

**Thesis Title** Chemical Constituents and Biological Activities of *Solanum spirale* Roxb.

**Author** Miss Sukanya Keawsa-ard

**Degree** Doctor of Philosophy (Pharmacy)

**Thesis Advisory Committee**

Assoc. Prof. Dr. Surapol Natakankitkul	Advisor
Assoc. Prof. Dr.Boonsom Liawruangrath	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr.Saisunee Liawruangrath	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Aphiwat Teerawutgulrag	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Sombat Chowwanapoonpohn	Co-advisor
Prof. Stephen G. Pyne	Co-advisor

**ABSTRACT**

The chemical constituents and biological activities of *Solanum spirale* Roxb. were studied. The leaf, stem, unripe fruit and ripe fruit powders of *S. spirale* were dried, ground and extracted with hexane, chloroform and methano, respectively. The fresh flowers of this plant were extracted with ethanol. The essential oils of the leaves and unripe fruits of *S. spirale* were isolated by hydrodistillation and analyzed for the first time using GC and GC-MS. The major components of the leaf essential oil were (*E*)-phytol (48.10%), *n*-hexadecanoic acid (7.34%),  $\beta$ -selinene (3.67%),  $\alpha$ -selinene (2.74%), octadecanoic acid (2.12%) and hexahydrofarnesyl acetone (2.00%). The major components of the unripe fruit essential oil were *n*-hexadecanoic acid (56.15%), linolelic acid (9.73%), octadecanoic acid (4.42%), methyl hexadecanoate (1.69%), tetradecanoic acid (1.55%) and (*E*) phytol (1.18%).

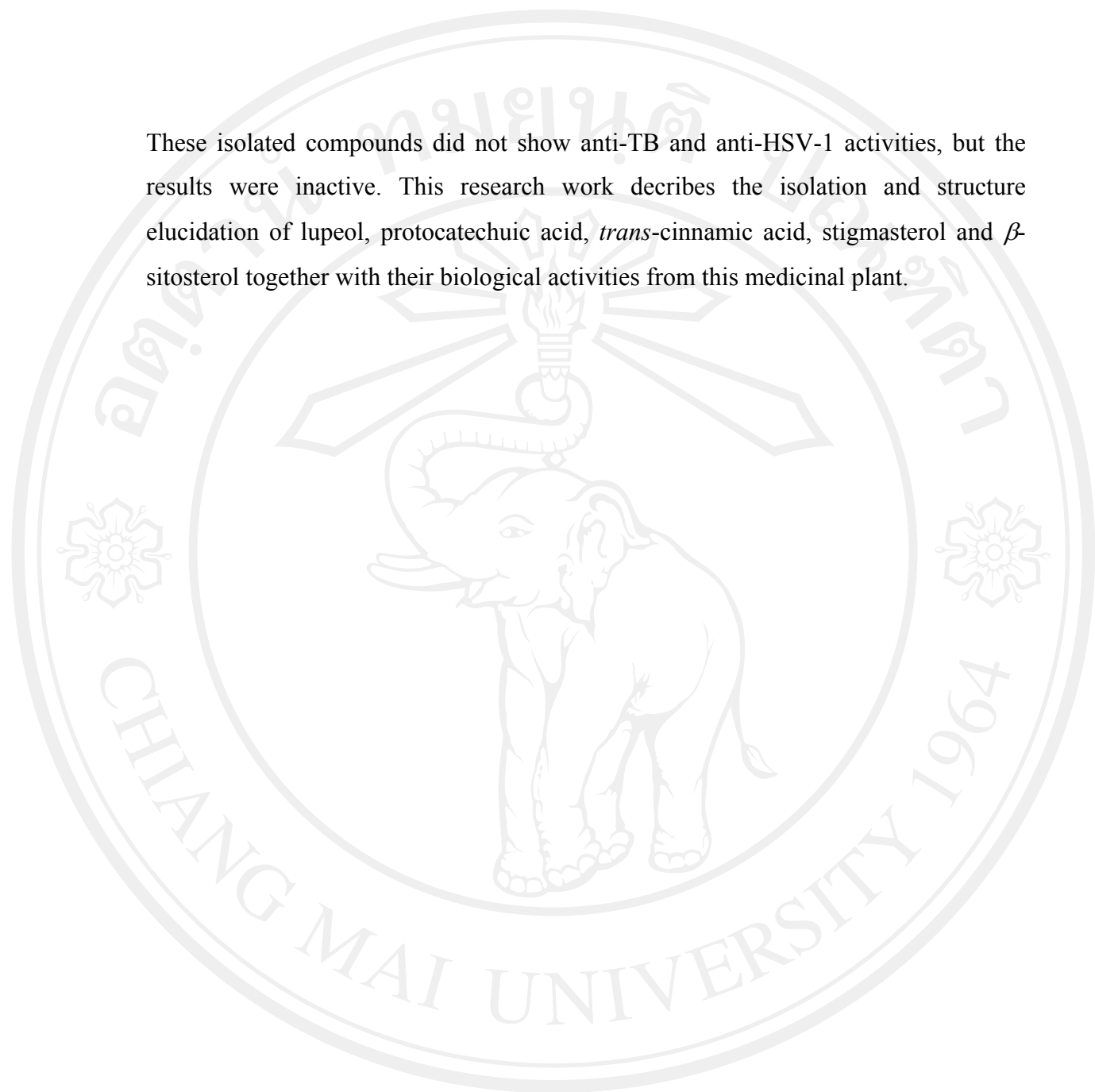
The antioxidant, antibacterial, antifungal, cytotoxic, antituberculosis and anti-herpes simplex virus type-1 activities of the crude extracts and the essential oils were investigated. The antioxidant activities of the crude extracts and the essential oils of *S. spirale* were determined by DPPH, ABTS and FRAP methods. Most crude extracts and the essential oils showed antioxidant activity except the hexane and the chloroform extracts of the unripe fruits and the hexane extract of the ripe fruits. The ethanol extract of the flowers possessed the highest antioxidant activity by DPPH and ABTS methods with the IC<sub>50</sub> values of  $0.95 \pm 0.01$  and  $0.062 \pm 0.000$  mg/mL, respectively. The leaf essential oil exhibited a weakly antioxidant activity with an IC<sub>50</sub> of 41.89 mg/mL. The total phenolic contents of the extracts were determined using the Folin Ciocalteu reagent. The ethanol extract of the flowers contained the maximum amount of total phenols (114.00 mg GAE, g extract). The methanol extracts of each part of this plant, the chloroform extracts of the leaves, the ethanol extract of the flowers, the leaf essential oil and the unripe fruits essential oil exhibited antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The MIC of the extracts and the essential oils from *S. spirale* were evaluated against *E. coli* and *S. aureus* using the microtiter broth method. The leaf essential oil showed the highest antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* with the MIC values of 43 and 21.5  $\mu$ g/mL, respectively. The antifungal activities of the extracts and the essential oils of *S. spirale* were determined using the agar diffusion against *Candida albican*, *Aspergillus flavus* and *Trichophyton mentagrophyte*. The methanol extract of the ripe fruits showed the highest antifungal activity against *C. albican* and the chloroform extract of the stems showed the highest antifungal activity against *T. mentagrophyte* with the inhibition zones of  $24.8 \pm 0.3$  and  $39.0 \pm 0.6$  mm, respectively. All the crude extracts and the essential oils showed no antifungal activity against *A. flavus* except the ethanol extract of the flowers.

The cytotoxic activities of the extracts and the essential oils of *S. spirale* were performed using the Resazurin Microplate Assay (REMA). The chloroform extract of the leaves and the ethanol extract of the flowers showed significant cytotoxic activities against KB, MCF7 and NCI-H187 cancer cell lines with the IC<sub>50</sub> values of

42.73, 17.90, 36.74, 45.97, 27.91 and 36.74  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The methanol extract of the leaves showed cytotoxicity against KB and NCI-H187 cancer cell lines with the  $\text{IC}_{50}$  values of 27.87 and 26.89  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The chloroform extracts of the stems and the unripe fruits showed only cytotoxicity against NCI-H187 cancer cell lines with the  $\text{IC}_{50}$  values of 34.02 and 29.23  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The leaf essential oil showed significant cytotoxicity against KB, MCF7 and NCI-H187 cancer cell lines with the  $\text{IC}_{50}$  values of 26.42, 19.69, and 24.02  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The unripe fruit essential oil showed cytotoxicity against MCF-7 and NCI-H187 cancer cell lines with the  $\text{IC}_{50}$  values of 23.17 and 49.07  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. All the crude extracts and the essential oils were non-cytotoxic to *Vero* cells. The antituberculosis activity of the extracts and the essential oils of *S. spirale* was determined by Green Fluorescent Protein Microplate Assay (GFPMA). The methanol extracts of the stems, unripe fruits, leaves and the essential oil of unripe fruit exhibited anti-TB activity against *Mycobacterium tuberculosis H37Ra* with MIC value of 50  $\mu\text{g/mL}$ . The anti-HSV-1 of the extracts and the essential oils were determined by Green Fluorescent Protein (GFP) detection. The chloroform extracts of the stems and the leaves showed moderately anti HSV-1 activity, while the methanol extract of the stems and the chloroform extract of the ripe fruits showed weakly activity.

Chemical investigation of the chloroform and the methanol extracts of the leaves resulted in the isolation of five compounds. Lupeol, protocatechuic acid and *trans*-cinnamic acid were isolated from the active chloroform extract. Stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol and *trans*-cinnamic acid were isolated from the active methanol extract. The pure compounds were tested for their antibacterial and cytotoxic activities. The isolated compounds inhibited the growth of *E. coli* and *S. aureus*. Lupeol, protocatechuic acid and *trans*-cinnamic acid exhibited equal antibacterial activity against *E. coli* with the MIC value of 250  $\mu\text{g/mL}$ . *trans*-Cinnamic acid and  $\beta$ -sitosterol showed better activity against *S. aureus* with the MIC value of 250  $\mu\text{g/mL}$ . Only lupeol exhibited cytotoxic activities against KB and NCI-H187 human cancer cell lines with the  $\text{IC}_{50}$  values of 26.73 and 13.53  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, while the other compounds were inactive. All isolated compounds were non-cytotoxic to *Vero* cells.

These isolated compounds did not show anti-TB and anti-HSV-1 activities, but the results were inactive. This research work describes the isolation and structure elucidation of lupeol, protocatechuic acid, *trans*-cinnamic acid, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol together with their biological activities from this medicinal plant.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์      องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผักคัตต่อน

ผู้เขียน      นางสาวสุกัญญา เกียวสะอาด

ปริญญา      วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรพล นธการกิจกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เหลียวเรืองรัตน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รองศาสตราจารย์ ดร.สายสุนีย์ เหลียวเรืองรัตน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิวัฒน์ ชีรวุฒิกุลรักษ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมบัติ เขาวนพูนผล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ศาสตราจารย์ สตีเฟน จี. ไพน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของผักคัตต่อน โดยนำส่วนใบ กิ่ง ผลดิบ และผลสุก มาทำให้แห้ง บดให้ละเอียด แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน คลอโรฟอร์ม และเมธานอล ส่วนดอกนำมาสกัดด้วยเอธานอล เมื่อนำใบและผลดิบมาสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำและวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS) สารที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากใบผักคัตต่อน ได้แก่ (*E*)-Phytol (48.10%), *n*-hexadecanoic acid (7.34%),  $\beta$ -selinene (3.67%),  $\alpha$ -selinene (2.74%), octadecanoic acid (2.12%) และ hexahydrofarnesyl acetone (2.00%) น้ำมันหอมระเหยจากผลดิบ พบสารที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ *n*-hexadecanoic acid (56.15%), linoleic acid (9.73%), octadecanoic acid (4.42%), methyl hexadecanoate (1.69%), tetradecanoic acid (1.55%) และ (*E*) phytol (1.18) เมื่อนำสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค และฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส

เริ่มชนิด HSV-1 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี DPPH ABTS และ FRAP พบว่า สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยกเว้น สารสกัดเฮกเซนและสารสกัดคลอโรฟอร์มจากผลดิบและสารสกัดเฮกเซนจากผลสุก ส่วนสารสกัดเอทานอลของดอกผักคืดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยวิธี DPPH และ ABTS มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $0.95 \pm 0.01$  และ  $0.062 \pm 0.000$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากใบผักคืดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 41.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดต่างๆ พบว่า สารสกัดเอทานอลของดอกผักคืดมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ  $114.00 \pm 4.44$  มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง สารสกัดเมธานอลของกิ่งผลดิบ ผลสุกและใบผักคืด สารสกัดคลอโรฟอร์มของใบ สารสกัดเอทานอลของดอก น้ำมันหอมระเหยของใบและผลดิบ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต่อเชื้อ *E.coli*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ทำโดยวิธี microtiter broth พบว่าน้ำมันหอมระเหยของใบผักคืดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 43 and 21.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยต่างๆ ด้วยวิธี agar diffusion ต่อเชื้อ *C. albican*, *A. flavus* and *T. mentagrophyte* พบว่า สารสกัดเมธานอลของผลสุกมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. albican* สูงสุด และสารสกัดคลอโรฟอร์มของกิ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *T. mentagrophyte* มีบริเวณยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) เท่ากับ  $24.8 \pm 0.3$  และ  $39.0 \pm 0.6$  มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยต่างๆ ไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อ *A. flavus* ยกเว้นสารสกัดเอทานอลจากดอกผักคืด

การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยของผักคืด โดยวิธี REMA พบว่า สารสกัดคลอโรฟอร์มของใบและสารสกัดเอทานอลของดอก มีฤทธิ์ต้านเชื้อมะเร็งทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ มะเร็งช่องปาก (KB-Oral cavity cancer) มะเร็งเต้านม (MCF7-Breast cancer) และมะเร็งปอด (NCI-H187-Small cell lung cancer) มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 42.73, 17.90, 36.74, 45.97, 27.91 และ 36.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดเมธานอลจากใบมีฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากและมะเร็งปอด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 27.87 และ 26.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดคลอโรฟอร์มของกิ่งและผลดิบมีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 34.02 และ 29.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยของใบมีฤทธิ์ต้านเชื้อมะเร็งช่องปาก มะเร็งเต้านม และมะเร็งปอด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 26.42, 19.69 และ 24.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ น้ำมันผลดิบมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเต้านมและมะเร็งปอด มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 23.17 และ 49.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยของผักคัตไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติ การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยของผักคัตต่อเชื้อ *M. tuberculosis H37Ra* ด้วยวิธี GFPMA พบว่าสารสกัดเมฆานอลของกิ่ง ผลดิบ และใบ และน้ำมันหอมระเหยของผลดิบมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และมีค่า MIC เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนฤทธิ์การต้านเชื้อไวรัสเริมชนิด HSV-1 ด้วยวิธี GFP พบว่า สารสกัดคลอโรฟอร์มจากกิ่งและใบมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริมชนิด HSV-1 ในระดับปานกลาง และสารสกัดเมฆานอลจากกิ่งและสารสกัดคลอโรฟอร์มจากผลสุกมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัสเริมชนิด HSV-1 ในระดับต่ำ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดคลอโรฟอร์มและสารสกัดเมฆานอลจากใบผักคัต พบสารบริสุทธิ์ทั้งหมด 5 ชนิด สารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดคลอโรฟอร์ม ได้แก่ lupeol, protocatechuic acid และ *trans*-cinnamic acid ส่วนสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสารสกัดเมฆานอล ได้แก่ stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol และ *trans*-cinnamic acid

นำสารบริสุทธิ์ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ต้านมะเร็ง พบว่า สารบริสุทธิ์ทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต่อเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* โดย lupeol, protocatechuic acid และ *trans*-cinnamic acid มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* เท่ากัน มีค่า MIC เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ *trans*-cinnamic acid และ  $\beta$ -sitosterol มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สูงสุดด้วยค่า MIC เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็ง พบว่ามีเพียง lupeol เท่านั้นที่มีฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปากและมะเร็งปอด ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 26.73 และ 13.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารบริสุทธิ์ทุกชนิดไม่มีฤทธิ์ต้านวัณโรคและฤทธิ์ต้านไวรัสเริม ชนิด HSV-1 งานวิจัยครั้งนี้ได้รายงานการแยกสารบริสุทธิ์ ได้แก่ lupeol, protocatechuic acid, *trans*-cinnamic acid, stigmasterol และ  $\beta$ -sitosterol และฤทธิ์ทางชีวภาพจากผักคัต