หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ทางชีวภาพและองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรไทย 3 ชนิด และการสังเคราะห์ (–)-สตีเวียมีนและแอนะล็อค	
ผู้เขียน	นางสาวเนตรชนก เจียงสืบชาติวีระ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	รศ.ดร.บุญสม เหลี่ยวเรืองรัตน์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ.ดร.สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ.ดร.อภิวัฒน์ ธีรวุฒิกุลรักษ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ.ดร.ดำรงณ์ ศานติอาวรณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ศ. ดร. สตีเฟน จี. ไพน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากพืชสมุนไพรไทยที่ถูกคัดเลือกมา 3 ชนิด ได้แก่ ใบเงิน ผักดีด และขนไก่ทองคำ ได้นำสมุนไพรเหล่านี้มาแยกสกัดทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาหาโครงสร้างทางเคมีโดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (เอ็นเอ็มอาร์) แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรเมทรี (จีซี-เอ็มเอส) แมสสเปคโทรเมตรี(เอ็มเอส) และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่เคยรายงานมาก่อน

ได้นำใบแห้งของต้นใบเงินมาสกัดโดยใช้เทคนิคการหมัก และการสกัดแบบแบ่งส่วนด้วยตัวทำละลาย และนำใบสดมาสกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำโดยใช้เครื่องสกัดน้ำมันหอมระเหยแบบประยุกต์ ได้น้ำมันสีเหลืองซึ่งถูกนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-เฟลมไอออไนเซชัน ดีเทคเตอร์ (จีซี-เอฟไอดี) และจีซี-เอ็มเอส ซึ่งองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยนี้ ได้แก่ ไฟทอล, เอ็น-โนนะโคเซน และ เฮกซะไฮโดรฟาร์เนซิล อะซีโตน น้ำมันหอมระเหยนี้แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปาก, มะเร็งปอดและมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (เซลล์วีโร่) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 27.04, 25.27 และ 26.52 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจากเอธานอล 95%, เฮกเซน, เอทิล อะซิเตท และสารสกัดน้ำ ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งทรวงอกโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 33.27, 38.66, 26.01 และ 20.41 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ สารสกัดทั้งหมดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ทั้งนี้น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดทั้งหมดแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและสารสกัดทั้งหมดยังแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดทั้งหมดยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งถูกทดสอบด้วยเทคนิคเอบีทีเอส และดีพีพีเอช

การศึกษาครั้งนี้ยังได้หาปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และทดสอบหาสารพฤกษเคมีเบื้องต้นจากใบของต้นใบเงิน ส่วนของสารสกัดเฮกเซนถูกเลือกมาทำการวิเคราะห์ต่อด้วยจีซี-เอ็มเอส โดยองค์ประกอบหลักของสารสกัดนี้ประกอบไปด้วย สควอลีน ไฟทอล และนีโอไฟตะไดอีน การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกสควอลีน และสติคมาสเตอรอลออกมาจากสารสกัดนี้ได้ และนอกจากนี้ 1,4-ไดไกลโคโลอิล-เบนซีนยังสามารถถูกแยกออกมาจากสารสกัดเอทิลอะซิเตทของต้นใบเงิน

กิ่งแห้งของต้นผักดีดถูกนำมาสกัดโดยอาศัยเทคนิคการหมักด้วยตัวทำละลาย สารสกัดด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มได้ถูกเลือกมาวิเคราะห์ด้วยจีซี-เอ็มเอส เนื่องจากสารสกัดนี้แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อเฮอร์ปีส์ ซิมเพล็กซ์ ไวรัส ไทป์ 1 จากผลรายงานการวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งองค์ประกอบหลักของสารสกัดนี้ประกอบไปด้วย ไตรอะเซตีน นีโอไฟตะไดอีน และเอทิล เฮคซะเดคาโนเอต ได้นำสารสกัดนี้มาแยกสกัด และทำให้ได้สารบริสุทธิ์ จนได้สารสโคโพเลตินซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ได้นำใบแห้งของต้นขนไก่ทองคำมาสกัดด้วยเทคนิคการหมัก และการสกัดด้วยเครื่องสกัดซอคห์เลท และนำใบสดมาสกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำจนได้น้ำมันสีเหลืองซึ่งถูกนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค จีซี-เอฟไอดี และจีซี-เอ็มเอส องค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยนี้ประกอบไปด้วย คูบีนอล และสปาธูลินอล ซึ่งให้ผลที่แตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมา นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยนี้ยังแสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งช่องปาก มะเร็งทรวงอก และมะเร็งปอดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.79, 47.44 และ17.65 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ ทั้งนี้สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (เซลล์วีโร) และน้ำมันหอมระเหยเองยังมีฤทธิ์ยับยั้งวัณโรคต่อเชื้อ *M. tuberculosis* สายพันธุ์ $H_{37}Ra$ ที่ค่า MIC เท่ากับ 50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ส่วนของสารสกัดนั้นแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยและสารสกัดยังแสดงฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ นำน้ำมันหอมระเหยมาแยกสกัดและทำให้บริสุทธิ์จนได้องค์ประกอบหลักคือ คูบีนอล และสปาธูลินอล และทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดแยกได้พบว่ามีเพียงคูบีนอลเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ต้านมะเร็งปอดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 45.37 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการวิจัยครั้งนี้ยังได้ทำการสังเคราะห์สารจากธรรมชาติ (–)-สตีเวียมีน และอนุพันธ์ของสตีเวียมีน (10-นอร์-สตีเวียมีน 10-นอร์-เอ็น-สตีเวียมีน และ5-อีพิ-เอ็น-สตีเวียมีน) การสังเคราะห์มี 4 ขั้นตอนโดยเริ่มจากการเตรียมอนุพันธ์ของเบต้า-แอล และเบต้า-ดี ไรโบฟิวราโนส ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์เหล่านี้ประกอบไปด้วยปฏิกริยาพีตาซีส ปฏิกิริยาโอ-เมซิเลท ไซไคลเซชั่น ปฏิกริยา ริง-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โคลสซิง เมตาทิซิส และปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่นซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ได้แก่ (–)-สตีเวียมีน 10-นอร์-สตีเวียมีน 10-นอร์-เอ็น-สตีเวียมีน และ5-อีพิ-เอ็น-สตีเวียมีนในปริมาณผลผลิตรวมเท่ากับ 39%, 30%, 21% และ 47% ตามลำดับ นอกจากนี้สารที่ได้จากการสังเคราะห์ทุกตัวจะถูกทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไกลโคซิเดสจำนวน 12 ชนิดที่ปริมาณความเข้มข้นของสาร 143 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลการทดสอบพบว่าโดยทั่วไปให้ผลการยับยั้งเอนไซม์ในระดับต่ำถึงปานกลาง โดยสารอนุพันธ์ของ10-นอร์แสดงผลการยังยั้งแอลฟ่า-แอล-แรมโนซิเดสจาก *Penicillium decumbens* ที่ 50-53% ส่วน10-นอร์-สตีเวียมีนสามารถยับยั้งเอ็น-อะเซทิล-เบต้า-ดี-กลูโคซามินิเดส (จากถั่วพร้าเมล็ดยาว) ที่ความเข้มข้นเดียวกันที่ 760 ไมโครโมลาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Biological Activities and Chemical Compositions of Three Thai Medicinal Plants and the Synthesis of (–)-Steviamine and Analogues	
Author	Miss Nadechanok Jiangseubchatveera	
Degree	Doctor of Philosophy (Pharmacy)	
Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Boonsom Liawruangrath	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Saisunee Liawruangrath	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Aphiwat Teerawutgulrug	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Dammrong Santiarworn	Co-advisor
	Prof. Dr. Stephen G. Pyne	Co-advisor

ABSTRACT

In this research, the biological activities of the crude and pure extracts of three selected Thai medicinal plants; *Graptophyllum pictum* (L.) Griff, *Solanum spirale* Roxb. and *Gynura divaricata* (L.) DC were investigated. The bioactive compounds of these plants were isolated and purified. Their chemical structures were elucidated using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and mass spectrometry (MS) and the spectroscopic data were compared with the previous reports.

The dried leaves of *G. pictum* were extracted using the maceration and solvent partitioning methods. Whereas, the fresh leaves were hydrodistilled using a modified Clevenger-type apparatus to obtain a yellow oil which was further analyzed by gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) and GC-MS. The major components of this essential oil were phytol, *n*-nonacosane and hexahydrofarnesyl acetone. The essential oil showed cytotoxic activities against the KB (oral cavity cancer), NCI-H187 (small cell lung cancer) and Vero cell lines with IC_{50} values of 27.04, 25.27 and 26.52 µg/mL, respectively. Moreover, the 95% EtOH, hexane, EtOAc and aqueous fractions inhibited the growth of MCF-7 (breast cancer) cell lines with IC_{50} values of 33.27, 38.66, 26.01 and 20.41 µg/mL, respectively. The extracts and the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

fractions were non-cytotoxic against Vero cells. The essential oil and all extracts of *G. pictum* showed antibacterial activities and all extracts were active against the tested fungi. Furthermore, all the extracts, fractions and the essential oil possessed antioxidant activities which were determined using the ABTS and DPPH methods. The total phenolic and flavonoid contents and a preliminary phytochemical screening of *G. pictum* leaves were also investigated. The hexane fraction of *G. pictum* was analyzed using GC-MS. The major components were squalene, phytol and neophytadiene. Squalene and stigmasterol were isolated from this fraction. While, 1,4-diglycoloyl-benzene was isolated from the EtOAc fraction.

The dried stems of *S. spirale* were extracted using the maceration method. The $CHCl_3$ extract showed anti-herpes simplex virus type-1 activity. Therefore, this extract was selected for analysis using GC-MS. The major components were triacetin, neophytadiene and ethyl hexadecanoate. This extract was separated and purified to obtain scopoletin as a bioactive compound.

The dried leaves of *G. divaricata* were extracted using the maceration and Soxhlet extraction methods. The fresh leaves were hydrodistilled to obtain a yellow oil which was further analyzed by GC-FID and GC-MS. The major components were cubenol and spathulenol, a result which was different from the previous reports. Moreover, the essential oil showed cytotoxicity against KB, MCF-7 and NCI-H187 cell lines with IC_{50} values of 5.79, 47.44 and 17.65 µg/mL, respectively. Both extracts and the essential oil were non-cytotoxic against Vero cells. In addition, this essential oil could also inhibit *M. tuberculosis* $H_{37}Ra$ with a MIC value of 50 µg/mL. The essential oil also showed antibacterial activities. The extracts possessed antibacterial and antifungal activities. Furthermore, the essential oil and the extracts exhibited antioxidant activities. This essential oil was further separated and purified to afford the major components, cubenol and spathulenol. The biological activities of the isolated compounds were examined, only cubenol could inhibit the NCI-H187 cell line with an IC_{50} value of 45.37 µg/mL.

Concise syntheses of natural (−)-steviamine and its analogues (10-*nor*-steviamine, 10-*nor*-*ent*-steviamine and 5-*epi*-*ent*-steviamine) were successfully achieved in four steps from readily available β-L and β-D ribofuranose derivatives. The

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

synthetic protocols consisted of a highly anti-selective Petasis reaction, a selective *O*-mesylate cyclization reaction, an efficient ring-closing metathesis reaction and hydrogenation reactions to generate (−)-steviamine, 10-*nor*-steviamine, 10-*nor*-*ent*-steviamine and 5-*epi*-*ent*-steviamine in 39%, 30%, 21% and 47% overall yields, respectively. Moreover, all synthetic compounds were tested against twelve glycosidases (at 143 μg/mL concentrations). The results showed that in general, they have poor to moderate inhibitory activities against most enzymes. The 10-*nor* analogues showed 50-53% inhibition of α-L-rhamnosidase from *Penicillium decumbens*, 10-*nor*-steviamine showed 51% inhibition of *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase (from Jack bean) at the same concentration (760 μM).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved