รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2558

ผลของสารไอโซฟลาโวนอยด์จากแก่นครี้ต่อการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวชนิด B16/F10 เพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากภูมิปัญญาท้องถิ่น

Effect of Isoflavonoids from *Dalbergia parviflora* Heartwood extract on Melanogenesis in B16/F10 melanoma cells: To Developing a Cosmetic Products Based on the Local Wisdom

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น และคณะ

กันยายน 2558

รหัสโครงการ 2558A13962003
เลขที่สัญญา 37 /2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2558

ผลของสารไอโซฟลาโวนอยด์จากแก่นครี้ต่อการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวชนิด B16/F10 เพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากภูมิปัญญาท้องถิ่น

Effect of Isoflavonoids from *Dalbergia parviflora* Heartwood extract on Melanogenesis in B16/F10 melanoma cells: To Developing a Cosmetic Products Based on the Local Wisdom

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

อรวรรณ มนทกานติรัตน์

วิทวัส วิระยบัญชา

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัย
ในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างยิ่งในความอนุเคราะห์ของ รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย ดีเอกนามกูล หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และความร่วมมือของเครือข่ายนักวิจัยต่างประเทศ คือ Asst. Prof. Dr. Kaoru Umehara และ Professor Dr. Hiroshi Noguchi จาก School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka ประเทศญี่ปุ่น ที่ได้อำนวยความสะดวกในด้านห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ทันสมัย ตลอดจนได้รับคำแนะนำด้านเทคนิคและวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

บทคัดย่อ

สารสกัดหยาบและสารไอโซฟลาโวนอยด์บริสุทธิ์จำนวน 27 ชนิด ที่สกัดแยกได้จากแก่นของต้นครี้ (*Dalbergia parviflora*) ได้ถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวชนิด B16F10 murine melanoma cell line พบว่าสารไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานินจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ชนิดที่มีฤทธิ์การกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานิน (20 ชนิด) และชนิดที่มีฤทธิ์การยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน (7 ชนิด) ในขณะสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 2.5 µg/ml มีฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้สูงกว่าในสภาวะปกติ 3 เท่า ผลการวิจัยนี้ทำให้พบแนวโน้มความเป็นไปได้ในใช้สารสกัดจากแก่นครี้เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมให้ดกดำหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรการแพทย์ทางเลือกเพื่อบรรเทาโรคด่างขาว

คำสำคัญ : ไอโซฟลาโวนอยด์, แก่นครี้, เมลานิน

ABSTRACT

Crude extract and twenty seven flavonoids isolated from heartwood of *Dalbergia parviflora* were determined the biological activity involved in melanogenesis in B16F10 murine melanoma cell line. The results, based on the melanogenesis activities can be classified the isoflavonoids into 2 groups: melanogenesis-stimulating compounds (20 isoflavonoids) and melanogenesis inhibitors (7 isoflavonoids). While the crude extract at concentration of 2.5 μg/ml showed 3-fold higher melanogenesis than untreated control. These results suggest that the crude extract and isoflavonoids from *Dalbergia parviflora* have the potential to applied as an agent in hair cosmetics to reduce gray-hair and treatment of vitiligo.

Keywords : Isoflavonoid, *Dalbergia parviflora*, Melanin

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....*(i)*
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....*(ii)*
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....*(iii)*
สารบัญเรื่อง.....*(iv)*
สารบัญรูปภาพ.....*(v)*
สารบัญตาราง.....*(vi)*

บทที่ 1

บทนำ.....1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....2
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....2
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....3

บทที่ 2

ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....5
ครี้ หรือ สักขี *(Dalbergia parviflora)*.....5
ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids).....10
ไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids).....11
ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์.....12
ไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้.....13
เมลานินและสีผิว 15
ชีวสังเคราะห์ของเมลานิน 16

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย……..18

อุปกรณ์และสารเคมี……18

การวิเคราะห์ฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับระบบการสังเคราะห์เม็ดสีผิว……..……..…...19

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวและเซลล์ปกติจากผิวหนังของมนุษย์…..……..…….....19

การเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิว…….....19

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิว……..…….....20

การทดสอบผลของสารสกัดจากแก่นครี้ต่อการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินในเซลล์
มะเร็งผิวหนัง ……..…….....21

การทดสอบผลของสารสกัดจากแก่นครี้ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งผิวหนัง…….21

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย……..23

ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจาก *D. parviflora* ต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
ของเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิว……..……..23

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก *D. parviflora* ต่อการสังเคราะห์เมลานิน
และการมีชีวิตรอดในเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิว……..24

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย……..28

ผลผลิต ……...30

รายงานสรุปการเงิน…….....31

บรรณานุกรม…….....34

ประวัตินักวิจัย…….....38

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ภาพที่ 2.1 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของแก่นครี้ (วัตถุดิบแห้ง) และเมื่อบดละเอียดเป็นผง……6
ภาพที่ 2.2 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของใบและผล……...7
ภาพที่ 2.3 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของใบ…….....8
ภาพที่ 2.4 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของใบและผล ……..9
ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์……11
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์ 3 ชนิด……...12
ภาพที่ 2.7 แผนผังชีวสังเคราะห์ของเมลานิน .....……...16

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้ (*Dalbergia parviflora*).....14
ตารางที่ที่ 4.1 โครงสร้างเคมีของสารสกัดจากแก่นครี้ (*Dalbergia parviflora*) ที่ใช้ในการทดลองนี้ 26
ตารางที่ที่ 4.2 ฤทธิ์ทางยังยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวจากสารสกัดจากแก่นครี้ (*Dalbergia parviflora*) 27

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในวิถีภูมิปัญญาไทยได้มีการนำพืชสมุนไพรมาใช้เพื่อการบำบัดรักษาโรคมาช้านาน และปัจจุบันได้รับความนิยมและสนใจมากขึ้นจึงส่งผลให้การแพทย์แผนไทยมีบทบาทที่สำคัญมากขึ้น โดยที่การบริการทางสุขภาพแผนไทยนั้นเป็นระบบการดูแลสุขภาพของท้องถิ่นที่มีความผูกพันกับวิถีชีวิตของชาวบ้านสอดคล้องกับความเชื่อและวัฒนธรรมท้องถิ่นมาตั้งแต่โบราณ ดังนั้นในการรักษาในระบบแพทย์แผนไทยนี้จึงมีการนำเอาภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีการถ่ายทอดกันมาตั้งแต่บรรพบุรุษในเรื่องการใช้สมุนไพรต่าง ๆ เข้ามามีส่วนเกี่ยวข้องในการใช้รักษาโรคที่เกิดขึ้นกับคนในชุมชนมากขึ้นด้วยเช่นกัน การวิจัยทางวิทยาศาสตร์เพื่อเป็นการต่อยอดภูมิปัญญาและเพื่อพิสูจน์ยืนยันประสิทธิภาพของสมุนไพรเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งในยุคปัจจุบัน

ครี้หรือสักขีเป็นพืชสมุนไพรที่นิยมนำมาเป็นส่วนผสมของยาบำรุงของสตรี การศึกษาทางพฤกษเคมีของแก่นครี้พบว่ามีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มากกว่า 60 ชนิด ซึ่งสารฟลาโวนอยด์บางชนิดพบว่ามีการออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง (De-Eknamkul et al., 2011; Songsiang, Hahnvajanawong, & Yenjai, 2011; Songsiang et al., 2009; Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009) และนอกจากนี้จากการศึกษาวิจัยของคณะวิจัยพบว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (Ref) และได้มีการรายงานถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของสารไอโซฟลาโวนอยด์ ในการศึกษาเบื้องต้นคณะผู้วิจัยยังพบว่าสารสกัดจากแก่นครี้มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินซึ่งเป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีผิว ดังนั้น

แนวทางหนึ่งในการพัฒนางานวิจัยเดิมให้เกิดเป็นโครงการวิจัยที่ขยายผลต่อไป คณะผู้วิจัยจึงเห็นสมควรให้มีการศึกษาฤทธิ์ในการกระตุ้นหรือยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินจากสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากแก่นครี้อย่างละเอียด ทั้งนี้หากพบฤทธิ์การกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินในระดับที่สูงและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง จะสามารถต่อยอดงานวิจัยไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมให้มีสีดำหรือชะลอการหงอกของเส้นผมได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์จากภูมิปัญญาท้องถิ่นด้านสมุนไพรไทย รวมทั้งได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความน่าเชื่อถือตามหลักวิทยาศาสตร์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของเซลล์มะเร็งผิวหนังของสารสกัดไอโซฟลาโวนอยด์และสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากแก่นครี้

2. ศึกษาระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งผิวหนังของไอโซฟลาโวนอยด์และสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากแก่นครี้

3. เพื่อประเมินแนวโน้มในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมให้มีสีดำหรือการชะลอการหงอกของเส้นผม

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. การทดลองนี้ใช้สารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์กลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากแก่นครี้

2. ศึกษาในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สีผิวในหลอดทดลอง

3. ศึกษาในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยวิเคราะห์ผลกระทบต่อการสังเคราะห์เม็ดสีจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิว (cell based assay)

4. ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ยังไม่พัฒนาไปสู่การทดลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และยังไม่พัฒนาไปสู่การทดลองในมนุษย์ (clinical trials)

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โดยปกติพืชสมุนไพรไทยมีการนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านในการรักษาโรคต่างๆ ซึ่งมีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง ดังนั้นการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ในเบื้องต้นจะช่วยให้เกิดองค์ความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับสมุนไพรนั้นๆ (Chen, Chan, Ho, Fung, & Wang, 1996; Fernandez-Panchon, Villano, Troncoso, & Garcia-Parrilla, 2008; Sies, 1997; Silva et al., 2002) การนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ จะทำให้สามารถพัฒนาขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นที่ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอาง (Grotewold, 2006; Yao et al., 2004)

แก่นครี้เป็นสมุนไพรที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทย โดยพบว่ามีการใช้เป็นยาบำรุงร่างกายและยาสำหรับสตรี (Songsiang, Hahnvajanawong, & Yenjai, 2011; Songsiang et al., 2009; Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009) และคณะผู้วิจัยได้ศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง จึงเห็นสมควรศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ให้รอบด้าน โครงการวิจัยนี้จึงได้พัฒนางานวิจัยเดิมให้มีการแตกแขนงการวิจัยออกไปในเชิงลึก โดยมุ่งประเด็นหลักไปที่การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อยืนยันผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับหลอดทดลองก่อนการประเมินแนวทางพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้การนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ จะทำให้สามารถพัฒนาขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นที่ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอาง

และเป็นการสร้างโอกาสในการพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อกลับคืนสู่ท้องถิ่น อันจะนำมาซึ่งโอกาสในการสร้างรายได้และความยั่งยืน

สมมติฐานของงานวิจัยนี้จึงเสนอไว้ว่าสารสกัดจากแก่นครี้ซึ่งมีสารพฤกษเคมีส่วนใหญ่เป็นไอโซฟลาโวนอยด์ และหากพบว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์กระตุ้นหรือยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินของเซลล์ในระดับหลอดทดลองได้ สารเหล่านี้ย่อมอาจจะสามารถกระตุ้นหรือยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์ผิวหนังของจริงได้ นอกจากนี้สารไอโซฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายประการเช่น ฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบ เป็นต้น เมื่อผสานกับฤทธิ์การกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินอาจจะส่งผลดีต่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อเพิ่มความดำให้สีผมหรือชะลอผมหงอก หรือหากมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินก็อาจจะส่งผลดีต่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อผิวขาวได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ครี้ หรือ สักขี (*Dalbergia parviflora*)

Dalbergia เป็นจีนัส (genus) ของพรรณไม้ขนาดเล็กถึงขนาดกลาง อยู่ในวงศ์ (family) *Fabaceae* และวงศ์ย่อย (subfamily) *Faboideae* พรรณไม้ในจีนัสนี้มีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในเขตร้อนได้แก่ ตอนกลางของอเมริกาใต้ แอฟริกา มาดากัสกา เอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีพรรณไม้หลายสปีชีส์ของ *Dalbergia* ที่มีความสำคัญในเชิงการใช้เป็นไม้ซุง ไม้เครื่องเรือน และไม้เนื้อหอมซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยมาก ไม้ในวงศ์นี้ที่มีชื่อเสียงคือ rosewood ซึ่งเป็นไม้ที่มีเนื้อไม้สีแดงมีกลิ่นหอมคล้ายกุหลาบและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจ สำหรับในประเทศไทยที่รู้จักแพร่หลายได้แก่ *Dalbergia cochinchinensis* (Siamese rosewood หรือไม้พะยุง) และ *Dalbergia* oliveri (ไม้ชิงชัน) ในทางโลกตะวันตกไม้ที่มีชื่อเสียงในวงศ์นี้คือ *Dalbergia nigra* (Brazilian rosewood) และ *Dalbergia atifolia* (Indian rosewood) อย่างไรก็ตามพรรณไม้หลายสปีชีส์ในจีนัส *Dalbergia* มีเพียงไม่กี่สปีชีส์เท่านั้นที่เป็น rosewood

Dalbergia parviflora Roxb. เป็นพรรณไม้ที่จัดอยู่วงศ์ *Fabaceae* วงศ์ย่อย *Faboideae* พบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่พม่า ไทย มาเลเซีย หมู่เกาะสุมาตรา มีชื่อสามัญคือ Blackwood และชื่อไทยได้แก่ ครี้ กระซิก ซิก สรี้ และ สักขี เป็นต้น มีลักษณะเป็นต้นไม้มีเถาขนาดใหญ่และพัฒนาเป็นแก่นไม้สีดำแดง เมื่อทำการเผาไหม้จะมีกลิ่นหอม ซึ่งในแถบประเทศจีน อินเดีย มาเลเซีย มีการใช้แก่นของ *D. parviflora* ที่บดละเอียดมาเป็นส่วนประกอบของธูป การใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์แผนโบราณพบว่าน้ำมันที่สกัดจากแก่นไม้ด้วยวิธีการกลั่นซึ่งมีลักษณะเป็นสีแดงเหนียวข้นถูกใช้รักษาแผลเปื่อยพุพอง การต้มแก่นไม้ในน้ำเดือดเพื่อ

ใช้เป็นยาบำรุงร่างกาย มีการใช้แก่นไม้เพื่อการนวดให้ร่างกายสดชื่นกระปี้กระเปร่า (Jansen, 1999)

มีรายงานเกี่ยวกับสารพฤกษเคมีที่สกัดได้จากแก่นครี้ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) และยังพบว่าสามารถออกฤทธิ์ในระบบชีวภาพได้ เช่นออกฤทธิ์แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งชนิด human epidermoid carcinoma (KB) เซลล์มะเร็งชนิด human small cell lung cancer (NCI-H187) และเซลล์มะเร็งชนิด breast adenocarcinoma (MCF-7) (Songsiang et al.). สารไอโซฟลาโวนอยด์บางชนิดมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเอสโตรเจน (Songsiang et al., 2009; Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009) และยังมีรายงานว่าเป็นสารพฤกษเคมีที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Chen, Chan, Ho, Fung, & Wang, 1996; Croft, 1998; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996)

ภาพที่ 2.1 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของแก่นครี้ (วัตถุดิบแห้ง) และเมื่อบดละเอียดเป็นผง

ภาพที่ 2.2 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของใบและผล

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

ภาพที่ 2.3 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของใบ

ที่มาของภาพ : US National Herbarium. Barcode 01188457 (©Smithsonian Institution, National Museum of Natural History, Department of Botany)

ภาพที่ 2.4 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของใบและผล

ที่มาของภาพ : US National Herbarium. Barcode 01188458 (©Smithsonian Institution, National Museum of Natural History, Department of Botany)

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

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

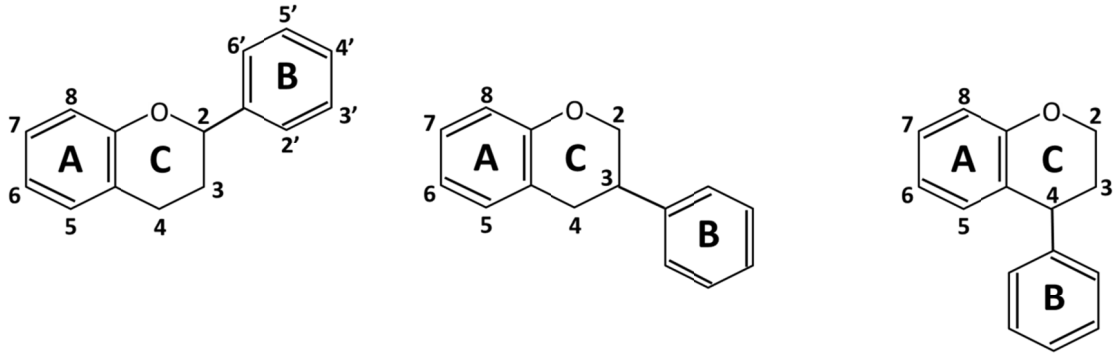
ในเชิงโครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีในธรรมชาติพบว่ามีโครงสร้างหลักเป็น C6-C3-C6 ประกอบกับการมีหมู่แทนที่ (substitution group) ในตำแหน่งต่างๆ ตามระบบการเรียกชื่อ IUPAC สามารถจัดจำแนกฟลาโวนอยด์ได้ดังนี้

1) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) หรือ ไบโอฟลาโวนอยด์ (bioflavonoid)

2) ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) เกิดจากโครงสร้างของ 3-phenylchromen-4-one

3) นีโอฟลาโวนอยด์ (neoflavonoid) เกิดจากโครงสร้างของ4-phenylcoumarine

ฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 ชนิด เป็นสารประกอบที่มีหมู่คีโทนและมีโครงสร้างวงแหวน 3 วง เป็นโครงหลัก (flavonoid backbone) โดยทั่วไปวงแหวนแต่ละวงจะมีชื่อคือ A B และ C

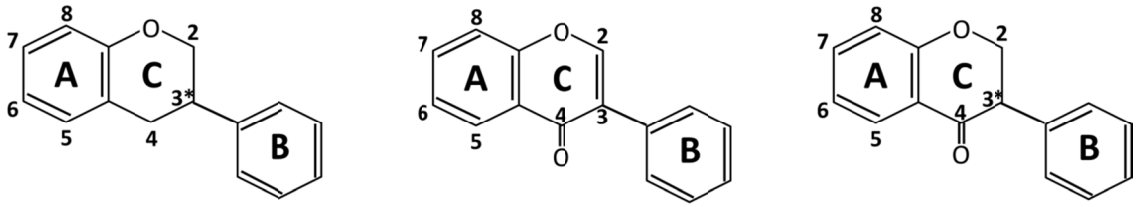


ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ (2-phenylbenzopyran) ไอโซฟลาโวนอยด์ (3-benzopyran) และ นีโอฟลาโวนอยด์ (4-benzopyran) แสดงการระบุหมายเลขตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน A B และ C

ไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids)

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

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



ภาพที่ 2.6 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) เทอร์ปีนอนด์ (terpenoid) อัลคาลอยด์ (alkaloid) เป็นต้น จากการศึกษาวิจัยพบว่าสารพฤกาเคมีเหล่านี้สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น example, อัลคาลอยด์มีผลต่อระบบสรีระวิทยาของมนุษย์และสัตว์ (Ferraz et al., 1999), สารประกอบฟีนอลซึ่งรวมถึงฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Fernandez-Panchon, Villano, Troncoso, & Garcia-Parrilla, 2008; Prochazkova, Bousova, & Wilhelmova, 2011), ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง (estrogen-like activity) (De-Eknamkul et al., 2011; Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009; Wungsintaweekul, Umehara, Miyase, & Noguchi, 2011) และยังสามารถยับยั้งเอนไซม์นิวรา

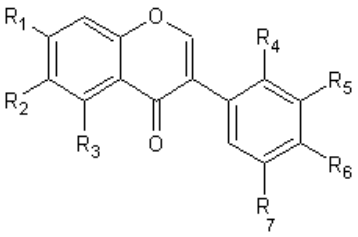
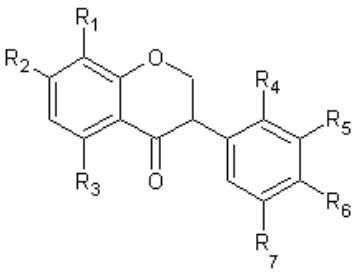
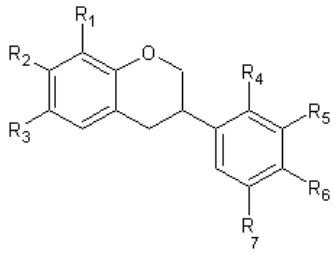
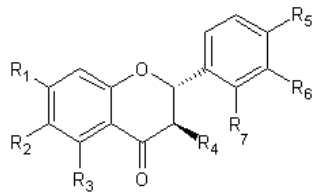
มินิเดส (neuraminidase) ของ avian influenza virus ได้ (Kongkamnerd et al., 2012; Kongkamnerd et al., 2011)

ในปัจจุบันนี้ฟลาโวนอยด์กำลังเป็นที่สนใจในวงการที่ศึกษาเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงมาก (Devasagayam et al., 2004; Nijveldt et al., 2001) สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารฟลาโวนอยด์พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น การต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Kim, Son, Chang, & Kang, 2004) ยับยั้งเอนไซม์บางกลุ่ม เช่น hydrolytic enzyme และ oxidative enzyme (Robinson, Robinson, & Martin, 1984; Yang et al.) นอกจากนี้ยังพบว่าฟลาโวนอยด์สามารถป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด ยับยั้งเซลล์มะเร็ง และฟลาโวนอยด์บางชนิดอาจมีศักยภาพที่สามารถยับยั้งไวรัส HIV ได้ (Yao et al., 2004)

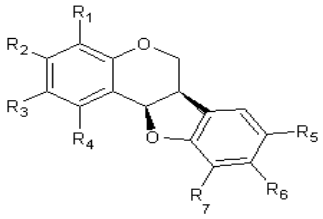
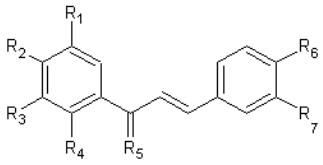
ไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้

พรรณไม้สปีชีส์ *Dalbergia spp*. พบว่าแก่นไม้ (heartwood) อุดมไปด้วยสารประกอบฟลาโวนอยด์ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลธรรมชาติ (natural phenolic compound) (An, Jeong, & Kim, 2008; Czako & Marton, 2001; Ito et al., 2003; Narayanan, Rao, Shanmugam, Gopalakrishnan, & Devi, 2007; Songsiang et al., 2009). ในการแพทย์แผนไทยมีการใช้แก่นครี้ *(Dalbergia parviflora)* เป็นยาบำรุงสตรีและเพื่อปรับสมดุลภาวะการมีรอบเดือนให้เป็นปกติ ในการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้สามารถสกัดแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์จากแก่นครี้ได้มากกว่า 60 ชนิด ซึ่งจำแนกกลุ่มได้เป็น ไอโซฟลาโวน (isoflavone) ไอโซฟลาวาโนน (isoflavanone) ไอโซฟลาแวน (isoflavan) ฟลาโวโนน (flavonone) ฟลาวาโนนอล (flavanonol) พีเทอโรคาแพน (pterocarpan) และชาร์โคน (Chalcone) แสดงดังตารางที่ 2.1 (Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009)

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้ (*Dalbergia parviflora*) (Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009)

	Isoflavones	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**	**R6**	**R7**
 **Isoflavones**	Formononetin	OH	H	H	H	H	OMe	H
	Calycosin	OH	H	H	H	OH	OMe	H
	Biochanin A	OH	H	OH	H	H	OMe	H
	Genistein	OH	H	OH	H	H	OH	H
	Khrinone B	OH	H	OH	OH	H	OMe	OH
	3'-O-methylorobol	OH	H	OH	H	OMe	OH	H
	Khrinone C	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	H
	Tectorigenin	OH	OMe	OH	H	H	OH	H
	Cajanin	OMe	H	OH	OH	H	OH	H
	Isoflavanones	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**	**R6**	**R7**
 ***Isoflavanones***	(3R)-7,3'-dihydroxy-4'-methoxy-isoflavanone	H	OH	H	H	OH	OMe	H
	Onogenin	H	OH	H	OMe	H	OCH_2O	H
	Dalparvin	H	OH	H	OMe	H	OMe	OH
	Dalparvin B	H	OH	H	OH	OMe	OMe	H
	(3S)-sativanone	H	OH	H	OMe	H	OMe	H
	(3RS)-violanone	H	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	(3RS)-3'-O-methylviolanone	H	OH	H	OMe	OMe	OMe	H
	(3RS)-kenusanone G	H	OH	OH	H	OH	OMe	H
	(3S)-secundiflorol H	H	OH	OH	OMe	OH	OMe	H
	Dalparvin A	H	OH	OH	OMe	H	OH	OH
	Isoflavans	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**	**R6**	**R7**
 ***Isoflavans***	(3*R*)-vestitol	H	OH	H	OH	H	OMe	H
	Sativan	H	OH	H	OMe	H	OMe	H
	(3*R*)(+)-mucronulatol	H	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	(3*R*S)-3'-hydroxy-8-methyoxy vestitol	OH	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	Duartin	OMe	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	(3*S*)-8-demethylduartin	OMe	OH	H	OH	OH	OMe	H
	Flavanones	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**	**R6**	**R7**
 ***Flavanones***	(2*S*)-liquiritigenin	OH	H	H	H	OH	H	H
	Dalparvinol A	OH	H	H	OH	OH	OMe	H
	(2*S*)-pinocembrin	OH	H	OH	H	H	H	H
	(2*S*)-naringenin	OH	H	OH	H	0H	H	H
	(2*R*,3*R*)-pinobanksin	OH	H	OH	OH	H	H	H
	Alpinetin	OH	H	OMe	H	H	H	H

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) โครงสร้างทางเคมีของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้ (*Dalbergia parviflora*) (Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009)

 ***Pterocarpan***	***Pterocarpan***	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**	**R6**	**R7**
	Medicarpin	H	OH	H	H	H	OMe	H
	(6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan	H	OH	H	H	OH	OMe	H
	I-maackiain	H	OH	H	H	OCH_2O	H	H
	Meliltocarpan D	OH	OMe	H	H	H	OMe	OH
 ***Chalcones***	***Chalcones***	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**	**R6**	**R7**
	Obustyrene	H	OH	H	OMe	H_2	H	H
	Isoliquiritigenin	H	OH	H	OH	O	OH	H

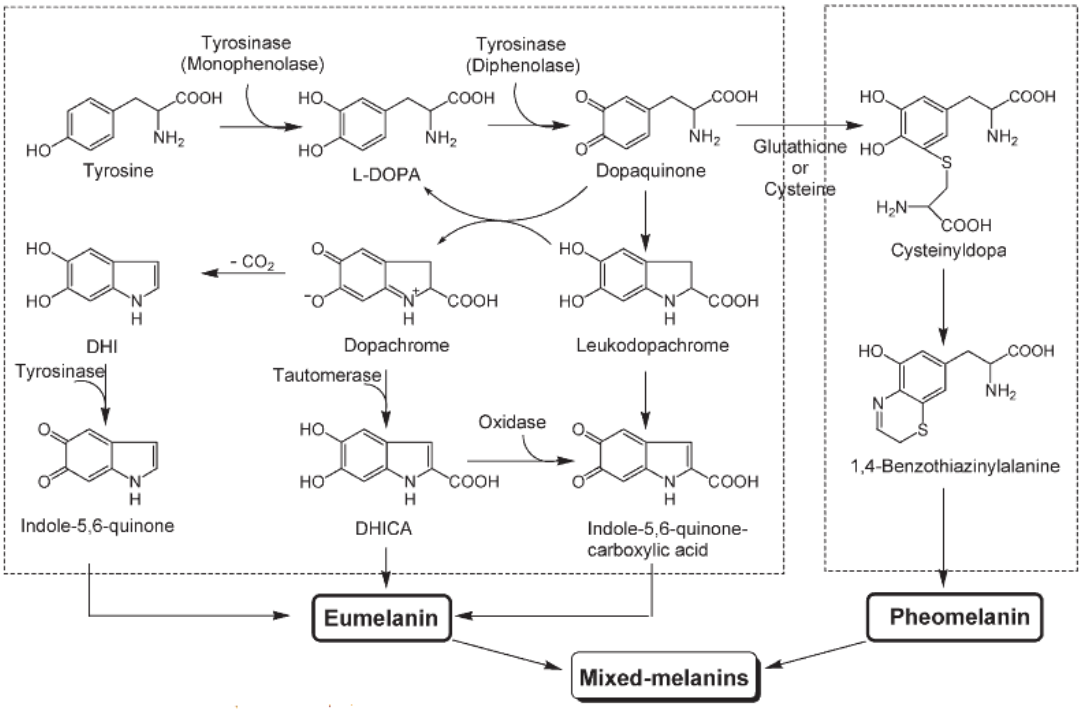
เมลานินและสีผิว

เมลานิน (melanin) เป็นรงควัตถุที่ทำให้ปรากฏลักษณะของสีผิว สีเส้นผม และสีนัยน์ตา เมลานินที่ถูกสร้างขึ้นในเซลล์เมลาโนไซท์ (melanocyte) ของมนุษย์ จะถูกส่งไปเก็บยังเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) ที่กระจายอยู่ทั่วไปตามผิวหนัง มีหน้าที่ดูดกลืนแสงซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองของร่างกายเมื่อได้รับแสงหรือสิ่งเร้าบางอย่างที่มากเกินไป เมลานินยังจำแนกออกเป็น 2 ชนิด คือ ยูเมลานิน (eumelanin) และฟีโอเมลานิน (pheomelanin) ซึ่งเมลานินทั้ง 2 ชนิดจะผสมกันอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกันไปตามแต่ละส่วนของอวัยวะต่างๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมหรือเชื้อชาติของแต่ละบุคคล ยูเมลานินจะแสดงบทบาทของสีผิวที่มีลักษณะสีน้ำตาล-ดำ ในขณะที่ฟีโอเมลานินที่จะแสดงบทบาทของสีผิวออกมาในลักษณะของสีชมพู-แดง ด้วยเหตุนี้ในอวัยวะต่างๆ เช่น ผิวหนังซึ่งมีสีน้ำตาล-เหลืองเนื่องจากบริเวณผิวหนังมีปริมาณของยูเมลานินมากกว่าฟีโอเมลานิน จึงทำให้ลักษณะสีของผิวหนังมีสีน้ำตาล แตกต่าง

จากบริเวณริมฝีปากที่จะมีสีชมพู-แดง เนื่องมาจากที่บริเวณริมฝีปากมีปริมาณฟีโอเมลานินมากกว่ายูเมลานิน (Prota, 1980)

ชีวสังเคราะห์ของเมลานิน (Biosynthesis pathway of Melanin)

เอนไซม์ไทโรสิเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในเซลล์เมลาโนไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีอยู่ประมาณ 2-5% ของปริมาณเซลล์ผิวทั้งหมด โดยเซลล์ดังกล่าวมีความจำเป็นต่อการกระบวนการสร้างเมลานินเพื่อส่งให้แก่เซลล์เคราติโนไซต์ กระบวนการสังเคาะห์เมลานินมีปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ไทโรสิเนสเป็นขั้นกำหนดอัตรา (rate-determining step)



ภาพที่ 2.7 แผนผังชีวสังเคราะห์ของเมลานิน (Biosynthesis pathway of Melanin)

จากแผนผังชีวสังเคราะห์ของเมลานินของเรเปอร์-เมสัน (Raper-Mason) (Raper, 1926; Raper, 1927; Mason, 1948) จะพบว่าขั้นตอนการใช้เอนไซม์ไทโรสิเนสจะเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน โดยมีแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) และแอล-โดปา (L-Dopa) เป็นสารตั้งต้น ที่จะถูกเปลี่ยนโดยปฏิกิริยาที่ใช้เอนไซม์ (enzymatic reaction) เป็นโดปาควิโนน (dopaquinone) ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ของแอล-ไทโรซีนเป็นแอล-โดปาและโดปาควิโนน เรียกว่าโมโนฟีนอลเลส (monophenolase) และออโธ-ไดฟีนอลเลส (*o*-diphenolase) ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเข้าสู่ช่วงปฏิกิริยาที่ไม่ใช้เอนไซม์ (non-enzymatic reaction) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องด้วยตนเอง ในวิถีหนึ่งนั้นโดปาควิโนนจะเกิดปฏิกิริยาออโต-ออกซิเดชั่น (auto-oxidation) ได้เป็นสารประกอบโดปาโครม (dopachrome) ซึ่งเป็นสารที่มีสีน้ำตาล-ดำ หลังจากนั้นโดปาโครมจะเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนแปลงขั้นต่อไปจนกระทั่งได้สารเมลานินชนิดยูเมลานินที่มีสีน้ำตาล-ดำ นอกจากนี้ในอีกวิถีหนึ่งสารโดปาควิโนนยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารกลูตาไธโอน (glutathione) หรือซิสเตอีน (cysteine) ได้ผลิตภัณฑ์ปลายทางคือสารประกอบเมลานินชนิดฟีโอเมลานินซึ่งมีสีชมพู-แดง(Prota, 1980; Prota, 1993; Prota, 2000)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- สเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบ microplate reader (Visible)
- สเปกโตรโฟโตมิเตอร์แบบ microplate reader (Fluorescence)
- ปิเปต และ มัลติชัลเนลปิเปตขนาดต่างๆ
- จานหลุมขนาด 96 ช่อง (96 well plate)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 ˚C และ CO2 สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำและความดัน
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope
- ตู้ปลอดเชื้อ

2. สารเคมีและเอนไซม์

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- PrestoBlue® reagent (Gibco®)
- DMEM medium (Gibco®)
- Fetal bovine serum (Gibco®)
- Penicillin / Steptomycin (Gibco®)

- Trypsin-EDTA (Gibco®)

- Soybean Trypsin Inhibitor (Gibco®)

- 10X Phosphate buffer (Gibco®)

- Isoflavonoids of *D. parviflora* (Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009)

- *D. parviflora* crude extract

3. เซลล์

- B16-F10 Mus musculus skin melanoma (ATCC® CRL-6475™)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับระบบการสังเคราะห์เม็ดสีผิว

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวและเซลล์ปกติจากผิวหนังของมนุษย์

เซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวของหนู (Mus musculus, melanoma cell line, B16-F10, ATCC® Number: CRL-6475™) เพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco®) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum 25 mM glucose 4 mM L-glutamine 1 mM sodium pyruvate 10 µg/mL penicillin และ 10 µg/mL streptomycin บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 และควบคุมความชื้น

การเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิว

เพาะเลี้ยงเซลล์ B16-F10 ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 10 cm ด้วยอาหาร DMEM จนกระทั่งเจริญเติบโต 100% confluence จากนั้นทำการ trypsinized ด้วยสารละลาย trypsin และล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เย็น 20 mM phosphate buffer pH 6.8 จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์เย็น ที่ผสม 1% Triton X-100 เขย่า

อย่างแรงด้วย vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการแยกเอาเศษเซลล์ออกด้วยเทคนิคเซนตริฟิเกชั่นที่ 1300g เวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 °C ส่วนสารละลายใสจะมีเอนไซม์ไทโรซิเนสอยู่ ให้นำส่วนใสมาทำการไดอะไลซิสในสารละลายบัฟเฟอร์เย็น 20 mM phosphate buffer pH 6.8 เป็นเวลาข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อกำจัด Triton X-100 ออก จะได้เป็นสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส นำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford โดยใช้ชุดวัดปริมาณโปรตีนสำเร็จรูป Bio-Rad Protein assay

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิว

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวใช้วิธีที่ดัดแปลงจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเห็ด (mushroom tyrosinase) ของกิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิและ บุญชู ศรีตุลารักษ์ โดยปฏิกิริยาทำในจานหลุมไมโครเพลทชนิด 96 หลุม ประกอบด้วย 20 mM phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 140 μL เติมสารสกัดที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ทำละลายใน 50% DMSO) ปริมาตร 20 μL และเติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเสนจากเซลล์มะเร็งเม็ดสี ปริมาตร 20 μL และนำไปบ่ม (pre-incubated) ที่ 37 °C เป็นเวลา10 นาที หลังจากนั้นจึงเริ่มต้นปฏิกิริยาโดยการเติม 2.5 mM L-DOPA ปริมาตร 20 μL และนำไปบ่ม ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาการเปลี่ยน L-dopa เป็น Dopachrome ซึ่งจะมีสีส้มถึงน้ำตาลเข้มด้วยเทคนิคสเปกโตโฟโตเมตรีที่ความยามคลื่น 475 นาโนเมตร และใช้ 50% DMSO แทนสารสกัดเพื่อเป็นการทดลองกลุ่มควบคุม และใช้ปฏิกิริยาที่ไม่เติมเอนไซม์เป็น Blank การวิเคราะห์ผลการยับยั้งเป็นร้อยละของการยับยั้ง จากสูตรต่อไปนี้

ร้อยละการยับยั้ง (%) = $[(A_0 - A_1) / A_0]$

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank

A_1 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของการทดลองกลุ่มทดสอบ

การทดสอบผลของสารสกัดจากแก่นครี้ต่อการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินในเซลล์มะเร็งผิวหนัง

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดสี B16-F10 ในจานหลุมขนาด 24 หลุม ด้วยอาหารเหลว Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco®) ชนิดไม่มี phenol red โดยใส่เซลล์เริ่มต้นจำนวน 50,000 เซลล์/0.5 mL/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 และควบคุมความชื้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (15 μM และ 30μM) หรือเติม DMSO ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5% เป็นชุดควบคุม และทำการบ่มต่ออีก 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณเมลานินที่เซลลผลิตขึ้นทั้งในเซลล์และที่หลั่งออกมานอกเซลล์ โดยการเติมสารละลาย 2 N NaOH ที่มี 20% DMSO ปริมาตร 0.5 mL ลงไปในจาดหลุมที่เลี้ยงเซลล์ไว้โดยตรง ใช้ปิเปตผสมโดยการดูดขึ้นลงช้าๆ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายของเหลวในจานหลุมลงหลอดทดลองและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเศษเซลล์ นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร รายงานปริมาณเมลานินเป็นค่าสัมพัทธ์กับค่าการดูดกลืนแสงของการทดลองกลุ่มควบคุม (ชุดที่เติม 0.5% DMSO แทนสารสกัด) ทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ และทำการทดลองซ้ำอีก 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

การทดสอบผลของสารสกัดจากแก่นครี้ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งผิวหนัง

การศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์ (cell viability) ใช้หลักการพื้นฐานของเซลล์ที่มีชีวิตจะมีคุณสมบัติที่สามารถรีดิวซ์สารละลาย resazurin (PrestoBlue™, Invitrogen) ให้กลายเป็นสาร resorufin ซึ่งมีคุณสมบัติที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ในการทดลองนี้เพาะเลี้ยงเซลล์ในจานหลุมขนาด 96 หลุม เติมเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิว B16F10 ลงไปจำนวน 10,000 เซลล์/0.1 mL/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 และควบคุมความชื้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ (15 μM และ 30μM) หรือเติม DMSO ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5% เป็นชุดควบคุม และทำการบ่มต่ออีก 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงล้างเซลล์ที่เกาะอยู่กันจานหลุมด้วยบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 10 mM ปริมาตร 200 μL แล้วทำการเติมสารละลาย PrestoBlue™ ที่เจือจางในอาหาร RMPI 1640 ที่ปราศจาก serum และ phenol red (อัตราส่วน 1:10) ลงไปหลุมละ 100 μL นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 และควบคุมความชื้น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปวัดค่าฟลูออเรสเซนต์ที่ excitation 535

nm และ emission 610 nm รายงานร้อยละค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์เป็นค่าสัมพัทธ์กับค่าฟลูออเรสเซนต์ของการทดลองกลุ่มควบคุม (ชุดที่เติม 0.5% DMSO แทนสารสกัด) ทำการทดลองชุดละ 4 ซ้ำ และทำการทดลองซ้ำอีก 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจาก *D. parviflora* ต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิว

ในการทดลองนี้ใช้สารฟลาโวนอยด์บริสุทธิ์จำนวน 27 ชนิดที่แยกได้จากแก่นครี้ (*D. parviflora*) โดยแสดงโครงสร้างและชื่อของฟลาโวนอยด์ดังตารางที่ 4.1 ในการศึกษาฤทธิ์ของสารฟลาโวนอยด์และสารสกัดหยาบต่อการยับยั้งการการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สกัดได้จากเซลล์มะเร็งผิวหนังเพาะเลี้ยง (B16F10 murine melanoma cell line) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่าสารสกัดหยาบของแก่นครี้ไม่มีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเซลล์มะเร็งผิวหนังได้อย่างมีนัยสำคัญ (ค่าร้อยละการยับยั้งมีค่าเป็น ร้อยละ 0.95 ที่ระดับความเข้มข้นสารสกัด 100 μg/mL) นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์จากแก่นครี้ส่วนใหญ่พบว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวโดยการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 200 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเตรียมได้ในการทดลอง อย่างไรก็ตามพบฤทธิ์ยับยั้งในระดับอ่อนโดยมีค่าร้อยละการยับยั้งประมาณร้อยละ 10 ในสารกลุ่มไอโซฟลาโวน (isoflavone) ได้แก่ Genistein, Khrinone B, Tectorigenin และ Cajanin กลุ่มไอโซฟลาวาโนน (isoflavanone) ได้แก่ Dalparvin B และ (3S)-sativanone กลุ่มไอโซฟลาแวน ได้แก่ (isoflavan) (3R)-vestitol, (3R)(+)-mucronulatol และ (3RS)-3'-hydroxy-8-methyoxy vestitol และกลุ่มฟลาวาโนน (flavanone) ได้แก่ (2S)-liquiritigenin และสารฟลาโวนอยด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวในระดับปานกลางพบเพียงชนิดเดียวซึ่งเป็นสารประเภท pterocarpan คือ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งที่ร้อยละ 29 ที่ความเข้มข้น 200 μM ในการทดลองนี้ได้ทำการทดลองชุดควบคุมผลบวกโดยใช้ kojic acid และ oxyresveratrol ซึ่งพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 200 μM kojic acid และ oxyresveratrol มีค่าการยับยั้งเป็น 73.8 ± 1.0% (IC_{50} = 39.9 μM) และ 99.4 ± 0.9 % (IC_{50} = 0.88 ± 0.16 μM) ตามลำดับ

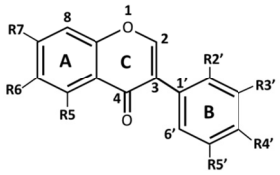
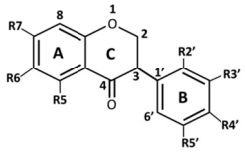
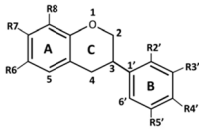
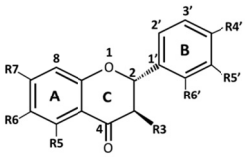
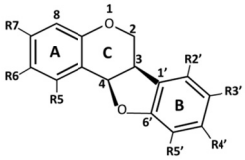
ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก *D. parviflora* ต่อการสังเคราะห์เมลานินและการมีชีวิตรอดในเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิว

ผลการศึกษาสารฟลาโวนอยด์และสารสกัดหยาบที่แยกได้จากแก่นครี้ (*D. parviflora*) ต่อการกระตุ้นหรือการยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุเมลานินของเซลล์มะเร็งผิวหนังเพาะเลี้ยง (B16F10 murine melanoma cell line) โครงสร้างและชื่อของสารฟลาโวนอยด์จำนวน 27 ชนิด ที่ใช้ทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของสารฟลาโวนอยด์ที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์กำหนดไว้ 2 ค่าความเข้มข้นคือ 15 µg/mL และ 30 µg/mL โดยปริมาณเมลานินที่ผลิตขึ้นถูกเปรียบเทียบและรายงานเป็นค่าสัมพัทธ์กับชุดการทดลองควบคุมดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่ามีไอโซฟลาโวนอยด์บางชนิดมีฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินได้ระดับสูงถึง เช่น ที่ความเข้มข้น 15 µg/mL สาร Duartin มีฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินได้ถึง 300% เทียบจากสภาวะที่ได้เติมสารสกัดใด ๆ สารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินในช่วง 150-180% BiochaninA, Genistein, 3'-O-methylorobol และ (3R)-vestitol สารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินในช่วง 120-140% ได้แก่ Formononetin A, Calycosin, Tectorigenin, Onogenin, Dalparvin, (3S)-sativanone, Dalparvin A และ (2S)-naringenin เป็นต้น โดยที่สารเหล่านี้พบว่าไม่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวที่ความเข้มข้น 15 µg/mL และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 30 µg/mLพบว่าสามารถเพิ่มการกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินให้สูงขึ้นได้อีกโดยที่ยังไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นเดียวกัน สารสกัดหยาบของแก่นครี้ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ในลักษณะเดียวกันพบว่าที่ความเข้มข้น 5 µg/mL 10 µg/mL และ 20 µg/mL สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินได้ที่ 112%, 123% และ 144% ตามลำดับ โดยที่ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 30 µg/mL และ 40 µg/mL พบว่าการมีชีวิตอยู่รอดของเซลล์ลดลงเหลือ 88% และ 80% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่ามีไอโซฟลาโวนอยด์บางชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน เช่น ที่ความเข้มข้น 15 µg/mL พบว่าเซลล์ที่เติมสาร Krinone B มีการผลิตเมลานิน 84% (ยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน 16%) เซลล์ที่เติมสาร Cajanin มีการผลิตเมลานิน 65% (ยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน 35%) และเซลล์ที่เติมสาร (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan มีการผลิตเมลานิน 42% (ยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน 68%) โดยที่สารเหล่านี้พบว่าไม่มีพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวที่ความเข้มข้น 15 µg/mL แต่เมื่อเพื่อความเข้มข้นเป็น

30 µg/mL พบว่าในกรณีของ Krinone B และ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan ทำให้เซลล์มีการรอดชีวิตลดลงเหลือ 63% และ 14.5% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 โครงสร้างเคมีของสารสกัดจากแก่นครี้ (*Dalbergia parviflora*) ที่ใช้ในการทดลองนี้

	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 ฤทธิ์ทางยังยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวจากสารสกัดจากแก่นครี้ (*Dalbergia parviflora*)

No.	*Isoflavones*	Mouse Tyrosinase Inhibition , % (at 200 µM)	15 µM		30 µM	
			% Melanin content	% Cell viability	% Melanin content	% Cell viability
1	Formononetin	-	133.8 ± 2.7	96.0 ± 3.3	155.3 ± 15.4	92.8 ± 9.4
2	Calycosin	-	142.8 ± 8.2	99.1 ± 9.2	196.6 ± 6.4	101.3 ± 1.9
3	Biochanin A	-	165.2 ± 5.9	103.4 ± 4.5	168.0 ± 5.1	102.2 ± 4.8
4	Genistein	9.9 ± 3.1	165.1 ± 1.6	128.2 ± 3.5	191.7 ± 13.9	93.8 ± 5.7
5	Khrinone B	10.1 ± 3.0	84.1 ± 5.3	95.1 ± 5.4	34.7 ± 12.3	62.3 ± 15.1
6	3'-O-methylorobol	-	170.1 ± 10.5	106.6 ± 6.2	215.7 ± 15.7	101.5 ± 2.7
7	Khrinone C	-	107.6 ± 0.8	93.3 ± 2.0	154.0 ± 9.9	93.4 ± 2.0
8	Tectorigenin	10.2 ± 2.9	127.6 ± 2.8	129.7 ± 3.4	152.1 ± 4.7	119.3 ± 1.3
9	Cajanin	9.2 ± 1.5	65.8 ± 7.5	101.5 ± 6.6	61.6 ± 8.9	107.2 ± 3.3
	Isoflavanones					
10	(3R)-7,3'-dihydroxy-4'-methoxy-isoflavanone	-	95.1 ± 3.0	94.9 ± 3.9	95.2 ± 2.7	96.5 ± 3.9
11	Onogenin	-	133.5 ± 4.6	100.0 ± 5.0	169.8 ± 15.4	92.0 ± 2.0
12	Dalparvin	-	133.8 ± 9.7	117.1 ± 8.9	199.6 ± 12.1	99.7 ± 6.7
13	Dalparvin B	9.8 ± 2.8	102.0 ± 2.7	82.3 ± 5.4	99.1 ± 2.3	74.1 ± 6.4
14	(3S)-sativanone	9.5 ± 1.6	124.2 ± 4.3	106.7 ± 10.6	127.6 ± 6.0	64.3 ± 23.7
15	(3RS)-3'-O-methylviolanone	-	143.3 ± 8.4	74.2 ± 7.8	157.2 ± 11.5	72.9 ± 6.2
16	(3RS)-kenusanone G	-	132.6 ± 5.1	124.0 ± 1.7	158.5 ± 13.5	102.2 ± 2.8
17	(3S)-secundiflorol H	-	117.6 ± 17.7	109.4 ± 6.6	146.4 ± 6.1	102.7 ± 4.1
18	Dalparvin A		132.0 ± 4.4	105.4 ± 4.8	184.2 ± 10.6	100.4 ± 7.1
	Isoflavans					
19	(3*R*)-vestitol	12.4 ± 3.3	186.1 ± 1.6	142.1 ± 3.0	232.0 ± 9.3	119.7 ± 4.1
20	(3*R*)(+)-mucronulatol	12.8 ± 2.1	178.6 ± 15.9	103.6 ± 6.9	263.7± 8.2	102.5 ± 2.7
21	(3*R*S)-3'-hydroxy-8-methyoxy vestitol	11.4 ± 2.5	97.0 ± 6.3	102.9 ± 1.0	36.3 ± 0.1	62.4 ± 3.2
22	Duartin	-	301.1 ± 2.3	139.9 ± 7.5	326.8 ± 2.1	94.4 ± 2.8
23	(3*S*)-8-demethylduartin	-	87.8 ± 2.0	93.5 ± 3.0	72.7 ± 4.3	98.3 ± 5.4
	Flavanones					
24	(2*S*)-liquiritigenin	13.2 ± 2.7	102.9 ± 5.5	98.9 ± 10.7	124.5 ± 2.0	100.0 ± 3.5
25	(2*S*)-naringenin	-	132.5± 14.5	94.3 ± 2.0	152.1 ± 3.8	98.1 ± 0.5
26	Alpinetin	-	89.7± 0.4	77.0 ± 12.7	92.3 ± 1.6	77.1 ± 10.2
	Pterocarpan					
27	(6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan	29.2 ± 2.9	41.9 ± 0.4	105.7 ± 4.9	53.5 ± 0.4	14.5 ± 0.9
	others					
28	Kojic acid	73.8 ± 1.0	68.9 ± 5.2	98.9 ± 4.7	74.2 ± 5.8	99.6 ± 2.3
29	Oxyresveratrol	99.4 ± 1.0	24.3 ± 1.1	117.2 ± 2.2	28.4 ± 1.7	118.1 ± 5.1

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

สารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) บริสุทธิ์จำนวน 27 ชนิด ที่สกัดได้จากแก่นของต้นครี้ (*Dalbergia parviflora*) ได้ถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวชนิด (B16F10 murine melanoma cell line) ซึ่งเป็นเซลล์ของหนูที่ใช้เป็นตัวแทนของ melanocyte ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยคาดว่าจะให้ผลได้เทียบเคียงกับเซลล์ของมนุษย์ งานวิจัยนี้พบว่าสารไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เมลานินจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ 20 ชนิดที่มีฤทธิ์การกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินและกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ 7 ชนิดที่มีฤทธิ์การยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน

ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากแก่นครี้ต่อสังเคราะห์เมลานินในเซลล์เม็ดสีผิวพบว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 2.5 µg/ml มีฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้สูงกว่าในสภาวะปกติ 3 เท่า สารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์บางชนิด เช่น Duartin, Genistein และ Naringenin มีฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์ เมลานินสูงกว่าสภาวะปกติ 3, 1.6 และ 1.2 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้เคยมีรายงานเกี่ยวข้องกับการฤทธิ์การกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินของสารฟลาโวนอยด์ต่อเซลล์ murine B16-F10 melanoma เช่น Quercetin ซึ่งสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินโดยอาจเป็นส่วนหนึ่งของกลไก melanocytotoxicity (Kubo, Nitoda, & Nihei, 2007) ในขณะที่ Naringenin มีรายนงานว่าสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินโดยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่กำหนดรหัสให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเมลานิน (Ohguchi, Akao, & Nozawa, 2006) นอกจากนี้มีการศึกษาในเซลล์เมลาโนไซต์ปกติของมนุษย์ (normal human melanocytes, R6-NHEM-2) โดยใช้สารสกัดจากผลของต้นเชสต์เบอร์รี่ (chaste tree

berry, *Vitex agnus-castus*) ที่ซึ่งมีสารฟลาโวนอยด์ Casticin เป็นองค์ประกอบหลัก พบว่าสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินได้ (Schmid, Belser, & Zülli, 2007)

ผลการวิจัยนี้ทำให้พบแนวโน้มความเป็นไปได้ในใช้สารสกัดจากแก่นครี้เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใน 2 แนวทาง ได้แก่ 1) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแก่นครี้สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับสุขภาพเพื่อชะลอบรรเทาโรคเสื่อมหรือผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อชะลอความชรา 2) ฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินของแก่นครี้สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมให้ดกดำหรือผลิตภัณฑ์สมุนไพรการแพทย์ทางเลือกเพื่อบรรเทาโรคด่างขาว อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นจะต้องศึกษาสารสกัดจากแก่นครี้ในเชิงลึกให้มากขึ้นทั้งในด้านการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ด้านความเป็นพิษ ความปลอดภัยและผลข้างเคียงของสารสกัด ซึ่งจะนำมาสู่การประยุกต์ใช้สมุนไพรไทยที่ผ่านกระบวนการวิจัยทางวิทยาศาสตร์อย่างมีคุณภาพและสร้างเป็นนวัตกรรมด้านสุขภาพและความงามที่เป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ร่วมกับการใช้ทรัพยากรธรรมชาติของประเทศไทยให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ผลผลิต (Output)

ปีงบประมาณ 2557

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Worrawat Promden, Orawan Monthakantirat, Kaoru Umehara, Hiroshi Noguchi and Wanchai De-Eknamkul. (2014). **Structure and Antioxidant Activity Relationships of Isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*. *Molecules***, 19, 2226-2237.

การประชุมนำเสนอผลงานวิชาการระดับนานาชาติ

Worrawat Promden, Wittawat Viriyabancha, Orawan Monthakantirat and Wanchai De-Eknamkul. **Investigation of In-vitro Antioxidant Potential of Thai Medicinal Plant Extracts.** Proceedings, The 6th Thailand-Japan International Academic Conference 2013, 9 November 2013. Osaka University Japan. 3-6.

ปีงบประมาณ 2558

อยู่ระหว่างการจัดเตรียมบทความวิจัย (Manuscript) เพื่อตีพิมพ์

รายงานสรุปการเงิน ประจำปีงบประมาณ 2558
เลขที่โครงการ (NRPM 13 หลัก 3311100069820)
โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

โครงการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลต่อการสังเคราะห์เมลานิน
ของสารพฤกษเคมีจากแก่นครี้เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากภูมิปัญญาท้องถิ่น

ชื่อหัวหน้าโครงการ อาจารย์ ดร. วรวัฒน์ พรหมเด่น

รายงานการเงินระหว่าง วันที่ 1 ตุลาคม 2557 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2558

หมวด*	งบประมาณ	ค่าใช้จ่าย งวดที่ 1	ค่าใช้จ่าย งวดที่ 2	ค่าใช้จ่ายรวม งวดที่ 1+2	คงเหลือ (หรือ เกิน)
1. ค่าตอบแทน	30,000	15,000	15,000	30,000	0
2. ค่าจ้าง	72,000	36,000	36,000	72,000	0
3. ค่าวัสดุ	80,000	30,000	50,000	80,000	0
4. ค่าใช้สอย	38,000	12,000	26,000	38,000	0
5. ค่าสาธารณูปโภค	30,000	13,000	17,000	30,000	0
รวม	250,000	106,000	144,000	250,000	

*รายละเอียดการใช้งบประมาณแสดงในหน้าถัดไป

<u>จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 บาท 150,000 บาท เมื่อ 2 กุมภาพันธ์ 2558

งวดที่ 2 บาท 100,000 บาท เมื่อ 1 กันยายน 2558

รวม 250,000 บาท

_____ _____

(อาจารย์ ดร. วรวัฒน์ พรหมเด่น) ( )

หัวหน้าโครงการ เจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

รายละเอียดการใช้งบประมาณ

งวดที่ 1

1. งบประมาณที่ได้รับการจัดสรรตลอดโครงการ **250,000 บาท** (สองแสนห้าหมื่นบาทถ้วน)
2. จำนวนเงินที่ได้รับ ในงวดที่ 1 **(A)** **150,000 บาท**
3. ค่าใช้จ่าย
   - 3.1 ค่าตอบแทน
     - 3.1.1 ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการและผู้ร่วมโครงการ 15,000 บาท
   - 3.2 ค่าจ้าง
     - 3.2.1 ค่าวัตถุดิบสมุนไพรแห้ง 2,000 บาท
     - 3.2.2 ค่าจ้างบริการการวิเคราะห์ทางเคมี 24,000 บาท
     - 3.2.3 ค่าจ้างเตรียมสมุนไพรบดแห้งและสกัด 2,000 บาท
     - 3.2.4 ค่าจ้างนักศึกษาช่วยปฏิบัติงาน 8,000 บาท
   - 3.3 ค่าวัสดุ
     - 3.3.1 ค่าสารเคมี 25,000 บาท
     - 3.3.2 ค่าวัสดุสำนักงาน 5,000 บาท
   - 3.4 ค่าใช้สอย
     - 3.4.1 ค่าเดินทางเพื่อใช้ห้องปฏิบัติการนอกสถานที่ 12,000 บาท
   - 3.5 ค่าสาธารณูปโภค
     - 3.5.1 ค่าจัดส่งพัสดุ-จดหมาย ตราไปรษณีย์ยากร 3,000 บาท
     - 3.5.2 ค่าโทรศัพท์ 4,000 บาท
     - 3.5.3 ค่าใช้จ่ายจัดประชุม 6,000 บาท
   - 3.6 รวมค่าใช้จ่ายทั้งสิ้น **(B)** **106,000 บาท**
4. จำนวนเงินที่คงเหลือจากงวดที่ 1 **(A-B)** เป็นจำนวน **44,000 บาท (C)**

งวดที่ 2

1. จำนวนเงินที่ได้รับ ในงวดที่ 2 **(D)** **100,000 บาท**
2. ยอดเงินคงเหลือรวม 2 งวด **(C+D)** **144,000 บาท**
3. ค่าใช้จ่าย
   - 3.1 ค่าตอบแทน
     - 3.1.1 ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการและผู้ร่วมโครงการ 15,000 บาท

3.2 ค่าจ้าง	
3.2.1 ค่าจ้างนักศึกษาช่วยปฏิบัติงาน	36,000 บาท
3.3 ค่าวัสดุ	
3.3.1 ค่าสารเคมี	25,000 บาท
3.3.2 ค่าวัสดุสำนักงาน	25,000 บาท
3.4 ค่าใช้สอย	
3.4.1 ค่าเดินทางเพื่อใช้ห้องปฏิบัติการนอกสถานที่	26,000 บาท
3.5 ค่าสาธารณูปโภค	
3.5.1 ค่าจัดส่งพัสดุ-จดหมาย ตราไปรษณีย์ากร	3,000 บาท
3.5.2 ค่าโทรศัพท์	4,000 บาท
3.5.3 ค่าใช้จ่ายจัดประชุม	10,000 บาท
3.6 รวมค่าใช้จ่ายทั้งสิ้น	**144,000 บาท (E)**
4. จำนวนเงินที่คงเหลือตลอดโครงการ **(C+D) – (E)**	**0 บาท**

บรรณานุกรม

An, R. B., Jeong, G. S., & Kim, Y. C. (2008). **Flavonoids from the heartwood of *Dalbergia odorifera* and their protective effect on glutamate-induced oxidative injury in HT22 cells.** Chem Pharm Bull (Tokyo), 56(12), 1722-1724.

Bentgsath, A., Rusznyak, S., & Szent-Gyorgyl, A. (1937). **Vitamin P**. Nature, 139, 326-327.

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(2), 157-163.

Croft, K. D. (1998). **The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids.** Ann N Y Acad Sci, 854, 435-442.

Czako, M., & Marton, L. (2001). **A heartwood pigment in *Dalbergia* cell cultures.** Phytochemistry, 57(6), 1013-1022.

De-Eknamkul, W., Umehara, K., Monthakantirat, O., Toth, R., Frecer, V., Knapic, L., et al. (2011). **QSAR study of natural estrogen-like isoflavonoids and diphenolics from Thai medicinal plants.** J Mol Graph Model.

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(7), 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(3), 367-375.

Grotewold, E. (2006). **The Science of Flavonoids (Vol. VII).** Ohio, USA: Springer.

Ito, C., Itoigawa, M., Kanematsu, T., Ruangrungsi, N., Mukainaka, T., Tokuda, H., et al. (2003). **Isoflavonoids from *Dalbergia olivari*.** Phytochemistry, 64(7), 1265-1268.

Jansen, P. C. M. (1999). ***Dalbergia parviflora* Roxb.[Internet] Record from Proseabase**. L.P.A. Oyen and Nguyen Xuan Dung (Editors).

PROSEA (Plant Resources of South-East Asia) Foundation, Bogor, Indonesia. http://www.proseanet.org. Accessed from Internet: 10-Jan-2014.

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(3), 229-245.

Kongkamnerd, J., Milani, A., Cattoli, G., Terregino, C., Capua, I., Beneduce, L., et al. (2012). **A screening assay for neuraminidase inhibitors using neuraminidases N1 and N3 from a baculovirus expression system.** J Enzyme Inhib Med Chem, 27(1), 5-11.

Kongkamnerd, J., Milani, A., Cattoli, G., Terregino, C., Capua, I., Beneduce, L., et al. (2011). **The quenching effect of flavonoids on 4-methylumbelliferone, a potential pitfall in fluorimetric neuraminidase inhibition assays.** J Biomol Screen, 16(7), 755-764.

Kubo, I., Nitoda, T., & Nihei, K. (2007). **Effects of quercetin on mushroom tyrosinase and B16-F10 melanoma cells.** Molecules, 12(5), 1045-1056.

Mason, H. S. (1948). **The chemistry of melanin; mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase.** J Biol Chem, 172(1), 83-99.

Narayanan, M. C., Rao, P. R., Shanmugam, N. N., Gopalakrishnan, S. M., & Devi, K. (2007). **Isolation and characterisation of bioactive isoflavonoids from the roots of *Dalbergia horrida*.** Nat Prod Res, 21(10), 903-909.

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(4), 418-425.

Ohguchi, K., Akao, Y., & Nozawa, Y. (2006). **Stimulation of melanogenesis by the citrus flavonoid naringenin in mouse B16 melanoma cells.** Biosci Biotechnol Biochem, 70(6), 1499-1501.

Prochazkova, D., Bousova, I., & Wilhelmova, N. (2011). **Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids.** Fitoterapia. 82(4), 513–523.

Prota, G. (1980). **Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals.** Invest Dermatol, 75(1), 122-127.

Prota, G. (1993). **Regulatory mechanisms of melanogenesis: beyond the tyrosinase concept.** J Invest Dermatol, 100(2 Suppl), 156S-161S.

Prota, G. (2000). **Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint.** Pigment Cell Res, 13(4), 283-293.

Raper, H. S. (1926). **The Tyrosinase-Tyrosine Reaction: Production of l-3.4-Dihydroxyphenylalanine from Tyrosine.** Biochem J, 20(4), 735-742.

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(1), 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(7), 933-956.

Robinson, J. D., Robinson, L. J., & Martin, N. J. (1984). **Effects of oligomycin and quercetin on the hydrolytic activities of the (Na^+/K^+)-dependent ATPase.** Biochim Biophys Acta, 772(3), 295-306.

Schmid, D., Belser, E., & Zülli, F. (2007). **Self-tanning Based on Stimulation of Melanin Biosynthesis.** Cosmetics & Toiletries® magazine, 122, 55-62.

Sies, H. (1997). **Oxidative stress: oxidants and antioxidants.** Exp Physiol, 82(2), 291-295.

Silva, M. M., Santos, M. R., Caroco, G., Rocha, R., Justino, G., & Mira, L. (2002). **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination.** Free Radic Res, 36(11), 1219-1227.

Songsiang, U., Hahnvajanawong, C., & Yenjai, C. (2011). **Cytotoxicity of chemical constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*.** Fitoterapia, 82(8), 1169-1174.

Songsiang, U., Wanich, S., Pitchuanchom, S., Netsopa, S., Uanporn, K., & Yenjai, C. (2009). **Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*.** Fitoterapia, 80(7), 427-431.

Umehara, K., Nemoto, K., Kimijima, K., Matsushita, A., Terada, E., Monthakantirat, O., et al. (2008). **Estrogenic constituents of the heartwood of *Dalbergia parviflora*.** Phytochemistry, 69(2), 546-552.

Umehara, K., Nemoto, K., Matsushita, A., Terada, E., Monthakantirat, O., De-Eknamkul, W., et al. (2009). **Flavonoids from the heartwood of the Thai medicinal plant *Dalbergia parviflora* and their effects on estrogenic-responsive human breast cancer cells.** J Nat Prod, 72(12), 2163-2168.

Wungsintaweekul, B., Umehara, K., Miyase, T., & Noguchi, H. (2011). **Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, *Smilax corbularia* (*Smilacaceae*).** Phytochemistry. 72(6), 495–502.

Yang, H. L., Chen, S. C., Senthil Kumar, K. J., Yu, K. N., Lee Chao, P. D., Tsai, S. Y., et al. **Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an *ex vivo* approach.** J Agric Food Chem, 60(1), 522-532.

Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., et al. (2004). **Flavonoids in food and their health benefits.** Plant Foods Hum Nutr, 59(3), 113-122.

ประวัตินักวิจัย

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

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3311100069820

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)

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 (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

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, 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 NADPH-cytochrome P450 reductase CPR I from *Croton stellatopilosus* Ohba. Phytochemistry 118, 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

2. นางสาวอรวรรณ มนทกานติรัตน์ (Orawan Monthaknatirat , Ph.D)

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3419900961351

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 7

หน่วยงานที่สังกัดและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

หมายเลขโทรศัพท์ 0-4320-2305, 0-4320-2378 ต่อ 1512 โทรสาร 0-4320-2379

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ oramon@kku.ac.th

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ชื่อสถานศึกษา	ได้รับปริญญา/สาขา
2539	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
2542	มหาวิทยาลัยมหิดล	ปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชเคมี)
2549	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต (เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ)

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

ด้านเคมีสังเคราะห์ และผลิตภัณฑ์ของธรรมชาติ ซึ่งรวมถึงการพัฒนาเทคนิคการสกัดแยกสารสำคัญ และการใช้วิธีการทางสเปคโตรสโคปี สำหรับการหาสูตรโครงสร้างของสารองค์ประกอบทางเคมีจากธรรมชาติ ด้านพฤกษนุกรมวิธานของพืช การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเพศและสมอง และเคมีเชิงเภสัชศาสตร์

การเผยแพร่ผลงานวิจัย Publications (5 ปีย้อนหลัง)

งานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

1. Umehara K, Nemoto K, Matsushita A, Terada E, **Monthakantirat O**, De-eknamkul W, et al. Flavonoids from the heartwood of Thai medicinal plant *Dalbergia parviflora* and their effects on estrogenic-rsponsive human breast cancer cells. J. Nat. Prod. 2009; 72, 2163-2168.

2. De-Eknamkul W, Umehara K, **Monthakantirat O**, Toth R, Frecer V, Knapic L, Braiuca P, Noguchi H, Miertus S. QSAR study of natural estrogen-like isoflavonoids and diphenolics from Thai medicinal plants. J Mol Graph Model. 2011; Apr ;29 (6):784-94.

3. 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. The Quenching Effect of Flavonoids on 4-Methylumbelliferone, a Potential Pitfall in Fluorimetric Neuraminidase Inhibition Assays. J Biomol Screen. 2011; Aug ;16 (7):755-64.

4. สุภาวดี ดาวดี, จินดา หวังบุญสกุล, ฉวี เย็นใจ, จันทนา บุญยะรัตน์, **อรวรรณ มนฑกานติรัตน์** การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 5 ชนิดจากรากส่องฟ้าดงโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง Determination of five carbazole alkaloids from the root of *Clausena harmandiana* by High Performance Liquid Chromatography วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. พ.ค.-ส.ค. 2555, 8(2)

5. Waranya Chatuphonprasert, Latiporn Udomsuk**, Orawan Monthakantirat**, Yaowared Churikhit, Waraporn Putalun, Kanokwan Jarukamjorn. Effects of Pueraria mirifica and

miroestrol on the antioxidation-related enzymes in ovariectomized mice. Journal of Pharmacy and Pharmacology Volume 65, Issue 3, pages 447–456, March 2013.

ผลงานวิจัยเสนอในประชุมวิชาการนานาชาติ

Oral Presentation

1. **Monthakantirat, O**, Umehara, K, Luecha, P, Wungsintaweekul, B, Miyase, T and Noguchi, H. Estrogenic and anti-estrogenic compounds from *Afgekia sericea* Craib and *Persicaria tomentosum* Willd. The 1st Current Drug Development International Conference Phuket, Thailand, May 6, 2010.

รางวัลที่ได้เคยได้รับ

พ.ศ. 2552 The AFPS Nagai-Sukri Pre-doctoral Poster Presentation จากการประชุมวิชาการนานาชาติ Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009. Centennial Hall Kyushu University School of Medicine, Japan เรื่อง Neuroprotective effects of extracted compounds from *Clausena Harmandiana* Linn.

พ.ศ. 2552 รางวัลชนะเลิศ ผลงานประเภท Oral presentation สาขา Pharmaceutical Sciences จากการประชุมนานาชาติ The First Annual Northeast Pharmacy research Conference 2009, Khon Kaen เรื่อง Screening of alpha-estrogen receptor agonist from Thai Herbal Database by virtual screening

พ.ศ. 2552 รางวัลรองชนะเลิศอันดับหนึ่ง ผลงานประเภท Oral presentation สาขา Pharmaceutical Sciences จากการประชุมนานาชาติ The First Annual Northeast Pharmacy

research Conference 2009, Khon Kaen เรื่อง Effect of antioxidants on the spatial cognitive deficit induced by scopolamine in mice.

3. นายวิทวัส วิริยะบัญชา (Mr. Wittawat Viriyabancha)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 1101401737177

ตำแหน่งปัจจุบัน เภสัชกรปฏิบัติการ

หน่วยงานที่สังกัดและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สำนักยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 88/24 ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

โทรศัพท์ 02-590-7165 **หมายเลขโทรศัพท์เคลื่อนที่** 0873533922

ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail) Billy_dojo@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ชื่อสถานศึกษา	ได้รับปริญญา/สาขา
2556	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต