

การวิเคราะห์หาปริมาณเปลาโนทอลในใบและเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของเปล้าน้อย  
*Croton sublyratus* Kurz



นางสาวพัชชา วงศ์เจริญสถิตย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-102-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๕๑๗๑๕๐๘๗

QUANTITATIVE ANALYSIS OF PLAUNOTOL IN THE LEAVES AND  
TISSUE CULTURES OF *Croton sublyratus* Kurz



Miss Aphacha Vongchareonsathit

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science  
Programme of Biotechnology

Chulalongkorn University


1994

ISBN 974-584-102-1


Thesis Title      QUANTITATIVE ANALYSIS OF PLAUNOTOL IN THE  
LEAVES AND TISSUE CULTURES OF *Croton sublyratus*  
Kurz  
By                   Miss Aphacha Vongchareonsathit  
Department       Programme Biotechnology  
Thesis Advisor   Assistant Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.

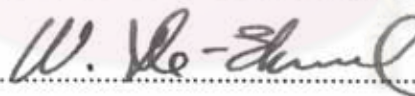



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

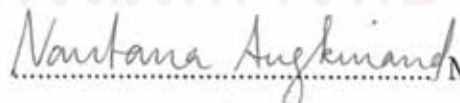
  
..... Dean of Graduate School  
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

  
..... Chairman  
(Assistant Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

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

  
..... Member  
(Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.)

  
..... Member  
(Associate Professor Nantana Angkinand, M.Sc.)



อพัชชา วงศ์เจริญสถิตย์ : การวิเคราะห์หาปริมาณเปลาโนทอลในใบและเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของเปล้าน้อย  
(QUANTITATIVE ANALYSIS OF PLAUNOTOL IN THE LEAVES AND TISSUE  
CULTURES OF *Croton sublyratus* Kurz) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. วันชัย ดีเอกนามกุล, 104 หน้า.  
ISBN 974-584-102-1

ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเปลาโนทอล (plaunotol) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์สมานแผลในกระเพาะอาหาร ในใบและเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของต้นเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz วงศ์ Euphorbiaceae) โดยใช้เทคนิค TLC-densitometry ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง วิธีการนี้สามารถตรวจหาเปลาโนทอลได้ในปริมาณต่ำถึง 50 นาโนกรัม และกราฟมาตรฐานของสารแสดงลักษณะกราฟเส้นตรงจนถึงปริมาณสาร 1.0 ไมโครกรัม ในการวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อย ได้ใช้ตัวอย่างใบจำนวน 68 ตัวอย่างที่ได้จากแหล่งต่างๆของประเทศไทย ซึ่งได้แก่ จังหวัดระยอง, ประจวบคีรีขันธ์, นครปฐม, กรุงเทพฯ และฉะเชิงเทรา ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณเปลาโนทอลในใบเปล้าน้อยพบอยู่ในช่วง 0.139-0.786% (w/w) โดยน้ำหนักแห้ง โดยตัวอย่างส่วนใหญ่ (39.71%) มีปริมาณเปลาโนทอลอยู่ในช่วง 0.3-0.4% (w/w) วิทยานิพนธ์นี้เป็นปฐมนิพนธ์ที่รายงานเกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณเปลาโนทอลในใบของต้นเปล้าน้อย ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าต้นเปล้าน้อยจากแหล่งที่ปลูกเดียวกันมีปริมาณเปลาโนทอลในใบที่ค่อนข้างแตกต่างกัน ซึ่งบ่งชี้ว่าลักษณะทางพันธุกรรมของต้นพืชในแต่ละต้นเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อปริมาณของเปลาโนทอลที่สะสมในใบ ดังนั้นการคัดเลือกต้นเปล้าน้อยที่มีสารเปลาโนทอลในปริมาณที่สูงถือว่าเป็นขั้นตอนสำคัญในการปรับปรุงคุณภาพของต้นเปล้าน้อย นอกจากนี้วิธีการของ TLC-densitometry ที่ถูกพัฒนาขึ้นยังใช้สำหรับการตรวจหาค่าคุณภาพในการสร้างสารเปลาโนทอลในใบของพืชตระกูลเบ้ง (Croton) รวมทั้งเนื้อเยื่อ (callus) และเซลล์ (cell) ของต้นเปล้าน้อย อย่างไรก็ตามไม่ตรวจพบสารเปลาโนทอลในตัวอย่างพืชต่างๆเหล่านี้เลย สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าต้นเปล้าน้อยที่มีสารเปลาโนทอลในปริมาณที่สูงสามารถทำให้เกิดต้นใหม่โดยผ่านทางเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง (callus culture) ได้โดยยอดใหม่จำนวนมาก (multiple shoot) ที่ได้เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อบนสูตรอาหาร MS (Murashige and Skoog (1962) medium) ที่ประกอบด้วยน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร, BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, GA<sub>3</sub> 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ gellan gum 0.2% (w/v) ประสิทธิภาพของการเกิดยอดเป็น 87.5% กับจำนวนยอด 13 ยอดต่อเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง

## ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....

สาขาวิชา..... เทคโนโลยีทางชีวภาพ

ปีการศึกษา 2536.....

ลายมือชื่อนิสิต..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



# # C426324 : MAJOR BIOTECHNOLOGY  
KEY WORD: *Croton sublyratus* Kurz / EUPHORBIACEAE / PLAUNOTOL / QUANTITATIVE ANALYSIS / TISSUE CULTURE

APHACHA VONGCHAREONSATHIT : QUANTITATIVE ANALYSIS OF PLAUNOTOL IN THE LEAVES AND TISSUE CULTURES OF *Croton sublyratus* Kurz. THESIS ADVISOR : ASSI. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D. 104 pp. ISBN 974-584-102-1

A simple, rapid and accurate method of TLC-densitometry was developed to quantitate plaunotol, an antipeptic ulcer substance, in the leaves and tissue cultures of *Croton sublyratus* Kurz (Euphorbiaceae). The developed method could detect plaunotol at the amount of as low as 50 ng and its standard curve showed linearity up to 1.0 µg of the compound. In the evaluation of plaunotol content in the leaves of Thai *C. sublyratus*, 68 samples of the leaves were collected from various sources, including Rayong, Prachuap Khiri Khan, Nakhon Pathom, Bangkok and Chachoengsao. The analysis revealed that *C. sublyratus* leaves contained plaunotol in the range of 0.139-0.789% (w/w) dry weight with the majority (39.71%) falling between 0.3-0.4%. This is the first report on the quantitative analysis of leaf plaunotol in *C. sublyratus*. Since the plants from the same geographical location also showed high variation of leaf plaunotol content, it was suggested that the genetic background of each individual plant is the major factor contributing to the apparent plaunotol content. Screening for high plaunotol-containing plant was, therefore, a crucial step for quality improvement of this plant. In addition, the developed TLC-densitometry was also used for the detection of plant materials which potentially contain plaunotol such as the leaves of other *Croton* species and callus and cell cultures of *C. sublyratus*. However, no detectable plaunotol was found in these materials. Starting with high plaunotol-containing *C. sublyratus* plant, we could regenerate the plant via callus culture. Multiple shoot formation was observed when the callus was cultured on MS medium containing 10 g/l sucrose, 1.0 mg/l BA, 0.05 mg/l GA<sub>3</sub> and 0.2% (w/v) gellan gum. The efficiency of the adventitious shoot formation was 87.5% with the number 13 shoots per callus.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....  
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ  
ปีการศึกษา.....2536

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



## ACKNOWLEDGEMENTS

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

The author would also like to thank the Graduate School of Chulalongkorn University and the University Development Commission (UDC) for granting her partial financial support to conduct this investigation.

The author wish to thank the Department of Pharmacognosy, and the R&D Unit for Herbs and Spices, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for providing laboratory facilities during this research.

The author wish to thank all staff members of the R&D Unit for Herbs and Spices, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their kindnesses and helps.

The author would like to extend her sincere thank to her friends for their friendship and encouragment.

Finally, the author would also like to acknowlege her appreciation to her parents, her sister and Mr. Maitree Soonthornwon for their love, understanding and cheerfulness through her gradute school.



## CONTENTS

	Page
Abstract (Thai).....	iv
Abstract (English).....	v
Acknowledgements.....	vi
Contents .....	vii
List of Tables .....	xii
List of Figures .....	xiv
Abbreviations.....	xvii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II HISTORICAL .....	4
1. Botanical Aspects of <i>Croton sublyratus</i> Kurz.....	4
2. The Uses of <i>C. sublyratus</i> .....	7
2.1 Traditional Uses.....	7
2.2 Therapeutic Uses.....	7
3. Chemical Constituents of <i>C. sublyratus</i> .....	8
4. Plaunotol .....	12
4.1 Structure and Chemical Properties .....	12
4.2 Isolation, Extraction and Purification of Plaunotol from <i>C. sublyratus</i> .....	13
4.3 Detection and Determination of Plaunotol.....	15
4.4 Synthesis of Plaunotol .....	16
4.5 Biological Activities of Plaunotol.....	19
5. The Biosynthetic Pathway of Diterpenes.....	20



	Page
6. Plant Tissue Culture for Plant Regeneration (Micropropagation).....	24
7. Review of the Studies on <i>C. sublyratus</i> Tissue Cultures .....	27
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	30
1. Chemicals.....	30
2. Quantitative Analysis of Plaunotol in <i>C. sublyratus</i> Leaves .....	30
2.1 Plant Material.....	30
2.2 Sample Preparation.....	32
2.3 Thin-Layer Chromatographic Densitometric Analysis .....	32
2.3.1 Thin Layer Chromatographic Conditions for Plaunotol Separation .....	32
2.3.2 Densitometric Analysis .....	33
2.4 Gas Chromatographic Analysis.....	33
2.4.1 Sample Preparation .....	34
2.4.2 Gas Chromatographic Conditions .....	34
2.5 Preparation of Standard Solutions for Calibration Curve.....	35
3. Plant Tissue Culture Techniques.....	35
3.1 Plant Material.....	35
3.2 Nutrient Media .....	35
3.3 Culture Conditions.....	36
3.4 Preparation of <i>C. sublyratus</i> Explants .....	37
3.5 Study on the Effect of Plant Growth Regulators on Growth and Development of <i>C. sublyratus</i> explants.....	37



	Page
3.6 Establishment of Callus Cultures .....	39
3.6.1 Callus Induction.....	39
3.6.2 Subculturing.....	40
3.7 Establishment of Cell Suspension Cultures .....	40
3.8 Shoot Regeneration from Callus .....	40
3.8.1 Callus Induction.....	41
3.8.2 Green Callus Formation and Proliferation.....	41
3.8.3 Shoot Formation via Callus.....	41
3.9 Root Induction .....	42
CHAPTER IV RESULTS .....	43
1. Development of TLC–Densitometry for Determination of Plaunotol in <i>C. sublyratus</i> Leaves.....	44
1.1 TLC Separation of Plaunotol in <i>C. sublyratus</i> Crude Extracts.....	44
1.2 Identification of Plaunotol on TLC Plate.....	44
1.3 Standard Calibration Curve.....	46
1.4 Accuracy and Precision.....	47
1.5 Sample Preparation for Determination of Plaunotol in <i>C. sublyratus</i> Leaves .....	50
2. Plaunotol Content in <i>C. sublyratus</i> Leaves .....	51
2.1 Variation of Plaunotol Content in <i>C. sublyratus</i> Growing in Various Parts of Thailand.....	51
2.2 Plaunotol Content in Mature and Young Leaves.....	52
3. Detection of Plaunotol in Callus and Cell Suspension Cultures of <i>C. sublyratus</i> .....	57

	Page
4. Screening for Plaunotol-Containing Plants in Some <i>Croton</i> species.....	59
5. Tissue Cultures of <i>C. sublyratus</i> .....	62
5.1 Effects of Plant Growth Regulators on Growth and Development of Various types of <i>C. sublyratus</i> Explants .....	62
5.1.1 Shoot Tips.....	62
5.1.2 Nodal Segments with Auxially Buds.....	63
5.1.3 Auxially Buds.....	64
5.1.4 Leaf Segments.....	66
5.2 Establishment of <i>C. sublyratus</i> Callus Cultures.....	67
5.3 Establishment of <i>C. sublyratus</i> Cell Suspension Cultures.....	69
5.4 Shoot Regeneration from <i>C. sublyratus</i> Callus Cultures.....	70
5.5 Root Induction .....	77
CHAPTER V DISCUSSION.....	79
1. Development of TLC-Densitometry for Determination of Plaunotol in <i>C. sublyratus</i> Leaves.....	80
2. Screening for High Plaunotol-Producing Plants of <i>C. sublyratus</i> .....	81
3. Praparation of Various Types of Explants and Callus Cultures from the High-Plaunotol Producing Plant.....	82
4. Regeneration of <i>C.sublyratus</i> Plant through the Explants.....	84
5. Regeneration of <i>C.sublyratus</i> Plant through Callus Cultures.....	84

	Page
CONCLUSION .....	88
REFERENCES .....	90
APPENDIX .....	99
VITA.....	104



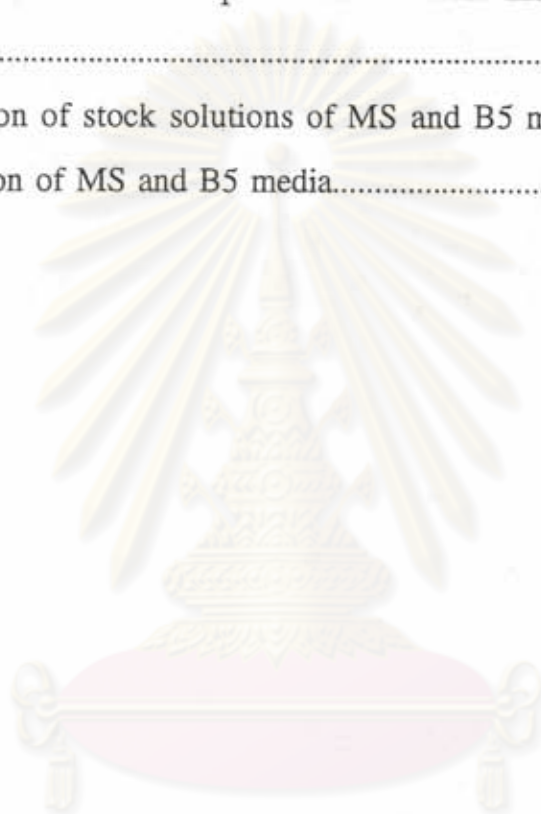
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## LIST OF TABLES

Table	Page
1 Chemical constituents and structures found in <i>C. sublyratus</i> .....	9
2 <i>In vitro</i> regeneration studies on some plant species (Bajaj, ed., 1988).....	26
3 Studies on <i>in vitro</i> culture studies of <i>C. sublyratus</i> for secondary metabolite production. ....	28
4 Studies on plant regeneration of <i>C. sublyratus</i> .....	29
5 Various sources of <i>Croton</i> plants and the plant parts used in this study.....	31
6 Methods for the sterilization and preparation of <i>C. sublyratus</i> explants.....	38
7 Percentage of plaunotol content as compared between the TLC-densitometric and GC methods.....	49
8 Comparison of methods for plaunotol extraction from <i>C. sublyratus</i> leaves.....	51
9 Plaunotol content in <i>C. sublyratus</i> leaves obtained from various parts of Thailand.....	53
10 The frequency of plaunotol content in <i>C. sublyratus</i> leaves.....	56
11 The average total plaunotol content in <i>C. sublyratus</i> leaves were obtained from mature plants, pruning plants and growing plants.....	57
12 Effect of various conditions for shoot formation from auxially bud.....	66
13 Effect of agar on multiple shoot formation of <i>C. sublyratus</i> callus.....	75

Table	Page
14 Effect of BA and GA <sub>3</sub> concentrations on shoot formation from <i>C. sublyratus</i> callus cultures .....	77
15 Composition of various plant tissue culture media used in this study.....	100
16 Preparation of stock solutions of MS and B5 media.....	101
17 Preparation of MS and B5 media.....	103



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 <i>Croton sublyratus</i> Kurz (Euphorbiaceae) .....	5
2 The chemical structure of plaunotol.....	12
3 Extraction and isolation of plaunotol from <i>C. sublyratus</i> stems.....	14
4 Synthesis of plaunotol by application of the method developed by Corey and Yamamoto (1970).....	17
5 Synthesis of plaunotol by the application of the stereoselective direct Wittig olefination to $\alpha$ -alkoxy ketones having geranylacetone skeleton .....	18
6 Biosynthesis of isopentenyl diphosphate from acetyl CoA.....	22
7 The biosynthetic pathway of diterpenes.....	23
8 The hypothesis of plaunotol formation from geranylgeraniol .....	24
9 TLC-chromatogram of plaunotol in ethanolic extract of <i>C. sublyratus</i> leaves after ascending triple development in solvents.....	45
10 UV-absorption spectra of authentic plaunotol and a unknown compound with similar R <sub>f</sub> -value to plaunotol.....	46
11 Calibration curve of plaunotol by TLC-densitometric method .....	47
12 GC chromatogram of authentic plaunotol and plaunotol in the leaf extract.....	48
13 Calibration curve of plaunotol by GC method.....	48
14 Bar graphs of plaunotol in <i>C. sublyratus</i> leaves determined by TLC-densitometric and GC methods.....	49
15 Variation of plaunotol content in <i>C. sublyratus</i> leaves obtained from various parts of Thailand .....	55



Figure	Page
16 Distribution of plaunotol content in <i>C. sublyratus</i> growing in various parts of Thailand .....	56
17 TLC patterns of the ethanolic extracts of leaves, callus and cell suspension cultures of <i>C. sublyratus</i> .....	58
18 TLC patterns of the extracts of various <i>Croton</i> plants .....	60
19 TLC-densitometric chromatograms of the extracts of various <i>Croton</i> plants as compared with the chromatogram of standard plaunotol .....	61
20 The shoot tip explant and the developed shoot tip on MS agar medium containing 2.0 mg/l BA .....	63
21 Three forms of the growth and development of auxially buds on the surface of node segment cultured on MS agar medium containing 2.0 mg/l BA .....	64
22 Steps of the development of shoot from auxially bud on MS agar medium containing 2.0 mg/l BA .....	65
23 Induction of callus from the leaf explants of <i>C. sublyratus</i> on MS agar medium containing 2.0 mg/l 2,4-D and 1.0 mg/l kinetin .....	68
24 Callus cultures of <i>C. sublyratus</i> on MS agar medium containing 1.0 mg/l 2,4-D and 1.0 mg/l BA .....	68
25 Cell suspension cultures of <i>C. sublyratus</i> maintained in MS liquid medium containing 0.2 mg/l NAA and 0.2 mg/l 2,4-D .....	69
26 Steps of shoot regeneration from callus cultures of <i>C. sublyratus</i> .....	71
27 The growth and development of adventitious shoot from calli cultured on MS medium containing 10 g/l sucrose, 1.0 mg/l BA, 0.05 mg/l GA <sub>3</sub> and 0.2% (w/v) gellan gum .....	73

Figure	Page
28 Shoot formation from callus cultures on MS medium containing 10 g/l sucrose, 1.0 mg/l BA and 0.05 mg/l GA <sub>3</sub> solidified with 0.6% (w/v) agar or 0.2% (w/v) gellan gum.....	74
29 The growth and development of calli on MS agar medium containing 30 g/l sucrose, 1.0 mg/l 2,4-D and 1.0 mg/l BA followed by transferring onto MS medium containing 10 g/l sucrose, 1.0 mg/l BA and 0.05 mg/l GA <sub>3</sub> solidified with 0.6% (w/v) agar or 0.2% (w/v) gellan gum.....	76
30 Root induction from the regenerated shoot on hormone-free MS medium.....	78



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ABBREVIATIONS

ABS	=	absorbance
aq	=	aqueous
B5	=	Gamborg <i>et al</i> (1968) medium
BA	=	6-benzylaminopurine, N <sup>6</sup> -benzyladenine
ca	=	about, approximately
calcd	=	calculated
cm	=	centimeter (s)
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
e.g.	=	for example
ext.	=	extract
etc.	=	et cetera
FID	=	flame ionization detector
Fig	=	figure
g	=	gram (s)
GA	=	gibberellic acid
GC	=	gas chromatography
hr	=	hour (s)
IAA	=	indole-3-acetic acid
IBA	=	indole-3-butyric acid
in	=	inch (es)
<i>in vitro</i>	=	culture of living material literally "in glass"
2iP	=	N <sup>6</sup> -( $\Delta_2$ isopentenyl)-adenine
kinetin	=	kinetin-6-furfuralaminopurine
kg	=	kilogram (s)



l	= liter (s)
lb	= pound (s)
m	= meter (s)
min	= minute (s)
mg	= milligram
ml	= milliliter
mm	= millimeter
MS	= Murashige and Skoog (1962) medium
<i>m/e</i>	= mass per charge ratio
M <sup>+</sup>	= molecular ion
N	= normal
NAA	= $\alpha$ -naphthaleneacetic acid
NaHCO <sub>3</sub>	= sodium hydrogen carbonate
nm	= nanometer
No.	= number
pH	= The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
PMR	= proton magnetic resonance
R <sub>f</sub>	= distance spot moved/distance solvent moved (TLC)
r.p.m.	= revolutions per minute
RT	= retention time
SD	= standard deviation
temp.	= temperature
TLC	= thin layer chromatography
UV	= ultraviolet light
w/v	= weight/volume (concentration)
w/w	= weight/weight (concentration)

$^{\circ}\text{C}$	= degree Celsius
$\delta$	= chemical shift
$\mu\text{g}$	= microgram (s) ( $10^{-6}$ g)
$\mu\text{l}$	= microliter (s) ( $10^{-6}$ l)
$\lambda_{\text{max}}$	= maximum absorption wavelength
/	= per
%	= percent (parts per 100); percentage



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย