

**ANTIPROLIFERATIVE EFFECT ON LIVER CANCER CELLS  
OF *DIPTEROCARPUS OBTUSIFOLIUS* ROOT**



**WORANAN CHANCHERDLHA**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE  
OF MASTER OF SCIENCE  
(PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND PHYTOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2016**

Copyright by Mahidol University

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

**ANTIPROLIFERATIVE EFFECT ON LIVER CANCER CELLS OF *DIPTEROCARPUS OBTUSIFOLIUS* ROOT**

WORANAN CHANCHERDLHA 5636686 PYPP/M

M.Sc. (PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND PHYTOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : WEENA JIRATCHARIYAKUL, Dr.rer.nat., (PHYTOCHEMISTRY), TANAWAN KUMMALUE, M.D., Ph.D. (MEDICAL SCIENCE)

**ABSTRACT**

*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. ex Miq. (local name : Hiang) is a dipterocarpaceous plant. In Thailand, *D. obtusifolius* root has been used in traditional Thai medicine for the ailments caused by liver cancer. This study aimed to investigate the plant substance with the antiproliferative effect on liver cancer and quantitate it using high-performance liquid chromatography (HPLC). The study began with the isolation of the plant substance from the dichloromethane root extract using silica gel column, with a gradient mobile phase of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. The substances DO-1 and DO-2 were isolated. The structures of both compounds were elucidated using spectroscopic analyses. The results revealed that DO-1 was ursolic acid (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>) with relative molecular mass (M<sub>r</sub>) of 456.70 and DO-2 was β-sitosteryl glucoside (C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>) with relative molecular mass (M<sub>r</sub>) of 576.44. The antiproliferative effect of DO-1, ethanolic and water root extracts were performed on two liver cancer cell lines (Hep3B and C3A). The results showed the significant antiproliferative activities of DO-1 and ethanolic root extract against Hep3B with ED<sub>50</sub> 296.42 and 72.75 μg/mL, respectively. In addition, DO-1 showed the antiproliferative activity against human dermal fibroblast (HDF) with ED<sub>50</sub> of 52.23 μg/mL. Quantitative analysis by HPLC of DO-1 was established and validated. The optimum HPLC system comprised Hypersil® C-18 reversed phase column (250×4.6 mm, i.d. 5 μm), mobile phase using isocratic elution with methanol and 0.2% ammonium acetate in water (83:17), UV detection at 215 nm. The retention time of ursolic acid was 18.9 min. The result showed that the content of ursolic acid (DO-1) in *D. obtusifolius* root was 0.0047% w/w.

**KEYWORDS :** *DIPTEROCARPUS OBTUSIFOLIUS* / URSOLIC ACID /  
ANTIPROLIFERATIVE EFFECT ON LIVER CANCER CELL /  
QUANTITATIVE HPLC ANALYSIS

141 pages

ผลการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับของรากเหียง

ANTIPROLIFERATIVE EFFECT ON LIVER CANCER CELLS OF *DIPTEROCARPUS*  
*OBTUSIFOLIUS* ROOT

วรณันท์ จันทร์เจ็ดหล้า 5636686 PYPP/M

วท.ม. (เภสัชเคมีและพฤกษเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: วิภา จิรัจฉยากุล, Dr.rer.nat. (PHYTOCHEMISTRY),  
ธนวรรณ กุมมาลือ, MD., Ph.D. (MEDICAL SCIENCE)

#### บทคัดย่อ

*Dipterocarpus obtusifolius* Teijsm. ex Miq. ชื่อท้องถิ่น : เหียง เป็นพืชในวงศ์ยาง (Dipterocarpaceae) ในประเทศไทย รากเหียงใช้เป็นส่วนประกอบในตำรับยารักษา มะเร็งตับ การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อทำการพิสูจน์สารต้านเซลล์มะเร็งตับจากรากเหียง และวิเคราะห์ปริมาณสารดังกล่าวโดยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) การศึกษาเริ่มจากการสกัดแยกสารจากรากเหียงด้วยคอลัมน์ซิลิกาเจล โดยใช้ไดคลอโรมีเทนและเมทานอลเป็น gradient mobile phase สามารถแยกสารได้ 2 ชนิด ซึ่งเมื่อนำไปพิสูจน์โครงสร้างด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปี พบว่าสาร DO-1 คือ ursolic acid ( $C_{30}H_{48}O_3$ ) มีมวลโมเลกุล ( $M_r$ ) 456.70 และสาร DO-2 คือ  $\beta$ -sitosteryl glucoside ( $C_{35}H_{60}O_6$ ) มีมวลโมเลกุล ( $M_r$ ) 576.44 เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (Hep3B และ C3A) ของสาร DO-1, สารสกัดเอทานอลและสารสกัดน้ำของรากเหียง พบว่า สาร DO-1 และสารสกัดเอทานอลของรากเหียง แสดงฤทธิ์ยับยั้ง Hep3B อย่างมีนัยสำคัญด้วยค่า  $ED_{50}$  296.42  $\mu\text{g/mL}$  และ 72.75  $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ นอกจากนี้สาร DO-1 ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์ผิวหนังปกติ (HDF) ด้วยค่า  $ED_{50}$  52.23  $\mu\text{g/mL}$  จากการประเมินวิธีวิเคราะห์ (method validation) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณสาร DO-1 ด้วยวิธี HPLC ประกอบด้วยคอลัมน์ C-18 Hypersil<sup>®</sup> (250×4.6 mm, i.d. 5  $\mu\text{m}$ ) ใช้เมทานอลและสารละลาย 0.2% แอมโมเนียมอะซิเตต เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ อัตราส่วน 83:17, ตรวจวัด UV ที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร retention time ของ ursolic acid ปรากฏที่ 18.9 นาที จากการวิเคราะห์ปริมาณ ursolic acid ในรากเหียง พบว่ามีปริมาณ ursolic acid 0.0047% w/w