

<b>Thesis Title</b>	Bioactive Compounds from Family Guttiferae and Schisandraceae Plants		
<b>Author</b>	Captain Rujida Wilairat		
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Biotechnology)		
<b>Thesis Advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Chairperson	
<b>Committee</b>	Assoc. Prof. Dr. Aranya Manosroi	Member	
	Prof. Dr. Anake Kijjoa	Member	

### ABSTRACT

The objectives of this study were 1) to screen the bioactivities of the crude extracts from the selected Guttiferae and Schisandraceae plants, 2) to purify and elucidate the structures of the isolated compounds, and 3) to determine the bioactivities of the isolated compounds. Leaves, wood of *Hypericum hookerianum*, *Garcinia speciosa*, *Garcinia xanthochymus*, *Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*, *Calophyllum polyanthum* and *Schisandra verruculosa* and the fruit of *G. xanthochymus* collected from Chiang Mai Province, Thailand were carried out to extract and screen for determining the free radical scavenging and antitumor activities. DPPH assay and SRB assay towards human cancer cell lines were performed. The methanol wood extract of *G. speciosa* exhibited the highest scavenging activity with an IC<sub>50</sub> value of 9.75 µg/ml. *H. hookerianum*, *S. verruculosa*, *C. formosum* ssp. *Pruniflorum*, *G. xanthochymus* and *C. polyanthum* showed the IC<sub>50</sub> value of 19.08, 23.34, 23.96, 32.10 and 44.29 µg/ml, respectively. For the fruit of *G. xanthochymus*, methanol extract and chloroform fraction of the methanol extract showed no significant IC<sub>50</sub>.

Chloroform fraction of the methanol extract of *G. speciosa* showed also the potent inhibitory effect with the GI<sub>50</sub> value of 4.0, 6.6 and 3.7 µg/ml from the leaves and 9.9, 15.7 and 8.1 µg/ml from the wood against HeLa (cervical), KB (epidermoid) and B16F10 (melanoma) tumor cell lines, respectively. The chloroform fraction of the methanol extracts of *H. hookerianum* and *G. xanthochymus* showed the inhibitory effect on cell growth with GI<sub>50</sub> value less than 20 µg/ml.

*H. hookerianum* and *S. verruculosa* were selected for the study of phytochemistry since the chemical constituents have not been reported and *H. hookerianum* showed also good results both of free radical scavenging activity and antitumor activity. The chloroform fraction of the methanol wood extract of *H. hookerianum* furnished 5-hydroxy-2-methoxyxanthone, 2-hydroxy-3-methoxy xanthone, the xanthonolignoid *trans*-kielcorin, as well as two cinnamate ester derivatives, betulinic acid-3β-yl caffeate and the new compound 4-hydroxy-3-methoxyphenyl ferulate. The chloroform fraction of the methanol wood extract of *S. verruculosa* gave vanillic acid, abscisic acid, methyl 4-hydroxybenzoate, 4-hydroxy benzaldehyde, methyl 3,4-dihydroxybenzoate, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-hydroxy-propan-1-one, 1,2-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-hydroxy-propan-1-one and 4-hydroxybenzoic acid. Spectroscopic methods, especially <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, COSY, NOESY, HMBC, HSQC and HRMS were used to elucidate the structures of these compounds.

*In vitro* effect of these compounds on the growth of human cancer cell lines: MCF-7 (breast), NCI-H 460 (lung), SF-268 (CNS) and UACC-62 (melanoma) and the effect of these compounds on the proliferation of human lymphocyte from the mitogenic effect of phytohemagglutinin (PHA) were evaluated. Cinnamate ester

derivatives from *H. hookerianum* showed the strong inhibitory effects against MCF-7, NCI-H460, SF-268 and UACC-62 with the  $GI_{50}$  value of 15.1, 18.7, 15.9 and 21.2  $\mu\text{M}$  for the new compound 4-hydroxy-3-methoxyphenyl ferulate and 12.2, 19.6, 24.3 and 31.8  $\mu\text{M}$  for betulinic acid- $3\beta$ -yl caffeate, respectively, while from *S. verruculosa*, only methyl 3,4-dihydroxybenzoate gave the moderate activity with the  $GI_{50}$  value of 78.9, 38.8 and 93.8  $\mu\text{M}$  toward MCF-7, NCI-H460 and SF-268, respectively. Compound 4-hydroxy-3-methoxyphenyl ferulate, betulinic acid- $3\beta$ -yl caffeate and methyl 3,4-dihydroxybenzoate showed antiproliferative activity with  $IC_{50}$  value of 26.1, 40.8 and 58.58  $\mu\text{M}$ , respectively. All of the isolated compounds were also determined for the free radical scavenging activity. Methyl 3,4-dihydroxybenzoate from *S. verruculosa* showed a strong activity with the  $IC_{50}$  value of 6.4  $\mu\text{M}$ , while both of cinnamate ester derivatives from *H. hookerianum* gave the moderate activities with the  $IC_{50}$  value of 48.2 and 15.6  $\mu\text{M}$  for 4-hydroxy-3-methoxyphenyl ferulate and betulinic acid- $3\beta$ -yl caffeate, respectively. The results from this study suggested a potential of the selected plants with significant biological activities for further study and development to new drugs.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

สารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชวงศ์  
Guttiferae และ Schisandraceae

ผู้เขียน

ร้อยเอกหญิงรุจิรา วิไลรัตน์

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. จีระเดช มโนสร้อย	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. อรัญญา มโนสร้อย	กรรมการ
ศ. ดร. อเนก กิจจา	กรรมการ

## บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากพืชวงศ์ Guttiferae และ Schisandraceae 2) ทำให้สารบริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างของสารประกอบที่สกัดแยก และ 3) ประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดแยกได้ พืชที่เลือกนำมาศึกษาคือ บัวทอง (*Hypericum hookerianum*) พะว้าหรือสารภีป่า (*Garcinia speciosa*), มะคะหลวงหรือมะคะ (*Garcinia xanthochymus*) ตั้วขนหรือตั้วเหลือง (*Cratoxylum formosum* ssp. *Pruniflorum*) พะองหรือมะแหนคอย (*Calophyllum polyanthum*) และ *Schisandra verruculosa* ซึ่งเก็บในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ในการทดลองได้สกัดสารสกัดหยาบจากใบ เนื้อไม้ของพืชเหล่านี้และผลของมะคะหลวงโดยใช้เมธานอลและคลอโรฟอร์ม จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ในการจับอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเนื้อไม้โดยเมธานอลของ *G. speciosa* แสดงฤทธิ์สูงสุดในการจับอนุมูลอิสระโดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถจับอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC<sub>50</sub>) เท่ากับ 9.75 ไมโครกรัมต่อ

มิลลิกรัม *H. hookerianum*, *S. verruculosa*, *C. formosum* ssp. *Pruniflorum*, *G. xanthochymus* และ *C. polyanthum* แสดงค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 19.08, 23.34, 23.96, 32.10 และ 44.29 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ สารสกัดหยาบส่วนกลอโรฟอร์มของสารสกัดเมธานอลผลของ *G. xanthochymus* แสดงค่า IC<sub>50</sub> ไม่แตกต่างกัน นอกจากนั้นสารสกัดหยาบส่วนกลอโรฟอร์มของสารสกัดเมธานอลของ *G. speciosa* ยังออกฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) เซลล์มะเร็งในช่องปาก (KB) และเซลล์มะเร็งผิวหนัง (B16F10) โดยจากส่วนของใบมีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ มะเร็งได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (GI<sub>50</sub>) เท่ากับ 4.0, 6.6 และ 3.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และจากส่วนของเนื้อไม้มีค่าเท่ากับ 9.9, 15.7 และ 8.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ สารสกัดส่วนกลอโรฟอร์มของสารสกัดเมธานอลจาก *H. hookerianum* และ *G. xanthochymus* แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งทั้งสามชนิดโดยมีค่า GI<sub>50</sub> น้อยกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ได้คัดเลือก *H. hookerianum* และ *S. verruculosa* ในการศึกษาโครงสร้างทางเคมี เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาในเรื่องนี้ อีกทั้ง *H. hookerianum* ยังแสดงฤทธิ์ที่ดีจากการทดสอบฤทธิ์ในการจับอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

จากการสกัดแยกเนื้อไม้ของต้น *H. hookerianum* ส่วนกลอโรฟอร์มของสารสกัดเมธานอลได้สารทั้งสิ้น 5 ตัวคือ 5-hydroxy-2-methoxyxanthone, 2-hydroxy-3-methoxyxanthone, xanthonolignoid *trans*-kielcorin, betulinic acid-3 $\beta$ -yl caffeate และสารใหม่ 4-hydroxy-3-methoxyphenyl ferulate ส่วนสารที่ได้จากการสกัดแยกเนื้อไม้ของต้น *S. verruculosa* มีจำนวนทั้งสิ้น 8 ตัวคือ vanillic acid, abscisic acid, methyl 4-hydroxy benzoate, 4-hydroxybenzaldehyde, methyl 3, 4-dihydroxybenzoate, 1-(4-hydroxy-3-methoxy

phenyl) -3-hydroxy-propan-1-one, 1, 2- bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-hydroxy propan-1-one และ 4-hydroxybenzoic acid

ในการศึกษาฤทธิ์ของสารที่แยกได้ต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) เซลล์มะเร็งปอด (NCI-460) เซลล์มะเร็งระบบประสาทส่วนกลาง (SF-268) และเซลล์มะเร็งผิวหนัง (UACC-62) รวมถึงฤทธิ์ต่อการเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซต์ จากผลการทดลองพบว่าสารใหม่ 4-hydroxy-3-methoxyphenyl ferulate และ betulinic acid-3 $\beta$ -yl caffeate จาก *H. hookerianum* มีฤทธิ์สูงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดย 4-hydroxy-3-methoxyphenyl ferulate มีค่า GI<sub>50</sub> เท่ากับ 15.1, 18.7, 15.9 และ 21.2 ไมโครโมลาร์ และ betulinic acid-3 $\beta$ -yl caffeate มีค่า GI<sub>50</sub> เท่ากับ 12.2, 19.6, 24.3 และ 31.8 ไมโครโมลาร์ ในระหว่างที่ methyl 3,4-dihydroxybenzoate จาก *S. verruculosa* แสดงฤทธิ์ปานกลางในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งปอด (NCI-460) และมะเร็งระบบประสาทส่วนกลาง (SF-268) โดยมีค่า GI<sub>50</sub> เท่ากับ 78.9, 38.8 และ 93.8 ไมโครโมลาร์ ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซต์ 4-hydroxy-3-methoxyphenyl ferulate betulinic acid-3 $\beta$ -yl caffeate และ methyl 3,4-dihydroxy benzoate มีค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนลิมโฟไซต์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC<sub>50</sub>) เท่ากับ 26.1, 40.8 และ 58.58 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ในการทดสอบฤทธิ์ในการจับอนุมูลอิสระ methyl 3,4-dihydroxy benzoate แสดงฤทธิ์ที่สูงใกล้เคียงกับวิตามินซี โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 6.4 ไมโครโมลาร์ betulinic acid-3 $\beta$ -yl caffeate และ 4-hydroxy-3-methoxy phenyl ferulate แสดงฤทธิ์ปานกลาง โดยมีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 48.2 และ 15.6 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าพืชที่ทำการศึกษานี้มีศักยภาพที่จะสามารถพัฒนาเพื่อเป็นยาใหม่ได้ต่อไป