การศึกษาปริมาณโคลชิซีนในเมล็ดคองดึงของไทย

นางสาวนุชนาฏ กิจเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชเวท
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 947-582-594-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Study on Colchicine Content in the Seeds of Thai *Gloriosa superba* L.

Miss Nudchanart Kitcharoen

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

1993

ISBN 974-582-594-8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Study on Colchicine Content in the Seeds of Thai *Gloriosa superba* L.
By	Miss Nudchanart Kitcharoen
Department	Pharmacognosy
Thesis Advisor	Assistant Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.

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

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

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

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

B-K- Laddawan
..... Member
(Associate Professor Laddawan Boonyaratanakornkit,M.Sc.)

S. Amnuoypol
..... Member
(Associate Professor Surattana Amnuoypol,M.Sc.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นุชนาฏ กิจเจริญ : การศึกษาปริมาณโคลชีซีนในเมล็ดดองดึงของไทย (STUDY ON COLCHICINE CONTENT IN THE SEEDS OF THAI *GLORIOSA SUPERBA* L.)
อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.วันชัย ตีเอกนามกูล, 118 หน้า. ISBN 974-582-594-8

ในการประเมินคุณภาพของพืชดองดึงของไทยเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งของสารโคลชีซีน เทคนิคของ HPLC และ TLC-densitometry ได้ถูกพัฒนาขึ้น โดยวิธี HPLC ใช้สำหรับตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารโคลชีซีนในเมล็ด และวิธี TLC-densitometry ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโคลชีซีนในส่วนต่าง ๆ ของพืช ทั้งสองวิธีนี้ทำได้ง่าย และรวดเร็วเนื่องจากไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนการแยกสารให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ ตัวอย่างเมล็ดดองดึงที่ใช้ในการทดลองนี้ได้มาจากบางแหล่งในภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ส่วนพืชทั้งต้นได้มาจากแหล่งที่ขึ้นเองตามธรรมชาติที่อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี สำหรับในต้นดองดึงพบว่ามีโคลชีซีนในทุก ๆ ส่วนของพืช โดยจะพบมากที่สุดในส่วนของเมล็ดแก่ในปริมาณ 1.35% ในส่วนของเปลือกผล 0.86% ในส่วนของดอก 0.40% ในส่วนของเหง้า 0.26% ในส่วนของใบ 0.06% และในส่วนของลำต้น 0.05% ต่อน้ำหนักแห้ง สำหรับเมล็ดดองดึงพบว่าตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ ของไทยมีโคลชีซีนอยู่ในระดับสูงในช่วง 0.83-1.46% ต่อน้ำหนักแห้ง โดยเมล็ดจากยุ่มพรที่เก็บในปี 1991 (1.46%) และจากพืชที่ขึ้นเองใน อ.ขลุง จ.จันทบุรี (1.43%) ให้ปริมาณสารโคลชีซีนสูงที่สุด ในขณะที่เมล็ดจากเชียงใหม่ซึ่งเริ่มปลูกมาจากเมล็ดพันธุ์ของอินเดียให้ปริมาณสารโคลชีซีนต่ำที่สุด (0.83%) นอกจากนี้ยังได้พบว่ามีสารโคลชีโคซายด์ในปริมาณสูงอยู่ในเมล็ดดองดึงด้วย คืออยู่ในช่วง 0.67-1.27% ต่อน้ำหนักแห้ง และเมื่อหาอัตราส่วนของสารโคลชีซีนต่อโคลชีโคซายด์ในเมล็ดดองดึงจากแหล่งต่าง ๆ พบว่าทุกตัวอย่างให้อัตราส่วน 55:45 ยกเว้นตัวอย่างเดียวจากปราจีนบุรีซึ่งให้อัตราส่วน 45:55 ในการตรวจหาปริมาณสารโคลชีซีนและอนุพันธ์ต่าง ๆ ของโคลชีซีนในสารสกัดเอธานอลของเมล็ดดองดึงโดยวิธี UV-spectrophotometry พบว่าให้ค่าใกล้เคียงกับการหาปริมาณของผลรวมของโคลชีซีนและโคลชีโคซายด์โดยวิธี HPLC ในตัวอย่างเดียวกัน ดังนั้นโดยทั่วไปแล้ว เราสามารถใช้วิธี UV-spectrophotometry แทนวิธี HPLC ในการวิเคราะห์หาปริมาณผลรวมของโคลชีซีนและโคลชีโคซายด์ในเมล็ดดองดึงได้ ผลการทดลองทั้งหมดที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าเมล็ดดองดึงของไทยเป็นแหล่งที่ดีมากของสารโคลชีซีนและโคลชีโคซายด์ วิทยานิพนธ์นี้เป็นปฐมนิพนธ์ที่รายงานเกี่ยวกับการประเมินคุณภาพของเมล็ดดองดึงของไทยในการเป็นแหล่งของสารโคลชีซีนและโคลชีโคซายด์ และการกระจายในเชิงปริมาณของโคลชีซีนในส่วนต่าง ๆ ของต้นดองดึง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต นุชนาฏ กิจเจริญ
สาขาวิชา - ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

C375429 : MAJOR PHARMACOGNOSY
KEY WORD: *GLORIOSA SUPERBA* L. SEEDS/COLCHICINE
NUDCHANART KITCHAROEN : STUDY ON COLCHICINE CONTENT IN THE SEEDS OF THAI *GLORIOSA SUPERBA* L. THESIS ADVISOR : ASSIS. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D. 118 pp. ISBN 974-582-594-8

In order to evaluate the quality of Thai *Gloriosa superba* plant as a source of colchicine, we developed a HPLC method for determination of colchicine in the seeds and a simple TLC-densitometric method for determination of colchicine in various plant parts. Both methods appear to be simple and rapid since the steps of purification prior to the analysis is not necessary. The samples of *G. superba* seeds were obtained from some experimental fields in various parts of Thailand and the whole plants were from the wild-grown area at Amphur Khlung, Chanthaburi. For the whole plant, colchicine is present in every plant part but mainly in the ripe seeds with its content in the seeds 1.35%, pericarps 0.86%, flowers 0.40%, tubers 0.26%, leaves 0.06% and stems 0.05%, on the dry weight basis. For the seeds, most seed samples obtained from various parts of Thailand contain relatively high level of colchicine, ranging from 0.83% to 1.46% dry weight. The two maximum ones are from the crops of Chumphon collected in the year 1991 (1.46%) and from the wild-grown plants at Amphur Khlung, Chanthaburi (1.43%). The lowest one is from the crops of Chiang Mai which was cultivated from Indian *G. superba* seeds (0.83%). In addition to colchicine, colchicoside is also present in *G. superba* seeds with high content, ranging from 0.67-1.27% dry weight. The ratio of colchicine and colchicoside in all of the seed samples is about 55:45 except the one from Prachin Buri which show the ratio of 45:55. UV-spectrophotometric analysis of total colchicine and its derivatives in the crude ethanolic extracts of *G. superba* seeds give the values very close to those of total colchicine and colchicoside in the same extracts as determined by the HPLC method. Therefore, in general, this spectrophotometric method can replace the HPLC method for determination of total colchicine and colchicoside in *G. superba* seeds. The overall results obtained from this study indeed suggest that Thai *G. superba* seeds are an excellent source of colchicine and colchicoside. Apparently, this is the first report on the quality evaluation of Thai *G. superba* seeds as a potential source of colchicine and colchicoside and on the quantitative distribution of colchicine in the whole plant.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต ...

สาขาวิชา - ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ...

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express her deepest appreciation and grateful thanks to her advisor, Assistant Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul of the Department of Pharmacognosy , Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University , for his helpful guidances, suggestions, keen interest and continual encouragements throughout the course of this work.

The author would like to acknowledge her grateful thanks to Assistant Professor Noppamas Suppakun , Department of Pharmacognosy , Faculty of Pharmacy , Mahidol University, for her helpful suggestions , kindness and helps.

The author would also like to thank Thai Commodities Co.Ltd., Dr. Arayar Jatisatienr, Mr. Niwat Kaewpradub, Mr. Somboon of Lop Buri field , and Mr. Sommai Suppakun , for their kindly provided of *G. superba* seed samples.

The author wishes to thank Mr.Kusorn Tan for the preparation of this manuscript and for his continual encouragements.

Finally, the author would further like to extend her sincere thanks to all staff members of the Department of Pharmacognosy, and the Research Unit for Herb and Spice Development , Faculty of Pharmaceutical Sciences , Chulalongkorn University , for their kindnesses and helps.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... xi

LIST OF FIGURES..... xiii

ABBREVIATIONS..... xvi

CHAPTER

I **INTRODUCTION**..... 1

II **HISTORICAL**..... 5

1. Botanical Aspects of *Gloriosa superba* L.. 5

2. The Uses of *G.superba*..... 8

3. Chemical Constituents of *G.superba*..... 11

4. Colchicine 12

4.1 History..... 12

4.2 Structure and Some Physicochemical Properties..... 17

4.3 Chemical Reaction and Degradation of Colchicine..... 22

4.4 Isolation of Colchicine from Plant Materials..... 26

4.5 Detection and Determination of Colchicine..... 28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 The Biosynthesis of Colchicine..... 36

4.7 Biological Activities of Colchicine. 40

4.8 Pharmacokinetics of Colchicine..... 43

4.9 Toxicity of Colchicine..... 44

III MATERIALS AND METHODS..... 46

1. Plant Material..... 46

2. Chemicals..... 48

3. Preparation of Standard Solutions..... 49

4. Sample Preparations..... 50

5. HPLC Conditions in the Determination of Colchicine in *G.superba* Seeds..... 51

6. Spectrophotometric Conditions in the Determination of Total Colchicine and Its Derivatives in *G.superba* Seeds..... 52

7. TLC-Densitometric Analysis of Colchicine in Various Parts of *G.superba*..... 52

IV RESULTS..... 54

1. HPLC Analysis of Colchicine and Colchicoside in *G. superba* Seeds..... 54

1.1 HPLC Chromatogram of Ethanolic Extracts of *G.superba* Seeds..... 54

1.2 Peak Identification of HPLC Chromatogram..... 54

1.3 Calibration Curves of Standard Colchicine and Colchicoside..... 60

1.4 Colchicine and Colchicoside Contents in *G.superba* Seeds..... 60

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.5 Determination of Total Content of Colchicine and Its Derivatives in *G. superba* Seeds by UV-Spectrophotometric Method..... 64

2. TLC-Densitometric Analysis of Colchicine in Various Plant Parts of *G. superba*..... 69

2.1 Optimization of TLC-Densitometric Conditions for Colchicine Determination..... 69

2.2 TLC-Densitometric Chromatograms of the Crude Ethanolic Extracts of Various *G.superba* Parts..... 76

2.3 Method Validation..... 78

2.3.1 Calibration Curve..... 78

2.3.2 Accuracy..... 78

2.3.3 Precision..... 81

2.4 Colchicine Content in Various Parts of *G.superba* Plant..... 83

2.4.1 Distribution of Colchicine in the Whole Plant..... 83

2.4.2 Colchicine Content in Premature and Mature Plants..... 85

2.4.3 Changes in Colchicine Content in *G.superba* Pericarps and Seeds During Maturation..... 86

V DISCUSSION..... 91

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONCLUSION..... 102

REFERENCES..... 105

VITA..... 118

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Chemical constituents of various parts of *G.superba*.	13
2	Mass spectrum fragmentation pattern of colchicine...	21
3	Colchicine-containing plants.....	27
4	Color test of colchicine.....	29
5	Thin-layer chromatography of colchicine.....	33
6	High-performance liquid chromatographic systems for colchicine.....	35
7	Various sources of *G. superba* seeds and plant materials used in this study.....	47
8	Colchicine and colchicoside contents in the seeds of *G.superba* obtained from various parts of Thailand by HPLC method.....	63
9	Total colchicine and its derivatives in *G.superba* seeds determined by UV-spectrophotometry compared with the total value of colchicine and colchicoside by HPLC.....	67
10	Optimum proportion of powdered samples from various plant parts of *G.superba* and volume of extracting solvent (95 % ethanol).....	70
11	Various solvent systems tried for TLC separation of colchicine in ethanolic extracts of various *G. superba* parts.....	71

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12 Relationship between colchicine concentrations and their peak areas as determined by TLC-densitometric method..... 79

13 Calculated concentrations of colchicine compared with their known concentrations by TLC-densitometric method..... 80

14 Colchicine content in *G.superba* seeds determined by TLC-densitometric method compared with HPLC method.. 81

15 Precision analysis of colchicine content in *G.superba* seeds by TLC-densitometric method..... 82

16 Colchicine content in *G.superba* seeds and pericarps obtained from various capsules different in their maturity and capsule sizes..... 89

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	The structures of colchicine and colchicoside.....	2
2	*Gloriosa superba* L. (Liliaceae).....	6
3	Infrared spectrum of colchicine.....	19
4	Ultraviolet spectrum of colchicine (in 95 % EtOH)...	19
5	Proton-NMR spectrum of colchicine.....	20
6	Carbon-13 NMR spectrum of colchicine.....	20
7	Mass spectrum of colchicine.....	21
8	Reaction of colchicine with ultraviolet light.....	23
9	Acid hydrolysis of colchicine.....	24
10	Hydrogenation of colchicine.....	25
11	Oxidation of colchicine.....	25
12	Biosynthetic pathway of colchicine.....	38
13	A typical HPLC chromatogram of ethanolic extract of *G.superba* seeds.....	55
14	HPLC chromatograms of ethanolic extract of *G.superba* seeds compared with those of various colchicine derivative standards.....	57
15	The structure of colchicine, colchicoside and 3-demethylcolchicine.....	58
16	TLC-separation on silica gel plates of chemical constituents of ethanolic extracts of *G.superba* seeds under two different developing solvent systems.....	58

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

17 Absorption spectra of the HPLC peaks assigned as colchicoside, 3-demethylcolchicine and colchicine as compared with the spectra of their authentic compounds..... 59

18 Calibration curves of standard colchicine and colchicoside by HPLC method..... 61

19 Bar graph of colchicine and colchicoside contents in the seeds of *G.superba* obtained from various parts of Thailand..... 63

20 Calibration curve of standard colchicine by UV-spectrophotometric method..... 65

21 Bar graph of total colchicine and its derivatives in *G.superba* seeds determined by UV-spectrophotometry and those of total colchicine and colchicoside determined by HPLC..... 67

22 HPLC chromatograms of ethanolic extracts of *G.superba* seeds from various sources of Thailand..... 68

23 TLC patterns of ethanolic extracts obtained from various plant parts of *G.superba* under 254 UV light. 72

24 UV-absorption spectra of authentic colchicine and the compound of similar Rf values obtained from various parts of *G.superba*..... 73

25 UV-absorption spectra of colchicine by UV-spectrophotometry and TLC-densitometry..... 75

26 TLC-densitometric chromatograms of the crude ethanolic extracts of various plant parts of *G.superba*..... 77

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

27 Calibration curve of standard colchicine obtained by TLC-densitometry..... 79

28 Distribution of colchicine in the mature *G.superba* plant..... 84

29 Bar graph of colchicine content in leaves and stems obtained from various portions of the mature *G.superba* plant..... 85

30 Comparison of colchicine content in various parts of *G.superba* between the premature and mature plants... 87

31 Bar graph of colchicine content in *G.superba* seeds obtained from various capsules different in their maturity and capsule sizes..... 89

32 Colchicine content in *G.superba* pericarps obtained from various capsules different in their maturity and capsule sizes..... 90

33 TLC-densitometric chromatogram of ethanolic extract of young pericarps compared with that of ripe pericarps..... 101

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

^{o}C	=	Degree Celsius
cm	=	Centimeter
^{13}C-NMR	=	Carbon-13 Nuclear magnetic resonance
conc.	=	Concentration
% CV	=	Percent coefficient of variation
3-DMC	=	3-Demethylcolchicine
ed.	=	edition, editor, edited by
et al.	=	et alii
EtOH	=	Ethanol
Fig.	=	Figure
fl.	=	Flower
g	=	Gram
^{1}H-NMR	=	Proton-Nuclear magnetic resonance
HPLC	=	High-performance liquid chromatography
Hz	=	Hertz
IR	=	Infrared
J	=	Coupling constance
lf.	=	leaf
m	=	Meter
m/e	=	Mass to charge ratio
mg	=	Milligram
MHz	=	Megahertz
min	=	Minute
ml	=	Milliliter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

mm	=	Millimeter
MS	=	Mass spectrometry
MW	=	Molecular weight
nm	=	Nanometer
no.	=	Number
p.(pp.)	=	Page (s)
pH	=	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
ppm	=	Part per million
Rf	=	Rate of flow in chromatography
Rt	=	Retention time
SD	=	Standard deviation
Si gel	=	Silica gel
st.	=	Stem
TLC	=	Thin layer chromatography
TMS	=	Tetramethylsilane
UV	=	Ultraviolet
Vol.(Vols.)	=	Volume (s)
w/w	=	Weight by weight
µg	=	Microgram
µl	=	Microliter
µm	=	Micrometer
λ_{max}	=	Maximum absorption wavelength

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย