

การเสาะหาสารเคมีเพื่อการเกษตรจากพืชบางชนิดในวงศ์ Euphorbiaceae.



นางสาวกรรช ชันจิรกุล

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดำเนินการตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-506-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๕๑๑๑๖๓๕๐

**SEARCHING FOR AGROCHEMICAL SUBSTANCE FROM SOME WEEDS
IN THE FAMILY EUPHORBIACEAE**



MISS KORAKOT CHANJIRAKUL

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

Program of Biotechnology

Graduate School

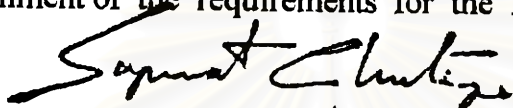
Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-332-506-9


Thesis Title Searching for Agrochemical Substance from Some Weeds
 in the Family Euphorbiaceae.
By Miss Korakot Chanjirakul
Department Biotechnology
Thesis Advisor Associate Professor Udom Kokpol, Ph.D.

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

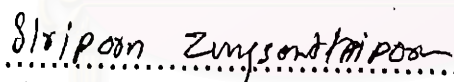



..... Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutuvonges, M.D.)

Thesis Committee:


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


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Udom Kokpol, Ph.D.)


..... Member
(Siriporn Zungsonthiporn, Ph.D.)


..... Member
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

กรกษ ชั้นจิรฤต : การเสาะหาสารเคมีเพื่อการเกษตรจากวัชพืชบางชนิดในวงศ์
 Euphorbiaceae (SEARCHING FOR AGROCHEMICAL SUBSTANCE
 FROM SOME WEEDS IN THE FAMILY EUPHORBIACEAE) อ. ที่ปรึกษา :
 รศ.ดร. อุดม ก๊กผล ; 75 หน้า, ISBN 974-332-506-9.

การเสาะหาสารเคมี เพื่อประโยชน์ทางการเกษตร จากวัชพืชบางชนิดในวงศ์
 Euphorbiaceae 3 ชนิดคือ น้านมราชสีห์, น้านมราชสีห์เล็ก และ หญ้ายาง โดยนำเอาสิ่งสกัดที่
 ได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชทั้ง 3 ชนิดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 แบบ คือ ฤทธิ์การยับยั้งการ
 เจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ กข 23 และการทดสอบความเป็นพิษต่อไรสีน้ำตาล พบว่าสิ่งสกัดที่ได้
 จากส่วนของลำต้นของหญ้ายางที่สกัดด้วยไดคลอโรมีเทน ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ
 ข้าวพันธุ์ กข 23 ได้ดีที่สุด โดยที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมของสิ่งสกัดต่อสารละลาย 3 มิลลิลิตร
 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของส่วนของกาบใบ และความยาวของรากได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์
 จึงทำการสกัดแยกออกเป็นส่วนย่อย ๆ และนำส่วนย่อย ๆ นี้ไปติดตามฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้ง
 การเจริญเติบโตของต้นข้าวอีกครั้ง พบว่าส่วนย่อยที่ III C ให้ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของ
 ข้าวพันธุ์ กข 23 มากที่สุด คือ ที่ 10,000 ส่วนในล้านส่วน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของกาบ
 ใบได้ 63.32 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากได้ 59.98 เปอร์เซ็นต์ และให้
 ผลเป็นพิษกับไรสีน้ำตาลสูง(LC₅₀ 9.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่เมื่อทำการแยกออกได้เป็น
 สารบริสุทธิ์พบว่ามีสารประกอบ 2 ชนิด คือ สารประกอบ 1 และ สารประกอบ 2 จากผลทาง
 สเปกโทรสโกปีสามารถพิสูจน์ได้ว่า สารประกอบ 1 เป็นสารลูทีโอลอะซีเตท และ สารประกอบ
 2 เป็นสารประเภทไตร-เทอร์ปีนอยด์ จากการติดตามฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของ
 ข้าวสามารถสรุปได้ว่าสารประกอบ 2 เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าว (55.54
 เปอร์เซ็นต์ในรากและ 39.64 เปอร์เซ็นต์ในกาบใบ ที่ความเข้มข้น 10,000 ส่วนในล้านส่วน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา
 สาขาวิชา
 ปีการศึกษา
 ลายมือชื่อนิสิต
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C827077 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD:

Euphorbia heterophylla / EUPHORBIACEAE / PLANT GROWTH INHIBITION

KORAKOT CHANJIRAKUL : SEARCHING FOR AGROCHEMICAL SUBSTANCE FROM SOME WEEDS IN THE FAMILY EUPHORBIACEAE : ASSOC.PROF.

UDOM KOKPOL, Ph.D. 75 pp. ISBN 974-332-506-9

Searching for agrochemical from 3 species of weeds in the family Euphorbiaceae, namely *Euphorbiace hirta*, *Euphorbia thymifolia* and *Euphorbia heterophylla*. The crude extracts of their parts were tested 2 activities, rice growth inhibition of rice (*Oryza sativa* cv. RD 23) and Brine shrimp cytotoxicity lethality. The results showed that the dichloromethane crude extract of the stem part of *Euphorbia heterophylla* inhibited 100 % of rice growth (*Oryza sativa* cv. RD 23) both leave sheath and root length at 0.5 g of the crude extract per solution 3 ml. The active fraction was fractionated by column chromatography using rice growth inhibition as guide for further fractionation, found that the fraction III C was the best fraction, which inhibited 63.32% (leave sheath), 59.98%(root length) of rice growth (*Oryza sativa* cv. RD 23) at 10,000 ppm and gave high activity with brine shrimp(LC₅₀ 9.09 µg/ml). The purification of this fraction gained two compound; Compound 1 and Compound 2. By mean of the spectroscopic identification, Compound 1 proved to be lupeol acetate and Compound 2 was a triterpenoid. From rice growth inhibition activity concluded that Compound 2 was an active compound. It was inhibited 39.64 % (leaf sheath) and 55.54 % (root length) at 10,000 ppm.

ภาควิชา.....
 สาขาวิชา..... *เทคโนโลยีการชีวภาพ*
 ปีการศึกษา..... *2541*

ลายมือชื่อนิสิต..... *กมล คุ้มรอด*
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *กมล คุ้มรอด*
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to especially be grateful to Associate Professor Dr. Udom Kokpol, her advisor for his advice and generous contribution of comments and suggestion. She would like to thank the members of her thesis committee Assistant Professor Dr. Sirirat Rengpipat, Dr. Siriporn Zungsonthiporn and Assistant Professor Dr. Warinthorn Chavasiri for valuable discussion and advice. She would like to thank Dr. Siriporn Zungsonthiporn and Mrs. Cha-um Premasthira, Weed Science Subdivision, Botany and Weed Science Division, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand, for their valuable assistance with technical bioassay and statistical analysis. She wishes to thank Assistant Professor Dr. Warinthorn Chavasiri and Dr. Santi Tip-pyang for their advice about chemical technique. This research was partially supported by Natural Products Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University and Graduate School.

Finally the author would like to express her deepest appreciation gratefulness to her parents for their warmest love, understanding and cheerfulness throughout her graduate study.

CONTENTS

| | Page |
|--|-----------|
| Abstract in Thai..... | iv |
| Abstract in English..... | v |
| Acknowledgement..... | vi |
| List of Figures..... | ix |
| List of Schemes..... | xi |
| List of Tables..... | xii |
| List of Abbreviation..... | xiii |
| CHAPTER | |
| I : INTRODUCTION..... | 1 |
| 1.1 Allelopathy..... | 1 |
| 1.2 Literature search on the allelopathy of weeds..... | 3 |
| 1.3 Biological characteristic, distribution and chemical constituent of some weeds in the family Euphorbiaceae..... | 5 |
| 1.4 Chemical constituents studies on <i>Euphorbia heterophylla</i> L..... | 12 |
| 1.5 Goal of this research..... | 18 |
| II : MATERIAL AND METHODS..... | 19 |
| 2.1 Plant materials..... | 19 |
| 2.2 General procedures..... | 19 |
| 2.3 Chemicals..... | 20 |
| 2.4 Chemical test..... | 20 |
| 2.5 Generation extraction for preliminary study..... | 20 |
| 2.6 Biological test..... | 22 |
| 2.6.1 Inhibition of rice growth bioassay experiments | 22 |

| | Page |
|---|-----------|
| 2.6.2 Brine shrimp cytotoxicity lethality test..... | 23 |
| 2.6.3 The inhibitory effect for carcinoma cell lines..... | 24 |
| 2.7 Extraction..... | 25 |
| III : RESULTS AND DISCUSSION..... | 27 |
| 3.1 The results of extraction..... | 27 |
| 3.2 The results of biological activity screening tests with carcinoma cell lines..... | 29 |
| 3.2.1 Ethanolic crude extract..... | 29 |
| 3.2.2 Various crude extract on Human Hepatocellular c arcinoma | 32 |
| 3.3 The results of preliminary rice growth inhibition bioassay..... | 38 |
| 3.4 Extraction and initial fractionation of the stem of <i>E. heterophylla</i> Linn..... | 42 |
| 3.5 Plant growth inhibition activity test..... | 44 |
| 3.6 Separation..... | 47 |
| 3.6.1 Separation of fraction III..... | 47 |
| 3.6.2 Rice growth inhibition activity of fraction III | 49 |
| 3.6.3 Brine shrimp bioassay experiments of fraction III..... | 53 |
| 3.6.4 Separation of fraction III C..... | 54 |
| 3.7 Structure elucidation of Compound 1..... | 59 |
| 3.8 Structure elucidation of Compound 2..... | 65 |
| IV : CONCLUSION..... | 69 |
| REFERENCES..... | 71 |
| VITA..... | 75 |

List of Figures

| Figures | Page |
|--|------|
| 1.1 <i>Euphorbia hirta</i> L..... | 6 |
| 1.2 <i>Euphorbia thymifolia</i> L..... | 8 |
| 1.3 <i>Euphorbia heterophylla</i> L..... | 9 |
| 1.4 Some flavonoids isolated from <i>E. heterophylla</i> | 14 |
| 1.5 Some steroids isolated from <i>E. heterophylla</i> | 16 |
| 1.6 Some terpenoids isolated from <i>E. heterophylla</i> | 17 |
| 3.1 Inhibitory effect of ethanolic crude extract on rice root growth (at 1.0 g/3ml)..... | 40 |
| 3.2 Inhibitory effect of ethanolic crude extract on rice leaf sheath growth (at 1.0g/3 ml)..... | 41 |
| 3.3 Inhibitory effect of solvent extract of <i>E. heterophylla</i> on root growth of rice (at 0.5g/3 ml)..... | 45 |
| 3.4 Inhibitory effect of solvent extract of <i>E. heterophylla</i> on leaf sheath growth of rice (at 0.5g/3 ml)..... | 46 |
| 3.5 Inhibitory effect of various fraction of dichloromethane extract on root growth of rice (at 10,000 ppm)..... | 51 |
| 3.6 Inhibitory effect of various fraction of dichloromethane extract on leaf sheath growth of rice (at 10,000 ppm)..... | 52 |
| 3.7 TLC spots of fraction III C | 55 |
| 3.8 Inhibitory effect of Compound 1 on root length and leaf sheath of rice..... | 56 |
| 3.9 Inhibitory effect of Compound 2 on root length and leaf sheath of rice..... | 57 |

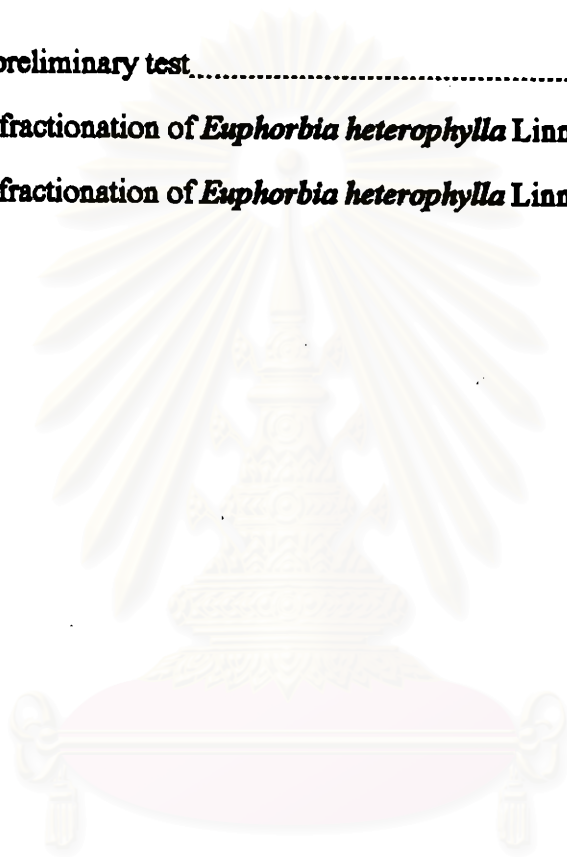
| Figures | Page |
|--|------|
| 3.10 IR spectrum of Compound 1..... | 60 |
| 3.11 The ^1H NMR spectrum of Compound 1..... | 61 |
| 3.12 The ^{13}C NMR spectrum of Compound 1..... | 62 |
| 3.13 IR spectrum of Compound 2..... | 66 |
| 3.14 The ^1H NMR spectrum of Compound 2..... | 67 |
| 3.15 The ^{13}C NMR spectrum of Compound 2..... | 68 |



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Scheme

| Schemes | Page |
|---|-------------|
| 2.1 Extraction for preliminary test..... | 21 |
| 2.2 Extraction and fractionation of <i>Euphorbia heterophylla</i> Linn,..... | 26 |
| 3.1 Extraction and fractionation of <i>Euphorbia heterophylla</i> Linn,..... | 43 |



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of Table

| Tables | Page |
|---|------|
| 1.1 Substances isolated from Euphorbia plants..... | 11 |
| 1.2 Chemical constituents of <i>Euphorbia heterophylla</i> | 12 |
| 3.1 Yield of crude extract by various solvent of studies species..... | 27 |
| 3.2 Inhibitory effect of ethanolic crude extract of <i>E. hirta</i> on carcinoma cell line..... | 30 |
| 3.3 Inhibitory effect of ethanolic crude extract of <i>E. heterophylla</i> on carcinoma cell line..... | 31 |
| 3.4 Percent inhibition of Human Hepatocellular carcinoma..... | 32 |
| 3.5 Percentage inhibition of Human Nasopharyngeal carcinoma..... | 33 |
| 3.6 Percentage inhibition of Human Gastric carcinoma..... | 34 |
| 3.7 Percentage inhibition of Human leukemia carcinoma..... | 35 |
| 3.8 Percentage inhibition of Human colon carcinoma..... | 36 |
| 3.9 Percentage inhibition of Human Erythroleukemia carcinoma..... | 37 |
| 3.10 Preliminary test of the crude extract at 0.1, 0.5 and 1.0 g per solvent 3 ml on root and leaf sheath of rice (<i>Oryza sativa</i> cv RD 23)..... | 39 |
| 3.11 The growth inhibition activity on rice (<i>Oryza sativa</i> cv RD 23)..... | 44 |
| 3.12 The results of separation of fraction III..... | 48 |
| 3.13 Effect of various fraction III (III A - III J)..... | 50 |
| 3.14 The results of brine shrimp bioassay experiment of fraction III | 53 |
| 3.15 Effect of Compound 1 and Compound 2 on growth of rice..... | 55 |
| 3.16 Brine shrimp bioassay experiment of Compound 1 and Compound 2 ... | 58 |
| 3.17 The ¹³ C NMR chemical shift assignments of lupeol acetate and Compound 1..... | 63 |

List of Abbreviations

| | |
|---------------------|--------------------------------------|
| $^{\circ}\text{C}$ | degree celsius |
| cont. | continue |
| ^{13}C NMR | carbon 13 nuclear magnetic resonance |
| cm^{-1} | unit of wavelength |
| Fig. | Figure |
| g | gram(s) |
| ^1H NMR | proton nuclear magnetic resonance |
| h | hour |
| ml | milliliter (s) |
| mg | milligram (s) |
| ppm | part per million |
| δ | chemical shift |
| μg | microgram |