# การศึกษาการสร้างสารอนุพันธ์ของลอว์โซนในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของเทียนบ้าน

นายภาคภูมิ พาณิชยุปการนันท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชเวท

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๓๕

ISBN 974-581-703-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018689 1171789 80

# Study on Lawsone Derivative Formation in *in vitro* Cultures of *Impatiens balsamina* L.

Mr. Pharkphoom Panichayupakaranant

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

1992

ISBN 974-581-703-1

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Study on Lawsone Derivative Formation in *in vitro* Cultures of *Impatiens balsamina* L. |
| By | Mr. Pharkphoom Panichayupakaranant |
| Department | Pharmacognosy |
| 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.

Thavorn Vajrabhaya

..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Payom Tantivatana ..... Chairman

(Professor Payom Tantivatana, Ph. D.)

Wanchai De-Eknamkul ..... Thesis Advisor

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

Sanha Panichayakul ..... Member

(Associate Professor Sanha Panichayakul, Ph.D.)

Phannipha Chumsri ..... Member

(Assistant Professor Phannipha Chumsri, M.S.)

Khanit Suwanborirux ..... Member

(Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

หอสมุดกลาง แผนวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคภูมิ พาณิชยุปการนันท์ : การศึกษาการสร้างสารอนุพันธ์ของลอว์โซนในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของเทียนบ้าน (Study on Lawsone Derivative Formation in *in vitro* Cultures of *Impatiens balsamina* L.) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. วันชัย ดีเอกนามกุล, 80 หน้า. ISBN 974-581-703-1

การสร้างเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง เซลล์เพาะเลี้ยงและรากเพาะเลี้ยงจากใบอ่อนของเทียนบ้านสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของฮอร์โมนพืชในสูตรอาหาร B5 ให้เหมาะสม เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงต่างๆ เหล่านี้ได้ถูกนำมาประเมินหาศักยภาพในการสร้างสารสำคัญสองชนิดซึ่งได้แก่ 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone) และ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในการตรวจหาสาร naphthoquinones ในสารสกัดจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ และส่วนต่างๆ ของต้นเทียนบ้านได้ใช้วิธี double-development thin-layer chromatography ซึ่งได้ถูกพัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าในบรรดาเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของต้นเทียนบ้านทั้งสามชนิดสามารถตรวจพบ lawsone ได้ในรากเพาะเลี้ยง และ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของเทียนบ้าน ในขณะที่ไม่พบสารทั้งสองชนิดนี้ในเซลล์เพาะเลี้ยงของเทียนบ้าน ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธี TLC-densitometry ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร naphthoquinone ทั้งสองชนิดที่ถูกสร้างขึ้นในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง จากวิธีการดังกล่าวพบว่าในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงมีปริมาณของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone อยู่เพียง 0.004% ในรากเพาะเลี้ยงกลับมีการสร้าง lawsone ใน ปริมาณสูงถึง 0.158 % ต่อน้ำหนักแห้ง ซึ่งเกือบจะมากกว่าในต้นเทียนบ้านตามธรรมชาติถึง 4 เท่า จากการศึกษาหาส่วนประกอบของสารเคมีที่สกัดได้จากรากเพาะเลี้ยงของต้นเทียนบ้าน พบว่ามีลักษณะส่วนประกอบของสารเคมีที่แตกต่างไปจากที่ได้จากรากของต้นเทียนบ้านตามธรรมชาติ และเมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลากับการสร้างสาร lawsone ในรากเพาะเลี้ยงพบว่ามีการแปรปรวนของระดับการสร้างสาร naphthoquinone มากในช่วง 20 วันของการเจริญเติบโต สำหรับในต้นเทียนบ้านที่ขึ้นตามธรรมชาติพบว่ามี 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในส่วนของใบในปริมาณ 0.130 % ในส่วนของลำต้น 0.075% และในส่วนของราก 0.032% ส่วน lawsone พบว่ามีมากที่สุดในส่วนของใบในปริมาณ 0.045% ต่อน้ำหนักแห้ง วิทยานิพนธ์นี้เป็นปฐมนิพนธ์ที่รายงานเกี่ยวกับการสร้าง lawsone ในรากเพาะเลี้ยงของเทียนบ้าน และการกระจายในเชิงปริมาณของ lawsone และ อนุพันธ์ methyl ether ของ lawsone ในส่วนต่างๆ ของต้นเทียนบ้าน

ภาควิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา เภสัชเวท ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2534

Pharkphoom Panichayupakaranant : Study on Lawsone Derivative Formation in *in vitro* Cultures of *Impatiens balsamina* L. Thesis advisor : Assistant Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D. 80 pp. ISBN 974-581-703-1

Callus, cell suspension and root cultures of *Impatiens balsamina* L. were successfully established from young leaf explants by manipulation of plant growth regulators in B5 medium. These *in vitro* cultures were maintained and evaluated for their potential in producing 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (lawsone ) and 2-methoxy-1,4-naphthoquinone, the two active constituents in *I. balsamina* plant. A method of double-development thin layer chromatography was developed carefully to ensure simultaneous detection of both natural naphthoquinones in the crude extracts of various *in vitro* cultures and the plants. Among the three different types of *I. balsamina* cultures, lawsone was detected in the root cultures, 2-methoxy-1,4-naphthoquinone in the callus cultures whereas neither of them was found in the cell suspension cultures. Quantitative analysis of both naphthoquinones produced by the cultures was carried out by the method of TLC-densitometry. While the callus cultures contained only 0.004 % 2-methoxy-1,4-naphthoquinone, the root cultures appeared to accumulate lawsone to the level of as high as 0.158 % dry weight which is almost four times of the content found in the intact plant. Careful examination of the chemical constituents extractable from the root cultures showed a pattern that was very different from the one obtained from the whole root. Time-couse study of lawsone production by the root cultures showed high fluctuation of the naphthoquinone formation during a growth period of 20 days. In the whole plant, the content 2-methoxy-1,4-naphthoquinone was determined to be 0.130, 0.075 and 0.032 % in the leaves, stems and roots, respectively, and lawsone was found mainly in the leaves with 0.045 % dry weight. Apparently, this is the first report on the formation of lawsone in *I. balsamina* root cultures and on the quantitative distribution of lawsone and its methyl ether in the whole plant.

**ภาควิชา** เภสัชเวท **ลายมือชื่อนิสิต**.....

**สาขาวิชา** เภสัชเวท **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา**.....

**ปีการศึกษา** 2534

# ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express his deepest appreciation and grateful thanks to his 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 auther would like to acknowledge his grateful thanks to Associate Professor Nijsiri Ruangrunsri, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his helpful suggestions.

The author would also like to thank Associate Profersor Dr. Sanha Panichajakul, Head of the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for providing his laboratory facilities during the beginning of this work.

The author wishes to express his sincere gratitude to Associate Professor Tanomjit Supavita and Associate Professor Dr. Narong Supavita, Head and staff of the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, respectively, Faculty of Pharmacy, Prince of Songkla University, Songkhla, for their kindnesses, under-standing and helps.

The author wishes to thank the Graduate School of Chulalongkorn University for a Teaching Assistantship and partial support in form of research grant.

The author would also like to acknowledge his appreciation to Mr. Phitsanu Soonthornrattanaruk for the preparation of this manuscript.

Finally, the author would further like to extend his sincere thanks to all staff members of the Department of Pharmacognosy, and the Research Unit for Herb and Spice Development, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their kindnesses and helps.

# CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI) ..... iv

ABSTRACT (ENGLISH) ..... v

ACKNOWLEDGEMENTS ..... vii

CONTENTS ..... viii

LIST OF FIGURES ..... xi

LIST OF TABLES ..... xiii

ABBREVIATIONS ..... xiv

**CHAPTER I INTRODUCTION** ..... 1

**CHAPTER II HISTORICAL** ..... 5

1. BOTANICAL ASPECT OF IMPATIENS BALSAMINA ..... 5
2. CHEMICAL CONSTITUENTS OF I. BALSAMINA ..... 7
3. THE USES OF I. BALSAMINA ..... 7
4. CHEMISTRY, DISTRIBUTION AND DETECTION OF NAPHTHOQUINONES ..... 9
   - 4.1 CHEMISTRY AND DISTRIBUTION ..... 9
   - 4.2 DECTECTION, SEPARATION AND IDENTIFICATION OF NAPHTHOQUINONES ..... 12
5. THE CHEMISTRY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF LAWSONE AND 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE ..... 14
   - 5.1 CHEMISTRY OF LAWSONE ..... 14
   - 5.2 BIOLOGICAL ACTIVITIES OF LAWSONE ..... 14
   - 5.3 CHEMISTRY OF 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE ..... 15
   - 5.4 BIOLOGICAL ACTIVITIES OF 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE ..... 16
6. THE PURPOSED BIOSYNTHETIC PATHWAY OF NAPHTHOQUINONES ..... 17
   - 6.1 THE SHIKIMATE-DERIVED PATHWAYS ..... 17
   - 6.2 THE ACETATE-MALONATE PATHWAYS ..... 21
   - 6.3 THE BIOSYNTHESIS OF LAWSONE ..... 21
7. IN VITRO CULTURE OF HIGHER PLANTS. ..... 25

7.1 SOURCES AND TYPES OF CULTURES .....25

7.2 CALLUS CULTURES .....26

7.3 CELL SUSPENSION CULTURES.....26

7.4 ROOT CULTURES .....27

7.5 PLANT CELL CULTURES AS METABOLIC MODEL SYSTEMS.....28

8. SECONDARY PRODUCT FORMATION IN PLANT TISSUE AND CELL CULTURES.....29

**CHAPTER III MATERIALS AND METHODS**.....32

1. CHEMICALS.....32

2. PLANT TISSUE CULTURE TECHNIQUES .....32

2.1 PREPARATION OF I. BALSAMINA LEAVE EXPLANTS .....32

2.2 MEDIUM PREPARATION.....33

2.3 STUDY ON THE EFFECT OF HORMONAL FACTORS ON CALLUS FORMATION.....36

2.4 ESTABLISHMENT OF CELL SUSPENSION CULTURES .....37

2.5 ESTABLISHMENT OF ROOT CULTURES.....37

2.6 STUDY ON GROWTH AND LAWSONE PRODUCTION IN THE ROOT CULTURES .....38

3. PHYTOCHEMICAL TECHNIQUES .....38

3.1 PREPARATION OF CRUDE EXTRACTS OF VARIOUS I. BALSAMINA CULTURES AND PLANT PARTS.....38

3.2 IDENTIFICATION OF LAWSONE AND 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE .....38

3.3 QUANTITATIVE ANALYSIS OF LAWSONE AND ITS METHYL ETHER.....39

**CHAPTER IV RESULTS**.....41

1. EFFECT OF HORMONAL FACTORS ON CALLUS FORMATION.....41

2. ESTABLISHMENT OF CELL SUSPENSION CULTURES AND ROOT CULTURES.....41

3. DETECTION OF LAWSONE AND 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE IN VARIOUS IN VITRO CULTURES OF I. BALSAMINA .....43

4. DETECTION OF SCOPOLETIN IN I. BALSAMINA CULTURES .....46

5. QUANTITATIVE ANALYSIS OF LAWSONE AND 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE ..... 55

6. CHEMICAL PATTERNS OF THE CRUDE EXTRACTS OF I. BALSAMINA ROOT CULTURES AND THE WHOLE ROOTS ..... 62

7. TIME-COURSE OF GROWTH AND LAWSONE PRODUCTION BY I. BALSAMINA ROOT CULTURES ..... 62

**CHAPTER V DISCUSSION** ..... 66

CONCLUSION ..... 70

REFERENCES ..... 71

VITA ..... 80

# LIST OF FIGURES


| Figure | | Page |
|---|---|---|
| 1 | IMPATIENS BALSAMINA L. (BALSAMINACEAE) | 6 |
| 2 | SOME NAPHTHOQUINONES AND BENZOQUINONES IN HIGHER PLANTS | 10 |
| 3 | THE PURPOSED BIOSYNTHETIC PATHWAY OF ALKANNIN. | 19 |
| 4 | THE PURPOSED BIOSYNTHETIC PATHWAY OF CHIMAPHILIN | 20 |
| 5 | THE PURPOSED BIOSYNTHETIC PATHWAY OF PLUMBAGIN. | 22 |
| 6 | THE PURPOSED BIOSYNTHETIC PATHWAY OF LAWSONE. | 24 |
| 7 | SCHEMATIC REPRESENTATION OF IN VITRO CULTURE OF HIGHER PLANTS | 25 |
| 8 | TWO FORMS OF I. BALSAMINA CALLUS CULTURES | 42 |
| 9 | TWO TYPES OF I. BALSAMINA CULTURES MAINTAINED IN B5 LIQUID MEDIA | 44 |
| 10 | TLC PATTERNS OF CRUDE EXTRACTS OBTAINED FROM VARIOUS IN VITRO CULTURES AND VARIOUS PLANT PARTS OF I. BALSAMINA | 46 |
| 11 | UV-ABSORPTION SPECTRA OF AUTHENTIC LAWSONE AND THE COMPOUND OF SIMILAR HRF VALUE | 47 |
| 12 | UV-ABSORPTION SPECTRA OF AUTHENTIC 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE AND THE COMPOUND OF SIMILAR HRF VALUE | 48 |
| 13 | UV-ABSORPTION SPECTRA OF AUTHENTIC 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE AND THE UNKNOWN COMPOUND OF SIMILAR HRF VALUE | 49 |
| 14 | MASS SPECTRUM OF THE UNKNOWN COMPOUND | 51 |
| 15 | FRAGMENTATION OF SCOPOLETIN. | 52 |
| 16 | UV-ABSORPTION SPECTRA OF AUTHENTIC SCOPOLETIN AND THE COMPOUND OF SIMILAR HRF VALUE | 53 |
| 17 | UV-ABSORPTION SPECTRA OF AUTHENTIC SCOPOLETIN AND THE UNKNOWN COMPOUND OF YELLOWISH FLUORESCENCE | 54 |
| 18 | STANDARD CURVE OF LAWSONE ESTABLISHED BY TLC-DENSITOMETRIC METHOD. | 55 |

19 STANDARD CURVE OF 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE ESTABLISHED BY TLC-DENSITOMETRIC METHOD.....56

20 TLC-DENSITOMETRIC CHROMATOGRAMS OF THE CRUDE EXTRACTS OF VARIOUS IN VITRO CULTURES AND THE LEAVE OF I. BALSAMINA .....58

21 HPLC-CHROMATOGRAM OF LAWSONE AND 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE .....59

22 STANDARD CURVE OF LAWSONE ESTABLISHED BY HPLC METHOD.....60

23 STANDARD CURVE OF 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE ESTABLISHED BY HPLC METHOD. .....61

24 TLC-DENSITOMETRIC CHROMATOGRAM OF CRUDE EXTRACTS OF ROOT CULTURES AND ROOT OF I. BALSAMINA .....63

25 TIME-CORUSE OF GROWTH AND LAWSONE PRODUCTION BY I. BALSAMINA ROOT CULTURES.....64

# LIST OF TABLES


| Table | | Page |
|---|---|---|
| 1 | CHEMICAL CONSTITUENTS OF VARIOUS PARTS OF I. BALSAMINA | 8 |
| 2 | THE COLORS OF HYDROXYLATED NAPHTHOQUINONES IN ALKALINE SOLUTION. | 12 |
| 3 | ULTRAVIOLET-VISIBLE ABSORPTION OF SOME NATURALLY OCCURRING NAPHTHOQUINONES. | 13 |
| 4 | EXAMPLES OF SECONDARY METABOLITE PRODUCTION BY PLANT TISSUE CULTURE | 30 |
| 5 | INORGANIC SALT AND VITAMIN COMPOSITIONS OF PLANT TISSUE CULTURE MEDIA | 33 |
| 6 | PREPARATION OF STOCK SOLUTION OF B5 AND MS MEDIA | 34 |
| 7 | PREPARATION OF B5 AND MS MEDIA | 35 |
| 8 | THE COMBINATION OF AUXINS AND CYTOKININS IN TESTED CULTURE MEDIA | 37 |
| 9 | LAWSONE AND 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE CONTENT IN VARIOUS FORM OF I. BALSAMINA CULTURES AND VARIOUS PARTS OF THE INTACT PLANT | 57 |
| 10 | CALCULATED CONCENTRATION OF LAWSONE AND 2-METHOXY-NAPHTHOQUINONE BY TLC DENSITOMETRIC METHOD COMPARED WITH HPLC METHOD | 62 |

## ABBREVIATIONS

| | | |
|---|---|---|
| 2,4-D | = | 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid |
| B5 | = | Gamborg media (1976) |
| BA | = | 6-Benzylaminopurine |
| *ca* | = | About |
| cm | = | Centimeter |
| dec. | = | Decomposition |
| EDTA | = | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| EtOH | = | Ethanol |
| g | = | Gram |
| GLC | = | Gas liquid chromatography |
| Glc | = | Glucose |
| HPLC | = | High-performance liquid chromatography |
| hRf | = | Rate of flow in chromatography multiplied by 100 |
| IAA | = | Indole-3-acetic acid |
| IR | = | Infrared |
| l | = | Liter |
| $lb/in^2$ | = | Pound per square inch |
| *m/z* | = | Mass to charge ratio |
| MFC | = | Maximal fungicidal concentration |
| MIC | = | Minimal inhibitory concentration |
| min | = | Minute |
| ml | = | Milliliter |
| mm | = | Millimeter |
| MS | = | Mass spectrometry |
| MS | = | Murashige and Skoog media (1962) |
| MW | = | Molecular weight |

| | | |
|---|---|---|
| NAA | = | α-Naphthaleneacetic acid |
| nm | = | Nanometer |
| NMR | = | Nuclear magnetic resonance |
| PEG | = | Polyethylene glycol |
| pH | = | The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions |
| PP | = | Pyrophophate |
| ppm | = | Part per million |
| r.p.m. | = | Round per minute |
| RT | = | Retention time |
| TLC | = | Thin layer chromatography |
| TPP | = | Thiamine pyrophosphate |
| UV | = | Ultraviolet |
| w/v | = | weight/volume (concentration) |
| °C | = | Degree Celsius |
| µl | = | Microliter |
| µm | = | Micrometer |
| %CV | = | Coefficient variation |