



ชุดโครงการ : การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากแก่นครีต้อการทำงานของ
เอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด

Studies on the inhibitory effects of *Dalbergia parviflora* extract on the activity of
mushroom tyrosinase

โครงการย่อยที่ 1

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี

Studies on the tyrosinase inhibitory effect of flavonoids isolated from *Dalbergia parviflora*

โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาจลนศาสตร์ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้
จากแก่นครี

Studies on the tyrosinase inhibition kinetics of some flavonoids isolated from *Dalbergia
parviflora*

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

เทพพร โลมารักษ์

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2559

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)



ชุดโครงการ : การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากแก่นครีต่อการทำงานของ
เอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด

Studies on the inhibitory effects of *Dalbergia parviflora* extract on the activity of
mushroom tyrosinase

โครงการย่อยที่ 1

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี

Studies on the tyrosinase inhibitory effect of flavonoids isolated from *Dalbergia parviflora*

โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาจลนศาสตร์ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้
จากแก่นครี

Studies on the tyrosinase inhibition kinetics of some flavonoids isolated from *Dalbergia
parviflora*

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

เทพพร โลมารักษ์

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2559

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนจากงบประมาณเพื่อจัดสรรทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี
งบประมาณ 2559 มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

บทคัดย่อ

สารสกัดหยาบของแก่นครี (*Dalbergia parviflora*) และสารฟลาโวนอยด์บริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี 27 ชนิด ได้ถูกนำมาตรวจคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (mushroom tyrosinase) พบว่าสารสกัดหยาบของแก่นครีมีค่า IC_{50} ต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็น $2.6 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ และสารฟลาโวนอยด์บริสุทธิ์ที่นำมาทดสอบทั้งหมดพบว่ามีเพียง 4 ชนิดที่ให้ผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีค่า IC_{50} ต่ำกว่า $100 \mu\text{M}$ ซึ่งได้แก่ Khirinone (5), Cajanin (9), (3RS)-3-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) และ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) สารฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดนี้ได้นำไปศึกษาจลศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์โดยสังเกตผลด้วยปฏิกิริยาการยับยั้งกิจกรรมจำเพาะของ *o*-diphenolase ผลการศึกษาเผยให้เห็นว่ากลไกการยับยั้งเอนไซม์ของสารประกอบ (5) (9) (21) และ (27) เป็นแบบชนิด uncompetitive, non-competitive, mixed และ competitive ตามลำดับ การค้นพบองค์ความรู้พื้นฐานนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากแก่นครีมีศักยภาพที่จะเป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นสารต้านปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (anti-browning) โดยผ่านกลไกการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส

คำสำคัญ : ครี สักซี ฟลาโวนอยด์ เอนไซม์ไทโรซิเนส ตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ABSTRACT

A crude extract of *Dalbergia parviflora* and its constituents of 27 flavonoids isolated as pure compounds were screened for their inhibitory activity against mushroom tyrosinase. The crude extract of *D. parviflora* exhibited tyrosinase inhibitory activity with an IC₅₀ of $2.6 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$. Among the flavonoids tested, only four, namely Khirinone (5), Cajanin (9), (3RS)-3-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) and (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) were shown to have IC₅₀ values lower than 100 μM . These flavonoids were further studied for their inhibition kinetics on the *o*-diphenolase activity of the mushroom tyrosinase. The results showed that the inhibition of (5),(9), (21) and (27) were uncompetitive, non-competitive, mixed and competitive inhibitors, respectively. Based on these findings, it was concluded that *D. parviflora* heartwood extract is a potential source of natural product which might be used as anti-browning agents that can inhibit the enzymatic oxidation of phenols by tyrosinase.

Keywords: *Dalbergia parviflora*, flavonoid, tyrosinase, tyrosinase inhibitor,

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	(i)
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	(ii)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	(iii)
สารบัญเรื่อง.....	(iv)
สารบัญรูปภาพ.....	(vi)
สารบัญตาราง.....	(vii)
บทที่ 1	
บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำกาวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	2
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	4
บทที่ 2	
ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	5
เอนไซม์ไทโรซิเนส	5
คีรี	6
ฟลาโวนอยด์และไอโซฟลาโวนอยด์.....	8
ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์.....	10
เอนไซม์ไทโรซิเนสกับสีผิว.....	11
ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของผลไม้กับเอนไซม์กลุ่มพอลิฟีนอลออกซิเดส.....	12

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย.....	14
เครื่องมือวิทยาศาสตร์.....	14
สารเคมี / สารสกัด / เอนไซม์	14
การเตรียมสารสกัดหยาบจากแก่นครี	14
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ด	16
การเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์และซับสเตรตสำหรับการศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยา	16
การเลือกชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายสารสกัดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษา อัตราการเกิดปฏิกิริยา	16
การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	17
การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารฟลาโวนอยด์จากแก่นครี.....	18

บทที่ 4

ผลการวิจัย.....	20
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ด.....	20
การเลือกความยาวคลื่นสูงสุดสำหรับการศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยา.....	20
การเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์และซับสเตรตสำหรับการศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยา.....	22
การเลือกชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายสารสกัดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษา อัตราการเกิดปฏิกิริยา.....	23
การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	24
การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารฟลาโวนอยด์จากแก่นครี	25

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	31
บรรณานุกรม.....	35
ภาคผนวก.....	40
ประวัตินักวิจัย.....	41

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1	แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย.....	3
ภาพที่ 2.1	<i>Dalbergia parviflora</i> Roxb. แสดงลักษณะของใบและผล.....	7
ภาพที่ 2.2	<i>Dalbergia parviflora</i> Roxb. แสดงลักษณะของแก่นครี (วัตถุดิบแห้ง) และเมื่อ บดละเอียดเป็นผง	7
ภาพที่ 2.3	โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์.....	9
ภาพที่ 2.4	โครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์.....	9
ภาพที่ 2.5	แผนผังชีวสังเคราะห์ของเมลานิน	12
ภาพที่ 4.1	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	20
ภาพที่ 4.2	กราฟแสดงอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ไทโรซิเนสและL-dopa ที่แปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์และซับสเตรตที่ความยาวคลื่น 475 nm.....	22
ภาพที่ 4.3	กราฟแสดงร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสภายใต้สภาวะ ที่มีการเติมตัวทำละลาย DMSO หรือ Methanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1.25, 2.5, 5 และ 10 %	23
ภาพที่ 4.4	แสดงกราฟ Lineweaver-Burk ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (mushroom tyrosinase) โดยสารฟลาโวนอยด์	30

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 แสดงรายการและปริมาณของส่วนผสมในปฏิกิริยาการวัดค่าการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส.....	18
ตารางที่ 4.1 ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสง (A) ที่ความยาวคลื่น (λ) ระหว่าง 400-600 นาโนเมตร ของผลิตภัณฑ์ (Dopachrome) ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	21
ตารางที่ 4.2 โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดบริสุทธิ์ที่ใช้ทดสอบในการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งสกัดแยกได้ จาก <i>Dalbergia parviflora</i>	27
ตารางที่ 4.3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (Mushroom tyrosinase) โดยสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จาก <i>Dalbergia parviflora</i>	28
ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ทางจุลศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ด (Mushroom tyrosinase) โดยสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จาก <i>Dalbergia parviflora</i>	29

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เอนไซม์ไทโรซิเนสมีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์เมลานินซึ่งทำให้เกิดสีผิวและยังเกี่ยวข้องกับ การเกิดสีน้ำตาลในอาหารจำพวกผักผลไม้และอาหารทะเล นอกจากนี้ยังเป็นเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของแมลง ดังนั้นการศึกษาตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงมีโอกาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้ 3 ประเภท คือ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินเพื่อให้ผิวขาว ผลิตภัณฑ์สารเติมแต่งอาหารเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล และผลิตภัณฑ์กำจัดตัวอ่อนแมลงโดยวิธีชีวภาพ ทั้งนี้มีรายงานว่าสารฟุกุซเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากพืชมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และคณะผู้วิจัยได้เคยรายงานการค้นพบสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์ดังกล่าวมาแล้ว ดังนั้นหากทำการวิจัยศึกษาถึงคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จะเป็นการสร้างโอกาสในการพัฒนาองค์ความรู้และพัฒนานวัตกรรมใหม่

ครีหรือสักซี (*Dalbergia parviflora*) เป็นพืชยืนต้นที่มีแก่นไม้ซึ่งมีการใช้เป็นยาสมุนไพร รักษาแผลเปื่อยพุพองตามหลักภูมิปัญญาท้องถิ่นแต่ยังมีได้มีการศึกษาในเชิงการตลาดทางวิทยาศาสตร์เพื่อสนับสนุนภูมิปัญญาการใช้สมุนไพร และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาสารฟุกุซเคมีที่เป็นองค์ประกอบในแก่นครีพบว่า มีสารประกอบฟลาโวนอยด์มากกว่า 60 ชนิด ในขณะที่มีงานวิจัยอื่นๆ ได้กล่าวถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบฟลาโวนอยด์ไว้อย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Fernandez-Pancho et al., 2008; Prochazkova et al., 2011) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Kim et al., 2004) ฤทธิ์ในการต้านจุลชีพประเภทแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส (Tereschuk et al., 1997; Tsao et al., 1982; Yao et al., 2004) และรวมถึงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในระบบชีวภาพ (Kongkamnerd et al., 2012; Kongkamnerd et al., 2011) ทั้งนี้การส่งเสริมการวิจัยด้านสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นการสร้างความพร้อมทางด้าน การ

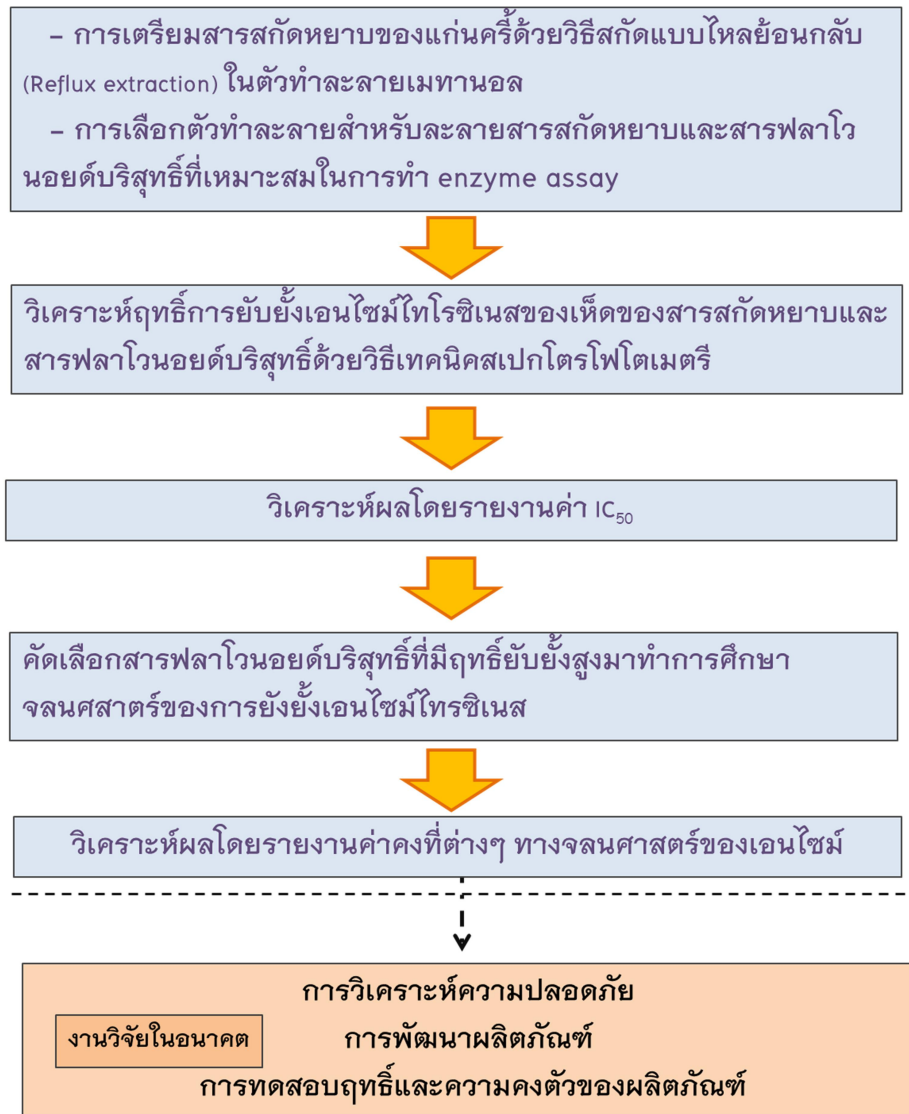
ผลิตรักษาโรค เครื่องสำอาง อาหาร รวมถึงยากำจัดโรคพืช และเป็นแผนหนึ่งของการพัฒนานวัตกรรมด้านสมุนไพรไทยให้มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับมากขึ้น ในทางเศรษฐกิจจะนำไปสู่การลดการนำเข้าของสารเคมีหรือสารสังเคราะห์ รวมถึงการส่งเสริมให้มีการอนุรักษ์พืชพันธุ์สมุนไพร และประชาสัมพันธ์ให้ทราบถึงคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติในท้องถิ่น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาดจากแก่นครี
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี
3. เพื่อศึกษาจรรยาบรรณของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์บางชนิด

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาวิจัยภายในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ดในหลอดทดลอง โดยการใช้เทคนิคการติดตามอัตราการเกิดปฏิกิริยาและอัตราการยับยั้งปฏิกิริยาดังวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรี โดยยังไม่มีการพัฒนาสารสกัดให้เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการใช้เป็นยาหรืออาหาร และการวิจัยนี้ยังไม่มีทดลองในมนุษย์หรือสัตว์ตัวอย่างสมุนไพรเป็นสมุนไพรแห่งจากร้านขายยาบริษัท เจ้ากรมเปือ จำกัด เลขที่ 229-231 ถนนจักรวรรดิ แขวงจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร



ภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แก่นครีเป็นสมุนไพรที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทย โดยพบว่ามีการใช้เป็นยาบำรุงร่างกายและยาสำหรับสตรี และคณะผู้วิจัยได้ศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและพบว่ามียูทิต้านอนุมูลอิสระสูง จึงเห็นสมควรศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ให้รอบด้าน โครงการวิจัยนี้จึงได้พัฒนางานวิจัยเดิมให้มีการแตกแขนงการวิจัยออกไปในเชิงลึก โดยมุ่งประเด็นหลักไปที่การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อยืนยันผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับหลอดทดลองก่อนการประเมินแนวทางพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้การนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ จะทำให้สามารถพัฒนาขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นที่ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับอาหาร สุขภาพ และความงาม และเป็นการสร้างโอกาสในการพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อกลับคืนสู่ท้องถิ่น อันจะนำมาซึ่งโอกาสในการสร้างรายได้และความยั่งยืน

บทที่ 2

ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase, EC 1.14.18.1) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase) มีชื่ออื่นๆ เช่น monophenol monooxygenase, phenolase, phenol oxidase, tyrosine-dopa oxidase หรือ monophenol oxidase เป็นต้น เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ชนิด copper-containing enzyme พบอยู่ในสิ่งมีชีวิตที่หลากหลาย เช่น ในจุลินทรีย์ สัตว์ และพืช เอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่ามีหน้าที่สำคัญใน 3 ประเด็นคือ

1) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเอนไซม์ไทโรซิเนสจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์รงควัตถุเมลานิน (melanin) ที่อยู่ภายในเซลล์เมลานโนไซต์ (Melanocytes) โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารตั้งต้นทั้งแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) และแอล-โดปา (L-dopa) ร่วมกับออกซิเจนได้เป็นสารประกอบโดปาโครม (dopachrome) หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันโดยไม่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเมลานินชนิดต่างๆ ซึ่งจะถูกส่งต่อเพื่อสะสมยังเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) และทำให้เกิดลักษณะการแสดงออกของสีผิว สีผม สีขน และสีนัยน์ตานัยน์ตา ความผิดปกติของการผลิตเอนไซม์นำไปสู่ภาวะการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับสีผิว ในทางด้านการประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางการค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitor) เป็นประเด็นยุทธศาสตร์สำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อผิวขาว (skin whitening agent) (Chang, 2009)

2) เอนไซม์กลุ่มนี้ยังพบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาล (enzymatic browning reaction) ของอาหารประเภทพืชผักผลไม้ โดยปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์นี้เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเกิดการชำรุด ช้ำ ขาด เมื่อถูกกระทบ บด หั่น หรือสับทำให้เอนไซม์ สารที่ทำปฏิกิริยา (substrate) และออกซิเจนเข้ามาสัมผัสกัน สาร monophenol (ไม่มีสี) จะถูกออกซิไดซ์เป็นไดฟีนอล (diphenol) ซึ่งไม่มีสี และถูกออกซิไดซ์ต่อเป็น o-quinone ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโนหรือโปรตีนได้เป็นสารสีน้ำตาล และจะรวมตัวกันเป็นพอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลใหญ่และมีสีน้ำตาล การศึกษาด้วยยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะสามารถนำไป

พัฒนาเป็นสารช่วยป้องกันการเกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น น้ำผลไม้ ผักผลไม้สดที่ผ่านการตัดแต่ง และอาหารทะเล (Li et al., 2007; Nirmal and Benjakul, 2011)

3) ในสัตว์กลุ่มแมลงและครัสเตเซียนพบว่าเอนไซม์นี้จะถูกเรียกว่า polyphenoloxidase (PPO) กลุ่มฟีนอลออกซิเดสมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของแมลงมีหน้าที่ช่วยในกระบวนการป้องกันตัวและเจริญเติบโต ได้แก่ การสร้างเมลานินเพื่อป้องกันรังสีที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ การรักษาบาดแผล การสร้างเกราะหุ้มปรสิต (parasite encapsulation) และการทำให้เกิดกระบวนการแข็งตัวของผนังลำตัว (sclerotization) หลังการลอกคราบ เป็นต้น จากความสำคัญของเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อการพัฒนาการของตัวอ่อนแมลง การศึกษาตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสามารถนำไปสู่การพัฒนาสารกำจัดแมลงที่ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้ (Kubo et al., 2003; Nguyen et al., 2015)

ครี (*Dalbergia parviflora* Roxb.) มีชื่อสามัญคือ Blackwood และชื่อท้องถิ่นได้แก่ กระชิก ชิก สรี และ สักชี เป็นต้น จัดอยู่ในวงศ์ (family) *Fabaceae* วงศ์ย่อย (subfamily) *Faboideae* อาจมีการสับสนกับต้นสักชี (*Dalbergia candenatensis*) ซึ่งเป็นพรรณไม้ในวงศ์เดียวกัน ครีเป็นต้นไม้ประจำจังหวัดสตูล พบทั่วไปตามป่าโปร่งในที่ลุ่มและตามชายห้วยทางภาคใต้ของไทย เป็นไม้ยืนต้นมีลักษณะเป็นไม้พุ่มรอเลื้อย ลำต้นมักมีหนาม ใบประกอบแบบขนนก ใบย่อยเรียงสลับ 5-9 ใบ รูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับ ปลายมน ช่อดอกแบบช่อแยกแขนงออกตามง่ามใบ ดอกรูปดอกถั่วขนาดเล็กมาก เรียงเป็นแถวทางด้านบนของแขนงช่อดอก กลีบเลี้ยง 5 กลีบ ติดกันเป็นรูปถ้วย กลีบดอก 5 กลีบ สีขาว เกสรเพศผู้ 10 อัน รังไข่เล็ก มีขนประปราย ฝักค่อนข้างหนา มี 1-4 เมล็ด เมล็ดรูปไต ประโยชน์ของแก่นครีคือใช้รักษาแผลเรื้อรัง ใช้เป็นยาแก้ไข้ ใช้ทำรูปและเครื่องเรือน

งานวิจัยเกี่ยวกับสารพฤกษเคมี (phytochemical) จากแก่นครีพบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มากกว่า 60 ชนิด และพบว่าหลายชนิดมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Promden et al., 2014; Songsiang et al., 2009) นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ยังมีรายงานว่า เป็นสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Chen et al., 1996; Croft, 1998; Rice-Evans et al., 1996) คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากแก่นครีโดยวิธี DPPH วิธี ORAC และวิธี xanthine/xanthine oxidase ซึ่งพบว่ามีสารหลายชนิดที่แสดงสมบัติ

ด้านอนุมูลอิสระได้ อีกทั้งยังได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ (Promden et al., 2014) สารฟลาโวนอยด์จากแก่นครีจึงเป็นเป้าหมายที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนา ยา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง



ภาพที่ 2.1 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของใบและผล

ที่มาของภาพ : US National Herbarium. Barcode 01188456 (©Smithsonian Institution, National Museum of Natural History, Department of Botany)



ภาพที่ 2.2 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของแก่นครี (วัตถุดิบแห้ง) และเมือ

บดละเอียดเป็นผง ที่มาของภาพ : วรวัฒน์ พรหมเด่น (2557)

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids)

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มาจากภาษาละตินคำว่า flavus หมายถึงสีเหลืองซึ่งเป็นสีที่พบในพืชตามธรรมชาติ ฟลาโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิของพืช (secondary metabolite) นอกจากนี้ในช่วงราวๆ ปี ค.ศ. 1930 – 1950 ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฟลาโวนอยด์มากขึ้นและมีการจัดให้ฟลาโวนอยด์เป็นวิตามิน P (Bentgsath et al., 1937) จนกระทั่งในปัจจุบันฟลาโวนอยด์ยังคงมีความน่าสนใจและมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในหลายๆ ด้านมากขึ้น เช่นด้านโภชนาการ ด้านสุขภาพ และด้านความงาม พบว่าฟลาโวนอยด์ที่รับประทานจากอาหารมีความสัมพันธ์กับระบบการต้านอนุมูลอิสระในมนุษย์ จึงเป็นที่มาของการศึกษาปริมาณและชนิดของฟลาโวนอยด์ในแหล่งอาหาร ทั้งนี้พบว่าในผักและผลไม้เป็นแหล่งของฟลาโวนอยด์ที่สำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่ามีฟลาโวนอยด์ใน ช็อกโกแลต ชา และไวน์อีกด้วย (Yao et al., 2004)

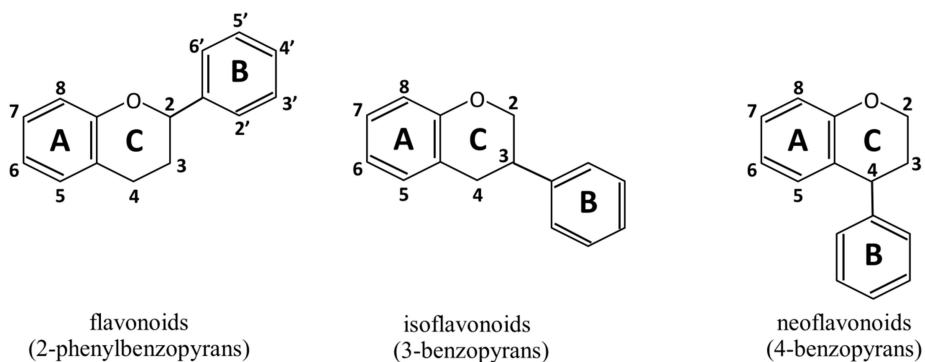
ในเชิงโครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารพฤษเคมีในธรรมชาติพบว่า มีโครงสร้างหลักเป็น C6-C3-C6 ประกอบกับการมีหมู่แทนที่ (substitution group) ในตำแหน่งต่างๆ ตามระบบการเรียกชื่อ IUPAC สามารถจัดจำแนกฟลาโวนอยด์ได้ดังนี้

- 1) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) หรือ ไบโอฟลาโวนอยด์ (bioflavonoid)
- 2) ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) เกิดจากโครงสร้างของ 3-phenylchromen-4-one
- 3) นีโอฟลาโวนอยด์ (neoflavonoid) เกิดจากโครงสร้างของ 4-phenylcoumarine

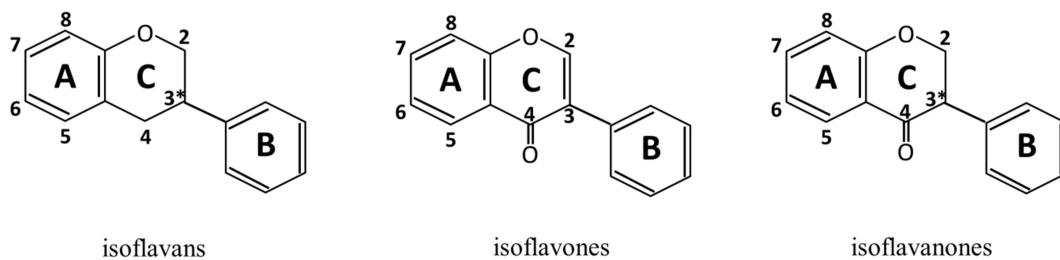
ฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 ชนิด เป็นสารประกอบที่มีหมู่คีโตนและมีโครงสร้างวงแหวน 3 วง เป็นโครงสร้างหลัก (flavonoid backbone) โดยทั่วไปวงแหวนแต่ละวงจะมีชื่อคือ A B และ C

ไอโซฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีโครงสร้างหลักมาจาก 3-phenylchroman เป็นสารประกอบที่พบอยู่ในสิ่งมีชีวิตอาณาจักรพืช ความหลากหลายของชนิดของไอโซฟลาโวนอยด์ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน และยังคงมีความแตกต่างหลากหลายของระดับออกซิเดชันบนวงแหวน (Grotewold, 2006) ไอโซฟลาโวนอยด์จึงสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้

1. ไอโซฟลาแวน (isoflavan)
2. ไอโซฟลาโวน (isoflavone)
3. ไอโซฟลาวาโนน (isoflavanone)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ (2-phenylbenzopyran) ไอโซฟลาโวนอยด์ (3-benzopyran) และ นีโอฟลาโวนอยด์ (4-benzopyran) แสดงการระบุหมายเลขตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน A B และ C



* stereocenter

ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์ 3 ชนิด คือ ไอโซฟลาเวอน ไอโซฟลาโวน และ ไอโซฟลาวานอน แสดงการระบุหมายเลขตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน A B และ C

ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์

ในอดีตมีการใช้ยาสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อรักษาความเจ็บป่วยและโรคเสื่อม (degenerative disease) ซึ่งเกี่ยวข้องกับความชราภาพรวมถึงโรคมะเร็ง เบาหวาน โรคหัวใจ ความดัน เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีสารพฤกษเคมี (phytochemical) หลายชนิดเป็นองค์ประกอบในพืชสมุนไพรเหล่านั้น ซึ่งได้แก่ สารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ไกลโคไซด์ (glycoside) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoid) อัลคาลอยด์ (alkaloid) เป็นต้น จากการศึกษาวิจัยพบว่าสารพฤกษเคมีเหล่านี้สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น อัลคาลอยด์มีผลต่อระบบสรีรวิทยาของมนุษย์และสัตว์ (Ferraz et al., 1999) สารประกอบฟีนอลซึ่งรวมถึงฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Fernandez-Pancho et al., 2008; Prochazkova et al., 2011) ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง (estrogen-like activity) (Promden et al., 2014; Wungsintaweekul et al., 2011) และยังสามารถยับยั้งเอนไซม์นิวรามิเนเดส (neuraminidase) ของ avian influenza virus ได้ (Kongkamnerd et al., 2012; Kongkamnerd et al., 2011)

ในปัจจุบันนี้ฟลาโวนอยด์กำลังเป็นที่สนใจในวงการที่ศึกษาเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงมาก (Devasagayam et al., 2004; Nijveldt et al., 2001) สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์พบว่ามีผลเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น การต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Kim et al., 2004) ยับยั้งเอนไซม์บางกลุ่ม เช่น hydrolytic enzyme และ oxidative enzyme (Theos et al., 2005; Yang et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าฟลาโวนอยด์สามารถป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และฟลาโวนอยด์บางชนิดอาจมีศักยภาพที่สามารถยับยั้งไวรัส HIV ได้ (Yao et al., 2004) ฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในสารประกอบฟลาโวนอยด์ ได้แก่ สารสกัดจากใบ *Tagetes minuta* ซึ่งการใช้เป็นยาพื้นบ้านเพื่อรักษาโรคติดเชื้อในประเทศแถบอาร์เจนตินาซึ่งพบว่ามีสารฟลาโวนอยด์คือ quercetagenin-7-arabinosyl-galactoside (Tereschuk et al., 1997) สารสกัดจาก *Scutellaria baicalensis* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจีนที่ใช้รักษาโรคเชื้อหุ่มพินอักเสบและแผลติดเชื้อในช่องปากพบว่ามีสารฟลาโวน baicalein เป็นสารออกฤทธิ์หลัก (Tsao et al., 1982)

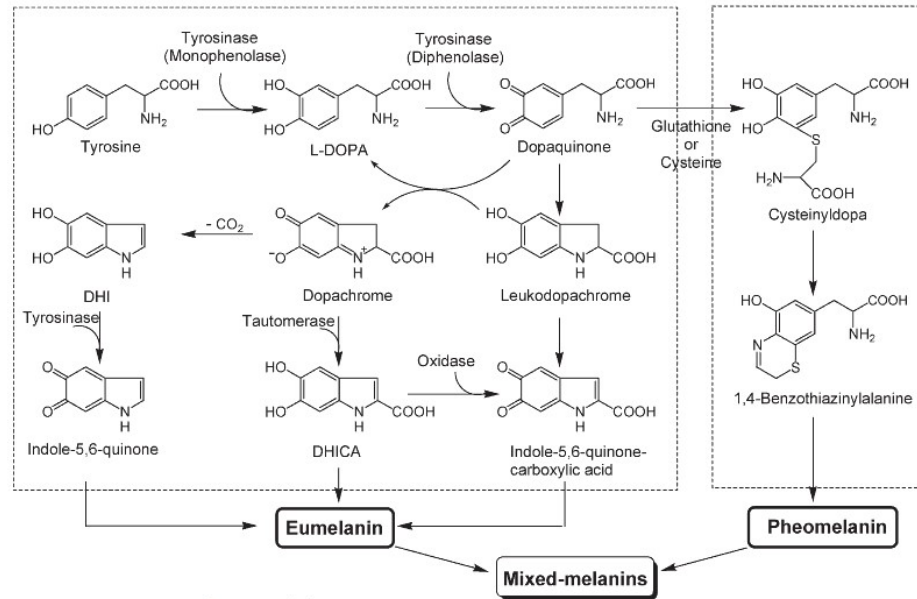
มีการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารพฤกษเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้แก่ Glabrene และ Isoliquiritigenin ในรากชะเอม (*Glycyrrhiza glabra* L.)(Nerya et al., 2003) Norartocarpetin จากเปลือกและรากของพืชตระกูลหม่อน (*Morus ihou*) (Jeong et al., 2009; Ryu et al., 2008) Taxifolin จากต้นอ่อนของพืชจำพวกผักแว่น (*Polygonum hydropiper* L.)(Miyazawa and Tamura, 2007)

เอนไซม์ไทโรซิเนสกับสีผิว

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในเซลล์เมลานโนไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีอยู่ประมาณ 2-5% ของปริมาณเซลล์ผิวทั้งหมด โดยเซลล์ดังกล่าวมีความจำเป็นต่อการกระบวนการสร้างเมลานินเพื่อส่งให้แก่เซลล์ข้างเคียงเช่น เซลล์เคลลาติโนไซต์ ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นขั้นกำหนดอัตรา (rate-determining step) ของกระบวนการสร้างเมลานิน (Chang, 2009) จากแผนผังชีวสังเคราะห์ของเมลานินของเรเปอร์-เมสัน (Raper-Mason) (Miranda et al., 1988; Raper, 1927)(ภาพที่ 2.5) พบว่าขั้นตอนการใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสจะเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน โดยมีแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) หรือแอล-โดปา (L-Dopa) เป็นสารตั้งต้น ซึ่งจะถูกเปลี่ยนโดยปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ (Enzymatic reaction) เป็นโดปาคิวโนน (Dopaquinone) ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ของแอล-ไทโรซีน เป็น แอล-โดปา และ โดปาคิวโนน เรียกว่า โมโนฟีโนลเลส (monophenolase) และออโร-ไดฟีโนลเลส (o-diphenolase) ตามลำดับ

หลังจากนั้นจะเข้าสู่ช่วงปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์ (Non-enzymatic reaction) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องด้วยตนเอง ในวิธีหนึ่งนั้นโดปาคิวโนนจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Auto-oxidation) ได้เป็นสารประกอบโดปาโครม (Dopachrome) ซึ่งเป็นสารที่มีสีน้ำตาล-ดำ หลังจากนั้นโดปาโครมจะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนแปลงขั้นต่อไปจนกระทั่งได้สารเมลานินชนิดยูเมลานิน (Eumelanin) ที่มีสีน้ำตาล-ดำ นอกจากนี้ในอีกวิธีหนึ่ง สารโดปาคิวโนนยังสามารถทำปฏิกิริยากับ สาร กลูตาไธโอน (Glutathione) หรือซิสเตอีน (Cysteine) ได้ผลิตภัณฑ์ปลายทางคือสารประกอบเมลานินชนิดฟีโอเมลานิน (Pheomelanin) ซึ่งมีสีชมพู-แดง จากแผนผังชีวสังเคราะห์ของเมลานิน จะพบว่าวิธีการหนึ่งที่จะลดการสร้างเมลานินได้นั้น คือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่

เป็นขั้นตอนสำคัญของชีวสังเคราะห์ของเมลานิน ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงเป็นเป้าหมายในการศึกษาค้นคว้าและสามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สู่ท้องตลาดในปัจจุบัน



ภาพที่ 2.5 แผนผังชีวสังเคราะห์ของเมลานิน (Raper, 1927)

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของผลไม้กับเอนไซม์กลุ่มพอลิฟีนอลออกซิเดส

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic browning reaction) มักพบในอาหารโดยเฉพาะ ผัก (vegetable) ผลไม้ (fruit) ชา กาแฟ โกโก้ และอาหารทะเล โดยเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของอาหาร เมื่อสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ จะเกิดขึ้นได้โดยมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ

1. สารตั้งต้น (substrate) ประเภทสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) เช่น แคทีชิน (catechins) ซึ่งเป็นสารฟลาโวนอยด์ที่พบมากในใบชา ไทโรซีน (tyrosine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโน (amino acid) อาหารทะเล และแทนนิน (tannin) ที่พบในผัก และผลไม้ เป็นต้น นอกจากนี้ เอนไซม์ยังต้องการออกซิเจนเป็นสารตั้งต้นร่วม (co-substrate) ในการเกิดปฏิกิริยา

2. เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase, PPO) หรืออาจเรียกว่าเอนไซม์ฟีนอลเอส (phenolase) ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลและ

ออร์โท-ไดฟีนอล ดังนั้นเอนไซม์ในกลุ่มนี้จึงรวมถึงเอนไซม์ต่างๆ เช่น ฟีนอลออกซิเดส (phenol oxidase) ไทโรซิเนส (tyrosinase) แคทีคอลเลส (catecholase) ครีโซเลส (cresolase) โดปาออกซิเดส (dopaoxidase) และออกซิเดส (oxidase) เอนไซม์เหล่านี้จะทำงานได้ดีที่ค่า pH เหมาะสมซึ่งอยู่ระหว่าง 5-7

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวกับเอนไซม์นี้เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเกิดการชำรุด ฉีก ขาด เมื่อถูกกระทบ บด หั่น หรือสับทำให้เอนไซม์ สารที่ทำปฏิกิริยา (substrate) และออกซิเจนเข้ามาสัมผัสกัน สาร monophenol (ไม่มีสี) จะถูกออกซิไดซ์ เป็นไดฟีนอล (diphenol) ซึ่งไม่มีสี และถูกออกซิไดซ์ต่อเป็น o-quinone ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับกรดแอมิโนหรือโปรตีนได้เป็นสารสีน้ำตาล และจะรวมตัวกันเป็นพอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลใหญ่ และมีสีน้ำตาล เช่น เมลานิน (melanin) ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวกับเอนไซม์ มักพบเป็นปัญหาการเกิดสีน้ำตาล ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการ ใน ผัก ผลไม้ เช่น มันฝรั่ง กะทอน กัลวย ฝรั่ง ซึ่งจะเกิดขึ้นหลังการปอกเปลือก (peeling) การลดขนาด (size reduction) และยังพบในอาหารทะเลสด เช่น กุ้ง ซึ่งการศึกษาตัวยับยั้งป้องกันปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ จะเป็นประโยชน์ต่อวงการอุตสาหกรรมอาหาร อย่างไรก็ตามปฏิกิริยานี้เป็นอาจปฏิกิริยาที่ต้องการให้เกิดขึ้นในการแปรรูปอาหารบางชนิดที่ต้องการให้เกิดสีน้ำตาลเข้ม และเกิดกลิ่นระหว่างการทำหมัก เช่น โกลี ซา กาแฟ ไชเดอร์ ลูกเกด ลูกพรุน อิทผลัมม เป็นต้น

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากแก่นครีโดยวิธี DPPH วิธี ORAC และวิธี xanthine/xanthine oxidase ซึ่งพบว่ามีสารหลายชนิดที่แสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ อีกทั้งยังได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Promden et al., 2014) ดังนั้นสารสกัดจากแก่นครีที่มีฟลาโวนอยด์หลายชนิดจึงสมควรนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ รวมทั้งฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส อันจะนำมาซึ่งองค์ความรู้ใหม่และแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ด้านต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มของเอนไซม์ไทโรซิเนสในด้านเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์อาหาร และสารกำจัดแมลง

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบ microplate reader (Visible)
3. ปิเปต และ มัลติชัลเนลปิเปตขนาดต่างๆ
4. จานหลุมขนาด 96 ช่อง (96 well plate)

สารเคมี / สารสกัด / เอนไซม์

1. DMSO
2. Methanol
3. Sodium dihydrogen phosphate / Sodium hydrogen phosphate
4. Mushroom tyrosinase lyophilized powder (CAS Number 9002-10-2)
(T3824, Sigma-Aldrich)
5. *Dalbergia parviflora* extract
6. Flavonoids (isolated from *Dalbergia parviflora*)

การเตรียมสารสกัดหยาบจากแก่นครี

ตัวอย่างแก่นครีในการวิจัยครั้งนี้ได้จากร้านขายยาบริษัท เจ้ากรมเปือ จำกัด เลขที่ 229-231 ถนนจักรวรรดิ แขวงจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพมหานคร สารสกัดหยาบจากแก่นครีเตรียมโดยวิธีสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลแบบไหลย้อนกลับ (reflux extraction) ดังนี้

1. บดแก่นครีด้วยเครื่องบดสมุนไพรให้เป็นผงละเอียดและชั่งมาจำนวน 30 กรัม ใส่ลงในขวดก้นกลม
2. เติมสารละลาย 90% methanol ลงไปจำนวน 250 mL
3. ประกอบขวดก้นกลมกับชุด condenser และเตาหลุม พร้อมกับให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4. ทำการกรองสารสกัดเมทานอลด้วยกระดาษกรองหยาบ Whatman เบอร์ 1 จำนวน 2 รอบ และกรองต่อด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 จำนวน 1 รอบ (ใช้กับกรวยบุชเนอร์) และพักไว้

5. เติมสารละลาย 90% methanol ลงไปจำนวน 250 mL ลงไปในขวดก้นกลมเดิมที่มีภาสุมุนไพรมีเหลืออยู่เพื่อสกัดซ้ำครั้งที่ 2 โดยดำเนินการตามขั้นตอนข้อที่ 3 และ 4

6. รวมสารสกัดที่ได้ทั้ง 2 รอบเข้าด้วยกันและนำไปทำการระเหยเมทานอลและน้ำออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator ที่อุณหภูมิ 45 °C และมีสูญญากาศปรับความดันเป็น 26 mm Hg

7. ภายหลังเมื่อทำการระเหยเมทานอลและน้ำออกแล้ว ให้ทำละลายกลับคืนในขวดก้นกลมเดิม ด้วย 100% เมทานอลปริมาตรที่น้อยที่สุด (10-30 mL) และถ่ายสารละลายสารสกัดหยาบลงในภาชนะแก้วอบแห้งที่ซึ่งน้ำหนักภาชนะเปล่า นำไประเหยแห้งอีกครั้งในตู้ดูดควันเป็นเวลา 3-5 วัน จนกระทั่งมั่นใจว่าเมทานอลระเหยไปหมด จากนั้นเก็บสารสกัดไว้ในภาชนะปิดดูดความชื้น (desiccator) เป็นเวลา 2 วัน

8. ชั่งน้ำหนักภาชนะที่บรรจุสารสกัดหยาบที่ระเหยเอาเมทานอลแล้ว และนำน้ำหนักรวมมาหักออกจากน้ำหนักภาชนะเปล่า จะได้น้ำหนักสุทธิของสารสกัดที่สกัดได้ เพื่อคำนวณร้อยละของสารสกัดที่ได้ (% yield) จากสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ yield} = \frac{100 \times \text{น้ำหนักสุทธิของสารสกัด}}{\text{น้ำหนักของผงสมุนไพรแห้ง}}$$

9. ชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบของสมุนไพรแต่ละชนิดจำนวน 1.0 -2.0 mg (บันทึกตัวเลขเทคนิคที่ซึ่งได้จริง) และทำละลายด้วย DMSO ให้มีความเข้มข้นเป็น 5 mg/mL (5000 µg/mL) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้เป็น Stock solution ในการทดลองวิเคราะห์ต่อไป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ด

การเลือกความยาวคลื่นสูงสุดสำหรับการศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยา

เตรียมปฏิกิริยาในจานหลุมขนาด 96 หลุม ซึ่งประกอบไปด้วยสารละลาย 20 mM phosphate buffer (PB) pH 6.8 จำนวน 160 μ L สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 100 Unit/mL จำนวน 20 μ L เติม 2.5 mM L-DOPA จำนวน 20 μ L เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา และนำไปปมที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายผสมปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-600 nm บันทึกผลและวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและค่าความยาวคลื่น เลือกค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุดไปใช้ในการทดลองตลอดการวิจัยครั้งนี้

การเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์และซับสเตรตสำหรับการศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยา

เตรียมปฏิกิริยาในจานหลุมขนาด 96 หลุม ซึ่งประกอบไปด้วยสารละลาย 20 mM phosphate buffer (PB) pH 6.8 จำนวน 160 μ L สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 20 Unit/mL หรือ 100 Unit/mL จำนวน 20 μ L เติม สารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 1mM หรือ 2.5 mM จำนวน 20 μ L เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา และนำสารละลายผสมปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm ในทันที พร้อมกับอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0-60 นาที บันทึกผลและวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและเวลาการดำเนินไปของปฏิกิริยา

การเลือกชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายสารสกัดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยา

เตรียมปฏิกิริยาในจานหลุมขนาด 96 หลุม ซึ่งประกอบไปด้วยสารละลาย 20 mM phosphate buffer (PB) pH 6.8 จำนวน 140 μ L เติม DMSO หรือ Methanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1.25, 2.5, 5 และ 10 % เติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 100 Unit/mL จำนวน 20 μ L เติม สารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 2.5 mM จำนวน 20 μ L เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา และนำไปปมที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายผสมปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm และคำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% inhibition) จากสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(\Delta A_0 - \Delta A_s) / \Delta A_0] \times 100$$

เมื่อ ΔA_0 = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ที่เวลา 10 นาที และ 0 นาทีของการทดลองกลุ่มที่ไม่เติมตัวทำละลายใดๆ

เมื่อ ΔA_s = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ที่เวลา 10 นาที และ 0 นาทีของการทดลองกลุ่มที่มีการเติม DMSO หรือ Metanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

วาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% inhibition) และความเข้มข้นของตัวทำละลายแต่ละชนิด เลือกชนิดของตัวทำละลายและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สำหรับการทดลองทดลองงานวิจัยครั้งนี้

การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

1. เตรียมสารละลายสารสกัดเหยาบ หรือ สารละลายสารฟลาโวนอยด์บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL โดยใช้ตัวทำละลายคือ 50% (v/v) DMSO

2. เตรียมสารละลาย 2.5 mM L-DOPA ใน 20 mM phosphate buffer (PB) pH 6.8

3. เตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Mushroom tyrosinase, E.C. 1.14.18.1, Sigma) ความเข้มข้น 100 Unit/mL ใน 20 mM phosphate buffer (PB) pH 6.8

4. เตรียมปฏิกิริยาในจานหลุมขนาด 96 หลุม (ตารางที่ 3.1) ซึ่งประกอบไปด้วย 20 mM phosphate buffer (PB) pH 6.8 จำนวน 140 μ L สารสกัดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 20 μ L สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 100 Unit/mL จำนวน 20 μ L จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเติม 2.5 mM L-DOPA จำนวน 20 μ L เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยาและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายผสมปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm พร้อมกับทำการทดลองชุดควบคุมโดยใช้สารละลาย 50% DMSO จำนวน 20 μ L แทนการใช้สารละลายสารสกัด

5. คำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% inhibition) จากสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition} = \{[(\Delta A_c - \Delta A_B) - (\Delta A_s - \Delta A_B)] / (\Delta A_c - \Delta A_B)\} \times 100$$

เมื่อ ΔA_c = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ที่เวลา 10 นาที และ 0 นาทีของการทดลองกลุ่มควบคุม (control)

เมื่อ ΔA_B = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ที่เวลา 10 นาที และ 0 นาที
ของการทดลองกลุ่ม Blank

ΔA_S = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ที่เวลา 10 นาที และ 0 ของการ
ทดลองกลุ่มที่ใช้สารสกัด (Blank)

ค่า IC_{50} (concentration providing 50% inhibition) สามารถคำนวณได้จากการวาดกราฟ
ของร้อยละการยับยั้ง (%inhibition) กับค่าความเข้มข้นของสารสกัดแล้วสร้างสมการความสัมพันธ์
เชิงเส้นเพื่อเทียบกลับเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ที่
ร้อยละ 50

ตารางที่ 3.1 แสดงรายการและปริมาตรของส่วนผสมในปฏิกิริยาการวัดค่าการยับยั้ง
เอนไซม์ไทโรซิเนส

ปฏิกิริยา	Phosphate Buffer pH 6.8 (μ L)	สาร สกัด (μ L)	50% DMSO (μ L)	100 Unit/mL Mushroom tyrosinase (μ L)	2.5 mM L-DOPA (μ L)	Total volume (μ L)
C (control)	140	-	20	20	20	200
S (Sample)	140	20	-	20	20	200
B (Blank)	160	20	-	20	-	200
Final conc.	-	Various*	5%	10 U/Rx	0.25 mM	

*สารสกัดทำการแปรผันความเข้มข้นระดับต่างๆ (0-1000 μ M หรือ 0-1000 μ g/mL)

การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารฟลาโวนอยด์จากแก่นครี

สารฟลาโวนอยด์บริสุทธิ์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงจะถูกคัดเลือกมาศึกษา
จลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์โดยใช้หลักของไลน์วีเวอร์ และเบริก (Lineweaver and Burk double-
reciprocal plot)(Lineweaver and Burk, 1934) ซึ่งจะทำการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่มี
และไม่มีตัวยับยั้ง โดยแปรผันความเข้มข้นซับสเตรต L-DOPA ที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125
และ 0.0625 mM โดยทำการทดลองในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้ง

เอนไซม์ไทโรซิเนสที่ในจานหลุมไมโคเพลทแต่จะวัดอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาซึ่งจะต้องอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตรที่ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 10 นาที และทำการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism software (version 4.00) เพื่อรายงานค่าทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์และวิเคราะห์ชนิดของกลไกการยับยั้ง

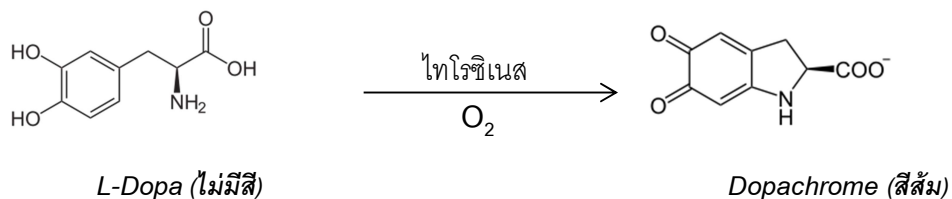
บทที่ 4

ผลการวิจัย

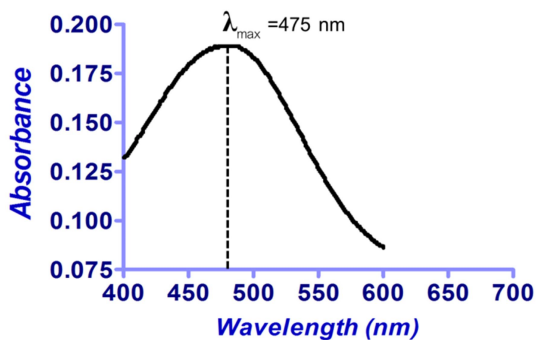
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ด

การเลือกความยาวคลื่นสูงสุดสำหรับการศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยา

การศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส ในงานวิจัยนี้ ใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (mushroom tyrosinase) และใช้ซับสเตรตเป็น L-Dopa ซึ่งมีการเร่งปฏิกิริยาดังนี้



การติดตามการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลง L-Dopa ไปเป็น Dopachrome ซึ่งมีสีส้ม จะใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) โดยเตรียมปฏิกิริยาในจานหลุมขนาด 96 หลุม ซึ่งประกอบไปด้วย phosphate buffer (PB) pH 6.8 จำนวน 160 μL สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 100 Unit/mL จำนวน 20 μL เติม 2.5 mM L-DOPA จำนวน 20 μL เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งการทดลองนี้ได้ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 400-600 นาโนเมตร (ตารางที่ 4.1) ซึ่งได้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 475 nm (ภาพที่ 4.1) และเลือกเป็นความยาวคลื่นที่ใช้ตลอดการทดลองนี้



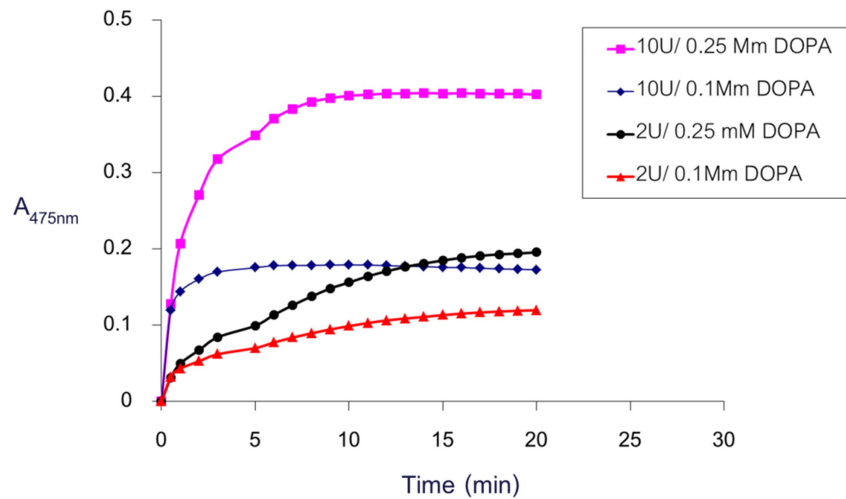
ภาพที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่ง L-Dopa ถูกเปลี่ยนไปเป็น Dopachrome และพบค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 475 nm

ตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสง (A) ที่ความยาวคลื่น (λ) ระหว่าง 400-600 นาโนเมตร ของผลิตภัณฑ์ (Dopachrome) ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส

λ	A	λ	A	λ	A	λ	A	λ	A	λ	A
400	0.132	435	0.168	470	0.189	505	0.179	540	0.138	575	0.101
401	0.133	436	0.168	471	0.188	506	0.178	541	0.137	576	0.100
402	0.133	437	0.169	472	0.188	507	0.177	542	0.136	577	0.099
403	0.134	438	0.170	473	0.189	508	0.176	543	0.134	578	0.099
404	0.135	439	0.171	474	0.190	509	0.175	544	0.133	579	0.098
405	0.136	440	0.172	475	0.190	510	0.175	545	0.132	580	0.097
406	0.137	441	0.173	476	0.190	511	0.174	546	0.131	581	0.097
407	0.138	442	0.174	477	0.189	512	0.173	547	0.130	582	0.096
408	0.139	443	0.175	478	0.189	513	0.171	548	0.129	583	0.095
409	0.140	444	0.175	479	0.189	514	0.170	549	0.127	584	0.095
410	0.142	445	0.176	480	0.189	515	0.169	550	0.126	585	0.094
411	0.143	446	0.177	481	0.189	516	0.168	551	0.125	586	0.093
412	0.143	447	0.177	482	0.189	517	0.167	552	0.124	587	0.093
413	0.144	448	0.178	483	0.189	518	0.166	553	0.123	588	0.092
414	0.145	449	0.179	484	0.189	519	0.165	554	0.122	589	0.092
415	0.147	450	0.180	485	0.189	520	0.163	555	0.120	590	0.091
416	0.148	451	0.180	486	0.189	521	0.162	556	0.119	591	0.090
417	0.149	452	0.181	487	0.189	522	0.161	557	0.118	592	0.090
418	0.150	453	0.181	488	0.189	523	0.160	558	0.117	593	0.089
419	0.151	454	0.182	489	0.188	524	0.159	559	0.116	594	0.089
420	0.152	455	0.183	490	0.188	525	0.157	560	0.115	595	0.088
421	0.153	456	0.183	491	0.187	526	0.156	561	0.114	596	0.088
422	0.154	457	0.184	492	0.187	527	0.155	562	0.113	597	0.087
423	0.155	458	0.184	493	0.187	528	0.154	563	0.112	598	0.087
424	0.156	459	0.185	494	0.186	529	0.152	564	0.111	599	0.087
425	0.157	460	0.185	495	0.186	530	0.151	565	0.110	600	0.086
426	0.158	461	0.186	496	0.185	531	0.150	566	0.109		
427	0.159	462	0.186	497	0.185	532	0.149	567	0.108		
428	0.161	463	0.186	498	0.184	533	0.148	568	0.107		
429	0.161	464	0.187	499	0.183	534	0.146	569	0.106		
430	0.162	465	0.187	500	0.183	535	0.145	570	0.105		
431	0.163	466	0.188	501	0.182	536	0.144	571	0.104		
432	0.165	467	0.187	502	0.182	537	0.143	572	0.104		
433	0.166	468	0.188	503	0.181	538	0.141	573	0.103		
434	0.167	469	0.188	504	0.180	539	0.140	574	0.102		

การเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์และซับสเตรตสำหรับการศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยา

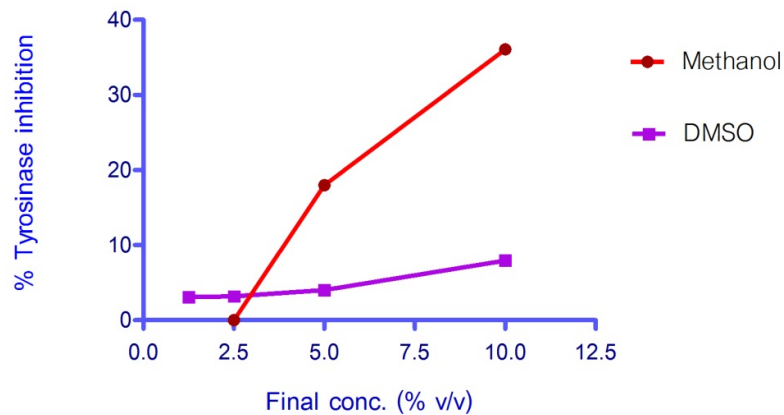
ทำการวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยการแปรผันความเข้มข้นเอนไซม์ไทโรซิเนสและซับสเตรต (L-Dopa) โดยเตรียมปฏิกิริยาในจานหลุมขนาด 96 หลุม ซึ่งประกอบไปด้วย phosphate buffer (PB) pH 6.8 จำนวน 160 μ L สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 20 Unit/mL หรือ 100 Unit/mL จำนวน 20 μ L เติม สารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 1mM หรือ 2.5 mM จำนวน 20 μ L เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา และนำสารละลายผสมปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm ในทันที พร้อมกับอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่ 0 -60 นาที ผลการทดลองพบว่าการใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 Unit และ L-Dopa เป็น 0.25 mM จะทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่ดำเนินไปในช่วงระยะเวลา 15-20 นาที ยังคงเกิดขึ้นเป็นแบบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง แสดงว่าปฏิกิริยายังไม่อิ่มตัว ซึ่งเหมาะสมที่จะศึกษาผลการยับยั้งของตัวยับยั้ง (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ไทโรซิเนสและ L-dopa ที่แปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์และซับสเตรต วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm

การเลือกชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายสารสกัดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาอัตราการเกิดปฏิกิริยา

ทำการวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาโดยการแปรผันชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลาย เพื่อศึกษาผลกระทบต่อตัวทำละลายสารสกัดที่มีผลต่อการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา โดยเตรียมปฏิกิริยาในจานหลุมขนาด 96 หลุม ซึ่งประกอบไปด้วย phosphate buffer (PB) pH 6.8 จำนวน 140 μL เติม DMSO หรือ Methanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1.25, 2.5, 5 และ 10 % เติมสารละลาย เอนไซม์ไทโรซิเนส 100 Unit/mL จำนวน 20 μL เติม สารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 2.5 mM จำนวน 20 μL เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา และนำไปป่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลาย ผสมปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm และคำนวณร้อยละการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส (% inhibition) ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.3 ซึ่งจะพบว่าตัวทำละลาย Methanol ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5% และ 10% สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ร้อยละ 20 และ ร้อยละ 35 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวทำละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5% และ 10% สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ร้อยละ 5 และ ร้อยละ 10 ตามลำดับ ดังนั้นชนิดของตัวทำละลาย และความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ทำละลายสารสกัดเพื่อเติมลงไปในปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงเลือก DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้ายไม่เกิน 5% และใช้ปฏิกิริยาที่เติม DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5% เป็นการทดลองชุดควบคุม



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสภายใต้สภาวะที่มีการเติมตัวทำละลาย DMSO หรือ Methanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 1.25, 2.5, 5 และ 10 %

การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี (*D. parviflora*) จำนวน 27 ชนิด ซึ่งประกอบไปด้วยสารกลุ่มไอโซฟลาโวน (isoflavone) ฟลาโวนอน (flavanone) ไอโซฟลาโวนอน (isoflavanone) ไอโซฟลาโวน (isoflavan) และ เพเทอโรคาร์พาน (pterocarpan) (ตารางที่ 4.2) โดยสารประกอบแต่ละชนิดถูกนำมาทดสอบคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200 μM โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรต พบว่ามีสารประกอบจำนวน 11 ชนิด ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 200 μM ได้สูงกว่า 30% เมื่อเทียบกับการทดลองชุดควบคุม ทั้งนี้ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบกับสารยับยั้งมาตรฐานได้แก่ออกซีเรสเวอราทรอล (oxyresveratrol) และกรดโคจิก (kojic acid) ซึ่งมีความสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ถึง 98.4% และ 93.4% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

สารประกอบจำนวน 11 ชนิด ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 200 μM ได้สูงกว่า 30% ได้นำมาศึกษาเพื่อวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50} , concentration providing 50% inhibition) โดยวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% inhibition) ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบระดับต่างๆ ผลค่า IC_{50} แสดงดังตารางที่ 4.3 ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบของแก่นครีมีค่า IC_{50} เป็น $2.6 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ สารกลุ่มไอโซฟลาโวน 9 ชนิด (1-9) มีเพียง 2 ชนิดคือ Khirnone B (5) และ Cajanin (9) ที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า IC_{50} เป็น $54.0 \pm 6.0 \mu\text{M}$ และ $67.9 \pm 6.2 \mu\text{M}$ ตามลำดับ ในขณะที่สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอีก 7 ชนิดที่เหลือนั้นไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอน (10-18) และฟลาโวนอน (24-26) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในระดับปานกลางถึงค่อนข้างต่ำโดยมีค่า IC_{50} สูงกว่า 100 μM และสารกลุ่มไอโซฟลาโวน (19-23) พบว่ามีเพียงสาร (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและหาค่า IC_{50} ได้เป็น $67.8 \pm 5.8 \mu\text{M}$ สารกลุ่มเพเทอโรคาร์พานคือ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดจากสารทดสอบทั้ง 27 ชนิด โดยมีค่า IC_{50} เป็น $16.7 \pm 5.0 \mu\text{M}$ ซึ่งเทียบเท่ากับกรดโคจิกที่ทำการทดลองนี้ได้ค่า IC_{50} เป็น $16.8 \pm 4.8 \mu\text{M}$ อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่าสารมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอล ยังคงเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดคือมีค่า IC_{50} เป็น $0.19 \pm 0.06 \mu\text{M}$

การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารพลาไวโนอยด์จากแก่นศรี

สารสกัดบริสุทธิ์จำนวน 4 ชนิดได้แก่ Khirinone B (5) Cajanin (9) (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) และ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpin (27) ที่พบว่ามียุทธียับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง โดยมีค่า IC_{50} ต่ำกว่า $100 \mu\text{M}$ ได้ถูกนำมาศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้ความสัมพันธ์จากสมการของ Michaelis-Menten และการวาดกราฟแบบ Lineweaver-Burk ดังภาพที่ 4.4 ซึ่งแสดงถึงชนิดของการยับยั้ง (type of inhibition) ของสารประกอบ 5, 9, 21 และ 27 ทั้งนี้ในสภาวะที่ไม่มีตัวยับยั้งเอนไซม์ค่าอัตราเร็วสูงสุด (V_{max}) ของการเกิด dopachrome โดยเอนไซม์นี้คือ $0.026 \Delta A_{475}/\text{min}$ และค่า K_m ต่อ L-DOPA คือ $0.26 \pm 0.06 \mu\text{M}$ ค่าคงที่ทางจลศาสตร์ต่างๆ เมื่อมีการเติมตัวยับยั้งแสดงดังตารางที่ 4.4

พฤติกรรมทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ Khirinone B (5) ระบุว่าเป็นการยับยั้งชนิด uncompetitive inhibitor ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนสต่างๆ (ภาพที่ 4.4) โดยมีค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) เป็น $75.1 \pm 3.2 \mu\text{M}$ ซึ่งลักษณะของการยับยั้งชนิด uncompetitive inhibitor ตัวยับยั้งจะเข้าจับกับ enzyme-substrate complex และลดอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้ enzyme-inhibitor-substrate complex (EIS) ยังคงเกิดปฏิกิริยาผันกลับได้และยังสามารถเกิดผลิตภัณฑ์ได้ จึงเป็นเหตุให้ค่า K_m และ V_{max} ลดลง

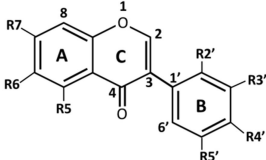
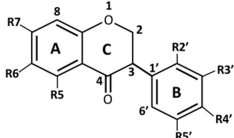
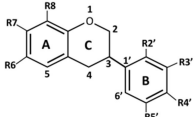
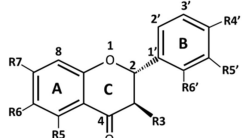
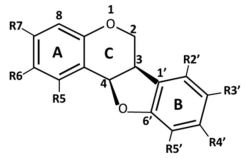
พฤติกรรมทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ Cajanin (9) เผยว่าเป็นการยับยั้งชนิด non-competitive inhibitor ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส (ภาพที่ 4.4) ซึ่งลักษณะของการยับยั้งชนิด non-competitive inhibitor ตัวยับยั้งและซับสเตรตจะสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ได้ตลอดเวลา โดยมีตำแหน่งจับคนละตำแหน่งกัน เมื่อทั้งตัวยับยั้งและซับสเตรต เข้าจับกับเอนไซม์แล้วจะเกิดเป็น enzyme-substrate-inhibitor complex (ESI) ที่ซึ่งไม่สามารถเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไปได้ แต่สามารถผันกลับไปเป็น enzyme-substrate complex (ES) หรือ enzyme-inhibitor complex (EI) ดังนั้นจึงพบว่าค่า V_{max} ลดลง โดยไม่มีผลต่อค่า K_m ค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) ของการเข้าจับระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ และระหว่างซับสเตรตกับเอนไซม์จึงเท่ากัน และจากการทดลองนี้มีค่าเป็น $65.6 \pm 4.1 \mu\text{M}$

พฤติกรรมทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) แสดงให้เห็นว่าเป็นการยับยั้งชนิด mixed inhibition (ภาพที่ 4.4) มีค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) เป็น $56.9 \pm 16.8 \mu\text{M}$ การยับยั้งแบบผสมนี้ตัวยับยั้งจะสามารถจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งเดียวกับซับสเตรต ค่า K_m อาจคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงก็ได้แต่ค่า V_{max} ที่สังเกตได้จะลดลง

พฤติกรรมทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ (6aR,11aR)-03,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) พบว่าเป็นการยับยั้งชนิด competitive inhibition (ภาพที่ 4.4) มีค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) เป็น $6.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$ กลไกการยับยั้งชนิด competitive inhibition ด้วยยับยั้งจะรบกวนการเข้าจับของซับสเตรตบนตำแหน่งจับของเอนไซม์ เป็นเหตุให้ค่า K_m เพิ่มสูงขึ้นโดยไม่ผลกระทบต่อค่า V_{max}

ตารางที่ 4.2 โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดบริสุทธิ์ที่ใช้ทดสอบในการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งสกัดแยกได้

จาก *Dalbergia parviflora*

 <p style="text-align: center;">Isoflavones</p>	No.	Isoflavones	R7	R6	R5	R2'	R3'	R4'	R5'
	1	Formononetin	OH	H	H	H	H	OMe	H
	2	Calycosin	OH	H	H	H	OH	OMe	H
	3	Biochanin A	OH	H	OH	H	H	OMe	H
	4	Genistein	OH	H	OH	H	H	OH	H
	5	Khrinone B	OH	H	OH	OH	H	OMe	OH
	6	3'-O-methylorobol	OH	H	OH	H	OMe	OH	H
	7	Khrinone C	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	H
	8	Tectorigenin	OH	OMe	OH	H	H	OH	H
9	Cajanin	OMe	H	OH	OH	H	OH	H	
 <p style="text-align: center;">Isoflavanones</p>	No.	Isoflavanones	R7	R6	R5	R2'	R3'	R4'	R5'
	10	(3R)-7,3'-dihydroxy-4'-methoxy-isoflavanone	OH	H	H	H	OH	OMe	H
	11	Onogenin	OH	H	H	OMe	H	OCH ₂ O	H
	12	Dalparvin	OH	H	H	OMe	H	OMe	OH
	13	Dalparvin B	OH	H	H	OH	OMe	OMe	H
	14	(3S)-sativanone	OH	H	H	OMe	H	OMe	H
	15	(3RS)-3'-O-methylviolanonone	OH	H	H	OMe	OMe	OMe	H
	16	(3RS)-kenusanone G	OH	H	OH	H	OH	OMe	H
	17	(3S)-secundiflorol H	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	H
18	Dalparvin A	OH	H	OH	OMe	H	OH	OH	
 <p style="text-align: center;">Isoflavans</p>		Isoflavans	R8	R7	R6	R2'	R3'	R4'	R5'
	19	(3R)-vestitol	H	OH	H	OH	H	OMe	H
	20	(3R)(+)-mucronulatol	H	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	21	(3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol	OH	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	22	Duartin	OMe	OH	H	OMe	OH	OMe	H
23	(3S)-8-demethylduartin	OMe	OH	H	OH	OH	OMe	H	
 <p style="text-align: center;">Flavanones</p>	No.	Flavanones	R7	R6	R5	R3	R4'	R5'	R6'
	24	(2S)-liquiritigenin	OH	H	H	H	OH	H	H
	25	(2S)-naringenin	OH	H	OH	H	OH	H	H
26	Alpinetin	OH	H	OMe	H	H	H	H	
 <p style="text-align: center;">Pterocarpan</p>	No.	Pterocarpan	R7	R6	R5	R2'	R3'	R4'	R5'
27	(6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan	OH	H	H	H	OH	OMe	H	

ตารางที่ 4.3 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (Mushroom tyrosinase)

โดยสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จาก *Dalbergia parviflora*

No.	Compounds	Mushroom tyrosinase inhibition	
		% inhibit (at 200 μ M)	IC_{50} (μ M)
29	Oxyresveratrol †	98.4 \pm 1.1	0.19 \pm 0.1
28	Kojic acid ††	93.4 \pm 1.7	16.8 \pm 4.6
27	(6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxypterocarpan	84.6 \pm 0.6	16.7 \pm 5.0
5	Khronone B	72.7 \pm 2.2	54.0 \pm 6.0
21	(3R)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol	64.1 \pm 1.3	67.8 \pm 5.8
9	Cajanin	65.0 \pm 1.6	67.9 \pm 6.2
10	(3R)-7,3'-dihydroxy-4'-methoxy-isoflavanone	52.1 \pm 0.4	176.7 \pm 16.3
24	(2S)-liquiritigenin	52.1 \pm 1.4	178.1 \pm 14.0
20	(3R)(+)-mucronulatol	48.3 \pm 1.6	228.9 \pm 22.2
17	(3S)-secundiflorol H	44.0 \pm 3.7	278.1 \pm 54.5
26	Alpinetin	36.9 \pm 0.5	450.0 \pm 48.5
19	(3R)-vestitol	35.6 \pm 2.2	473.0 \pm 60.9
12	Dalparvin	31.6 \pm 0.5	906.1 \pm 43.6
6	3'-O-methylrobol	14.3 \pm 1.1	>1000
3	Biochanin A	9.2 \pm 0.4	>1000
1	Formononetin	10% (at 300 μ M)	>1000
7	Khronone C	2% (at 300 μ M)	>1000
2	Calycosin	0% (at 300 μ M)	>1000
11	Onogenin	0% (at 300 μ M)	>1000
15	(3RS)-3'-O-methylviolanonone	0% (at 300 μ M)	>1000
13	Dalparvin B	4% (at 500 μ M)	>1000
14	(3S)-sativanone	13% (at 500 μ M)	>1000
16	(3RS)-kenusanone G	0% (at 500 μ M)	>1000
18	Dalparvin A	0% (at 500 μ M)	>1000
22	Duartin	0% (at 500 μ M)	>1000
4	Genistein	S*	N.D.
8	Tectorigenin	S*	N.D.
23	(3S)-8-demethylduartin	S*	N.D.
25	(2S)-naringenin	S*	N.D.

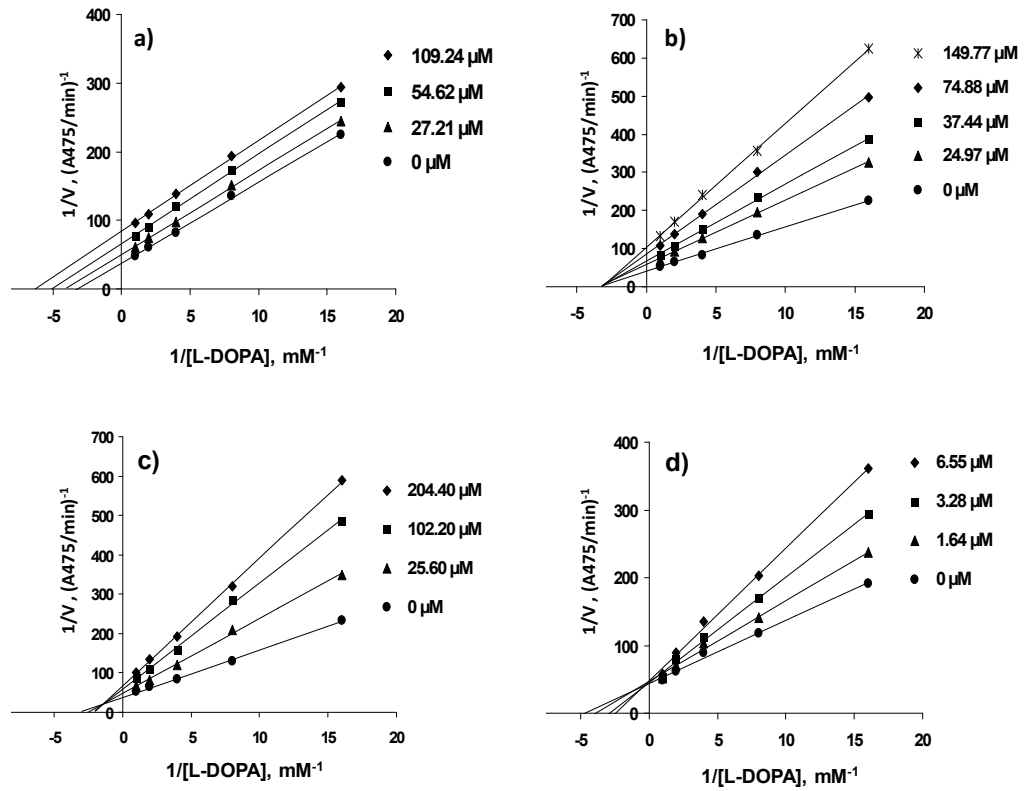
N.D. = Not Determined

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ทางจุลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ด (Mushroom tyrosinase) โดยสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จาก *Dalbergia parviflora*

No.	Compounds	Mushroom tyrosinase inhibition		K_i for <i>o</i> -diphenolase activity (μM)	Type of inhibition for <i>o</i> -diphenolase activity
		% inhibit (at 200 μM)	IC_{50} (μM)		
29	Oxyresveratrol	98.4 \pm 1.1	0.19 \pm 0.1	0.9 [†]	Non-competitive [†]
28	Kojic acid	93.4 \pm 1.7	16.8 \pm 4.6	N.D. ^{††}	Mixed
27	(6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan	84.6 \pm 0.6	16.7 \pm 5.0	6.4 \pm 0.9	Competitive
5	Khrinone B	72.7 \pm 2.2	54.0 \pm 6.0	75.1 \pm 3.2	Uncompetitive
21	(3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol	64.1 \pm 1.3	67.8 \pm 5.8	56.9 \pm 16.8	Mixed
9	Cajanin	65.0 \pm 1.6	67.9 \pm 6.2	65.6 \pm 4.1	Non-competitive

[†] อ้างอิงจาก (Alam et al., 2009)

^{††} N.D. = Not Determined



ภาพที่ 4.4 แสดงกราฟ Lineweaver-Burk ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (mushroom tyrosinase) โดยสารฟลาโวนอยด์ Khrinone B (5) (a), Cajanin (9) (b), (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) (c) และ(6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) (d) การเร่งปฏิกิริยาใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรตที่อุณหภูมิ 25°C pH 6.8 ในปฏิกิริยามีการเติมสารฟลาโวนอยด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามที่ระบุโดยใช้สัญลักษณ์ดังต่อไปนี้ \bullet , \blacktriangle , \blacksquare , \times และ \blacklozenge

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากแก่นครี (*Dalbergia parviflora*) ต่อการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด (mushroom tyrosinase, Sigma-Aldrich) ได้ทำการศึกษาทั้งในส่วนของสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่สกัดด้วยเมทานอลและศึกษาในสารสกัดบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จำนวน 27 ชนิด โดยมีการใช้กรดโคจิก (kolic acid) และออกซีเรสเวอรอล (oxyresveratrol) เป็นการทดลองชุดควบคุมผลบวก (positive control) ได้มีการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาโดยการแปรผันตัวทำละลาย ความเข้มข้นเอนไซม์ ความเข้มข้นซับสเตรต ระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยา และค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ผลผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จากผลการศึกษาขั้นต้นพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสังเกตปฏิกิริยา คือ สภาวะสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 20 mM pH 6.8 อุณหภูมิ 25°C ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมตามคำแนะนำจากคู่มือการใช้เอนไซม์ของผู้ผลิต ความเข้มข้นสุดท้ายเอนไซม์ไทโรซิเนสในปฏิกิริยา คือ 2 Unit ความเข้มข้นสุดท้ายของซับสเตรต L-Dopa คือ 0.25 mM ซึ่งพบว่าทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเป็นไปในอัตราที่ไม่รวดเร็วเกินไปและสามารถสังเกตการดำเนินไปของปฏิกิริยาได้ในลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างปริมาณผลิตภัณฑ์ (ค่าการดูดกลืนแสง) ต่อหน่วยเวลา ในช่วงระยะเวลา 0-20 นาที ในกรณีที่มีการเติมสารสกัดทดสอบจะต้องทำละลายด้วย DMSO และใช้ในปริมาณที่ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายต้องไม่เกิน 5% ซึ่งพบว่าความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ที่ 5% นั้นไม่มีผลยับยั้งประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่เมทานอลที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5% พบว่ามีผลยับยั้งประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ให้เหลือเพียงร้อยละ 80-85 ซึ่งไม่เหมาะสมในการใช้ศึกษาผลการยับยั้งของสารสกัด เนื่องจากจะทำให้การแปลผลการยับยั้งผิดพลาดมากยิ่งขึ้น การเลือกค่าการดูดกลืนแสงที่เหมาะสมในการวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้ใช้วิธี Wavelength Scanning โดยนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มี L-dopa เป็นซับสเตรต อ่านค่าการดูดกลืนแสงทีละ 1 นาโนเมตร ตั้งแต่ความยาวคลื่น 400-600 นาโนเมตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วงความยาวคลื่น 474-476 นาโนเมตร และได้เลือกความยาว

คลื่นที่ 475 นาโนเมตรมาใช้ในการวิจัยตลอดการทุกการทดลอง เนื่องจากที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum wavelength, λ_{\max}) จะทำให้การวัดค่าตัวอย่างมีความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด

การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบคัดกรองโดยใช้สารบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ที่สกัดแยกได้จากแก่นครีที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 μM พบว่ามีสารบริสุทธิ์เพียง 11 ชนิด จากทั้งหมด 27 ชนิด ที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ซึ่งทั้ง 11 ชนิดนี้ถูกนำไปศึกษาเพื่อหาค่า IC_{50} การทดลองชุดควบคุมผลบวกพบว่ากรดโคจิกและออกซีเรสเวอราทรอลเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพสูง โดยมีค่า IC_{50} เป็น $16.8 \pm 4.8 \mu\text{M}$ และ $0.19 \pm 0.06 \mu\text{M}$ ตามลำดับ แม้ว่าสารสกัดจากแก่นครีส่วนใหญ่ยังไม่พบว่ามีฤทธิ์ดีเทียบเท่ากับกรดโคจิกและออกซีเรสเวอราทรอล การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์อาจเกิดขึ้นโดยการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลฟลาโวนอยด์และสารอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นบริเวณแอ่ง (active site) ของเอนไซม์ (Xie et al., 2003) หรืออาจเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลฟลาโวนอยด์กับไอออนทองแดง (copper ion) ที่อยู่บน catalytic domain ของเอนไซม์ (Kubo and Kinst-Hori, 1999) ทั้งนี้จำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่บนโมเลกุลฟลาโวนอยด์จะเป็นจุดสำคัญในการแสดงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสนี้

จากตัวอย่างสารสกัดฟลาโวนอยด์บริสุทธิ์จำนวน 11 ชนิดที่สกัดจากแก่นครี พบว่ามีสาร 4 ชนิดที่ให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่า 100 μM ซึ่งได้แก่ Khirinone B (5) Cajanin (9) (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) และ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) ซึ่งได้นำมาศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อรายงานผลการวิเคราะห์ชนิดของการยับยั้งและค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) ซึ่งค่า K_i จะแตกต่างจากค่า IC_{50} โดยที่ค่า K_i จะมีประโยชน์ในการบ่งบอกถึงศักยภาพของความเป็นตัวยับยั้งของสารแต่ละชนิด ในขณะที่ค่า IC_{50} จะใช้เปรียบเทียบผลการทดลองที่กระทำในสภาวะเดียวกัน เนื่องจากค่า IC_{50} อาจแปรผันไปเมื่อเปลี่ยนแปลงสภาวะการทดลองบางอย่างเช่น ความเข้มข้นซับสเตรต ความเข้มข้นเอนไซม์ อุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยา นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้ทดลองใช้กรดโคจิกเป็นชุดการทดลองควบคุมผลบวกซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ทางจลนศาสตร์การยับยั้งเป็นการยับยั้งแบบผสม (mixed inhibition) มีค่า K_i เป็น $7.5 \pm 1.0 \mu\text{M}$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) ที่มีค่า K_i เป็น $6.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$ แสดงให้เห็นว่าสารประกอบ 27 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเทียบเท่ากับกรดโคจิก ในขณะที่สารประกอบออกซีเรสเวอราทรอลได้เคยมีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ว่าให้ผลการยับยั้งเป็นชนิด non-competitive ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส และมีค่า K_i เป็น $0.9 \mu\text{M}$ (Alam et al., 2009)

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการทดลองศึกษาสารสกัดยับยั้งเอนไซม์กลุ่มโพลีฟีนอลออกซิเดสที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดสีคล้ำในอาหารต่างๆ เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี เช่น การศึกษาการใช้น้ำผึ้งเพื่อลดการเกิดภาวะสีน้ำตาลในผลไม้ตัดแต่ง (Jeon and Zhao, 2005; Oszmianski and Lee, 1990) การใช้สารสกัดน้ำมันหอมระเหย (Phytoncide essential oil) จากใบสนเพื่อลดการเกิดภาวะสีน้ำตาลในผลไม้ตัดแต่ง (Kim et al., 2014) การใช้สารธรรมชาติ เช่น Glutathione และ cinnamic acid เพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาลจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในน้ำแอปเปิ้ล (Gacche et al., 2004) การใช้สาร catechin ที่สกัดแยกได้จากชาเขียวเพื่อป้องกันการเกิดสีดำคล้ำจากภาวะ melanosis โดยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในกุ้งแช่แข็ง (Nirmal and Benjakul, 2009) การศึกษาวิจัยที่มุ่งเน้นค้นหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อการประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางบำรุงผิวขาว (whitening) มีรายงานในสารสกัดสาหร่ายทะเล *Salicornia herbacea* ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและลดการสังเคราะห์เมลานินใน B16 melanoma cell (Sung et al., 2009) สารสกัดจากพืชกลุ่มมัลเบอรี่ (Mulberry) ที่มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเช่น *Ramulus Mori* (Lee et al., 2003) *Broussonetia papyrifera* (Hwang and Lee, 2007) *Morus alba* (Lee et al., 1997) *Morus nigra* (Zhang et al., 2009) *Morus bombycis* (Hwang and Lee, 2007) และในพืชสมุนไพรไทยที่มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสคือสารสกัดจากมะหาด (*Artocarpus lakoocha*) ที่มีสารออกซีเรสเวอราทอรอล (Tengamnuay et al., 2006) สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้แก่ kaempferol ที่สกัดจากดอกของหญ้าฝรั่ง (*Crocus sativus*) ซึ่งกลไกยับยั้งแบบ competitive inhibitor (Kubo and Kinst-Hori, 1999) morachalcone A ที่สกัดจากแก่นขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) (Nguyen et al., 2012) ในส่วนการใช้สารฟลาโวนอยด์เพื่อกำจัดแมลงได้มีการศึกษาพบว่าสาร quercetin สามารถยับยั้งเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่แยกได้จากตัวอ่อนของแมลงวันหัวเขียว blowfly (*Sarcophaga bullata*) ได้ (Wang et al., 2004) แม้ว่าฟลาโวนอยด์และสารกลุ่มโพลีฟีนอลในพืชตามธรรมชาติจะมีไว้เพื่อเป็นกลไกการต้านแมลงศัตรูพืช แต่การประยุกต์ใช้สารกลุ่มนี้เพื่อกำจัดแมลงยังไม่มีงานวิจัยอย่างแพร่หลายจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษาต่อในอนาคต

การศึกษาวิจัยในแก่นครี๊ยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมาก่อน อย่างไรก็ตามมีการรายงานเกี่ยวกับพืชในวงศ์เดียวกับครี๊ (วงศ์ Fabaceae) ซึ่งพบว่าสารสกัดจากลำต้นของ *Maackia fauriei* มีสารฟลาโวนอยด์คือ mirkoin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบ competitive inhibitor (Kim et al., 2010) การศึกษาวิจัยครั้งนี้ถือได้ว่าเป็นการค้นพบฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ของสารสกัดแก่นครี๊ ซึ่งเป็นฤทธิ์การยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มโพลีฟีนอลออกซิเดสโดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดเป็นตัวแทนในการศึกษา นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เคยรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้แก่นครี๊มาแล้ว ซึ่งสามารถนำองค์ความรู้นี้ไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาให้เกิดผลิตภัณฑ์สำหรับการใช้ยับยั้งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอางประเภทบำรุงผิวขาว และต้องการการวิจัยเพิ่มเติมสำหรับการศึกษาแนวโน้มในการเป็นใช้สารกำจัดแมลงศัตรูพืช

บรรณานุกรม

- Alam, N., Shim, M. J., Lee, M. W., Shin, P. G., Yoo, Y. B., Lee, T. S., 2009. Vegetative Growth and Phylogenetic Relationship of Commercially Cultivated Strains of *Pleurotus eryngii* based on ITS sequence and RAPD. *Mycobiology* 37, 258-266.
- Bentgsath, A., Rusznyak, S., Szent-Gyorgyl, A., 1937. Vitamin P. *Nature* 139, 326-327.
- Chang, T. S., 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 10, 2440-2475.
- Chen, Z. Y., Chan, P. T., Ho, K. Y., Fung, K. P., Wang, J., 1996. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem Phys Lipids* 79, 157-163.
- Croft, K. D., 1998. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 854, 435-442.
- Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., Lele, R. D., 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52, 794-804.
- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., Garcia-Parrilla, M. C., 2008. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to in vivo evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48, 649-671.
- Ferraz, A. C., Angelucci, M. E., Da Costa, M. L., Batista, I. R., De Oliveira, B. H., Da Cunha, C., 1999. Pharmacological evaluation of ricinine, a central nervous system stimulant isolated from *Ricinus communis*. *Pharmacol Biochem Behav* 63, 367-375.
- Gacche, R. N., Warangkar, S. C., Ghole, V. S., 2004. Glutathione and cinnamic acid: natural dietary components used in preventing the process of browning by inhibition of Polyphenol Oxidase in apple juice. *J Enzyme Inhib Med Chem* 19, 175-179.
- Grotewold, E., 2006. *The Science of Flavonoids*. Springer, Ohio, USA.
- Hwang, J. H., Lee, B. M., 2007. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. *J Toxicol Environ Health A* 70, 393-407.

- Jeon, M., Zhao, Y., 2005. Honey in combination with vacuum impregnation to prevent enzymatic browning of fresh-cut apples. *Int J Food Sci Nutr* 56, 165-176.
- Jeong, S. H., Ryu, Y. B., Curtis-Long, M. J., Ryu, H. W., Baek, Y. S., Kang, J. E., Lee, W. S., Park, K. H., 2009. Tyrosinase inhibitory polyphenols from roots of *Morus ihou*. *J Agric Food Chem* 57, 1195-1203.
- Kim, D. H., Kim, H. B., Chung, H. S., Moon, K. D., 2014. Browning control of fresh-cut lettuce by phytoncide treatment. *Food Chem* 159, 188-192
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S., 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* 96, 229-245.
- Kim, J. M., Ko, R. K., Jung, D. S., Kim, S. S., Lee, N. H., 2010. Tyrosinase inhibitory constituents from the stems of *Maackia fauriei*. *Phytother Res* 24, 70-75
- Kongkamnerd, J., Milani, A., Cattoli, G., Terregino, C., Capua, I., Beneduce, L., Gallotta, A., Pengo, P., Fassina, G., Miertus, S., De-Eknamkul, W., 2012. A screening assay for neuraminidase inhibitors using neuraminidases N1 and N3 from a baculovirus expression system. *J Enzyme Inhib Med Chem* 27, 5-11.
- Kongkamnerd, J., Milani, A., Cattoli, G., Terregino, C., Capua, I., Beneduce, L., Gallotta, A., Pengo, P., Fassina, G., Monthakantirat, O., Umehara, K., De-Eknamkul, W., Miertus, S., 2011. The quenching effect of flavonoids on 4-methylumbelliferone, a potential pitfall in fluorimetric neuraminidase inhibition assays. *J Biomol Screen* 16, 755-764.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., 1999. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *J Agric Food Chem* 47, 4121-4125.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., Nihei, K., Soria, F., Takasaki, M., Calderon, J. S., Cespedes, C. L., 2003. Tyrosinase inhibitors from galls of *Rhus javanica* leaves and their effects on insects. *Z Naturforsch C* 58, 719-725.
- Lee, K. T., Kim, B. J., Kim, J. H., Heo, M. Y., Kim, H. P., 1997. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (I): inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *Int J Cosmet Sci* 19, 291-298.

- Lee, K. T., Lee, K. S., Jeong, J. H., Jo, B. K., Heo, M. Y., Kim, H. P., 2003. Inhibitory effects of *Ramulus mori* extracts on melanogenesis. *J Cosmet Sci* 54, 133-142.
- Li, H., Cheng, K. W., Cho, C. H., He, Z., Wang, M., 2007. Oxyresveratrol as an antibrowning agent for cloudy apple juices and fresh-cut apples. *J Agric Food Chem* 55, 2604-2610.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society* 56, 658-666.
- Miranda, M., Amicarelli, F., Poma, A., Ragnelli, A. M., Arcadi, A., 1988. Liposome-entrapped tyrosinase: a tool to investigate the regulation of the Raper-Mason pathway. *Biochim Biophys Acta* 966, 276-286.
- Miyazawa, M., Tamura, N., 2007. Inhibitory compound of tyrosinase activity from the sprout of *Polygonum hydropiper* L. (Benitade). *Biol Pharm Bull* 30, 595-597.
- Nerya, O., Vaya, J., Musa, R., Izrael, S., Ben-Arie, R., Tamir, S., 2003. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J Agric Food Chem* 51, 1201-1207.
- Nguyen, B. C., Chompoo, J., Tawata, S., 2015. Insecticidal and Nematicidal Activities of Novel Mimosine Derivatives. *Molecules* 20, 16741-16756.
- Nguyen, N. T., Nguyen, M. H., Nguyen, H. X., Bui, N. K., Nguyen, M. T., (2012). Tyrosinase inhibitors from the wood of *Artocarpus heterophyllus*. *J Nat Prod* 75, 1951-1955.
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., van Norren, K., van Leeuwen, P. A., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74, 418-425.
- Nirmal, N. P., Benjakul, S., 2009. Melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. *J Agric Food Chem* 57, 3578-3586.
- Nirmal, N. P., Benjakul, S., 2011. Inhibitory effect of mimosine on polyphenoloxidase from cephalothoraxes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Agric Food Chem* 59, 10256-10260.

- Oszmianski, J., Lee, C. Y., 1990. Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1892-1895
- Prochazkova, D., Bousova, I., Wilhelmova, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*.
- Promden, W., Monthakantirat, O., Umehara, K., Noguchi, H., De-Eknamkul, W., 2014. Structure and antioxidant activity relationships of isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*. *Molecules* 19, 2226-2237.
- Raper, H. S., 1927. The Tyrosinase-tyrosine Reaction: Production from Tyrosine of 5: 6-Dihydroxyindole and 5: 6-Dihydroxyindole-2-carboxylic Acid-the Precursors of Melanin. *Biochem J* 21, 89-96.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.
- Ryu, Y. B., Ha, T. J., Curtis-Long, M. J., Ryu, H. W., Gal, S. W., Park, K. H., 2008. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by flavones from the stem barks of *Morus ihou* (S.) Koidz. *J Enzyme Inhib Med Chem* 23, 922-930.
- Songsiang, U., Wanich, S., Pitchuanom, S., Netsopa, S., Uanporn, K., Yenjai, C., 2009. Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. *Fitoterapia* 80, 427-431.
- Sung, J. H., Park, S. H., Seo, D. H., Lee, J. H., Hong, S. W., Hong, S. S., 2009. Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *Salicornia herbacea*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 552-556.
- Tengamnuy, P., Pengrungruangwong, K., Pheansri, I., Likhitwitayawuid, K., 2006. *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the in vitro anti-tyrosinase and in vivo skin whitening activities. *Int J Cosmet Sci* 28, 269-276.
- Tereschuk, M. L., Riera, M. V., Castro, G. R., Abdala, L. R., 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J Ethnopharmacol* 56, 227-232.
- Theos, A. C., Tenza, D., Martina, J. A., Hurbain, I., Peden, A. A., Sviderskaya, E. V., Stewart, A., Robinson, M. S., Bennett, D. C., Cutler, D. F., Bonifacino, J. S., Marks, M. S., Raposo, G., 2005. Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol Biol Cell* 16, 5356-5372.

- Tsao, T. F., Newman, M. G., Kwok, Y. Y., Horikoshi, A. K., 1982. Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria. *J Dent Res* 61, 1103-1106.
- Wang, Q., Chen, Q. X., Huang, X. H., Ke, L. N., Shi, Y., Wang, J., (2004). Enzymatic characterization and functional groups of polyphenol oxidase from the pupae of blowfly (*Sarcophaga bullata*). *Biochemistry (Mosc)* 69, 918-920.
- Wungsintaweekul, B., Umehara, K., Miyase, T., Noguchi, H., 2011. Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, *Smilax corbularia* (*Smilacaceae*). *Phytochemistry*. 72, 495-502.
- Xie, L. P., Chen, Q. X., Huang, H., Wang, H. Z., Zhang, R. Q., 2003. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry (Mosc)* 68, 487-491.
- Yang, H. L., Chen, S. C., Senthil Kumar, K. J., Yu, K. N., Lee Chao, P. D., Tsai, S. Y., Hou, Y. C., Hseu, Y. C., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an *ex vivo* approach. *J Agric Food Chem* 60, 522-532.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S. S., 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr* 59, 113-122.
- Zhang, X., Hu, X., Hou, A., Wang, H., 2009. Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull* 32, 86-90.

ภาคผนวก

ประวัตินักวิจัย

1. นายวรวัฒน์ พรหมเด่น (Worrawat Promden, Ph.D)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3311100069820

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

หน่วยงานที่สังกัดและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ เลขที่ 439 ถ.จิระ ต.

ในเมือง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 31000

หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่ 089-424-2324

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) p_worrawat@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ชื่อสถานศึกษา	ได้รับปริญญา/สาขา
พ.ศ. 2547	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ) สาขาชีวเคมี
พ.ศ. 2550	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	ศิลปศาสตรบัณฑิต (ศศ.บ) สาขาปรัชญา
พ.ศ. 2551	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์ดุซงู้บัณฑิต (วท.ด) สาขาชีวเคมี

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

อณูชีววิทยาและพันธุวิศวกรรมในแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารต้านอนุมูลอิสระ

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

พ.ศ. 2553-2555 ผู้ประสานงานหลัก หน่วยปฏิบัติงานวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและ

เทคโนโลยีชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเผยแพร่ผลงานวิจัย Publications (5 ปีย้อนหลัง)

งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

1. Worrawat Promden, Alisa S. Vangnai, Piamsook Pongsawasdi, Osao Adachi, Kazunobu

Matsushita & Hirohide Toyama. Disruption of quinoprotein ethanol dehydrogenase gene

and adjacent genes in *Pseudomonas putida* HK5. FEMS Microbiology Letters, 280 (2), 203-209, March 2008.

2. Worrawat Promden, Alisa S. Vangnai, Hirohide Toyama, Kazunobu Matsushita, and Piamsook Pongsawasdi. Analysis of promoter activities of the genes encoding three quinoprotein alcohol dehydrogenases of *Pseudomonas putida* HK5. Microbiology, 155, 594-603, February 2009.

3. Fuminori Fukaya, Worrawat Promden, Takashi Hibino, Yoshito Tanaka, Tatsunosuke Nakamura, and Teruhiro Takabe. An Mrp-like cluster in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* functions as a Na⁺/H⁺ antiporter. Applied and Environmental Microbiology, 75, 6626-6629, October 2009.

4. Nana Yamada, Worrawat Promden, Koji Yamane, Hideto Tamagake, Takashi Hibino, Yoshito Tanaka, and Teruhiro Takabe. Preferential accumulation of betaine uncoupled to choline monooxygenase in young leaves of Sugar beet -Importance of long distance translocation of betaine under normal and salt-stressed conditions. Journal of Plant Physiology, 116(18), 2058-2070, December 2009.

5. Alisa S. Vangnai, Worrawat Promden, Wanchai De-Eknamkul, Kazunobu Matsushita, and Hirohide Toyama. Molecular characterization and heterologous expression of quinate dehydrogenase gene from *Gluconobacter oxydans* IFO3244. Biochemistry (Moscow), 75(4), 452-459, May 2010.

6. Kanteera Soontharapirakkul, Worrawat Promden, Nana Yamada, Hakuto Kageyama, Aran Incharoensakdi, Atsuko Iwamoto-Kihara, and Teruhiro Takabe. Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* contains a Na⁺-dependent F1F0-ATP synthase with potential role in salt tolerance. Journal of Biological Chemistry, 286(12), 10169-10176, March, 2011.

7. Nana Yamada, Suriyan Cha-Um, Hakuto Kageyama, Worrawat Promden, Yoshito Tanaka, Chalernpol Kirdmanee and Teruhiro Takabe. Isolation and characterization of proline/betaine transporter gene from oil palm. *Tree Physiology* 31, 462–468, April, 2011.
8. Pithi Chanvorachote, Sudjit Luanpitpong, Preedakorn Chunhacha, Worrawat Promden, Virote Sriuranpong, Expression of CA125 and cisplatin susceptibility of pleural effusion-derived human lung cancer cells from a Thai patient. *Oncology Letters*, 252-256, May, 2012.
9. Worrawat Promden, Orawan Monthakantirat, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi and Wanchai De-Eknamkul. Structure and Antioxidant Activity Relationships of Isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*. *Molecules*, 19, pp. 2226-2237. February, 2014.
10. Siriluk Sintupachee, Worrawat Promden, Nattaya Ngamrojanavanich, Worapan Sitthithaworn, Wanchai De-Eknamkul. Functional expression of a putative geraniol 8-hydroxylase by reconstitution of bacterially expressed plant CYP76F45 and NADPHcytochrome P450 reductase CPR I from *Croton stellatopilosus* Ohba. *Phytochemistry*, 118, pp. 204–215. October, 2015.

บทความวิชาการ

วรวัฒน์ พรหมเด่น. (2556). ชีวเคมีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรีย. วารสารวิจัย มช., 18(6), หน้า 1003-1020.

ประวัติการได้รับทุน

1. พ.ศ. 2548-2550 : ทุน โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก รุ่นที่ 8 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
2. พ.ศ. 2551-2552 : ทุนนักวิจัย สถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยเมโจ (Meijo University) เมืองนาโงยา ประเทศญี่ปุ่น

3. พ.ศ. 2553-2554 : ทุนนักวิจัยหลังปริญญากองทุนเอกรัชดาภิเษกสมโภช บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. พ.ศ. 2557: ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2557 โดยสำนักบริหารโครงการ
ส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
5. พ.ศ. 2558: ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2558 โดยสำนักบริหารโครงการ
ส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
6. พ.ศ. 2559: ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2559 โดยสำนักบริหารโครงการ
ส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

2. นายเทพพร โลมารักษ์ (Tepporn Lomarak, Ph.D)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3349900038624

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)

หน่วยงานที่สังกัด สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

เลขที่ 439 ถ.จระ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 31000

สถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราช

ภัฏรำไพพรรณี เลขที่ 439 ถ.จระ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 31000

หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่ 0817046945

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) tlomarak@gmail.com

ประวัติการศึกษา

การศึกษา	ระดับการศึกษา	สถานศึกษา
2554	การศึกษาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ศึกษา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
2546	ประกาศนียบัตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2545	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิมัธยมศึกษา) : การวิจัยทางการสอนวิทยาศาสตร์การใช้สื่อออนไลน์สำหรับการสอนวิทยาศาสตร์ และการนิเทศน์ศึกษาฝึกประสบการณ์วิชาชีพครู

ผลงานวิจัย:

1. Enhancing High School Students' Conceptual Understanding of Chemical Bonding by Using Learning Units Incorporated with Information Processing Theory
2. A Development of High School Chemical Bonding Learning Units Incorporated with Information Processing Theory

ปริญญาการศึกษาดุสิตบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ศึกษา)

ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินดา แต่มบรรจง

กรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. สมสรร วงษ์อยู่น้อย

ดร. ปรีชาญ เดชศรี

แหล่งตีพิมพ์: วารสารศรีนครินทรวิโรฒวิจัยและพัฒนา (สาขามนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์)

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปีที่ 5ฉบับที่ 9 มกราคม-มิถุนายน พ.ศ. 2556