การสังเคราะห์ไพรีทรินจากเซลล์เพาะเลี้ยงของไพรีทรัม

(*Chrysanthemum cinerariaefolium* Bocc.)

นางสาวอภิตา เวชประสิทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2533

ISBN 977-577-786-2

SYNTHESIS OF PYRETHRINS IN TISSUE CULTURE OF PYRETHRUM (*CHRYSANTHEMUM CINERARIAEFOLIUM* BOCC.)

Miss Apitar Vesprasit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1990

ISBN 974-577-786-2

Thesis Title SYNTHESIS OF PYRETHRINS IN TISSUE CULTURE OF PYRETHRUM (CHRYSANTHEMUM CINERARIAEFOLIUM Bocc.)

By Miss Apitar Vesprasit

Department Programme Biotechnology

Thesis Advisor Associate Professor Sanha Panichjakul, Ph.D.

Associate Professor Oradee Sahavacharin, 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 Suthep Taneeyawan, Ph. D.)

..... Member

(Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph. D.)

..... Member

(Associate Professor Oradee Sahavacharin, Ph. D.)

..... Member

(Associate Professor Soongsri Kulpreecha, Ph. D.)

อภิตา เวชประสิทธิ์ : การสังเคราะห์ไพรีทรินจากเซลล์เพาะเลี้ยงของไพรีทรัม (CHRYSANTHEMUM CINERARIAEFOLIUM BOCC.) (SYNTHESIS OF PYRETHRINS IN TISSUE CULTURE OF PYRETHRUM (CHRYSANTHEMUM CINERARIAEFOLIUM BOCC.)) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สิณห์ พนิชยกุล และ รศ.ดร.อรดี สหวัชรินทร์, 147 หน้า.
ISBN 974-577-786-2

สารไพรีทรินซึ่งสกัดได้จากพืชไพรีทรัม (Chrysanthemum cinerariaefolium Bocc.) พบว่ามีคุณสมบัติในการฆ่าแมลง ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการสังเคราะห์สารไพรีทรินจากพืชไพรีทรัมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยนำชิ้นส่วนต่าง ๆ (ก้านใบ ใบ และส่วนลำต้น) ของพืชมาเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมและอาหารสูตรต่าง ๆ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตสารไพรีทริน นอกจากนี้ได้พัฒนาวิธีสกัดและวิเคราะห์สารไพรีทรินที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลผลิตสารไพรีทรินในปริมาณมากที่สุด และพบว่าเนื้อเยื่อใบให้ผลตอบสนองต่อภาวะของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูงสุด และการชักนำให้เกิดแคลลัสของพืชไพรีทรัมสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชในอาหารสูตร MS เติมสูตรมาตรฐานเสริมด้วย 2,4-D และ BA (ความเข้มข้น 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ) ที่ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ 2,000 ลักซ์ และอุณหภูมิ 25±2 °ซ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต ต่อการเจริญเซลล์พบว่า IAA และ BA (ความเข้มข้น 1.0 และ 3.0 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ) ให้ผลการผลิตสารไพรีทรินจากเซลล์เพาะเลี้ยงมากกว่าที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย 2,4-D และ BA

การสกัดสารไพรีทรินใช้วิธี Soxhlet ที่อุณหภูมิ 60°ซ โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวสกัด ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถสกัดสารไพรีทรินได้สูงสุด และการศึกษาทางคุณภาพวิเคราะห์ใช้วิธี Thin-layer chromatography โดยใช้ n-hexane:n-heptane:ethylacetate ในอัตราส่วน 40:48:12 เป็นตัวพา สามารถแยกองค์ประกอบทั้ง 6 ชนิดของสารไพรีทรินออกจากกันได้ดีที่สุด การศึกษาปริมาณและองค์ประกอบของสารไพรีทรินโดยละเอียดใช้วิธี gas chromatography และ high performance liquid chromatography โดยใช้ methylstearate เป็นสารมาตรฐาน

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า หากใช้อาหาร และสภาพเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมแล้ว ทำให้สามารถเจริญเซลล์และสังเคราะห์สารไพรีทรินจากไพรีทรัมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ภาควิชา .....เทคโนโลยีชีวภาพ.....
สาขาวิชา .....เทคโนโลยีชีวภาพ.....
ปีการศึกษา .....2532.....

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

APITAR VESPRASIT : SYNTHESIS OF PYRETHRINS IN TISSUE CULTURE OF PYRETHRUM (*CHRYSANTHEMUM CINERARIAEFOLIUM* BOCC.). THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SANHA PANICHAJAKUL, PH.D. AND ASSO. PROF. ORADEE SAHAVACHARIN, PH.D., 147 PP. ISBN 974-577-786-2

Pyrethrins extracted from pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Bocc.) has been found to possess an active insecticidal property. Through this property an attempt to synthesize pyrethrins in tissue culture of pyrethrum was carried out. Explants of three organ sources (petiole, leaf and stem piece) were cultured under varying influential factors on the growth and production of pyrethrins such as the medium constituents, and the environmental conditions. In addition, to maximize the pyrethrins extracted from pyrethrum grew under those conditions, the suitable extraction and analysis procedures were established. Through this study it was found that leaf tissue gave the highest response to those treated conditions and the maximum pyrethrum callus initiation could be achieved when the explants were grown on full strength MS medium supplemented with 2,4-D, BA (1.0:3.0 mg/ml) under 2,000 lux fluorescent illumination and maintained at the temperature of 25±2°C. However, it was found that the effect of growth regulators, IAA and BA recombined at a ratio of 1.0 to 3.0 mg/ml was more sustained on the pyrethrins production in culture cells than the 2,4-D and BA recombined at the ratio 1.0 to 3.0 mg/ml respectively.

Maximum yield of pyrethrum extract could be established when petroleum ether was employed as an extracting solvent in the Soxhlet apparatus at performing temperature of 60°C for at least 7 hours. The TLC qualitative analysis developed by n-hexane-n-heptane-ethylacetate (40:48:12) comprised the good separation of all six compounds. GC and HPLC analysis of the culture cells revealed to facilitate for more separation of pyrethrins constituents. It can be concluded that with appropriate media constituents and environmental culture conditions, an efficient synthesis of pyrethrins in tissue culture of pyrethurm can be achieved.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express her sincere gratitude to the following people :-

Associate Professor Dr. Sanha Panichajakul of the department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for his valuable suggestion, useful guideness and keen interest throughout the course of practical work and presentation of the thesis.

Associate Professor Oradee Sahavacharin of the Deparment of Horticulture, Facaulty of Agriculture, Kasetsart, University, for her kindness to advise in tissue culture practical work and her supervision of this research ideas.

Associate Professor Preeda Chaisiri of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for her kindness and valuable advise in determining the Gas Chromatography during the present work.

Mr. Pin Thawanvichajakij of East Asiatic Company Limited for his kind providing of the pyrethrum dry power.

Mr. Wichai Supanimitrakul of Wellcome Thailand Limited for his kind providing of the pyrethrum extract.

Mrs. Yupa Mongkolsuk of Central Laboratory Instrument Center, Kasetsart University, for her helpful guidance and providing shoot culture.

All staff members of the Department of Biotechnology and Biochemistry, Faculty of Science Chulalongkorn University, for their kindness and helpful.

Finally, the author's grateful thanks are due to National Center for Genetic Enginerring and Biotechnology for granting her partial financial support through conduct some parts of this investigation.

CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF TABLES (cont.)

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES (cont.)

LIST OF FIGURES (cont.)

LIST OF FIGURES (cont.)

LIST OF FIGURES (cont.)

ABBREVATION

AcOH	=	acetic acid
BA	=	Benzyladenine
p-BAP	=	p-benzylaminopurine
^{o}C	=	degree celcius
ca.	=	circa (approximately)
cm	=	centimeter
2,4-D	=	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
EtOAc	=	ethylacetate
EtOH	=	ethanol
et al.	=	et alli (and others)
g	=	gram
Glu	=	glucose
GC	=	gas chromatography
GI	=	growth index
hr	=	hour
hg	=	hugnur (mercury)
HPLC	=	high performance liquid chromatography
H_2	=	hydrogen gas
IAA	=	indoleacetic acid
kg	=	kilogram
l	=	liter
M	=	molarity
MS medium	=	Murashige and Skoog's medium
MeOH	=	methanol
µl	=	microliter
mg	=	milligram

min.	=	minute
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
m.p.	=	melting point
NAA	=	∝ -naphthaleneacetic acid
N_2	=	nitrogen gas
nm	=	nanometer
no.	=	number
P	=	page
ppm	=	parts per million
rpm	=	revolutions per minute
RT medium	=	revised tobacco medium
wt	=	weight
v	=	volume

CHEMICAL FORMULA

CH_3COCH_3 = acetone

 = benzene

$CHCl_3$ = chloroform

CrO_3 = chromic acid

H_2O = water

H_2SO_4 = sulfuric acid