



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสี
Phenolic natural products with anti-melanogenesis

ชื่อนิสิต	นางสาวอิสริย์ จรรย์ารติพงษ์	เลขประจำตัว	5933115223
ภาควิชา	เคมี		
ปีการศึกษา	2562		

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสี

Phenolic natural products with anti-melanogenesis

โดย

นางสาวอิสริย์ จรรย์ารติพงศ์

รายงานนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการ สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสี


โดย นางสาวอิสริยา จรรย์ารติพงศ์


ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

- | | |
|--|------------------|
| 1. ศาสตราจารย์ ดร.อรรพรรณ ชัยลภากุล | ประธานกรรมการ |
| 2. รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวนิชย์ | กรรมการ |
| 3. ศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา พุดหอม | อาจารย์ที่ปรึกษา |

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี


.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา พุดหอม)
อาจารย์ที่ปรึกษา


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 1 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2563

ชื่อโครงการ สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสี
ชื่อนิติโนโครงการ นางสาวอิสริย์ จรรย์ารติพงศ์ เลขประจำตัว 5933115223
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาตราจารย์ ดร.ชนิษฐา พุดหอม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

ปัจจุบันทั่วโลกกำลังเผชิญกับภาวะโลกร้อน ความร้อนจากแสงแดดกระตุ้นให้ร่างกายผลิต เม็ดสีเมลานินมากขึ้น เป็นเหตุให้ผิวหมองคล้ำ มีรอยเหี่ยวย่นบนผิวหนัง เกิดปัญหาฝ้าและกระ อีกทั้งอาจก่อให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้ งานวิจัยนี้จึงได้นำผักแขยง (*Limnophila aromatica* (Lam.) Merr.) ซึ่งเป็นผักพื้นบ้านที่สามารถพบได้ในทุกภาคของประเทศไทย และมีสารประกอบหลักเป็นสารกลุ่มฟีนอลิก มาสกัดแยกเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน ทำให้ได้สารบริสุทธิ์สองชนิดได้แก่ 5-demethyl tangeretin และ xanthomicrol พิสูจน์ทราบโครงสร้างจากวิธีทางสเปกโตรสโกปี ได้แก่ เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) และ เทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (IR) และได้ส่วนสกัดหยาบย่อยจำนวน 50 ส่วน จากการนำสารที่สกัดได้ทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC และบน 96-well plates โดยใช้ L-tyrosine และ L-DOPA เป็นสับสเตรท และ Kojic acid เป็นสารควบคุมเพื่อหาค่า IC_{50} พบว่าส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D4.5 ให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} 9.66 และ 11.25 $\mu\text{g/mL}$ ที่ใช้ L-tyrosine และ L-DOPA เป็นสับสเตรทตามลำดับ และจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ MTT assay พบว่าส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D4.5 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ จึงสามารถนำไปสกัดต่อเพื่อใช้เป็นยาหรือเครื่องสำอางที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดสีเมลานินได้

คำสำคัญ: เมลานิน, เอนไซม์ไทโรซิเนส, ผักแขยง, สารฟีนอลิก

Project Title Phenolic natural products with anti-melanogenesis
Student Name Miss isaree janyaratipong Student ID 5933115223
Advisor Name Professor Khanitha Pudhom, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2019

Abstract

Nowadays, the world is facing global warming. Sunlight can stimulate more melanin pigment that causes dull skin, wrinkles, freckles, melasma and skin cancer. This research focused on melanogenesis inhibitory activity of the extracts from *Limnophila aromatica* (Lam.) Merr., a local plant found in all regions of Thailand and the major constituents are phenolic. Two pure compounds, 5-demethyl tangeretin and xanthomicrol were purified from *L. aromatica* (Lam.) Merr. The structures of the isolated compounds were confirmed by spectroscopic methods, mainly NMR and IR spectroscopy. In addition, fifty subfractions were obtained and were tested for their anti-melanogenesis by Mushroom tyrosinase inhibition assay on TLC and 96-well plates, used L-tyrosine and L-DOPA as a substrate and Kojic acid as a positive control to obtain their IC_{50} . The results showed subfraction D4.5 provided the most potent activity with IC_{50} values of 9.66 and 11.25 $\mu\text{g/mL}$ for L-tyrosine and L-DOPA, respectively. Moreover, subfraction D4.5 did not show any significant cytotoxicity at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$. Therefore, it can be further purified for use as a medicine or cosmetic that is effective in inhibiting melanin pigments.

Keywords: Melanin, Tyrosinase enzyme, *Limnophila aromatica* (Lam.) Merr. , phenolic compounds

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ชนิษฐา พุดหอม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย ตลอดจนการเขียนรายงานฉบับนี้จนสมบูรณ์และการช่วยเหลือในการเอื้อเพื่อห้องปฏิบัติการเคมี เครื่องมือ สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อรรวรรณ ชัยลภา กุล และรองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวิชัย ประธานกรรมการและกรรมการที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณนักวิจัยหลังปริญญาเอกและนักวิจัยร่วมห้องปฏิบัติการเคมีทุกท่านที่ให้คำแนะนำทางทั้งการทำวิจัย ตลอดจนการเขียนรายงานจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
หน้าบทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย	2
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
1.3.1 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanogenesis)	2
1.3.2 ผักแขยง (<i>Limnophila aromatica</i> (Lam.) Merr.)	5
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์	8
2.1.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	8
2.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	8
2.2 รายการสารเคมี	9
2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยก	9
2.2.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการพิสูจน์ทราบโครงสร้าง	9
2.2.3 สารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสี เมลานิน	9
2.3 เซลล์ไลน์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	10
2.4 วิธีการทดลอง	10
2.4.1 การสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)	10
2.4.2 การแยกสารสกัดจากผักแขยง	10

2.4.3 การทดสอบและคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC	12
2.4.4 การทดสอบและคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน 96-well plates (Mushroom tyrosinase inhibition assay)	12
2.4.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay) ด้วยวิธี MTT assay	13
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	
3.1 การแยกสารสกัดจากผักแขยง	15
3.2 วิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์	19
3.3 การทดสอบและคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC	24
3.4 การทดสอบและคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน 96-well plates (Mushroom tyrosinase inhibition assay)	26
3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay) ด้วยวิธี MTT assay	28
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	35
ประวัติผู้วิจัย	45

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ปัจจุบันทั่วโลกกำลังเผชิญกับภาวะโลกร้อนอย่างรุนแรง ทำให้อุณหภูมิเฉลี่ยของโลกเพิ่มขึ้น โดยมีสาเหตุหลักมาจากการเผาไหม้เชื้อเพลิงและการตัดไม้ทำลายป่า กิจกรรมเหล่านี้เพิ่มปริมาณสารเรือนกระจกซึ่งทำลายชั้นโอโซนที่ช่วยป้องกันแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ก่อความเสียหายต่อผิวหนังของมนุษย์ไม่ให้ลงมาถึงพื้นโลก อีกทั้งประเทศไทยมีภูมิประเทศอยู่ในเขตร้อนชื้น บริเวณใกล้เส้นศูนย์สูตร มีแสงแดดจัดตลอดปี ทำให้ประชากรจำนวนมากมักเกิดปัญหาด้านผิวพรรณ ความร้อนจากแสงแดดกระตุ้นให้ร่างกายผลิต เม็ดสีเมลานินมากขึ้น เป็นเหตุให้ผิวหนังหมองคล้ำ มีรอยเหี่ยวย่นบนผิวหนัง เกิดปัญหาฝ้าและกระ อีกทั้งอาจก่อให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้^[1]

จากบทความและงานวิจัยต่างๆ มีการรายงานผลว่าสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในกลุ่มฟีนอลิกจำนวนมากสามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีได้^[2-5] โดยจากงานวิจัยการศึกษาสาร gingerol ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มฟีนอลิกที่พบได้ในพืชจำพวกขิง (Zingiberaceae) และมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีในเซลล์เมลานิน B16 (B16 melanoma cell)^[5] พบว่าใช้ arbutin และ kojic acid เป็นสารมาตรฐานในการศึกษาการยับยั้งการสร้างเม็ดสี เนื่องจากสารทั้งสองนั้นเป็นสารที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใช้ในการสร้างเม็ดสีได้ อีกทั้งยังสามารถนำไปพัฒนาเป็นสาร whitening agent ได้^[6] โดยปัจจุบันนิยมใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางที่ต้องการให้ผิวขาวใสและลดฝ้า กระ จุดด่างดำ แต่สาร kojic acid มีรายงานว่าเป็นสารก่อมะเร็ง^[7] เป็นเหตุให้มีการศึกษาและวิจัยสารอื่นๆ เพื่อนำมาทดแทน โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีความปลอดภัยสูงกว่าสารสังเคราะห์ ทำให้ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางหรือในทางการแพทย์ และจากงานวิจัยการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากมะม่วงหาวมะนาวโห่^[8] พบว่าการสกัดโดยใช้เฮกเซนและเอทิลอะซิเตตเป็นตัวทำละลาย จะให้ปริมาณสารสกัดน้อยกว่าการสกัดโดยใช้เมทานอล เนื่องจากเมทานอลสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มพอลิฟีนอลและฟลาโวนอยด์ได้ดี โดยชนิดของตัวทำละลายที่ใช้จะส่งผลต่อประสิทธิภาพของการสกัด และฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น การต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังนั้นการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมกับสารที่ต้องการสกัดจึงมีความสำคัญมาก โดยสามารถใช้หลักการ like dissolves like มาหาตัวทำละลายที่เหมาะสม อีกทั้งยังต้องคำนึงถึงการละลายที่ไม่เข้ากันกับตัวทำละลายที่มีขี้หรือสารละลายอื่นๆที่ใช้ในการทดลอง

จากการวิจัยทั้งหมดพบว่าการศึกษาสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีที่มาจากพืชไทย มีค่อนข้างน้อย ดังนั้นในการทำโครงการนี้จึงมุ่งเน้นสารสกัดธรรมชาติที่มาจากพืชไทย โดยได้คัดเลือก ผักแขยง (*Limnophila aromatica* (Lam.) Merr.) มาใช้ในการทดลอง เนื่องจากเป็นผักพื้นบ้านที่สามารถปลูกง่ายและหาซื้อได้ง่าย อีกทั้งยังมีรายงานว่ามีการต้านอนุมูลอิสระสูง มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และยับยั้งการอักเสบ ผักแขยงเป็นพรรณไม้ล้มลุกเนื้ออ่อน เจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีความชื้น มักพบตามบริเวณที่มีน้ำขังเล็กน้อย มีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศจีน เกาหลี ญี่ปุ่น ลาว เวียดนาม อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ อินเดีย ภูฏาน และออสเตรเลีย รวมทั้งทั่วทุกภาคของประเทศไทย อีกทั้งใบและลำต้นของผักแขยงสามารถรับประทานได้ทั้งแบบสดและปรุงสุก^[9] การสกัดสารจากผักแขยงทำได้โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายและคอลัมน์โครมาโตกราฟี จากนั้นนำมาทดสอบและคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อคำนวณหาค่า Inhibitory concentration (IC₅₀) ของสารตัวอย่างต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส^[10] และทดสอบความเป็นพิษของสารตัวอย่างต่อเซลล์ B16 melanoma cell ด้วย MTT assay^[11] หากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มฟีนอลิกที่ศึกษาสามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีได้และไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์จะสามารถนำไปต่อยอดในการผลิตเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์เพื่อลดปัญหาผิวหนังหมองคล้ำ จุดต่างดํา และรอยเหี่ยวย่นบนผิวหนังได้

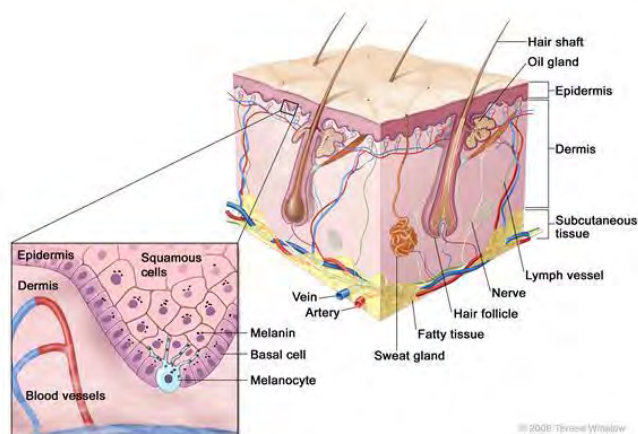
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีของสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติกลุ่มฟีนอลิกที่ได้จากพืชไทย

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

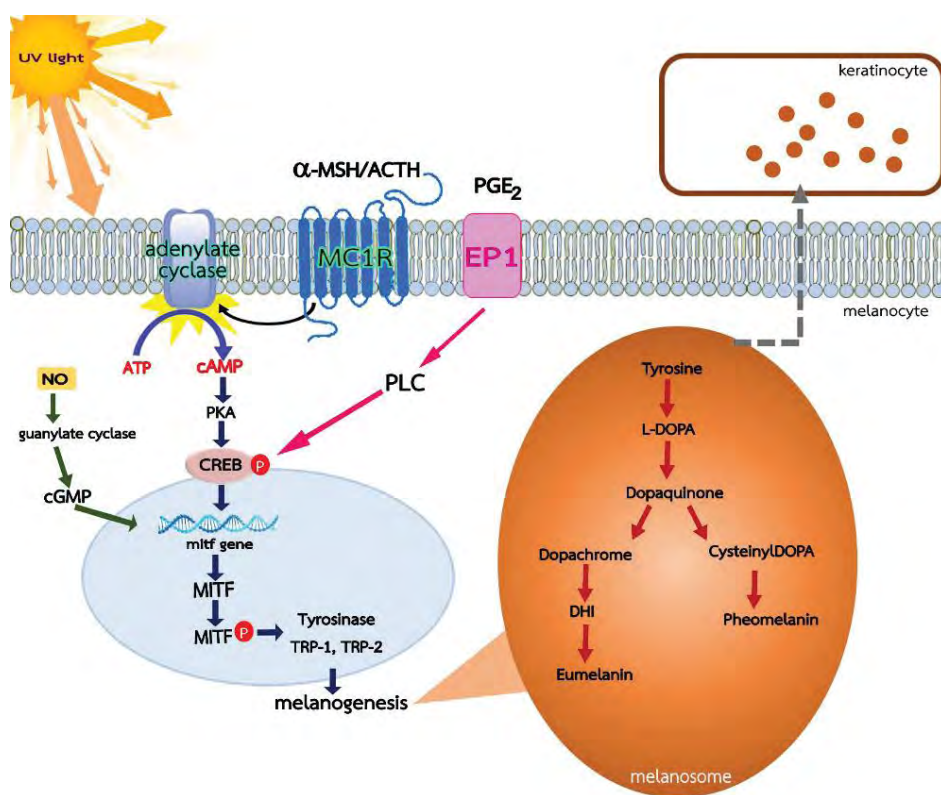
1.3.1 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanogenesis)

กระบวนการสร้างเม็ดสีเกิดขึ้นที่ผิวหนังชั้นล่างสุดของเอพิเดอร์มิสหรือชั้นหนังกำพร้าซึ่งเป็นบริเวณที่มีเคราติโนไซต์ (keratinocyte) โดยเซลล์เมลานโนไซต์ (melanocyte) จะทำหน้าที่ผลิตเม็ดสีเมลานินแล้วเก็บไว้ในเมลานโซม (melanosome) จากนั้นจึงส่งต่อไปยังเคราติโนไซต์

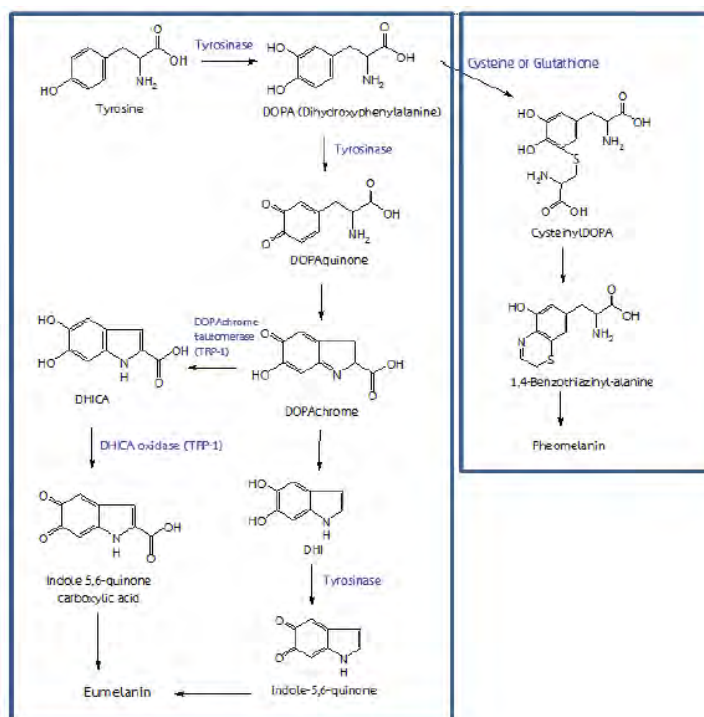


รูปที่ 1.1 บริเวณผิวหนังชั้นกำพร้าที่มีเซลล์เมลานोไซต์^[12]

กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินสามารถถูกกระตุ้นได้จากรังสีอัลตราไวโอเล็ต โดยผ่านกระบวนการดังรูปที่ 1.2 และ 1.3



รูปที่ 1.2 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินภายในผิวหนัง^[13]



รูปที่ 1.3 กระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน^[13]

(DHI= 5,6-dihydroxyindole; DHICA= 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid ; TRP-1=tyrosinase related protein-1; TRP-2 = tyrosinase related protein-2)

รังสีอัลตราไวโอเล็ตสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ 2 วิธีได้แก่กระตุ้นผ่านเซลล์เมลานोไซต์โดยตรง ทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสผลิตมากขึ้น ส่งผลให้เม็ดสีเมลานินมีจำนวนมากขึ้น ผิวจึงมีสีเข้มขึ้น อีกวิธีคือการกระตุ้นผ่านเซลล์เคราติโนไซต์ ทำให้หลั่งสารต่างๆออกมาได้แก่ โพรสตาแกลนดิน อี2 (Prostaglandin E2, PGE2) และฮอร์โมนเมลานोไซต์สติมูเลติง (α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สร้างมาจากเซลล์เมลานอไซต์ที่หลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนกลาง ฮอร์โมน α -MSH จะเร่งปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน โดยการกระตุ้นโปรตีนไคเนส เอ (proteinkinase A) ผ่าน cyclic AMP (cAMP) ซึ่งทำให้ยีนที่ควบคุมเซลล์เมลานอไซต์ microphthalmiaassociated transcription factor (mitf gene) เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อผลิตเมลานินและเอนไซม์หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องได้แก่เอนไซม์ไทโรซิเนส TRP-1 และ TRP-2^[13] โดยการสังเคราะห์ เมลานินที่ผ่านการกระตุ้นทั้งสองแบบมีขั้นตอนที่เหมือนกันดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 กรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นในร่างกาย ถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มออกซิเดส (oxidase) ที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ โดย

เอนไซม์ไทโรซิเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ทำให้ไทโรซินเปลี่ยนเป็น แอลโดปา (L-DOPA, 3,4-dihydroxyphenyl-alanine)

ขั้นตอนที่ 2 แอลโดปาจะถูกออกซิไดส์เป็นโดปาคิวินิน (DOPAquinine) ผ่านกระบวนการออกซิเดชัน (Oxidation) และกระบวนการโพลีเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) ก่อนที่จะกลายเป็นเมลานินทั้งสองชนิดได้แก่ ยูเมลานิน (eumelanin) ซึ่งเป็นเม็ดสีเมลานินสีน้ำตาลที่จะถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) และเอนไซม์ DOPAchrome tautomerase (DCT หรือ TRP-2) และฟีโอเมลานิน (pheomelanin) ซึ่งเป็นเม็ดสีเมลานินสีแดงหรือสีเหลืองที่จะถูกกระตุ้นด้วยการคอนจูเกตกันระหว่างโดปาคิวินินกับซิสเตอีน (cysteine) หรือกลูตาไธโอน (glutathione)

ขั้นตอนที่ 3 เมลานินที่ผลิตได้ถูกส่งไปเก็บที่เมลานโซม จากนั้นจะถูกส่งต่อไปยังเคราติโนไซต์ที่อยู่ใต้ผิวหนังเพื่อแทนที่เซลล์ผิวหนังเก่าที่จะถูกผลัดทุก 28-39 วัน^[14]

1.3.2 ผักแขยง (*Limnophila aromatica* (Lam.) Merr.)

ผักแขยง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Limnophila aromatica* (Lam.) Merr. จัดอยู่ในวงศ์ SCROPHLARIACEAE ผักแขยงจัดเป็นพรรณไม้ล้มลุกเนื้ออ่อน เจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่ที่มีความชื้นสูง มีเขตการกระจายพันธุ์มีในประเทศจีน เกาหลี ญี่ปุ่น ลาว เวียดนาม อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ อินเดีย ภูฏาน และออสเตรเลีย รวมทั้งทั่วทุกภาคของประเทศไทย ลำต้นมีลักษณะกลม กลวง เป็นข้อปล้อง ความสูงประมาณ 30-50 เซนติเมตร ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามกันเป็นคู่ๆ ใบมีลักษณะเรียวยาวแหลม โคนใบห่อติดกับลำต้น ขอบใบมีลักษณะเป็นฟันเลื่อย แผ่นใบสีเขียว กว้างประมาณ 3-15 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 1-5 เซนติเมตร ออกดอกเป็นช่อ ดอกย่อยประมาณ 2-10 ดอก กลีบดอกเป็นสีม่วง ผิวด้านนอกเรียบด้านในมีขน ผลมีลักษณะเป็นรูปกระสวย เมล็ดกลมรีขนาดเล็กสีน้ำตาลดำ ลำต้นและใบ มีรสเผ็ด สามารถนำมารับประทานได้^[9] ผักแขยงประกอบไปด้วยสารประกอบอะโรมาติกหลากหลายชนิดและมีน้ำมันหอมระเหยเป็นจำนวนมาก ดังตารางที่ 1.2 มีการศึกษาและวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของผักแขยงในด้านต่างๆดังนี้

ในปี 2007 Kukongviriyapan U. และคณะ ได้ศึกษาสารสกัด aqueous ของใบผักแขยง เมื่อให้สารสกัดจำนวน 1 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 kg ต่อ 1 วัน และกระตุ้นด้วย phenylhydrazine (PHZ)

ให้เกิดการไหลเวียนโลหิตที่มากขึ้น พบว่าสารสกัดสามารถป้องกันความผิดปกติของหลอดเลือด (Vascular protective activity) ได้^[15]

ในปี 2009 Nanasombat S. และ Teckchuen N. ได้ศึกษาสารสกัดเมทานอลของใบผักแขยง พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) ได้แก่ *Bacillus Cereus* และ *Staphylococcus Aureus* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยความเข้มข้นของสารในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ (MIC value) ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีค่าเท่ากัน คือ 2.6 mg/mL^[16]

ในปี 2012 Rattanasena P. ได้ศึกษาสารสกัดเอทานอลของใบผักแขยง พบว่ามีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.92 ± 0.01 mg/mL จากวิธี DPPH radical scavenging^[17]

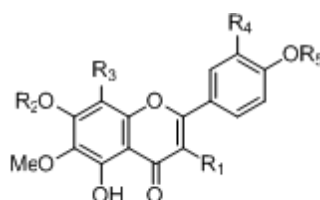
ตารางที่ 1.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธานของผักแขยง (*Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr.)^[9]

Kingdom	Plantae
Sub-kingdom	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Sub-class	Asteridae
Order	Scrophulariales
Family	Scrophulariaceae
Genus	Limnophila
Species	L. aromatica
Binomial name	Limnophila aromatica (Lamk.) Merr.

ตารางที่ 1.2 สารประกอบเคมีที่แยกได้จากผักแขยง (*Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr.)^[9]

สารประกอบที่แยกได้	ส่วนของพืช
5,7-Dihydroxy-3,6,3',4'-tetramethoxyflavone (7-desmethyl artemetin) (1)	ทั้งต้น

5,7-Dihydroxy-6,8,4'-trimethoxyflavone (Nevadensin) (2)	ทั้งต้น
5-Hydroxy-6,7,8,4'-tetramethoxyflavone (Gardenin B, 5-demethyltangeretin) (3)	ส่วนเหนือดิน
Nevadensin-7-O- β -D-glucopyranoside (4)	ส่วนเหนือดิน
Isothymusin (5)	ส่วนเหนือดิน
Pilosin (6)	ส่วนเหนือดิน
8-Hydroxysalvigenin (7)	ส่วนเหนือดิน
Salvigenin (8)	-
Pectolinarigenin (9)	ส่วนเหนือดิน



- 1 $R_1=R_4=OMe, R_2=R_3=H, R_5=Me$
 2 $R_1=R_2=R_4=H, R_3=R_5=OMe$
 3 $R_1=R_4=H, R_2=R_5=Me, R_3=OMe$
 4 $R_1=R_4=R_5=H, R_2=Glc, R_3=OMe$
 5 $R_1=R_4=R_5=H, R_2=Me, R_3=OH$
 6 $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH, R_5=Me$
 7 $R_1=R_3=OH, R_2=R_5=Me, R_4=H$
 8 $R_1=OH, R_2=R_5=Me, R_3=R_4=H$
 9 $R_1=R_2=R_3=R_4=H, R_5=OMe$

รูปที่ 1.4 โครงสร้างของสารประกอบเคมีที่แยกได้จาก ผักแขยง (*Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr.)^[9]

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์

2.1.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- | | |
|--|-----------------|
| - ปีกเกอร์ | - หลอดทดลอง |
| - กรวยแก้ว | - กระจกตวง |
| - ขวดก้นกลม | - ขวดรูปกรวย |
| - แท่งแก้วคนสาร | - ซ้อนตักสาร |
| - กระจกนาฬิกา | - กรวยบุชเนอร์ |
| - หลอดแคปิลลารี | - คอนเดนเซอร์ |
| - กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 | - ปิมน้ำ/สายยาง |
| - กระดาษเช็ดทำความสะอาด Kimtech | - งานเพาะเชื้อ |
| - ไมโครเพลต 96 หลุม (96 well plates) | - ไมโครปิเปต |
| - คอลัมน์แยกสาร | - จุกยาง |
| - แผ่น Thin-layer chromatography (TLC) | |

2.1.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องชั่งน้ำหนักกรุ่น Sartorius Basic บริษัท Scientific promotion
- ตู้อบ (Memert UM 500, BEC, Thailand)
- Safety Laboratory Hood (Asia chemical and engineering Co.,Ltd,Thailand)
- Sonicator (Branson, USA)
- เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) บริษัท IKA Labortechnik
- Microplate reader (Biotek, POWERWAVE XS2)
- Rotary evaporator (BÜCHI Rotavapor R-114)
- flash chromatography
- โปรแกรม GraphPad Prism version 8.4.0

- Nuclear Magnetic Resonance Spectrophotometer (JEOL 500 MHz)
- Fourier-transform Infrared Spectroscopy (NICOLET 6700)

2.2 รายการสารเคมี

2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยก

- ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)
- เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate)
- เมทานอล (methanol)
- อะซิโตน (acetone)
- เฮกเซน (hexane)
- น้ำกลั่น (DI water)

2.2.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการพิสูจน์ทราบโครงสร้าง

- - CDCl₃ (chloroform-d) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR

2.2.3 สารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน

- Sodium phosphate dibasic anhydrous (Na₂HPO₄)
- Hydrochloric acid (HCl)
- Mushroom tyrosinase
- 4-hydroxyphenylalanine (tyrosine)
- L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, yellow color)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO, cell culture grade)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO, AR grade)
- Kojic acid
- Milli Q water

2.3 เซลล์ไลน์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

- เซลล์ผิวหนัง B16F10 melanoma

2.4 ขั้นตอนการทดลอง

2.4.1 การสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

ลำต้นและใบของผักแขยงปริมาณ 3.8 กิโลกรัมถูกทำให้แห้งและบดละเอียด ได้ออกมาเป็นผงแห้ง ปริมาณ 250 กรัม นำมาแช่ในสารละลายไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอลตามลำดับ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) ระเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator

2.4.2 การแยกสารสกัดจากผักแขยง

นำสารสกัดหยาบของไดคลอโรมีเทนปริมาณ 11.2044 กรัมมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้วัฏภาคอยู่กับที่ (Stationary phase) คือซิลิกาเจล และวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ อะซิโตน : เฮกเซน 10%, 20%, 40%, 50% และ 100% ตามลำดับ จากนั้นแยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำ Thin-layer chromatography (TLC) โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 30% (2 ครั้ง) ได้ผลลัพธ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อย D1-D10

ส่วนสกัดหยาบย่อย D4 ปริมาณ 2.4968 กรัมนำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้วัฏภาคอยู่กับที่คือซิลิกาเจล และวัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 20%, 40%, 50% และ 100% ตามลำดับ แยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 30% ได้ผลลัพธ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อย D4.1-D4.9

ส่วนสกัดหยาบย่อย D4.3 ปริมาณ 0.6468 กรัมนำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้วัฏภาคอยู่กับที่คือซิลิกาเจล และวัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 20%, 40%, 50% และ 100% ตามลำดับ แยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ เมทานอล : เฮกเซน 2% ได้ผลลัพธ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อย D4.3A-D4.3E

ส่วนสกัดหยาบย่อย D4.4 ปริมาณ 0.1989 กรัมนำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้วัฏภาคอยู่กับที่คือเซฟาเดกซ์ (sephadex) และวัฏภาคเคลื่อนที่คือเมทานอล 100% แยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 30% ได้ผลลัพธ์

เป็นส่วนสกัดหยาบย่อย D4.4A-D4.4G และได้สารบริสุทธิ์จากส่วนสกัดหยาบย่อย D4.4F คือสาร 5-Hydroxy-6,7,8,4'-tetramethoxyflavone หรือ 5-demethyltangeretin

ส่วนสกัดหยาบย่อย D4.6 ปริมาณ 0.1975 กรัมนำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้วัฏภาคอยู่กับที่คือซิลิกาเจล และวัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 20%, 40%, 50% และ 100% ตามลำดับ แยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำให้ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : ไดคลอโรมีเทน 5% ได้ผลลัพธ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อย D4.6A-D4.6E

ส่วนสกัดหยาบย่อย D8 ปริมาณ 0.3306 กรัมนำมาแยกต่อด้วยแฟลชโครมาโตกราฟี (flash chromatography) โดยวัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 20%, 40%, 50% และ 100% ตามลำดับ แยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำให้ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 30% ได้ผลลัพธ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อย D8.1-D8.5

ส่วนสกัดหยาบย่อย D9 ปริมาณ 0.1658 กรัมนำมาแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้วัฏภาคอยู่กับที่คือเซฟาเดกซ์ (sephadex) และวัฏภาคเคลื่อนที่คือเมทานอล 100% แยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำให้ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 30% (2 ครั้ง) ได้ผลลัพธ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อย D9.1-D9.4 และได้สารบริสุทธิ์จากการตกตะกอนของสารที่ไม่ละลายในเมทานอลคือสาร 5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6,7,8-trimethoxychromen-4-one หรือ xanthomicrol

ส่วนสกัดหยาบย่อย D9.1 ปริมาณ 0.3220 กรัมนำมาแยกต่อด้วยแฟลชโครมาโตกราฟี โดยวัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 20%, 40%, 50% และ 100% ตามลำดับ แยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำให้ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ เอทิลอะซิเตท : เฮกเซน 40% ได้ผลลัพธ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อย D9.1A-D9.1D

ส่วนสกัดหยาบย่อย D9.2 ปริมาณ 0.1096 กรัมนำมาแยกต่อด้วยแฟลชโครมาโตกราฟี โดยวัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 20%, 40%, 50% และ 100% ตามลำดับ แยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำให้ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 40% ได้ผลลัพธ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อย D9.2A-D9.2C

ส่วนสกัดหยาบย่อย D9.3 ปริมาณ 0.3251 กรัมนำมาแยกต่อด้วยแฟลชโครมาโตกราฟี โดยวัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตน : เฮกเซน 20%, 40%, 50% และ 100% ตามลำดับ แยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำให้ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ เอทิลอะซิเตท : เฮกเซน 50% ได้ผลลัพธ์

เป็น ผลึก1 (crystal1) และ ผลึก2 (crystal2) โดยผลึก1 นำมาตกผลึกอีกครั้งด้วย อะซิโตน : เฮกเซน 40% จากนั้นล้างด้วยเมทานอลได้ผลึกที่ออกมาเป็นสาร xanthomicrol ที่พบใน ส่วนสกัดหยาบ ย่อย D9

2.4.3 การทดสอบและคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC

เตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) pH 6.8 ความเข้มข้น 5000 mM โดยการละลาย Sodium phosphate dibasic anhydrous (Na_2HPO_4) ปริมาณ 1.42 กรัมในน้ำ milli Q 150 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบส (pH value) ให้มีค่าประมาณ 6.5 ด้วย 1N กรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำ milli Q โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -5°C

เตรียม L-tyrosine ความเข้มข้น 2 mM โดยละลาย L-tyrosine 18.1 มิลลิกรัมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร

เตรียม L-DOPA ความเข้มข้น 2 mM โดยละลาย L-DOPA 19.7 มิลลิกรัมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิลิตร

เตรียม mushroom tyrosinase ความเข้มข้น 168 units/mL โดยละลาย mushroom tyrosinase 1 มิลลิกรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 16 มิลลิลิตร

Spot สารที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ทำให้แห้ง แล้วนำมาสเปรย์ด้วย mushroom tyrosinase ให้ทั่วทั้งแผ่น บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นสเปรย์ด้วยซับสเตรท (substrate) ซึ่งได้แก่ L-tyrosine และ L-DOPA ให้ทั่วทั้งแผ่น บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที (ใช้ kojic acid เป็นสารควบคุมเชิงบวก (positive control))

2.4.4 การทดสอบและคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน 96-well plates (Mushroom tyrosinase inhibition assay)

การทดสอบและคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน 96-well plates เป็นการวัดความเข้มข้นของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารเมื่อให้เอนไซม์และซับสเตรทในเวลาที่แตกต่างกันเทียบกับสารละลาย blank และสามารถคำนวณค่า Inhibitory concentration (IC_{50}) จากการนำข้อมูลมาพล็อตกราฟได้ โดยมีขั้นตอนดังนี้^[10]

- 1) เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 ความเข้มข้น 20 mM ปริมาตร 140 μ L และสารที่ต้องการทดสอบ ความเข้มข้น 50 μ g/mL หรือ 50 mM ปริมาตร 20 μ L ลงใน 96-well plates (ใช้ kojic acid ความเข้มข้น 100 mM เป็น positive control และใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็น negative control)
- 2) เติม mushroom tyrosinase ความเข้มข้น 60 units/mL ปริมาตร 20 μ L จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- 3) เติมซับสเตรทที่ได้แก่ L-tyrosine และ L-DOPA ความเข้มข้น 0.85 mM ปริมาตร 20 μ L จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- 4) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 475 นาโนเมตร โดยใช้ Microplate reader โดยวัดทุกๆ 10 นาทีเป็นเวลา 40 นาที และทำการทดลองซ้ำตอนที่ 1-4 ซ้ำอีกหนึ่งครั้ง
- 5) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

$$\% \text{inhibition} = [(B - S)/B] \times 100$$

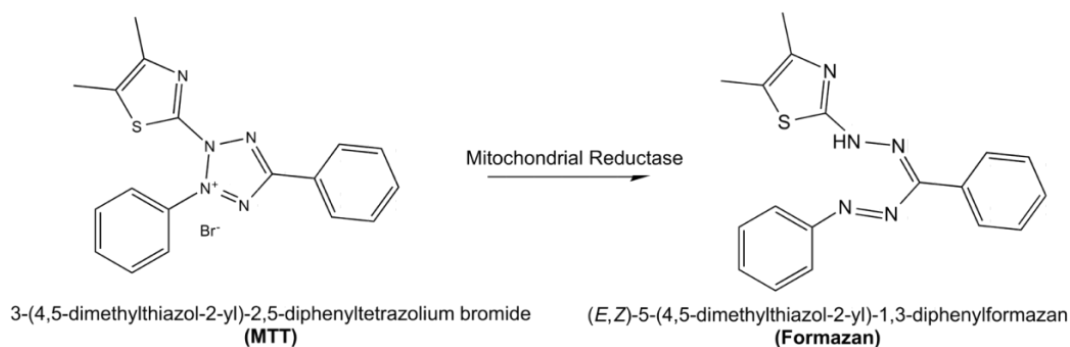
S = ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ใช้ทดสอบ

B = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย blank

- 6) พล็อตกราฟระหว่าง %inhibition กับ log ของความเข้มข้น เพื่อหาสมการเส้นตรง แล้วนำมาคำนวณค่า IC_{50}

2.4.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay) ด้วยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นการวัดการเกิดรีดักชันของ MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) ด้วยเอนไซม์ Mitochondrial reductase ทำให้เกิดโครงสร้าง Formazan ที่มีสีม่วงเข้มขึ้น โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นทำให้สามารถวัดปริมาณความอยู่รอดของเซลล์ได้^[18]



รูปที่ 2.1 ปฏิกริยาที่เกิดจาก MTT assay^[18]

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มีขั้นตอนดังนี้^[11]

- 1) เตรียมเซลล์ B16F10 melanoma cell ใน 96-well plates โดยใน 1 หลุมมี 5000 เซลล์ จากนั้นบ่มในสภาวะบรรยากาศที่มี 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2) ใช้ suction ดูดอาหารเก่าออก สารที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 100 และ 50 µg/mL ปริมาตร 0.1 µL ที่ละลายใน DMEM 100 µL เติมลงไปในแต่ละหลุม จากนั้นบ่มในสภาวะบรรยากาศที่มี 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ใช้ DMSO ปริมาตร 0.1 µL ที่ละลายใน DMEM 100 µL เป็นชุดควบคุม)
- 3) เติม MTT solution หลุมละ 10 µL บ่มในสภาวะบรรยากาศที่มี 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 4) ใช้ suction ดูดอาหารเก่าออก แล้วเติม DMSO AR grade หลุมละ 100 µL
- 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ Microplate reader
- 6) คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

$$\% \text{cell survival} = (\text{OD}_{\text{test}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

$$\text{OD}_{\text{test}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ใช้ทดสอบ}$$

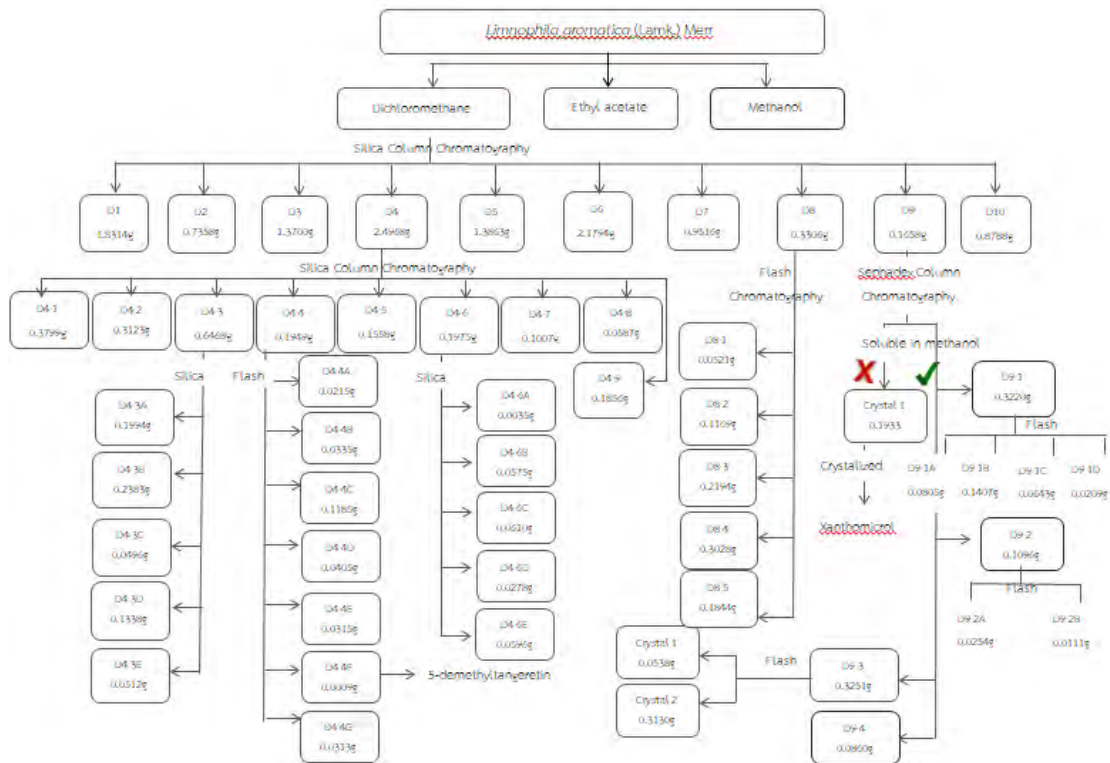
$$\text{OD}_{\text{control}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม}$$

บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การแยกสารสกัดจากผักแขยง

จากการนำลำต้นและใบของผักแขยงมาสกัดด้วยตัวทำละลายได้แก่ ไตคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ได้สารสกัดหยาบปริมาณ 11.20, 19.09 และ 16.08 กรัม ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากไตคลอโรมีเทนมาสกัดแยกต่อ ดังแผนภาพที่ 3.1

แผนภาพที่ 3.1 แสดงการสกัดแยกสารจากผักแขยง



ได้ผลิตภัณฑ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D1-D10 แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณของส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D1-D10

ส่วนสกัดหยาบย่อยที่	ปริมาณ (g)
D1	1.83

D2	0.74
D3	1.37
D4	2.50
D5	1.39
D6	2.18
D7	0.95
D8	0.33
D9	0.17
D10	0.88

นำส่วนสกัดหยาบย่อยที่น่าสนใจจากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้เทคนิค Thin-layer chromatography (TLC) ซึ่งได้แก่ส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D4 D8 และ D9 มาทำการสกัดแยกสารต่อโดยใช้เทคนิค column chromatography ที่แตกต่างกัน ส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D4 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D4.1-D4.9 แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณของส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D4.1-D4.9

ส่วนสกัดหยาบย่อยที่	ปริมาณ (mg)
D4.1	379.9
D4.2	312.3
D4.3	646.8
D4.4	194.9
D4.5	155.8
D4.6	197.5
D4.7	100.7
D4.8	58.7
D4.9	185.6

นำส่วนสกัดหยาบย่อยที่น่าสนใจจากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC ซึ่งได้แก่ส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D4.3 D4.4 และ D4.6 มาทำการสกัดแยกสารต่อ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร

สกัดหยาบย่อยที่ D4.3A-D4.3E สารสกัดหยาบย่อยที่ D4.4A-D4.4G และ สารสกัดหยาบย่อยที่ D4.6A-D4.6E ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 แสดงปริมาณของส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D4.3A-D4.3E, D4.4A-D4.4G และ D4.6A-D4.6E

ส่วนสกัดหยาบย่อยที่	ปริมาณ (mg)
D4.3A	199.4
D4.3B	238.3
D4.3C	46.0
D4.3D	133.8
D4.3E	51.2
D4.4A	21.5
D4.4B	33.5
D4.4C	118.5
D4.4D	40.5
D4.4E	31.5
D4.4F	0.9
D4.4G	31.3
D4.6A	3.5
D4.6B	57.5
D4.6C	61.0
D4.6D	27.8
D4.6E	59.6

ส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D8 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D8.1-D8.5 แสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงปริมาณของส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D8.1-D8.5

ส่วนสกัดหยาบที่	ปริมาณ (mg)
-----------------	-------------

D8.1	52.1
D8.2	116.9
D8.3	219.4
D8.4	302.8
D8.5	184.4

ส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D9 ได้ผลิตภัณฑ์เป็น crystal1 ซึ่งไม่ละลายในเมทานอลปริมาณ 0.1933 กรัม และส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D9.1-D9.4 แสดงดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาณส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D9.1-D9.4

ส่วนสกัดหยาบย่อยที่	ปริมาณ (mg)
D9.1	322.0
D9.2	109.6
D9.3	325.1
D9.4	86.0

จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบย่อยที่น่าสนใจจากการใช้เทคนิค TLC มาสกัดแยกต่อ โดยส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D9.1 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D9.1A-D9.1D ส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D9.2 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D9.2A และ D9.2B และส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D9.3 ได้ผลิตภัณฑ์เป็น crystal1 และ crystal2 แสดงดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แสดงปริมาณของส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D9.1A-D9.1D, D9.2A, D9.2B, crystal1 และ crystal2

ส่วนสกัดหยาบย่อยที่	ปริมาณ (mg)
D9.1A	80.5
D9.1B	140.7
D9.1C	64.3
D9.1D	20.9

D9.2A	25.4
D9.2B	11.1
crystal1	53.8
crystal2	31.3

เมื่อนำ crystal1 ทั้งจากส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D9 และ D9.3 มาตกผลึกในสารละลายอะซิโตน และเฮกเซน ทำให้ได้สารบริสุทธิ์คือ xanthomicrol ปริมาณ 0.0248 กรัม

จากการสกัดแยกสารทั้งหมดได้ผลลัพธ์เป็นสารบริสุทธิ์จำนวนสองชนิดได้แก่ 5-demethyl tangeretin มีลักษณะเป็นผลึกของแข็งสีเหลืองอ่อน ปริมาณ 0.9 มิลลิกรัม ซึ่งได้มาจากส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D4.4F มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{19}H_{15}O_7$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 358.1053 กรัมต่อโมล และสาร xanthomicrol ซึ่งมีลักษณะเป็นผงของแข็งสีเหลืองเข้ม ปริมาณ 24.8 มิลลิกรัม ซึ่งได้มาจากส่วนของแข็ง crystal1 มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{18}H_{16}O_7$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 344.0896 กรัมต่อโมล

3.2 วิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

จากการนำสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดพิสูจน์ทราบโครงสร้างโดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR Spectroscopy) ซึ่งได้แก่ โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (1H -NMR) และคาร์บอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{13}C -NMR) และเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (IR Spectroscopy) ได้ผลดังนี้

1) สาร 5-demethyl tangeretin

จากข้อมูล 1H NMR spectrum (ตารางที่ 3.7) พบสัญญาณแบบ singlet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 3 ที่ δ_H 6.59 ppm สัญญาณแบบ doublet ของโปรตอนตำแหน่ง 2', 3', 5' และ 6' ที่ δ_H 7.90 ($J=7.89$ Hz), 7.04 ($J=7.03$ Hz), 7.04 ($J=7.03$ Hz) และ 7.90 ($J=7.89$ Hz) ppm สัญญาณแบบ singlet ของหมู่ methoxy ตำแหน่ง 6, 7, 8, 4' ที่ δ_H 3.89, 3.94, 4.10 และ 3.96 ppm สัญญาณแบบ singlet ของหมู่ hydroxyl ตำแหน่ง 5 ที่ δ_H 12.57 ppm

จากข้อมูล ^{13}C NMR spectrum (ตารางที่ 3.8) พบสัญญาณคาร์บอนตำแหน่งที่ 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1', 2', 3', 4', 5' และ 6' ที่ δ_C 162.8, 103.8, 149.7, 136.5, 153.1, 131.5, 146.4,

107.2, 123.6, 128.1, 114.6, 164.1, 114.6 และ 128.1 ppm สัญญาณของหมู่ methoxy ตำแหน่ง 6, 7, 8 และ 4' ที่ δ_C 55.5, 62.1, 61.1 และ 63.6 ppm

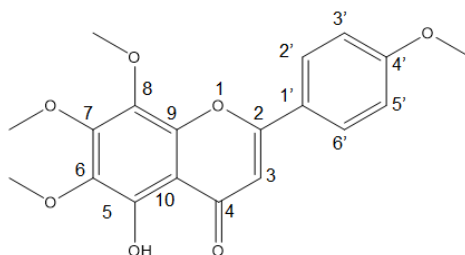
จากข้อมูล NMR spectrum ทั้งโปรตอนและคาร์บอน ทำให้ทราบโครงสร้างของสาร 5-demethyl tangeretin ซึ่งแสดงดังรูปที่ 3.1

2) สาร xanthomicrol

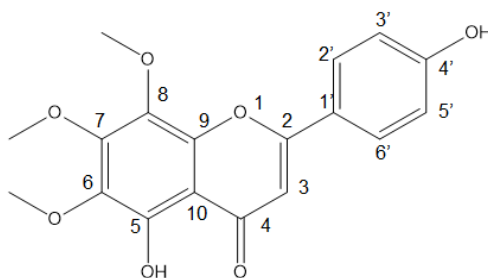
จากข้อมูล ^1H NMR spectrum (ตารางที่ 3.9) พบสัญญาณแบบ singlet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 3 ที่ δ_H 7.260 ppm สัญญาณแบบ doublet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 2', 3', 5' และ 6' ที่ δ_H 7.90 ($J=7.89$ Hz), 7.05 ($J=7.04$ Hz), 7.05 ($J=7.04$ Hz) และ 7.90 ($J=7.89$ Hz) ppm สัญญาณแบบ singlet ของหมู่ methoxy ตำแหน่ง 6, 7 และ 8 ที่ δ_H 3.90, 4.02 และ 4.04 ppm สัญญาณแบบ singlet ของหมู่ hydroxyl ตำแหน่ง 5 ที่ 12.780 ppm

จากข้อมูล ^{13}C NMR spectrum (ตารางที่ 3.10) พบสัญญาณคาร์บอนที่ 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1', 2', 3', 4', 5' และ 6' ที่ δ_C 163.9, 103.8, 183.1 148.4, 136.2, 152.4, 130.7, 145.8, 106.2, 123.6, 128.1, 114.7, 162.8, 114.7 และ 128.1 ppm สัญญาณของหมู่ methoxy ตำแหน่งที่ 60.0, 61.9, 61.1 ppm

จากข้อมูล IR spectrum (ตารางที่ 3.11) พบสัญญาณของหมู่ hydroxyl ที่ λ_{\max} 3396 cm^{-1} สัญญาณของ γ -pyrone C=O ที่ λ_{\max} 1776 cm^{-1} และสัญญาณของวงอะโรมาติกที่ λ_{\max} 1502, 1578 และ 1666 cm^{-1}



รูปที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมีของสาร 5-demethyltangeretin



รูปที่ 3.2 โครงสร้างของสาร xanthomicrol

ตารางที่ 3.7 ข้อมูล ^1H NMR spectrum ของสาร 5-demethyl tangeretin ที่ได้จากการทดลอง เทียบกับงานวิจัยอ้างอิง

^1H	δ_{H} ppm, J (Hz)	
	ผลจากงานวิจัยอ้างอิง ^[19]	ผลจากการทดลอง
3	6.61 (s)	6.60 (s)
2'	7.91 (d, $J=8.8$ Hz)	7.90 (d, $J=7.89$ Hz)
3'	7.05 (d, $J=8.8$ Hz)	7.04 (d, $J=7.03$ Hz)
5'	7.05 (d, $J=8.8$ Hz)	7.04 (d, $J=7.03$ Hz)
6'	7.91 (d, $J=8.8$ Hz)	7.90 (d, $J=7.89$ Hz)
6-OCH ₃	3.91 (s)	3.89 (s)
7-OCH ₃	3.97 (s)	3.94 (s)
8-OCH ₃	3.99 (s)	4.10 (s)
4'-OCH ₃	3.98 (s)	3.96 (s)
5-OH	12.35 (s)	12.57 (s)

ตารางที่ 3.8 ข้อมูล ^{13}C NMR spectrum ของสาร 5-demethyl tangeretin ที่ได้จากการทดลอง เทียบกับงานวิจัยอ้างอิง

^{13}C	δ_{C} ppm
-----------------	-------------------------

	ผลจากงานวิจัยอ้างอิง ^[19]	ผลจากการทดลอง
2	163.0	162.8
3	104.0	103.8
4	183.3	-
5	149.8	149.7
6	136.8	136.5
7	153.2	153.1
8	133.2	131.5
9	146.0	146.4
10	107.2	107.2
1'	123.7	123.6
2'	128.6	128.1
3'	114.9	114.6
4'	164.3	164.1
5'	114.9	114.6
6'	128.6	128.1
6-OCH ₃	55.8	55.5
7-OCH ₃	62.0	62.2
8-OCH ₃	61.4	61.1
4'-OCH ₃	62.4	63.6

ตารางที่ 3.9 ข้อมูล ¹H NMR spectrum ของสาร xanthomicrol ที่ได้จากการทดลองเทียบกับงานวิจัยอ้างอิง

¹ H	δ_H ppm, J (Hz)	
	ผลจากงานวิจัยอ้างอิง ^[20]	ผลจากการทดลอง

3	6.89 (s)	7.26 (s)
2'	7.95 (d, $J=8.8$ Hz)	7.90 (d, $J=7.89$ Hz)
3'	6.96 (d, $J=8.8$ Hz)	7.05 (d, $J=7.04$ Hz)
5'	6.96 (d, $J=8.8$ Hz)	7.05 (d, $J=7.04$ Hz)
6'	7.95 (d, $J=8.8$ Hz)	7.90 (d, $J=7.89$ Hz)
6-OCH ₃	3.82 (s)	3.90 (s)
7-OCH ₃	3.92 (s)	4.02 (s)
8-OCH ₃	4.02 (s)	4.04 (s)
5-OH	12.79 (s)	12.78 (s)

ตารางที่ 3.10 ข้อมูล ^{13}C NMR spectrum ของสาร xanthomicrol ที่ได้จากการทดลองเทียบกับงานวิจัยอ้างอิง

^{13}C	δ_c ppm	
	ผลจากงานวิจัยอ้างอิง ^[20]	ผลจากการทดลอง
2	164.2	163.9
3	102.6	103.8
4	182.6	183.05
5	148.6	148.4
6	135.8	136.2
7	152.5	152.4
8	132.7	130.7
9	145.2	145.8
10	106.2	106.2
1'	121.0	123.6
2'	128.6	128.1

3'	116.2	114.7
4'	161.6	162.8
5'	116.2	114.7
6'	128.6	128.1
6-OCH ₃	60.6	60.0
7-OCH ₃	61.9	61.9
8-OCH ₃	61.5	61.1

ตารางที่ 3.11 ข้อมูล IR spectrum ของสาร xanthomicrol ที่ได้จากการทดลองเทียบกับงานวิจัยอ้างอิง

f ⁿ group	V _{max} (cm ⁻¹)	
	ผลจากงานวิจัยอ้างอิง ^[20]	ผลจากการทดลอง
OH	3278	3396
γ-pyrone C=O	1655	1776
aromatic ring	1506, 1562, 1605	1502, 1578, 1666

3.3 การทดสอบและคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC ของสารที่สกัดได้จากผักแขยง โดยสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจะปรากฏจุดสีขาวยื่นบนแผ่น TLC ที่มีพื้นหลังเป็นสีน้ำตาลม่วง เนื่องจากเอนไซม์ไทโรซิเนสทำปฏิกิริยากับซับสเตรทซึ่งได้แก่สาร L-tyrosine และ L-DOPA ทำให้เกิดกลไกดังรูปที่ 1.3 พบว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC ได้แก่สารสกัดหายบย่อยที่ D3-D8, D4.3-D4.9, D4.3A-D4.3E, D4.4B-D4.4D และ D4.6A-A4.6E ดังแสดงในตารางที่ 3.12 และจากการทดลองพบว่าการใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรทให้ผลการทดลองที่เร็วกว่าการใช้ L-

tyrosine เนื่องจาก L-DOPA เกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อเปลี่ยนเป็น DOPAquinone ก่อนจะเปลี่ยนเป็นเมลานินเพียงขั้นตอนเดียวเท่านั้น ต่างกับ L-tyrosine ที่เกิดปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน ทำให้การใช้ L-DOPA เป็นข้อได้เปรียบที่เร็วกว่าและชัดเจนมากกว่า

ตารางที่ 3.12 ผลการทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC ของสารที่สกัดได้จากผักแขยง (*Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr.)*

สารบริสุทธิ์/ส่วนสกัดหยาบย่อย	L-tyrosine	L-Dopa
5-Demethyltangeretin	-	-
Xanthomicrol	-	-
D1	-	-
D2	-	-
D3	+	+
D4	+++	+++
D5	++	++
D6	+++	+++
D7	+	+
D8	+	+
D9	-	-
D10	-	-
D4.1	-	-
D4.2	-	-
D4.3	+++	+++
D4.5	+++	+++
D4.6	++	++
D4.7	+	+

D4.8	+	+
D4.9	+	+
D4.3A	+++	+++
D4.3B	++	++
D4.3C	++	++
D4.3D	++	++
D4.3E	++	++
D4.4A	-	-
D4.4B	+	+
D4.4C	++	++
D4.4D	+	+
D4.4E	-	-
D4.6A	++	++
D4.3B	+++	+++
D4.6C	+++	+++
D4.6D	++	++
D4.6E	++	++

*ผลการทดลองแสดงเป็น - หมายถึงไม่ปรากฏจุดสีขาบนแผ่นTLC, + หมายถึงปรากฏจุดสีขาบนแผ่นTLCเล็กน้อย, ++ หมายถึงปรากฏจุดสีขาบนแผ่นTLCปานกลาง และ +++ปรากฏจุดสีขาบนแผ่นTLCเป็นจำนวนมาก

3.4 การทดสอบและคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน 96-well plates

(Mushroom tyrosinase inhibition assay)

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน 96-well plates ของสารที่สกัดได้จากผักแขยงที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC โดยทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง สามารถคำนวณค่า IC₅₀ เฉลี่ยจากโปรแกรม GraphPad Prism ได้ดังแสดงในตารางที่ 3.13 พบว่า Kojic acid ที่ใช้

เป็นตัวควบคุมเชิงบวกมีค่า IC_{50} ใกล้เคียงกับงานวิจัยอ้างอิง^[21] แสดงว่าการทดลองที่ทำค่อนข้างมีประสิทธิภาพในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน 96-well plates พบว่าสารสกัดหยาบย่อยที่ D4.5, D4.8, D4.3B และ D4.4C มีค่า IC_{50} ที่น้อยกว่าหรือใกล้เคียงกับ Kojic acid ทั้งการใช้ L-tyrosine และ L-DOPA เป็นสับสเตรท แสดงว่าสารสกัดหยาบย่อยเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน 96-well plates ดีกว่าหรือใกล้เคียง Kojic acid และยังพบว่ามีสารสกัดหยาบย่อยจำนวนหนึ่งรวมถึงสารบริสุทธิ์ที่ไม่สามารถหาค่า IC_{50} จากโปรแกรมได้ เนื่องจากกราฟมีช่วงค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่กว้างมากเกินไป กราฟที่ได้ออกมาจึงมีความแปรปรวนสูงมาก หากนำไปคำนวณ ค่า IC_{50} ที่ได้ออกมาจะไม่สามารถเชื่อถือได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่สารอาจไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสังเกตได้จากสารบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดที่ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC เมื่อนำมาทดสอบบน 96-well plates ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มีค่าสูงมากจนไม่สามารถนำมาพล็อตกราฟได้ อีกทั้งยังพบว่าในสารสกัดหยาบย่อยที่ D4.7 และ D4.9 สามารถหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine เป็นสับสเตรทได้แต่ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-DOPA เป็นสับสเตรทได้ อาจเกิดจากการเลือกช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ โดยสารทั้งสองอาจจะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใช้ L-DOPA เป็นสับสเตรทเร็วกว่าช่วงเวลาที่ทำทดลอง จึงไม่สามารถคำนวณค่า IC_{50} ออกมาได้

ตารางที่ 3.13 แสดงการคำนวณค่า Inhibitory concentration (IC_{50}) เฉลี่ยจากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน 96-well plates ของสารที่สกัดได้จากผักแขยง

สาร/ส่วนสกัดหยาบย่อย	IC_{50} เฉลี่ย ($\mu\text{g/mL}$)	
	L-tyrosine	L-DOPA
Kojic acid*	12.63	14.23
D4.5	9.66	11.25
D4.7	10.68	ไม่สามารถระบุได้
D4.8	6.20	15.07
D4.9	15.69	ไม่สามารถระบุได้

D4.3A	67.32	13.24
D4.3B	16.32	13.59
D4.3C	ไม่สามารถระบุได้	ไม่สามารถระบุได้
D4.3D	21.72	30.90
D4.3E	22.22	19.66
D4.4B	25.04	241.02
D4.4C	6.20	9.70
D4.4D	34.38	53.27
D4.6B	17.59	29.08
D4.6C	25.50	28.42
D4.6D	ไม่สามารถระบุได้	ไม่สามารถระบุได้
D4.6E	ไม่สามารถระบุได้	ไม่สามารถระบุได้
5-Demethyltangeretin	ไม่สามารถระบุได้	ไม่สามารถระบุได้
Xanthomicrol	ไม่สามารถระบุได้	ไม่สามารถระบุได้

* Kojic acid ใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวก(Positive control) ความเข้มข้นของ หน่วย μM

3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay) ด้วยวิธี MTT assay

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ B16F10 melanoma cell ของสารที่สกัดได้จากผักแขยง สามารถคำนวณ %cell survival ดังแสดงในตารางที่ 3.14 พบว่าส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D4.5, D4.7, D4.8, D4.9, D4.3A, D4.3B, D4.3D, D4.3E, D4.6B และ D4.6C ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ทุกๆความเข้มข้น แต่ส่วนสกัดหยาบย่อยที่ D4.4C และ D4.4D เป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น $100 \mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 3.14 แสดง %cell survival ของสารสกัดหยาบย่อยและ Kojic acid ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ $100 \mu\text{g/ml}$

ส่วนสกัดหยาบย่อย	%cell survival ที่ความเข้มข้น		
	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$

DMSO (blank)	100		
Kojic acid*	96.31	92.41	66.56
D4.5	-	77.15	76.43
D4.7	-	108.82	101.41
D4.8	-	109.00	104.98
D4.9	-	100.11	90.46
D4.3A	-	94.94	87.96
D4.3B	-	88.13	90.11
D4.3C	-	90.48	92.06
D4.3E	-	78.01	72.38
D4.4C	-	84.84	44.12
D4.4D	-	86.55	43.24
D4.6B	-	99.59	87.71
D4.6C	-	84.46	89.88

* Kojic acid ใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวก(Positive control) ความเข้มข้นของ หน่วย μM , - แสดงถึงการไม่ได้ทำการทดลองในช่วงความเข้มข้นนั้น

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการนำผักแขยง (*Limnophila aromatica* (Lam.) Merr.) ที่มีสารประกอบหลักเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกมาสกัดแยกพบว่าได้สารบริสุทธิ์สองชนิดคือ 5-demethyl tangeretin ($C_{19}H_{15}O_7$, 358.1053 กรัมต่อโมล) ลักษณะเป็นผลึกของแข็งสีเหลืองอ่อน ปริมาณ 0.9 มิลลิกรัม และ xanthomicrol ($C_{18}H_{16}O_7$, 344.0896 กรัมต่อโมล) ลักษณะเป็นผงของแข็งสีเหลืองเข้ม ปริมาณ 24.8 มิลลิกรัม โดยสารทั้งสองชนิดได้พิสูจน์ทราบโครงสร้างจากวิธีทางสเปกโตรสโคปี อีกทั้งได้สารสกัดหยาบย่อยจำนวน 50 สาร สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน TLC ได้แก่สารสกัดหยาบย่อยที่ D3-D8, D4.3-D4.9, D4.3A-D4.3E, D4.4B-D4.4D และ D4.6A-A4.6E และได้นำสารเหล่านี้มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสบน 96-well plates พบว่าสารสกัดหยาบย่อยที่ D4.5, D4.8, D4.3B และ D4.4C มีค่า IC_{50} ที่น้อยกว่าหรือใกล้เคียงกับ Kojic acid ที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกทั้งการใช้ L-tyrosine และ L-DOPA เป็นสับสเตรท แสดงว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีกว่าหรือใกล้เคียง Kojic acid และเป็นไปได้ว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน เนื่องจากเอนไซม์ไทโรซิเนสมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้ร่างกายผลิตเม็ดสีเมลานิน หากมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสให้ลดลงได้ เม็ดสีเมลานินก็จะสร้างได้ลดลงเช่นกัน โดยสารสกัดหยาบย่อยที่ D4.4C มีค่า IC_{50} ที่ต่ำที่สุดคือ 6.20 และ 9.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ที่ใช้ L-tyrosine และ L-DOPA เป็นสับสเตรทตามลำดับ แต่สารสกัดหยาบย่อยที่ D4.4C มีความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จึงไม่เหมาะต่อการนำไปใช้เป็นส่วนผสมของยาหรือเครื่องสำอาง ดังนั้นตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีที่สุดในการทดลองนี้คือสารสกัดหยาบย่อยที่ D4.5 โดยมีค่า IC_{50} 9.66 และ 11.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ที่ใช้ L-tyrosine และ L-DOPA เป็นสับสเตรทตามลำดับ อีกทั้งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ 50 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ จึงสามารถนำไปสกัดต่อเพื่อใช้เป็นยาหรือเครื่องสำอางที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดสีเมลานินได้

เอกสารอ้างอิง

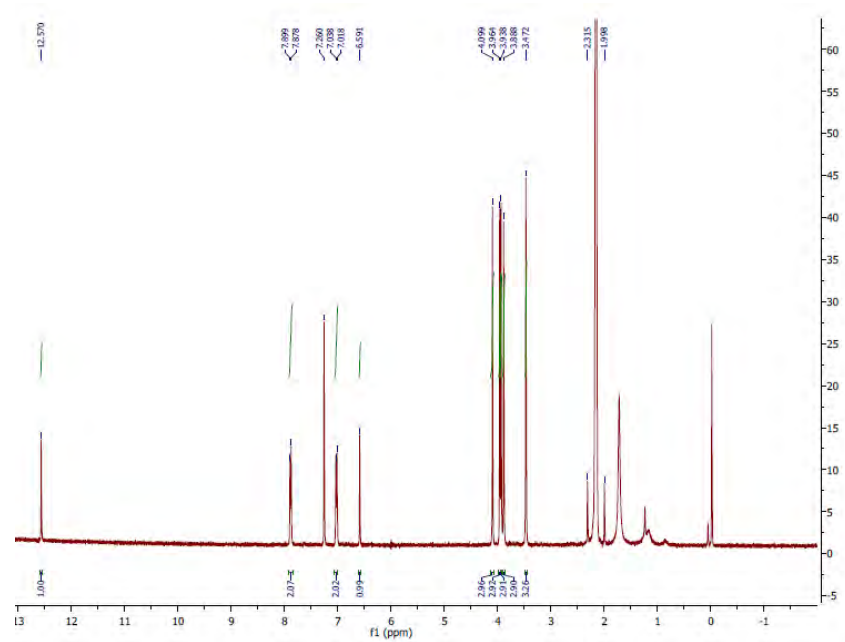
- [1] Schmidt, Charles W., UV Radiation & Skin Cancer: The Science behind Age Restrictions for Tanning Beds, *Environmental Health Perspectives*, **2012**, 120, 310-313.
- [2] Te-Sheng Chang, An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors, *International Journal of Molecular Sciences*, **2009**, 10, 2440-2475.
- [3] Eunsun Jung, Jongsung Lee, Sungran Huh, Jienny Lee, Young-Soo Kim, Gyedong Kim, Deokhoon Park, and Phloridzin-induced melanogenesis is mediated by the cAMP signaling pathway, *Food and Chemical Toxicology*, **2019**, 47, 2436–2440.
- [4] Huey-Chun Huang, Shu-Jen Chang, Chia-YinWu, Hui-Ju Ke, and Tsong-Min Chang, Shogaol Inhibits α -MSH-Induced Melanogenesis through the Acceleration of ERK and PI3K/Akt-Mediated MITF Degradation, *BioMed Research International*, **2014**, 1-9.
- [5] Huey-Chun Huang, Yin-Chun Chou, Chia-Yin Wu, and Tsong-Min Chang, Gingerol inhibits melanogenesis in murine melanoma cells through down-regulation of the MAPK and PKA signal pathways, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2013**, 438, 375–381.
- [6] Sang Hee Lee, Sang Yoon Choi, Hocheol Kim, Jae Sung Hwang, Byeong Gon Lee, Jian Jun Gao, and Sun Yeou Kim, Mulberroside F. isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2002**, 25, 1045 -1048.

- [7] Kim S, Jung SH and Cho CW. Physicochemical studies of a newly synthesized molecule, 6-methyl-3-phenethyl-3,4-dihydro-1h-quinazoline-2-thione(jsh18) for topical formulations. *Archives of Pharmacal Research*, **2008**, 31, 1363-1368.
- [8] Dspace, Tyrosinase Inhibition activity and total phenolics content of the extracts from *Carissa carandas* L. in Samut Songkhram, Retrieved from. <http://www.eresearch.ssru.ac.th/handle/123456789/883> (accessed 19.03.19).
- [9] Gorai, D., Jash, S. K., Singh, R. K., and Gangopadhyay, A., Chemical and pharmacological aspects of *Limnophila aromatica* (Scrophulariaceae): an overview, *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, **2014**, 2(3), 348-356.
- [10] F.A. Larik, A. Saeed, P.A. Channar, U. Muqadar, Q. Abbas, M. Hassan, S.-Y. Seo, and M. Bolte, Design, synthesis, kinetic mechanism and molecular docking studies of novel 1-pentanoyl-3-arylthioureas as inhibitors of mushroom tyrosinase and free radical scavengers, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, 141, 273–281.
- [11] K. Hałdysa, W. Goldemanb, M. Jewgiskia, E. Woliskaa, N. Angerc, J. Rossowskac, R. and Latajka, Inhibitory properties of aromatic thiosemicarbazones on mushroom tyrosinase: Synthesis, kinetic studies, molecular docking and effectiveness in melanogenesis inhibition, *Bioorganic Chemistry*, **2018**, 81, 577-586.
- [12] OHSU Knight Cancer Institute, Melanoma and Other Skin Cancers, Retrieved from. <https://www.ohsu.edu/knight-cancer-institute/melanoma-and-other-skin-cancers> (accessed 20.02.08).

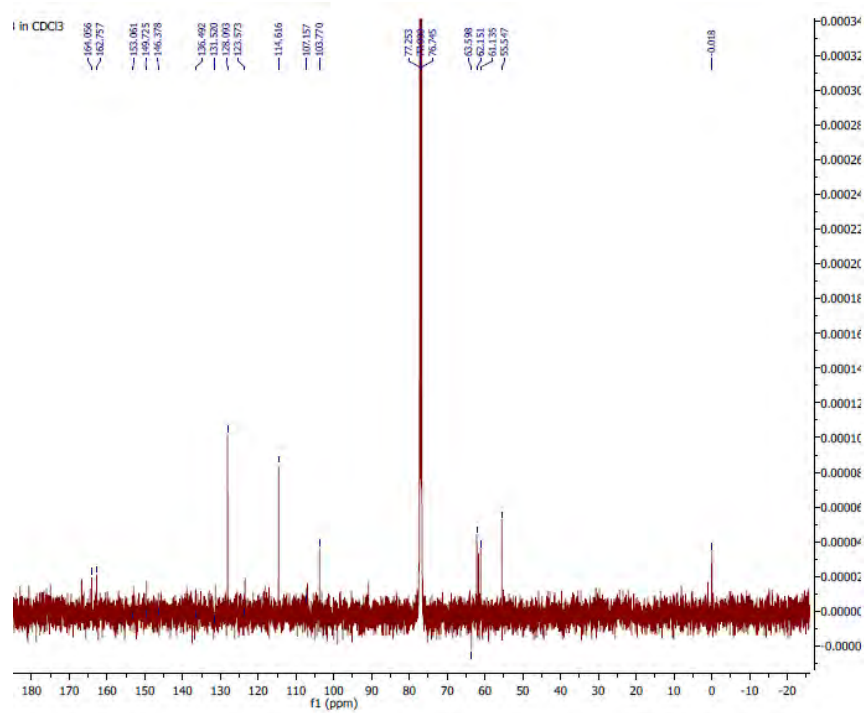
- [13] Insain, P., Inhibition of Melanogenesis from Thai Berries, *EAU Heritage Journal Science and Technology*, **2018**, 12(2), 69-82.
- [14] Pillaiyar, T., Manickam, M., and Namasivayam, V., Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, **2017**, 32(1), 403-425.
- [15] Kukongviriyapan U., Luangaram S., Leekhaosoong K., Kukongviriyapan V., and Preeprame S., Antioxidant and Vascular Protective Activities of *Cratoxylum formosum*, *Syzygium gratum* and *Limnophila aromatica*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2007**, 30(4), 661-666.
- [16] Nanasombat S. and Teckchuen N. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables, *Journal of Medicinal Plants Research*, **2009**, 3(5), 443-449.
- [17] Rattanasena, Paweena., Antioxidant and Antibacterial Activities of Vegetables and Fruits Commonly Consumed in Thailand, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **2012**, 15(18), 877-882.
- [18] Sciencedirect, MTT assay, Retrieved from. https://www.sciencedirect.com/topics/_/neuroscience/mtt-assay (accessed 20.02.08).
- [19] Wang D., Wang J., Huang X., Tu Y., and Ni K., Identification of polymethoxylated flavones from green tangerine peel (*Pericarpium Citri Reticulatae Viride*) by chromatographic and spectroscopic techniques, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2007**, 44, 63-69.

- [20] F. Pınar S., Nurten E., and Ihsan C., Terpenic and Phenolic Compounds from *Sideritis stricta*, *Turkish Journal of Chemistry*, **2006**, 30, 495-504.
- [21] Enos T. A., Shoko F., Kazuhiro S., Kuniyoshi S., Hiroya I., Yoh-ichi M. and Ryuichiro K., The Inhibitory Effects of Representative Chalcones Contained in *Angelica keiskei* on Melanin Biosynthesis in B16 Melanoma Cells, *Natural Product Communications*, **2012**, 7, 1007-1010.

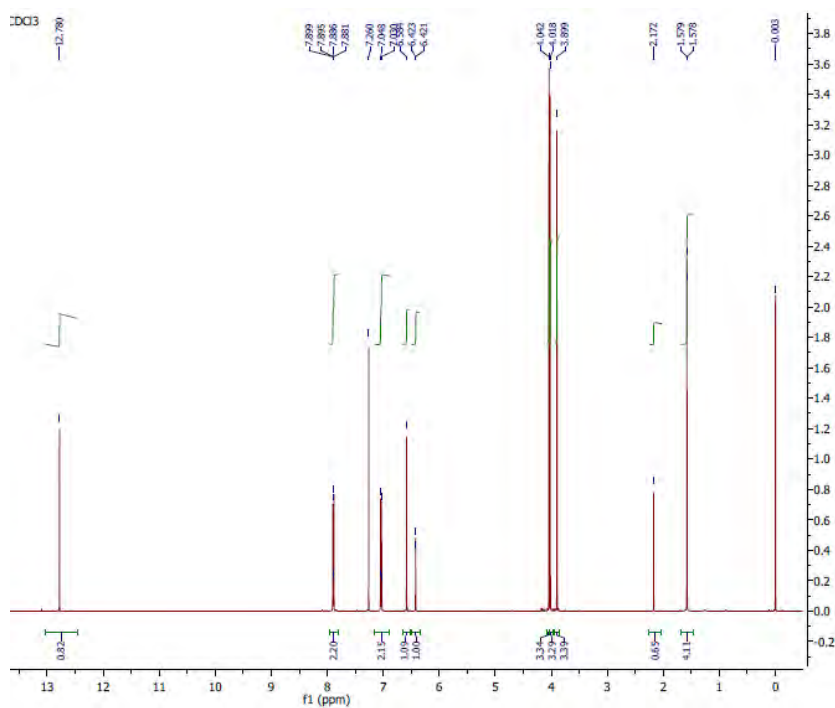
ภาคผนวก



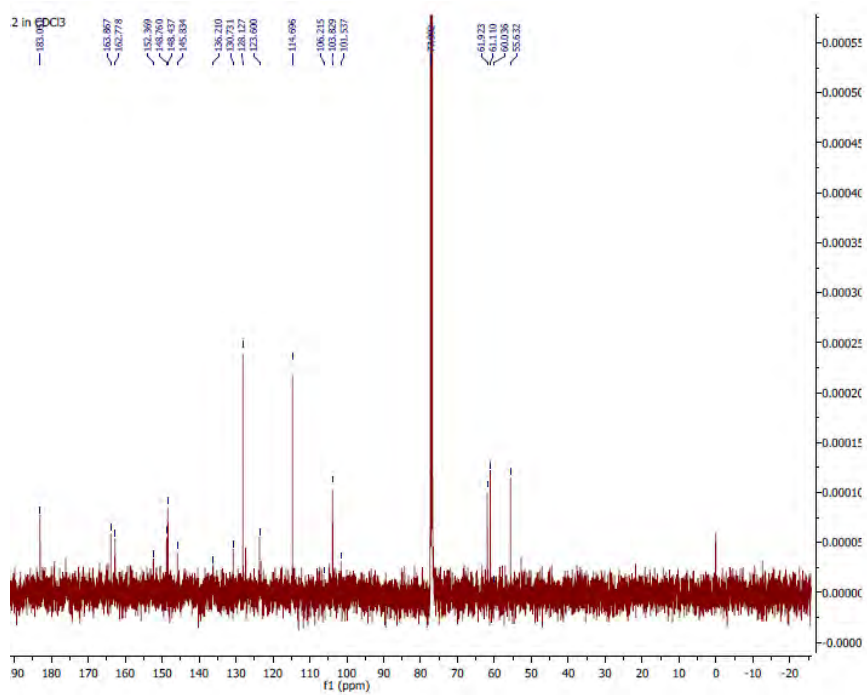
รูปที่ A.1 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสาร 5-demethyl tangeretin



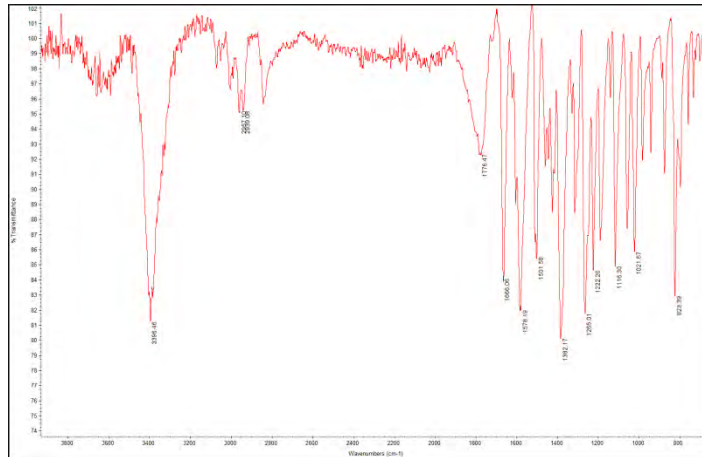
รูปที่ A.2 $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสาร 5-demethyl tangeretin



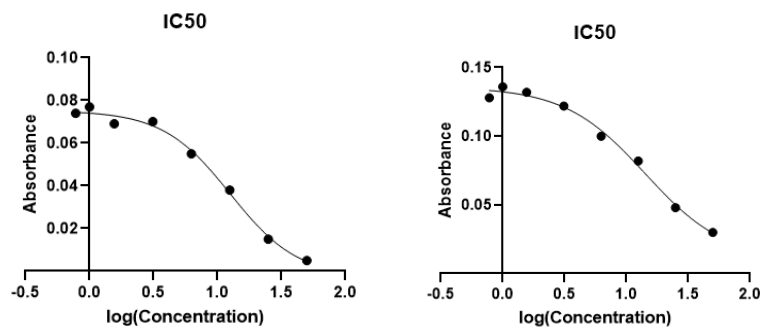
รูปที่ A.3 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัมของสาร xanthomicrol



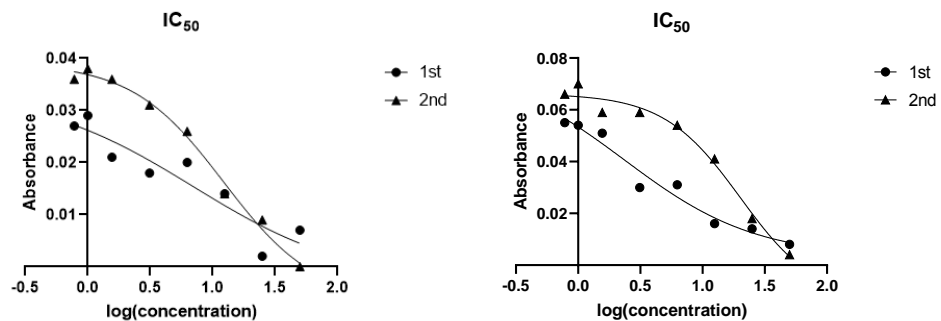
รูปที่ A.4 $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตรัมของสาร xanthomicrol



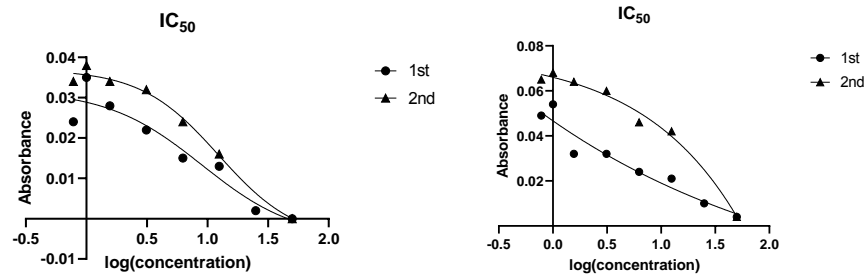
รูปที่ A.5 IR สเปกตรัมของสาร xanthomicrol



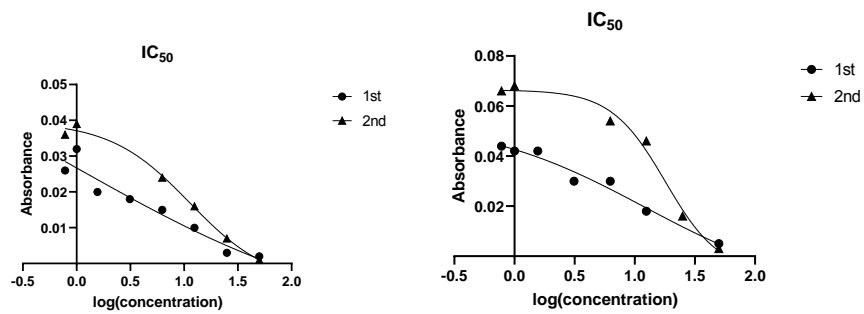
รูปที่ A.6 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของ kojic acid



รูปที่ A.7 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย

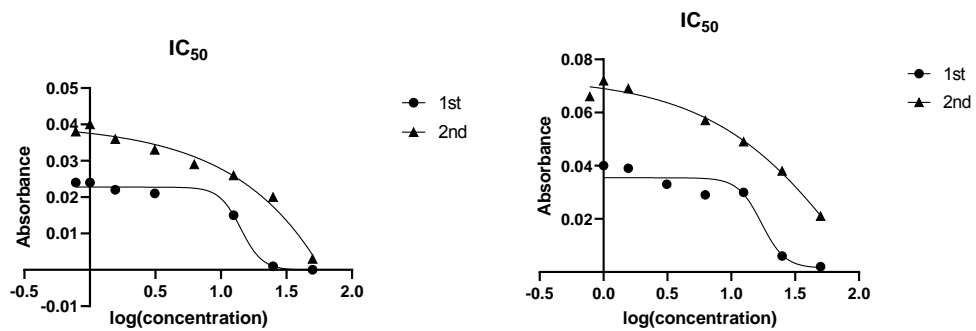


รูปที่ A.8 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) สารสกัดหยาบย่อย D4.7



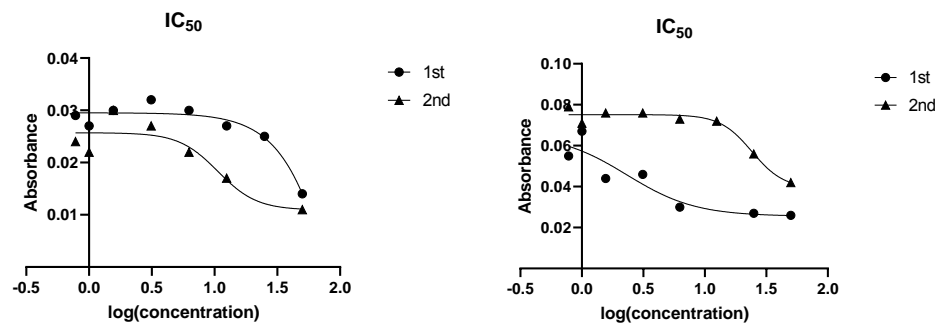
รูปที่ A.9 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาบย่อย

D4.8

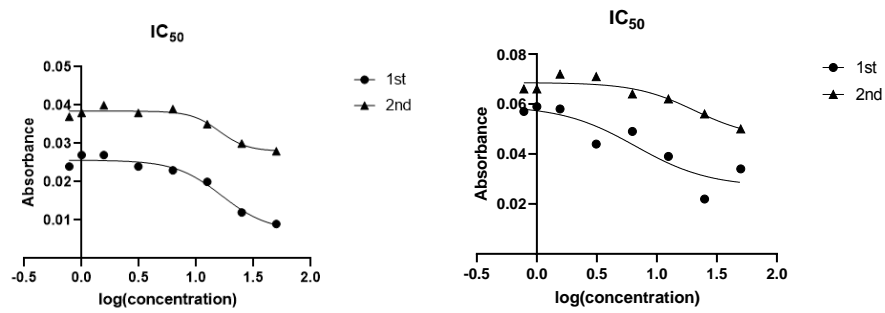


รูปที่ A.10 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาบย่อย

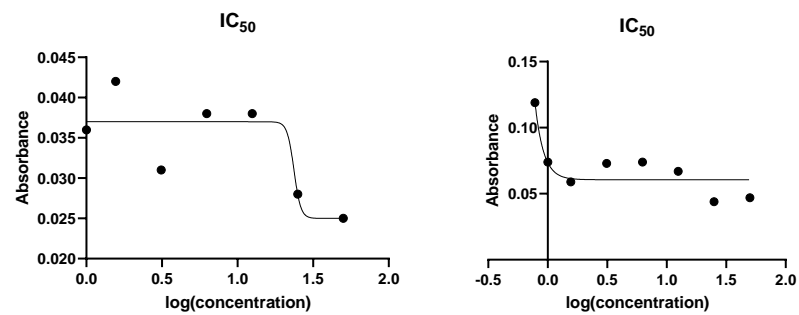
D4.9



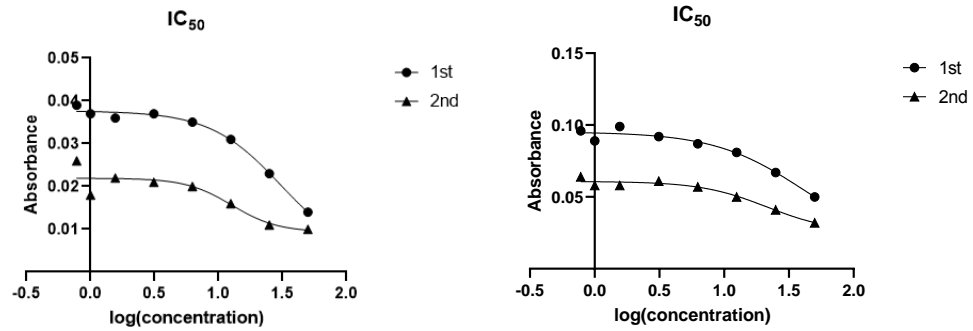
รูปที่ A.11 กราฟหาค่า IC₅₀ ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย
D4.3A



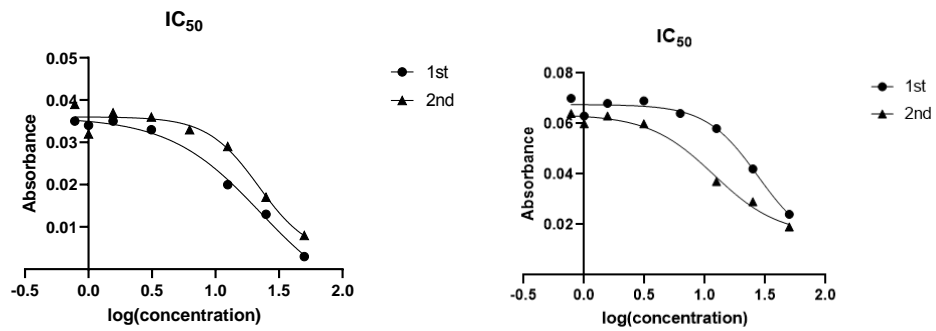
รูปที่ A.12 กราฟหาค่า IC₅₀ ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย
D4.3B



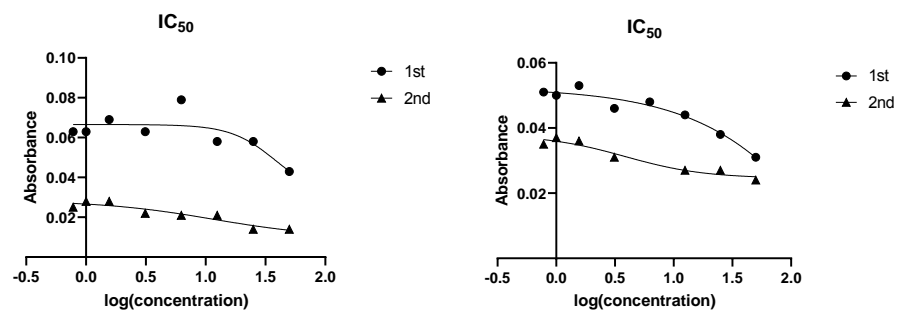
รูปที่ A.13 กราฟหาค่า IC₅₀ ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย
D4.3C



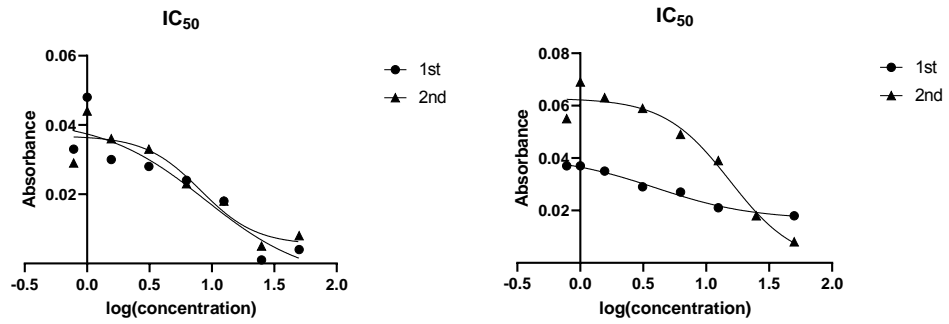
รูปที่ A.14 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย D4.3D



รูปที่ A.15 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย D4.3E

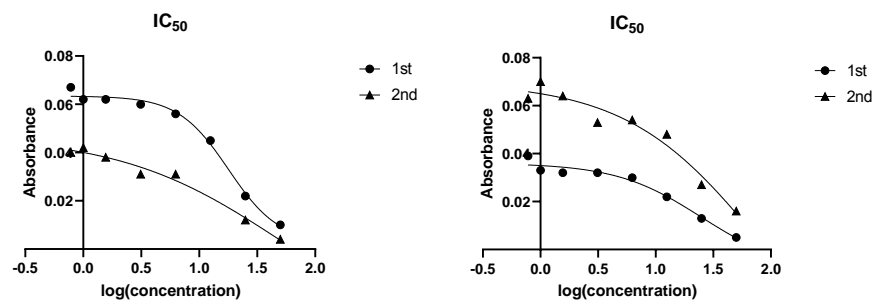


รูปที่ A.16 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย D4.4B



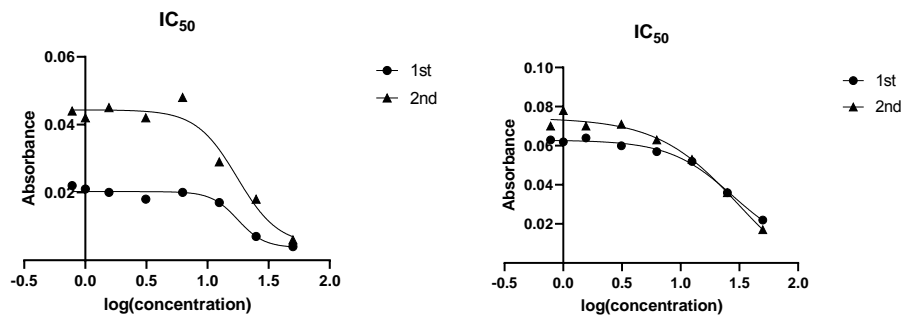
รูปที่ A.17 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย

D4.4C



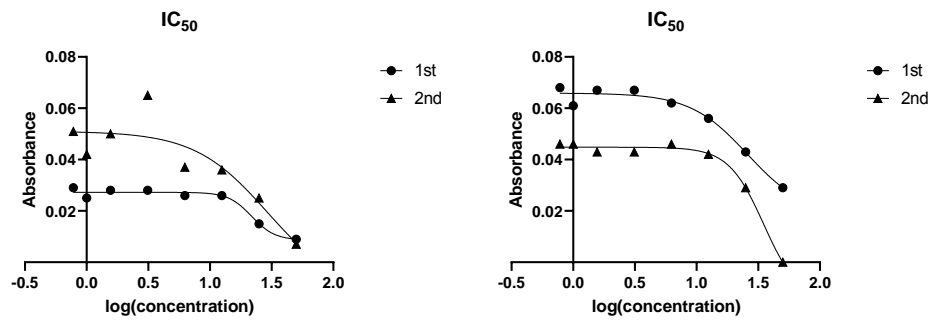
รูปที่ A.18 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย

D4.4D

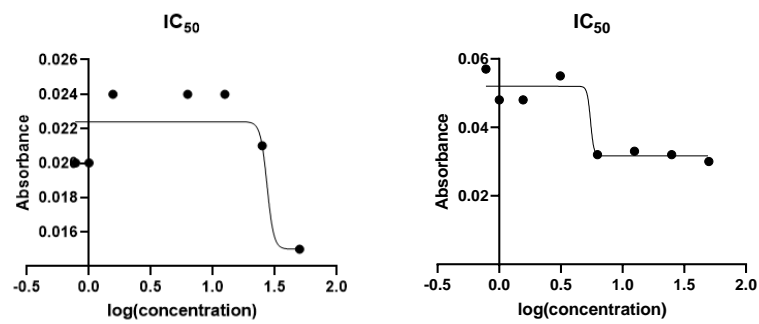


รูปที่ A.19 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย

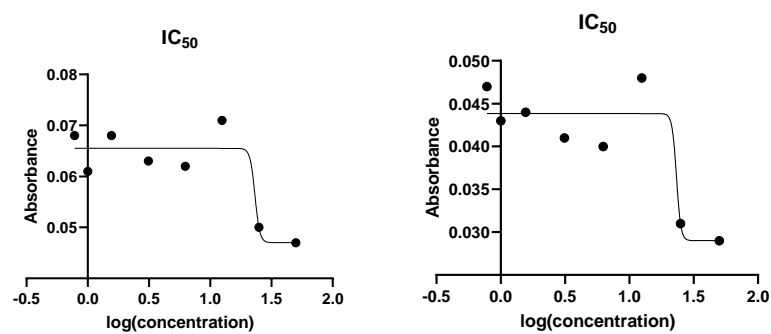
D4.6B



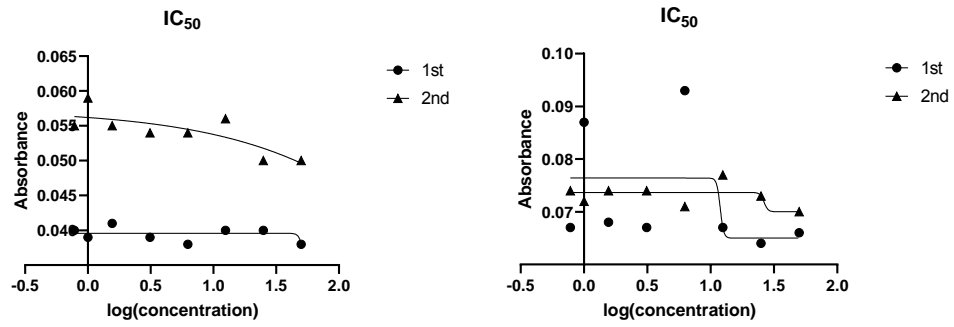
รูปที่ A.20 กราฟหาค่า IC₅₀ ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย
D4.6C



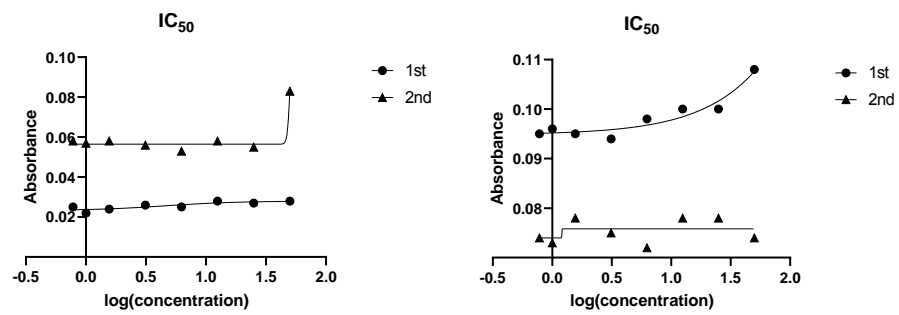
รูปที่ A.21 กราฟหาค่า IC₅₀ ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย
D4.6D



รูปที่ A.22 กราฟหาค่า IC₅₀ ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสารสกัดหยาดย่อย
D4.6E



รูปที่ A.23 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสาร 5-demethyl tangeretin



รูปที่ A.23 กราฟหาค่า IC_{50} ที่ใช้ L-tyrosine (ซ้าย) และ L-DOPA (ขวา) ของสาร xanthomicrol

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวอิสรีร์ จรรย์ารติพงษ์ เกิดเมื่อวันที่ 16 เดือนเมษายน พ.ศ. 2541 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนบุญวาทย์วิทยาลัย จังหวัดลำปาง เมื่อปีการศึกษา 2558 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2559 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 288/45 แขวงหลักสอง เขตบางแค จังหวัดกรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10160 อีเมล isaree_jub@hotmail.com