การศึกษาการสร้างไอโซควิโนลีนแอลคาลอยด์ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของบอระเพ็ดพุงช้าง

นายชาลี ทองเรือง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชเวท
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538
ISBN 974-632-658-7
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16654572

STUDY ON ISOQUINOLINE ALKALOID PRODUCTION IN TISSUE CULTURES OF *STEPHANIA PIERREI* DIELS

Mr. Charlee Thongruang

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirement
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Graduate School
Chulalongkorn University
1995

ISBN 974-632-659-7

Thesis Title	Study on Isoquinoline Alkaloid Production in Tissue Cultures of *Stephania pierrei* Diels
By	Mr. Charlee Thongruang
Department	Pharmacognosy
Thesis Advisor	Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.

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

..... Dean of Graduate School
(Associate Professor Santi Thoongsuwan,Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman
(Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, M.Sc.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor
(Assistant Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)

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

..... Member
(Associate Professor Ekarin Saifah, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ชาลี ทองเรือง : การศึกษาการสร้างไอโซควิโนลีนแอลคาลอยด์ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของบอระเพ็ดพุงช้าง (Study on Isoquinoline Alkaloid Production in Tissue Culture of *Stephania pierrei* Diels.) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.วันชัย ดีเอกนามกูล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ, 91 หน้า. ISBN 974-632-658-7

การสร้างเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงและรากเพาะเลี้ยงจากหัว (tuber) ของ บอระเพ็ดพุงช้าง ทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหาร, ชนิดและปริมาณของฮอร์โมนพืช และสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม จากการทดลองพบว่าสูตรอาหารของ WHITE สามารถชักนำให้เกิดเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงและรากสั้น ๆ เมื่อวางไว้ในที่มืด และสูตรอาหาร ROOT สามารถชักนำให้เกิดรากขนาดยาวขึ้นได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืดเช่นกัน รากเพาะเลี้ยงที่ได้ถูกนำมาประเมินหาศักยภาพในการสร้าง ไอโซควิโนลีน แอลคาลอยด์ ทั้งในแง่ชนิดและปริมาณ ในการตรวจหาชนิดของสารในสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของพืช และรากเพาะเลี้ยงได้ใช้วิธีรงคเรชผิวบาง (Thin layer chromatography) โดยใช้สารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ พบว่า แอลคาลอยด์ที่รากเพาะเลี้ยงสามารถสร้างได้มีอย่างน้อย 4 ชนิด แต่จากการเปรียบเทียบค่า Rf และสเปคตรัมของ UV, IR, Mass และ ^{1}H-nmr จะพบสาร Dicentrine ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไอโซควิโนลีน แอลคาลอยด์ ที่พบในหัวเพียงตัวเดียว จากการวิเคราะห์ปริมาณของ Dicentrine ในรากเพาะเลี้ยงโดยวิธี TLC-Densitometry พบว่าปริมาณ Dicentrine ในรากเพาะเลี้ยงสูงถึง 0.82 % ต่อน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ปริมาณในหัวในธรรมชาติมีเพียง 0.013% ต่อน้ำหนักแห้ง วิทยานิพนธ์นี้เป็นปฐมนิพนธ์ที่รายงานเกี่ยวกับการสร้าง Dicentrine ซึ่งเป็นสารอะพอร์ฟีนแอลคาลอยด์ในรากเพาะเลี้ยงของบอระเพ็ดพุงช้าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เภสัชเวท ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

C575394 : MAJOR PHARMACOGNOSY
KEY WORD: ISOQUINOLINE ALKALOIDS, *STEPHANIA PIERREI* DIELS, TISSUE CULTURES, APORPHINE ALKALOIDS
CHARLEE THONGRUANG : STUDY ON ISOQUINOLINE ALKALOID PRODUCTION IN TISSUE CULTURES OF *STEPHANIA PIERRIEI* DIELS. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSIST.PROF.KITTISAK LIKHITWITAYAWUID, Ph.D. 91 PP. ISBN 974-632-658-7

Callus and root cultures of *Stephania pierrei* Diels were established from the tuber explants of the plant by manipulation of media, plant growth regulators and cultured conditions. Callus and root buds were formed on the solid medium of White in the dark and the root buds could elongate to form roots by using Root medium in same conditions. These *in vitro* cultured roots were maintained and evaluated for their potential in producing isoquinoline alkaloids. Thin layer chromatographic method was used to detect isoquinoline alkaloid types potentially produced by the cultured roots by comparing Rf values, UV, IR, Mass and ^{1}H-nmr spectra with various authentic isoquinolines. The results showed that dicentrine, an aporphine alkaloid, was the main isoquinoline alkaloid accumulated in the cultured roots. Quantitative analysis of dicentrine in the cultured roots and other plant parts was carried out by TLC-densitometry. While the tubers contained only 0.013% w/w dry weight dicentrine, the cultured roots appeared to accumulate dicentrine to the level of as high as 0.82% w/w dry weight. Apparently, this is the first report on the formation of dicentrine in *S. pierrei* cultured roots.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา เภสัชเวท ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express his sincere gratitude to his advisor, Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his invaluable advice, helpful guidance and continual encouragment throughout the course of this work.

The author is very grateful to Assistant Professor Dr.Kittisak Likhitwitayawuid of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his kindness in providing authentic isoquinolines.

The author wishes to express his thanks to

Tissue Culture Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences,Chulalongkorn University, for providing laboratory facilities during the course of this work.

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Graduate School of Chulalongkorn University and the R&D Unit for Herbs and Spices, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for granting partial financial support to conduct this research work.

All staff members of the Tissue Culture Unit for their friendship, kindness and helps.

Finally, the author wishes to express his indebtness and grateful thanks to his parents and his girl-friend, Miss Arisa Pisan-aswasenee, without whose love, understanding and cheerfulness this work would have not been successful.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

ABSTRACT (Thai)..... iv
ABSTRACT (English)..... v
ACKNOWLEDGMENTS..... vi
CONTENTS..... vii
LIST OF TABLES..... ix
LIST OF FIGURES..... x
ABBREVIATIONS.....xii
CHAPTER
I INTRODUCTION..... 1
II HISTORICAL..... 4
1.Botanical aspects.....4
1.1 Botanical aspects of *Stephania* species..... 4
1.2 Botanical aspects of *Stephania pierrei* Diels.....6
2.Chemistry of isoquinoline alkaloids..... 7
2.1. Chemical aspect of isoquinoline alkaloids.....7
2.2 Aporphine alkaloids..... 10
2.3 Isoquinoline alkaloids isolated from the *Stephania* species.....12
2.4 Extraction and isolation of isoquinoline alkaloids from *Stephania pierrei*.....28
2.5 Biosynthesis of aporphine alkaloids.....30
2.6 The production of aporphine alkaloids by plant cell cultures..... 40
III MATERIALS AND METHODS.....42
1.Chemicals..... 42
2.Plant tissue culture technique..... 42
2.1 Plant material..... 42
2.2 Nutrient media.....43
2.3 Media preparation.....44
2.4 Preparation of *S. pierrei* explants.....46
2.5 Establishment of callus cultures..... 48
2.5.1 Callus induction.....48

2.5.1.1 Effect of basal media..... 48
2.5.1.2 Effect of plant growth regurators..... 48
2.5.1.3 Effect of culture conditions.....49
2.5.2 Subculturing.....49
2.6 Root regeneration from callus cultures.....49
3,Phytochemical technique..... 49
3.1 Preparation of crude extacts from plant parts
and tissue cultures of *S. pierrei*..... 49
3.2 Identification of isoquinoline alkaloids in the sample extracts..50
3.2.1 Thin layer chromatographic conditions
for isoquinoline separation..... 50
3.2.2 TLC Densitometric analysis..... 51
3.3 Purification of dicentrine for IR,Mass and NMR analysis.....51
3.4 Spectroscopy.....52
4.Quantitative analysis of dicentrine in tissue cultures
and plant parts of *S. pierrei*.....52
IV RESULTS.....53
1.Establishment of callus cultures from
the tubers of *Stephania pierrei*.....53
2.Root regeneration from callus cultures.....56
3.Detection of isoquinoline alkaloids
produced by *S.pierrei* root cultures.....58
4.Quantitative analysis of dicentrine from
the root culture and plant parts of *S. pierrei*..... 72
V DISCUSSION..... 75
CONCLUSION..... 82
REFERENCES.....83
VITA.....91

LIST OF TABLES

Page

Table 1	Isoquinoline alkaloids isolated from the *Stephania* species	12
Table 2	The structures of formulae in table 1	16
Table 3	Aporphine alkaloids isolated from plant cell cultures	41
Table 4	Inorganic salt and vitamin composition of plant tissue culture media	43
Table 5	Preparation of stock solution of WT, RT and plant growth regulators	45
Table 6	Preparation of WT and RT media	46
Table 7	Rf values of authentic isoquinoline alkaloids	61
Table 8	Dicentrine content in plant parts and cultured roots of *S. pierrei*	74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Page

Figure 1 *Stephania pierrei* Diels..... 2
Figure 2 Structure of simple isoquinoline alkaloid.....9
Figure 3 Main structure of aporphine alkaloid..... 10
Figure 4 Central role of *(S)*-reticuline in biogenetic pathways of isoquinoline alkaloids..... 30
Figure 5 Biosynthetic pathways of *(S)*-reticuline starting from L-tyrosine leading to the biosynthesis of aporphines.....32
Figure 6 Proposed biogenesis routes of aporphines from benzylisoquinoline.. 33
Figure 7 Formation of aporphine alkaloid isoboldine belonging to the *(R)*-reticuline..... 34
Figure 8 Biosynthesis of isothebaine belonging to the (-)-orientaline.....35
Figure 9 The biosynthetic pathways of aporphines via *ortho-ortho* and *ortho-para* coupling.....37
Figure 10 Changes in the methylation patterns in ring A during the biosynthesis of aporphines starting from *(S)*-reticuline.....39
Figure 11 Explant preparation before culturing.....47
Figure 12 Callus cultures of *S. pierrei* on White medium.....54
Figure 13 Callus cultures.....55
Figure 14 Root cultures on Root medium.....57
Figure 15 TLC pattern of $CHCl_3$ extract from cultured roots.....59
Figure 16 TLC pattern of authentic isoquinoline alkaloids.....60
Figure.17-20 UV-absorption spectra of authentic isoquinoline alkaloids..... 62-65
Figure 21 UV-absorption spectra of spots of cultured root extracts.....66
Figure 22 UV-absorption spectra of (a) authentic dicentrine and (b) spot at Rf= 0.34.....67
Figure 23 IR spectra of dicentrine and purified sample from cultured roots..... 68
Figure 24 Mass spectra of dicentrine and purified sample from cultured roots...69
Figure 25 Mass fragmentation pattern of (-)-dicentrine.....70
Figure 26 ^{1}H-nmr spectra of dicentrine and purified sample from cultured roots 71
Figure 27 Standard curve of dicentrine.....72

Figure 28 Chromatogram of plant parts and cultured extract using EtoAc : methanol (5: 1) as mobile phase.....73
Figure 29 Structure of (-)-dicentrine (a) and (-)-nantenine.....78
Figure 30 Twisted biphenyl system of aporphine alkaloids.....79

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABRREVIATIONS

2,4-D	=	2,4-Dichloroacetic acid
B5	=	Gamborg media (1976)
BA	=	6-Benzylaminopurine
cm	=	Centimeter
DEA	=	Diethylamine
EDTA	=	Ethylenediamineacetic acid
g	=	Gram
GA_3	=	Giberellic acid
Glu	=	Glucose
hr(s)	=	Hour(s)
IAA	=	Indole-3-acetic acid
IR	=	Infrared spectroscopy
l	=	Liter
LS	=	Linsmiaier and Skoog medium (1965)
lb/in^2	=	Pound per square inch
m/z	=	Mass to charge ratio
min	=	Minute
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
MS	=	Murashige and Skoog medium (1962)
MW	=	Molecular weight
NAA	=	α-Naphthaleneacetic acid
NN	=	Nisch and Nitsch medium (1969)
nm	=	Nanometer
pH	=	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
ppm	=	Part per million
Rf	=	Rate of flow in chromatography
r.p.m.	=	Round per minute
RT	=	Root medium
TLC	=	Thin Layer Chromatography
UV	=	Ultraviolet
WPM	=	Woody plant medium (1990)
WT	=	White medium (1963)
w/v	=	Weight by volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

w/w	=	Weight by weight
^{o}C	=	Degree Celsius
µl	=	Microliter
µm	=	Micrometer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย