

ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของพืชบางชนิดที่ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็ง  
ในตำรายาพื้นบ้านของไทย

นางสาว ชลาลัย มุลทองขุน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0258-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20396594

**CYTOTOXICITY AGAINST CANCER CELL LINES OF  
SELECTED PLANTS USED AS ANTICANCER IN THAI  
TRADITIONAL MEDICINE**

Miss Chalalai Moonthongchun

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0258-2

Thesis Title                   CYTOTOXICITY AGAINST CANCER CELL LINES OF  
  SELECTED PLANTS USED AS ANTICANCER IN THAI  
  TRADITIONAL MEDICINE  
By                                   Miss Chalalai Moonthongchun  
Field of Study                 Biotechnology  
Thesis Advisor                Associate Professor Dr. Sophon Roengsumran  
Thesis Co-advisor            Associate Professor Dr. Amorn Petsom

.....

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

*Pipat Karntiang* ..... Deputy Dean for Administrative Affairs  
Acting Dean, Faculty of Science  
(Associate Professor Pipat Karntiang, Ph.D.)

Thesis Committee

*V. Rimpanitchayakit* ..... Chairman  
(Assistant Professor Vichien Rimpanitchayakit, Ph.D.)

*Sophon Roengsumran* ..... Thesis Advisor  
(Associate Professor Sophon Roengsumran, Ph.D.)

*Amorn Petsom* ..... Thesis Co-advisor  
(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

*Nattaya Ngamrojanavanich* ..... Member  
(Assistant Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)

*Polkit Sangvanich* ..... Member  
(Polkit Sangvanich, Ph.D.)

ชลาสัย มูลทองขุน : ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของพืชบางชนิดที่ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งในตำรายาพื้นบ้านของไทย (CYTOTOXICITY AGAINST CANCER CELL LINES OF SELECTED PLANTS USED AS ANTICANCER IN THAI TRADITIONAL MEDICINE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. โสภณ เรืองสำราญ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. อมร เพชรสม 114 หน้า. ISBN 974-17-0258-2

การศึกษานี้ได้นำพืชที่ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งในตำรายาพื้นบ้านของไทยจำนวนยี่สิบห้าชนิดมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้เลือกต้นเปล้าใหญ่ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีมาทำการสกัดสารออกฤทธิ์ เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีจากเปลือกต้นเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) จากจังหวัดเพชรบูรณ์สามารถแยกสารบริสุทธิ์ได้ 5 ชนิดจากสิ่งสกัดเฮกเซน และ 1 ชนิดจากสิ่งสกัดเอธิลอะซีเตต การหาสูตรโครงสร้างของสารเหล่านี้อาศัยคุณสมบัติทางกายภาพและเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี ซึ่งได้แก่ IR, MS, 1D-NMR สำหรับสารทุกชนิด สามารถพิสูจน์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ทั้ง 6 ชนิดได้คือ สารประกอบเซมเบรน ไดเทอร์ปีนอยด์ 2 ชนิดคือ crotocebraneic acid (1) และ neocrotocebraneic acid (2) สารประกอบเคลอโรเดน ไดเทอร์ปีนอยด์ 3 ชนิดคือ สารประกอบที่คล้ายคลึงกับ kolavenol (3), (-)-hardwickiic acid (4) และ (-)-20-benzyloxyhardwickiic acid (5) และ สารประกอบฟลาเวน 1 ชนิดคือ (+)-Catechin (6) แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบทั้ง 6 ชนิด ในด้านความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไซคลิกเอเอ็มพีฟอสโฟไดเอสเทอเรส และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสาร neocrotocebraneic acid (2), สารประกอบที่คล้ายคลึงกับ kolavenol (3) และ (-)-20-benzyloxyhardwickiic acid (5) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ได้แก่ BT474, Chago, Hep-G2, Kato-3 และ SW620 ได้ดี ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่ามีฤทธิ์เฉพาะสารที่ 6 โดยมี  $IC_{50}$  0.036  $\mu$ M ส่วนสารประกอบ 1 - 5 มีฤทธิ์ต่ำมากหรือไม่มีฤทธิ์

หลักสูตร.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต..... *ชลาสัย มูลทองขุน*

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *ดร. โสภณ เรืองสำราญ*

ปีการศึกษา.....2544..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... *ดร. อมร เพชรสม*

##4272250723 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: CYTOTOXICITY / *Croton oblongifolius* ROXB. / CANCER CELL LINES

CHALALAI MOONTHONGCHUN : CYTOTOXICITY AGAINST CANCER CELL LINES OF SELECTED PLANTS USED AS ANTICANCER IN THAI TRADITIONAL MEDICINE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOPHON ROENGSUMRAN, Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D., 114 pp. ISBN 974-17-0258-2

Twenty-five selected plants used as anticancer in Thai traditional medicine were examined for their cytotoxicity and antioxidant activity. Due to its cytotoxicity, this study selects *Croton oblongifolius* Roxb. which had interesting anticancer activity for further investigation of its active compounds. By chemical investigation of the stem bark of *Croton oblongifolius* Roxb. from Petchaboon province, five compounds were isolated from hexane crude extract and one compound from ethyl acetate crude extract. The structures of these compounds were elucidated on the basis of physical properties and spectroscopic data including IR, MS, 1D-NMR techniques. There were two cembrane diterpenoids ; crotocebraneic acid (1) and neocrotocebraneic acid (2); three clerodane diterpenoids ; a compound which is similar to kolavenol (3), (-)-hardwickiic acid (4) and (-)-20-benzyloxyhardwickiic acid (5) and one flavan: (+)-catechin (6). All of the six compounds were tested for biological activity: cytotoxicity against human cancer cell lines and antioxidant activity. It was found that neocrotocebraneic acid (2), compound which is similar to kolavenol (3), (-)-20-benzyloxyhardwickiic acid (5) have high activity against 5 cancer cell lines; BT474 (breast), Chago (lung), Hep-G2 (hepatoma), Kato-3 (gastric) and SW620(colon). Antioxidant assay showed that (+)-catechin (6) had high activity with  $IC_{50}$  0.036  $\mu$ M while compounds 1 – 5 had very low activity or inactive.

Program.....Biotechnology... Student's signature.....*Chalalai Moonthongchun.*  
 Field of study..Biotechnology.. Advisor's signature.....*Sophon Roengsumran*  
 Academic Year.....2001..... Co-advisor's signature.....*Amorn Petsom*

## ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to express her deepest appreciation to her advisor, Associated Professor Sophon Roengsumran, Ph.D. and her co-advisor, Associated Professor Amorn Petsom, Ph.D., for her encouraging guidance, supervision and beneficial suggestions throughout the course of this research. The author is grateful for the suggestion and guidance given by Dr. Surachai Pornpakakul, Dr. Polkit Sangvanich and Assistant Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D. during the research work. In addition, she would like to thank you for the valuable advice from Associated Professor Chaiyo Chaichantipyuth.

Gratitude is also extended to the Program of Biotechnology, Faculty of Science and the Graduate School, Chulalongkorn University for the financial support. Moreover, thank you to Mrs. Songchan Phutong, the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering for cytotoxicity test.

Finally, the author wishes to express sincere gratitude to her parents for all things that they have endured and sacrificed for her success.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# CONTENTS

Page

ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLE.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF SCHEMES.....	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 <i>Croton oblongifolius</i> Roxb. ....	2
1.2 The purposes of research.....	2
CHAPTER II LITERATURES REVIEW .....	3
2.1 Cytotoxicity against cancer cell lines of selected plants used as anticancer agenst.....	3
2.2 General characteristics of plants in Genus <i>Croton</i> .....	5
2.3 General characteristics of <i>Croton oblongifolius</i> Roxb.....	5
2.4 The previous study of diterpenoids components of <i>Croton</i> <i>oblongifolius</i> Roxb. ....	7
2.5 The cytotoxic activity of some isolated compounds of <i>croton</i> <i>oblongifolius</i> Roxb. ....	15
CHAPTER III EXPERIMENTAL.....	18
3.1 General experimental procedures.....	18
3.2 Plant material for cytotoxicity preliminary screening test.....	18
3.3 Extraction.....	20
3.4 Isolation of crude extract of <i>Croton oblongifolius</i> Roxb.....	21
3.4.1 Separation of hexane crude extract.....	21
3.4.2 Separation of ethyl acetate crude extract.....	21
3.4.3 Separation of methanol crude extract.....	21

	<b>Page</b>
3.5 Biological evaluation.....	22
3.5.1 Chemical for biological activity test.....	22
3.5.2 Biological assay procedure.....	22
3.6 Single crystal x-ray diffraction experiment.....	26
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....	27
4.1 Cytotoxicity preliminary screening.....	27
4.2 Antioxidant activity preliminary screening.....	29
4.3 Purification and properties of the compounds eluted from column chromatography of hexane crude extract.....	31
4.3.1 Purification and properties of compound <u>1</u> .....	31
4.3.2 Purification and properties of compound <u>2</u> .....	32
4.3.3 Purification and properties of compound <u>3</u> .....	33
4.3.4 Purification and properties of compound <u>4</u> .....	34
4.3.5 Purification and properties of compound <u>5</u> .....	35
4.4 Purification and properties of the compounds eluted from column chromatography of ethyl acetate crude extract.....	36
4.4.1 Purification and properties of compound <u>6</u> .....	36
4.5 Structural elucidation of the isolated compounds from the stem barks of <i>Croton oblongifolius</i> Roxb. ....	37
4.5.1 Structure elucidation of compound <u>1</u> .....	37
4.5.2 Structure elucidation of compound <u>2</u> .....	46
4.5.3 Structure elucidation of compound <u>3</u> .....	55
4.5.4 Structure elucidation of compound <u>4</u> .....	58
4.5.5 Structure elucidation of compound <u>5</u> .....	62
4.5.6 Structure elucidation of compound <u>6</u> .....	66
4.6 Result of biological activity test.....	70
CHAPTER V CONCLUSION.....	75
REFERENCES.....	77
APPENDICES.....	83
VITA.....	114



## LIST OF TABLES

Table	Page
1 Natural compounds which are under development as anticancer drug.....	3
2 Chemical constituents from stem bark of <i>Croton oblongifolius</i> Roxb. ....	9
3 Cytotoxicity against six human cancer cell lines of some isolated compounds from <i>Croton oblongifolius</i> .....	16
4 Selected plants used as anticancer in thai traditional medicine.....	18
5 The weight of crude extract.....	22
6 Ratio of dilution samples 1 mg/ml with absolute ethanol.....	25
7 Cytotoxicity activity of selected plants from preliminary screening.....	27
8 Antioxidant activity of ethanol crude extract of selected plants.....	29
9 The results from separation of hexane crude extract by column chromatography.....	30
10 The IR absorption bands of compound <u>1</u> .....	37
11 <sup>1</sup> H-NMR chemical shifts of compound <u>1</u> and crotoembraneic acid.....	38
12 <sup>13</sup> C-NMR chemical shifts of compound <u>1</u> and crotoembraneic acid.....	39
13 Crystal data and structure refinement for compound <u>1</u> .....	40
14 Atomic coordinates ( $\times 10^4$ ) and equivalent isotropic displacement parameters ( $A^2 \times 10^3$ ) for Compound <u>1</u> .....	41
15 Bond lengths [A] and angles [deg] for compound <u>1</u> .....	42
16 Anisotropic displacement parameters ( $A^2 \times 10^3$ ) for compound <u>1</u> .....	44
17 Hydrogen bonds for compound <u>1</u> [A and deg.].....	45
18 The IR absorption bands of compound <u>2</u> .....	46
19 <sup>1</sup> H-NMR chemical shifts of compound <u>2</u> and neocrotoembraneic acid.....	47
20 <sup>13</sup> C-NMR chemical shifts of compound <u>2</u> and neocrotoembraneic acid.....	48
21 Crystal data and structure refinement for compound <u>2</u> .....	49
22 Atomic coordinates ( $\times 10^4$ ) and equivalent isotropic displacement parameters ( $A^2 \times 10^3$ ) for compound <u>2</u> .....	50
23 Bond lengths [A] and angles [deg] for compound <u>2</u> .....	51
24 Anisotropic displacement parameters ( $A^2 \times 10^3$ ) for compound <u>2</u> .....	53
25 Hydrogen bonds for compound <u>1</u> [A and deg.].....	54
26 The IR absorption bands assignment of compound <u>3</u> .....	55

Table	Page
27 <sup>1</sup> H-NMR NMR spectrum data of compound <u>3</u> compared with kolavenol.....	56
28 <sup>13</sup> C-NMR NMR spectrum data of compound <u>3</u> compared with kolavenol.....	57
29 The IR absorption bands of assignment compound <u>4</u> .....	58
30 <sup>1</sup> H-NMR chemical shifts of compound <u>4</u> and hardwickiic acid.....	60
31 <sup>13</sup> C-NMR chemical shifts of compound <u>4</u> and hardwickiic acid.....	61
32 The IR absorption bands of compound <u>5</u> .....	62
33 <sup>1</sup> H-NMR chemical shifts of compound <u>5</u> and (-)-20-benzyloxyhardwickiic acid .....	64
34 <sup>13</sup> C-NMR spectrum data of compound <u>5</u> .....	65
35 The IR absorption bands of compound <u>6</u> .....	66
36 <sup>1</sup> H-NMR chemical shifts of compound <u>6</u> and .....	68
37 <sup>13</sup> C-NMR spectrum data of compound <u>6</u> .....	69
38 Cytotoxicity activity against 6 cancer cell lines of compounds of <u>1-6</u> <i>Croton oblongifolius</i> Roxb. ....	70
39 Cytotoxicity data of compound <u>2, 3</u> and <u>5</u> .....	71
40 Antioxidant activity of compound <u>1 – 6</u> and Vitamin E .....	72
41 Isolated substances from the stem barks of <i>Croton oblongifolius</i> Roxb. From Amphur Vicheinburi Petchaboon Province.....	76

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1	<i>Croton oblongifolius</i> Roxb..... 6
2	The structure of the chemical constituents of <i>C. oblongifolius</i> Roxb..... 10
3	ORTEP drawing of Compound <u>1</u> ..... 45
4	The structure of Compound <u>1</u> ..... 45
5	ORTEP drawing of Compound <u>2</u> ..... 54
6	The structure of Compound <u>2</u> ..... 54
7	The structure of kolavenol..... 58
8	The structure of Compound <u>4</u> ..... 62
9	The structure of Compound <u>5</u> ..... 66
10	The structure of Compound <u>6</u> ..... 69
11	The IR-spectrum of compound <u>1</u> ..... 84
12	The <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <u>1</u> ..... 85
13	The <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <u>1</u> ..... 86
14	The DEPT-135,90 and <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <u>1</u> ..... 87
15	The EIMS spectrum of compound <u>1</u> ..... 88
16	The IR-spectrum of compound <u>2</u> ..... 89
17	The <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <u>2</u> ..... 90
18	The <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <u>2</u> ..... 91
19	The DEPT-135,90 and <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <u>2</u> ..... 92
20	The EIMS spectrum of compound <u>2</u> ..... 93
21	The IR-spectrum of compound <u>3</u> ..... 94
22	The <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <u>3</u> ..... 95
23	The <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <u>3</u> ..... 96
24	The DEPT-135,90 and <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <u>3</u> ..... 97
25	The EIMS spectrum of compound <u>3</u> ..... 98
26	The IR-spectrum of compound <u>4</u> ..... 99
27	The <sup>1</sup> H-NMR spectrum of compound <u>4</u> ..... 100
28	The <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <u>4</u> ..... 101
29	The DEPT-135,90 and <sup>13</sup> C-NMR spectrum of compound <u>4</u> ..... 102
30	The EIMS spectrum of compound <u>4</u> ..... 103
31	The IR-spectrum of compound <u>5</u> ..... 104

Figure	Page
32 The $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound <u>5</u> .....	105
33 The $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound <u>5</u> .....	106
34 The DEPT-135,90 and $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound <u>5</u> .....	107
35 The EIMS spectrum of compound <u>5</u> .....	108
36 The IR-spectrum of compound <u>6</u> .....	109
37 The $^1\text{H}$ -NMR spectrum of compound <u>6</u> .....	110
38 The $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound <u>6</u> .....	111
39 The DEPT-135,90 and $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound <u>6</u> .....	112
40 The EIMS spectrum of compound <u>6</u> .....	113



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**LIST OF SCHEMES**

<b>Scheme</b>	<b>Page</b>
1 The extraction procedure of the stem bark of <i>Croton oblongifolius</i> Roxb... 20	
2 Scavenging the DPPH radical by an antioxidant.....24	



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ABBRAVIATIONS

b.p.	= Boiling point'
br	= Broad ( for NMR spectrum)
c	= Concentration
° C	= Degree Celsius
CDCl <sub>3</sub>	= Duterated chloroform
CHCl	= Chloroform
cm	= centimeter
<sup>13</sup> C-NMR	= Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
COSY	= Correlated Spectroscopy
d	= Doublet (for NMR spectrum)
dd	= Doublet of doublet (for NMR spectrum)
ddd	= Doublet of doublet of doublet (for NMR spectrum)
DEPT	= Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	= Dimethylsulfoxide
δ	= Chemical shift
EI MS	= Electron Impact Mass Spectrum
EtOAc	= Ethyl acetate
g	= Gram
<sup>1</sup> H-NMR	= Proton Nuclear Magnetic Resonance
Hz	= Hertz
HMBC	= Heteromolecular Multiple Bond Correlation
HMQC	= Heteromolecular Multiple Quantum Correlation
IR	= Infrared spectrum
<i>J</i>	= Coupling constant
kg	= Kilogram
L	= Liter
M <sup>+</sup>	= Molecular ion
mg	= Milligram
MHz	= Megahertz
ml	= Milliliter
mm	= Millimeter
m.p.	= Melting point
MeOH	= Methanol
M	= Molar
<i>m/z</i>	= Mass to charge ratio
M.W.	= Molecular weight
MS	= Mass spectrometry
No.	= Number
NMR	= Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	= Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
ppm	= Part per million
q	= Quartet (for NMR spectrum)
s	= Singlet (for NMR spectrum)
t	= Triplet (for NMR spectrum)
TLC	= Thin Layer Chromatography
wt	= Weight
R <sub>f</sub>	= Retention factor in chromatography