



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2557

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลต่อการสังเคราะห์เมลานินของ
สารพฤกษเคมีจากแก่นครีเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากภูมิปัญญาท้องถิ่น

**Evaluation of the Antioxidant and Melanogenesis Properties of
Phytochemicals from *Dalbergia parviflora* Heartwood: To Developing a
New Product Based on the Local Wisdom**

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น และคณะ

กันยายน 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2557

การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลต่อการสังเคราะห์เมลานินของสารพฤกษเคมีจากแก่นครีเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากภูมิปัญญาท้องถิ่น

**Evaluation of the Antioxidant and Melanogenesis Properties of
Phytochemicals from *Dalbergia parviflora* Heartwood: To Developing a
New Product Based on the Local Wisdom**

โดย

วรวัฒน์ พรหมเด่น

อรรรรณ มณฑกานดิรัตน์

วิทวัส วีระยัญชา

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัย

ในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยใน
อุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณอย่างยิ่งในความอนุเคราะห์ของ รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย
ดีเอกนามกุล หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และความร่วมมือของเครือข่ายนักวิจัยต่างประเทศ คือ Asst. Prof.
Dr. Kaoru Umehara และ Professor Dr. Hiroshi Noguchi จาก School of Pharmaceutical
Sciences, University of Shizuoka ประเทศญี่ปุ่น ที่ได้อำนวยความสะดวกในด้าน
ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ทันสมัย ตลอดจนได้รับคำแนะนำด้านเทคนิคและ
วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

บทคัดย่อ

สารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) บริสุทธิ์จำนวน 24 ชนิด ที่สกัดได้จากแก่นของต้นครี (*Dalbergia parviflora*) ได้ถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับหลอดทดลอง (in vitro) ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือ วิธี xanthine/xanthine oxidase (X/XO) วิธี ORAC และวิธี DPPH ในการทดลองนี้สามารถจำแนกสารประกอบประเภทไอโซฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ไอโซฟลาโวน (isoflavone) ไอโซฟลาวาโนน (isoflavanone) และไอโซฟลาแวน (isoflavan) ซึ่งมีความหลากหลายของหมู่แทนที่ในตำแหน่งต่างๆ บนโครงสร้าง ทำให้เกิดแนวคิดในการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ที่ศึกษา (structure activity relationship หรือ SAR) การวิเคราะห์ SAR ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยใช้ผลการวัดค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยพิจารณาจากทั้งหมู่แทนที่ของไอโซฟลาโวนอยด์ระหว่างกลุ่มที่มีรูปแบบหมู่แทนที่แบบเดียวกัน และระหว่างกลุ่มของไอโซฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่แทนที่รูปแบบที่แตกต่างกัน ผลการเปรียบเทียบวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มของไอโซฟลาโวนอยด์ แสดงให้เห็นว่าไอโซฟลาโวนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุดในทั้ง 3 วิธีวิเคราะห์ ในการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ พบว่าจากโครงสร้างพื้นฐานที่มีหมู่ R7-OH ของวงแหวน A และ R4'-OH (หรือ -OMe) ของวงแหวน B หากมีการเพิ่มขึ้นของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของวงแหวน B ที่ตำแหน่ง R3' หรือ R5' จะสามารถเพิ่มฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของไอโซฟลาโวนอยด์ในทุกกลุ่ม ในขณะที่ตำแหน่งของหมู่แทนที่ไฮดรอกซิลและหมู่แทนที่เมทิล (-OMe) ในตำแหน่งอื่นๆ จะพบว่ามีผลต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันขึ้นกับวิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจากความหลากหลายของโครงสร้างของไอโซฟลาโวนอยด์ จาก *D. parviflora* ในการทดลองนี้จึงเป็นรายงานแรกที่มีการชี้ชัดให้เห็นถึงรายละเอียดของความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ สำหรับการศึกษาลงสู่การสังเคราะห์เมลานินของสารพิษจากแก่นครี เบื้องต้นพบว่ามีสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์บางชนิดที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์ ทั้งนี้จะทำการศึกษาเพื่อยืนยันและขยายผลต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : ไอโซฟลาโวนอยด์, สารต้านอนุมูลอิสระ, แก่นครี, เมลานิน

ABSTRACT

The antioxidant activities of 24 isoflavonoids that were previously isolated as pure compounds from *Dalbergia parviflora* were evaluated using three different in vitro antioxidant-based assay systems: xanthine/xanthine oxidase (X/XO), ORAC, and DPPH. The isolates consisted of three subgroups, namely isoflavones, isoflavanones, and isoflavans, each of which appeared to have diversified substituents, and were thus ideal for the study of their structure-activity relationships (SARs). The SAR analysis was performed using the results obtained from both the inter-subgroup isoflavonoids with the same substitution pattern and the intra-subgroup compounds with different substitution patterns. The inter-subgroup comparison showed that the isoflavones exhibited the highest antioxidant activities based on all three assays. The intra-subgroup analysis showed that the additional presence of an OH group in Ring B at either R3' or R5' from the basic common structure of the R7-OH of Ring A and the R4'-OH (or -OMe) of Ring B greatly increased the antioxidant activities of all of the isoflavonoid subgroups and that other positions of OH and OMe substitutions exerted different effects on the activities depending on the subgroup and assay type. Therefore, based on the structural diversity of the isoflavonoids in *D. parviflora*, the present study provides the first clarification of the detailed antioxidant SARs of isoflavonoids. Preliminary studies indicate that some isoflavonoids may effect on melanogenesis stimulation in cell culture and need to be confirmed in further studies.

Keywords : Isoflavonoid, Antioxidant, DPPH, ORAC, 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.....	4
ครี หรือ สักขี (<i>Dalbergia parviflora</i>).....	4
ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids).....	9
ไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoids).....	10
ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์.....	11
ไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี.....	12
อนุมูลอิสระ (free radicals)	14
สารต้านอนุมูลอิสระ.....	16
การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ.....	17
พฤษเคมีและการสังเคราะห์เมลานิน.....	26

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3	
วิธีการดำเนินการวิจัย.....	27
อุปกรณ์และสารเคมี.....	27
การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	29
การวิเคราะห์การยับยั้งการเกิดอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์โดยวิธี แซนทีน/แซนทีน ออกซิเดส (Xanthine/Xanthine Oxidase, X/XO Assay).....	29
การวิเคราะห์การยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซิลโดยวิธีออกซิเจนแรดิคอลแอบซอร์แบนซ์ คาพาซิตี (Oxygen Radical Absorbance Capacity,ORAC).....	30
การวิเคราะห์การกำจัดอนุมูล DPPH [•] (DPPH assay).....	31
การวิเคราะห์การสังเคราะห์เมลานินของเซลล์เพาะเลี้ยง.....	32
บทที่ 4	
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย.....	34
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดจาก <i>D. parviflora</i> ด้วยวิธีแซนทีน /แซนทีนออกซิเดส (xanthine/xanthine oxidase, X/XO assay).....	34
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดจาก <i>D. parviflora</i> ด้วยวิธีออกซิเจน แรดิคอลแอบซอร์แบนซ์คาพาซิตี (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC).....	36
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดจาก <i>D. parviflora</i> ด้วยวิธี DPPH.....	39
ผลการศึกษาเบื้องต้นของฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก <i>D. parviflora</i> ต่อการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์เพาะเลี้ยง.....	47
บทที่ 5	
สรุปผลการวิจัย.....	48
ผลผลิต	50
รายงานสรุปการเงิน.....	51
บรรณานุกรม.....	53
ประวัตินักวิจัย.....	60

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ภาพที่ 2.1 <i>Dalbergia parviflora</i> Roxb. แสดงลักษณะของแก่นครี (วัดถุดิบแห้ง) และเมื่อบดละเอียดเป็นผง.....	5
ภาพที่ 2.2 <i>Dalbergia parviflora</i> Roxb. แสดงลักษณะของใบและผล.....	6
ภาพที่ 2.3 <i>Dalbergia parviflora</i> Roxb. แสดงลักษณะของใบ.....	7
ภาพที่ 2.4 <i>Dalbergia parviflora</i> Roxb. แสดงลักษณะของใบและผล	8
ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์.....	10
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์ 3 ชนิด.....	11
ภาพที่ 2.7 แสดงลักษณะทั่วไปของอนุมูลอิสระซึ่ง.....	15
ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของสารอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน (ROS).....	16
ภาพที่ 2.9 ลักษณะสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือสามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ....	17
ภาพที่ 2.10 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ORAC แสดงผลด้วยค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์กับเวลาและค่าพื้นที่ใต้กราฟสุทธิ (net area under curve).....	21
ภาพที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของ Trolox.....	21
ภาพที่ 2.12 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระ DPPH [•] และรูปรีดิวซ์ของ DPPH.....	23
ภาพที่ 2.13 ค่า SC ₅₀ (concentration providing 50% scavenging).....	24
ภาพที่ 2.14 แผนผังแสดงการใช้ระบบเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส เพื่อผลิตอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และใช้ปฏิกิริยารีดักชันของ XTT เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับของอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์.....	25
ภาพที่ 4.1 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ (a) และไอโซฟลาโวนอยด์ (b).....	41
ภาพที่ 4.2 การลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยการเกิดขึ้นของ AAPH แสดงลักษณะรูปแบบของสัญญาณของตัวอย่างสารทดสอบบางชนิด.....	45

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของสารฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี (<i>Dalbergia parviflora</i>).....	13
ตารางที่ 4.1 ความสัมพันธ์ของโครงสร้างเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ จาก <i>D. parviflora</i> ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ xanthine/xanthine oxidase assay.....	42
ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์ของโครงสร้างเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ จาก <i>D. parviflora</i> ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ ORAC assay.....	43
ตารางที่ 4.3 ความสัมพันธ์ของโครงสร้างเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ จาก <i>D. parviflora</i> ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ DPPH.....	44
ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบไอโซฟลาโวนอยด์ 3 ชนิด ที่มีตำแหน่งของหมู่แทนที่ที่มีรูปแบบ เดียวกันแต่อยู่ในกลุ่มต่างๆ กัน.....	46
ตารางที่ 4.5 ปริมาณเมลานินสัมพัทธ์ที่ผลิตจากเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวหนัง B16F10 murine melanoma cell line ภายใต้การเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสารไอโซฟลาโวนอยด์บางชนิดที่ระดับ ความเข้มข้น 15 μ M.....	47

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในวิถีภูมิปัญญาไทยได้มีการนำพืชสมุนไพรมาใช้เพื่อการบำบัดรักษาโรคมานาน และปัจจุบันได้รับความนิยมและสนใจมากขึ้นจึงส่งผลให้การแพทย์แผนไทยมีบทบาทที่สำคัญมากขึ้น โดยที่การบริการทางสุขภาพแผนไทยนั้นเป็นระบบการดูแลสุขภาพของท้องถิ่นที่มีความผูกพันกับวิถีชีวิตของชาวบ้านสอดคล้องกับความเชื่อและวัฒนธรรมท้องถิ่นมาตั้งแต่โบราณ ดังนั้นในการรักษาในระบบแพทย์แผนไทยนี้จึงมีการนำเอาภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีการถ่ายทอดกันมาตั้งแต่บรรพบุรุษในเรื่องการใช้สมุนไพรต่าง ๆ เข้ามามีส่วนเกี่ยวข้องในการใช้รักษาโรคที่เกิดขึ้นกับคนในชุมชนมากขึ้นด้วยเช่นกัน การวิจัยทางวิทยาศาสตร์เพื่อเป็นการต่อยอดภูมิปัญญาและเพื่อพิสูจน์ยืนยันประสิทธิภาพของสมุนไพรเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งในยุคปัจจุบัน

ครีหรือสักรีเป็นพืชสมุนไพรที่นิยมนำมาเป็นส่วนผสมของยาบำรุงของสตรี การศึกษาทางพฤกษเคมีของแก่นครีพบว่ามีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มากกว่า 60 ชนิด ซึ่งสารฟลาโวนอยด์บางชนิดพบว่ามีฤทธิ์ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง (De-Eknamkul et al., 2011b; Songsiang, Hahnvajjanawong, & Yenjai, 2011; Songsiang et al., 2009; Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009) อีกทั้งมีแนวโน้มเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และบางชนิดมีผลต่อการกระตุ้นและการยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินของเซลล์ผิว ดังนั้นหากมีการวิจัยเชิงลึกของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพฤกษเคมีเหล่านี้ จะทำให้ได้ข้อมูลที่จะสามารถนำมาพัฒนา

เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและความงามได้ และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์จากภูมิปัญญาท้องถิ่นรวมทั้งมีความน่าเชื่อถือตามหลักวิทยาศาสตร์

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทางเคมีของสารสกัดกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์จากแก่นครี
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีของสารไอโซฟลาโวนอยด์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
3. เพื่อศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับผลของสารสกัดจากแก่นครีต่อการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน
4. เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ภูมิปัญญาท้องถิ่น

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. กำหนดขอบเขตการทดลองในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยใช้สารสกัดหยาบแก่นครีและสารบริสุทธิ์กลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่แยกได้จากแก่นครี เพื่อทำการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีทางเคมี 3 วิธี คือ DPPH assay ORAC assay และ X/XO assay โดยที่เทคนิค DPPH assay และ X/XO assay จะรายงานค่า SC₅₀ (50% scavenging concentration) และเทคนิค ORAC assay จะรายงานค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)
2. กำหนดขอบเขตการทดลองในระดับหลอดทดลอง (*in vitro*) เพื่อศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ โดยวิเคราะห์เบื้องต้นเกี่ยวกับผลของสารสกัดจากแก่นครีต่อการสังเคราะห์เม็ดสีจากการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งเม็ดสี ซึ่งเป็นเทคนิค cell based assay

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โดยปกติพืชสมุนไพรไทยมีการนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้านในการรักษาโรคต่างๆ ซึ่งมีความปลอดภัยในระดับหนึ่ง ดังนั้นการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ในเบื้องต้นจะช่วยให้เกิดองค์ความรู้เพิ่มเติมเกี่ยวกับสมุนไพรนั้นๆ (Chen, Chan, Ho, Fung, & Wang, 1996; Fernandez-Panchon, Villano, Troncoso, & Garcia-Parrilla, 2008; Sies, 1997; Silva et al., 2002) แก่นครีเป็นสมุนไพรที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นของไทย โดยพบว่ามีการใช้เป็นยาบำรุงร่างกายและยาสำหรับสตรี (Songsiang, Hahnvajjanawong, & Yenjai, 2011; Songsiang et al., 2009; Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009)

การนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ จะทำให้สามารถพัฒนาขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นที่ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอาง (Grotewold, 2006; Yao et al., 2004) และเป็นการสร้างโอกาสในการพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมที่มาจากภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อกลับคืนสู่ท้องถิ่น อันจะนำมาซึ่งโอกาสในการสร้างรายได้และความยั่งยืน

บทที่ 2

ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ครี หรือ สักขี (*Dalbergia parviflora*)

Dalbergia เป็นจันัส (genus) ของพรรณไม้ขนาดเล็กถึงขนาดกลาง อยู่ในวงศ์ (family) *Fabaceae* และวงศ์ย่อย (subfamily) *Faboideae* พรรณไม้ในจันัสนี้มีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในเขตร้อนได้แก่ 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) อย่างไรก็ตามพรรณไม้หลายสปีชีส์ในจันัส *Dalbergia* มีเพียงไม่กี่สปีชีส์เท่านั้นที่เป็น rosewood

Dalbergia parviflora Roxb. เป็นพรรณไม้ที่จัดอยู่ในวงศ์ *Fabaceae* วงศ์ย่อย *Faboideae* พบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่พม่า ไทย มาเลเซีย หมู่เกาะสุมาตรา มีชื่อสามัญคือ Blackwood และชื่อไทยได้แก่ ครี กระชิก ชิก สรี และ สักขี เป็นต้น มีลักษณะเป็นต้นไม้มีเถาขนาดใหญ่และพัฒนาเป็นแก่นไม้สีดำแดง เมื่อทำการเผาไหม้จะมีกลิ่นหอม ซึ่งในแถบประเทศจีน อินเดีย มาเลเซีย มีการใช้แก่นของ *D. parviflora* ที่บดละเอียดมาเป็นส่วนประกอบของรูป การใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์แผนโบราณพบว่าน้ำมันที่สกัดจากแก่นไม้ด้วยวิธีการกลั่นซึ่งมีลักษณะเป็นสีแดงเหนียวข้นถูกใช้รักษาแผลเปื่อยพุพอง การต้มแก่นไม้ในน้ำเดือดเพื่อ

ใช้เป็นยาบำรุงร่างกาย มีการใช้แก่นไม้เพื่อการนวดให้ร่างกายสดชื่นกระปี้กระเปร่า (Jansen, 1999)

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



ภาพที่ 2.1 *Dalbergia parviflora* Roxb. แสดงลักษณะของแก่นครี (วัตตุติบแห้ง) 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)

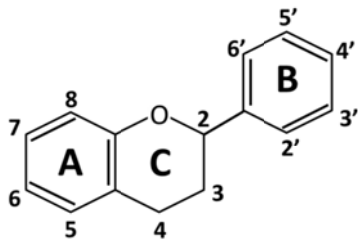
ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

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

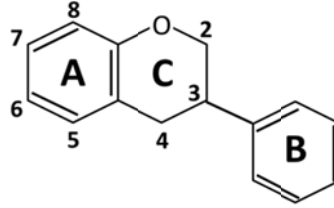
ในเชิงโครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ซึ่งเป็นสารพฤษเคมีในธรรมชาติพบว่ามีโครงสร้างหลักเป็น C6-C3-C6 ประกอบกับการมีหมู่แทนที่ (substitution group) ในตำแหน่งต่างๆ ตามระบบการเรียกชื่อ IUPAC สามารถจัดจำแนกฟลาโวนอยด์ได้ดังนี้

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

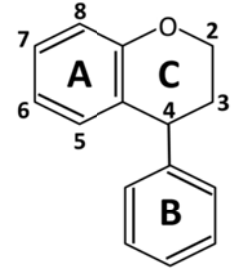
ฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 ชนิด เป็นสารประกอบที่มีหมู่คีโตนและมีโครงสร้างวงแหวน 3 วง เป็นโครงหลัก (flavonoid backbone) โดยทั่วไปวงแหวนแต่ละวงจะมีชื่อคือ A B และ C



flavonoids
(2-phenylbenzopyrans)



isoflavonoids
(3-benzopyrans)



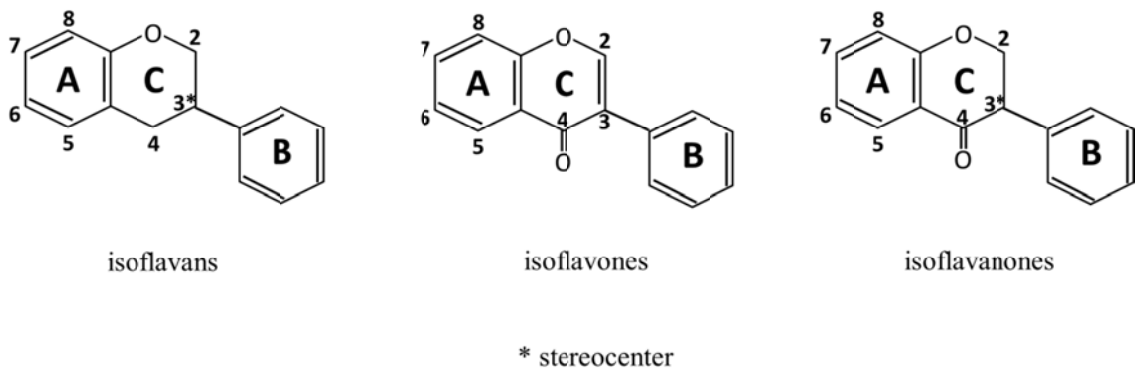
neoflavonoids
(4-benzopyrans)

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 ความหลากหลายของชนิดของไอโซฟลาโวนอยด์ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของหมู่แทนที่บนวงแหวน และยังคงมีความแตกต่างหลากหลายของระดับออกซิเดชันบนวงแหวน (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) ซึ่งเกี่ยวข้องกับความชราภาพรวมถึงโรคเมเร็ง เบาหวาน โรคหัวใจ ความดัน เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีการพบสารพฤกษเคมี (phytochemical) หลายชนิดเป็นองค์ประกอบในพืชสมุนไพรเหล่านั้น ซึ่งได้แก่ สารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ไกลโคไซด์ (glycoside) เทอร์ปีนอยด์ (terpenoid) อัลคาลอยด์ (alkaloid) เป็นต้น จากการศึกษาวิจัยพบว่าสารพฤกษเคมีเหล่านี้สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เช่น example, อัลคาลอยด์มีผลต่อระบบสรีรวิทยาของมนุษย์และสัตว์ (Ferraz et al., 1999), สารประกอบฟีนอลซึ่งรวมถึงฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Fernandez-Pancho, Villano, Troncoso, & Garcia-Parrilla, 2008; Prochazkova, Bousova, & Wilhelmova, 2011), ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง (estrogen-like activity) (De-Eknamkul et al., 2011a; Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009; Wungsintaweekul, Umehara, Miyase, & Noguchi, 2011) และยังสามารถยับยั้งเอนไซม์นิวรา

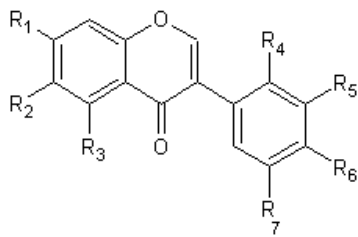
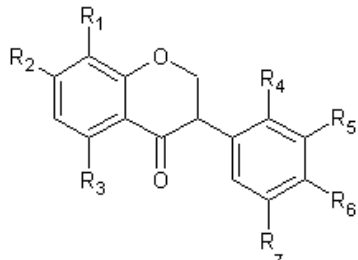
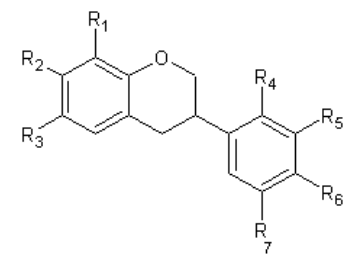
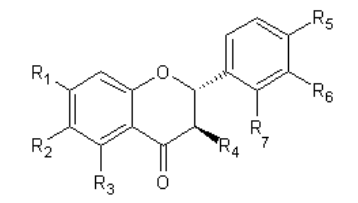
มีนินเดส (neuraminidase) ของ avian influenza virus ได้ (Kongkamnerd et al., 2012; Kongkamnerd et al., 2011)

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

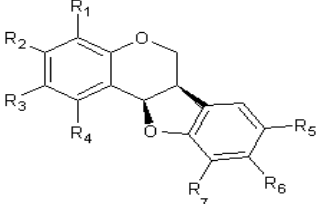
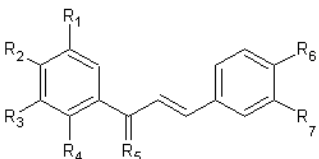
ไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดแยกได้จากแก่นครี

พรรณไม้สปีชีส์ *Dalbergia spp.* พบว่าแก่นไม้ (heartwood) อุดมไปด้วยสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลธรรมชาติ (natural phenolic compound) (An, Jeong, & Kim, 2008; Czako & Marton, 2001; Ito et al., 2003; Narayanan, Rao, Shanmugam, Gopalakrishnan, & Devi, 2007; Songsiang et al., 2009). ในการแพทย์แผน ไทยมีการใช้แก่นครี (*Dalbergia parviflora*) เป็นยาบำรุงสตรีและเพื่อปรับสมดุลภาวะการมีรอบ เดือนให้เป็นปกติ ในการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้สามารถสกัดแยกสารประกอบฟลาโวนอยด์จาก แก่นครีได้มากกว่า 60 ชนิด ซึ่งจำแนกกลุ่มได้เป็น ไอโซฟลาโวน (isoflavone) ไอโซฟลาวาโนน (isoflavanone) ไอโซฟลาแวน (isoflavan) ฟลาโวนน (flavonone) ฟลาวาโนนอล (flavanonol) พีเทอโรคาแพน (pterocarpan) และชาร์โคน (Chalcone) แสดงดังตารางที่ 2.1 (Umehara et al., 2008; Umehara et al., 2009)

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

 <p>Isoflavones</p>	Isoflavones	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	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
 <p>Isoflavanones</p>	Isoflavanones	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	(3R)-7,3'-dihydroxy-4'-methoxy-isoflavanone	H	OH	H	H	OH	OMe	H
	Onogenin	H	OH	H	OMe	H	OCH ₂ O	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)-violanonone	H	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	(3RS)-3'-O-methylviolanonone	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	
 <p>Isoflavans</p>	Isoflavans	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	(3R)-vestitol	H	OH	H	OH	H	OMe	H
	Sativan	H	OH	H	OMe	H	OMe	H
	(3R)(+)-mucronulatol	H	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	(3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol	OH	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	Duartin	OMe	OH	H	OMe	OH	OMe	H
	(3S)-8-demethylduartin	OMe	OH	H	OH	OH	OMe	H
 <p>Flavanones</p>	Flavanones	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	(2S)-liquiritigenin	OH	H	H	H	OH	H	H
	Dalparvinol A	OH	H	H	OH	OH	OMe	H
	(2S)-pinocembrin	OH	H	OH	H	H	H	H
	(2S)-naringenin	OH	H	OH	H	OH	H	H
	(2R,3R)-pinobanksin	OH	H	OH	OH	H	H	H
Alpinetin	OH	H	OMe	H	H	H	H	

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

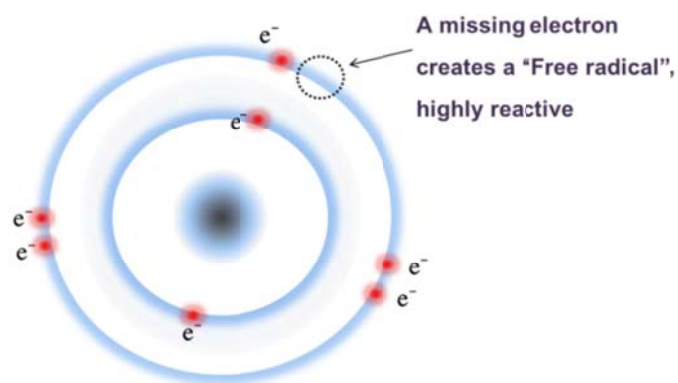
 <p>Pterocarpan</p>	Pterocarpan	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	Medicarpin	H	OH	H	H	H	OMe	H
	(6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan	H	OH	H	H	OH	OMe	H
	I-maackiain	H	OH	H	H	OCH ₂ O	H	H
	Meliltocarpan D	OH	OMe	H	H	H	OMe	OH
 <p>Chalcones</p>	Chalcones	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	Obustyrene	H	OH	H	OMe	H ₂	H	H
	Isoliquiritigenin	H	OH	H	OH	O	OH	H

อนุมูลอิสระ (free radicals)

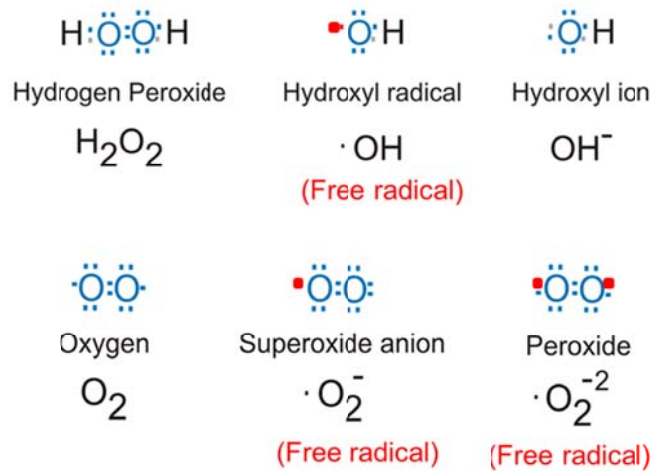
อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นอะตอม หรือ ไอออน หรือ โมเลกุล ที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (unpaired electron) จำนวนหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่ง มีความไม่เสถียร (unstable) และว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี (reactive) โมเลกุลหรือไอออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อเนื่อง ในระบบสิ่งมีชีวิตมีอนุมูลอิสระที่ร่างกายผลิตขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมซึ่งมีบทบาททั้งเป็นประโยชน์และเป็นโทษต่อร่างกาย ซึ่งกลุ่มอนุมูลอิสระจากสิ่งมีชีวิตได้แก่ อนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) อนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจน (reactive nitrogen species, RNS) ตัวอย่างของ ROS ได้แก่ hydroxyl radical (HO[•]) superoxide anion (O₂^{•-}) hydroperoxyl radical (HO₂[•]) peroxy radical (ROO[•]) และ alkoxy radical (RO[•]) ในขณะที่ ROS บางชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีไม่เป็นอนุมูล เช่น hydrogen peroxide (H₂O₂), ozone (O₃) และ singlet oxygen แต่พบว่าสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและเกิด

อนุมูลอิสระได้ ในขณะที่ตัวอย่างของอนุมูลอิสระกลุ่มไนโตรเจน ได้แก่ nitric oxide (NO) (Schöneicha, 1999)

หน้าที่ของอนุมูลอิสระที่มีผลในทางบวกในสิ่งมีชีวิตจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นหรือยับยั้ง กลไกของร่างกาย เช่น การหลั่งของฮอร์โมนและสารคัดหลั่ง การหมุนเวียนโลหิต การสื่อสารระหว่างเซลล์สมอง และกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากพยาธิ แบคทีเรีย ไวรัสหรือเซลล์มะเร็ง แม้ว่าสารอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาโดยมีสาเหตุมาจากระบบเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ซึ่งมีการใช้ออกซิเจนในการสันดาป นอกจากนี้ยังได้รับ ROS มาจากสิ่งแวดล้อมได้แก่ รังสี UV คาร์บอนพิษจากบุหรี่ ไอเสียรถยนต์ ยาและสารเคมี เป็นต้น (Schöneicha, 1999) ในสภาวะที่เซลล์มีผลผลิตหรือได้รับสาร ROS มากขึ้น เซลล์จะมีโอกาสได้รับผลกระทบในทางลบ เช่น การทำลาย DNA โปรตีน เยื่อหุ้มเซลล์ และรบกวนปฏิกิริยาต่างๆ ในเซลล์ มีผลทำให้ร่างกายเกิดความเสื่อม ความแก่ชรา และมีโอกาสเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ โรคเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Benzi & Moretti, 1995; Levy, 2006; Nishikawa, 2008; Ono, Hamaguchi, Naiki, & Yamada, 2006; Schöneicha, 1999)



ภาพที่ 2.7 แสดงลักษณะทั่วไปของอนุมูลอิสระซึ่งมีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (unpaired electron) มีความไม่เสถียรและว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา

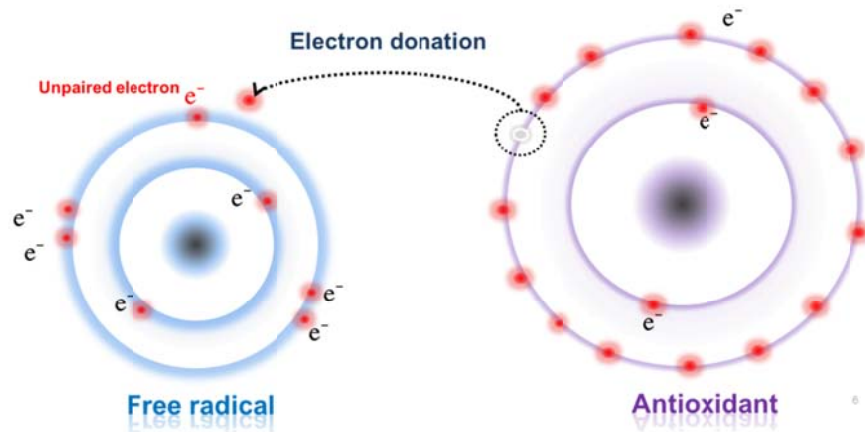


ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของสารอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน (ROS) แสดง unpaired electron ด้วยจุดสีแดง

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) คือสารที่ทำลายอนุมูลอิสระหรือยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถจำแนกออกเป็น 2 ประเภทคือ สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ และไม่เอนไซม์ ลักษณะสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือสามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระหรือสารที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนนั้น ความสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระในระบบชีวภาพคือทำหน้าที่ป้องกันสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก และโครงสร้างของเซลล์ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ และ ออร์แกเนลล์ มิให้ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ (Levy, 2006; Ono, Hamaguchi, Naiki, & Yamada, 2006) ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ได้แก่ superoxide dismutase (SOD) catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPX) เป็นต้น และตัวอย่างสารชีวโมเลกุลที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเซลล์ตามธรรมชาติได้แก่ กลูตาไธโอน (glutathione) อัลบูมิน (albumin) ทอรีน (taurine) กรดยูริก (uric acid) แคโรทีน (carotene) กรดไดไฮดรอลิโปอิก (dihyrolipoic acid) พอลิเอมีน (polyamine)

และไฟบริโนเจน (fibrinogen) เป็นต้น ในขณะที่สารพิษทุกชนิดและวิตามินที่พบในอาหารตามธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ วิตามิน A C E สารฟลาโวนอยด์และพอลิฟีนอลต่างๆ เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำลายอนุมูลอิสระโดยการจับกับอนุมูลอิสระ (free radical scavenging antioxidant) เพื่อลดการเกิดเริ่มต้นปฏิกิริยาหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่



ภาพที่ 2.9 ลักษณะสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระคือสามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่จะเกิดเป็นลูกโซ่

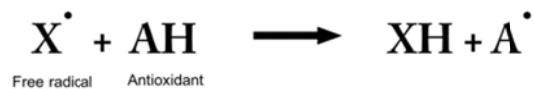
การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

การตรวจวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระคือการประเมินประสิทธิภาพความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระหรือลดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ของสารที่สนใจ หลักการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภทตามจลนศาสตร์และกลไกการเกิดปฏิกิริยา คือ

หลักการวิเคราะห์แบบ hydrogen atom transfer (HAT)

เป็นการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการการถ่ายทอดอะตอมไฮโดรเจนซึ่งปฏิกิริยาแบบ HAT เป็นปฏิกิริยาที่มีจลนศาสตร์ของปฏิกิริยาแบบแข่งขัน (competitive reaction) โดยมีการแข่งขันระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระและสารตั้งต้น (substrate) ในการเข้าจับกับอนุมูลอิสระประเภท peroxy radicals ที่สังเคราะห์จากการสลายตัวของสารกลุ่มเอโซ (azo compounds) ตัวอย่างของเทคนิคการวิเคราะห์แบบ HAT ได้แก่ การยับยั้งการเกิด auto-oxidation ของ Low-density lipoprotein, Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC), Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) และ Crocin bleaching assays เป็นต้น (Apak et al., 2013; Huang, Ou, & Prior, 2005; Prior, Wu, & Schaich, 2005)

การวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจนสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

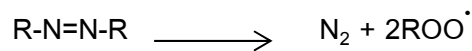


ความว่องไวของสารต้านออกซิเดชันหรือการวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับ จลนศาสตร์การแย่งจับ (competitive kinetics) ไม่ขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายหรือค่า pH ในปฏิกิริยา ปฏิกิริยาส่วนใหญ่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระดับวินาทีหรือนาที ในที่นี้จะกล่าวถึงการวิเคราะห์แบบ HAT ด้วยเทคนิค Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC)

ORAC เป็นการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการสร้างอนุมูลอิสระเปอร์ออกซิลจากสารตั้งต้นคือ 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) เมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับ Fluorescent probe จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ซึ่งสามารถติดตามวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ลดลงได้ ในขณะที่เติมสารต้าน

ออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระลงไป สารเหล่านั้นจะทำปฏิกิริยากำจัดอนุมูลเปอร์ออกซิล ทำให้ Fluorescent probe มีความคงตัวมากขึ้น (Prior et al., 2003) การเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จะคงอยู่ได้นานเมื่อเทียบกับการทดลองที่ไม่มีการเติมสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ สมการโดยทั่วไปเขียนได้ดังนี้

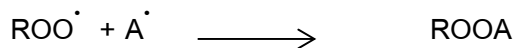
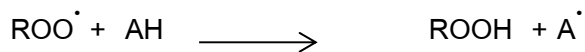
1. การสร้างอนุมูลเปอร์ออกซิล



2. การทำปฏิกิริยาของอนุมูลเปอร์ออกซิลกับ Fluorescent probe (ไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระ)

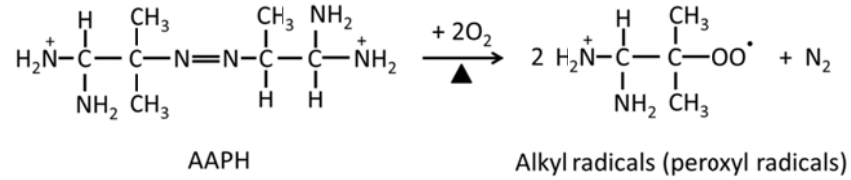


3. ในสภาวะที่เติมสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ

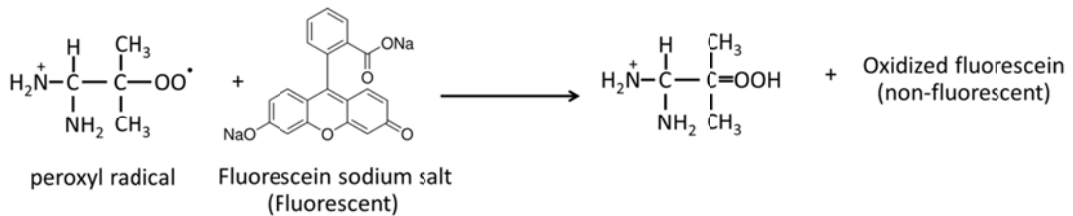


ในยุคแรกเริ่มเทคนิค ORAC ได้พัฒนาโดย Ghiselli และคณะ (Ghiselli, Serafini, Maiani, Azzini, & Ferro-Luzzi, 1995) และมีการปรับปรุงโดย Cao และคณะ. (Cao, Alessio, & Cutler, 1993) ในการทดลองมีการใช้ AAPH เพื่อเป็นสารตั้งต้นในการสร้างอนุมูลอิสระ โดยการให้สลายตัวภายใต้อุณหภูมิ 37 °C และใช้ Fluorescein sodium salt เป็น Fluorescent probe สามารถเขียนสมการได้ดังนี้

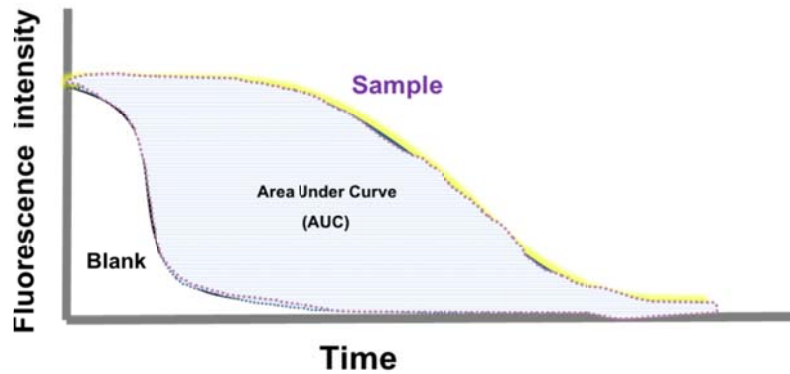
1. การสร้างอนุมูลเปอร์ออกซิล จาก AAPH



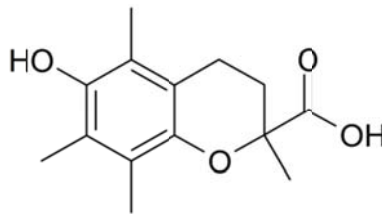
2. การทำปฏิกิริยาของอนุมูลเปอร์ออกซิลกับ Fluorescent probe



การวิเคราะห์ความสามารถต้านออกซิเดชันทำได้โดยการคำนวณความแตกต่างของพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) ของความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับค่าระดับแสงฟลูออเรสเซนต์สัมพัทธ์ (relative fluorescent intensity) ของการทดลองที่มีและไม่มีสารต้านออกซิเดชันหรือสารต้านอนุมูลอิสระ ค่า ORAC ที่ซึ่งใช้บอกระดับความสามารถต้านออกซิเดชันจะรายงานในรูปของค่าสมมูลของ Trolox (Trolox equivalent) ที่ได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเมื่อใช้สารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยมีหน่วยของค่า ORAC เป็น ไมโครโมลของ Trolox equivalent (TE) ต่อน้ำหนัก หรือปริมาตรของสารตัวอย่าง เช่น $\mu\text{mol of TE/L}$ หรือ $\mu\text{mol of TE/mg sample}$



ภาพที่ 2.10 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ORAC แสดงผลด้วยค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์กับเวลาของการทดลองกลุ่ม sample และ blank ทำให้เกิดค่าพื้นที่ใต้กราฟสุทธิ (net area under curve)

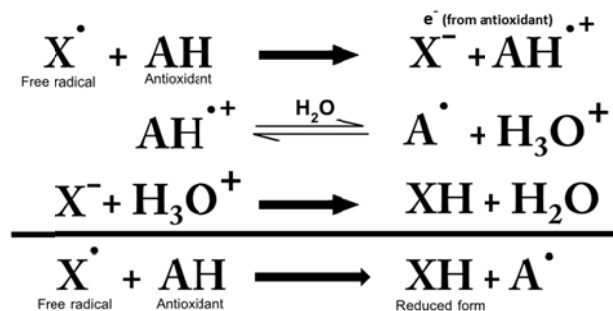


ภาพที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของ Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) ซึ่งเป็น water-soluble analog ของวิตามิน E และใช้เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ORAC

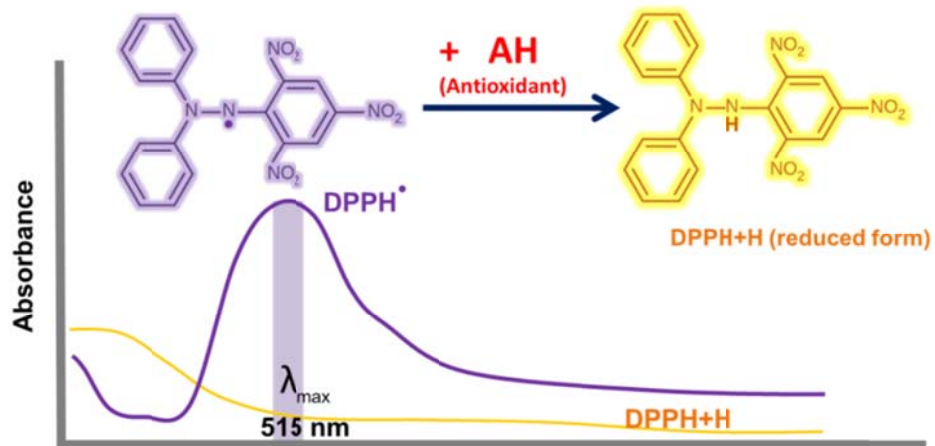
หลักการวิเคราะห์แบบ electron transfer (ET)

การวิเคราะห์แบบ ET เป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน การวิเคราะห์หาค่าศักยภาพหลักการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ซึ่งวัดความสามารถการต้านออกซิเดชันในการให้อิเล็กตรอน (reduction reaction) แก่สารออกซิแดนต์ เมื่อสารออกซิเดนต์นั้นๆ ให้อิเล็กตรอน (reduced) จะมีการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่สัมพันธ์กับปริมาณสารต้านออกซิเดชัน ตัวอย่างเทคนิคการวิเคราะห์แบบ ET ได้แก่ Folin-ciocalteu reagent (FCR), Trolox equivalence antioxidant capacity (TEAC), Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), และ DPPH เป็นต้น (Apak et al., 2013; Huang, Ou, & Prior, 2005; Prior, Wu, & Schaich, 2005)

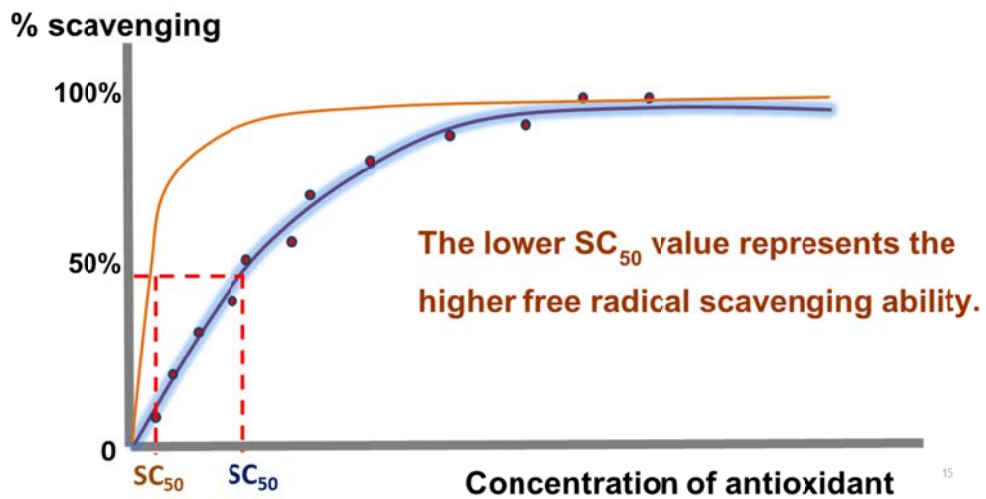
ความว่องไวของปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเล็กตรอนขึ้นอยู่กับ การปลดปล่อยโปรตอน (deprotonation) และ ionization potential ดังนั้นปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจึงขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลายในปฏิกิริยา ซึ่งหากสารละลายมีค่า pH สูงขึ้นจะทำให้ค่า ionization potential ลดลง และความสามารถการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจะเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม อัตราการเกิดปฏิกิริยาการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจะเกิดขึ้นได้ช้ากว่าปฏิกิริยาการถ่ายเทไฮโดรเจน สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้



ในกรณีนี้จะกล่าวถึงการวิเคราะห์แบบ ET ด้วยเทคนิค 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) อนุมูล DPPH[•] เป็นอนุมูลอิสระชนิด organic nitrogen radical ที่มีความเสถียร และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH[•] เกิดปฏิกิริยารีดักชันหรือได้รับอิเล็กตรอนจะมีการเปลี่ยนสีจากสีม่วงกลายเป็นสีเหลือง ซึ่งการเปลี่ยนสีนี้สามารถติดตามโดยใช้เทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีได้ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันหรือต้านอนุมูลอิสระสามารถคำนวณในรูปร้อยละของความสามารถในการกำจัด DPPH[•] และคำนวณหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างในช่วงที่สามารถกำจัดอนุมูล DPPH[•] ได้ร้อยละ 50 ของปริมาณเริ่มต้น ซึ่งเรียกว่าค่า SC₅₀ (50% radical scavenging concentration) (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995)



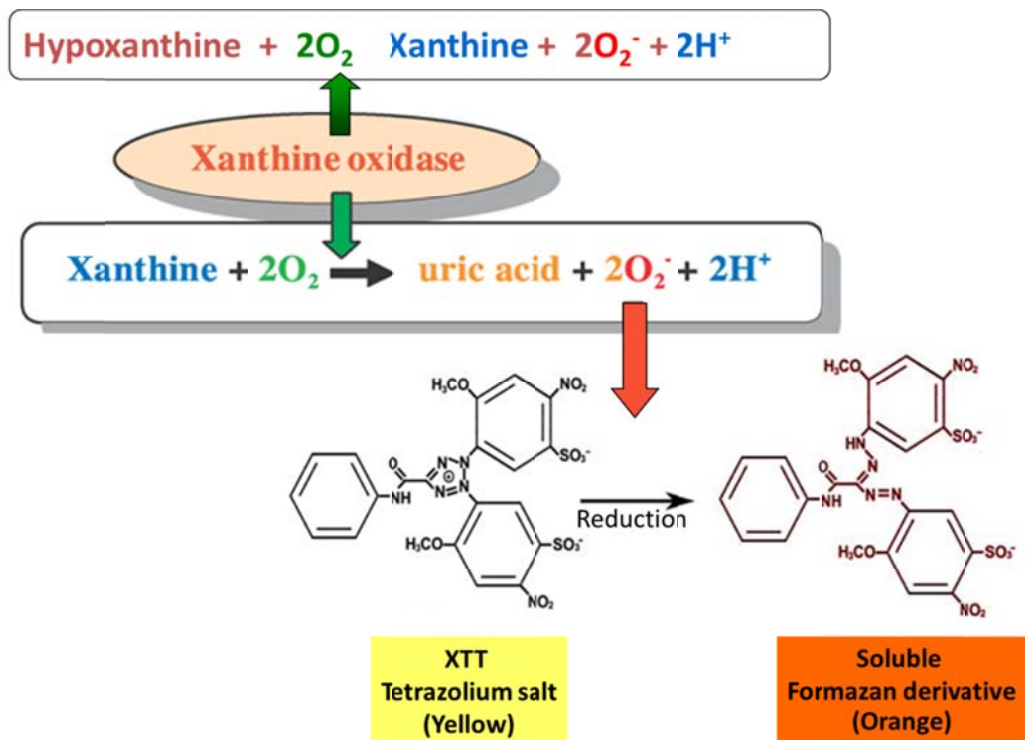
ภาพที่ 2.12 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของอนุมูลอิสระ DPPH[•] และรูปรีดิวซ์ของ DPPH[•] ซึ่งจะถูกเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรีที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร



ภาพที่ 2.13 ค่า SC_{50} (concentration providing 50% scavenging) คือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ปริมาณสารอนุมูลอิสระถูกกำจัดไปร้อยละ 50 สามารถคำนวณได้โดยใช้ calibration curve ที่วาดจากค่าร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้นต่างๆ

นอกจากหลักการวิเคราะห์แบบ ET และ HAT ยังมีการวิเคราะห์สารอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจน (ROS) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความสัมพันธ์กับระบบชีวภาพ กรณีนี้จะใช้อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical) ที่ผลิตขึ้นจากระบบ xanthine/xanthine oxidase (X/XO) ซึ่งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase, XOD) จะเร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) เป็นแซนทีนและกรดยูริกตามลำดับ ในปฏิกิริยาจะมีการผลิตผลพลอยได้เป็น $O_2^{\cdot -}$ (superoxide anion) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระชนิดออกซิเจน ในการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระจะมีการเติม XTT (XTT (2, 3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้การมีอนุมูลอิสระ ในสภาวะที่มีอนุมูลอิสระชนิดซูเปอร์ออกไซด์ XTT จะถูกรีดิวซ์ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้และมีสีส้ม (formazan) สามารถตรวจวัดด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาว

คลื่น 475 นาโนเมตรได้ และเมื่อมีการเติมสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดการยับยั้งการรีดิวซ์ ค่าร้อยละของการยับยั้งการรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดสามารถนำมาคำนวณหาค่า SC_{50} ได้เช่นเดียวกับวิธี DPPH



ภาพที่ 2.14 แผนผังแสดงการใช้ระบบเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส เพื่อผลิตอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์และใช้ปฏิกิริยารีดักชันของ XTT เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับของอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์

พฤษเคมีและการสังเคราะห์เมลานิน

การศึกษาผลของสารพฤษเคมีต่อการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของเซลล์ผิวหนัง โดยส่วนมากพบว่ามีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ในหลอดทดลอง โดยวัดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลง L-dopa ให้กลายเป็น dopachrome ซึ่งเป็นสารที่มีสี (Chang, 2009; Shimizu, Kondo, & Sakai, 2000) และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน (melanogenesis) ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยง (Matsuda, Nakashima, Oda, Nakamura, & Yoshikawa, 2009) โดยใช้เซลล์มะเร็งเม็ดสีของหนู (B16F10 murine melanoma) เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับทำให้ผิวขาวขึ้น อย่างไรก็ตามอาจมีพฤษเคมีบางชนิดที่สามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินได้ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันผมหงอกได้ มีรายงานถึงฤทธิ์ของฟลาโวนอยด์บางชนิดที่ยับยั้งการสร้างเมลานิน (Fujii & Saito, 2009; Matsuda, Nakashima, Oda, Nakamura, & Yoshikawa, 2009) และบางชนิดกระตุ้นการสร้างเมลานิน (Kubo, Nitoda, & Nihei, 2007; Ohguchi, Akao, & Nozawa, 2006) ซึ่งหากมีการศึกษาคุณสมบัติเหล่านี้จากสารสกัดแก่นครีและผนวกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อใช้เสริมสุขภาพหรือเป็นเครื่องสำอางได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. Microplate Reader Spectrophotometer UV/VIS
3. Microplate Reader Spectrophotometer Fluorescent
4. 96-wells plate
5. Pipette 2, 10,20, 100, 200, 1000 μ l
6. Multi-Chanel pipette 20 μ l

สารเคมี

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA)
2. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox™)
(Sigma-Aldrich, USA)
3. Sodium fluorescein (Sigma-Aldrich, USA)
4. 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH)
(Sigma-Aldrich, USA)
5. (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) (Sigma-Aldrich, USA)
6. Xanthine oxidase (EC 1.1.3.22, Grade IV) (Sigma-Aldrich, USA)

7. Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, USA)
8. Methanol
9. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
10. Monosodium phosphate - Disodium hydrogen phosphate
11. PrestoBlue[®] reagent (Gibco[®])
12. DMEM medium (Gibco[®])
13. Fetal bovine serum (Gibco[®])
14. Penicillin / Steptomycin (Gibco[®])
15. Trypsin-EDTA (Gibco[®])
16. Soybean Trypsin Inhibitor (Gibco[®])
17. 10X Phosphate buffer (Gibco[®])
18. Isoflavonoids of *D. parviflora* (Umehara et al., 2008; Umehara et al.,

2009).

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์การยับยั้งการเกิดอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์โดยวิธีแซนทีน/แซนทีนออกซิเดส (Xanthine/Xanthine Oxidase, X/XO Assay)

อนุมูลอิสระชนิดออกซิเจน (Reactive oxygen specie) ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้ระบบแซนทีน/แซนทีน ออกซิเดส ตามที่อธิบายโดย McCord และ Fridovich (McCord & Fridovich, 1968) เอนไซม์แซนทีนออกซิเดสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนคือการเปลี่ยนไฮโปแซนทีนให้เป็นแซนทีน และเปลี่ยนแซนทีนให้เป็นกรดยูริก โดยมีการใช้ออกซิเจนเป็นสับสเตรทร่วมและเกิดผลิตภัณฑ์เป็นอนุมูลอิสระซูปเปอร์ออกไซด์ ($\cdot\text{O}_2^-$) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) การเกิดอนุมูลอิสระสามารถตรวจวัดได้ทางอ้อมโดยการวัดอัตราปฏิกิริยารีดักชันของ XTT (2, 3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) ไปเป็นสารละลายสีส้มของฟอร์มazan (orange formazan dye) ในปฏิกิริยาประกอบด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM NaHCO_3 (pH 9.4) ที่มี 1 mM EDTA จำนวน 120 μL สารละลาย 0.5 mM hypoxanthine จำนวน 20 μL และ สารละลาย 0.25 mM XTT จำนวน 20 μL สารสกัดตัวอย่างจำนวน 20 μL ทำละลายใน 50% DMSO (ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO ในปฏิกิริยา คือ 5.0%) ในกรณีชุดการทดลองควบคุม ใช้ 50% DMSO จำนวน 20 μL แทนสารสกัดตัวอย่าง ในการเริ่มต้นปฏิกิริยาให้เติมสารละลายเอนไซม์แซนทีนออกซิเดสความเข้มข้น 100 mU/mL จำนวน 20 μL ทำการวัดอัตราการเกิด XTT ในรูปรีดิวซ์ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร (Beckman Coulter AD 200 UV/VIS Plate Reader) ที่เวลาเริ่มต้นและที่เวลา 10 นาที ร้อยละการกำจัดอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์สามารถคำนวณได้ดังนี้

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

เมื่อ ΔA_c = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ที่เวลา 10 นาที และ 0 นาที ของการทดลองกลุ่มควบคุม

ΔA_s = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ที่เวลา 10 นาที และ 0 ของการทดลองกลุ่มที่ใช้สารสกัด

ค่า SC_{50} (concentration providing 50% scavenging) สามารถคำนวณได้จากการวาดกราฟของร้อยละการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (% Scavenging effect) กับค่าความเข้มข้นของสารสกัดแล้วสร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นเพื่อเทียบกลับเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้มีการกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 50

การวิเคราะห์การยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซิลโดยวิธีออกซิเจน แรดิคอล แอบซอร์เบนต์ คาพาซิตี (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC)

การวิเคราะห์การยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซิลโดยวิธีออกซิเจน แรดิคอล แอบซอร์เบนต์ คาพาซิตี หรือ ORAC ดัดแปลงจากวิธีของ Huang และคณะ (Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan, & Prior, 2002; Prior et al., 2003) ในการวิเคราะห์จะให้จานหลุมสี่ดำที่ขนาด 96 ช่อง ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเป็น 200 μ L ประกอบด้วยสารละลาย 10 nM fluorescein ใน 10 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 จำนวน 160 μ L สารสกัดตัวอย่างทำละลายใน 50% DMSO จำนวน 20 μ L (ในการนี้การทดลองชุดควบคุมใช้ 50% DMSO จำนวน 20 μ L แทนสารสกัดตัวอย่าง) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเริ่มต้นปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 240 mM AAPH จำนวน 20 μ L เป็นการเริ่มต้นการเกิดปฏิกิริยาการผลิตอนุมูลเปอร์ออกซิลโดยการสลายตัวของ AAPH ให้เริ่มทำการวัดค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 °C ทุกๆ 90 วินาที เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้เทคนิคฟลูออโรสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Beckman

Coulter DTX880 Multimode Detector) ที่ความยาวคลื่นภาวะกระตุ้น (excitation wavelength) 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นภาวะปลดปล่อย (emission wavelength) 530 นาโนเมตร สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานให้ปฏิบัติในทำนองเดียวกันโดยใช้สารละลาย Trolox™ ใน 50% DMSO ที่ความเข้มข้น 50 25 12.5 และ 6.25 μM ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ลดลงเมื่อเวลาผ่านไปจะทำให้เกิดพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC) ซึ่งสามารถคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟได้โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism พื้นที่ใต้กราฟของสารตัวอย่างให้นำมาหักออกจากพื้นที่ใต้กราฟของกลุ่มควบคุมจะได้พื้นที่ใต้กราฟสุทธิ (net AUC) ในขณะเดียวกันสร้างกราฟมาตรฐานของพื้นที่ใต้กราฟของ Trolox™ ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟสุทธิของสารสกัดทดสอบมาเปรียบเทียบกับรายงานค่าการยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซิล (ค่า ORAC) โดยรายงานในหน่วยสมมูลย์กับจำนวนโมลของ Trolox™ ($\mu\text{mole Trolox equivalent, TE}$)

การวิเคราะห์การกำจัดอนุมูล DPPH[•] (DPPH assay)

การวิเคราะห์การกำจัดอนุมูล DPPH[•] ใช้เทคนิคที่ดัดแปลงจาก Blois (Blois, 1958) โดยใช้สารสกัดตัวอย่างที่ทำละลายใน 50% DMSO ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 μL เติมลงในจานชนิด 96 หลุม (96-well micorplate) (กรณีกลุ่มควบคุมใช้ 50% DMSO จำนวน 5 μL และกรณีกลุ่มควบคุมผลบวกใช้สารละลายวิตามิน ซี ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 μL) จากนั้นเติมสารละลาย 100 μM DPPH ในเมทานอล จำนวน 195 μL ปิดฝาจานหลุมแล้วนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ค่าการรีดิวซ์อนุมูล DPPH[•] จากการทำปฏิกิริยาของสารตัวอย่างที่มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระจะสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{Scavenging effect (\%)} = [(A_C - A_S) / A_C] \times 100$$

เมื่อ A_C = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ของการทดลองกลุ่มควบคุม

A_S = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ของการทดลองกลุ่มที่ใช้สารสกัด

ทดสอบที่ความเข้มข้นใดๆ

ค่า SC_{50} (concentration providing 50% scavenging) สามารถคำนวณได้จากการวาดกราฟของร้อยละการกำจัดอนุมูล DPPH \cdot (% Scavenging effect) กับค่าความเข้มข้นของสารสกัดแล้วสร้างสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นเพื่อเทียบกลับเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้มีการกำจัดอนุมูล DPPH \cdot ร้อยละ 50

การวิเคราะห์การสังเคราะห์เมลานินของเซลล์เพาะเลี้ยง

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็้วผิวหนังของหนูชนิด *Mus musculus* (mouse) melanoma cell line, B16-F10 (ATCC® Number: CRL-6475™) โดยใช้อาหารเหลวเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, phenol red-free medium) และผสม 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 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเซลล์เจริญขึ้นเต็มจานเพาะเชื้อ จึงทำการ ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวด้วยสารละลาย Trypsin และทำการกระจายเซลล์ด้วยอาหารเหลวใหม่ให้มีความเข้มข้นเซลล์ 10,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แบ่งออกใส่จานหลุม (24-well plate) หลุมละ 0.5 mL (จะได้หลุมละ 50,000 เซลล์) บ่มเซลล์ภายใต้สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งเซลล์ยึดเกาะกับพื้นผิวสม่ำเสมอดี จากนั้นจึงเติมอาหารใหม่เพิ่มอีก 0.5 mL โดยมีการผสมสารสกัดไอโซฟลาโวนอยด์ที่ต้องการทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ และในกลุ่มควบคุมให้เติมตัวทำละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5% บ่มเซลล์ต่อไป

อีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งจะสามารถสังเกตเห็นเซลล์กลุ่มควบคุมมีการผลิตรงควัตถุออกมาในสารละลายอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นสีน้ำตาล ในการวิเคราะห์ปริมาณเมลานินทั้งหมด (total melanin content) จะทำการวิเคราะห์จากเมลานินที่อยู่ในเซลล์และเมลานินที่หลั่งออกมาในอาหารเหลว โดยการเติมสารละลาย 2N NaOH ใน 20% DMSO จำนวน 0.5 mL ลงไปในหลุมเพาะเซลล์โดยตรง ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงจนสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ที่สกัดแล้วมาแยกเอาเศษเซลล์ออกโดยการหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงเป็นปริมาณเมลานินสัมพันธ์กับการทดลองชุดควบคุม

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดจาก *D. parviflora* ด้วยวิธี

แซนทีน/แซนทีน ออกซิเดส (xanthine/xanthine oxidase, X/XO assay)

ในการศึกษานี้ได้สังเคราะห์อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ($\cdot\text{O}_2^-$) โดยใช้ระบบของ xanthine/xanthine oxidase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องโดยการออกซิเดชันไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) ให้เป็นแซนทีน (xanthine) และเปลี่ยนจากแซนทีนเป็นกรดยูริก (uric acid) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) (Mc Cord & Fridovich, 1968). ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (scavenging activity) ของไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดจาก *D. parviflora* แสดงดังตารางที่ 4.1 ซึ่งสามารถสังเกตได้ว่าสารไอโซฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์สูง ในกลุ่มไอโซฟลาโวน (isoflavone) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง calycosin (5), khirone B (4) และ khirone C (8) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ได้สูงที่สุดโดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (SC_{50}) เป็น 0.25 0.60 และ 0.67 μM ตามลำดับ ตามด้วยกลุ่มไอโซฟลาแวน (isoflavan) ได้แก่ (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (24) และ (3R)-vestitol (21) มีค่า SC_{50} เป็น 2.8 และ 6.4 μM ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มไอโซฟลาวาโนน (isoflavanone) มีเพียง (3RS)-kenusanone G (15) เท่านั้นที่มีแสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระซึ่งมีค่า SC_{50} เป็น 8.6 μM จุดนี้ชี้ให้เห็นว่าในสารไอโซฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 กลุ่ม มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทั้ง 3 โดยเลือกพิจารณาสารประกอบชนิดที่มีหมู่แทนที่ใน

รูปแบบเดียวกัน (substitution pattern) ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า khrinone (**8**) มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์สูงกว่า (3S)-8-demethylduartin (**22**) และสูงกว่า (3S)-secundiflorol H (**17**) จึงสามารถเรียงลำดับประสิทธิภาพการต้านอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ได้คือไอโซฟลาโวน > ไอโซฟลาแวน > ไอโซฟลาวาโนน

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ทั้ง 3 กลุ่มย่อย โดยพิจารณาจากรูปแบบของหมู่แทนที่พบว่าสิ่งที่มีเหมือนกันของไอโซฟลาโวนอยด์ทั้งหมดคือการมีหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง R7 บนวงแหวน A และหมู่ -OMe ที่ตำแหน่ง R4' และการมีหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง R3' หรือ R5' (ตารางที่ 4.1) อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง R7 และมีหมู่ -OMe ที่ตำแหน่ง R4' แต่หากในตำแหน่งอื่นๆ ไม่มีหมู่แทนที่ใดๆ จะพบว่ามีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ค่อนข้างต่ำมาก ดังตัวอย่างของ formononetin (**1**) ซึ่งมีค่า SC_{50} เป็น 117 μM ซึ่งบ่งชี้ว่าหมู่แทนที่ -OH ในตำแหน่ง R7 และหมู่แทนที่ -OMe ในตำแหน่ง R4' นั้นไม่มีความสำคัญ

ในการวิเคราะห์ตำแหน่ง R2' ของวงแหวน B พบว่าการมีหมู่แทนที่ -OMe ที่ตำแหน่ง R2' สามารถลดระดับผลบวกที่เกิดจากการมีหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง R3' และ R5' ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มไอโซฟลาวาโนน ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.1 โดยสังเกตได้จากโครงสร้างของ (3RS)-kenuanone G (**15**) และ (3S)-secundiflorol H (**17**) ที่มีความแตกต่างกันเพียงตำแหน่ง R2' โดยเปลี่ยนจาก -H เป็นหมู่แทนที่ -OMe แต่มีผลทำให้ค่า SC_{50} แตกต่างกันอย่างมาก (8.6 และ 247 μM ตามลำดับ)

จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าหมู่แทนที่ -OH ที่ตำแหน่ง R3' และ R5' ในสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์สามารถส่งเสริมฤทธิ์การกำจัดอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี X/XO ในขณะที่หมู่แทนที่ -OMe ที่ตำแหน่ง R2' กลับทำหน้าที่ลดความแรงในการกำจัดอนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการกล่าวถึงการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ

ความสัมพันธ์เชิงโครงสร้างทางเคมีของไอโซฟลาโวนอยด์ต้านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี X/XO ค่อนข้างน้อย ซึ่งเคยมีรายงานว่า genistein มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.1 ถึง 4.0 μM ในขณะที่มีรายงานว่า calycosin ที่ความเข้มข้น 35 μM สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) ได้ร้อยละ 52% ในขณะที่ formononetin มีรายงานว่าไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (Yu, Bao, An, & Yang, 2009) อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบว่า calycosin (**5**) ฤทธิ์กำจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ที่สูงกว่า genistein (**3**) เคยมีการเสนอว่าหมู่แทนที่ตำแหน่ง R4' ที่เป็น -OH และต้องไม่เป็น -OMe จะมีความสำคัญต่อผลการกำจัดอนุมูลอิสระมาก โดยมีรายงานที่สนับสนุนแนวคิดนี้คือการศึกษาไอโซฟลาโวนอยด์จากถั่วเหลือง ซึ่งมีข้อสรุปว่า genistein มีฤทธิ์สูง daidzein มีฤทธิ์ปานกลาง และ biochanin A ไม่มีฤทธิ์ (Wei, Bowen, Cai, Barnes, & Wang, 1995) ในทางตรงกันข้ามการศึกษาวิจัยครั้งนี้กลับพบว่าหมู่แทนที่ในตำแหน่ง R4' ไม่ว่าจะ เป็น -OH หรือ -OMe ล้วนแต่ไม่มีความสำคัญในเชิงการเพิ่มฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดจาก *D. parviflora* ด้วยวิธีออกซิเจน แรดิคอล แอบซอร์เบ้นซ์ คาพาซิตี (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC)

เทคนิค ORAC เป็นวิธีการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลเปอร์ออกซิล ($\text{ROO}\cdot$) (Cao, Alessio, & Cutler, 1993). โดยอาศัยหลักการยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซิลที่สังเคราะห์จากการสลายตัวของสารประกอบเอโซ (azo compound) คือ 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) ในการวิเคราะห์จะทำการวัดอัตราการลดลงของแสงฟลูออเรสเซนซ์ต่อเวลาซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณของอนุมูลเปอร์ออกซิลที่เกิดขึ้น การเติมสารสกัดทดสอบลงในปฏิกิริยาจะทำให้

ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์มีความคงตัวนาน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารนั้นๆ

สารมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในการทดลองนี้คือ Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid) ซึ่งเป็นสารที่โครงสร้างเลียนแบบวิตามินอีที่อยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้ เมื่อรายงานค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงรายงานในค่าสมมูลของ Trolox ตัวอย่างเช่นในการทดลองนี้พบว่าวิตามินซีมีค่า ORAC เป็น 5 μM Trolox equivalents / 10 μM ascorbic acid ซึ่งหมายความว่า Trolox มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามิน ซี 2 เท่า ในกรณีผลการวิเคราะห์สารไอโซฟลาโวนอยด์ 24 ชนิดที่แยกได้จาก *D. parviflora* ค่า ORAC จะแสดงในหน่วย μM Trolox equivalents / 10 μM isoflavonoid (μM TE/10 μM) ดังที่แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าสารไอโซฟลาโวนอยด์หลายชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลเปอร์ออกซิลสูงกว่า Trolox (มีค่ามากกว่า 20 μM TE) โดยที่ไอโซฟลาโวนมีฤทธิ์สูงกว่าไอโซฟลาวาโนน และสูงกว่าไอโซฟลาเวน (ตารางที่ 4.4) สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลเปอร์ออกซิลสูงสุดคือ (3*R*)-dalparvin A (**18**) ซึ่งเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาวาโนนที่มีหมู่แทนที่เป็น R7-OH R5-OH R2'-OMe R4'-OH และ R5'-OH โดยมีค่า ORAC เป็น 120 μM TE การเปลี่ยนหมู่แทนที่ตำแหน่ง R4' จาก -OH ให้กลายเป็น -OMe เช่น (3*R*S)-dalparvin (**13**) ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลเปอร์ออกซิลลดลง โดยมีค่า ORAC เป็น 22 μM TE และในกรณีที่วงแหวน B ของไอโซฟลาวาโนนปราศจากหมู่ -OH จะพบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลเปอร์ออกซิลเลย ได้แก่ (3*R*S)-onogenin (**11**) (3*S*)-sativanone (**10**) และ (3*R*S)-3'-O-methylviolanone (**9**) ทั้งนี้ยังกล่าวได้ว่าหมู่แทนที่ -OH ของตำแหน่ง R5' และ R3' ของวงแหวน B เป็นตำแหน่งที่สำคัญสำหรับการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการมีหมู่แทนที่ -OMe ที่ตำแหน่ง R2' แม้ว่าจะมีผลในเชิงลบอย่างมากต่อการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในวิธี X/XO assay แต่กลับไม่พบผลเชิงลบนี้ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี ORAC assay

ในทำนองเดียวกันสำหรับกลุ่มไอโซฟลาโวนพบว่าการมีหมู่แทนที่ -OH ในตำแหน่ง R3' เช่น khirnone C (**8**) (44 μ M TE) และ calycosin (**5**) (38 μ M TE) ก็มีความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้หมู่แทนที่ -OH ที่ตำแหน่ง R5 ของวงแหวน A ก็มีความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสังเกตได้จาก biochanin A (**2**) มีค่า ORAC เป็น 27 μ M TE ในขณะที่ formononetin (**1**) มีค่า ORAC เป็น 2.8 μ M TE โดยที่ทั้งสองโมเลกุลมีความแตกต่างกันเฉพาะที่หมู่แทนที่ -OH ที่ตำแหน่ง R5 เท่านั้น การวิเคราะห์โครงสร้างโมเลกุลของไอโซฟลาโวนพบว่าทุกชนิดที่สกัดแยกได้เป็นไอโซฟลาโวนที่มีหมู่แทนที่ -OMe ที่ตำแหน่ง R4' และบางชนิดมีหมู่แทนที่ -OH ที่ตำแหน่ง R3' เพิ่มอีกด้วยแต่ไม่ได้แสดงความแตกต่างของค่า ORAC ได้อย่างมีนัยสำคัญ (ค่า ORAC อยู่ในช่วง 30-40 μ M TE) จากผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าการมีหมู่แทนที่ -OH ที่ตำแหน่ง R4' ร่วมกับการมีหมู่แทนที่ -OH ที่ตำแหน่ง R3' หรือ R5' อย่างใดอย่างหนึ่ง และการมีหมู่แทนที่ -OH ที่ตำแหน่ง R5 ในโมเลกุลสารไอโซฟลาโวนอยด์จะเป็นการส่งเสริมให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลเปอร์ออกซิล และการมีหมู่แทนที่ OH ที่ตำแหน่ง R4' จะทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลเปอร์ออกซิลลดลง

ค่า ORAC ที่สูงผิดปกติของ (3R)-dalparvin A (**18**) (120 μ M TE/10 μ M) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซฟลาโวนอยด์อื่นๆ โดยส่วนใหญ่จะมีค่า ORAC อยู่ประมาณ 20-40 μ M TE/10 μ M ซึ่งสันนิษฐานว่าผลการทดลองของ (3R)-dalparvin A (**18**) อาจเป็นผลบวกเท็จ โดยเมื่อพิจารณากราฟการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารทดสอบ 4 ชนิด คือ (3R)-dalparvin A (**18**) khirnone C (**8**) Trolox และ ascorbic acid ที่ความเข้มข้นเดียวกันคือ 12.5 μ M (3R)-dalparvin A (**18**) มีรูปแบบของกราฟการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์แตกต่างจากสารทดสอบอื่นๆ เป็นเหตุให้ได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟสูงกว่าปกติ (ภาพที่ 4.2) โดยหลักการวิเคราะห์นี้มีการสลาย AAPH ให้เป็นอนุมูลเปอร์ออกซิลจะมีผลทำให้สามารถสังเกตการลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยการเข้าทำลายโมเลกุลฟลูออเรสซินให้ไม่

สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ แต่การทดลองนี้กลับพบว่าค่าความเข้มแสงกลับเพิ่มสูงขึ้นในระยะแรกแล้วจึงค่อยลดลงในเวลาต่อมา จึงตั้งสมมติฐานว่าอนุมูลเปอร์ออกซิลที่เกิดขึ้นสามารถออกซิไดส์ (3R)-dalparvin A (**18**) ให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ จึงทำให้ได้ลักษณะของกราฟที่สูงขึ้นและเมื่อเวลาผ่านไปอนุมูลเปอร์ออกซิลเกิดมากขึ้นจึงเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลฟลูออเรสซินเป็นผลให้ความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ลดต่ำลงในเวลาต่อมา เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบนี้จึงได้ตั้งสมมติฐานว่าหากลากเส้นกราฟในรูปแบบปกติตามแนวโน้มที่ควรจะเป็นดังภาพที่ 4.2 จะได้ค่า ORAC โดยประมาณของ (3R)-dalparvin A (**18**) เป็น 50 $\mu\text{M TE}/10 \mu\text{M}$ ซึ่งยังคงเป็นค่าที่สูงสุดในบรรดากลุ่มสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ที่นำมาทดสอบและผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโครงสร้างเคมีกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ยังคงเป็นไปในแนวทางเดิมที่ได้อธิบายไว้

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ที่สกัดจาก *D. parviflora* ด้วยวิธี

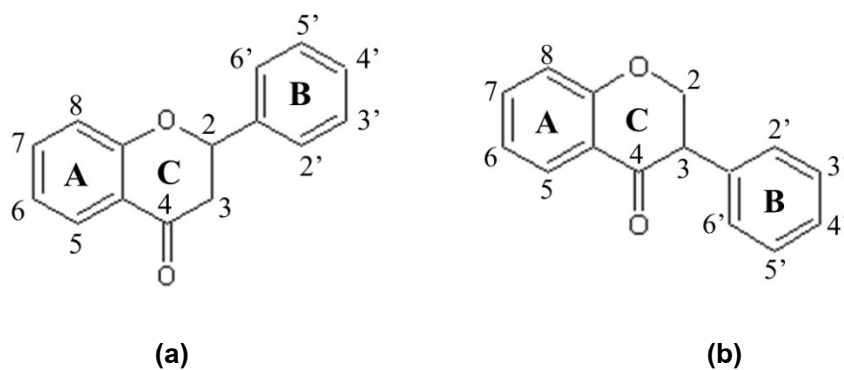
DPPH

เทคนิคการวัดการฟอกจางสีอนุมูล DPPH[•] เป็นหนึ่งในวิธีทั่วไปที่เป็นที่นิยมใช้ประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร การวิเคราะห์วิธีนี้จะตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของอนุมูล DPPH[•] ที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ภายหลังจากเกิดปฏิกิริยากับสารทดสอบด้วยหลักการการถ่ายทอดอิเล็กตรอน (Electron transfer) (Prior, Wu, & Schaich, 2005) ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH[•] ของไอโซฟลาโวนอยด์จาก *D. parviflora* แสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่ามีสารไอโซฟลาโวนอยด์หลายชนิดที่แสดงฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH[•] ได้สูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง (3R)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (**24**) (3R)-dalparvin A (**18**) และ khronone C (**8**) ซึ่งแสดงค่า SC₅₀ เป็น 38.7 μM 41.9 μM และ 61.7 μM

ตามลำดับ ในขณะที่การทดลองนี้ได้ค่า SC_{50} ของวิตามินซี (ascorbic acid) เป็น 39.6 μM ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่าวิตามินซีมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

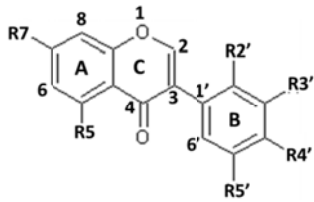
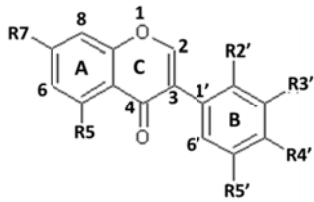
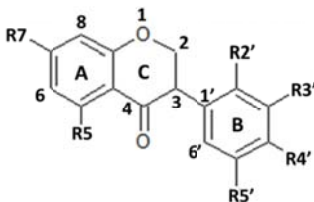
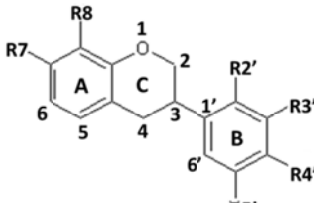
ในการวิเคราะห์ผลของไอโซฟลาโวนอยด์ในแต่ละกลุ่มที่มีรูปแบบของตำแหน่งหมู่แทนที่ที่เหมือนกัน พบว่าสารกลุ่มไอโซฟลาโวน คือ khirone C (**8**) มีฤทธิ์สูงกว่าสารกลุ่มไอโซฟลาโวนิน คือ (3S)-secundiflorol H (**17**) และสูงกว่าสารกลุ่มไอโซฟลาเวน คือ (3S)-8-demethylduartin (**22**) (ตารางที่ 4.4) ในบริบทของการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า สารกลุ่มไอโซฟลาโวน คือ khirone C (**8**) ซึ่งมีหมู่แทนที่ -OH ที่ตำแหน่ง R7 R5 และ R3' มีหมู่แทนที่ -OMe ที่ตำแหน่ง R2' และ R4' แสดงฤทธิ์การกำจัดอนุมูล DPPH ได้สูงที่สุด (SC_{50} , 61.7 μM) (ตารางที่ 4.3) การมีหมู่ -OH หรือ -OMe ที่ตำแหน่ง R3'- หรือมีหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง R5' จะให้ผลคล้ายคลึงกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี X/XO และ ORAC และยังสำคัญสำหรับการกำจัดอนุมูล DPPH[•] การปราศจากโมเลกุลออกซิเจนในตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งอาจทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูญเสียไปอย่างสมบูรณ์ดังตัวอย่างที่พบใน genistein (**3**) biochanin A (**2**) และ formononetin (**1**) (ตารางที่ 4.3) การวิเคราะห์โครงสร้างของไอโซฟลาโวนอยด์ยังพบว่าหมู่แทนที่ที่สำคัญคือหมู่ -OH ที่ตำแหน่ง R3' หรือ R5' และยังพบว่าทั้งหมู่แทนที่ -OH ที่ตำแหน่ง R5 และ หมู่แทนที่ -OMe หรือ -OH ที่ตำแหน่ง R2' ที่สำคัญสำหรับกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์อีกด้วย ในทำนองเดียวกันการวิเคราะห์โครงสร้างเคมีของไอโซฟลาเวนแสดงให้เห็นว่าหมู่แทนที่ -OH ที่ตำแหน่ง R3' และ R5' มีส่วนช่วยในการเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH[•] ทั้งนี้ในการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีของสารฟลาโวนอยด์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ระบุว่าตำแหน่งของหมู่แทนที่ที่สำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระคือการมีหมู่แทนที่มีโครงสร้างแบบ dihydroxy เช่น *ortho*-dihydroxy (catechol structure) บนวงแหวน B ซึ่งมีคุณสมบัติในการอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (Chen, Chan, Ho, Fung, & Wang, 1996; Lien, Ren, Bui, &

Wang, 1999; Sekher Pannala, Chan, O'Brien, & Rice-Evans, 2001; Silva et al., 2002; Yokozawa et al., 1998) สำหรับในผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (**24**) และ (3R)-dalparvin A (**18**) มีหมู่แทนที่ในโครงสร้างแบบ *ortho*-catechol บนวงแหวน B ซึ่งมีผลทำให้มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH[·] ได้สูงที่สุด ในทางตรงกันข้ามหากมีการแทนที่โครงสร้างแบบ *ortho*-catechol ด้วยหมู่ *O*-methylation จะมีผลกระทบต่อฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH[·] อย่างมีนัยสำคัญ ตัวอย่างเช่น (3RS)-3'-hydroxy-8-methoxy vestitol (**24**) ที่เปลี่ยนเป็น (3RS)-duartin (**20**) โดยการเติม 2'-*O*-methylation มีผลทำให้ฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระลดลงอย่างชัดเจน (ตารางที่ 4.3) นอกจากนี้ยังพบผลกระทบในลักษณะเดียวกันนี้ได้ใน formononetin (**1**) biochanin A (**2**) (3RS)-3'-*O*-methylviolanonone (**9**) และ (3RS)-sativan (**19**) ในกรณีของ genistein (**3**) ตรวจไม่พบฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH[·] ซึ่งเหมือนกับที่รายงานที่มีผู้ศึกษาวิจัยมาก่อนหน้านี้ (Han et al.; Johnson & Loo, 2000; Matsuda, Wang, Managi, & Yoshikawa, 2003) ซึ่งสนับสนุนว่าหมู่แทนที่ -OH ตำแหน่ง R4' ของวงแหวน B นั้นไม่มีความสำคัญต่อฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH[·]



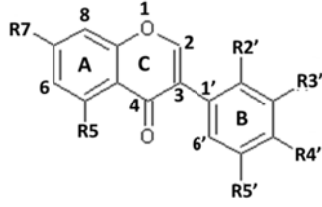
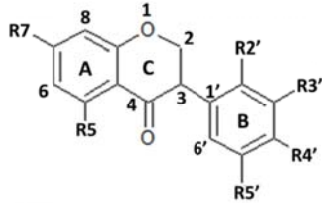
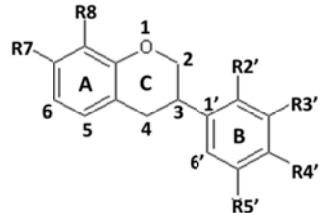
ภาพที่ 4.1 โครงสร้างทางเคมีของฟลาโวนอยด์ (a) และไอโซฟลาโวนอยด์ (b)

ตารางที่ 4.1 ความสัมพันธ์ของโครงสร้างเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์ จาก *D. parviflora* ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ xanthine/xanthine oxidase assay

		No.	Isoflavones	R7	R5	R2'	R3'	R4'	R5'	SC ₅₀ (μM)
 Isoflavones		5	Calycosin	OH	H	H	OH	OMe	H	0.25 ± 0.05
		4	Khrinone B	OH	OH	OH	H	OMe	OH	0.60 ± 0.1
		8	Khrinone C	OH	OH	OMe	OH	OMe	H	0.64 ± 0.03
		3	Genistein	OH	OH	H	H	OH	H	9.0 ± 2.2
		6	3'-O-Methylorobol	OH	OH	H	OMe	OH	H	36.7 ± 7.2
		7	Cajananin	OMe	OH	OH	H	OH	H	54.3 ± 10.7
		1	Formononetin	OH	H	H	H	OMe	H	116.92 ± 15.6
		2	Biochanin A	OH	OH	H	H	OMe	H	203.3 ± 57.6
 Isoflavanones		No.	Isoflavanones	R7	R5	R2'	R3'	R4'	R5'	SC ₅₀ (μM)
		15	3(R,S)-Kensanone G	OH	OH	H	OH	OMe	H	8.6 ± 1.2
		12	3(R)-7,3'-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavanone	OH	H	H	OH	OMe	H	27.9 ± 5.4
		14	Dalparvin B	OH	H	OH	OMe	OMe	H	30.5 ± 3.8
		16	3(R,S)-Violanone	OH	H	OMe	OH	OMe	H	43.7 ± 9.7
		13	3(R,S)-Dalparvin	OH	H	OMe	H	OMe	OH	48.2 ± 15.0
		11	3(R,S)-Onogenin	OH	H	OMe	H	OCH ₂ O	H	56.9 ± 0.18
		10	3(S)-Sativanone	OH	H	OMe	H	OMe	H	59.3 ± 21.7
		18	3(R)-Dalparvin A	OH	OH	OMe	H	OH	OH	160.3 ± 54.4
		17	3(S)-Secundiflorol H	OH	OH	OMe	OH	OMe	H	247.2 ± 82.2
9	3(R,S)-3'-O-Methyl-violanone	OH	H	OMe	OMe	OMe	H	-		
 Isoflavans		No.	Isoflavans	R7	R8	R2'	R3'	R4'	R5'	SC ₅₀ (μM)
		24	3(R,S)-3''-Hydroxy-8-methoxy vestitol	OH	OMe	OH	OH	OMe	H	2.8 ± 0.7
		21	(3R)-Vestitol	OH	H	OH	H	OMe	H	6.4 ± 0.1
		23	(3R)(+)-Mucronulatol	OH	H	OMe	OH	OMe	H	10.0 ± 3.6
		22	(3S)-8-Demethylduartin	OH	OH	OMe	OH	OMe	H	13.4 ± 3.6
		20	3(R,S)-Duartin	OH	OMe	OMe	OH	OMe	H	12.2 ± 4.2
		19	3(R,S)-Sativan	OH	H	OMe	H	OMe	H	12.8 ± 1.2

“-” ตรวจไม่พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

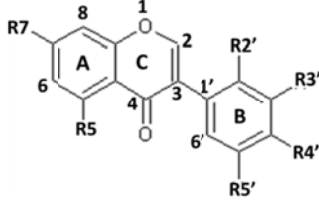
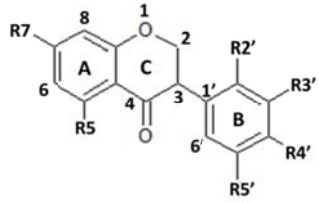
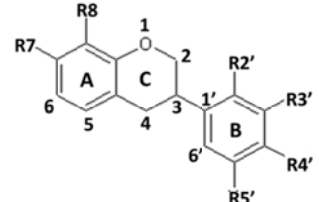
ตารางที่ 4.2 ความสัมพันธ์ของโครงสร้างเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์
จาก *D. parviflora* ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ ORAC assay

		No.	Isoflavones	R7	R5	R2'	R3'	R4'	R5'	($\mu\text{M TE}$) [†]
 <p>Isoflavones</p>	8	Khronone C	OH	OH	OMe	OH	OMe	H	43.5 ± 3.2	
	5	Calycosin	OH	H	H	OH	OMe	H	37.8 ± 1.2	
	3	Genistein	OH	OH	H	H	OH	H	37.8 ± 4.5	
	6	3'-O-Methylrobol	OH	OH	H	OMe	OH	H	35.7 ± 5.5	
	7	Cajanin	OMe	OH	OH	H	OH	H	34.7 ± 2.2	
	4	Khronone B	OH	OH	OH	H	OMe	OH	34.2 ± 2.9	
	2	Biochanin A	OH	OH	H	H	OMe	H	26.6 ± 1.3	
	1	Formononetin	OH	H	H	H	OMe	H	2.8 ± 0.5	
 <p>Isoflavanones</p>	18	3(R)-Dalparvin A	OH	OH	OMe	H	OH	OH	120.3 ± 15.1	
	15	3(R,S)-Kenusanone G	OH	OH	H	OH	OMe	H	42.1 ± 0.5	
	14	Dalparvin B	OH	H	OH	OMe	OMe	H	33.4 ± 4.9	
	16	3(R,S)-Violanone	OH	H	OMe	OH	OMe	H	31.1 ± 2.5	
	12	3(R)-7,3'-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavonone	OH	H	H	OH	OMe	H	28.4 ± 7.5	
	17	3(S)-Secundiflorol H	OH	OH	OMe	OH	OMe	H	27.4 ± 7.7	
	13	3(R,S)-Dalparvin	OH	H	OMe	H	OMe	OH	21.8 ± 1.5	
	11	3(R,S)-Onogenin	OH	H	OMe	H	OCH ₂ O	-	-	
	10	3(S)-Sativanone	OH	H	OMe	H	OMe	H	-	
	9	3(R,S)-3'-O-Methyl-violanone	OH	H	OMe	OMe	OMe	H	-	
 <p>Isoflavans</p>	21	3(R)-Vestitol	OH	H	OH	H	OMe	H	40.1 ± 1.0	
	23	3(R)(+)-Mucronulatol	OH	H	OMe	OH	OMe	H	39.8 ± 0.5	
	20	3(R,S)-Duartin	OH	OMe	OMe	OH	OMe	H	34.2 ± 0.7	
	24	3(R,S)-3'-Hydroxy-8-methoxyvestitol	OH	OMe	OH	OH	OMe	H	31.4 ± 2.7	
	22	3(S)-8-Demethyl-duartin	OH	OH	OMe	OH	OMe	H	27.0 ± 1.9	
	19	3(R,S)-Sativan	OH	H	OMe	H	OMe	H	24.8 ± 3.1	

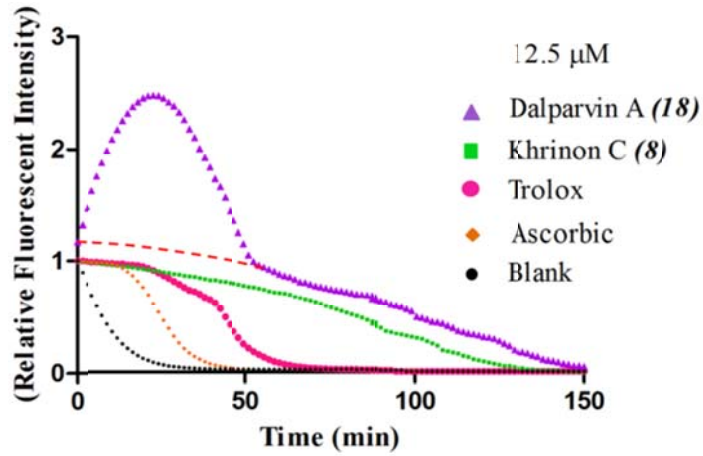
[†] หน่วยคือ Trolox equivalents (TE, $\mu\text{M Trolox}$)/10 $\mu\text{M isoflavonoid}$

“-” ตรวจไม่พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 4.3 ความสัมพันธ์ของโครงสร้างเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไอโซฟลาโวนอยด์
จาก *D. parviflora* ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบ DPPH

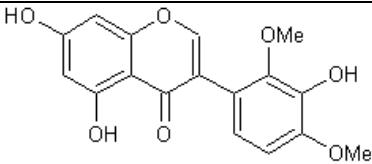
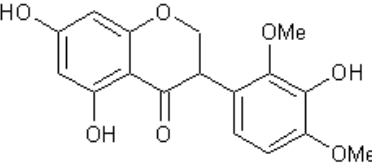
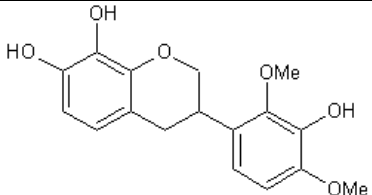
		No.	Isoflavones	R7	R5	R2'	R3'	R4'	R5'	SC ₅₀ (µM)
		8	Khronone C	OH	OH	OMe	OH	OMe	H	61.7 ± 4.5
		7	Cajanin	OMe	OH	OH	H	OH	H	70.8 ± 1.1
		6	3'-O-Methylrobol	OH	OH	H	OMe	OH	H	81.2 ± 14.1
		5	Calycosin	OH	H	H	OH	OMe	H	96.2 ± 2.8
		4	Khronone B	OH	OH	OH	H	OMe	OH	133.6 ± 7.0
		3	Genistein	OH	OH	H	H	OH	H	-
		2	Biochanin A	OH	OH	H	H	OMe	H	-
		1	Formononetin	OH	H	H	H	OMe	H	-
		No.	Isoflavanones	R7	R5	R2'	R3'	R4'	R5'	SC ₅₀ (µM)
		18	3(R)-Dalparvin A	OH	OH	OMe	H	OH	OH	41.9 ± 4.8
		17	3(S)-Secundiflorol H	OH	OH	OMe	OH	OMe	H	74.3 ± 4.2
		12	3(R)-7,3'-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavanone	OH	H	H	OH	OMe	H	78.9 ± 1.1
		13	3(R,S)-Dalparvin	OH	H	OMe	H	OMe	OH	80.4 ± 1.3
		16	3(R,S)-Violanone	OH	H	OMe	OH	OMe	H	89.7 ± 1.7
		15	3(R,S)-Kenusanone G	OH	OH	H	OH	OMe	H	111.9 ± 4.7
		14	Dalparvin B	OH	H	OH	OMe	OMe	H	236.3 ± 9.8
		11	3(RS)-Onogenin	OH	H	OMe	H	OCH ₂ O	-	-
		10	3(S)-Sativanone	OH	H	OMe	H	OMe	H	-
		9	3(R,S)-3'-O-Methyl-violanone	OH	H	OMe	OMe	OMe	H	-
		No.	Isoflavans	R7	R8	R2'	R3'	R4'	R5'	SC ₅₀ (µM)
		24	3(RS)-3'-Hydroxy-8-methoxyvestitol	OH	OMe	OH	OH	OMe	H	38.7 ± 3.0
		23	3(R)(+)-Mucronulatol	OH	H	OMe	OH	OMe	H	75.41 ± 3.2
		22	3(3)-8-Demethyl-duartin	OH	OH	OMe	OH	OMe	H	115.4 ± 4.3
		21	3(3)-Vestitol	OH	H	OH	H	OMe	H	204.1 ± 8.0
		19	3(R,S)-Sativan	OH	H	OMe	H	OMe	H	-
		20	3(R,S)-Duartin	OH	OMe	OMe	OH	OMe	H	-

“-” ตรวจไม่พบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 4.2 การลดลงของความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยการเกิดขึ้นของ AAPH แสดงลักษณะรูปแบบของสัญญาณของตัวอย่างสารทดสอบบางชนิด เช่น Khrinone C (8) และรูปแบบสัญญาณของกลุ่มควบคุม (Blank) หรือสารมาตรฐาน เช่น Trolox และ Ascorbic acid เพื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณของ Dalpavin A (18) ที่มีลักษณะผิดปกติ เส้นแนวโน้มที่สันนิษฐานว่าควรจะเป็นสัญญาณที่แท้จริงของ Dalpavin A (18) แสดงด้วยเส้นประ (----)

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบไอโซฟลาโวนอยด์ 3 ชนิด ที่มีตำแหน่งของหมู่แทนที่ที่มีรูปแบบเดียวกันแต่อยู่ในกลุ่มต่างๆ กัน คือ ไอโซฟลาโวน (khrinone C) ไอโซฟลาวาโนน (3(S)-secundiflorol H) และไอโซฟลาแวน (3(S)-8-demethylduartin)

Chemical Structures	X/XO assay, SC ₅₀ (μM)	ORAC assay, Trolox Equivalents (μM TE/10 μM isoflavonoid)	DPPH assay, SC ₅₀ (μM)
 <p>Khrinone C (8)</p>	0.64 ± 0.03	43.5 ± 3.2	61.7 ± 4.5
 <p>3(S)-Secundiflorol H (17)</p>	247.2 ± 82.2	27.4 ± 7.7	74.3 ± 4.2
 <p>3(S)-8-Demethylduartin (22)</p>	13.4 ± 3.6	27.0 ± 1.9	115.4 ± 4.3

ผลการศึกษาเบื้องต้นของฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจาก *D. parviflora* ต่อการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์เพาะเลี้ยง

ผลการศึกษาเบื้องต้นของสารไอโซฟลาโวนอยด์ต่อการกระตุ้นหรือการยับยั้งการสังเคราะห์รงควัตถุเมลานินของเซลล์มะเร็งผิวหนังเพาะเลี้ยง (B16F10 murine melanoma cell line) พบว่ามีไอโซฟลาโวนอยด์บางชนิดมีฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เมลานิน เช่น Durtin (2S)-naringenin และ Genistein เป็นต้น ไอโซฟลาโวนอยด์บางชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน เช่น Cajanin และ (6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan โดยปริมาณเมลานินที่ผลิตขึ้นถูกเปรียบเทียบและรายงานเป็นค่าสัมพัทธ์กับชุดการทดลองควบคุมดังแสดงในตารางที่ 4.5 ทั้งนี้ยังจำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมอย่างละเอียด มีการปรับปรุงสภาพการทดลองและมีการทำซ้ำ พร้อมทั้งวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ของสารสกัด

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเมลานินสัมพัทธ์ที่ผลิตจากเซลล์มะเร็งเม็ดสีผิวหนัง B16F10 murine melanoma cell line ภายใต้การเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสารไอโซฟลาโวนอยด์บางชนิดที่ระดับความเข้มข้น 15 μ M

Isoflavonoids	ปริมาณเมลานินสัมพัทธ์ (%)
ชุดควบคุม (5% DMSO)	100.00
Durtin	314.6 \pm 4.8
(2S)-naringenin	127.8 \pm 5.3
Genistein	161.3 \pm 2.5
Cajanin	68.2 \pm 1.2
(6aR,11aR)-3,8-dihydroxy-9-methoxy pterocarpan	44.3 \pm 0.8
Kojic acid (ชุดควบคุมผลการยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน)	61.2 \pm 3.1

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

สารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) บริสุทธิ์จำนวน 24 ชนิด ที่สกัดได้จากแก่นของต้นครี (*Dalbergia parviflora*) ได้ถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับหลอดทดลอง (in vitro) ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือ วิธี xanthine/xanthine oxidase (X/XO) วิธี ORAC และวิธี DPPH ในการทดลองนี้สามารถจำแนกสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ไอโซฟลาโวน (isoflavone) ไอโซฟลาวาโนน (isoflavanone) และไอโซฟลาแวน (isoflavan) ซึ่งมีความหลากหลายของหมู่แทนที่ในตำแหน่งต่างๆ บนโครงสร้าง ทำให้เกิดแนวคิดในการศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์ที่ศึกษา (structure activity relationship หรือ SAR) การวิเคราะห์ SAR ของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยใช้ผลการวัดค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยพิจารณาจากทั้งหมดแทนที่ของไอโซฟลาโวนอยด์ระหว่างกลุ่มที่มีรูปแบบหมู่แทนที่แบบเดียวกัน และระหว่างกลุ่มของไอโซฟลาโวนอยด์ที่มีหมู่แทนที่รูปแบบที่แตกต่างกัน ผลการเปรียบเทียบวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มของไอโซฟลาโวนอยด์ แสดงให้เห็นว่าไอโซฟลาโวนมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุดในทั้ง 3 วิธีวิเคราะห์ ในการวิเคราะห์ระหว่างกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ พบว่าจากโครงสร้างพื้นฐานที่มี R7-OH ของวงแหวน A และ R4'-OH (หรือ -OMe) ของวงแหวน B หากมีการเพิ่มขึ้นของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของวงแหวน B ที่ตำแหน่ง R3' หรือ R5' จะสามารถเพิ่มฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของไอโซฟลาโวนอยด์ในทุกกลุ่ม ในขณะที่ตำแหน่งของหมู่แทนที่ไฮดรอกซิล และหมู่แทนที่เมทิล (-OMe) ในตำแหน่งอื่นๆ จะพบว่ามีผลต่อฤทธิ์การต้านออกซิเดชันขึ้นกับวิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นจากความหลากหลายของโครงสร้างของไอโซฟลาโวนอยด์ จาก *D. parviflora* ในการทดลองนี้จึงเป็นรายงานแรกที่มีการชี้ชัดให้เห็นถึงรายละเอียดของ

ความสัมพันธ์ของโครงสร้างทางเคมีกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ สำหรับการศึกษผลต่อการสังเคราะห์เมลานินของสารพฤษเคมีจากแก่นครี เบื้องต้นพบว่ามี สารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์บางชนิดที่มีฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์ ทั้งนี้จะ ทำการศึกษาเพื่อยืนยันและขยายผลต่อไปในอนาคต ซึ่งคาดว่าจะสามารถนำองค์ความรู้เหล่านี้ มาพัฒนาสารสกัดจาก *D. parviflora* จนกระทั่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถวางจำหน่ายได้

ผลผลิต (Output)

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.

รายงานสรุปการเงิน ประจำปีงบประมาณ 2557
เลขที่โครงการ (NRPM 13 หลัก 3311100069820)
โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

โครงการประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลต่อการสังเคราะห์เมลา닌
ของสารพฤษเคมีจากแก่นศรีเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์จากภูมิปัญญาท้องถิ่น

ชื่อหัวหน้าโครงการ อาจารย์ ดร. วรวัฒน์ พรหมเด่น

รายงานการเงินระหว่าง วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่ 30 พฤศจิกายน 2557

หมวด*	งบประมาณ	ค่าใช้จ่าย งวดที่ 1	ค่าใช้จ่าย งวดที่ 2	ค่าใช้จ่ายรวม งวดที่ 1+2	คงเหลือ (หรือ เกิน)
1. ค่าตอบแทน	20,000	22,000	-	22,000	(-2,000)
2. ค่าจ้าง	120,000	32,960	87,040	120,000	0
3. ค่าวัสดุ	60,000	5,190	52,810	58,000	2,000
4. ค่าใช้สอย	30,000	2,000	28,000	30,000	0
รวม	230,000	62,150	167,850	230,000	0

*รายละเอียดการใช้งานงบประมาณแสดงในหน้าถัดไป

จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 บาท	138,000 บาท	เมื่อ	8 สิงหาคม 2557
งวดที่ 2 บาท	92,000 บาท	เมื่อ	30 พฤศจิกายน 2557
รวม 230,000 บาท			

(อาจารย์ ดร. วรวัฒน์ พรหมเด่น)
 หัวหน้าโครงการ

()
 เจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

รายละเอียดการใช้งบประมาณ

งวดที่ 1

1.	งบประมาณที่ได้รับการจัดสรรตลอดโครงการ 230,000 บาท (สองแสนสามหมื่นบาทถ้วน)	
2.	จำนวนเงินที่ได้รับ ในงวดที่ 1 (A)	138,000 บาท
3.	ค่าใช้จ่าย	
3.1	ค่าตอบแทน	
3.1.1	ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการและผู้ร่วมโครงการ	10,000 บาท
3.1.2	ค่าตอบแทนนักศึกษาผู้ช่วยวิจัย	12,000 บาท
3.2	ค่าจ้างและค่าวัสดุ	
3.2.1	ค่าวัสดุดับสมุนไพรมะเร็ง	3,000 บาท
3.2.2	ค่าจ้างบริการการวิเคราะห์ทางเคมี	12,960 บาท
3.2.3	ค่าสารเคมี	2,190 บาท
3.2.4	ค่าจ้างเตรียมสมุนไพรมะเร็งและสกัด	20,000 บาท
3.4	ค่าใช้สอย	
3.4.1	ค่าเดินทางเพื่อใช้ห้องปฏิบัติการนอกสถานที่	2,000 บาท
3.5	รวมค่าใช้จ่ายทั้งสิ้น (B)	62,150 บาท
4.	จำนวนเงินที่คงเหลือจากงวดที่ 1 (A-B) เป็นจำนวน	75,850 บาท (C)

งวดที่ 2

1.	จำนวนเงินที่ได้รับ ในงวดที่ 2 (D)	92,000 บาท
2.	ยอดเงินคงเหลือรวม 2 งวด (C+D)	167,850 บาท
3.	ค่าใช้จ่าย	
3.1	ค่าตอบแทน	-
3.2	ค่าจ้างและค่าวัสดุ	
3.2.1	ค่าวัสดุดับสมุนไพรมะเร็ง	4,000 บาท
3.2.2	ค่าจ้างบริการการวิเคราะห์ทางเคมี	83,040 บาท
3.2.3	ค่าจ้างเตรียมสมุนไพรมะเร็งและสกัด	52,810 บาท
3.3	ค่าใช้สอย	
3.3.1	ค่าเดินทางเพื่อใช้ห้องปฏิบัติการนอกสถานที่	28,000 บาท
3.4	รวมค่าใช้จ่ายทั้งสิ้น (E)	167,850 บาท
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.
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). **Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report).** *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.
- Bentgsath, A., Rusznyak, S., & Szent-Gyorgyl, A. (1937). **Vitamin P.** *Nature*, 139, 326-327.
- Benzi, G., & Moretti, A. (1995). **Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease?** *Neurobiology of Aging*, 16(4), 661-674.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Blois, M. S. (1958). **Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical.** *Nature*, 181, 1199-1200.
- Cai, Y. Z., Mei, S., Jie, X., Luo, Q., & Corke, H. (2006). **Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants.** *Life Sci*, 78(25), 2872-2888.
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). **Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants.** *Free Radic Biol Med*, 14(3), 303-311.
- Chang, T. S. (2009). **An updated review of tyrosinase inhibitors.** *Int J Mol Sci*, 10(6), 2440-2475.
- Chen, Z. Y., Chan, P. T., Ho, K. Y., Fung, K. P., & Wang, J. (1996). **Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups.** *Chem Phys Lipids*, 79(2), 157-163.
- Choi, J. S., Chung, H. Y., Kang, S. S., Jung, M. J., Kim, J. W., No, J. K., et al. (2002). **The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite.** *Phytother Res*, 16(3), 232-235.

- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., et al. (1998). **Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers.** *J Nat Prod*, 61(1), 71-76.
- 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. (2011a). **QSAR study of natural estrogen-like isoflavonoids and diphenolics from Thai medicinal plants.** *J Mol Graph Model*.
- De-Eknamkul, W., Umehara, K., Monthakantirat, O., Toth, R., Frecer, V., Knapic, L., et al. (2011b). **QSAR study of natural estrogen-like isoflavonoids and diphenolics from Thai medicinal plants.** *J Mol Graph Model*, 29(6), 784-794.
- 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.
- Farkas, O., Jakus, J., & Heberger, K. (2004). **Quantitative structure-antioxidant activity relationships of flavonoid compounds.** *Molecules*, 9(12), 1079-1088.
- 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.
- Fujii, T., & Saito, M. (2009). **Inhibitory effect of quercetin isolated from rose hip (*Rosa canina* L.) against melanogenesis by mouse melanoma cells.** *Biosci Biotechnol Biochem*, 73(9), 1989-1993.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., & Ferro-Luzzi, A. (1995). **A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability.** *Free Radic Biol Med*, 18(1), 29-36.
- Grotewold, E. (2006). *The Science of Flavonoids* (Vol. VII). Ohio, USA: Springer.

- Guo, Q., Rimbach, G., Moini, H., Weber, S., & Packer, L. (2002). **ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids.** *Toxicology*, 179(1-2), 171-180.
- Han, T., Cheng, G., Liu, Y., Yang, H., Hu, Y. T., & Huang, W. ***In vitro* evaluation of tectoridin, tectorigenin and tectorigenin sodium sulfonate on antioxidant properties.** *Food Chem Toxicol*, 50(2), 409-414.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). **High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format.** *J Agric Food Chem*, 50(16), 4437-4444.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). **The chemistry behind antioxidant capacity assays.** *J Agric Food Chem*, 53(6), 1841-1856.
- Ito, C., Itoigawa, M., Kanematsu, T., Ruangrunsi, 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).
- 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.
- Johnson, M. K., & Loo, G. (2000). **Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA.** *Mutat. Res.*, 459(3), 211-218.
- 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.
- Levy, A. P. (2006). **Application of pharmacogenomics in the prevention of diabetic cardiovascular disease: Mechanistic basis and clinical evidence for utilization of the haptoglobin genotype in determining benefit from antioxidant therapy.** *Pharmacology & Therapeutics*, 112(2), 501-512.
- Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H., & Wang, R. (1999). **Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants.** *Free Radic Biol Med*, 26(3-4), 285-294.
- Matsuda, H., Nakashima, S., Oda, Y., Nakamura, S., & Yoshikawa, M. (2009). **Melanogenesis inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* in B16 melanoma cells.** *Bioorg Med Chem*, 17(16), 6048-6053.
- Matsuda, H., Wang, T., Managi, H., & Yoshikawa, M. (2003). **Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities.** *Bioorg Med Chem*, 11(24), 5317-5323.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1968). **The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase.** *J Biol Chem*, 243(21), 5753-5760.
- 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.
- Nishikawa, M. (2008). **Reactive oxygen species in tumor metastasis.** *Cancer Letters*, 266(1), 53-59.
- 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.
- Ono, K., Hamaguchi, T., Naiki, H., & Yamada, M. (2006). **Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1762(6), 575-586.

- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). **Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe.** *J Agric Food Chem*, 49(10), 4619-4626.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., et al. (2003). **Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples.** *J Agric Food Chem*, 51(11), 3273-3279.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). **Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements.** *J Agric Food Chem*, 53(10), 4290-4302.
- PROSEA (Plant Resources of South-East Asia) Foundation, Bogor, Indonesia. <http://www.proseanet.org>. Accessed from Internet: 10-Jan-2014.
- Prochazkova, D., Bousova, I., & Wilhelmova, N. (2011). **Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids.** *Fitoterapia*.
- 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.
- Schöneicha, C. (1999). **Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach.** *Experimental Gerontology*, 34(1), 19-34.
- Sekher Pannala, A., Chan, T. S., O'Brien, P. J., & Rice-Evans, C. A. (2001). **Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics.** *Biochem Biophys Res Commun*, 282(5), 1161-1168.
- Shimizu, K., Kondo, R., & Sakai, K. (2000). **Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: structure-activity investigations.** *Planta Med*, 66(1), 11-15.
- 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., Pitchuanom, S., Netsopa, S., Uanporn, K., & Yenjai, C. (2009). **Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*.** *Fitoterapia*, 80(7), 427-431.
- Sumbayev, V. V. (2001). **Genistein effect on xanthine oxidase activity.** *Ukr Biokhim Zh*, 73(4), 39-43.
- 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.
- Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S., & Wang, Y. (1995). **Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein.** *Proc Soc Exp Biol Med*, 208(1), 124-130.
- Williams, R. J., Spencer, J. P., & Rice-Evans, C. (2004). **Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?** *Free Radic Biol Med*, 36(7), 838-849.
- Wungsintaweekul, B., Umehara, K., Miyase, T., & Noguchi, H. (2011). **Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, *Smilax corbularia* (*Smilacaceae*).** *Phytochemistry*.
- 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.

- Yang, J. G., Liu, B. G., Liang, G. Z., & Ning, Z. X. (2009). **Structure-activity relationship of flavonoids active against lard oil oxidation based on quantum chemical analysis.** *Molecules*, 14(1), 46-52.
- 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.
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. I., & Nishioka, I. (1998). **Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.** *Biochem Pharmacol*, 56(2), 213-222.
- Yu, D. H., Bao, Y. M., An, L. J., & Yang, M. (2009). **Protection of PC12 cells against superoxide-induced damage by isoflavonoids from *Astragalus mongholicus*.** *Biomed Environ Sci*, 22(1), 50-54.

ประวัตินักวิจัย

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

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3311100069820

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)

หน่วยงานที่สังกัดและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ เลขที่ 439 ถ.จระ

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	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วท.ด) สาขาชีวเคมี

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

อณูชีววิทยาและพันธุวิศวกรรมในแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารต้านอนุมูลอิสระ

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

พ.ศ. 2553-2555 ผู้ประสานงานหลัก หน่วยปฏิบัติงานวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและเทคโนโลยีชีว

วิทยา 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, 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 Chunchacha, **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

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) เมืองนาโงยา ประเทศญี่ปุ่น
3. พ.ศ. 2553-2554 : ทุนนักวิจัยหลังปริญญากองทุนเอกรัชดาภิเษกสมโภช บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. พ.ศ. 2557 : ทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2557 โดยสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

2. นางสาวอรวรรณ มณฑกานดิรัตน์ (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 (เภสัชเคมีและ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ)

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

ด้านเคมีสังเคราะห์ และผลิตภัณฑ์ของธรรมชาติ ซึ่งรวมถึงการพัฒนาเทคนิคการสกัด
แยกสารสำคัญ และการใช้วิธีการทางสเปคโตรสโคปี สำหรับการหาสูตรโครงสร้างของสาร
องค์ประกอบทางเคมีจากธรรมชาติ ด้านพิษเภสัชกรรมวิธานของพืช การทดสอบฤทธิ์ทาง
ชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเพศและสมอง 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-responsive 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 มณฑกานติรัตน์** การวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บาโซลแอลคาลอยด์ 5 ชนิดจากรากสองฟ้าแดงโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง Determination of five carbazole alkaloids from the root of *Clausena harmandiana* by High Performance Liquid Chromatography วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. พ.ศ.-ส.ศ. 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 จากการประชุม วิชาการนานาชาติ 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 เกษตรกรปฏิบัติการ

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	ปริญญาเกษตรศาสตรบัณฑิต