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

นิพนธ์ต้นฉบับ

# องค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดใบบัวหลวงที่มีฤทธิ์ลดไขมัน

**สมจิตร์ เนียมสกุล***
**ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก***
**นันทีทิพ ลิ้มเพียรชอบ****
**กรกนก อิงคนินันท์****
**ประไพ วงศ์สินคงมั่น***
**สุนันทา ศรีโสภณ***

***บทคัดย่อ***

**การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดจากสารสกัดเอทานอลของใบบัวหลวง (Nn-E3) เนื่องจากผลการศึกษาวิจัยเบื้องต้น พบว่าส่วนสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase โดยค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ๕๐% ($IC_{50}$) เท่ากับ ๓๖.๘๐ มคก./มล. โดยใช้ orlistat เป็นสารควบคุมบวก (positive control) และส่วนสกัดดังกล่าวยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ได้ปานกลาง (๖๕.๘๗%) ที่ความเข้มข้น ๑๐ มคก./มล. โดยใช้ pravastatin เป็นสารควบคุมบวก เมื่อทำการศึกษาต่อด้วยการแยกสารสกัดให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปี พบว่า ส่วนสกัดเอทานอลมีสารประกอบเฟลโวนอยด์ ๒ ชนิด quercetin 3-O-$\beta$-D-glucuronide (miquelianin) และ rutin**

*คำสำคัญ :* ใบบัวหลวง, องค์ประกอบเคมี, ฤทธิ์ลดไขมัน

## ภูมิหลังและเหตุผล

ภาวะอ้วนเป็นภาวะที่มีความเสี่ยงสูงจากการเกิดโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ เช่น ความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ เบาหวาน ข้อเสื่อม รวมทั้งโรคมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเยื่อบุมดลูก เป็นต้น[๑] ในการรักษาภาวะอ้วนหรือการมีระดับไขมันสูงในร่างกายนั้น ยาแผนปัจจุบันที่ใช้อยู่มีหลายกลุ่ม โดยยาบางกลุ่มมีกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ตัวอย่างเช่น ยาในกลุ่ม statins มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ซึ่งส่งผลให้ยับยั้ง HMG-CoA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของคอเลสเตอรอล จึงทำให้ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดชนิด low-density lipoprotein cholesterol ได้[๒,๓] แต่ยา กลุ่มนี้มีผลข้างเคียงต่อการทำงานของกล้ามเนื้อและตับ นอกจากนี้ ยาบางชนิด เช่น orlistat ซึ่งเป็น potent competitive inhibitor ของ gastric และ pancreatic lipase มีฤทธิ์ยับยั้งการย่อยสลายไขมัน เป็นผลให้ลดการดูดซึมไขมันและเพิ่มการขับถ่ายออกทางอุจจาระ ดังนั้น สมุนไพรไทยอาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวได้ และ มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ลดไขมันต่อไปได้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่คัดกรองสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ลดไขมัน และได้รายงานถึงผลการศึกษาวิจัยเบื้องต้น ซึ่งพบว่าสมุนไพรไทย

** สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดนนทบุรี ๑๑๐๐๐*
*** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ๖๕๐๐๐*

หลายชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองได้ในความแรงที่แตกต่างกัน[๔]

บัวหลวงเป็นพืชที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* Gaertn. วงศ์ Nelumbonaceae และมีชื่อเรียกตามท้องถิ่นได้แก่ สัตตบงกช สัตตบุษย์ อุบล[๕] จากการสืบค้นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ มีรายงานว่า สารสกัดบัวหลวงพบสารสำคัญในส่วนต่าง ๆ ของบัวหลวง ดังนี้ ส่วนใบประกอบด้วย nuciferine, pronuciferine, roemerine, asimilobine, lirinidine, nornuciferine, *O*-nornuciferine และ *N*-nornuciferine เมล็ดบัวประกอบด้วย liensinine และ lotusine ดีบัวประกอบด้วย liensinine, lsoliensinine, lotusine, neferine, methylcorypalline, higenamine, di-armepavine และ 4′-methyl-*N*-methylcoclaurine และฝักบัวประกอบด้วย nuciferine, *N*-nornuciferine, oxoushinsunine และ *N*-norarmepavine[๖]

สำหรับการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่า บัวหลวงมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ส่วนสกัดด้วยน้ำและเอทานอลผงดอกบัวหลวง มีฤทธิ์ลดปริมาณน้ำตาลในเลือดของกระต่ายปกติ และมีฤทธิ์เทียบเท่ากับ ๕๐% ของยามาตรฐาน tolbutamide ขนาด ๒๕๐ มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว ๑ กิโลกรัม เมล็ดบัวมีโปรตีนประมาณ ๑๔% โปรตีนที่สกัดจากเมล็ดบัวเมื่อนำมาให้หนูขาวที่เป็นเบาหวานกินประมาณ ๒ สัปดาห์ พบว่าช่วยลดน้ำตาลในเลือดได้ประมาณ ๔๔%[๖-๘] ฤทธิ์ลดคอเลสเตอรอลและไขมันในเลือด[๙] ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง รากสดของบัวหลวงสารสกัดชั้น ethyl acetate มีฤทธิ์ยับยั้งเนื้อเยื่อเซลล์ที่ความเข้มข้น ๒๐๐.๐ มคก./มล.[๑๐] ฤทธ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดเกสรด้วยน้ำ มีฤทธ์ต้านเชื้อ Staphylococcus aureus เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงสารสกัดเกสรแห้งบัวหลวงด้วย ๙๕% เอทานอล มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *β-Streptococcus* group A แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *S.aureus, Klebsaella pneuniae* และ *Pseudomonas aeruginosa*[๑๑]

จากผลการศึกษาวิจัยเบื้องต้นที่รายงานแล้ว[๔] พบว่า สารสกัดเอทานอลจากสมุนไพรใบบัวหลวง (Nn-Ec) ซึ่งเป็นสารประกอบ PVP และมีปริมาณสารสกัด ๒๐% มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipaseได้ โดยมีค่า $IC_{50}$ ที่ความเข้มข้น ๓๙๘.๓ มคก./มล. โดยใช้ orlistat เป็นสารควบคุมบวก และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HMG CoA reductase ได้ ๔๐.๒๒% ที่ความเข้มข้น ๑๐ มคก./มล. โดยใช้ prevastatin เป็นสารควบคุมบวก เมื่อศึกษาการแยกสารสกัดดังกล่าวให้บริสุทธิ์ขึ้น พบว่าส่วนสกัด Nn-E3 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase ได้ดีขึ้นประมาณ ๑๐ เท่า โดย $IC_{50}$ เท่ากับ ๓๖.๘๐ มคก./มล. นอกจากนี้ ส่วนสกัดดังกล่าวยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase[๔] ได้ปานกลาง (๖๕.๘๗%) ที่ความเข้มข้น ๑๐ มคก./มล. ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาแยกองค์ประกอบทางเคมีของส่วนสกัดดังกล่าวให้ได้สารบริสุทธิ์ ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์ต่อไปโดยนำไปศึกษาวิจัยเพิ่มเติม และอาจพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะไขมันสูงต่อไปในอนาคตได้

## วัสดุและวิธีการ

**๑. เครื่องมือ**

๑.๑ เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) EYELA

๑.๒ ตู้ตรวจวัดแสงอัตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น ๒๕๔ และ ๓๖๖ นาโนเมตร (nm), CAMAG

๑.๓ เครื่องสกัดสารแบบอัตโนมัติ (supercritical Fluid Extracter, SFE), APPLIED

๑.๔ เครื่องทำให้แห้งด้วยความเย็น (Freeze dryer), LABCONCO

๑.๕ Bruker AV 500 MHz NMR Spectrometer

**๒. สารเคมี**

๒.๑ กรดกำมะถันเข้มข้น และกรดเกลือเข้มข้นเป็นชนิดที่ใช้กับงานวิเคราะห์

๒.๒ สารละลายเอ็นพี-พีอีจี เป็นสารละลายชนิดหนึ่งที่ใช้ทดสอบกลุ่มสารเฟลโวนอยด์ ของส่วนสกัดหยาบใบบัวหลวง (NP-PEG reagent ย่อมาจาก Natural Products-Polyethylene Glycol reagent) มีวิธีเตรียมดังต่อไปนี้

๒.๒.๑ สารละลายเอ็นพี เตรียมโดยละลาย diphenylboric acid-2-aminoethyl ester จำนวน ๑ กรัม ในเมทานอลจำนวน ๑๐๐ มิลลิลิตร

๒.๒.๒ สารละลายพีอีจี เตรียมโดยละลาย polyethylene glycol 4,000 จำนวน ๕ กรัม ในเอทานอลจำนวน ๑๐๐ มิลลิลิตร

๒.๓ ตัวทำละลายทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองนี้เป็น

ชนิดที่ใช้กับงานวิเคราะห์

๑.๔ ตัวทำละลายที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วย Bruker AV 500 MHz NMR spectrometer ใช้ deuterated dimethylsulphoxide (DMSO-$d_6$)

**วิธีการ**

**๑. การเตรียมสมุนไพรและสารสกัดใบบัวหลวง**

**การเตรียมสมุนไพรใบบัวหลวง**

นำใบบัวหลวง (สด) น้ำหนัก ๗ กิโลกรัม มาล้างด้วยน้ำให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ และอบให้แห้งด้วยตู้อบร้อนไฟฟ้าที่อุณหภูมิ ๔๕-๕๐ องศาเซลเซียส นานประมาณ ๗๒ ชั่วโมงจากนั้นนำใบบัวหลวงที่แห้งแล้วไปบดเป็นผงและผ่านแร่งได้น้ำหนักแห้ง ๑,๒๕๐ กรัม คิดเป็นร้อยละของผลผลิต (%yield) เท่ากับ ๑๗.๘๕

**การเตรียมสารสกัดใบบัวหลวง**

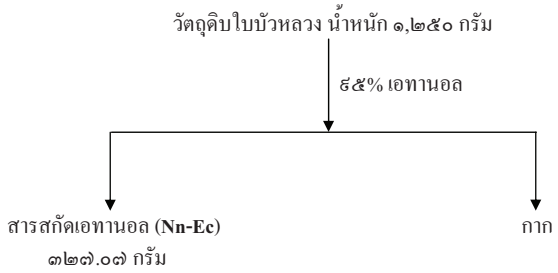
ใบบัวหลวงที่อบแห้ง บด และผ่านแร่ง นำมาสกัดด้วย ๙๕% เอทานอล ด้วย Soxhlet apparatus จะสารสกัดหยาบใบบัวหลวง (Nn-Ec) แสดงดังในแผนภูมิที่ ๑

**๒. การแยกส่วนสกัดโดยเทคนิค column chromatography**

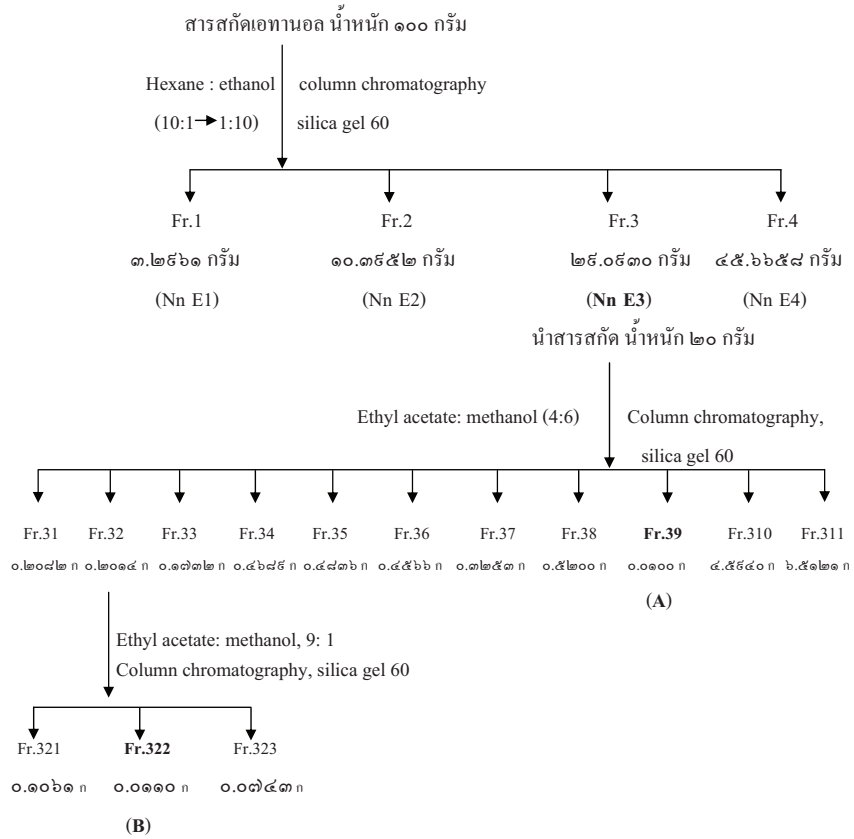
นำสารสกัดเอทานอล Nn-Ec มาแยกด้วย คอลัมน์โครมาโทรกราฟี (column chromatography) ได้ ๔ ส่วนสกัดย่อย (fraction, Fr) และทดสอบฤทธิ์ pancreatic lipase และ HMG-CoA reductase พบว่าส่วนสกัดย่อย Nn-E3 มีฤทธิ์แรงที่สุด จากนั้นนำมาแยกหาองค์ประกอบทางเคมีของสารบริสุทธิ์ A และ B แสดงดังแผนภูมิที่ ๒

**๓. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี**

๓.๑ การตรวจสอบเบื้องต้นด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี




**แผนภูมิที่ ๑** วิธีการเตรียมสารสกัด




**แผนภูมิที่ ๒** การแยกส่วนสกัดโดยเทคนิคโครมาโทกราฟี

Cyanidin Test:หากลุ่มเฟลโวนอยด์ในส่วนสกัดหยาบใบบัวหลวง โดยชั่งใบบัวหลวงน้ำหนัก ๑ กรัม บรรจุในขวดแก้วก้นกลม เติมเมทานอล ๑๐ มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ นาน ๕ นาที กรอง นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยจนเหลือ ๑ มิลลิลิตร แล้วเติมแผ่นแมกนีเซียม ๑-๒ ชิ้น และกรดเกลือเข้มข้น ๓-๔ หยด นำไปอุ่นในอ่างไอน้ำ สังเกตผลที่เกิดขึ้น[๑๐]

๓.๒ การตรวจยืนยันกลุ่มสารเฟลโวนอยด์ด้วยโครมาโทกราฟีผิวบาง

๓.๒.๑ การเตรียมสารละลายบริสุทธิ์ A (Fr. 39) และ B (Fr. 322) ที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟี จากแผนภูมิที่ ๒

ละลายสาร A และ B จำนวน ๑ มิลลิกรัม ในเมทานอล ๑ มิลลิลิตร

๓.๒.๒ การเตรียมสารมาตรฐาน (Quercitrin) ละลายสาร Quercitrin จำนวน ๑ มิลลิกรัม ในเมทานอล ๑ มิลลิลิตร

๓.๒.๓ น้ำยาแยก

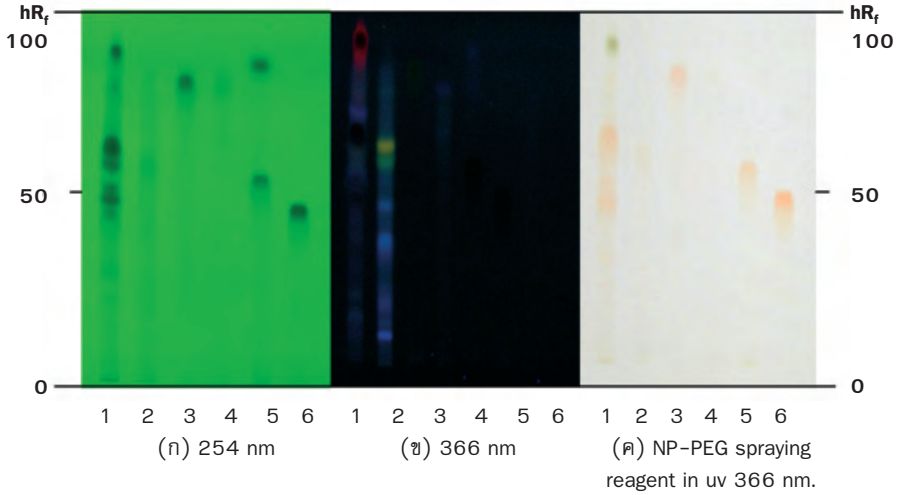
เตรียมน้ำยาแยกโดยผสมบิวทานอล กรดแอซิติก และน้ำ ในอัตราส่วน ๔:๑:๑ ให้เข้ากัน นำมาใส่ในถังโครมาโทกราฟีทิ้งไว้อย่างน้อย ๑ ชั่วโมงก่อนใช้ เพื่อให้บรรยากาศในถังอิ่มตัวด้วยน้ำยาแยก

๓.๒.๔ วิธีการ

ใช้หลอดรูเล็ก (capillary) บรรจุสารละลายใบบัวหลวง ได้แก่ Nn-Ec, Nn-E3, standard quercitrin, สารละลาย A และ B ชนิดละ ๒ ถึง ๕ มคล. มาแต้มบนแผ่นเคลือบซิลิกาเจลในแนวระดับเดียวกันตามลำดับ โดยให้ห่างจากขอบล่างของกระจกประมาณ ๒ เซนติเมตร ผึ่งให้แห้ง นำไปตั้งในถังโครมาโทกราฟีที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อน้ำยาแยกซึมขึ้นไปตามผิวที่ฉาบสูง ๑๕ เซนติเมตร นำแผ่นกระจกออกจากถังโครมาโทกราฟี ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปตรวจสอบ

๓.๒.๕ การตรวจสอบ

นำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปดูภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น ๒๕๔ นาโนเมตร และ ๓๖๖ นาโนเมตร บันทึกผล จากนั้นนำแผ่นเคลือบซิลิกาเจลไปทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ ๘๐ องศาเซลเซียส นาน ๕ นาที พ่นด้วยสารละลายเอ็นพี ตั้งทิ้งไว้ที่บรรยากาศจนแห้ง แล้วนำไปพ่นด้วยพีอีจี สังเกตสีที่เกิดขึ้นภายใต้แสงความยาวคลื่น ๓๖๖ นาโนเมตร




1 = Nn-Ec
2 = Nn-E3
3 = standard quercitrin, CAS Number [522-12-3] แต้ม ๕ มคล.
4 = standard quercitrin, CAS Number [522-12-3] แต้ม ๒ มคล.
5 = สาร B
6 = สาร A

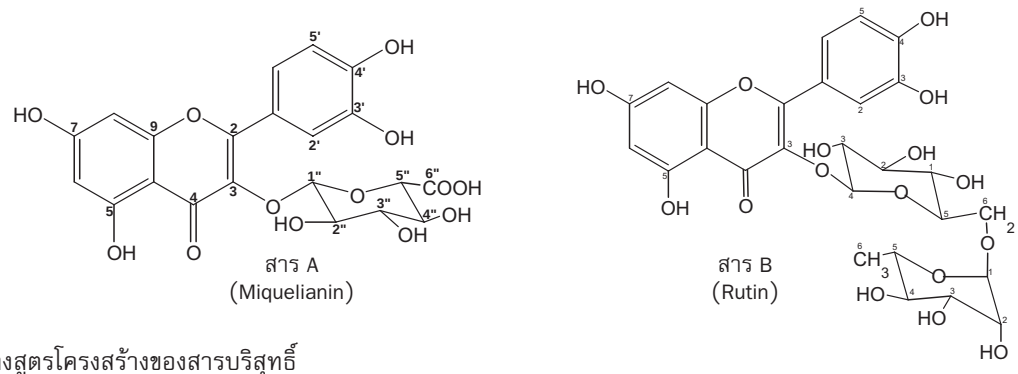
**รูปที่ ๑** แสดงการแยกส่วนสกัดโดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี

**๔. การตรวจสอบสารบริสุทธิ์ (สาร A และ B) ด้วยเทคนิค NMR**

นำสารบริสุทธิ์ สาร A น้ำหนัก ๑๐.๐ มก. และสาร B น้ำหนัก ๑๑.๐ มิลลิกรัม มาละลาย ด้วย DMSO-d6 ๓ มิลลิลิตร แล้วนำมาใส่หลอด NMR จากนั้นนำไปตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง Bruker AV 500 MHz NMR spectrometer ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

## ผลการทดลอง

จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางเคมีของสารสกัดเอทานอลใบบัวหลวงด้วยปฏิกิริยาการเกิดสี Cyanidin Test และทดสอบยืนยันผลเอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟี




**รูปที่ ๒** แสดงสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

**ตารางที่ ๑** $^{1}$H and $^{13}$C (125 MHz) NMR spectral data of miquelianin and $^{1}$H, $^{13}$C (500 MHz) of สาร A (in DMSO-$d_6$)

| Position | Miquelianin[a] | | Compound A | |
|---|---|---|---|---|
| | $^{1}$H (mult., J in Hz) | $^{13}$C | $^{1}$H (mult., J in Hz) | $^{13}$C |
| 2 | - | 156.3[d] | - | 156.5[c] |
| 3 | - | 133.4 | - | 133.4 |
| 4 | - | 177.2 | - | 177.3 |
| 5 | - | 160.6 | - | 161.1 |
| 6 | 6.15 (d, 2) | 98.6 | 6.21 (bs) | 98.8 |
| 7 | - | 164.3 | - | 164.4 |
| 8 | 6.33 (d, 2) | 93.8 | 6.41 (bs) | 93.7 |
| 9 | - | 156.7[d] | - | 156.7[c] |
| 10 | - | 103.5 | - | 103.9 |
| 1′ | - | 120.8[g] | - | 120.8[f] |
| 2′ | 7.97 (d, 2) | 115.2 | 7.81 (bs) | 116.8 |
| 3′ | - | 144.3 | - | 144.9 |
| 4′ | - | 148.1 | - | 148.6 |
| 5′ | 6.85 (d, 8) | 117.0 | 6.83 (d, 8.4) | 115.3 |
| 6′ | 7.43 (dd, 2, 8) | 121.0[g] | 7.51 (bd, 8.9) | 121.3[f] |
| 1″ | 5.40 (d, 7) | 101.7 | 5.41 (d, 6.6) | 101.7 |
| 2″ | 3.44-4.15 (m) | 73.8 | 3.27-3.52 (m) | 73.9 |
| 3″ | 3.44-4.15 (m) | 76.2 | 3.27-3.52 (m) | 76.1 |
| 4″ | 3.44-4.15 (m) | 71.5 | 3.27-3.52 (m) | 71.5 |
| 5″ | 3.44-4.15 (m) | 74.4 | 3.27-3.52 (m) | 75.4 |
| 6″ | - | 172.2 | - | 170.6 |

[a]Literature values: Ishimatsu et al., 1989 (DMSO-d6)[๑๗]

c, d, f, g, Assignments bearing the same superscript in the same column may be interchangable

**ตารางที่ ๒** $^{1}H$ and $^{13}C$ (125 MHz) NMR spectral data of rutin and $^{1}H$, $^{13}C$ (500 MHz) of สาร B (in DMSO-$d_6$)

| Position | Rutin[a] | | Compound B | |
|---|---|---|---|---|
| | $^{1}H$ (mult., *J* in Hz) | $^{13}C$ | $^{1}H$ (mult., J in Hz) | $^{13}C$ |
| 2 | - | 156.4 | - | 156.2 |
| 3 | - | 133.3 | - | 133.1 |
| 4 | - | 177.4 | - | 177.0 |
| 5 | - | 161.2 | - | 160.9 |
| 6 | 6.20 (d, 2.1) | 98.7 | 6.19 (br s) | 98.5 |
| 7 | - | 164.1 | - | 163.8 |
| 8 | 6.39 (d, 2.1) | 93.6 | 6.38 (br s) | 93.4 |
| 9 | - | 156.6 | - | 156.3 |
| 10 | - | 104.0 | - | 103.7 |
| 1′ | - | 121.2 | - | 120.9 |
| 2′ | 7.55 (m) | 115.2 | 7.52 (br s) | 115.0 |
| 3′ | - | 144.7 | - | 144.4 |
| 4′ | - | 148.4 | - | 148.1 |
| 5′ | 6.85 (d, 8.9) | 116.3 | 6.84 (d, 8.4) | 116.0 |
| 6′ | 7.55 (m) | 121.6 | 7.54 (d, 8.4) | 121.3 |
| 1″ | 5.35 (d,7.3) | 101.2 | 5.32 (d, 7.2) | 101.0 |
| 2″ | - | 74.0 | - | 73.9 |
| 3″ | - | 76.3 | - | 76.3 |
| 4″ | - | 70.6 | - | 70.4 |
| 5″ | - | 75.9 | - | 75.8 |
| 6″ | - | 67.0 | - | 66.9 |
| 1‴ | 5.35 (d, 7.3) | 100.7 | 4.37 (br s) | 100.5 |
| 2‴ | - | 70.4 | - | 70.2 |
| 3‴ | - | 70.3 | - | 69.9 |
| 4‴ | - | 71.8 | - | 71.7 |
| 5‴ | - | 68.2 | - | 68.1 |
| 6‴ | 1.00 (d, 6.1) | 17.7 | 0.98 (d, 5.1) | 71.7 |

[a]Literature values: Ishimatsu et al., 1989 (DMSO-$d_6$)[๑๗]

ผิวบาง โดยพ่นด้วยสารละลายเอ็นพี-พีอีจี แล้วนำไปส่องดูการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น ๓๖๖ นาโนเมตร พบสารเฟลโวนอยด์ จำนวน ๕-๖ ชนิด แสดงดังรูปที่ ๑ (ค)

เมื่อนำส่วนสกัด Nn-E3 ซึ่งเป็นสารสกัดที่มีฤทธิ์แรงที่สุดมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทรกราฟี ได้สาร A และสาร B และพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยโครมาโทกราฟีผิวบาง สาร A มีค่า hRf เท่ากับ ๔๔ และสาร B มีค่า hRf เท่ากับ ๕๔ (แสดงดังรูปที่ ๑ (ค) จากนั้น นำไปพิสูจน์สูตรโครงสร้างและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยการแปลผลสเปกตรา จาก $^{1}H$-NMR และ $^{13}C$-NMR spectrum ซึ่งตรวจวิเคราะห์โดยเครื่อง Bruker AV 500 MHz NMR Spectrometer ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และเปรียบเทียบข้อมูลค่า chemical shift กับ 125 MHz ของโปรตอนและคาร์บอนกับข้อมูลของสารที่เคยมีรายงานมาก่อนทำให้สามารถพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์จากบัวหลวง สาร A คือ quercetin 3-*O*-*β*-*D*-glucuronide (miquelianin) สาร B คือ Rutin แสดงดังตารางที่ ๑ และ ๒

## วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเตรียมสารสกัดสมุนไพรจำนวน ๙ ชนิด ๒๐ สารสกัดให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ โดยการเตรียมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารสกัดสมุนไพร และ PVP complex เพื่อทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ซึ่งสารสกัดสมุนไพรทุกชนิดมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ที่แตกต่างกัน โดยขึ้นกับ ความเข้มข้นและความแรงที่ใช้ในหลอดทดลอง (*in vitro*)[๔] พบว่า ส่วนสกัด Nn-Ec มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ซึ่งมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ ๓๙๘.๓๐ มคก./มล. และเมื่อทดสอบยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ HMG-CoA reductase จำนวน ๑๖ สารสกัด พบว่า Nn-E3 มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ HMG-CoA reductase ที่ความเข้มข้น ๑๐ มคก./มล. เท่ากับ ๖๕.๘๗% จากนั้นนำสารสกัดมาแยกส่วนโดยเทคนิค quick column chromatography ใช้ silica gel 60 บรรจุใน column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ๑๐.๐ เซนติเมตร สูง ๑๕.๐ เซนติเมตร ชะ column ด้วยตัวทำละลาย hexane : ethanol ในอัตราส่วน ๑๐:๑ ถึง ๑:๑๐ และใช้ตัวทำละลายครั้งละ ๑๐๐ มิลลิลิตร ระเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันได้ส่วนสกัดย่อยจำนวน ๔ ส่วน คือ Fr.1, Fr.2, Fr.3 และ Fr.4 นำสารสกัดแต่ละส่วนที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศได้สารสกัด คือ Nn-E1, Nn-E2, Nn-E3 และ Nn-E4 (คิดเป็นร้อยละของผลผลิต เท่ากับ ๐.๐๘๖๒, ๒.๗๑๙๙, ๗.๖๑๒๓ และ ๑๑.๙๔๘๗ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำหนักผงสมุนไพรแห้ง) นำส่วนสกัดย่อยทั้ง ๔ ส่วนไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase พบว่าส่วนสกัดย่อย Nn-E3 มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase ดีที่สุด ซึ่งมีค่า $IC_{50}$ เท่ากับ ๓๖.๘๐ มคก./มล. ขณะเดียวกันก็นำสารสกัดย่อย Nn-E3 มาแยกส่วนให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยเทคนิค column chromatography ได้ส่วนสกัดย่อย จำนวน ๑๑ ส่วนใช้ ethyl acetate : methanol (๔:๖) เป็นตัวชะ (คิดเป็นร้อยละของผลผลิต เท่ากับ ๐.๐๒๔๒, ๐.๐๒๓๔, ๐.๐๒๐๑, ๐.๐๕๔๕, ๐.๐๕๖๒, ๐.๐๕๓๑, ๐.๐๓๗๘, ๐.๐๖๐๕, ๐.๐๐๑๑, ๐.๕๓๖๑ และ ๐.๗๕๙๔ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำหนักผงสมุนไพรแห้ง) และได้สารบริสุทธิ์ ๑ ชนิด คือสาร A โดยใช้สารผสมของบิวทานอล กรดแอซิติก และน้ำ ในอัตราส่วน ๔:๑:๑ เป็นตัวพา (developing solvent) จากนั้นนำแผ่นเคลือบซิลิกาเจล พ่นด้วยสารละลายเอ็นพี-พีอีจี บันทึกสีที่เกิดขึ้นภายใต้แสงความยาวคลื่น ๓๖๖ นาโนเมตร (แผนภูมิที่ ๑, ๒ และรูปที่ ๑)

เมื่อนำสารบริสุทธิ์มาพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีโดย NMR ตารางที่ ๑ พบว่า 1H-NMR (500 MHz, DMSO-d6) chemical shift (δ) in ppm, พีคเดียว ๒ พีคปรากฏที่ 6.21 (1H, bs, H-6), 6.41 (1H, bs, H-8) แสดงว่าคือ meta-coupling ของสารflavonol aglycone, 7.81 (1H, bs, H-2'), 7.51 (1H, bd, H-6') และ 6.83 (1H, d, H-5') และ [M+Na]+(m/z), 501.07 และ MS fragment ions (m/z) 301 ดังนั้น สาร A คือ quercetin 3-O-$\beta$-D- glucuronide (miquelianin) มีรายงานการวิจัยพบว่าสาร miquelianin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[๑๒] อย่างไรก็ตาม จากการศึกษานี้ แยกได้สารปริมาณน้อย จึงไม่เพียงพอต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ซึ่งน่าจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากนั้นนำส่วนสกัดย่อยของ Fr.32 มาแยกส่วนโดยเทคนิค column chromatography ได้ส่วนสกัดย่อย จำนวน ๓ ส่วน คิดเป็นร้อยละของผลผลิต เท่ากับ ๐.๐๐๘๔, ๐.๐๐๐๘ และ ๐.๐๐๕๙ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำหนักผงสมุนไพรแห้ง และได้สารบริสุทธิ์ ๑ ชนิด คือ สาร B เมื่อนำสารบริสุทธิ์มาพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีโดย NMR พบว่า 1H-NMR (500 MHz, DMSO-$d_6$) chemical shift (δ) in ppm, ๖.๑๙ (1H, bs, H-6), ๖.๓๘ (1H, bs, H-8), ๗.๕๒ (1H, bs, H-2'), พีค doublet ปรากฏที่ ๗.๕๔ (1H, d, H-6') คือ ortho-coupled ของสัญญาณ และ ๖.๘๔ (1H, d, H-5') และเทียบกับสารมาตรฐาน พบว่า สาร B คือ rutin (แสดงดังตารางที่ ๒) มีรายงานการวิจัยพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[๑๓,๑๔] และฤทธิ์ลดไขมัน[๑๕,๑๖]

จากผลการทดลององค์ประกอบทางเคมีของใบบัวหลวงในด้านการแยกสารและพิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากสมุนไพรมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพได้ โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการย่อยไขมันนั้น อาจจะมีประโยชน์สำหรับผู้ที่มีความเสี่ยงต่อภาวะไขมันในเลือดสูงหรือ ผู้ที่นิยมรับประทานอาหารไขมันสูง โดยสมุนไพรดังกล่าวอาจช่วยยับยั้งการย่อยไขมันจากอาหาร และในที่สุด จะลดการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ เนื่องจากผลการศึกษานี้เป็นผลการศึกษาเบื้องต้นในหลอดทดลองเท่านั้น ดังนั้น การศึกษาวิจัยฤทธิ์ลดไขมันในสัตว์ทดลอง การศึกษา

ด้านพิษวิทยา และการวิจัยทางคลินิกควรดำเนินการต่อไป ควบคู่กับการแยกสารอื่น ๆ ที่เป็นสารออกฤทธิ์ดังกล่าว และพัฒนาวิธีการควบคุมคุณภาพ หากต้องการพัฒนาสมุนไพรดังกล่าวเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป

## สรุปผลการทดลอง

เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบบัวหลวงซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ pancreatic lipase และ HMG-CoA reductase โดยวิธีทางโครมาโทกราฟี และ พิสูจน์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ด้วยเทคนิค สเปกโตรสโคปี ได้แก่ NMR และ MS spectrometry พบว่า สารสกัดเอทานอล จากใบบัวหลวงมี miquelianin และ rutin เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารทั้ง ๒ ชนิดนี้เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เคยมีรายงานในอดีต ดังนั้น สารทั้ง ๒ ชนิดนี้จึงสามารถนำมาใช้เป็นสารบ่งชี้ทางเคมี (chemical marker) ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรชนิดนี้ต่อไปได้

### เอกสารอ้างอิง


๑. Zhang J, Kang MJ, Kim MJ, Kim ME, Song JH et al. Pancreatic lipase inhibitory activity of Taraxacum offcinale in vitro and in vivo. Nutrition Research and Practice 2008; 2(4):200-3.

๒. Bhutani KK, and Gohil VM. Natural products drug discovery research in India: Status and appraisal 2010;48:199-207.

๓. Nabekura T, Yamaki T, Ueno K, and Kitagawa S. Effect of plant sterols on human multidrug transportors ABCB1 and ABCC1. Biochem Biophys Res Commun 2008;369(2):363-8.

๔. สมจิตร์ เนียมสกุล, ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก, นันทีทิพ ลิ้มเพียรชอบ, กรกนก อิงคนินันท์, ประไพ วงศ์สินคงมั่น. ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเอนไซม์ pancreatic lipase และ HMG-CoA reductase. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 2553;8:161-9.

๕. เต็ม สมิตินันทน์. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. กรุงเทพมหานคร: ประชาชน; ๒๕๔๔. หน้า ๓๗๔.

๖. อัญชลี จูฑะพุทธิ. ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบัวหลวง. วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ๒๕๔๖;๑(๑):๖๑-๓.

๗. Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S and Ohizumi. Anti-obesity effect of Nelumbo nucifera leaves extract in mice and rats. J Ethnopharmacol 2006;106:238-44.

๘. มาลี บรรจบ, สุธิดา ไชยราช. การศึกษาสรรพคุณลดน้ำตาลในเลือดของพันธุ์ไม้ไทย นนทบุรี. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. บริษัท เอส อาร์ พริ้นติ้ง แมสโปรดักส์ จำกัด; ๒๕๔๑. หน้า ๘๖-๗.

๙. Onishi E. Yamada K. Yamada T. et al. Comparative effects of crude drugs on serum lipids. Chem Pharm Bull 1984;32(2):646-50.

๑๐. Koshimizu K. Ohigashi H. Tokuda H. Kondo A. Yamaguchi K. Screening of edible plants against possible anti-tumor promoting activity. Cancer Lett 1988;39(3):247-57.

๑๑. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. บัวหลวง. www.drug.pharmacy.psu.ac.th/wbfile/ 281254716513

๑๒. Alexandra B. Bentz. A Review of Quercetin: Chemistry, Antioxidant properties, and bioavailability. The Journal of Young Investigators: an undergraduate. Peer-Rev Sci J 2010. 24:19.

๑๓. Chat OA, Najar MH, Mir MA, Rather GM, Dar AA. Effects of surfactant micelles on solubilization and DPPH radical scavenging activity of Rutin. J Colloid Interface Sci. 2011 Mar 1;355(1):140-9. Available from http//www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21194710.

๑๔. Almeida JS, Lima F, Ros SD, Bulhões LO, de Carvalho LM, Beck RC. Nanostructured systems containing rutin: *In vitro* antioxidant activity and photostability studies. Nanoscale Res Lett. 2010 Jul 15;5(10):1603-1610. Available from http// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21076700.

๑๕. Huang W, Ye X, Li X, Zhao Z, Lan P et al. The inhibition activity of chemical constituents in hawthorn fruit and their synergistic action to HMG-CoA reductase. 2010;35(18):2428-31. Available from http// www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21141493.

๑๖. Wu CH, Lin MC, Wang HC, Yang MY, Jou MJ, Wang CJ. Rutin inhibits oleic acid induced lipid accumulation via reducing lipogenesis and oxidative stress in hepatocarcinoma cells. J Food Sci. 2011 Mar;76(2):T65-72. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.02033.x. Available from http//www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535797.

๑๗. Ishimatsu M, Tanaka T, Nonaka G and Nishioka I: A and B from the leaves of *Alnus sieboldiana*. Phytochemistry 1989;28:3179-84.

## Abstract

**Chemical Constituents of *Nelumbo nucifera* Gaertn Leaf Extract Exhibiting Hypolipidemia Activity**



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

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

***Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000*



**The purpose of this study was to investigate and isolate compounds from ethanolic extract of lotus leaves (*Nelumbo nucifera* Gaertn) exhibiting inhibitory activity against pancreatic lipase or HMG-CoA reductase. From a previous study, it was found that the partially purified portion of the ethanolic extract of lotus leaves (Nn-E3) showed the best inhibitory activity against pancreatic lipase enzyme, with $IC_{50}$ at 36.80 μg/ml, using orlistat as a positive control. In addition, the crude extract at the concentration of 10 μg/ml showed moderate inhibitory activity (65.87%) against HMG-CoA reductase, using pravastatin as a positive control. Therefore, it was interesting to further isolate the constituents from Nn-E3. As a result, two flavonoid compounds (A, B) were purified using column chromatography and their chemical structures were elucidated using NMR and MS spectroscopic techniques. These compounds were identified as quercetin 3-*O*-*β*-*D*-glucuronide (miquelianin) and rutin respectively.**



***Key words:*** ***Nelumbo nucifera*** **Gaertn. leaf, miquelianin, quercetin 3-*O*-*β*-*D*-glucuronide, rutin**