



รายงานการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการชีวสังเคราะห์เมลานินของส่วนสกัด
จากพญาชาและปลาไหลเผือก

The Melanin Biosynthesis inhibitory Effect of *Naringi crenulata*
(Roxb.) Nicolson and *Eurycoma longifolia* Jack. Extracts

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ
นางสาวบันัส วงษ์สุด
คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ผู้ร่วมวิจัย

นางสาวนนิตย ธีระวัฒนสุข
นาย อารี วังมณีรัตน์
นาย ฐิติเดช ลือตระกูล
นางสาว กุสุมา จิตแสง

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
หมวดเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2545



A Research Report

The Melanin Biosynthesis inhibitory Effect of *Naringi crenulata* (Roxb.) Nicolson and *Eurycoma longifolia* Jack. Extracts

Researchers

Head of Project

Buanus Wongsud

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Ubonratchathani University

Co-researchers

Nongnit Teerawattanasuk

Aree Wangmaneerat

Thitidej Leutrakul

Kusuma Jitsaeng

This Research was Financially Supported from Ubonratchathani University

In Fiscal Year, 2002

รายงานการวิจัยเรื่อง	การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการชีวสังเคราะห์เมลานินของส่วนสกัดจาก พญาชาและปลาไหลเผือก	
หัวหน้าโครงการวิจัย	นางสาวบัวนัส	วงศ์สุด
ผู้ร่วมโครงการวิจัย	นางสาวนงนิตย์	ธีระวัฒนสุข
	นายอารี	วังมณีรัตน์
	นาย จิตติเดช	ลือตระกูล
	นางสาวกฤษมา	จิตแสง
คณะเภสัชศาสตร์	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี	
ปีงบประมาณ	2545	
งบประมาณที่ได้รับ	20,000.- บาท	
คำสำคัญ	พญาชา ปลาไหลเผือก โลดทะนงแดง เอนไซม์ไทโรซิเนส	

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดเมธานอล และผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification) โดยใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอธิลอะซิเตตกับเฮกเซนอัตราส่วนต่าง ๆ กัน โดยศึกษาพืช 3 ชนิดคือ พญาชา โลดทะนงแดงและปลาไหลเผือก เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า พญาชา มีฤทธิ์มากกว่า โลดทะนงแดง และ ปลาไหลเผือก คือยับยั้งเอนไซม์ได้สูงสุด 30.90 ± 1.42 23.27 ± 0.65 และ 15.42 ± 3.29 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความแรงโดยดูจากค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 20% (IC_{20}) ในพืชชนิดเดียวกัน พบว่าสิ่งสกัดหยาบ (crude extract) และส่วนสกัด (fraction) ต่าง ๆ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ด้วย ความแรงแตกต่างกันไป โดยส่วนสกัดที่ 2 ของพญาชา มีความแรงมากกว่าสิ่งสกัดหยาบ ซึ่งมีค่า IC_{20} คือ 0.822 และ 1.156 มก./มล. ตามลำดับ ขณะที่ส่วนสกัดที่ 3 และ ส่วนสกัดที่ 1 ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ถึง 20% สำหรับโลดทะนงแดงพบว่ามีเพียงสิ่งสกัดหยาบเท่านั้นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ถึง 20% โดยมีค่า IC_{20} คือ 1.822 มก./มล. ส่วนปลาไหลเผือกพบว่าทั้งสิ่งสกัดหยาบและส่วนสกัดต่าง ๆ มีฤทธิ์ดังกล่าวค่อนข้างต่ำ และไม่มีส่วนสกัดใดสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ถึง 20 %

The Melanin Biosynthesis inhibitory Effect of *Naringi crenulata* (Roxb.) Nicolson and *Eurycoma longifolia* Jack. Extracts

Head of Project	Miss. Buanus	Wongsud
Co-researchers	Miss. Nongnit	Teerawattanasuk
	Mr. Aree	Wangmaneerat
	Mr. Thitidej	Leutrakul
	Miss. Kusuma	Jitsaeng

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ubonratchathani University

In Finance Year 2002 for 20,000.- Bath

Keyword Whitening agent, Enzyme tyrosinase

Abstract

The methanol extract and partial purification by different ratio of ethyl acetate and hexane solvents of the 3 plants, *Naringi crenulata* (Roxb) Nicolson, *Trignostemon reidides* (Kurz) Craib and *Eurycoma longifolia* Jack were studied on tyrosinase inhibitory effect. The maximal inhibitory effects of *N. crenulata* (Roxb) Nicolson, *T. reidides* (Kurz) Craib and *E. longifolia* Jack were 30.90 ± 1.42 , 23.27 ± 0.65 and $15.42 \pm 3.29\%$, respectively. Those extracts had different potency on tyrosinase inhibitory activities. Their inhibitory activities were compared by the concentration of extract that inhibits the enzyme activity 20% (IC_{20}). It was showed that the Fraction 2 of *N. crenulata* (Roxb) Nicolson was more potent than its crude extract. Their IC_{20} were 0.822 and 1.156 mg/ml, respectively. However, Fraction 1 and Fraction 3 could not reach the 20% of inhibitory effect. Meanwhile, the crude extract of *T. reidides* (Kurz) Craib showed IC_{20} at 1.822 mg/ml. The inhibitory activities of *E. longifolia* Jack was minimal. Neither crude extracts nor fractions of *E. longifolia* Jack could reach the 20% of inhibitory effect.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำรายงานการวิจัยฉบับนี้ ได้บรรลุวัตถุประสงค์และจัดเป็นรูปเล่มสำเร็จด้วยความช่วยเหลือของบุคคลหลายท่าน โดยเฉพาะ ภญ. พรพรรณ สุนทรธรรม กองเครื่องสำอาง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ผู้จุดประกายความคิดสำหรับงานวิจัยชิ้นนี้ รวมทั้งเป็นผู้เอื้อเฟื้อตัวอย่างพืชในการศึกษา ตลอดจนให้คำแนะนำในการทำวิจัยต่างๆ อ. สุภาภรณ์ ฤกษ์พูลสวัสดิ์ และ อ. ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ ที่ช่วยตรวจทานและแก้ไขรายงาน นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ในการอำนวยความสะดวกทั้งด้านอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้ การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2545

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2546

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	2
2.1 กระบวนการชีวสังเคราะห์เมลานิน	2
2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน	4
2.3 เอนไซม์ไทโรซิเนส และสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	4
2.4 คุณลักษณะของพืชที่นำมาศึกษา	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	10
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี	10
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	15
4.1 การเก็บและการเตรียมพืชสมุนไพรก่อนการสกัด	15
4.2 การสกัดพืชสมุนไพรโดยวิธี Maceration	16
4.3 การแยกส่วนประกอบของสิ่งสกัดหยาบโดยวิธี column chromatography.....	18
4.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	23
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	32
บรรณานุกรม	34

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักของสิ่งสกัดหยาบและปริมาตรตัวทำละลาย 16	16
ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลของส่วนสกัดพญาชา ปลาไหลเผือกและไลดะนงแดง 20	20
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณและสัดส่วนของ eluting solvent ที่ใช้ในการสกัดพญาชา ไลดะนงแดงและปลาไหลเผือกด้วยเทคนิค column chromatography 21	21
ตารางที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร 24	24
ตารางที่ 5 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดพญาชา 26	26
ตารางที่ 6 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดปลาไหลเผือก..... 28	28
ตารางที่ 7 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดไลดะนงแดง 30	30

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ขั้นตอนวิธีสังเคราะห์เมลานิน	3
รูปที่ 2 ลักษณะส่วนต่างๆของพญาชา	7
รูปที่ 3 ลักษณะส่วนต่างๆของปลาไหลเผือก	8
รูปที่ 4 ลักษณะส่วนต่างๆของโลดทะนงแดง	9
รูปที่ 5 เครื่อง Rotary Evaporator	11
รูปที่ 6 การแยกส่วนประกอบของสิ่งสกัดโดยวิธี column chromatography	13
รูปที่ 7 ลักษณะพืชสมุนไพรทั้ง พญาชา ปลาไหลเผือกและโลดทะนงแดง.....	15
รูปที่ 8 ลักษณะสิ่งสกัดหยาบพญาชา ปลาไหลเผือกและโลดทะนงแดง	16
รูปที่ 9 รูปแบบการแยกสิ่งสกัดหยาบบนแผ่น TLC (ethylacetate : hexane 1:9)	17
รูปที่ 10 รูปแบบการแยกสิ่งสกัดหยาบบนแผ่น TLC (ethylacetate : hexane 3:7)	17
รูปที่ 11 รูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ของพญาชา	18
รูปที่ 12 รูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ของปลาไหลเผือก	19
รูปที่ 13 รูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ของโลดทะนงแดง	19
รูปที่ 14 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร	25
รูปที่ 15 กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดพญาชา	27
รูปที่ 16 กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดปลาไหลเผือก	29
รูปที่ 17 กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดโลดทะนงแดง	31

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันผู้คนได้ให้ความสำคัญกับความสวยงามและบุคลิกภาพมากขึ้น เครื่องสำอางจึงเข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวัน โดยเฉพาะเครื่องสำอางที่ใช้กับใบหน้าและผิวหนังซึ่งได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย และเป็นสินค้าที่มีมูลค่าทางการตลาดสูง สำหรับในประเทศไทย ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน คือเครื่องสำอางลดสีผิว (skin depigmentation or lightener) ทำให้ใบหน้าและผิวขาวขึ้น ช่วยลดรอยด่างดำบนใบหน้า สารที่มีฤทธิ์ลดสีผิวซึ่งนิยมใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ได้แก่ kojic acid, arbutin, licorice extract, L-ascorbic acid derivative และ placental extract เป็นต้น (Masuda et al. 1996) สารเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากธรรมชาติ นอกจากนี้มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากพบว่าสารสำคัญในพืชหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งขั้นตอนการสร้างเมลานิน เช่น สารที่พบใน *Morus alba* (Ramulus Mori) (Kim JH and Lee KT 1998), Cumin (*Cuminum cyminum* L.) (Kubo I and Kinst-Hori I 1998), anise oil (*Pimpinella anisum*) (Kubo I and Kinst-Hori I 1998), Saffron flower (*Crocus sativus*) (Kubo I and Kinst-Hori I 1999), *Pulsatilla cernua* (Lee HS 2002)

จากการสำรวจร้านเสริมความงามในประเทศไทยของกองควบคุมเครื่องสำอาง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา พบว่าได้มีการนำพืชหลายชนิด เช่น พญายา ปลาไหลเผือก และ โลดทะนงแดง มาใช้ประพรมผิวทำให้ผิวขาวใส ไร้ฝ้า โดยนำลำต้นมาผ่านเป็นชั้นบางๆ แหในอัลกอฮอลล์แล้วนำมาใช้ทาใบหน้าและผิวกายพบว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ พญายาหรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่ากระเจ้านั้นมีประวัติว่าเป็นสมุนไพรที่นิยมใช้กันมากในหญิงสาวชาวพม่า เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าพืชดังกล่าวมีฤทธิ์ลดสีผิวได้จริง คณะผู้วิจัยจึงได้นำชิ้นส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ดังกล่าวของพืชทั้งสามชนิด กล่าวคือ ส่วนลำต้นและเปลือกลำต้นของพญายา ส่วนรากของปลาไหลเผือกและโอดทะนงแดง มาทำการแยกสกัดสารสำคัญอยู่ในรูปกึ่งบริสุทธิ์ ตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญ และนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioassay) โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ควบคุมปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์เมลานิน ซึ่งนับเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาศักยภาพของสมุนไพรต่อไป

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

ผิวหนังเป็นส่วนที่ปกคลุมร่างกาย ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากสิ่งต่างๆ เช่น ป้องกันอันตรายจากการสูญเสียน้ำ ป้องกันอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคต่างๆ นอกจากนี้ยังเป็นที่อยู่ของรากขน ต่อมเหงื่อ เป็นต้น จากการที่ผิวหนังเป็นส่วนนอกสุด จึงมีโอกาสดังกล่าวจะได้รับอันตรายจากรังสี โดยเฉพาะประชากรที่อยู่ในทวีปเอเชีย ซึ่งเป็นเขตที่มีแสงแดดจัดตลอดปี อย่างไรก็ตามร่างกายก็มีกลไกป้องกันตนเองโดยการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin) เพื่อประโยชน์ดังกล่าว

เซลล์เมลานोไซต์จะสร้างเม็ดสีเมลานินซึ่งทำหน้าที่ดูดซับแสงในช่วงแสงที่มองเห็น (visible light; 400–700 nm) และในช่วงแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet; 281–400 nm) ปริมาณเมลานินที่ไม่เท่ากันในคนต่างเชื้อชาติเผ่าพันธุ์ทำให้เกิดความแตกต่างของสีผิว เมื่อเปรียบเทียบส่วนต่างๆ ของร่างกายของคนคนเดียวกันพบว่าจำนวนเมลานอไซต์จะแตกต่างกันในส่วนต่างๆ ของร่างกาย พบว่าบริเวณใบหน้าจะพบเมลานอไซต์หนาแน่นที่สุด ส่วนบริเวณลำตัวและแขนขาจะมีน้อยลงตามลำดับ ในคนผิวขาวและคนผิวดำจะมีจำนวนเมลานอไซต์ต่อพื้นที่ของร่างกายไม่แตกต่างกัน แต่การทำงานของเมลานอไซต์ในคนผิวดำจะมากกว่า, ขนาดของเมลานอไซต์โตกว่า, มีเดนไดรต์ (dendrite) มากกว่า (ดวงดาว ฉันทศาสตร์, 2540)

2.1 กระบวนการชีวสังเคราะห์เมลานิน

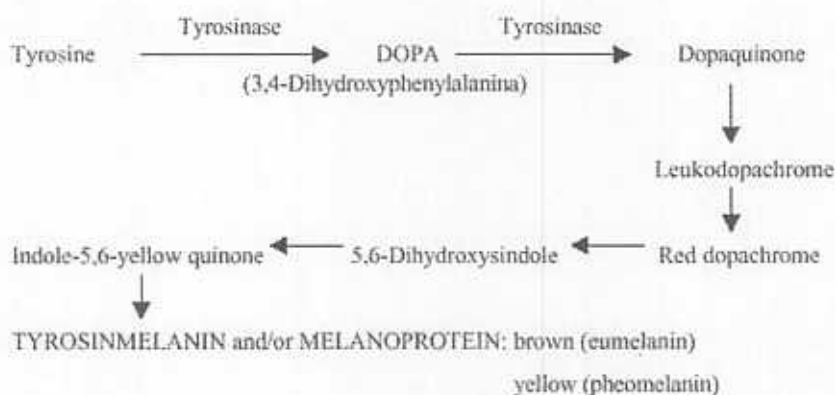
สีผิวของมนุษย์เกิดจากเม็ดสีเมลานิน (melanin) ซึ่งถูกสร้างโดยเซลล์ที่เรียกว่าเมลานอไซต์ (melanocyte) เซลล์ชนิดนี้พบตามผิวหนัง รากผม รากขน และ uveal tract ที่ผิวหนัง เมลานอไซต์จะกระจายอยู่บริเวณ epidermal/dermal junction เมื่อถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนบางชนิด (เช่น melanocyte stimulating hormone; MSH) หรือกระตุ้นด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) เมลานอไซต์จะสร้าง melanin ออกมาแล้วส่งไปที่เซลล์ผิวหนัง (keratinocytes) ที่อยู่บริเวณโดยรอบ เซลล์ผิวหนังจะเก็บกินเมลานิน (phagocytosis) ส่วนที่อยู่บนเมลานอไซต์ เมื่อเมลานินไปอยู่ในเซลล์ผิวหนัง จะทำให้ผิวหนังมีสีเข้มขึ้น (skin tanning) (Prota 1996)

ในกรณีที่ผิวหนังถูกแสงแดด แสงแดดจะทำให้มีการผลิตเมลานินเพิ่มขึ้น สีผิวจึงเข้มขึ้น หากการกระตุ้นมีมากเกินไปจนเสียสมดุลของการสร้างเมลานิน เช่นเซลล์สร้างสีเกิดความผิดปกติปล่อยเมลานินโซมหรือผลิตเมลานินส่วนเกิน จะทำให้ผิวหนังกลายเป็นกระ จุดด่างดำ และฝ้าแดดได้

(Giuseppe Prota, 1996) ซึ่งรักษาได้ด้วย depigmenting agents เช่น hydroquinone, ascorbic acid derivative, azelaic acid, retinoids, arbutin และ kojic acid เป็นต้น (Kim YM et al, 2002)

หากมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณหรือการกระจายของเม็ดสีเมลานินที่ผิดปกติ ก็อาจทำให้เกิดโรคหลายอย่าง เช่น ภาวะผิวอกซึ่งเกิดจากการสร้างเม็ดสีเมลานินน้อยเกินไป (melanotic hypopigmentation) บริเวณผิวหนัง ผมหงอก และตา ทำให้ผิวหนังไวต่อแสงอัลตราไวโอเล็ตและมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งผิวหนังเพิ่มขึ้น

กระบวนการชีวสังเคราะห์ของเมลานิน มีขั้นตอนตามแสดงในรูปที่ 1 ดังนี้ สารเริ่มต้นในการสร้างเมลานินคือ L-tyrosine จะถูกเปลี่ยนเป็น L-dopa โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส จากนั้น L-dopa จะถูกเปลี่ยนต่ออย่างรวดเร็วไปเป็น dopaquinone โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่นกัน ขั้นตอนการเปลี่ยน L-tyrosine มาเป็น L-dopa เป็นขั้นตอนที่ช้าและเป็น rate limiting step



รูปที่ 1 ขั้นตอนชีวสังเคราะห์เมลานิน

จากนั้น dopaquinone จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น dopachrome ซึ่งมีสีแดง และถูกเปลี่ยนต่อไปอีกจนสุดท้ายได้เป็นเมลานินที่สำคัญ 2 ชนิด คือ eumelanin ซึ่งมีน้ำตาลปนดำ และ pheomelanin ซึ่งมีสีเหลืองปนน้ำตาลเข้ม เซลล์จะสร้างเมลานินชนิดใดมากน้อย ขึ้นกับเชื้อชาติ และลักษณะทางพันธุกรรม กล่าวคือในคนผิวดำ จะมี eumelanin ปริมาณมาก ส่วนคนผิวขาวจะพบ pheomelanin มาก

2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน

การยับยั้งการสร้างเมลานิน สามารถทำได้หลายวิธี โดยอาศัยกลไกการยับยั้งการสร้างเมลานินที่แตกต่างกัน ได้แก่

1. การป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต เช่น สารดูดซับรังสีอัลตราไวโอเลต (UVA, UVB absorber) หรือสารอนินทรีย์ที่มีคุณสมบัติสะท้อนแสงหรือกระจายแสงได้ เช่น titanium dioxide ซึ่งกลไกนี้เป็นการป้องกันปัจจัยที่กระตุ้นการสร้างเมลานิน คือแสงแดด
2. การใช้สารที่ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น biomein, placenta extract
3. การใช้สารที่มีคุณสมบัติกำจัดอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับเมลานิน ซึ่งจะลดปริมาณเมลานินที่จะสร้างขึ้น เช่น วิตามินอี (α -tocopherol) (ดวงดาว ฉันทศาสตร์, 2540)
4. การใช้สารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีคุณสมบัติเป็น copper-chelating agent เข้าจับกับไอออนของทองแดงในโมเลกุลของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสารกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์โดยตรงต่อการทำงานของเอนไซม์ จึงจัดเป็นสารกลุ่ม suppressive type เช่น kojic acid และ benzhydroxamic acid
5. การใช้สารที่เป็นพิษต่อเมลานोไซต์ (nonsuppressive tyrosinase inhibitor) เช่น hydroquinone, monobenzyl ether of hydroquinone (HBEH) ซึ่ง hydroquinone ให้ผลดีที่สุดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Giuseppe Prota, 1996)

สารลดสีผิวที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ตัวอย่างเช่น เครื่องสำอางยี่ห้อซีเซโด มีสารสำคัญคือ kojic acid และ arbutin ครีมและโลชั่นยี่ห้ออันเวียมี licorice extract สำหรับสารที่มีฤทธิ์ทำลายเมลานोไซต์ คือ hydroquinone นั้น ทำให้เซลล์ตายและมีพิษต่อผิวหนัง ดังนั้นจึงถูกห้ามใช้ในเครื่องสำอาง

2.3 เอนไซม์ไทโรซิเนส และสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) เป็น rate-limiting enzyme ของกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Kim YM *et al*, 2002) โดยเป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงอยู่ในโมเลกุล (copper containing enzyme) ถูกสังเคราะห์เบื้องต้นบนผิวของ rough endoplasmic reticulum แล้วถูกขนส่งไปยัง golgi complex หลังจากนั้นเอนไซม์นี้จะถูกกระตุ้นโดยการเติมสายโซ่น้ำตาลก่อนที่จะถูกนำไปเก็บใน coated vesicle ต่อไป (Mitsuahara Masuda *et al*, 1996) เอนไซม์นี้มีหน้าที่หลากหลาย โดยทำหน้าที่คatabolize สารที่เกิดจากกระบวนการ hydroxylation ของ monophenols เช่นการเปลี่ยน tyrosine ไปเป็น o-diphenols โดยวิธี monophenol monooxygenase หรือการเปลี่ยน o-diphenols ไปเป็น o-quinones โดยวิธี oxidation

(EC 1.10.3.1, catechol oxidase) ซึ่งต่อมาจะถูกเปลี่ยนเป็นเม็ดสีเมลานินโดยกระบวนการ polymerization แบบไม่อาศัยเอนไซม์ (Espin JC, and Wichers HJ, 1999)

ในแมลง เอนไซม์ไทโรซิเนสนี้มีบทบาทในการสร้าง o-diphenols และ quinones ซึ่งใช้ในการสร้างเม็ดสี การซ่อมแซมส่วนที่บาดเจ็บ และการเกิด encapsulation ของปรสิต (Lee HS, 2002) นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังทำงานร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ เพื่อสร้าง reactive intermediate และทำให้เกิด cross-linking ของโปรตีนและโคตินกลายเป็เกล็ดแข็งหุ้มตัวแมลง ซึ่งจำเป็นในการดำรงชีวิตและป้องกันตัวของแมลง ดังนั้นจึงอาจพัฒนาเพื่อนำมาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการหาวิธีควบคุมจำนวนแมลงที่ส่งผลเสียต่อการเกษตรได้ (Kim YM et al, 2002)

ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร พบว่าเอนไซม์นี้ทำให้เกิดการคล้ำของพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว การที่ผลิตผลทางการเกษตรมีสีคล้ำลงนี้เกิดจากปฏิกิริยา oxidation ของสารกลุ่ม phenolic ที่ประกอบด้วยหมู่ o-dihydroxy จำนวน 2 กลุ่ม ไปเป็นสารกลุ่ม o-quinone ผลที่เกิดขึ้นคือการเปลี่ยนแปลงของทั้งสี รส และคุณค่าทางโภชนาการ ส่งผลให้ผลผลิตมีราคาต่ำลง การคล้ำลงของพืชผลนั้นจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนของสารกลุ่ม phenolic ที่พืชแต่ละชนิดมี และความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ (Lee HS, 2002) ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีทางด้านอาหารโดยอาศัยความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์ไทโรซิเนส จะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างยิ่ง

สำหรับมนุษย์และสัตว์ พบว่าเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยน tyrosine ไปเป็น dopa และจะ oxidize หมู่ phenols และ diphenols ของ dopa โดยอาศัยการทำงานของ copper atom ที่อยู่บน active site ของเอนไซม์ ได้เป็น dopaquinone ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น dopachrome โดยไม่อาศัยเอนไซม์ จากนั้นจะเกิดการ rearrangement ของ dopachrome ซึ่งถูกควบคุมด้วย tyrosinase-related protein (TRP-2) ที่ชื่อว่า dopachrome tautomerase ได้เป็น 5,6- dihydroxyindole -2- carboxylic acid (DHICA) นอกจากนี้ยังอาจถูกควบคุมโดยอิออนของโลหะที่พบใน melanin-containing tissue เช่นอิออน ของทองแดง สังกะสี และเหล็ก (Giuseppe Prota, 1996) กระบวนการสร้างเม็ดสีจะเกิดขึ้นหลังจากกระบวนการ oxidation และ polymerization ของ indoles เหล่านี้ โดยเมลานินที่สร้างขึ้นที่ผิวหนังมี 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีสีน้ำตาลหรือสีดำ เรียกว่า eumelanin ซึ่งเป็นกลุ่มเม็ดสีที่ไม่ละลายน้ำและมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ และชนิดที่มีสีเหลืองหรือสีส้ม เรียกว่า pheomelanin

เอนไซม์ไทโรซิเนสมีความสำคัญในขั้นตอนชีวสังเคราะห์เมลานินดังที่กล่าวมา จากการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากพืชและแหล่งธรรมชาติต่างๆ ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เพราะสารนี้มีประโยชน์ทั้งทางด้านเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมอาหาร และเชื่อว่าสารที่ได้จากธรรมชาติน่าจะมีความปลอดภัยในการนำมาใช้กับผิวหนังมนุษย์

การศึกษาวิจัยที่ผ่านมา พบว่าพืชหลายชนิดมีสารมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้ดี เช่น สารสำคัญที่พบใน *Morus alba* (Ramulus Mori) คือ 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-

3,8-bis(3-methyl-2-butenyl)-4H-1-benzopyran-4-one มีฤทธิ์ยับยั้ง mushroom tyrosinase สูงกว่า kojic acid ประมาณ 10 เท่า และสูงกว่า arbutin ประมาณ 128 เท่า ($ID_{50} = 0.507, 5.82, 65.2 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ) (Kim JH and Lee KT 1998), สารสำคัญใน anise oil (*Pimpinella anisum*) คือ anisaldehyde และ *p*-hydroxyanisole มีฤทธิ์ยับยั้ง mushroom tyrosinase แบบ non-competitive inhibition ($ID_{50} = 0.32$ และ 0.15 mM ตามลำดับ) นอกจากนี้ใน anise oil ยังมีสารอีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์นี้แต่อ่อนกว่าสารสองตัวที่กล่าวมา (Kubo I and Kinst-Hori I 1998), สารสำคัญใน Saffron flower (*Crocus sativus*) คือ Kaempferol (Kubo I and Kinst-Hori I 1999) มีฤทธิ์ยับยั้ง mushroom tyrosinase แบบ competitive inhibition ($ID_{50} = 0.23 \text{ mM}$) แต่ฤทธิ์นี้อ่อนกว่า kojic acid ($ID_{50} = 0.014 \text{ mM}$), สารสำคัญ 2 ชนิดจากราก *Pulsatilla cernua* คือ 3,4-dihydroxycinnamic acid และ 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid มีฤทธิ์ยับยั้ง mushroom tyrosinase แบบ non-competitive inhibition ($ID_{50} = 0.97$ และ 0.33 mM ตามลำดับ) (Lee HS 2002)

2.4 คุณลักษณะของพืชที่นำมาศึกษา

2.4.1 ชื่อพื้นเมือง: พญากระเจา หนาคา

ชื่อพฤกษศาสตร์ *Hesperethusa crenulata* Roem หรือ *Naringi crenulata* (Roxb.) Nicolson

วงศ์ Rutaceae

ลักษณะ เป็นไม้ต้นขนาดเล็ก ผลัดใบ สูง 2-10 เมตร ตามลำต้นและกิ่งก้านมีหนามแหลมยาวทั่วไปเปลือกสีขาวปนเขียว ใบประกอบแบบขนนกชั้นเดียว ออกเป็นช่อเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 2-3 หรือ 4 ช่อ เรียงสลับ มีใบย่อย 1-3 คู่ เรียงตรงกันข้าม ปลายแกนกลางใบประกอบมีใบย่อยเดี่ยวๆ ที่ไม่มีก้านใบติดกับใบย่อยคู่ปลาย ใบย่อยคู่อื่นๆไม่มีก้าน ตามก้านและแกนกลางใบประกอบมีครีบลักษณะคล้ายแผ่นใบแผ่กว้างมากหรือน้อยปรากฏอยู่ทั้ง 2 ด้าน ใบย่อยรูปรี รูปไข่ หรือรูปรี แกมรูปไข่กลับ ปลายแหลมมนหรือเว้าเล็กน้อย โคนสอบ ขอบจักมนห่างๆ แผ่นใบและครีบของแกนกลางใบประกอบมีต่อมน้ำมันโปร่งแสงกระจายทั่วไป ช่อดอกออกเดี่ยวๆตามกิ่งด้านข้างหรือออกมาจากกลุ่มใบประกอบ บางครั้งมีเพียง 1-2 ดอก ดอกเล็กสีขาวอมเหลือง กลิ่นหอมเย็น กลีบเลี้ยง 4 กลีบ กลีบดอก 4 กลีบแยกเป็นอิสระ มีต่อมน้ำมันทั่วไป เกสรตัวผู้ 8 อัน ผลกลม มีเนื้อ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7-1.2 ซม. มีต่อมน้ำมันทั่วไป เมื่อสุกมีสีดำ รสเปรี้ยว มี 1-4 เมล็ด

สรรพคุณ มีสรรพคุณมากมาย ใช้ต้มดื่มแก้ไข้ แก้ปวดข้อ ปวดเมื่อย แก้อ่อนใน ในประเทศพม่านิยมนำส่วนเปลือกต้น เปลือกราก และไม้ฝนกับน้ำทาใบหน้าและผิวหนัง เพื่อประทุษพิษ และปกป้องผิวจากแสงแดด ทำให้ผิวขาว สด ไร้ฝ้า



กระเจาะ / หนุ่ย / หนุ่ย

ไม้ยืนต้นขนาดเล็กสูง 3-8 เมตร กิ่งก้านมีหนาม ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก

รูปที่ 2 ลักษณะส่วนต่าง ๆ ของหนุ่ย

2.4.2 ชื่อพื้นเมือง: ปลาไหลเผือก

ชื่อพฤกษศาสตร์ *Eurycoma longifolia* Jack

วงศ์ Simaroubaceae

ลักษณะ เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง สูงประมาณ 5 เมตร มีลำต้นสีแดงทรงเพรียว ไม่แตกกิ่งก้านทางด้านข้าง จะมีใบอยู่ตรงส่วนยอดของลำต้น และใบที่ยอดนี้ยาวประมาณ 1 เมตร ใบประกอบด้วยใบย่อยเป็นจำนวนมาก ใบย่อยมีขน และมีรูปร่างเรียวยาวแหลม หรือรูปไข่ หักกลับปลายเรียวยาวแหลม ดอกสีแดงยาวประมาณ 10-15 มม. มีทั้งดอกตัวผู้และตัวเมีย ออกรวมกันเป็นช่อใหญ่ ผลสีน้ำตาลคล้ายรูปไข่ ขนาดยาว 10-17 มม. กว้าง 5-12 มม.



รูปที่ 3 ส่วนต่างๆของปลาไหลเผือก

สรรพคุณ แก้ไข้ รักษามาลาเรีย และมีฤทธิ์กระตุ้นความต้องการทางเพศ (aphrodisiac)

2.4.3 ชื่อพื้นเมือง: โลดทะนงแดง, ข้าวเย็นเนินตู๋เบี้ย, ตู๋เตี้ยทะนง, รักทะนง ทะนงแดง นางแซงหนาดคำ ห้วยาเข้าเย็นเนิน

ชื่อพฤกษศาสตร์ *Trignostemon reidides* (Kurz) Craib

วงศ์ Euphorbiaceae

ลักษณะ เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 0.5 - 1.5 เมตร ทุกส่วนของต้นมีขน ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปของขอบขนานหรือรูปขอบขนานแกมใบหอก กว้าง 2 - 4 ซม. ยาว 7 - 12 ซม. ผิวใบมีขนทั้งสองด้าน ดอกช่อ ออกที่ซอกใบและกึ่งก้าน แยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน กลีบดอกสีขาว ชมพูหรือม่วง ผลแห้ง แตกได้ 3 พู รูปค่อนข้างกลม

สรรพคุณ รากโลดทะนงแดงใช้ฝนกับสุรารับประทานทำให้อาเจียนอย่างแรง ถอนพิษคนที่ถูกยาเบื่อ ยาเมา เมาเห็ด เมาหอยต่าง ๆ และถอนพิษเสหะได้ดี แก้หอบหืด เป็นทั้งยาระบายด้วย ขนาดรับประทานประมาณ 5 เกรน แพทย์แผนไทยอีสานใช้ต้มดื่มแก้วัณโรค ภาคเหนือตอนล่างใช้รากฝนกับมะนาวหรือเหล้าเป็นยาแก้พิษงู ภายนอก ทาเกลื่อน หัวฝีที่ยังไม่ตั้งหนอง ถ้าฝีแตกใช้เป็นยาดูดหนอง ถ้านับรากโลดทะนงเป็นผงผสมกับแป้งพอกปิดหัวฝี สามารถช่วยไม่ให้เจ็บปวดได้ดีมาก



รูปที่ 4 ลักษณะดอกของโสดทะนงแดง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือ

vacuum filter

เครื่องตัดบดสมุนไพร

Fritch, Germany

เครื่องส่องโครมาโตกราฟี

Dseaga, HP-Uvts, Germany

เครื่องชั่ง (analytical balance)

Mettler, Mod AT 200, Switzerland

ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20(C (deep freezer)

Sunyo, MDFU 331, Japan

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

Mettler, Delta 340, Switzerland

เครื่องช่วยการละลายระบบ ultrasonic (sonicator) Bransonic, B2210E-MTH, USA

ตู้อบสมุนไพรแห้ง (hot air oven)

Heraeus Instrument T6200 Germany

เครื่องระเหยแห้ง (rotary evaporator) Buchi Rotavapor, R-134, Switzerland

เครื่องวัดความเข้มข้นของยาโดยวิธีดูดกลืนแสง Pharmacia Biotech Novospec II,

(UV-VIS spectrophotometer)

England

เครื่องเขย่าส่วนผสมสารละลายในหลอดทดลอง K, MS1 Minishaker, USA

3.1.2 สารเคมี

sodium hydroxide

Carlo Erba Reagenti, Italy

methanol A.R. grade

Carlo Erba Reagenti, Italy

kojic acid A.R. grade

Acros Organics, New Jersey, USA

dimethylsulfoxide A.R. grade

Carlo Erba Reagenti, Italy

trans-cinnamic acid A.R. grade

Acros Organics, New Jersey, USA

monobasic potassium phosphate

Baker Analyzed, New Jersey, USA

mushroom tyrosinase (3216 units/ mg, solid)

Fluka, Buchs SG1, Switzerland

silica gel type 60 F₂₅₄ สำหรับ TLC

Merck, Darmstadt, Germany

silica gel type 60 สำหรับ column chromatography

Fluka, Buchs SG1, Switzerland

hexane commercial grade

methanol commercial grade

ethyl acetate commercial grade

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเก็บและการเตรียมสมุนไพรก่อนการสกัด

1. นำส่วนของพืชที่ต้องการสกัดซึ่งมีน้ำหนักสดประมาณ 3 กิโลกรัมมาล้างให้สะอาด
2. ผึ่งให้แห้งและตัดให้มีขนาดพอประมาณ
3. นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C นาน 7 วัน
4. นำส่วนสกัดของพืชที่อบแล้วไปเข้าเครื่องตัดและบดไฟฟ้าเพื่อย่อยขนาดให้เล็กลง

3.2.2 การสกัดพืชสมุนไพรโดยวิธี Maceration

1. แช่สมุนไพรที่บดแล้วน้ำหนักประมาณ 1.5 กิโลกรัม ในตัวทำละลายที่ใช้สกัด (methanol) จนสมุนไพรพองตัว
2. ห่อสมุนไพรที่แช่จนพองตัวด้วยผ้าขาวบางพันทบหลาย ๆ ชั้น และบรรจุในถังหมัก สเตนเลสที่ปิดสนิท
3. สกัดด้วย methanol โดยในการสกัดแต่ละครั้งจะใช้อัตราส่วนของน้ำหนักของสมุนไพรแห้ง : methanol เท่ากับ 1 : 3
4. ไซสารสกัดออกทุกวันเว้นวัน โดยระหว่างที่สกัดจะคนอย่างน้อยวันละ 2 ครั้ง
5. กรองสารสกัดที่ได้ ด้วยเครื่องกรองสุญญากาศผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1
6. เติม methanol ใหม่ลงในถังหมัก (ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3-5) สกัดต่อเนื่องจนกระทั่งสารละลายที่ได้ไม่มีสี นำสารละลายที่กรองได้ทั้งหมดไประเหยเอา methanol ออก โดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator เพื่อให้ได้สิ่งสกัดหยาบ (crude extract) แห้ง
7. นำสิ่งสกัดหยาบที่ได้ไปแยกส่วนประกอบโดยใช้เทคนิค column chromatography

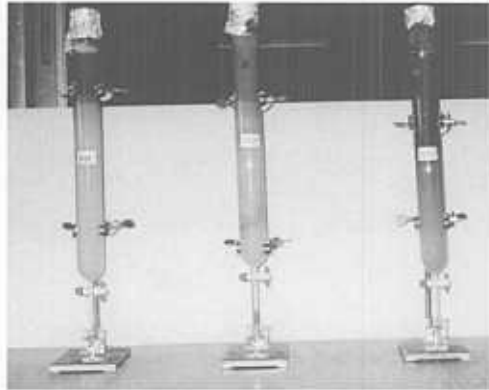


รูปที่ 5 เครื่อง Rotary evaporator

3.2.3 การแยกส่วนประกอบของสิ่งสกัดหยาบ โดยวิธี column chromatography

หลังจากได้ส่วนสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิดแล้ว นำมาแยกส่วนประกอบโดยใช้เทคนิค column chromatography โดยมี silica gel type 60 ทำหน้าที่เป็น stationary phase และ ethylacetate กับ hexane เป็น mobile phase โดยใช้วิธี Wet packed method ตามขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม slurry ของ silica gel และ eluting solvent ตามจำนวนที่ต้องการ และเทใส่ในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอและต่อเนื่อง พร้อมทั้งเคาะคอลัมน์เบาๆ จนกระทั่งได้ adsorbent column สูงเท่าที่ต้องการ โดยให้มี eluting solvent อยู่สูงกว่าระดับของสารดูดซับเสมอ เพื่อป้องกันการแห้งและแตก (cracking) ของ adsorbent column
2. ใส่กระดาษกรองแผ่นเล็กๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าคอลัมน์เล็กน้อยให้มี ความหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เหนือ adsorbent column เพื่อป้องกันไม่ให้ ผิวหน้าของ adsorbent column ถูกรบกวนเมื่อใส่สารละลายตัวอย่างหรือในขณะ ที่เติม eluting solvent ลงไป
3. ใส่ตัวอย่างลงในคอลัมน์ (sample introduction) โดยชั่งตัวอย่างหนัก 60 กรัม นำมา ละลายใน methanol แล้วเติมสารดูดซับลงไปปริมาณเล็กน้อยแล้วผสมให้เข้ากัน นำไปประเหยเอาตัวทำละลายออกให้หมด จะได้ตัวอย่างที่เคลือบอยู่บนสารดูดซับ แล้ว จึงนำสารดูดซับนั้นมาใส่ลงไปในคอลัมน์ให้ได้ความหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร
4. ชะแยกสารประกอบออกจากคอลัมน์ (elution) โดยเติม eluting solvent (ethylacetate และ hexane ในอัตราส่วนต่างๆ กันคือ 3:7 4:6 5:5 6:4 7:3 8:2 และ 9:1 ตามลำดับ) ลงไปในคอลัมน์ที่ได้ใส่ตัวอย่างแล้ว และปล่อยให้ eluent ชะเอาสารประกอบต่างๆ ออกมา
5. เก็บ eluate (fractional collecting) ทุก 50 มิลลิลิตร
6. ตรวจสอบส่วนประกอบของส่วนสกัดต่างๆ (Fraction) โดยนำ eluate ที่เก็บได้ทุก ส่วนมาตรวจสอบส่วนประกอบของสารโดยใช้ TLC จากนั้นรวม eluate ที่มีรูปแบบ การเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ที่คล้ายคลึงกันไว้ด้วยกัน แล้วนำไปประเหยเอา eluent ออก เก็บเอาตะกอนของส่วนสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อไป โดยแบ่งส่วนสกัดที่ได้นำมาตรวจสอบส่วนประกอบของสารประกอบโดยใช้ TLC และเก็บไว้ เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิงต่อไป



รูปที่ 6 การแยกส่วนประกอบของสิ่งสกัดโดยวิธี column chromatography

3.2.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.2.4.1 การเตรียมสารทดสอบ

1. ส่วนสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด เตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.5, 1, 1.5 และ 2 มก./มล โดยใช้ dimethylsulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลาย
2. สารละลายของเอนไซม์ mushroom tyrosinase ความเข้มข้น 1380 unit/ml ใน sodium phosphate buffer (pH 6.8)
3. สารละลาย Kojic acid และ Cinnamic acid ซึ่งใช้เป็น positive control ความเข้มข้น 1 mmol โดยใช้ dimethylsulfoxide (DMSO) เป็นตัวทำละลาย
4. สารละลาย L-dopamine (L-dopa) ความเข้มข้น 2.5 mmol ใน sodium phosphate buffer (pH 6.8)

3.2.4.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

1. เติม sodium phosphate buffer pH 6.8 จำนวน 900 μ l ลงในหลอดทดลอง
2. เติมตัวทำละลายหรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบจำนวน 50 μ l ลงในหลอดทดลองในข้อ 1
3. เติมเอนไซม์ mushroom tyrosinase 50 μ l ลงในหลอดทดลองในข้อ 1
4. ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ C
5. เติมสารละลาย L-dopamine (L-dopa) จำนวน 500 μ l ลงในหลอดทดลองในข้อ 1 แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 nm เป็นเวลา 8 นาที เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงในเวลาต่าง ๆ แล้วเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยานี้ แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้ แต่เลือกวัดค่าการดูดกลืนแสง ณ. เวลาที่เหมาะสมเพียงตำแหน่งเดียว โดยใช้ UV spectrophotometer

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งฤทธิ์เอนไซม์ไทโรซิเนส(% tyrosinase inhibition) หาได้ จากสูตร

$$\% \text{ Tyrosinase Inhibitor} = \frac{[(A-B)] \times 100}{A}$$

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 nm ที่เวลา 5 นาที
เมื่อไม่มีสารทดสอบแต่มีเอนไซม์ไทโรซิเนส

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 nm ที่เวลา 5 นาที
เมื่อมีทั้งสารทดสอบและเอนไซม์ไทโรซิเนส

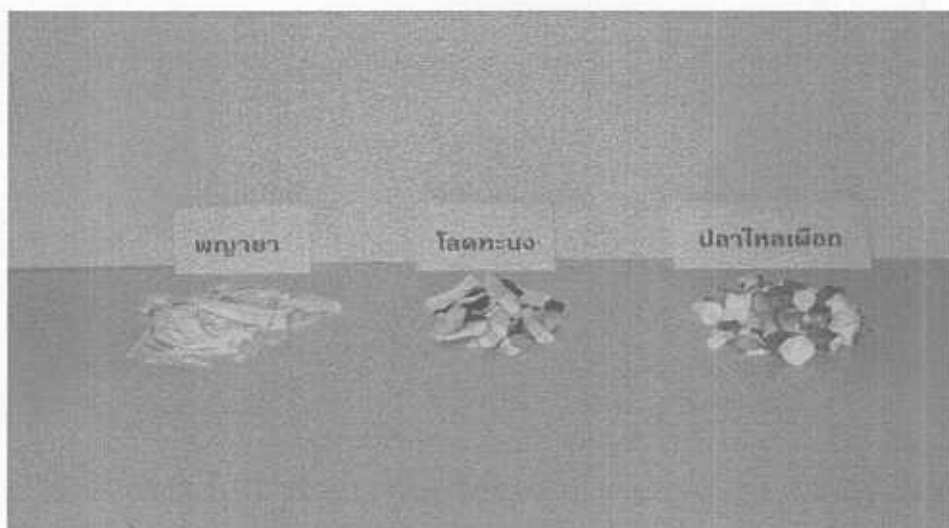
3.2.4.3 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
ใช้สถิติ student's T-test

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเก็บและการเตรียมสมุนไพรก่อนการสกัด

สมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่นำมาทดสอบได้ผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยผู้มีความรู้ ด้านพืชสมุนไพร ว่าเป็นพญายา โลดทะนงแดง และปลาไหลเผือกจริง จึงนำมาทำการวิจัยโดยพญายาจะใช้ส่วนของลำต้นรวมทั้งเปลือกนอกด้วย ส่วนปลาไหลเผือกและโลดทะนงแดงใช้ส่วนของราก มาทำการวิจัยในครั้งนี้



รูปที่ 7 ลักษณะของพืชสมุนไพรทั้งพญายา โลดทะนงแดง และ ปลาไหลเผือก

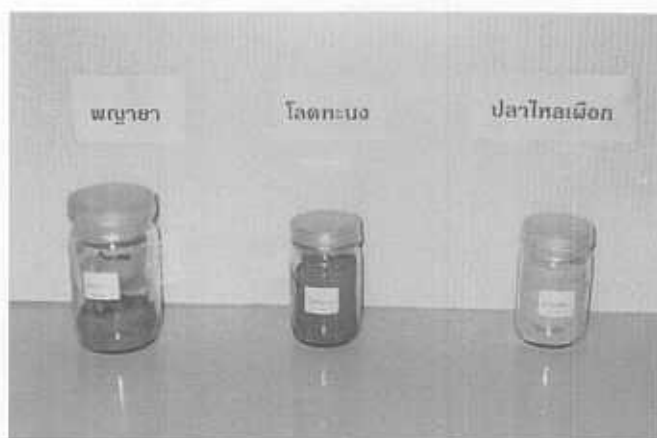
ลักษณะของลำต้นพญายาหลังจากอบแห้งแล้ว ลักษณะเนื้อไม้เป็นไม้เนื้อแข็ง มีสีขาว ไม่มีกลิ่น

รากของปลาไหลเผือกจะมีเปลือกสีน้ำตาลค่อนข้างเรียบ เนื้อรากเป็นสีขาว เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 ซม. เปลือกรากจะติดสนิทกับราก ลอกออกได้ยาก ไม่มีกลิ่น

รากของโลดทะนงแดง มีเปลือกสีเข้ม เป็นสีน้ำตาลแดง เปลือกขรุขระ เป็นร่องและสามารถหลุดลอกได้ง่าย เนื้อรากเป็นสีน้ำตาลแดง แต่สีไม่เข้มเท่ากับเปลือกราก ไม่มีกลิ่น

4.2 การสกัดพืชสมุนไพรโดยวิธี Maceration

หลังจากนำส่วนของพืชทั้ง 3 ชนิดมาอบและย่อยขนาดโดยเครื่องบดไฟฟ้า แล้วนำมาหมักด้วย methanol โดยใช้อัตราส่วนของสมุนไพรแห้งต่อ methanol คือ 3:1 พบว่าสารละลายที่ได้เป็นสีเหลืองเข้ม โดยเฉพาะโศดทะนงแดง ซึ่งเมื่อรวบรวมปริมาตรของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดทั้งหมด ได้ผลดังนี้ พญายา 24,300 มล. ปลาไหลเผือก 25,300 มล. และโศดทะนงแดง 26,025 มล. ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อนำสารละลายที่สกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมาทำการระเหยด้วย rotary evaporator ได้สิ่งสกัดหยาบ (crude extract) มีลักษณะเป็นผงแห้ง และมีสีดังนี้ คือสิ่งสกัดหยาบ พญายาและปลาไหลเผือกมีสีเหลืองเข้ม ส่วนสิ่งสกัดหยาบโศดทะนงแดงมีสีน้ำตาลแดง ดังรูปที่ 8 และมีน้ำหนักดังนี้ พญายาได้สิ่งสกัดหยาบหนัก 24.80 กรัม ปลาไหลเผือกได้สิ่งสกัดหยาบ 75.76 กรัมและโศดทะนงแดงได้สิ่งสกัดหยาบ 77.58 กรัม สิ่งสกัดหยาบที่รอการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป จะเก็บไว้ที่ 4 °C

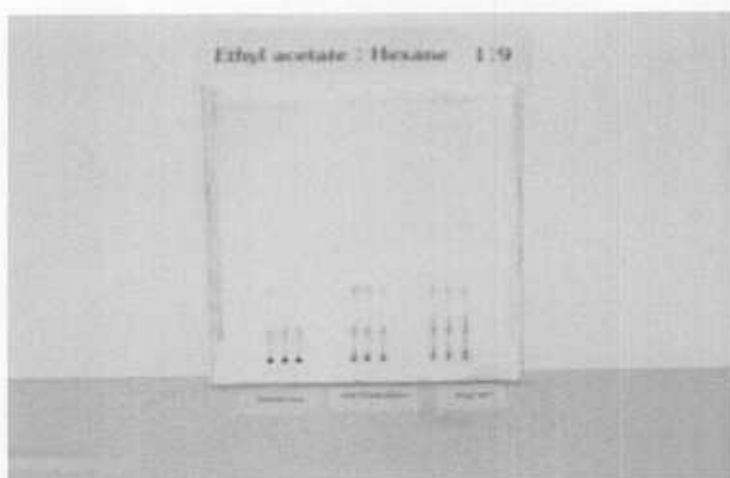


รูปที่ 8 ลักษณะของสิ่งสกัดหยาบของพญายา โศดทะนงแดง และ ปลาไหลเผือก

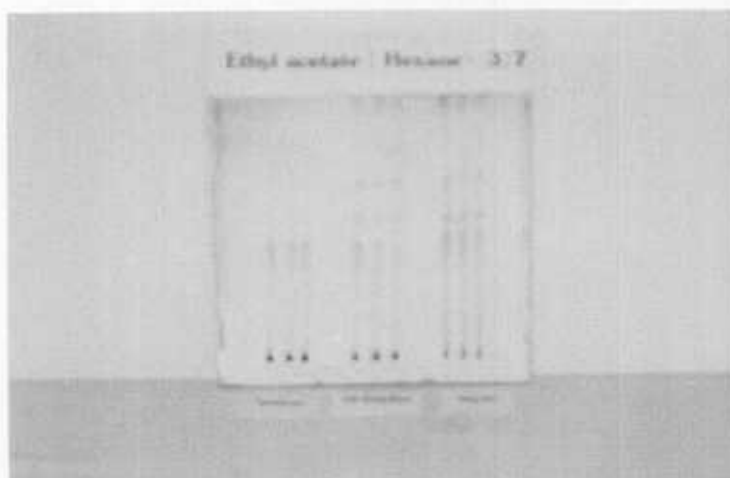
ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักของสิ่งสกัดหยาบและปริมาตรของตัวทำละลาย

ข้อมูล - พืช	พญายา	ปลาไหลเผือก	โศดทะนงแดง
น้ำหนักพืชสมุนไพรแห้ง (กรัม)	750	1,750	1,350
ปริมาตร Methanol (มล.)	24,300	25,300	25,025
น้ำหนักสิ่งสกัด(กรัม)	24.80	75.76	77.58

เมื่อเสร็จขั้นตอนนี้ คณะผู้วิจัยได้นำสิ่งสกัดหยาบที่ได้จากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มาทำแยกส่วนประกอบโดยใช้เทคนิค Thin layer chromatography (TLC) เพื่อเก็บไว้ใช้อ้างอิงเมื่อทำการศึกษาต่อไป โดยใช้ hexane และ ethyl acetate เป็น mobile phase ซึ่งเป็นตัวทำละลายและอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด ทำให้เห็นการแยกของสารที่เป็นองค์ประกอบในสิ่งสกัดได้ชัดเจน ลักษณะการเคลื่อนที่ของสิ่งสกัดบนแผ่น Thin layer chromatography มีลักษณะดังรูปที่ 9 และ 10



รูปที่ 9 รูปแบบการแยกสิ่งสกัดหยาบบนแผ่น TLC (Ethylacetate:Hexane 1:9)



รูปที่ 10 รูปแบบการแยกสิ่งสกัดหยาบบนแผ่น TLC (Ethylacetate:Hexane 3:7)

เมื่อคำนวณค่า Rate of flow (R_f) ของสิ่งสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดได้ดังนี้ พญาสามารถสังเกตเห็นกลุ่มของสารที่เคลื่อนที่ได้แตกต่างกัน 4 กลุ่ม มีค่า Rate of flow ดังนี้ 0.44 0.68 0.79 และ 0.97ตามลำดับ

ปลาไหลเผือก สามารถสังเกตเห็นกลุ่มของสารที่เคลื่อนที่ได้แตกต่างกัน 5 กลุ่ม มีค่า Rate of flow ดังนี้ 0.41 0.51 0.65 0.93 และ 0.97 ตามลำดับ

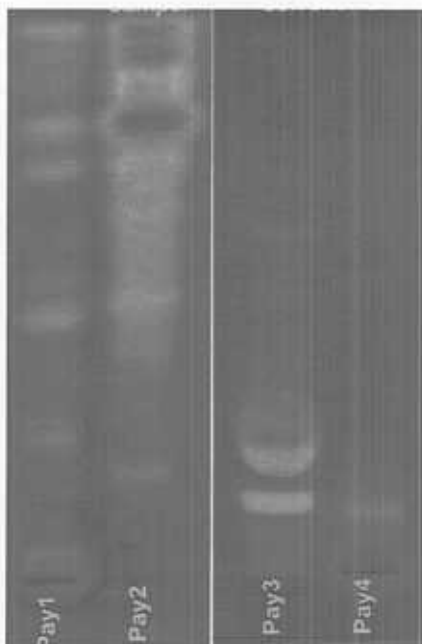
โสดทะนงแดง สามารถสังเกตเห็นกลุ่มของสารที่เคลื่อนที่ได้แตกต่างกัน 5 กลุ่ม มีค่า Rate of flow ดังนี้ 0.45 0.51 0.65 0.93 และ 0.95 ตามลำดับ

4.3 การแยกส่วนประกอบของสิ่งสกัดหยาบโดยวิธี Column chromatography

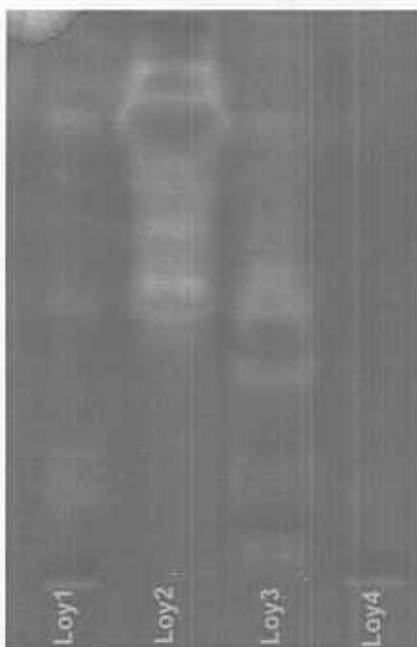
หลังจากได้สิ่งสกัดหยาบของพืชทั้ง 3 ชนิดแล้ว จึงนำมาแยกส่วนประกอบโดยวิธี Column chromatography โดยเก็บ ส่วนสกัด(fraction)ทุกๆ 50 มล. จากนั้นนำแต่ละส่วนสกัดทั้งหมด มาศึกษารูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC แล้วรวมส่วนสกัด ที่มีรูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่นTLC คล้ายกันไว้ด้วยกันดังรูป 11 - 13 โดยพืชแต่ละชนิดจะมี 3 ส่วนสกัด (Fraction) ซึ่งข้อมูลส่วนสกัดต่างๆที่ได้ ดังตารางที่ 2 และ 3



รูปที่ 11 รูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ของส่วนสกัดพญา (สิ่งสกัดหยาบ ส่วนสกัดที่ 1 ส่วนสกัด 2 และส่วนสกัด 3 ตามลำดับ)



รูปที่ 12 รูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ของส่วนสกัดปลาไหลเผือก
(สิ่งสกัดหยาบ ส่วนสกัดที่ 1 ส่วนสกัด 2 และส่วนสกัด 3 ตามลำดับ)



รูปที่ 13 รูปแบบการเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ของส่วนสกัดโลดทะนงแดง
(สิ่งสกัดหยาบ ส่วนสกัดที่ 1 ส่วนสกัด 2 และส่วนสกัด 3 ตามลำดับ)

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลของส่วนสกัดพญาฯ ปลาไหลเผือก และโลดทะนงแดง

ชนิดของส่วนสกัด	น้ำหนักส่วนสกัด (กรัม)	ลักษณะที่สามารถสังเกตได้
สิ่งสกัดหยาบ พญาฯ (Crude extract)	24.80	เป็นผงแห้ง สีเหลืองเข้ม ออกสีน้ำตาลอ่อน
พญาฯ ส่วนสกัด 1 พ. A1 – พ. C2	1.33	เป็นของกึ่งแข็ง กึ่งเหลว สีเหลือง ชืด
พญาฯ ส่วนสกัด 2 พ. C3 – พ. D12	0.54	เป็นของกึ่งแข็ง กึ่งเหลว สีเหลืองอ่อน แต่เข้มข้นกว่า ส่วนสกัด1
พญาฯ ส่วนสกัด 3 พ. E1 – พ. J 6	19.27	เป็นผงแห้ง สีน้ำตาลเข้ม
สิ่งสกัดหยาบ ปลาไหลเผือก (Crude extract)	75.76	เป็นผงแห้ง สีเหลืองเข้มคล้ายสีของขมิ้นผง
ปลาไหลเผือก ส่วนสกัด 1 ป. A1 – ป. B9	1.33	เป็นของกึ่งแข็ง กึ่งเหลว สีเหลือง ชืด คล้ายพญาฯส่วนสกัด1
ปลาไหลเผือก ส่วนสกัด 2 ป. B10 – ป. D7	2.01	เป็นของกึ่งแข็ง กึ่งเหลว สีเหลืองอ่อน คล้ายพญาฯ ส่วนสกัด 2
ปลาไหลเผือก ส่วนสกัด 3 ป.D8 – ป.H10	18.29	เป็นผงแห้ง สีน้ำตาลแดงเข้ม
สิ่งสกัดหยาบ โลดทะนงแดง (Crude extract)	77.58	เป็นผงแห้ง สีน้ำตาลแดงเข้มจนเกือบดำ
โลดทะนงแดง ส่วนสกัด1 ล.A1- ล.B10	4.95	เป็นของกึ่งแข็ง กึ่งเหลว สีเหลืองอ่อน
โลดทะนงแดง ส่วนสกัด2 ล.B11 – ล.G2	1.56	เป็นของกึ่งแข็ง กึ่งเหลว สีเหลืองออกน้ำตาล
โลดทะนงแดง ส่วนสกัด 3 ล.G3 – ล.M4	18.16	เป็นผงสีดำ มีผลึกรูปเหลี่ยมปนด้วย

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณและสัดส่วนของ eluting solvent ที่ใช้ในการสกัดพญาชา ปลาไหลเผือก และโอดทะนง แดง ด้วยเทคนิค column chromatography

พญาชา	รหัสส่วนสกัด	ปลาไหลเผือก	รหัสส่วนสกัด	โอดทะนง	รหัสส่วนสกัด
EtOAc:Hexane 3:7		EtOAc:Hexane 3:7		EtOAc:Hexane 3:7	
200 ml.		200 ml.		200 ml.	
100 ml.		100 ml.	ป. A1-A3	100 ml.	
100 ml.		100 ml.		100 ml.	ล. A1-A8
100 ml.	พ. A1 -A2	100 ml.		100 ml.	
100 ml.		100 ml.		100 ml.	
100 ml.	พ. A3 -A12	100 ml.	ป. A4-A12	100 ml.	
100 ml.	พ. B1 -B2	100 ml.		100 ml.	
100 ml.		100 ml.		100 ml.	ล. A9-A12
100 ml.		100 ml.	ป. B1-B7	100 ml.	ล. B1-B4
100 ml.		100 ml.		100 ml.	
100 ml.		100 ml.		4:6	
100 ml.	พ. B3 -B4	100 ml.	ป. B8	100 ml.	
4:6		100 ml.	ป. B9-B12	100 ml.	ล. B5-B11
100 ml.	พ. B5 -B8	100 ml.		100 ml.	
100 ml.	พ. B9 -B10	4:6		100 ml.	
5:5		100 ml.		100 ml.	
100 ml.		100 ml.	ป. C1-C8	200 ml.	ล. B12-C1
100 ml.	พ. B11- B12	50 ml.		100 ml.	ล. C2-C6
100 ml.	พ. C1	100 ml.	ป. C9-C12	100 ml.	
6:4		100 ml.		100 ml.	ล. C7-C8
100 ml.	พ. C2-C6	100 ml.		5:5	
100 ml.		100 ml.	ป. D1-D4	100 ml.	
100 ml.		100 ml.	ป. D5-D7	100 ml.	ล. C9-C12
100 ml.	พ. C7	100 ml.		100 ml.	ล. D1-D10
100 ml.	พ. C8-C12	100 ml.	ป. D8-D9	100 ml.	
100 ml.		100 ml.	ป. D10-D12	100 ml.	
100 ml.	พ. D1-D3	50 ml.		100 ml.	

ตารางที่ 3 (ต่อ) แสดงปริมาณและสัดส่วนของ eluting solvent ที่ใช้ในการสกัดพญาชา
ปลาไหลเผือก และโสดทะนงแดง ด้วยเทคนิค column chromatography

พญาชา	รหัสส่วนสกัด	ปลาไหลเผือก	รหัสส่วนสกัด	โสดทะนง	รหัสส่วนสกัด
100 ml.		100 ml.	ป.Е1-Е3	100 ml.	
100 ml.	พ.Д4-Д6	100 ml.	ป.Е4-Е6	6:4	
100 ml.	พ.Д7-Д9	5:5		100 ml.	ล.Д11-Д12
100 ml.		100 ml.		100 ml.	ล.Е1-Е3
100 ml.	พ.Д10-Д12	100 ml.	ป.Е7-Е9	100 ml.	
100 ml.		100 ml.	ป.Е10-Е12	100 ml.	ล.Е4-Е8
100 ml.	พ.Е1-Е3	100 ml.	ป.Ф1-Ф2	100 ml.	
50 ml.		100 ml.		100 ml.	ล.Е9-Е10
7:3		100 ml.	ป.Ф3-Ф6	100 ml.	ล.Е11-Е12
100 ml.	พ.Е4	100 ml.	ป.Ф7-Ф10	100 ml.	ล.Ф1-Ф4
100 ml.	พ.Е5-Е6	100 ml.	ป.Ф11-Ф12	7:3	
100 ml.	พ.Е7-Е9	50 ml.	ป.Г1-Г2	100 ml.	
100 ml.	พ.Е10-Е12	6:4		100 ml.	ล.Ф5-Ф8
100 ml.		100 ml.	ป.Г3-Г4	100 ml.	ล.Ф9-Ф12
100 ml.	พ.Ф1-Ф2	100 ml.	ป.Г5-Г6	100 ml.	ล.Г1-Г3
100 ml.	พ.Ф3-Ф4	100 ml.	ป.Г7-Г8	100 ml.	
100 ml.	พ.Ф5-Ф8	100 ml.	ป.Г9	50 ml.	
100 ml.	พ.Ф9-Ф10	7:3		100 ml.	
100 ml.	พ.Ф11-Ф12	100 ml.	ป.Г10-Г11	100 ml.	ล.Г4-Г5
50 ml.	พ.Г1-Г3	100 ml.	ป.Г12-Н1	100 ml.	ล.Г6-Г8
100 ml.	พ.Г4-Г5	100 ml.	ป.Н2-Н3	100 ml.	ล.Г9-Г12
8:2		8:2		100 ml.	ล.Н1-Н3
100 ml.	พ.Г6-Г7	100 ml.	ป.Н6-Н7	8:2	
100 ml.	พ.Г8-Г10	100 ml.	ป.Н8-Н10	100 ml.	
100 ml.	พ.Г11-Г12			100 ml.	ล.Н4-Н5
100 ml.	พ.Н1	9:1		100 ml.	
9:1		100 ml.	ป.Н11-Н12	100 ml.	ล.Н6-Н8
100 ml.	พ.Н2-Н4	100 ml.	ป.І1-І2	100 ml.	ล.Н9-І4
100 ml.	พ.Н5-Н6	EtOAc 100%		100 ml.	ล.І5-І6
100 ml.	พ.Н7-Н9	100 ml.		100 ml.	ล.І7-І8
100 ml.	พ.Н10-Н11	100 ml.	ป.І3-І6	100 ml.	ล.І9-І10

ตารางที่ 3 (ต่อ) แสดงปริมาณและสัดส่วนของ eluting solvent ที่ใช้ในการสกัดพญาชา
ปลาไหลเผือก และโลดทะนงแดง ด้วยเทคนิค column chromatography

พญาชา	รหัสส่วนสกัด	ปลาไหลเผือก	รหัสส่วนสกัด	โลดทะนง	รหัสส่วนสกัด
EtOAc 100%		100 ml.	ป.17-18	9:1	
100 ml.	พ.11-12	100 ml.		100 ml.	ล.111-112
100 ml.	พ.11-13	MeOH 100%		100 ml.	ล.11-13
100 ml.	พ.14-15	100 ml.	ป.19	100 ml.	ล.14-16
MeOH 100%				100 ml.	ล.17-18
100 ml.	พ.16-17			100 ml.	
100 ml.				100 ml.	ล.19-111
100 ml.	พ.18-19			EtOAc 100%	
100 ml.				100 ml.	ล.112-11
100 ml.	พ.110-112			100 ml.	ล.112-113
100 ml.	พ.11			MeOH 100%	
100 ml.	พ.12-15			100 ml.	ล.114-116
100 ml.	พ.16			100 ml.	ล.117-111
				100 ml.	ล.112-11
				100 ml.	ล.112-113
				100 ml.	ล.114-117
				100 ml.	ล.118-1112
				100 ml.	ล.111-114

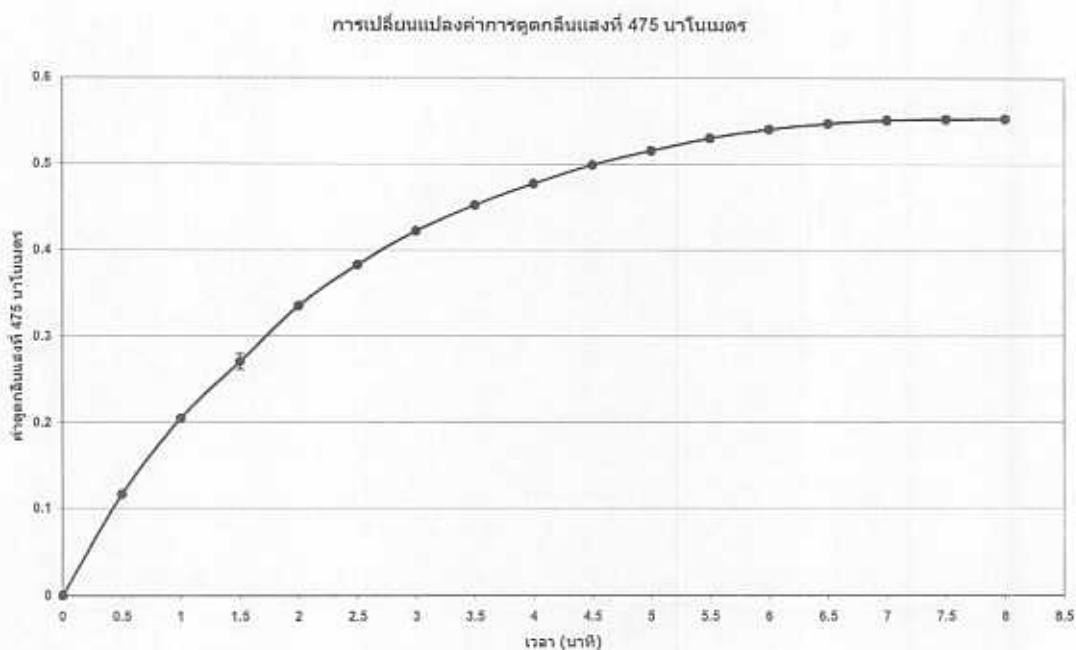
4.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

4.4.1 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ในภาวะปกติ

ผลการทดลองของเอนไซม์ไทโรซิเนส ในภาวะปกติโดยไม่มีการทดสอบใดๆ ได้ผลดัง
ตารางที่ 4 และรูปที่ 14 ซึ่งพบว่าเอนไซม์จะเปลี่ยน L-dopa เป็น dopachrome ซึ่งสามารถดูดกลืน
แสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปเพิ่มขึ้น และ
จะเริ่มคงที่เมื่อเวลา 5 นาที ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของส่วน
สกัดต่างๆ จึงเลือกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 5 นาที

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร

เวลา (นาที)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร (mean ±SD)
0.0	0.000 ± 0.000
0.5	0.117 ± 0.001
1.0	0.205 ± 0.001
1.5	0.271 ± 0.009
2.0	0.335 ± 0.001
2.5	0.383 ± 0.001
3.0	0.422 ± 0.002
3.5	0.4523 ± 0.002
4.0	0.477 ± 0.003
4.5	0.499 ± 0.003
5.0	0.516 ± 0.004
5.5	0.530 ± 0.003
6.0	0.541 ± 0.003
6.5	0.548 ± 0.003
7.0	0.552 ± 0.004
7.5	0.553 ± 0.004
8.0	0.553 ± 0.004



รูปที่ 14 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร

4.4.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของ ส่วนสกัดพญาชา

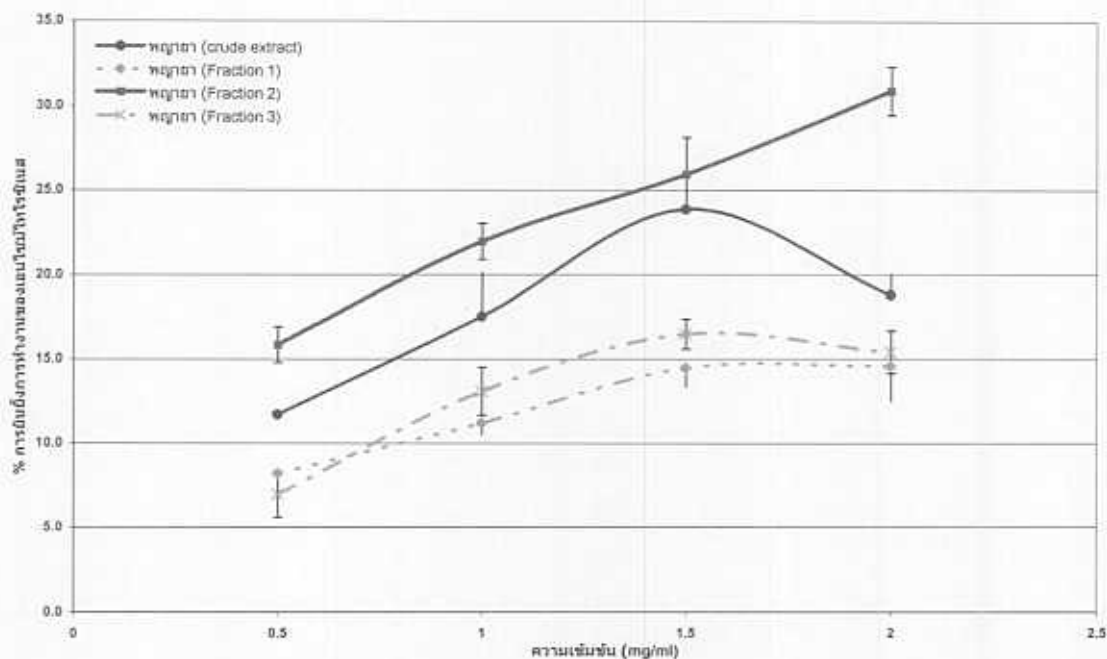
จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของ สิ่งสกัดหยาบและส่วนสกัดต่างๆของพญาชา ที่ความเข้มข้น 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 มก./มล. โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 5 นาที ได้ผลดังตารางที่ 5 และรูปที่ 15

จากผลการทดลองพบว่า สิ่งสกัดหยาบและส่วนสกัดต่างๆ ของพญาชา มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยส่วนสกัด 2 สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้มากที่สุดคือ ยับยั้งได้ 30.90 ± 1.42 % ที่ความเข้มข้น 2.0 มก./มล. ส่วนสกัดอื่นๆก็สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เช่นกัน โดยสิ่งสกัดหยาบสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 23.91 ± 1.18 % ที่ความเข้มข้น 1.5 มก./มล. และส่วนสกัด 3 สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 16.47 ± 0.89 % ที่ความเข้มข้น 1.5 มก./มล ส่วนสกัด 1 สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้น้อยที่สุดคือ 14.66 ± 1.01 % ที่ความเข้มข้น 1.5 มก./มล. ซึ่งหากเปรียบเทียบความแรง(potency) ของส่วนสกัดต่างๆ โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของส่วนสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 20 เปอร์เซ็นต์ (IC_{20}) พบว่าความแรงของส่วนสกัดสกัด 2 มากกว่าสิ่งสกัดหยาบ โดยมีค่า IC_{20} ดังนี้ คือ 0.822 และ 1.156 มก./มล ส่วน ส่วนสกัด 1 และ ส่วนสกัด 3 ไม่สามารถหาค่า IC_{20} ได้

ตารางที่ 5 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของส่วนสกัดพญายา

ชนิดของส่วนสกัด	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Inhibition : mean \pm SD)
Cinnamic 1 mmol.	(40.60 \pm 2.97) *
Kojic acid 1 mmol.	(63.87 \pm 2.07) *
พญายา (Crude extract)	
0.5 มก./มล.	(11.71 \pm 0.19) *
1.0 มก./มล.	(17.52 \pm 2.64) *
1.5 มก./มล.	(23.91 \pm 1.18) *
2.0 มก./มล.	(18.82 \pm 1.24) *
พญายา (Fraction 1)	
0.5 มก./มล.	(8.61 \pm 2.07) *
1.0 มก./มล.	(11.20 \pm 0.71) *
1.5 มก./มล.	(14.66 \pm 1.01) *
2.0 มก./มล.	(14.45 \pm 2.94) *
พญายา (Fraction 2)	
0.5 มก./มล.	(15.85 \pm 1.06) *
1.0 มก./มล.	(21.99 \pm 1.08) *
1.5 มก./มล.	(25.98 \pm 2.17) *
2.0 มก./มล.	(30.90 \pm 1.42) *
พญายา (Fraction 3)	
0.5 มก./มล.	(6.95 \pm 1.36) *
1.0 มก./มล.	(13.08 \pm 1.42) *
1.5 มก./มล.	(16.47 \pm 0.89) *
2.0 มก./มล.	(15.41 \pm 1.26) *

* มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ L-dopa ที่ 5 นาที่อย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05)



รูป 15 กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของส่วนสกัดพญายา

* มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกับ L-dopa ที่ 5 นาทีอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05)

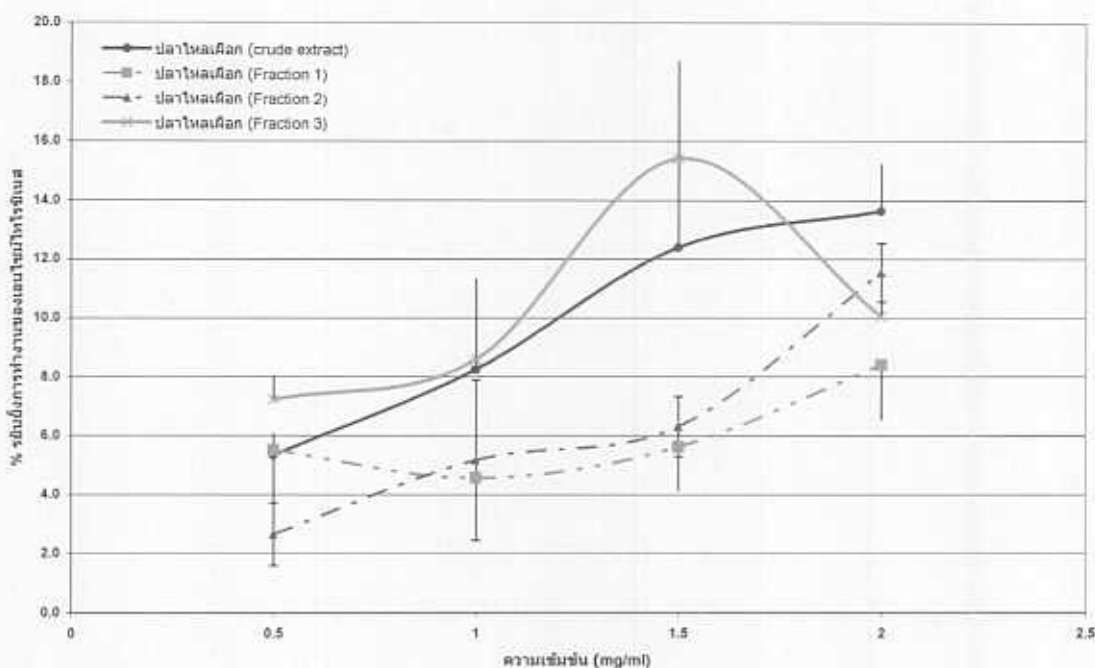
4.4.3 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของส่วนสกัดปลาไหลเผือก

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 5 นาที ได้ผลดังตารางที่ 6 และรูปที่ 17 ซึ่งพบว่าทั้งสิ่งสกัดหยาบและส่วนสกัดต่างๆของ ปลาไหลเผือก ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ค่อนข้างต่ำ และไม่มีส่วนสกัดใดสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่าส่วนสกัดที่มีฤทธิ์มากที่สุดคือ ส่วนสกัด 3 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 15.42 ± 3.29 % ที่ความเข้มข้น 1.5 มก./มล. ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์ดังกล่าวรองลงมาได้แก่ สิ่งสกัดหยาบ และ ส่วนสกัด 2 ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 13.63 ± 1.59 % และ 11.54 ± 0.99 % ที่ความเข้มข้น 2.0 มก./มล. ตามลำดับ ส่วนสกัด 1 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยที่สุด คือยับยั้งได้ 8.40 ± 1.86 % ที่ความเข้มข้น 2.0 มก./มล.

ตารางที่ 6 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของ ส่วนสกัดปลาไหลเผือก

ชนิดของส่วนสกัด	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Inhibition : mean \pm SD)
Cinnamic 1 mmol.	(40.60 \pm 2.97) [*]
Kojic acid 1 mmol.	(63.87 \pm 2.07) [*]
ปลาไหลเผือก (Crude extract)	
0.5 มก./มล	(5.34 \pm 0.73) [*]
1.0 มก./มล.	(8.26 \pm 1.06) [*]
1.5 มก./มล.	(12.40 \pm 2.89) [*]
2.0 มก./มล.	(13.63 \pm 1.59) [*]
ปลาไหลเผือก (Fraction 1)	
0.5 มก./มล	(5.51 \pm 2.78) [*]
1.0 มก./มล.	(4.56 \pm 1.93) [*]
1.5 มก./มล.	(5.61 \pm 1.47) [*]
2.0 มก./มล.	(8.40 \pm 1.86) [*]
ปลาไหลเผือก (Fraction 2)	
0.5 มก./มล	(2.656 \pm 1.07) [*]
1.0 มก./มล.	(5.17 \pm 2.73) [*]
1.5 มก./มล.	(6.31 \pm 1.02) [*]
2.0 มก./มล.	(11.54 \pm 0.99) [*]
ปลาไหลเผือก (Fraction 3)	
0.5 มก./มล	(7.24 \pm 0.79) [*]
1.0 มก./มล.	(8.60 \pm 2.72) [*]
1.5 มก./มล.	(15.42 \pm 3.29) [*]
2.0 มก./มล.	(10.07 \pm 1.48) [*]

* มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกับ L-dopa ที่ 5 นาที่อย่างมีนัยสำคัญ (p- value < 0.05)



รูป 16 กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของส่วนสกัดปลาไหลเผือก

* มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกับ L-dopa ที่ 5 นาทีอย่างมีนัยสำคัญ (p-value < 0.05)

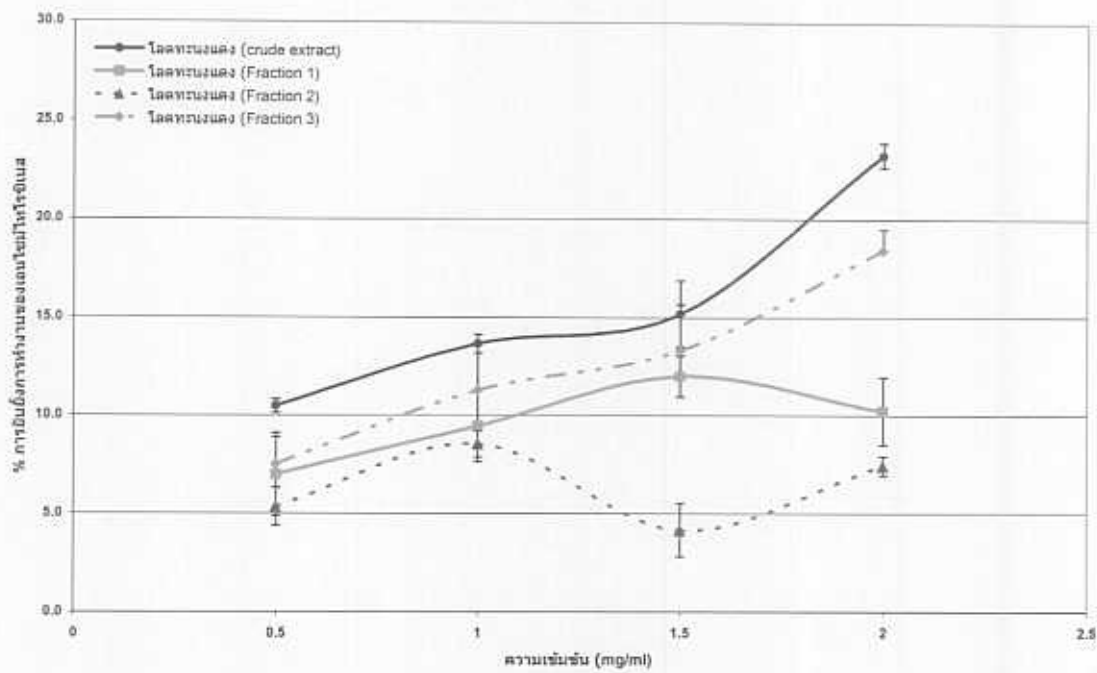
4.4.5 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของส่วนสกัดโอดทะนงแดง

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 5 นาที ได้ผลดังตารางที่ 7 และรูปที่ 17 ซึ่งพบว่าทั้งสิ่งสกัดหยาบและส่วนสกัดต่างๆของ ปลาไหลเผือกมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยพบว่าสิ่งสกัดหยาบมีฤทธิ์มากที่สุดคือยับยั้งการทำงานได้ 23.27 ± 0.65 % ที่ความเข้มข้น 2.0 มก./มล. รองลงมาได้แก่ ส่วนสกัด 3 และส่วนสกัด 1 ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 18.42 ± 1.08 % และ 12.59 ± 1.08 % ที่ความเข้มข้น 2.0 มก./มล. และ 1.5 มก./มล. ตามลำดับ ส่วนสกัดที่มีฤทธิ์น้อยที่สุดคือส่วนสกัด 2 ซึ่งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 8.54 ± 0.66 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{20} พบว่ามีเพียงสิ่งสกัดหยาบเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า IC_{20} คือ 1.822 มก./มล.

ตารางที่ 7 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของ ส่วนสกัดโลดทะนงแดง

ชนิดของส่วนสกัด	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Inhibition : mean \pm SD)
Cinnamic 1 mmol.	(40.60 \pm 2.97)*
Kojic acid 1 mmol.	(63.87 \pm 2.07)*
โลดทะนงแดง (Crude extract)	
0.5 มก./มล	(10.47 \pm 0.35)*
1.0 มก./มล.	(13.66 \pm 0.48)*
1.5 มก./มล.	(15.19 \pm 1.68)*
2.0 มก./มล.	(23.27 \pm 0.65)*
โลดทะนงแดง (Fraction 1)	
0.5 มก./มล	(6.99 \pm 2.11)*
1.0 มก./มล.	(9.46 \pm 1.85)*
1.5 มก./มล.	(12.59 \pm 1.00)*
2.0 มก./มล.	(10.22 \pm 1.73)*
โลดทะนงแดง (Fraction 2)	
0.5 มก./มล	(5.34 \pm 0.97)*
1.0 มก./มล.	(8.54 \pm 0.66)*
1.5 มก./มล.	(4.15 \pm 1.35)*
2.0 มก./มล.	(7.42 \pm 0.48)*
โลดทะนงแดง (Fraction 3)	
0.5 มก./มล	(7.52 \pm 1.38)*
1.0 มก./มล.	(11.27 \pm 2.48)*
1.5 มก./มล.	(13.32 \pm 2.35)*
2.0 มก./มล.	(18.42 \pm 1.08)*

* มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกับ L-dopa ที่ 5 นาที่อย่างมีนัยสำคัญ (p- value < 0.05)



รูป 17 กราฟแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของ ส่วนสกัดโสดทะนงแดง
* มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกับ L-dopa ที่ 5 นาที่อย่างมีนัยสำคัญ (p- value < 0.05)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดพญาชา ปลาไหลเผือก และ โลดทะนงแดง พบว่าส่วนสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้แตกต่างกันคือ ส่วนสกัดพญาชาสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้มากกว่า โลดทะนงแดง และ ปลาไหลเผือก ตามลำดับ โดยพญาชาส่วนสกัด 2 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงสุด คือ $30.90 \pm 1.42\%$ สิ่งสกัดหยาบโลดทะนงแดงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้สูงสุดคือ $23.27 \pm 0.65\%$ ส่วนปลาไหลเผือกพบว่ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงสุดคือ $15.42 \pm 3.29\%$ เมื่อเปรียบเทียบความแรง โดยดูจากค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 20% (IC_{20}) พบว่าส่วนสกัดพญาชา 2 มีความแรงมากกว่า สิ่งสกัดหยาบพญาชา และสิ่งสกัดหยาบ โลดทะนงแดง (IC_{20} เท่ากับ 0.822 มก./มล. 1.156 มก./มล. และ 1.822 มก./มล. ตามลำดับ) ส่วนสกัดอื่นๆ พบว่าไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์

จากการหมักส่วนของพืชสมุนไพรดังกล่าวด้วย methanol ซึ่งนับเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถละลายสารอินทรีย์ได้ในช่วงกว้าง ทั้งสารที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ทำให้สามารถสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรที่ต้องการทดสอบออกมาได้เป็นส่วนใหญ่หรืออาจทั้งหมด ซึ่งพบว่าสารละลายที่ได้จากการหมัก ก่อนนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกนั้น เป็นสารละลายสีเหลือง โดยสารละลายที่ได้จากพญาชาจะเป็นสีเหลืองอ่อน ในขณะที่สารละลายที่ได้จากการหมักรากปลาไหลเผือกและโลดทะนงแดง จะเป็นสารละลายสีเหลืองเข้ม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ในส่วนสกัดดังกล่าวอาจมีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งเป็นสารที่มีสีเหลือง และมีรายงานว่าสารในกลุ่มดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Kubo I and Kinst Hori 1998 และ Kubo I and Kinst Hori 1999) ซึ่งเมื่อนำมาศึกษาแบบของสารบนแผ่น TLC หลังจากพ่นด้วย anisaldehyde พบว่ามีสีเหลือง สีน้ำตาล และม่วงและสีน้ำเงิน โดยส่วนสกัดที่ได้จากโลดทะนงแดง จะมีสีดำ และ น้ำตาล ส่วนส่วนสกัดที่ได้จากปลาไหลเผือก และพญาชา ได้จุดสีส้ม สีดำ สีเขียว ฟ้ำ และม่วง ซึ่งอาจบอกได้ว่าส่วนสกัดที่มีสีน้ำเงิน และสีม่วง อาจมีส่วนประกอบของสารในกลุ่ม terpenoids และ steroids ตามลำดับ ซึ่งได้มีรายงานถึงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เช่นกัน (Aldo Cristoni et al. 2002) แต่ในส่วนที่เป็นสีเหลือง น้ำตาลหรือดำ ไม่สามารถระบุได้ว่า เป็นสารประกอบกลุ่มใด ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ส่วนสกัดต่างๆ ประกอบด้วยสารมากมายหลายชนิดถึงแม้ว่าจะนำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธี

column chromatography ก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดพญาชา และปลาไหลเผือก มีสีน้ำเงินคล้ายกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าพืชทั้ง 2 ชนิดอาจมีสารกลุ่มเดียวกันเป็นองค์ประกอบ ในขณะที่รูปแบบของส่วนสกัดไลโอทเทนนงแดง กลับมีสีน้ำเงินเพียงเล็กน้อย

อย่างไรก็ตาม เมื่อนำส่วนสกัดต่างๆ มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าส่วนสกัดพญาชา มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ทุกส่วนสกัด แต่ส่วนสกัดจากปลาไหลเผือกมีฤทธิ์ดังกล่าวเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แม้ว่าลักษณะสีบนแผ่น TLC จะมีสีน้ำเงินคล้ายกับพญาชา อย่างไรก็ตาม ส่วนสกัดหยาบไลโอทเทนนงแดงสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงกว่าปลาไหลเผือก ในขณะที่มีลักษณะรูปแบบบนแผ่น TLC แตกต่างไปจากพญาชาและปลาไหลเผือก

จากผลการทดลอง พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลองคือ 2 มก./มล. กลับพบว่าส่วนสกัดส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้น้อยลง ซึ่งในความเป็นจริงนั้น พบว่าสารละลายของส่วนสกัดต่างๆ ยกเว้นส่วนสกัด 1 (Fraction 1) มักเป็นสารละลายที่มีสี ซึ่งอาจรบกวนการดูดกลืนแสงของ dopachrome ที่ 475 นาโนเมตร ก็อาจเป็นไปได้

จากผลการวิจัยครั้งนี้ พบว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอาจยังไม่ชัดเจนในส่วนสกัดพืชบางชนิด ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ส่วนสกัดที่นำมาทดสอบนั้นประกอบด้วยสารมากมายหลายชนิด ซึ่งหากทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นอาจใช้ความเข้มข้นของส่วนสกัดลดลงในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และยังอาจใช้วิธีการอื่นๆ ในการทดสอบ เช่นการศึกษาการสังเคราะห์ melanin ใน melanoma cell line นอกจากนี้ส่วนสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้น้อยนั้น อาจมีกลไกการออกฤทธิ์อื่นๆ ที่ทำให้ผิวขาวขึ้นก็ได้ ดังนั้นในการวิจัยครั้งต่อไป จึงควรทำส่วนสกัดให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และอาจทดสอบฤทธิ์อื่นๆ เช่น ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นต้น

บรรณานุกรม

- กิตติพันธ์ ดันตระกูลโรจน์ม กฤษณา ภูตะคามม ทองปาน เทียมราช และคณะ. 2531. เกล็ดขี้กิ้งกิ้ง
เทคโนโลยี และโครมาโตกราฟี. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ม.เชียงใหม่. 440-64.
- ดวงดาว ฉันทศาสตร์. 2540. กลไกการสร้างและยับยั้งเมลานิน (Formation and Inhibition of
melanin). ใน : เทคโนโลยีการพัฒนาตัวรับเครื่องสำอางและการผลิตชั้นอุตสาหกรรม. พิมพ์
ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บ.ประชาชน จำกัด. 236-42.
- บุญชู ศรีตุลารักษ์ วันชัย ตื้อเนกนามกุล และกิตติศักดิ์ ลิขิตวิทย์. 1998. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโร
ซีนเนสจากมะหาด. *Thai J. Pharm. Sci.* 22:149-55.
- Aldo Cristoni, Francesco Di Pierro, Giancarlo Guglielmini, *et al.* 2002. Soothing activity of
terpenoid fraction of *Ginkgo biloba* and of its phospholipid complex. Poster presentation
in International Federation Society of Cosmetic Chemists 22nd Edinburg 23-26
September 2002.
- Faulkner MB, Watts BM, Humm HJ. 1954. Enzymatic darkening of shrimp. *Food Research*
19:302.
- Harborne JB. 1998. *Phytochemical Methods (A guide to modern techniques of plant
analysis)*. Chapman & Hall, London. 1-32.
- Kim J-H, Lee KT. 1998. Inhibitory effects of *Ramulus Mori* extracts on melanogenesis.
Cosmetics & Toiletries. 113:65-70.
- Kubo I, Kinst-Hori I. 1998. Tyrosinase inhibitors from anise oil. *J Agric Food Chem.*
46:1268-1271.
- Kubo I, Kinst-Hori I. 1998. Tyrosinase inhibitors from cumin. *J Agric Food Chem.* 46:5338
-5341.
- Kubo I, Kinst-Hori I. 1999. Flavonols from Saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and
inhibition mechanism. *J Agric Food Chem.* 47:4121-4125.
- Lee H-S. 2002. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J Agric
Food Chem.* 50:1400-1403.

- Lee Ok-Sub and Kim Eun-Jong. 1995. Skin Lightening. *Cosmetic & Toiletries*. 110: 51-56.
- Masuda M, Tejima T, Suzuki T, Imokawa G. 1996. Skin lighteners. *Cosmetics & Toiletries*. 111:65-77.
- Masamoto Y, Iida S, Kubo M. 1980. Inhibitory effect of chinese crude drugs on tyrosinase. *Planta Med icine*. 40:361-365.
- Prota G. 1996. Melanins and Melanogenesis. *Cosmetic & Toiletries*. 111: 51
- Wagner H, Bladt S. 1996. **Plant Drug Analysis (A thin layer chromatography atlas)**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.355-357.
- http://www.geocities.com/yai25/news_herbs2.html.
- <http://www.benjama.ac.th/pos/vegetable/item03/page031.html>.
- <http://www.ku.ac.th/AgrInfo/plant/plant1/p38.html> .
- http://www.baanrak.com/herbal/herbal_detail.asp?intHerbalID=6 .

