การสร้างดีอะเซทิลไอโซไอพีโคไซด์จากโดปามีนและเซโคโลกานิน โดยใช้เอนไซม์ในต้นปรู๋

นายอนันต์ อุ่นอรุณ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชเวท
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2538

ISBN 974-632-661-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16746867

FORMATION OF DEACETYLISOIPECOSIDE FROM DOPAMINE AND SECOLOGANIN BY USING ENZYME IN A*langium salviifolium*

Mr. Anun Ounaroon

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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
1995
ISBN 974-632-661-9

Thesis Title	Ezymic Formation from Dopamine and Secologanin by Using Enzyme in *Alangium salviifolium*
By	Mr. Anan Ounaroon
Department	Pharmacognosy
Thesis Advisor	Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.

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

Santi Thoongsuwan
..... Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

Chaiyo Chaichantipyuth
..... Chairman

(Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth, M.Sc.)

Wanchai De-Eknamkul
..... Thesis Advisor

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

Rapepol Bavovada
..... Member

(Associate Professor Rapepol Bavovada, Ph.D.)

Sumphan Wongseripipatana
..... Member

(Associate Professor Sumphan Wongseripipatana, D.Pharm. Sc.)

Nijsiri Ruangrungsi
..... Member

(Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อนันต์ อุ่นอรุณ : การสร้างดีอะเซทิลไอโซไอพีโคไซด์จากโดปามีนและเซโคโลกานินโดยใช้เอนไซม์ในต้นปรู๋ (FORMATION OF DEACETYLISOIPECOSIDE FROM DOPAMINE AND SECOLOGANIN BY USING ENZYME IN *ALANGIUM SALVIIFOLIUM*) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. วันชัย ดีเอกนามกูล, 80 หน้า ISBN 974-632-661-9

จากการศึกษาโดยใช้สารสกัดเอนไซม์จากใบปรู๋ ทำให้ค้นพบเอนไซม์สองชนิด ซึ่งทำหน้าที่อย่างเฉพาะเจาะจงในปฏิกิริยาการรวมตัวกันระหว่างโดปามีนและเซโคโลกานิน ปฏิกิริยานี้เป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารในกลุ่มโมโนเทอร์ปีนอยด์ไอโซควิโนลีนอัลคาลอยด์ สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากการทดลองคือ เอนไซม์จะต้องอยู่ในไตรซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ค่า pH เท่ากับ 7.5 ผลิตผลที่ได้จากปฏิกิริยา คือ ดีอะเซทิลไอพีโคไซด์ (โครงแบบเอส) และดีอะเซทิลไอโซไอพีโคไซด์ (โครงแบบอาร์) สารทั้งสองชนิดสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นดีเมธิลอะแลงจิไซด์ และดีเมธิลไอโซอะแลงจิไซด์ได้ตามลำดับ

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของผลิตผลที่ได้โดยดูจากผลของค่า Rf จาก TLC, retention time จาก HPLC, การดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลต และน้ำหนักโมเลกุลจากแมสสเปคตรัม ยืนยันว่าผลิตผลแรกสุดจากการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในสารสกัดจากใบปรู๋ คือ ดีอะเซทิลไอพีโคไซด์ และ ดีอะเซทิลไอโซไอพีโคไซด์

การทำงานของเอนไซม์ทั้งสองในขั้นตอนแรก มีความสำคัญต่อการกำหนดโครงแบบของสารอัลคาลอยด์ในกลุ่มนี้ว่าจะอยู่ในโครงแบบอาร์หรือโครงแบบเอส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต อนันต์ อุ่นอรุณ

สาขาวิชา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C575387 : MAJOR PHARMACOGNOSY
KEY WORD: ALANGIACEAE/*ALANGIUM SALVIIFOLIUM* /*IN VITRO* CULTURES /
DEACETYLISOIPECOSIDE SYNTHASE
ANUN OUNAROON : FORMATION OF DEACETYLISOIPECOSIDE FROM DOPAMINE
AND SECOLOGANIN BY USING ENZYME IN *ALANGIUM SALVIIFOLIUM*
THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.WANCHAI DE-EKNAMKUL,Ph.D.
80 pp. ISBN 974-632-661-9

Two new enzymes involved in the stereospecific condensation of dopamine and secologanin were discovered in the crude enzyme extracts prepared from the leaves of *A. salviifolium*. Both enzymes potentially catalyze the first reaction steps of the biosynthesis of monoterpenoid isoquinoline alkaloids (eg. emetine, cephaeline) accumulated in this plant. The crude enzyme extracts appeared to condense dopamine and secologanin under the conditions of 100mM Tricine- NaOH buffer,pH 7.5, to form both deacetylipecoside(R-configuration) and deacetylisoipecoside (S-configuration) which were spontaneously converted to demethylalangiside and demethylisoalangiside, respectively.

Identification of the reaction products was performed by using TLC, HPLC and LC-MS. The results obtained from the TLC Rf values, HPLC retention times, UV-absorption spectra and MS-spectra clearly showed that the immediate enzymatic products produced by the enzyme extracts of *A.salviifolium* were deaectylipecoside and deacetylisoipecoside.

The discovery of these two new enzymes in *A. salviifolium* suggested that the C1-configuration (either R or S form) of various naturally ipecac alkaloids were determined by the first enzymatic step of dopamine and secologanin condensation.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต อนันต์ อุ่นอรุณ

สาขาวิชา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ACKNOWLEDGEMENTS

Of all the people who helped the author on this book, Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul must be singled out for his invaluable help. The author can not adequately express his gratitude for this help. All he can say, with all his heart, is "Thank you".

The author would, however, like to thank all those who have been concerned with this work. Thank you for encouraging him though all the good times and the bad.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

ABSTRACT (Thai)..... iv

ABSTRACT (English)..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... ix

LIST OF FIGURES..... x

ABBREVIATIONS..... xii

CHARPTER I INTRODUCTION..... 1

1. Taxa and Description..... 4

2. Chemical Constituents of *A. salviifolium*..... 7

3. Biosynthetic Studies of Monoterpenoid Isoquinoline Alkaloids..... 8

CHARPTER II MATERIALS AND METHODS

1. Source of Materials..... 14

2. Phytochemical Techniques..... 15

3. Plant Tissue Culture Techniques..... 17

4. Enzymatic Techniques..... 20

CHARPTER IV RESULTS

1. Establishment of Callus and Cell Cultures of *A. salviifolium*..... 23

2. Alkaloid Detections from *A. salviifolium*..... 29

3. Enzyme Detections and Product Identification..... 34

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Page

CHARPTER V DISCUSSION

1. Establishment of *in vitro* Cultures of *A. salviifolium*.....44

2. Alkaloid Detections from *A. salviifolium*.....48

3. Detection of the First Enzyme of Emetine Biosynthetic Pathway in *A. salviifolium*.....50

4. Proposed Biosynthetic Pathway of Emetine in *A. salviifolium* 51

CHARPTER VI CONCLUSION.....54

REFERENCES..... 55

APPENDIX.....61

VITA.....67

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Page

Table 1 List of compounds in *A. salviifolium* 7

Table 2 Composition of plant tissue culture media B5, MS, RM and WPM 60

Table 3 Stock solutions of B5 and MS..... 61

Table 4 Stock solutions of RM and WPM..... 62

Table 5 Preparation of various plant tissue culture media..... 63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Page

Figure 1 Proposed biosynthetic sequence for the biosynthesis of cephaeline, emetine, ipecoside and alangiside..... 3

Figure 2 *Alangium salviifolium* (Alangiaceae)..... 6

Figure 3 Biogenesis pathway of the emetine group of alkaloids..... 9

Figure 4 [2-^{14}C]-Tyrosine acts as precursor of both protoemetine and emetine..... 10

Figure 5 Condensation of dopamine and secologanin gives deacetylisoipecoside..... 11

Figure 6 The callus culture of *A. salviifolium* on WPM containing 0.3 mg/l BA and 0.3 mg/l 2,4-D..... 24

Figure 7 The suspension culture of *A. salviifolium* in WPM containing 0.3 mg/l BA and 0.3 mg/l 2,4-D..... 25

Figure 8 The root culture of *A. salviifolium* in RM containing 2.0 mg/l GA_3, 1.0 mg/l BA and 0.1 mg/l Ki..... 27

Figure 9 The separated root from root culture of *A. salviifolium*..... 28

Figure 10 TLC patterns of the ethanolic extracts of 1)leaves, 2)roots, 3)callus cells, 4)suspension cells, 5)standard cephaeline, 6)standard emetine; using the solvent system of toluene:ethyl acetate:diethylamine (7:2:1), detection : Dragendorff's reagent..... 30

Figure 11 TLC patterns of the ethanolic extracts of 1)leaves, 2)roots, 3)callus cells, 4)suspension cells, 5)standard cephaeline, 6)standard emetine; using the solvent system of dichloromethane:methanol:ammonia (90:9:1), detection : Dragendorff's reagent..... 31

Figure 12 Mass spectrum, EI 70 V, of anangimarckine..... 32

Page

Figure 13 Mass fragmentation pattern of alangimarckine..... 33
Figure 14 TLC-densitometric chromatograms (240 nm) of the control (boiled), complete reaction mixture and enzyme extract..... 35
Figure 15 TLC-densitometric chromatograms (290 nm) of the control (boiled), complete reaction mixture and enzyme extract..... 36
Figure 16 TLC-densitometric chromatograms (290 nm) of time-course studies in enzymatic activities at 5, 30, 60, 90 and 120 min..... 37
Figure 17 UV spectra of (1) dopamine (2) secologanin (3) a.deacetyl(iso)ipecoside from chemical reaction, b.product from enzymatic reaction..... 38
Figure 18 HPLC chromatograms (photodiode array detector) of (1) demethylalangiside (standard), (2) enzymatic product..... 39
Figure 19 HPLC chromatograms (photodiode array detector) of (1) demethylisoalangiside (standard), (2) enzymatic product..... 40
Figure 20 LC-MS chromatograms (UV detector) of (1) demethylalangiside (standard), (2) enzymatic product.....41
Figure 21 LC-MS chromatograms (UV detector) of (1) demethylisoalangiside (standard), (2) enzymatic product..... 42
Figure 22 Deacetylipecoside and deacetylisoipecoside could be cyclised in a basic condition. This could take place also in a neutral condition while purification process..... 43
Figure 23 Proposed biosynthetic pathway of monoterpenoid isoquinoline alkaloids.....53

ABBREVIATIONS

Abs	=	absorbance
B5	=	Gamborg et al (1968) medium
BA	=	6-benzylaminopurine, N^6 - benzyladenine
cm	=	centrimeter (s)
2,4-D	=	2,4 - dichlorophenoxyacetic acid
EIMS	=	electron-impact mass spectrophotometry
g	=	gram (s)
GA_3	=	gibberellic acid
hr	=	hour (s)
in^2	=	square inch
Ki	=	kinetin - 6 - furfuralaminopurine
l	=	liter (s)
lb	=	pound (s)
M	=	molar
MS	=	Murashige and Skoog (1962) medium
mM	=	millimolar
mm	=	millimeter (s)
min	=	minute (s)
N	=	normal
NAA	=	α - naphthaleneacetic acid
No	=	number
nm	=	nanometer (s)
RM	=	root medium
TLC	=	thin layer chromatography
UV	=	ultraviolet
WPM	=	woody plant medium

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

w/v	=	weight/volume
°C	=	degree Celsius
µg	=	microgram (s)
µl	=	microliter (s)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย