

**Thesis Title** Chemical Constituents and Biological Activities of Some Euphorbiaceae

**Author** Miss Duangsuree Sanseera

**Degree** Doctor of Philosophy (Pharmacy)

**Thesis Advisory Committee**

Assoc. Prof. Dr. Wirat Niwatananun	Advisor
Assoc. Prof. Dr.Boonsom Liawruangrath	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr.Saisunee Liawruangrath	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Apiwat Baramee	Co-advisor
Prof. Stephen G. Pyne	Co-advisor

**ABSTRACT**

In this research work, the chemical constituents and biological activities of three members of the Euphorbiaceae family, *Acalypha indica* Linn., *Bridelia retusa* (L.) A. Juss. and *Cleidion javanicum* BL., were studied. The aerial parts of *A. indica*, the leaves, stems and fruits of *B. retusa* and *C. javanicum* were dried, ground and macerated with hexane, chloroform and methanol, sequentially. The essential oil from the fresh aerial parts of *A. indica*, the fresh leaves, and fresh fruits of *B. retusa* and *C. javanicum* were isolated by hydrodistillation and analysed by using a combination of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The major components of *A. indica* were phytol (47.49%), 9-tricosene (7.05%), pentacosane (3.96%), nonacosane (1.61%) and heptacosane (1.23%). The major constituents of *C. javanicum* leaves were ethyl linoleolate (32.12%), hexadecanoic acid (26.77%), *trans*-phytol (24.64%) and *iso*-phytol (4.80%). The major constituents of *C. javanicum* fruits were hexadecanoic acid (34.42%), linoleic acid (21.68%), 9,12,15-octadecatrien-1-ol

(21.00%), phthalic acid (4.64%) and phytol (1.19%). The major constituents of *B. retusa* leaves were phytol (33.4%), phthalic acid (5.2%), 6,13-dimethoxy-2,3,9,10-tetramethylpentacene-1,4,8,11-tetrone (3.4%), heptacosane (2.3%) and nonacosane (1.2%). The major constituents of *B. retusa* fruits were dibutyl sebacate (25.6%), phytol isomer (4.8%), diacetin (4.3%), tricosane (3.9%), isophytol (2.7%), phthalic acid (1.9%), hexadecanoic acid (1.5%), and eicosane (1.2%). Most of them were terpenes. The antibacterial, antifungal, antioxidant, anticancer and cytotoxicity activities of the crude extracts and essential oils were investigated. The leaves methanolic extract of *C. javanicum*, the fruits chloroform extract of *B. retusa* and the essential oils of all three medicinal plants exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Only the crude extract of *A. indica* showed antifungal activity against *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* and *Trichophyton mentagrophyte*.

The MIC values of the selected active essential oils were investigated using disc diffusion method. The most active essential oil was from *C. javanicum* fruits and showed MIC values of 10 mg/mL against all of three bacteria: *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. The antioxidant activity of the crude extracts and the essential oil of each plant were determined by ABTS and DPPH methods. The essential oil of *C. javanicum* fruits exhibited the highest antioxidant activity (ABTS) with an  $IC_{50}$  of 0.71 mg mL<sup>-1</sup>. Only the methanol extract of *B. retusa* fruits exhibited the highest antioxidant activity (ABTS) with an  $IC_{50}$  of 0.29 mg mL<sup>-1</sup>. The essential oil of *C. javanicum* leaves exhibited the highest antioxidant activity (DPPH) with an  $IC_{50}$  of 27.05 mg mL<sup>-1</sup>. The methanolic extract of *B. retusa* stems exhibited the highest antioxidant activity (DPPH) with an  $IC_{50}$  of 0.12 mg mL<sup>-1</sup>. The total phenolic and the total flavonoid contents of crude extracts of *A. indica*, *C. javanicum* and *B. retusa* in various solvents: hexane, chloroform and methanol were investigated. The total phenolic contents of the test samples were expressed as % gallic acid (w/w) of dry plant material by comparison with the gallic acid standard curve. The methanol extract of *C. javanicum* stems exhibited the highest total phenol contents of the extracts was 3.32 % gallic acid (w/w) of dry plant material. The total flavonoid contents of the crude extracts of *A. indica*, *C. javanicum* and *B. retusa* in various solvents: hexane, chloroform and methanol were also investigated. Total flavonoid

contents of the test samples were expressed as % quercetin (w/w) of dry plant material by comparison with the quercetin standard curve. The chloroform extract of *A. indica* aerial parts exhibited the highest total phenol contents of the extracts was 22.44 % quercetin (w/w) of dry plant material. The anticancer activity of the selected active extracts and the selected active essential oils of *A. indica*, *C. javanicum* and *B. retusa* were performed using the resazurin microplate assay (REMA).

The essential oil of *A. indica* (aerial parts) and *C. javanicum* (leaves) exhibited cytotoxic activity against KB, MCF7 and NCI-H187 cancer cell lines. The essential oil of *A. indica* showed more significant cytotoxic activity than those of the *C. javanicum* (leaves). The methanol leaf extract of *B. retusa* showed significant cytotoxic activity against all three human cancer cell lines. The hexane stem extract of *C. javanicum* and the methanol fruit extract of *B. retusa* possessed cytotoxic activity against KB and NCI-H187 cancer cell lines, but the methanol fruit extract of *B. retusa* showed more significant cytotoxic activity than those of hexane stem extract of *C. javanicum*. The methanol aerial parts extract of *A. indica* only showed significant cytotoxic activity against the NCI-H187 cancer cell line. All the extracts and the essential oils of three medicinal plants were non-cytotoxic to vero cells.

Fractionation of the active fraction of *A. indica* (aerial parts), afforded L-quebrachitol, a white crystalline powder. A reversed phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method was also developed for determination of this compound. The proposed RP-HPLC method was also validated. Fractionation of the active fraction of *C. javanicum* (fruits), yielded stigmaterol, a crystalline white powder. Fractionation of the active fraction of *B. retusa* (fruits) resulted in an amorphous crystalline white powder of benzoic acid. The structure of all isolated compounds were also elucidated by spectroscopic methods and GC-MS.

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรวงศ์ยูฟอร์บิซอ  
บางตัว

**ผู้เขียน** นางสาวดวงสุรีย์ แสนสีระ

**ปริญญา** วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

รองศาสตราจารย์ ดร.วิรัตน์ นวัตกรรมนนท์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เหลี้ยวเรืองรัตน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รองศาสตราจารย์ ดร.สายสุนีย์ เหลี้ยวเรืองรัตน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิวัฒน์ บารมี	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศาสตราจารย์ สตีเฟน จี. ไพน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรวงศ์ยูฟอร์บิซอบางตัว ได้แก่ ตำแยแมว เต็งหนาม และดีหมี นำส่วนเหนือดินของต้นตำแยแมว ส่วนใบ กิ่ง และผลของต้นเต็งหนามและต้นดีหมีมาทำแห้ง บด และทำการสกัดด้วยวิธีการหมักโดยใช้ตัวทำละลาย เฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมธานอล ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย โดยนำส่วนเหนือดินสดของต้นตำแยแมว ส่วนใบสด และผลสดของต้นเต็งหนามและต้นดีหมีมาสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี-แมส สเปกโตรเมทรี (GC-MS) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินของตำแยแมวมีองค์ประกอบหลัก คือ phytol (47.49%), 9-tricosene (7.05%), pentacosane (3.96%), nonacosane (1.61%) และ heptacosane (1.23%) องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากใบดีหมีคือ ethyl linoleolate (32.12%), hexadecanoic acid (26.77%), *trans*-phytol (24.64%) และ iso-phytol (4.80%) องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากผลดีหมีคือ hexadecanoic acid (34.42%), linoleic acid

(21.68%), 9,12,15-Octadecatrien-1-ol (21.00%), phthalic acid (4.64%) และ phytol (1.19%) องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากใบเต็งหนามคือ phytol (33.4%), phthalic acid (5.2%), 6,13-dimethoxy-2,3,9,10-tetramethylpentacene-1,4,8,11-tetrone (3.4%), heptacosane (2.3%) and nonacosane (1.2%) องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากผลเต็งหนามคือ dibutyl sebacate (25.6%), phytol isomer (4.8%), diacetin (4.3%), tricosane (3.9%), isophytol (2.7%), phthalic acid (1.9%), hexadecanoic acid (1.5%), and eicosane (1.2%) องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเทอร์ปีน ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย พบว่า สารสกัดเมธานอลจากใบดีหมี สารสกัดคลอโรฟอร์มจากผลเต็งหนาม และน้ำมันหอมระเหยของพืชทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งสามชนิดคือ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่า มีเพียงสารสกัดจากตำแยแมวมีฤทธิ์ต้านเชื้อราทั้งสามชนิดคือ *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* และ *Trichophyton mentagophyte* ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยวิธี disc diffusion พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากผลดีหมีมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุคมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) ทั้งสามชนิดคือ *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยของพืชแต่ละชนิดโดยวิธี ABTS และ DPPH พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากผลดีหมีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS มากที่สุดโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.71 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบ พบว่า มีเพียงสารสกัดเมธานอลจากผลเต็งหนามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS มากที่สุดโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบดีหมีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH มากที่สุดโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 27.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดหยาบพบว่า เมธานอลจากกิ่งเต็งหนามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH มากที่สุดโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษาปริมาณสารฟีนอลรวมและปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมธานอลจากตำแยแมว ดีหมี และเต็งหนาม โดยปริมาณสารฟีนอลรวมแสดงผลการทดสอบเป็น % gallic acid โดยน้ำหนักแห้ง พบว่า สารสกัดเมธานอลจากกิ่งดีหมีมีปริมาณฟีนอลรวมสูงสุดคือ 3.32 % gallic acid โดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมแสดงผลการทดสอบเป็น % quercetin โดยน้ำหนักแห้ง พบว่า สารสกัดคลอโรฟอร์มจากส่วนเหนือดินของตำแยแมวมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดคือ 22.44 % quercetin โดยน้ำหนักแห้ง ศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยของตำแยแมว ดีหมี และเต็งหนามโดยวิธี REMA พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากส่วนเหนือดินต้นตำแยแมว และน้ำมันหอมระเหยจากใบดีหมี มีฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งสามชนิดคือ

มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) มะเร็งทรวงอก (MCF7-Breast cancer) และมะเร็งปอด (NCI-H187-Small cell lung cancer) โดยน้ำมันหอมระเหยของคำแยแมวมี่ฤทธิ์ต้านมะเร็งดีกว่า น้ำมันหอมระเหยของใบคิหิมี ส่วนฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัด พบว่า สารสกัดเมธานอลจากใบเต็งหนามมีฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งสามชนิด สารสกัดเฮกเซนจากกิ่งคิหิมีและสารสกัดเมทานอลจากผลเต็งหนามมีฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปาก และมะเร็งปอด ซึ่งสารสกัดเมธานอลจากผลเต็งหนามมีฤทธิ์ต้านมะเร็งดีกว่าสารสกัดเฮกเซนจากกิ่งคิหิมี พบว่า สารสกัดเมทานอลของส่วนเหนือดินคำแยแมวมี่ฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรทั้งสามชนิด พบว่า สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรทั้งสามชนิด ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ (Vero cell) ศึกษาการแยกสารจากสารสกัดออกฤทธิ์ของส่วนเหนือดินคำแยแมว พบผลิตภัณฑ์ของ L-quebrachitol และศึกษาวิธีการหาปริมาณ L-quebrachitol โดยวิธี RP-HPLC พบว่า วิธี RP-HPLC สามารถพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบของสารชนิดนี้ในการวิเคราะห์ปริมาณ L-quebrachitol ในคำแยแมว ศึกษาการแยกสารจากสารสกัดออกฤทธิ์ของผลคิหิมี พบผลิตภัณฑ์ของ stigmasterol ศึกษาการแยกสารจากสารสกัดออกฤทธิ์ของผลเต็งหนาม พบผลิตภัณฑ์ของ benzoic acid การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารทุกตัว ทำโดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี และ GC-MS