

การศึกษาการสร้างสารอนุพันธ์ของลิวโอนินในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของเทียนบ้าน

นายภาคภูมิ พาณิชยุปการนันท์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเกศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชเวท

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๓๕

ISBN 974-581-703-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018689

117178980

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

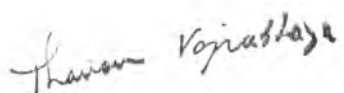
Chulalongkorn University

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.

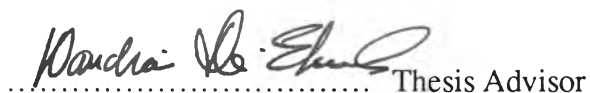


..... Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

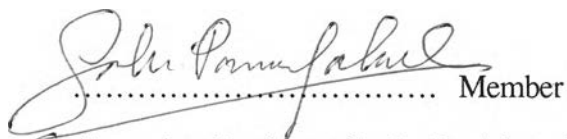
Thesis Committee

 Chairman

(Professor Payom Tantivatana, Ph. D.)

 Thesis Advisor

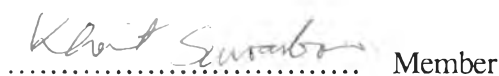
(Assistant Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)

 Member

(Associate Professor Sanha Panichayakul, Ph.D.)

 Member

(Assistant Professor Phannipha Chumsri, M.S.)

 Member

(Khanit Suwanborirux, Ph.D.)



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

การสร้างเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง เซลล์เพาะเลี้ยงและรากเพาะเลี้ยงจากใบอ่อนของเทียนบ้านสามารถทำได้
โดยการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของฮอร์โมนพืชในสูตรอาหาร B5 ให้เหมาะสม เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงต่างๆ
เหล่านี้ได้ถูกนำมาประเมินหาศักยภาพในการสร้างสารสำคัญสองชนิดซึ่งได้แก่ 2-hydroxy-1,4-naphtho-
quinone (lawsone) และ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในการตรวจหาสาร naphtho-
quinones ในสารสกัดจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ และส่วนต่างๆ ของต้นเทียนบ้านได้ใช้วิธี double-
development thin-layer chromatography ซึ่งได้ถูกพัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าในบรรดาเนื้อ
เยื่อเพาะเลี้ยงของต้นเทียนบ้านทั้งสามชนิดสามารถตรวจพบ lawsone ได้ในรากเพาะเลี้ยง และ 2-methoxy-
1,4-naphthoquinone ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของเทียนบ้าน ในขณะที่ไม่พบสารทั้งสองชนิดนี้ในเซลล์เพาะเลี้ยง
ของเทียนบ้าน ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธี TLC-densitometry ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสาร
naphthoquinone ทั้งสองชนิดที่ถูกสร้างขึ้นในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง จากวิธีการดังกล่าวพบว่าในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง
มีปริมาณของ 2-methoxy-1,4-naphthoquinone อยู่เพียง 0.004% ในรากเพาะเลี้ยงกลับมีการสร้าง
lawsone ใน ปริมาณสูงถึง 0.158 % ต่อน้ำหนักแห้ง ซึ่งเกือบจะมากกว่าในต้นเทียนบ้านตามธรรมชาติถึง
4 เท่า จากการศึกษาหาส่วนประกอบของสารเคมีที่สกัดได้จากรากเพาะเลี้ยงของต้นเทียนบ้าน พบว่ามีลักษณะ
ส่วนประกอบของสารเคมีที่แตกต่างไปจากที่ได้จากรากของต้นเทียนบ้านตามธรรมชาติ และเมื่อหาความสัมพันธ์
ระหว่างระยะเวลากับการสร้างสาร lawsone ในรากเพาะเลี้ยงพบว่าการแปรปรวนของระดับการสร้างสาร
naphthoquinone มากในช่วง 20 วันของการเจริญเติบโต สำหรับในต้นเทียนบ้านที่ขึ้นตามธรรมชาติพบว่ามี
2-methoxy-1,4-naphthoquinone ในส่วนของใบในปริมาณ 0.130 % ในส่วนของลำต้น 0.075% และ
ในส่วนของราก 0.032% ส่วน lawsone พบว่ามีมากที่สุดในส่วนใบในปริมาณ 0.045% ต่อน้ำหนัก
แห้ง วิทยานิพนธ์นี้เป็นปฐมนิพนธ์ที่รายงานเกี่ยวกับการสร้าง lawsone ในรากเพาะเลี้ยงของเทียนบ้าน และ
การกระจายในเชิงปริมาณของ lawsone และ อนุพันธ์ methyl ether ของ lawsone ในส่วนต่างๆ
ของต้นเทียนบ้าน

ภาควิชา เกษศาสตร์
สาขาวิชา เกษศาสตร์
ปีการศึกษา 2534

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

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-course 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 เกษตรเวท

สาขาวิชา เกษตรเวท

ปีการศึกษา 2534

ลายมือชื่อผู้สมัคร.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

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 author would like to acknowledge his grateful thanks to Associate Professor Nijisiri Ruangrunsrri, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his helpful suggestions.

The author would also like to thank Associate Professor 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, understanding 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 Soonthornrattananuruk 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 <u>IMPATIENS BALSAMINA</u>	5
2. CHEMICAL CONSTITUENTS OF <u>I. BALSAMINA</u>	7
3. THE USES OF <u>I. BALSAMINA</u>	7
4. CHEMISTRY, DISTRIBUTION AND DETECTION OF NAPHTHOQUINONES	9
4.1 CHEMISTRY AND DISTRIBUTION.....	9
4.2 DETECTION, 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 <u>I. BALSAMINA</u> 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 <u>I. BALSAMINA</u> 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 <u>I. BALSAMINA</u>	43
4. DETECTION OF SCOPOLETIN IN <u>I. BALSAMINA</u> CULTURES	46

5. QUANTITATIVE ANALYSIS OF LAWSONE AND 2-METHOXY-1,4-NAPHTHOQUINONE	55
6. CHEMICAL PATTERNS OF THE CRUDE EXTRACTS OF <u>L. BALSAMINA</u> ROOT CULTURES AND THE WHOLE ROOTS.....	62
7. TIME-COURSE OF GROWTH AND LAWSONE PRODUCTION BY <u>L. BALSAMINA</u> ROOT CULTURES.....	62
CHAPTER V DISCUSSION.....	66
CONCLUSION	70
REFERENCES	71
VITA	80

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 <u>IMPATIENS BALSAMINA</u> 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 <u>IN VITRO</u> CULTURE OF HIGHER PLANTS.....	25
8 TWO FORMS OF <u>I. BALSAMINA</u> CALLUS CULTURES	42
9 TWO TYPES OF <u>I. BALSAMINA</u> CULTURES MAINTAINED IN B5 LIQUID MEDIA.....	44
10 TLC PATTERNS OF CRUDE EXTRACTS OBTAINED FROM VARIOUS IN VITRO CULTURES AND VARIOUS PLANT PARTS OF <u>I. BALSAMINA</u>	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 <u>I. BALSAMINA</u>	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 <u>I. BALSAMINA</u>	63
25	TIME-CORUSE OF GROWTH AND LAWSONE PRODUCTION BY <u>I. BALSAMINA</u> ROOT CULTURES.....	64

LIST OF TABLES

Table	Page
1 CHEMICAL CONSTITUENTS OF VARIOUS PARTS OF <u>I. BALSAMINA</u>	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 <u>I. BALSAMINA</u> 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
<i>ca</i>	=	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
<i>m/z</i>	=	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	=	Pyrophosphate
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
μ l	=	Microliter
μ m	=	Micrometer
%CV	=	Coefficient variation