

การแยกสารด้านการเจริญของ เซลล์จากเปลือกต้นจำปีป่า

นายอาทร ไร่ไพลย์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชเวท

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

ISBN 974-568-962-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014234

117465170

ISOLATION OF CYTOTOXIC AGENTS FROM
PARAMICHELIA BAILLONII STEM BARK

Mr.Arthorn Rivepiboon

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

Department of Pharmacognosy

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-568-962-9

Thesis Title ISOLATION OF CYTOTOXIC AGENTS FROM
PARAMICHELIA BAILLONII STEM BARK
By Mr.Arthorn Rivepiboon
Department Pharmacognosy
Thesis Advisors Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi
Ms.Porntipa Picha

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

Thavorn Vajrabhaya
.....Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee :

Kalaya Pharadai
.....Chairman
(Associate Professor Kalaya Pharadai, M.Eng.)

Payom Tantivatana
.....Member
(Professor Payom Tantivatana, Ph.D.)

Nijsiri Ruangrungsi
.....Member
(Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, M.Sc.)

Porntipa Picha
.....Member
(Ms. Porntipa Picha, M.Sc.)



อาทร รวีไพบูลย์ : การแยกสารด้านการเจริญของเซลล์จากเปลือกต้นจำปีป่า (ISOLATION OF CYTOTOXIC AGENTS FROM PARAMICHELIA BAILLONII STEM BARK) อ.ที่ปรึกษา : รศ.นิจศิริ เรืองรังษี, นางพรทิพา พิศา, 221 หน้า.

จากการแยกและตรวจสอบสูตรโครงสร้างของสารประกอบจากเปลือกต้นจำปีป่า (Paramichelia baillonii) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองในภาคเหนือของประเทศไทย สามารถแยกสารประกอบได้ 4 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 คือ dihydroparthenolide ชนิดที่ 2 คือ (-)-parthenolide ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท germacranolide epoxide และมีรายงานว่ามียฤทธิ์ต้านเนื้องอก ชนิดที่ 3 เป็นสารประกอบชนิดใหม่ประเภท germacranolide alkaloid ที่ไม่เคยพบมาก่อนในธรรมชาติและให้ชื่อว่า (-)-bisparthenolidine ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด KB พบว่า $ED_{50}=0.73$ mcg/ml และสารประกอบชนิดที่ 4 คือ liriodenine ซึ่งเป็น oxoaporphinoid alkaloid สีเหลือง ได้ทำการพิสูจน์สูตรโครงสร้างโดยใช้ proton-nmr ^{13}C -nmr, และ 2D-COSY พร้อมทั้งบรรยายการกำหนดสูตรโครงสร้างอย่างละเอียด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เกษัชเวช
สาขาวิชา เกษัชเวช
ปีการศึกษา 2530

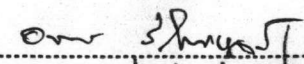

ลายมือชื่อนิติ *Om Phung*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *Andi*
.....

ARTHORN RIVEPIBOON : ISOLATION OF CYTOTOXIC AGENTS FROM PARAMICHE-
LIA BAILLONII STEM BARK. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. NIJSIRI
RUANGRUNGSI, M.Sc., Ms. PORNTIPA PICHA, M.Sc., 221 PP.

Four components have been isolated from the stem bark of Paramiche-
lia baillonii and their structures determined. This plant has been used by
natives of Northern Thailand for medicinal purposes. The first component was
dihydroparthenolide. The second component was the germacranolide epoxide,
(-)-parthenolide, which was previously reported to possess antitumor activity.
The third component was a new and unusual germacranolide alkaloid which has
been named (-)-bisparthenolidine. It was found to be active in the KB
cytotoxic test with ED₅₀ = 0.73 mcg/ml. The fourth component was the yellow
oxoaporphinoid alkaloid, liriodenine. Structures elucidation has been
established through high field proton-nmr, ¹³C-nmr and 2D-COSY experiment.
A detail discussion on the elucidation of chemical structures is included.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา Pharmacognosy
สาขาวิชา Pharmacognosy
ปีการศึกษา 1987

ลายมือชื่อนิติศ 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express his sincere gratitude to the following:

*Associate Professor Nijsiri Ruangrunsi of Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for his supervision of the research, helpful guidances, keen interest and continual encouragements throughout the course of this study.

Ms. Porntipa Picha, Chief of Section of Experimental Cancer Therapy, Research Division, National Cancer Institute for her co-advisor encouragements and keen interest during the work.

Professor Gordon L.Lange, Guelph-Waterloo Centre for Graduate Work in Chemistry, Department of Chemistry and Biochemistry; University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada for his kindness in identification of all compounds.

Miss Kalaya Preechanukul, Miss Dalad Pornsiriprasert and staff of Research Division, National Cancer Institute for their suggestions in cytotoxic activity test.

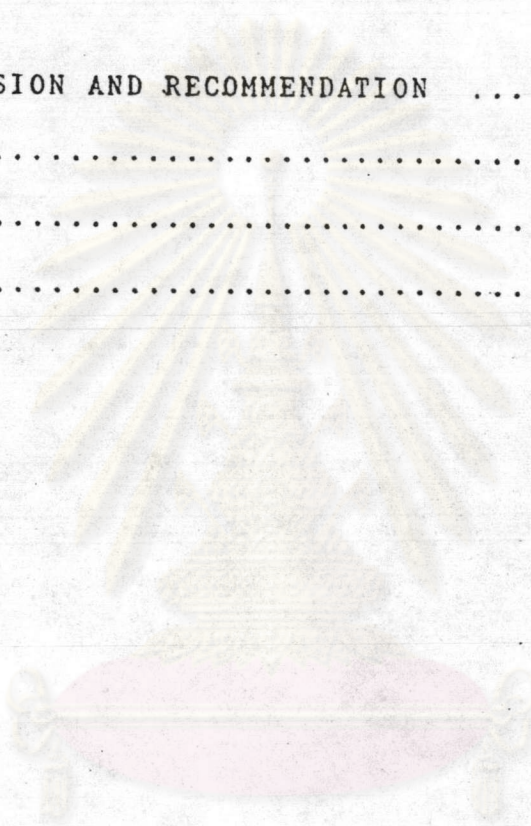
All staff members of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their kindnesses and helps.

Graduate School, Chulalongkorn University, for granting his partial financial support of eight thousand and five baht to fullfil this investigation.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	IV
ABSTRACT (ENGLISH)	V
ACKNOWLEDGEMENTS	VI
CONTENTS	VII
LIST OF FIGURES	IX
LIST OF TABLES	XII
ABBREVIATIONS	XIII
CHAPTER I	
INTRODUCTION	1
CHAPTER II	
HISTORICAL	8
- Chemistry of Magnoliaceae	8
- Biosynthesis of Sesquiterpene Lactones ...	42
- Biological Activities of Sesquiterpene Lactones	52
CHAPTER III	
EXPERIMENTAL	79
- Source of Plant Material	79
- General Techniques	79
- Extraction and Purification	82
- Characterization and Identification of the Individual Components	84
- Cytotoxicity Activity Test	92

	Page
CHAPTER IV	
DISCUSSION	105
CHAPTER V	
CONCLUSION AND RECOMMENDATION	112
REFERENCES	113
APPENDICES	172
VITA	221



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 <i>Paramichelia baillonii</i> (Pierre)Hu	5
1.2 <i>Paramichelia baillonii</i> (Pierre)Hu stem bark	6
1.3 <i>Paramichelia baillonii</i> (Pierre)Hu leaves	7
2.1 Preliminary stages in the biosynthesis of isoprenoid compounds	43
2.2 Types and biogenetic relationships of germacranolide-derived sesquiterpene lactones ..	44
2.3 Biogenesis of the germacranolide skeleton	46
2.4 Biogenesis of the lactone ring	50
2.5 Biogenesis of the lactone ring via furanosesesquiterpene	51
2.6 Configurational types of germacranolides	51
3.1 Microscopic appearance (100x) of 4-day culture of KB cell after normal saline addition. (negative control)	102
3.2 Microscopic appearance (100X) of 4-day culture of KB cell after 5-FU (2.5 mcg/ml) addition. (positive control)	103
3.3 Microscopic appearance (100X) of 4-day culture of KB cell after bisparthenolidine (0.5 mcg/ml) addition	104

Figure	Page
4 Infrared absorption of PB-1 in CCl ₄	199
5 ¹ H-nuclear magnetic resonance spectrum (400 MHz) of PB-1 in CDCl ₃	200
6 ¹³ C-nuclear magnetic resonance spectrum (100 MHz) of PB-1 in CDCl ₃	201
7 Electron impact mass spectrum of PB-1	202
8 Infrared absorption of PB-2 in CCl ₄	203
9 ¹ H-nuclear magnetic resonance spectrum (400 MHz) of PB-2 in CDCl ₃	204
10 ¹ H-nuclear magnetic resonance spectrum (400 MHz) of PB-2 in C ₆ D ₆	205
11 Electron impact mass spectrum of PB-2	206
12 Infrared absorption of PB-3 in CCl ₄	207
13 ¹ H-nuclear magnetic resonance spectrum (400 MHz) of PB-3 in CDCl ₃	208
14 ¹ H-nuclear magnetic resonance spectrum (400 MHz) of PB-3 in C ₆ D ₆	209
15 ¹³ C-nuclear magnetic resonance spectrum (100 MHz) of PB-3 in C ₆ D ₆ (¹ H-decoupled)	210
16 ¹ H- ¹ H COSY nuclear magnetic resonance spectrum (400 MHz) of PB-3 in CDCl ₃	211
17 ¹³ C-nuclear magnetic resonance spectrum (100 MHz) of PB-3 in CDCl ₃ (Attached Proton Test)	212
18 Electron impact mass spectrum of PB-3	213

Figure	Page
19 Ultraviolet absorption spectrum of PB-4 in EtOH	215
20 Ultraviolet absorption spectrum of PB-4 in 0.1 N HCl in EtOH	216
21 Infrared absorption of PB-4 in CH ₂ Cl ₂	217
22 ¹ H-nuclear magnetic resonance spectrum (400 MHz) of PB-4 in CDCl ₃	218
23 ¹ H-nuclear magnetic resonance spectrum (400 MHz) of PB-4 in CDCl ₃ +few drops of DMSO-D ₆	219
24 Electron impact mass spectrum of PB-4	220

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Chemical investigation of Magnoliaceae	9
2. Sesquiterpane lactones demonstrated to have antitumor and cytotoxic activity	57
3. ^1H nmr spectral data of PB-1, PB-2, PB-3 ^a	89
4. ^{13}C nmr spectral data of PB-1, PB-2, PB-3 ^a	91
5. Cell protein analysis, showing the electrophotometric absorption at 660 nm and percent growth rate	98
6. Cytotoxic activity of isolates of <i>P. baillonii</i> ...	101
7. The volume of solutions in protein determination .	179

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

APT	=	Attached Proton Test
ATP	=	Adenosine Triphosphate
B.A.	=	Biological Abstract
°C	=	Degree Celcius
¹³ C	=	Carbon 13
C.A.	=	Chemical Abstract
Calcd.	=	Calculated
CoA	=	Coenzyme A
DMSO	=	Dimethylsulphoxide
2D-NOESY	=	2 Dimension-Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ED ₅₀	=	Effective Dose 50%
eims	=	Electron Impact Mass Spectrum
5-FU	=	5 Fluorouracil
¹ H- ¹ H 2D-COSY	=	Proton-Proton 2 Dimension Correlation Spectroscopy
¹ H-NOE	=	Protron Nuclear Overhauser Effect
hrms	=	High Resolution Mass Spectrum
Hz	=	Hertz
J	=	Coupling constant
kg	=	Kilogram
M ⁺	=	Molecular ion
M	=	Molar

mcg	=	Microgram
mg	=	Milligram
MHz	=	Megahertz
min.	=	Minute
ml	=	Millilitre
mm	=	Millimetre
M.P.	=	Melting Point
m/z	=	mass to charge ratio
NOESY	=	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NSS	=	Normal Saline Solution
ppm	=	Part per Million
rel. int.	=	Relative Intensity
TFA	=	Trifluoroacetic acid
TMS	=	Tetramethylsilane

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย