



โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาจลนศาสตร์ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่
สกัดแยกได้จากแก่นครี

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

ภายใต้ชุดโครงการ : การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากแก่นครีต่อการทำงานของ
เอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด

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

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

และ

เทพพร โลมารักษ์

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2559

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)



โครงการย่อยที่ 2

การศึกษาจลนศาสตร์ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์ที่
สกัดแยกได้จากแก่นครี

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

ภายใต้ชุดโครงการ : การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารสกัดจากแก่นครีต่อการทำงานของ
เอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด

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

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

และ

เทพพร โลมารักษ์

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2559

(ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนจากงบประมาณเพื่อจัดสรรทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี
งบประมาณ 2559 มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

บทคัดย่อ

สารฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดที่สกัดแยกได้จากแก่นครี ได้แก่ Khinone (5), Cajanin (9), (3R)-3-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) และ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpin (27) ได้นำไปศึกษาจุลศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์โดยสังเกตผลด้วยปฏิกิริยาการยับยั้งกิจกรรมจำเพาะของ *o*-diphenolase ผลการศึกษาเผยให้เห็นว่ากลไกการยับยั้งของสารประกอบ (5) (9) (21) และ (27) เป็นแบบชนิด uncompetitive non-competitive mixed และ competitive ตามลำดับ การค้นพบองค์ความรู้พื้นฐานนี้ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากแก่นครีมีศักยภาพที่จะเป็นแหล่งของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นสารต้านปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (anti-browning) โดยผ่านกลไกการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส

คำสำคัญ : ครี สักชี ฟลาโวนอยด์ ตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จุลศาสตร์ของเอนไซม์

ABSTRACT

Four flavonoids isolated from *Dalbergia parviflora*, namely Khronone (5), Cajanin (9), (3RS)-3-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) and (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) 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 inhibitor, Enzyme kinetics

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.....	6
ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์.....	8
จลนศาสตร์ของของเอนไซม์.....	8

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย.....	18
เครื่องมือวิทยาศาสตร์.....	18
สารเคมี / สารสกัด / เอนไซม์	18
การเตรียมสารสกัดหยาบจากแก่นครี	14
การวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	18
การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารฟลาโวนอยด์จากแก่นครี.....	20

บทที่ 4

ผลการวิจัย.....	20
การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารฟลาโวนอยด์จากแก่นครี	22

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	28
บรรณานุกรม.....	30
ภาคผนวก.....	33
ประวัตินักวิจัย.....	34

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1	แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย.....	3
ภาพที่ 2.1	โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์.....	9
ภาพที่ 2.2	โครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์.....	7
ภาพที่ 2.3	กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์	7
ภาพที่ 2.4	กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ (Michaelis-Menten saturation curve).....	10
ภาพที่ 2.5	Double reciprocal plot ระหว่าง $1/v_o$ (แกน Y) และ $1/[S]$	13
ภาพที่ 2.6	สมการรูปแบบของการยับยั้งเอนไซม์แบบผันกลับไม่ได้	14
ภาพที่ 2.7	สมการรูปแบบและกลไกของการยับยั้งแบบ Competitive	15
ภาพที่ 2.8	สมการรูปแบบและกลไกของการยับยั้งเอนไซม์แบบ Uncompetitive	16
ภาพที่ 2.9	สมการรูปแบบและกลไกของการยับยั้งเอนไซม์แบบ Noncompetitive.....	17
ภาพที่ 4.1	โครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดที่ศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์.....	22
ภาพที่ 4.2	Michaelis-Menten saturation curve และ Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยไม่มีการเติมตัวยับยั้ง.....	23
ภาพที่ 4.3	Michaelis-Menten saturation curve และ Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยมีการเติมตัวยับยั้ง Khinone B (5)	24
ภาพที่ 4.4	Michaelis-Menten saturation curve และ Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยมีการเติมตัวยับยั้ง Cajanin (9)	25
ภาพที่ 4.5	Michaelis-Menten saturation curve และ Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยไม่มีการเติมตัวยับยั้ง (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21).....	26
ภาพที่ 4.6	Michaelis-Menten saturation curve และ Lineweaver-Burk Plot ของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยไม่มีการเติมตัวยับยั้ง 6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27)	27

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3.1 แสดงรายการและปริมาณของส่วนผสมในปฏิกิริยาการวัดค่าการยับยั้ง	
เอนไซม์ไทโรซิเนส.....	19
ตารางที่ 4.1 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) โดยไม่มีตัวยับยั้ง.....	23
ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) โดยมีการเติมตัวยับยั้ง Khinone B (5)	24
ตารางที่ 4.3 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) โดยมีการเติมตัวยับยั้ง Cajanin (9).....	25
ตารางที่ 4.4 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) โดยมีการเติมตัวยับยั้ง (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21)	26
ตารางที่ 4.5 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) โดยมีการเติมตัวยับยั้ง (6aR, 11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27).....	27

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

จลศาสตร์ของเอนไซม์ (enzyme kinetics) คือ การศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยา (reaction rate) และการเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วของปฏิกิริยาเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยบางอย่าง เพื่อทำความเข้าใจกลไกการทำงานของเอนไซม์นั้นๆ ได้ การศึกษาจลศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์จึงเป็นแนวปฏิบัติสำหรับการศึกษาเชิงลึกหลังจากการศึกษาเบื้องต้นแล้วพบว่ามีสารไดออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่กำลังศึกษาอยู่ ซึ่งโครงการวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นศึกษาสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี (*Dalbergia parviflora*) ที่มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (mushroom tyrosinase) เป็นตัวแทนในการศึกษา จากการศึกษาเบื้องต้นพบสารสกัดฟลาโวนอยด์บริสุทธิ์จากแก่นครีจำนวน 4 ชนิด มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ดีมาก จึงควรนำมาศึกษาจลศาสตร์การยับยั้ง เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ที่สามารถอธิบายกลไกการยับยั้งและข้อมูลทางจลศาสตร์ที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของตัวยับยั้งที่ศึกษาและตัวยับยั้งอื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อน

เอนไซม์ไทโรซิเนสมีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์เมลานินซึ่งทำให้เกิดสีผิวและยังเกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลในอาหารจำพวกผักผลไม้และอาหารทะเล ดังนั้นการศึกษาดัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงมีโอกาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ด้านอาหารและเครื่องสำอาง ทั้งนี้มีรายงานว่าสารฟลาโวนอยด์มีกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากพืชมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และคณะผู้วิจัยได้เคยรายงานการค้นพบสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์ดังกล่าวมาแล้ว ดังนั้นหากทำการวิจัยศึกษาถึงคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จะเป็นการสร้างโอกาสในการพัฒนาองค์ความรู้และพัฒนานวัตกรรมใหม่

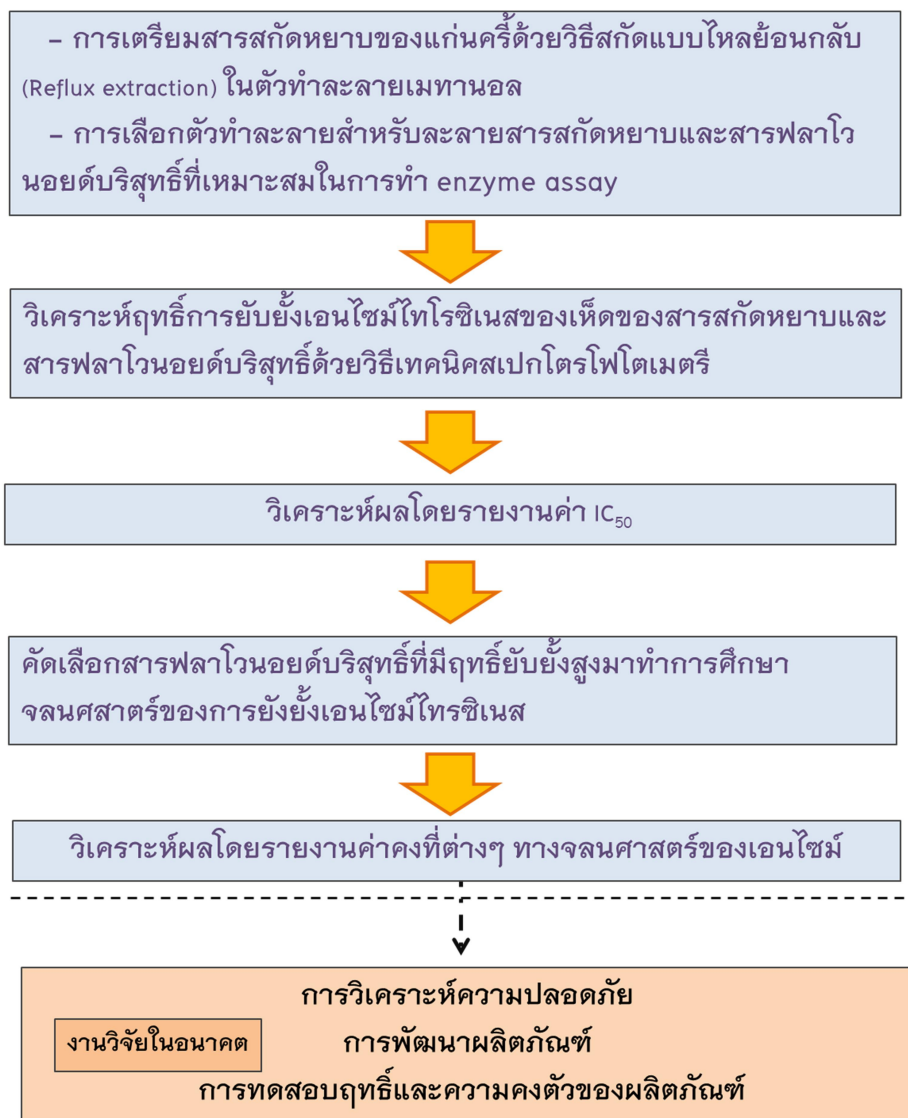
สารพฤษเคมีที่เป็นองค์ประกอบในแก่นศรี (*Dalbergia parviflora*) พบว่ามีสารประกอบฟลาโวนอยด์มากกว่า 60 ชนิด ซึ่งงานวิจัยต่างๆ ได้กล่าวถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์ไว้อย่างหลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Fernandez-Pancho et al., 2008; Prochazkova et al., 2011) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Kim 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) การส่งเสริมการวิจัยด้านสมุนไพรและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะเป็นการสร้างความพร้อมทางด้านการผลิตยารักษาโรค เครื่องสำอาง อาหาร รวมถึงยากำจัดโรคพืชและเป็นแผนหนึ่งของการพัฒนานวัตกรรมด้านสมุนไพรไทยให้มีประสิทธิภาพและได้รับการยอมรับมากขึ้น ในทางเศรษฐกิจจะนำไปสู่การลดการนำเข้าของสารเคมีหรือสารสังเคราะห์ รวมถึงการส่งเสริมให้มีการอนุรักษ์พืชพันธุ์สมุนไพร และประชาสัมพันธ์ให้ทราบถึงคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติในท้องถิ่น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาจนศาสตร์ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารฟลาโวนอยด์บางชนิดที่พบแนวโน้มการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และรายงานค่าทางจุลนศาสตร์ของเอนไซม์

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาวิจัยภายในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ดในหลอดทดลอง โดยการใช้เทคนิคการติดตามอัตราการเกิดปฏิกิริยาและอัตราการยับยั้งปฏิกิริยาดังวิธีทางสเปกโตรโฟโตเมตรี โดยยังไม่มีการพัฒนาสารสกัดให้เป็นผลิตภัณฑ์สำหรับการใช้เป็นยาหรืออาหาร และการวิจัยนี้ยังไม่มีทดลองในมนุษย์หรือสัตว์



ภาพที่ 1.1 แผนผังแสดงขอบเขตและขั้นตอนของงานวิจัย

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แก่นครีเป็นสมุนไพรที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทย โดยพบว่ามีการใช้เป็นยาบำรุงร่างกายและยาสำหรับสตรี และคณะผู้วิจัยได้ศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและพบว่ามีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระสูง จึงเห็นสมควรศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ให้รอบด้าน โครงการวิจัยนี้จึงได้พัฒนางานวิจัยเดิมให้มีการแตกแขนงการวิจัยออกไปในเชิงลึก โดยมุ่งประเด็นหลักไปที่การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อยืนยันผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับหลอดทดลองก่อนการประเมินแนวทางพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้การนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ จะทำให้สามารถพัฒนาขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นที่ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวข้องกับอาหาร สุขภาพ และความงาม 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) ที่อยู่ในเซลล์เมลานोไซต์ (melanocytes) โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารตั้งต้นทั้งแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) และแอล-โดปา (L-dopa) ร่วมกับออกซิเจนได้เป็นสารประกอบโดปาโครม (dopachrome) หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันโดยไม่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเมลานินชนิดต่างๆ ซึ่งจะถูกส่งต่อเพื่อสะสมยังเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) และทำให้เกิดลักษณะการแสดงออกของสีผิว สีผม สีขน และสีนัยน์ตานัยน์ตา

2) เอนไซม์กลุ่มนี้ยังพบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาล (enzymatic browning reaction) ของอาหารประเภทพืชผักผลไม้ โดยปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์นี้เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเกิดการชำรุด ฉีก ขาด เมื่อถูกกระแทก บด หั่น หรือสับทำให้เอนไซม์

3) ในสัตว์กลุ่มแมลงและครัสเตเชียนพบว่าเอนไซม์นี้จะถูกเรียกว่า polyphenoloxidase (PPO) กลุ่มฟีนอลออกซิเดสมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของแมลงมีหน้าที่ช่วยในกระบวนการป้องกันตัวและเจริญเติบโต

ครี (*Dalbergia parviflora* Roxb.) มีชื่อสามัญคือ Blackwood และชื่อท้องถิ่นได้แก่ กระซิก ชิก สรี และ สักชี เป็นต้น จัดอยู่ในวงศ์ (family) *Fabaceae* วงศ์ย่อย (subfamily) *Faboideae* อาจมีการสับสนกับต้นสักชี (*Dalbergia candenatensis*) ซึ่งเป็นพรรณไม้ในวงศ์เดียวกัน งานวิจัยเกี่ยวกับสารพฤกษเคมี (phytochemical) จากแก่นครีพบว่ามียาสารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มากกว่า 60 ชนิด และพบว่าหลายชนิดมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Promden et al., 2014; Songsiang et al., 2009) นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์ยังมีรายงานว่ามียาสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Chen et al., 1996; Croft, 1998; Rice-Evans et al., 1996) คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษากลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากแก่นครีโดยวิธี DPPH วิธี ORAC และวิธี xanthine/xanthine oxidase ซึ่งพบว่ามียาสารหลายชนิดที่แสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ อีกทั้งยังได้รายงานถึงความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Promden et al., 2014) สารฟลาโวนอยด์จากแก่นครีจึงเป็นเป้าหมายที่จะนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนายา ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องสำอาง

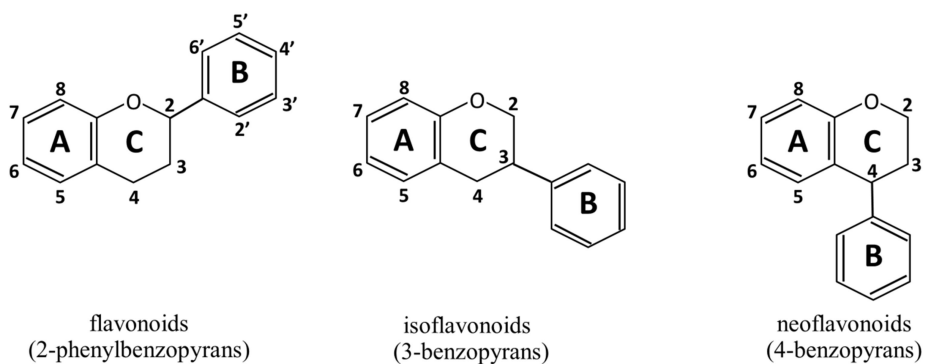
ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids)

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

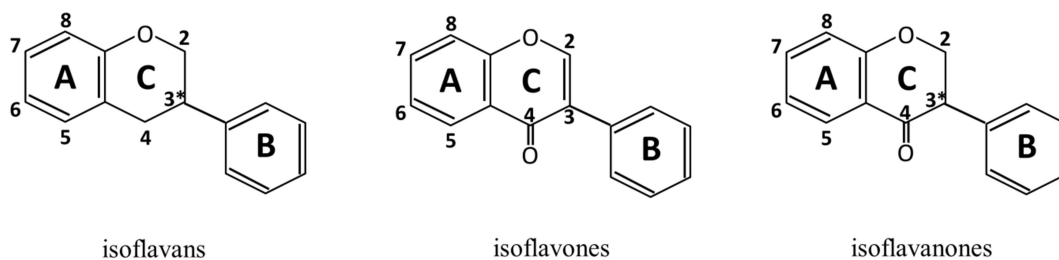
- 1) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) หรือ ไบโอฟลาโวนอยด์ (bioflavonoid)
- 2) ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) เกิดจากโครงสร้างของ 3-phenylchromen-4-one
- 3) เนโอฟลาโวนอยด์ (neoflavonoid) เกิดจากโครงสร้างของ 4-phenylcoumarine

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

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



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



* stereocenter

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

ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์

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* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจีนที่ใช้รักษาโรคเยื่อหุ้มปอดอักเสบและแผลติดเชื้อในช่องปากพบว่ามีสารฟลาโวน baicalein เป็นสารออกฤทธิ์หลัก (Tsao et al., 1982)

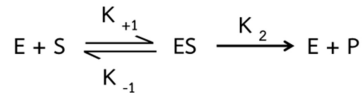
มีการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารพฤกษเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้แก่ Glabrene และ Isoliquiritigenin ในรากชะเอม (*Glycyrrhiza glabra* L.) (Nery et al., 2003) Norartocarpetin จากเปลือกและรากของพืชตระกูลหม่อน (*Morus ihou*) (Jeong et al., 2009; Ryu et al., 2008) Taxifolin จากต้นอ่อนของพืชจำพวกผักแว่น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

จลนศาสตร์ของของเอนไซม์

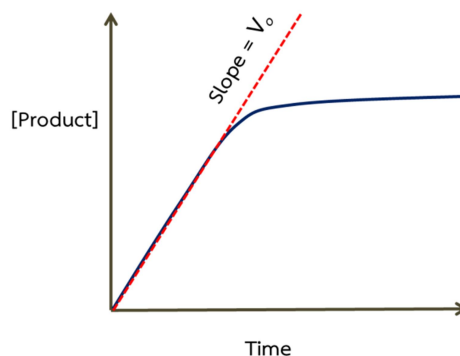
ในปี ค.ศ. 1913 วิคเตอร์ เฮนรี (Victor Henri, 1872 – 1940) ลีโอนอร์ มิเคลิส (Leonor Michaelis) และ มัด เมนเทน (Maud Menten) ได้เสนอทฤษฎีเอนไซม์จลนศาสตร์ ซึ่งยังคงใช้กันอยู่อย่างแพร่หลายในทุกวันนี้ ซึ่งรู้จักกันในชื่อที่เรียกว่าจลนศาสตร์ของมิเคลิส-เมนเทน (Michaelis-Menten kinetics) ซึ่งหมายถึงการศึกษากฎกิริยาเคมีที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ซึ่งมีการวัดความเร็วการศึกษาปัจจัยบางอย่างที่มีผลกระทบต่อความเร็วการอธิบายกลไกการเร่งปฏิกิริยาและกลไกยับยั้งเอนไซม์

ความเร็วของปฏิกิริยา (velocity)

เมื่อพิจารณาสมการปฏิกิริยาที่มีตัวเร่งโดยที่มีซับสเตรตเพียงตัวเดียวดังนี้



ปฏิกิริยาขั้นแรกเป็นปฏิกิริยาที่สามารถผันกลับได้โดยที่โมเลกุลเชิงซ้อนของเอนไซม์และซับสเตรต (ES) จับกันด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโคเวเลนต์ จากนั้นจึงผันกลับเป็นเอนไซม์ (E) และซับสเตรต (S) ได้อย่างรวดเร็ว สำหรับปฏิกิริยาในขั้นที่สองมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโมเลกุลเกิดขึ้นในโมเลกุลเชิงซ้อน ES ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ (P) ซึ่งจะแยกตัวออกมาจากเอนไซม์ในที่สุด และเอนไซม์ยังคงสามารถกลับมาจับกับซับสเตรตตัวใหม่ได้ พร้อมจะเร่งปฏิกิริยาได้อีก ค่า k_{+1} , k_{-1} และ k_2 คือ ค่าคงที่ของความเร็ว (rate constants) ของปฏิกิริยา ในการวัดความเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์จะพบว่าในช่วงแรกของปฏิกิริยาความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับเวลา แต่หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มของผลิตภัณฑ์จะลดลงและอาจหยุดลง (ภาพที่ 2.3) ด้วยเหตุนี้ในการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์จึงต้องวัดความเร็วของปฏิกิริยาในระหว่างที่กราฟของผลิตภัณฑ์และเวลายังเป็นเส้นตรงอยู่ ซึ่งความชันของกราฟในระยะนี้หมายถึงความเร็วเริ่มต้น (initial velocity, V_0) (สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพนิชยกิจ. 2553 : 286)



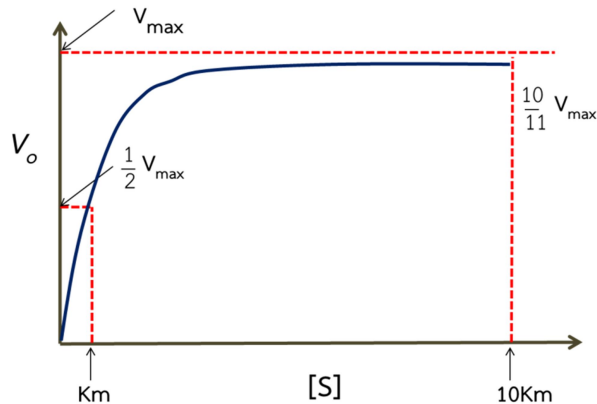
ภาพที่ 2.3 กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ (progress curve) แสดงการเพิ่มขึ้นของผลิตภัณฑ์ [Product] กับ เวลา จะพบว่าในระยะต้นกราฟยังคงเป็นเส้นตรงและความชันของกราฟจะหมายถึงค่าความเร็วเริ่มต้น (V_0)

สมการของไมเคิลิส-เมนเทน (Michaelis-Menten equation)

เมื่อวาดกราฟระหว่างความเร็วเริ่มต้นกับความเข้มข้นของซับสเตรตจะได้กราฟลักษณะเป็นไฮเพอร์โบลา (ภาพที่ 2.4) เป็นที่สังเกตว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตในระยะเริ่มต้นความเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตระดับหนึ่งจะได้ความเร็วสูงสุด ($V_{\max}$) และหากเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรตต่อไปอีกความเร็วของปฏิกิริยาจะคงที่ไม่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก

1. ที่ความเข้มข้นของซับสเตรตมีค่าต่ำ โมเลกุลเอนไซม์ยังคงมีบริเวณว่างที่ว่างอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตจะมีผลทำให้ความเร็วเพิ่มขึ้นได้

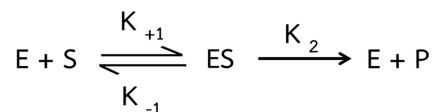
2. ที่ความเข้มข้นของซับสเตรตมีค่าสูงมาก ความเร็วของปฏิกิริยาจะไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของซับสเตรต เนื่องจากเอนไซม์ไม่มีบริเวณว่างที่เหลือว่าง และมีซับสเตรตอิสระเหลืออยู่อีกมาก แม้ว่าจะเพิ่มซับสเตรตเข้าไปอีกก็ไม่มีที่ให้เข้าจับบนเอนไซม์ อัตราเร็วก็จึงเกือบไม่เพิ่มขึ้นให้สังเกตได้



ภาพที่ 2.4 กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์ (Michaelis-Menten saturation curve) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (v_o) กับความเข้มข้นของซับสเตรต $[S]$

สามารถพิจารณาความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับจลนศาสตร์ของเอนไซม์ได้ดังนี้

จากสมการ



จะได้ว่า ความเร็วเริ่มต้น v_o มีค่าดังนี้

$$\begin{aligned} v_o &= \frac{d[P]}{dt} \\ &= k_2[ES] \dots\dots\dots (1) \end{aligned}$$

อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถวัดการเกิดขึ้นของ [ES] ได้โดยตรง แต่ทราบว่าความเร็วสูงสุด (maximum velocity, V_{max}) จะเกิดขึ้นเมื่อเอนไซม์ทั้งหมดอยู่ในรูป enzyme-substrate complex, [ES] ดังนั้นความเข้มข้นรวมของเอนไซม์ $[E_{total}]$ จึงเท่ากับ $[E] + [ES]$ และสามารถเขียนสมการได้เป็น

$$\begin{aligned} V_{max} &= k_2[E_{total}] \\ &= k_2([E] + [ES]) \dots\dots\dots (2) \end{aligned}$$

นำสมการ (1) ตั้งแล้วหารด้วยสมการ (2) จะได้

$$\frac{v_o}{V_{max}} = \frac{[ES]}{[E] + [ES]}$$

เมื่อ ค่าคงที่การแตกตัว (dissociation constant, K_s) มีค่า

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

หรือ

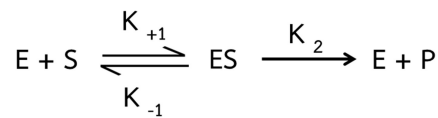
$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s}$$

แทนค่า [ES] ลงใน สมการ (2) จะได้

$$v_o = \frac{V_{max} [S]}{K_s + [S]} \dots\dots\dots (3)$$

ซึ่งสมการ (3) คือ สมการของมิเคลิส-เมนเทน

ในปี ค.ศ. 1925 จอร์จ เอ็ดเวิร์ด บริกส์ (George Edward Briggs) และ จอห์น เบอร์ดอน ฮาลเดน (John Burdon Sanderson Haldane) ได้เสนอแนวคิดสภาวะคงที่ (steady state concept) ของการเกิด enzyme-substrate complex [ES] โดยกล่าวว่าขณะที่มีการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ ความเข้มข้นของ [ES] จะคงที่เสมอ เนื่องจากการจับกันของเอนไซม์และซับสเตรตเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและผันกลับได้ จากนั้น ES จะสลายตัวได้เป็นผลิตภัณฑ์ (P) และเอนไซม์อิสระ (E) ซึ่งปฏิกิริยาขั้นตอนที่สองนี้จะช้ากว่ามาก จึงเป็นขั้นกำหนดความเร็วของปฏิกิริยา (rate-limiting step)



จากสมการข้างต้นจะเห็นว่าปริมาณของ ES จะขึ้นกับปริมาณของเอนไซม์และซับสเตรต ดังนั้นหากมีปริมาณซับสเตรตมากเกินไป ภายหลังจากที่ ES กลายเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว เอนไซม์อิสระจะจับกับซับสเตรตตัวใหม่ ได้เป็น ES จึงทำให้ ES มีค่าคงที่ สภาวะนี้เรียกว่าสภาวะคงที่ (steady state)

ดังนั้น ความเร็วของการสร้าง ES = $k_1 [E][S]$

ความเร็วของการสลาย ES = $k_{-1}[ES] + k_2[ES]$

ณ ที่สภาวะคงที่ ความเร็วของการสร้าง ES = ความเร็วของการสลาย ES

ดังนั้น $k_1 [E][S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$

หรือ

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \dots\dots\dots (4)$$

K_m ในสมการ (4) เรียกว่าค่าคงที่ของมิเคลิส เมนเทน (Michaelis-Menten constant) เป็นตัวแปรสำคัญในการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ มีหน่วยเป็นโมลาร์ (Molar)

จากสมการ (4) จะได้ว่า

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m}$$

แทนค่า [ES] ลงใน สมการ (2) จะได้

$$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \dots\dots\dots (5)$$

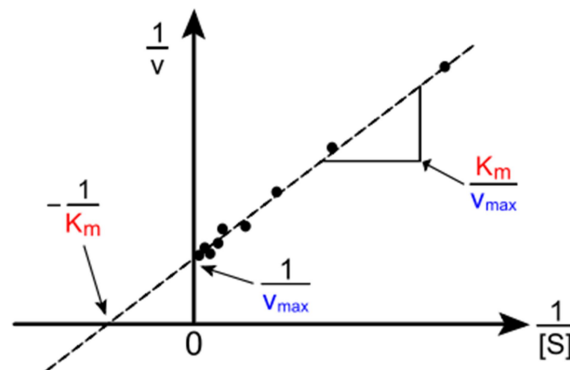
เรียกสมการ (5) ว่า Briggs-Haldane equation ซึ่งคล้ายกับสมการ (3) แต่ปัจจุบันสมการทั้งสอง มักถูกเรียกรวมไปว่าเป็น สมการมิเคลิส-เมนเทน (Michaelis-Menten equation)

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง ความเร็ว v_o กับ $[S]$ จะได้กราฟดังรูปที่ 2.4

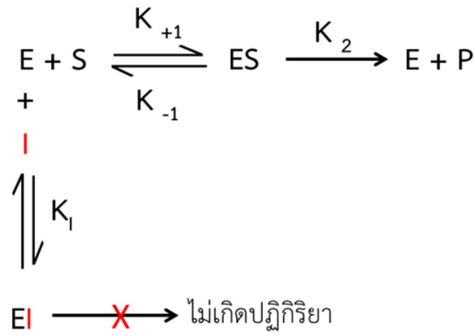
เพื่อให้การหาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ สะดวกยิ่งขึ้น ฮานส์ ไลน์วีเวอร์ (Hans Lineweaver) และดีน เบริก (Dean Burk) ได้แปลงสมการมิเคลิส-เมนเทน (สมการ 5) ให้เป็นส่วนกลับ ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \frac{1}{v} &= \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} \\ \frac{1}{v} &= \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]} \\ \frac{1}{v} &= \frac{K_m}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}} \dots\dots\dots (6) \end{aligned}$$

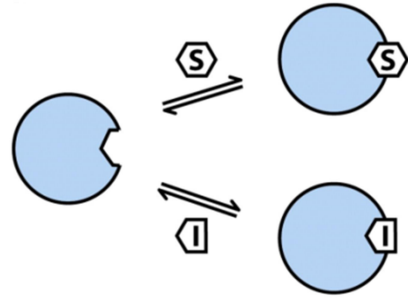
สมการ (6) เรียกว่า สมการไลน์วีเวอร์เบริก (Lineweaver-Burk equation) และเมื่อเขียนกราฟระหว่าง $1/v_o$ เป็นแกน Y และ $1/[S]$ เป็นแกน X จะได้กราฟเส้นตรงดังภาพที่ 2.5 เรียกว่า กราฟไลน์วีเวอร์เบริก (Lineweaver-Burk plot) ซึ่งจะช่วยให้สามารถหาค่า K_m และ $V_{\max}$ เป็นไปได้อย่างถูกต้องแม่นยำกว่าการใช้กราฟตามภาพที่ 2.4



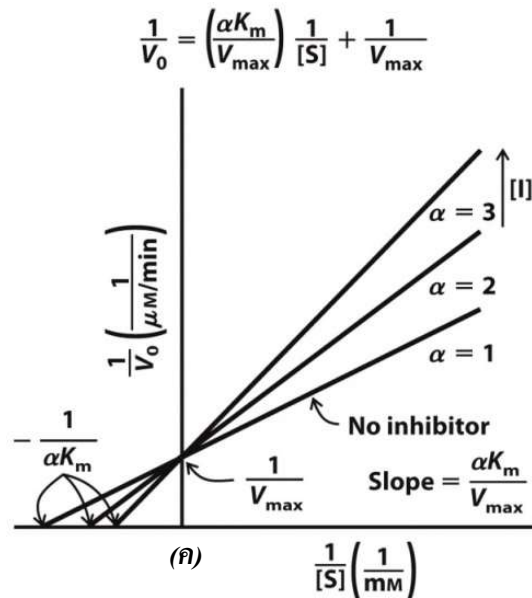
ภาพที่ 2.5 Double reciprocal plot ระหว่าง $1/v_o$ (แกน Y) และ $1/[S]$ (แกน X) ตามสมการไลน์วีเวอร์เบริก (Lineweaver-Burk equation) จะได้จุดตัดแกน Y เป็น $1/V_{\max}$, จุดตัดแกน X เป็น $-1/K_m$ และความชันคือ $K_m/V_{\max}$



(ก)



(ข)

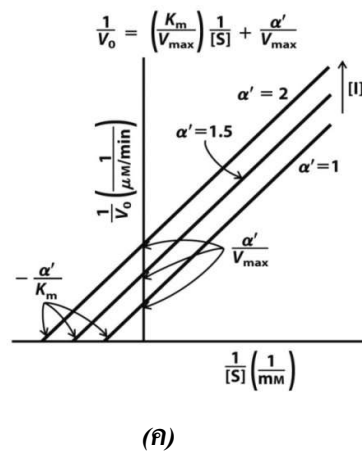
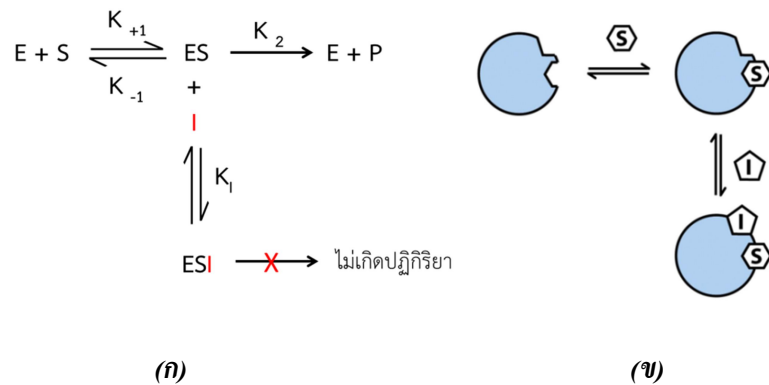


(ค)

ภาพที่ 2.7 (ก) สมการรูปแบบของการยับยั้งแบบแข่งขัน (ข) ภาพจำลองการการยับยั้งแบบแข่งขัน
 (ค) ผลของตัวยับยั้งแบบแข่งขันแสดงด้วยกราฟของ Lineweaver-Burk เมื่อแปรค่าความเข้มข้นของ
 ตัวยับยั้งจากที่ไม่มีตัวยับยั้ง ($\alpha = 1$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น $\alpha = 2, 3 \dots$ ผลลัพธ์ทาง
 จลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่มีตัวยับยั้งแบบแข่งขันคือ ค่า K_m เพิ่มขึ้น ในขณะที่ $V_{\max}$ คงที่

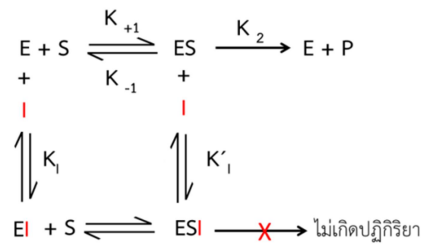
ที่มาของภาพ : (Cox และ Nelson. 2008 : 201-202)

2. การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ Uncompetitive ตัวยับยั้งชนิดนี้จะจับเฉพาะสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์กับซับสเตรต (ES) อย่างแบบผันกลับได้เกิดเป็น ESI ซึ่งไม่สามารถเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ได้ ตัวยับยั้งจะไม่สามารถจับกับเอนไซม์อิสระได้ การจับของซับสเตรตกับเอนไซม์อาจทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนโครงรูปไปจนทำให้ตัวยับยั้งจับด้วยได้ ตัวยับยั้งชนิดนี้จะไม่แข่งขันกับซับสเตรตในการเข้าจับกับบริเวณเร่ง ดังนั้นจึงไม่สามารถแก้ไขผลการยับยั้งที่เกิดขึ้นโดยการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรต รูปแบบของการยับยั้งเขียนได้ดังนี้

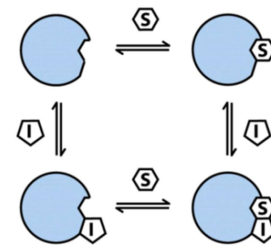


ภาพที่ 2.8 (ก) สมการรูปแบบของการยับยั้งแบบ Uncompetitive (ข) ภาพจำลองการยับยั้งแบบ Uncompetitive (ค) ผลของตัวยับยั้งแบบ Uncompetitive แสดงด้วยกราฟของ Lineweaver-Burk เมื่อแปรค่าความเข้มข้นของตัวยับยั้งจากที่ไม่มีตัวยับยั้ง ($\alpha' = 1$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น $\alpha' = 1.5, 2 \dots$ ผลลัพธ์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่มีตัวยับยั้งแบบ Uncompetitive คือ ทั้งค่า K_m และ V_{max} ลดลง ที่มาของภาพ : (Cox และ Nelson. 2008 : 201-202)

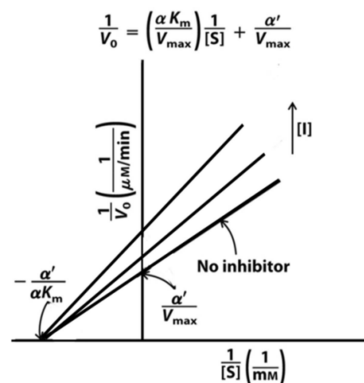
3. การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ Noncompetitive เป็นการยับยั้งโดยตัว ยับยั้งเข้าจับบริเวณที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง ซึ่งสามารถเข้าจับได้ทั้งกับ E หรือ ES ตัวยับยั้งจะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้หมู่เร่ง (catalytic group) ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติหรือไม่อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา จึงเปลี่ยนข้อเสตเรตให้เป็นผลิตภัณฑ์ได้น้อยลงหรือไม่ได้เลย ถ้าการจับกันของข้อเสตเรตหรือตัวยับยั้งเป็นอิสระต่อกัน ($K_i = K'_i$) จะเรียกว่าการยับยั้งแบบ pure noncompetitive inhibition แต่ถ้การเข้าจับของข้อเสตเรตมีผลต่อการเข้าจับของตัวยับยั้ง หรือ การเข้าจับของตัวยับยั้งมีผลต่อการเข้าจับของข้อเสตเรต ($K_i \neq K'_i$) จะทำให้มีลักษณะคล้ายการแข่งกัน จึงเรียกว่าการยับยั้งแบบนี้ว่า การยับยั้งแบบผสม (mixed inhibition)



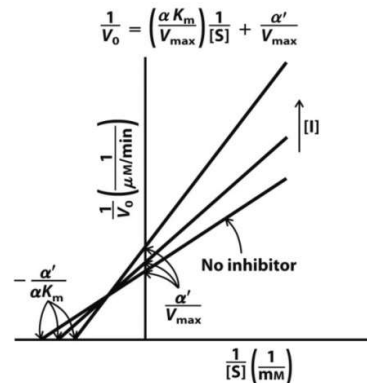
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 2.9 (ก) สมการรูปแบบของการยับยั้งแบบ Noncompetitive (ข) ภาพจำลองการยับยั้งแบบ Noncompetitive (ค) ผลของตัวยับยั้งแบบ pure noncompetitive แสดงด้วยกราฟของ Lineweaver-Burk เมื่อแปรค่าความเข้มข้นของตัวยับยั้ง ผลลัพธ์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ที่มีตัวยับยั้งแบบ pure noncompetitive คือ ทั้งค่า K_m คงที่ และ V_{max} ลดลง และ (ง) ผลของตัวยับยั้งแบบผสม (mixed) คือ ค่า K_m เพิ่มขึ้น ในขณะที่ V_{max} ลดลง ที่มาของภาพ : (Cox และ Nelson. 2008 : 201-202)

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 μ L สารสกัดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 20 μ L สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 100 Unit/mL จำนวน 20 μ L จากนั้นนำไปป่มที่

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 475 นาโนเมตร ที่เวลา 10 นาที และ 0 ของการทดลองกลุ่มที่ใช้สารสกัด (Blank)

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

การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารฟลาโวนอยด์จากแก่นศรี

สารฟลาโวนอยด์บริสุทธิ์ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงจะถูกคัดเลือกมาศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์โดยใช้หลักของไลน์วีเวอร์ และเบิร์ก (Lineweaver and Burk double-reciprocal plot)(Lineweaver and Burk, 1934) ซึ่งจะทำการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (V_0) ที่มีและไม่มีตัวยับยั้ง โดยแปรผันความเข้มข้นยับยั้ง L-DOPA ที่ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.0625 mM โดยทำการทดลองในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์ฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ในงานหลุมไม้โคเฟลทแต่จะวัดอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาซึ่งจะต้องอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตรที่ทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 10 นาที และทำการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism software (version 4.00) เพื่อรายงานค่าทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์และวิเคราะห์ชนิดของกลไกการยับยั้ง

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารฟลาโวนอยด์จากแก่นศรี

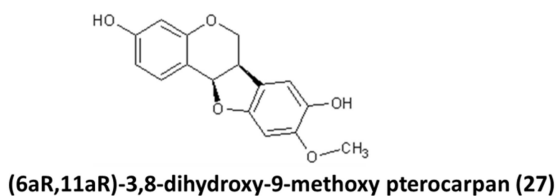
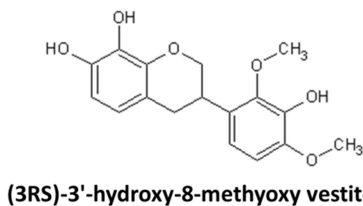
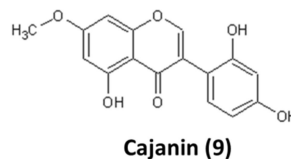
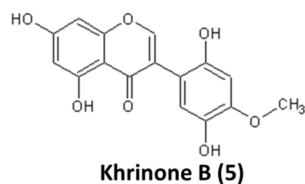
สารสกัดบริสุทธิ์จำนวน 4 ชนิดได้แก่ Khirone B (5) Cajanin (9) (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) และ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpin (27) (ภาพที่ 4.1) ที่พบว่ามียับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง โดยมีค่า IC_{50} ต่ำกว่า $100 \mu M$ ได้ถูกนำมาศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้ความสัมพันธ์จากสมการของ Michaelis-Menten และการวาดกราฟแบบ Lineweaver-Burk ซึ่งแสดงถึงชนิดของการยับยั้ง (type of inhibition) ของสารประกอบ 5, 9, 21 และ 27 ทั้งนี้ในสภาวะที่ไม่มีตัวยับยั้งเอนไซม์ค่าอัตราเร็วสูงสุด (V_{max}) ของการเกิด dopachrome โดยเอนไซม์นี้คือ $0.0265 \Delta A_{475}/min$ โดยคำนวณจากกราฟของ Lineweaver-Burk ที่พิจารณาจุดตัดแกน Y และค่า K_m ต่อ L-DOPA คือ $0.26 \pm 0.06 \mu M$ โดยคำนวณจากกราฟของ Lineweaver-Burk ที่พิจารณาจุดตัดแกน X แสดงดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.2

พฤติกรรมทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ Khirone B (5) ระบุว่าเป็นการยับยั้งชนิด uncompetitive inhibitor ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนสต่างๆ (ตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.3) โดยมีค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) เป็น $75.1 \pm 3.2 \mu M$ ซึ่งลักษณะของการยับยั้งชนิด uncompetitive inhibitor ตัวยับยั้งจะเข้าจับกับ enzyme-substrate complex และลดอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้ enzyme-inhibitor-substrate complex (EIS) ยังคงเกิดปฏิกิริยาผันกลับได้และยังสามารถเกิดผลิตภัณฑ์ได้จึงเป็นเหตุให้ค่า K_m และ V_{max} ลดลง

พฤติกรรมทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ Cajanin (9) เผยว่าเป็นการยับยั้งชนิด non-competitive inhibitor ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส (ตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.4) ซึ่งลักษณะของการยับยั้งชนิด non-competitive inhibitor ตัวยับยั้งและซับสเตรตจะสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ได้ตลอดเวลาโดยมีตำแหน่งจับคนละตำแหน่งกัน 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 $65.6 \pm 4.1 \mu M$

พฤติกรรมทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ (3R)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) แสดงให้เห็นว่าเป็นการยับยั้งชนิด mixed inhibition (ตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.5) มีค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) เป็น $56.9 \pm 16.8 \mu\text{M}$ การยับยั้งแบบผสมนี้ตัวยับยั้งจะสามารถจับกับเอนไซม์ที่ตำแหน่งเดียวกับซับสเตรต ค่า K_m อาจคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงก็ได้แต่ค่า $V_{\max}$ ที่สังเกตได้จะลดลง

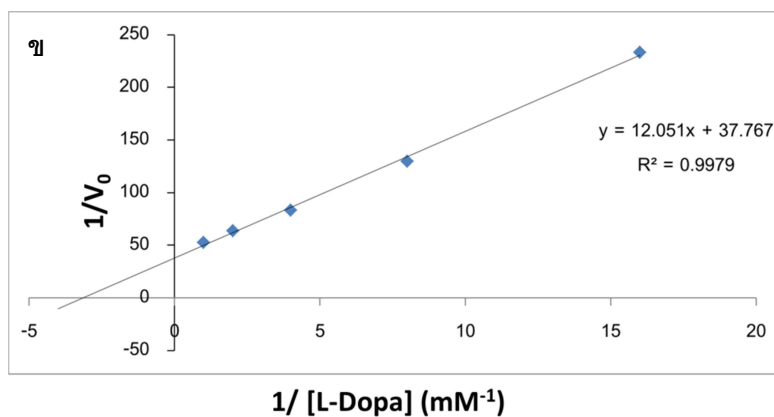
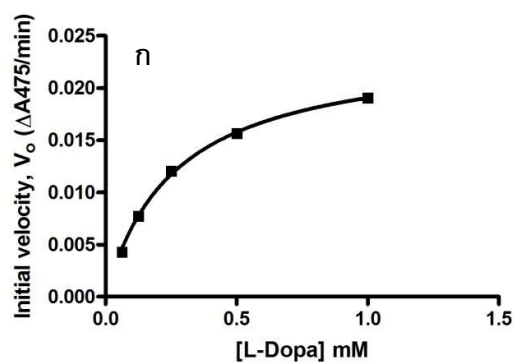
พฤติกรรมทางจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) พบว่าเป็นการยับยั้งชนิด competitive inhibition (ตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.6) มีค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) เป็น $6.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$ กลไกการยับยั้งชนิด competitive inhibition ตัวยับยั้งจะรบกวนการเข้าจับของซับสเตรตบนตำแหน่งจับของเอนไซม์ เป็นเหตุให้ค่า K_m เพิ่มขึ้นโดยไม่ผลกระทบบต่อค่า $V_{\max}$



ภาพที่ 4.1 โครงสร้างของสารฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดที่นำมาศึกษาจลนศาสตร์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด

ตารางที่ 4.1 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) โดยไม่มีตัวยับยั้ง

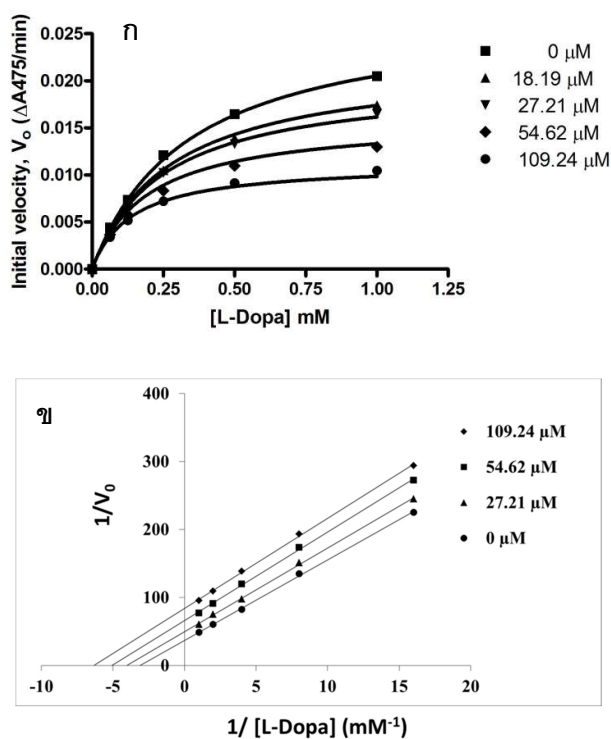
Substrate (L-Dopa) (mM)	ความเร็วเริ่มต้น (V_o) ($\Delta A_{475} / \text{min}$)
0.0625	0.00429
0.125	0.00771
0.25	0.01203
0.5	0.01564
1	0.01903



ภาพที่ 4.2 (ก) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) ที่เร่งด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนส แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_o) กับความเข้มข้นของซับสเตรต [L-Dopa] โดยไม่มีการเติมตัวยับยั้ง (ข) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) จุดตัดแกน Y คือ $1/V_{\max}$ จุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ และความชันคือ $K_m/V_{\max}$

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง Khirone B (5)

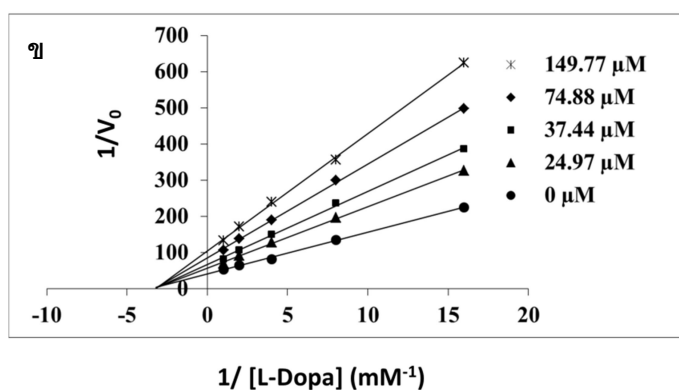
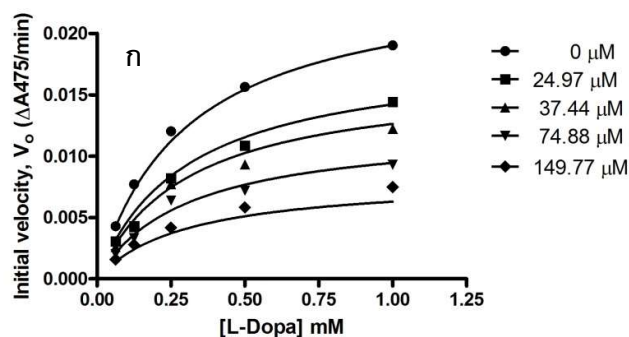
Substrate (L-Dopa) (mM)	ความเร็วเริ่มต้น (V_o) ($\Delta A_{475} / \text{min}$)				
	ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง Khirone B (5)				
	0 μM	18.196 μM	27.21 μM	54.62 μM	109.24 μM
0.0625	0.004440	0.004340001	0.004079999	0.003670	0.003400
0.1250	0.007400	0.007390	0.006610001	0.005760	0.005170
0.2500	0.012130	0.010490	0.010210	0.008339998	0.007220
0.5000	0.01648536	0.013890	0.013300	0.010990	0.009150
1.0000	0.02051593	0.017420	0.016490	0.012980	0.010470



ภาพที่ 4.3 (ก) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) ที่เร่งด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนส แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_o) กับความเข้มข้นของซับสเตรต [L-Dopa] ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของตัวยับยั้ง Khirone B (5) (ข) Double reciprocal plot ตามสมการไลนวีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) จุดตัดแกน Y คือ $1/V_{\text{max}}$ จุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ และความชันคือ K_m/V_{max}

ตารางที่ 4.3 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง Cajanin (9)

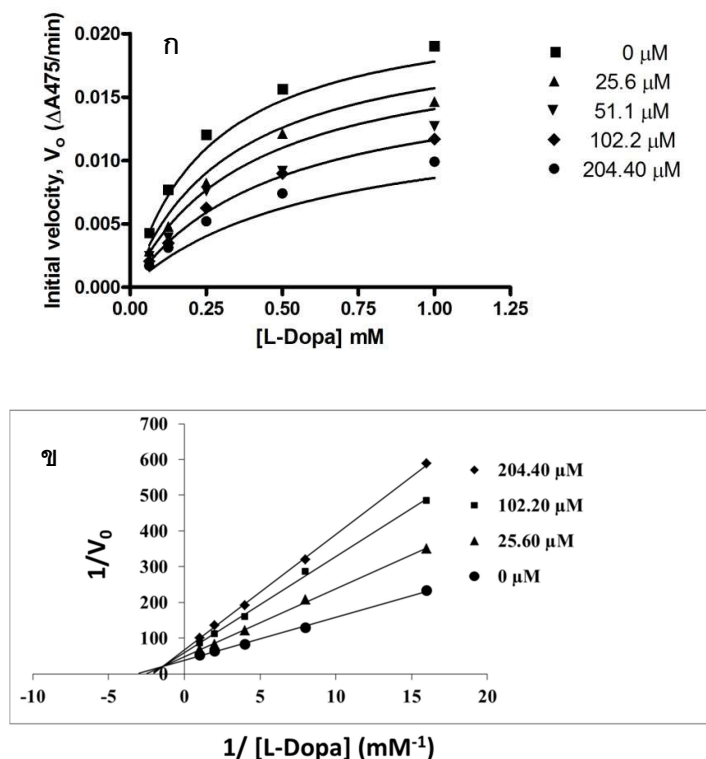
Substrate (L-Dopa) (mM)	ความเร็วเริ่มต้น (V_o) ($\Delta A_{475} / \text{min}$)				
	ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง Cajanin (9)				
	0 μM	24.97 μM	37.44 μM	74.88 μM	149.77 μM
0.0625	0.00429	0.00306	0.00259	0.00201	0.0016
0.1250	0.00771	0.00430	0.00423	0.00333	0.0028
0.2500	0.01203	0.00820	0.00772	0.00640	0.00417
0.5000	0.01564	0.01085	0.00932	0.00719	0.00583
1.0000	0.01903	0.01441	0.01223	0.00930	0.00748



ภาพที่ 4.4 (ก) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) ที่เร่งด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนส แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_o) กับความเข้มข้นของซับสเตรต [L-Dopa] ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของตัวยับยั้ง Cajanin (9) (ข) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) จุดตัดแกน Y คือ $1/V_{\max}$ จุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ และความชันคือ $K_m/V_{\max}$

ตารางที่ 4.4 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21)

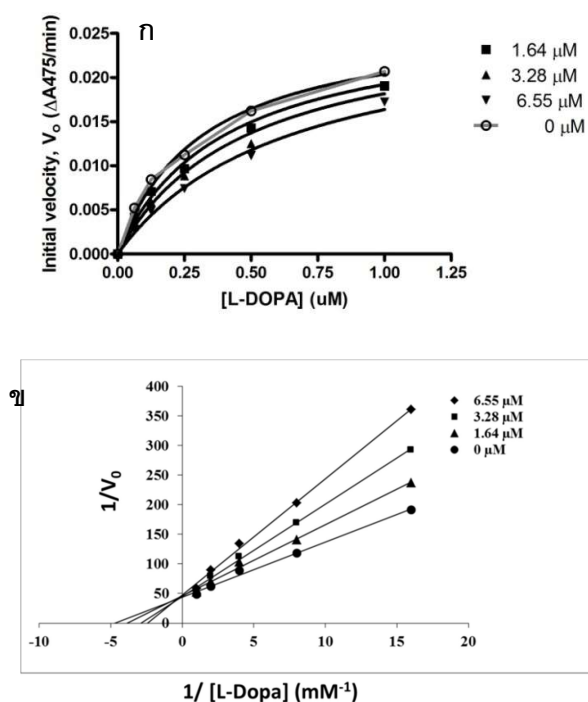
Substrate (L-Dopa) (mM)	ความเร็วเริ่มต้น (V_o) (ΔA_{475} / min)				
	ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21)				
	0 μM	25.26 μM	51.11 μM	102.20 μM	204.40 μM
0.0625	0.00429	0.002860	0.002460	0.002060	0.0017
0.1250	0.00771	0.004800	0.003910	0.003489	0.00312
0.2500	0.01203	0.008240	0.007570	0.006260	0.00521
0.5000	0.01564	0.012130	0.009160	0.008970	0.00741
1.0000	0.01903	0.014641	0.012690	0.011690	0.0099



ภาพที่ 4.5 (ก) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) ที่เร่งด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนส แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_o) กับความเข้มข้นของซับสเตรต [L-Dopa] ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) (ข) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) จุดตัดแกน Y คือ $1/V_{\text{max}}$ จุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ และความชันคือ K_m/V_{max}

ตารางที่ 4.5 แสดงอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีการแปรผันความเข้มข้นของสารตั้งต้น (L-Dopa) และตัวยับยั้ง (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27)

Substrate (L-Dopa) (mM)	ความเร็วเริ่มต้น (V_o) ($\Delta A_{475} / \text{min}$)			
	ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27)			
	0 μM	1.64 μM	3.28 μM	6.55 μM
0.0625	0.00521823	0.004218	0.003412	0.002774
0.1250	0.00844834	0.007110	0.005890	0.004934
0.2500	0.01124181	0.009700	0.008860	0.007430
0.5000	0.01622181	0.014300	0.012510	0.011170
1.0000	0.02068944	0.019100	0.019035	0.017230



ภาพที่ 4.6 (ก) กราฟแสดงจลนศาสตร์ของปฏิกิริยา (Michaelis-Menten saturation curve) ที่เร่งด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนส แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (V_o) กับความเข้มข้นของซับสเตรต [L-Dopa] ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของตัวยับยั้ง (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) (ข) Double reciprocal plot ตามสมการไลน์วีเวอร์เบิร์ก (Lineweaver-Burk equation) จุดตัดแกน Y คือ $1/V_{\max}$ จุดตัดแกน X คือ $-1/K_m$ และความชันคือ $K_m/V_{\max}$

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากตัวอย่างสารสกัดพลาโวนอยด์บริสุทธิ์จำนวน 11 ชนิดที่สกัดจากแก่นศรี 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 $7.5 \pm 1.0 \mu M$ เมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) ที่มีค่า K_i เป็น $6.4 \pm 0.9 \mu M$ แสดงให้เห็นว่าสารประกอบ 27 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเทียบเท่ากับกรดโคจิก ในขณะที่สารประกอบออกซีเรสเวอราทรอลได้เคยมีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ว่าให้ผลการยับยั้งเป็นชนิด non-competitive ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส และมีค่า K_i เป็น $0.9 \mu M$ (Alam et al., 2009)

การศึกษาตัวยับยั้งของเอนไซม์ ทำให้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีต่าง ๆ ต่อระบบชีวภาพและยังเป็นเครื่องมือที่ดีในการศึกษากลไกการทำงานของเอนไซม์ในรายละเอียด การยับยั้งของสารพลาโวนอยด์แต่ละชนิดที่สกัดแยกได้จากแก่นศรีพบว่าการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive) และการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive และ uncompetitive) การยับยั้งแบบแข่งขันตัวยับยั้งจะเข้าจับบนโมเลกุลของเอนไซม์บริเวณเดียวกับสารตั้งต้น ในขณะที่การยับยั้งแบบไม่แข่งขันตัวยับยั้งจะเข้าจับกับคนละบริเวณกับสารตั้งต้น ซึ่งการยับยั้งแบบไม่แข่งขันมักจะเป็นความสามารถในการเปลี่ยนโครงรูปของเอนไซม์หรือกระทบต่อจลนศาสตร์ของเอนไซม์

การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ที่พบในกรณีของ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan (27) อาจสันนิษฐานได้ว่าการยับยั้งลักษณะนี้ด้วยยับยั้งมีหมู่ฟังก์ชันบางตำแหน่งคล้ายกับซับสเตรต (S) จึงสามารถแย่งเข้าจับกับบริเวณเร่ง (active site) บนเอนไซม์ได้ การยับยั้งแบบแข่งขันนี้สามารถผันกลับได้ (reversible) เพราะว่าตัวยับยั้งและสารตั้งต้นพยายามแข่งขันแย่งกันเข้าจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ หากตัวใดมีความเข้มข้นมากกว่า ก็จะเข้าจับได้ดีกว่า และการยับยั้งแบบนี้เป็นการยับยั้งแบบย้อนกลับได้ โดยการกำจัดตัวยับยั้งออกไปจากสารละลาย หรือโดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้น สารตั้งต้นที่มีจำนวนความเข้มข้นสูงกว่าจะเข้าแย่งจับที่บริเวณเร่ง ทำให้ตัวยับยั้งหลุดออกไปจากบริเวณเร่ง

การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบ pure noncompetitive inhibition ที่พบในกรณีของ Cajanin (9) เป็นการยับยั้งโดยตัวยับยั้งเข้าจับที่ที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง โดยเข้าจับได้ทั้งกับสารเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น (ES complex) และเอนไซม์อิสระ (E) หรือกล่าวอีกอย่างหนึ่งว่าตัวยับยั้งชนิดนี้สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ได้ โดยไม่สนใจว่ามีสารตั้งต้นจับอยู่กับเอนไซม์หรือไม่ นอกจากนี้ตัวยับยั้งแบบนี้ไม่รบกวนการจับของสารตั้งต้นที่บริเวณเร่ง แต่จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ทำให้ catalytic group ของเอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ จึงเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ได้น้อยลงหรือเปลี่ยนไม่ได้เลย ในขณะที่ (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (21) สามารถเข้าจับได้กับทั้งเอนไซม์อิสระ (E) หรือ ES complex ได้เช่นเดียวกัน แต่เมื่อภายหลังจากที่ตัวยับยั้งเข้าจับแล้ว มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ทำให้ affinity ของเอนไซม์ต่อซับสเตรตเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจจะทำให้สารเชิงซ้อนเอนไซม์-ตัวยับยั้ง (EI complex) จับกับซับสเตรตได้มากขึ้นหรือลดลงจากเดิม ดังนั้นจึงได้เรียกตัวยับยั้งนี้ใหม่เป็น mixed type inhibitor

การยับยั้งแบบไม่แข่งขันแบบที่ uncompetitive inhibition ที่พบในกรณีของ Khirone B (5) เป็นการยับยั้งโดยตัวยับยั้งเข้าจับเฉพาะกับสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น (ES complex) แต่ไม่จับกับเอนไซม์อิสระ (E) ผลของการจับของตัวยับยั้งทำให้เอนไซม์เสียโครงรูปไป ทำให้ความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ลดลงหรือหมดไป อย่างไรก็ตาม เมื่อนำไปวิเคราะห์ตามสมการของไมเคิลิส-เมนเทน และเขียนกราฟตามสมการลายวิฟเวอร์เบอร์ก พบว่าทั้งค่าคงที่ของไมเคิลิส (K_m) และค่าความเร็วสูงสุด (V_{max}) กลับลดลง

บรรณานุกรม

- สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพนิชยกิจ. (2553). **ชีวโมเลกุล**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- 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.
- 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.
- Grotewold, E., 2006. *The Science of Flavonoids*. Springer, Ohio, USA.
- 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, 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.
- 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.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society* 56, 658-666.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

ภาคผนวก

ประวัตินักวิจัย

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

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3311100069820

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

หน่วยงานที่สังกัดและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก

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	วิทยาศาสตร์ดุริยางค์บัณฑิต (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 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 : ทู่นักวิจัยหลังปริญญากองทุนเอกรัชาดาภิเษกสมโภช บัณทิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. พ.ศ. 2557: ทู่นสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2557 โดยสำนักบริหารโครงการ
ส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
5. พ.ศ. 2558: ทู่นสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2558 โดยสำนักบริหารโครงการ
ส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
6. พ.ศ. 2559: ทู่นสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2559 โดยสำนักบริหารโครงการ
ส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

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

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3349900038624

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)

หน่วยงานที่สังกัด สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

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

สถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราช

ภัฏรำไพพรรณี 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 (วิทยาศาสตร์ศึกษา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
2546	ประกาศนียบัตรบัณฑิต สาขาวิชาชีพครู	มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2545	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) : การวิจัยทางการสอน
วิทยาศาสตร์การใช้สื่อออนไลน์สำหรับการสอนวิทยาศาสตร์ และการนิเทศน์ศึกษาฝึกประสบการณ์
วิชาชีพครู

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. สมสรว วังษ์อยู่น้อย

ดร. ปรีชาญ เดชศรี

แหล่งตีพิมพ์: วารสารศรีนครินทรวิโรฒวิจัยและพัฒนา (สาขามนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์)

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