

การศึกษาชีวสังเคราะห์ของแนพโทควิโนนในรากพะเยาเลี้ยงของเทียนบ้าน

นายภาคภูมิ พาณิชยุปการนันท์



สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-636-260-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**BIOSYNTHETIC STUDIES OF NAPHTHOQUINONES IN
IMPATIENS BALSAMINA ROOT CULTURES**



Mr. Pharkphoom Panichayupakaranant

**สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy

Pharmaceutical Chemistry and Natural Products

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-636-260-7

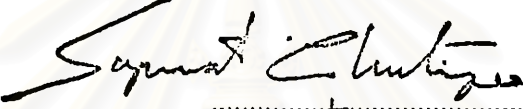
Thesis Title BIOSYNTHETIC STUDIES OF NAPHTHOQUINONES IN *IMPATIENS*
BALSAMINA ROOT CULTURES

By Mr. Pharkphoom Panichayupakaranant

Department Pharmaceutical Chemistry and Natural products


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


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



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

Thesis Committee



.....Chairman
(Associate Professor Rapepol Bavovada, Ph.D.)


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


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


.....Member
(Assistant Professor Duangdeun Meksuriyen, Ph.D.)


.....Member
(Assistant Professor Kittisak Likhitwitayawuid, Ph.D.)


.....Member
(Rutt Suttisri, Ph.D.)



พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ภาคภูมิ พาณิชยูปการนันท์ : การศึกษาชีวสังเคราะห์ของแนฟโธควิโนนในรากเพาะเลี้ยงของเทียนบ้าน
(BIOSYNTHETIC STUDIES OF NAPHTHOQUINONES IN *IMPATIENS BALSAMINA*
ROOT CULTURES) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. วันชัย ดีเอกนามกุล, 135 หน้า. ISBN 974-636-260-7

รากเพาะเลี้ยงของเทียนบ้านถูกสร้างขึ้นมาเพื่อใช้เป็นแบบในการศึกษาชีวสังเคราะห์ของสารในกลุ่มแนฟโธควิโนนที่เป็นอนุพันธ์ของ lawsone จากการวิเคราะห์สารในสิ่งสกัดที่ได้จากการสกัดรากเพาะเลี้ยงด้วย ethyl acetate และ methanol โดย TLC พบว่าสิ่งสกัดดังกล่าวมีสารประกอบในกลุ่มแนฟโธควิโนนและคูมารินเป็นองค์ประกอบหลัก สารประกอบเหล่านี้ถูกแยกให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยอาศัยข้อมูลทาง spectroscopy ได้เป็น lawsone, 2-methoxy-1,4-naphthoquinone, methylene-3,3'-bilawsone (diphthicol), scopoletin, isofraxidin, 4,4'-biisofraxidin และ spinasterol ในบรรดาสารต่างๆ เหล่านี้พบว่า methylene-3,3'-bilawsone (bisanaphthoquinone) และ 4,4'-biisofraxidin (biscoumarin) เป็นสารประกอบชนิดใหม่ สารประกอบต่างๆ เหล่านี้สามารถแยกออกจากกันได้โดยอาศัยเทคนิคทาง HPLC ซึ่งทำให้สามารถศึกษาลักษณะทางเคมี (chemical pattern) และปริมาณของสารประกอบทุติยภูมิที่ถูกสร้างขึ้นในรากเพาะเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบกับในใบและรากของต้นเทียนบ้าน นอกจากนี้ยังมีการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตไบโอดีของรากเพาะเลี้ยงและการสร้างสารประกอบแต่ละชนิดด้วย โดยพบว่ารากเพาะเลี้ยงมีการสร้างสารแนฟโธควิโนนสูงในช่วงท้ายของ linear phase ของ growth cycle การศึกษาชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มแนฟโธควิโนนโดยการป้อน $[^{14}\text{C}]\alpha\text{-ketoglutarate}$ ให้กับรากเพาะเลี้ยงพบว่าสารนี้ถูกนำไปใช้ในการสร้างโมเลกุลของ lawsone และ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone โดยไม่พบว่ามีสารตัวกลาง (intermediates) ที่ถูกติดตามด้วย ^{14}C ในวิถีชีวสังเคราะห์ของสารกลุ่มนี้ ในทำนองเดียวกันการทดลองโดยใช้สิ่งสกัดโปรตีน (crude protein extract) จากรากเพาะเลี้ยงพบว่า $[^{14}\text{C}]\alpha\text{-ketoglutarate}$ จะถูกนำไปใช้ในการสร้างโมเลกุลของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone โดยไม่มีการตรวจพบว่ามีสารตัวกลางในวิถีชีวสังเคราะห์ที่ถูกติดตามด้วย ^{14}C เช่นกัน จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ต่างๆ ในวิถีชีวสังเคราะห์ของ lawsone และ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในเทียนบ้านมีการจัดตัวแบบ multienzyme complex หรือ multifunctional enzyme นอกจากนี้ยังพบว่า enzyme complex นี้จะถูกชะออกมาจาก Superose 12 gel filtration column ด้วย void volume ซึ่งเป็นการยืนยันถึงการมีน้ำหนักโมเลกุลสูงและความซับซ้อนของเอนไซม์ การศึกษาคุณสมบัติของ enzyme complex พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวสามารถใช้ $\alpha\text{-ketoglutarate}$ และ chorismic acid เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ได้ และต้องอาศัย coenzyme A, ATP และ Mg^{2+} ในการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ และดูเหมือนว่า lawsone-O-methyltransferase ไม่ได้เป็นส่วนประกอบของ enzyme complex นี้ นอกจากนี้ยังพบว่า methionine เป็นแหล่งของหมู่ methyl ของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone แต่ไม่ได้เป็นแหล่งของหมู่ methyl ให้กับ methylene bridge ของ methylene-3,3'-bilawsone

ภาควิชา
สาขาวิชา เกษตรเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
ปีการศึกษา 2539

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

** C575507 : MAJOR MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
KEY WORD: *IMPATIENS BALSAMINA* / NAPHTHOQUINONES / COUMARINS /

ROOT CULTURES / MULTIENTZYME COMPLEX

PHARKPHOOM PANICHAYUPAKARANANT : BIOSYNTHETIC STUDIES OF
NAPHTHOQUINONES IN *IMPATIENS BALSAMINA* ROOT CULTURES. THESIS

ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D. 135 pp.

ISBN 974-636-260-7.

Impatiens balsamina root cultures have been established in order to be used as a model for biosynthetic studies of lawsone-derived naphthoquinones. Chemical analysis of the ethyl acetate and methanolic extracts of the cultured roots by TLC revealed the presence of naphthoquinone and coumarin derivatives as major components. These compounds were isolated and their structures were elucidated by various spectroscopic data, as lawsone, 2-methoxy-1,4-naphthoquinone, methylene-3,3'-bilawsone (diphthicol), scopoletin, isofraxidin, 4,4'-biisofraxidin and a plant sterol, spinasterol. Among these, methylene-3,3'-bilawsone (bisanaphthoquinone) and 4,4'-biisofraxidin (biscoumarin) appeared to be new compounds. All these compounds could be effectively separated from one another by HPLC technique. Based on this technique, the chemical pattern and content of the secondary products produced by the cultured roots were investigated and compared with those of the intact plants (leaves and roots). The relationship between the root culture growth and the formation of each compound was also determined. Formation of the naphthoquinones was highly active in the late linear phase of the growth cycle. *In vivo* feeding experiments with [¹⁴C]α-ketoglutarate showed that the radiolabelled precursor was incorporated directly into lawsone and 2-methoxy-1,4-naphthoquinone without detection of any radioactively labelled intermediates (e.g. o-succinylbenzoic acid). With cell-free extract prepared from the root cultures, [¹⁴C]α-ketoglutarate was also converted directly to 2-methoxy-1,4-naphthoquinone, without detection of any labelled intermediates. These results suggest that various enzymes involved in the biosynthetic pathway of lawsone and 2-methoxy-1,4-naphthoquinone in *I. balsamina* are organized as either multifunctional enzyme or multienzyme complex. The enzyme complex was eluted with void volume of Superose 12 gel filtration column confirming its high molecular weight nature and complexity. The partially purified enzyme complex could use α-ketoglutarate and chorismic acid as substrates for the formation of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone, with coenzyme A, ATP and Mg²⁺ as essentials for the enzyme activity. Lawsone-O-methyltransferase seemed not to be part of the enzyme complex. Methionine appeared to be the methyl source for 2-methoxy-1,4-naphthoquinone, but not for the methylene bridge of methylene-3,3'-bilawsone.

ภาควิชา.....

สาขาวิชา..... เกษตรเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ปีการศึกษา 2539.....

ลายมือชื่อนิสิต..... Pharkphoom Panichayupakaranant

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... W. W. Ek

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENTS

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

The author would like to acknowledge his grateful thanks to Professor Ushio Sankawa of Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical and Pharmaceutical University, and Professor Eutaka Ebizuka of Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Japan for their being kind scientific hosts and for their helpful guidances and suggestions during his work in Japan.

The author wishes to express his sincere gratitude to Professor Hiroshi Noguchi of School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, and Associate Professor Fujii Isao of Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Japan, for their helpful guidances and suggestions.

The author wishes to thank the National Research Council of Thailand (NRCT) and the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) for granting research fellowships.

Finally, the author would futher like to extend his sincere thanks to the thesis committee for their helpful suggestions, and also to all staff members of the Department of Pharmacognosy, Department of Pharmaceutical Chemistry and the Research Unit for Herb and Spice Development, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their kindness and help.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai).....	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II HISTORICAL.....	4
1. BOTANICAL ASPECT OF <i>IMPATIENS BALSAMINA</i> L.....	4
2. CHEMICAL CONSTITUENTS OF <i>IMPATIENS BALSAMINA</i>	6
3. USES OF <i>IMPATIENS BALSAMINA</i>	7
4. PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF <i>IMPATIENS BALSAMIN</i>	8
5. BIOSYNTHETIC PATHWAYS OF PLANT NAPHTHOQUINONES.....	10
5.1 THE SHIKIMATE-DERIVED PATHWAYS.....	10
5.2 THE POLYKETIDE PATHWAY.....	20
6. GENERAL CONSIDERATION ON SECONDARY METABOLITES.....	22
7. SECONDARY PRODUCTS FROM PLANT CELL AND TISSUE CULTURES.....	24
8. ACCUMULATION OF SECONDARY PRODUCTS BY ORGANIZED PLANT CULTURES.....	27
9. PLANT CELL AND TISSUE CULTURES AS SOURCE OF NOVEL PHYTOCHEMICALS AND ENZYMES.....	31
9.1 NOVEL SECONDARY PRODUCTS FROM CELL AND TISSUE CULTURES.....	31
9.2 PLANT CELL AND TISSUE CULTURE AS SOURCE OF ENZYMES.....	33
CHAPTER III EXPERIMENTAL.....	35
1. GENERAL.....	35
2. ROOT CULTURES OF <i>IMPATIENS BALSAMINA</i>	35

3.	EXTRACTION AND ISOLATION.....	36
3.1	EXTRACTION OF <i>I. BALSAMINA</i> ROOT CULTURES.....	36
3.2	ISOLATION AND PURIFICATION OF SECONDARY PRODUCTS.....	36
4.	CHARACTERIZATION OF THE ISOLATED COMPOUNDS.....	37
5.	CHEMICAL PATTERN AND CONTENT OF SECONDARY PRODUCTS.....	39
6.	KINETIC STUDIES OF GROWTH AND THE FORMATION OF NAPHTHOQUINONE AND COUMARIN DERIVATIVES.....	40
7.	BIOSYNTHETIC STUDIES OF LAWSONE AND 2-METHOXY-1,4- NAPHTHOQUINONE.....	41
7.1	SYNTHESIS OF OSB AND [2,3- ¹⁴ C]-OSB.....	41
7.2	IDENTIFICATION OF OSB.....	41
7.3	PREPARATION OF CELL-FREE EXTRACT FOR OSB-COA LIGASE ASSAY.....	41
7.4	ASSAY FOR OSB-COA LIGASE ACTIVITY.....	42
7.5	[¹⁴ C-U]α-KETOGLUTARATE <i>IN VIVO</i> FEEDING EXPERIMENT.....	42
7.6	[¹⁴ C]-METHIONINE <i>IN VIVO</i> FEEDING EXPERIMENT.....	43
7.7	PREPARATION OF CELL-FREE EXTRACT FOR THE ENZYME COMPLEX ASSAY.....	43
7.8	SUPEROSE 12 COLUMN CHROMATOGRAPHY.....	43
7.9	ASSAY FOR ENZYME COMPLEX ACTIVITY.....	44
7.10	DETERMINATION OF PROTEIN CONCENTRATION.....	44
7.11	IDENTIFICATION OF ENZYMATIC PRODUCT.....	44
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....		46
1.	PURIFICATION AND STRUCTURE ELUCIDATION OF THE SECONDARY PRODUCTS FROM <i>I. BALSAMINA</i> ROOT CULTURES.....	46
1.1	IDENTIFICATION OF ET-1.....	46
1.2	IDENTIFICATION OF ET-2.....	54
1.3	IDENTIFICATION OF ET-3.....	60
1.4	STRUCTURE ELUCIDATION OF ME-1.....	65
1.5	IDENTIFICATION OF ME-2.....	74
1.6	IDENTIFICATION OF ME-3.....	78

1.7	STRUCTURE ELUCIDATION OF ME-4.....	83
2.	SECONDARY PRODUCT COMPOSITION THE CULTURED ROOT AND INTACT PLANTS.....	91
2.1	CHEMICAL PATTERNS OF SECONDARY PRODUCTS.....	91
2.2	QUANTITATIVE ANALYSIS OF NAPHTHOQUINONE AND COUMARIN DERIVATIVES.....	95
3.	KINETIC STUDIES OF GROWTH, AND THE FORMATION OF NAPHTHOQUINONES AND COUMARIN DERIVATIVES.....	101
4.	STUDIES ON THE BIOSYNTHESIS OF LAWSONE AND 2-METHOXY-1,4- NAPHTHOQUINONE.....	104
4.1	DETECTION OF OSB-COA LIGASE ACTIVITY.....	104
4.2	<i>IN VIVO</i> FEEDING EXPERIMENT WITH [¹⁴ C-U]α-KETOGLUTARATE.....	106
4.3	<i>IN VIVO</i> FEEDING EXPERIMENT WITH [¹⁴ C]-METHIONINE.....	109
4.4	ENZYMATIC FORMATION OF 2-METHOXY-1,4- NAPHTHOQUINONE BY CELL-FREE EXTRACT.....	111
4.5	IDENTIFICATION OF THE ENZYMATIC PRODUCT.....	112
4.6	PARTIAL PURIFICATION OF THE ENZYME SYSTEM PRODUCING 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE.....	113
4.7	SOME CHARACTERISTICS OF THE ENZYME COMPLEX.....	115
	CONCLUSION.....	118
	REFERENCES.....	120
	VITA.....	135

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table	Page
1 CHEMICAL CONSTITUENTS OF <i>IMPATIENS BALSAMINA</i>	6
2 SELECTED EXAMPLES OF USEFUL SECONDARY PRODUCTS FROM PLANT CELL AND TISSUE CULTURES.....	25
3 EXAMPLES OF THE USEFUL SECONDARY METABOLITES ACCUMULATED IN VARIOUS ROOT CULTURES.....	29
4 EXAMPLES OF THE USEFUL SECONDARY METABOLITES ACCUMULATED IN VARIOUS SHOOT CULTURES.....	30
5 ¹ H NMR DATA OF ET-1.....	51
6 ¹³ C NMR DATA OF ET-1.....	53
7 ¹ H NMR DATA OF ET-2.....	58
8 ¹³ C NMR DATA OF ET-2.....	59
9 ¹³ C NMR DATA OF ET-3.....	64
10 ¹³ C NMR DATA OF ME-1.....	69
11 ¹ H NMR DATA OF ME-1.....	73
12 ¹³ C NMR DATA OF ME-3.....	82
13 ¹ H NMR DATA OF ME-3.....	83
14 ¹³ C NMR DATA OF ME-4.....	87
15 ¹ H NMR DATA OF ME-4.....	88
16 THE CONTENT OF NAPHTHOQUINONES AND COUMARIN DERIVATIVES IN <i>I. BALSAMINA</i> ROOT CULTURES AND THE LEAVES AND THE WHOLE ROOTS OF THE INTACT PLANTS.....	99
17 RELATIVE INCORPORATION OF [14C]Α-KETOGLUTARATE INTO 2-METHOXY- 1,4-NAPHTHOQUINONE BY CELL-FREE PREPARATION OF <i>I. BALSAMINA</i> ROOT CULTURES.....	116

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 <i>IMPATIENS BALSAMINA</i> (BALSAMINACEAE).....	5
2 BIOSYNTHETIC ROUTES OF PLANT NAPHTHOQUINONES.....	10
3 THE BIOSYNTHETIC PATHWAY OF SHIKONIN.....	12
4 THE PROPOSED BIOSYNTHETIC PATHWAY OF CHIMAPHILIN.....	16
5 THE PROPOSED BIOSYNTHETIC PATHWAY OF NAPHTHOQUINONE AND ANTHRAQUINONE BY O-SUCCINYL BENZOATE PATHWAY.....	17
6 THE PROPOSED BIOSYNTHETIC PATHWAY OF SOME POLYKETIDE-DERIVED NAPHTHOQUINONES.....	22
7 STRUCTURE OF ET-1.....	46
8 MASS SPECTRUM OF ET-1.....	47
9 FRAGMENTATION OF ET-1.....	47
10 IR SPECTRUM OF ET-1.....	48
11 UV SPECTRUM OF ET-1.....	48
12 DEPT 135° AND THE PROTON DECOUPLE ¹³ C NMR OF ET-1.....	49
13 ¹ H NMR SPECTRUM OF ET-1.....	50
14 CH HETERO COSY SPECTRUM OF ET-1.....	51
15 HMBC SPECTRUM OF ET-1.....	52
16 IMPORTANT ¹³ C- ¹ H LONG RANGE CORRELATIONS OBSERVED BY HETERONUCLEAR COSY OF ET-1.....	53
17 STRUCTURE OF ET-2.....	54
18 MASS SPECTRUM OF ET-2.....	54
19 FRAGMENTATION OF ET-2.....	55
20 IR SPECTRUM OF ET-2.....	56
21 UV SPECTRUM OF ET-2.....	56
22 ¹ H NMR SPECTRUM OF ET-2.....	57
23 ¹³ C NMR SPECTRUM OF ET-2.....	58
24 ¹ H NMR SPECTRUM OF ET-2, WITH ADDED D ₂ O.....	59

25	STRUCTURE OF ET-3.....	60
26	MASS SPECTRUM OF ET-3.....	61
27	CHARACTERISTIC MASS FRAGMENTATION OF ET-3.....	61
28	IR SPECTRUM OF ET-3.....	62
29	¹ H NMR SPECTRUM OF ET-3.....	62
30	¹³ C NMR SPECTRUM OF ET-3.....	63
31	STRUCTURE OF ME-1.....	65
32	UV SPECTRUM OF ME-1.....	66
33	MASS SPECTRUM OF ME-1.....	66
34	FRAGMENTATION OF ME-1.....	67
35	IR SPECTRUM OF ME-1.....	68
36	¹³ C NMR SPECTRUM OF ME-1.....	69
37	DEPT 135° NMR SPECTRUM OF ME-1.....	70
38	SINGLE FREQUENCY OFF RESONANCE ¹³ C NMR SPECTRUM OF ME-1.....	71
39	¹ H NMR SPECTRUM OF ME-1.....	72
40	HMBC SPECTRUM OF ME-1.....	73
41	IMPORTANT ¹³ C- ¹ H LONG RANGE CORRELATIONS OBSERVED BY HETERONUCLEAR COSY OF ME-1.....	74
42	STRUCTURE OF ME-2.....	74
43	MASS SPECTRUM OF ME-2.....	75
44	FRAGMENTATION OF ME-2.....	76
45	IR SPECTRUM OF ME-2 AND THE AUTHENTIC SCOPOLETIN.....	77
46	UV SPECTRUM OF ME-2 AND THE AUTHENTIC SCOPOLETIN.....	78
47	STRUCTURE OF ME-3.....	78
48	MASS SPECTRUM OF ME-3.....	79
49	FRAGMENTATION OF ME-3.....	80
50	¹ H NMR SPECTRUM OF ME-3.....	81
51	PROTON DECOUPLED ¹³ C NMR SPECTRUM OF ME-3.....	81
52	NOE SPECTRUM OF ME-3.....	82
53	STRUCTURE OF ME-4.....	83

54	UV SPECTRUM OF ME-4.....	84
55	MASS SPECTRUM OF ME-4.....	84
56	IR SPECTRUM OF ME-4.....	85
57	PROTON DECOUPLED ¹³ C NMR SPECTRUM OF ME-4.....	86
58	DEPT 135° NMR SPECTRUM OF ME-4.....	86
59	¹ H NMR SPECTRUM OF ME-4.....	88
60	HMBC SPECTRUM OF ME-4.....	89
61	IMPORTANT ¹³ C- ¹ H LONG RANGE CORRELATIONS OBSERVED BY HETERONUCLEAR COSY OF ME-4.....	89
62	NOE DIFFERENCE SPECTRUM OF ME-4.....	90
63	HPLC CHROMATOGRAMS OF THE SECONDARY METABOLITES ISOLATED FROM THE ROOT CULTURES.....	92
64	HPLC CHROMATOGRAM (UV 275 nm) OF THE METHANOLIC EXTRACTS OF THE LEAVES, CULTURED ROOT AND ROOTS OF <i>I. BALSAMINA</i>	93
65	HPLC CHROMATOGRAM (UV 365 nm) OF THE METHANOLIC EXTRACTS OF THE LEAVES, CULTURED ROOT AND ROOTS OF <i>I. BALSAMINA</i>	94
66	CALIBRATION CURVE OF LAWSONE.....	96
67	CALIBRATION CURVE OF 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE.....	97
68	CALIBRATION CURVE OF SCOPOLETIN.....	98
69	TIME OF GROWTH AND THE FORMATION OF NAPHTHOQUINONES AND COUMARINS IN <i>I. BALSAMINA</i> ROOT CULTURES.....	103
70	BIOGENESIS OF LAWSONE FROM OSB.....	104
71	HPLC CHROMATOGRAM AND TLC-RADIOCHROMATOGRAM OF OSB-COA LIGASE ASSAY.....	105
72	TLC CHROMATOGRAMS OF THE AUTHENTIC LAWSONE, CULTURED ROOT EXTRACT AND RADIOCHROMATOGRAM OF CULTURED ROOT EXTRACT	107
73	TLC CHROMATOGRAMS OF THE AUTHENTIC 2-METHOXY-1,4- NAPHTHOQUINONE, CULTURED ROOT EXTRACT AND RADIOCHROMATOGRAM OF CULTURED ROOT EXTRACT.....	108
74	¹³ C NMR SPECTRUM OF 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE SHOWING THE ¹³ C-ENRICHED SIGNAL.....	110

75	^{13}C NMR SPECTRUM OF METHYLENE-3,3'-BILAWSONE SHOWING NO ^{13}C -ENRICHED SIGNAL.....	110
76	TLC-RADIOCHROMATOGRAM SHOWING THE CONVERSION OF [^{14}C -U] α -KETOGLUTARATE INTO 2-METHOXY-1,4- NAPHTHOQUINONE BY CELL-FREE EXTRACT.....	111
77	UV SPECTRA OF THE ENZYME PRODUCT.....	112
78	TLC-RADIOCHROMATOGRAM SHOWING THE CONVERSION OF [^{14}C -U] α -KETOGLUTARATE INTO 2-METHOXY-1,4- NAPHTHOQUINONE BY 100,000g SUPERNATANT FRACTIONS.....	114
79	THE ELUTION PROFILE OF ENZYME ACTIVITY AND PROTEIN ON SUPEROSE 12 GEL FILTRATION COLUMN.....	115



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

^{13}C NMR	=	Carbon-13 Nuclear magnetic resonance
^1H NMR	=	Proton nuclear magnetic resonance
ATP	=	Adenosine 5'-triphosphate
B5	=	Gamborg media (1976)
BA	=	6-Benzylaminopurine
BSA	=	Bovine serum albumin
ca	=	About
cm	=	Centimeter
CoASH	=	Coenzyme A
COSY	=	Correlated spectroscopy
cpm	=	Counts per minute
d	=	Doublet
dd	=	Doublet of doublets
ddd	=	Doublet of doublets of doublets
dec.	=	Decomposition
DEPT	=	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
DTT	=	Dithiothreitol
e.g.	=	For example
EDTA	=	Ethylenediamine tetraacetic acid
EIMS	=	Electron impact mass spectroscopy
EtOH	=	Ethanol
Fig.	=	Figure

FPLC	=	Fast protein liquid chromatography
g	=	Gram
HMBC	=	¹ H-detected heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	=	¹ H-detected heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	=	High-performance liquid chromatography
hr	=	Hour
Hz	=	Hertz
IR	=	Infrared
<i>J</i>	=	Coupling constant
Kg	=	Kilogram
l	=	Liter
lb/in ²	=	Pound per square inch
M	=	Mole per liter
M ⁺	=	Molecular ion
<i>m/z</i>	=	Mass to charge ratio
μCi	=	MicroCurie
MHz	=	Megahertz
min	=	Minute
μl	=	Microliter
ml	=	Milliliter
μm	=	Micrometer
mm	=	Millimeter
μmol	=	Micromole
MS	=	Mass spectrometry
MW	=	Molecular weight
NAA	=	α-Naphthaleneacetic acid
NADP	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	=	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form

nm	=	Nanometer
nmol	=	Nanomole
NMR	=	Nuclear magnetic resonance
OSB	=	o-succinylbenzoic acid
pH	=	The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
pkat	=	Pico katal
ppm	=	Part per million
PVP	=	Polyvinylpyrrolidone
q	=	Quartet
r.p.m.	=	Round per minute
Rf	=	Rate of flow in chromatography
R _t	=	Retention time
s	=	Singlet
sp. act.	=	Specific activity
t	=	Triplet
TLC	=	Thin layer chromatography
TPP	=	Thiamine pyrophosphate
UV	=	Ultraviolet
°C	=	Degree Celsius
ν_{\max}	=	Wave number at maximum absorption
λ_{\max}	=	Wavelength at maximum absorption
δ	=	Chemical shift