

บทนำ

เขื่อนจุฬาภรณ์เป็นหนึ่งในโครงการพัฒนาไฟฟ้าพลังน้ำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สร้างปิดกั้นลำน้ำพรมบนเทือกเขาขุนพาย บริเวณที่เรียกว่า ภูหยวก ในท้องที่ตำบลทุ่งพระ อำเภอคอนสาร จังหวัดชัยภูมิ การก่อสร้างเขื่อนเริ่มในปี พ.ศ. 2511 แล้วเสร็จในปี พ.ศ. 2516 พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวและสมเด็จพระนางเจ้าพระบรมราชินีนาถได้เสด็จพระราชดำเนินพร้อมด้วยสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีและสมเด็จพระเจ้าลูกเธอเจ้าฟ้าจุฬาภรณวลัยลักษณ์ ไปทรงเปิดเขื่อน และโรงไฟฟ้า เมื่อ วันที่ 3 มิถุนายน 2516 พร้อมทั้งได้พระราชทาน พระนามสมเด็จพระเจ้าลูกเธอเจ้าฟ้าจุฬาภรณวลัยลักษณ์ มาขนานนามเขื่อนว่า " เขื่อนจุฬาภรณ์ " ลักษณะเขื่อนเป็นเขื่อนหินทิ้ง แกนกลางเป็นดินเหนียว ตัวสันเขื่อนยาว 700 เมตร ความสูงจากฐานราก 70 เมตร เป็นลักษณะเขื่อนเอนกประสงค์ในความดูแลของการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (กฟผ.) โดยใช้ประโยชน์ในการผลิตพลังงานไฟฟ้าและยังอำนวยประโยชน์ในด้านเกษตรกรรม ในอ่างเก็บน้ำของเขื่อนยังเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ปลาน้ำจืดอีกด้วย นอกจากนี้ บริเวณโดยรอบของเขื่อนยังตกแต่งเป็นป่าอนุรักษ์ในพื้นที่ประมาณ 41 ไร่ มีต้นไม้ขนาดใหญ่ บางชนิดเป็นพืชหายาก และเป็นแหล่งของพืชสมุนไพรที่สำคัญ

เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ เป็นแหล่งธรรมชาติที่มีความหลากหลายของพืช และจากการศึกษาวิจัยพืชในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) สำนักพระราชวัง ในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ ในปีงบประมาณ 2551 และ 2552 พบว่าพืชที่ศึกษาในวงศ์ Acoraceae, Dilleniaceae, Euphorbiaceae, Guttiferae, Leguminosae และ Zingiberaceae มีสารสำคัญเป็นกลุ่ม phenolic compounds ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี (บังอร และคณะ 2551; 2552) ซึ่งได้มีการจัดทำมาตรฐานสมุนไพรไปแล้ว 8 ชนิด และพบว่ามีพืชสมุนไพร 5 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง มีสารสำคัญเป็นกลุ่ม phenolic และเนื่องจากสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน เช่น วิตามินอี วิตามินซี มักมีฤทธิ์สำคัญในเวชสำอางที่ใช้เป็น whitening agent นอกจากนี้ยังพบว่าสาร phenolic หลายชนิดเช่น gallic acid, catechin, epicatechin มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ที่มีบทบาทในการสร้างเม็ดสีผิวเมลานิน (melanin) ดังนั้นเพื่อขยายข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรดังกล่าว จึงต้องการศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรเหล่านี้ในด้านความสามารถเป็น whitening agent ได้ โดยในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรจากพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิจำนวน 5 ชนิดคือ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตัวขน และเจตพังคี ต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี enzymatic test และรวมถึงศึกษาในเซลล์เมลานोไซต์ (melanocytes) โดยดูผลของสารสกัดเหล่านี้ต่อการผลิตเมลานิน และผลต่อการแสดงออกในระดับยีนของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเมลานินในเซลล์เพาะเลี้ยงนี้ด้วย ซึ่งข้อมูลที่ได้จะช่วยสนับสนุนการนำพืชสมุนไพรเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายขึ้น และเป็นการศึกษาเพื่อเป็นการสร้างฐานข้อมูลด้านประโยชน์ของพืชในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ต่อไป

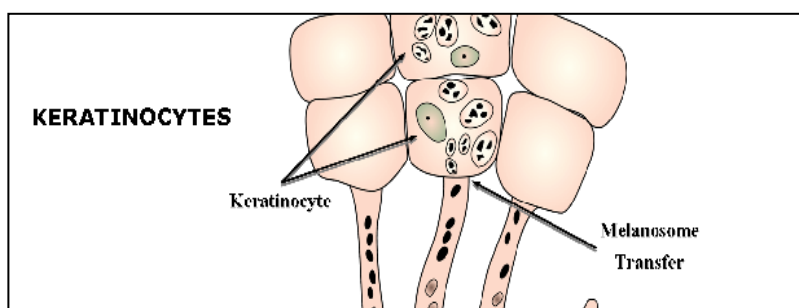
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาศักยภาพด้านฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสและการเกิดเมลานินของพืชสมุนไพรในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ เพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ

การทบทวนวรรณกรรม

1. การสร้างเม็ดสีผิว (melanogenesis)

ผิวหนังของเราจะประกอบไปด้วยเซลล์ผิวหนังชนิดหนึ่งในชั้นหนังกำพร้าเรียกว่า เมลาโนไซต์ (melanocyte) ซึ่งมีประมาณ 8% ของเซลล์ผิวหนังชั้นหนังกำพร้า เซลล์นี้จะผลิตเม็ดสีที่เรียกว่า เมลานิน (melanin) อยู่ในถุงหุ้มเมลานโซม (melanosome) โดยที่เมลาโนไซต์จะส่งเม็ดสีเมลานินไปให้กับเซลล์เคอราติโนไซต์ (keratinocytes) ทำให้เกิดเป็นสีของผิวหนังขึ้น ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 การผลิตเมลานินจากเซลล์เมลานोไซต์และส่งต่อไปยังเซลล์เคอราติโนไซต์

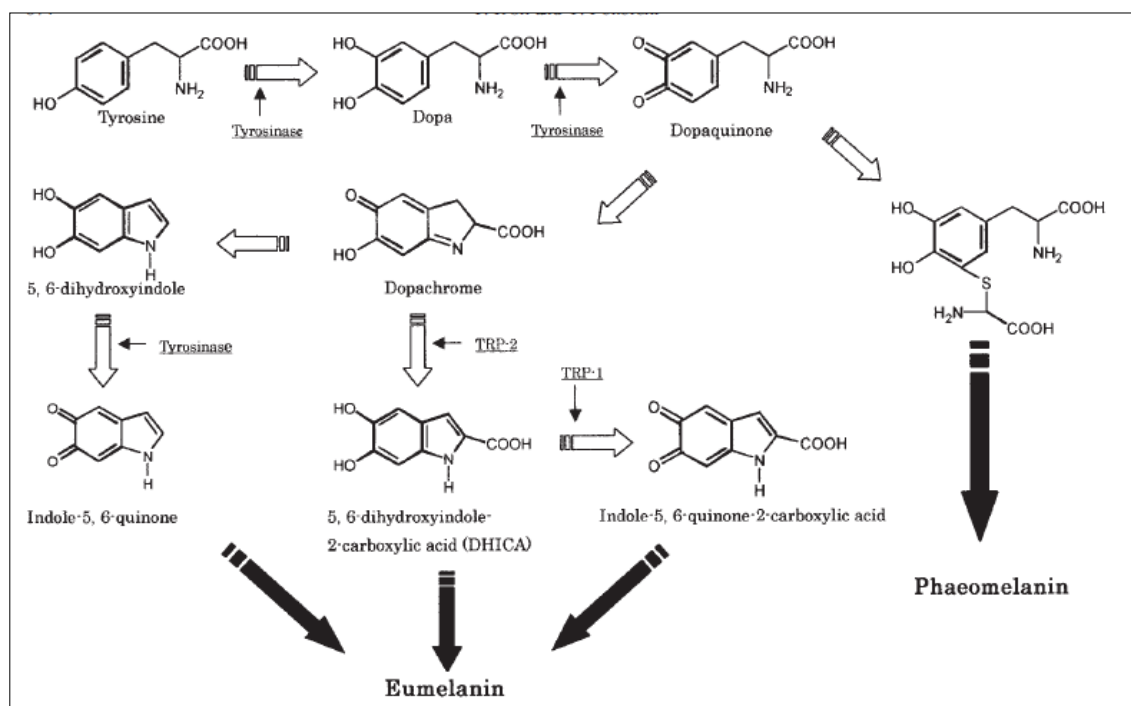
(http://www.brecosmeticlab.com/newslet/54/02_feb/_melanin_syn_02.html)

การที่คนเรามีสีผิวไม่เหมือนกันเนื่องมาจากการผลิตเม็ดสีที่แตกต่างกัน (Neste and Tobin, 2004) โดยสามารถแบ่งเม็ดสีผิว ได้เป็น 3 แบบคือ

1. ยูเมลานิน (eumelanin) เม็ดสีเมลานินชนิดนี้มีสีน้ำตาล-ดำ คนเอเชียและคนผิวคล้ำจะมีเม็ดสีชนิดนี้เป็นจำนวนมาก
2. ฟีโอเมลานิน (pheo-melanin) และเม็ดสีสีแดงหรือที่เรียกว่า ออกซิโมโกลบิน (oxyhemoglobin) หรือสีเหลือง ที่เรียกว่าแคโรทีน (carotene) ซึ่งคนผิวขาวจะมีเม็ดสีชนิดนี้มากกว่าคนผิวคล้ำ
3. แบบผสม คือมีเม็ดสีเมลานินทั้งสองแบบผสมกัน เรียกว่า mixed melanin

เมลานิน (melanin) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากระบวนการสร้างเม็ดสี หรือที่เรียกว่า melanogenesis ซึ่งถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์เฉพาะของเซลล์เมลานोไซต์ 3 ชนิด คือ tyrosinase, tyrosinase-related protein (TRP-1) และ TRP-2 (Krause and Foitzik, 2006; Yang et al., 2006) Microphthalmia associated transcription factor (MITF) เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่เชื่อว่ามีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการผลิตเม็ดสีภายในเซลล์เมลานอไซต์เนื่องจาก MITF สามารถเปลี่ยนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ให้เป็นเซลล์ที่คล้ายเมลานอไซต์ (melanocyte-like cells) ได้ (Kim et al., 2006) Melanogenesis เป็นลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมลานอไซต์ (Sato et al., 2011) ซึ่งมีหลายขั้นตอนได้แก่ การสร้างเมลานิน, การขนส่งเมลานิน และการปล่อยเมลานิน (Harata et al., 2007)

ปัจจุบันการพัฒนาผลิตภัณฑ์กลุ่ม whitening จะให้ความสนใจกับเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เนื่องจากเป็นที่ทราบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทในการควบคุมกระบวนการสร้างเม็ดสีผิว ซึ่งในกลุ่มของไทโรซิเนส (tyrosinase family) ประกอบด้วย tyrosinase, TRP-1 และ TRP-2 โดยที่ tyrosinase จะเปลี่ยน tyrosine ไปเป็น 3,4-dihydroxy-phenylalanine (L-DOPA) และเกิดออกซิเดชันของ DOPA เพื่อผลิต DOPA-quinone ในขณะที่ TRP-2 จะทำหน้าที่เหมือน DOPAchrome tautomerase และกระตุ้นให้ DOPA-chrome สร้าง 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) ส่วน TRP-1 จะออกซิไดซ์ DHICA เพื่อผลิต carboxylated indole-quinone แล้วเกิดเป็น Eumelanin ในที่สุด (รูปที่ 2)



สีผิวของคนเราสามารถเข้มข้นหรือจางลงได้ขึ้นกับหลายปัจจัย ทั้งเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของ เอนไซม์ที่เป็นตัวกระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินต่างๆ สิ่งแวดล้อม การสัมผัสแสงแดด การรับประทาน ยาบางชนิด เป็นต้น โดยเฉพาะการสัมผัสกับแสงแดด ที่มีรังสีอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet: UV) ทั้งชนิด A และ B โดยรังสี UV ชนิด A เป็นรังสีที่มีช่วงคลื่นยาว พลังงานต่ำ จะกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังเมลานोไซต์สร้าง เม็ดสีเมลานินได้โดยตรง กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมากขึ้น และทำให้เซลล์เคอราติโนไซต์รับ สารเมลานินได้มากขึ้นส่งผลให้ผิวคล้ำ เกิดฝ้า หรือกระ ในขณะที่รังสี UV ชนิด B มีช่วงคลื่นสั้น พลังงานสูง ทำให้การทำงานของประสานกันของเซลล์เมลานोไซต์และเคอราติโนไซต์เกิดได้ดีขึ้นในการรับส่งเมลานินจึงทำ ให้ผิวคล้ำได้เช่นกัน โดยเมื่อเซลล์เคอราติโนไซต์ได้รับแสง UV จะปล่อยสาร α -MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone), Prostaglandin E2 (PEG2), Plasmin, Adenocorticotrophic hormone (ACTH) และ Endothelial-1 ซึ่งสารทุกตัวนี้จะไปกระตุ้นเซลล์เมลานोไซต์ ให้สร้างเม็ดสีเมลานิน (Choi et al., 2005)

ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่มีสมุนไพรเป็นองค์ประกอบออกจำหน่ายในท้องตลาดหลายชนิด ได้แก่ ทับทิม เมล็ดองุ่น สารสกัดจากเปลือกต้นสน ขมิ้น ว่านหางจระเข้ มะขามป้อม เป็นต้น เวชสำอางที่ นิยมใช้กันมาก คือ ประเภที่ทำให้ผิวขาวกระจ่าง (skin whitening) เพื่อกำจัดจุดด่าง ฝ้า ซึ่งเวชสำอาง เหล่านี้มีสารที่มีฤทธิ์ต้านการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase สารเคมีที่ใช้ในอดีต คือ โปรท และ hydroquinone ซึ่งมีพิษสูง จึงมีการค้นหาสารจากพืชซึ่งเป็นแหล่งธรรมชาติ เช่น พบว่า *Mitracarpus scaber* (bearberry), *Morus alba* (mulberry), *Broussonetia papyrifera* (paper mulberry) มี สารสำคัญ คือ arbutin ที่สามารถยับยั้งการสร้างเมลานิน และยังพบ kojic acid, azelaic acid, glycolic acid ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากชะเอม ทับทิม มะขามป้อม และชา เขียว มี ellagic acid และยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวได้ (<http://www.whiterskin.com/skin-lightening-ingredients.html>)

การศึกษาของ บังอร และคณะ (2547) พบว่าสารสกัดจากพื้นที่โคกภูตากาหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี เช่น กิ่งมะขามป้อม ซึ่งมีสาร phenolic ปริมาณสูง และพบว่ามี gallic acid เป็นส่วนประกอบ สามารถต้านเอนไซม์ tyrosinase ได้ดี (บังอร และคณะ 2552) ซึ่งการศึกษาด้านฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ 8 ชนิด พบว่า 5 ชนิด มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้ดี คือ มะขามเครือ จานา เจตพังคี ตั้วหนาม และรสสุคนธ์ (บังอร และคณะ 2551) ซึ่งยังไม่พบรายงานด้านฤทธิ์ต้าน tyrosinase หรือการสร้างเมลานินมาก่อน

Tyrosinase เป็นเอนไซม์ที่นิยมนำมาใช้ทดสอบสารที่ป้องกันการเกิดสีผิวคล้ำในระบบ *in vitro* (Prota, 1996) โดยพบว่ามียางสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase หลายชนิด เช่น *Artocarpus incisus* (Shimizu et al., 1998), *Broussonetia papyrifera* (Jang et al., 1997) *Glycyrrhiza glabra* (Yokota et al., 1998) และ *Rheum officinale* (Lida et al., 1995) ซึ่งการศึกษาด้วยระบบ *in vivo* ต่อมาพบว่ามีสารสกัดจากสมุนไพรหม่อนและชะเอมมีฤทธิ์เป็น whitening agent ที่ใช้ในเครื่องสำอางได้ (Kim et al., 1998; Petit and Perard, 2003)

เมลานิน เป็นเม็ดสีที่สร้างจากเซลล์ melanocyte หากมีการสังเคราะห์มากจะทำให้สีผิวคล้ำเกิดเป็นจุดต่าง ฝ้า ได้ สามารถหาปริมาณได้โดยวิเคราะห์ปริมาณการสังเคราะห์ภายในเซลล์ ซึ่งนิยมใช้เซลล์เพาะเลี้ยง melanoma B16-F10 cells (Sapkota et al., 2011) มียางว่าสารสังเคราะห์พวก hydroxyphenyl benzyl ether ที่เป็น skin whitening agent สามารถยับยั้งเมลานินได้และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้

2. ข้อมูลทางด้านพฤกษศาสตร์ของสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

2.1 จันทนา

ชื่อท้องถิ่น: จันทนา (รูปที่ 3)

ชื่อทั่วไป: เหมือดเลือด (เลย) ตานาดง (ชัยภูมิ) เสเพลซ่า (กระเหรี่ยง กาญจนบุรี) ไคร้ (ภาคกลาง)

ชื่อพฤกษศาสตร์: *Glochidion daltonii* (MÜLL. Arg.) Kurz

ชื่อพ้อง: *Phyllanthus daltonii* MÜLL. Arg.

Diasperus daltonii (Müller Arg.) Kuntze.

ชื่อวงศ์: Euphorbiaceae

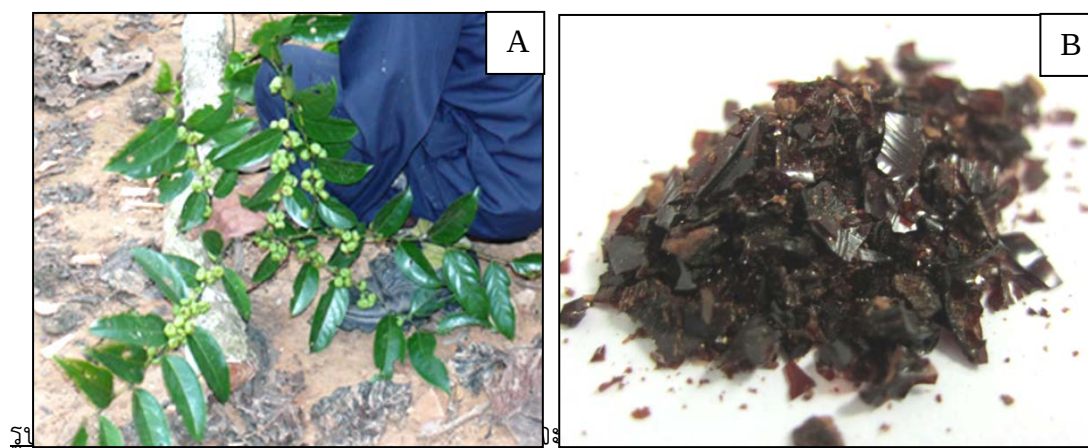
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ใบเดี่ยว รูปหอกหรือรูปขอบขนานแกมรูปไข่ ยาว 9-15 เซนติเมตร กว้าง 4-8 เซนติเมตร ใบหนา ผิวใบเกลี้ยง เป็นมัน ก้านใบสั้น ประมาณ 3-5 มิลลิเมตร เรียงสลับ ดอกเป็นดอกช่อ ออกเป็นกระจุกสั้นประมาณ 0.5 เซนติเมตร ที่ซอกใบ สีขาวอมเขียว กลีบเลี้ยงสีเขียว มี 6 กลีบ ผลเป็นผลแห้งแก่ไม่แตก (indehiscent capsule) ลักษณะกลมแป้น เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร มีพูและร่องตามยาวของผลตามจำนวนเมล็ดประมาณ 6 พู ก้านผล ยาวประมาณ 7 มิลลิเมตร

การกระจายพันธุ์: กลุ่มประเทศแถบเทือกเขาหิมาลัยด้านตะวันออก พม่า จีนตอนใต้ กลุ่มประเทศอินโดจีน สำหรับในประเทศไทยพบได้ทั้งภาคเหนือ ภาคตะวันตกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

นิเวศวิทยาทั่วไป: พบกระจายตามป่าดิบเขาต่ำ (lower montane forest)

ช่วงการออกดอกและติดผล: มีนาคม ถึง ตุลาคม

พฤกษศาสตร์พื้นบ้านในพื้นที่วิจัย: ผลอ่อนและยอดอ่อนกินเป็นผักสด เปลือกต้นใช้เคี้ยวรักษาแผลปากเปื่อย



2.2 รสสุคนธ์

ชื่อท้องถิ่น: เถาวัลย์ไฟ (รูปที่ 4)

ชื่อทั่วไป: มะตาดเครือ รสสุคนธ์ รสสุคนธ์ขาว สุนทรธส เสาวรธ (กรุงเทพฯ) เถากะปดใบเลื่อม (ประจวบคีรีขันธ์) บอระคน อรคนธ์ (ตรัง) ปดคาย ปดเลื้อน (สุราษฎร์ธานี) ปดน้ำมัน (ปัตตานี) ปะละ สะปัลละ (มาเล-นราธิวาส) ย่านปด (นครศรีธรรมราช)

ชื่อพฤกษศาสตร์: *Tetracera loureiri* (Finet & Gagnep.) Pierre

ชื่อพ้อง: *T. assa* DC. var. *loureiri* Finet & Gagnep.

T. sarmentosa Vahl var. *loureiri* Finet & Gagnep.

T. fragrans Ridl.

ชื่อวงศ์: Dilleniaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ไม้เถาวัลย์มีอายุหลายปี มีเนื้อไม้แข็ง ลำต้นสีน้ำตาล แตกกิ่งก้านมาก ใบ (Foliage) ใบเดี่ยว รูปรีถึงรูปขอบขนาน ยาว 5-10 เซนติเมตร กว้าง 4-6 เซนติเมตร ปลายใบเรียวแหลมเป็นติ่งหรือมน โคนใบแหลมหรือมน ขอบใบจัก ผิวใบด้านบนสีเขียวเข้มและสาก เส้นใบเป็นร่องลึก ก้านใบยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร เรียงเวียนสลับ ดอกเป็นช่อดอก ออกเป็นช่อกระจุกตามซอกใบ ใกล้ปลายกิ่งและปลายกิ่ง ดอกสีขาวครีม มีกลิ่นหอม กลีบดอกบาง มี 5 กลีบ หลุดร่วงง่าย กลีบเลี้ยงสีเขียว ติดทน (persistent calyx) เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก ผลเป็นผลแห้งแก่แล้วแตก (dehiscent capsule) ค่อนข้างกลม เมล็ดมี 3-5 เมล็ด สีดำ ผิวมันและมีเนื้อเยื่อรกสีแดงสดเจริญหุ้มเมล็ด (arillated seed)

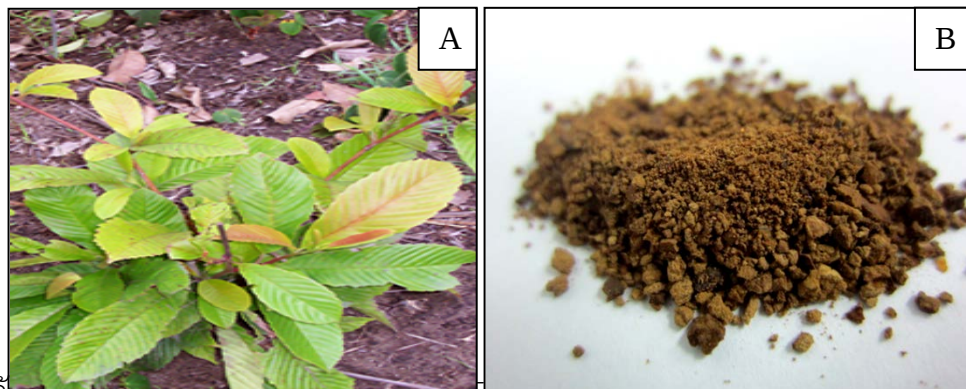
การกระจายพันธุ์: อินเดีย พม่า ลาว กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย

ประเทศไทย: พบกระจายทั่วทุกภาค

นิเวศวิทยาทั่วไป: พบในชายป่าดงดิบและป่าเบญจพรรณ

ช่วงการออกดอกและติดผล: เมษายน ถึง กันยายน

พฤกษศาสตร์พื้นฐานในพื้นที่วิจัย: ดอกตูมอบแห้งใช้บด เข้ายารักษาโรคเอดส์



รูปที่ 4 ลักษณะใบ (A) และเกสรแห้ง (B) พืชชนิด (Petalocaulis) (Petalocaulis) (Petalocaulis) (Petalocaulis) (Petalocaulis) (Petalocaulis) (Petalocaulis) (Petalocaulis) (Petalocaulis) (Petalocaulis)

2.3 มะขามเครือ

ชื่อท้องถิ่น: มะขามเครือ (รูปที่ 5)

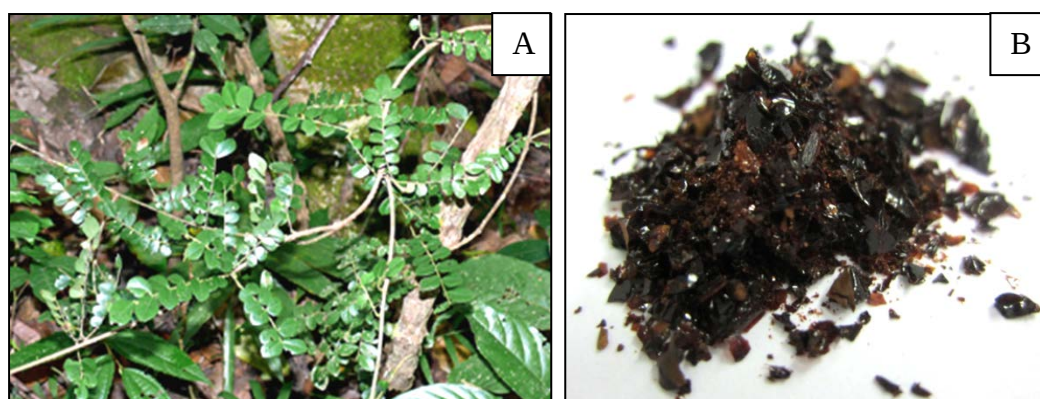
ชื่อพฤกษศาสตร์: *Dalbergia darlacensis* P.H.HO & Niyomdham

ชื่อวงศ์: Leguminosae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ไม้เถาวัลเลื้อย มีเนื้อไม้ ส่วนกิ่งอ่อน ก้านใบมีขนนุ่มสั้นปกคลุม ใบประกอบแบบขนนกปลายช่อคี่ ก้านช่อบี ยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร มีใบย่อย 13-17 ใบ ใบย่อยรูปรีหรือรูปไข่ไม่มีสมมาตร (asymmetry) ยาว 1.5-3 เซนติเมตร กว้าง 1-2 เซนติเมตร ก้านใบย่อยสั้นประมาณ 1 มิลลิเมตร

นิเวศวิทยาทั่วไป: พบในชายป่าดงดิบหรือป่าผลัดใบที่ชื้น

พฤกษศาสตร์พื้นฐานในพื้นที่วิจัย: เถาต้มน้ำหรือดองเหล้าดื่มแก้ปวด



รูปที่ 5 ลักษณะใบและเถา (A) และสารสกัด (B) มะขามเครือ (*Dalbergia darlacensis* P.H.HO & Niyomdham)

2.4 ตั้วขน

ชื่อท้องถิ่น: ตั้วขน หรือ ตั้วหนาม (รูปที่ 6)

ชื่อทั่วไป: ตัวเหลือง (ภาคกลาง) กวยโซง (กะเหรี่ยง-กาญจนบุรี) กุยฉ่องเช่า (กะเหรี่ยง-ลำปาง) แต้วหิน (ลำปาง) ตัวแดง ตัวยาง ตัวเลือด (ภาคเหนือ) ตัว (กาญจนบุรี) ตัวขน (นครราชสีมา) ราเง้ง (เขมร-สุรินทร์) แต้ว (จันทบุรี) ดาว (สตูล)

ชื่อพฤกษศาสตร์: *Cratoxylum formosum* (Jack.) Dyer spp. *Pruniflorum* (Kurz) Gogel.

ชื่อพ้อง: -

ชื่อวงศ์: Guttiferae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ไม้ยืนต้นขนาดเล็ก พัดใบ (deciduous) กิ่งอ่อน ใบอ่อนและช่อดอกอ่อนมีขนนุ่มทั่วไป เปลือกมีสีน้ำตาลอมดำ แตกเป็นเกล็ด เปลือกในสีน้ำตาลเหลืองและมีน้ำยางสีเหลืองปนแดง ใบเดี่ยว รูปรีหรือรูปขอบขนาน ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร กว้างประมาณ 5 เซนติเมตร มีขนละเอียดปกคลุมทั้งสองด้าน เรียงตรงข้าม ก้านใบสั้นประมาณ 0.3 เซนติเมตร ดอกเป็นช่อดอก ออกเป็นกระจุกตามกิ่งเหนือรอยแผลก้านใบและซอกใบ (axillary) ดอกสีชมพูอ่อน ผลเป็นผลแห้งแก่แล้วแตกกลางพู (loculicidal capsule) รูปไข่แกมกระสวยมีคราบไขเคลือบตามผิวของผล เมล็ดมีจำนวนมาก ลักษณะมีครีบเป็นรูปโค้ง กลีบเลี้ยงติดถาวรหุ้ม 1 ใน 4 ของผล (persistent calyx) ก้านผลยาวประมาณ 1 เซนติเมตร

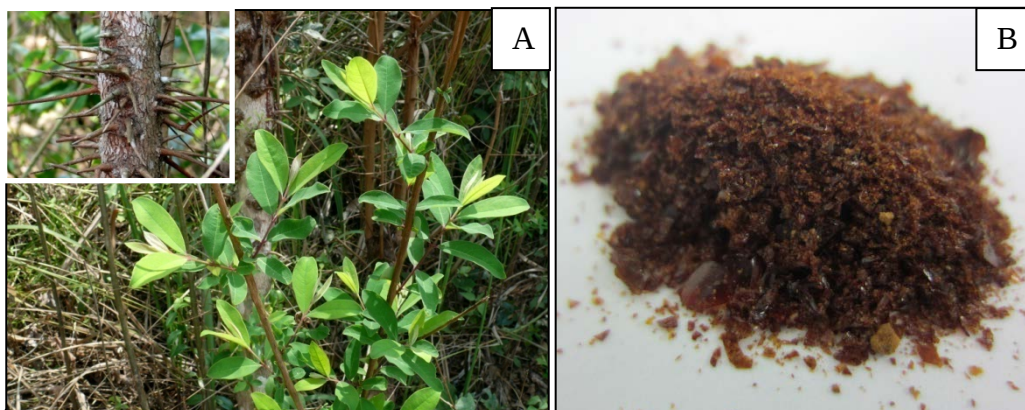
การกระจายพันธุ์: พม่า จีน กัมพูชา ลาว และเวียดนาม

ประเทศไทย: พบกระจายทั่วทุกภาค

นิเวศวิทยาทั่วไป: พบในป่าผลัดใบ

ช่วงการออกดอกและติดผล: กุมภาพันธ์ ถึงกรกฎาคม

พฤกษศาสตร์พื้นฐานในพื้นที่วิจัย: กิ่งและลำต้นใช้ต้มน้ำดื่มรักษาแก้เจ็บท้อง



รูปที่ 6 ลักษณะใบและลำต้น (A) และสารสกัด (B) ตัวขน (*Cratoxylum formosum* (Jack.) Dyer)

2.5 เจตพังคี

ชื่อท้องถิ่น: ใบเงินหรือพังคี (รูปที่ 7)

ชื่อทั่วไป: เจตพังคี (เชียงใหม่) ตองตาพราน (สระบุรี) เป้าเงิน หนาดตะกั่ว (นครราชสีมา) ใบหลังขาว (ภาคกลาง) สมิ (ประจวบคีรีขันธ์) มนเขา (สุราษฎร์ธานี) เป้าน้ำเงิน (ภาคใต้)

ชื่อพฤกษศาสตร์: *Cladogynos orientalis* Zipp. ex Span

ชื่อพ้อง: *Adenogynum discolor* Rchb.f. & Zoll.

Chloradnia discolor (Rchb.f. & Zoll.) Baill.

Cephalocroton discolor (Rchb.f. & Zoll.) Müll.Arg.

Adenochlaena siamensis Ridl.

Baprea bicolor Pierre ex Pax & K.Hoffm. in Engl.,

ชื่อวงศ์: Euphorbiaceae

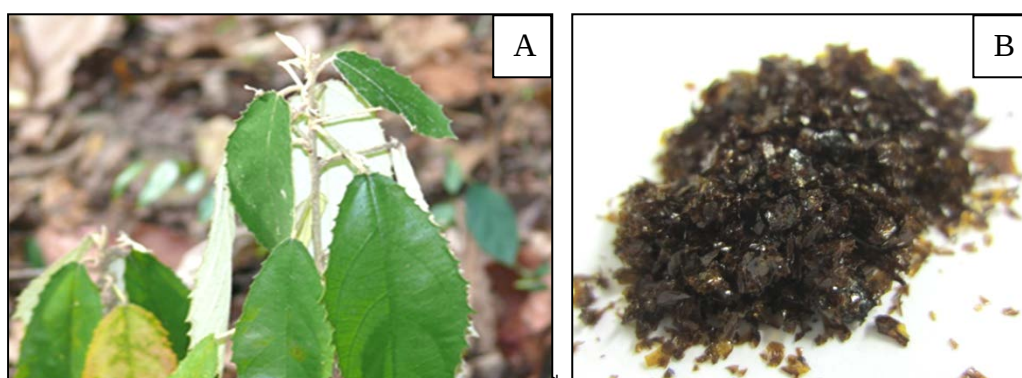
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ไม้พุ่ม (Shrub) สูงประมาณ 1 เมตร ส่วนที่อ่อนตามกิ่ง ใบและช่อดอกมีขนรูปดาวสีขาวครีม ใบเดี่ยว รูปไข่ รูปรีหรือรูปหอก ยาว 7-20 เซนติเมตร กว้าง 4-9 เซนติเมตร มีก้านใบ (petiolate) ยาว 4-10 เซนติเมตร เรียงสลับ หลังใบมีสีเขียวเข้ม ท้องใบสีขาว ดอกเป็นช่อดอกออกที่ซอกใบ แยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน ก้านช่อดอกยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ดอกมีสีขาว ครีมนอมเหลือง ผลเป็นผลแห้งแก่ไม่แตก (indehiscent capsule) มี 3 พู และมีขนปกคลุม

การกระจายพันธุ์: จีนตอนใต้ กลุ่มประเทศอินโดจีน มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ประเทศไทย พบกระจายทั่วทุกภาค

นิเวศวิทยาทั่วไป: พบในป่าดงดิบและป่าเบญจพรรณ

ช่วงการออกดอกและติดผล: เมษายน ถึง ตุลาคม

พฤกษศาสตร์พื้นบ้านในพื้นที่วิจัย: รากและลำต้นเข้าเครื่องยาต้มน้ำดื่มแก้ จุก เสียด แน่นท้อง



รูปที่ 7 ลักษณะยอดใบ (A) และสารสกัด (B) เจตพังค์ (*Cladogynos orientalis* Zipp. ex Span)

วิธีการวิจัย

1. สารเคมีและอุปกรณ์

Molecular Biology Agarose (Bio-Rad, Spain), 1kb DNA ladder (Promega, U.S.A.), Blue/Orange 6X loading dye (Promega, U.S.A.), primer β -actin, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 (Eurofins MWG Operon, Germany), tris base, glacial acetic acid, EDTA (Ajax/Australia), Omiscript RT Kit (QIAGEN, Germany), TopTaq MasterMix kit (QIAGEN, Germany), Novel Juice (GeneDirex), RNA extraction kit (GE Healthcare, UK), 3-[4, 5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dyphenyl tetra-zolium bromide (Invitrogen, USA), DMEM (Invitrogen, UK), FBS (Invitrogen, UK), RNase free DNase Set (QIAGEN), melanin (Sigma, USA), kojic (sigma, USA), tyrosinase enzyme (Sigma, USA)

2. ตัวอย่างสมุนไพร และวิธีการเตรียมสารสกัดหยาบ

จัดหาตัวอย่างสมุนไพรในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จำนวน 5 ชนิด (ตารางที่ 1) นำตัวอย่างสมุนไพรมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วชั่งน้ำหนักสด นำมาอบที่ 45°C จนน้ำหนักคงที่ บดให้ละเอียด นำผงสมุนไพรมาหมักใน 50% เอทานอลเป็นเวลา 7 วัน คนเป็นระยะๆ แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง 3-4 ชั้น แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง No.1 (WhatmanTM) จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาระเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator (EYELA, N-100, RIKAKIKAI CO., LTD, Japan) แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry (CHRIST GAMMA 1-1 LSC, Germany) จะได้สารสกัดหยาบ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 พืชสมุนไพรที่นำมาศึกษา

สมุนไพร	ชื่อไทย	ส่วนที่ใช้	Voucher specimen no.*	% Yield
<u>Dilleniaceae</u>				
1. <i>Tetracera loureirii</i>	รสสุคนธ์	ลำต้น	TT-OC-SK-845	6.37
<u>Euphobiaceae</u>				
2. <i>Cladogynos orientalis</i> Zipp. ex Span	เจตพังคี	ใบ	TT-OC-SK-912	7.40
3. <i>Glochidion coccineum</i> (Buch.-Ham.) Mull.Arg.	จางา	ลำต้น	TT-OC-SK-839	4.26
<u>Guttiferae</u>				
4. <i>Cratoxylum formosum</i> (Jack.) Dyer spp. <i>pruniflorum</i> (Kurz) Gogel.	ตัวหนาม หรือตัวขน	ลำต้น	TT-OC-SK-862	3.78
<u>Leguminosae</u>				
5. <i>Dalbergia darlacensis</i> P.H.HO & Niyomdham	มะขาม เครือ	ลำต้น	TT-OC-SK-837	10.29

*TT-OC-SK: Thaweesak Thitimetharoch, Orasa Chaichumporn and Sureerat Kaewsart

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition)

ทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ tyrosinase จากเห็ด ใช้ L-DOPA เป็น substrate และวัด DOPA chrome ที่เกิดขึ้น โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 475 nm จากนั้นคำนวณหาค่า IC₅₀ โดยมี kojic acid เป็นสารมาตรฐาน (Lida et al., 1995; Momtaz et al., 2008)

อุปกรณ์และสารเคมี

- การเตรียม phosphatebuffer (50mM, pH 6.5 at 25 °C) ซึ่ง Potassiumdihydrogen orthophosphate 680.45 mg. ละลายใน Deionized water 100 ml. ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1M KOH
- เตรียม 2mM L-tyrosine 50 ml โดยซึ่ง L-tyrosine 18.119 mg. ละลายใน phosphate buffer 50 ml
- เตรียม tyrosinase (167 unit/ml) 10 ml ซึ่ง tyrosinase mushroom (1715 unit/mg.) 0.9737 mg. ละลายใน phosphate buffer 10 ml
- ตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน Kojic acid ละลายด้วย DMSO

วิธีทดสอบ

เติมตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ลงใน 96-well เติม 2mM L-tyrosine ปริมาตร 110 ไมโครลิตร จากนั้นเติม tyrosinase (167 unit/ml) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 และ 60 นาทีแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492 nm คำนวณค่า percent inhibition ตามสูตรข้างล่าง

$$\% \text{ Inhibition} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อการสร้างเมลานินในเซลล์ B16-F10

วัดปริมาณเมลานินในเซลล์ B16-F10 (Sato et al., 2011) โดยการเลี้ยงเซลล์ B16-F10 ใน 12-well plate ใช้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 cell/well แล้ว incubate ไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมตัวอย่างทดสอบต่างๆ ลงไป และ incubate ต่อภายใต้สภาวะที่มี 5%CO₂, 37°C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงเก็บเซลล์โดยใช้ 0.25% trypsin และล้างเซลล์ด้วย DMEM ปั่นเหวี่ยงและเก็บ cell pellets มาละลายใน 1M NaOH ปริมาณ 100 µl อุณหภูมิ 60°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm และเทียบปริมาณเมลานินกับกราฟมาตรฐาน

5. การศึกษาการออกฤทธิ์ต้านการสร้างเมลานิน

5.1 การเลี้ยงเซลล์

เซลล์ murine melanoma cell (B16-F10) จาก ATCC (CRL-6475) เป็นเซลล์ไลน์ที่ได้จากผิวหนังของหนู C57BL/6J ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS และ 1% penicillin-streptomycin เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มี CO₂ 5%, 37°C

5.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด โดยใช้วิธี MTT assay (Mossman, 1993)

ทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยเลี้ยงเซลล์ 10,000 cells/well ใน 96 well plate แล้ว incubate ใน CO₂ incubator, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากนั้นเติมสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ แล้ว incubate ใน CO₂ incubator, 5% CO₂, 37°C เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงและเติม methyl thiazol tetrazolium bromide (MTT) วัดสี formazan ที่เกิดจากการทำงานของ mitochondrial dehydrogenases ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการรอดชีวิตของเซลล์ โดยใช้เครื่อง microplate reader (anthos, 2010) ที่ 570 nm ทำซ้ำ 3 ครั้ง

5.3 การทดสอบผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน β -actin, tyrosinase, TRP-1, TRP-2

5.3.1 Split cell ความเข้มข้น 10⁶ cells/ml ปริมาตร 1 ml ลงใน 12 well plate จากนั้น incubated เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3.2 เติมสารทดสอบ ความเข้มข้นที่กำหนด incubated เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5.3.3 เก็บ และสกัด RNA โดยใช้ RNA extraction kit (GE Healthcare, UK) และใช้วิธีการสกัดตามทีระบุนมาในชุดสกัด ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก และตามด้วยการทำให้ชิ้นส่วนของเซลล์ที่แตกนั้นมีขนาดลดลง และเมื่อใช้ Column ที่สามารถจับกับ RNA ได้ total RNA จะจับอยู่บริเวณ Column นี้ จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ต่างๆ และกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนด้วย DNase enzyme สุดท้ายล้าง RNA ที่ได้ออกจาก Column โดยใช้น้ำที่ไม่มี RNase วัดปริมาณ total RNA ที่ได้ด้วย UV spectrophotometer ที่ 260 และ 280 nm แล้วคำนวณหาปริมาณ total RNA ที่ได้โดยใช้สูตร

$$\text{Concentration of RNA sample} = 40 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{dilution factor}$$

ใช้ Omiscript RT Kit (QIAGEN, Germany) เปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase ซึ่งใช้ปริมาณ RNA เริ่มต้น 40 ng แล้วตรวจหาปริมาณของ β -actin, tyrosinase, TRP-1 และ TRP-2 ด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งใช้ cDNA เริ่มต้น 3 μ l โดยใช้ primer สำหรับ β -actin, tyrosinase, TRP-1 และ TRP-2 ดังแสดงในตารางที่ 2 เพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเครื่อง thermal cycler PCR (AB Applied Biosystems GeneAmp PCR system 2400) แต่ละยีนใช้ 27 รอบในการเพิ่มปริมาณซึ่งระบบที่ใช้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 Oligonucleotide primers ที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR

Gene	Primer	Sequence : (5'-3')	Product size (bp)
β -actin ⁽¹⁾	Forward	TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT	285
	Reverse	CCTAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG	
Tyrosinase ⁽¹⁾	Forward	ACAGAGGAGAACATCTGCCAGCTT	368
	Reverse	TGGTGACTCAACAGGTGTGAAGGT	
TRP-1 ⁽²⁾	Forward	ATACTGGGACCACATGGCAACACA	428
	Reverse	ATTGGTCCACCCTCAGTGCTGTTA	
TRP-2 ⁽¹⁾	Forward	AGACTACGTGATCACCACGCAACA	366
	Reverse	TTCCGACTAATCAGCGTTGGGTCA	

⁽¹⁾ = Won et al., 2006; ⁽²⁾ = Sato et al., 2011

ตารางที่ 3 ระบบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA

Genes	Denaturation / RT Inactivation	For Cycles			Final Extension	Hold
		Denaturation	Annealing	Extension		
β -actin ⁽¹⁾	95°C, 2 min	94°C, 1 min	60°C, 1 min	72°C, 1 min		
Tyrosinase ⁽¹⁾	95°C, 2 min	95°C, 30 sec	60°C, 30 sec	72°C, 1 min	72 °C, 10 min	4 °C
TRP-1 ⁽²⁾	95°C, 2 min	95°C, 30 sec	60°C, 30 sec	72°C, 1 min		
TRP-2 ⁽¹⁾	95°C, 2 min	95°C, 30 sec	60°C, 30 sec	72°C, 1 min		

ตรวจสอบ RT-PCR products ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) บน 1.5% เจลอะกาโรส ใช้ TAE buffer 1X เป็นตัวทำละลาย วัดความเข้มของแถบ products โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของ Novel Juice (GeneDirex) กับ DNA และสามารถเรืองแสงได้เมื่อตรวจสอบด้วยเครื่อง Gel Documentation InGenius L (Gel Documentation and Analysis system) เพื่อแสดงถึงระดับการแสดงออกของ tyrosinase, TRP-1 และ TRP-2 จากนั้นคำนวณเป็นสัดส่วนที่สัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน β -actin ซึ่งเป็นยีนควบคุม ทำการศึกษาซ้ำ 3 ครั้ง

6. สถานที่ทำการวิจัย

- ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

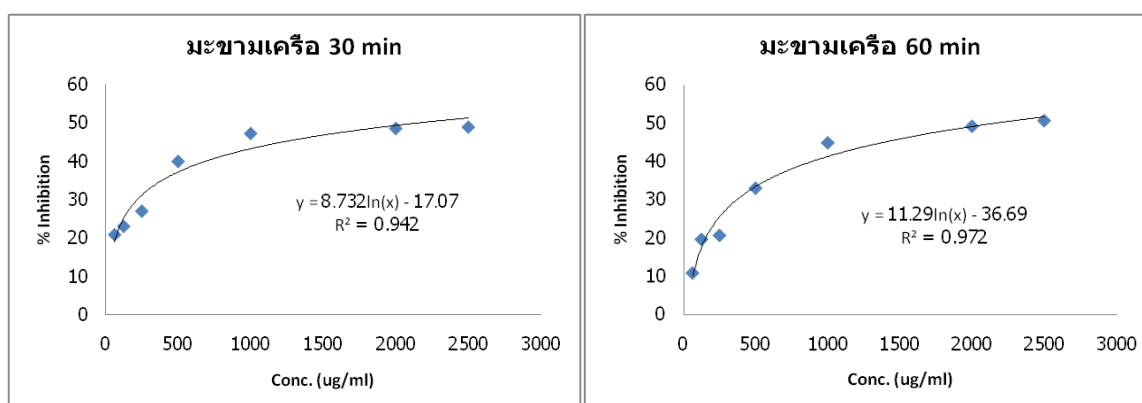
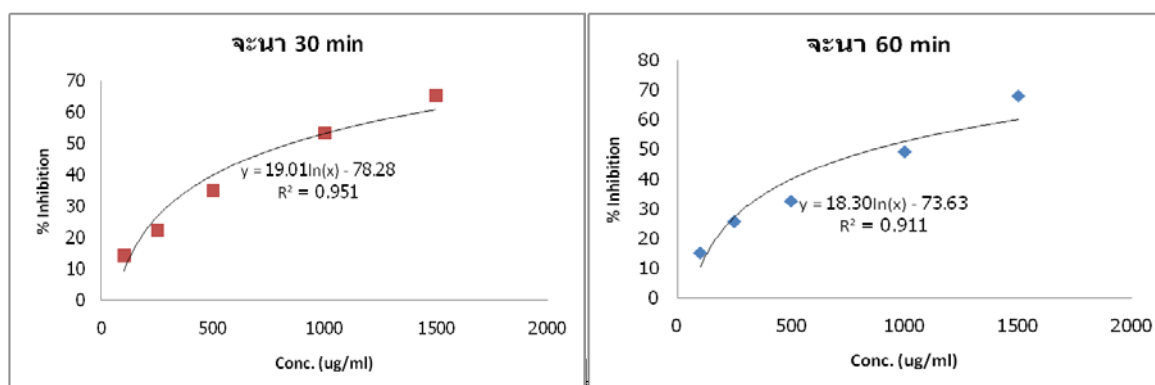
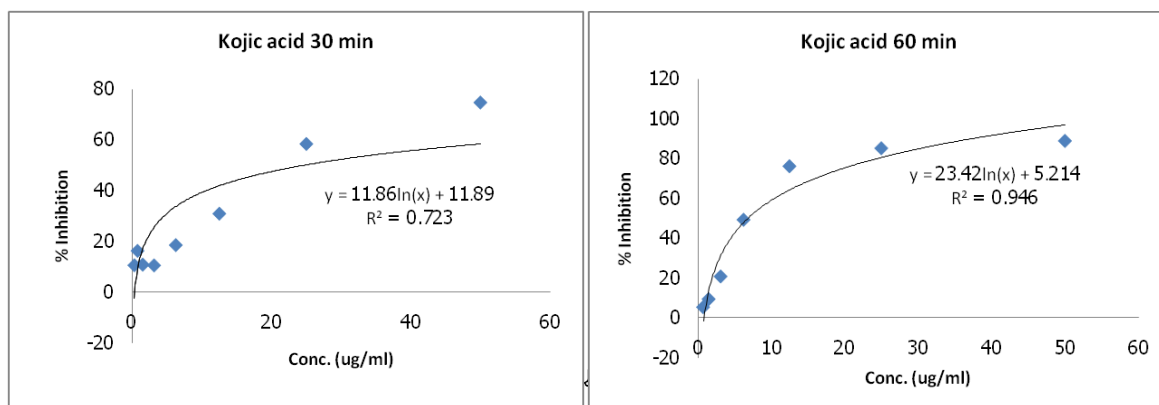
7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม การแสดงออกของยีน β -actin, tyrosinase, TRP-1 และ TRP-2 ใช้สถิติ one way ANOVA และใช้การเปรียบเทียบของ Post HOC Multiple Comparisons เป็น LSD (Least Significant Difference)

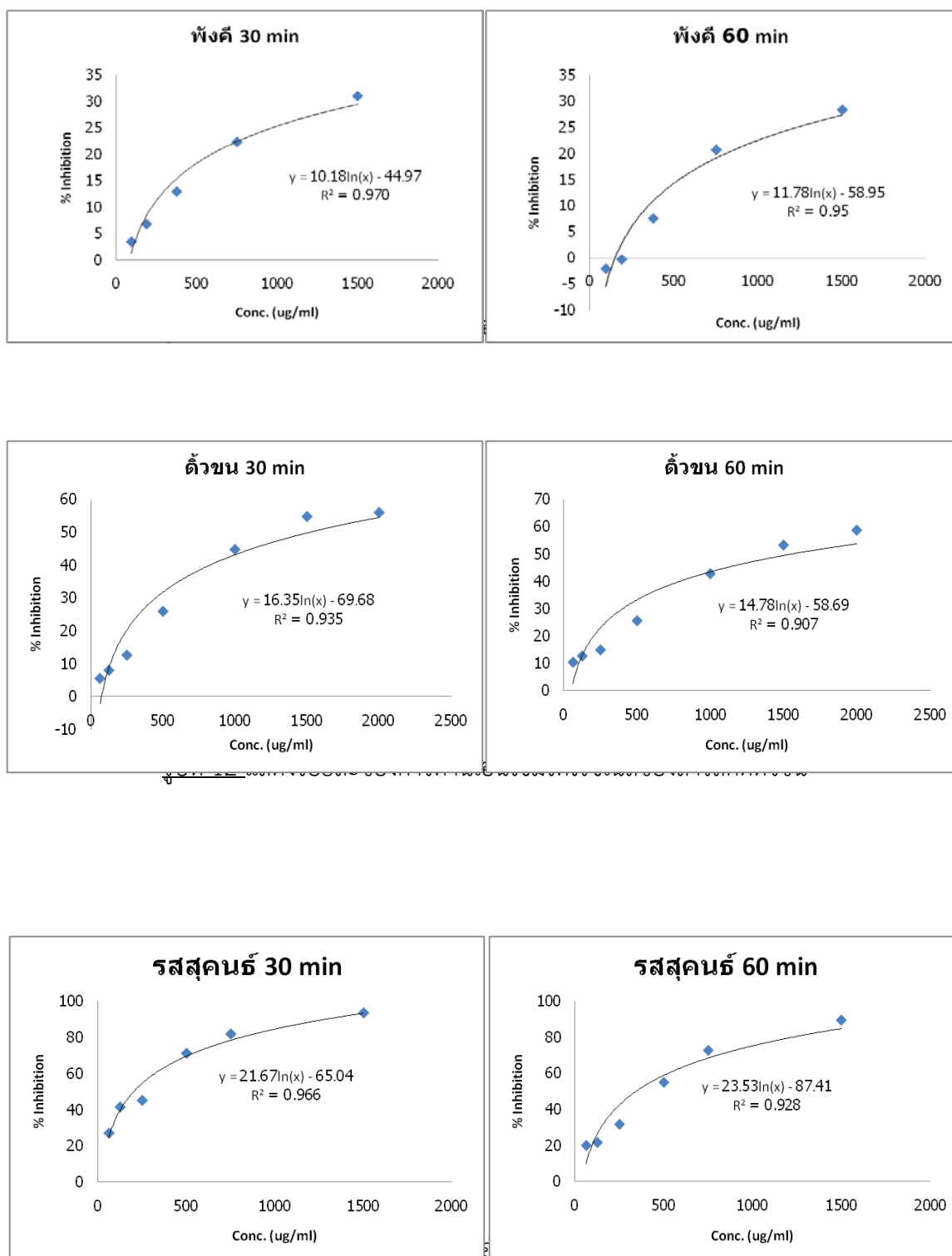
ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition) ของสารสกัดจะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตัวขน เจตพังคิ โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรท และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 30 และ 60 นาที พบว่าสารสกัดรสสุคนธ์มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด รองลงมาคือ จะนา ตัวขน มะขามเครือ และเจตพังคิ (รูปที่ 8-13, ตารางที่ 4)



รูปที่ 10 แสดงร้อยละของการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดมะขามเครือ



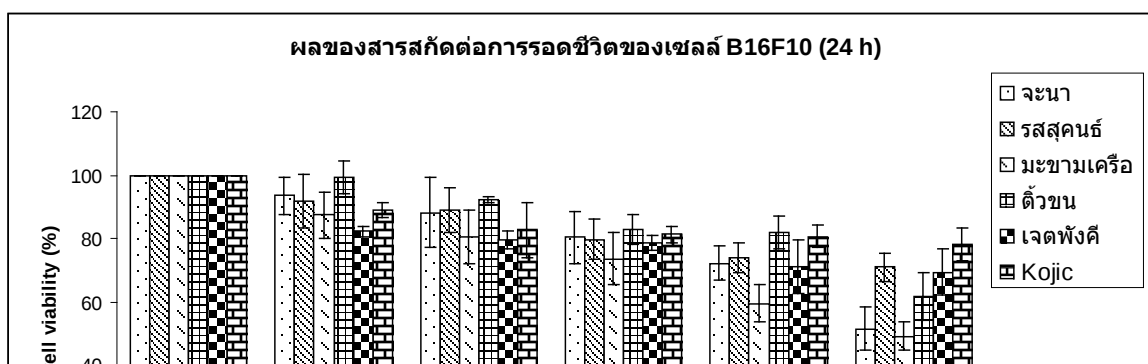
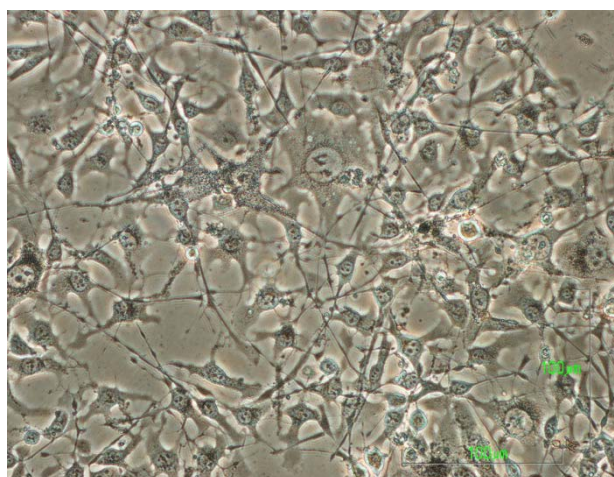
ตารางที่ 4 ผลการต้านอนุมูลอิสระของ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน เจตพังคี และสารมาตรฐาน Kojic

Sample	IC ₅₀ (mg/ml)	
	30 min	60 min
จะนา	0.852	0.859
รสสุคนธ์	0.202	0.344
มะขามเครือ	2.166	2.161
ตั้วขน	1.314	1.562
เจตพังคี	9.024	10.391
Kojic	0.015	0.024

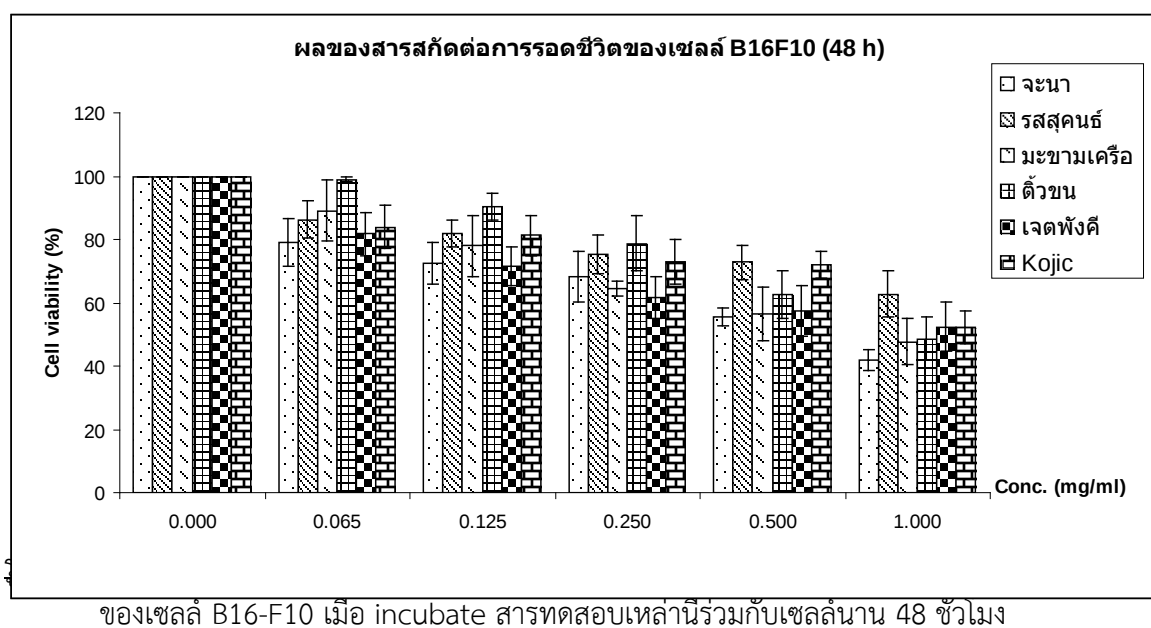
2. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ B16-F10

เซลล์ B16-F10 มีรูปร่างผสมผสานระหว่าง spindle-shaped และ epithelial-like cells (ดังรูปที่ 14)

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อ Incubated สารสกัดจะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน และเจตพังคี ร่วมกับเซลล์ B16-F10 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารสกัดทั้งห้าชนิดที่ทำให้เซลล์รอดชีวิต 50% (IC₅₀) และ 80% (IC₂₀) มีค่ามากกว่า 0.50 และ 0.10 mg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 15-16 และตารางที่ 5-6) ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดทั้งห้าชนิดที่เลือกใช้ในการศึกษาต่อไปคือ 0.065-0.250 mg/ml



รูปที่ 15 ผลของ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน เจตพังคี และสารมาตรฐาน Kojic ต่อการรอดชีวิตของเซลล์ B16-F10 เมื่อ incubate สารทดสอบเหล่านี้ร่วมกับเซลล์นาน 24 ชั่วโมง



ตารางที่ 5 ผลของ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน เจตพังคี และสารมาตรฐาน Kojic ที่ทำให้เซลล์ B16-F10 รอดชีวิต 50% (IC_{50})

Sample	IC_{50} (mg/ml)	
	24 h	48 h
จะนา	1.00 ± 0.03	0.73 ± 0.16

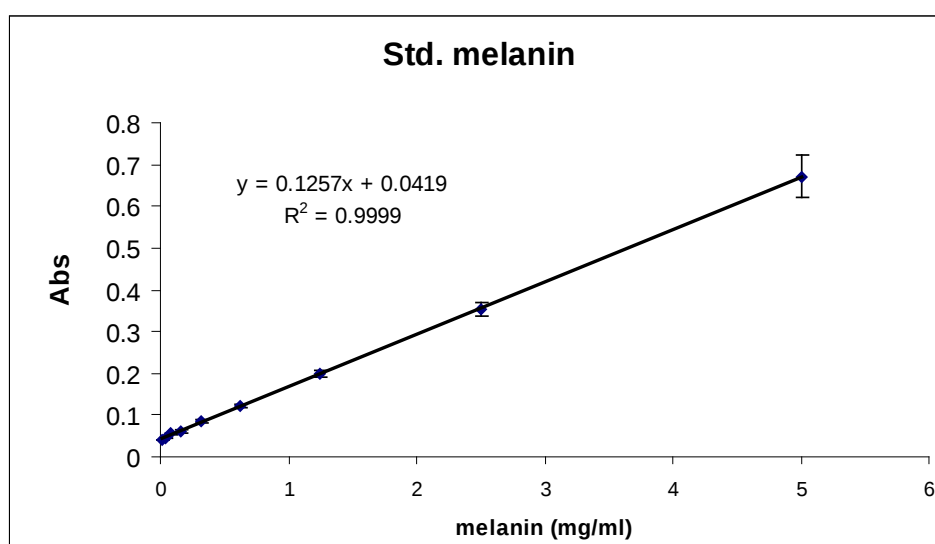
รสสุคนธ์	1.63 ± 0.22	1.33 ± 0.29
มะขามเครือ	0.87 ± 0.10	0.80 ± 0.04
ตัวขน	1.31 ± 0.19	0.89 ± 0.08
เจตพังคี	1.62 ± 0.51	0.85 ± 0.03
Kojic	1.24 ± 0.05	0.51 ± 0.04

ตารางที่ 6 ผลของ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตัวขน เจตพังคี และสารมาตรฐาน Kojic ที่ทำให้เซลล์ B16-F10 รอดชีวิต 80% (IC_{20})

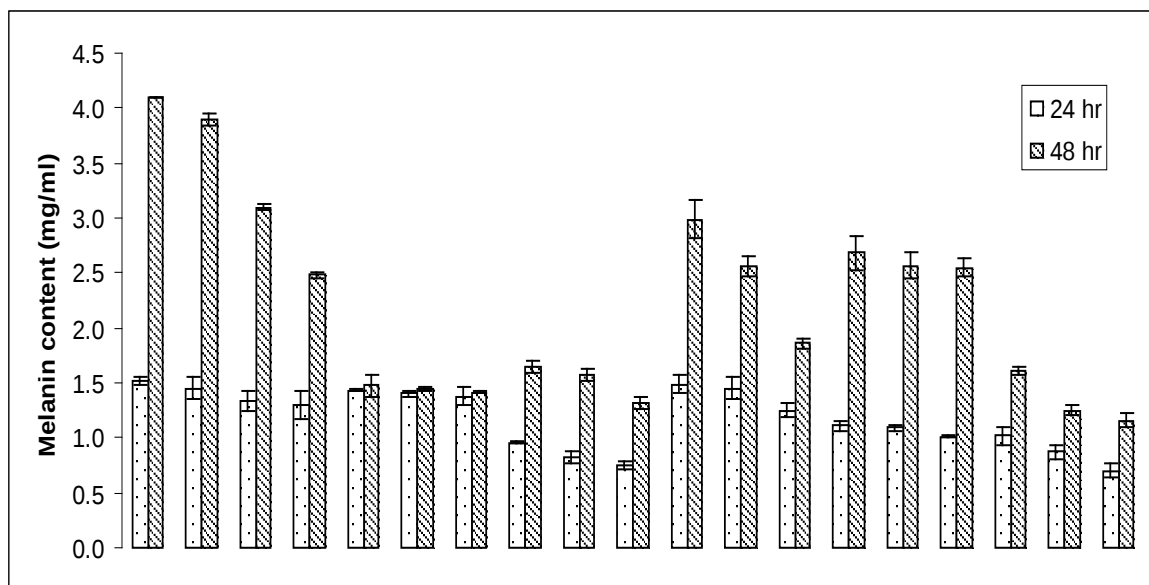
Sample	IC_{20} (mg/ml)	
	24 h	48 h
จะนา	0.34 ± 0.11	0.13 ± 0.04
รสสุคนธ์	0.48 ± 0.06	0.32 ± 0.09
มะขามเครือ	0.22 ± 0.13	0.17 ± 0.02
ตัวขน	0.50 ± 0.10	0.31 ± 0.08
เจตพังคี	0.37 ± 0.10	0.16 ± 0.03
Kojic	0.39 ± 0.03	0.12 ± 0.03

3. ผลของสารสกัดต่อการสร้างเมลานินในเซลล์ B16-F10

ภายหลังการ Incubate สารสกัดจะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตัวขน และเจตพังคี ที่ความเข้มข้น 0.065-0.250 mg/ml ร่วมกับเซลล์ B16-F10 นาน 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ B16-F10 มีการสร้างเม็ดสี (melanin) ลดน้อยลง โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm และเทียบกับกราฟมาตรฐานเมลานิน (รูปที่ 17) โดยจากผลการศึกษพบว่าสารสกัดมะขามเครือ มีความสามารถในการยับยั้งการผลิตเมลานินในเซลล์ B16-F10 มากที่สุด รองลงมาคือสารสกัดรสสุคนธ์ ตัวขน จะนา และเจตพังคี ตามลำดับ (รูปที่ 18) และสามารถคำนวณเป็น % of control ดังตารางที่ 7



รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานของเมลานิน (melanin)



รูปที่ 18 ผลของสารสกัดต่อการสร้างเมลานินในเซลล์ B16-F10

- | | |
|---|---|
| 1=Unstimulated B16-F10 cells | 11=B16-F10 cells+ตัวขน (0.065 mg/ml) |
| 2=B16-F10 cells+จะนา (0.065 mg/ml) | 12= B16-F10 cells+ตัวขน (0.125 mg/ml) |
| 3=B16-F10 cells+จะนา (0.125 mg/ml) | 13=B16-F10 cells+ตัวขน (0.250 mg/ml) |
| 4=B16-F10 cells+จะนา (0.250 mg/ml) | 14=B16-F10 cells+เจตพังคิ (0.065 mg/ml) |
| 5=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.065 mg/ml) | 15=B16-F10 cells+เจตพังคิ (0.125 mg/ml) |
| 6=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.125 mg/ml) | 16=B16-F10 cells+เจตพังคิ (0.250 mg/ml) |
| 7=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.250 mg/ml) | 17=B16-F10 cells+Kojic (0.065 mg/ml) |
| 8=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.125 mg/ml) | 18=B16-F10 cells+Kojic (0.125 mg/ml) |
| 9=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.125 mg/ml) | 19=B16-F10 cells+Kojic (0.250 mg/ml) |
| 10=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.250 mg/ml) | |

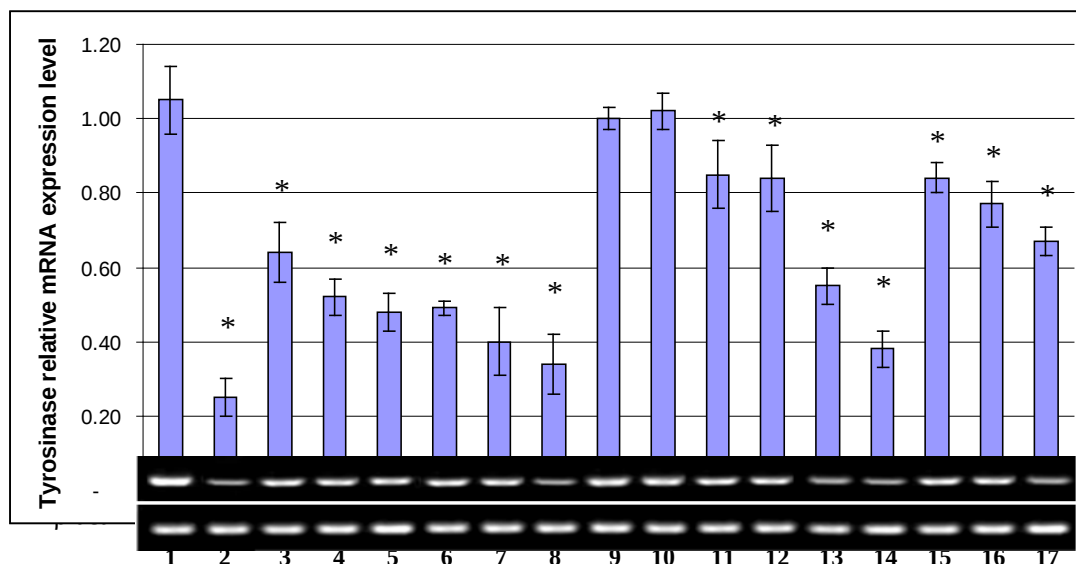
ตารางที่ 7 ผลของ จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน เจตพังคี และสารมาตรฐาน Kojic ต่อการสร้าง เมลานินในเซลล์ B16-F10

ตัวอย่างทดสอบ		การสร้างเมลานินของเซลล์ B16-F10 (% of control)	
		24 h	48 h
Unstimulated B16-F10 cells		100	100
จะนา	0.065 mg/ml	95.39	95.12
	0.125 mg/ml	87.50	75.61
	0.250 mg/ml	85.53	60.49
รสสุคนธ์	0.065 mg/ml	73.03	36.10
	0.125 mg/ml	71.71	35.12
	0.250 mg/ml	66.45	34.39
มะขามเครือ	0.065 mg/ml	63.16	40.24
	0.125 mg/ml	53.95	38.29
	0.250 mg/ml	49.34	32.20
ตั้วขน	0.065 mg/ml	98.03	72.93
	0.125 mg/ml	95.39	62.44
	0.250 mg/ml	82.24	45.37
เจตพังคี	0.065 mg/ml	94.08	65.37
	0.125 mg/ml	92.11	62.68
	0.250 mg/ml	90.79	62.20
Kojic	0.065 mg/ml	67.11	39.27
	0.125 mg/ml	57.24	30.49
	0.250 mg/ml	46.05	28.29

4. การศึกษาผลของสารสกัดต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเมลานิน

4.1 ผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน Tyrosinase

จากการ Incubate สารสกัดจะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตัวขน และเจตพังคิ ที่ความเข้มข้น 0.065-0.250 mg/ml ร่วมกับเซลล์ B16-F10 นาน 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดเหล่านี้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน Tyrosinase ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในลักษณะที่เป็น dose dependent manner และพบว่าสารสกัดรสสุคนธ์ มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ได้ดีที่สุด และคล้ายคลึงกับสารมาตรฐาน Kojic สารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งยีนนี้รองลงมาคือ จะนา ตัวขน เจตพังคิ และมะขามเครือ ตามลำดับ (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 ปริมาณการแสดงออกของยีน Tyrosinase โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin

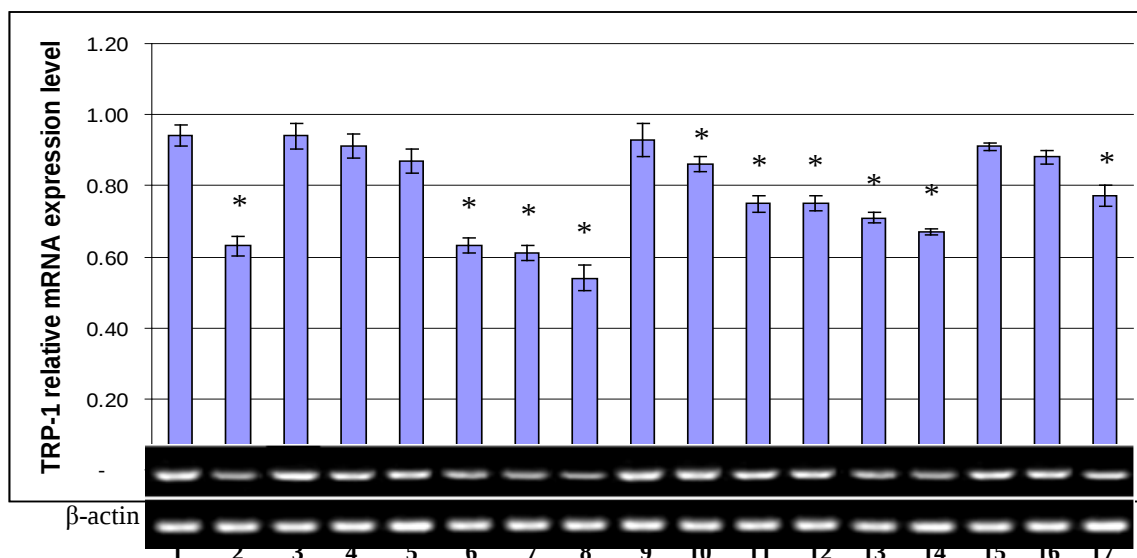
- | | |
|--|---|
| 1=Unstimulated B16-F10 cells | 10=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.125 mg/ml) |
| 2=B16-F10 cells+Kojic (0.065 mg/ml) | 11=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.250 mg/ml) |
| 3=B16-F10 cells+จะนา (0.065 mg/ml) | 12=B16-F10 cells+ตัวขน (0.065 mg/ml) |
| 4=B16-F10 cells+จะนา (0.125 mg/ml) | 13=B16-F10 cells+ตัวขน (0.125 mg/ml) |
| 5=B16-F10 cells+จะนา (0.250 mg/ml) | 14=B16-F10 cells+ตัวขน (0.250 mg/ml) |
| 6=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.065 mg/ml) | 15=B16-F10 cells+เจตพังคิ (0.065 mg/ml) |
| 7=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.125 mg/ml) | 16=B16-F10 cells+เจตพังคิ (0.125 mg/ml) |
| 8=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.250 mg/ml) | 17=B16-F10 cells+เจตพังคิ (0.250 mg/ml) |
| 9=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.065 mg/ml) | |

* แตกต่างจากกลุ่ม Unstimulated B16-F10 cells อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.2 ผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน TRP-1

จากการ Incubate สารสกัดจะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตัวขน และเจตพังคิ ที่ความเข้มข้น 0.065-0.250 mg/ml ร่วมกับเซลล์ B16-F10 นาน 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดเหล่านี้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TRP-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในลักษณะที่เป็น dose dependent manner และพบว่าสารสกัดรสสุคนธ์ มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ได้ดีที่สุด และที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 mg/ml สารสกัดรสสุคนธ์ สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ได้ดีกว่า

สารมาตรฐาน Kojic ความเข้มข้น 0.065 mg/ml อีกด้วย สารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้ง TRP-1 รองลงมาคือ ตั้วขน มะขามเครือ เจตพังคี และจะนา ตามลำดับ (รูปที่ 20)



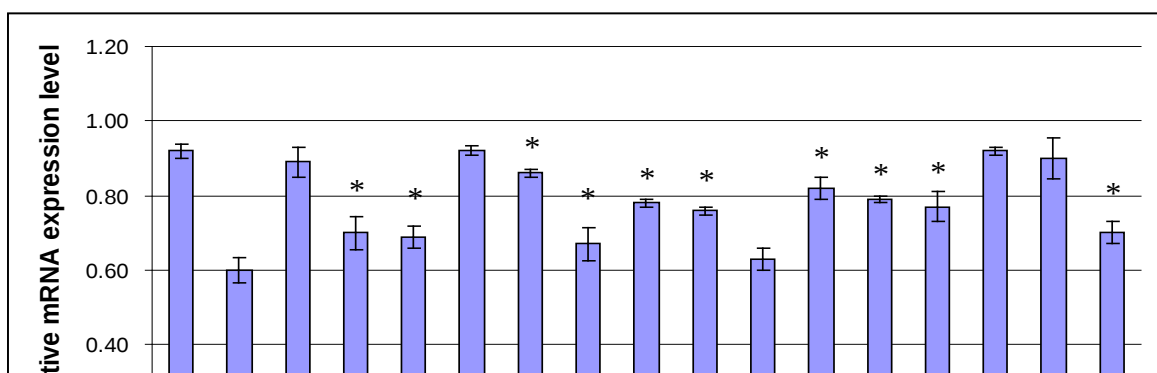
รูปที่ 20 ปริมาณการแสดงออกของยีน TRP-1 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin

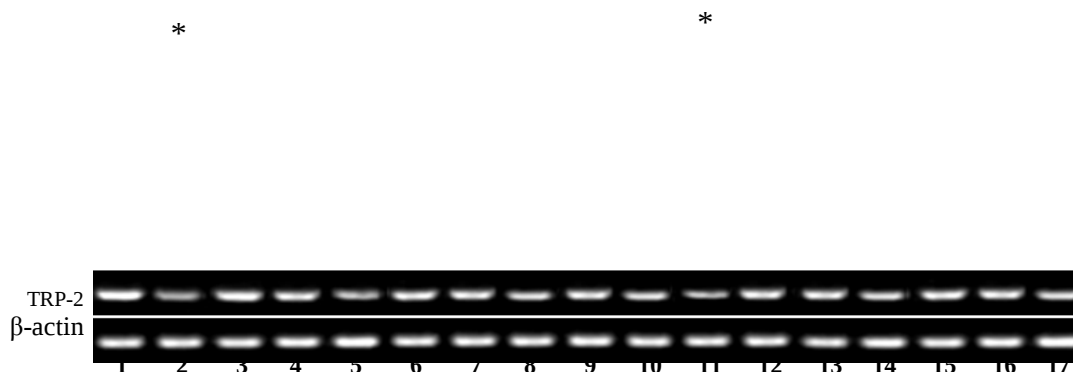
- | | |
|--|---|
| 1=Unstimulated B16-F10 cells | 10=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.125 mg/ml) |
| 2=B16-F10 cells+Kojic (0.065 mg/ml) | 11=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.250 mg/ml) |
| 3=B16-F10 cells+จะนา (0.065 mg/ml) | 12=B16-F10 cells+ตั้วขน (0.065 mg/ml) |
| 4=B16-F10 cells+จะนา (0.125 mg/ml) | 13=B16-F10 cells+ตั้วขน (0.125 mg/ml) |
| 5=B16-F10 cells+จะนา (0.250 mg/ml) | 14=B16-F10 cells+ตั้วขน (0.250 mg/ml) |
| 6=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.065 mg/ml) | 15=B16-F10 cells+เจตพังคี (0.065 mg/ml) |
| 7=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.125 mg/ml) | 16=B16-F10 cells+เจตพังคี (0.125 mg/ml) |
| 8=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.250 mg/ml) | 17=B16-F10 cells+เจตพังคี (0.250 mg/ml) |
| 9=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.065 mg/ml) | |

* แตกต่างจากกลุ่ม Unstimulated B16-F10 cells อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.3 ผลของสารสกัดต่อการแสดงออกของยีน TRP-2

จากการ Incubate สารสกัดจะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตั้วขน และเจตพังคี ที่ความเข้มข้น 0.065-0.250 mg/ml ร่วมกับเซลล์ B16-F10 นาน 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดเหล่านี้สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TRP-2 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในลักษณะที่เป็น dose dependent manner และพบว่าสารสกัดมะขามเครือ มีความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ได้ดีที่สุด และคล้ายคลึงกับสารมาตรฐาน Kojic สารสกัดที่มีความสามารถในการยับยั้งยีนนี้รองลงมาคือ ตั้วขน จะนา รสสุคนธ์ และเจตพังคี ตามลำดับ (รูปที่ 21)





รูปที่ 21 ปริมาณการแสดงออกของยีน TRP-2 โดยคิดเป็นสัดส่วนกับ β -actin

1=Unstimulated B16-F10 cells	10=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.125 mg/ml)
2=B16-F10 cells+Kojic (0.065 mg/ml)	11=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.250 mg/ml)
3=B16-F10 cells+จะนา (0.065 mg/ml)	12=B16-F10 cells+ตัวขน (0.065 mg/ml)
4=B16-F10 cells+จะนา (0.125 mg/ml)	13=B16-F10 cells+ตัวขน (0.125 mg/ml)
5=B16-F10 cells+จะนา (0.250 mg/ml)	14=B16-F10 cells+ตัวขน (0.250 mg/ml)
6=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.065 mg/ml)	15=B16-F10 cells+เจตพังคิ (0.065 mg/ml)
7=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.125 mg/ml)	16=B16-F10 cells+เจตพังคิ (0.125 mg/ml)
8=B16-F10 cells+รสสุคนธ์ (0.250 mg/ml)	17=B16-F10 cells+เจตพังคิ (0.250 mg/ml)
9=B16-F10 cells+มะขามเครือ (0.065 mg/ml)	

* แตกต่างจากกลุ่ม Unstimulated B16-F10 cells อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จะนา รสสุคนธ์ มะขามเครือ ตัวขน และเจตพังคิ เป็นสมุนไพรในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ ซึ่งได้รับการคัดเลือกให้นำมาศึกษาฤทธิ์ด้านการสร้างเมลานิน เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าพืชทั้งห้าชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และมีสารสำคัญกลุ่ม phenolic compounds สูง

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ L-DOPA เป็นซับสเตรท พบว่าที่เวลาในการทำปฏิกิริยา 30 นาที สารสกัดรสสุคนธ์มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด รองลงมาคือจะนา ตัวขน มะขามเครือ และเจตพังคิ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.202, 0.852, 1.314, 2.167 และ 9.023 mg/ml ตามลำดับ และเมื่อศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เมลานोไซต์ (B16-F10) พบว่าที่เวลาในการ incubate นาน 48 ชั่วโมง สารสกัดทั้งห้าชนิดมีค่า IC_{50} มากกว่า 0.5 mg/ml โดยสารสกัดรสสุคนธ์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ B16-F10 น้อยที่สุด รองลงมาคือสารสกัดตัวขน เจตพังคิ มะขามเครือ และจะนาตามลำดับ

และเมื่อศึกษาผลของสารสกัดทั้งห้าชนิดต่อการสร้างเมลานินในเซลล์ B16-F10 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดในช่วง 0.065-0.250 mg/ml พบว่าสารสกัดมะขามเครือ มีความสามารถในการยับยั้งการผลิตเม็ดสีเมลานินในเซลล์ชนิดนี้มากที่สุด รองลงมาสารสกัดรสสุคนธ์ ตัวขน จะนา และเจตพังคิ ซึ่งพบว่า ที่เวลา 48 ชั่วโมง สารสกัดความเข้มข้น 0.250 mg/ml มีการสร้างเมลานินเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (%of control) เท่ากับ 32.20%, 34.39%, 45.37%, 60.49% และ 62.20% ตามลำดับ โดยพบว่าสาร

มาตรฐาน Kojic มีการสร้างเมลานินเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เท่ากับ 28.29% นอกจากนี้จากกลุ่มที่ไม่ได้ให้สารทดสอบใดๆ (untreated group) เมื่อเปรียบเทียบเวลาในการ incubate สารทดสอบร่วมกับเซลล์ B16-F10 พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงเซลล์ชนิดนี้มีการผลิตเมลานินเพิ่มขึ้นสูงมาก โดยปริมาณเมลานินที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1.52 และ 4.10 mg/ml ตามลำดับ ดังนั้นเวลาในการทดสอบที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบสารที่มีความสามารถในการเพิ่มหรือลดการสร้างเมลานินในเซลล์ B16-F10 ที่เหมาะสมคือ 48 ชั่วโมง

ผลจากการศึกษาผลต่อการแสดงออกของ Tyrosinase, TRP-1 และ TRP-2 ในระดับยีน ด้วยวิธี Semi-quantitative-reverse transcription-polymerase chain reaction ในเซลล์ B16-F10 พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.065-0.250 mg/ml และใช้เวลาในการ incubate 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดทั้งห้าชนิดสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนเหล่านี้ได้ โดยในยีน tyrosinase พบว่าสารสกัดรสสุคนธ์สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ จะนา ตั้วขน เจตพังคีและมะขามเครือ ตามลำดับ เช่นกันกับในยีน TRP-1 ที่พบว่าสารสกัดรสสุคนธ์มีความสามารถในการยับยั้งยีนนี้ได้ดีที่สุด และที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.250 mg/ml สารสกัดรสสุคนธ์ สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้ได้ดีกว่าสารมาตรฐาน Kojic ความเข้มข้น 0.065 mg/ml อีกด้วย ในขณะที่สารสกัดมะขามเครือสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน TRP-2 ได้ดีที่สุด

จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดทั้งห้าชนิดนั้นมีฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดรสสุคนธ์และมะขามเครือ เป็นสมุนไพรที่ควรได้รับการสนับสนุนในด้านนี้ต่อไป จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาและส่งเสริมสมุนไพรเหล่านี้ให้เป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

เอกสารอ้างอิง

- บังอร ศรีพานิชกุลชัย จินตนา จุลทัศน์ ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์ การศึกษามาตรฐานสารสำคัญจากพืชสมุนไพร ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น. พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ปีงบประมาณ 2551.
- บังอร ศรีพานิชกุลชัย อรุณศรี ปรีเปรม และคณะ รายงานการวิจัย เรื่อง โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีพื้นที่โคกภูตากา อำเภอกุเวียง จังหวัดขอนแก่น โครงการย่อย ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านการกลายพันธุ์ของพืชในพื้นที่โคกภูตากา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2547.
- บังอร ศรีพานิชกุลชัย อัญชลี ตัตตะวะศาตร์ นิรามย์ ผางกระโทก การศึกษาฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของพืชสมุนไพร ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยขอนแก่น. พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ปีงบประมาณ 2552.
- Choi, H., Ahn, S., Lee, B.G., Chang, I., Hwang, J.S. (2005). Inhibition of skin pigmentation by an extract of *Lepidium apetalum* and its possible implication in IL-6 mediated signaling. **Pigment Cell Research**, 18, 439-446.
- Harada, N., Okajima, K., Arai, M., Kurihara, H., Nakagata, N. (2007). Administration of capsaicin and isoflavone promotes hair growth by increasing insulin-like growth factor-I production in mice and in humans with alopecia. **Growth Hormone & IGF Research**, 17, 408-415.
- Itoh, T., Furuichi, Y. (2005). Hot-water extracts from Adzuki Beans (*Vigna angularis*) stimulate not only melanogenesis in cultured mouse B16 melanoma cells but also pigmentation of hair color in C3H mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 69 (5), 873-882.

- Jang, D.I., Lee, B.G., Jeon, C.O., Jo, N.S., Park, J.H., et al. (1997). Melanogenesis inhibitor from paper mulberry. **Cosmetics and Toiletries**, 112, 59–62.
- Kim, H.J., Cho, Y.D., Leem, K.H., Lee, D.N., Kim, E.H., et al. (2006). Effects of *Ephedrae herba* on melanogenesis and gene expression profiles using cDNA microarray in B16 melanocytes. **Phytotherapy research**, 20, 748-754.
- Kim, J.H., Lee, K.T. (1998). Inhibitory effects of *Morus alba* extracts on melanogenesis. **Cosmetics and Toiletries**, 113, 65–70.
- Krause, K., Foitzik, K. (2006). Biology of the hair follicle: The basics. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, 25, 2-10.
- Lida, K., Hase, K., Shimomura, K., Sudo, S., Kadota, S., et al. (1995). Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. **Planta Medica**, 61, 425–428.
- Momtaz, S., Mapunya, MB., Houghton, P.J., Edgerly, C., Hussein, A.A., et al. (2008). Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in south Africa for skin lightening. **Journal of Ethnopharmacology**, 119, 507-512.
- Mossman, T. (1993). Rapaid colorimetric assay for cellular growth and survival: applicication to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63.
- Neste, D.V., Tobin, D.J. (2004). Hair cycle and hair pigmentation: dynamic inter- actions and changes associated with aging. **Micron**, 35, 193-200.
- Petit, L., Pie´rard, G.E. (2003). Skin-lightening products revisited. **International Journal of Cosmetic Science**, 25, 169–181.
- Prota, G. (1996). Melanin and melanogenesis. **Cosmetics and Toiletries**, 111, 44–45.
- Sapkota, K., Roh, E., Lee, E., Ha, E.M., Yang, J.H., et al. (2011). Synthesis and anti-melanogenic activity of hydroxyl phenyl benzyl ether analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 19, 2168-2175.
- Sato, E., Tsukimoto, M., Shimura, N., Awaya, A., Kojima, S. (2011). Mechanism of pigmentation by minocycline in murine B16 melanoma cells. **The Pharmaceutical Society of Japan**, 131 (5), 731-738.
- Shimizu, K., Kondo, R., Sakai, K., Lee, S.H., Sato, H. (1998). The inhibitory components from *Artocarpus incisus* on melanin biosynthesis. **Planta Medica**, 64, 408–412.
- Won, J.H., Im, H.T., Kim, Y.H., Yun, K.J., Park, H.J., et al. (2006). Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation. **British Journal of Pharmacology**, 148, 216-225.

Yang, J.Y., Koo, J.H., Song, Y.G., Kwon, K.B., Lee, J.H., et al. (2006). Stimulation of melanogenesis by scoparone in B16 melanoma cells.

Acta Pharmacologica Sinica, 11, 1467-1473.

Yokota, T., Nishio, H., Kubota, Y., Mizoguchi, M. (1998) .The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. **Pigment Cell Research**, 11, 355-361.

(<http://www.whiterskin.com/skin-lightening-ingredients.html>)

(http://www.brecosmeticlab.com/newslet/54/02_feb/_melanin_syn_02.html)

ประวัตินักวิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

นางบังอร ศรีพานิชกุลชัย

ตำแหน่งปัจจุบัน

สัดส่วนของงานที่ทำ 50%

ศาสตราจารย์

รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่	40-20-0141 ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 โทร 0-4320-2378 โทรสาร 0-4320-2379
---	--

1. ผู้ร่วมงานวิจัย

1.นางสาวจินตนา จุลทัศน์ รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ ตำแหน่งปัจจุบัน หน่วยงานที่สังกัด	สัดส่วนของงานที่ทำ 40% - นักวิจัย ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 โทร 0- 4320-2378 โทรสาร 0-4320-2379 E- mail: plara_jin@hotmail.com
2 นายทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์ รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ ตำแหน่งปัจจุบัน หน่วยงานที่สังกัดและที่อยู่	สัดส่วนของงานที่ทำ 10% - ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ 8 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 โทร 0-4320-2378 โทรสาร 0-4320-2379