



รายงานการวิจัย

องค์ประกอบทางเคมีของใบพญาอระยะที่สอง  
**Chemical Constituents from the Leaves of *Clinacanthus*  
*nutans* Lindau Part II**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

องค์ประกอบทางเคมีของใบพญาอระยะที่สอง  
Chemical Constituents from the Leaves of *Clinacanthus*  
*nutans* Lindau Part II

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ ศักดารัตน์

สาขาวิชาเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ช่วยวิจัย

นายเกษทัย ปัญญาคม

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548-2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2552

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548 - 2549 หัวหน้าโครงการและผู้ร่วมวิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณหัวหน้าโครงการคุณทวีผล เดชาติวงศ์ ณ อยุธยา สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุขที่ให้คำปรึกษาแนะนำมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ รศ.ดร. ฉันทนา อารมณดี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ให้ สมนุนไพรพญาอที่ได้ผ่านการคัดเลือกอย่างถูกต้องแล้วมาทำการวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.ดร. แจ่มใส เพียรทอง รศ. ทิพย์ เอกลักษณ์นันท์ และ น.ส. ศศิธร ธงชัย สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ คณะ แพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้ช่วยทดสอบฤทธิ์ ยับยั้งเชื้อ herpes simplex virus (HSV) ของสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบจากพญาอ

นายเกษทัย ปัญญาคม นักศึกษาระดับมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ ที่ช่วย ดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรรพญาอ

## บทคัดย่อ

พญาขอ เป็นพืชสมุนไพรที่นิยมใช้กันในอดีตจนถึงปัจจุบัน มีสรรพคุณในการรักษาอาการอักเสบ อันเนื่องมาจากพิษสัตว์แมลงกัดต่อย โรคเรื้อรัง โรคงูสวัด และ อาการแพ้ต่างๆ เมื่อนำส่วนสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม ของใบพญาขอมาแยกด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 8 ชนิด จากการ วิเคราะห์โครงสร้างของสารทั้งหมดที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลทางสเปคโทรสโกปี (DEPT ,COSY NOESY ,HMQC และ HMBC) สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้แล้วพบว่า เป็นสารประกอบที่มีสูตร โครงสร้างคล้ายคลึงกับ คลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี คือ  $13^2$ -hydroxy-( $13^2$ -S)-chlorophyll b,  $13^2$ -hydroxy-( $13^2$ -R)-chlorophyll b,  $13^2$ - hydroxy-( $13^2$ -S) - phaeophytin b,  $13^2$ -hydroxy-( $13^2$ -R) - phaeophytin b,  $13^2$  - hydroxy - ( $13^2$ -S) - phaeophytin a,  $13^2$  - hydroxy - ( $13^2$ - R ) -phaeophytin a, purpurin 18 phytyl ester and phaeophorbide a ซึ่งสารประกอบ เหล่านี้ยังไม่มียางานว่าพบในพืชนี้มาก่อน

## ABSTRACT

The leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau have long been traditionally used in Thailand as an anti-inflammatory drug for the treatment of insect bites, herpes infection and allergic responses. A crude chloroform extract was separated by means of chromatographic techniques and bioactivity-guided fractionation to give eight pure compounds. Structure elucidation of the isolated compounds was carried out on the basis of spectral analyses. Eight of these were identified as novel compounds related to chlorophyll a and chlorophyll b namely 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-chlorophyll b, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-chlorophyll b, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-phaeophytin b, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-phaeophytin b, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-phaeophytin a, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-phaeophytin a, purpurin 18 phytol ester and phaeophorbide a. These compounds have not been previously reported in this species.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ระเบียบวิธีวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	5
บทที่ 3 ผลการวิจัย	5
บทที่ 4 บทสรุป	5
บรรณานุกรม	5

ใช้ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการทั้งในประเทศและนานาชาติ 2 ผลงานคือ

1. Chemical Composition Investigation of the *Clinacanthus nutans* Lindau Leaves

Santi Sakdarat<sup>1\*</sup>, Aussavashai Shuyprom<sup>2</sup>, Thaweephol Dechatiwongse Na Ayudhya<sup>2</sup>, Peter G. Waterman<sup>3</sup> and Gloria Karagianis<sup>3</sup>

<sup>1</sup> School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

<sup>2</sup> Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand.

<sup>3</sup> Centre for Phytochemistry, Southern Cross University, Lismore, P, Australia.

2. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau

Santi Sakdarat <sup>a,\*</sup>, Aussavashai Shuyprom <sup>b</sup>, Chamsai Pientong <sup>c</sup>,

Tipaya Ekalaksananan <sup>c</sup>, Sasithorn Thongchai <sup>c</sup>

<sup>a</sup> School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology,  
Nakhon Ratchasima, Thailand

<sup>b</sup> Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Ministry of  
Public Health, Nonthaburi, Thailand

<sup>c</sup> Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon  
Kaen, Thailand

## สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงรูปใบของสมุนไพรพญาขอ	2
รูปที่ 2 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 1	24
รูปที่ 3 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 1	24
รูปที่ 4 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 1	25
รูปที่ 5 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 1	25
รูปที่ 6 แสดง $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ spectrum ของสารตัวที่ 1	26
รูปที่ 7 แสดง HMQC spectrum ของสารตัวที่ 1	26
รูปที่ 8 แสดง HMBC spectrum ของสารตัวที่ 1	27
รูปที่ 9 แสดง NOESY spectrum ของสารตัวที่ 1	27
รูปที่ 10 แสดง Mass spectrum ของสารตัวที่ 1	28
รูปที่ 11 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 2	29
รูปที่ 12 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 2	29
รูปที่ 13 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 2	30
รูปที่ 14 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 2	30
รูปที่ 15 แสดง $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ spectrum ของสารตัวที่ 2	31
รูปที่ 16 แสดง HMQC spectrum ของสารตัวที่ 2	31
รูปที่ 17 แสดง HMBC spectrum ของสารตัวที่ 2	32
รูปที่ 18 แสดง NOESY spectrum ของสารตัวที่ 2	32
รูปที่ 19 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 3	33
รูปที่ 20 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 3	33
รูปที่ 21 แสดง Gradient HMBC spectrum ของสารตัวที่ 3	34
รูปที่ 22 แสดง Gradient COSY-45 spectrum ของสารตัวที่ 3	35
รูปที่ 23 แสดง Gradient NOESY spectrum ของสารตัวที่ 3	36
รูปที่ 24 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 4	37
รูปที่ 25 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 4	37
รูปที่ 26 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 4	38
รูปที่ 27 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 4	38
รูปที่ 28 แสดง $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ spectrum ของสารตัวที่ 4	39



รูปที่ 29 แสดง HSQC spectrum ของสารตัวที่ 4	39
รูปที่ 30 แสดง HMBC spectrum ของสารตัวที่ 4	40
รูปที่ 31 แสดง NOESY spectrum ของสารตัวที่ 4	40
รูปที่ 32 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 5	41
รูปที่ 33 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 5	41
รูปที่ 34 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 5	42
รูปที่ 35 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 5	42
รูปที่ 36 แสดง $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ spectrum ของสารตัวที่ 5	43
รูปที่ 37 แสดง HSQC spectrum ของสารตัวที่ 5	43
รูปที่ 38 แสดง HMBC spectrum ของสารตัวที่ 5	44
รูปที่ 39 แสดง NOESY spectrum ของสารตัวที่ 5	44
รูปที่ 40 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 6	45
รูปที่ 41 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 6	45
รูปที่ 42 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 6	46
รูปที่ 43 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 6	46
รูปที่ 44 แสดง $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ spectrum ของสารตัวที่ 6	47
รูปที่ 45 แสดง HSQC spectrum ของสารตัวที่ 6	47
รูปที่ 46 แสดง HMBC spectrum ของสารตัวที่ 6	48
รูปที่ 47 แสดง NOESY spectrum ของสารตัวที่ 6	48
รูปที่ 48 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 7	49
รูปที่ 49 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 7	49
รูปที่ 50 แสดง Gradient HSQC spectrum ของสารตัวที่ 7	50
รูปที่ 51 แสดง Gradient HMBC spectrum ของสารตัวที่ 7	51
รูปที่ 52 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 8	52
รูปที่ 53 แสดง $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum ของสารตัวที่ 8	52
รูปที่ 54 แสดง Gradient HSQC spectrum ของสารตัวที่ 8	53
รูปที่ 55 แสดง Gradient HMBC spectrum ของสารตัวที่ 8	54
รูปที่ 56 แสดง Gradient COSY spectrum ของสารตัวที่ 8	55

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เนื่องจากได้มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากใบพญาขอในห้องปฏิบัติการแล้วพบว่า สารสกัดจากสมุนไพรรชชนิดนี้มีผลที่น่าสนใจในการฆ่าเชื้อโรคแบคทีเรีย และไวรัส และได้มีการนำผลการศึกษานี้ไปพัฒนาเตรียมผลิตภัณฑ์ทดลองทางคลินิก ซึ่งก็พบว่ายาจากสมุนไพรรชชนิดนี้ใช้รักษาผู้ป่วยโรคเรื้อรังไวรัสได้ การทดลองดังกล่าวดำเนินการโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และได้มีการถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่องค์การเภสัชกรรม ปัจจุบันองค์การเภสัชกรรมได้ผลิตเป็นยาออกจำหน่ายแล้ว และ โรงพยาบาลของรัฐและภาคเอกชนก็ได้มีการเตรียมผลิตภัณฑ์ยาจากสมุนไพรรชออกจำหน่ายด้วย นอกจากนี้ได้มีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากพญาขอมีฤทธิ์ระงับปวดและลดอาการอักเสบได้ และมีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ในหลอดทดลองด้วย ปัญหาที่สำคัญของการใช้ผลิตภัณฑ์ยาพญาขอในปัจจุบันคือ การควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและยาเตรียม เพราะปัจจุบันดำเนินการควบคุมคุณภาพโดยวิธีทางชีววิทยา ซึ่งสิ้นเปลืองเวลาและค่าใช้จ่ายมาก หากมีการควบคุมคุณภาพโดยวิธีทางเคมีได้ ก็จะมีประโยชน์มาก ซึ่งการที่จะควบคุมคุณภาพโดยวิธีทางเคมีให้ได้ผลที่เชื่อถือได้ จำเป็นต้องมีสารออกฤทธิ์ที่จะนำมาใช้เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ได้สังเกตเห็นความจำเป็นนี้ จึงได้มีการศึกษาวิจัยหาสารสำคัญกันอย่างกว้างขวาง ทั้งในและต่างประเทศ จากการศึกษาส่วนของใบและลำต้น พบสาร C-glycosyl flavones 6 ชนิด ได้แก่ vitexin, isovitexin, shaftoside, isomollupentin 7-O- $\beta$ -glucopyranoside, orientin isoorientin และ sulfur-containing glucosides แต่ยังไม่มีการพบสารออกฤทธิ์ในปี 2001 (งานวิจัยในระยะแรก) ได้นำส่วนสกัดด้วยคลอโรฟอร์มของใบพญาขอมาแยกโดยวิธีคลอแลมน์โครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ 10 ชนิด จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารทั้งหมดที่แยกได้ โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี สามารถพิสูจน์โครงสร้างได้แล้ว 3 ชนิด เป็นสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี และนอกจากนี้ ได้มีการพบสารสำคัญในใบพญาขอ ซึ่งเป็นสารที่มีสูตรคล้ายคลึงกับคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี (chlorophyll a and chlorophyll b related compounds) ทั้ง 3 ชนิด จากการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นพบว่าปริมาณไม่เพียงพอที่จะใช้ในการทดสอบฤทธิ์ เพราะสารกลุ่มนี้มีปริมาณน้อยมากในใบพญาขอ และสารบริสุทธิ์อีก 7 ชนิด ที่เหลือก็มีปริมาณไม่เพียงพอที่จะใช้ในการวิเคราะห์พิสูจน์หาโครงสร้าง ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในระยะที่สอง เพื่อแยกสารให้มีปริมาณเพียงพอที่จะใช้ในการทดสอบฤทธิ์เพื่อยืนยันผล และเพื่อเก็บไว้เป็นสารมาตรฐาน (standard substances) สำหรับการศึกษาวิจัยหาวิธี

กำหนดมาตรฐาน เพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรชนิดนี้ โดยวิธีทางเคมี และเพื่อวิเคราะห์พิสูจน์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่เหลือต่อไป



รูปที่ 1 แสดงรูปใบของสมุนไพรพญาอ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อแยกสารจากใบพญาอ สำหรับใช้เป็นสารมาตรฐาน และพิสูจน์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่เหลือจากงานวิจัยในระยะแรก

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เตรียมสารสำคัญจากใบพญาอที่จะใช้เป็นสารมาตรฐานและวิเคราะห์พิสูจน์หาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่เหลือจากงานวิจัยในระยะแรก

## 1.4 ระเบียบวิธีวิจัย

- 1 รวบรวมข้อมูลจากรายงานการวิจัย และเอกสารวิชาการที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ และวางแผนการศึกษาวิจัย

- 2 เตรียมตัวอย่างวัตถุดิบใบพญาอแห้ง
- 3 เตรียมสารสกัดโดยวิธีการที่เหมาะสม
- 4 ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารสกัดโดยวิธีทางเคมีเพื่อหาสารสำคัญ
- 5 แยกสารสำคัญโดยวิธีที่เหมาะสม โดยใช้เอกสารอ้างอิงหมายเลข 13 เป็นหลัก
- 6 ตรวจสอบยีนสูตร โครงสร้างของสารสำคัญที่แยกได้ และส่งทดสอบฤทธิ์เพื่อยืนยันผลในการฆ่าเชื้อโรคเริ่ม
- 7 จัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์

เนื่องจากผลงานวิจัย(ฉบับสมบูรณ์) ทั้งหมดนี้ ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการทั้งในประเทศและนานาชาติ 2 ผลงานคือ

1. Chemical Composition Investigation of the *Clinacanthus nutans* Lindau Leaves Santi Sakdarat<sup>1\*</sup>, Aussavashai Shuyprom<sup>2</sup>, Thaweephol Dechatiwongse Na Ayudhya<sup>2</sup>, Peter G. Waterman<sup>3</sup> and Gloria Karagianis<sup>3</sup>

<sup>1</sup> School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

<sup>2</sup> Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand.

<sup>3</sup> Centre for Phytochemistry, Southern Cross University, Lismore, P, Australia.

2. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau Santi Sakdarat<sup>a,\*</sup>, Aussavashai Shuyprom<sup>b</sup>, Chamsai Pientong<sup>c</sup>, Tipaya Ekalaksananan<sup>c</sup>, Sasithorn Thongchai<sup>c</sup>

<sup>a</sup> School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

<sup>b</sup> Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand

<sup>c</sup> Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

จึงขอแนะนำผลงานวิชาการทั้ง 2 ผลงาน มาแนบเพื่อเป็นเรื่องโดยสมบูรณ์ โดยมีเนื้อหา คือ Abstract, Introduction, Materials Methods, Result, Discussion, Summary และ Reference พร้อม Table และ Figures.

## 1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. สารมาตรฐานที่เตรียมได้ จะเป็นประโยชน์ต่อกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ในการศึกษาวิจัยจัดทำข้อกำหนดมาตรฐาน เพื่อใช้ควบคุมคุณภาพของ วัตถุดิบและผลิตภัณฑ์จาก สมุนไพรพญายอ โดยวิธีทางเคมี ซึ่งจะมีความสะดวก รวดเร็ว ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย และสามารถดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการเคมีต่าง ๆ
2. ข้อมูลการกำหนดคุณภาพมาตรฐานของสมุนไพรชนิดนี้ จะมีประโยชน์ในการพิจารณา จัดพิมพ์ไว้ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) ซึ่งจะใช้เป็นคู่มือ ในการตรวจ คุณภาพโดยวิธีทางเคมีต่อไป
3. ส่งเสริมการผลิตวัตถุดิบพญายอให้มีคุณภาพดี โดยการสนับสนุนการดำเนินงานด้าน การเพาะปลูก จะทำให้ทราบอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม เพราะสามารถตรวจหาปริมาณของ สารสำคัญในช่วง ที่พืชเจริญเติบโต ทำให้ทราบอายุการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม
4. ผู้ผลิตยาจากวัตถุดิบพญายอ จะได้มีโอกาสที่จะควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและ ผลิตภัณฑ์ให้มี คุณภาพสม่ำเสมอ และทราบการคงสภาพของยา เป็นประโยชน์ต่อการคุ้มครอง ผู้บริโภค
5. ตรวจยืนยันสูตรโครงสร้างของสารสำคัญที่แยกได้ และส่งทดสอบฤทธิ์เพื่อยืนยันผลใน การฆ่าเชื้อ โรคเริ่ม เชื้อโรคงูสวัด
6. ได้ทราบถึงองค์ประกอบทางเคมี และพิสูจน์โครงสร้างของสารที่เป็นองค์ประกอบ ทางเคมี จาก ใบพญายอ
7. นักศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา ได้ศึกษาฝึกหัดเรียนรู้วิธีการใช้เครื่องมือต่าง ๆ และ วิธีการทำงาน วิจัย ซึ่งสามารถนำผลงานวิจัยนี้ไปเขียนเป็นส่วนหนึ่งของวิทยานิพนธ์ได้ หรือ เผยแพร่ผลงานวิจัย ในวารสารวิจัยได้

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

## บทที่ 3

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

## บทที่ 4

### บทสรุป

### บรรณานุกรม

ใช้ผลงานวิชาการที่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการทั้งในประเทศและนานาชาติ 2 ผลงานคือ

1. Chemical Composition Investigation of the *Clinacanthus nutans* Lindau Leaves  
Santi Sakdarat<sup>1\*</sup>, Aussavashai Shuyprom<sup>2</sup>, Thaweephol Dechatiwongse Na Ayudhya<sup>2</sup>, Peter G. Waterman<sup>3</sup> and Gloria Karagianis<sup>3</sup>

<sup>1</sup> School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

<sup>2</sup> Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand.

<sup>3</sup> Centre for Phytochemistry, Southern Cross University, Lismore, P, Australia.

2. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau  
Santi Sakdarat<sup>a,\*</sup>, Aussavashai Shuyprom<sup>b</sup>, Chamsai Pientong<sup>c</sup>,  
Tipaya Ekalaksananan<sup>c</sup>, Sasithorn Thongchai<sup>c</sup>

<sup>a</sup> School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

<sup>b</sup> Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand

<sup>c</sup> Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

## ORIGINAL ARTICLE

**Chemical composition investigation of the  
*Clinacanthus nutans* Lindau leaves**

Santi Sakdarat<sup>1\*</sup>, Aussavashai Shuyprom<sup>2</sup>, Thaweephol Dechatiwongse Na Ayudhya<sup>2</sup>,  
Peter G. Waterman<sup>3</sup>, Gloria Karagianis<sup>3</sup>

<sup>1</sup> School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

<sup>2</sup> Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand

<sup>3</sup> Centre for Phytochemistry, Southern Cross University, Lismore, Australia

## ABSTRACT

The leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau have long been traditionally used in Thailand as an anti-inflammatory drug for the treatment of insect bites, herpes infection and allergic responses. A crude chloroform extract was separated by means of chromatographic and bioactivity-guided fractionation techniques to give eight pure compounds. Structure elucidation of the isolated compounds was carried out on the basis of spectral analyses, including DEPT, COSY, NOESY, HMQC and HMBC. These eight compounds were related to chlorophyll a and chlorophyll b namely 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-chlorophyll b (1), 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-chlorophyll b (2), 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-phaeophytin b (3), 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-phaeophytin b (4), 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-phaeophytin a (5), 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-phaeophytin a (6), purpurin 18 phytyl ester (7) and phaeophorbide a (8). Five of these (compounds 1, 2, 4, 5, 6) were identified as novel compounds. These compounds have not been previously reported in this species. Further studies on the antiviral activity of the isolated compounds are in progress.

**Keywords:** *Clinacanthus nutans* Lindau, chlorophyll a and chlorophyll b related compounds, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-chlorophyll b, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-chlorophyll b, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-phaeophytin b, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-phaeophytin b, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-phaeophytin a, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-phaeophytin a, purpurin 18 phytyl ester, phaeophorbide a.

## องค์ประกอบทางเคมีของใบพญาขอ

สันติ ศักดารัตน์<sup>1</sup> ทวีผล เดชาดิวงษ์ ณ อยุธยา<sup>2</sup> อัครชัย ช่วยพรม<sup>2</sup> ปีเตอร์จี วอเตอร์แมน<sup>3</sup>  
กลอเรีย คารากิเอนิส<sup>3</sup>

<sup>1</sup> สาขาวิชาเคมี สำนักวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา

<sup>2</sup> สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี

<sup>3</sup> Centre for Phytochemistry, Southern Cross University, P.O.Box 151 Lismore, NWS 2480, Australia.

### บทคัดย่อ

ใบพญาขอเป็นพืชสมุนไพรที่นิยมใช้กันในอดีตจนถึงปัจจุบัน มีสรรพคุณในการรักษาอาการอักเสบอันเนื่องมาจากพิษสัตว์แมลงกัดต่อย โรคเรื้อรัง โรคผิวหนัง และอาการแพ้ต่างๆ เมื่อนำส่วนสกัดด้วยคลอโรฟอร์มของใบพญาขอมาแยกด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีได้สารบริสุทธิ์ 8 ชนิด จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสารทั้งหมดที่แยกได้โดยใช้ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (DEPT, COSY, NOESY, HMQC และ HMBC) พบว่าเป็นสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับคลอโรฟิลล์ เอ และคลอโรฟิลล์ บี คือ 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-S)-chlorophyll b (1), 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-R)-chlorophyll b (2), 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-S)-phaeophytin b (3), 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-R)-phaeophytin b (4), 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-S)-phaeophytin a (5), 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-R) phaeophytin a (6), purpurin 18 phytol ester (7) and phaeophorbide a (8) ซึ่งสารประกอบหมายเลข 1, 2, 4, 5, 6 ยังไม่มีรายงานว่าพบในพืชนี้มาก่อน และการทดสอบฤทธิ์ต้านไวรัสของสารเหล่านี้ กำลังอยู่ในระหว่างทำการวิจัยทดสอบฤทธิ์อยู่

### INTRODUCTION

*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau is an often cultivated small shrub, native to tropical Asia. Fresh leaves of *C. nutans* has long been used in Thailand by traditional doctors to treat skin rashes, insect and snake bite as well as herpes simplex virus (HSV), and varicella-zoster virus (VZV) lesions. Extracts from the leaves were reported to possess analgesic and anti-inflammatory activities (Satayavivad, *et al.*, 1996), antiviral activities against varicella-zoster virus (Thawaranantha, *et al.*, 1992) and herpes

simplex virus type-2 (Jayavasud, *et al.*, 1992a). Clinical trials in patients with genital herpes are also reported (Jayavasud, *et al.*, 1992b) and (Sangkitjaporn, *et al.*, 1995). Clinical trials have shown the successful use of a *C. nutans* preparation (cream or lotion) for the relief of minor skin inflammation, insect bites, treatment of genital herpes and varicella-zoster lesions in patients (Charuwichitratana, *et al.*, 1996), however, negative results have also been reported (Yoosook, *et al.*, 1999).



*C. nutans* has been phytochemically and chemically investigated previously for stigmastanol (Dampawan, 1976), lupeol,  $\beta$ -sitosterol (Dampawan, *et al.*, 1977), belutin (Lin, *et al.*, 1983). Six known C-glycosyl flavones, vitaxin, isovitexin, shaftoside, isomollupentin-7-O- $\beta$ -glucopyranoside, orientin, isoorientin (Teshima, *et al.*, 1997), five sulfur-containing glycosides (Teshima, *et al.*, 1998), two glycolipids (Satakhun, *et al.*, 2001), a mixture of nine cerebroside and a monoacylmonogalatosylglycerol (Tuntiwachwuttikul, *et al.*, 2004), have been isolated. However, only the two glycolipids have been shown to exhibit antiviral activity.

This present article deals with the preliminary study at the Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Ministry of Public Health on antiviral compounds isolated from this plant using bioassay-guided fractionation. The most antiviral active fractions were selected for further antiviral-guided fractionation by means of chromatographic techniques. This led to the isolation of eight pure compounds which were identified as chlorophyll a and chlorophyll b related compounds by spectroscopic methods. Chlorophyll related compounds isolated from plants and marine organisms have been shown to possess antioxidative activity (Sakata, *et al.*, 1990; Watanabe, *et al.*, 1993). Further studies on the antiviral activity of the isolated compounds are in progress.

## MATERIAL AND METHODS

### General

The  $^1\text{H}$  NMR data for compounds 1-8 are shown in Table 1 and the  $^{13}\text{C}$ -NMR data compounds 1-8 are shown in Table 2. The NMR spectra were run in  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  at room temperature on a Bruker 500 MHz spectrometer. HMBC and HMQC spectra were recorded on a Bruker 500 MHz spectrometer.

Silica gel 60 for column chromatography, 70-230 mesh, silica gel GF<sub>254</sub> for thin layer chromatography, silica gel 60 PF<sub>254</sub> for preparative layer chromatography (E. Merck, Germany) and solvents of technical grade were used. Anisaldehyde-sulfuric acid spraying reagent (modification b) was prepared according to the method of Stahl (1965).

### Plant material

Fresh aerial parts of *C. nutans* (Burm.f.) Lindau (Family Acanthaceae) were collected during October to December 1998, from Bangkok, Chanthaburi and Nakhon Pathom Provinces of Thailand. The specimens were authenticated by the Botanical Section, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, where a voucher specimens (Bansiddhi 432) was deposited. The leaves were separated from the stems, washed thoroughly and dried in an oven at 50 °C. The dried sample was ground to powder.

### Extraction and Isolation

The dried powdered leaves (4.9 kg) were sequentially extracted with hexane and chloroform, respectively. The chloroform extract was concentrated in vacuo to give a residue (90.5 g) which was chromatographed on a silica gel 60 column. The column was eluted successively with hexane-ethyl acetate (1:1), ethyl acetate, chloroform-ethanol (1:1), and ethanol. Four major fractions (I, 32.92 g; II, 6.50 g; III, 30.51 g and IV, 4.90 g) were obtained by monitoring with TLC (toluene-petroleum ether 35:60 °C-methanol-methyl ethyl ketone 30:60:5:5). All fractions were examined for anti-herpes simplex virus activities by plaque reduction method. Fraction I and II, were selected for further purification. A portion of Fraction I (1.0017 g) was further separated by preparative thin-layer chromatography (hexane-ethyl acetate 7:3) to afford five fractions (A, 0.0450 g; B, 0.0406 g; C, 0.0791 g; D, 0.0697 g and E, 0.1469 g). Fraction A (0.0450 g) was further purified by preparative thin-layer chromatography using the same developing solvent to give crude **compound 1** (0.0105 g) and **compound 2** (0.0098 g), which were recrystallized from methanol (0.0052 g) and (0.0048 g), respectively (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR: Table 1 and 2). Fraction B (0.0406 g) was further purified by preparative thin-layer chromatography using the same developing solvent to give crude **compound 3** (0.0105 g), which was recrystallized from methanol (0.0047 g) (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR: Table 1 and 2). Fraction C (0.0791 g) was further purified by preparative thin-layer chromatography using the same developing solvent to give crude **compound 4**

(0.0136 g) (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR: Table 1 and 2). Fraction D (0.0791 g) was further purified by preparative thin-layer chromatography using the same developing solvent to give crude **compound 5** (0.0117 g) and **compound 6** (0.0113 g), which was recrystallized from methanol (0.0061 g) and (0.0057 g), respectively (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR: Table 1 and 2).

Fraction III (30.51 g) was chromatographed on a silica gel 60 column (855 g), eluting successively with chloroform, followed by chloroform-ethanol gradient. Monitoring by TLC using the same solvent system as mentioned above, five fractions (A, 1.39 g; B, 0.80 g; C, 0.49 g; D, 6.13 g and E, 2.55 g) were obtained. Fraction A (1.39 g) was purified by preparative thin-layer chromatography using chloroform-methanol (9:1) as the developing solvent to give crude **compound 7** (0.3503 g). The crude compound was further purified by preparative thin-layer chromatography using hexane-ethyl acetate (7:3) as the solvent system to provide pure **compound 7** (0.0285 g) (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR: Table 1 and 2). Purification of fraction B (0.80 g) by the preparative thin-layer chromatography, developing with chloroform-methanol (9:1) and recrystallization from chloroform-ethanol yielded **compound 8** (0.0136 g) (<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR: Table 1 and 2). The structures of compounds isolated from the chloroform extract of *C. nutans* leaves were elucidated on the basis of spectral analysis, including DEPT, COSY, NOESY, HMQC and HMBC. The compounds 1-8 were identified as chlorophyll a and chlorophyll b derivatives.

## RESULTS AND DISCUSSION

The dried powdered leaves were extracted in a soxhlet apparatus. The isolation of compounds was performed by column chromatography on a silica gel 60 column eluted with appropriate solvents. Collection of fractions was monitored by TLC on silica gel 60 GF<sub>254</sub> using anisaldehyde-sulfuric acid as a spraying reagent. Further purification of isolated compounds were carried out by PLC on silica gel 60 PF<sub>254</sub>, 1.00 mm thickness to give eight pure compounds (**Compounds 1-8**). Structures of isolated compound were elucidated on the basis of spectral analysis, including DEPT, COSY, NOESY, HMQC and HMBC. By comparison of their NMR data with literature values, compounds 1-8 were identified as chlorophyll a and chlorophyll b related compounds.

Compound 1 was obtained as a bright green powder. The MS (ESI-TOF) mass spectrum of compound 1 showed a molecular ion peak at  $m/z$  923.6 (M+1)<sup>+</sup>; C<sub>55</sub>H<sub>70</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Mg requires 922.5. The <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of compound 1 were found to be closely similar to those of compounds 3 and 4. It was therefore proved to have a chlorin ring system like compounds 3 and 4, except for the lack of two NH protons for chlorin (dihydroporphine) ring. Furthermore, the <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic properties established the presence of three downfield methine protons ( $\delta$  11.01 for H-5,  $\delta$  10.16 for H-10,  $\delta$  8.92 for H-20), methyls attached to C-2, C-12, and C-18, an ethyl at C-8 and an aldehyde at C-7<sup>1</sup> (Tables 1 and 2). The <sup>13</sup>C-NMR spectrum of compound 1 displayed

four carbonyl carbon signals at  $\delta$  194.9, 188.0, 174.0 and 173.5. The absolute configuration at C-13<sup>2</sup> of compound 1 was further confirmed by the observed correlations of H-18<sup>1</sup> to H-13<sup>4</sup> and H-17 to H-13<sup>4</sup> in the NOESY spectrum of compound 1 (Fig. 2). Direct comparison of the <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of compound 1 (Table 1 and 2) with those of the known compound 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-chlorophyll b (Watanabe, *et al.*, 1993) showed that they were closely equivalent indicating that compound 1 is 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-chlorophyll b (Fig. 1).

Compound 2 was obtained as a bright green powder. The MS (ESI-TOF) mass spectrum. The <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of compound 2 were found to be closely similar to those of compound 1. Direct comparison of the <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of compound 2 (Table 1 and 2) with those of the known compound 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-chlorophyll b (Watanabe, *et al.*, 1993) showed that they were closely equivalent indicated that compound 2 is 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-chlorophyll b (Fig. 1).

Compound 3 was obtained as a green powder. The IR spectrum present of amine, hydroxyl, and ester functional groups. The absolute configuration at C-13<sup>2</sup> of compound 3 was further confirmed by the observed correlations of H-17<sup>1</sup> to H-13<sup>4</sup> and H-17<sup>2</sup> to H-13<sup>4</sup> in the NOESY spectrum of compound 3 (Fig. 2). These features indicated the structure of compound 3 was similar to the known compound phaeophytin a (Dechatiwongse, *et al.*, 2001) except for the presence of an aldehyde group at C-7<sup>1</sup>. Thus compound 3 was identified as 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-phaeophytin b (Fig. 1).

Compound 4 was obtained as a dark green amorphous solid. The IR,  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data of compound 4 were found to be closely similar to those of compound 3. Direct comparison of the  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data of compound 4 (Table 1 and 2) with those of the known compound 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-phaeophytin b (Matuo, *et al.*, 1996) showed that they were closely equivalent indicated that compound 4 is 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-phaeophytin b (Fig. 1).

Compound 5 was obtained as a green powder. The IR spectrum showed the presence of amine, hydroxyl, and ester functional groups. The absolute configuration at C-13<sup>2</sup> of compound 5 was further confirmed by the observed correlations of H-17<sup>1</sup> to H-13<sup>4</sup> and H-17<sup>2</sup> to H-13<sup>4</sup> in the NOESY spectrum of compound 5 (Fig. 2). These features indicated the structure of compound 5 was similar to the known compound phaeophytin a (Matuo, *et al.*, 1996). Thus compound 5 was identified as 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*S*)-phaeophytin a (Fig. 1).

Compound 6 was obtained as a green powder. The IR,  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data of compound 6 were found to be closely similar to those of compound 5. Direct comparison of the  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data of compound 6 (Table 1 and 2) with those of the known compound 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-phaeophytin a (Matuo, *et al.*, 1996) showed that they were closely equivalent indicated that compound 6 is 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-*R*)-phaeophytin a (Fig. 1).

Compound 7 was isolated as a grayish green solid. The  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra of compound 7 (Tables 1 and 2) closely matched

with those of compound 3 and purpurin 18 (Dechatiwongse, *et al.*, 2001). The  $^1\text{H-NMR}$  data comparison showed similarity to purpurin 18 with an extra phytyl ester proton side chain. Thus compound 7 was identified as purpurin 18 phytyl ester (Fig. 1).

Compound 8 was isolated as dark green powder. The  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra of compound 8 (Tables 1 and 2) showed similarity to that of the known compound phaeophorbide a methyl ester (Dechatiwongse, *et al.*, 2001). The  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound 8 however, lacked the methyl ester signal at  $\delta$  3.57 (Table 1). The HMBC spectrum of compound 8 (Fig. 3) showed the interaction via multiple bonds between C and H giving the support to the assignments. Thus compound 8 was identified as phaeophorbide a (Fig. 1).

In conclusion, we have discovered the antiviral chlorophyll a and chlorophyll b related compounds from *C. nutans*, an important Thai medicinal plant used for herpes infections in primary health care. By using suitable analytical methods, these compounds will be further used as markers for qualitative control of the preparations made from the plant extract. Further studies on the antiviral activity and the use of these compounds as markers are being conducted at the Department of Medical Science Ministry of Public Health.

วารสารสมุนไพร ปีที่ 13(2) พ.ศ. 2549 - 15(1) มี.ย. 2551

Table 1 <sup>1</sup>H-NMR chemical shifts of the compounds 1-8

Proton	Chemical Shifts in ppm (Coupling Constant in Hz)								
	1		2	3	4	5	6	7	8
2 <sup>1</sup>	3.27	<i>s</i>	3.27	3.45	3.35	3.61	3.40	3.32	3.38
3 <sup>1</sup>	8.26	<i>dd, J =</i> 11.65,10.9	8.26	8.18	8.19	7.85	8.10	8.10	8.22
3 <sup>2</sup> ( <i>E</i> )	6.49	<i>dd, J =</i> 17.8, 2.5	6.49	6.54	6.54	6.41	6.37	6.41	6.40
3 <sup>2</sup> ( <i>Z</i> )	6.06	<i>dd, J =</i> 12.6, 2.5	6.06	6.21	6.21	6.25	6.18	6.20	6.21
5	10.91	<i>s</i>	10.91	11.01	11.00	9.91	9.70	9.66	9.73
7 <sup>1</sup>	11.57	<i>s</i>				3.29	3.19	3.17	3.26
8 <sup>1</sup>	4.18	<i>q, J = 7.65</i>	11.57	11.48	11.50	4.18	4.19	4.22	3.76
8 <sup>2</sup>	1.75	<i>t, J = 7.55</i>	4.18	4.19	4.22	3.76	3.66	3.71	3.75
10	10.06	<i>s</i>	1.75	1.81	1.83	1.73	1.68	1.69	1.71
12 <sup>1</sup>	3.68	<i>s</i>	10.06	10.16	10.16	9.76	9.88	9.89	9.90
13 <sup>2</sup> -H		<i>s</i>	3.68	3.72	3.70	3.87	3.73	3.84	3.69
13 <sup>2</sup> -OH	6.48	<i>s</i>							
13 <sup>4</sup> -OMe	3.74	<i>s</i>	6.46	6.52	6.20	5.53	5.35		
17	5.14	<i>m</i>	3.74	3.85	3.85	3.69	3.71		3.93
18	4.49	<i>dq, J = 7.3</i>	5.54	5.23	5.41	5.24	5.77	5.46	4.59
18 <sup>1</sup>	1.56	<i>d, J = 6.95</i>	4.50	4.67	4.60	4.41	4.60	4.67	4.66
20	8.55	<i>s</i>	1.56	1.74	1.71	1.61	1.74	1.74	1.86
21-NH		<i>(br,s)</i>	8.57	8.92	8.89	8.74	8.93	8.84	8.86
23-NH		<i>(br,s)</i>		-1.33	-1.32	-0.89	-1.48	0.11	-1.30
				0.66	0.68	0.78	0.67	0.38	0.89

Table 2  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts of the compounds 1-8

Carbon	1	2	3	4	5	6	7	8
1	148.7	148.6	144.0	150.0	142.6	142.6	144.8	142.7
2	149.5	149.5	133.5	135.5	132.8	132.8	133.0	133.0
2 <sup>1</sup>	12.8	12.8	12.4	12.1	12.4	12.5	12.3	12.5
3	140.9	140.8	137.5	135.5	136.8	136.7	137.9	137.8
3 <sup>1</sup>	130.9	130.9	129.5	124.3	129.9	129.8	129.3	129.9
3 <sup>2</sup>	120.8	120.7	123.0	121.5	123.4	123.3	123.0	123.0
4	137.3	137.1	137.4	136.0	136.3	136.8	138.0	137.3
5	104.5	104.2	102.6	104.9	98.7	98.6	104.0	90.3
6	156.6	156.4	160.2	152.0	155.9	156.1	157.2	156.4
7	132.2	131.9	138.8	134.3	137.4	137.4	137.5	137.3
7 <sup>1</sup>	188.8	188.7	188.0	191.7	11.5	11.5	11.4	11.6
8	143.3	143.5	148.2	149.7	146.2	146.0	147.0	146.1
8 <sup>1</sup>	19.9	19.8	19.6	18.7	19.1	19.3	20.0	20.0
8 <sup>2</sup>	19.9	19.6	19.6	18.7	18.0	18.0	20.0	20.0
9	156.4	156.2	151.8	150.2	152.0	151.9	151.4	152.0
10	110.5	109.9	108.2	114.6	105.2	105.1	108.9	105.5
11	139.4	139.3	138.1	135.9	137.9	138.6	132.5	138.8
12	131.4	131.0	138.8	135.7	129.7	129.9	140.8	129.7
12 <sup>1</sup>	12.8	12.9	12.5	12.3	12.5	12.4	12.7	12.3
13	149.0	149.1	128.8	135.8	128.3	128.1	112.7	130.1
13 <sup>1</sup>	195.4	195.3	194.9	196.5	194.6	194.7	160.1	190.3
13 <sup>2</sup>	92.2	92.4	91.3	92.1	91.1	91.2	165.0	65.9
13 <sup>3</sup>	175.0	174.4	174.0	172.8	174.2	173.5		170.8
13 <sup>4</sup>	53.3	53.4	53.6	54.9	53.1	53.1		53.1
14	163.2	163.8	151.1	150.4	150.7	150.7	140.0	150.5
15	110.7	109.2	111.0	106.0	111.7	111.2	94.0	106.9
16	160.1	160.4	166.8	162.5	163.5	163.5	178.3	163.0
17	50.8	50.4	51.5	51.8	51.7	51.3	56.0	52.5
17 <sup>1</sup>	31.1	31.0	32.4	31.1	31.1	32.4	32.4	31.2
17 <sup>2</sup>	31.6	31.0	32.7	31.6	32.3	32.7	33.6	32.9
17 <sup>3</sup>	173.5	173.3	173.5	173.6	173.9	173.9	173.6	177.8
18	50.6	50.3	51.1	50.3	51.1	51.1	49.8	50.9
18 <sup>1</sup>	23.3	23.3	23.3	22.7	23.1	23.1	24.4	23.6
19	170.4	171.7	175.6	178.7	173.5	173.0	177.7	173.8
20	94.1	94.2	95.1	95.1	94.9	91.8	96.2	94.6

วารสารสมุนไพร ปีที่ 13(2) ธ.ค. 2549 - 15(1) มี.ย. 2551

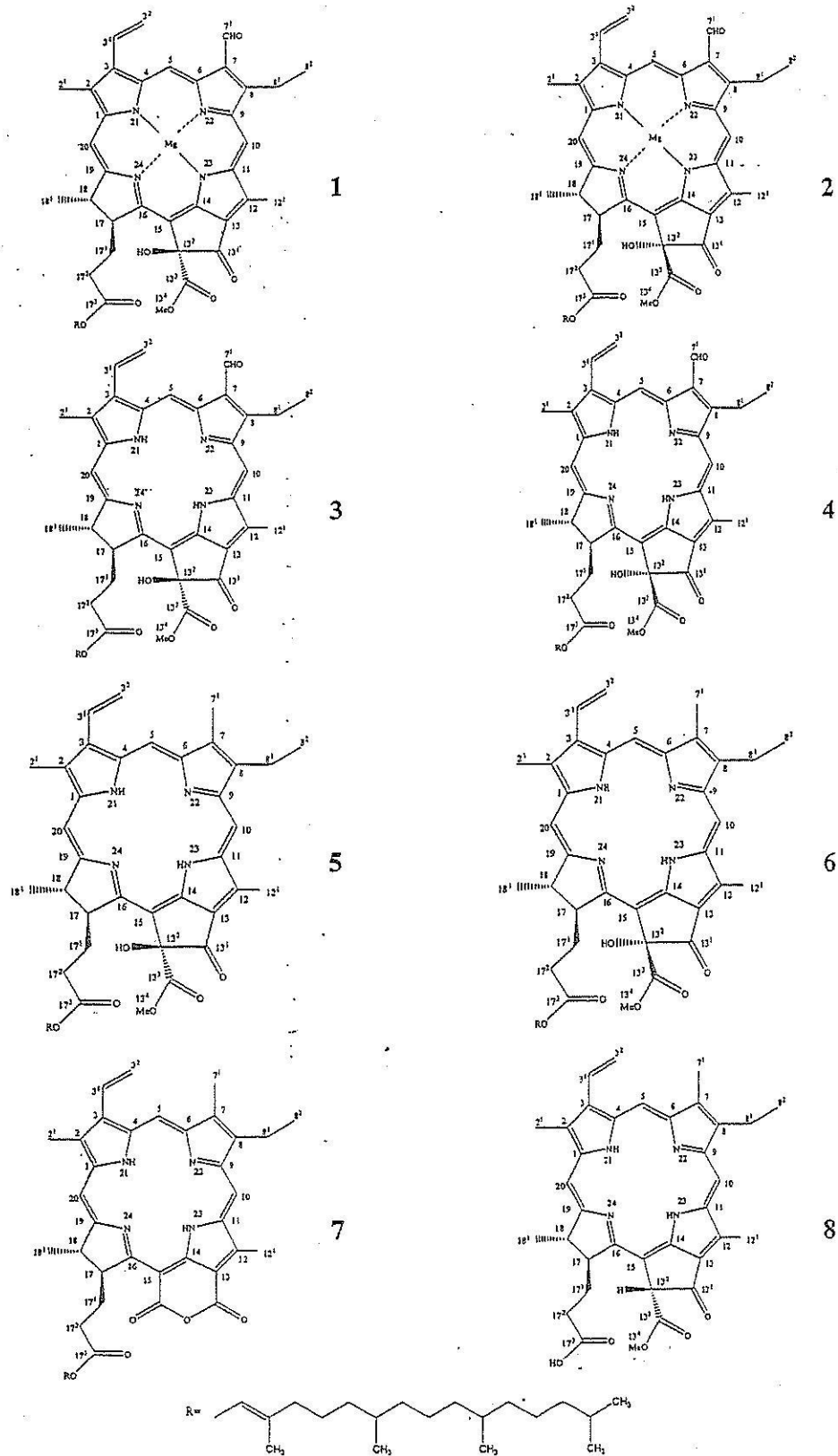


Fig. 1 Structure of compounds 1-8

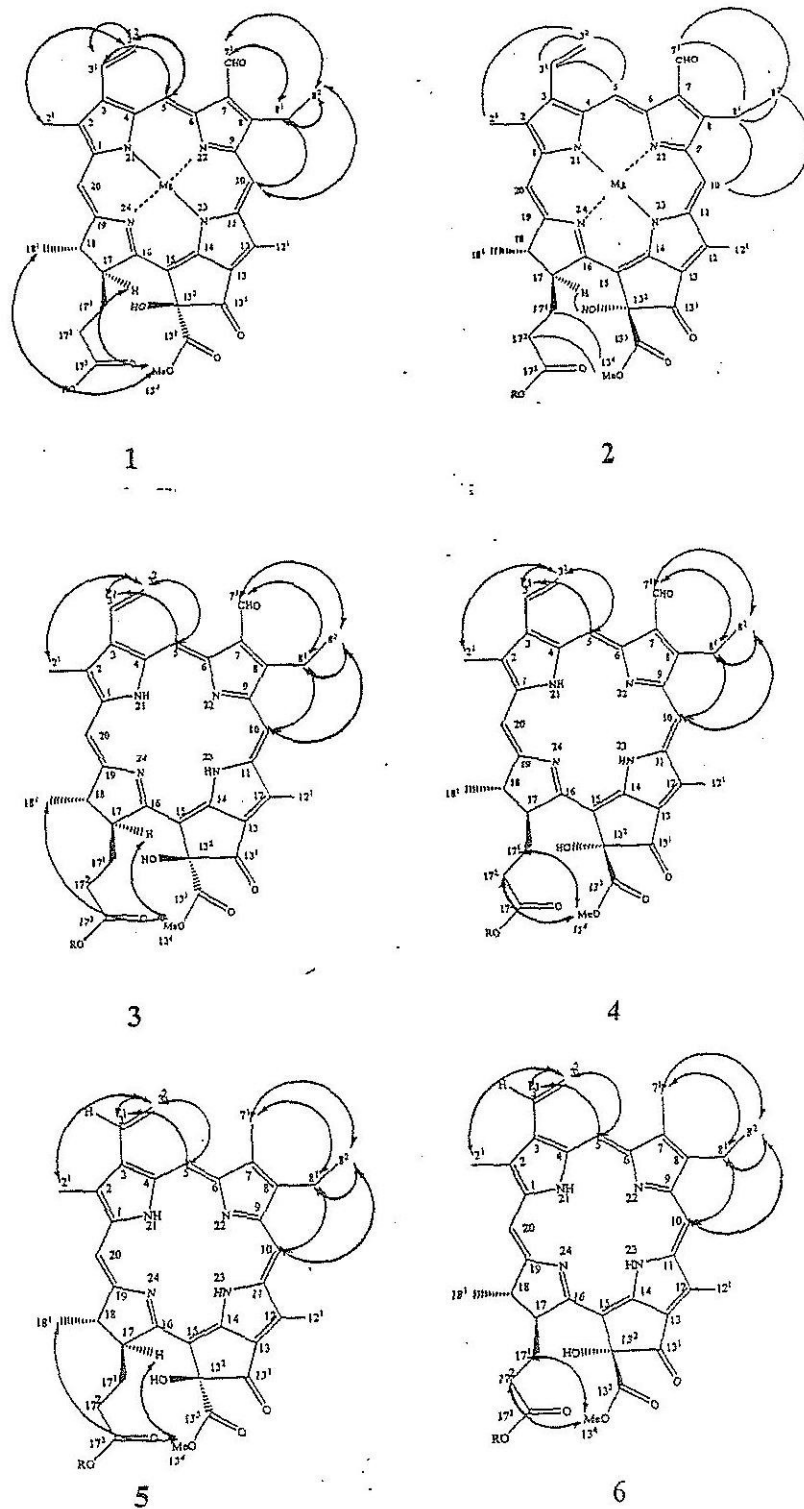


Fig. 2 The NOESY correlations of compounds 1, 2, 3, 4, 5 and 6



วารสารสมุนไพร ปีที่ 13(2) พ.ศ. 2549 - 15(1) มี.ย. 2551

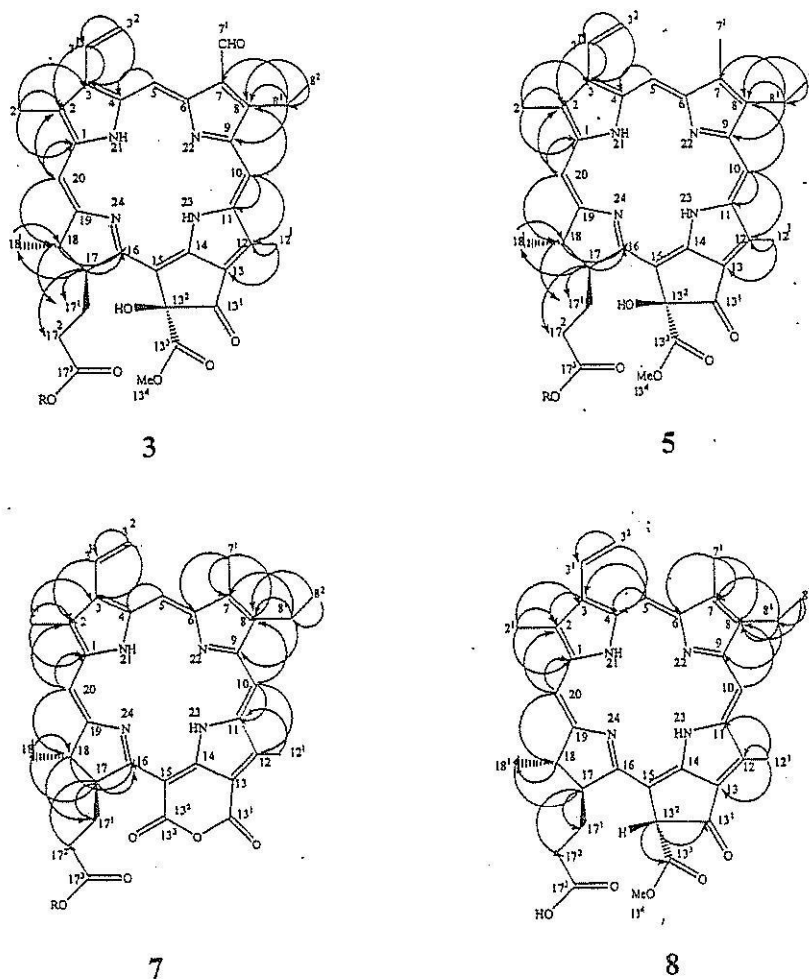


Fig. 3 The HMBC correlations of compounds 3, 5, 7 and 8

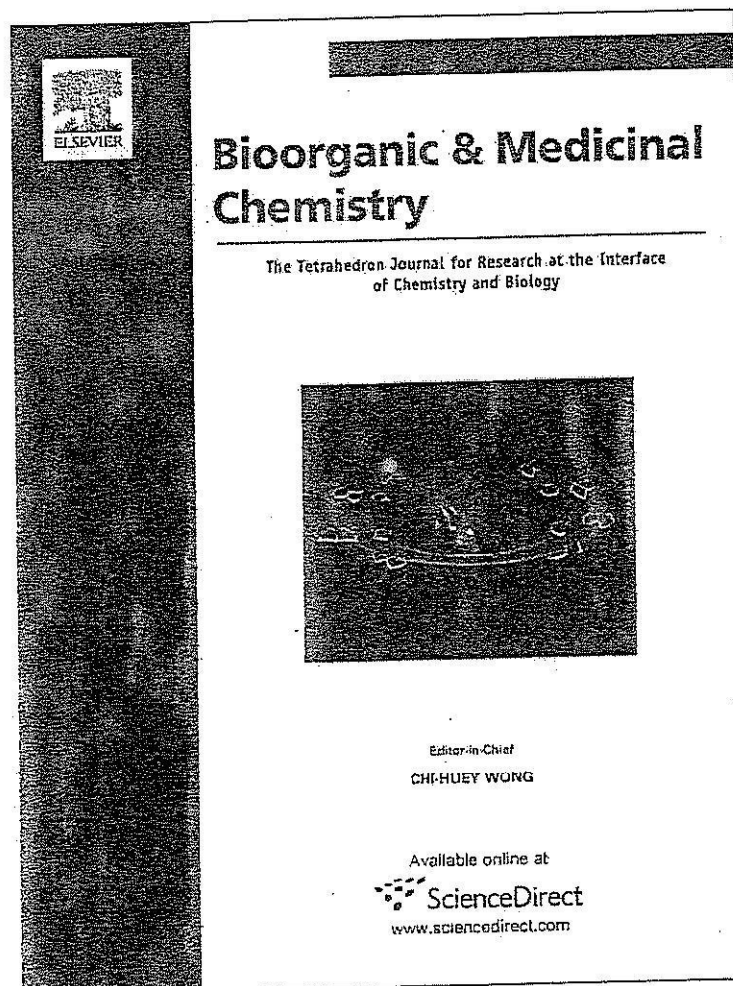
#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the following persons and institutions for their invaluable assistance in carrying out this study: Suranaree University of Technology Research Fund; National Research Council of Thailand; Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; The Ministry of University Affairs and Centre for Phytochemistry; Southern Cross University, Australia, for the generous support of the research programme; Dr. Pakdee Pothisiri, Director

General and Dr. Sathaporn Wongjaroen, Deputy Director General, Department of Medical Sciences, for their interest; Mr. Prathom Thongsrirak and Miss Jaree Bansiddhi, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences for the supply of plant material, Miss Pichitra Mekprayoon, Miss Duangpen Pattamadilok and Mr. Noppadorn Mettamehtar for their technical assistance.

## References

- Charuwichitratana S, Wongrattanapasson N, Timpatanapong P, Bunjob M. *Herpes zoster*: treatment with *Clinacanthus nutans* cream. *Int J Dermatol* 1996;35:665-6.
- Dampawan P, Huntrakul C, Reutrakul V. Constituents of *Clinacanthus nutans* and the crystal structure of LUP-20(29)-ene-3-one. *J Sci Soc Thailand* 1977;3:14-26.
- Dampawan P. Studies of the chemical constituents of *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae) and *Zingiber cassumunar* Roxb. Master thesis, Mahidol University, Bangkok, Thailand. 1976.
- Dechatiwongse Na Ayudhya T, Sakdarat S, Shuyprom A, Pattamadilok D, Bansiddhi J, Waterman PG, Karagianis G. Chemical constituents of the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. *Thai J Phytopharm* 2001;8(1):1-8.
- Hynninen PH, Leppakases TS, Mesilaakso M. The enolate anions of chlorophylls a and b as ambident nucleophiles in oxidations with (L)- or (D)-(10-camphor-sulfonyl)oxaziridine. Synthesis of 132(S/R)-hydroxy-chlorophylls a and b. *Tetrahedron* 2006;62:3412-22.
- Jayavasu C, Balachandra K, Sangkitjaporn S. Clinical trial in the treatment of genital herpes patients with *Clinacanthus nutans* extract. *Com Dis J* 1992;18:152-61.
- Jayavasu C, Dechatiwongse T, Balachandra K. The virucidal activity of *Clinacanthus nutans* Lindau extract against *Herpes simplex virus type-2*: an in vitro study. *Bull Dept Med Sci* 1992;34:153-8.
- Lin J, Li HM., Yu JG. Studies on the chemical constituents of niu xu hua (*Clinacanthus nutans*). *Zhongcaoyao* 1983;14:337-8.
- Matuo A, Ono K, Hamasaki K, Nozaki, H. Phaeophytins from cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. *Phytochemistry* 1996;42(2):427-30.
- Sakata K, Yamamoto K, Ishikawa H, Yagi A, Etoh H, Ina K. Chlorophyllone-a, a new pheophorbide-A related compound isolated from *Ruditapes Philippinarum* as an antioxidative compound. *Tetrahedron Lett* 1990;31:1165-8.
- Sangkitporn S, Balachandra K, Bunjob M, Chaiwat S, Dechatiwongse Na Ayudhya T, Jayavasa C. Treatment of *Herpes zoster* patients with *Clinacanthus nutans* (bi phyya yaaw). *J Med Assoc Thailand* 1995;78:624-7.
- Satakhun S. Chemical Constituents of *Clinacanthus nutans* leaves. Master thesis, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. 2001.
- Satayavivad J, Bunyaoraphatsara N, Kitisiripornkul S, Tanasomwang W. Analgesic and anti-inflammatory activities of extract of *Clinacanthus nutans* Lindau. *Thai J Phytopharm* 1996;3:7-17.
- Teshima K, Kaneko T, Ohtani K. C-glycosyl flavones from *Clinacanthus nutans*. *Natural Medicines* 1997;51:557.
- Teshima K, Kaneko T, Ohtani K. Sulfur-containing glucosides from *Clinacanthus nutans*. *Phytochemistry* 1998;48:831-5.
- Thawaranantha D, Balachandra K, Jongtrakulsiri S, Chavalittumrong P, Bhumiswasdi J, Janyavasu C. *In vitro* antiviral activity of *Clinacanthus nutans* on varicella-zoster virus. *Siriraj Hosp Gaz* 1992;44:285-91.
- Tuntiwachwutikul P, Pootaeng-on Y, Phansa P, Taylor WC. Cerebrosides and a monoacylmonogalactosylglycerol from *Clinacanthus nutans*. *Chem Pharm Bull* 2004;52:27-32.
- Watanabe N, Yamamoto K, Ishikawa H, Yagi A. New chlorophyll-a related compounds isolated as antioxidants from Marine Bivalves. *J Nat Prod* 1993;56:305-17.
- Yoosook C, Panpisutchai Y, Chaichana S, Santisuk T, Reutrakul V. Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. *J Ethnopharmacol* 1999;67:179-87.



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

Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry

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



## Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau

Santi Sakdarat<sup>a,\*</sup>, Aussavashai Shuyprom<sup>b</sup>, Chamsai Pientong<sup>c</sup>,  
Tipaya Ekalaksananan<sup>c</sup>, Sasithorn Thongchai<sup>c</sup>

<sup>a</sup>School of Chemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

<sup>b</sup>Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand

<sup>c</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 October 2008

Revised 23 January 2009

Accepted 24 January 2009

Available online 31 January 2009

#### Keywords:

*Clinacanthus nutans* Lindau  
Chlorophyll a and chlorophyll b related  
compounds  
13<sup>2</sup>-Hydroxy-(13<sup>2</sup>-R)-phaeophytin b  
13<sup>2</sup>-Hydroxy-(13<sup>2</sup>-S)-phaeophytin a  
13<sup>2</sup>-Hydroxy-(13<sup>2</sup>-R)-phaeophytin a  
Anti-herpes simplex activity

### ABSTRACT

Three chlorophyll derivatives (phaeophytins) were isolated from the chloroform extract of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by means of chromatographic techniques and bioactivity-guided fractionation to give three pure compounds. Structure elucidation of the isolated compounds was carried out on the basis of spectral analyses. Three of these were known compounds with structures related to chlorophyll a and chlorophyll b namely 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-R)-phaeophytin b, 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-S)-phaeophytin a and 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-R)-phaeophytin a. These compounds, which have not previously been reported in this plant, were shown to have anti-herpes simplex activity. They exhibited anti-HSV-1F activity at subtoxic concentrations. Their inhibitory activity affected the virus before viral entry to the host cells. This effect might be virucidal or interference with viral adsorption or penetration.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Herpes simplex virus (HSV) is highly infectious and the prevalence of the antibodies to herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in the normal populace was shown to be as high as 60% and 55%, respectively.<sup>1</sup> Acyclovir, the antiviral drug of choice for the treatment of HSV infection, is quite expensive and the consumption of this medicine in Thailand is increasing at approximately 20% annually.

*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau (Thai name: Phaya Yo or Phaya Plong Thong) is a small shrub, native to tropical Asia, and often cultivated. *C. nutans* has long been used in Thailand as a traditional medicine for the treatment of skin rashes, insect and snake-bite, herpes simplex virus (HSV), and varicella-zoster virus (VZV) lesions. Extracts from the leaves were reported to possess analgesic and anti-inflammatory activities,<sup>2</sup> antiviral activities against varicella-zoster virus<sup>3</sup> and herpes simplex virus type-2,<sup>4</sup> Clinical trials in patients with genital herpes are also reported.<sup>5,6</sup> However, negative results have also been reported.<sup>7</sup> Nonetheless clinical trials have reported the successful use of a *C. nutans* preparation (cream or lotion) for the relief of minor skin inflammation and insect bites, including treatment of genital herpes and varicella-zoster lesions in patients.<sup>8</sup>

*C. nutans* has been phytochemically and chemically investigated and previously stigmasterol,<sup>9</sup> lupeol,  $\beta$ -sitosterol,<sup>10</sup> belutin,<sup>11</sup> six known C-glycosyl flavones, vitexin, isovitexin, shaftoside, isomollupentin-7-O- $\beta$ -glucopyranoside, orientin, isoorientin,<sup>12</sup> five sulfur-containing glycosides,<sup>13</sup> two glycoacylglycerols,<sup>14</sup> a mixture of nine cerebrosides and a monoacylmonogalatosylglycerol,<sup>15</sup> have been isolated. Only the two glycoacylglycerols have been shown to exhibit antiviral activity.

The present communication reports a preliminary study initiated by the Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Science, Ministry of Public Health on antiviral compounds from *C. nutans* using bioassay-guided fractionation. The most antivirally active fractions were selected for further antiviral-guided fractionation by means of chromatographic techniques. This led to the isolation of three pure compounds, which were identified as chlorophyll a and chlorophyll b related compounds by spectroscopic methods, and the determination of their anti-HSV-1 activity.

### 2. Results and discussion

The structures of Compounds 1–3 were identified as chlorophyll a and chlorophyll b related compounds as follow (Fig. 1).

Compound 1 was obtained as a dark green amorphous solid. The IR, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR data of 1 were found to be closely similar to those of compound 2. By direct comparison of the <sup>1</sup>H

\* Corresponding author. Tel.: +66 44 224302; fax: +66 44 224185.  
E-mail address: santi@sut.ac.th (S. Sakdarat).

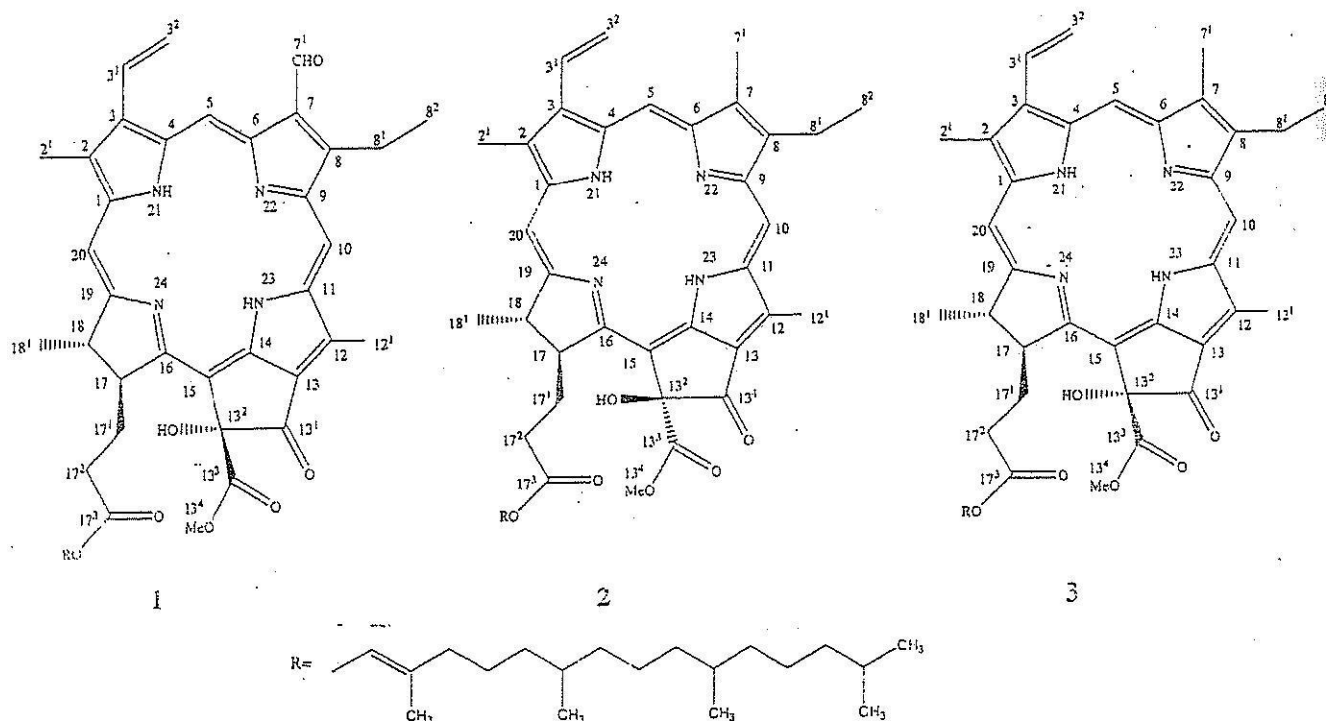


Figure 1. Structure of compounds 1–3.

NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound 1 with those of the known compound 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-S)-phaeophytin b<sup>16,17</sup> they were found to be closely equivalent indicating that compound 1 is 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-R)-phaeophytin b (Fig. 1).

Compound 2 was obtained as a green powder. The IR spectrum display signal of amine, hydroxyl, and ester functional groups. The absolute configuration at C-13<sup>2</sup> of compound 2 was further confirmed by the observed correlations of H-17<sup>1</sup> to H-13<sup>4</sup> and H-17<sup>2</sup> to H-13<sup>4</sup> in the NOESY spectrum of compound 2. These features indicated that the structure of 2 was similar to the known compound phaeophytin a.<sup>18</sup> Thus compound 2 was identified as 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-S)-phaeophytin a (Fig. 1).

Compound 3 was obtained as a green powder. The IR,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR data of 3 were found to be closely similar to those of compound 2. By direct comparison of the  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound 3 with those of the known compound 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-R)-phaeophytin a<sup>18</sup> they were closely equivalent indicating that compound 3 is 13<sup>2</sup>-hydroxy-(13<sup>2</sup>-R)-phaeophytin a (Fig. 1).

To study the anti-HSV-1F activity, all compounds were first subjected to a determination of cell cytotoxicity. Results showed that 5.89, 6.21 and 6.21  $\mu\text{M}$  of compound 1, 2, 3, respectively were the maximal concentration which were not toxic to Vero cells. Subtoxic concentrations of each compound were used in anti-HSV-1F study. DMSO with the same concentrations in diluted compound also did not affect the cell viability.

With respect to the anti-HSV-1F activity, subtoxic concentration of compounds 1, 2 and 3 exhibited 100% inhibition activity as shown in Figure 2. IC<sub>50</sub> of each compound was 1.96, 3.11 and 3.11 nM, respectively. When all three compounds were further evaluated for inhibition step of infection for the pre-viral entry and post-viral entry step, 100% inhibition activity of all compounds was demonstrated in pre-viral entry step (Fig. 2). This inhibitory effect on HSV-1F infectious dose at 1000 PFU/mL was time dependent. Plaque formation was completely inhibited at 30 min of virus-compounds incubation (data not shown). For post-viral en-

try, anti-HSV-1F activity showed about 30% of inhibition. These result suggested that these compounds affected on HSV-1F infection in the step before viral entry.

Compounds 1–3 might interfere with the virion envelope structures or a mask viral glycoproteins, which are necessary adsorption and entry into host cells. The virus might also be directly inactivated by the compounds during incubation. The result is similar to the study by Schuhmacher et al. who showed that virucidal effect of peppermint oil occurs on virus before adsorption of HSV-1 and -2 to RC-37 cells.<sup>19</sup> Liu et al. show anti-HSV-1 effects in pretreatment and treatment during viral infection with GLPG proteoglycan which was extracted and purified from the mycelia of *Ganoderma lucidum*. They suggested that GLPG inhibited viral replication by interfering with the events of viral adsorption and entry into target cells.<sup>20</sup> This suggested that an interaction between chlorophyll a and chlorophyll b related compounds of *C. nutans* and HSV-1 has a different mechanism from ACV, which is the worldwide drug usage for HSV-1 infection.

The three compounds inactivate HSV-1F before cell entry. The mechanisms may be binding of the compounds to viral glycoproteins involved in host cell adsorption and penetration, whereas the mechanism of ACV is interference with the viral DNA polymerase inside the infected cells.<sup>21</sup> Therefore, these compounds may be used in a synergistic treatment of HSV infection in the future.

### 3. Experimental

UV spectra were obtained with a Hewlett Packard 8452A diode array UV–vis spectrophotometer. IR spectra were measured with Perkin–Elmer FT-IR 2000 spectrophotometer (KBr disk method) and Mass spectra were measured on a mass spectrometer (5973 Hewlett–Packard) FAB-MS; glycerol as matrix. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT, COSY, NOESY,  $^1\text{H}$ -MQC, and HMBC spectra were recorded with a Bruker DRX 500 spectrometer in pyridine-*d*<sub>5</sub> solution and chemical shifts are expressed in  $\delta$  (ppm) with reference

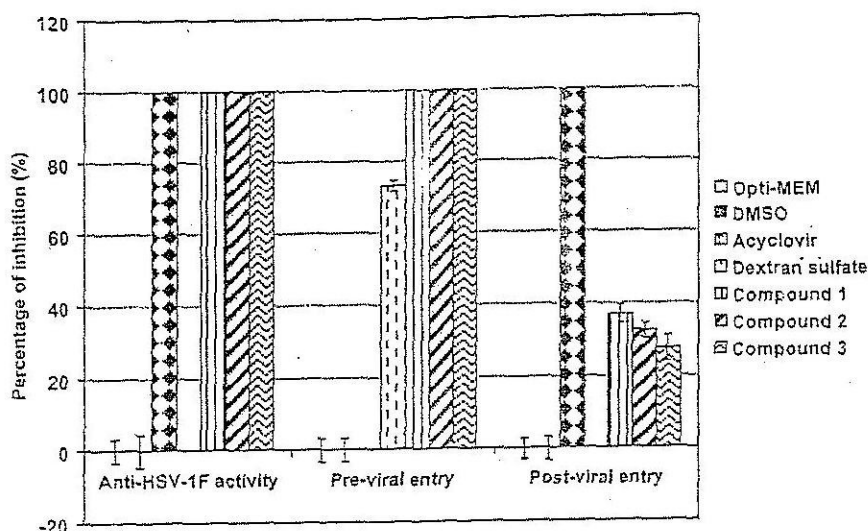


Figure 2. Mode of inhibitory activities of chlorophyll a and chlorophyll b related compounds against HSV-1F during different stages of the viral infection. Virus was treated with the maximal subtoxic concentration of the compounds, acyclovir or dextran sulfate was used as a control in each of experiment. Experiments were repeated independently two times and data presented are the mean of three experiments.

to the solvent signals. Silica gel 60 (70–230 mesh) and silica gel 60 PF 254 were used for column chromatography and preparative thin-layer chromatography, respectively. Solvents of technical grade were used for chromatographic purposes. Anisaldehyde-sulfuric acid spraying reagent (modification b) was prepared according to the method of Stahl (1965).

### 3.1. Plant material

Fresh aerial parts of *C. nutans* (Burm. f.) Lindau (Family Acanthaceae) were collected during October to December. The specimens were authenticated by the Botanical Section, Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, where voucher specimens (Bansiddhi 432) are deposited. The leaves were separated from the stems, washed thoroughly and dried in an oven at 50 °C. The dried sample was ground to powder.

### 3.2. Extraction and isolation

The dried powdered leaves (1.0 kg) were sequentially extracted with hexane and chloroform, respectively. The chloroform extract was concentrated *in vacuo* to give a residue (18.7 g) which was chromatographed on a silica gel 60 column. The column was eluted successively with hexane-ethyl acetate (1:1), ethyl acetate, chloroform-ethanol (1:1), and ethanol. Four major fractions (I, 6.65 g; II, 1.40 g; III, 6.24 g and IV, 0.97 g) were obtained by monitoring with TLC (toluene-petroleum ether-methanol-methyl ethyl ketone 30:60:5:5). All fractions were examined for anti-herpes simplex virus activity by the plaque reduction method. The most antivirally active fractions were selected for further purification. A portion of Fraction I (1.0017 g) was further separated by preparative thin-layer chromatography (hexane-ethyl acetate 7:3) to afford five fractions (A, 0.0450 g; B, 0.0406 g; C, 0.0791 g; D, 0.0697 g and E, 0.1469 g). Fraction C (0.0791 g) was further purified by preparative thin-layer chromatography using the same developing solvent to give crude compound 1 (0.0136 g), which was recrystallized from methanol (0.0065 g). Fraction D (0.0697 g) was further purified by preparative thin-layer chromatography using the same developing solvent to give crude compound 2 (0.0117 g) and compound 3 (0.0113 g), which were recrystallized from methanol (0.0061 g) and (0.0057 g), respectively.

### 3.3. 13<sup>2</sup>-Hydroxy-(13<sup>2</sup>-R)-phaeophytin b (1)

A dark green powder; FABMS  $m/z$  901  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{55}H_{72}N_4O_7$ ); UV/vis ( $CHCl_3$ )  $\lambda_{max}$  nm 412, 438, 520, 600 and 670; FT-IR (KBr)  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 3429, 2925, 2852, 1740, 1721, 1637 and 1300;  $^1H$  NMR and  $^{13}C$  NMR are the same as those published data.<sup>16,17</sup>

### 3.4. 13<sup>2</sup>-Hydroxy-(13<sup>2</sup>-S)-phaeophytin a (2)

A bright green color; FABMS  $m/z$  887  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{55}H_{74}N_4O_6$ ); UV/vis ( $CHCl_3$ )  $\lambda_{max}$  nm 408, 506, 536, 613 and 670; FT-IR (KBr)  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 3430, 2924, 1741, 1620 and 1450;  $^1H$  NMR and  $^{13}C$  NMR are the same as those published data.<sup>18</sup>

### 3.5. 13<sup>2</sup>-Hydroxy-(13<sup>2</sup>-R)-phaeophytin a (3)

A bright green color; FABMS  $m/z$  887  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{55}H_{74}N_4O_6$ ); UV/vis ( $CHCl_3$ )  $\lambda_{max}$  nm 412, 507, 537, 612 and 668; FT-IR (KBr)  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 3429, 2995, 1740, 1617 and 1455;  $^1H$  NMR and  $^{13}C$  NMR are the same as those published data.<sup>18</sup>

### 3.6. Anti-herpes simplex viral activity assay

The plaque reduction assay was employed using Vero cell line (African green monkey kidney cell line) and HSV-1 strain F (HSV-1F). Subtoxic concentrations of the compounds were determined before study of anti-HSV-1F activity. Briefly, Vero cells were seeded in a 96-well tissue culture plate at a density of  $2 \times 10^6$  cells per well and incubated at 37 °C overnight. Then a cell monolayer was cultured in medium with or without serial twofold dilutions of each compound at 37 °C. After 72 h of treatment, cells were washed and stained with 3% crystal violet solution and dried at room temperature overnight. Stained crystal violet was dissolved in DMSO and OD<sub>620</sub> of solution was measured. The percentage of cell viability was evaluated by comparing the OD value of sample to that of a cell control. Subtoxic concentration was the maximal concentration which had OD as the cell control and was used in anti-HSV-1F activity studies.

For the study of anti-HSV-1 activity, 1000 PFU/mL of HSV-1F were incubated with compounds at the subtoxic concentration or acyclovir (5  $\mu$ g/mL) at 37 °C for 60 min. HSV-1F in culture

medium and DMSO diluted to a concentration as in compound were used as viral and solvent control, respectively. After 60 min incubation, 50  $\mu$ L of each mixture were adsorbed on confluent Vero cell at 37 °C for 1 h, subsequently the mixtures were aspirated. The infected cells and non-infected cells were cultured in medium with CMC containing compounds at 37 °C for 72 h. The viral plaques were counted and the percentage of inhibition was calculated as  $(100\% \times (C - T)/C)$ , where  $C$  and  $T$  refer to the plaque number in the absence and presence of the compound, respectively. Compounds which had % inhibitory activity more than 80 were further investigated for the step of inhibition: pre-viral entry or post-viral entry. Each of compounds was diluted in serial twofold dilution and used in the experiment for determination of IC<sub>50</sub>.

In pre-viral entry step, the subtoxic concentration of compounds and dextran sulfate (1 mg/mL) were incubated with 1000 PFU/mL of HSV-1F at 37 °C for various times (10, 30 and 60 min). HSV-1F in cultured medium and DMSO diluted to a concentration as in compound were used as viral and solvent control, respectively. After incubation, 50  $\mu$ L of each mixture was adsorbed on confluent Vero cell and incubated for viral adsorption at 37 °C for 1 h. After virus adsorption, the mixtures were aspirated. The cells were washed and cultured in medium containing CMC at 37 °C for 72 h. The viral plaques were counted and the percentage of inhibitory activities of compounds and dextran sulfate on HSV-1F in pre-viral entry step were calculated.

In the post-viral entry step, the confluent Vero cells were adsorbed with 1000 PFU/mL of HSV-1F at 37 °C for 1 h. After viral adsorption, the excess viruses were aspirated and the cells were washed and cultured in medium with CMC containing subtoxic concentration of compounds. The viral controls were cultured in cultured medium with CMC and acyclovir was used as drug control. After incubation at 37 °C for 72 h, the viral plaques were counted and the percentage of inhibitory activities of compounds were calculated.

In conclusion, we have discovered the inhibitory activities against HSV-1F in pre-viral entry step but not in post-viral entry step of chlorophyll a and chlorophyll b related compounds from *C. nutans* an important Thai medicinal plant used for herpes infections in primary health care. These compounds are shown to have anti-herpes simplex activity for the first time in this plant. By using suitable analytical methods, these compounds will be further used as markers for qualitative control of the preparations made from the plant extract. Further studie on using these compounds as

markers are being conducted at the Department of Medical Science, Ministry of Public Health.

#### Acknowledgements

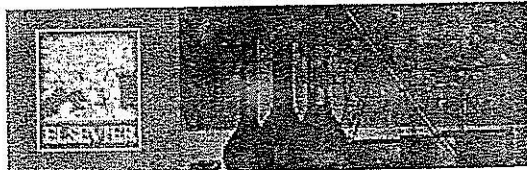
The authors are indebted to the following persons and institutions for their invaluable assistance in carrying out this study: Suranaree University of Technology Research Fund, National Research Council of Thailand, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, The Ministry of University Affairs and Centre for Phytochemistry, Southern Cross University, Australia for the generous support of the research programme, Dr. Pakdee Pothisiri, Director General and Dr. Sathaporn Wongjaroen, Deputy Director General, Department of Medical Sciences, for their interest, Associate Professor Chantana Aromdee, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, for the supply of plant material.

#### References and notes

- Jayavasu, C.; Thavatsupa, P.; Thitvongwarasakul, P. *Bull. Infect. Dis. Thailand* 1981, 1, 1.
- Satayavivad, J.; Bunyaphatsara, N.; Kitisiripornkul, S.; Tanasomwang, W. *J. Phytopharmacy* 1996, 3, 7.
- Thawaranantha, D.; Balachandra, K.; Jongtrakulsiri, S.; Chavalitumrong, P.; Bhumiswasdi, J.; Jayavasu, C. *Siriraj Hosp. Gaz.* 1992, 44, 285.
- Jayavasu, C.; Dechatiwongse, T.; Balachandra, K. *Bull. Dept. Med. Sci.* 1992, 34, 153.
- Jayavasu, C.; Balachandra, K.; Sangkitjaporn, S. *Commun. Dis. J.* 1992, 18, 152.
- Sangkitjaporn, S.; Balachandra, K.; Bunjob, M.; Chaiwat, S.; Dechatiwongse Na Ayudhya, T.; Jayavasu, C. *J. Med. Assoc. Thailand* 1995, 78, 624.
- Yooosook, C.; Panpisutchai, Y.; Chaichana, S.; Santisuk, T.; Reutrakul, V. *J. Ethnopharmacol.* 1999, 67, 179.
- Charuwichitratana, S.; Wongratapanasson, N.; Timpatanapong, P.; Bunjob, M. *J. Dermatol.* 1996, 35, 165.
- Dampawan, P. Master thesis; Mahidol University; Bangkok: Thailand, 1976.
- Dampawan, P.; Huntrakul, C.; Reutrakul, V. *J. Sci. Soc. Thailand* 1977, 3, 14.
- Lin, J.; Li, H. M.; Yu, J. G. *Zhongcaoyao* 1983, 14, 337.
- Teshima, K.; Kaneko, T.; Ohtani, K. *Nat. Med.* 1997, 51, 557.
- Teshima, K.; Kaneko, T.; Ohtani, K. *Phytochemistry* 1998, 48, 831.
- Satakhun, S. Master thesis; Chulalongkorn University; Bangkok: Thailand, 2001.
- Tuntiwachwuttikul, P.; Pootaeng-on, Y.; Phansa, P.; Taylor, W. C. *Chem. Pharm.* 2004, 52, 27.
- Nakatanai, Y.; Ourisson, G.; Beck, J. P. *Chem. Pharm. Bull.* 1981, 29, 2261.
- Hynninen, P. H.; Leppakases, T. S.; Mesitaakso, M. *Tetrahedron* 2006, 62, 3412.
- Matsuo, A.; Ono, K.; Hamasaki, K.; Nozaki, H. *Phytochemistry* 1996, 42, 427.
- Schuhmacher, A.; Reichling, J.; Schnitzler, P. *Phytomedicine* 2004, 10, 504.
- Liu, J.; Yang, F.; Ye, L. B.; Yang, X. J.; Timani, K. A.; Zheng, Y., et al. *J. Ethnopharmacol.* 2004, 95, 265.
- Roizman, B.; Sears, A. E.; In *Fields Virology*; Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Eds.; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1996; pp 2231–2295.

From: "Impact Factors 2008" <stjournals@mail.elsevier-alerts.com>  
 To: "santi@sut.ac.th" <santi@sut.ac.th>  
 Date: 06/26/2009 07:09 PM  
 Subject: Increasing Impact Factors of Elsevier Journals

To display this email in a browser, please click [here](#)



## 2008 IMPACT FACTORS Organic and Inorganic Chemistry

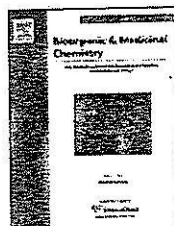
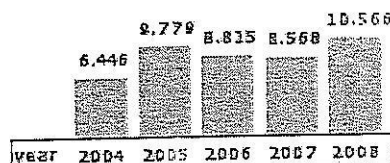
The latest impact factors\* for Organic and Inorganic Chemistry have just been released and highlights include...



Coordination Chemistry Reviews

2007 Impact Factor WAS  
8.568

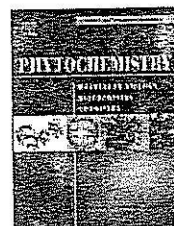
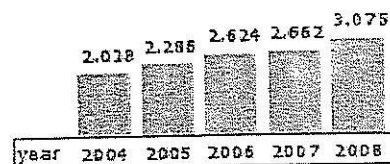
2008 Impact Factor NOW  
10.566



Bioorganic & Medicinal Chemistry

2007 Impact Factor WAS  
2.662

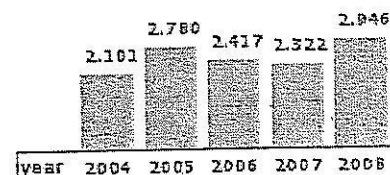
2008 Impact Factor NOW  
3.075



Phytochemistry

2007 Impact Factor WAS  
2.322

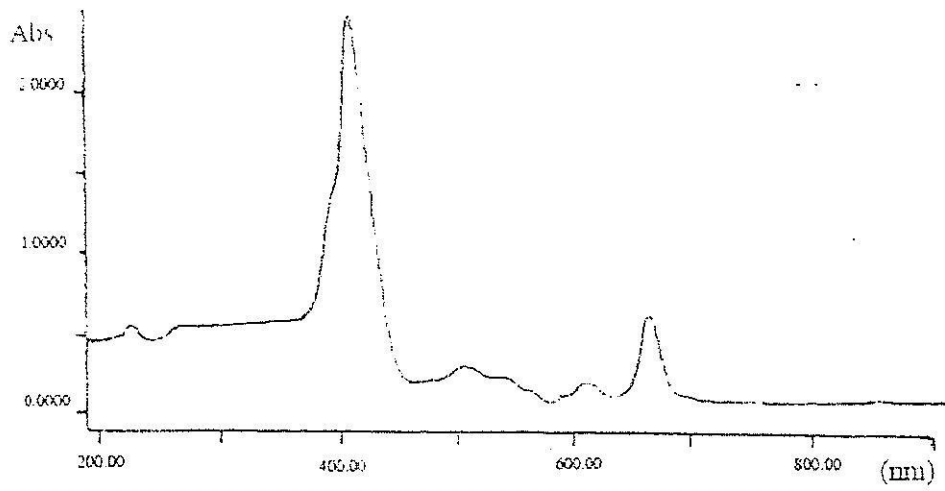
2008 Impact Factor NOW  
2.946



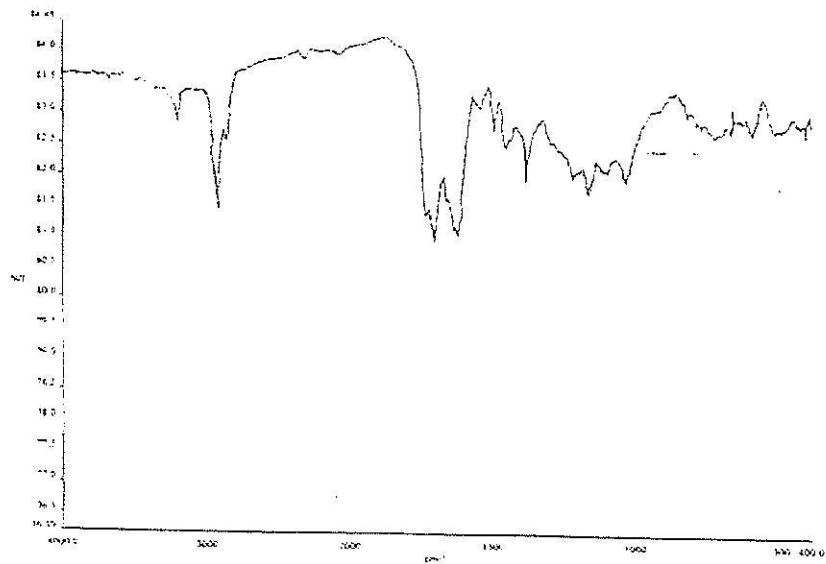
### Listed alphabetically

Journal Title	2008 Impact Factor
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	2.531
Bioorganic Chemistry	1.958
Carbohydrate Research	1.960
Current Opinion in Chemical Biology	7.854
European Journal Of Medicinal Chemistry	2.882
Heterocycles	0.980
Inorganic Chemistry Communications	1.854

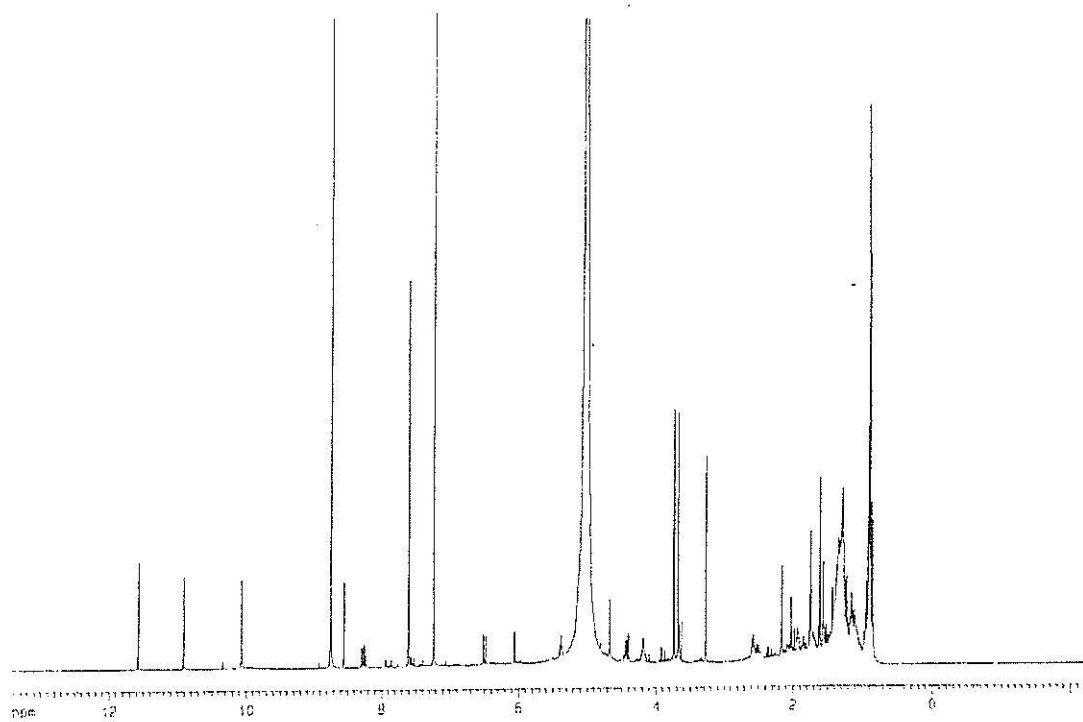




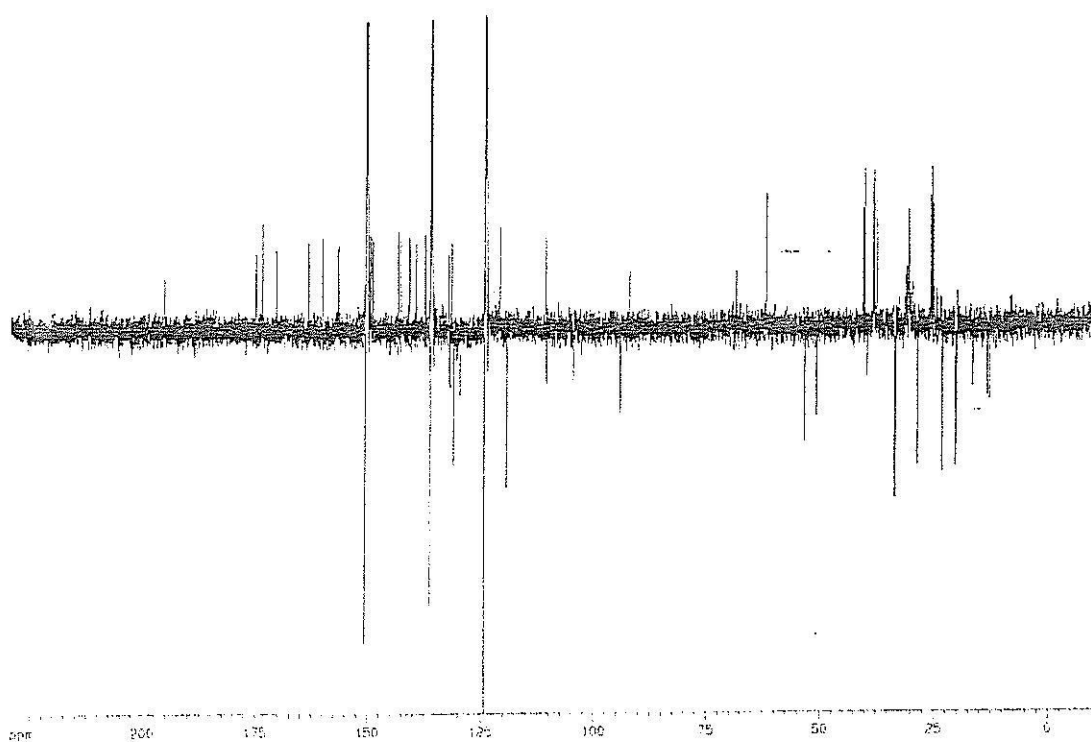
รูปที่ 2 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 1



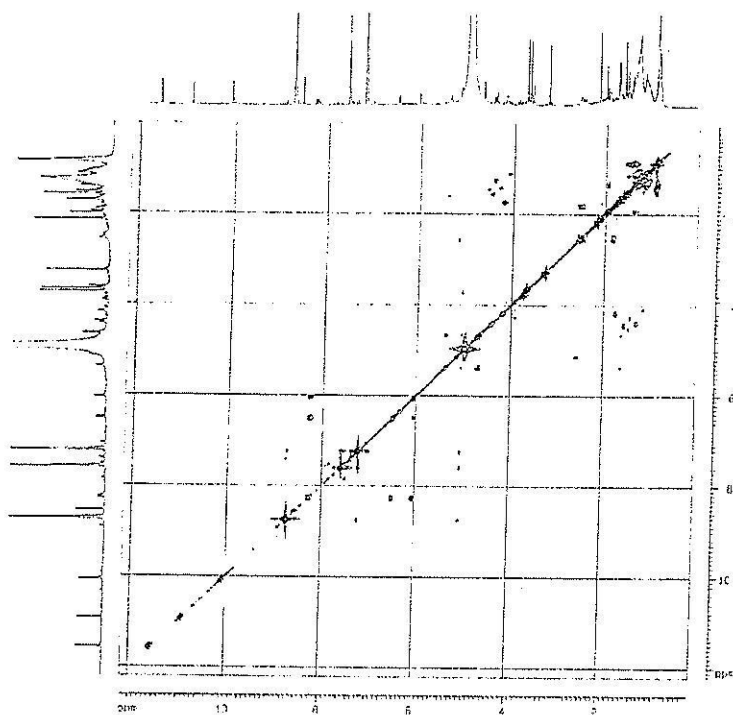
รูปที่ 3 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 1



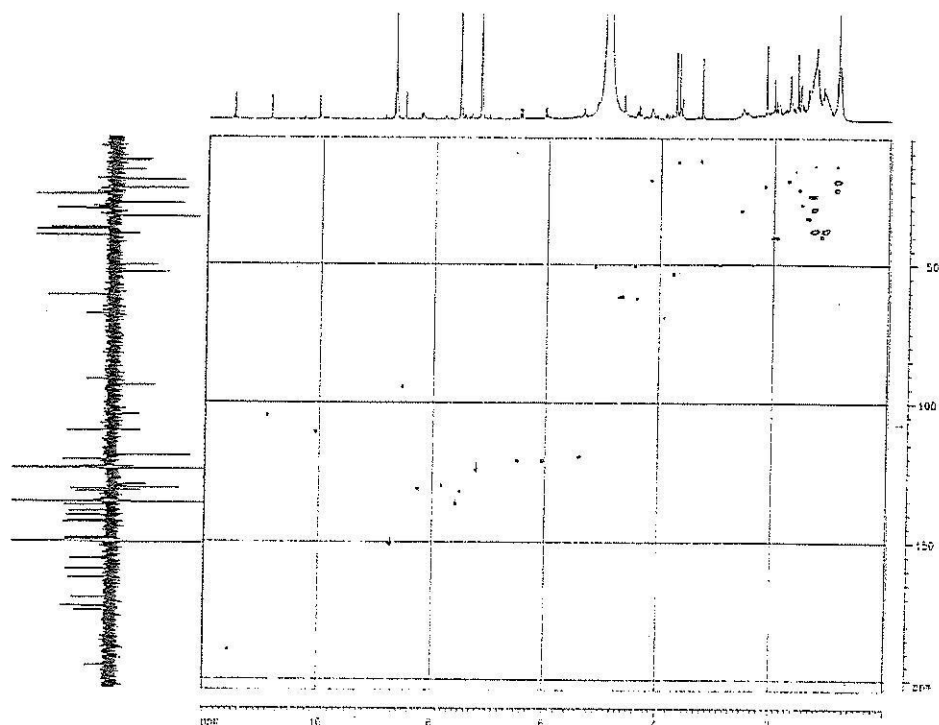
รูปที่ 4 แสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 1



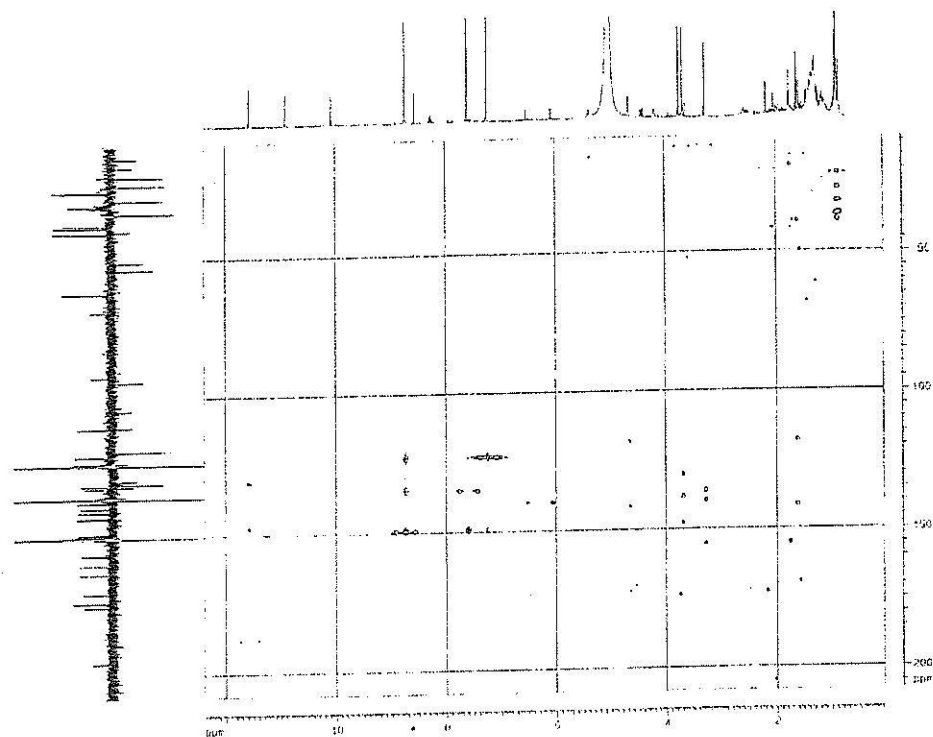
รูปที่ 5 แสดง  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 1



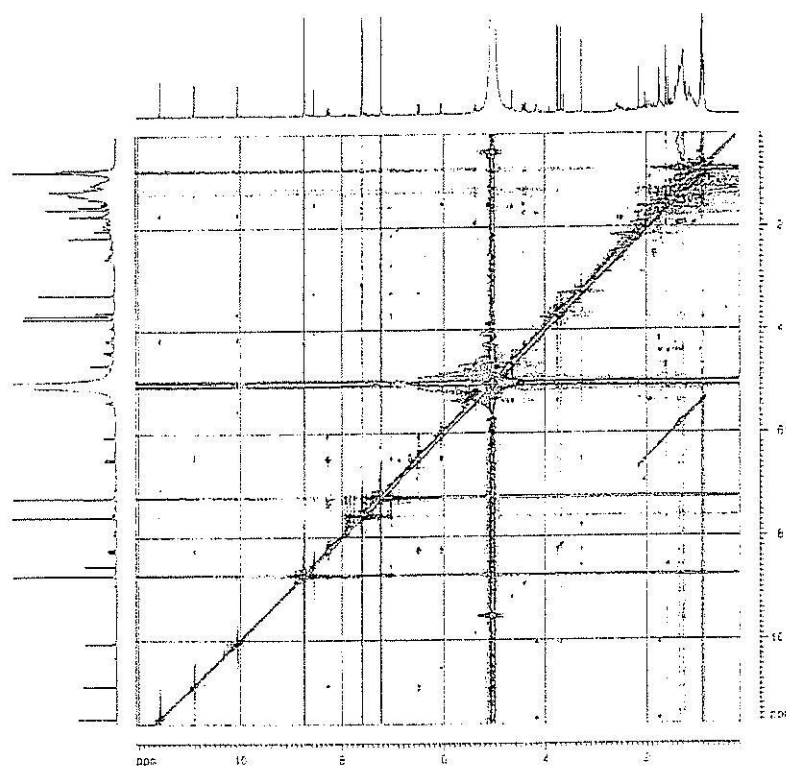
รูปที่ 6 แสดง  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY spectrum ของสารตัวที่ 1



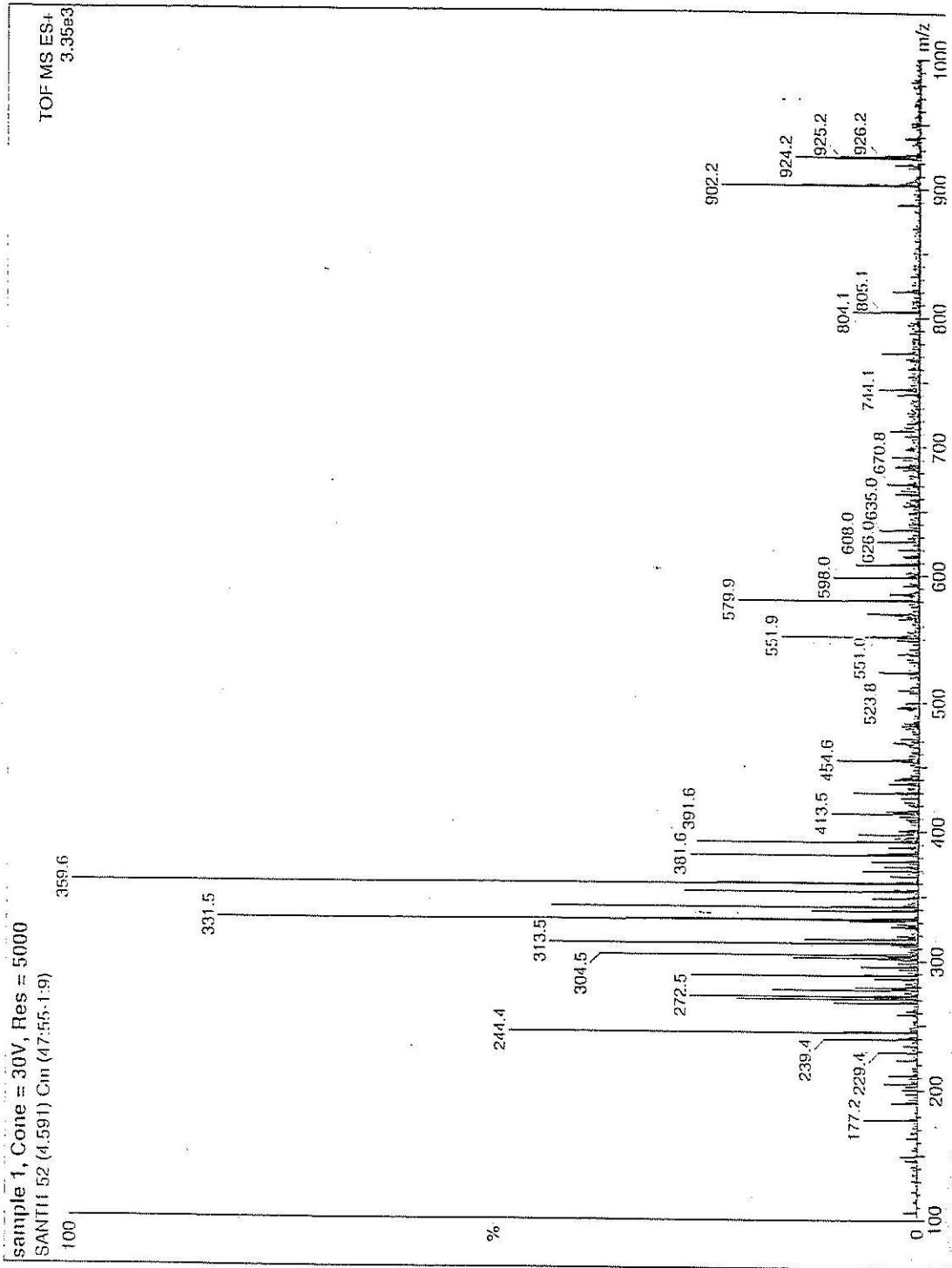
รูปที่ 7 แสดง HMQC spectrum ของสารตัวที่ 1



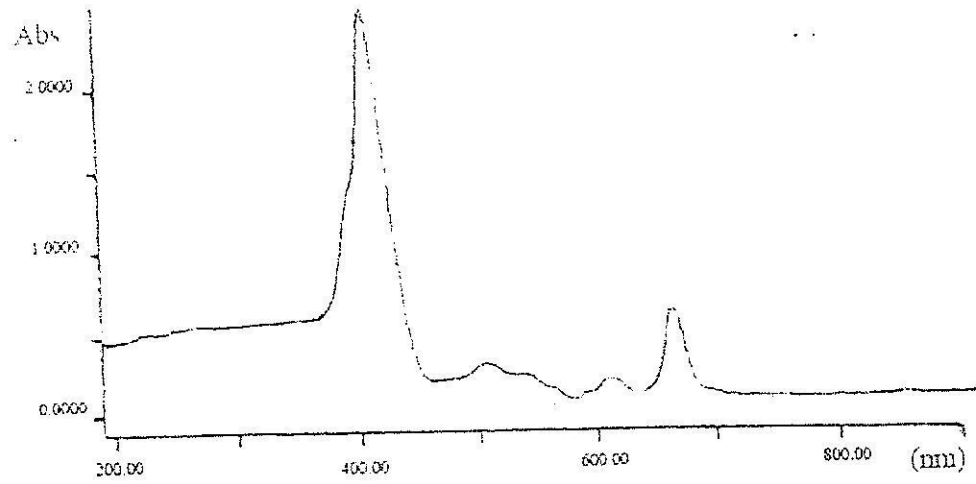
รูปที่ 8 แสดง HMBC spectrum ของสารตัวที่ 1



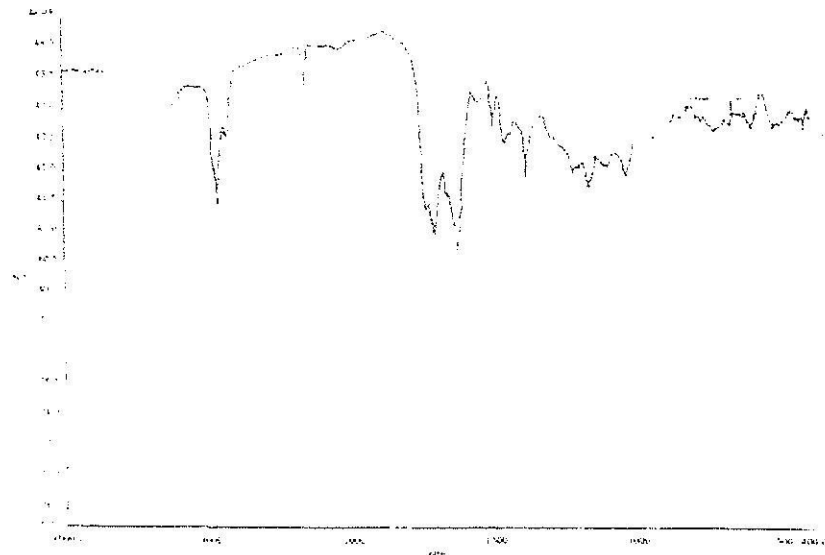
รูปที่ 9 แสดง NOESY spectrum ของสารตัวที่ 1



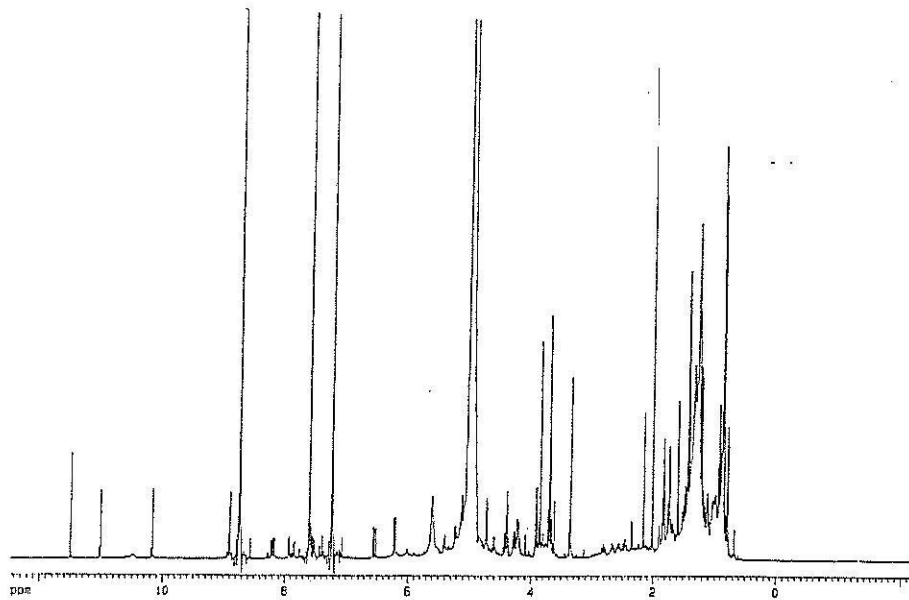
รูปที่ 10 แสดง Mass spectrum ของสารตัวที่ 1



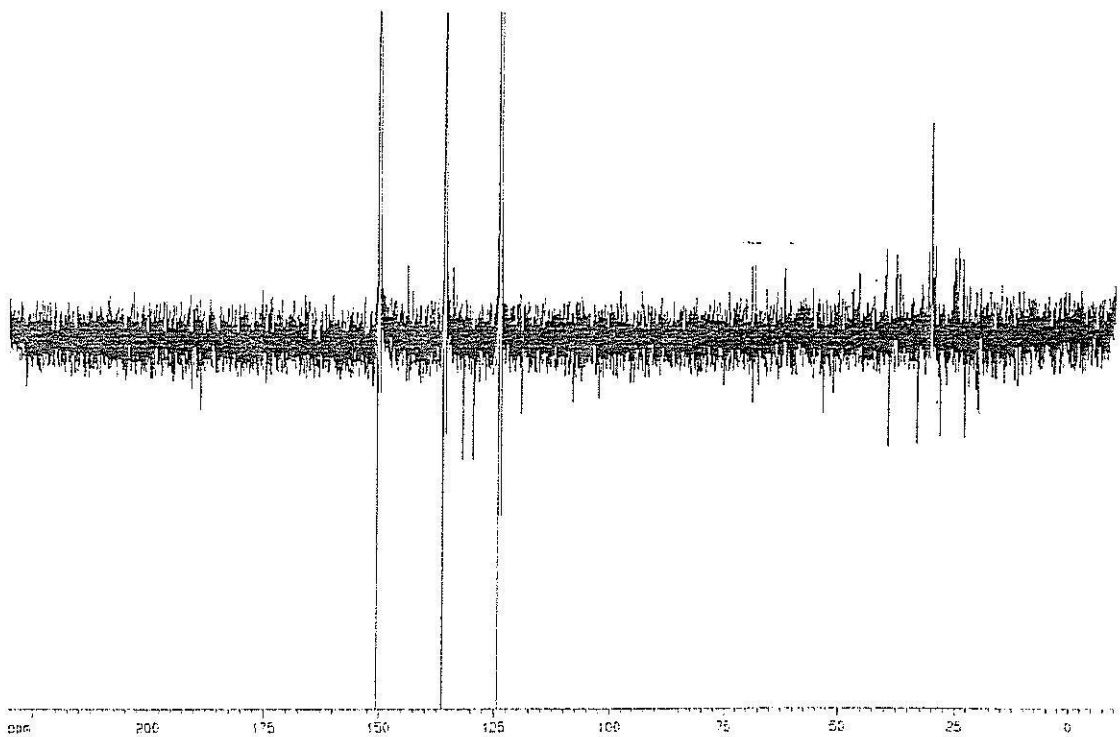
รูปที่ 11 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 2



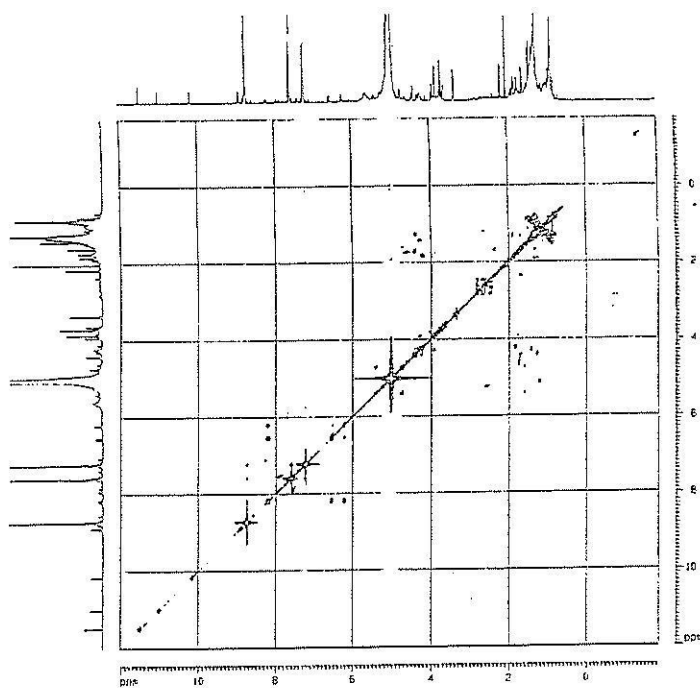
รูปที่ 12 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 2



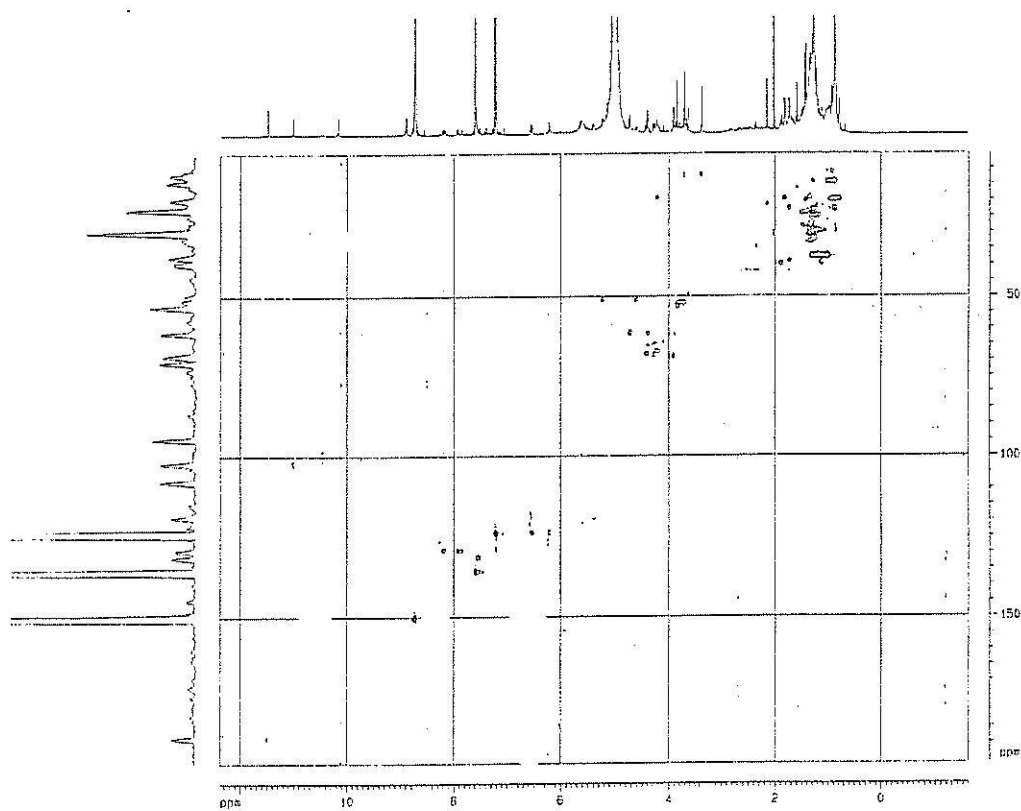
รูปที่ 13 แสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 2



รูปที่ 14 แสดง  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 2

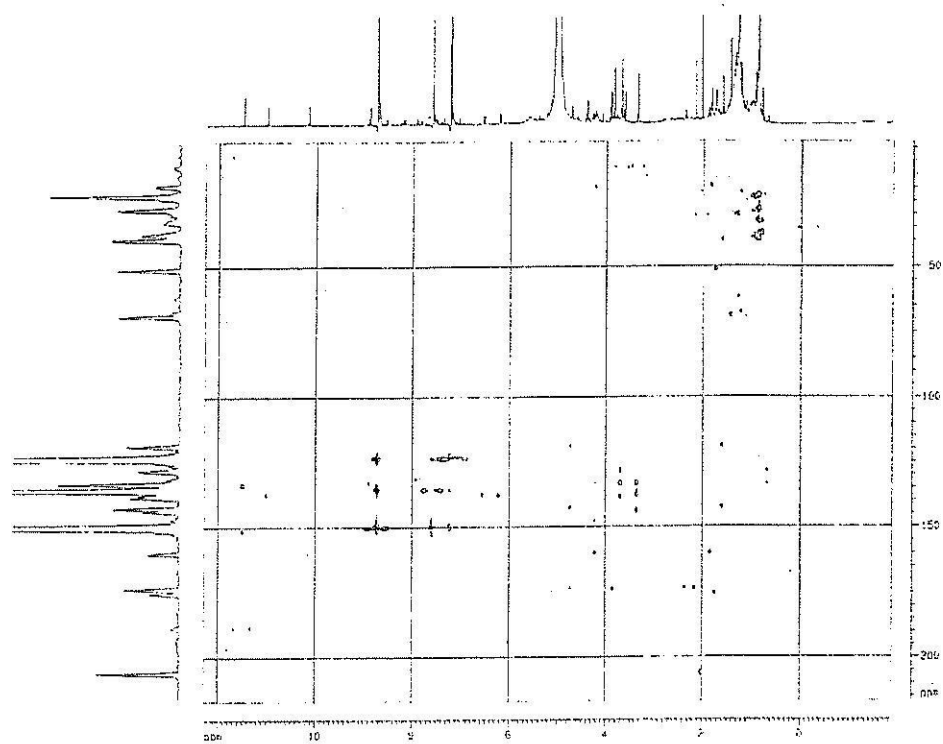


รูปที่ 15 แสดง  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY spectrum ของสารตัวที่ 2

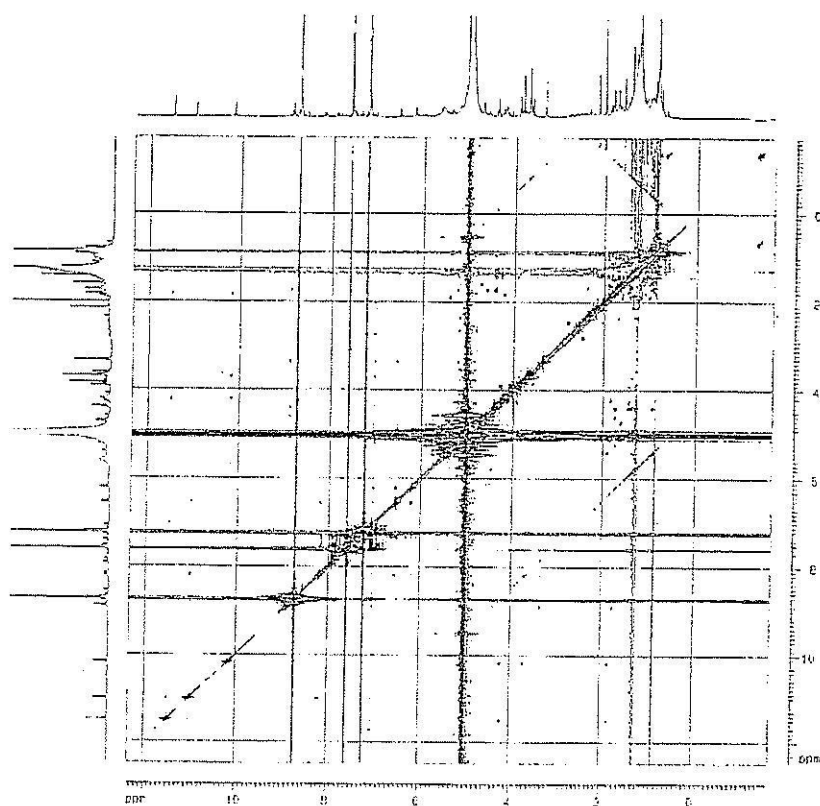


รูปที่ 16 แสดง HMQC spectrum ของสารตัวที่ 2

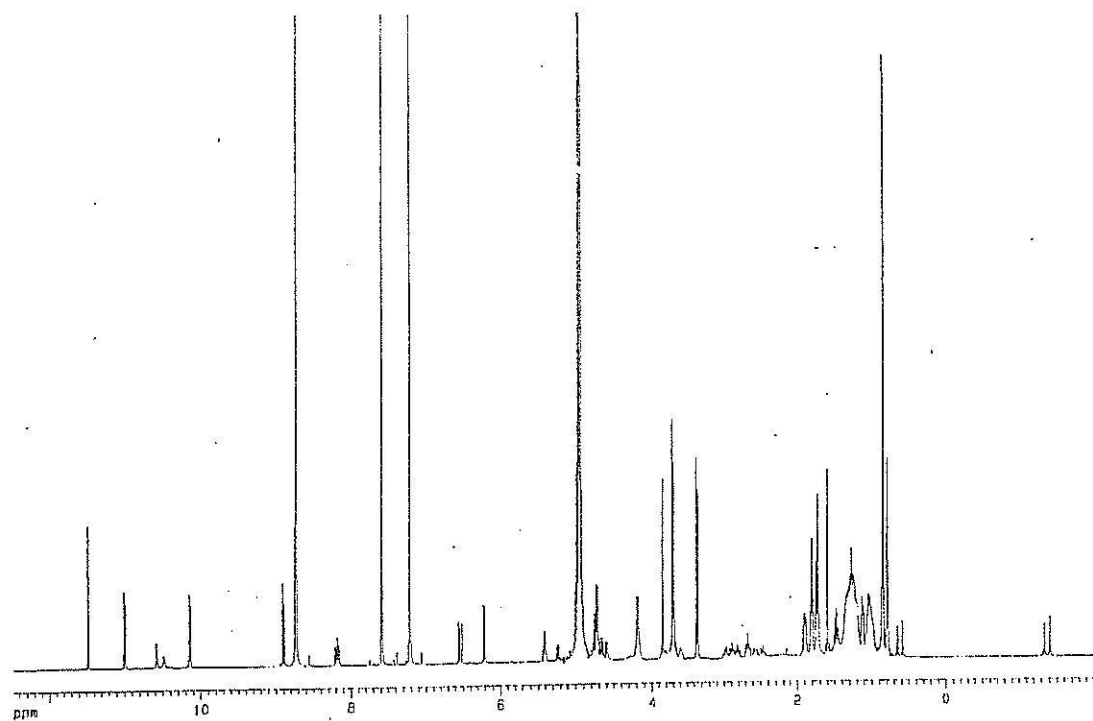




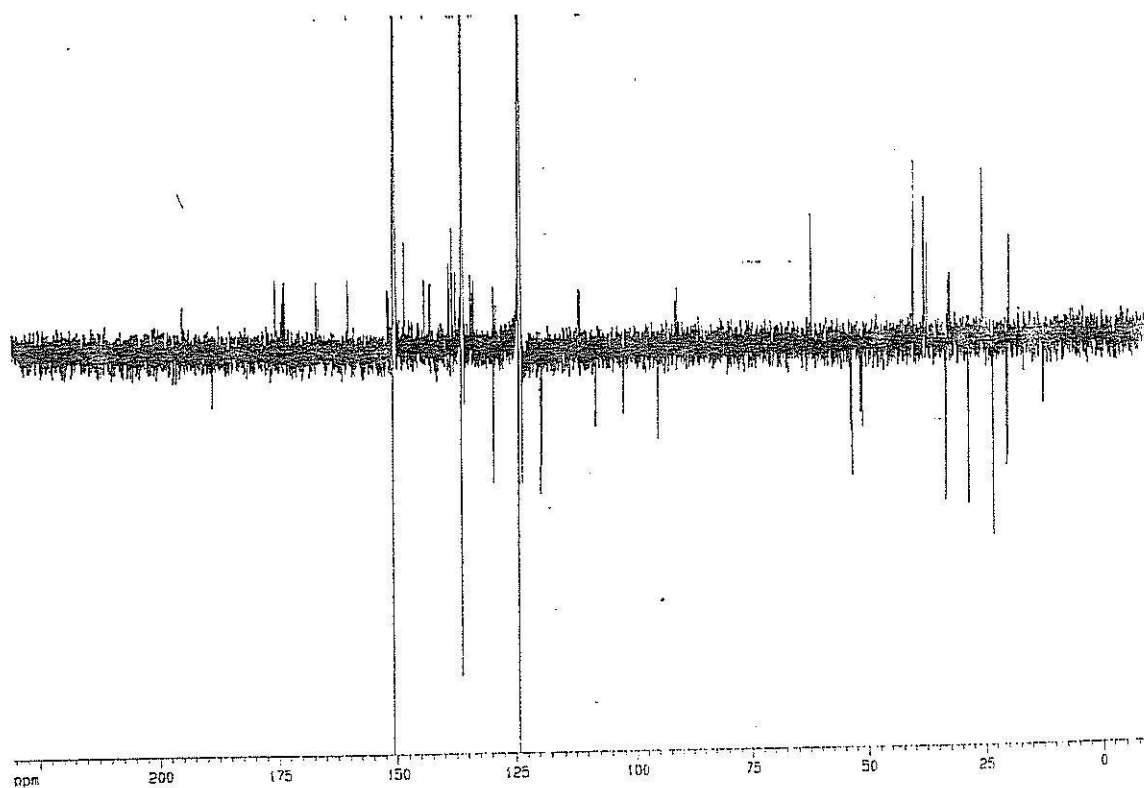
รูปที่ 17 แสดง HMBC spectrum ของสารตัวที่ 2



รูปที่ 18 แสดง NOESY spectrum ของสารตัวที่ 2



รูปที่ 19 แสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 3



รูปที่ 20 แสดง  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 3

Control Data Parameters  
 NAME: 11  
 EXPNO: 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20080111  
 Time 09:00:00  
 HighRes 1  
 Procd 5  
 Acq 1  
 Inj 1  
 Prg 1  
 S2 1  
 S3 1  
 S4 1  
 S5 1  
 S6 1  
 S7 1  
 S8 1  
 S9 1  
 S10 1  
 S11 1  
 S12 1  
 S13 1  
 S14 1  
 S15 1  
 S16 1  
 S17 1  
 S18 1  
 S19 1  
 S20 1

F1 - Processing parameters  
 SI 1  
 SF 125.2710 MHz  
 DF 500.132528 MHz  
 AS 2  
 GC 1.00  
 PC 1.00

F2 - Processing parameters  
 SI 1  
 SF 125.2710 MHz  
 DF 500.132528 MHz  
 AS 2  
 GC 1.00  
 PC 1.00

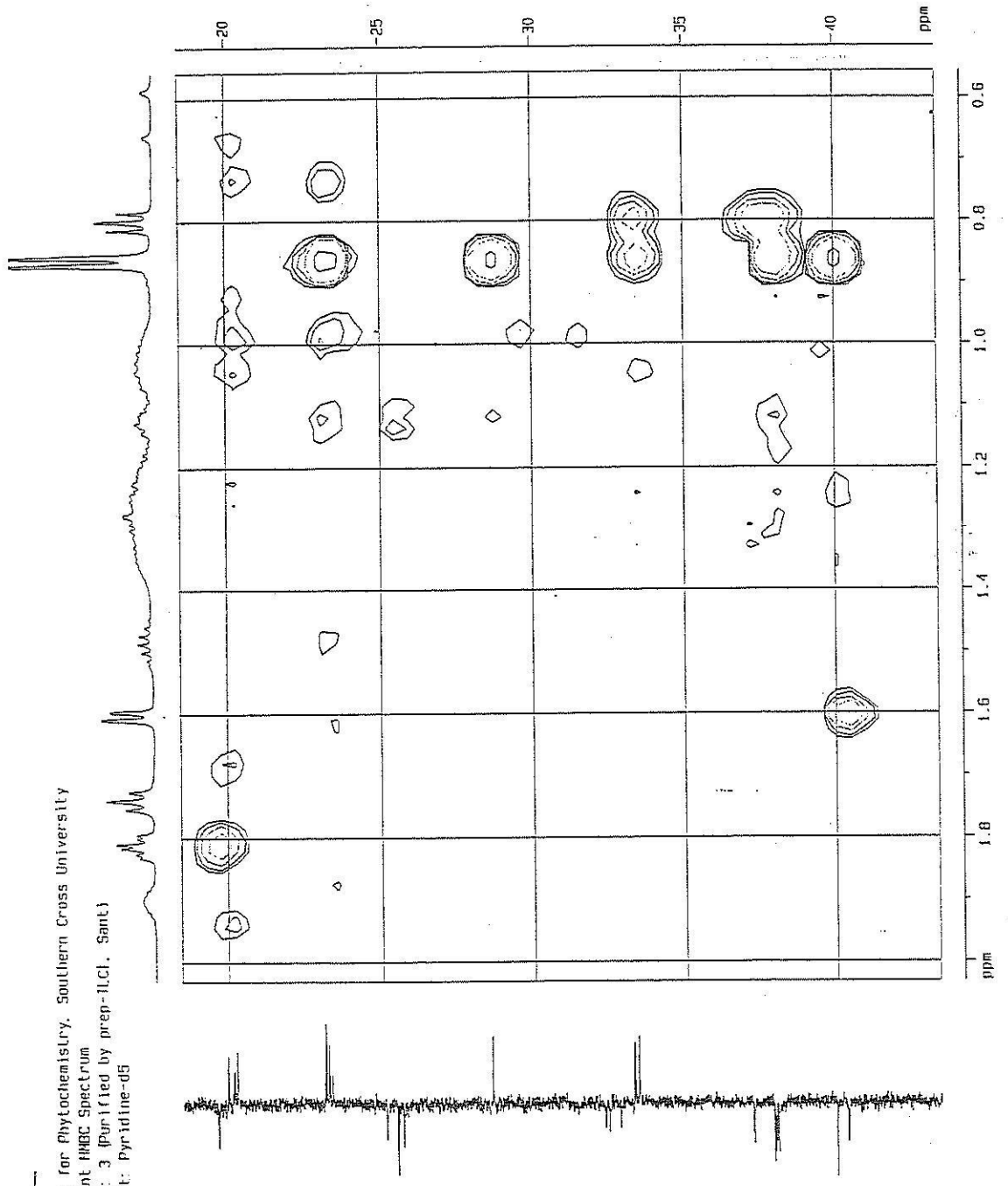
F1 - Acquisition parameters  
 SI 1  
 SF 125.2710 MHz  
 DF 500.132528 MHz  
 AS 2  
 GC 1.00  
 PC 1.00

F2 - Acquisition parameters  
 SI 1  
 SF 125.2710 MHz  
 DF 500.132528 MHz  
 AS 2  
 GC 1.00  
 PC 1.00

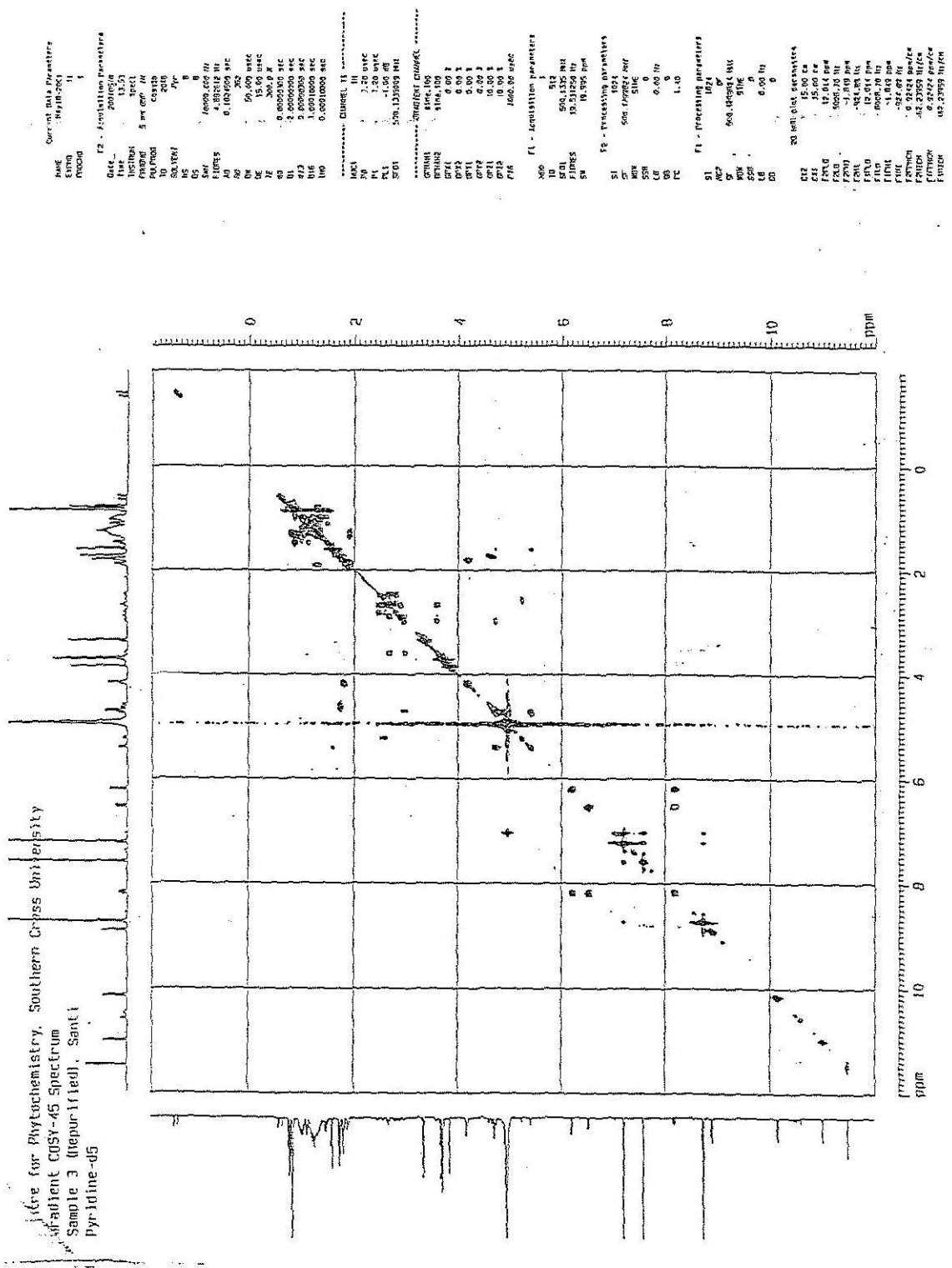
F1 - Processing parameters  
 SI 1  
 SF 125.2710 MHz  
 DF 500.132528 MHz  
 AS 2  
 GC 1.00  
 PC 1.00

F2 - Processing parameters  
 SI 1  
 SF 125.2710 MHz  
 DF 500.132528 MHz  
 AS 2  
 GC 1.00  
 PC 1.00

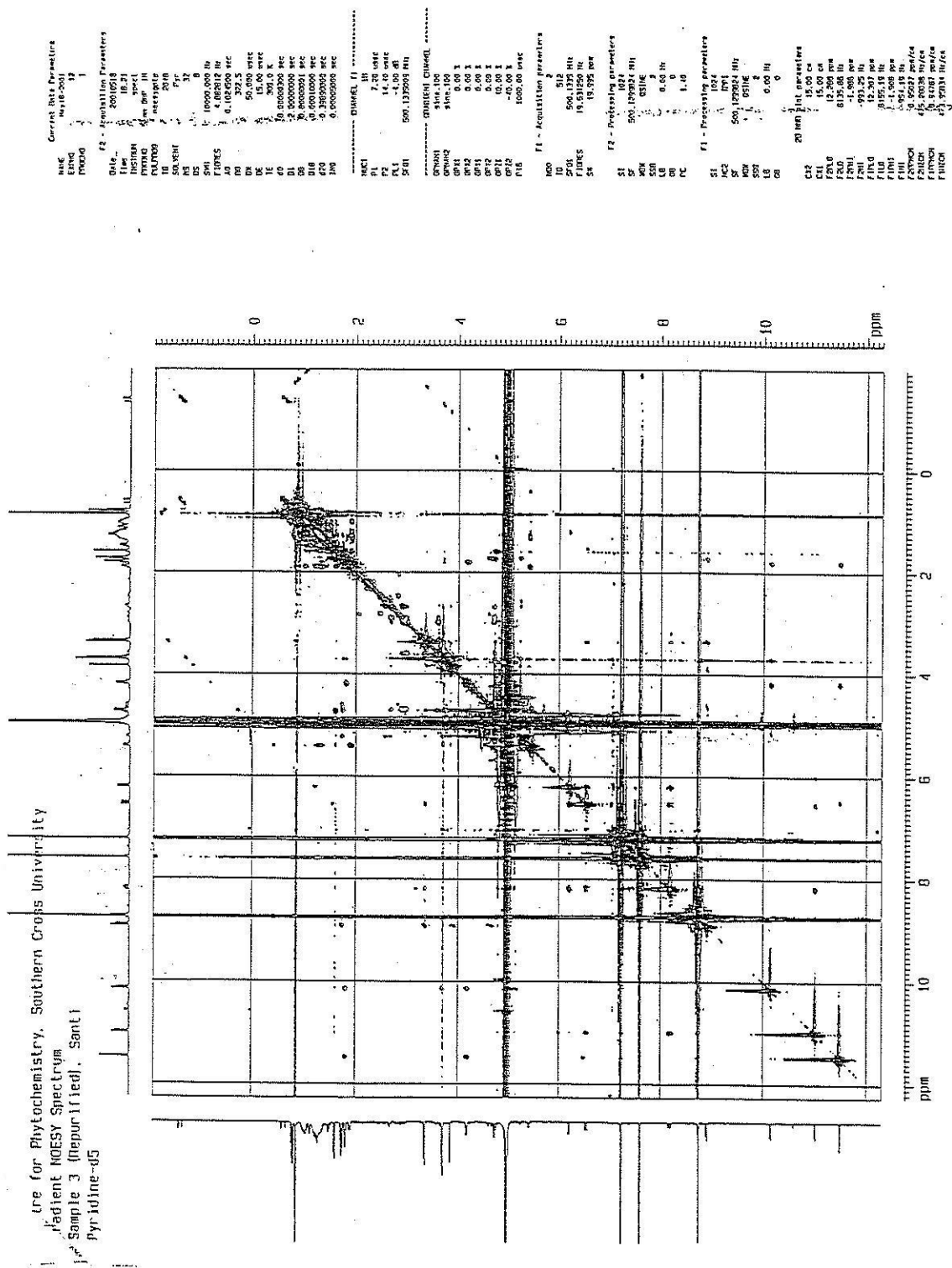
Centre for Phytochemistry, Southern Cross University  
 Gradient HMBC Spectrum  
 Sample: 3 (Purified by prep-ILCl, Sant)  
 Solvent: Pyridine-d5



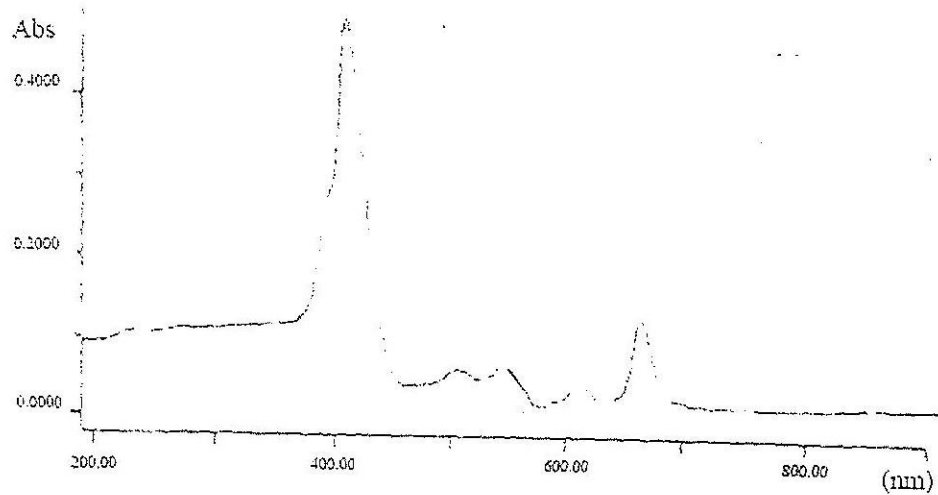
รูปที่ 21 แสดง Gradient HMBC spectrum ของสารตัวที่ 3



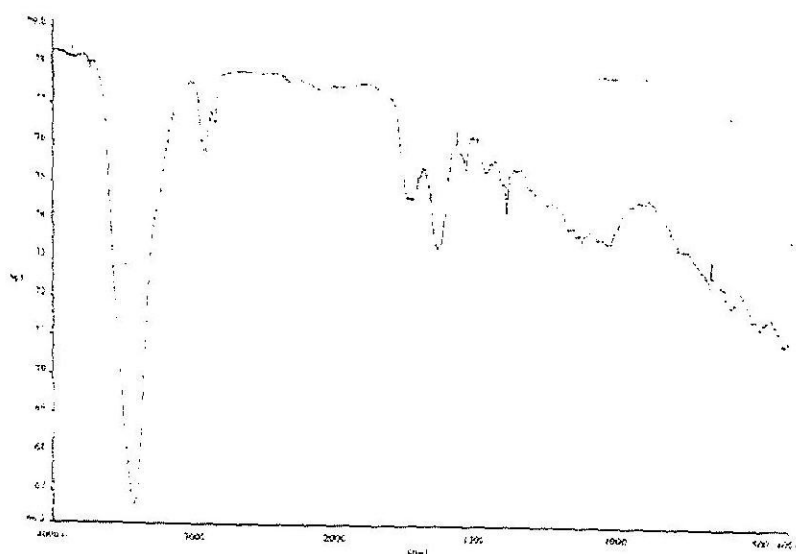
รูปที่ 22 แสดง Gradient COSY-45 spectrum ของสารตัวที่ 3



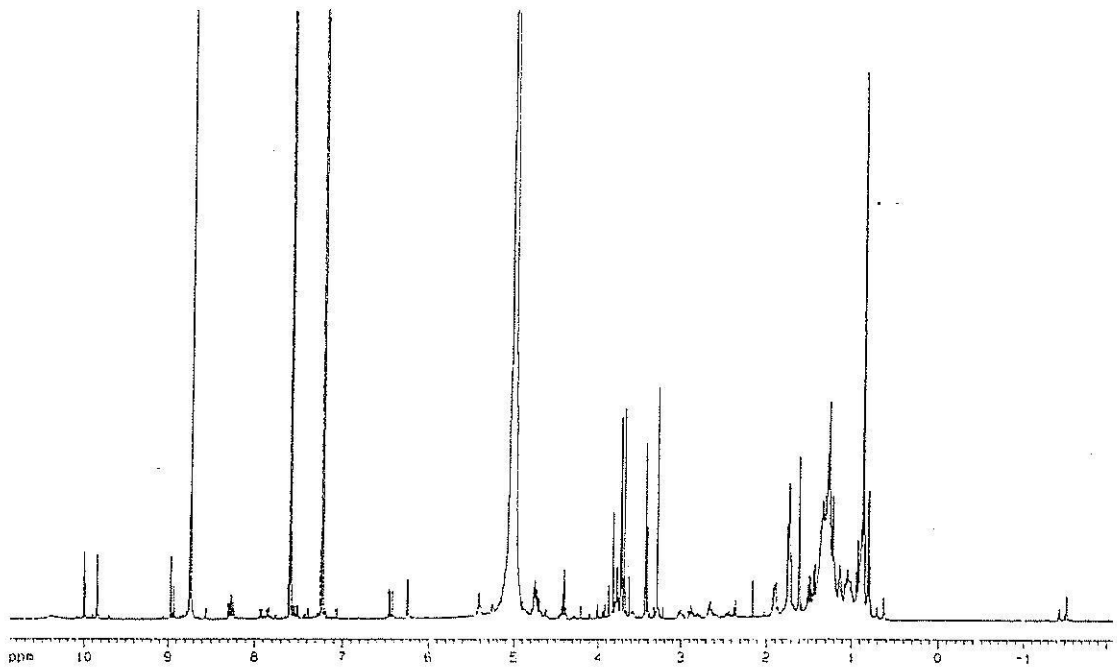
รูปที่ 23 แสดง Gradient NOESY spectrum ของสารตัวที่ 3



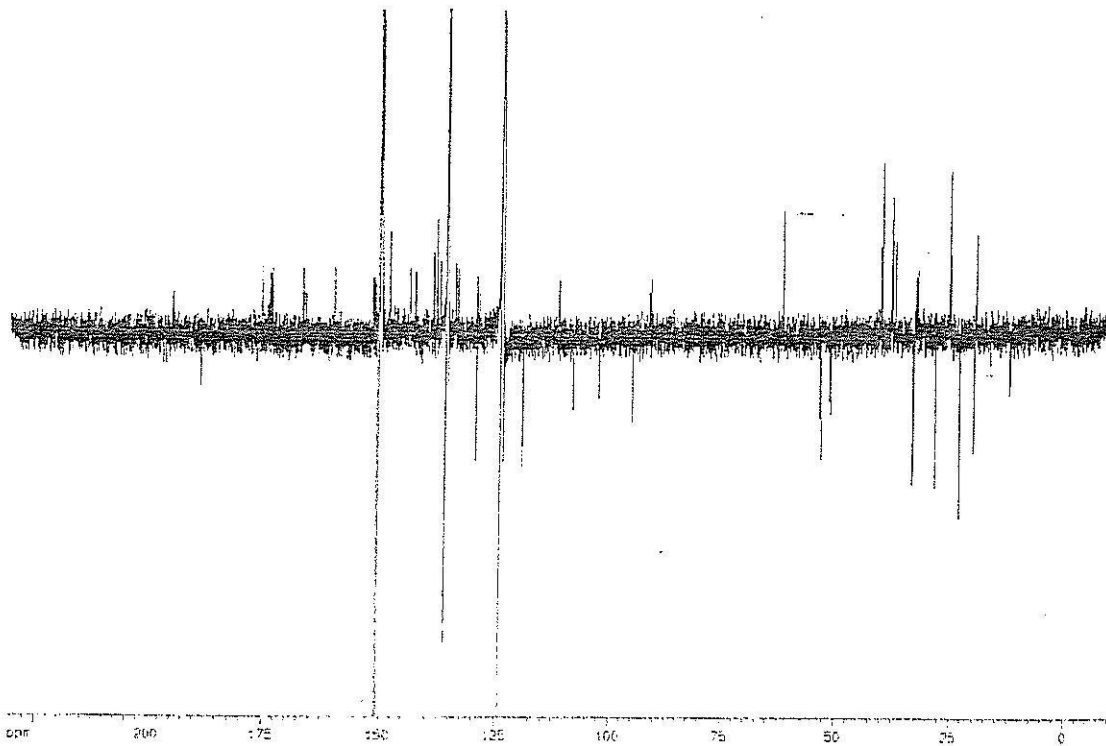
รูปที่ 24 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 4



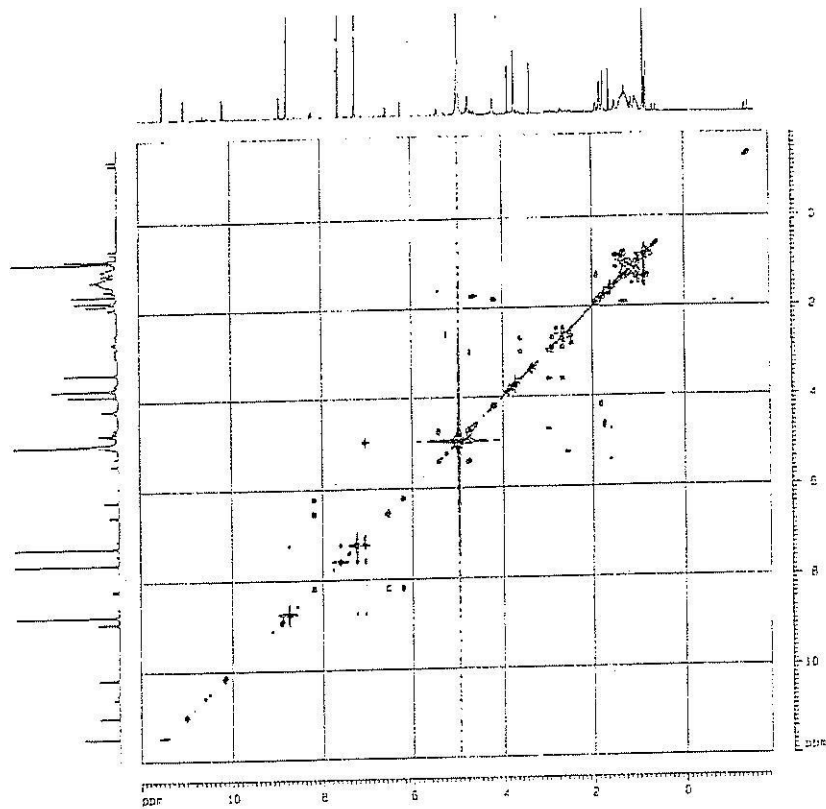
รูปที่ 25 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 4



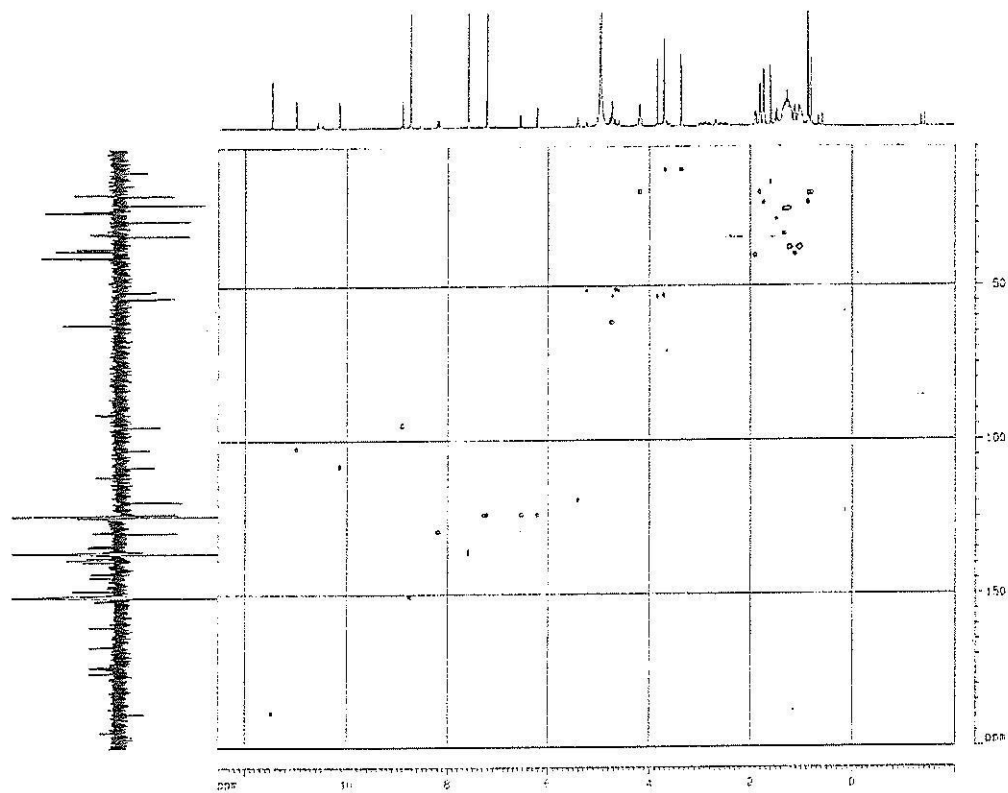
รูปที่ 26 แสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 4



รูปที่ 27 แสดง  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 4

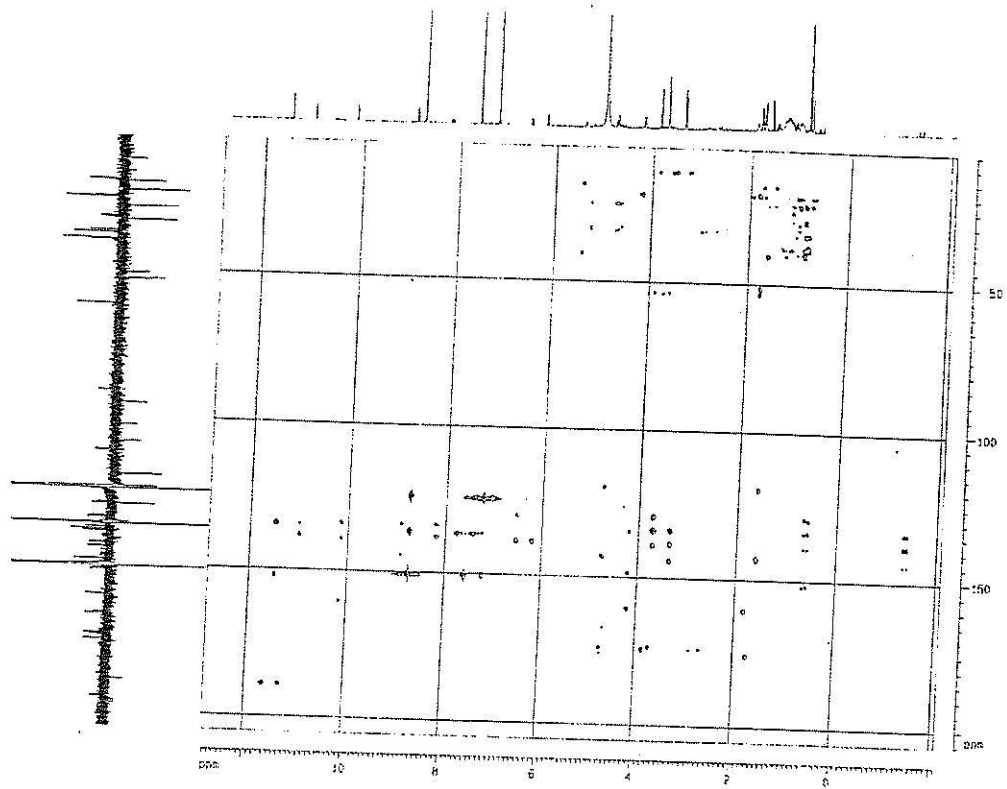


รูปที่ 28 แสดง  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY spectrum ของสารตัวที่ 4

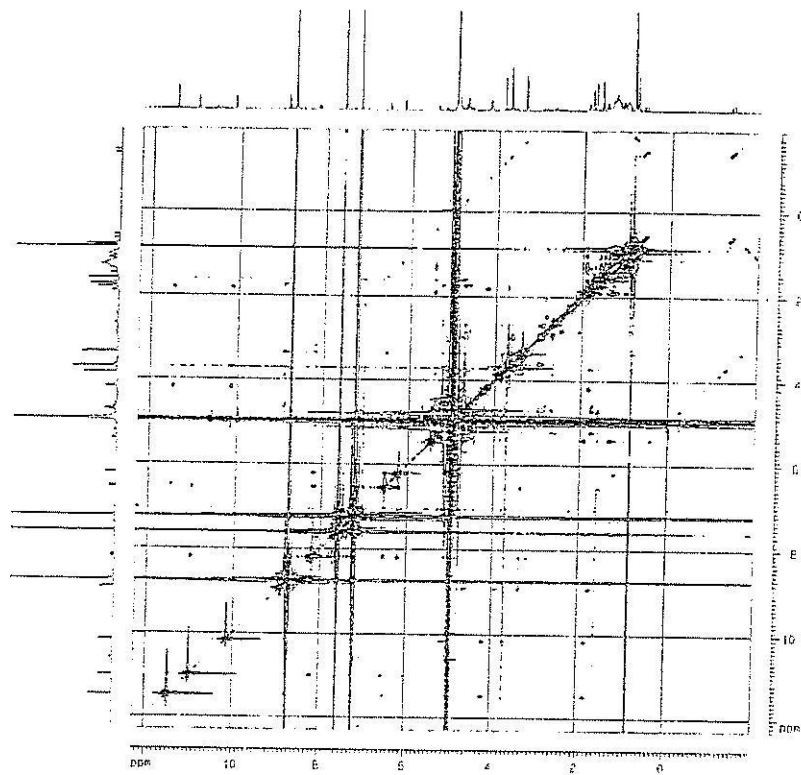


รูปที่ 29 แสดง HSQC spectrum ของสารตัวที่ 4

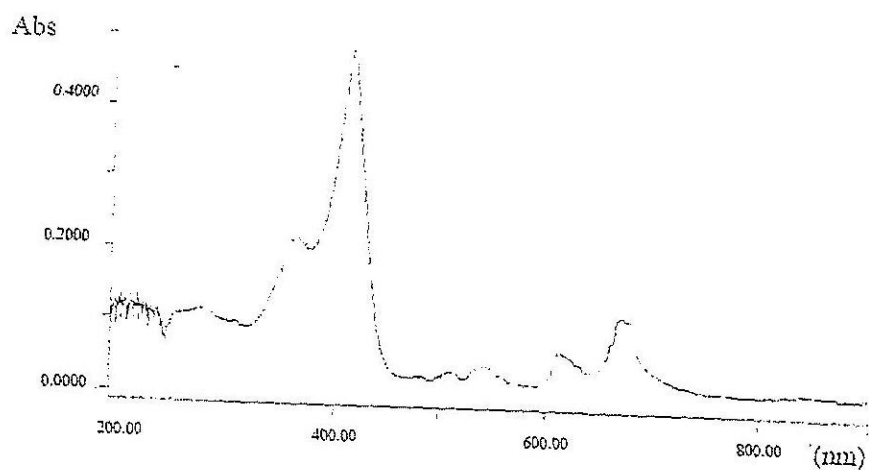




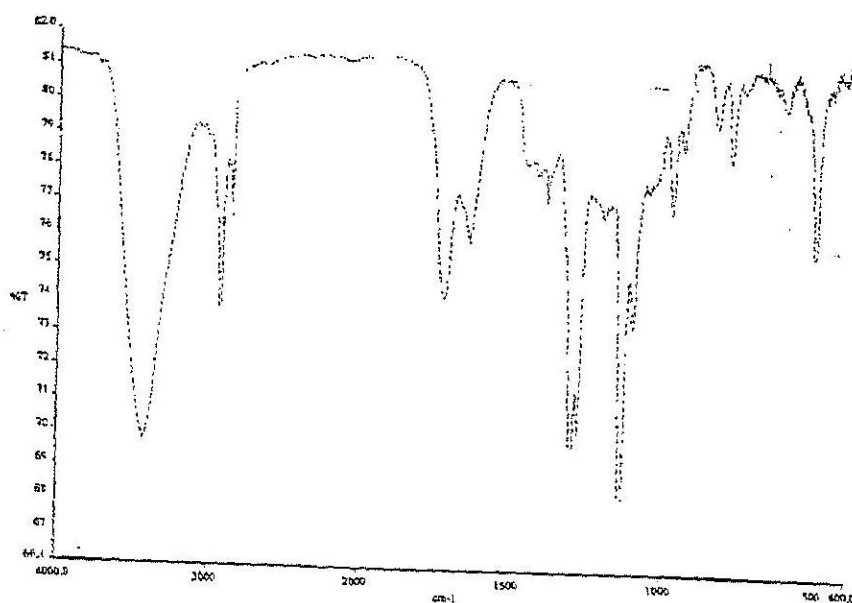
รูปที่ 30 แสดง HMBC spectrum ของสารตัวที่ 4



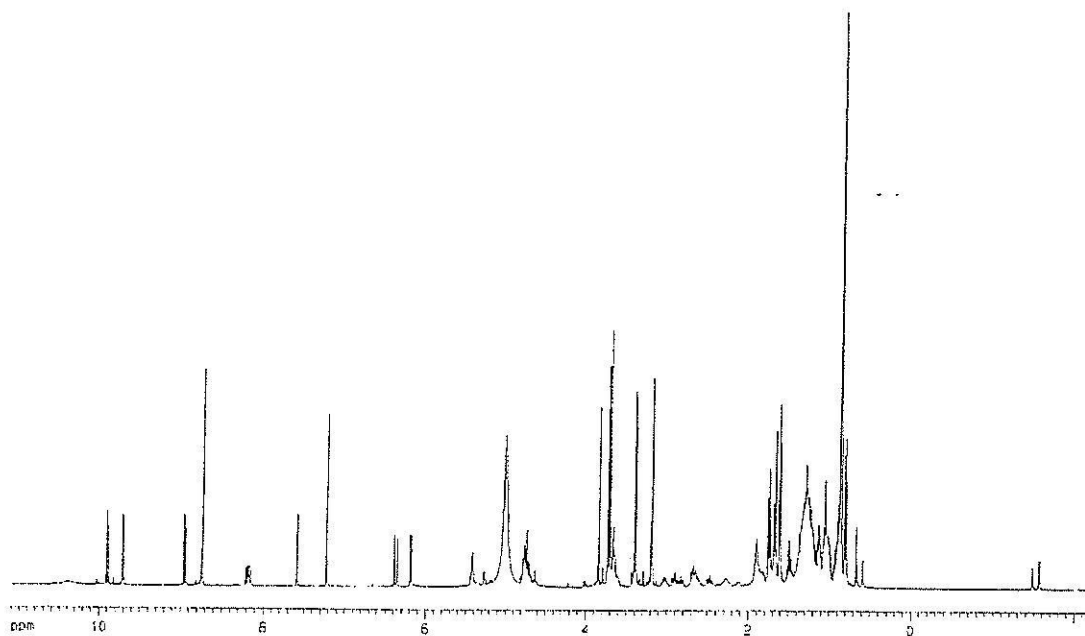
รูปที่ 31 แสดง NOESY spectrum ของสารตัวที่ 4



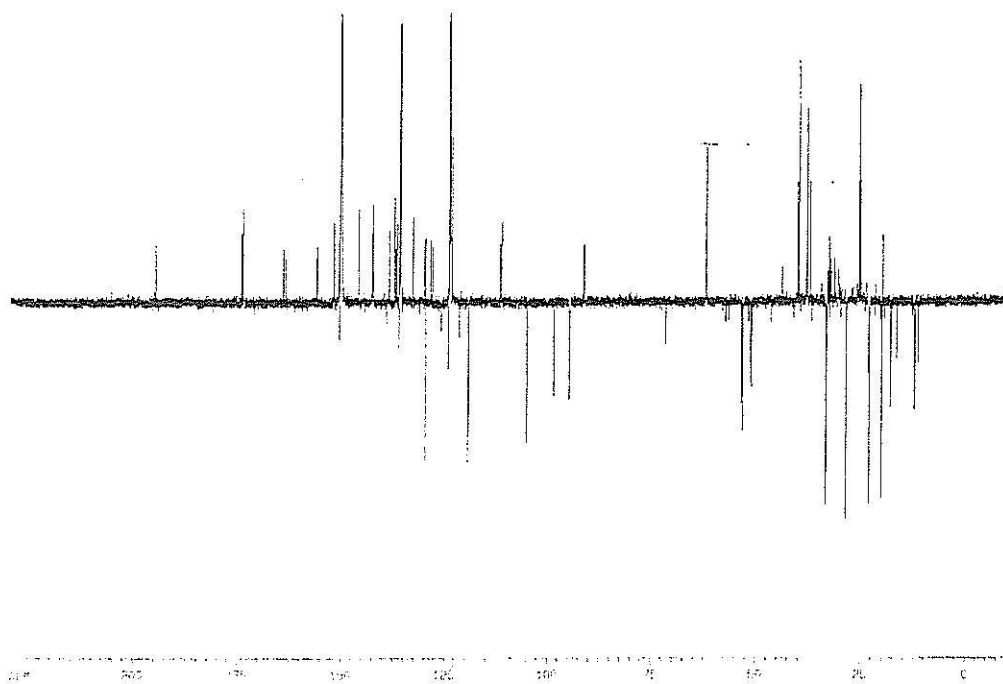
รูปที่ 32 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 5



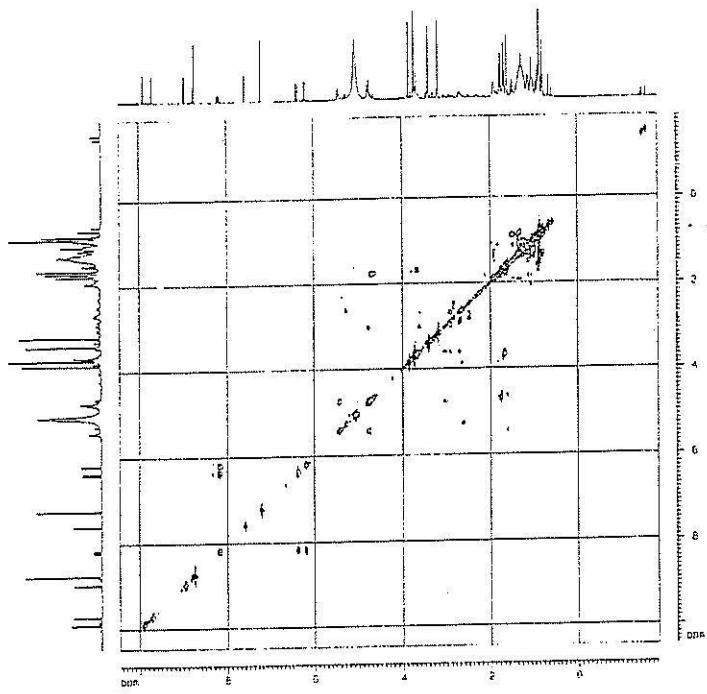
รูปที่ 33 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 5



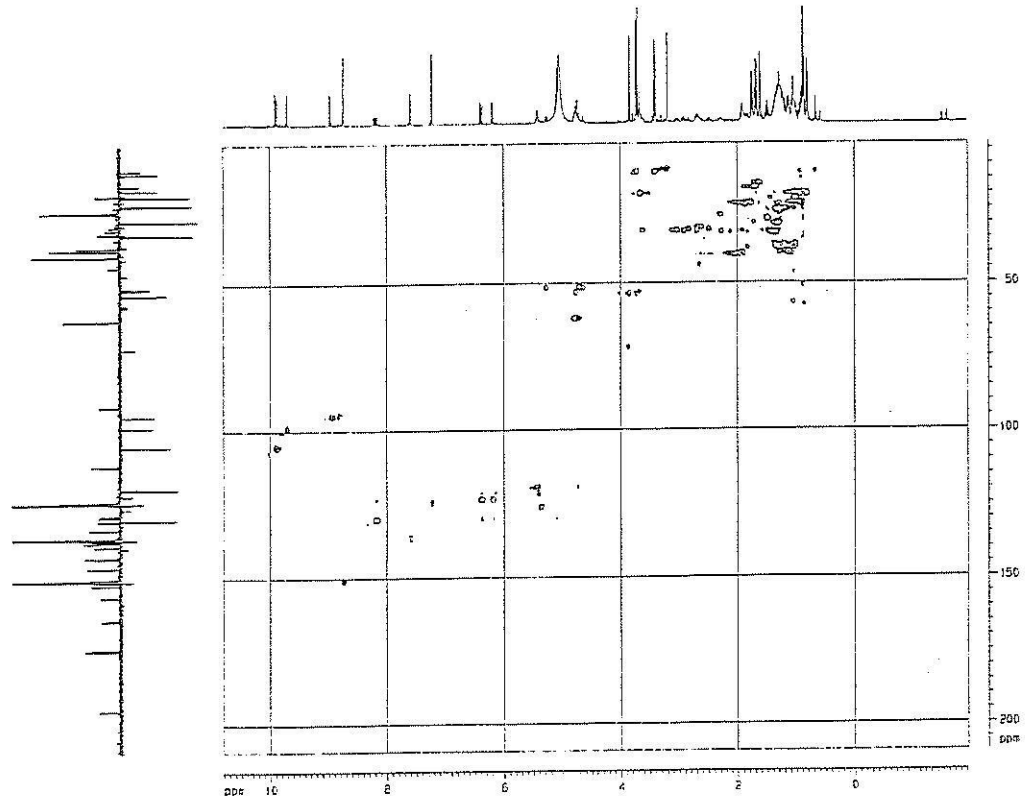
รูปที่ 34 แสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 5



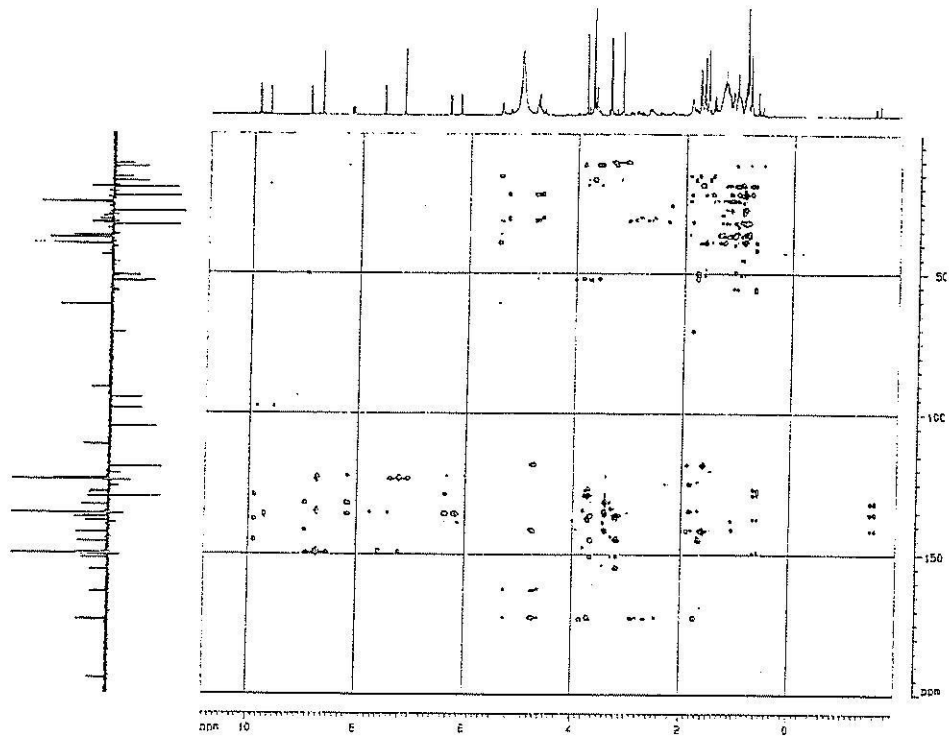
รูปที่ 35 แสดง  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 5



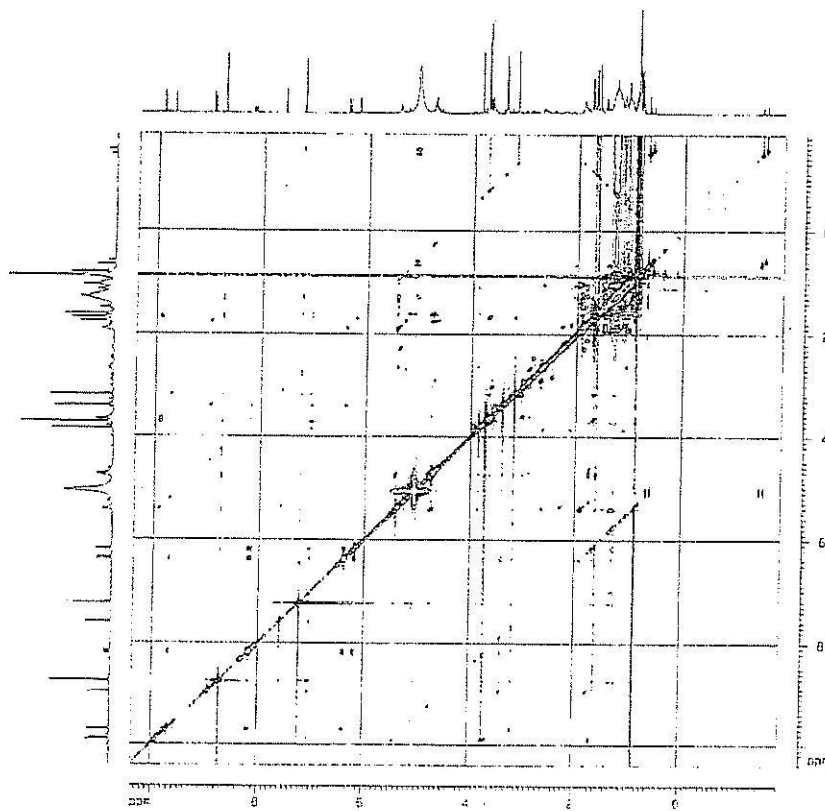
รูปที่ 36 แสดง  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY spectrum ของสารตัวที่ 5



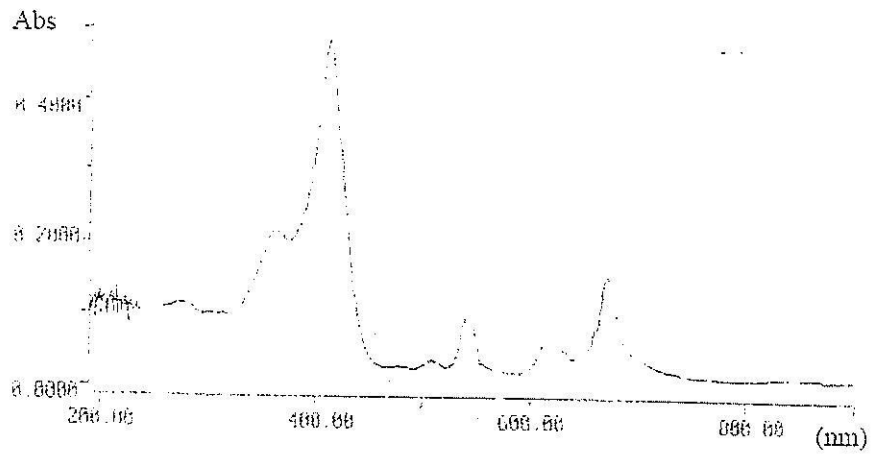
รูปที่ 37 แสดง HSQC spectrum ของสารตัวที่ 5



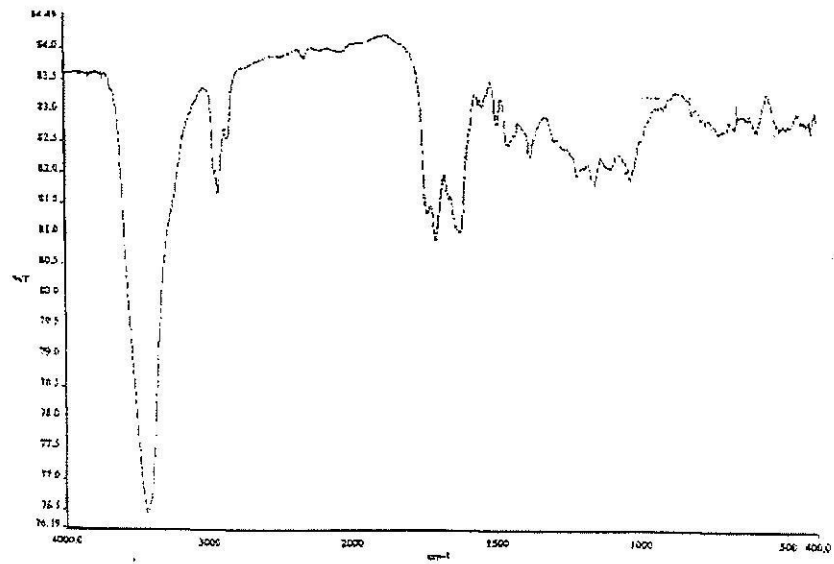
รูปที่ 38 แสดง HMBC spectrum ของสารตัวที่ 5



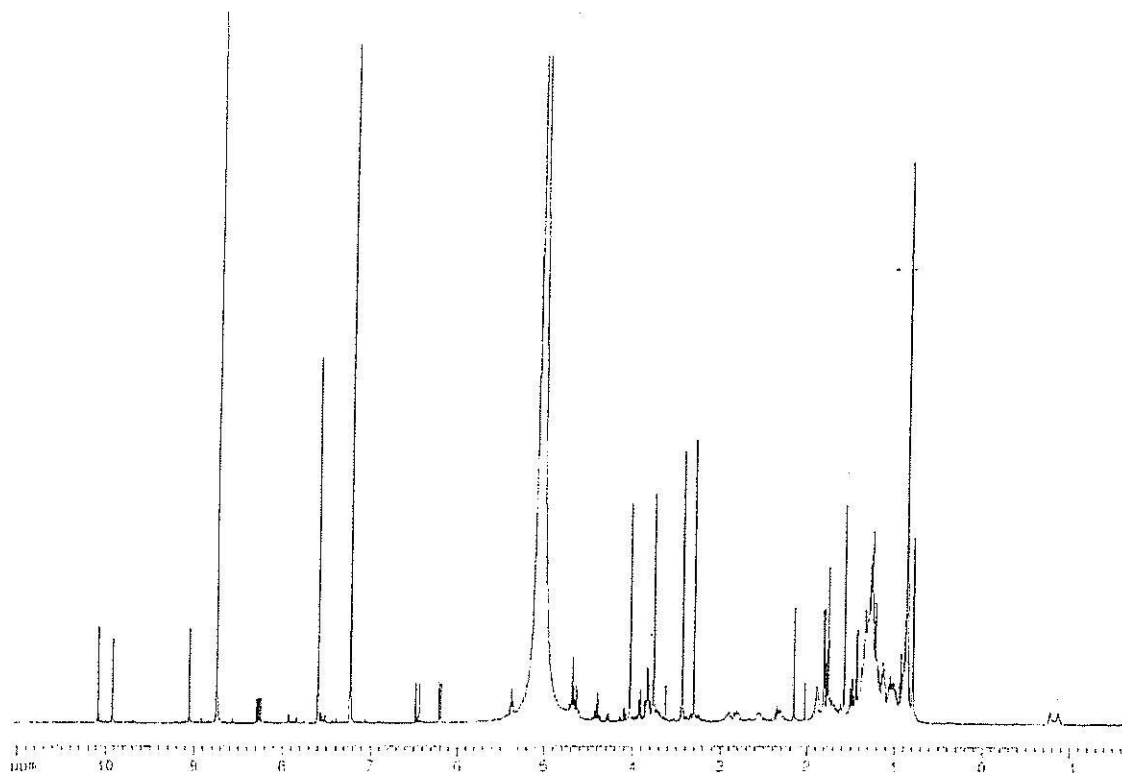
รูปที่ 39 แสดง NOESY spectrum ของสารตัวที่ 5



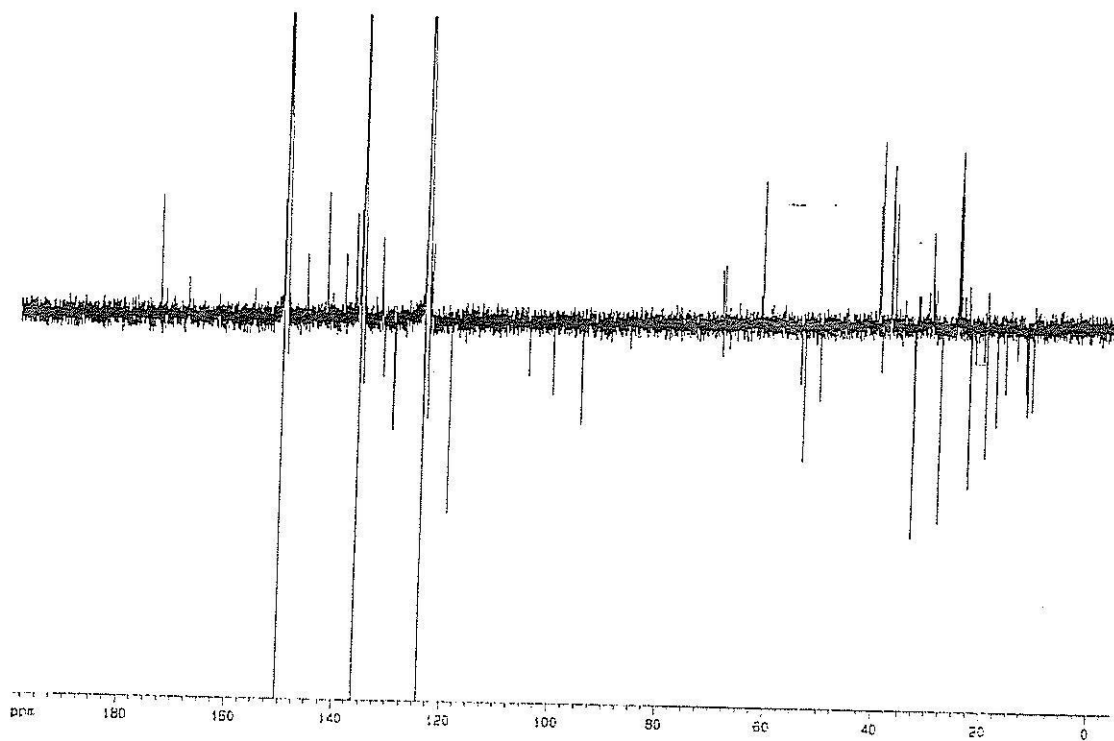
รูปที่ 40 แสดง UV-Vis spectrum ของสารตัวที่ 6



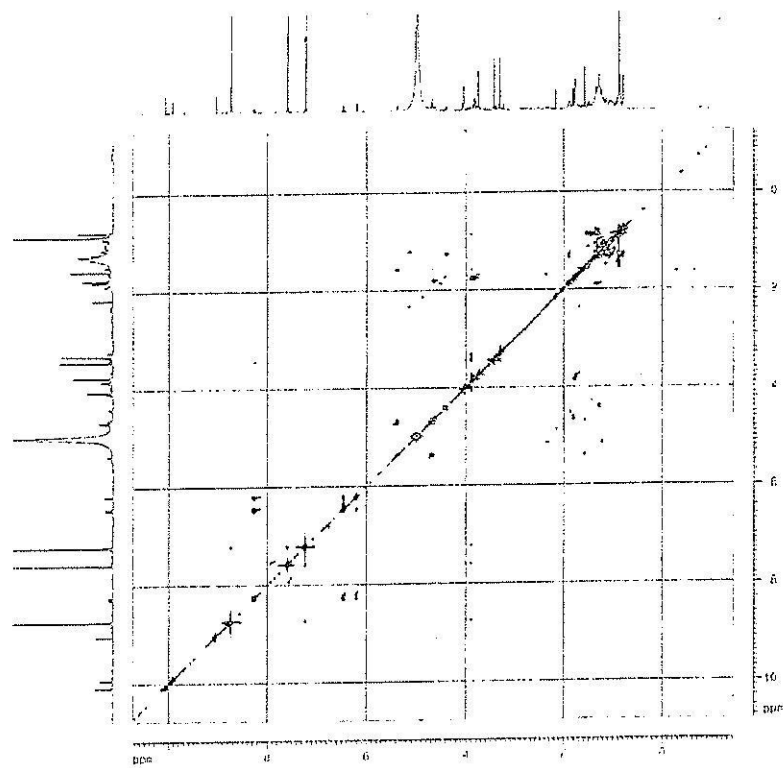
รูปที่ 41 แสดง IR spectrum ของสารตัวที่ 6



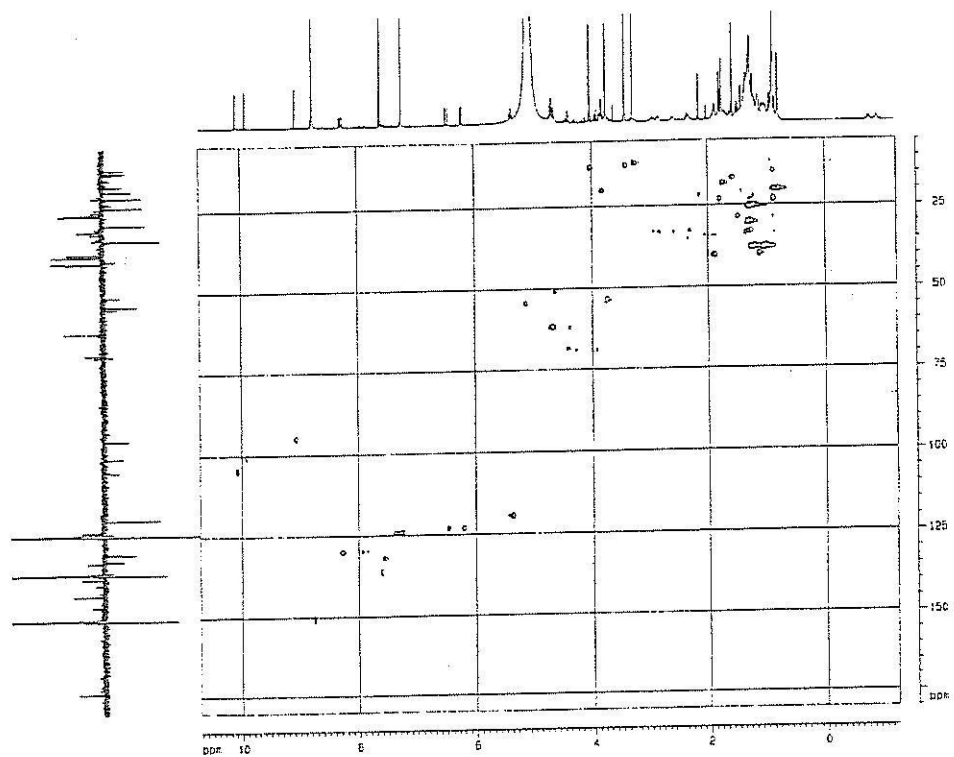
รูปที่ 42 แสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 6



รูปที่ 43 แสดง  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 6

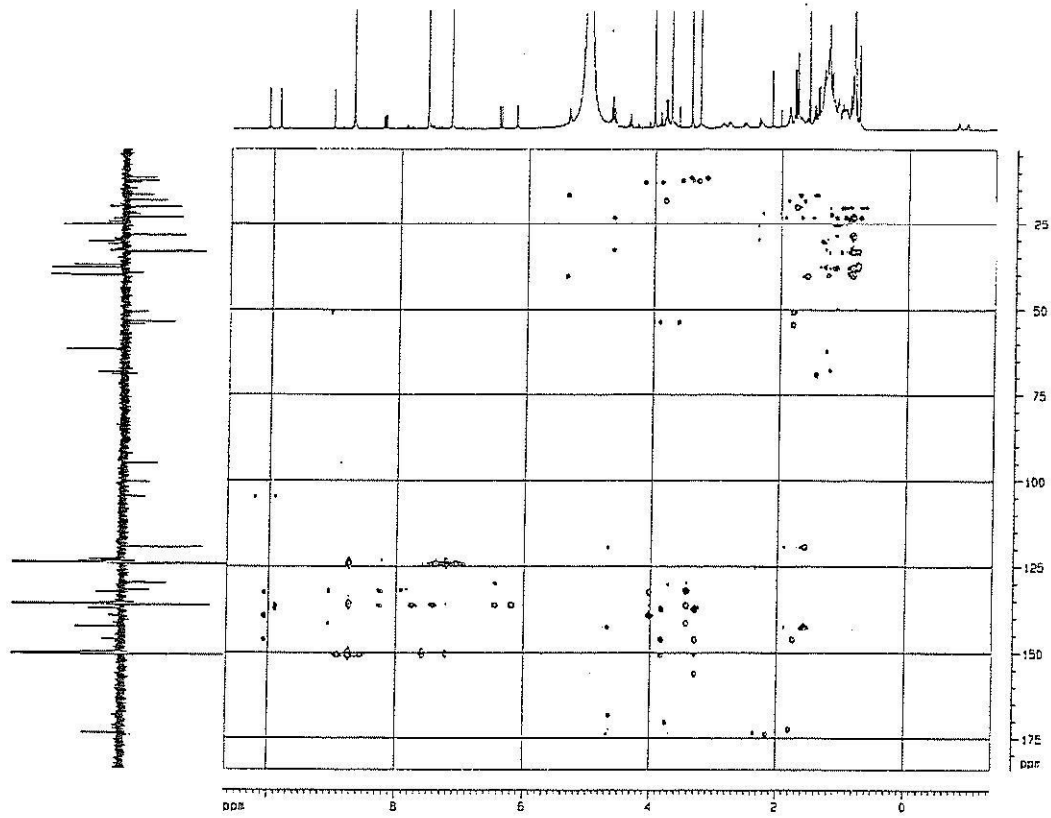


รูปที่ 44 แสดง  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY spectrum ของสารตัวที่ 6

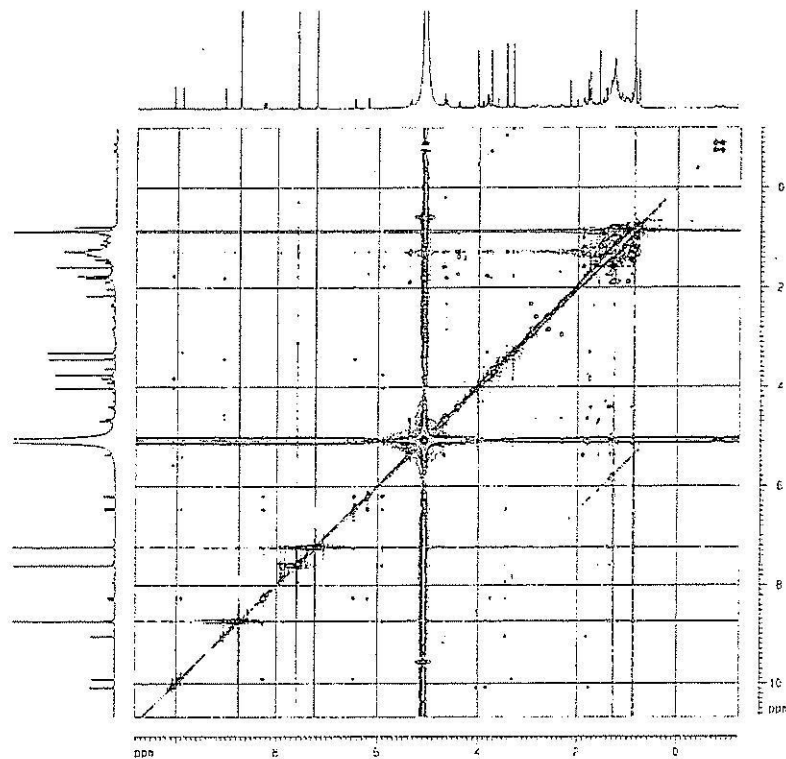


รูปที่ 45 แสดง HSQC spectrum ของสารตัวที่ 6

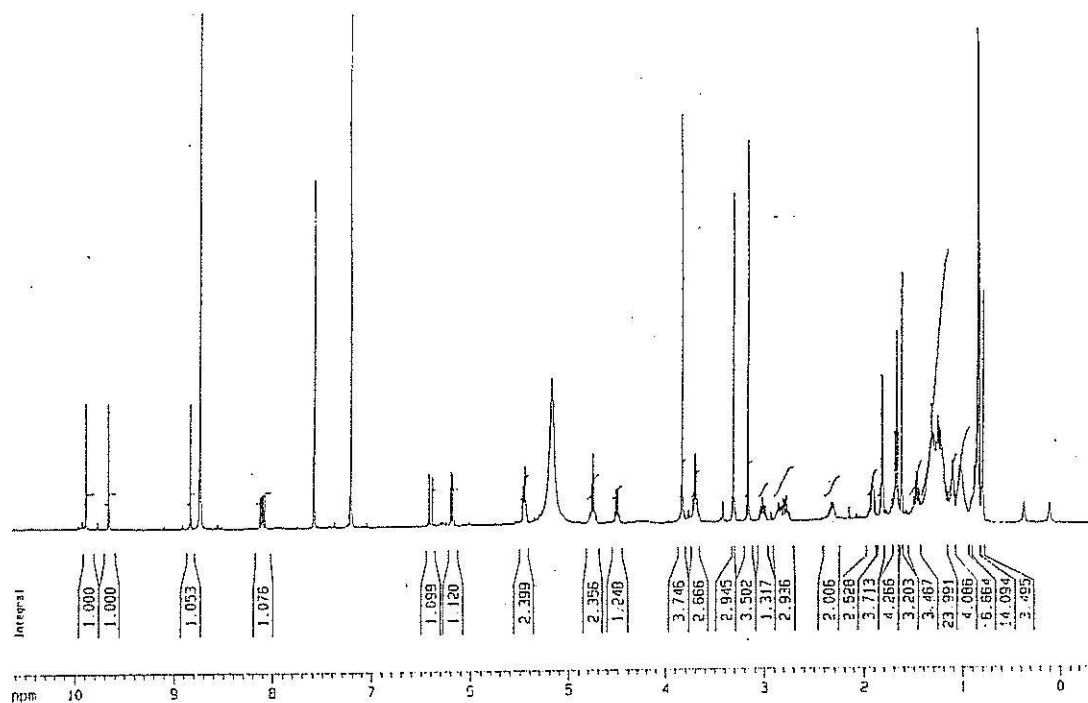




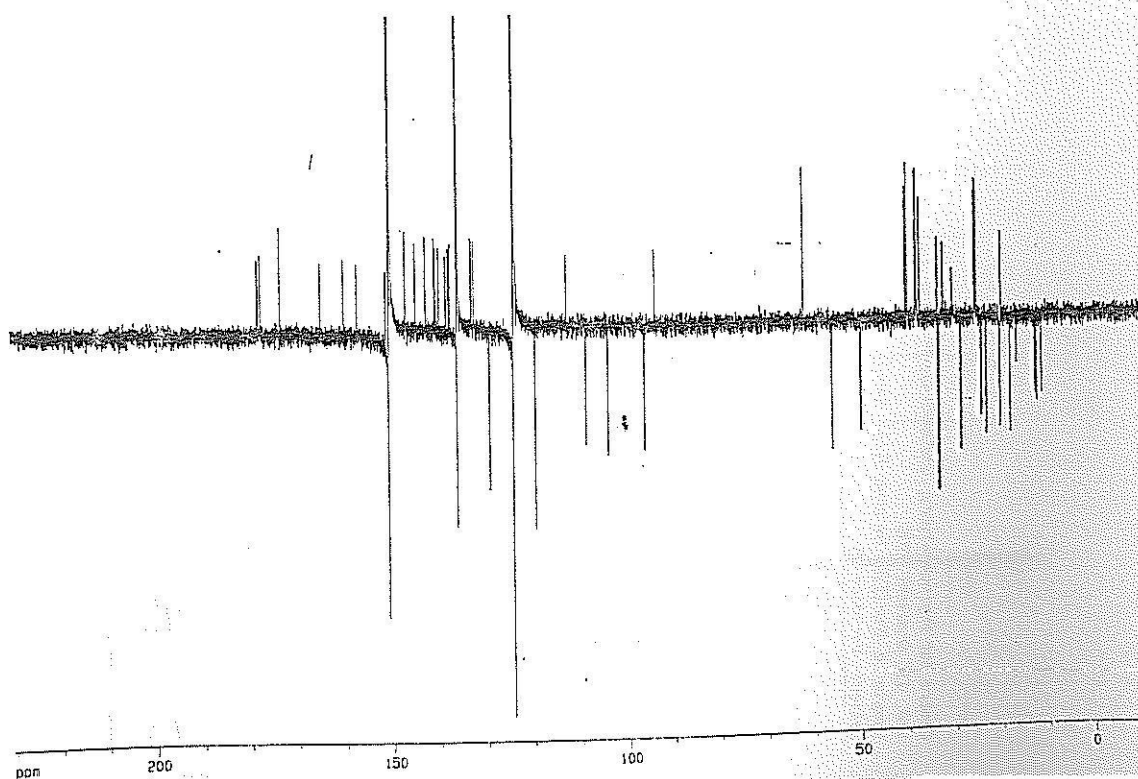
รูปที่ 46 แสดง HMBC spectrum ของสารตัวที่ 6



รูปที่ 47 แสดง NOESY spectrum ของสารตัวที่ 6

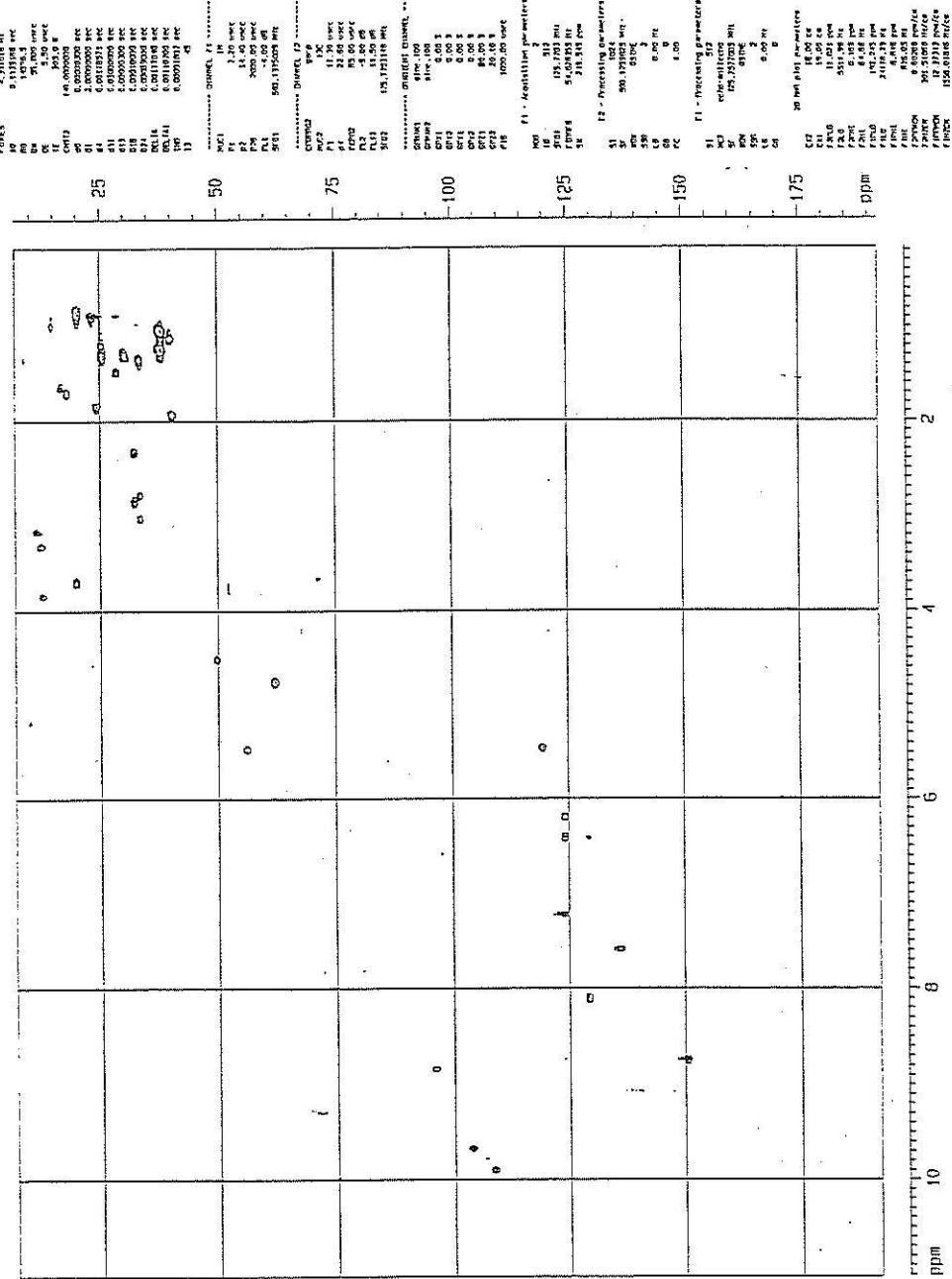
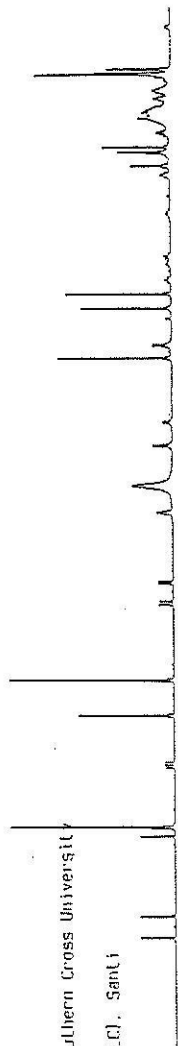


รูปที่ 48 แสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 7



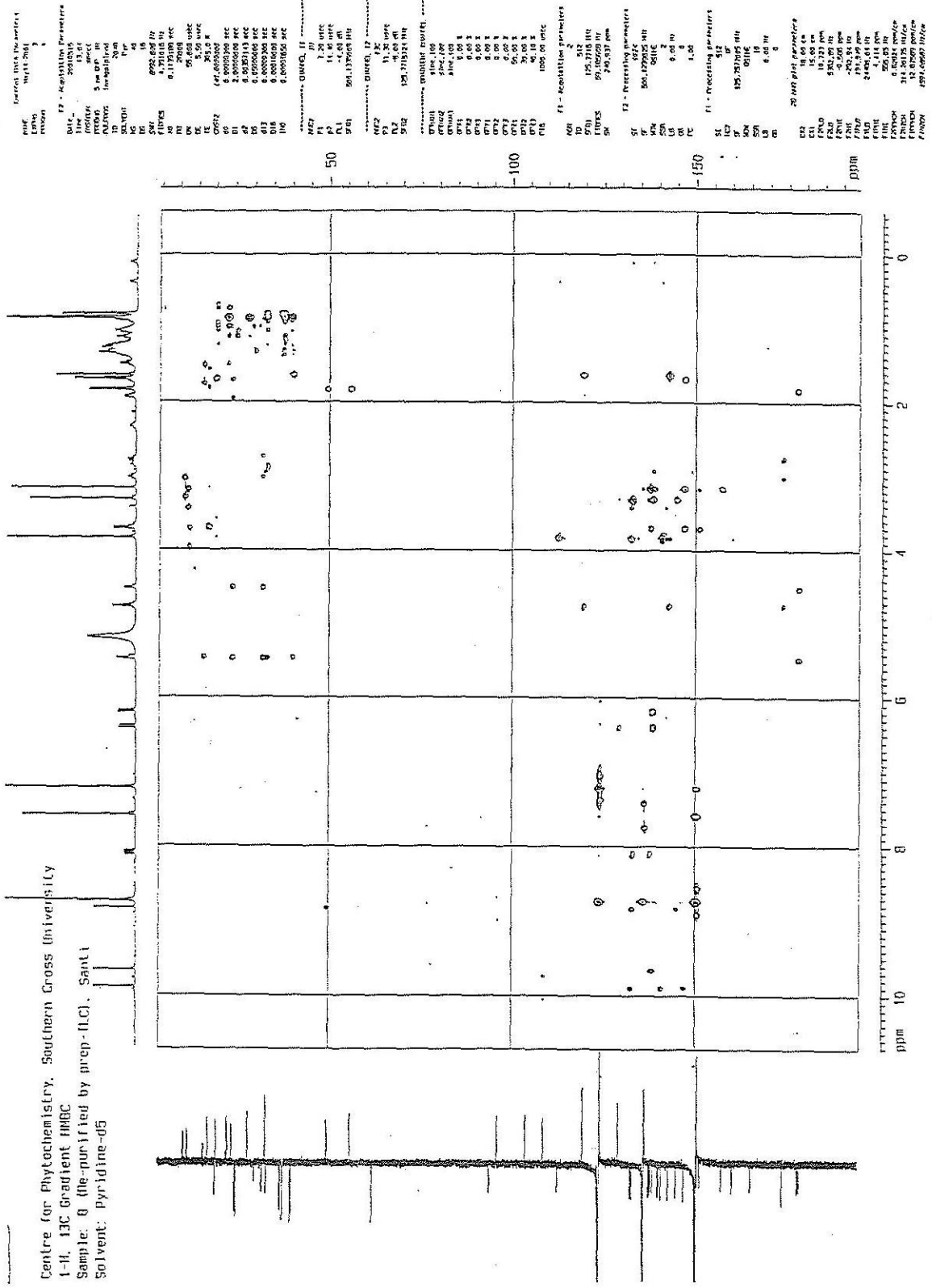
รูปที่ 49 แสดง  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 7

Date: 20131019  
 Time: 11:35  
 Name: 8  
 Sample: 8 (Purified by prep-HPLC, Santi)  
 Solvent: Pyridine-d5

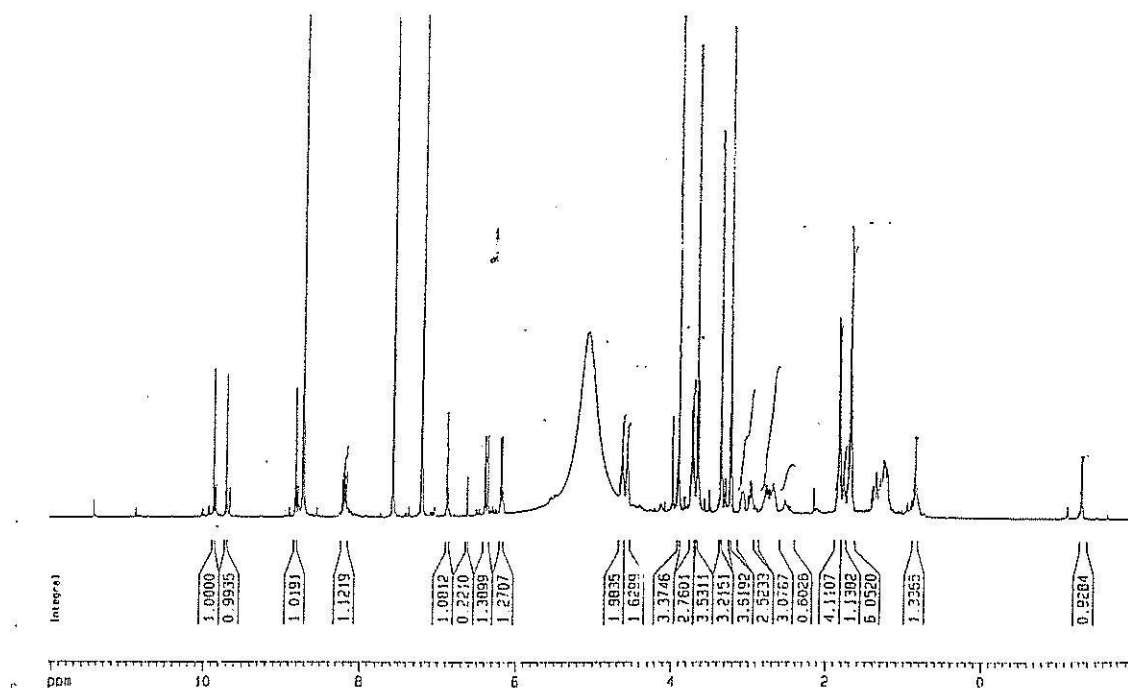


Centre for Phytochemistry, Southern Cross University  
 1-H, 13C Gradient HSQC  
 Sample: 8 (Purified by prep-HPLC, Santi)  
 Solvent: Pyridine-d5

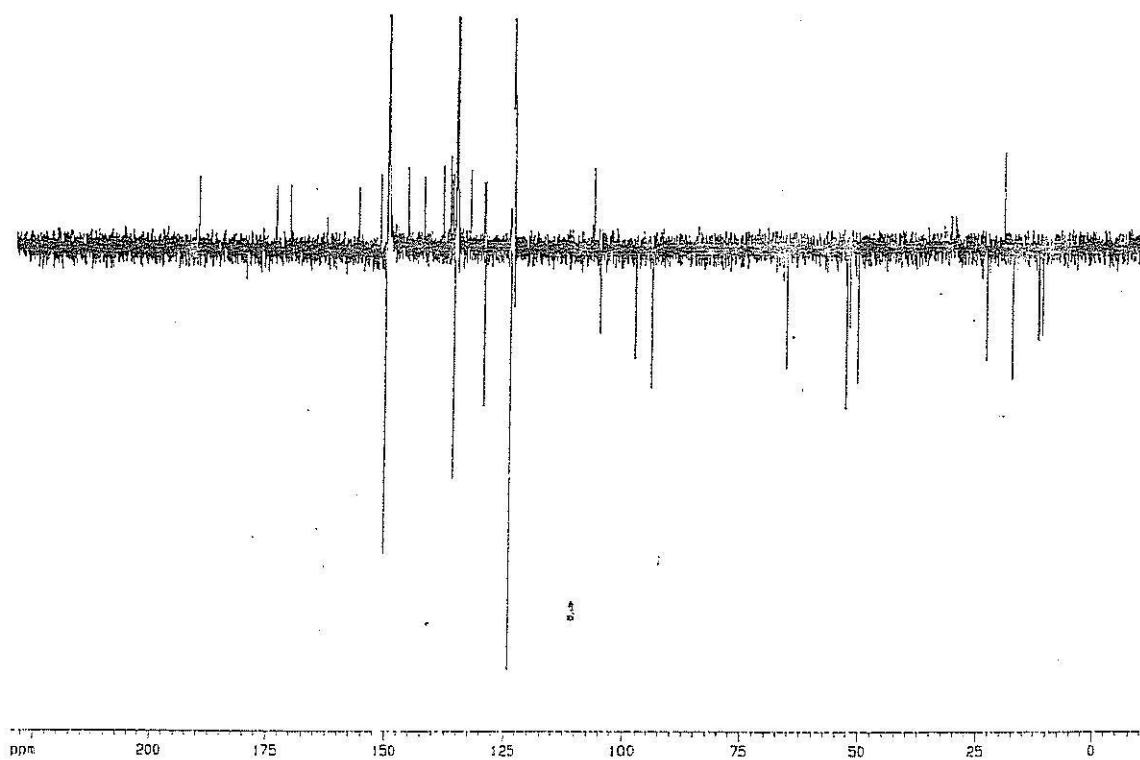
รูปที่ 50 แสดง Gradient HSQC spectrum ของสารตัวที่ 7



รูปที่ 51 แสดง Gradient HMBC spectrum ของสารตัวที่ 7

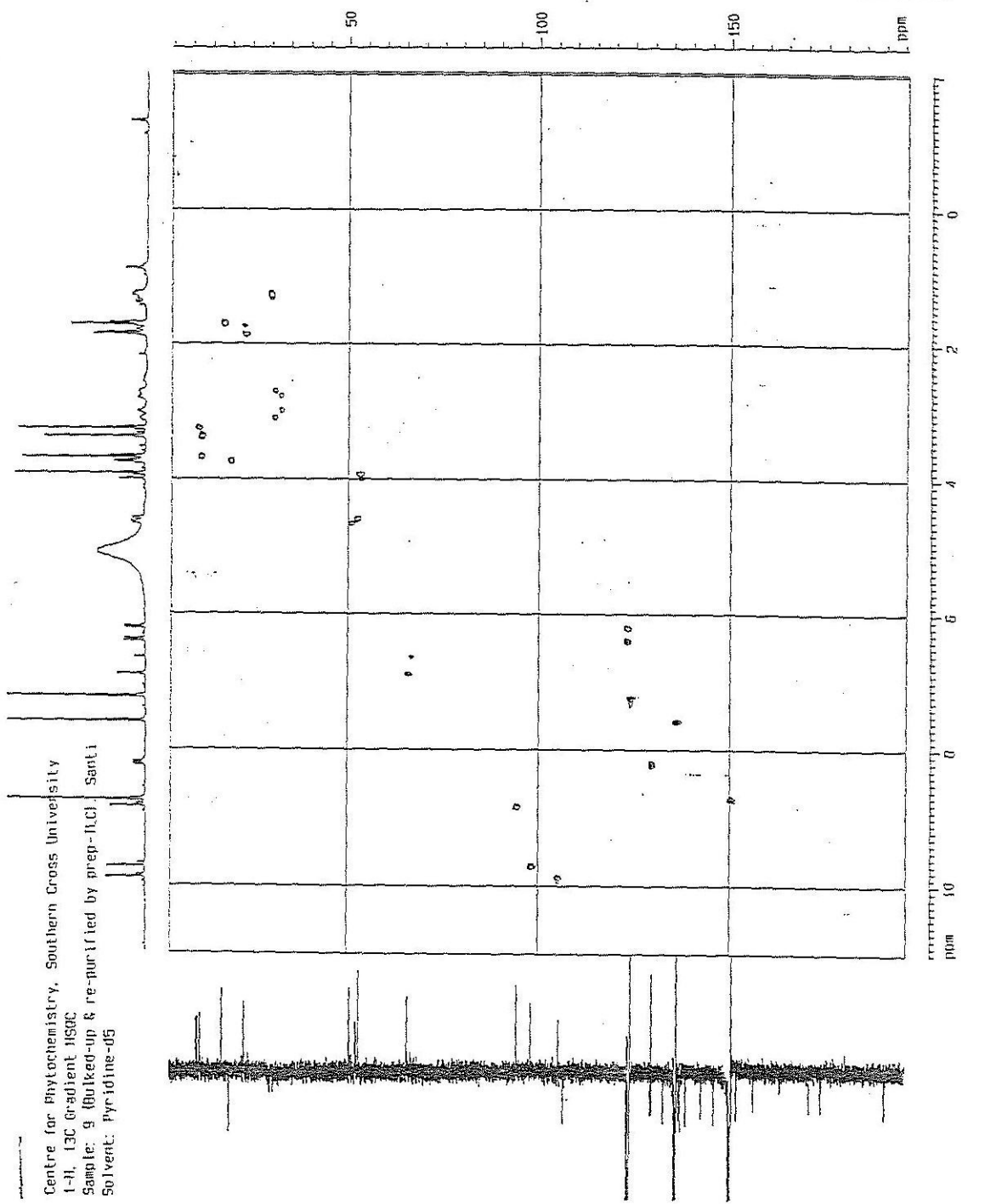


รูปที่ 52 แสดง  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 8



รูปที่ 53 แสดง  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ของสารตัวที่ 8

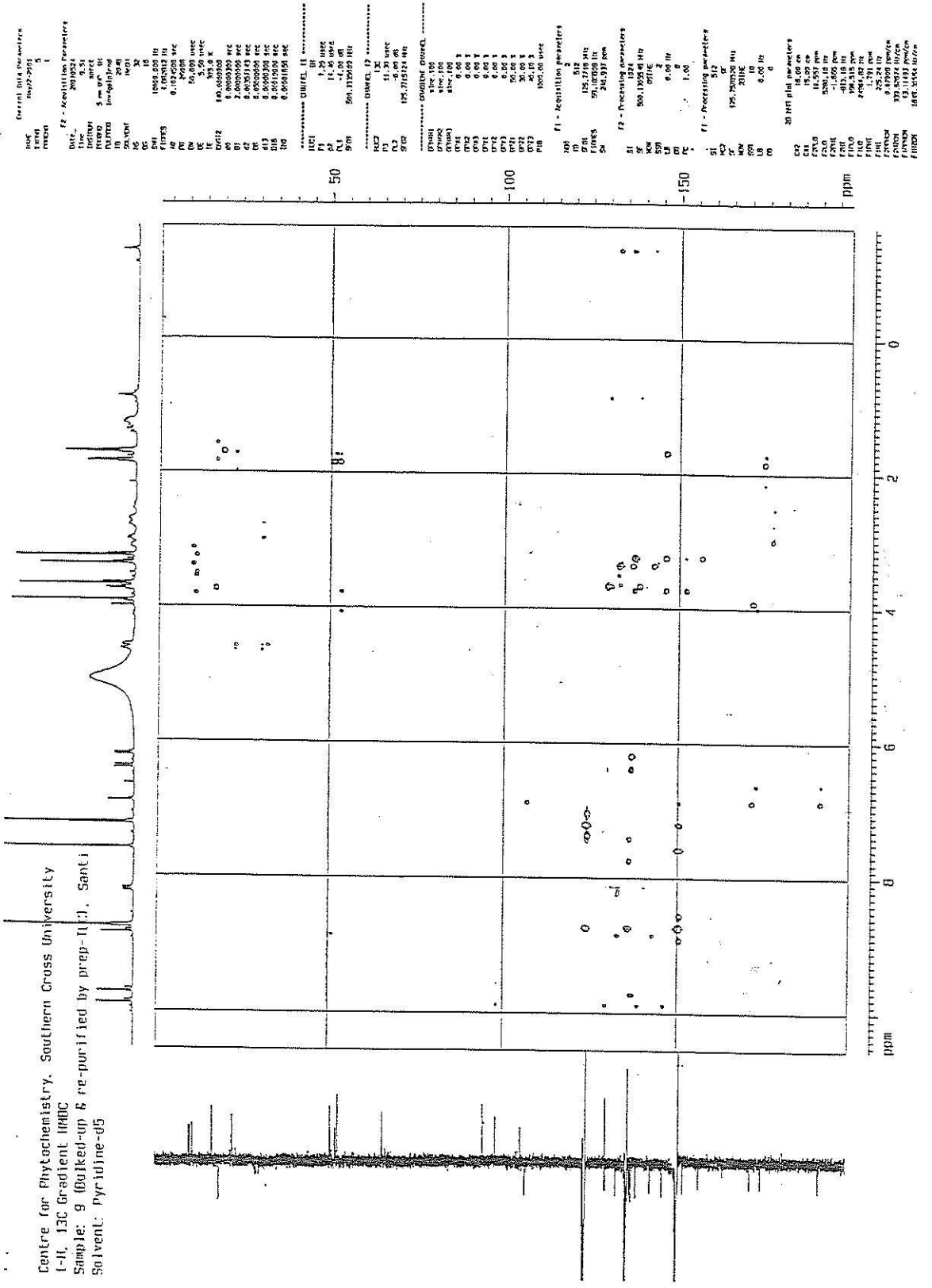
Name:   
 Date:   
 13 - Acquisition Parameters   
 Date\_ 20060414   
 Time\_ 09:00:00   
 Sample 9   
 Solvent pyridine-d5   
 13 - Processing parameters   
 SI 1024   
 SF 500.135000 MHz   
 F2 101.625131 MHz   
 F1 500.135000 MHz   
 AQ 1.00   
 20 - 1H 1D parameters   
 SI 65536   
 SF 500.135000 MHz   
 F2 101.625131 MHz   
 F1 500.135000 MHz   
 AQ 1.00   
 20 - 13C 1D parameters   
 SI 65536   
 SF 125.761328 MHz   
 F2 101.625131 MHz   
 F1 500.135000 MHz   
 AQ 1.00   
 20 - 2D parameters   
 SI 65536   
 SF 500.135000 MHz   
 F2 101.625131 MHz   
 F1 500.135000 MHz   
 AQ 1.00   
 20 - 2D parameters   
 SI 65536   
 SF 500.135000 MHz   
 F2 101.625131 MHz   
 F1 500.135000 MHz   
 AQ 1.00



Centre for Phytochemistry, Southern Cross University  
 1-11, 13C Gradient HSQC  
 Sample: 9 (Bulked-up & re-purified by prep-HPLC) Santi  
 Solvent: Pyridine-d5

รูปที่ 54 แสดง Gradient HSQC spectrum ของสารตัวที่ 8

Centre for Phytochemistry, Southern Cross University  
 1-11, 13C Gradient HMBC  
 Sample: 9 (Bulked-up & re-purified by prep-II). Santal  
 Solvent: Pyridine-d5



===== CHANNEL F1 =====  
 CH101 B1  
 F1 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F2 =====  
 CH201 B1  
 F2 500.132545 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F3 =====  
 CH301 B1  
 F3 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F4 =====  
 CH401 B1  
 F4 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F5 =====  
 CH501 B1  
 F5 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F6 =====  
 CH601 B1  
 F6 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F7 =====  
 CH701 B1  
 F7 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F8 =====  
 CH801 B1  
 F8 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F9 =====  
 CH901 B1  
 F9 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F10 =====  
 CH1001 B1  
 F10 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F11 =====  
 CH1101 B1  
 F11 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

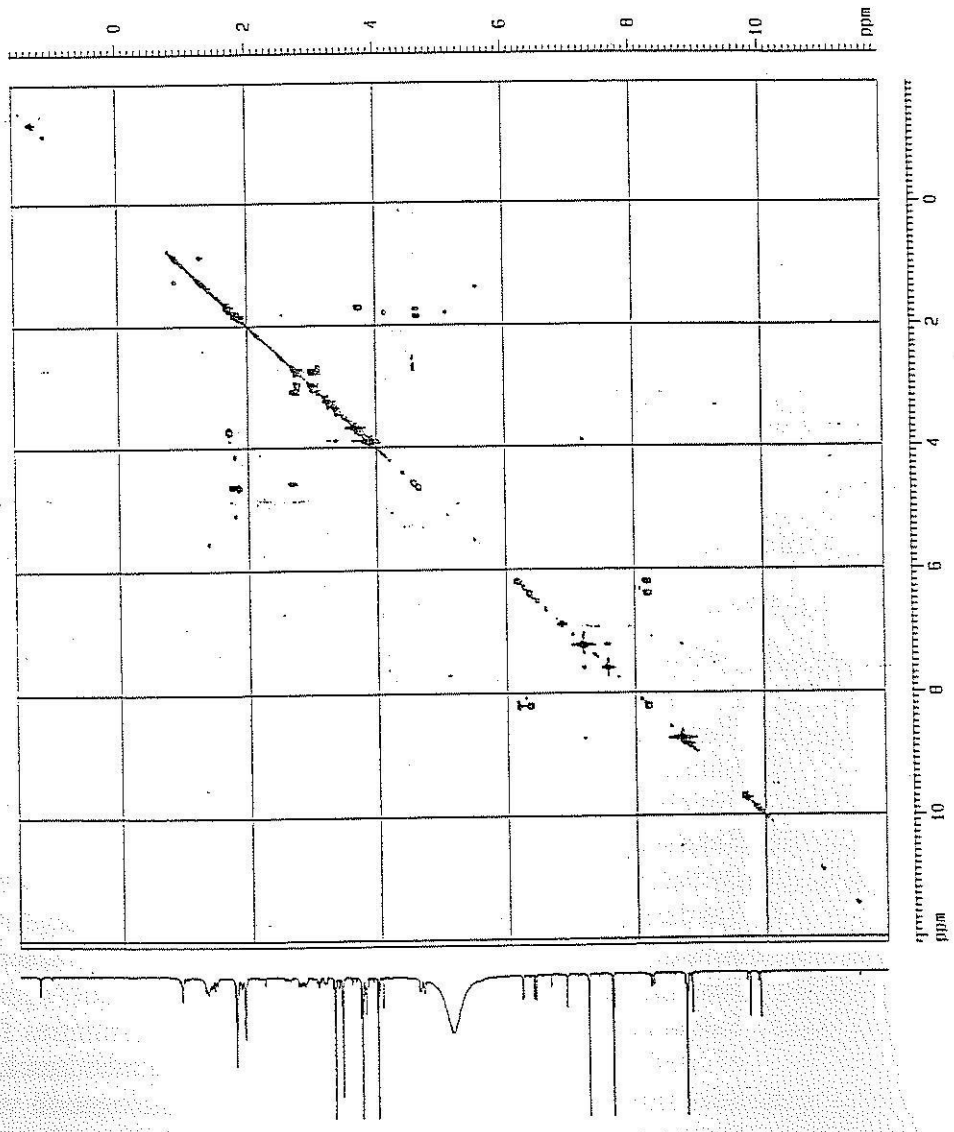
===== CHANNEL F12 =====  
 CH1201 B1  
 F12 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F13 =====  
 CH1301 B1  
 F13 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F14 =====  
 CH1401 B1  
 F14 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

===== CHANNEL F15 =====  
 CH1501 B1  
 F15 125.7718 MHz  
 Q1 14.40 MHz  
 Q2 50.313102 MHz

Centre for Phytochemistry, Southern Cross University  
 1-11 Gradient COSY  
 Sample: 9 (Bulked-up & re-purified by prep-(L). Santi  
 Solvent: Pyridine-d5



Current Data Parameters  
 NAME: M422-2001  
 EXPNO: 3  
 PROCNO: 1  
 Date\_: 20010523  
 Time: 18.05  
 INSTRUM: spect  
 PULPROG: zgpg30  
 TD: 65536  
 SOLVENT: Py  
 NS: 8  
 DS: 4  
 SWH: 10792.000 Hz  
 FIDRES: 4.391610 Hz  
 AQ: 0.1135100 sec  
 RG: 409.500  
 DQ: 15.000 usec  
 DE: 15.000 usec  
 TE: 300.2 K  
 D0: 0.0000000 sec  
 U1: 2.0000000 sec  
 U2: 0.0000000 sec  
 U3: 0.0000000 sec  
 U4: 0.0000000 sec  
 U5: 0.0000000 sec  
 U6: 0.0000000 sec  
 U7: 0.0000000 sec  
 U8: 0.0000000 sec  
 U9: 0.0000000 sec  
 U10: 0.0000000 sec  
 CHANNEL f1  
 NUC1: 13C  
 P1: 7.20 usec  
 PL1: 7.20 usec  
 FLS: -4.00 dB  
 SFO1: 125.7603000 MHz  
 \*\*\*\*\* ACQUISITION CHANNEL \*\*\*\*\*  
 CPDPRG1: sine100  
 GAMMA1: 13C  
 SFO1: 125.7603000 MHz  
 P1: 7.20 usec  
 PL1: 7.20 usec  
 FLS: -4.00 dB  
 SFO1: 125.7603000 MHz  
 \*\*\*\*\* CHANNEL PARAMETERS \*\*\*\*\*  
 F1 - Acquisition parameters  
 NU0: 100  
 NU1: 512  
 SFO1: 500.1325 MHz  
 FIDRES: 17.564274 Hz  
 SW: 17.581100 MHz  
 \*\*\*\*\* CHANNEL PARAMETERS \*\*\*\*\*  
 F2 - Processing parameters  
 SI: 1024  
 SF: 500.1300500 MHz  
 WH: sine  
 SH: sine  
 LB: 0.00 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.00  
 \*\*\*\*\* CHANNEL PARAMETERS \*\*\*\*\*  
 F1 - Processing parameters  
 SI: 1024  
 SF: 500.1300500 MHz  
 WH: sine  
 SH: sine  
 LB: 0.00 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.00  
 \*\*\*\*\* CHANNEL PARAMETERS \*\*\*\*\*  
 F2 - Processing parameters  
 SI: 1024  
 SF: 500.1300500 MHz  
 WH: sine  
 SH: sine  
 LB: 0.00 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.00  
 \*\*\*\*\* CHANNEL PARAMETERS \*\*\*\*\*  
 F1 - Processing parameters  
 SI: 1024  
 SF: 500.1300500 MHz  
 WH: sine  
 SH: sine  
 LB: 0.00 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.00  
 \*\*\*\*\* CHANNEL PARAMETERS \*\*\*\*\*  
 F2 - Processing parameters  
 SI: 1024  
 SF: 500.1300500 MHz  
 WH: sine  
 SH: sine  
 LB: 0.00 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.00

รูปที่ 56 แสดง Gradient COSY spectrum ของสารตัวที่ 8



## ประวัติบุคคล

1. ชื่อ – นามสกุล ภาษาไทย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สันติ สักดาร์ตัน  
ภาษาอังกฤษ Asst. Prof. Dr.Santi Sakdarat
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3110101782504
3. ระบุตำแหน่งบริหาร/วิชาการ ที่เป็นปัจจุบัน ผศ.ดร.
4. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
111 ถนนมหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000  
โทรศัพท์ 044 – 224302 โทรสาร 044 – 224185  
โทรศัพท์เคลื่อนที่ 084 -0927697  
E-mail [santi@sut.ac.th](mailto:santi@sut.ac.th)

## 5. ประวัติการศึกษา

B.Sc. Honors (Chemistry) 2517 Prince of Songkla University  
M.Sc. (Organic Chemistry) 2519 Mahidol University  
Ph.D. (Organic Synthesis) 2522 University of Glasgow. UK

## 6. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ

1. Searching New Drugs from Thai Traditional Medicinal Plants and Natural Products by Extraction, Isolations, Structure Elucidation and Biological Evaluation
2. Applications of LC-MS for analysis determination of natural products, drugs residues in environment food and toxicology

## 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

## 7.1 ผลงานวิจัย

1. Sakdarat, S. and Robins, D.J. 1979. "Synthesis of the  $8\beta$ -Pyrrolizidine Base, (+)-Isoretronecanol, (+) – Supinidine, and (+)-Laburnine" J.chem. Soc., Chem. Commun., 1181.
2. Sakdarat, S. and Robins, D.J.1980. "Synthesis of 13, 13-Dimethyl-1, 2-dihydrocrotalanine", J. Chem. Soc., Chem. Commun., 282
3. Sakdarat, S. and Robins, D.J. 1981. "Synthesis of Optically Active Pyrrolizidine Bases". J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1., 909.
4. Sakdarat, S. Robins, D.J.and Devlin, J.A. 1982 ."Pyrrolizidine Alkaloid Analogues. Synthesis of Eleven-membered Macrocyclic Diester of Retronecine". J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1., 1117.
5. Sakdarat, S. and Williams, D.R. 1983. "Opportunities for Selective Removal of Methoxyethoxymethyl (MEM) Ethers". Tetrahedron Lett. 24, 3965.
6. Sakdarat, S. and Kowalski, C.J. "Ester Homologation via Ynolate Anions" J. Organic Synthesis, submitted.
7. Sakdarat, S. and Kowalski, C.J. "Silyl Ynol Ethers for Alkoxyethylene Introduction, Including the Synthesis of d, 1-Oudemansin". Journal of the American Chemical Society, submitted.

8. Sakdarat, S. and Kowalski, C.J. 1990. "Reaction of Silyl Ynol Ethers with Aldehyde and Acetals: An Alternative to the Horner-Wadsworth-Emmons Condensation". *Journal of Organic Chem.* 55, 1977-1979.
9. Sakdarat, S., Barrett, A.G.M., Cheng, M.C., Spilling, C.D. and Taylor, S.J. 1989. "Stereocontrolled Total Synthesis of the Penicillanate ester (2S, 5R)-benzyl 3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo [3.2.0] heptane-2-carboxylate". *Tetrahedron Lett.* 30, 2349.
10. Sakdarat, S. and Barrett, A.G.M. 1990. "Total Synthesis of Penicillanic Acid S, S-Dioxide and 6-Aminopenicillanic Acid Using (Benzyloxy) nitromethane". *Journal of Organic Chem.* 55, 5110-5117.
11. Smitasiri, Y., and Sakdarat, S 1995. "The Means of Application of *Pueraria mirifica* for Pigeon (*Columba sp.*) Birth control". *Suranaree J. Sci. Technol.* 2, 89-96.
12. Sakdarat, S. and Robins, D.J. 1999. Chemical constituents from Bitter Cucumber, *Momordica charantia* Linn. Abstract of the 25th Congress on Science and Technology of Thailand, at Pissanulog, A-158, 404-5
13. Dechatiwongse Na Ayudhya T, Sakdarat S, Shuyyaprom A, Pattamadilok D, Bansiddhi J, Waterman PG and Karagianis G. 2001. Chemical Constituents from the Leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. 2001. Abstract of the 27th Congress on Science and Technology of Thailand, at Songkhla, 16-03p-05, 156
14. Dechatiwongse Na Ayudhya T, Sakdarat S, Shuyyaprom A, Pattamadilok D, Bansiddhi J, Waterman PG and Karagianis G. 2001. Chemical Constituents of the Leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. *Thai Journal of Phytopharmacy.* 8(1), 1 – 8.
15. Chuankhayan P, Hua Y, Svasti J, Sakdarat S, Sullivan P.A., and Ketudat Cairns J.R. 2005. Purification of an isoflavonoid 7-O-B-apiosyl-glucoside B-glycosidase and its substrates from *Dalbergia nigrescens* Kurz. *Phytochemistry.* 66, 1880-1889.
16. Sakdarat S., Panyakom K., Shuyyaprom A., and Samart N.(2006). The constituents of the leaves of *clinacanthus nutans* landau part II. In *International Conference on Applied Science(ICAS-2006)*. 5-7 November 2006, Laos.
17. Sakdarat S., Panyakom K., Shuyyaprom A., and Samart N.(2007). Chemical composition investigation of the *clinacanthus nutans* landau leaves. In *The 10th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry(IKCOC-10)* 12-17 November 2006, Japan.
18. Sakdarat S., Robins D., 2008. Chemical Constitutens of the Thai Bitter Gourd *Momordica Charantia* Linn. (Marakheenok). The 2nd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region, Hanoi, Vietnam, 2-3 October, 2008.
19. Sakdarat S., Samart N., 2008. Chemical Constituents from the rhizome of Smaller Galanga (*Alpinia officinarum* Hance). The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products, Nanning, Guangxi, P.R. China 29-31 October 2008.
20. Sakdarat S., Shuyyaprom A., Dechatiwongse Na Ayudhya T., Pientong C., Ekalaksananan T., Thongchai S., 2008. Bioactive Constituents from the Leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau for anti-herpes simplex virus type 1 and type 2 activities. The 2nd International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO). Naresuan University at Phayoa, Thailand

17-19 December 2008, Naresuan Phayoa Journal Volume 1, Supplement(1) page 43, 2008.

21. Sakdarat S., Shuyprom A., Dechatiwongse Na Ayudhya T., Waterman P.G. and Karagianis G., 2008, 'Chemical composition investigation of the clinacanthus nutans landau leaves', Thai Journal of Phytopharmacy, 13(2) – 15(1), 13-24
22. Sakdarat S., Shuyprom A., Pientong C., Ekalaksananan T., Thongchai S., 2009, 'Bioactive constituents from the leaves of Clinacanthus nutans Lindau', Bioorganic & Medicinal Chemistry 17 (2009) 1857-1860

## 7.2 รางวัลที่เคยได้รับ

1. Graduate Fellowship, Glasgow University, U.K. Oct. 1976 – Sept. 1979
2. Graduate Fellowship, Mahidol University, THAILAND March 1974 – Feb. 1976
3. Studentship from Prime Minister T. Kittikajon, THAILAND. 1971 – 1972

## 7.3 งานวิจัยหลังปริญญาเอก

1. 1979 – 1982 Postdoctorate Southampton University, England
2. 1982 – 1986 Postdoctorate Indiana University, USA.
3. 1986 – 1988 Postdoctorate Smith Kline Beecham, Pharmaceutical Company USA.
4. 1988 – 1990 Postdoctorate Northwestern University, USA.
5. 1990 – 1992 Postdoctorate Virginia Tech. and State University, USA.