

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สำนักพระราชวัง ปีงบประมาณ พ.ศ.2556 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่น เจ้าหน้าที่โครงการ อพ.สธ. และเจ้าหน้าที่การไฟฟ้า เขื่อนจุฬาภรณ์ ในการประสานงานโครงการและการประสานงานด้านต่างๆ มาโดยตลอด

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2556

บทคัดย่อ

การศึกษารั้วนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านการสร้างเมลานินของสมุนสาธิตด้วยแอลกอฮอล์ของไฟที่เก็บจากเขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ 5 ชนิด ได้แก่ จะนา (*Glochidion coccineum*), รสสุคนธ์ (*Tetracera loureirii*), มะขามเครือ (*Dalbergia darlacensis*), ตั้วขน

(*Cratoxylum formosum*) และเจตพังคี (*Cladogynos orientalis*) ผลจากการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สารสกัดรสสุคนธ์สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด (IC_{50} เท่ากับ 0.202 mg/ml) และมีความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานोไซต์ B16-F10 น้อยที่สุด ทั้งนี้จากการ incubate นาน 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดทั้งห้าชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำโดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 0.5 mg/ml เมื่อศึกษาผลของสารสกัดต่อการสร้างเมลานินในเซลล์ B16-F10 พบว่าสารสกัดมะขามเครือสามารถยับยั้งการผลิตเมลานินได้สูงที่สุด (67.80%) รองลงมาคือสารสกัดรสสุคนธ์ ตั้วขน จะนา และเจตพังคี ตามลำดับ และเมื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านการสร้างเมลานิน ในเซลล์ B16-F10 โดยใช้เทคนิค Semi-quantitative-reverse transcription-polymerase chain reaction พบว่าที่ความเข้มข้น 0.065-0.250 mg/ml สารสกัดรสสุคนธ์สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน Tyrosinase และ TRP-1 ได้สูงที่สุด ในขณะที่สารสกัดมะขามเครือมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน TRP-2 ได้ดีที่สุด นอกจากนี้สารสกัดจะนา ตั้วขน และเจตพังคี ล้วนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเมลานินได้ด้วยเช่นกัน

ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดทั้งห้าชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดรสสุคนธ์และมะขามเครือ มีศักยภาพในการต้านการสร้างเมลานินสูง ควรได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ Whitening ต่อไป

คำสำคัญ การต้านการสร้างเมลานิน ไทโรซิเนส จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน เจตพังคี

Abstract

This study aims to examine the anti-melanogenetic effect of ethanolic extracts of 5 plants collected from Chulabhorn Dam, Chaiyaphum Province including *Glochidion coccineum*, *Tetracera loureirii*, *Dalbergia darlacensis*, *Cratoxylum formosum* and *Cladogynos orientalis*. *T. loureirii* showed the highest tyrosinase inhibition by enzymatic test with IC_{50} at 0.202 mg/ml. All of five extracts revealed low toxicity on B16-F10 melanoma cells with IC_{50} higher than 0.5 mg/ml especially *T. loureirii* exhibited the lowest toxicity on this cell line. The result on melanin synthesis in B16-F10 cells indicated that, *D. darlacensis* inhibited the melanin production at 67.80% which was higher than that of *T. loureirii*, *C. formosum*, *G.*

coccineum, and *C. orientalis*, respectively. The anti-melanogenesis mechanism was examined in B16-F10 cells by using semi-quantitative-reverse transcription-polymerase chain reaction. At 0.065-0.250 mg/ml, the extract of *T. loureirii* showed the highest inhibition on the expression of tyrosinase and TRP-1 genes whereas *D. darlacensis* showed the highest inhibition on the expression of TRP-2 gene.

The findings revealed the anti-melanin production competency of these five plant with high effects of *T. loureirii* and *D. darlacensis* extracts. They have potential to be utilized in whitening product development.

Keywords: anti-melanogenetic, tyrosinase, *Glochidion coccineum*, *Tetracera loureirii*, *Dalbergia darlacensis*, *Cratoxylum formosum*, *Cladogynos orientalis*

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูป	vi
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
การทบทวนวรรณกรรม	3
1. การสร้างเม็ดสีผิว (melanogenesis)	3
2. ข้อมูลทางด้านพฤกษศาสตร์ของสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา	6
วิธีการวิจัย	11

1. สารเคมีและอุปกรณ์	11
2. ตัวอย่างสมุนไพร และวิธีการเตรียมสารสกัดหยาบ	11
3. การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition)	12
4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสร้างเมลานินในเซลล์ B16-F10	13
5. การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ด้านการสร้างเมลานิน	13
6. สถานที่ทำการวิจัย	15
7. การวิเคราะห์ทางสถิติ	15
ผลการวิจัย	16
1. ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส	16
2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ B16-F10	18
3. ผลของสารสกัดต่อการสร้างเมลานินในเซลล์ B16-F10	21
4. การศึกษาผลของสารสกัดต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเมลานิน	24
อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	27
เอกสารอ้างอิง	29
ประวัตินักวิจัย	32

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษา	12
ตารางที่ 2 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR	14
ตารางที่ 3 ระบบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA	15
ตารางที่ 4 ผลการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน เจตพังคี และสารมาตรฐาน Kojic	18
ตารางที่ 5 ผลของ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน เจตพังคี และสารมาตรฐาน Kojic ที่ทำให้เซลล์ B16-F10 รอดชีวิต 50% (IC_{50})	20
ตารางที่ 6 ผลของ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน เจตพังคี และสารมาตรฐาน Kojic ที่ทำให้เซลล์ B16-F10 รอดชีวิต 80% (IC_{20})	21
ตารางที่ 7 ผลของ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน เจตพังคี และสารมาตรฐาน Kojic ต่อการสร้างเมลานินในเซลล์ B16-F10	23

สารบัญรูป

รูปที่ 1 การผลิตเมลานินจากเซลล์เมลานोไซต์และส่งต่อไปยังเซลล์เคอราติโนไซต์	3
รูปที่ 2 กระบวนการสร้างเมลานิน	4
รูปที่ 3 ลักษณะใบและผล (A) และสารสกัด (B) จะนา (<i>Glochidion daltonii</i> (MÜLL. Arg.) Kurz)	7
รูปที่ 4 ลักษณะใบ (A) และสารสกัด (B) รสสุคนธ์ (<i>Tetracera loureiri</i> (Finet & Gagnep.) Pierre)	8
รูปที่ 5 ลักษณะใบและเถา (A) และสารสกัด (B) มะขามเครือ (<i>Dalbergia darlacensis</i> P.H.HO & Niyomdham)	8
รูปที่ 6 ลักษณะใบและลำต้น (A) และสารสกัด (B) ตั้วขน (<i>Cratoxylum formosum</i> (Jack.) Dyer)	9
รูปที่ 7 ลักษณะยอดใบ (A) และสารสกัด (B) เจตพังคี (<i>Cladogynos orientalis</i> Zipp. ex Span)	10
รูปที่ 8 แสดงร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระไทโรซิเนสของสารมาตรฐาน Kojic	16
รูปที่ 9 แสดงร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระไทโรซิเนสของสารสกัดจะนา	16
รูปที่ 10 แสดงร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระไทโรซิเนสของสารสกัดมะขามเครือ	17
รูปที่ 11 แสดงร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระไทโรซิเนสของสารสกัดเจตพังคี	17
รูปที่ 12 แสดงร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระไทโรซิเนสของสารสกัดตั้วขน	17
รูปที่ 13 แสดงร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระไทโรซิเนสของสารสกัดรสสุคนธ์	18
รูปที่ 14 ลักษณะเซลล์ B16-F10 ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	19
รูปที่ 15 ผลของ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน เจตพังคี และสารมาตรฐาน Kojic ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ B16-F10 เมื่อ incubate สารทดสอบเหล่านี้ร่วมกับเซลล์นาน 24 ชั่วโมง	19
รูปที่ 16 ผลของ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน เจตพังคี และสารมาตรฐาน Kojic ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ B16-F10 เมื่อ incubate สารทดสอบเหล่านี้ร่วมกับเซลล์นาน 48 ชั่วโมง	20
รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานของเมลานิน (melanin)	21
รูปที่ 18 ผลของสารสกัดต่อการสร้างเมลานินในเซลล์ B16-F10	22
รูปที่ 19 ปริมาณการแสดงออกของยีน Tyrosinase โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin	24

รูปที่ 20 ปริมาณการแสดงออกของยีน TRP-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin	25
รูปที่ 21 ปริมาณการแสดงออกของยีน TRP-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin	26