วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine
ปีที่ ๘ ฉบับที่ ๒-๓ พฤษภาคม-ธันวาคม ๒๕๕๓ Vol. 8 Nos. 2-3 May-December 2010

นิพนธ์ต้นฉบับ

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ลดไขมันของใบชะมวง

ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก*, สมจิตร์ เนียมสกุล*, นันทีทิพ ลิ้มเพียรชอบ†, กรกนก อิงคนินันท์† ประไพ วงศ์สินคงมั่น*

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ลดไขมันในหลอดทดลองของใบชะมวง (*Garcinia cowa* Roxb. ex DC. วงศ์ Clusiaceae (Guttiferae) โดยพบว่า สารสกัดเอทานอลจากใบชะมวงสามารถยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ Caco-2 ได้ร้อยละ ๑๔.๖ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase ได้ร้อยละ ๕๗.๐๖ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ด้วยค่า IC_{50} ๑๕๖.๖๐ มคก./มล. จึงนำสารสกัดเอทานอลจากใบชะมวงมาแยกเป็นส่วนสกัดย่อยด้วยวิธีการ partition ได้เป็นสารสกัดเฮกเซน สารสกัดไดคลอโรมีเทน สารสกัดบิวทานอล และสารสกัดน้ำ. ผลการทดสอบฤทธิ์ลดไขมันในหลอดทดลอง พบว่า ที่ความเข้มข้น ๑๐๐ มคก./มล. สารสกัดเฮกเซนและสารสกัดไดคลอโรมีเทนสามารถยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ Caco-2 ได้ร้อยละ ๓๖.๗๔ และ ๓๒.๘๐ ตามลำดับ. ที่ความเข้มข้น ๑๐ มคก./มล. สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase ร้อยละ ๑๑๔.๓๔ และ ๘๐.๕๕ ตามลำดับ. สารสกัดเฮกเซนและสารสกัดไดคลอโรมีเทนมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ด้วยค่า IC_{50} ๖๗.๔๕ และ ๓๔๒.๘๐ มคก./มล. ตามลำดับ. เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากใบชะมวงด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยวิธี NMR spectrometry และเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัมกับสารที่เคยมีรายงานในอดีต พบว่า สารสกัดไดคลอโรมีเทนจากใบชะมวงมีสารกลุ่ม flavonoid C-glycoside ๒ ชนิด คือ vitexin และ orientin และยังพบ β-sitosterol เป็นองค์ประกอบ

คำสำคัญ : **ชะมวง, ฤทธิ์ลดไขมัน, องค์ประกอบทางเคมี, cholesterol uptake, pancreatic lipase, HMG CoA reductase, vitexin, orientin**

บทนำ

ชะมวง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia cowa* Roxb. ex DC. วงศ์ Clusiaceae (Guttiferae)[๑] เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูงประมาณ ๑๐ เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว ขอบใบเรียบ ใบหนายาว สีเขียวอ่อนถึงสีเขียวอมม่วงแดง ก้านใบยาว ๑-๒ ซม. ตัวใบยาว ๑๘-๒๐ ซม. ใบออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน มีกลิ่นหอม ดอกขนาดเล็ก ประมาณ ๑๐-๑๕ มม. มี ๓ กลีบ กลีบดอกแข็งสีนวล มีกลิ่นหอม ออกดอกตามกิ่ง ผลทรงกลม เว้าเป็นพู ผลมีเนื้อสีเหลือง รสฝาด ผลสุกสีเหลืองส้ม มีเมล็ดอยู่ภายใน ๔-๖ เมล็ด ใบอ่อนและยอดอ่อนของชะมวงมีรสเปรี้ยว ช่วยระบายท้อง แก้ไข้ กัดฟอกเสมหะ แก้ธาตุพิการ และใช้เป็นอาหาร[๒]

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้น พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากใบชะมวงมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น

*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จ.นนทบุรี ๑๑๐๐๐
†คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก ๖๕๐๐๐

ต้านเชื้อจุลินทรีย์[๓] ยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอล ยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase และยับยั้งเอนไซม์ HMG CoA reductase[๔] เป็นต้น

การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ลดไขมันในหลอดทดลองของสารสกัดจากใบชะมวง โดยศึกษาผลต่อการดูดซึมคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ลำไส้เพาะเลี้ยง Caco-2 ซึ่งเป็น cell-based assay และศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase และ HMG Co-A reductase ซึ่งเป็น *in vitro* enzymatic assay และได้ทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหากลุ่มสารสำคัญและศึกษาทางพฤกษเคมีเพื่อหาสารออกฤทธิ์ลดไขมันหรือสารบ่งชี้ (marker) ในการควบคุมคุณภาพใบชะมวงต่อไปในอนาคต และยังเป็นการเพิ่มเติมข้อมูลทางพฤกษเคมีของใบชะมวงซึ่งยังมีรายงานไม่มากนัก

ระเบียบวิธีศึกษา

สมุนไพร

ใบชะมวงสด น้ำหนัก ๑๐ กิโลกรัม นำมาล้างน้ำให้สะอาด อบที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส จนแห้ง นำไปบดหยาบได้ผงใบชะมวงแห้ง น้ำหนัก ๑.๙ กิโลกรัม (คิดเป็นร้อยละ ๑๙ เมื่อเทียบกับน้ำหนักใบชะมวงสด)

วัสดุและสารเคมี

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดสมุนไพรและแยกสารให้บริสุทธิ์ใช้ commercial grade โดยกลั่นซ้ำก่อนนำมาใช้

DMSO-d_6 และ CD_3OD (Wilmad Labglass, USA) สำหรับการเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี NMR spectroscopy

สารเคมีอื่น ๆ ได้แก่ anisaldehyde (Fluka, Germany) และ sulfuric acid (Labscan, Thailand), polyvinylpyrrolidone 40,000 (Fluka, USA), BCA protein assay kit (Pierce) (Thermo Fisher Scientific, USA), scintillation cocktail (Perkin Elmer, USA), HMG CoA reductase assay kit (Sigma, USA), pancreatic lipase (Sigma, USA), 4- methylumbelliferyl oleate (Sigma, USA), pravastatin (Sigma, USA), orilstat (Roche, Korea)

วัสดุวิทยาศาสตร์ที่ใช้ ได้แก่ silica gel 60 (E. Merck, Garmany), Sephadex LH20 (GE Healthcare, Sweden) และ Silica gel GF254 precoated plate, 0.25 mm (E. Merck, Germany)

วิธีการศึกษา

๑. การสกัดสาร

สกัดใบชะมวงด้วย ๙๕% เอทานอล ด้วยวิธี soxhlet extraction แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ ได้สารสกัดเอทานอล (GC-1) ซึ่งนำมา partition ต่อด้วยเฮกเซน ไดคลอโรมีเทนและบิวทานอล แล้วนำสารสกัดแต่ละส่วนที่ได้ไประเหยแห้งได้สารสกัดเฮกเซน (GC-2), สารสกัดไดคลอโรมีเทน (GC-3), สารสกัดบิวทานอล (GC-4) และสารสกัดน้ำ (GC-5) น้ำหนัก ๖๙.๒๐, ๘๕.๖๗, ๑๙๖.๗๕ และ ๔๓.๐๙ กรัม ตามลำดับ (คิดเป็นร้อยละ ๓.๖๔, ๔.๕๑, ๑๐.๓๖ และ ๒.๒๗ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำหนักใบชะมวงแห้ง)

๒. การทดสอบกลุ่มสารสำคัญในใบชะมวง[๕]

ศึกษากลุ่มของสาระสำคัญที่พบในสารสกัดต่าง ๆ จากใบชะมวง ได้แก่ terpenoids-steroids, flavonoids, phenolics, alkaloids, anthraquinones, saponins และ amines-amino acids โดยใช้ phytochemical screening test

๓. การเตรียมสารสกัดเพื่อทดสอบฤทธิ์ลดไขมันในหลอดทดลอง

สารสกัด GC-1, GC-2, GC-3 และ GC-4 ไม่สามารถละลายน้ำได้ ต้องเตรียมให้อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับ polyvinylpyrrolidone 40,000 (PVP complex) โดยสารสกัดแต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่แตกต่างกัน สำหรับสารสกัด GC-5 สามารถละลายน้ำได้ จึงไม่ต้องเตรียมเป็น PVP complex

๔. การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ Caco-2

ใช้วิธี MTT assay เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบชะมวงต่อ cell viability ของเซลล์ Caco-2[๖]

๔.๑ การเพาะเลี้ยงเซลล์ Caco-2

เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM/F12 ที่มีส่วนผสมของ ๑๐% FBS และ ๑% penicillin-streptomycin บ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ ๓๗°ซ และ CO_2 ๕% เมื่อเซลล์ Caco-2 เจริญทั่วจานเลี้ยง ทำการ subculture ทุก ๓-๔ วัน โดย detach เซลล์ด้วย ๐.๒๕% trypsin ใน Ca^{2+}-, Mg^{2+}-free phosphate buffer ที่มี EDTA ๐.๒ ก./ล. เป็น

ส่วนประกอบ

๔.๒ การทดสอบ Cell viability

เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ใน 96-well plate ที่มีความหนาแน่น ๑๐,๐๐๐ เซลล์/หลุม โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ใน CO_2 incubator เป็นเวลา ๑ วัน จากนั้นนำเซลล์ Caco-2 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดสมุนไพรผสมอยู่เป็นเวลา ๑ วัน โดยในชั่วโมงที่ ๒๒ เติมสารละลาย ๐.๕% MTT ปริมาตร ๑๐ มคล. ลงไป เมื่อครบ ๒๔ ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสารละลาย DMSO-EtOH (๑:๑ v/v) ปริมาตร ๒๐๐ มคล./หลุม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ ๓๗°ซ เป็นเวลา ๑๐ นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

๕. การยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลของสารสกัดสมุนไพร[๗]

วัดการดูดซึมคอเลสเตอรอลโดยประเมินระดับของคอเลสเตอรอลที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ Caco-2 ใช้ ezetimibe เป็น positive control

๕.๑ การเตรียม cholesterol micelles

โดยเตรียม ๒ mM taurocholate, ๕๐ μM phosphatidylcholine, ๑ μM cholesterol และ ๑ (Ci/ml [1,2-^{3}H] cholesterol มาละลายในคลอโรฟอร์ม แล้วนำมาผสมกันในหลอดแก้ว จากนั้น นำไประเหยภายใต้แก๊สไนโตรเจน และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -๒๐°ซ จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดสอบ เมื่อจะนำมาใช้ให้ ละลายใน DMEM/F12 และ sonicate แล้วนำไปกรองผ่าน ๐.๒ μm filter membrane

๕.๒ การนำเข้าคอเลสเตอรอล (cholesterol uptake) ในเซลล์ Caco-2

เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ใน 24-well plate โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๒-๓ วัน เมื่อเซลล์มีอายุ ๒-๓ สัปดาห์ เซลล์ Caco-2 จะเกิดการ differentiation เป็น monolayer ซึ่งเลียนแบบเซลล์ที่ผนังลำไส้เล็ก เมื่อจะวัดการดูดซึมหรือการนำเข้าคอเลสเตอรอลให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิด serum free-medium ที่มี [1,2-^{3}H] cholesterol micelles และสารสกัดสมุนไพรเป็นส่วนประกอบ นำไปบ่มใน CO_2 incubator เป็นเวลา ๓ ชั่วโมง จากนั้น ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ทำการล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เย็น แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย ๐.๑ M NaOH และ ๑ ก./ล. SDS จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วย BCA protein assay kit และวัดค่า radioactivity

๖. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase[๘]

เตรียมสารละลายของสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วปิเปตมา ปริมาตร ๒๕ มคล. เติม buffer (Tris-HCl, NaCl, $CaCl_2$) ที่มีค่า pH ๘.๐ แล้วจึงเติมเอนไซม์ pancreatic lipase ๒๕ มคล. ใน ขั้นตอนสุดท้าย เติม 4-methylumbelliferyl oleate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ pancreatic lipase ปริมาตร ๑๐ มคล. แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๒๕°ซ เป็นเวลา ๓๐ นาที จากนั้นนำไปวัดการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase โดยวิธี fluorometry ที่ excitation ๓๖๐ นาโนเมตร และ emission ๔๓๕ นาโนเมตร รายงานผลด้วยค่า IC_{50} ในหน่วย มคก./มล. การทดสอบนี้ใช้ orilstat เป็น positive control

๗. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HMG CoA reductase

ทดสอบด้วยวิธี *in vitro* enzymatic assay โดยใช้ HMG CoA reductase assay kit วัดการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA reductase (HMG CoA reductase) โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งการเปลี่ยนสารตั้งต้น คือ HMG Co A ไปเป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งได้แก่ กรดเมวาโลนิก Co-enzyme A และ NADP ดังนั้น ในการทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase จะประเมินการลดลงของ NADPH โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น ๓๔๐ นาโนเมตร รายงานผลเป็น %การยับยั้ง การทดสอบนี้ใช้ pravastatin เป็น positive control

๘. การแยกหาสารบริสุทธิ์

๘.๑ การแยกสารสกัด GC-2

สารสกัด GC-2 น้ำหนัก ๓๐.๗๙ กรัม นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 60 น้ำหนัก ๒๒๐ กรัม เป็นตัวดูดซับและชะด้วยส่วนผสมระหว่างเฮกเซนและอะซีโตนในลักษณะ gradient elution โดยเริ่มจาก ๐-๑๐๐% อะซีโตน ตรวจสอบผลการแยกโดยดูจาก TLC chromatogram และรวม fraction ที่ให้ TLC pattern เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด ๙ fraction (A1-A9)

นำ fraction A4 มากรองผ่าน sephadex LH20 โดยชะด้วยส่วนผสมของไดคลอโรมีเทนและเมทานอล (อัตราส่วน

๒:๑) ได้สาร friedelan-3-(-ol น้ำหนัก ๑๒ มิลลิกรัม (คิดเป็น ๐.๐๑% เมื่อเทียบน้ำหนักใบชะมวงแห้ง)[๓]

ส่วน fraction A5 นำมาแยกด้วย silica gel 60 และชะด้วย ๕% อะซีโตนในเฮกเซน ได้ ๓ fraction ย่อย (A51-A53) นำ fraction A52 มาตกผลึกซ้ำ ได้ของผสมระหว่าง β-sitosterol และ stigmasterol น้ำหนัก ๗๕ มิลลิกรัม (คิดเป็น ๐.๐๙% เมื่อเทียบน้ำหนักใบชะมวงแห้ง)[๓]

๘.๒ การแยกสารสกัด GC-3

สารสกัด GC-3 น้ำหนัก ๓๐ กรัม นำมาแยกด้วยวิธี column chromatography โดยใช้ silica gel 60 น้ำหนัก ๒๕๐ กรัม เป็นตัวดูดซับและชะด้วยส่วนผสมระหว่างเฮกเซนและอะซีโตน ในลักษณะ gradient elution โดยเริ่มจาก ๕-๑๐๐% อะซีโตน ตรวจสอบผลการแยกโดยดูจาก TLC chromatogram และรวม fraction ที่ให้ TLC pattern เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้ทั้งหมด ๙ fraction (B1-B9)

นำ fraction B1 มาละลายด้วยส่วนผสมระหว่างคลอโรฟอร์มและเมทานอล แล้วตั้งทิ้งไว้ พบว่า มีการตกผลึกเป็นผลึกรูปเข็มใส น้ำหนัก ๑๑.๙ มิลลิกรัม (คิดเป็น ๐.๐๐๑๘% เมื่อเทียบกับน้ำหนักใบชะมวงแห้ง) ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีรงคเลขผิวบางเทียบกับสาร β-sitosterol แล้วพบว่า ผลึกชนิดนี้ให้ค่า R_f เท่ากันกับ β-sitosterol

fraction B6 นำมาแยกด้วย sephadex LH20 และชะด้วยส่วนผสมระหว่างไดคลอโรมีเทน และเมทานอล (อัตราส่วน ๒:๑) ได้ผงละเอียดสีเหลือง (สารบริสุทธิ์ ๑) น้ำหนัก ๓.๕ มิลลิกรัม (คิดเป็น ๐.๐๐๐๕% เมื่อเทียบกับน้ำหนักใบชะมวงแห้ง)

fraction B7 นำมากรองผ่าน sephadex LH20 เช่นเดียวกับ fraction B6 ได้ผงละเอียดสีเหลือง (สารบริสุทธิ์ ๒) น้ำหนัก ๔ มิลลิกรัม (คิดเป็น ๐.๐๐๐๖ % เมื่อเทียบกับน้ำหนักใบชะมวงแห้ง)

ผลการศึกษา

๑. การตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญ

จากการทำ phytochemical screening test เพื่อตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญที่พบในสารสกัดเอทานอล (GC-1) และส่วนสกัดย่อยต่าง ๆ (GC-2, GC-3, GC-4 และ GC-5) จากใบชะมวง พบสารกลุ่ม terpenoids-steroids เป็นองค์ประกอบในสารสกัด GC-1, GC-2 และ GC-3 พบสารกลุ่ม phenolic ในสารสกัด GC-2, GC-3 และ GC-4 ดังแสดงในตารางที่ ๑

๒. การเตรียมสารสกัดจากใบชะมวง

การเตรียมสารสกัดชนิดต่าง ๆ จากใบชะมวงให้อยู่ในรูปที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบฤทธิ์ลดไขมันในหลอดทดลอง โดยเตรียมในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับ polyvinylpyrrolidone 40,000 ดังแสดงใน ตารางที่ ๒

๓. ผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2

ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากใบชะมวงในรูปของ PVP complex ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2 โดยสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดจะถูกนำมาทดสอบที่ ๓ ความเข้มข้น รายงานผลเป็นค่า % cell viability เทียบกับ control ซึ่งคิดเป็น ๑๐๐% cell viability ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ ๓ พบว่า สารสกัด GC-1, GC-2, GC-3, GC-4 และ GC-5 ที่ความเข้มข้น ๑๐ และ ๑๐๐ มคก./มล. ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2 แต่สารสกัดทั้ง ๕ ชนิดจากชะมวง ที่ความเข้มข้น ๑,๐๐๐ มคก./มล. มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2 โดยเฉพาะ GC-2 และ GC-5 มีค่า cell viability ต่ำกว่า ๕๐% ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นที่ ๑๐๐ มคก./มล. เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลต่อไป

๔. ผลต่อการยับยั้งการนำเข้าคอเลสเตอรอล

การศึกษาผลการดูดซึมคอเลสเตอรอล ทำโดยการวัด

ตารางที่ ๑ ผลการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหากลุ่มสารสำคัญในใบชะมวง

Phytochemical constituents	สารสกัดจากใบชะมวง				
	GC-1	GC-2	GC-3	GC-4	GC-5
Terpenoids – steroids	+	+	+	–	–
Flavonoids	–	–	–	–	–
Phenolics	–	+	+	+	–
Alkaloids	–	–	–	–	–
Anthraquinones	–	–	–	–	–
Saponins	–	–	–	–	–
Amines – amino acids	–	–	–	–	–

หมายเหตุ + หมายถึง พบ
– หมายถึง ไม่พบ

ตารางที่ ๒ การเตรียมสารสกัดจากใบชะมวงเพื่อทดสอบฤทธิ์

ลำดับที่	รหัสสารสกัด	ชนิดสารสกัด	อัตราส่วนสารสกัด: PVP 40,000
๑	GC-1	สารสกัดเอทานอล	๑:๔
๒	GC-2	สารสกัดเฮกเซน	๑:๖
๓	GC-3	สารสกัดไดคลอโรมีเทน	๑:๕
๔	GC-4	สารสกัดบิวทานอล	๑:๒
๕	GC-5	สารสกัดน้ำ	-

ตารางที่ ๓ ผลของสารสกัดจากใบชะมวงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2

ลำดับที่	สารสกัด	Cell viability (% of control)		
		๑๐ มคก./มล.	๑๐๐ มคก./มล.	๑,๐๐๐ มคก./มล.
๑	GC-1	๙๔.๘๔	๘๔.๑๑	๖๙.๖๙
๒	GC-2	๙๒.๔๒	๗๙.๖๗	๓๔.๖๘
๓	GC-3	๗๗.๒๙	๗๐.๕๗	๕๐.๔๐
๔	GC-4	๖๓.๘๔	๗๓.๙๖	๕๕.๒๖
๕	GC-5	๗๗.๗๒	๖๒.๐๔	๔๘.๑๖

ระดับคอเลสเตอรอลที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีที่ผ่านเข้าไปในเซลล์ Caco-2 รายงานผลเป็นค่า % การนำเข้าคอเลสเตอรอล (cholesterol uptake) เทียบกับ control ซึ่งการนำเข้าคอเลสเตอรอล คิดเป็น ๑๐๐% หากสารสกัดสมุนไพรส่งผลให้เกิดการนำเข้าคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ได้มาก แสดงว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลต่ำ ผลการทดสอบแสดงใน ตารางที่ ๔ พบว่า สารสกัดต่าง ๆ จากใบชะมวงที่ความเข้มข้น ๑๐๐ มคก./มล. สามารถยับยั้งการนำเข้าของคอเลสเตอรอลได้ในระดับที่ต่างกัน โดยทั่วไปสามารถยับยั้งการนำเข้าคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ Caco-2 ประมาณ ๑๕-๓๗% ซึ่งค่าไม่สูงนัก โดยสารสกัด GC-2 สามารถยับยั้งการนำเข้าคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด โดยให้ผลดีพอ ๆ กับ ezetimibe โดยที่ความเข้มข้น ๑๐๐ μM ezetimibe สามารถ ยับยั้งการนำเข้าคอเลสเตอรอลได้ ๓๖%

๔. ผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase

สารสกัดจากใบชะมวงทั้ง ๕ ชนิด ในรูปของ PVP complex สามารถในการยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase ในความแรงที่ต่างกันและผลการยับยั้งเป็นไปในลักษณะ dose dependent manner การทดสอบนี้ใช้ orilstat เป็น positive

ตารางที่ ๔ ผลของสารสกัดจากใบชะมวง ที่ความเข้มข้น ๑๐๐ มคก./มล. ต่อการนำเข้าคอเลสเตอรอล

ลำดับที่	สารสกัด	Cholesterol uptake (% of control)
๑	GC-1	๘๕.๖๐ ± ๒.๘๗
๒	GC-2	๖๓.๒๖ ± ๗.๒๙
๓	GC-3	๖๗.๒๐ ± ๕.๗๙
๔	GC-4	๖๗.๒๗ ± ๔.๘๐
๕	GC-5	๗๗.๗๖ ± ๗.๓๓
๖	ezetimibe ๑๐๐ μM	๖๔.๓๗

ตารางที่ ๕ ผลของสารสกัดจากใบชะมวงต่อการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase

ลำดับที่	สารสกัด	การยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase IC_{50} (มคก./มล.)
๑	GC-1	๑๙๖.๖๐
๒	GC-2	๖๗.๔๕
๓	GC-3	๓๔๒.๘๐
๔	GC-4	๑๕๖.๖๐
๕	GC-5	๑๒๗.๙๐

control โดย orilstat ที่ความเข้มข้น ๐.๐๒๕ mM สามารถยับยั้งการทำงานของ pancreatic lipase ได้ร้อยละ ๙๓.๒๓ ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ของสารสกัดจากใบชะมวงแสดงใน ตารางที่ ๕ พบว่า สารสกัด GC-2 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุดด้วยค่า IC50 เท่ากับ ๖๗.๔๕ มคก./มล.

๖. ผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase

จากการศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG

ตารางที่ ๖ ผลของสารสกัดจากใบชะมวง ที่ความเข้มข้น ๑๐ มคก./มล. ต่อการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase

ลำดับที่	สารสกัด	% การยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase
๑	GC-1	๙๗.๐๖ ± ๙.๓๑
๒	GC-2	๑๑๔.๓๔ ± ๒๔.๔๓
๓	GC-3	๘๐.๕๕ ± ๑๖.๖๕
๔	GC-4	๘๐.๒๗ ± ๔๐.๖๓
๕	GC-5	๕๖.๑๘ ± ๑๑.๖๔

ตารางที่ ๗ 500 MHz 1H NMR และ 125 MHz 13C NMR สเปกตรัมของ vitexin และ orientin (ใน CD3OD+DMSO-d6)

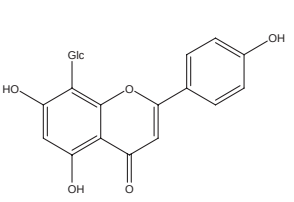
ตำแหน่ง	Vitexin[๑๐,๑๑]		Orientin[๑๑]	
	δ_H ppm	δ_C ppm	δ_H ppm	δ_C ppm
2	-	163.96	-	164.08
3	6.63 (1H, s)	102.44	6.63 (1H, s)	102.44
4	-	182.10	-	182.02
5	-	161.13	-	161.13
5-OH	13.15 (1H, s)	-	13.15 (1H, s)	-
6	6.26 (1H, s)	98.13	6.25 (1H, s)	98.13
7	-	162.55	-	163.96
7-OH	10.84 (1H, s)	-	-	-
8	-	104.60	-	104.60
9	-	155.99	-	155.99
10	-	104.03	-	104.03
1′	-	121.61	-	121.61
2′	8.01 (1H, d, J = 8.5 Hz)	128.97	7.47 (1H, s)	114.04
3′	6.88 (1H, d, J = 8.5 Hz)	115.81	-	145.80
4′	-	160.38	-	149.60
4′-OH	10.35 (1H, s)	-	-	-
5′	6.88 (1H, d, J = 8.5 Hz)	115.81	6.85 (1H, d, J = 8.5 Hz)	115.64
6′	8.01 (1H, d, J = 8.5 Hz)	128.97	7.52 (1H, d, J = 8.5 Hz)	119.36
Glc-1	4.67 (1H, d, J = 9.5 Hz)	73.38	4.67 (1H, d, J = 9.5 Hz)	73.38
Glc-2	3.82 (1H, t, J = 9.3 Hz)	70.83	3.82 (1H, t, J = 9.3 Hz)	70.76
Glc-3		78.66		78.75
Glc-4	3.0-3.6	70.54	3.0-3.6	70.69
Glc-5		81.84		81.98
Glc-6		61.29		61.63

CoA reductase ของสารสกัดจากใบชะมวง โดยวิธี *in vitro* enzymatic assay ที่ความเข้มข้นของสารสกัด (ในรูปของ PVP complex) เท่ากับ ๑๐ มคก./มล. แสดงผลเป็นค่า % การยับยั้งในรูปของค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ซึ่งมาจาก ๓ การทดลอง แต่ละการทดลองทำซ้ำ ๒ ครั้ง ดังแสดงใน ตารางที่ ๖ โดยสารสกัด GC-2 มีฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัด GC-1 ส่วนสารสกัด GC-3 และ GC-4 ให้ผลเหมือนกัน

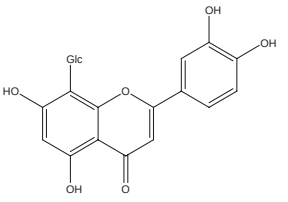
๗. การแยกสารบริสุทธิ์

จากการทดสอบฤทธิ์ลดไขมันในหลอดทดลองของสารสกัดจากใบชะมวง พบว่า สารสกัดเฮกเซน (GC-2) ในรูปของ PVP complex มีฤทธิ์ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลได้ร้อยละ ๓๗ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ด้วยค่า IC_{50} ๖๗.๔๕ มคก./มล. และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase ได้สมบูรณ์ในความเข้มข้นที่ทดสอบ ส่วนสารสกัดไดคลอโรมีเทน (GC-3) มีฤทธิ์รองลงมา โดยยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลได้ร้อยละ ๓๔ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ด้วยค่า IC_{50} ๓๔๒.๘ มคก./มล. และยับยั้งเอนไซม์ HMG CoA reductase ได้ร้อยละ ๘๐.๕๕ ดังนั้น จึงนำสารสกัด GC-2 และ GC-3 มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีต่อไป

ในงานวิจัยด้านพฤกษเคมีก่อนหน้านี้ ได้รายงานการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดเฮกเซน ด้วยวิธีการทางโครมาโทกราฟีและการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่แยกได้ ซึ่งสามารถแยกได้สาร friedelan-3-β-ol น้ำหนัก ๑๒ มิลลิกรัม, ของผสมระหว่าง β-sitosterol และ stigmasterol น้ำหนัก ๗๕ มิลลิกรัม[๓] ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดไดคลอโรมีเทน (GC-3) โดยเมื่อนำมาแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่า ได้สาร β-sitosterol และสารที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลือง ๒ ชนิด ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี NMR spectrometry (Bruker 500 MHz NMR spectrometer) และเปรียบเทียบกับข้อมูล NMR ของสารที่เคยมีรายงานมาก่อนทำให้สามารถพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารดังกล่าวได้ พบว่า สารทั้ง ๒ ชนิด คือ vitexin[๑๐,๑๑] (สารบริสุทธิ์ ๑) และ orientin[๑๑] (สารบริสุทธิ์ ๒) ข้อมูลทาง NMR spectrum ของสารทั้ง ๒ ชนิด แสดงในตารางที่ ๗



vitexin



orientin

สรุปและวิจารณ์ผล

สารสกัดเอทานอล (GC-1) จากใบชะมวง *(Garcinia cowa* Roxb. ex DC.) มีฤทธิ์ลดไขมันในหลอดทดลองที่น่าสนใจ โดยสามารถยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ Caco-2 ได้ร้อยละ ๑๔.๖ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase ได้ร้อยละ ๙๗.๐๖ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ด้วยค่า IC_{50} ๑๙๖.๖๐ มคก./มล. จึงนำมาแยกเป็นส่วนสกัดย่อยด้วยวิธีการ partition ได้เป็น ๔ สารสกัดย่อย ได้แก่ สารสกัดเฮกเซน (GC-2) สารสกัดไดคลอโรมีเทน (GC-3) สารสกัดบิวทานอล (GC-4) และสารสกัดน้ำ (GC-5) และพบว่า สารสกัด GC-2 และ GC-3 ที่ความเข้มข้น ๑๐๐ มคก./มล. สามารถยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลเข้าสู่เซลล์ Caco-2 ได้ร้อยละ ๓๖.๗๔ และ ๓๒.๘๐ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น ๑๐ มคก./มล. สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG CoA reductase ร้อยละ ๑๑๔.๓๔ และ ๘๐.๕๕ ตามลำดับ สารสกัด GC-2 และ GC-3 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ด้วยค่า IC_{50} ๖๗.๔๕ และ ๓๔๒.๘๐ มคก./มล. ตามลำดับ เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด GC-3 ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีและพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยวิธี NMR spectrometry และเปรียบเทียบข้อมูลสเปกตรัมกับสารที่เคยมีรายงานในอดีต พบว่า สารสกัด GC-3 มีสารกลุ่ม flavonoid C-glycoside ๒ ชนิด คือ vitexin และ orientin และยังพบ β-sitosterol เป็นองค์ประกอบ

ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ลดไขมันของสารสกัดจากใบชะมวงในเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture based assay) และในหลอดทดลอง (*in vitro* enzyme assay) ซึ่งให้ข้อมูลเบื้องต้นเพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกสารสกัดและความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลองระดับที่สูงขึ้นต่อไป และผลที่ได้อาจเหมือนหรือแตกต่างจากฤทธิ์ที่เกิดขึ้นในสัตว์ทดลองหรือในร่างกายมนุษย์ได้ ส่วนสารพฤกษเคมีที่แยกได้จากใบ

ชะมวงนั้นสามารถนำไปใช้เป็นสารบ่งชี้ (marker) ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อการควบคุมคุณภาพใบชะมวง และยังเป็นการเพิ่มเติมข้อมูลทางพฤกษเคมีของใบชะมวง เนื่องจากยังมีข้อมูลพฤกษเคมีของสมุนไพรชนิดนี้ไม่มากนัก

vitexin และ orientin จัดอยู่ในกลุ่ม flavonoid C-glycoside พบกระจายอยู่ทั่วไปในพืชหลายวงศ์ รวมทั้งวงศ์ Gutiferae[๑๑-๑๘] และมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของ vitexin เช่น ต้านการเกิดออกซิเดชัน[๑๘] ต้านอนุมูลอิสระ[๑๙] ลดความดันเลือด ต้านอักเสบ ต้านการบีบเกร็งกล้ามเนื้อ[๒๐] ต้านจุลชีพ[๒๑] เป็นต้น ในขณะที่ orientin มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน ต้านอาการปวด[๒๒] ต้านเชื้อรา[๒๓] เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

๑. เต็ม สมิตินันท์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. กรุงเทพฯ: บริษัท ประชาชน จำกัด; ๒๕๔๔. หน้า ๒๔๗.

๒. นันทวรรณ บุณยะประภัศร, อรนุช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน (๑). พิมพ์ครั้งที่ ๑. กรุงเทพฯ: บริษัท ประชาชน จำกัด; ๒๕๓๙. หน้า ๗๖๑.

๓. ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก, ปัทมาวดี เสตะกัณณะ, สุนิสา กำพลชัยเดช ,กัลยา อนุลักขณาปกรณ์, ประไพ วงศ์สินคงมั่น. องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากใบชะมวง. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก (ฉบับเสริม) ๒๕๕๒;๗(๒):๑๓๕.

๔. สถาบันวิจัยสมุนไพร. รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ลดไขมัน (Herbs as hypolipidemic agents) ปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๒-๒๕๕๓.

๕. Trease GE, Evans WC. Pharmacognosy. 12th ed., Alden Press, Oxford, 1983. pp. 309-537.

๖. Plumb JA, Milroy A, Kaye SB. Effect of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determinated by a novel tetrazolium-based assay. Cancer Res 1989;49:4435-40.

๗. Kirana C, Rogers PF, Bennett LE, Abeywardena MY, Patten GS. Naturally derived micelles for rapid *in vitro* screening of potential cholesterol-lowering bioactives. J Agric Food Chem 2005;53(11):4623-7.

๘. Zhang J, Kang M-J, Kim M-J, Kim M-E, SongJ-H, Lee Y-M, et al. Pancreatic lipase inhibitory activity of *Taraxacum officinale* in vitro and in vivo. Nutrition Res Prac 2008;2(4):200-3.

๙. Perchellet JH, Perchellet EM, Crow KR, Buszek KR, Brown N, Ellappan S, et al. Novel synthetic inhibitors of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase activity that inhibit tumor cell proliferation and are structurally unrelated to existing statins. Int J Mol Med 2009;24(5):633-43.

๑๐. Harborne JB, Mabry TJ. The flavonoids: advances in research. Cambridge: Chapman and Hall; 1982.

๑๑. Zhou X, Peng J, Fan G, Wu Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. J Chromatogr A 2005;1092:216-21.

๑๒. Deachattchai S, Mahabusarakam W, Phongpaichit S, Taylor WC. Phenolic compounds from the fruit of *Garcinia dulcis*. Phytochemistry 2005;66:2368-75.

๑๓. Compagnone RS, Suarez AC, Leitao SG, Monache FD. Flavonoids, benzophenones and a new euphane derivative from *Clusia columnaris* Engl. Braz J Pharmacog 2008;18(1):6-10.

๑๔. Abid R, Qaiser M. Chemotaxonomic study of Inula L. (S. STR.) and its allied Genera (Inuleae-Compositae) from Pakistan and Kashmir. Pak J Bot 2003;35(2):127-40.

๑๕. Bohm BA, Chalmers G, Bhat UG. Flavonoids and the relationship of Itea to the Saxifragaceae. Phytochemistry 1988;27(8):2651-53.

๑๖. Chen M-T, Wan C-H. Flavonoids from *Hypericum nagasawai* Hayata. J Chin Chem Soc 1988;35:167-72.

๑๗. Krasteva IN, Popov IS, Balabanova VI, Nikolo SD. Phytochemical study of *Gypsophila trichotoma* Wend. (Caryophyllaceae). Quim Nova 2008; 3(5):1125-1126.

๑๘. Kim JH, Lee BC, Kim JH, Sim GS, Lee DH, Lee KE, et al. The isolation and antioxidative effect of vitexin from *Acer palmatum*. Arch Pharm Res 2005;28(2):195-202.

๑๙. Eldahshan OA, Ayoub NA, Singab AB, Al-Azizi MM. Potential superoxide anion radical scavenging activity of Doum palm (*Hyphaene thebaica* L.) leaves extract. Rec Nat Prod 2008;2(3):83-93.

๒๐. Prabhakar MC, Bano H, Kumar I, Shamsi MA, Khan SY. Pharmacological investigations on vitexin. Planta Med 1981;43(2):396-403.

๒๑. Fu Y, Zu Y, Liu W, Hou C, Chen L, Li S, et al. Preparative separation of vitexin and isovitexin from pigeonpea extract with macroporous resins. J Chromatogr A 2007;1139:206-13.

๒๒. Da Silva RZ, Yunes RA, De Souza MM, Delle Monache F, Cechinel-Filho V. Antinociceptive properties of conocarpan and orientin obtained from *Piper solmsianum* C.DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). J Nat Med 2010;64:402-8.

๒๓. De Campos MP, Cechinel-Filho V, Da Silva RZ, Yunes RA, Zacchino S, Juarez S, et al. Evaluation of antifungal activity of *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). Biol Pharm Bull 2005;28(8): 1527-30.

Abstract

Chemical Constituents and Anti-hyperlipidemic Activity of *Garcinia cowa* Leaves

Duangpen Pattamadilok* Somchit Niumsakul* Nanteetip Limpeanchob†, Kornkanok Ingkaninan†, Prapai Wongsinkongman*

**Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000*

†Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000

The aim of this study was to investigate the chemical constituents and in vitro anti-hyperlipidemic activity of *Garcinia cowa* Roxb. ex DC. leaves (Family: Guttiferae). The ethanolic extract of *G. cowa* leaves inhibited cholesterol absoption in Caco-2 and HMG CoA reductase with a percentage inhibition of 14.6 and 97.06 percent, respectively. It showed pancreatic lipase inhibitory effect at the IC_{50} value of 196.60 μg/ml. Further partition of the ethanolic extract of *G. cowa* leaves yielded hexane extract, dichloromethane extract, butanol extract and water extract. The study revealed an interesting hypolipidemic effect of *G. cowa* leaf extracts. At the concentration of 100 μg/ml, the hexane extract and dichloromethane extract inhibited cholesterol absoption in Caco-2 at 36.74 and 32.80 percent inhibition, respectively. At the concentration of 10 μg/ml, the hexane extract and the dichloromethane extract also inhibited HMG CoA reductase at 114.34 and 80.55 percent, respectively. The hexane and dichloromethane extract of *G. cowa* leaves exhibited pancreatic lipase inhibitory activity at the IC_{50} values of 67.45 and 342.80 percent, respectively. Phytochemical study of the dichloromethane extract of *G. cowa* leaves, using chromatographic techniques and structural determination of isolated compounds by means of comparison of the NMR spectral data reported previously, showed that the dichloromethane extract of *G. cowa* leaves consisted of two flavonoid C-glycosides, including vitexin and orientin, and β-sitosterol.

Key words: ***Garcinia cowa*, anti-hyperlipidemic, chemical constituent, cholesterol uptake, pancreatic lipase, HMG CoA reductase, vitexin, orientin**