



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การหาสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส
และต้านอนุมูลอิสระจากต้นมะดัน รวมถึงการศึกษาเชิงเภสัชศาสตร์
ของเอนไซม์และโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งของสารที่มีฤทธิ์

โดย อาจารย์ ดร.จิราพัชญ์ สีแจ่ม

เมษายน 2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การหาสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส
และต้านอนุมูลอิสระจากต้นมะดัน รวมถึงการศึกษาเชิงเภสัชศาสตร์
ของเอนไซม์และโมเลกุลลาร์ดิอกกิ่งของสารที่มีฤทธิ์

อาจารย์ ดร.จิราพัทธ์ สีแจ่ม

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ไม่จำเป็นต้องเป็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุนขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้สนับสนุนงบประมาณสำหรับดำเนิน โครงการการหาสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและต้านอนุมูลอิสระจากต้นมะดัน รวมถึงการศึกษาเชิงจุลนาศาสตร์ของเอนไซม์และโมเลกุลสารสกัดกึ่งของสารที่มีฤทธิ์ (MRG6180104) ในครั้งนี้เป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพโรตติรส อาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาจนโครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG6180104

ชื่อโครงการ: การหาสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและต้านอนุมูลอิสระจากต้นมะดัน รวมถึงการศึกษาเชิงจุลนาศาสตร์ของเอนไซม์และโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งของสารที่มีฤทธิ์

ชื่อนักวิจัย: ดร.จิราพัทธ์ สีแจ่ม สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

อีเมล: jirapast@tu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ: จากผลของการคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของมะดันเบื้องต้น พบว่าสารสกัดจากเอทานอลจากเปลือกต้นและกิ่งมะดันมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี โดยสามารถแยกสารใหม่ในกลุ่มไบฟลาโวนอยด์ที่มีชื่อว่า schomburgkixanthone (**1**) พร้อมด้วยสารที่มีรายงานมาแล้วอีก 21 ชนิด (**2-22**) จากเปลือกต้นและกิ่งมะดัน สำหรับโครงสร้างใหม่ของสาร **1** ได้พิสูจน์ทราบโดยใช้การวิเคราะห์ข้อมูลทาง NMR, IR, UV และ MS พร้อมกับการเปรียบเทียบกับรายงานก่อนหน้านี้ สาร **18** แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด (IC_{50} 49.64 ไมโครโมลาร์) และดีกว่าสารควบคุมเชิงบวก (วิตามินซี, IC_{50} 198.7 ไมโครโมลาร์) ส่วนสาร **1** แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ได้ดีที่สุด (IC_{50} 0.314 ไมโครโมลาร์) และดีกว่าสารควบคุมเชิงบวก (อะคาโบส, IC_{50} 114.3 ไมโครโมลาร์) ในทางกลับกันสาร **3** (IC_{50} 118.92 ไมโครโมลาร์) และ **4** (IC_{50} 135.36 ไมโครโมลาร์) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไส้หนู (ซูเครส) ได้ต่ำ จากการศึกษาเชิงจุลนาศาสตร์ของเอนไซม์ตามวิธีการของ Lineweaver-Burk plot พบว่าสาร **1** มีพฤติกรรมการยับยั้งเป็นตัวยับยั้งแบบผสม ส่วนการศึกษาเชิงจุลนาศาสตร์ของเอนไซม์และโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งของสาร **1** พบว่าหมู่ไฮดรอกซีฟีนอลิกบนวงแหวนฟีนิลที่ด็อกกิ่งเชื่อมโยงกับบริเวณที่รับโปรตีนในสาร **1** ซึ่งป้องกันการเข้าซ้อนของลำดับดีเอ็นเอ ทำให้สาร **1** สามารถเกิดการยับยั้งที่ดีกับเอนไซม์เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของมะดันสำหรับการใช้รักษาโรคเบาหวานในอนาคตได้ และสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ (สาร **1**) มีแนวโน้มที่จะใช้เป็นโมเลกุลที่สามารถบำบัดโรคเบาหวานได้

คำหลัก : มะดัน, schomburgkixanthone, ไบแซนโทน, สารต้านอนุมูลอิสระ, การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

Abstract

Project Code : MRG6180104

Project Title : Identification of potent α -glucosidase inhibitory and antioxidant constituents from *Garcinia schomburgkiana*, and the enzyme kinetic and molecular docking studies on active metabolites

Investigator : Dr. Jirapast Sichaem, Department of Chemistry Faculty of Science and Technology Thammasat University

E-mail Address : jirapast@tu.ac.th

Project Period : 2 years

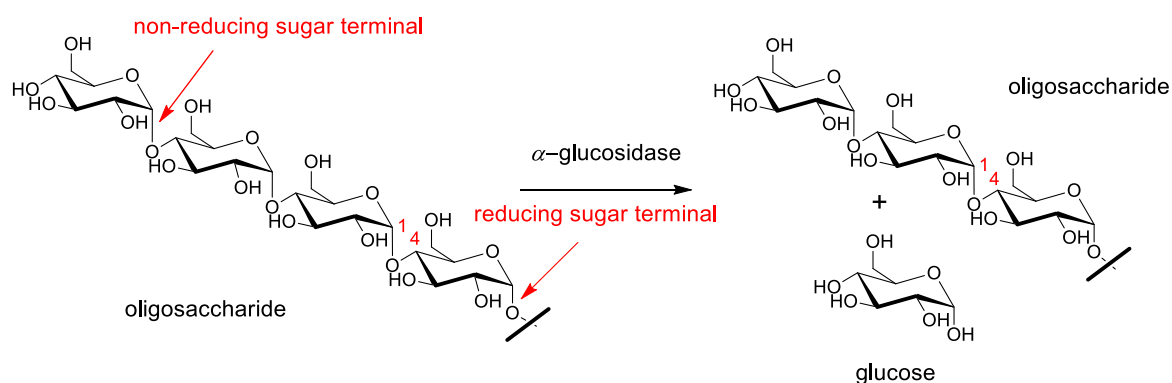
Abstract: Based on the results of primary screening of α -glucosidase inhibition of *Garcinia schomburgkiana* crude extracts, the ethanol crude extracts of stem bark and twigs showed significant α -glucosidase inhibition. A novel bixanthone, named schomburgkixanthone (**1**), along with 21 known compounds (**2-22**) were isolated from the stem bark and twigs of *G. schomburgkiana*. The novel structure of **1** was identified by the application of NMR, IR, UV and MS data analyses and comparison with previous reports. Compound **18** showed the highest antioxidant activity (IC_{50} 49.64 μ M) and stronger than the positive compound (vitamin C, IC_{50} 198.7 μ M). Compound **1** exhibited the most potential yeast α -glucosidase activity (IC_{50} 0.314 μ M), which was superior to the positive control (acarbose, IC_{50} 114.3 μ M). On the other hand, compounds **3** (IC_{50} 118.92 μ M) and **4** (IC_{50} 135.36 μ M) revealed low inhibitory activity against rat intestinal α -glucosidase (sucrase). The Lineweaver-Burk plots of a kinetic study indicated that **1** inhibited as a mixed mode inhibitor of α -glucosidase. The molecular docking results highlighted the role of the phenolic hydroxyl groups on the phenyl rings linked to active sites of receptors of protein in **1** that prevented the duplication of DNA sequences so that the compound **1** made an excellent inhibitor against the α -glucosidase enzyme. These results suggest the potential of *G. schomburgkiana* for future application in the treatment of diabetes and a novel active compound **1** has emerged as a promising molecule for therapy.

Keywords : *Garcinia schomburgkiana*, schomburgkixanthone, bixanthone, antioxidant, α -glucosidase inhibition

บทสรุปผู้บริหาร

ที่มาและความสำคัญของปัญหา-ทบทวนวรรณกรรม

การบำบัดโรคเบาหวานนั้นมีอยู่หลากหลายวิธีด้วยกัน แต่วิธีการรักษาที่เป็นที่ยอมรับและมีประสิทธิภาพกันมาก คือ การลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหาร เพราะเมื่ออาหารเข้าสู่ร่างกายแล้ว แป้งจะถูกเปลี่ยนเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็ก จากนั้นแอลฟาไกลูโคซิเดสจะทำหน้าที่ย่อยโอลิโกแซคคาไรด์หรือไดแซคคาไรด์บริเวณปลายที่เป็นนอนรีดิวซิงซูก้า (non-reducing sugar terminal) ให้เป็นกลูโคสที่ลำไส้เล็กก่อนที่จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด โดยกลไกการทำงานของแอลฟาไกลูโคซิเดสแสดงดังนี้



โดยแอลฟาไกลูโคซิเดส (EC 3.2.1.20) จัดเป็น glycoside hydrolase หรือตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการไฮโดรไลซิส (กระบวนการสลายตัวของสารโดยอาศัยน้ำ) ที่ตำแหน่ง α -1,4 ซึ่งมีความแตกต่างกับ β -glucosidase (EC 3.2.1.21) ที่จะทำปฏิกิริยาตรงพันธะ β -1,4 ซึ่งเป็นพันธะที่พบมากในเซลลูโลส ดังนั้นหากสามารถยับยั้งการทำงานของแอลฟาไกลูโคซิเดสได้ จะทำให้การย่อยโอลิโกแซคคาไรด์เป็นกลูโคสได้ช้าลงและชะลอการเพิ่มของระดับน้ำตาลในเลือด นอกจากนี้สารยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสยังช่วยเพิ่มระดับอินซูลิน ลดไตรกลีเซอไรด์ และสามารถต้านการติดเชื้อจากไวรัสโรคเมะเร็ง และเชื้อ HIV รวมถึงช่วยต้านโรคที่เกิดกับไลโซโซมได้อีกด้วย

สำหรับยารักษาโรคเบาหวานที่ใช้ในปัจจุบันจะเป็นยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของแอลฟาไกลูโคซิเดส เช่น acarbose, voglibose และ miglitol ซึ่งได้มีการใช้ในการรักษาโรคเบาหวานกันอย่างแพร่หลาย แต่ยาในกลุ่มดังกล่าวยังมีผลข้างเคียงคือ ท้องอืด ท้องเฟ้อ และท้องร่วง ส่งผลให้ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกหันมาสนใจในการค้นหายาที่มีศักยภาพในการบำบัดรักษาโรคเบาหวานชนิดใหม่ อยู่ตลอดเวลา

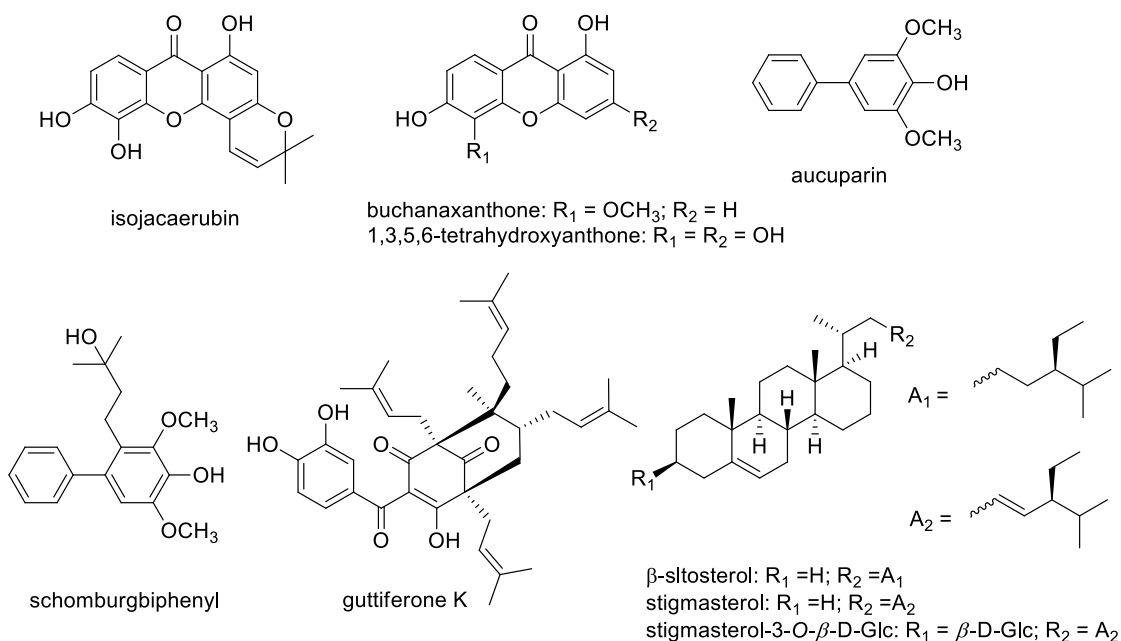
จากการศึกษารายงานวิจัยหลาย ๆ ฉบับ ที่ผ่านมามีพบว่า สมุนไพรหลายชนิดมีศักยภาพในการรักษาโรคเบาหวานได้เทียบเท่าหรือดีกว่ายาแผนปัจจุบัน ตัวอย่างสารเคมีสำคัญที่พบในสมุนไพรเหล่านั้น เช่น 1-deoxynojirimycin ซึ่งแยกได้จากพืชในวงศ์ Moraceae หรือสารในกลุ่ม thiosugar ได้แก่ salacinol และ kotalanol ซึ่งแยกได้จากพืช *Salacia reticulata* โดย salacinol มีรายงานการศึกษาว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลโคซิเดสได้ดีกว่า acarbose ซึ่งใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวาน

มะดันมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia schomburgkiana* Pierre จัดอยู่ในวงศ์มังคุด (Guttiferae) ลักษณะโดยทั่วไปของมะดัน คือ เป็นไม้ยืนต้น ไม่ผลัดใบ สูงประมาณ 7-10 เมตร แตกกิ่งก้านออกเป็นพุ่ม ลักษณะของเปลือกต้นและกิ่งจะเรียบและมีสีน้ำตาลอมดำ ใบเป็นใบเดี่ยว สีเขียวเข้ม รูปขอบขนาน ขอบใบเรียบออกเรียงสลับกัน โคนใบและปลายใบแหลม แผ่นใบเรียบลื่น ส่วนดอกมีลักษณะเป็นดอกเดี่ยวหรือกระจุกประมาณ 3-6 ดอก โดยจะออกตามซอกใบ ดอกมีสีเหลืองอมส้ม ลักษณะของผลจะคล้ายรูปรีปลายแหลมสีเขียว ผิวเรียบเป็นมันลื่น และมีรสเปรี้ยว ด้านในผลมีเมล็ดประมาณ 3-4 เมล็ด ดังแสดง



จากข้อมูลปัญหาการใช้สมุนไพรพื้นบ้านมีรายงานว่ามันดันมีสรรพคุณมากมาย เช่น แก้ไข้หวัด แก้ไข้ทับระดู ขับฟอกโลหิต ขับเสมหะในลำคอ แก้กะษัย แก้กะดูเสีย เป็นยาระบายอ่อน ๆ และแก้เบาหวานได้

จากการศึกษาทางพฤกษเคมีของมะดันก่อนหน้านี้ได้มีรายงานการค้นพบแซนโทน ไบโอฟลาโวนอยด์ ไบฟิโนลิล อนุพันธ์เบนโซฟีโนล คิวโนน และเตียรอยด์ เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างเช่น



จากการสืบค้นรายงานวิจัยหลายฉบับ พบว่ายังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการระบุองค์ประกอบทางเคมีที่ออกฤทธิ์จากมะดันเกี่ยวกับคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสมาก่อน ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพร้อมกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากมะดัน นอกจากนี้ยังรวมถึงการศึกษาเชิงจุลนาศาสตร์ของเอนไซม์และโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งของสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเพื่อจะได้เข้าใจถึงโหมดการออกฤทธิ์ระหว่างสารออกฤทธิ์กับเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสอย่างแท้จริง

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและหาสารที่มีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและต้านอนุมูลอิสระจากมะดัน รวมถึงการศึกษาเชิงจุลนาศาสตร์ของเอนไซม์และโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งของสารที่มีฤทธิ์

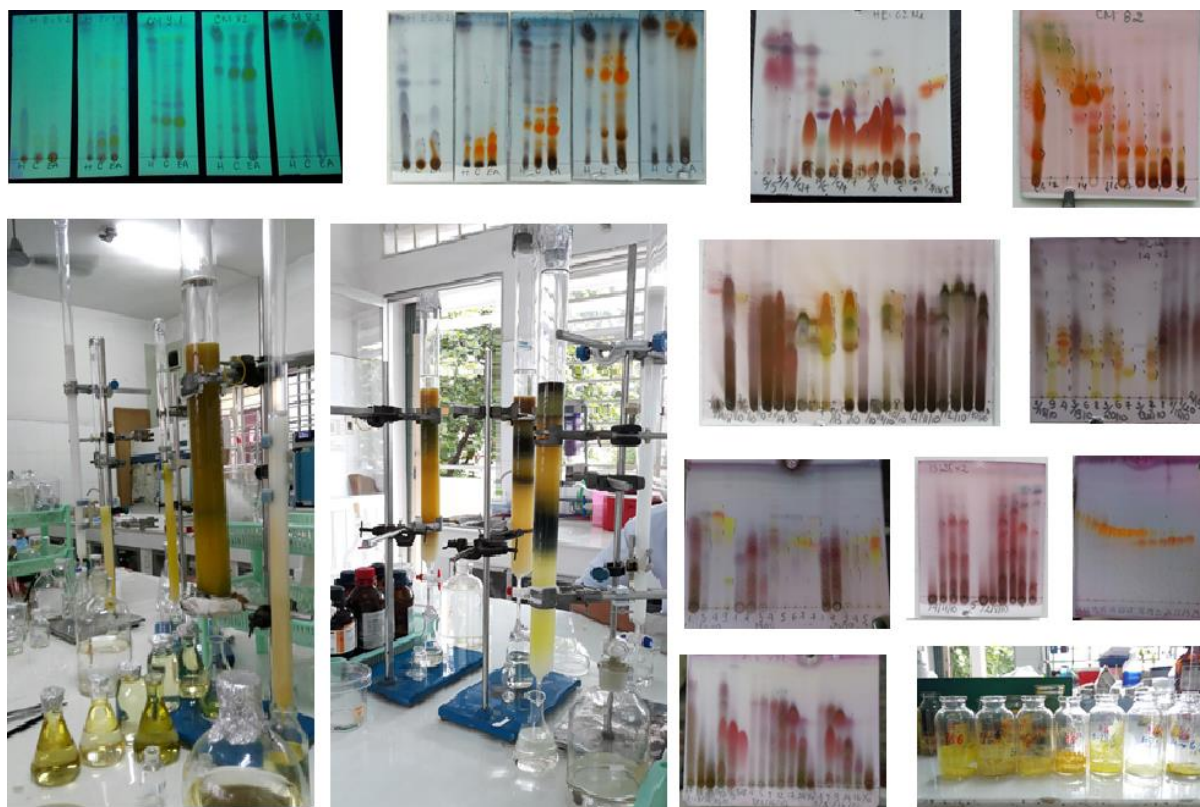
วิธีทดลอง

การเตรียมสารสกัดหยาบจากเปลือกต้นและกิ่งมะดัน

นำผงตัวอย่างที่บดละเอียดของเปลือกต้นและกิ่งมะดัน อย่างละประมาณ 20 กิโลกรัม มาสกัดสารสำคัญด้วยตัวทำละลายเอทานอล หลังจากนั้นระเหยตัวทำละลายเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) จะได้สารสกัดหยาบเอทานอลออกมา

การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดหยาบเอทานอลที่ได้มาแยกสารบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีที่เหมาะสม เช่น โครมาโทกราฟีแบบผิวนาง (TLC), คอลัมน์โครมาโทกราฟี (column chromatography) หรือเทคนิคอื่นๆ ดังแสดง



การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้

หลังจากแยกสารบริสุทธิ์ได้แล้วจะทำการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี เช่น นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR), แมสสเปกโตรเมทรี (Mass spectrometry, MS) และอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี (Infrared spectroscopy, IR) เป็นต้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) เบื้องต้น ด้วยวิธี TLC

1. เตรียมสารละลาย 0.2% DPPH ในเมทานอล
2. จุดสารตัวอย่างและสารมาตรฐาน (ascorbic acid) บนแผ่น TLC จากนั้นจุ่มแผ่น TLC ลงในภาชนะที่อ้อมไปด้วยตัวทำละลาย เพื่อชะให้สารเคลื่อนที่ไปตามแผ่น TLC จนกระทั่งตัวทำละลายเคลื่อนที่มาถึงเส้นที่กำหนดไว้ แล้วยกออก
3. พ่นแผ่น TLC ด้วย 0.2% DPPH ในเมทานอล จนเป็นสีม่วงทั่วแผ่น
4. สังเกตจุดสีเหลืองที่ปรากฏขึ้นและหาสารไหนปรากฏจุดสีเหลือง แสดงว่าสารนั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ด้วยวิธี spectrophotometry assay

หลังจากที่ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นแล้ว ให้นำสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นมาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี spectrophotometry assay เพื่อหาค่า % radical scavenging และ IC_{50} มีวิธีการทดลองดังนี้

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐาน (ascorbic acid) ให้มีความเข้มข้น 10 ความเข้มข้น ได้แก่ 0 , 3.91×10^{-3} , 7.81×10^{-3} , 1.56×10^{-2} , 3.13×10^{-2} , 0.0625 และ 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
2. เตรียมสารละลาย 0.3 mM DPPH ในเมทานอล โดยชั่งสาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) ประมาณ 5.92 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 50 มิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นละ 50 μ L ลงในช่องของ microplate ความเข้มข้นละ 3 ช่อง
4. เติมสารละลาย 0.3 mM DPPH ในเมทานอล ลงไป 200 μ L
5. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30 นาที
6. นำ 96 well plate ไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 517 นาโนเมตร
7. คำนวณ % radical scavenging จากสมการ

$$\% \text{ radical scavenging} = (1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}})) \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่า absorbance ที่วัดได้ของสารละลายที่ผสม DPPH แล้ว

A_{control} = ค่า absorbance ที่วัดได้ของตัวทำละลายที่ใช้ผสมกับ DPPH

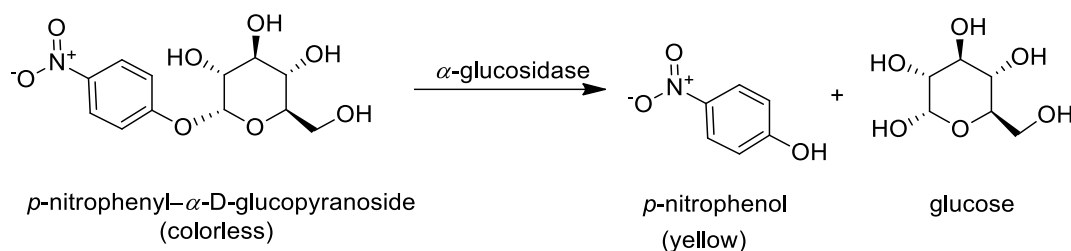
ในการรายงานค่าจะรายงานค่าเป็น IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration) ซึ่งได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % radical scavenging กับความเข้มข้น ซึ่งความเข้มข้น

ที่ 50% radical scavenging จะมีค่าเป็น IC_{50} (IC_{50} คือ ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งสีอันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ DPPH ให้จางลง 50%) โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel 2016

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์

เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.1 1 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO) จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.9 จำนวน 90 ไมโครลิตร ตามด้วยสารละลายเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ ความเข้มข้น 0.1 ยูนิต หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมสารละลาย *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (*p*NPG) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 37°C เป็นเวลา 20 นาที โดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ *p*NPG โดยเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจาก baker's yeast เกิดขึ้นดังนี้



จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม Na_2CO_3 เข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้อะคาโบส (acarbose) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ ดังสมการ

$$\text{โดย } \% \text{ inhibition} = (1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}})) \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่า absorbance ที่วัดได้โดยมีสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบผสม

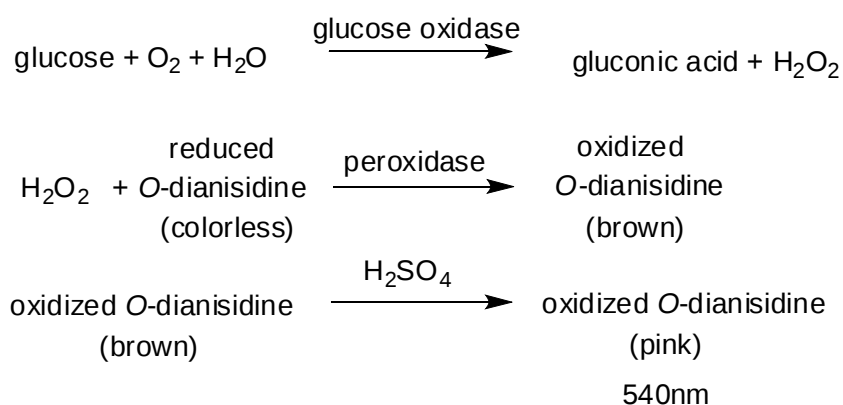
A_{control} = ค่า absorbance ที่วัดได้โดยไม่มีสารละลายตัวอย่างที่จะทดสอบผสม

ในการรายงานค่าจะรายงานค่าเป็น IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration) ซึ่งได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้น ซึ่งความเข้มข้นที่ 50% inhibition จะมีค่าเป็น IC_{50} โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel 2016

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสในลำไส้หนู

เตรียมจากเอนไซม์อย่างหยาบ (Rat intestinal acetone power Sigma-Aldrich. (St. Louis, MO, USA)) ซึ่งประกอบด้วยมอลเตส (maltase) และซูโครส (sucrase) ที่มีค่าความจำเพาะเท่ากับ 0.09 และ 0.45 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ โดยชั่งเอนไซม์อย่างหยาบจำนวน 1 กรัม เติม 0.9% NaCl จำนวน 30 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายส่วนบนเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

เตรียมสารตัวอย่างที่ความเข้มข้น (0.1 1 และ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ละลายใน DMSO) จำนวน 10 ไมโครลิตร เติมสารละลายเอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที เติมซับสเตรต โดยใช้มอลโตส ความเข้มข้น 0.58 มิลลิโมลาร์ และ ซูโครส ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 6.9 จำนวน 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 15 นาที วัดความเข้มข้นของ กลูโคส โดยการทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส โดยใช้ glu-kit (Sigma-Aldrich) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์กับ glu-kit แสดง ดังนี้



วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้อะคาโบสเป็นตัวควบคุมเชิงบวก คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์และค่า IC_{50} ของการยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กหนูโดยใช้สูตรดังที่กล่าวมาแล้วในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์

ผลการทดลอง

การคัดกรองสารสกัดหยาบมะดันเบื้องต้น

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบเอทานอลจากเปลือกต้นและกิ่งมะดันมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสอยู่ในระดับที่ดี (>75%) รองลงมาคือ ใบ และราก ตามลำดับ ดังแสดง

ส่วน	% ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์	
	สารสกัดเอทานอล	สารสกัดน้ำ
เปลือกต้น (SB)	80.5	14.2
กิ่ง (TW)	77.2	25.6
ราก (RT)	47.9	20.4
ใบ (LV)	48.8	46.8

จากผลการคัดกรองเบื้องต้น สารสกัดหยาบเอทานอลจากเปลือกต้นและกิ่งมะดันได้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) เบื้องต้นต่อ โดยใช้วิธีแบบ TLC พบว่าสารสกัดหยาบดังกล่าวแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH) ได้ดี

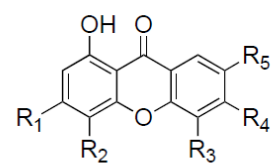
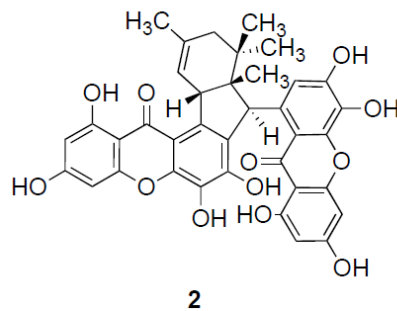
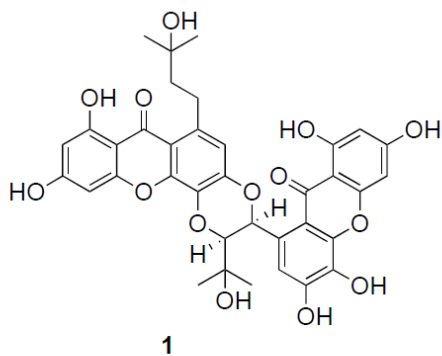
การแยกองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นและกิ่งมะดัน

เปลือกต้นและกิ่งมะดันมะดันแห้ง (อย่างละ 10 กิโลกรัม) ถูกบดให้เป็นผงและสกัดที่อุณหภูมิห้องด้วย 95% (v/v) เอทานอล (4 × 35 L) สารละลายที่ผ่านการกรองนั้นถูกระเหยออกภายใต้สุญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (evaporator) ได้สารสกัดหยาบเอทานอลออกมา 1.02 กิโลกรัม สารสกัดหยาบนี้ถูกนำมาพาร์ติชัน (partition) ด้วยน้ำ เฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ตามลำดับ ได้สารสกัดเฮกเซน (96.0 กรัม), สารสกัดเอทิลอะซิเตท (560.2 กรัม) และสารละลายน้ำที่เหลือ สารสกัดเอทิลอะซิเตทถูกนำมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วยเฮกเซน:เอทิลอะซิเตท (90:10-0:10) และตามด้วยเอทิลอะซิเตท:เมทานอล (10:0-0:10) แยกได้ออกมา 19 แฟรกชัน คือ EA.1-EA.19 แฟรกชัน EA.5 (1.6 กรัม) ถูกแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ จากนั้นชะด้วยเฮกเซน:เอทิลอะซิเตท (8:2) แยกได้ออกมา 5 แฟรกชันย่อย คือ EA.5.1-EA.5.5 แฟรกชันย่อย EA.5.2 (0.6 กรัม) ถูกทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ Sephadex LH-20 (100 กรัม) เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1) ได้สาร 5,5'-[oxybis(methylene)]di(2-furaldehyde) (**12**, 10.5 มิลลิกรัม) แฟรกชันย่อย EA.5.3 (0.8 กรัม) ถูกทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ Sephadex LH-20 (100 กรัม) เป็นตัวดูดซับ ชะด้วย

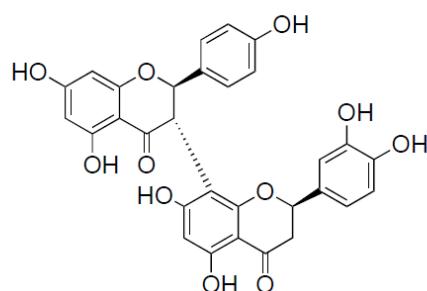
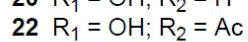
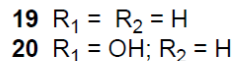
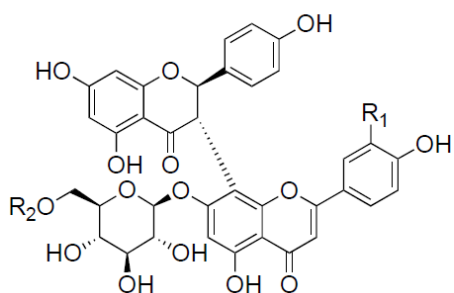
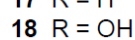
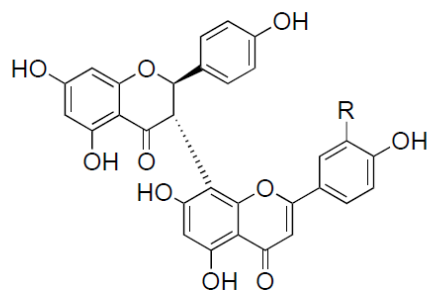
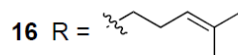
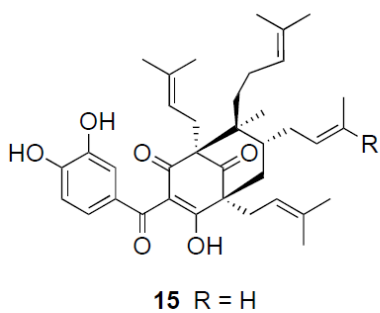
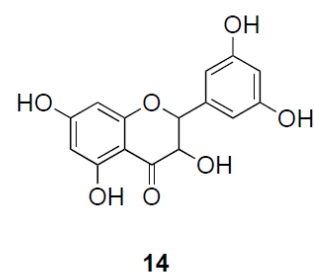
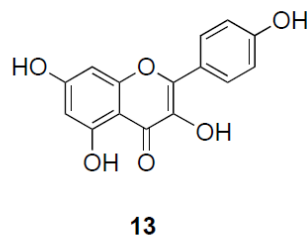
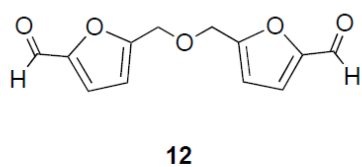
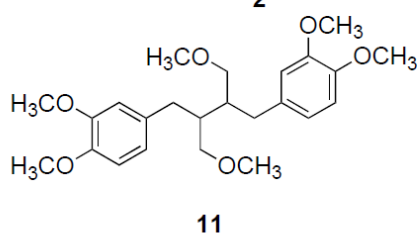
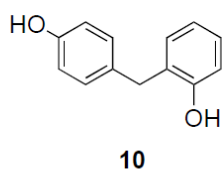
ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1) ตามด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ RP-C18 เป็นตัวดูดซับ และชะด้วยน้ำ:เมทานอล (60:10) ได้สาร phyllanthin (**11**, 14.5 มิลลิกรัม) แพรกชัน EA.6 (2.0 กรัม) ถูกนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วยเฮกเซน:เอทิลอะซิเตท (8:2) จะได้แพรกชันย่อย EA.6.1-EA.6.6 แพรกชันย่อย 6.2 (0.3 กรัม) ถูกแยกให้บริสุทธิ์ต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ Sephadex LH-20 (100 กรัม) เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1) ได้สาร 2,4'-dihydroxydiphenylmethane (**10**, 4.5 มิลลิกรัม) และ kaempferol (**13**, 6.4 มิลลิกรัม) แพรกชันย่อย EA.6.3 (0.8 กรัม) ถูกนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วยเฮกเซน:เอทิลอะซิเตท (8:2) จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ Sephadex LH-20 (100 กรัม) เป็นตัวดูดซับ (ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1) ได้สาร 1,3,7-trihydroxyxanthone (**3**, 21.5 มิลลิกรัม) และ 1,5,6-trihydroxyxanthone (**4**, 10.0 มิลลิกรัม) แพรกชัน EA.7 (3.7 กรัม) ถูกนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วยเฮกเซน:เอทิลอะซิเตท (2:1) จะได้แพรกชันย่อย EA.7.1-EA.7.6 แพรกชันย่อย 7.2 (0.5 กรัม) ถูกทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ Sephadex LH-20 (100 กรัม) เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1) ได้สาร griffipavixanthone (**2**, 11.5 มิลลิกรัม) 1,3,5,6-tetrahydroxyxanthone (**5**, 12.4 มิลลิกรัม) และ 1,6-dihydroxyxanthone (**6**, 3.5) มิลลิกรัม) แพรกชันย่อย EA.7.3 (0.8 กรัม) ถูกนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วยเฮกเซน:เอทิลอะซิเตท (1:1) และทำให้บริสุทธิ์ถูกทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ Sephadex LH-20 (100 กรัม) เป็นตัวดูดซับ ชะด้วยไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1) ได้สาร 1,3,5-trihydroxyxanthone (**7**, 25.0 มิลลิกรัม) และ 1,3,6-trihydroxyxanthone (**8**, 20.0 มิลลิกรัม) แพรกชัน EA.9 (10.5 มิลลิกรัม) ถูกนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วย 80%เฮกเซน:เอทิลอะซิเตท ได้สาร 1,6,7- schomburgkixanthone (**1**, 20.3 มิลลิกรัม), trihydroxyxanthone (**9**, 2.0 มิลลิกรัม) และ oblongifolin C (**16**, 1.2 มิลลิกรัม) แพรกชัน EA.11 (45.0 กรัม) ถูกนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ Sephadex LH-20 (250 กรัม) เป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วย 50% ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล ได้แพรกชันย่อย EA.11.1-EA.11.4 นำแพรกชันย่อย EA.11.1 (60.0 มิลลิกรัม) มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วย 70%เฮกเซน:เอทิลอะซิเตท ได้สาร 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanonol (**14**, 1.7 มิลลิกรัม) และ guttiferone K (**15**, 1.4 มิลลิกรัม) ส่วนแพรกชันย่อย EA.11.3 (55.3 มิลลิกรัม) ถูกนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วยเฮกเซน:เอทิลอะซิเตท:เมทานอล (3:2:0.5) ได้สาร volkensiflavone (**17**, 52.3 มิลลิกรัม และ morelloflavone (**18**, 950

มิลลิกรัม) แพรกชั้น EA.13 (25.5 มิลลิกรัม) ถูกนำมาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ Sephadex LH-20 (250 กรัม) เป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วย 50% ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล ได้สาร morelloflavone-7-*O*-glucopyranoside (**20**, 2.1 มิลลิกรัม) และ fukugetin (**21**, 1.9 มิลลิกรัม) แพรกชั้น EA.15 (35 กรัม) มาแยกต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์โดยใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วย เมทานอล:เอทิลอะซิเตท (0-100%) จะได้แฟรชันย่อย EA.15.1-EA.15.3 สำหรับสาร volkensiflavone-7-*O*-glucopyranoside (**19**, 13.5 มิลลิกรัม) และ (2*S*,3*S*)-morelloflavone-7-*O*- β -acetylglucopyranoside (**22**, 10.8 มิลลิกรัม) แยกได้จากแฟรชันย่อย EA.15.2 (3 กรัม) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ โดยใช้ Sephadex LH-20 (250 กรัม) เป็นตัวดูดซับแล้วชะด้วย ไดคลอโรมีเทน:เมทานอล (1:1)

โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้งหมด (สาร **1-22**) ที่แยกได้สามารถพิสูจน์ทราบด้วยเทคนิค สเปกโทรสโกปีและเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับข้อมูลที่มีรายงานแล้วมาก่อนหน้านี้ โดยมีโครงสร้างดังนี้



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
3	OH	H	H	H	OH
4	H	H	OH	OH	H
5	OH	H	OH	OH	H
6	H	H	H	OH	H
7	OH	H	OH	H	H
8	OH	H	H	OH	H
9	H	H	H	OH	OH



การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

สำหรับผลของการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและต้านอนุมูลอิสระ (ไมโครโมลาร์; μM) ของสารที่แยกได้ แสดงดังนี้

สาร	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (μM)			ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
	ยีสต์	มอลเตส	ซูเครส	DPPH (μM)
1	0.314	>500	>500	NT
2	11.84	>500	>500	>300
3	>500	>500	>500	>300
4	92.54	>500	>500	NT
5	97.80	>500	>500	216.1
6	>500	>500	>500	>300
7	>500	>500	>500	>300
8	>500	>500	>500	>300
9	73.74	>500	>500	187.7
10	>500	>500	>500	>300
11	>500	>500	>500	>300
13	NA	>500	118.9	185.3
14	62.97	>500	135.3	50.00
15	12.14	>500	>500	87.38
16	10.61	>500	>500	NT
17	28.94	>500	>500	>300
18	25.60	>500	>500	49.64
19	14.37	>500	>500	NT
20	NT	>500	>500	NT
21	>500	>500	>500	NT
22	NT	>500	>500	NT
อะคาร์โบส	114.3	33.89	4.55	NT
วิตามินซี	NT	NT	NT	198.73

NT = ไม่ได้ทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แสดงให้เห็นว่าสาร **18** (IC_{50} 49.64 ไมโครโมลาร์) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดตามด้วยสาร **14** (IC_{50} 50.00 ไมโครโมลาร์), **15** (IC_{50} 87.38 ไมโครโมลาร์), **13** (IC_{50} 185.3 ไมโครโมลาร์) และ **9** (IC_{50} 187.7 ไมโครโมลาร์) ตามลำดับ โดยพบว่าสาร **9**, **14**, **15** และ **18** นั้น ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารควบคุมเชิงบวก (วิตามินซี) ในทางตรงกันข้ามสารชนิดอื่นที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 300 ไมโครโมลาร์ ถือว่าไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

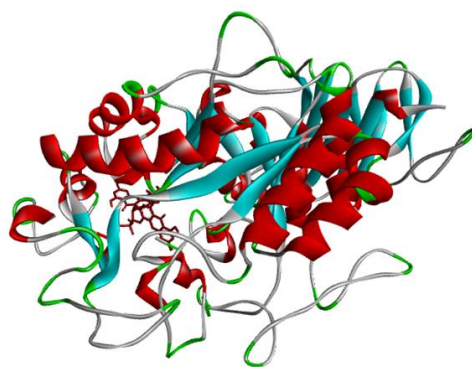
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและการศึกษาเชิงจลนศาสตร์ของเอนไซม์

สาร **1-11**, **13-19** และ **21** ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์และลำไ้หนู พบว่าสาร **1** และ **2** แสดงฤทธิ์ของยีสต์เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.314 และ 11.84 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งดีกว่าสารควบคุมเชิงบวก (อะคาร์โบส) (IC_{50} 114.3 ไมโครโมลาร์) ส่วนสาร **3** และ **4** แสดงการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไ้หนู (ซูเครส) ได้ต่ำ ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 118.9 และ 135.3 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

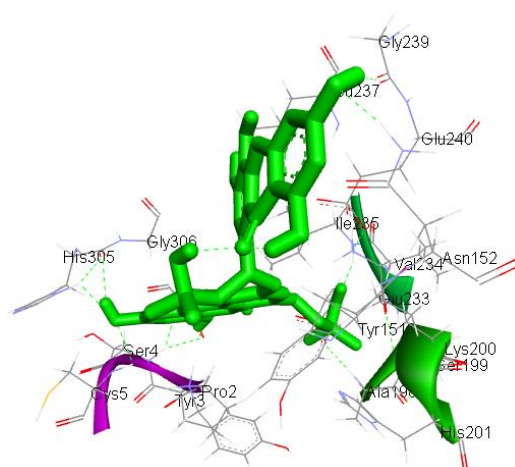
เนื่องจากสาร **1** มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ดีที่สุดจึงได้มีการศึกษาเชิงจลนศาสตร์ของเอนไซม์ของสารดังกล่าวตามวิธีการของ Lineweaver-Burk plot พบว่าสาร **1** มีพฤติกรรมการยับยั้งเป็นตัวยับยั้งแบบผสม (mixed inhibitor) โดยตัวยับยั้งชนิดนี้จะเข้าไปจับที่บริเวณอื่นบนโมเลกุลของเอนไซม์ที่ไม่ใช่บริเวณเร่งแต่ทำให้บริเวณเร่งเปลี่ยนไปจึงทำงานไม่ได้

การศึกษาเชิงโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่ง

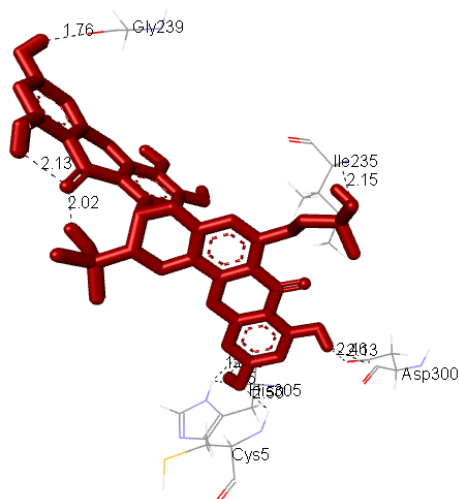
จากผลการทดลองพบว่าสาร **1** มีความสามารถในการการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ได้ดีที่สุด จึงได้มีการศึกษาเชิงโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งของสาร **1** ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากผลการทดลอง พบว่าโครงสร้างส่วนใหญ่ (สาร **1**) ด็อกกิ่งกับตัวรับ (5KEZ: PDB) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสซึ่งเป็นตัวยับยั้งไฮโดรเลสหลังจากจัดวางเสร็จแล้ว ค่าของการจับพลังงานอิสระและค่าคงที่การยับยั้งคือ -8.86 กิโลแคลอรีต่อโมล และ 0.323 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ดังแสดง



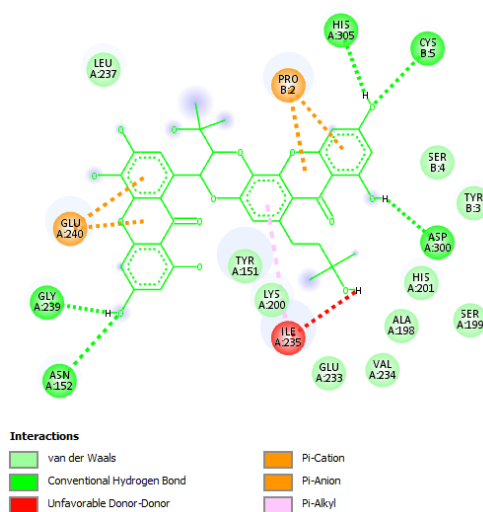
ส่วนกรดอะมิโนส่วนที่เหลือของตัวรับ 5KEZ รอบแกนตั้งซึ่งก่อให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับบริเวณของแกนตั้ง (สาร 1) แสดงดังนี้



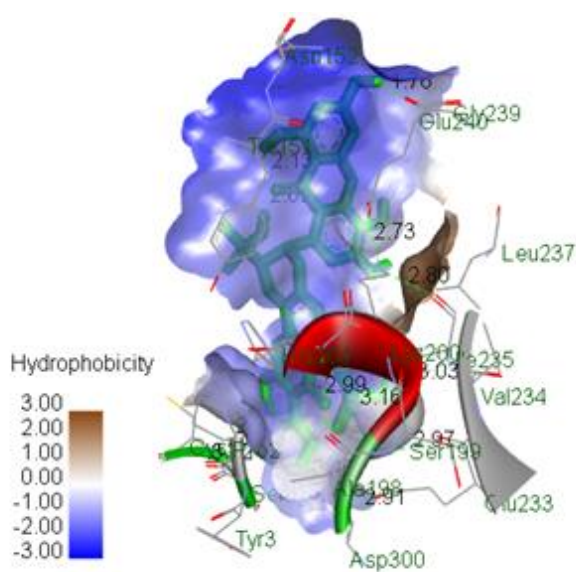
พันธะไฮโดรเจนเกิดจากส่วนที่เหลือของกรดอะมิโนของตัวรับ (สาร 1) กับแกนตั้งที่เสถียรที่สุดแสดงดังนี้



สำหรับปฏิกริยาระหว่างกรดอะมิโนของตัวรับและลิแกนด์ (สาร 1) ถูกนำเสนอบนแผนภาพ 2 มิติ แสดงดังนี้



บริเวณของโครงสร้างที่เสถียรที่สุดของสาร 1 และความสามารถในการเป็นไฮโดรโฟบิซิตีหรือภาวะที่มีความชอบน้ำต่ำของโครงสร้าง แสดงดังนี้



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาองค์ประกอบของสิ่งสกัดหยาบเอทานอลจากเปลือกต้นและกิ่งมะดัน (20 กิโลกรัม) ซึ่งเป็นสารสกัดที่มีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดี พบว่าสามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 22 ชนิด โดยเป็นสารใหม่ในกลุ่มไบฟลาโวนอยด์ 1 ชนิด คือ สาร schomburgkixanthone (1) พร้อมด้วยสารที่ได้มีการรายงานแล้วอีก 21 ชนิด ได้แก่ สาร griffipavixanthone (2), 1,3,7-trihydroxyxanthone (3), 1,5,6-trihydroxyxanthone (4), 1,3,5,6-tetra hydroxyxanthone (5), 1,6-dihydroxyxanthone (6), 1,3,5-trihydroxyxanthone (7), 1,3,6-trihydroxyxanthone (8), 1,6,7-trihydroxyxanthone (9), 2,4'-dihydroxydiphenylmethane (10), phyllanthin (11), 5,5'-[oxybis(methylene)]di(2-furaldehyde) (12), kaempferol (13), 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanonol (14), guttiferone K (15), oblongifolin C (16), volkensiflavone (17), morelloflavone (18), volkensi flavone-7-O-glucopyranoside (19), morelloflavone-7-O-glucopyranoside (20), fukugetin (21) และ (2S,3S)-morelloflavone-7-O- β -acetylglucopyranoside (22) โดยโครงสร้างของสารทั้งหมดที่แยกได้สามารถพิสูจน์ทราบด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีและเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้กับข้อมูลที่มีรายงานแล้วมาก่อนหน้านี้

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แสดงให้เห็นว่าสาร 18 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 49.64 ไมโครโมลาร์ ตามด้วยสาร 14, 15, 13 และ 9 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 50.00, 87.38, 185.3 และ 187.7 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งสารดังกล่าวแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารควบคุมเชิงบวก (วิตามินซี)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์และลำไส้หนู พบว่าสาร 1 และ 2 แสดงฤทธิ์ของยีสต์เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.314 และ 11.84 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งดีกว่าสารควบคุมเชิงบวก (อะคาร์โบส) ส่วนสาร 3 และ 4 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากลำไส้หนู (ซูเครส) ได้ต่ำ ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 118.9 และ 135.3 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และจากการศึกษาเชิงจลนศาสตร์ของเอนไซม์ของสาร 1 ตามวิธีการของ Lineweaver-Burk plot พบว่าสาร 1 มีพฤติกรรมการยับยั้งเป็นตัวยับยั้งแบบผสม

ในแบบจำลองโมเลกุลลาร์ด็อกกิ่งโครงสร้างของสาร 1 พบว่ามีการยับยั้งที่แข็งแกร่งต่อเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากยีสต์มากกว่าสารควบคุมเชิงบวก (อะคาร์โบส) โดยหมู่ฟังก์ชันของไฮดรอกซีฟีนอลิกของสาร 1 บนวงแหวนอะโรมาติกที่ C-1, C-3 และ C-3' เป็นบริเวณที่ลิแกนด์ซึ่งเกิดพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนที่เหลือของตัวรับ หมู่ไฮดรอกซีฟีนอลิกบนวงแหวนฟีนิลที่ด็อกกิ่งเชื่อมโยงกับบริเวณที่รับโปรตีนในสาร 1 ซึ่งป้องกันการเข้าซ้อนของลำดับดีเอ็นเอ ทำให้สาร 1 สามารถเกิดการยับยั้ง

ที่ดีกับเอนไซม์เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของมะดันสำหรับการใช้รักษาโรคเบาหวานในอนาคตได้ และสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ (สาร 1) ยังมีแนวโน้มที่จะใช้เป็นโมเลกุลที่สามารถบำบัดโรคเบาหวานได้

ข้อเสนอแนะ

สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเปลือกต้นและกิ่งมะดันในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) เพียงเท่านั้น ผู้วิจัยเสนอว่าควรจะมีการศึกษาในเชิงลึกในระดับสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ต่อไปในอนาคต หรือการนำสาร morelloflavone (18) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่สามารถแยกได้ในปริมาณมากมาทำการสังเคราะห์หรือเตรียมอนุพันธ์ (derivatization) ชนิดใหม่ เพื่อให้ได้สารที่มีความหลากหลายทางโครงสร้างและมีฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับที่ดีขึ้น

ผลงานวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

- Thi My Lien Do, Thuc-Huy Duong, Van-Kieu Nguyen, Preecha Phuwapraisirisan, Titiruetai Doungwichitkul, Nakorn Niamnont, Suekanya Jarupinthusophon & Jirapast Sichaem (2020): Schomburgkixanthone, a novel bixanthone from the twigs of *Garcinia schomburgkiana*, Natural Product Research, DOI: 10.1080/14786419.2020.1716351

- Jirapast Sichaem, Thi My Lien Do, Thuc-Huy Duong & Preecha Phuwapraisirisan (2020): Highly potent α -glucosidase inhibitory and antioxidant constituents from *Garcinia schomburgkiana*: enzyme kinetic and molecular docking studies (in preparation).

ภาคผนวก

Mass Spectrum List Report

Analysis Info

Analysis Name OSCUKVN291002019002.d
Method Tune_wide_POS_Tawatchai_05Feb2016.m
Sample Name GA46
GA46

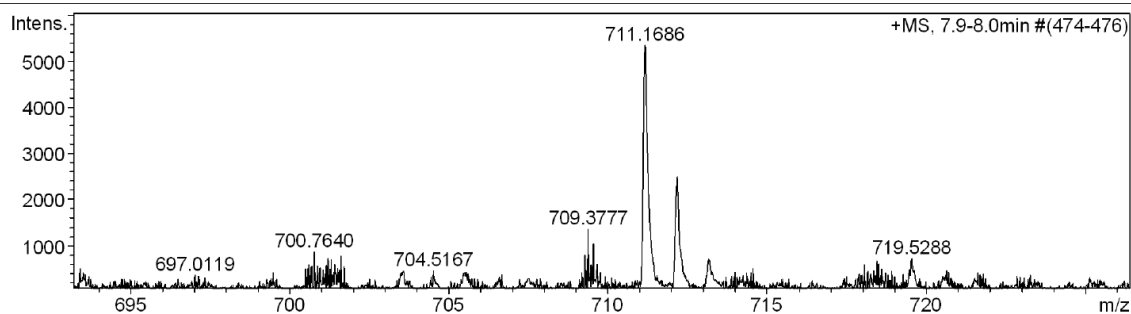
Acquisition Date 10/29/2019 2:21:46 PM
Operator Administrator
Instrument micrOTOF 72

Acquisition Parameter

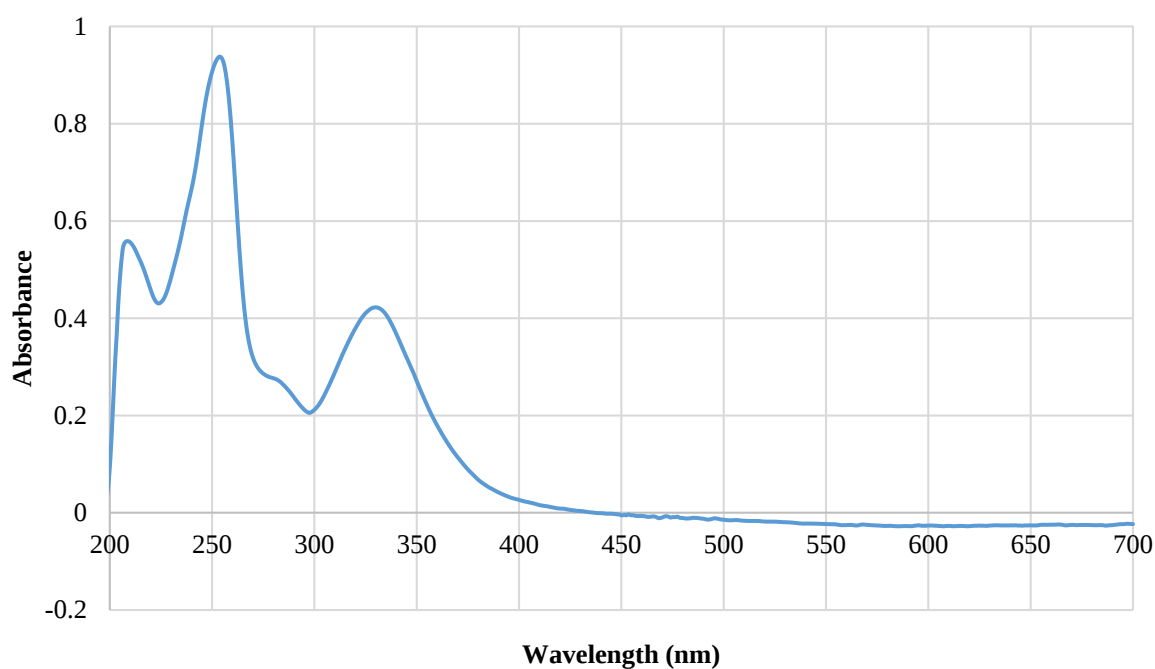
Source Type ESI
Scan Range n/a
Scan Begin 50 m/z
Scan End 3000 m/z

Ion Polarity Positive
Capillary Exit 250.0 V
Hexapole RF 400.0 V
Skimmer 1 70.0 V
Hexapole 1 25.0 V

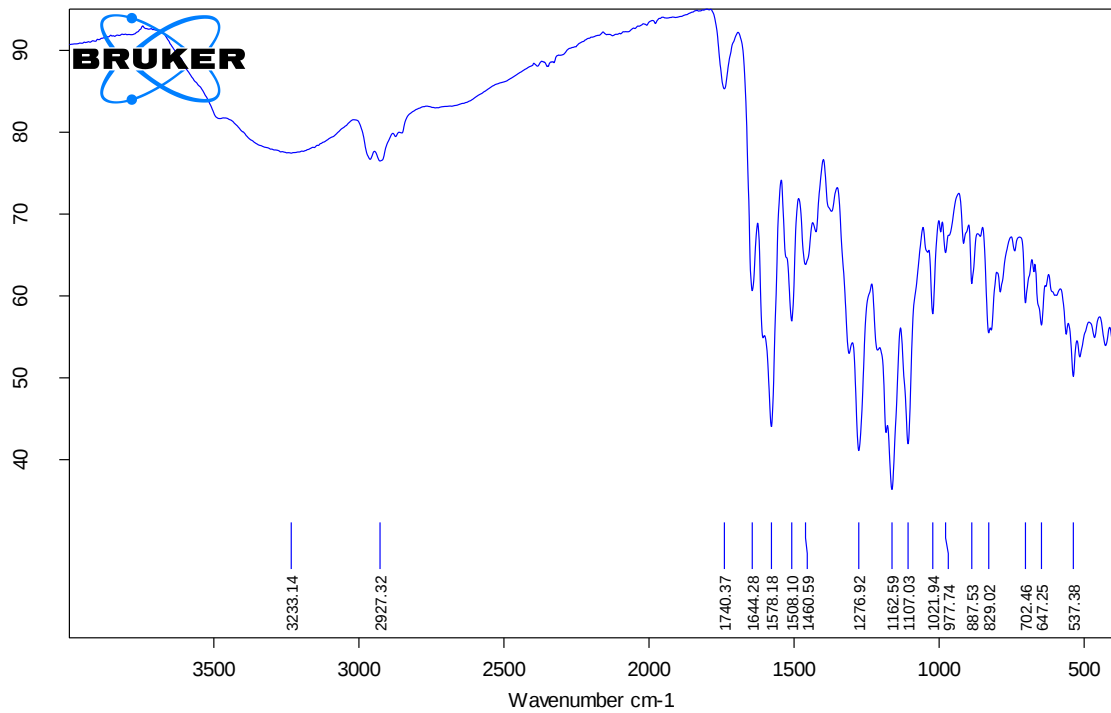
Set Corrector Fill 50 V
Set Pulsar Pull 337 V
Set Pulsar Push 337 V
Set Reflector 1300 V
Set Flight Tube 9000 V
Set Detector TOF 2295 V



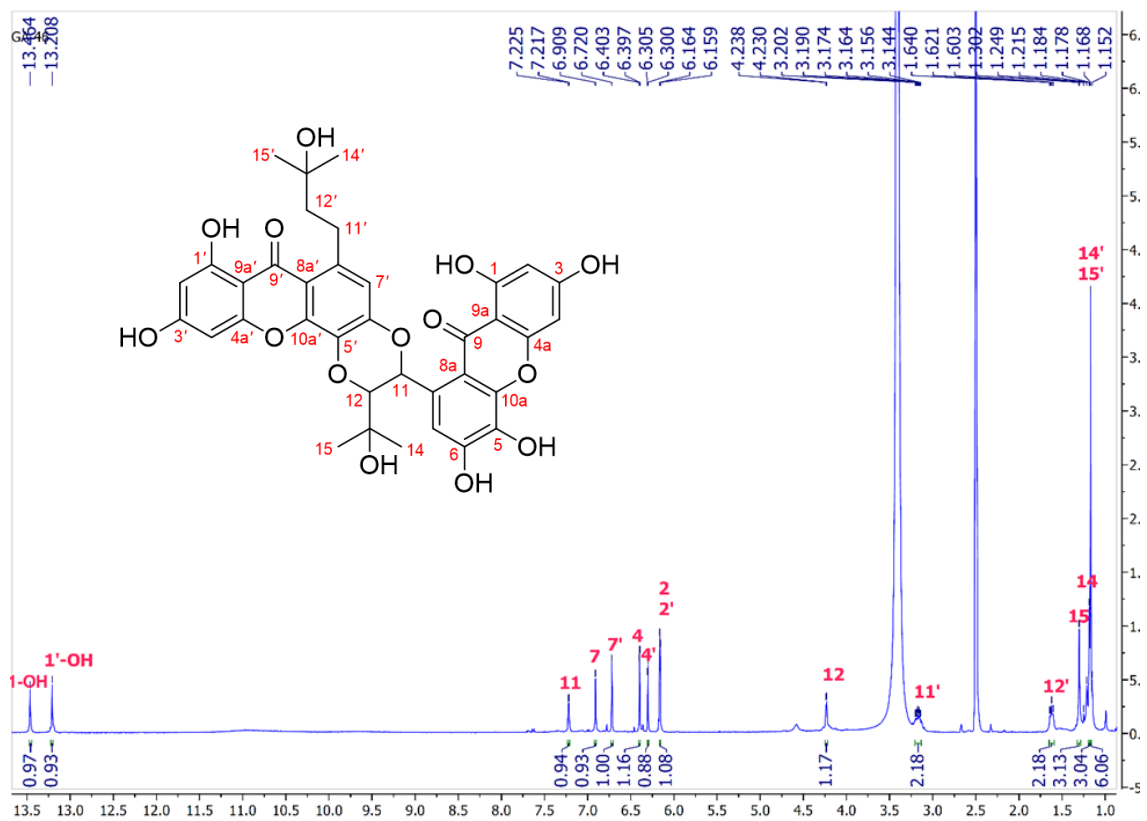
รูปที่ 1 สเปกตรัม HRESIMS ของสาร 1



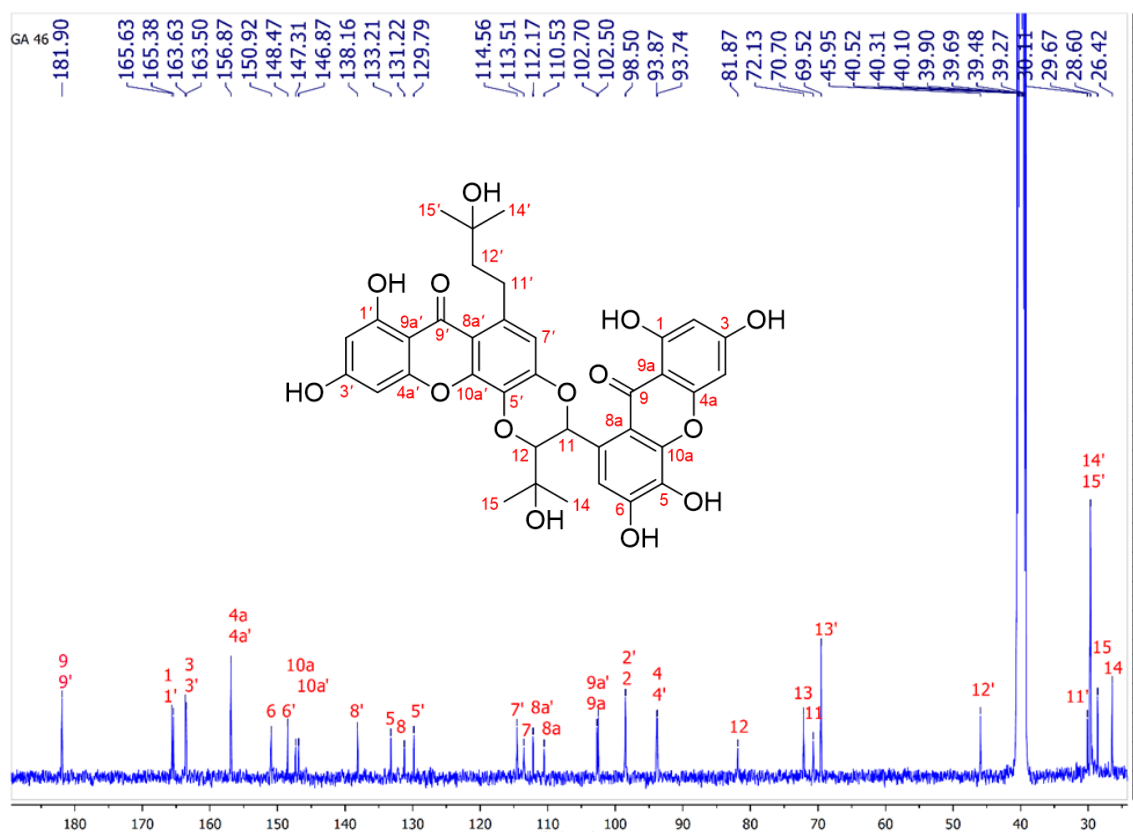
รูปที่ 2 สเปกตรัมการดูดกลืน UV-visible ของสาร 1



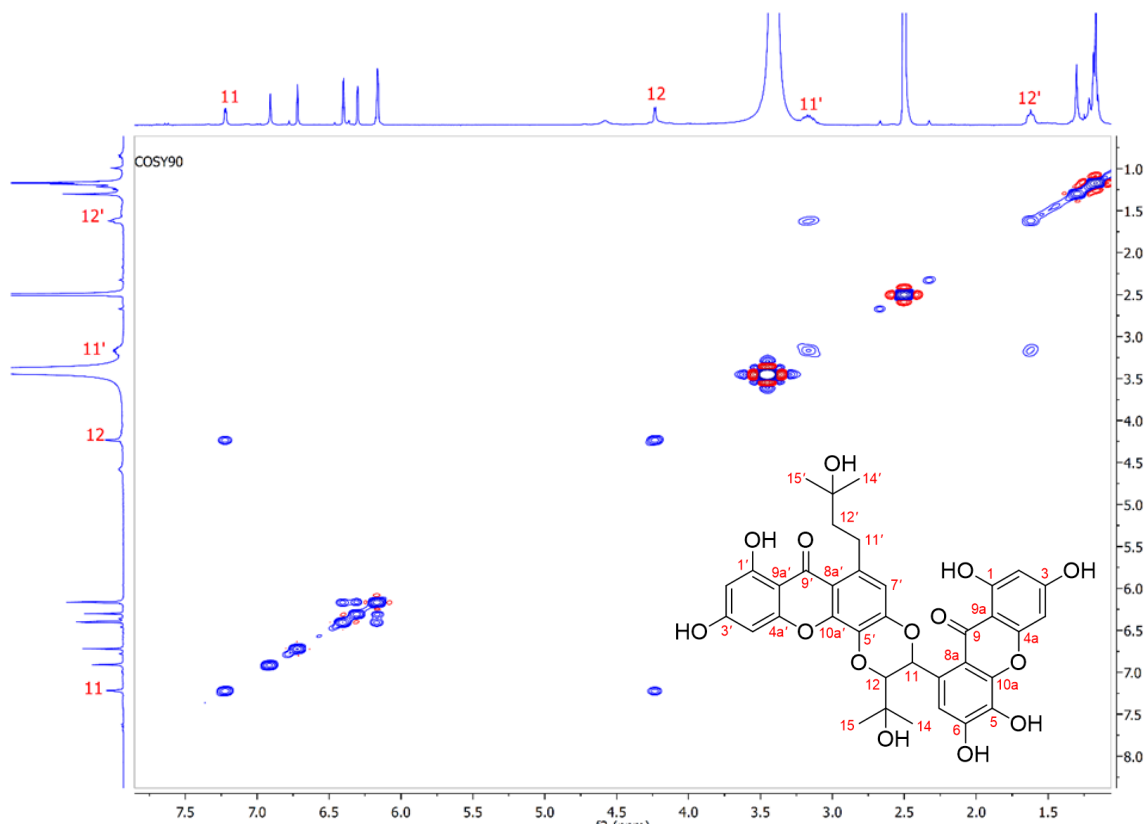
รูปที่ 3 สเปกตรัม IR ของสาร 1



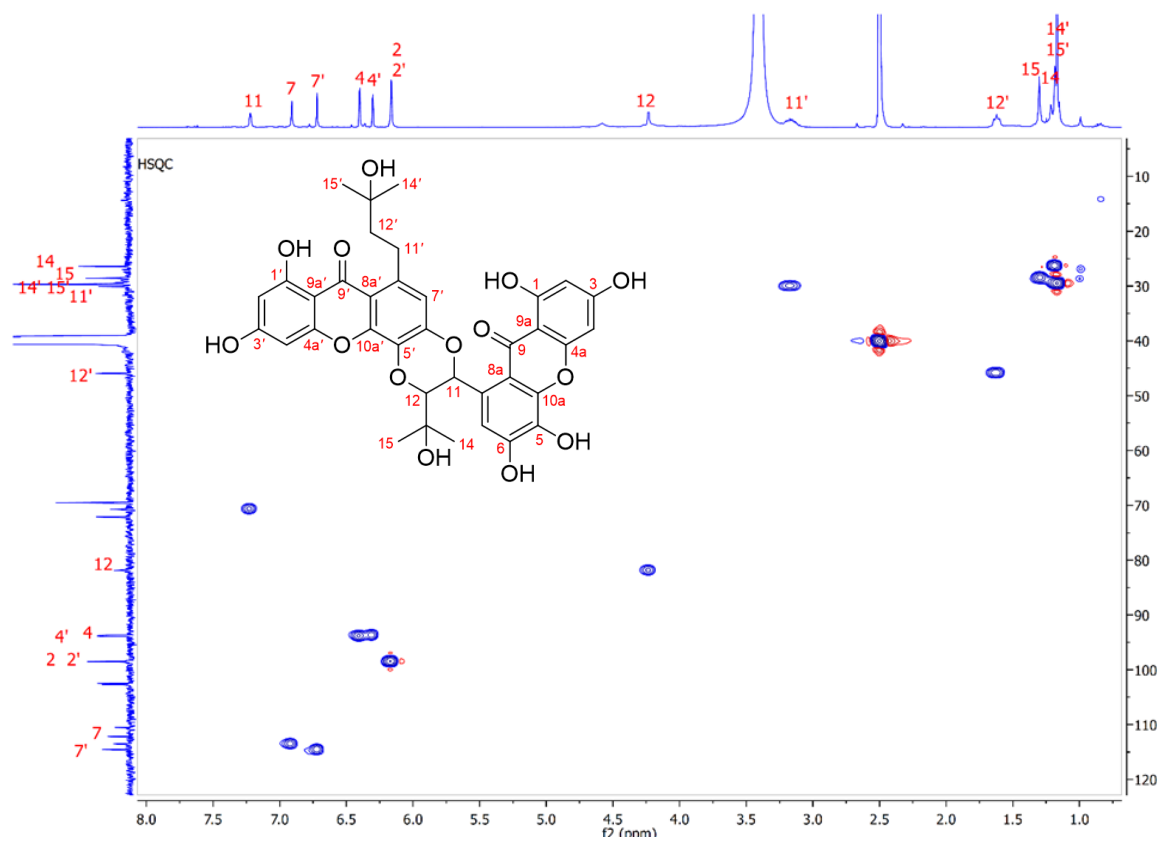
รูปที่ 4 สเปกตรัม ^1H NMR ของสาร 1 ใน $\text{DMSO}-d_6$



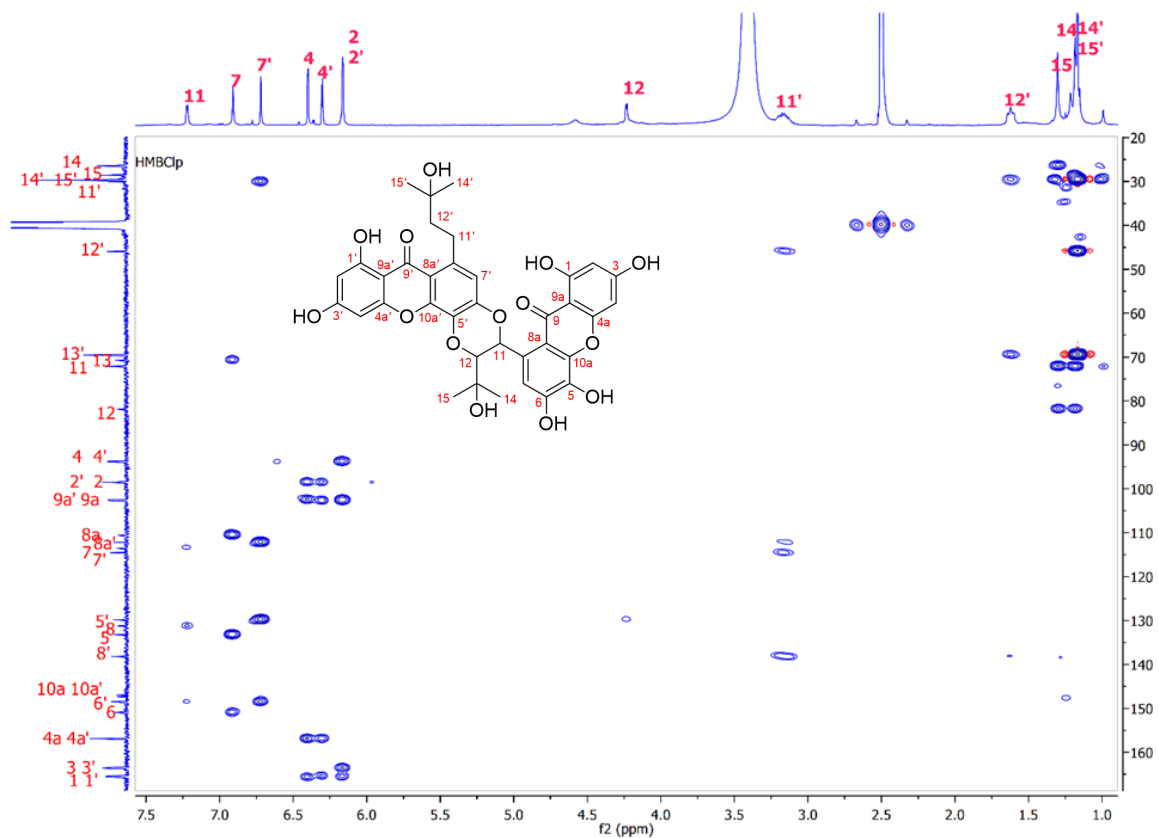
รูปที่ 5 สเปกตรัม ^{13}C NMR ของสาร 1 ใน $\text{DMSO}-d_6$



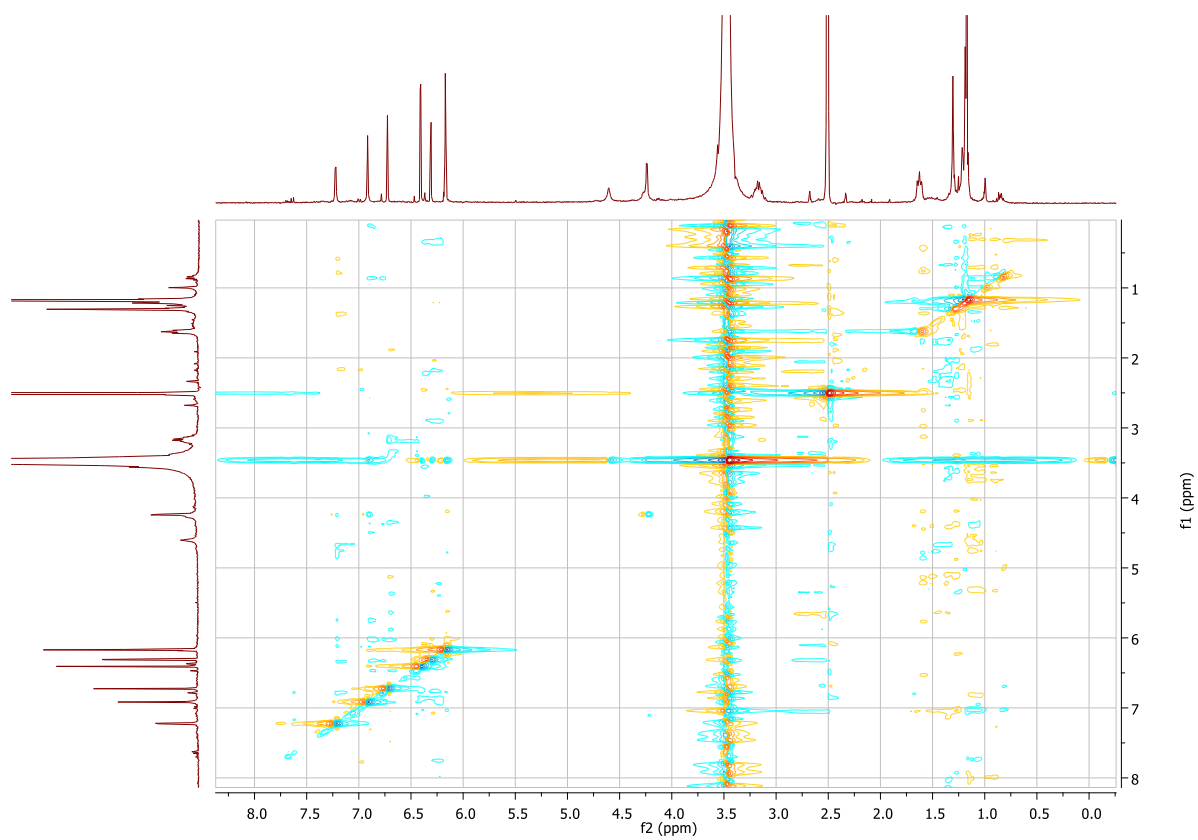
รูปที่ 6 สเปกตรัม COSY ของสาร 1 ใน $\text{DMSO}-d_6$



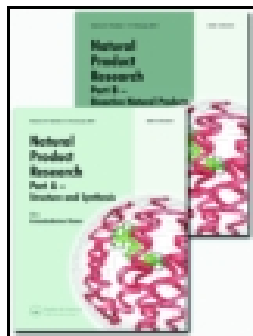
รูปที่ 7 สเปกตรัม HSQC ของสาร 1 ใน DMSO- d_6



รูปที่ 8 สเปกตรัม HMBC ของสาร 1 ใน DMSO- d_6



รูปที่ 9 สเปกตรัม NOESY ของสาร 1 ใน DMSO- d_6



Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

Schomburgkixanthone, a novel bixanthone from the twigs of *Garcinia schomburgkiana*

Thi My Lien Do, Thuc-Huy Duong, Van-Kieu Nguyen, Preecha Phuwapraisirisan, Titiruetai Doungwichitrkul, Nakorn Niamnont, Suekanya Jarupinthusophon & Jirapast Sichaem

To cite this article: Thi My Lien Do, Thuc-Huy Duong, Van-Kieu Nguyen, Preecha Phuwapraisirisan, Titiruetai Doungwichitrkul, Nakorn Niamnont, Suekanya Jarupinthusophon & Jirapast Sichaem (2020): Schomburgkixanthone, a novel bixanthone from the twigs of *Garcinia schomburgkiana*, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2020.1716351](https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1716351)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1716351>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 25 Jan 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 46



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Schomburgkixanthone, a novel bixanthone from the twigs of *Garcinia schomburgkiana*

Thi My Lien Do^a, Thuc-Huy Duong^b , Van-Kieu Nguyen^c,
Preecha Phuwapraisirisan^c , Titiruetai Doungwichitrkul^c,
Nakorn Niamnont^d, Suekanya Jarupinthusophon^e and Jirapast Sichaem^f 

^aInstitute of Environment-Energy Technology, Sai Gon University, Ho Chi Minh City, Vietnam; ^bDepartment of Chemistry, Ho Chi Minh University of Education, Ho Chi Minh City, Vietnam; ^cCenter of Excellence in Natural Products Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; ^dOrganic Synthesis, Electrochemistry & Natural Product Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand; ^eProgram of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Phranakorn Rajabhat University, Bangkok, Thailand; ^fFaculty of Science and Technology, Thammasat University Lampang Campus, Lampang, Thailand

ABSTRACT

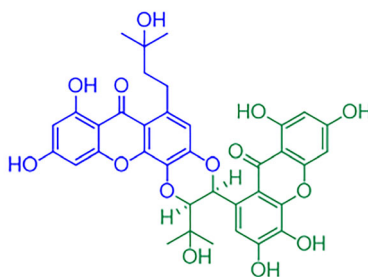
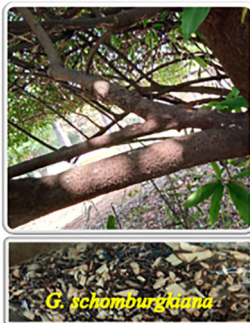
A novel bixanthone, named schomburgkixanthone (**1**), was isolated from the twigs of *Garcinia schomburgkiana*, along with six known compounds, griffipavixanthone (**2**), 4-hydroxyxanthone (**3**), 2-hydroxyxanthone (**4**), 1,6-dihydroxyxanthone (**5**), 1,7-dihydroxyxanthone (**6**), and 1,3,5-trihydroxyxanthone (**7**). The structure of **1** was identified by the application of NMR and MS data analyses and comparison with previous reports. Compound **1** showed the most powerful inhibition of rat intestinal α -glucosidase, with IC_{50} values of 0.79 for maltase and 1.81 mM for sucrase. Compound **2** most strongly inhibited sucrase, with an IC_{50} value of 4.58 mM.

ARTICLE HISTORY

Received 6 December 2019
Accepted 7 January 2020

KEYWORDS

Guttiferae; *Garcinia schomburgkiana*; schomburgkixanthone; bixanthone; α -glucosidase inhibition



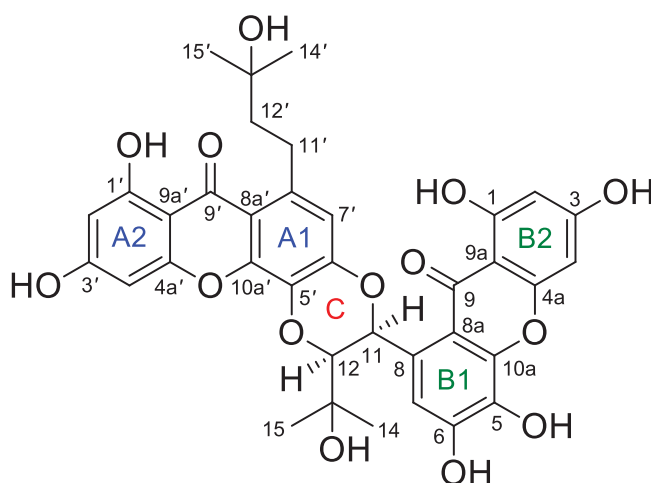


Figure 1. Chemical structure of **1**.

1. Introduction

The genus *Garcinia* belongs to the family Guttiferae and comprises more than 300 species (Feng et al. 2014). These are widespread in South America, Africa and Southeast Asia. Plants from this genus are well-known as rich natural sources of xanthenes, biphenyls, benzoylphloroglucinols, and flavonoids. These have a wide range of biological and pharmacological properties, being anti-inflammatory, antibacterial, anti-oxidant, antitumor, antifungal, and anti-HIV (Minami et al. 1994; Ito et al. 1997; Chiang et al. 2003; Shen and Yang 2006). In an ongoing search for new secondary metabolites from Thai medicinal plants (Sichaem et al. 2011, 2012, 2014), *Garcinia schomburgkiana* Pierre., known in Thailand as ‘Ma-dan’, was investigated in this study. This medium-sized tree bears sour but edible fruit. Previous phytochemical investigations of *G. schomburgkiana* have isolated xanthenes, depsidones, biphenyls, flavonoids, triterpenoids, and phloroglucinols. Some of these compounds have been shown to be anti-malarial and cytotoxic (Le et al. 2016; Sukandar et al. 2016). In this work, we investigated xanthenes present in the twigs of *G. schomburgkiana*. A novel bixanthone, named schomburgkixanthone (**1**) (Figure 1), was isolated from *G. schomburgkiana* twig extract, along with six known compounds, griffipavixanthone (**2**) (Feng et al. 2014), 4-hydroxyxanthone (**3**) (Terashima et al. 1999), 2-hydroxyxanthone (**4**) (Carvalho et al. 2003), 1,6-dihydroxyxanthone (**5**) (Singh et al. 1993), 1,7-dihydroxyxanthone (**6**) (Nguyen et al. 2013) and 1,3,5-trihydroxyxanthone (**7**) (Fouotsa et al. 2014). Herein, we report the structural elucidation of the novel compound **1** by the interpretation of its spectroscopic data and comparison with literature reports. In addition, all isolated xanthenes were evaluated for inhibition of rat intestinal α -glucosidases (maltase and sucrase).

2. Results and discussion

Compound **1** was obtained as a yellow amorphous powder. Its molecular formula was determined as $C_{36}H_{32}O_{14}$ from positive HRESIMS data at m/z 711.1686 $[M + Na]^+$ (calcd. for $C_{36}H_{32}O_{14}Na$, 711.1684). The UV spectrum displayed absorption bands at

λ_{max} 330, 254 and 240 nm. The IR spectrum showed absorptions for phenolic hydroxyl groups at 3233 cm^{-1} and a hydrogen-bonded carbonyl group at 1644 cm^{-1} . The ^1H NMR and HSQC spectra of **1** showed signals of two chelated OH groups [δ_{H} 13.46 (1 H, s) and 13.21 (1 H, s)], two sets of *meta*-aromatic protons [δ_{H} 6.40 (1 H, d, $J=2.4\text{ Hz}$)/6.16 (1 H, d, $J=2.0\text{ Hz}$) and 6.30 (1 H, d, $J=2.0\text{ Hz}$)/6.16 (1 H, d, $J=2.0\text{ Hz}$)], two singlet aromatic protons [δ_{H} 6.91 (1 H, s) and 6.72 (1 H, s)], two oxygenated methine protons [δ_{H} 7.22 (1 H, d, $J=3.2\text{ Hz}$) and 4.23 (1 H, d, $J=3.2\text{ Hz}$)], two methylene protons [δ_{H} 3.17 (2 H, m) and 1.61 (2 H, m)], and four methyl groups in the range δ_{H} 1.35–1.10 ppm. The ^{13}C NMR spectrum of **1** revealed 36 carbons including two carbonyl carbons [δ_{C} 181.9 ($\times 2$)], 24 aromatic carbons in the range δ_{C} 166.0–93.0 ppm, four oxygenated carbons [δ_{C} 81.9, 72.1, 70.7 and 69.5], and six aliphatic carbons [δ_{C} 46.0, 30.1, 29.7 ($\times 2$), 28.6, and 26.4]. The ^{13}C NMR spectrum of **1** displayed apparent pairing at many carbon resonances, suggesting a dimeric structure with some slight differences between each monomer (units A and B). The skeleton of each monomer could be a prenylated xanthone (Xu et al. 1998; Chen et al. 2011).

From COSY and HMBC analysis, monomeric unit A was determined as a xanthone containing the 3-hydroxy-3-methylbutyl group. A spin system identified as $\text{H}_2\text{-11'}/\text{H}_2\text{-12'}$ was connected by HMBC cross-peaks between $\text{H}_3\text{-15'}$ and $\text{H}_3\text{-14'}$ at δ_{H} 1.17 (6 H, s) to C-12' (δ_{C} 46.0) and C-13' (δ_{C} 69.5). This group was linked to a benzene ring by HMBC correlations from $\text{H}_2\text{-11'}$ to C-7' (δ_{C} 114.6), C-8' (δ_{C} 138.2) and C-8a' (δ_{C} 112.2). HMBC correlations from a singlet aromatic proton H-7' at δ_{H} 6.72 (6 H, s) to C-5' (δ_{C} 129.8), C-6' (δ_{C} 148.5), C-7', C-8' and C-11' (δ_{C} 30.1) led to the construction of benzene ring A1. Furthermore, the ^1H -NMR spectrum of the monomeric unit A of **1** revealed signals of one chelated OH group at δ_{H} 13.21 (1 H, s) and one set of *meta*-aromatic protons at δ_{H} 6.40 (1 H, d, 2.4) and 6.16 (1 H, d, 2.0), attributed respectively to H-4' and H-2' in the 1',3',5',6'-tetrasubstituted benzene ring A2. This was further supported by correlations of 1'-OH at δ_{H} 13.21 (1 H, s) to C-1' (δ_{C} 165.4), C-2' (δ_{C} 98.5), C-9a' (δ_{C} 102.5), H-2' to C-1', C3' (δ_{C} 163.5), C-4' (δ_{C} 93.7), C-9a', and H-4' to C-3', C-4a' (δ_{C} 156.9).

Monomeric unit B was highly reminiscent of the first. The key spectroscopic difference was a more downfield shift of C-11 (δ_{C} 72.1) and C-12 (δ_{C} 81.9) compared to their homologous positions C-11' (δ_{C} 30.1) and C-12' (δ_{C} 46.0) in monomeric unit A. This suggested the presence of two oxygenated methines ($-\text{OCHCHO}-$), supported by HMBC cross-peaks of H-11 (δ_{H} 7.22), $\text{H}_3\text{-14}$ (δ_{H} 1.18), and $\text{H}_3\text{-15}$ (δ_{H} 1.18) to C-12 and C-13 (δ_{C} 70.7). In addition, the HMBC cross-peaks between H-11 and C-6', H-12 and C-5' formed a six-member C ring between monomeric units A and B through a diether linkage, previously reported for mesuabixanthonones A and B (Singh et al. 1993). The relative configuration of **1** was defined by NOESY data and coupling constant analysis. The correlation between H-11 and H-12 in combination with the small coupling constant of 3.2 Hz indicated their *syn* orientation (Nguyen et al. 2013). This established the structure of **1**, which was named schomburgkixanthone.

All isolated compounds were assessed for *in vitro* inhibition of rat intestinal α -glucosidases. Compound **1** exhibited the most potent inhibition of maltase and sucrase with IC_{50} values of 0.79 and 1.81 mM, respectively, while compound **2** most strongly inhibited sucrase with an IC_{50} value of 4.58 mM. By contrast, compounds **3–7** showed no inhibition.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

NMR spectra were recorded on a Bruker 400 AVANCE spectrometer and HRESIMS spectra on a Bruker MicrOTOF-Q II mass spectrometer. The UV-visible absorption spectra were recorded on a UV-2550 UV-Vis spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The IR spectra were measured on a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer using KBr discs. Thin layer chromatography was carried out on precoated Kieselgel 60 F₂₅₄ or silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck). Spots were visualised by spraying with 20% H₂SO₄ solution, followed by heating. Acarbose® was obtained from Bayer Vitol Leverkusen, Germany. Rat intestinal acetone powder was supplied by Sigma Aldrich. Spectrophotometric measurements for the investigation of α -glucosidase inhibition were taken on a Sunrise microplate reader spectrophotometer.

3.2. Plant material

The *G. schomburgkiana* twigs were collected in Mahasarakham Province, Thailand, in April 2018. The plant material was identified by Dr. Suttira Khumkratok at the Walai Rukhavej Botanical Research Institute, Mahasarakham University, and a voucher specimen was retained as a reference (Khumkratok no. 92-08).

3.3. Extraction and isolation

The *G. schomburgkiana* twigs (10.5 kg) were air-dried, ground into powder, and exhaustively extracted at room temperature using EtOH (3 × 15 L). The filtered solution was evaporated under reduced pressure to afford a residue (534.4 g). This crude extract was suspended in H₂O and partitioned with *n*-hexane and EtOAc, yielding 45.7 g of *n*-hexane extract and 257.2 g of EtOAc extract. The EtOAc extract was subjected to silica gel column chromatography (CC) and eluted with *n*-hexane–EtOAc (10:0–0:10) and EtOAc–MeOH (80:20–0:1) gradients to yield ten fractions EA.1–EA.10. Fraction EA.2 (1.6 g) was loaded on silica gel CC (*n*-hexane–EtOAc, 8:2) as eluent yielding **2** (12.4 mg) and **3** (5.7 mg). Fraction EA.4 (0.8 g) was purified by a Sephadex LH-20 CC (100 g) with CH₂Cl₂–MeOH (1:1) as eluent followed by RP–C18 silica gel CC and eluting with H₂O–MeOH (60:10) to give **1** (4.5 mg) and **4** (13.5 mg). Fraction EA.6 was isolated by a silica gel CC with *n*-hexane–EtOAc (stepwise 70:30–0:10) as eluent to yield **5** (8.5 mg) and **6** (15.7 mg). Finally, fraction EA.9 was purified by a silica gel CC with CH₂Cl₂–MeOH (stepwise 80:20–0:10) as eluent to give **7** (13.1 mg).

3.3.1. Schomburgkixanthone (**1**)

Yellow amorphous powder, [α]_D²⁵ +5.4 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ) 330 (0.93), 254 (1.27), 240 (1.12) nm; IR $\nu_{\max}$ 3233 (br), 1740, 1644, 1578, 1508, 1461, 1277, 1163, 1107, 1021, 978, 888, 829, 702, 647, 537 cm⁻¹; HRESIMS *m/z* 711.1686 (M + Na; calcd for C₃₆H₃₂O₁₄Na, 711.1690); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ_{H} 13.46 (1 H, s, 1-OH), 13.21 (1 H, s, 1'-OH), 7.22 (1 H, d, *J* = 3.2 Hz, H-11), 6.91 (1 H, s, H-7), 6.72 (1 H, s, H-7'), 6.40 (1 H, d, *J* = 2.4 Hz, H-4), 6.30 (1 H, d, *J* = 2.0 Hz, H-4'), 6.16 (2 H, *J* = 2.0, H-2, H-2'),

4.23 (1 H, d, $J=3.2$ Hz, H-12), 3.17 (2 H, m, H-11'), 1.61 (2 H, m, H-12'), 1.30 (3 H, s, H-15), 1.18 (3 H, s, H-14), 1.17 (6 H, s, H-15', H-14'). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{C} 181.9 (C-9, C-9'), 165.4 (C-1, C-1'), 163.6 (C-3), 163.5 (C-3'), 156.9 (C-4a, C-4a'), 150.9 (C-6), 148.5 (C-6'), 147.3 (C-10a), 146.9 (C-10a'), 138.2 (C-8'), 133.2 (C-5), 131.2 (C-8), 129.8 (C-5'), 114.6 (C-7'), 113.5 (C-7), 112.2 (C-8a'), 110.5 (C-8a), 102.7 (C-9a), 102.5 (C-9a'), 98.5 (C-2, C-2'), 93.9 (C-4), 93.7 (C-4'), 81.9 (C-12), 72.1 (C-11), 70.7 (C-13), 69.5 (C-13'), 46.0 (C-12'), 30.1 (C-11'), 29.7 (C-14', C-15'), 28.6 (C-15), 26.4 (C-14).

3.4. α -Glucosidase inhibitory activity

Inhibition of rat intestinal α -glucosidase was assessed following the protocol of Ramadhan and Phuwapraisirisan (2015). Crude enzyme solution prepared from powdered rat intestinal acetone was used as a source of maltase and sucrase. The powder (1 g) was homogenised in 30 mL of 0.9% NaCl solution and centrifuged at 12,000 rpm for 30 min, then the supernatant was assayed. The isolated compounds (1 mg/mL in DMSO, 10 μL) were added to 30 μL of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.9), 20 μL of substrate solution (maltose: 10 mM; sucrose: 100 mM) in 0.1 M phosphate buffer, 80 μL of glucose kit, and 20 μL of the crude enzyme solution. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 10 min (maltose) or 40 min (sucrose). The concentration of glucose liberated from the reaction mixture was detected by the glucose oxidase method using a glu-kit (Human, Germany). Enzymatic activity was quantified by measuring absorbance at 503 nm. The percentage inhibition was calculated as $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, where A_0 is the absorbance without the sample and A_1 is the absorbance with the sample. The IC_{50} value was determined from a plot of percentage inhibition vs. sample concentration. IC_{50} values were calculated using Microsoft Excel software. Acarbose® was used as the standard control and showed IC_{50} values of 0.023 mM (maltase) and 0.025 mM (sucrase).

4. Conclusions

In this study, seven xanthonoids (**1–7**) were isolated from the twigs of *G. schomburgkiana*. Their structures were elucidated as schomburgkixanthone (**1**), griffipavixanthone (**2**), 4-hydroxyxanthone (**3**), 2-hydroxyxanthone (**4**), 1,6-dihydroxyxanthone (**5**), 1,7-dihydroxyxanthone (**6**) and 1,3,5-trihydroxyxanthone (**7**). To the best of our knowledge, compound **1** is a novel bixanthone in which the two xanthone moieties are connected by a diether linkage. Such linkages are rarely reported for natural products. Compound **1** exhibited the most potent inhibition of rat intestinal α -glucosidases, with IC_{50} values of 0.79 mM (maltase) and 1.81 mM (sucrase). Compound **2** showed the strongest inhibitory activity against sucrase (IC_{50} 4.58 mM).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This project was supported by the Thailand Research Fund (TRF) (Grant No. MRG6180104).

ORCID

Thuc-Huy Duong  <http://orcid.org/0000-0001-9891-4326>
 Preecha Phuwapraisirisan  <http://orcid.org/0000-0001-6481-7712>
 Jirapast Sichaem  <http://orcid.org/0000-0003-1407-496X>

References

- Carvalho MJ, Carvalho LM, Ferreira AM, Silva AM. 2003. A new xanthone from *Hedychium gardnerianum*. *Nat Prod Res.* 17(6):445–449.
- Chen Y, Fan H, Yang GZ, Jiang Y, Zhong FF, He HW. 2011. Two unusual xanthones from the bark of *Garcinia xanthochymus*. *Helv Chim Acta.* 94(4):662–668.
- Chiang YM, Kuo YH, Oota S, Fukuyama Y. 2003. Xanthones and benzophenones from the stems of *Garcinia multiflora*. *J Nat Prod.* 66(8):1070–1073.
- Feng S, Jiang Y, Li J, Qiu S, Chen T. 2014. A new bixanthone derivative from the bark of *Garcinia oblongifolia*. *Nat Prod Res.* 28(2):81–85.
- Fouotsa H, Tatsimo SJ, Neumann B, Michalek C, Mbazoa CD, Nkengfack AE, Sewald N, Lannang AM. 2014. A new xanthone derivative from twigs of *Garcinia nobilis*. *Nat Prod Res.* 28(14):1030–1036.
- Ito C, Miyamoto Y, Nakayama M, Kawai Y, Rao KS, Furukawa H. 1997. A novel depsidone and some new xanthones from *Garcinia* species. *Chem Pharm Bull.* 45(9):1403–1413.
- Le DH, Nishimura K, Takenaka Y, Mizushima Y, Tanahashi T. 2016. Polyprenylated Benzoylphloroglucinols with DNA polymerase inhibitory activity from the fruits of *Garcinia schomburgkiana*. *J Nat Prod.* 79(7):1798–1807.
- Minami H, Kinoshita M, Fukuyama Y, Kodama M, Yoshizawa T, Sugiura M, Nakagawa K, Tago H. 1994. Antioxidant xanthones from *Garcinia subelliptica*. *Phytochemistry.* 36(2):501–506.
- Nguyen LT, Nguyen DM, Nguyen LH. 2013. A new xanthone from the bark of *Calophyllum thorelii*. *Nat Prod Res.* 27(6):563–567.
- Nguyen PH, Yang JL, Uddin MN, Park SL, Lim SI, Jung DW, Williams DR, Oh WK. 2013. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors from *Morinda citrifolia* (Noni) and their insulin mimetic activity. *J Nat Prod.* 76(11):2080–2087.
- Ramadhan R, Phuwapraisirisan P. 2015. New arylalkanones from *Horsfieldia macrobotrys*, effective antidiabetic agents concomitantly inhibiting α -glucosidase and free radicals. *Bioorg Med Chem Lett.* 25(20):4529–4533.
- Shen J, Yang J-S. 2006. Two new xanthones from the stems of *Garcinia cowa*. *Chem Pharm Bull.* 54 (1):126–128.
- Sichaem J, Jirasirichote A, Sapasuntikul K, Khumkratok S, Sawasdee P, Do TM, Tip-Pyang S. 2014. New furoquinoline alkaloids from the leaves of *Evodia lepta*. *Fitoterapia.* 92:270–273.
- Sichaem J, Kaennakam S, Siripong P, Tip-Pyang S. 2012. Tabebuialdehydes A-C, cyclopentene dialdehyde derivatives from the roots of *Tabebuia rosea*. *Fitoterapia.* 83(8):1456–1459.
- Sichaem J, Ruksilp T, Worawalai W, Siripong P, Khumkratok S, Tip-Pyang S. 2011. A new dimeric aporphine from the roots of *Artabotrys spinosus*. *Fitoterapia.* 82(3):422–425.
- Singh S, Gray AI, Waterman PG. 1993. Mesuabixanthone-A and mesuabixanthone-B: novel bis-xanthones from the stem bark of *Mesua ferrea* (Guttiferae). *Nat Prod Res.* 3(1):53–58.
- Sukandar ER, Siripong P, Khumkratok S, Tip-Pyang S. 2016. New depsidones and xanthone from the roots of *Garcinia schomburgkiana*. *Fitoterapia.* 111:73–77.
- Terashima K, Kondo Y, Aqil M, Niwa M. 1999. A new xanthone from the stems of *Garcinia kola*. *Nat Prod Res.* 14(2):91–97.
- Xu YJ, Cao SG, Wu XH, Lai YH, Tan BH, Pereira JT, Goh SH, Venkatraman G, Harrison LJ, Sim KY. 1998. Griffipavixanthone, a novel cytotoxic bixanthone from *Garcinia griffithii* and *G. pavifolia*. *Tetrahedron Lett.* 39(49):9103–9106.