บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ทางชีวภาพของต้นบุนนาค โดยนำใบและกิ่งของบุนนาคมาทำให้แห้ง บดให้ละเอียด และสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเมทานอล ตามลำดับ นอกจากนี้ได้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบบุนนาคด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำและวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคก๊าซโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโทรเมตรี ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีสีเหลือง ร้อยละผลผลิตเท่ากับ 0.064 และพบสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมี 35 สาร คิดเป็นร้อยละ 81.4 ของสารทั้งหมด สารที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ *trans*-caryophyllene (30.9%), β-caryophyllene oxide (17.9%), α-humulene (6.0%),δ-cadinene (4.1%), γ-muurolene (3.5%), γ-cadinene (2.3%), β-selinene (1.9%), germacrene D (1.8%) และ β-bisabolene (1.6%) เมื่อนำสารสกัดต่างๆ มาวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteau reagent พบว่า สารสกัดเมทานอลจากกิ่งบุนนาคมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด (199.27 $\pm$ 6.55 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) และสารสกัดเฮกเซนจากกิ่งบุนนาคมีปริมาณฟีนอลิกต่ำสุด (6.82 $\pm$ 0.73 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดต่างๆ และน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี DPPH วิธี ABTS และวิธี reducing power พบว่า สารสกัดเมทานอลจากกิ่งบุนนาคมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และวิธี ABTS สูงสุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.15 $\pm$ 0.01 และ 0.284 $\pm$ 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี ABTS ต่ำสุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 31.67 $\pm$ 0.18 และ 7.712 $\pm$ 0.077 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดเมทานอลจากกิ่งบุนนาคมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี reducing power สูงสุด รองลงมาได้แก่ สารสกัดเมทานอลจากใบ สารสกัดไดคลอโรมีเทนจากกิ่ง สารสกัดไดคลอโรมีเทนจากใบ สารสกัดเฮกเซนจากใบ สารสกัดเฮกเซนจากกิ่ง และน้ำมันหอมระเหย ตามลำดับ การวิจัยครั้งนี้ได้นำสารสกัดต่างๆ และน้ำมันหอมระเหยไปศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ดี และฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราใช้วิธี agar diffusion พบว่าสารสกัดเมทานอลจากกิ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *Escherichia coli* สูงสุด มีบริเวณยับยั้งเชื้อ เท่ากับ 16.0 $\pm$ 1.0 มิลลิเมตร สารสกัดเมทานอลจากใบมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* สูงสุดมีบริเวณยับยั้งเชื้อเท่ากับ 23.0 $\pm$ 0.5 มิลลิเมตร และสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากกิ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สูงสุด มีบริเวณยับยั้งเชื้อเท่ากับ 12.2 $\pm$ 0.3 มิลลิเมตร สารสกัดเมทานอลจากกิ่งมีฤทธิ์ต้านราต่อเชื้อ *Candida albican* สูงสุด และสารสกัดเมทานอลจากใบมีฤทธิ์ต้านราต่อเชื้อ *Trichophyton mentagrophyte* สูงสุด มีบริเวณยับยั้งเชื้อเท่ากับ 11.8 $\pm$ 0.6 และ 18.0 $\pm$ 0.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยไม่มีฤทธิ์

ต้านราต่อเชื้อ *Aspergillus flavus* นอกจากนี้ได้หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ทำโดยวิธี microtiter broth พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบและกิ่งบุนนาคมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* สูงสุด มีค่า MIC เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดเมทานอลจากใบ สารสกัดเมทานอล และสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากกิ่งบุนนาค มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* สูงสุด มีค่า MIC เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยใช้เซลล์มะเร็งของคน ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H 187 และทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ปกติโดยใช้เซลล์ของไตลิง ด้วยวิธี Resazurin microplate assay (REMA) พบว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนและสารสกัดเมทานอลจากใบและกิ่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB มีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.70, 25.14, 18.01 และ 29.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดเฮกเซนจากใบและสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากกิ่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 38.12 และ 28.83 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดไดคลอโรมีเทนและสารสกัดเมทานอลจากใบและกิ่ง มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H187 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 38.68, 30.80, 18.42 และ 33.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ KB, MCF-7 และ NCI-H187 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 24.02, 16.19 และ 20.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดต่างๆ และน้ำมันหอมระเหยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ เมื่อนำสารสกัดไดคลอโรมีเทนของกิ่งบุนนาคมาแยกบริสุทธิ์ได้สาร คือ สาร friedelin, สารผสมระหว่าง α-amyrin กับ β-amyrin, สาร lupeol และสาร β-sitosterol ซึ่งวิเคราะห์หาโครงสร้างโดยใช้เทคนิคสเปคโทสโคปี นำสารที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า สาร friedelin, สารผสมระหว่าง α-amyrin และ β-amyrin และสาร lupeol มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *E. coli* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารβ-sitosterol มีค่า MIC เท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สาร friedelin, สารผสมระหว่าง α-amyrin และ β-amyrin, สาร lupeol และสาร β-sitosterol มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 250, 250, 500 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารผสมระหว่างα-amyrin และ β-amyrin มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 28.45 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสาร lupeol มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งช่องปากชนิด KB เซลล์มะเร็งเต้านมชนิด MCF-7 และเซลล์มะเร็งปอดชนิด NCI-H187 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 30.12, 34.25 และ 21.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสารที่แยกได้ทั้งหมดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ

Abstract

In this research work, the chemical constituents**,** antioxidant and biological activities of *Mesua ferrea* Linn. were studied. The leaves and stems of *M. ferrea* were dried, ground and extracted with hexane, dichloromethane and methanol, respectively. The essential oil from the leaves of *M. ferrea* was isolated by hydrodistillation and analyzed by means of GC-MS. The yield of obtained essential oil was at 0.064% and its characterize was as yellow liquid. Thirty-five constituents were identified, constituting 81.4% of the total volatile components. The major constituents were *trans*-caryophyllene (30.9%), β-caryophyllene oxide (17.9%), α-humulene (6.0%), δ-cadinene (4.1%), γ-muurolene (3.5%), γ-cadinene (2.3%), β-selinene (1.9%), germacrene D (1.8%) and β-bisabolene (1.6%). The total phenolic contents of the crude extracts were estimated by Folin Ciocalteau method. The methanol extract of the stems exhibited the highest total phenol contents (199.27 $\pm$ 6.55 mg GAE, g extract), but the hexane extract of the stems exhibited the lowest total phenol contents (6.82 $\pm$ 0.73 mg GAE, g extract). The antioxidant activities of the extracts and the essential oil of this plant were determined by the DPPH, ABTS and reducing power methods. The methanol extract of stems exhibited the highest antioxidant activities by DPPH and ABTS methods with the IC_{50} values of 0.15 $\pm$ 0.01 and 0.284 $\pm$ 0.005 mg/mL, respectively. The leaf essential oil showed the lowest antioxidant activity by DPPH and ABTS methods with the IC_{50} values of 31.67 $\pm$ 0.18 and 7.712 $\pm$ 0.077 mg/mL, respectively. The extracts and the essential oil also showed antioxidant activity by reducing power method. The methanol extract of *M. ferrea* stems showed the highest reducing power, followed by the methanol extract of the leaves, the dichloroform extract of the stems, the dichloroform extract of the leaves, the hexane extracts of the leaves, the hexane extracts of the stems, and the leaf essential oil, respectively. The antibacterial, antifungal, cytotoxic and anticancer activities of the extracts and the leaf essential oil were investigated. The antibacterial and antifungal activities of the extracts and the leaf essential oil were determined using the agar diffusion method. The methanol extract of the stems showed the highest antibacterial activity against *Escherichia coli* (diameter of inhibition zone of 16.0 $\pm$ 1.0 mm), the methanol extract of the leaves showed the highest antibacterial activitiy against *Staphylococcus aureus* (diameter of inhibition zone of 23.0 $\pm$ 0.5 mm), and the dichloromethane extract of the stems showed the highest antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* (diameter of inhibition zone of 12.2 $\pm$ 0.3 mm). The methanol extract of the stems showed the highest antifungal activity against *Candida albican* and the methanol extract of the leaves showed the highest antifungal activity against *Trichophyton mentagrophyte* with the inhibition zones of 11.8 $\pm$ 0.6 and

18.0 $\pm$ 0.5 mm, respectively. All extracts and this leaf oil did not inhibit *Aspergillus flavus*. The MIC of the extracts and the leaf essential oil were evaluated against *E. coli* and *S. aureus* using the microtiter broth method. The methanol extract of the leaves and the stems showed the highest antibacterial activity against *E. coli* with the MIC values of 31.25 μg/mL. The methanol extract of the leaves, dichloromethane extract and the methanol extract of the stems showed the highest antibacterial activity against *S. aureus* with the MIC values of 31.25 μg/mL. In addition, the essential oil exhibited significant antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* with the MIC values of 250 and 125 μg/mL, respectively. The anticancer activities of the extracts and the essential oil were determined by the Resazurin Microplate Assay using three human cancer cell lines; KB, MCF-7 and NCI-H187. Their cytotoxicities against *Vero* cell line (African green monkey kidney) were also carried out. The dichloromethane extracts of the stems and the essential oil exhibited anticancer activities against three cell lines. The dichloromethane extracts, the methanol extracts of the leaves and the stems exhibited anticancer activities against KB cell line with the IC_{50} values of 23.70, 25.14, 18.01, and 29.91 μg/mL, respectively. The hexane extract of the leaves, the dichloromethane extract of the stems exhibited anticancer activities against MCF-7 cell line with the IC_{50} values of 38.12 and 28.83 μg/mL, respectively. The dichloromethane extracts, the methanol extracts of the leaves and the stems exhibited anticancer activities against NCI-H187 cell line with the IC_{50} values of 38.68, 30.80, 18.42, and 33.54 μg/mL, respectively. The leaf oil also exhibited anticancer activities against KB, MCF-7 and NCI-H187 cell lines with the IC_{50} values of 24.02, 16.19, and 20.32 μg/mL, respectively. All the extracts and the essential oil were non cytotoxic to *Vero* cells. Friedelin, the mixture of α-amyrin and β-amyrin, lupeol and β-sitosterol were isolated from the active dichloromethane extract of the stems. All identified compounds were elucidated by spectroscopic techniques and compared with the physicochemical and spectroscopic data in the literature. The isolated compounds were tested for their biological activities. Friedelin, the mixture of α-amyrin and β-amyrin, and lupeol showed the antibacterial activity against *E. coli* with the MIC values of 250 μg/mL, but β-sitosterol showed the activity with the MIC value of 1000 μg/mL. Friedelin, the mixture of α-amyrin and β-amyrin, lupeol and β-sitosterol showed the antibacterial activity against *S. aureus* with the MIC values of 250, 250, 500 and 1000 μg/mL. The mixture of α-amyrin and β-amyrin exhibited anticancer activity against MCF-7 cell line with the IC_{50} value 28.45 μg/mL. Lupeol exhibited anticancer activities against KB, MCF-7 and NCI-H187 cell lines with the IC_{50} values of 30.12, 34.25 and 21.56 μg/mL, respectively. All isolated compounds were non-cytotoxic to *Vero* cells.