

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 mentagophyte*.

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⁻¹. Only the methanol extract of *B. retusa* fruits exhibited the highest antioxidant activity (ABTS) with an IC_{50} of 0.29 mg mL⁻¹. The essential oil of *C. javanicum* leaves exhibited the highest antioxidant activity (DPPH) with an IC_{50} of 27.05 mg mL⁻¹. The methanolic extract of *B. retusa* stems exhibited the highest antioxidant activity (DPPH) with an IC_{50} of 0.12 mg mL⁻¹. 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 องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรวงศ์ยูฟอร์บิซิอิว
บางตัว

ผู้เขียน นางสาวดวงสุรีย์ แสนสีระ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

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

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรวงศ์ยูฟอร์บิซิอิวบางตัว 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 น้ำมันหอมระเหยจากผลดีหมีมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุดที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย (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) โดยน้ำมันหอมระเหยของตำแยแมวมีฤทธิ์ต้านมะเร็งดีกว่า น้ำมันหอมระเหยของใบดีหมี ส่วนฤทธิ์ต้านมะเร็งของสารสกัด พบว่า สารสกัดเมธานอลจากใบเต็งหนามมีฤทธิ์ต้านมะเร็งทั้งสามชนิด สารสกัดเฮกเซนจากกิ่งดีหมีและสารสกัดเมทานอลจากผลเต็งหนามมีฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปาก และมะเร็งปอด ซึ่งสารสกัดเมธานอลจากผลเต็งหนามมีฤทธิ์ต้านมะเร็งดีกว่าสารสกัดเฮกเซนจากกิ่งดีหมี พบว่า สารสกัดเมทานอลของส่วนเหนือดินตำแยแมวมีฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดเพียงชนิดเดียวเท่านั้น ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรทั้งสามชนิด พบว่า สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรทั้งสามชนิด ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ (Vero cell) ศึกษาการแยกสารจากสารสกัดออกฤทธิ์ของส่วนเหนือดินตำแยแมว พบผลึกสีขาวของ L-quebrachitol และศึกษาวิธีการหาปริมาณ L-quebrachitol โดยวิธี RP-HPLC พบว่า วิธี RP-HPLC สามารถพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีทดสอบของสารชนิดนี้ในการวิเคราะห์ปริมาณ L-quebrachitol ในตำแยแมว ศึกษาการแยกสารจากสารสกัดออกฤทธิ์ของผลดีหมี พบผลึกสีขาวของ stigmasterol ศึกษาการแยกสารจากสารสกัดออกฤทธิ์ของผลเต็งหนาม พบผลึกสีขาวของ benzoic acid การพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารทุกตัว ทำโดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี และ GC-MS