Thesis Title Anticancer Potential and Chemical Constituents of Some Thai Medicinal Plants

Author Miss Jiraporn Chuangbunyat

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee

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

ABSTRACT

This research work was focused on bioassay-directed fractionation of four selected medicinal plants which possess anticancer and/or antioxidant activity including fractionation, purification and structure elucidation of the isolated compounds. Four medicinal plants: *Spanlahes acmella* (Linn.) Murr., *Bauhinia acuminata* Linn., *Diospyros decandra* Lour. and *Lepisanthes rubiginosa* (Roxb.) Leenh. were used in this study. The ethanolic extract of *L. rubiginosa* leaves gave the highest antioxidant activity more than those of the other three medicinal plants (ABTS method). Therefore *L. rubiginosa* was selected for further study.

The leaf, flower and fruit essential oils of *L. rubiginosa* were extracted by hydrodistillation. Their chemical constituents were analysed by GC and GC-MS. The major compounds found in the leaf essential oil were phytol (38.6%**)** and phytone (22.5%) which were oxygenated acyclic diterpenes, followed by two sesquiterpenes, nerolidol (1.1%) and farnesol (0.8%). The flower essential oil consisted of nerolidol (34.8%) and farnesol (10.0%). The major compounds present in the fruit essential oil were palmitic acid (66.1%), tetradecanoic acid (10.0%) and linoleic acid (5.5%).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The cytotoxic activities of the chloroform, hexane and methanol extracts of the leaves, and the leaf, flower and fruit essential oils of *L. rubiginosa* were tested against three cancerous human-cell lines: KB, MCF-7 and NCI-H187 cancers using the resazurin microplate assay (REMA). The chloroform extract showed strong cytotoxicity against the NCI-H187 cancer with the IC_{50} value of 14.31 µg/mL. It also possessed moderate cytotoxicity against KB cancer cell line and MCF-7 cancer with the IC_{50} values of 35.59 µg/mL and 40.25 µg/mL, respectively. The leaf essential oil showed cytotoxicity against NCI-H187 cancer cell line with the IC_{50} value of 17.93 µg/mL. It also exhibited moderate anticancer activity against KB cancer (IC_{50}=33.39 µg/mL). The flower essential oil showed moderate cytotoxicity against NCI-H187 cancer cell line with the IC_{50} value of 43.90 µg/mL. All of the extracts and essential oils of *L. rubiginosa* were non-cytotoxic against Vero cells.

The antioxidant activity of the essential oils of *L. rubiginosa* was evaluated by using the DPPH method. The flower essential oil showed the highest antioxidant activity with an IC_{50} value of 17.5 mg/mL, whereas the fruit and leaf essential oils showed moderate antioxidant activity. All of the essential oils possessed antifungal activities against *Candida albican* and *Trichophyton mentagrophyte.* The flower essential oil showed antibacterial activity against *Esscherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (Agar diffusion method).

It is revealed that *L. rubiginosa* possessed cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities. Therefore the crude ethanol extract of the leaves was subjected to liquid-liquid partition between hexane and chloroform to yield the hexane fraction and the chloroform fraction. Isolation and purification of the hexane fraction yielded compounds (1) and (2). The chloroform fraction was subjected to column chromatography and preparative thin layer chromatography to afford compound (3). The structures of compound (1), compound (2) and compound (3) were elucidated by ^{1}H-NMR and GC-MS analysis. Compounds (1) and (3) were identified as lupeol and compound (2) was identified as stigmasterol. Lupeol inhibited significant cytotoxicity against the NCI-H187 cancer (IC_{50}=27.4 µg/mL) and MCF-7 cancer cell line (IC_{50}=38.0 µg/mL). But stigmasterol was inactive to all cancer cell lines.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ศักยภาพต้านมะเร็งและองค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรไทยบางชนิด

ผู้เขียน นางสาวจิราภรณ์ ช่วงบัญญัติ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. บุญสม เหลี่ยวเรืองรัตน์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.ดร. สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ.ดร. อภิวัฒน์ ธีรวุฒิกุลรักษ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Prof. Stephen G Pyne	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นเกี่ยวกับการแยกสารตามฤทธิ์ชีวภาพต้านมะเร็ง และ/หรือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจพบในพืชสมุนไพรที่คัดเลือกมาศึกษา แล้วทำการแยกสารจากสารสกัด ทำให้สารที่แยกได้บริสุทธิ์พร้อมกับวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารประกอบที่แยกได้ พืชสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษามี 4 ชนิดคือ ผักคราดหัวแหวน กาหลง จัน และมะหวด พบว่าสารสกัดหยาบของใบมะหวดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเมื่อเทียบกับพืชอีกสามชนิด (วิธี ABTS) ดังนั้น จึงเลือกมะหวดในการศึกษาต่อไป

เมื่อสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี hydrodistillation จากส่วนของใบ ดอก และผลของมะหวด แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธี GC และ GC-MS พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบมีองค์ประกอบหลักคือ สาร oxygenated acyclic diterpenes ได้แก่ phytol (38.6%) และ phytone (22.5%) รองลงมาคือ สาร sesquiterpenes ได้แก่ nerolidol (1.1%) และ farnesol (0.8%) น้ำมันหอมระเหยจากดอกมีองค์ประกอบหลักคือ nerolidol (34.8%) และ farnesol (10.0%) น้ำมันหอมระเหยจากผลมีองค์ประกอบหลักคือ palmitic acid (66.1%) tetradecanoic acid (10.0%) และ linoleic acid (5.5%)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบของใบมะหวดจากตัวทำละลาย chloroform hexane และmethanol และ น้ำมันหอมระเหยจากใบ ดอก และผลของมะหวด ต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ KB MCF-7 และ NCI-H187 โดยใช้วิธี resazurin microplate assay พบว่า สารสกัดหยาบคลอโรฟอร์มสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ได้ดี (IC_{50}=14.13 µg/mL) และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง KB และ MCF-7 ได้ปานกลาง (IC_{50}=35.59 µg/mL และ IC_{50}=40.25 µg/mL) น้ำมันหอมระเหยจากใบมะหวดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ดีมากโดยมีค่าการยับยั้ง IC_{50}=17.93 µg/mL และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง KB ได้ปานกลาง (IC50=33.39 µg/mL) น้ำมันหอมระเหยจากดอกมะหวดมีฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง NCI-H187 ด้วยค่าการยับยั้ง IC_{50}=43.90 µg/mL โดยทั้งนี้สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ Vero cell แต่อย่างใด

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี DPPH พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากดอกมีฤทธิ์ดีที่สุด (IC_{50}=17.5 mg/mL) ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากผลและใบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระปานกลาง และพบว่า น้ำมันหอมระเหยทุกตัวมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิด *Candida albican* และ *Trichophyton metagrophyte* และน้ำมันหอมระเหยจากใบสามารถต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia Coli Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* (Agar diffusion method)

เนื่องจาก *L. rubiginosa* มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านจุลชีพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงนำสารสกัดหยาบเอทานอลของใบมะหวดมาแยกสารที่เป็นองค์ประกอบต่อโดยวิธีการ partition ในตัวทำละลาย hexane และ chloroform และพบว่าจากการแยกและทำบริสุทธิ์สารสกัดส่วน hexane fraction ด้วยวิธี column chromatography และ preparative thin layer chromatography ได้ผลึกของสารประกอบ compound (1) และ compound (2) ส่วน chloroform fraction ได้สารประกอบ compound (3) ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างสารต่อด้วยวิธี ^{1}H-NMR และ GC-MS สามารถระบุได้ว่า compound (1) และ (3) คือ lupeol และ compound (2) คือ stigmasterol จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง พบว่า lupeol สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิด NCI-H187 (IC_{50}=27.34 µg/mL) และ MCF-7 (IC_{50}=38.0 µg/mL) ได้ ขณะที่ stigmasterol ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิดแต่อย่างใด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved