

การเสาะหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชวงศ์ Compositae บางชนิด

นางสาว สุทธิจิต ศรีวัชรกุล



สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดมหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-280-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SEARCHING FOR BIOACTIVE SUBSTANCES FROM SOME COMPOSITAE WEEDS



Miss Suttijit Sriwatcharakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Graduate School

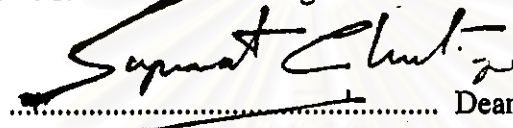
Chulalongkorn University

Academic year 1998

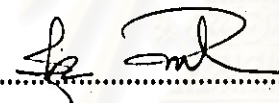
ISBN 974-332-280-9

Thesis Title Searching for bioactive substances from some Compositae weeds
By Miss Suttijit Sriwatcharakul
Department Biotechnology
Thesis Advisor Associate Professor Udom Kokpol, Ph.D.


Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment
of the Requirements for the Master's Degree



..... Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee:


..... Chairman
(Assistant Professor Sumate Tantratian, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Udom Kokpol, Ph.D.)


..... Member
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)


..... Member
(Siriporn Zungsonthiporn, Ph.D.)

สุทธิจิต ศรีวัชรกุล : การเสาะหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัชพืชวงศ์ Compositae บางชนิด
(SEARCHING FOR BIOACTIVE SUBSTANCES FROM SOME COMPOSITAE WEEDS)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. อุดม ก๊กผล; 106 หน้า. ISBN 974-332-280-9.

ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของวัชพืชวงศ์ Compositae 4 ชนิด คือ สาบหมา (*Eupatorium adenophorum* Spreng.), สาบเสือ (*Eupatorium odoratum* Linn.), สาบแร้งสาบกา (*Ageratum conyzoides* Linn.) และหญ้าก้อนกลม (*Sphaeranthus africanus* Linn.) พบว่า สกัดได้จากส่วนเหนือดินของสาบหมา แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ และเมื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชและความเป็นพิษต่อไรสน้ำตาล พบว่า สกัดโคคลอโรมีเทน, เอทิลเอซิเตต และบิวทานอล ของสาบหมา สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว 95.35%, 90.05% และ 100% ที่ความเข้มข้น 0.1 g และแสดงความเป็นพิษต่อไรสน้ำตาล โดยมีค่า LC_{50} 10.43, 12.56 และ 10.02 ตามลำดับ เมื่อทำการแยกสกัดทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี สามารถแยกสารได้ 6 ชนิด คือ ของผสมแอลกอฮอล์โซ่ตรง, stigmasterol, ของผสมกรดโซ่ตรง, ของผสมเอสเทอร์โซ่ตรง, protocatechuic acid และสเตียรอยด์ไกลโคไซด์ โดย protocatechuic acid แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นข้าว 92.30% ที่ความเข้มข้น 1000 ppm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา
สาขาวิชา เทคโนโลยีสารสนเทศ
ปีการศึกษา 2541

ลายมือชื่อนิติกร ศพไฉต ศักดิ์กุล
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศพพ ๕-๖
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C827262

BIOTECHNOLOGY

*** Eupatorium adenophorum / COMPOSITAE / PLANT GROWTH INHIBITION

KEY WORD:

SUTTIJIT SRIWATCHARAKUL : SEARCHING FOR BIOACTIVE

SUBSTANCES FROM SOME COMPOSITAE WEEDS. THESIS ADVISOR :

ASSOC. PROF. UDOM KOKPOL, Ph.D. 106 pp. ISBN 974-332-280-9.

In the search for bioactive substances from four weed species in Compositae family; *Eupatorium adenophorum* Spreng., *Eupatorium odoratum* Linn., *Ageratum conyzoides* Linn. and *Sphaeranthus africanus* Linn., the preliminary results revealed that the crude extract of the aerial part of *E. adenophorum* displayed the most attractive biological activities. Further solvent fractionation of *E. adenophorum* and biological tests exhibited that dichloromethane, ethyl acetate and butanol crude extracts showed rice growth inhibition activity 95.35%, 90.05% and 100% at concentration 0.1 g, respectively and displayed cytotoxicity against brine shrimp (*Artemia salina* Linn.) with LC_{50} value of 10.43, 12.56 and 10.02, respectively at 24 h. The separation of dichloromethane, ethanol, ethyl acetate and butanol crude extracts by means of chromatograph led to the isolation of 6 substances. They were found to be a mixture of long chain alcohols, stigmasterol, a mixture of long chain carboxylic acids, a mixture of long chain esters, protocatechuic acid and steroid glycoside. Protocatechuic acid displayed high bioactivity as plant growth inhibitor 92.30% at dose level 1000 ppm.

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....

สาขาวิชา เทคโนโลยีสารสนเทศ.....

ปีการศึกษา 2541.....

ลายมือชื่อนิสิต..... สติจิต สัตยาภรณ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... สติจิต สัตยาภรณ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to express her deep gratitude to her advisor, Associate Professor Dr. Udom Kokpol for his advice and generous contribution of comment and suggestion. She is grateful to Dr. Siriporn Zungsonthiporn (Weed Science Subdivision, Botany and Weed Science Division, Ministry of Agriculture and Cooperatives) for plant growth inhibition assay, Associate Professor Dr. Kingkaew Wattanasermkit (Department of Biology) for providing facilities and advice in brine shrimp cytotoxicity tests, Dr. Worawan Bhanumnavin for kindly testing antifungal, antioxidant and larvicidal activity. The author also would like to thank her thesis committee, Assistant Professor Dr. Sumate Tantratian, Assistant Professor Dr. Warinthorn Chavasiri, Dr. Siriporn Zungsonthiporn. Great appreciations are to Associate Professor Dr. Gaysorn Veerachato and Dr. Santi Tip-pyang of the Natural Product Research Unit for their helpful discussion, advice and support.

Special thank is given to collaborative partners at Beijing Medical School who kindly performed and provided a preliminary results of cytotoxicity tests against various cell lines. Thanks are extended to her friends for their friendship, comment, helpfulness and cheerfulness.

She would like to express her deepest sincere gratitude to her parents and brother for their love, understanding, encouragement and support throughout the entire study.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Contents

	Pages
Abstract in Thai.....	iv
Abstract in English.....	v
Acknowledgement.....	vi
List of Figures.....	ix
List of Schemes.....	xi
List of Tables.....	xii
List of Abbreviations.....	xiv
Chapter	
I INTRODUCTION	
1.1 Botanical Description of Family Compositae.....	2
1.2 Allelopathy.....	3
1.3 Literature Search of <i>Eupatorium odoratum</i> Linn.	9
1.4 Literature Search of <i>Ageratum conyzoides</i> Linn.	9
1.5 Literature Search of <i>Sphaeranthus africanus</i> Linn.	10
1.6 Literature Search on the Chemical Constituents of <i>Eupatorium</i> <i>adenophorum</i> Spreng.....	11
1.7 Utility of <i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng.....	13
1.8 Chemical Constituents Studies on <i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng.....	13
1.9 Goal of Research.....	19
II EXPERIMENTAL	
2.1 Plant Materials.....	20
2.2 General Procedures.....	23
2.3 Chemicals.....	23
2.4 General Extraction for Preliminary Study.....	23

	Pages
2.5 Bioassay Experiments.....	25
2.6 Extraction.....	29
III RESULTS AND DISCUSSION	
3.1 Biological Activity Results of Preliminary Screening Tests.....	30
3.2 The Results of Extraction and Fractionation of <i>E. adenophorum</i> Spreng.	37
3.3 Separation.....	46
3.4 Structural Elucidation.....	62
3.5 Plant Growth Inhibition Activity of Isolated Substances	80
IV CONCLUSION	
REFERENCES.....	91
APPENDICES.....	96
VITA.....	106

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Figures

Figures	Pages
1.1 <i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng.	12
1.2 Some compounds isolated from <i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng.....	16
2.1 Plant materials	21
3.1 Inhibitory effect of 0.1 g ethanolic crude extract of some Compositae weeds on rice seedling growth	31
3.2 Inhibitory effect of 0.1 g crude extract of <i>E. adenophorum</i> on rice seedling growth	40
3.3 Inhibitory effect of crude extract of <i>E. adenophorum</i> on <i>M. pigra</i>	41
3.4 Inhibitory effect of crude extract of <i>E. adenophorum</i> on <i>E. crusgalli</i>	42
3.5 Inhibitory effect of fractions of dichloromethane crude extract of <i>E. adenophorum</i> on rice seedling	47
3.6 Inhibitory effect of fractions of dichloromethane crude extract of <i>E. adenophorum</i> on <i>E. crusgalli</i>	48
3.7 Inhibitory effect of fraction III DE of dichloromethane crude extract of <i>E. adenophorum</i> on rice seedling.....	52
3.8 Inhibitory effect of fractions of ethyl acetate crude extract on rice seedling	55
3.9 The IR spectrum of Mixture 1.....	63
3.10 The ¹ H-NMR spectrum of Mixture 1.....	63
3.11 The ¹³ C-NMR spectrum of Mixture 1.....	64
3.12 The IR spectrum of Compound 2.....	66
3.13 The ¹ H-NMR spectrum of Compound 2.....	66
3.14 The ¹³ C-NMR spectrum of Compound 2.....	67
3.15 The IR spectrum of Mixture 3.....	70
3.16 The IR spectrum of Mixture 4.....	71
3.17 The ¹ H-NMR spectrum of Mixture 4.....	72

Figures	Pages
3.18 The IR spectrum of Compound 5.....	73
3.19 The ¹ H-NMR spectrum of Compound 5.....	74
3.20 The ¹³ C-NMR spectrum of Compound 5.....	75
3.21 The IR spectrum of Compound 6.....	77
3.22 The ¹ H-NMR spectrum of Compound 6.....	78
3.23 The ¹³ C-NMR spectrum of Compound 6.....	78
3.24 Inhibitory effect of Compound 2 on rice seedling growth	81
3.25 Inhibitory effect of Mixture 3 on rice seedling growth	82
3.26 Inhibitory effect of Mixture 4 on rice seedling growth	83
3.27 Inhibitory effect of Compound 5 on rice seedling growth	84
3.28 Inhibitory effect of Compound 6 on rice seedling growth	85
3.29 Inhibitory effect of Mixture 7 on rice seedling growth	86
3.30 Inhibitory effect of Mixture 8 on rice seedling growth	87


 สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Schemes

Schemes	Pages
2.1 The extraction and fractionation for preliminary study of plant sample	24
3.1 The procedure and results of extraction and fractionation of <i>E. adenophorum</i> Spreng.	38



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Tables

Tables	Pages
1.1 Chemical constituents of <i>E. adenoporum</i> Spreng.....	14
3.1 Inhibitory effect of ethanolic crude extract of some Compositae on growth of rice (<i>Oryza sativa</i> cv. RD23).....	30
3.2 Inhibitory effect of crude extracts of some Compositae on growth of rice (<i>Oryza sativa</i> cv. RD23)	31
3.3 Brine shrimp (<i>Artemia salina</i>) cytotoxicity test by some Compositae weeds	34
3.4 Cytotoxicity test against various carcinoma cell lines by some Compositae weeds.....	35
3.5 Other activities against some Compositae crude extracts.....	36
3.6 Inhibitory effect of crude extracts of <i>E. adenophorum</i> on growth of rice (<i>Oryza sativa</i> cv. RD23).....	37
3.7 Inhibitory effect of crude extracts of <i>E. adenophorum</i> on <i>Mimosa pigra</i>	41
3.8 Inhibitory effect of crude extracts of <i>E. adenophorum</i> on growth of <i>E. crusgalli</i>	42
3.9 Brine shimp (<i>Artemia salina</i>) cytotoxicity test.....	43
3.10 Cytotoxicity test against various carcinoma cell lines.....	44
3.11 The results of the separation of Fraction III.....	46
3.12 Inhibitory effect of fractions of dichloromethane crude extract of <i>E. adenophorum</i> on growth of rice	47
3.13 Inhibitory effect of fractions of dichloromethane crude extract of <i>E. adenophorum</i> on <i>E. crusgalli</i>	48
3.14 Brine shimp (<i>Artemia salina</i>) cytotoxicity test.....	49
3.15 Cytotoxicity test against various carcinoma cell lines.....	50
3.16 The results of the separation of Fraction III DE.....	51

	Pages
3.17 Inhibitory effect of fractions of dichloromethane crude extract of <i>E. adenophorum</i> on growth of rice (<i>O. sativa</i> cv. RD23).....	52
3.18 The results of the separation of Fraction III DEE.....	53
3.19 The results of the separation of Fraction IV.....	54
3.20 Inhibitory effect of fractions of ethyl acetate crude extract of <i>E. adenophorum</i> on growth of rice (<i>O. sativa</i> cv. RD23).....	55
3.21 Brine shimp cytotoxicity test.....	56
3.22 Cytotoxicity test against various carcinoma cell lines.....	57
3.23 The results of the separation of Fraction IV AC.....	58
3.24 The results of the separation of Fraction IV ACA.....	59
3.25 The results of the separation of Fraction V.....	60
3.26 Brine shimp (<i>Artemia salina</i>) test.....	61
3.27 The results of the separation of Fraction VD.....	61
3.28 The ¹³ C-NMR spectrum of β -sitosterol and stigmasterol compared with Compound 2.....	68
3.29 The comparison of ¹³ C-NMR of protocatechuic acid.....	75
3.30 Inhibitory effect of Compounds 2 on growth of rice.....	81
3.31 Inhibitory effect of Mixture 3 on growth of rice.....	82
3.32 Inhibitory effect of Mixture 4 on growth of rice.....	83
3.33 Inhibitory effect of Compound 5 on growth of rice.....	84
3.34 Inhibitory effect of Compound 6 on growth of.....	85
3.35 Inhibitory effect of Mixture 7 on growth of rice.....	86
3.36 Inhibitory effect of Mixture 8 on growth of rice.....	87

List of Abbreviations

b	broad	LC ₅₀	concentration that caused 50% lethality
°C	degree celsius		
cont.	continue	m	multiplet (NMR)
¹³ C NMR	carbon 13 nuclear magnetic resonance	min	minute
cm ⁻¹	unit of wavenumber	mL	milliliter (s)
d	doublet (NMR)	mg	milligram (s)
dd	doublet of doublet (NMR)	m.p.	melting point
DMSO	dimethylsulfoxide	MW	molecular weight
Fig.	Figure	NMR	nuclear magnetic resonance
g	gram (s)	No.	number
GC-MS	gas chromatograph- mass spectrometry	ppm	part per million
¹ H NMR	proton nuclear magnetic resonance	R _f	retarding factor in chromatogram
IR	infrared	s	singlet (NMR)
J	coupling constant	t	triplet (NMR)
kg	kilogram (s)	wt	weight
		wt by wt	weight by weight
		δ	chemical shift

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย