โครงการย่อยที่ 1

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นคริ้

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

ภายใต้ชุดโครงการ : การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากแก่นคริ้ต่อการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด

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

โดย

เทพพร โลมารักษ์

วรวัฒน์ พรหมเด่น

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2559

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)

เลขที่สัญญา 71/2559

โครงการย่อยที่ 1
การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นคริ้

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

ภายใต้ชุดโครงการ : การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากแก่นคริ้ต่อการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด

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

โดย

เทพพร โลมารักษ์
วรวัฒน์ พรหมเด่น

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
พ.ศ. 2559
(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุ\รีรัมย์)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนจากงบประมาณเพื่อจัดสรรทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2559 มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

บทคัดย่อ

สารสกัดหยาบของแก่นครี้ (*Dalbergia parviflora*) และสารฟลาโวนอยด์บริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้ 27 ชนิด ได้ถูกนำมาตรวจคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (mushroom tyrosinase) ในจำนวนที่ทดสอบทั้งหมดพบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดที่ให้ผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซเนสที่มีค่า IC_{50} ต่ำกว่า 100 μM ได้แก่ Khrinone (5), Cajanin (9), (3RS)-3-hydroxy-8-methyoxy vestitol (21) และ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) โดยมีค่าเป็น 54.0 ± 6.0 μM, 67.9 ± 6.2 μM, 67.8 ± 5.8 μM และ 16.7 ± 5.0 μM ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดหยาบของแก่นครี้มีค่า IC_{50} เป็น 2.6 ± 0.4 μg/mL การค้นพบองค์ความรู้พื้นฐานนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากแก่นครี้มีศักยภาพที่จะเป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นสารต้านปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (anti-browning) โดยผ่านกลไกการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส

คำสำคัญ : ครี้ สักขี 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. Among the flavonoids tested, only four, namely Khrinone (5), Cajanin (9), (3RS)-3-hydroxy-8-methyoxy vestitol (21) and (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) were shown to have IC_{50} values lower than 100 μM. The IC_{50} values were 54.0 ± 6.0 μM, 67.9 ± 6.2 μM, 67.8 ± 5.8 μM and 16.7 ± 5.0 μM respectively. The crude extract of *D. parviflora* exhibited tyrosinase inhibitory activity with an IC_{50} of 2.6 ± 0.4 μg/mL. 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.....2

บทที่ 2

ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....4

เอนไซม์ไทโรซิเนส 4

คริ้ 5

ฟลาโวนอยด์และไอโซฟลาโวนอยด์.....6

ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์.....7

เอนไซม์ไทโรซิเนสกับสีผิว.....8

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของผลไม้กับเอนไซม์กลุ่มพอลิฟีนอลออกซิเดส.....10

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย.....12

เครื่องมือวิทยาศาสตร์.....12

สารเคมี / สารสกัด / เอนไซม์ 12

การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....12

ตัวอย่างการคำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% inhibition) 14

ตัวอย่างการคำนวณค่า IC_{50}.....14

บทที่ 4

ผลการวิจัย.....17

การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....17

การวิเคราะห์ค่า IC50 ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....17

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....21

บรรณานุกรม.....24

ภาคผนวก.....29

ประวัตินักวิจัย.....30

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย……3

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์……6

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์……7

ภาพที่ 2.3 แผนผังชีวสังเคราะห์ของเมลานิน ……12

ภาพที่ 3.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละของการยับยั้งและสมการความสัมพันธ์เชิงลอกาลิทึม……15

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 แสดงรายการและปริมาตรของส่วนผสมในปฏิกิริยาการวัดค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....13

ตารางที่ 3.2 ตัวอย่างการบันทึกผลการสังเกตุค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา.....14

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างการบันทึกผลการสังเกตุค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ.....15

ตารางที่ 4.1 โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดบริสุทธิ์ที่ใช้ทดลสอบในการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งสกัดแยกได้จาก *Dalbergia parviflora*.....19

ตารางที่ 4.2 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (Mushroom tyrosinase) โดยสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จาก *Dalbergia parviflora*.....20

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ครี้หรือสักขี (*Dalbergia parviflora*) เป็นพืชยืนต้นที่มีแก่นไม้ซึ่งมีการใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาแผลเปื่อยพุพองตามหลักภูมิปัญญาท้องถิ่นแต่ยังมิได้มีการศึกษาในเชิงการทดลองทางวิทยาศาสตร์เพื่อสนับสนุนภูมิปัญญาการใช้สมุนไพร และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาสารพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบในแก่นครี้พบว่ามีสารประกอบฟลาโวนอยด์มากกว่า 60 ชนิด ทั้งนี้การส่งเสริมการวิจัยด้านสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นการสร้างความพร้อมทางด้านการผลิตยารักษาโรค เครื่องสำอาง อาหาร รวมถึงยากำจัดโรคพืช และเป็นแผนหนึ่งของการพัฒนานวัตกรรมด้านสมุนไพรไทยให้มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับมากขึ้น ในทางเศรษฐกิจจะนำไปสู่การลดการนำเข้าของสารเคมีหรือสารสังเคราะห์ รวมถึงการส่งเสริมให้มีการอนุรักษ์พืชพันธุ์สมุนไพรและประชาสัมพันธ์ให้ทราบถึงคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติในท้องถิ่น งานวิจัยนี้จะมุ่งศึกษาฤททธิ์ของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้ที่มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทั้งนี้เอนไซม์ไทโรซิเนสมีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์เมลานินซึ่งทำให้เกิดสีผิว และยังเกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลในอาหารจำพวกผักผลไม้และอาหารทะเล นอกจากนี้ยังเป็นเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของแมลง การศึกษาตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงมีโอกาสพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้ 3 ประเภท คือ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินเพื่อให้ผิวขาว ผลิตภัณฑ์สารเติมแต่งอาหารเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล และผลิตภัณฑ์กำจัดตัวอ่อนแมลงโดยวิธีชีวภาพ ทั้งนี้มีรายงานว่าสารพฤกษเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากพืชมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และคณะผู้วิจัยได้เคยรายงานการค้นพบสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์ดังกล่าวมาแล้ว ดังนั้นหากทำการวิจัยศึกษาถึงคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จะเป็นการสร้างโอกาสในการพัฒนาองค์ความรู้และพัฒนานวัตกรรมใหม่

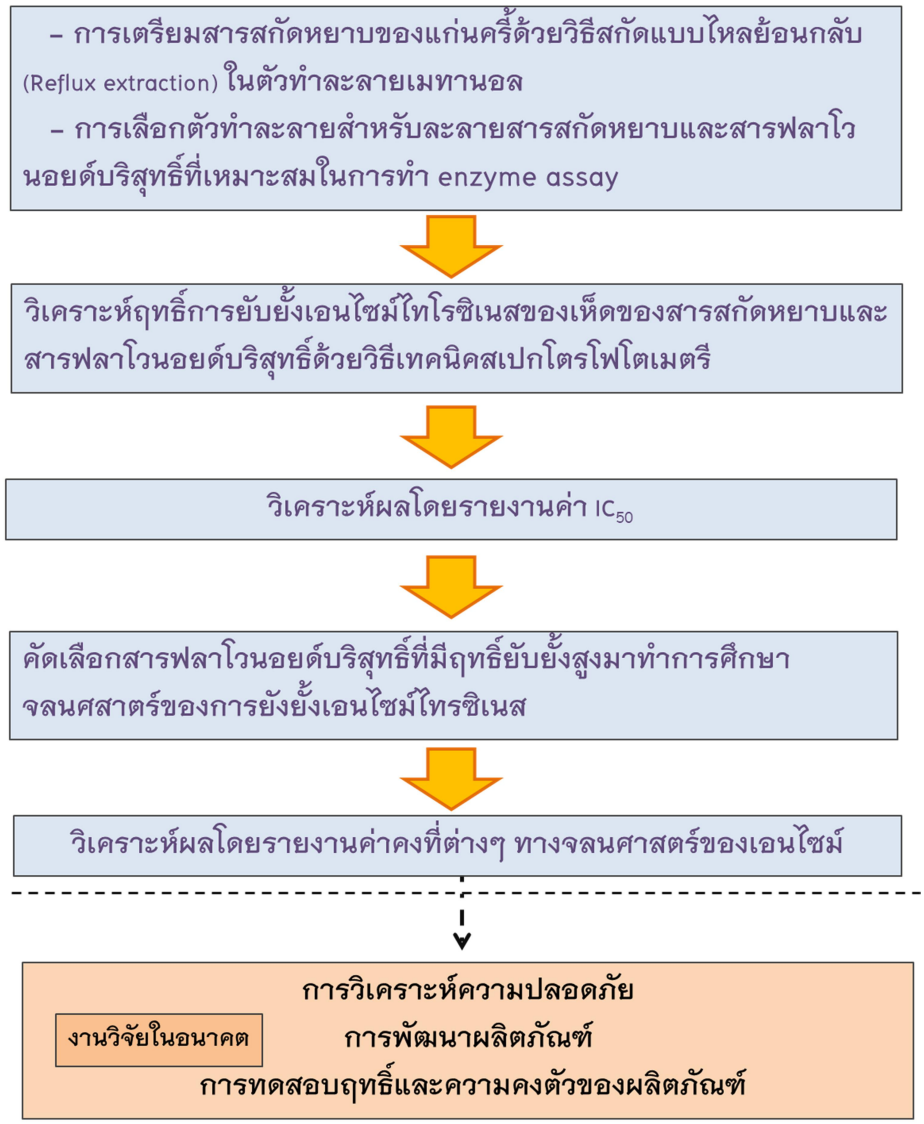
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้

2. เพื่อวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้ต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาวิจัยภายในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ดในหลอดทดลอง โดยการใช้เทคนิคการติดตามอัตราการเกิดปฏิกิริยาและอัตราการยับยั้งปฏิกิริยาด้วยวิธีทางสเปกโตรโฟโตรเมตรี โดยยังไม่มีการพัฒนาสารสกัดให้เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการใช้เป็นยาหรืออาหาร และการวิจัยนี้ยังไม่มีการทดลองในมนุษย์หรือสัตว์



ภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แก่นครี้เป็นสมุนไพรที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทย โดยพบว่ามีการใช้เป็นยาบำรุงร่างกายและยาสำหรับสตรี และคณะผู้วิจัยได้ศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จึงเห็นสมควรศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ให้รอบด้าน โครงการวิจัยนี้จึงได้พัฒนางานวิจัยเดิมให้มีการแตกแขนงการวิจัยออกไปในเชิงลึก โดยมุ่งประเด็นหลักไปที่การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อยืนยันผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับหลอดทดลองก่อนการประเมินแนวทางพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้การนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ จะทำให้สามารถพัฒนาขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นที่ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับอาหาร สุขภาพและความงาม และเป็นการสร้างโอกาสในการพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อกลับคืนสู่ท้องถิ่น อันจะนำมาซึ่งโอกาสในการสร้างรายได้และความยั่งยืน

บทที่ 2
ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase, EC 1.14.18.1) เป็นเอนไซม์ในที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (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) ที่อยู่ภายในเซลล์เมลาโนไซต์ (melanocytes) โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสารตั้งต้นทั้งแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) และแอล-โดปา (L-dopa) ร่วมกับออกซิเจน ได้เป็นสารประกอบโดปาโครม (dopachrome) หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชันโดยไม่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเมลานินชนิดต่างๆ ซึ่งจะถูกส่งต่อเพื่อสะสมยังเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) และทำให้เกิดลักษณะการแสดงออกของสีผิว สีผม สีขน และสีนัยน์ตา นัยน์ตา ความผิดปกติของการผลิตเอนไซม์นำไปสู่ภาวะการเกิดโรคที่เกี่ยวกับสีผิว ในทางด้านการประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางการค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitor) เป็นประเด็นยุทธศาสตร์สำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อผิวขาว (skin whitening agent) (Chang, 2009)

2) เอนไซม์กลุ่มนี้ยังพบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาล (enzymatic browning reaction) ของอาหารประเภทพืชผักผลไม้ โดยปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวกับเอนไซม์นี้เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเกิดการช้ำ ฉีก ขาด เมื่อถูกกระแทก บด หั่น หรือสับทำให้เอนไซม์ สารที่ทำปฏิกิริยา (substrate) และออกซิเจนเข้ามาสัมผัสกัน สาร monophenol (ไม่มีสี) จะถูกออกซิไดซ์เป็นไดฟีนอล (diphenol) ซึ่งไม่มีสี และถูกออกซิไดซ์ต่อเป็น o-quinone ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับกรดอะมิโนหรือโปรตีนได้เป็นสารสีน้ำตาล และจะรวมตัวกันเป็นพอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลใหญ่และมีสีน้ำตาล การศึกษาตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะสามารถนำไป

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

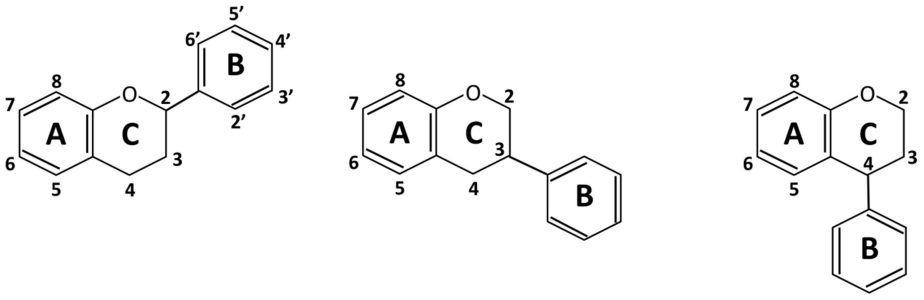
3) ในสัตว์กลุ่มแมลงและครัสเตเซียนพบว่าเอนไซม์นี้จะถูกเรียกว่า polyphenoloxidase (PPO) กลุ่มฟีนอลออกซิเดสมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของแมลงมีหน้าที่ช่วยในกระบวนการป้องกันตัวและเจริญเติบโต ได้แก่ การสร้างเมลานินเพื่อป้องกันรังสีที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ การรักษาบาดแผล การสร้างเกราะหุ้มปรสิต (parasite encapsulation)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

ครี้ (*Dalbergia parviflora* Roxb.) มีชื่อสามัญคือ Blackwood และชื่อท้องถิ่นได้แก่ กระซิก ซิก สรี้ และ สักขี เป็นต้น จัดอยู่วงศ์ (family) *Fabaceae* วงศ์ย่อย (subfamily) *Faboideae* อาจมีการสับสนกับต้นสักขี (*Dalbergia candenatensis*) ซึ่งเป็นพรรณไม้ในวงศ์เดียวกัน งานวิจัยเกี่ยวกับสารพฤกษเคมี (phytochemical) จากแก่นครี้พบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มากกว่า 60 ชนิด และพบว่าหลายชนิดมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเอสโตรเจน (Promden et al., 2014; Songsiang et al., 2009) นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ยังมีรายงานว่าเป็นสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Chen et al., 1996; Croft, 1998; Rice-Evans et al., 1996) คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากแก่นครี้โดยวิธี DPPH วิธี ORAC และวิธี xanthine/xanthine oxidase ซึ่งพบว่ามีสารหลายชนิดที่แสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ อีกทั้งยังได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Promden et al., 2014) สารฟลาโวนอยด์จากแก่นครี้จึงเป็นเป้าหมายที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนายา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง

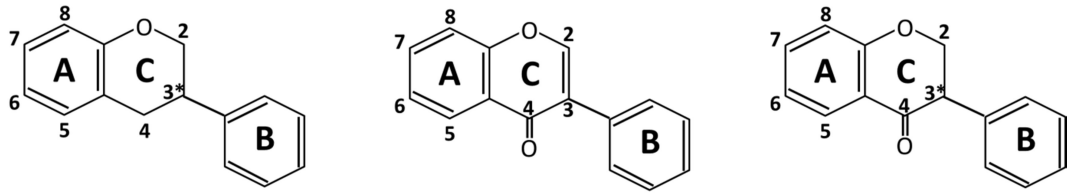
ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids)

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 จึงเป็นที่มาของการศึกษาปริมาณและชนิดของฟลาโวนอยด์ในแหล่งอาหา ทั้งนี้พบว่าในผักและผลไม้เป็นแหล่งของฟลาโวนอยด์ที่สำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่ามีฟลาโวนอยด์ใน ช้อกโกแลต ชา และไวน์อีกด้วย (Yao et al., 2004)

ไอโซฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีโครงสร้างหลักมาจาก 3-phenylchroman เป็นสารประกอบที่พบอยู่ในสิ่งมีชีวิตอาณาจักรพืช ความหลากของชนิดของไอโซฟลาโวนอยด์ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน และยังมีความแตกต่างหลากหลายของระดับออกซิเดชั่นบนวงแหวน (Grotewold, 2006) ไอโซฟลาโวนอยด์จึงสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังนี้



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ (2-phenylbenzopyran) ไอโซฟลาโวนอยด์ (3-benzopyran) และ นีโอฟลาโวนอยด์ (4-benzopyran) แสดงการระบุหมายเลขตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน A B และ C



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์ 3 ชนิด คือ ไอโซฟลาแวน ไอโซฟลาโวน และไอโซฟลาวาโนน แสดงการระบุหมายเลขตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน A B และ C

ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์

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

ในปัจจุบันนี้ฟลาโวนอยด์กำลังเป็นที่สนใจในวงการที่ศึกษาเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงมาก (Devasagayam et al., 2004; Nijveldt et al., 2001) สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น การต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Kim et al., 2004) ยับยั้ง

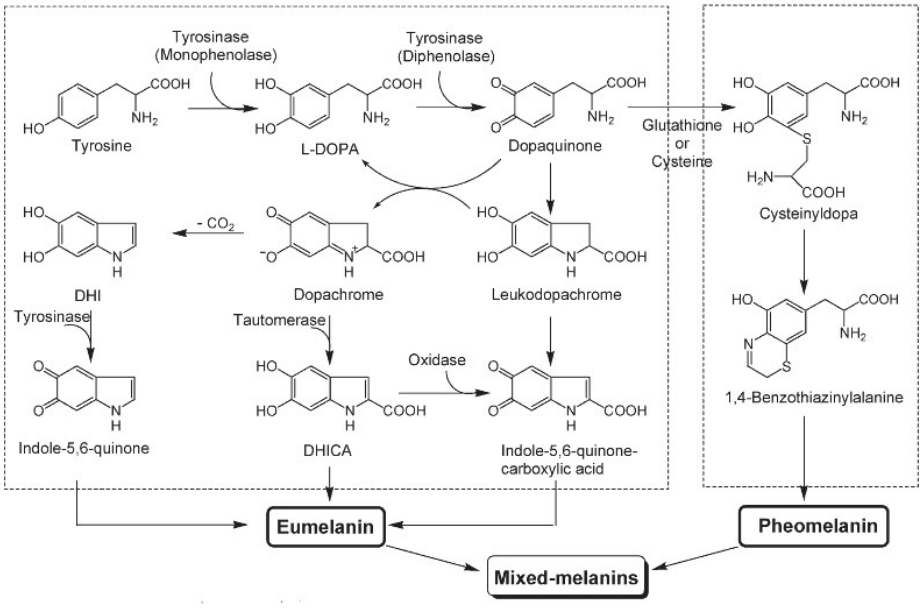
เอนไซม์บางกลุ่ม เช่น hydrolytic enzyme และ oxidative enzyme (Theos et al., 2005; Yang et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าฟลาโวนอยด์สามารถป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และฟลาโวนอยด์บางชนิดอาจมีศักยภาพที่สามารถยับยั้งไวรัส HIV ได้ (Yao et al., 2004) ฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในสารประกอบฟลาโวนอยด์ ได้แก่ สารสกัดจากใบ *Tagetes minuta* ซึ่งการใช้เป็นยาพื้นบ้านเพื่อรักษาโรคติดเชื้อในประเทศแถบอาร์เจนตินาซึ่งพบว่ามีสารฟลาโวนอยด์คือ quercetagetin-7-arabinosyl-galactoside (Tereschuk et al., 1997) สารสกัดจาก *Scutellaria baicalensis* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจีนที่ใช้รักษาโรคเยื่อหุ้มฟันอักเสบและแผลติดเชื้อในช่องปากพบว่ามีสารฟลาโวน 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 จากต้นอ่อนของพืชจำพวกผักแพว (*Polygonum hydropiper* L.)(Miyazawa and Tamura, 2007)

เอนไซม์ไทโรซิเนสกับสีผิว

เอนไซม์ไทโรสิเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในเซลล์เมลาโนไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีอยู่ประมาณ 2-5% ของปริมาณเซลล์ผิวทั้งหมด โดยเซลล์ดังกล่าวมีความจำเป็นต่อการกระบวนการสร้างเมลานินเพื่อส่งให้แก่เซลล์ข้างเคียงเช่น เซลล์เคลาติโนไซต์ ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรสิเนสเป็นขั้นกำหนดอัตรา (rate-determining step) ของกระบวนการสร้างเมลานิน (Chang, 2009) จากแผนผังชีวสังเคราะห์ของเมลานินของเรเปอร์-เมสัน (Raper-Mason) (Miranda et al., 1988; Raper, 1927)(ภาพที่ 2.5) พบว่าขั้นตอนการใช้เอนไซม์ไทโรสิเนสจะเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน โดยมีแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) หรือแอล-โดปา (L-Dopa) เป็นสารตั้งต้น ซึ่งจะถูกเปลี่ยนโดยปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ (Enzymatic reaction) เป็นโดปาควิโนน (Dopaquinone) ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ของแอล-ไทโรซีน เป็น แอล-โดปา และ โดปาควิโนน เรียกว่า โมโนฟีนอลเลส (monophenolase) และออโธ-ไดฟีนอลเลส (*o*-diphenolase) ตามลำดับ

หลังจากนั้นจะเข้าสู่ช่วงปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์ (Non-enzymatic reaction) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องด้วยตนเอง ในวิถีหนึ่งนั้นโดปาควิโนนจะเกิดปฏิกิริยาออโต-ออกซิเดชั่น (Auto-oxidation) ได้เป็นสารประกอบโดปาโครม (Dopachrome) ซึ่งเป็นสารที่มีสีน้ำตาล-ดำ หลังจากนั้นโดปาโครมจะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนแปลงขั้นต่อไปจนกระทั่งได้สารเมลานินชนิดยูเมลานิน (Eumelanin) ที่มีสีน้ำตาล-ดำ นอกจากนี้ในอีกวิถีหนึ่ง สารโดปาควิโนนยังสามารถทำปฏิกิริยากับสาร กลูตาไธโอน (Glutathione) หรือซิสเตอีน (Cysteine) ได้ผลิตภัณฑ์ปลายทางคือสารประกอบเมลานินชนิดฟีโอเมลานิน (Pheomelanin) ซึ่งมีสีชมพู-แดง จากแผนผังชีวสังเคราะห์ของเมลานินจะพบว่าวิธีการหนึ่งที่จะลดการสร้างเมลานินได้นั้น คือการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรสิเนสที่เป็นขั้นตอนสำคัญของชีวสังเคราะห์ของเมลานิน ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนสจึงเป็นเป้าหมายในการศึกษาค้นคว้าและสามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สู่ท้องตลาดในปัจจุบัน



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 นอกจากนี้เอนไซม์ยังต้องการออกซิเจนเป็นสารตั้งต้นร่วม (co-substrate) ในการเกิดปฏิกิริยา

2. เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase, PPO) หรืออาจเรียกว่าเอนไซม์ฟีนอเลส (phenolase) ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลและออร์โท-ไดฟีนอล ดังนั้นเอนไซม์ในกลุ่มนี้จึงรวมถึงเอนไซม์ต่างๆ เช่น ฟีนอลออกซิเดส (phenol oxidase) ไทโรซิเนส (tyrosinase) แคทีคอเลส (catecholase) ครีโซเลส (cresolase) โดปาออกซิเดส (dopaoxidase) และออกซิเดส (oxidase) เอนไซม์เหล่านี้จะทำงานได้ดีที่ค่า pH เหมาะสมซึ่งอยู่ระหว่าง 5-7

ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวกับเอนไซม์นี้เป็นปฏิกริยาออกซิเดชัน (oxidation) จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเกิดการช้ำ ฉีก ขาด เมื่อถูกกระแทก บด หั่น หรือสับทำให้เอนไซม์สารที่ทำปฏิกิริยา (substrate) และออกซิเจนเข้ามาสัมผัสกัน สาร monophenol (ไม่มีสี) จะถูกออกซิไดซ์ เป็นไดฟีนอล (diphenol) ซึ่งไม่มีสี และถูกออกซิไดซ์ต่อเป็น o-quinone ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับกรดแอมิโนหรือโปรตีนได้เป็นสารสีน้ำตาล และจะรวมตัวกันเป็นพอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลใหญ่และมีสีน้ำตาล เช่น เมลานิน (melanin) ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวกับเอนไซม์ มักพบเป็นปัญหาการเกิดสีน้ำตาล ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการ ใน ผัก ผลไม้ เช่น มันฝรั่ง กะท้อน กล้วย ฝรั่ง ซึ่งจะเกิดขึ้นหลังการปอกเปลือก (peeling) การลดขนาด (size reduction) และยังพบในอาหารทะเลสด เช่น กุ้ง ซึ่งการการศึกษาตัวยับยั้งป้องกันปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ จะเป็นประโยชน์ต่อวงการอุตสาหกรรมอาหาร อย่างไรก็ตามปฏิกิริยานี้เป็นอาจปฏิกิริยาที่ต้องการให้

เกิดขึ้นในการแปรรูปอาหารบางชนิดที่ต้องการให้เกิดสีน้ำตาลเข้ม และเกิดกลิ่นรสระหว่างการหมัก เช่น โกโก้ ชา กาแฟ ไซเดอร์ ลูกเกด ลูกพรุน อิทผลัมน เป็นต้น

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากแก่นครี้โดยวิธี DPPH วิธี ORAC และวิธี xanthine/xanthine oxidase ซึ่งพบว่ามีสารหลายชนิดที่แสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ อีกทั้งยังได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Promden et al., 2014) ดังนั้นสารสกัดจากแก่นครี้ที่มีฟลาโวนอยด์หลายชนิดจึงสมควรนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ 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*)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

1. เตรียมสารละลายสารสกัดหยาบ 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 µL สารสกัดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 20 µL สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 100 Unit/mLจำนวน 20 µL จากนั้นนำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเติม 2.5 mM L-DOPA จำนวน 20 µL เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายผสมปฏิกิริยาไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm พร้อมกับทำการทดลองชุดควบคุมโดยใช้สารละลาย 50% DMSO จำนวน 20 µL 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 นาที ของการทดลองกลุ่มควบคุม (control)

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

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

ค่า IC_{50} (concentration providing 50% inhibition) สามารถคำนวณได้จากการวาดกราฟของร้อยละการยับยั้ง (%inhibition) กับค่าความเข้มข้นของสารสกัดแล้วสร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นเพื่อเทียบกลับเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ที่ร้อยละ 50

ตารางที่ 3.1 แสดงรายการและปริมาตรของส่วนผสมในปฏิกิริยาการวัดค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ปฏิกิริยา	Phosphate Buffer pH 6.8 (µL)	**สารสกัด** (µL)	50% DMSO (µL)	100 Unit/mL Mushroom tyrosinase (µL)	2.5 mM L-DOPA (µL)	Total volume (µL)
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 µM หรือ 0-1000 µg/mL)

ตัวอย่างการคำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% inhibition)

ทำการเตรียมปฏิกิริยาตามวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แล้วบันทึกผลดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 **ตัวอย่างการบันทึกผลการสังเกตค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา**

ปฏิกิริยา	**ค่าการดูดกลืนแสงที่** 475 nm		
	เวลา 0 นาที	**เวลา 20 นาที**	**ผลต่าง** (Δ, t_{20}-t_0)
C (control)	0.019	0.458	0.439
S (Sample) สารสกัด A ที่ระดับความเข้มข้น 100 µM	0.022	0.103	0.081
B (Blank)	0.015	0.015	0

นำค่าผลต่างของเวลาที่ T_{20} และ T_0 ที่สังเกตได้มาแทนค่าในสูตร

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

$$= \{[(0.439-0) - (0.081-0)] / 0.439-0)\} \times 100$$

$$= 81.55\ \%$$

ดังนั้นค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด A ที่ระดับความเข้มข้น 100 µM

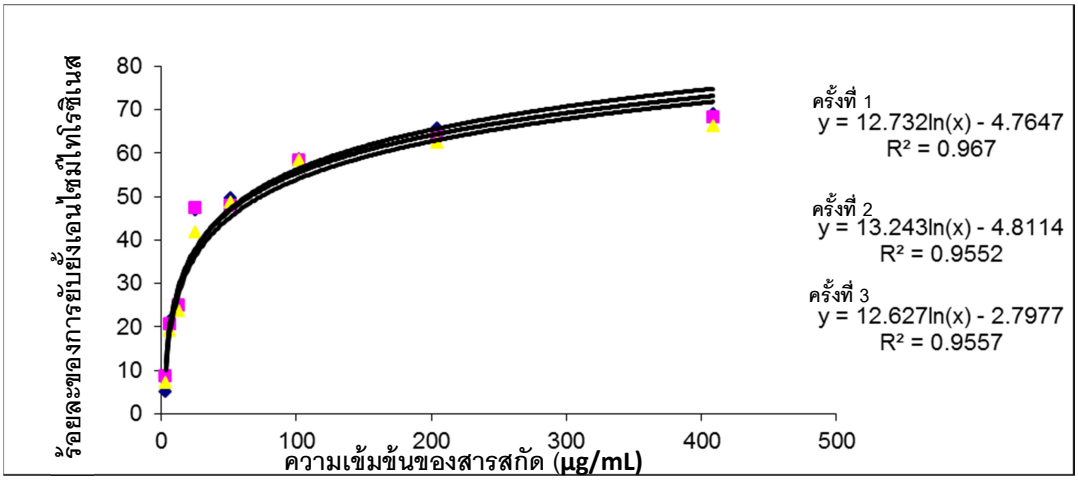
มีค่าเป็น 81.55 %

ตัวอย่างการคำนวณค่า IC_{50} (concentration providing 50% inhibition)

ทำการเตรียมปฏิกิริยาตามวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยแปรผันความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละชนิด และคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดบันทึกผลดังตารางที่ 3.3 และ ให้นำค่าจากตาราง มาวาดเป็นกราฟของความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละของการยับยั้ง เพื่อสร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นหรือลอกาลิทึมเพื่อเทียบกลับเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้มีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ที่ร้อยละ 50 ดังภาพที่ 3.1

ตารางที่ 3.3 ตัวอย่างการบันทึกผลการสังเกตค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นสารสกัด A (μM)	**ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด A (%)**		
	ครั้งที่ 1	**ครั้งที่ 2**	**ครั้งที่ 3**
3.19	5.12	8.63	7.15
6.39	21.46	20.54	19.17
12.78	25.27	24.97	23.59
25.55	46.75	47.42	41.66
51.10	49.66	47.82	48.64
102.20	58.62	58.26	58.36
204.40	65.79	64.21	62.43
408.80	68.90	68.13	66.25



ภาพที่ 3.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละของการยับยั้ง และสมการความสัมพันธ์เชิงลอกาลิทึมของกราฟแต่ละเส้น

จากสมการความสัมพันธ์เชิงลอกาลิทึมในภาพที่ 3.1 สามารถคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัด A ที่ทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ที่ระดับ 50% โดยแทนค่า X = 50 µM ในแต่ละสมการดังนี้

การทดลองครั้งที่ 1 ได้สมการ $y = 12.732\ln(x) - 4.7647$

การทดลองครั้งที่ 2 ได้สมการ $y = 13.243\ln(x) - 4.8114$

การทดลองครั้งที่ 3 ได้สมการ $y = 12.627\ln(x) - 2.7977$

เมื่อแทนค่า X = 50 µM ในแต่ละสมการ จะได้ค่าเป็น ดังนี้

การทดลองครั้งที่ 1 ได้ค่า $y = 62.69$ µM

การทดลองครั้งที่ 2 ได้ค่า $y = 65.35$ µM

การทดลองครั้งที่ 3 ได้ค่า $y = 64.10$ µM

ทำการหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจะได้ เป็น 64.05 ± 1.33 µM

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัด A มีค่า IC_{50} ต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็น 64.05 ± 1.33 µM

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

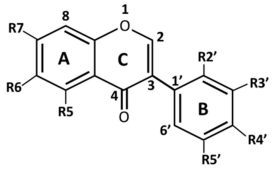
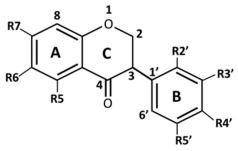
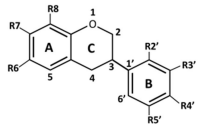
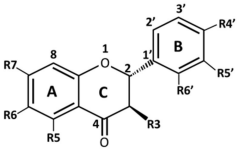
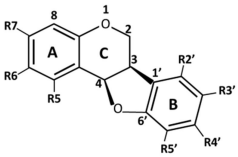
การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้ (*D. parviflora*) จำนวน 27 ชนิด ซึ่งประกอบไปด้วยสารกลุ่มไอโซฟลาโวน (isoflavone) ฟลาวาโนน (flavanone) ไอโซฟลาวาโนน (isoflavanone) ไอโซฟลาวาน (isoflavan) และ เพเทอโรคาร์พาน (pterocarpan) (ตารางที่ 4.1) โดยสารประกอบแต่ละชนิดถูกนำมาทดสอบคัดกรองฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 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 4.2)

การวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารประกอบจำนวน 11 ชนิด ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 200 μM ได้สูงกว่า 30% ได้นำมาศึกษาเพื่อวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ 50% (IC_{50}, concentration providing 50% inhibition) โดยวาดกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% inhibition) ที่ความเข้มข้นของสารทดสอบระดับต่างๆ ผลค่า IC_{50} แสดงดังตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบของแก่นครี้มีค่า IC_{50} เป็น 2.6 ± 0.4 μg/mL สารกลุ่มไอโซฟลาโวน 9 ชนิด (1-9) มีเพียง 2 ชนิดคือ Khrinone B (5) และ Cajanin (9) ที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า IC_{50} เป็น 54.0 ± 6.0 μM และ 67.9 ± 6.2 μM ตามลำดับ ในขณะที่สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอีก 7 ชนิดที่เหลือนั้นไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สารกลุ่มไอโซฟลาวาโนน (10-18) และฟลาวาโนน (24-26) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในระดับปานกลางถึงค่อนข้างต่ำโดยมีค่า IC_{50} สูงกว่า 100 μM และสารกลุ่มไอโซฟลาวาน (19-23) พบว่ามีเพียงสาร (3RS)-3'-hydroxy-8-methyoxy vestitol (21) ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและหาค่า IC_{50} ได้เป็น 67.8 ± 5.8 μM สารกลุ่มเพเทอโรคาร์พานคือ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy

pterocarpan (27) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดจากสารทดสอบทั้ง 27 ชนิด โดยมีค่า IC_{50} เป็น 16.7 ± 5.0 μM ซึ่งเทียบเท่ากับกรดโคจิกที่การทดลองนี้ได้ค่า IC_{50} เป็น 16.8 ± 4.8 μM อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่าสารมาตรฐานออกซีเรสเวอราทรอล ยังคงเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุดคือมีค่า IC_{50} เป็น 0.19 ± 0.06 μM

ตารางที่ 4.1 โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดบริสุทธิ์ที่ใช้ทดลสอบในการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งสกัดแยกได้จาก *Dalbergia parviflora*

	No.	***Isoflavones***	**R7**	**R6**	**R5**	**R2'**	**R3'**	**R4'**	**R5'**
 ***Isoflavones***	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
	No.	***Isoflavanones***	**R7**	**R6**	**R5**	**R2'**	**R3'**	**R4'**	**R5'**
 ***Isoflavanones***	10	(3R)-7,3'-dihydroxy-4'-methoxy-isoflavanone	OH	H	H	H	OH	OMe	H
	11	Onogenin	OH	H	H	OMe	H	OCH_2O	
	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-methylviolanone	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
		Isoflavans	**R8**	**R7**	**R6**	**R2'**	**R3'**	**R4'**	**R5'**
 ***Isoflavans***	19	(3*R*)-vestitol	H	OH	H	OH	H	OMe	H
	20	(3*R*)(+)-mucronulatol	H	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	21	(3*R*S)-3'-hydroxy-8-methyoxy vestitol	OH	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	22	Duartin	OMe	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	23	(3*S*)-8-demethylduartin	OMe	OH	H	OH	OH	OMe	H
	No.	***Flavanones***	**R7**	**R6**	**R5**	**R3**	**R4'**	**R5'**	**R6'**
 ***Flavanones***	24	(2*S*)-liquiritigenin	OH	H	H	H	OH	H	H
	25	(2*S*)-naringenin	OH	H	OH	H	0H	H	H
	26	Alpinetin	OH	H	OMe	H	H	H	H
	No.	***Pterocarpan***	**R7**	**R6**	**R5**	**R2'**	**R3'**	**R4'**	**R5'**
 ***Pterocarpan***	27	(6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan	OH	H	H	H	OH	OMe	H

ตารางที่ 4.2 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (Mushroom tyrosinase) โดยสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จาก *Dalbergia parviflora*

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

N.D. = Not Determined

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากแก่นคร้ี (*Dalbergia parviflora*) ต่อการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด (mushroom tyrosinase, Sigma-Aldrich) ได้ทำการศึกษาทั้งในส่วนของสารสกัดหยาบ (crude extract) ที่สกัดด้วยเมทานอลและศึกษาในสารสกัดบริสุทธิ์ที่สกัดแยกได้ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จำนวน 27 ชนิด โดยมีการใช้กรดโคจิก (kokic acid) และออกซีเรสเวอราทรอล (oxyresveratrol) เป็นการทดลองชุดควบคุมผลบวก (positive control) ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบคัดกรองโดยใช้สารบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ ที่สกัดแยกได้จากแก่นคร้ีที่ความเข้มข้นสุดท้าย 200 μM พบว่ามีสารบริสุทธิ์เพียง 11 ชนิด จากทั้งหมด 27 ชนิด ที่มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ซึ่งทั้ง 11 ชนิดนี้ถูกนำไปศึกษาเพื่อหาค่า IC_{50} การทดลองชุดควบคุมผลบวกพบว่ากรดโคจิกและออกซีเรสเวอราทรอลเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพสูง โดยมีค่า IC_{50} เป็น16.8 ± 4.8 μM และ 0.19 ± 0.06 μM ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบของแก่นคร้ีมีค่า IC_{50} ต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็น 2.6 ± 0.4 μg/mL แม้ว่าสารสกัดจากแก่นคร้ีส่วนใหญ่ยังไม่พบว่ามีฤทธิ์ดีเทียบเท่ากับกรดโคจิกและออกซีเรสเวอราทรอล การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์อาจเกิดขึ้นโดยการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลฟลาโวนอยด์และสารอนุมูลอิสระที่ถูกผลิตขึ้นบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ (Xie et al., 2003) หรืออาจเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลฟลาโวนอยด์กับไอออนทองแดง (copper ion) ที่อยู่บน catalytic domain ของเอนไซม์ (Kubo and Kinst-Hori, 1999) ทั้งนี้จำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่บนโมเลกุลฟลาโวนอยด์จะเป็นจุดสำคัญในการแสดงความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสนี้

งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการดลองศึกษาสารสกัดยับยั้งเอนไซม์กลุ่มโพลีฟีนอลออกซิเดสที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดสีคล้ำในอาหารต่างๆ เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี เช่น การศึกษาการใช้น้ำผึ้งเพื่อลดการเกิดภาวะสีน้ำตาลในผลไม้ตัดแต่ง(Jeon and Zhao, 2005; Oszmianski and Lee, 1990) การใช้สารสกัดน้ำมันหอมระเหย (Phytoncide essential oil) จากใบสนเพื่อลดการเกิดภาวะสี

น้ำตาลในผลไม้ตัดแต่ง (Kim et al., 2014) การใช้สารธรรมชาติ เช่น Glutathione และ cinnamic acid เพื่อป้องกันการเกิดสีน้ำตาลจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในน้ำแอปเปิ้ล (Gacche et al., 2004) การใช้สาร catechin ที่สกัดแยกได้จากชาเขียนเพื่อป้องกันการเกิดสีดำคล้ำจากภาวะ melanosis โดยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในกุ้งแช่แข็ง (Nirmal and Benjakul, 2009) การศึกษาวิจัยที่มุ่งเน้นค้นหาสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อการประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางบำรุงผิวขาว (whitening) มีรายงานในสารสกัดสาหร่ายทะเล *Salicornia herbacea* ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและลดการสังเคราะห์เมลานินใน B16 melanoma cell (Sung et al., 2009) สารสกัดจากพืชกลุ่มมัลเบอรี่ (Mulberry) ที่มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น *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*) ที่มีสารออกซีเรสเวอราทรอล (Tengamnuay et al., 2006) สารประกอบฟลาโวนอยด์ที่มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้แก่ kaempferol ที่สกัดจากดอกของหญ้าฝรั่น (*Crocus sativus*) (Kubo and Kinst-Hori, 1999) morachalcone A ที่สกัดจากแก่นขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) (Nguyen et al., 2012) ในส่วนการใช้สารฟลาโวนอยด์เพื่อกำจัดแมลงได้มีการศึกษาพบว่าสาร quercetin สามรถยับยั้งเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดลที่แยกได้จากตัวอ่อนของแมลงวันหัวเขียว blowfly (*Sarcophaga bullata*) ได้ (Wang et al., 2004) แม้ว่าฟลาโวนอยด์และสารกลุ่มโพลีฟีนอลในพืชตามธรรมชาติจะมีไว้เพื่อเป็นกลไกการต้านแมลงศัตรูพืช แต่การประยุกต์ใช้สารกลุ่มนี้เพื่อกำจัดแมลงยังไม่มีการวิจัยอย่างแพร่หลายจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษาต่อในอนาคต

การศึกษาวิจัยในแก่นครี้ยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมาก่อน อย่างไรก็ตามมีการรายงานเกี่ยวกับพืชในวงศ์เดียวกับครี้ (วงศ์ Fabaceae) ซึ่งพบว่าสารสกัดจากลำต้นของ *Maackia fauriei* มีสารฟลาโวนอยด์คือ mirkoin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบ competitive inhibitor (Kim et al., 2010) การศึกษาวิจัยครั้งนี้ถือได้ว่าเป็นการค้นพบฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ของสารสกัดแก่นครี้ ซึ่งเป็นฤทธิ์การยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มโพลีฟีนอลออกซิเดสโดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดเป็นตัวแทนในการศึกษา นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เคย

รายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้แก่นครี้มาแล้ว ซึ่งสามารถนำองค์ความรู้นี้ไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาให้เกิดผลิตภัณฑ์สำหรับการใช้ยังยั้งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอางประเภทบำรุงผิวขาว และต้องการการวิจัยเพิ่มเติมสำหรับการศึกษาแนวโน้มในการเป็นใช้สารกำจัดแมลงศัตรูพืช

บรรณานุกรม

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., Boloor, 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., 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.

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.

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 82, 513-523.

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., Pitchuanchom, 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.

Tengamnuay, 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.

Wungsintaweekul, B., Umehara, K., Miyase, T., Noguchi, H., 2011. Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, *Smilax corbularia* (Smilacaceae). Phytochemistry.

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 พรมเด่น** (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	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ) สาขาชีวเคมี
พ.ศ. 2550	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	ศิลปศาสตรบัณฑิต (ศศ.บ) สาขาปรัชญา
พ.ศ. 2551	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วท.ด) สาขาชีวเคมี

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

อณูชีววิทยาและพันธุวิศกรรมในแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารต้านอนุมูลอิสระ

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

พ.ศ. 2553-2555 ผู้ประสานงานหลัก หน่วยปฏิบัติงานวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเทคโนโลยีชีวภาพ 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, **Worawat 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, Chalermpol 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 มข., 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) เมืองนาโกยา ประเทศญี่ปุ่น

3. พ.ศ. 2553-2554 : ทุนนักวิจัยหลังปริญญากองทุนเอกรัชดาภิเษกสมโภช บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. พ.ศ. 2557: ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2557 โดยสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

5. พ.ศ. 2558: ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2558 โดยสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

6. พ.ศ. 2559: ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2559 โดยสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

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

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3349900038624

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)

หน่วยงานที่สังกัด สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ เลขที่ 439 ถ.จิระ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 31000

สถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ เลขที่ 439 ถ.จิระ ต.ในเมือง อ.เมือง จ.บุรีรัมย์ 31000

หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่ 0817046945

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) tlomarak@gmail.com

ประวัติการศึกษา

การศึกษา	**ระดับการศึกษา**	**สถานศึกษา**
2554	การศึกษาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรศึกษา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
2546	ประกาศนียบัตรบัณฑิต สาขาวิชาชีพครู	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2545	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) : การวิจัยทางด้านการสอนวิทยาศาสตร์การใช้สื่อออนไลน์สำหรับการสอนวิทยาศาสตร์ และการนิเทศนักศึกษาฝึกประสบกาณ์วิชาชีพครู

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

ปริญญาการศึกษาดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรศึกษา)

ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินดา แต้มบรรจง

กรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. สมสรร วงษ์อยู่น้อย

ดร. ปรีชาญ เดชศรี

แหล่งตีพิมพ์: วารสารศรีนครินทรวิโรฒวิจัยและพัฒนา (สาขามนุษย์ศาสตร์และสังคมศาสตร์)

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