องค์ประกอบทางเคมีของชะมวง (*Garcinia cowa* Roxb. ex DC.) และความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

Chemical Constituents of *Garcinia cowa* Roxb. ex DC. and Their Cytotoxicity

ชุติโชติ ปัทมดิลก[1*] จตุพล เหลี่ยงสกุล[2] สุพจนา สิทธิกูล[1] และ รุทธ์ สุทธิศรี[1]
Chutichot Pattamadilok[1*], Jatupol Liangsakul[2], Supotchana Sitthigool[1] and Rutt Suttisri[1]

บทคัดย่อ

ชะมวง (*Garcinia cowa* Roxb. ex DC.) เป็นพรรณไม้ในวงศ์ Guttiferae พบมากทางภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศไทย มีหลายรายงานการวิจัย พบว่า องค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดจากส่วนต่าง ๆ ของชะมวง เช่น ใบ กิ่ง เปลือกต้น มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งหลายชนิด จึงน่าสนใจที่จะศึกษาพืชชนิดนี้ต่อไป การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของชะมวง โดยอาศัยฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อชี้นำการแยกสารบริสุทธิ์จากชะมวง โดยทำการสกัดสารจากส่วนต่าง ๆ ของชะมวง 8 ส่วน ได้แก่ ใบ ดอก ผล เนื้อไม้ เปลือกต้น ราก เปลือกราก และยาง ด้วยวิธีแช่หมักในเอทานอล แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด คือ มะเร็งลำไส้ (SW620) มะเร็งปอด (CHAGO-KI) และมะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) ด้วยวิธี MTT พบว่า สารสกัดเอทานอลจากยางชะมวงแสดงฤทธิ์ดีที่สุด จึงนำมาเตรียมเป็นส่วนสกัดย่อยโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วนเป็นส่วนสกัดเฮกเซน เอทิลอะซีเตท และ บิวทานอล แล้วทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอีกครั้ง เลือกส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทมาทำการแยกสารบริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโทกราฟี ได้สารบริสุทธิ์ จำนวน 4 ชนิด ซึ่งเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีพบว่า สารที่แยกได้ คือ α-mangostin, cowanin, cowanol และ 7-*O*-methylgarcinone E ซึ่งสาร 3 ชนิดแรก มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่ทำการทดสอบ โดยมีค่า IC_{50} ในช่วง 1.7-4.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า ชะมวงมีศักยภาพอันอาจจะพัฒนาเป็นยาใหม่ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ชะมวง ความเป็นพิษต่อเซลล์

Abstract

Cha-muang (*Garcinia cowa* Roxb. ex DC) belongs to the family Guttiferae. It widely distributes in the south and the east of Thailand. Previous reports revealed chemical constituents from different parts of Cha-muang including leaves, branches and stem bark to possess useful biological activities, especially cytotoxicity against a number of cancer cell lines. It was therefore interesting to further study this plant. The objective of this study was to investigate the chemical constituents of Cha-muang by bioactivity-guided isolation. Eight parts of Cha-muang plant i.e. leaves, flowers, fruits, heartwood, stem bark, root, root bark

[1]ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330
[2]ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330
[1]Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, 10520
[2] Scientific and Technological Research Equipment Centre, Chulalongkorn University, Bangkok, 10520
*Corresponding author: e-mail: chutichot.p@pharm.chula.ac.th

***Received:** 10 July 2019, **Revised:** 18 July 2019, **Accepted:** 23 July 2019, **Published:** 23 August 2019*

and latex were extracted by maceration with ethanol. All extracts were tested for cytotoxic activity against three cancer cell lines including SW620, CHAGO-K and KATO-III usingMTT assay. Ethanol extract of the latex showed the strongest activity. It was further partitioned to obtain hexane, ethyl acetate and butanol extracts, then their cytotoxic activity was investigated. The ethyl acetate extract was subjected to isolation by chromatographic technique, yielding four pure compounds. Using NMR spectroscopy for structural determination, these compounds were identified as α-mangostin, cowanin,cowanoland7-*O*-methylgarcinone E. The first three compounds showed cytotoxic activity against all tested cell lines with the IC_{50} values in the range of 1.7-4.1 μg/ml. In conclusion this study showed the potential of Cha-muang to be developed into new drug in the future.

Keywords: *Garcinia cowa*, cytotoxicity

บทนำ

วงศ์ Guttiferae เป็นวงศ์ของไม้ยืนต้นหรือไม้พุ่มในเขตร้อน ลักษณะเด่นของพืชในวงศ์นี้ คือ มีน้ำยางสีเหลือง ใบเป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกัน มักมีเนื้อใบหนามัน กลีบดอกและกลีบเลี้ยงแยก ชั้นละ 5 กลีบ มีเกสรตัวผู้จำนวนมาก ยอดเกสรตัวเมียเป็นรูปจาน ซึ่งอาจติดอยู่จนเป็นผล ผลมีเนื้อ ภายในมีหลายเมล็ด พืชวงศ์นี้มีอยู่ประมาณ 40 สกุล แต่พบในประเทศไทยเพียง 7 สกุล หลายชนิดเป็นพืชที่ให้ผลที่นำมาบริโภคได้ หรือบางชนิดเราสามารถนำส่วนใบมาเป็นอาหาร ตัวอย่างสกุลของพืชในวงศ์นี้ ได้แก่ สกุล *Garcinia* ซึ่งชนิดที่รู้จักกันดี เช่น มังคุด (*G. mangostana* L.) มะดัน (*G. schomburgkiana* Pierre) มะดันป่า (*G. fusca*Pierre) ส้มแขก (*G. cambogia* Desr.) หลายชนิดปลูกเป็นไม้ประดับ ได้แก่ สกุล *Calophyllum* เช่น กระทิง (*C. inophyllum* L.) สกุล *Mammea* เช่น สารภี (*M. siamensis* Kosterm) กับสกุล *Mesua* เช่น บุนนาค (*M. ferrea* L.) ส่วนสกุล *Cratoxylum* เช่น ติ้วขาว (*C. formosum* Dyer) ใช้ส่วนยอดอ่อนและใบอ่อนเป็นผักจิ้ม

สกุล *Garcinia* เป็นสกุลของพืชวงศ์นี้ที่มีจำนวนชนิดพรรณมากที่สุดในประเทศไทย คือ ประมาณ 29 ชนิด องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุลนี้มีหลายชนิด เช่น มีสารกลุ่ม xanthone ในน้ำยางเหลือง ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ เช่น ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านไวรัส ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านอักเสบ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน นอกจากนี้ ยังพบองค์ประกอบทางเคมีกลุ่ม flavonoid, chromone, biphenyl, benzophenone, phloroglucinol, terpenoid และ steroid (Ritthiwigrom *et. al.*, 2013)

ชะมวง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Garcinia cowa* Roxb. ex DC. (ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, 2544) เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ไม่ผลัดใบ ต้นสูงประมาณ 5-10 เมตร เรือนยอดเป็นทรงพุ่มรูปกรวยคว่ำ ใบเป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกัน มีรสเปรี้ยว นำมาเป็นส่วนประกอบในอาหารได้ ดอกแยกเพศอยู่กันคนละต้น ออกตามซอกใบและกิ่ง ผลทรงกลมแป้น ขนาดประมาณ 2.5-6 เซ็นติเมตร ผิวผลเรียบเป็นมัน มีหลายการวิจัยซึ่งพบว่า องค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดจากส่วนต่าง ๆ ของชะมวงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง เช่น สาร chamuangone จากใบชะมวง มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (SBC3 และ A549) และมะเร็งเม็ดเลือดขาว (K562 และ K562/ADM) (Sakunpak *et al.*, 2017), สาร garcicowin B, C และ D จากกิ่งชะมวง มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29 และ HCT116) (Xu *et al.*, 2010) และสาร dulxanthone A จากเปลือกต้นชะมวงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (Hep G2) (Tian *et al.*, 2010) ส่วนอื่น ๆ ของต้นชะมวงยังไม่มีการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งมากนัก จึงน่าสนใจที่จะมีการวิจัยเชิงพฤกษเคมีและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของชะมวงเพิ่มเติม เพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการนำพืชพื้นบ้านชนิดนี้ มาพัฒนาสำหรับใช้เป็นยาต่อไปในอนาคต รวมทั้งข้อมูลที่ได้ยังเอื้อต่อการศึกษาเชิงเคมีอนุกรมวิธานของพืชอื่นในสกุลเดียวกัน หรือพืชชนิดอื่นในวงศ์ Guttiferae ซึ่งยังมีอีกหลายชนิดในประเทศไทยที่รอการนำมาศึกษาวิจัยต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของต้นชะมวงต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด ได้แก่ มะเร็งลำไส้ (SW620) มะเร็งปอด (CHAGO-KI) และมะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III)

2. เพื่อสกัดแยกย่อยต่อโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการเตรียมส่วนสกัด รวมทั้งการแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดชะมวงที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3. เพื่อศึกษาความเป็นพิษขององค์ประกอบทางเคมีของชะมวงต่อเซลล์มะเร็งที่ทดสอบ

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างพืชชะมวง

เก็บตัวอย่างชะมวง (*Garcinia cowa* Roxb. ex DC.) จากสวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560

2. สารเคมีและเครื่องมือ

เครื่องมือ ได้แก่ เครื่องระเหยแบบหมุน (Buchi V-750, Switzerland) และ 300 MHzNMR spectrometer (Bruker Fourier 300, Germany)

ตัวทำละลายอินทรีย์สำหรับการสกัดและแยกสารบริสุทธิ์ ได้แก่ เอทานอล (95%), เฮกเซน, เอทิลอะซีเตท, เมทานอล, บิวทานอลและ ไดคลอโรมีเทนชนิด commercial grade โดยนำมากลั่นซ้ำก่อนใช้ และใช้ตัวทำละลาย $CDCl_3$ และ acetone-d_6 (Merck, Germany) สำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)

วัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ Silica gel 60 (E. Merck, Germany), เพลท Silica gel GF254 ความหนา 0.25 มิลลิเมตร (E. Merck, Germany) และ Sephadex LH20 (GE Healthcare, Sweden)

3. การเตรียมสารสกัด

นำชะมวงมาแยกส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ใบ ดอก ผล เนื้อไม้ เปลือกต้น ราก และเปลือกราก แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ก่อนบดเป็นผงหยาบ นำมาแช่หมักในเอทานอลที่อุณหภูมิห้อง 3 ครั้ง ๆ ละ 3 วัน กรองแล้วระเหยสารสกัดให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนจะได้สารสกัดเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของชะมวง ในส่วนของยางชะมวงเมื่อเก็บตัวอย่างยางมาแล้ว นำไปละลายในเอทานอล กรองเศษชิ้นส่วนของต้นชะมวงที่ปะปนมาด้วยออก แล้วจึงระเหยตัวทำละลายออกได้เป็นสารสกัดเอทานอลจากยางชะมวง จากนั้นจึงนำตัวอย่างสารสกัดทั้ง 8 ชนิดไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง SW620, CHAGO-KI และ KATO-III ด้วยวิธี MTT ต่อไป

หลังจากทราบผลความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง นำยางชะมวงน้ำหนัก 45.07 กรัม มาละลายในเอทานอล แล้วระเหยตัวทำละลายออกบางส่วนเพื่อให้สารสกัดเข้มข้นขึ้น ก่อนจะสกัดแยกย่อยต่อโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน (Partition chromatography) กับตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซีเตท และบิวทานอล ตามลำดับ ระเหยส่วนสกัดที่ได้แต่ละส่วนให้แห้ง ได้ส่วนสกัดเฮกเซน มีน้ำหนัก 5.03 กรัม (11.16% yield) ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท 36.04 กรัม (79.96% yield) และส่วนสกัดบิวทานอล 0.34 กรัม (0.75% yield) นำส่วนสกัดทั้ง 3 ชนิดไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง พบว่า ส่วนสกัดทุกชนิดแสดงฤทธิ์ไม่ต่างกันมากนัก แต่ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทมีปริมาณมากที่สุด จึงเลือกนำส่วนสกัดนี้ไปแยกสารบริสุทธิ์ต่อไป

4. การแยกสารบริสุทธิ์

นำสารสกัดเอทิลอะซีเตทจากยางชะมวงน้ำหนัก 36.04 กรัม มาแยกด้วยควิกคอลัมน์โครมาโทกราฟี (quick column chromatography) โดยใช้ silica gel 60 น้ำหนัก 170 กรัม เป็นตัวดูดซับและชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน โดยค่อย ๆ เพิ่มสัดส่วนของไดคลอโรมีเทนจาก 10-100% ตรวจสอบผลการแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (TLC) แล้วรวม fraction ที่มี TLC pattern เหมือนกันเข้าด้วยกันได้เป็น 5 fraction (A-E) โดย fraction มีน้ำหนัก 7.52, 22.50, 0.78, 1.86 และ 0.80 กรัม ตามลำดับ

นำ fractionA (7.52 กรัม) มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ silica gel 60 น้ำหนัก 200 กรัม เป็นตัวดูดซับและชะด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน (1:1) โดยรวม fraction ที่มี TLC pattern เหมือนกันเข้าด้วยกัน ได้เป็น 17 fraction (A1-A17) นำ fraction A3 มาแยกต่อด้วยวิธีเดิม โดยใช้ silica gel 60 น้ำหนัก 20 กรัม เป็นตัวดูดซับและชะด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน (4:1) หลังจากตรวจสอบด้วย TLC สามารถรวม fraction ได้เป็น 10 fraction (A3-1 ถึง A3-10) นำ fraction A3-3 มาแยกต่อด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแยกตามขนาดโมเลกุลโดยใช้ Sephadex LH20 เป็น gel filter และชะด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล (1:1) ได้**สารบริสุทธิ์ 1** มีลักษณะเป็นผงสีส้ม น้ำหนัก 7.9 มิลลิกรัม (คิดเป็น 0.0175 % เมื่อเทียบกับน้ำหนักยางชะมวง) ในทำนองเดียวกัน เมื่อนำ fraction A3-4 มาแยกโดยใช้ Sephadex LH20 และชะด้วยตัวทำละลายผสมไดคลอโรมีเทนกับเมทานอล (1:1) ได้**สารบริสุทธิ์ 2** มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง น้ำหนัก 3.8 มิลลิกรัม (คิดเป็น 0.0084 % เมื่อเทียบกับน้ำหนักยางชะมวง) ส่วน fraction A6 เมื่อปล่อยทิ้งไว้มีการตกผลึกได้เป็น**สารบริสุทธิ์ 3** มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง น้ำหนัก 2.45 กรัม (คิดเป็น 5.44 % เมื่อเทียบกับน้ำหนักยางชะมวง)

เมื่อนำ fraction B (22.50 กรัม) มาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ silica gel 60 น้ำหนัก 400 กรัม เป็นตัวดูดซับและชะด้วยตัวทำละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน โดยค่อยๆ เพิ่มสัดส่วนของไดคลอโรมีเทนจาก 10-100% แล้วรวม fraction ที่มี TLC pattern เหมือนกันเข้าด้วยกันได้เป็น 6 fraction (B1-B6) นำ fraction B4 มาแยกต่อด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีโดยใช้ silica gel 60 น้ำหนัก 180 กรัม เป็นตัวดูดซับและชะด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน (9:1) จากนั้นรวม fraction ได้ 3 fraction (B4-1 ถึง B4-3) และเมื่อนำ fraction B4-2 มาแยกด้วย Sephadex LH20 และชะด้วยตัวทำละลายผสมเฮกเซนกับไดคลอโรมีเทน (1:1) ได้**สารบริสุทธิ์4** เป็นผลึกรูปเข็มสีเหลือง น้ำหนัก 2.21 กรัม (คิดเป็น 5.43 % เมื่อเทียบกับน้ำหนักยางชะมวง)

นำสารบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิด ไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี และเปรียบเทียบข้อมูลของ NMRกับสารที่เคยมีรายงานในอดีต

5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด SW620, CHAGO-KI และ KAGO-III ของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของต้นชะมวง ส่วนสกัดยางชะมวงด้วยตัวทำละลายต่างชนิด รวมทั้งสารบริสุทธิ์ทุกชนิดที่แยกได้จากยางชะมวงโดยการประเมินความอยู่รอดได้ของเซลล์ (cell viability) ด้วย3-(4,5)-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ซึ่งอาศัยคุณสมบัติของเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งสามารถเปลี่ยน MTT ซึ่งละลายน้ำได้ ไปเป็นผลึก formazan ที่มีสีม่วง (Carmichael *et al.*, 1987; Twentyman *et al.*, 1987)

เซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิดถูกเลี้ยงไว้ใน 96-well plate (200 ไมโครลิตร/หลุม ความหนาแน่นของเซลล์ 25 x 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร) หลังจากบ่มใน growth medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของต้นชะมวง ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือส่วนสกัด/สารบริสุทธิ์จากชะมวงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 7 ค่าความเข้มข้น (ปริมาตร 2 ไมโครลิตร/หลุม) บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นจึงดูดสารละลายส่วนบนออก แล้วเติม DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ glycine buffer (pH 10.4) 25 ไมโครลิตร เพื่อละลายผลึก formazan ที่เกิดขึ้น จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และคำนวนค่าร้อยละของเซลล์ที่อยู่รอด คำนวนค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายได้ 50% (IC_{50}) ของส่วนสกัด/สารบริสุทธิ์ และเปรียบเทียบกับยาต้านมะเร็ง doxorubicin ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมผลบวก

ผลการวิจัย

1. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดเอทานอลจากชะมวง

นำสารสกัดเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของพืชชะมวง ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด SW620, KAGO-III และ CHAGO-KI ด้วยวิธีทดสอบโดยใช้ MTT แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ (% cell survival) ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดของสารสกัดเอทานอลจากชะมวง (10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ทดสอบด้วยวิธี MTT

ส่วนที่ใช้	% cell survival		
	SW620	CHAGO-KI	KATO-III
ใบ	23	72	51
ดอก	95	101	111
ผล	15	57	48
เนื้อไม้	100	100	99
เปลือกต้น	31	93	99
ราก	98	100	108
เปลือกราก	13	44	30
ยาง	14	15	27

SW620: มะเร็งลำไส้, CHAGO-KI: มะเร็งปอด, KATO-III: มะเร็งกระเพาะอาหาร, วิธีMTT: ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดโดยใช้ MTT 3-(4,5)-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide

จากตารางที่ 1 พบว่า สารสกัดเอทานอลจากยางชะมวง มีผลทำให้เซลล์มะเร็งทั้ง 3 ชนิด มีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด โดยที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ คือ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เซลล์มะเร็งทั้งหมดที่ทดสอบรอดชีวิตเพียง 14-27% จึงนำสารสกัดจากยางชะมวงมาทำการศึกษาต่อไป

2. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของส่วนสกัดเฮกเซน เอทิลอะซีเตทและบิวทานอลจากยางชะมวง

เมื่อนำสารสกัดเอทานอลจากยางชะมวงมาแยกด้วยวิธี โครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซีเตทและบิวทานอล แล้วนำส่วนสกัดแต่ละชนิดไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT แสดงผลด้วยค่าความเข้มข้นของส่วนสกัดที่มีผลทำให้เซลล์มะเร็งมีชีวิตรอดเพียงครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) ดังในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเป็นพิษของส่วนสกัดจากยางชะมวงต่อเซลล์มะเร็ง3 ชนิดทดสอบด้วยวิธี MTT

ส่วนสกัด	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	SW620	CHAGO-KI	KATO-III
เฮกเซน	5.77	6.42	4.65
เอทิลอะซีเตท	4.91	5.71	4.25
บิวทานอล	4.58	5.14	6.49

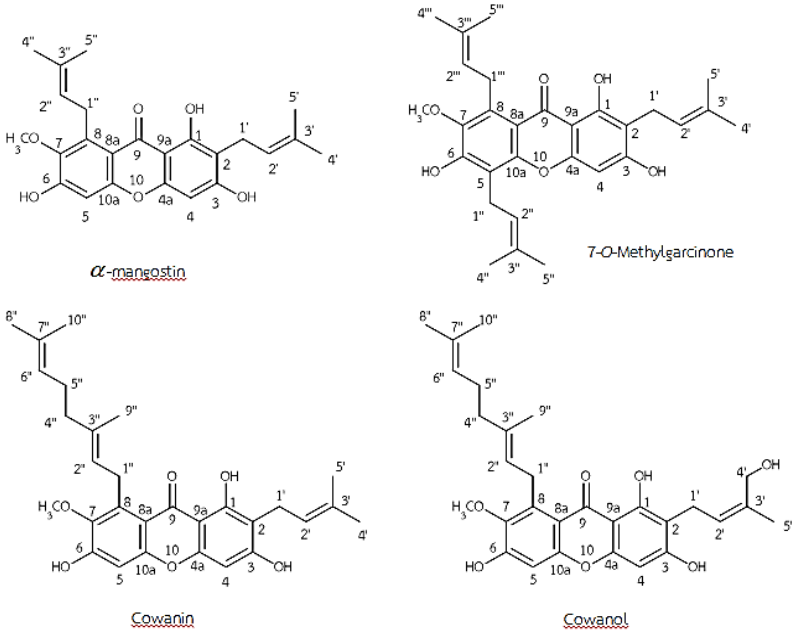
SW620: มะเร็งลำไส้, CHAGO-KI: มะเร็งปอด, KATO-III: มะเร็งกระเพาะอาหาร, วิธี MTT: ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดโดยใช้ MTT 3-(4,5)-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า ส่วนสกัดเฮกเซน เอทิลอะซีเตท และบิวทานอล จากยางชะมวงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่ทดสอบ โดยส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KATO-III มากที่สุด ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 4.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ส่วนสกัดบิวทานอล มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง SW620 และ CHAGO-KI มากที่สุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 4.58 และ 5.14 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เนื่องจากส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท มี % yield สูงถึง 79.96% ดังนั้นในการศึกษานี้จึงคัดเลือกส่วนสกัดดังกล่าวไปทำการแยกหาสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

3. การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารบริสุทธิ์จากยางชะมวง

นำสารบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิดที่แยกได้จากส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทจากยางชะมวงไปวิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปีและเปรียบเทียบข้อมูล NMR ของสารเหล่านี้กับที่เคยมีรายงานในอดีต พบว่า สารบริสุทธิ์ 1-4 เป็นสารกลุ่ม xanthone (Ritthiwigrom *et al.*, 2013) ที่มีชื่อว่า α-mangostin (Pattamadilok *et al.*, 2016; Anggia *et al.*, 2015), 7-*O*-methylgarcinone E (Na *et al.*,

2013; Likhitwitayawuid *et al.*, 1997), cowanin (Mahabusarakam *et al.*, 2005; Pattalung *et al.*, 1994) และ cowanol (Trisuwan and Ritthiwigrom, 2012; Pattalung *et al.*, 1994) ตามลำดับ โครงสร้างทางเคมีและข้อมูล NMR ของสารทั้ง 4 ชนิด แสดงในภาพที่ 1 ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 4 ตามลำดับ



ภาพที่ 1 โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทจากยางชะมวงด้วยวิธีนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี

ตารางที่ 3 ข้อมูล ^{1}H NMR ของสารบริสุทธิ์ 1-4 ที่แยกได้จากส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทจากยางชะมวง

ตำแหน่ง	α-Mangostin(ppm)	7-*O*- Methylgarcinone E (ppm)	Cowanin (ppm)	Cowanol (ppm)
4	6.29 (*s*)	6.33 (*s*)	6.33 (*s*)	6.29 (*s*)
5	6.82 (*s*)	-	6.83 (*s*)	6.80 (*s*)
1′	3.44 (*d*, *J* = 7.2 Hz)	3.46 (*d*, *J* = 7.5 Hz)	3.45 (*d*, *J* = 7.2 Hz)	3.51 (*d*, *J* = 8.1 Hz)
2′	5.27 (*m*)	5.27 (*m*)	5.26 (*m*)	5.46 (*br t*, *J* = 7.8 Hz)
4′	1.83 (*br s*)	1.85 (*s*)	1.77 (*s*)	4.35 (*br s*)
5′	1.76 (*s*)	1.77 (*d*, *J* = 1.2 Hz)	1.84 (*s*)	1.79 (*s*)
1′′	4.08 (*d*, *J* = 6.3 Hz)	3.57 (*d*, *J* = 7.5 Hz)	4.09 (*d*, *J* = 6.0 Hz)	4.08 (*d*, *J* = 6.0 Hz)
2′′	5.27 (*m*)	5.27 (*m*)	5.26 (*m*)	5.26 (*br t*, *J* = 6.0 Hz)
4′′	1.83 (*br s*)	1.87 (*s*)	2.02 (*m*)	2.04 (*m*)
5′′	1.62 (*s*)	1.69 (*s*)	2.02 (*m*)	2.04 (*m*)
6′′	-	-	5.03 (*br t*, *J* = 6.3 Hz)	5.02 (*br t*, *J* = 6.3 Hz)
8′′	-	-	1.60 (*s*)	1.60 (*s*)
9′′	-	-	1.82 (*s*)	1.82 (*s*)
10′′	-	-	1.55 (*s*)	1.54 (*s*)
1′′′	-	4.07 (*d*, *J* = 6.3 Hz)	-	-
2′′′	-	5.25 (*m*)	-	-
4′′′	-	1.83 (*s*)	-	-
5′′′	-	1.69 (*s*)	-	-
7-OCH_3	3.80 (*s*)	3.80 (*s*)	3.80 (*s*)	3.80 (*s*)
1-OH	13.76 (*s*)	13.85 (*s*)	13.80 (*s*)	13.84 (*s*)
3-OH	-	6.14 (*s*)	6.16 (*s*)	-
6-OH	-	6.40 (*s*)	6.30 (*s*)	-

ตารางที่ 4 ข้อมูล ^{13}C NMR ของสารบริสุทธิ์ 1-4 ที่แยกได้จากส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทจากยางชะมวง

ตำแหน่ง	α-Mangostin(ppm)	7-*O*- Methylgarcinone E (ppm)	Cowanin (ppm)	Cowanol (ppm)
1	160.6	160.6	160.7	160.7
2	108.5	108.2	108.4	108.1
3	161.6	161.5	161.6	161.7
4	93.3	93.3	93.3	93.6
4a	155.0	155.1	155.0	154.5
5	101.6	114.0	101.5	101.6
6	154.6	152.3	155.8	155.7
7	142.6	142.2	142.6	142.6
8	137.0	131.9	137.1	137.1
8a	112.2	111.9	112.3	102.4
9	182.1	182.4	182.0	101.6
9a	103.7	103.6	103.7	103.3
10a	155.8	153.5	154.5	155.1
1′	21.4	21.4	21.5	21.6
2′	121.5	121.5	121.4	127.0
3′	135.6	135.9	131.3	133.2
4′	25.8	17.9	25.8	62.9
5′	18.2	25.8	17.9	22.9
1′′	26.5	26.4	26.6	26.5
2′′	123.2	123.5	123.2	123.3
3′′	132.2	133.8	135.6	135.5
4′′	17.9	18.2	39.7	39.7
5′′	25.8	25.8	26.5	26.5
6′′	-	-	124.3	124.3
7′′	-	-	135.8	131.3
8′′	-	-	17.7	25.6
9′′	-	-	16.5	16.5
10′′	-	-	25.6	17.7
1′′′	-	22.6	-	-
2′′′	-	121.1	-	-
3′′′	-	132.7	-	-
4′′′	-	17.9	-	-
5′′′	-	25.8	-	-
7-OCH_3	62.0	62.0	62.1	62.0

4. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารบริสุทธิ์จากยางชะมวง

นำสาร xanthone ที่แยกได้จากยางชะมวง จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ α-mangostin, cowanin และ cowanol ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งด้วยวิธี MTT โดยใช้ doxorubicin เป็น positive control (สาร 7-*O*-methylgarcinone ที่แยกได้มีปริมาณน้อยเกินไป จึงไม่ได้นำมาทดสอบ) ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ดังแสดงในตารางที่ 5

พบว่าสารบริสุทธิ์ในกลุ่ม xanthone ทั้ง 3 ชนิดมีความเป็นพิษระดับสูงต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่ทดสอบ โดย cowanin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง SW620 และ KATO-III ได้แรงที่สุดเมื่อเทียบกับอีก 2 ชนิดที่แยกได้จากยางชะมวง ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 2.2 และ 1.7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน α-mangostin เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง CHAGO-KI สูงที่สุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 2.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับ doxorubicin ซึ่งเป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้เป็น positive control พบว่า cowanin มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ SW620 ใกล้เคียงกับ doxorubicin แต่สารบริสุทธิ์จากชะมวงทั้ง 3 ชนิดยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง CHAGO-KI และ KATO-III ได้ต่ำกว่า doxorubicin

ตารางที่ 5 ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทจากยางชะมวง ด้วยวิธี MTT

สาร	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	SW620	CHAGO-KI	KATO-III
α-mangostin	4.1	2.1	3.7
cowanin	2.2	2.8	1.7
cowanol	3.2	3.0	3.9
doxorubicin	2.5	0.6	0.7

SW620: มะเร็งลำไส้, CHAGO-KI: มะเร็งปอด, KATO-III: มะเร็งกระเพาะอาหาร, วิธี MTT: ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิดโดยใช้ MTT 3-(4,5)-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของชะมวง โดยอาศัยฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นสิ่งชี้นำการแยกสารบริสุทธิ์จากชะมวง (bioactivity-guided isolation) โดยงานวิจัยนี้เลือกความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิดคือ มะเร็งลำไส้ (SW620) มะเร็งปอด (CHAGO-KI) และมะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) สำหรับชี้นำการสกัดสารด้วยเอทานอลจากส่วนต่าง ๆ ของพืชชะมวง ได้แก่ ส่วนใบ ดอก ผล เนื้อไม้ เปลือกต้น ราก เปลือกราก และยาง แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง ด้วยวิธี MTT พบว่ายางชะมวงแสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด โดยมีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุด โดยที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ คือ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เซลล์มะเร็งทั้งหมดที่ทดสอบรอดชีวิตเพียง 14-27% การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของส่วนสกัดเฮกเซน เอทิลอะซีเตท และบิวทานอล จากยางชะมวงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่ทดสอบ โดยส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KATO-III มากที่สุด ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 4.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ส่วนสกัดบิวทานอล มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง SW620 และ CHAGO-KI มากที่สุดด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 4.58 และ 5.14 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถแยกสารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทจากยางชะมวงได้ 4 ชนิด เป็นสารกลุ่ม xanthone ได้แก่ α-mangostin, 7-*O*-methylgarcinone, cowanin และ cowanol สารบริสุทธิ์ที่แยกได้มีความเป็นพิษระดับสูงต่อเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่ทดสอบ โดย cowanin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KATO-III และ SW620 ได้แรงที่สุด ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 1.7 และ 2.2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ยางชะมวง ซึ่งมีสีเหลืองจากสารกลุ่ม xanthone ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญนั้นแสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งสูงที่สุด โดยที่ส่วนอื่น ๆ ของต้นชะมวงที่สามารถพบยางของพืชนี้ได้เช่นกัน ได้แก่ เปลือกราก เปลือกต้น หรือผล ก็มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้เช่นกัน แต่ในระดับที่ต่ำกว่า เมื่อนำสารสกัดยางชะมวงด้วยเอทานอลมาแยกเป็นส่วนสกัดย่อยด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแบ่งส่วน ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด เรียงตามลำดับความมีขั้ว คือ เฮกเซน เอทิลอะซีเตท และบิวทานอลแล้วทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งอีกครั้ง พบว่าส่วนสกัดยางชะมวงทั้ง 3 ชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งใกล้เคียงกันด้วยค่า IC_{50} ในช่วง 4.25-6.49 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แต่องค์ประกอบทางเคมีของยางชะมวงสามารถละลายได้ในเอทิลอะซีเตทในปริมาณมากที่สุด จึงทำให้ส่วนสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดนี้มี % yield สูงสุด (79.96%) ในแง่ของการนำไปใช้จึงอาจไม่จำเป็นต้องทำการ partition ยางชะมวงด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ แต่อาจหาวิธีกำจัดเศษสิ่งเจือปนต่าง ๆ ที่อาจปะปนมาในขั้นตอนการเก็บรวบรวมยางชะมวง เช่น เศษเปลือกต้น ออกไปจากน้ำยาง

อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้พิจารณาเลือกนำส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทไปแยกองค์ประกอบทางเคมีของยางชะมวงจนได้สารบริสุทธิ์ในกลุ่ม xanthone 4 ชนิด คือα-mangostin, cowanin, cowanol และ 7-*O*-methylgarcinone E ซึ่งเมื่อนำสาร 3 ชนิดแรกไปทดสอบฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งพบว่า ต่างก็มีความเป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญโดย cowanin เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) และเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) แรงที่สุดเมื่อเทียบกับสารบริสุทธิ์อีก 2 ชนิดที่แยกได้ ส่วน α-mangostin เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ปอด (CHAGO-KI) ได้สูงกว่า cowanin และ cowanol ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับยาต้านมะเร็ง doxorubicin ที่ใช้เป็น positive control พบว่า cowanin มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง SW620 ได้ใกล้เคียงกับ doxorubicin แต่ xanthone ทั้ง 3 ชนิดนี้มีฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็ง CHAGO-KI และ KATO-III ต่ำกว่า doxorubicin

องค์ประกอบทางเคมีในกลุ่ม xanthone ทั้ง 3 ชนิดของยางชะมวงที่ผู้วิจัยได้สกัดแยกมาศึกษาฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งในงานวิจัยนี้ ยังพบได้ในพืชสกุล *Garcinia* ที่พบได้ในประเทศไทยอีกหลายชนิด เช่น ในเปลือกต้นพะวา (*G. celebica* L.) (Okudaira *et al.*, 2000) หรือในรากมะดันป่า (*G. fusca*Pierre) (Nguyen *et al.*, 2017) นอกจากนี้ยังพบ cowanin กับ cowanol ในเปลือกต้นมะดัน (*G. schomburgkiana* Pierre) (Vo *et al.*, 2012) ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยที่เคยมีการรายงานไว้ก่อนเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารเหล่านี้ (Ha *et al.*, 2009; Vo *et al.*, 2012) และยืนยันว่าองค์ประกอบทางเคมีของยางชะมวงมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาร cowanin ซึ่งเป็นองค์ประกอบชนิดหลักในยางชะมวง(5.44% โดยน้ำหนักของยาง) และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีงานวิจัยพบว่า สารชนิดนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งเต้านม MDA-MB-468 แตกตายเอง (apoptosis) (Chowchaikong *et al.*, 2017) ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและเหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ LoVo แตกตายเอง (Chowchaikong *et al.*, 2018) และยับยั้งวิถี Notch (Notch pathway) ซึ่งการทำงานที่ผิดปกติไปของวิถีการส่งสัญญาณนี้ เป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งได้หลายชนิด (Arai *et al.*, 2018) จึงนับได้ว่า cowanin เป็นสารที่มีศักยภาพในการที่จะพัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งต่อไปในอนาคต โดยควรนำไปศึกษาเชิงลึก เช่น กลไกการออกฤทธิ์ การปรับเปลี่ยนโครงสร้างด้วยกระบวนการทางเคมีเพื่อให้ได้ตัวยาที่ออกฤทธิ์ได้เฉพาะเจาะจงและมีพิษน้อยต่อเซลล์ปกติ วิธีการที่เหมาะสมในการนำส่งยาเข้าสู่ร่างกาย การขจัดยาออกจากเซลล์หรือร่างกาย เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับอุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของสารสกัดและสารบริสุทธิ์จากยางชะมวง

เอกสารอ้างอิง

ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. พ.ศ. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544. บริษัทประชาชนจำกัด. กรุงเทพฯ. หน้า 247.

Anggia, V., Bakhtiar, A. and D. Arbain. 2015. The isolation of xanthones from trunk latex of *Garcinia mangostana* Linn. and their antimicrobial activities. Indonesian Journal of Chemistry. 15: 187-193.

Arai, M.A., Akamine, R., Tsuchiya, A., Yoneyama, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T. and M. Ishibashi. 2018. The Notch inhibitor cowanin accelerates nicastrin degradation. Scientific Reports.8: 5376.

Carmichael, J., De Graff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and J.B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Research. 47: 936–942.

Chowchaikong, N., Nilwarangoon, S., Tanjapatkul, N., Laphookhieo, S. and R. Watanapokasin. 2017. Apoptosis induction in breast cancer cells by cowanin. Journal of the Medical Association of Thailand. 100 (Suppl. 8): S7-S12.

Chowchaikong, N., Nilwarangkoon, S., Laphookhieo, S., Tanunyutthawongse, C. and R. Watanapokasin. 2018. P38 inhibitor inhibits the apoptosis of cowanin-treated human colorectal adenocarcinoma cells. International Journal of Oncology. 52: 2031-2040.

Ha, L.D., Hansen, P.E., Vang, O., Duus, F., Pham, H.D. and L.H. Nguyen. 2009. Cytotoxic geranylated xanthones and O-alkylated derivatives of alpha-mangostin. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 57: 830-834.

Likhitwitayawuid, K., Chanmahasathien, W., Ruangrungsi, N. and J. Krungkrai. 1998. Xanthones with antimalarial activity from *Garcinia dulcis*, Planta Medica. 64: 281-282.

Mahabusarakam, W., Chairerk, P. and W.C. Taylor. 2005. Xanthones from *Garcinia cowa* Roxb. latex. Phytochemistry. 66: 1148-1153.

Na, Z., Song, Q. and H. Hu. 2013. A new prenylated xanthone from latex of *Garcinia cowa* Roxb. Records of Natural Products. 7: 220-224.

Nguyen, N. K., Truong, X. A., Bui, T.Q., Bui, D.N., Nguyen, H.X., Tran, P.T. and L.H.D. Nguyen, 2017. α-Glucosidase inhibitory xanthones from the roots of *Garcinia fusca*. Chemistry & Biodiversity. 14: e1700232.

Okudaira, C., Ikeda, Y., Kondo, S., Furuya, S., Hirayabashi, Y., Koyano, T., Saito, Y. and K. Umezawa. 2000. Inhibition of acidic sphingomyelinase by xanthone compounds isolated from *Garcinia speciosa*. Journal of Enzyme Inhibition. 15: 129-138.

Pattalung, Na., Thongtheeraparp, W., Wiriyachitra, P. and W.C. Taylor. 1994. Xanthones of Garcinia cowa. Planta Medica 60: 365-368.

Pattamadilok, C., Suttisri, R. and S. Sitthigool.2016. Xanthones from *Garcinia cowa* flowers and their cytotoxicity. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 40 (Special Issue): 84-87.

Ritthiwigrom, T., Laphookhieo, S. and S.G. Pyne. 2013. Chemical constituents and biological activities of *Garcinia cowa* Roxb. Maejo International Journal of Science and Technology.7: 212-231.

Sakunpak, A., Matsunami, K., Otsuka, H. and P. Panichayupakaranant. 2017. Isolation of chamuangone, a cytotoxic compound against leishmania major and cancer cells from *Garciniacowa* leaves and its HPLC quantitative determination method. Journal of Cancer Research Updates. 6: 38-45.

Tian, Z., Shen, J., Moseman, A. P., Yang, Q., Yang, J., Xiao, P., Wu, E. and I.S. Kohane. 2008. Dulxanthone a induces cell cycle arrest and apoptosis via up-regulation of p53 through mitochondrial pathway in HepG2 cells. International Journal of Cancer. 122: 31-38.

Trisuwan, K. and T. Ritthiwigrom.2012. Benzophenone and xanthone derivatives from the inflorescences of *Garcinia cowa*. Archives of Pharmacal Research. 35: 1733–1738.

Twentyman, P.R. and M. Luscombe. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. British Journal of Cancer. 56: 279–285.

Vo, H.T., Nguyen, N.T.T., Nguyen, H.T., Do, K.Q., Connolly, J.D., Maas, G., Heilmann, J., Werz, U.R., Pham, H.D. and L.H.D. Nguyen. 2012. Phytochemistry Letters. 5: 553-557.

Xu, G., Kan, W.L.T., Zhou,Y., Song, J.Z., Han, Q.B., Qiao, C.F., Cho, C.H., Rudd, J.A., Lin, G. and H.X. Xu. 2010. Cytotoxic acylphloroglucinol derivatives from the twigs of *Garcinia cowa*. Journal of Natural Products. 73: 104-108.