

สารคดีจากเลือกรากห่อคุณไทย



นางสาวคณาพรรณ พจนาคม

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย

ภาควิชาเภสัชเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534


ISBN 974-579-650-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017778 117756665

COUMARINS FROM THE ROOT BARK OF

*Micormelum minutum*



MISS KANAWAN POCHANAKOM

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

Department of Pharmaceutical Chemistry  
Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-579-650-6

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University



หนังสือต้นฉบับยกย่อง โทษานิพนธ์ ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เรียงแน่นด้วย

คนาวรรณ พจนาคม : สารคูมารินจากเปลือกรากหัสคุณไทย (COUMARINS FROM THE  
ROOT BARK OF MICROMELUM MINUTUM) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สุนิพนธ์ ภูมิมางกูร,  
อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ชัยโย ชัยชาญพิพยุธร, 148 หน้า. ISBN 974-579-650-6

ในการสกัดแยกสารจากเปลือกรากของต้นหัสคุณไทย โดยวิธีการทางโครมาโทกราฟีและ  
การตกผลึก สามารถแยกสารคูมารินได้ 3 ชนิด คือ Osthol, Micromelin และ Murrangatin  
พร้อมทั้งหาสูตรโครงสร้างเหล่านี้ โดยวิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมี

การประยุกต์นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีแบบหนึ่งมิติซึ่งอาศัยเทคนิค  
polarization transfer และ proton decoupling ร่วมกับแบบสองมิติสามารถกำหนดตำแหน่ง  
คาร์บอนในสูตรโครงสร้างได้ โดยการใช้เทคนิค DEPT, COSY, NOESY และ Long Range C-H  
COSY ซึ่งทำให้กำหนดค่า chemical shift ของคาร์บอนในสารที่แยกได้อย่างแม่นยำ



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....เภสัชเคมี.....  
สาขาวิชา .....เภสัชเคมี.....  
ปีการศึกษา ..... 2534 .....

ลายมือชื่อนิติคุณ .....คนาวรรณ พจนาคม.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....ชัยโย ชัยชาญพิพยุธร.....



พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อ วิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมเพียงแผ่นเดียว

KANAWAN POCHANAKOM : COUMARINS FROM THE ROOT BARK OF MICROMELUM MINUTUM. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. SUNIBHOND PUMMANGURA, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. CHAIYO CHAICHANTIPYUTH, 148 PP. ISBN 974-579-650-6

Three coumarins, osthol, micromelin and murrangatin were isolated from the root bark of Micromelum minutum Wight & Arn. by chromatographic techniques and recrystallization. Their structures were elucidated by physical and chemical method.

Application of one dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy (polarizing effect and proton decoupling) and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy result in the assignment of carbon in the structure. The chemical shift of carbon of all isolated compounds were exactly assigned using DEPT, COSY NOESY and Long Range C-H COSY techniques.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..... เภสัชเคมี  
สาขาวิชา ..... เภสัชเคมี  
ปีการศึกษา ..... 2534

ลายมือชื่อนักศึกษา KANAWAN POCHANAKOM  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
..... ธีชัย ชัยเชษฐาพิย



## ACKNOWLEDGEMENTS

The Author wishes to express her grateful appreciation to those who assisted her in her research and in the writing of this thesis :

To Associate Professor Dr. Sunibhond Pummangura, her major advisor, for his continued interest, invaluable suggestions, encouragement, guidance and kindness throughout the research studies.

To Associate Professor Chaiyo Chaichantippyuth, her co-advisor, for his invaluable advice and willing cooperation.

To all staff of the Pharmaceutical Chemistry Department Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University, for their advice and helpful cooperation.

To the staff of the Scientific and Technological Research Equipment Center for their Cooperation in analyzing compounds.

To ICI Agrochemicals Company, England for the cooperation in assignment the structure of isolated compound by high resolution NMR.

To the graduate school of Chulalongkorn University for the provision of partial financial support.

To her friends for their friendship, understanding and encouragement.

And lastly to her parents for their love, encouragement and cheerfulness through her graduate study.



## CONTENTS

|  | Page |
|--|------|
| THAI ABSTRACT .....  | iv   |
| ENGLISH ABSTRACT .....                                     | v    |
| ACKNOWLEDGEMENT .....                                      | vi   |
| LIST OF TABLES .....                                       | ix   |
| LIST OF FIGURES .....                                      | x    |
| CHAPTER  |      |
| I    INTRODUCTION .....                                    | 1    |
| II   HISTORY .....   | 3    |
| Classification of Coumarins .....                          | 3    |
| Biosynthesis of Coumarins .....                            | 21   |
| Physiological Activity of Coumarin ..                      | 28   |
| Experimental Techniques in $^{13}\text{C}$ NMR ..          | 29   |
| 1. Proton-decoupling Techniques ..                         | 29   |
| 2. Polarization Transfer and<br>Related Experiments' ..... | 39   |
| 3. Two-dimensional Nuclear Magnetic<br>Resonance .....     | 56   |



|                                      | Page |
|--------------------------------------|------|
| III      EXPERIMENT                  |      |
| 1. Source of Plant Material .....    | 74   |
| 2. General Techniques .....          | 75   |
| 3. Extraction .....                  | 83   |
| 4. Isolation .....                   | 84   |
| IV      RESULTS AND DISCUSSION ..... | 86   |
| V      CONCLUSIONS .....             | 112  |
| REFERENCES .....                     | 114  |
| APPENDIX .....                       | 123  |
| VITA .....                           | 148  |



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## LIST OF TABLES

| TABLE |  | Page |
|-------|--|------|
| 1     | The example of some simple coumarins ...           | 5    |
| 2     | The example of some psoralene type coumarins. .... | 7    |
| 3     | Xanthyletin linear pyranocoumarins type.           | 13   |
| 4     | Xanthyletin angular pyranocoumarins type.          | 14   |



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

| FIGURE |   | Page |
|--------|---|------|
| 1      | Pathway from phenylalanine to coumarins.  | 23   |
| 2      | Formation of demethylsuberosin by prynylase. ....   | 24   |
| 3      | Hypothesis of linear and angular furanocoumarins biosynthesis. ....   | 25   |
| 4      | Mechanism proposed for conversion of marmesin to proralen. ....   | 26   |
| 5      | Formation of linear furanocoumarins and pyranocoumarins from 6-C-isoprenyl coumarin precursor. ....                                   | 27   |
| 6      | Proton noise-decoupled $^{13}\text{C}$ spectrum of Brucine. ....  | 30   |
| 7      | $^{13}\text{C}$ spectra showing the aliphatic carbon region of Brucine, (a) Proton-noise decoupled, (b) Off-resonance decoupled. .... | 32   |
| 8      | Series of $^{13}\text{C}$ SFORD spectra, showing the aromatic region in 6-Methylcoumarin.   | 33   |

## FIGURE

## Page

- 9 Array of selectively decoupled  $^{13}\text{C}$  spectra of 6-Methylcoumarin signals of fully decoupled carbons in each trace are labelled with a dot(.). . . . . 35
- 10 Timing diagram in a gated decoupling experiment . . . . . 37
- 11 (a) Proton-coupled spectrum of 2-Bromoaniline, (b) Gated decoupling spectrum of 2-Bromoaniline. . . . . 38
- 12 Timing diagram in a gated decoupling without NOE. . . . . 37
- 13 (a) Schematic energy level diagram for an AX spin system ( $A = ^1\text{H}$ ,  $X = ^{13}\text{C}$ ) allowed proton and  $^{13}\text{C}$  transition are labelled  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$ , and  $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_2$ , respectively. (b) Energy states and relative spin population for the AX spin system. . . . . 40
- 14  $^{13}\text{C}$  spectra of Oxaline, (a) Proton-coupled, (b) SPI experiment; transition of C-8 proton selectively inverted, (c) same as (b); Transition of C-15 proton selectively inverted. . . . . 42

| FIGURE  | Page |
|---|------|
| 15 The pulse sequence of INEPT experiment.  | 44   |
| 16 Behaviour of the proton magnetization shown for a $^{13}\text{C}^1\text{H}$ (AX spin system) during an INEPT in the rotating frame.  | 44   |
| 17 (a) Proton-coupled $^{13}\text{C}$ INEPT spectra of the aromatic region of Naphthacene quinone. (b) Expanded spectrum. (c) Proton noise-decoupling spectrum. ....  | 45   |
| 18 The pulse sequence of INEPT with refocusing and decoupling. ....   | 47   |
| 19 Dependence of the enhancement on the phase angle $\phi = 2\pi J T_2$ for CH (circles), $\text{CH}_2$ (triangles), and $\text{CH}_3$ (squares) signal for an INEPT experiment. ....   | 47   |
| 20 $^{13}\text{C}$ spectra of the aliphatic region in Lasalocid (a) Proton noise-decoupled, (b) SFORD, (c), (d) INEPT with refocusing and decoupling, (c) $T_2 = (2.7 \text{ J})^{-1}$ : $\text{CH}_1, \text{CH}_3 > 0, \text{CH}_2 < 0 <$ (d) $T_2 = (4 \text{ J})^{-1}$ : $\text{CH}_3, \text{CH}_2 = 0, \text{CH} > 0$ . | 49   |



## FIGURE

## Page

|    |  |    |
|----|--|----|
| 21 | Evolution of the transverse $^{13}\text{C}$ magnetization, following a $90^\circ$ pulse, for the three spin systems $^{13}\text{CH}$ (a), $^{13}\text{CH}_2$ (b) and $^{13}\text{CH}_3$ (c). . . . . | 50 |
| 22 | The Attached Proton Test (APT) pulse sequence. . . . .   | 51 |
| 23 | Proton noise-decoupled $^{13}\text{C}$ spectra of Strychnine (a) Standard spectrum, (b) Spectrum obtained by APT technique. . . . .  | 53 |
| 24 | The pulse sequence of DEPT experiment. . . . .   | 54 |
| 25 | Proton-decoupled $^{13}\text{C}$ DEPT signals obtained with $\tau = (2J)^{-1}$ and various flip angles. . . . .  | 55 |
| 26 | Schematic representation of the three time periods in two-dimensional experiments. . . . .   | 57 |
| 27 | The 2D NMR stacked plot of trans-decalin, hetero-J resolved. . . . .   | 58 |
| 28 | $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of 4-Methyl piperidine (a) $^1\text{H}$ decoupled 1D spectrum, (b) Contour diagram of the J ( $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ ) resolved 2D spectrum. . . . .            | 60 |

## FIGURE

## Page

|    |  |    |
|----|--|----|
| 29 | The SEFT (spin-echo Fourier transform) pulse sequence. ....  | 62 |
| 30 | (a) $^1\text{H}$ spectrum of ethyl n-butyl ether. (b) The projection of the H-spectrum onto the $F_2$ -axis. (c) The homonuclear J-resolved contour plot. .... | 63 |
| 31 | The 2D NMR stacked plot of Ethyl acetate, homo-J resolved. ....  | 64 |
| 32 | The correlated spectroscopy experiment : (a) Pulse sequence for the homonuclear case, (b) 2D absolute value mode contour for the AX case. ....                 | 66 |
| 33 | The $^1\text{H}$ spectrum and COSY contour plot of 3-Heptanone. ....   | 68 |
| 34 | Pulse timing diagram for the $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ chemical shift experiment. ....  | 70 |
| 35 | The NOESY pulse sequence. ....   | 70 |

## FIGURE

## Page

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 36 | The 2D $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ chemical shift correlation plot of Methylcyclohexane with the $^1\text{H}$ spectrum along $F_1$ and the $^{13}\text{C}$ proton noise decoupled spectrum along $F_2$ . . . . . | 72  |
| 37 | The $^1\text{H}$ NMR NOESY spectrum of Erythromycin A. . . . .  | 73  |
| 38 | Ultraviolet absorption spectrum of Osthol (compound-I) . . . . .  | 124 |
| 39 | Infrared spectrum of Osthol (compound-I). . . . .   | 125 |
| 40 | Mass spectrum of Osthol (compound-I). . . . .   | 126 |
| 41 | $^1\text{H}$ NMR spectrum of Osthol (compound-I). . . . .   | 127 |
| 42 | DEPT-90, DEPT-135 and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of Osthol (compound-I). . . . .   | 128 |
| 43 | H-H COSY spectrum of Osthol (compound-I). . . . .   | 129 |
| 44 | NOESY spectrum of Osthol (compound-I). . . . .  | 130 |
| 45 | C-H COSY spectrum of Osthol (compound-I). . . . .   | 131 |
| 46 | Long range C-H COSY spectrum of Osthol (compound-I). . . . .  | 132 |
| 47 | Long range C-H COSY spectrum of Osthol (compound-I). . . . .  | 133 |

| FIGURE   | Page |
|--|------|
| 48 Structure of Osthol and coumarin nucleus. ....                                      | 92   |
| 49 The cracking pattern of Osthol. ....  | 96   |
| 50 Ultraviolet absorption spectrum of Micromelin (compound-II). ....                   | 134  |
| 51 Infrared spectrum of Micromelin (compound-II). ....                                 | 135  |
| 52 Mass spectrum of Micromelin (compound-II). ....                                     | 136  |
| 53 $^1\text{H}$ NMR spectrum of Micromelin (compound-II). ....                         | 137  |
| 54 DEPT-90, DEPT-135 and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of Micromelin (compound-II). .... | 138  |
| 55 H-H COSY spectrum of Micromelin (compound-II). ....                                 | 139  |
| 56 NOESY spectrum of Micromelin (compound-II). ....                                    | 140  |
| 57 C-H COSY spectrum of Micromelin (compound-II). ....                                 | 141  |
| 58 Infrared spectrum of compound-III. ....   | 142  |
| 59 Mass spectrum of compound-III. ....   | 143  |



## FIGURE.

## Page

|    |  |     |
|----|--|-----|
| 60 | $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound-III. ....                | 145 |
| 61 | $^1\text{H}$ NMR deuterated spectrum of compound-<br>III ..... | 146 |
| 62 | $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound-III. ....             | 147 |



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย