บทที่ 1
บทนำ
(Introduction)

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรได้แก่ ยา เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพกำลังเป็นที่แพร่หลายไปทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย เนื่องจากมนุษย์ในสังคมสมัยใหม่หันมานิยมสินค้าจากธรรมชาติ โดยเห็นได้จากตลาดผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพรในประเทศขยายตัวปีละไม่ต่ำกว่าร้อยละ 20-30 (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2548)

ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากพืชสมุนไพรของไทยนอกจากเป็นสินค้าภายในประเทศ ในอนาคตยังมีแนวโน้มที่จะเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ (กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์, 2545) ปัจจัยหนึ่งที่หนุนศักยภาพการแข่งขันของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากพืชสมุนไพรได้แก่ การที่ประเทศไทยมีพืชสมุนไพรที่สามารถพัฒนาเป็นวัตถุดิบได้อีกมาก แต่การที่จะสามารถพัฒนาเป็นสินค้าได้ยังมีปัจจัยที่เป็นอุปสรรคอยู่หลายประการ เช่น เทคโนโลยีการผลิตที่เกี่ยวกับสูตรผสมต่างๆยังไม่พัฒนาเท่าที่ควร ปัญหาด้านการวิจัยและพัฒนาทรัพยากร ธรรมชาติในประเทศเพื่อนำมาผลิตเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเครื่องสำอางอย่างเป็นระบบและกำลังซื้อของผู้บริโภคเป็นต้น (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2549)

เนื่องจากมนุษย์มีอายุที่ยืนยาวขึ้นประกอบกับค่านิยมในสังคมที่ให้ความสำคัญกับภาพลักษณ์ ผลิตภัณฑ์ต่อต้านริ้วรอยและผลิตภัณฑ์ช่วยให้ผิวขาวเป็นเครื่องสำอางที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เหล่านี้มักเป็นสารธรรมชาติจากพืชที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่สารกลุ่ม flavonoids, phenylpropanoids หรือสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเกี่ยวข้องการสร้างเม็ดสีของผิวหนัง เช่น สารจำพวก phenolic compounds เป็นต้น ดังนั้นพืชจึงเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าของพืชสมุนไพรโดยพัฒนาเป็นแหล่งที่ให้สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของพืชสมุนไพรเพื่อนำไปสู่การวิจัยต่อยอด จึงจะทำการศึกษากระดังงาจีน (*Artabotrys hexapetalus* (L.f.) Bhandari)) ซึ่งเป็นพืชที่ปลูกแพร่หลาย โดยทำการสกัด ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และแยกบริสุทธิ์สารที่มีฤทธิ์ พิสูจน์เอกลักษณ์สารพร้อมทั้งนำสารที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 สกัด แยกบริสุทธิ์และศึกษาสูตรโครงสร้างสารจากกระดังงาจีน

1.2.2 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารที่แยกได้จากกระดังงาจีน

1.2.3 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารที่แยกได้จากกระดังงาจีน

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม
(Literature Review)

2.1 ความสำคัญของเมลานิน

เมลานินเป็นเม็ดสีที่ทำให้เกิดสีผิวแตกต่างกัน โดยมี 2 รูปแบบ ได้แก่เม็ดสีเหลือง (Phaeomelanins) ทำให้เกิดผิวสีเหลืองหรือสีขาวในคนยุโรป และเม็ดสีน้ำตาล (Eumelanins) ซึ่งทำให้เกิดผิวสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลค่อนข้างดำในคนเอเชียและแอฟริกา (ดวงดาว ฉันทศาสตร์, 2540) สีผิวยังขึ้นอยู่กับเส้นเลือดและสารบางชนิด เช่น เบต้าแคโรทีนที่ทำให้ผิวเหลือง นอกจากนี้ความเข้มของสีผิวยังขึ้นกับปัจจัยทางกรรมพันธุ์ ปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมด้วย เช่น ในหญิงตั้งครรภ์จะมีการหลั่งฮอร์โมน MSH (Melanocyte-Stimulating Hormone) มากกว่าปกติ การรับประทานยาเม็ดคุมกำเนิด การใช้เครื่องสำอางบางชนิดที่มีส่วนผสมของฮอร์โมนเพศ หรือการได้รับแสงแดดนานๆ สิ่งเหล่านี้เป็นปัจจัยกระตุ้นให้เกิดการสร้างเมลานินมากขึ้น (Giuseppe, 1996)

2.2 กระบวนการชีวสังเคราะห์เมลานิน

การสังเคราะห์เมลานินอาศัยเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยไทโรซิเนสจะถูกสังเคราะห์ขึ้นภายในพลาสมิคเรติคูลัมชนิดหยาบ (rough endoplasmic reticulum) จากนั้นถูกส่งไปยังกอลจิคอมเพลกซ์ (golgi complex) เพื่อบรรจุภายในเวสซิเคิล (vesicle) แล้วจึงถูกส่งต่อไปยังเมลาโนไซต์ซึ่งจะเรียกเวสซิเคิลนี้ว่าเมลาโนโซม โดยจะเป็นแหล่งของการสังเคราะห์เมลานินจากกรดอะมิโนไทโรซีน เมลานินที่บรรจุอยู่ในเมลาโนโซมจะถูกส่งไปยังเซลล์เคราติโนไซต์ (keratinocyte) ผ่านกระบวนการเดนไดร์ติก (dentritic process) ของเมลาโนไซต์ เมื่อเมลาโนโซมภายในเซลล์เคราติโนไซต์ถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyse) สีผิวก็จะจางลง (Stawiski, 1992) เมลานินเป็นออกซิไดซ์โพลิเมอร์ (oxidized polymer) จัดเป็นสีชีวภาพ (biochrome) ช่วยปกป้องผิวจากแสงแดด แสงแดดเป็นตัวกระตุ้นให้เพิ่มการผลิตเมลาโนโซมและเมลานิน ส่วน melanocyte stimulating hormone (MSH) เป็นฮอร์โมนตัวหนึ่งที่เป็นตัวช่วยให้เมลานินกระจายตัว ผิวจึงมีสีเข้มขึ้น เมลานินเป็นอะโรเมติกควิโนน (aromatic quinone) ที่มีระบบการเชื่อม (conjugate bond system) ในโครงสร้างซึ่งทำให้มีสี เมลานินมี 2 ชนิดหลัก คือยูเมลานิน (eumelanin) สังเคราะห์มาจากไทโรซีน (tyrosine) มีสีน้ำตาลดำ อีกชนิดคือฟีโอเมลานิน (pheomelanin) สังเคราะห์มาจากไทโรซีน และซีสเตอีน (cysteine) มีสีเหลืองแดง นอกจากนี้ยังมีสารตัวกลาง (intermediate) ของสารเมลานินได้แก่ leucomelanin, hallochrome (สีแดง), indole-5,6,-quinone (Coomes, 1997)

ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงอยู่ในโมเลกุล (copper-containing enzyme) จัดเป็นเอนไซม์จำกัดอัตรา (rate limiting enzyme) จะเร่งปฏิกิริยาระหว่างไทโรซีน (ใช้ monophenolase tyrosinase) กับออกซิเจน ได้เป็น 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) และยังช่วยเร่งปฏิกิริยา (ใช้ diphenolase tyrosinase) ระหว่างโดปากับออกซิเจน ได้เป็นโดปาควิโนน (dopaquinone) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อภายใต้กระบวนการใช้และไม่ใช้เอนไซม์ (enzymatic และ nonenzymatic) โดยที่ถ้าอยู่ภายใต้ของกระบวนการไทโรซิเนส แล้วเกิดโพลิเมอร์จะได้ยูเมลานิน ส่วนกรณีที่โดปาควิโนนสร้างพันธะไทโออีเธอร์ (thioether) กับกูตาไธโอน (glutathione) หรือซีสเตอีน (cysteine) โดยมีเอนไซม์ตัวอื่นเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาผลที่ได้จะเป็นฟีโอเมลานิน ซึ่งพบว่าเซลล์จะสร้างเมลานินชนิดใดมากน้อยเพียงใดขึ้นกับเชื้อชาติและลักษณะทางพันธุกรรม ในคนผิวคล้ำจะมี ยูเมลานินปริมาณมาก ส่วนคนผิวขาวจะมีฟีโอเมลานินปริมาณมาก

เมื่อผิวสัมผัสกับแสงแดด รังสี UVA หรือ UVB จะกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ (cytokines) หลายชนิดที่มีผลทำให้เมลาโนไซต์แบ่งตัว (Rosdahl and Szabo, 1978) เพิ่มการสังเคราะห์และกระตุ้นไทโรซิเนส (Mishima and Imokawa, 1983) และมีผลต่อการขนส่งเมลาโนโซมไปยังเคราติโนไซต์ (Okazaki et al, 1976)

หากมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณหรือการกระจายของเม็ดสีเมลานินที่ผิดปกติ ก็อาจทำให้เกิดโรคหลายอย่างได้ เช่น ภาวะเผือกหรือโรคด่างขาว (Vitiligo) ซึ่งเกิดจากการสร้างเม็ดสีเมลานินน้อยเกินไป (melanotic hypopigmentation) โดยตัวเซลล์สร้างสี (Melanocyte) ถูกทำลายจนขาดหายไปทำให้ผิวหนังเปลี่ยนแปลงจากสีปกติเป็นสีขาวขอบเขตชัด รอยขาวนี้จะขาวมากมีหลายรูปแบบเป็นวงเดียวหรือหลายวงก็ได้ แต่หากมีเมลานินมาสะสมที่ผิวหนังมากจะทำให้ผิวหนังส่วนนั้นมีสีคล้ำลงหรือเข้มขึ้น เรียก hyperpigmentation ซึ่งจะทำให้ผิวหนังกลายเป็นกระ จุดด่างดำ และฝ้าแดดได้ (Giuseppe, 1996)

2.3 กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน

การยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน สามารถทำได้หลายวิธีโดยอาศัยกลไกการสังเคราะห์เมลานินที่แตกต่างกัน

2.3.1 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมีคุณสมบัติเป็น copper-chelating agent จะเข้าจับกับไอออนของทองแดงในโมเลกุลของเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้เอนไซม์ไม่แสดงฤทธิ์ หรือด้วยการยับยั้งบริเวณที่ออกฤทธิ์ (active site) ของเอนไซม์ โดยสารกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์โดยตรงกับเอนไซม์ จึงจัดเป็นสารกลุ่ม suppressive type เช่น kojic acid

2.3.2 การใช้สารที่ยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น Placenta extract, biomein

2.3.3 การยับยั้งการเกิดออโต้ออกซิเดชั่น (autoxidation) จากโดปาโครมไปเป็นเมลานิน เป็นสารที่มีคุณสมบัติกำจัดอนุมูลอิสระได้ ซึ่งจะช่วยลดปริมาณเมลานินที่จะสร้างขึ้น เช่น วิตามินอี (α – tocopherol) (ดวงดาว ฉันทศาสตร์, 2540)

2.3.4 การยับยั้งการทำงานของเอนโดธีลิน – 1 (endothelin-1, ET-1) ซึ่งเอนโดธีลิน -1 จัดเป็นสารปัจจัยที่กระตุ้นการเจริญของไฟโบรบลาสท์ (fibroblast growth factor, β-FGF) ที่สังเคราะห์จากเคราติโนไซต์ เอนโดธีลิน -1 ออกฤทธิ์กระตุ้นให้เมลาโนไซต์แบ่งตัว (mitogen) และกระตุ้นการสังเคราะห์เมลานิน (melanogenesis) (Yada et al,1991) ด้วยการเพิ่มการสังเคราะห์และการแสดงออกของไทโรซิเนส (Imokawa et al, 1995)

2.3.5 การป้องกันรังสีอุลตราไวโอเลต เช่น สารดูดซับรังสี (UVA, UVB absorber) หรือสารอนินทรีย์ที่มีคุณสมบัติสะท้อนแสงหรือกระจายแสงได้ เช่น titanium dioxide ซึ่งกลไกนี้เป็นการป้องกันปัจจัยที่กระตุ้นการสร้างเมลานิน คือแสงแดด

2.3.6 การใช้สารที่เป็นพิษต่อเมลาโนไซต์ (non suppressive tyrosinase inhibitor) เช่น hydroquinone, monobenzyl ether of hydroquinone (HBEH) ซึ่ง hydroquinone ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบแข่งขัน (competitive enzyme inhibitor) และไปขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ทำให้จำนวนและรูปร่างเมลาโนไซต์เปลี่ยนแปลง

2.4 การศึกษาสารธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

กรดอะเซลาอิค (Azelaic acid) เป็นสารที่พบตามธรรมชาติในเมล็ดข้าวสาลี ข้าวไรน์ และข้าวบาร์เลย์ สารตัวนี้สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในเซลล์สร้างสีที่ผิดปกติ (เช่น การเกิดฝ้า) แต่ไม่มีผลต่อเซลล์สร้างสีที่ทำงานผิดปกติ ดังนั้นจึงใช้ในการรักษาฝ้าได้ดีโดยไม่ทำให้เกิดรอยด่างขาวเป็นวงบนใบหน้า สารตัวนี้ไม่เหมาะที่จะใช้ในผลิตภัณฑ์ทำให้หน้าขาวโดยทั่วไป กรดโคจิค (kojic acid) เป็นสารเดิมที่สกัดได้จากเชื้อราซึ่งใช้หมักถั่วและข้าวในการทำมิโซะ ค้นพบโดยชาวญี่ปุ่น สารตัวนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยจับกับ copper ซึ่งเป็น coenzyme ในกระบวนการสร้างสีผิว อนุพันธ์ของวิตามินซี มีอนุพันธ์ที่นำมาใช้หลายตัวทั้งที่ละลายในน้ำและในน้ำมัน อนุพันธ์ละลายในน้ำ ได้แก่ magnesium ascorbyl phosphate (VC-PMG) ซึ่งนิยมใช้มากที่สุด มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สามารถจับอนุมูลอิสระและเสริมสร้างคอลลาเจนได้ สารสกัดจากชะเอม (Licorice extract PT40) เป็นสารสกัดธรรมชาติจากรากชะเอม ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และยังออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระ ต่อต้านการเกิดริ้วรอยโดยสารสกัดจากชะเอม มีสารสำคัญ คือ Glabradin และ Glabrene และยังมีคุณสมบัติช่วยดูดซับรังสียูวีไม่ให้เข้าไปสู่ผิวภายใน Arbutin เป็นสารสกัดจากต้น Bearburry ช่วยยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ออกฤทธิ์โดยเข้าไปแย่งกับโดปา ที่ receptor site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส (ดวงดาว ฉันทศาสตร์, 2540) สารสกัดจากกิ่งของ

ต้นหม่อน (*Morus alba*) มีสาร oxyresveratol ซึ่งเป็นสารกลุ่ม stilbene มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (Kim et al, 2002) ส่วนในใบแห้งของหม่อน พบสารสำคัญ คือ mulberroside F ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด autoxidation ของโดปาโครม แต่มีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินน้อยกว่า kojic acid (Lee et al, 2002) สารสกัดจากใบสดของโสม (*Panax ginseng*) เมื่อนำมาแยกจะได้ p-coumaric acid ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในช่วง monophenolase ดีกว่าช่วง diphenolase (Lim et al, 1999) สารสกัดจากใบชา *(Camellia sinensis*) ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในช่วง monophenolase สารออกฤทธิ์คือ (-)-epicatechin 3-O-gallate (ECG), (-)-gallocatechin 3-O-gallate (GCG) และ(-)-epicgallocatechin 3-O-gallate (EGCG) จากการศึกษาพบว่า GCG ยับยั้งแบบแข่งขันการจับที่ active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส (No et al, 1999) สารสำคัญในหญ้าฝรั่น (*Crocus sativa*) สารที่ออกฤทธิ์คือ crocusatin H, crocin-1 และcrocin-3 ซึ่งสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (Li and Wu, 2000), สารสำคัญที่แยกได้จากโกฐน้ำเต้า (*Rheum offcinale*) พบสารออกฤทธิ์คือ 3,4′,5-trihydroxystibene-4′-O-β-D-(2″-O-galloyl) glucopyranoside และ 3,4′,5-trihydroxystibene-4′-O-β-D-(6″-O-galloyl) glucopyranoside สารทั้งสองนี้ออกฤทธิ์ใกล้เคียงกับ kojic acid โดยออกฤทธิ์ในช่วง monophenolase แรงกว่า diphenolase (Iida et al, 1995), สารสกัดจากกุหลาบมอญ (*Rosa damascena*) และรำเพย (*Thevetia peruviana*) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยทั้งสองชนิดมีค่า IC_{50} > 5 mg/ml ซึ่งถือว่ามีค่าต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน kojic acid (IC_{50} > 0.92 mg/ml) (ปวีณา ดวงสุริยเนตรและคณะ, 2547), สารสกัดจากมะหาด (*Artocarpus lakoocha*) พบสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส คือ 2,4,3′,5′-tetrahydroxystilbene และ 4,3′,5′-tri hydroxystilbene (บุญชู ศรีตุลารักษ์และคณะ, 1998), สารสกัดจากเนื้อไม้สาเก (*Artocarpus incisus*) ให้ผลยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนสด้วยความแรงเท่ากับกรดโคจิก (kojic acid) (Shimizu et al, 1998), สารสำคัญใน anise oil (*Pimpinella anisum*) คือ anisaldehyde และ *p*-hydroxyanisole มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบไม่แข่งขันโดยการจับที่ active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50} เท่ากับ 0.32 และ 0.15 mM ตามลำดับ) นอกจากนี้ใน anise oil ยังมีสารอีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่มีฤทธิ์อ่อนกว่าสารสำคัญทั้งสองตัวที่กล่าวมา (Kubo and Kinst-Hori, 1998), สารสกัดจากข้าวดำ (Black Rice Bran) ที่สกัดด้วย Ethyl acetate มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 80.5 % ที่ความเข้มข้น 0.4 mg/ml (Miyazawa et al, 2003), สารสกัดจากเมล็ดดอกคำฝอย (*Carthamus tinctorius* L.) ที่สกัดด้วย Ethyl acetate และ Methanol มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 80 % (Roh et al, 2004)

2.5 ความสำคัญของอนุมูลอิสระ

Reactive oxygen species (ROS) เป็นอนุมูลอิสระ (Free radicals) ซึ่งในอะตอมหรือโมเลกุลของสารที่มี oxygen เป็นองค์ประกอบที่มี electron ไม่ครบคู่ เป็นคำที่เรียกรวมถึง oxygen-centered radical ตัวอย่างเช่น superoxide (O^{-}_{2}), hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$) และ nonradical derivatives ของออกซิเจนที่สามารถทำปฏิกิริยาแล้วเกิดอนุมูลอิสระตามมา เช่น H_2O_2 หรือ potent oxidant สามารถทำให้เกิดการทำลายโดยไม่ต้องมี radical intermediate เช่น singlet oxygen hypochlorous acid และ nitric oxide ($NO^{\cdot}$) เป็นต้น อนุมูลอิสระเป็นสารที่ไม่เสถียร ดังนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาได้ว่องไวและสามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆในร่างกาย เช่น lipid, protein, carbohydrate หรือ DNA (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

ในสภาวะธรรมชาติทั้ง O^{-}_{2} และ $HO^{\cdot}$ ถูกสร้างขึ้นตลอดเวลา โดย $HO^{\cdot}$ Radical เกิดจาก H_2O_2 ทำปฏิกิริยากับเหล็กและทองแดงในร่างกาย ส่วน O^{-}_{2} เกิดจาก chemical accident เกิด autooxidation หรือรั่วไหลจาก electron transport chain เนื่องจาก O^{-}_{2} มีประโยชน์และบทบาทสำคัญในการฆ่าแบคทีเรีย ดังนั้น ROS จึงมีประโยชน์และโทษ ร่างกายจึงต้องมีกลไกสำหรับควบคุม ROS ไม่ให้มีอนุมูลอิสระมากเกินไปจนทำให้เกิดอันตรายแก่ร่างกาย จนเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress (วิชิต ลีนุตพงษ์, 2547)

พยาธิสภาพที่เกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative stress ได้แก่ ภาวะ aging ของผิวหนัง ทำให้เซลล์ผิวหนังโดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนที่มีไขมันเกิดออกซิเดชัน (lipid peroxidation) การเกิด lipid peroxidation ที่ผิวหนังเป็นมูลเหตุสำคัญในการเกิดการทำลายของเซลล์ โดย oxidative stress ของรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) เนื่องจากไขมันที่ผนังเซลล์ทั่วไปและที่ผิวหนังส่วนมากเป็นกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ถูก oxidized เป็น lipid peroxide ได้ง่ายโดยรังสีอัลตราไวโอเลต UV ทำให้เกิด lipid peroxidation ในหนังกำพร้า โดย superoxide radical (O^{-}_{2}) ที่เกิดจาก UV ทำปฏิกิริยากับ hydrogen atom โดยมีเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเกิดเป็น H_2O_2 จากนั้น H_2O_2 ทำปฏิกิริยา กับ ferrous ion โดย fenton reaction เกิด hydroxyl radical เปลี่ยน unsaturated fatty acid ให้เป็น lipid peroxide เมื่อ polyunsaturated fatty acid ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตจะเกิด lipid radical (alkyl radical) ทำปฏิกิริยากับออกซิเจน เกิด lipid peroxy radical ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยาต่อกับ polyunsaturated fatty acid ที่อยู่ใกล้เคียง เกิด lipid peroxide ปฏิกิริยานี้จะเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่และทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายในที่สุด ทำให้ผิวหนังเสียหน้าที่ในการป้องกันการสูญเสียความชื้นจากผิว ผิวเสียความยืดหยุ่นเพราะคอลลาเจนและอีลาสตินแปรสภาพหรือถูกทำลายไป เช่น เกิดรอยเหี่ยวย่น (wrinkle) เกิดเป็นจุดสี (lipofusin spot) (วิชิต ลีนุตพงษ์, 2547) นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังมีผลทำให้เกิดภาวะหลอดเลือดหัวใจอุดตัน (atherosclerosis) โรคระบบประสาทเสื่อมการทำงานหลายชนิด (neurodegenerative diseases) และมีผลทำลาย DNA ของเซลล์ทำให้เป็นสาเหตุของมะเร็งบางชนิด

ดังนั้นการหลีกเลี่ยงจากอนุมูลอิสระจึงสามารถป้องกันเซลล์ร่างกายจากการถูกทำลายดังกล่าวได้ในแง่ของผลต่อผิวหนังนี้สามารถป้องกันได้โดยการหลีกเลี่ยงจากแสงแดดและการใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Papas, 1998)

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือ Antioxidants ทำหน้าที่จับอนุมูลอิสระไว้ ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันต่าง ๆ ไม่เกิดขึ้น สามารถป้องกันเซลล์ผิวหนังจากการถูกทำลาย จึงใช้ป้องกันหรือชะลอความเหี่ยวย่นของผิวได้ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบหรือได้จากธรรมชาติ ได้แก่

Protective enzymes เป็นเอนไซม์ที่สร้างได้ภายในเซลล์ร่างกาย ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase สามารถทำลายอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์ catalase ทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์ glutathione peroxides สร้าง reduced glutathione เป็นสารต้านออกซิเดชันที่ละลายน้ำได้

Antioxidant vitamins ได้แก่ carotenoids เช่น β-carotene ในผักใบเขียว, lycopene ในมะเขือเทศ สตรอเบอรรี่, xanthophyll ในข้าวโพด, α- tocopherol หรือ vitamin E, ascorbic acid หรือ vitamin C

Phytochemicals เป็นสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในพืช ส่วนใหญ่มีโครงสร้างเป็นกลุ่มแทนนิน ฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แรงและมีประสิทธิภาพในเครื่องสำอาง เช่น catechin ในชาเขียว สารกลุ่ม flavonoids ในพืชหลายชนิด เช่น anthocyanins ในผลไม้blueberry สาร proanthocyanidin oligomers ในเปลือกสนหรือเมล็ดองุ่น เป็นต้น พืชที่ได้รับความสนใจในการนำมาสกัดสาร flavonoid มาใช้ในทางเครื่องสำอาง ได้แก่ henbane ประกอบด้วย rutin, esculetin และ chlorogenic acid ใบแป๊ะก๊วย คาเลนดูลามี narcissi และ quercetin

Minerals แร่ธาตุเป็น coenzyme ในปฏิกิริยาต้านออกซิเดชันต่าง ๆ ช่วยเสริมการทำงานของ protective enzymes ได้แก่ ซีลีเนียมในกระเทียม สังกะสีในเมล็ดฟักทอง (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2547)

2.7 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชที่นำมาศึกษา

กระดังงาจีน *(Artabotrys hexapetalus* (L.f.) Bhandari, *A. unicatus* (Lam.) Merr, *A. odoratissimus* R. Br. อยู่ในวงศ์กระดังงา หรือ Annonaceae พบได้ทั่วไปในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย ลักษณะทั่วไปเป็นพืชที่ปลูกง่าย นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ เป็นไม้พุ่ม ไม้เถาเลื้อยเนื้อแข็ง มีหนามขอเกี่ยวหรือไม้ยืนต้น ในเนื้อไม้และใบมีกลิ่นและมีต่อมน้ำมัน ใบเป็นแบบใบเดี่ยวติดเรียงแบบสลับ ขอบใบเรียบ ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือออกเป็นกลุ่ม ออกที่ซอกกิ่งหรือปลายกิ่ง กลีบดอกเป็นกลีบนุ่มหนา อมน้ำ ดอกอ่อนจะมีสีเขียวและจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อแก่มากขึ้น กลีบวงนอกมี 3 กลีบ วง

ในมี 3-6 กลีบแยกกัน โคนกลีบชนกันหรือซ้อนเหลื่อมกัน เกสรตัวผู้มีจำนวนมาก ก้านเกสรสั้น ขึ้นอัดเบียดกันเรียงเวียนติดบนฐานแกนดอก ซึ่งยื่นขยายเป็นรูปเนินโค้งนูน เกสรตัวเมียมีจำนวนมาก อยู่แยกกัน เป็นแบบ superior รังไข่แต่ละอันภายในมี 1 ห้องมีเม็ดไข่ตั้งแต่ 1 เม็ด การติดของไข่เป็นแบบ parietal placentation ผลเป็นแบบ berry ติดอยู่บนแกนดอก บางชนิดจะเชื่อมติดกันเป็นกลุ่ม มีเมล็ดขนาดใหญ่ผิวหุ้มเมล็ดแข็งและเป็นมัน (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2544)

รูปที่ 1 กระดังงาจีน *Artabotrys hexapetalus* (L.f.) Bhandari

2.8 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*

จากการทบทวนงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีหรือพฤกษเคมีของพืชสกุล *Artabotrys* พบว่ามีสารกลุ่มหลักที่พบในพืชสกุลนี้ได้แก่ สารกลุ่มอัลคาลอยด์ (Alkaloid) นอกจากนั้นยังพบ สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) สารกลุ่มฟีนอลิค (Phenolic compounds) เป็นต้น

2.8.1 สารกลุ่มอนุพันธ์ไอโซควิโนลีน(Isoquinoline derived alkaloid)

จากการสกัดเปลือกต้น *A. lastourvillensis* ด้วย 95% ethanol สามารถแยกสารจำพวก aporphine alkaloid ได้ 7 ชนิดได้แก่ lastourvilline (**1**), suveoline (**2**), glaucine (**3**), boldine (**4**), isoboldine (**5**), bracteoline (**6**), lilioriotulipiferine (**7**) (Eloumi-Ropivia et al, 1985) การศึกษาลำต้น *A. maingayi* แยกสารจำพวก noraporphine เช่น norstephalagine (**8**) สารจำพวก oxoaporphine เช่น atherospermidine (**9**) (Cortes et al, 1990) จากการสกัดเปลือกต้นและลำต้นของ *A. uncinatus* พบสาร atherospermidine (**9**), liriodenine (**10**) และ artacinatine (**11**) (Wu et al, 1989) จากผลดิบพบ artabonatine A (**12**), artabonatine B (**13**) (Hsieh et al, 1999) จากรากและลำต้นพบ uncinine (14), artabonatine C (**15**), artabonatine D (**16**), artabonatine E (**17**), artabonatine F (**18**) (Hsieh et al, 2001), 4, 5-dioxoartacinatine (**19**) (Lan et al, 2007) การศึกษาลำต้นของ *A. venutus* พบสารกลุ่ม noraporphine ได้แก่ (-)-nornuciferine (**20**), (-)- asimilobine (**21**), (-)-anonaine (**22**), norstephalagine (**8**), (-)-norushinsunine (**23**) ส่วนกลุ่ม aporphine ได้แก่ (-)-nuciferine (**24**), (-)-liridinine (**25**), (+)-*S*-reticuline (**26**), (+)-norcorydine (**27**) และกลุ่ม berbine เช่น (-)-discretamine (**28**), (-)-10-*O*-methyldiscretine (**29**), (-)-artavenustine (**30**) (Cave et al, 1986) ส่วนสารสกัดจากลำต้น *A. zeylanicus* พบสาร 8-methoxyouregidinone (**31**), artabotrine (**32**), ouregidinone (**33**), liriodenine (**10**), oxicrebanine (**34**), oxobuxiforine (**35**), atherospermidine (**9**), lanuginosine (**36**) (Wijeratine et al, 1996) จากส่วนลำต้นของ *A. brachypetaus* พบสารเช่น (-)- asimilobine (**21**), (-)-anonaine (**22**), 10-*O*-methyldiscretine (**29**) (Sagen et al, 2003) การศึกษาลำต้น *A. hainanensis* พบสารเช่น (-)- asimilobine (**21**), (-)-liridinine (**25**) (Han et al, 2005) ส่วนการศึกษารากของ *A. spinosus* พบสาร artabotrysine (**37**), bidebiline (**38**), 10-*O*-methylmoschatoline (**39**), artacinatine (**11**) และ artabonatine C (**15**) (Sichaem et al, 2010)

2.8.2 สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid)

จากการศึกษาใบและผลของ *A. madagascariensis* พบสาร tritepene เช่น polycarpol (**40**) (Murphy et al, 2008) จากการศึกษาเปลือกต้นของ *A. odoratissimus* พบสาร เช่น polycarpol (**40**), 24-methylene-lanosta-7,9(11)-dien-3β-ol (**41**) (Hassan et al, 1987) และจากเมล็ดพบสาร เช่น artabotryol A (**42**), artabotryol B (**43**), artabotryol C (**44**), artabotryol D (**45**) และ artabotryol E (**46**) (Gupta et al, 2010) ส่วนจากการศึกษาลำต้นของ *A. uncinatus* พบสาร เช่น β-sitosterol (**47**), stigmasterol (**48**), β-sitosteryl-3-O-β-glucoside (**49**), stigmasteryl3-O-β-glucoside (**50**) (Lan et al, 2007) นอกจากนั้นยังพบสาร sesquiterpene เช่น yinzhousu A (**51**) (Liang et al, 1979), yinzhousu B (**52**) (Liang et al, 1979), yinzhousu C (**53**) และ yinzhousu D (**54**) (Zhang et al, 1988) จากเปลือกต้นของ A. *stenopetalus* พบ pogostol-*O*-methyl ether (**55**) และ artabotrol (**56**) (Fleischer et al, 1997)

2.8.3 สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid)

จากการศึกษาใบของ *A. odoratissimus* พบสาร quercetin (**57**), kaempferol (**58**), myricetin (**59**), quercetin 3-*O*-arabinoside (**60**), quercetin 3-*O*-glucoside (**61**), quercetin 3-*O*-galactoside (**62**) (Singh and Sahai, 1996) จากการศึกษาใบของ *A. hexapetalus* พบสารเช่น quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinofuranoside (**63**), kaempferol 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinofuranoside (**64**), apigenin 7-*O*-apiosyl-(1→2) -glucoside (**65**), taxifolin (**66**), glucoluteolin (**67**) (Li et al, 1997)

2.8.4 สารกลุ่มอนุพันธ์ฟีนอลิค (Phenolic acid derivatives)

จากการศึกษาใบของ *A. hexapetalus* พบสารกลุ่ม phenolic acid ได้แก่ gallic acid (**68**) (Singh and Sahai, 1996) จากการศึกษาใบและผลของ *A. madagascariensis* พบสาร artabotrol A (**69**), melodorinol (**70**), acetylmelodorinol (**71**) (Murphy et al, 2008)

2.8.5 สารกลุ่มอนุพันธ์บิวไทโรแลคโตน (Butyrolatone derivatives)

จากการศึกษาใบของ *A. hexapetalus* พบสารอนุพันธ์ butyrolactone ได้แก่ artapetalin A (**72**), artapetalin B (**73**), artapetalin C (**74**), (+)-tulipalin B (**75**) และ (2*R*,3*R*)-3-hydroxy-2-methylbutyrolactone (**76**) (Wong and Brown, 2002) จากการศึกษาผลของ *A. odoratissimus* พบสารอนุพันธ์ butyrolactone ได้แก่ 3-methylene-4-pentadecyldihydrofuran-2-one (**77**) (Bordoloi et al, 2009)

2.8.6 สารกลุ่มลิกแนน (Lignan)

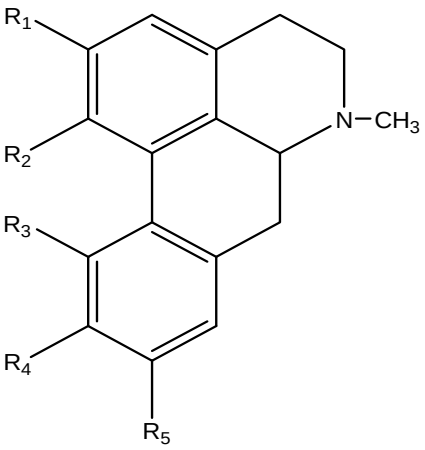
จากการศึกษาใบของ *A. hexapetalus* พบสารกลุ่มลิกแนนได้แก่ artabotrycinol (**78**) (Yu et al, 2001)

2.8.7 สารกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinone)

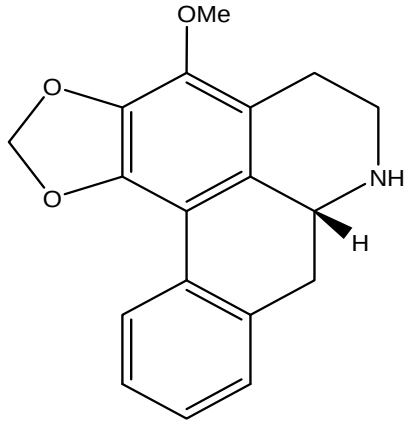
จากการศึกษาใบของ *A. hexapetalus* พบสารได้แก่ 1-hydroxy-2,5-dimethoxy-9,10-anthraquinone (**79**) และ 1,4,5-trihydroxy-anthraquinone (**80**) (Singh et al, 2005)

2.9 ฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล *Artabotrys*

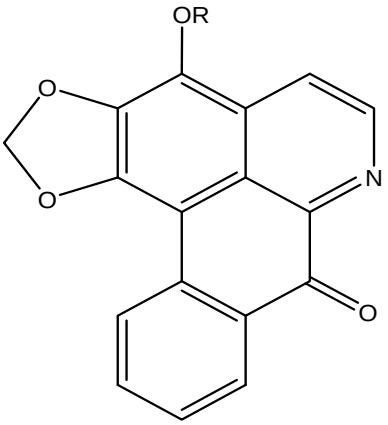
สารจำพวก noraporphine เช่น norstephalagine (**8**) และสารจำพวก oxoaporphine เช่น atherospermidine (**9**) จาก *A. maingayi* มีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อ (Cortes et al, 1990) การศึกษาฤทธิ์ต้านมะเร็งพบว่าสาร atherospermidine (**9**) และ liriodenine (**10**) ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด KB ได้ (Wu et al, 1989) จากการศึกษาของ Wijeratine et al, 1995 ยังพบว่า atherospermidine (**9**) และ artabotrine (**32**) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P-388 สาร artabonatine F มีฤทธิ์ต้านการเกิดลิ่มเลือด (antithrombin) (Hsieh et al, 2001) สาร melodorinol (**70**) และ acetylmelodorinol (**71**) จากใบและผลของ *A. madagascariensis* มีฤทธิ์ต้านการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งรังไข่ชนิด A 2780 (Murphy et al, 2008) ส่วนสาร 3-methylene-4-pentadecyldihydrofuran-2-one (**77**) มีฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิด *Alternaria tenuissima* (Bordoloi et al, 2009) Phytoterpenoid จาก *A. odoratissimus* ยับยั้งการงอกของสปอร์ (spore germination) ของรา เช่น *Alternaria alternata*, *A. solani, Cercospora* sp., *Curvularia maculans*, *C. penniseti*, *Fusarium udum*, *Helminthosporium echinochloae*, *H. frumentacei*, *H. penniseti* และ *Ustilago cynodontis* (Singh et al, 2006) ส่วน sesquiterpene yinzhousu A (**51**) ที่แยกจาก *A. uncinatus* มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (Liang et al, 1979)



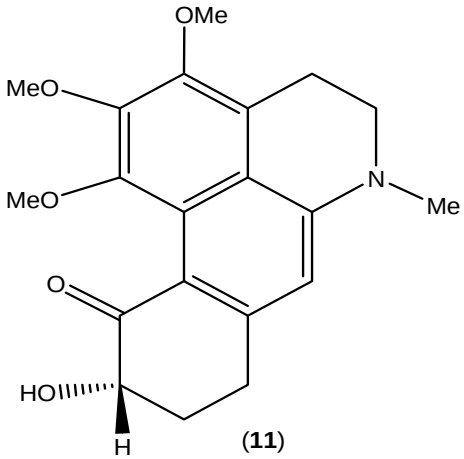
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
(**1**)	OH	OH	H	OMe	OMe
(**2**)	OMe	OMe	OH	OH	H
(**3**)	OMe	OMe	OH	OMe	OMe
(**4**)	OH	OMe	OH	OMe	OH
(**5**)	OMe	OH	H	OMe	OH
(**6**)	OMe	OH	H	OH	OMe
(**7**)	OH	OMe	H	OH	OMe



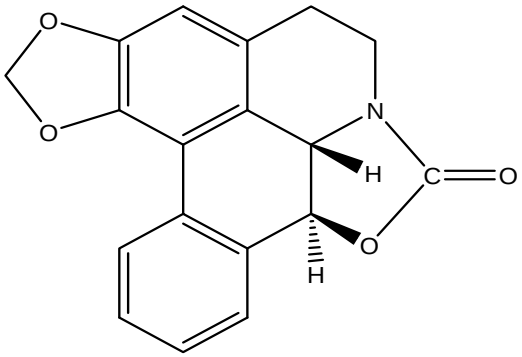
(**8**)



	R
(**9**)	Me
(**10**)	H

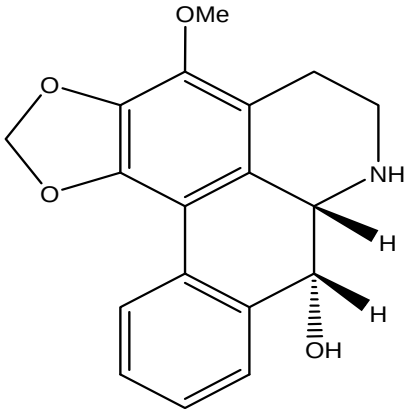


(**11**)

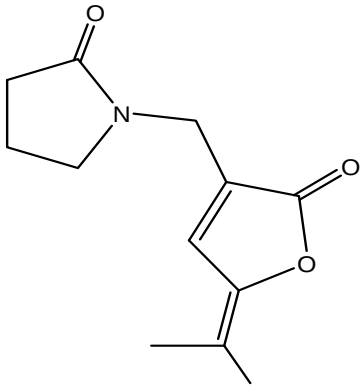


(**12**)

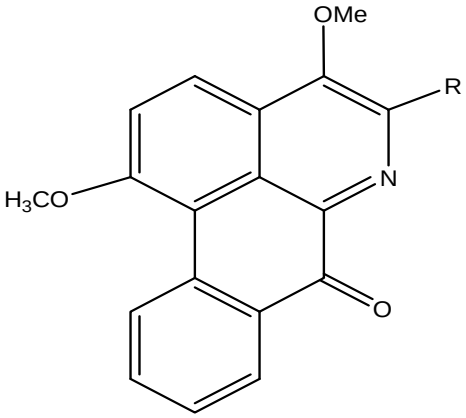
รูปที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*



(**13**)



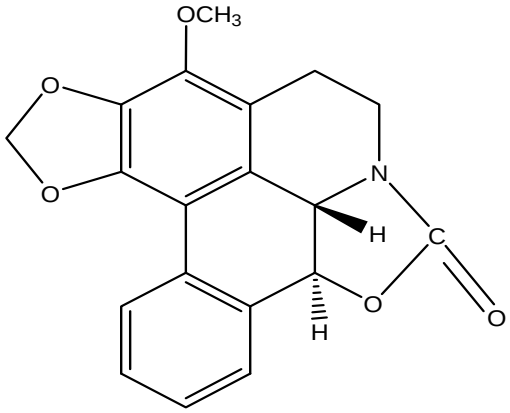
(**14**)



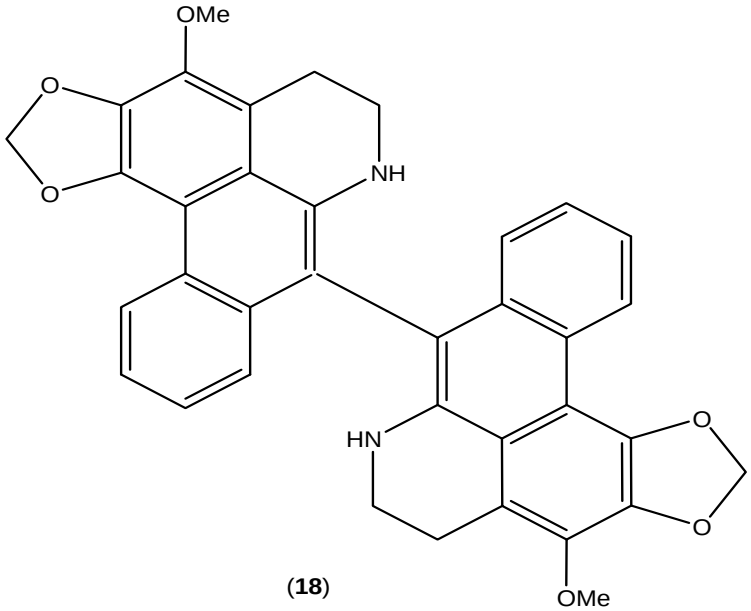
R

(**15**) OMe

(**16**) OH

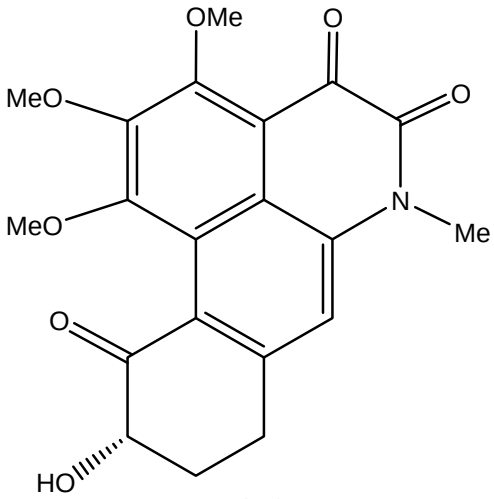


(**17**)

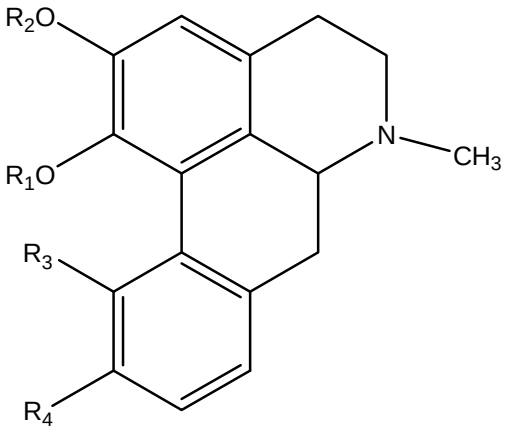


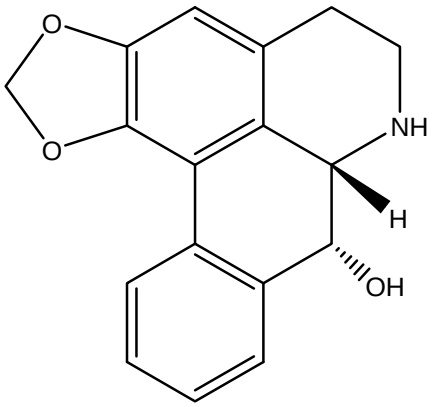
(**18**)

รูปที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*



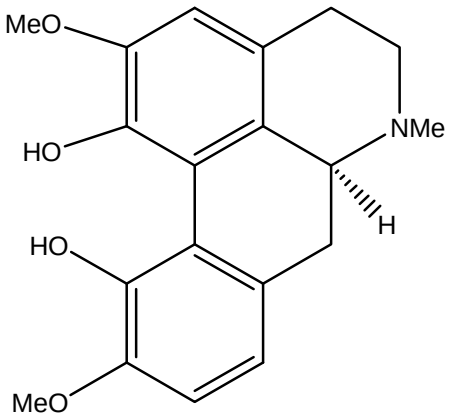
(**19**)



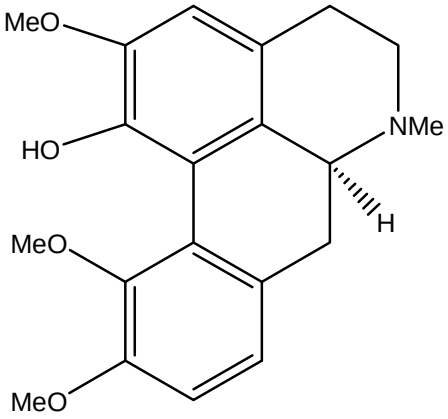


(**23**)

	R_1	R_2	R_3	R_4
(**20**)	Me	Me	H	H
(**21**)	Me	H	H	H
(**22**)	—CH_2—		H	H
(**24**)	Me	Me	H	Me
(**25**)	H	Me	H	Me

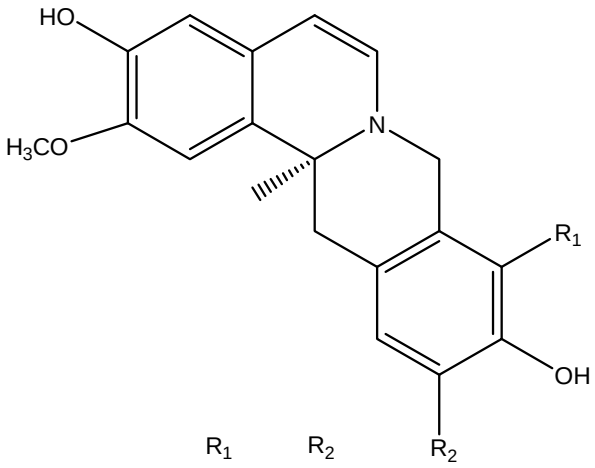


(**26**)

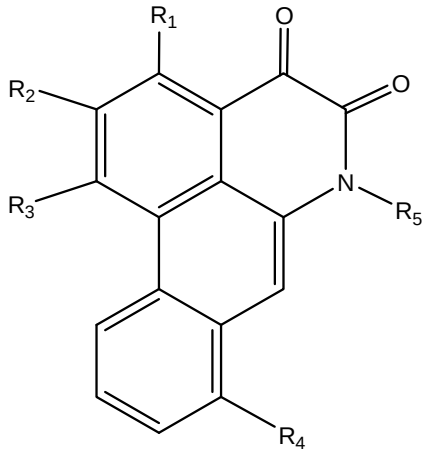


(**27**)

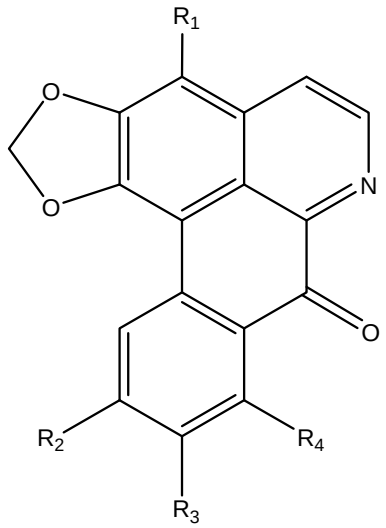
รูปที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*



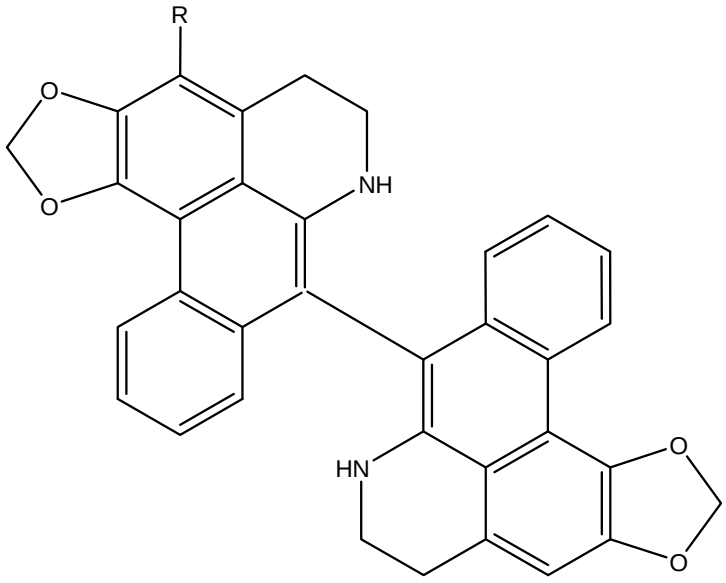
	R_1	R_2
(**28**)	OMe	H
(**29**)	H	OMe
(**30**)	H	OH



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
(**31**)	OMe	OMe	OMe	OMe	H
(**32**)	H	O-CH_2-O		H	OMe
(**33**)	OMe	OMe	OMe	H	H

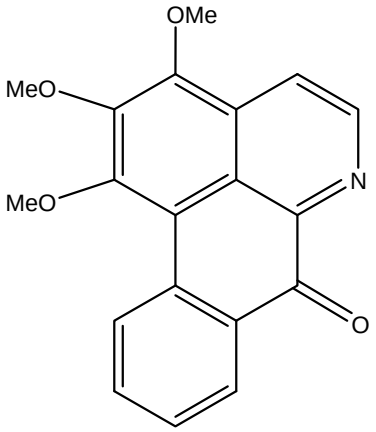


	R_1	R_2	R_3	R_4
(**34**)	H	H	OMe	OMe
(**35**)	OMe	H	OMe	H
(**36**)	H	H	OMe	H

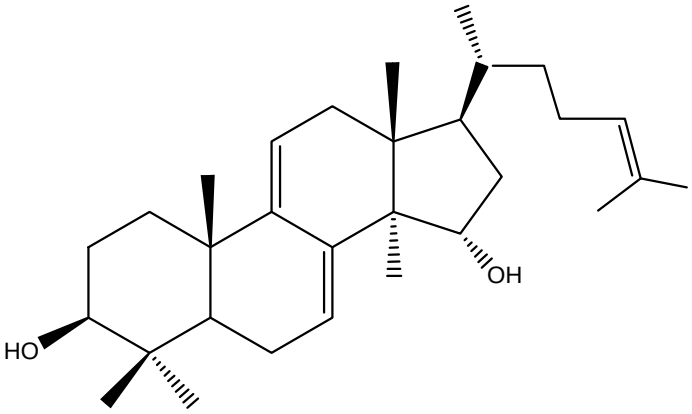


	R
(**37**)	OMe
(**38**)	H

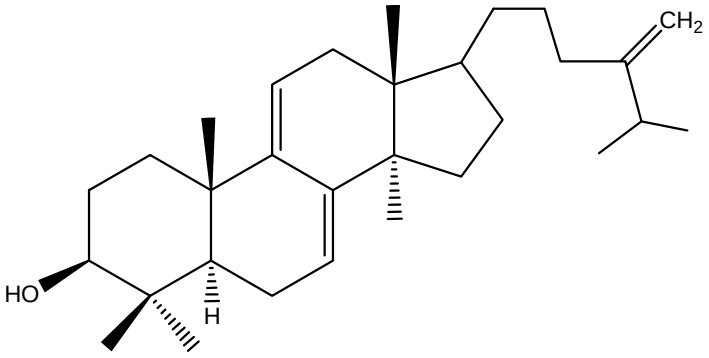
รูปที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*



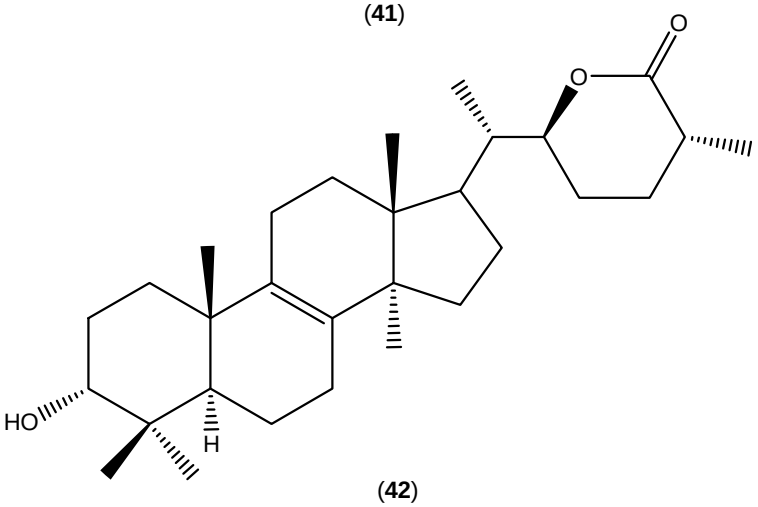
(**39**)



(**40**)

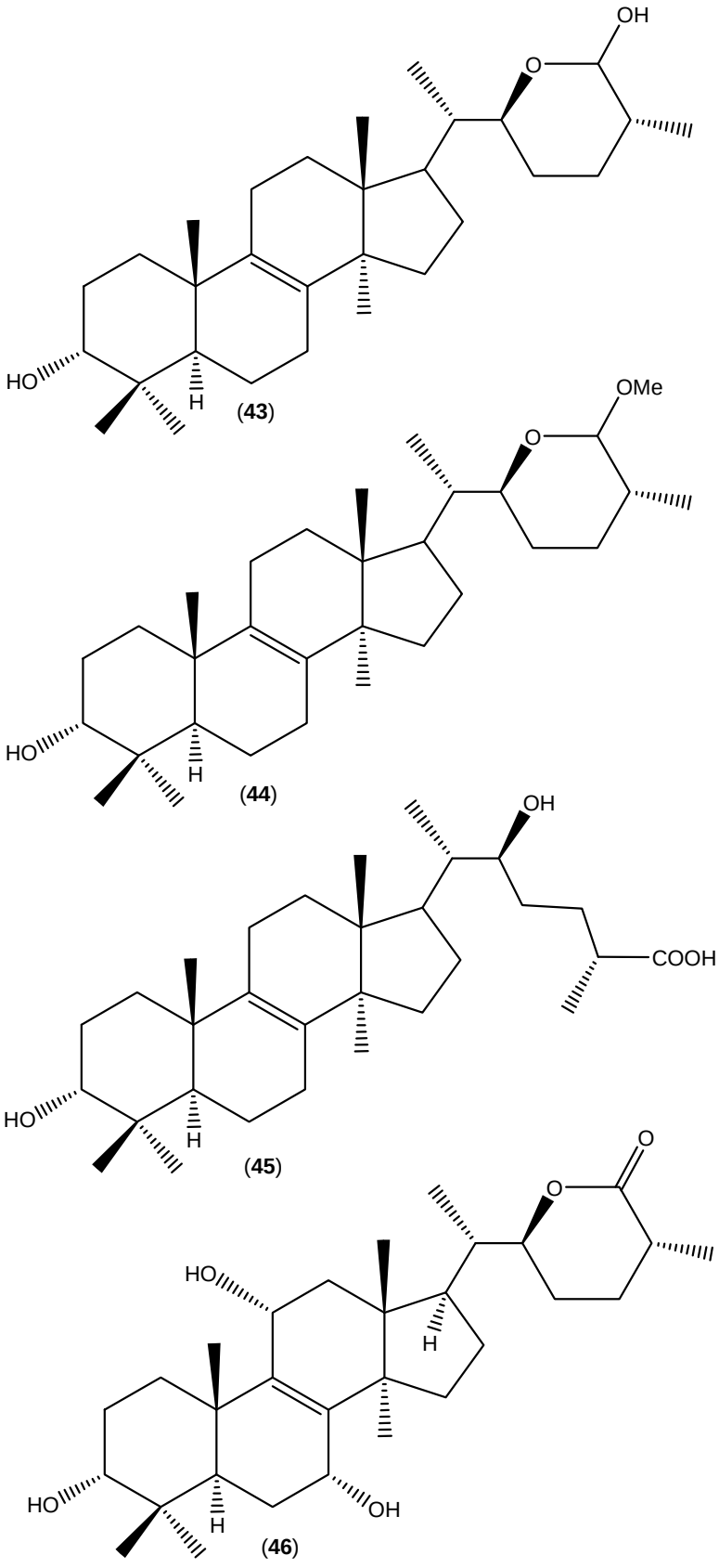


(**41**)

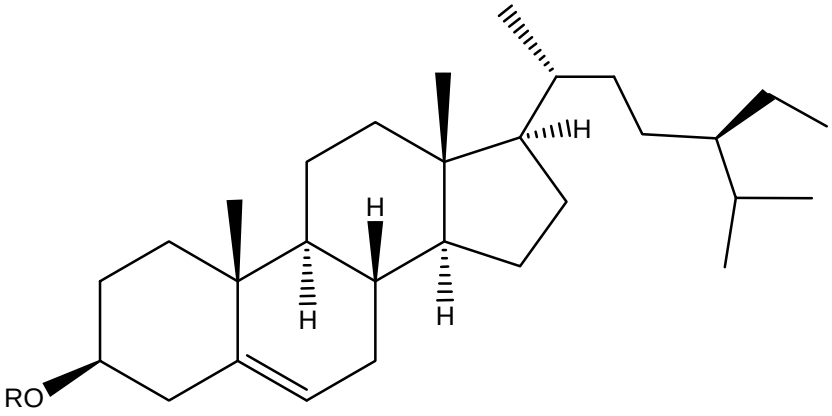


(**42**)

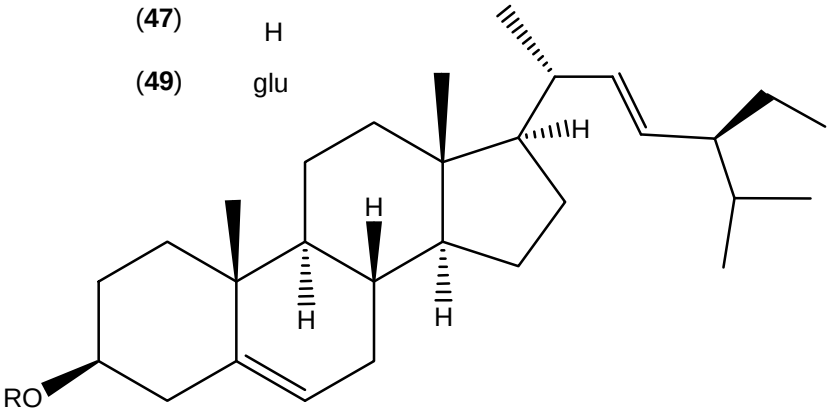
รูปที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*



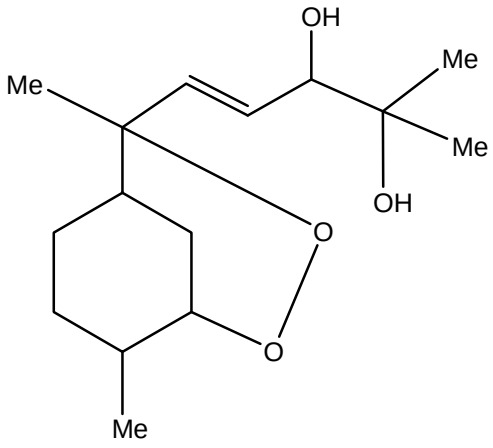
รูปที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*



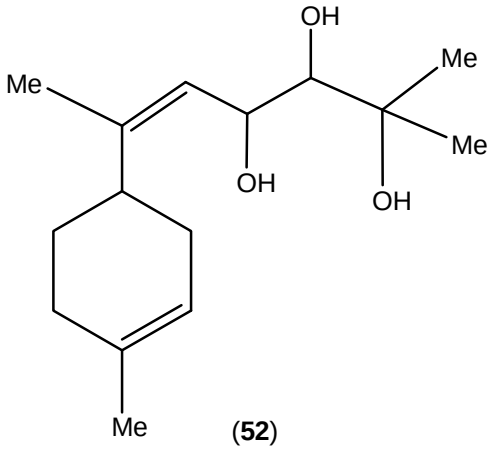
	R
(**47**)	H
(**49**)	glu



	R
(**48**)	H
(**50**)	glu

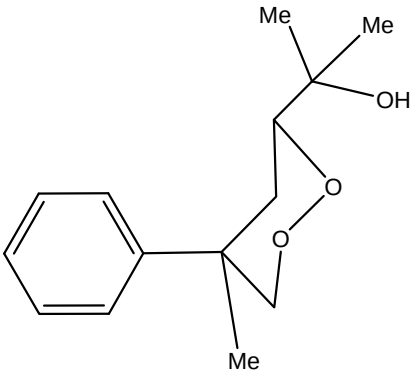


(**51**)

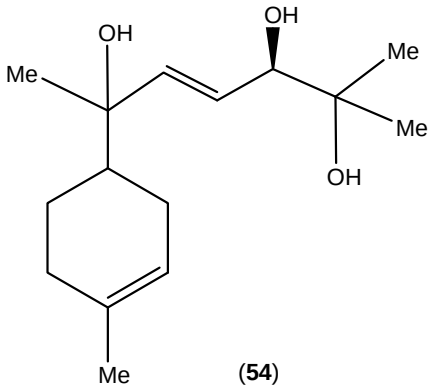


(**52**)

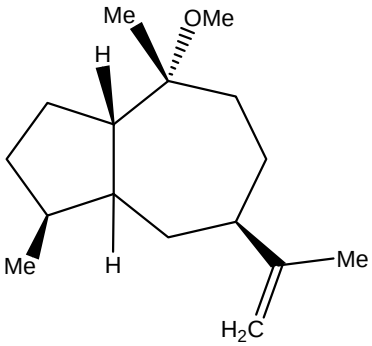
รูปที่ 8 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*



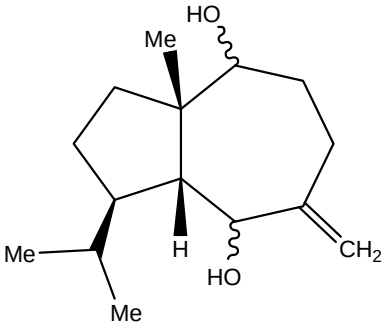
(**53**)



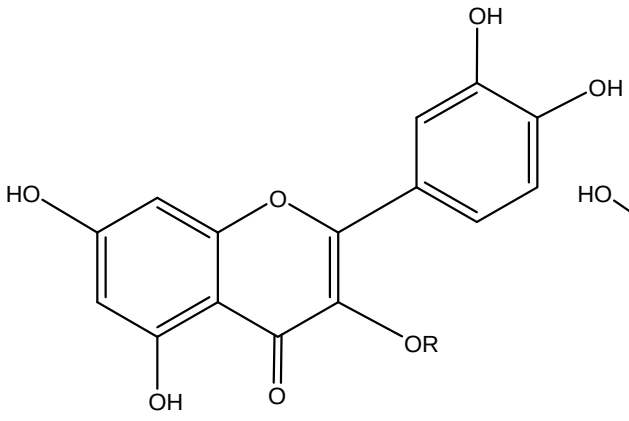
(**54**)



(**55**)



(**56**)



R

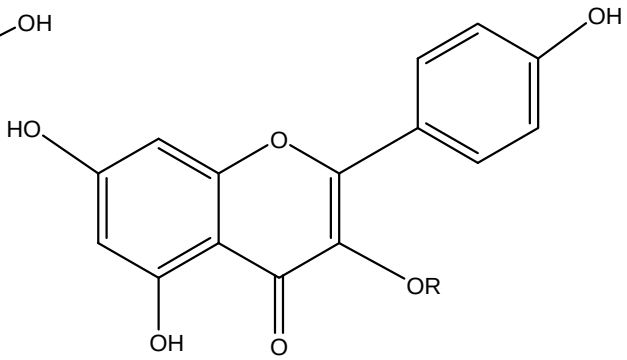
(**57**) H

(**60**) ara

(**61**) glu

(**62**) gal

(**63**) rham-(1→2)-ara

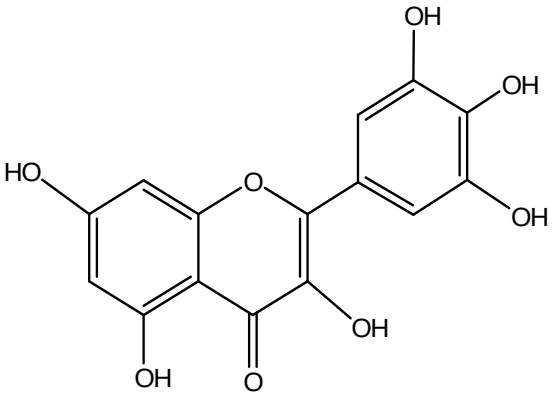


R

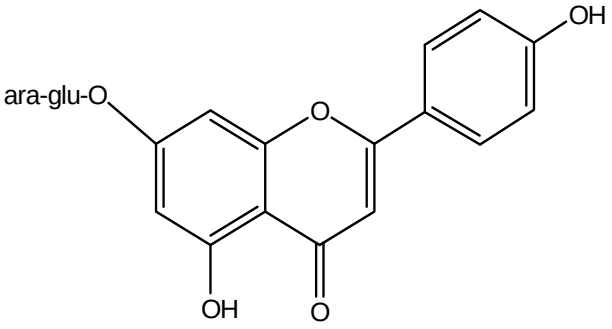
(**58**) H

(**64**) rham-(1→2)-ara

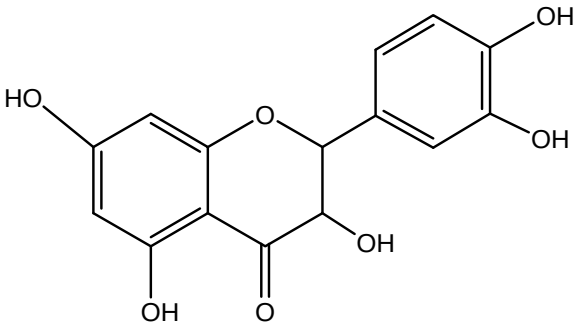
รูปที่ 9 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*



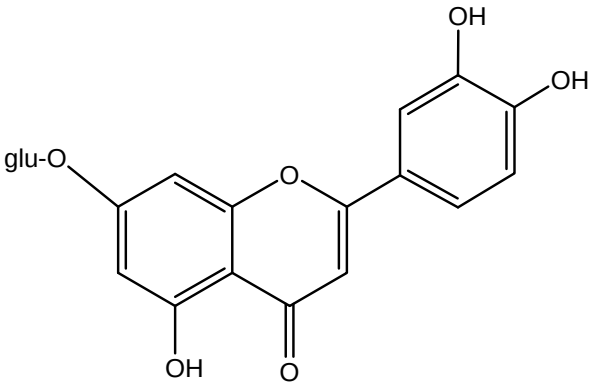
(**59**)



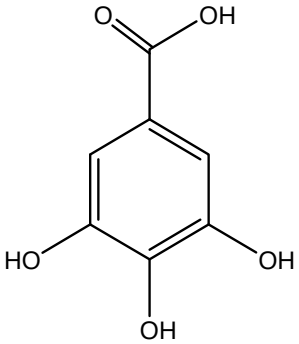
(**65**)



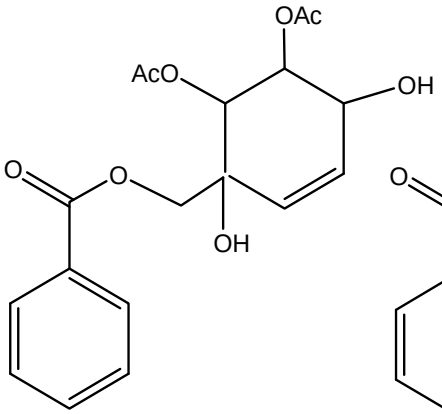
(**66**)



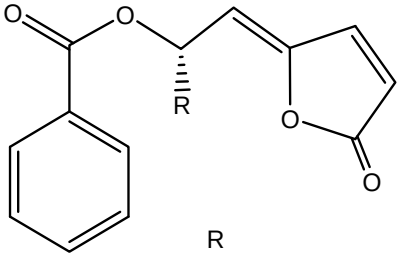
(**67**)



(**68**)



(**69**)

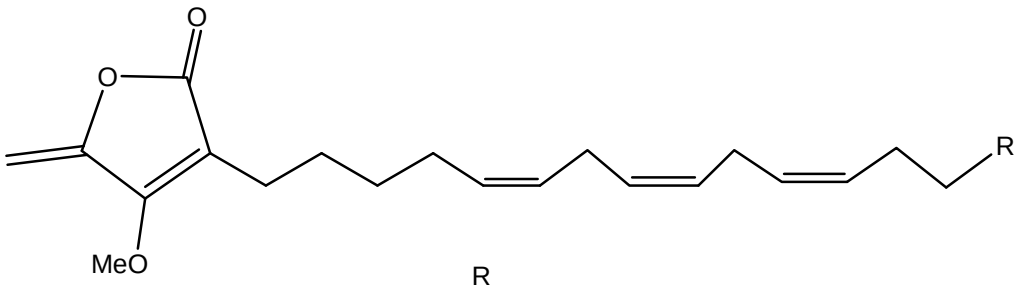


R

(**70**) OH

(**71**) OAc

รูปที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*

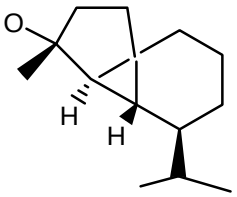


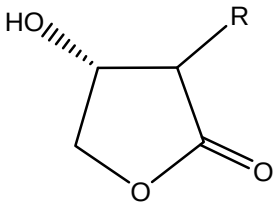
R

(**72**) H

(**73**) OH

(**74**)

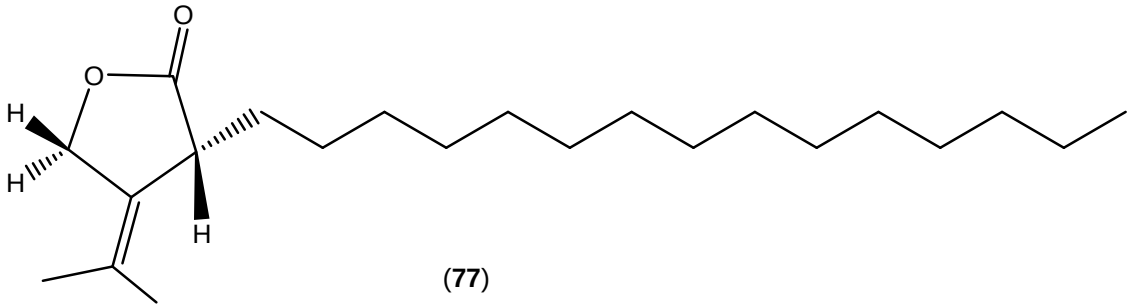




R

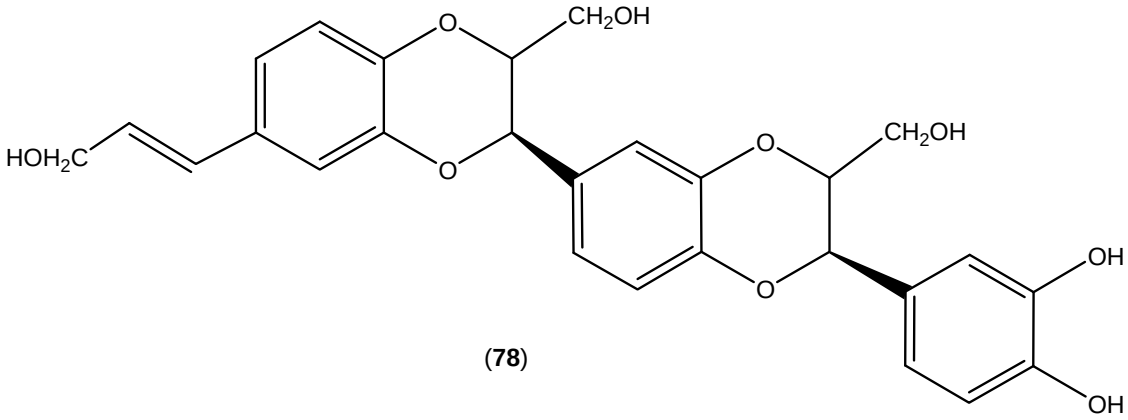
(**75**) CH_2

(**76**) β-CH_3

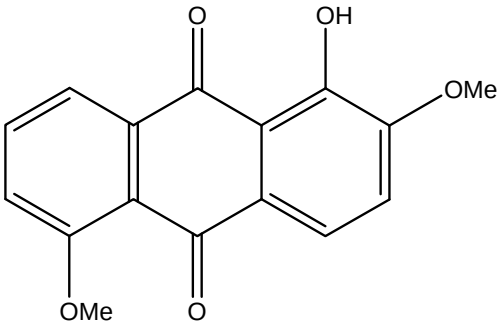


(**77**)

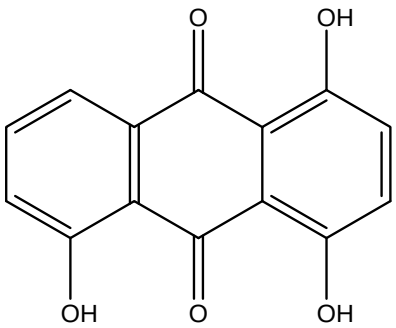
รูปที่ 11 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*



(**78**)



(**79**)



(**80**)

รูปที่ 12 องค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Artabotrys*

บทที่ 3
วิธีการศึกษา

3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

เก็บพืชตัวอย่างใน อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี นำมาตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์โดยเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้แห้งในหอพรรณไม้ กรมสัตว์ป่าและพรรณพืช

3.2 เทคนิคทั่วไป

3.2.1 Analytical Thin-Layer Chromatography (TLC)

3.2.1.1 Normal phase Thin-Layer Chromatography

Technique : One dimension, ascending

Adsorbent : Silica gel 60 F_{254} (E. Merck) precoated plate (Aluminium sheet)

Layer thickness : 0.2 mm

Distance : 5 cm

Temperature : room temperature (25-35^{O}C)

Detection : 1. Ultraviolet light at 254 and 365 nm

2. Anisaldehyde reagent

3.2.1.2 Normal phase Thin-Layer Chromatography

Technique : One dimension, ascending

Adsorbent : Silica gel 60 F_{254} (E. Merck) precoated plate (Glass plate)

Layer thickness : 0.25 mm

Distance : 5 cm

Temperature : room temperature (25-35^{O}C)

Detection : 1. Ultraviolet light at 254 and 365 nm

2. Anisaldehyde reagent

3.2.1.3 Reverse phase Thin-Layer Chromatography

Technique : One dimension, ascending

Adsorbent : RP_{18} F_{254S} (E. Merck) precoated plate (Glass plate)

Layer thickness : 0.25 mm

Distance : 5 cm

Temperature : room temperature (25-35^{O}C)

Detection : Ultraviolet light at 254 and 365 nm

3.2.2 Column Chromatography

3.2.2.1 Column Chromatography

Adsorbent: Silica gel 60 (70-230 mesh); particle size 0.063-0.200 mm (E. Merck)

Sample loading : ละลายตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วยตัวทำละลาย จากนั้นนำใส่ column

Detection : นำส่วนสกัดที่แยกได้ (Fractions) ตรวจสอบด้วย TLC สังเกตผลด้วยการส่องUV light จากนั้นพ่นด้วย anisaldehyde reagent

3.2.2.2 Gel Filtration Chromatography

Gel filter : Sephadex LH 20 (Pharmacia)

Packing method : แช่ Sephadex LH 20 ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เทลงใน column

Sample loading : ละลายตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วยตัวทำละลาย จากนั้นนำใส่ column

Detection : นำส่วนสกัดที่แยกได้ (Fractions) ตรวจสอบด้วย TLC สังเกตผลด้วยการส่องUV light จากนั้นพ่นด้วย anisaldehyde reagent

3.2.3 Spectroscopy

3.2.3.1 Mass Spectra

Fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS) และ Electron impact mass spectra (EIMS) วัดด้วยเครื่องมือ Polaris Q mass spectrometer (USA)

3.2.3.2 Proton and Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance (^{1}H and ^{13}C-NMR) Spectra

^{1}H NMR (500 MHz) และ ^{13}C NMR (125 MHz) spectra วัดด้วยเครื่องมือ Bruker 500 spectrometer (USA)

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

L-DOPA, Kojic acid (Acros Organics, USA), Methanol A.R.grade (Carlo Erba, Italy), Mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich, USA), L-ascorbic acid (Carlo Erba, Italy)

3.3 วิธีเตรียมสารสกัดจากพืช

นำส่วนใบของกระดังงาจีน 1.2 kg อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45^{O}C จากนั้นย่อยให้มีขนาดที่เหมาะสม ส่วนใบกำจัดส่วนไขออกด้วยตัวทำละลาย hexane จากนั้นหมักต่อด้วย methanol ครั้งละ 2 L เก็บสารสกัดที่ได้ไประเหยให้แห้งโดยใช้ เครื่องมือ rotary evaporator (Switzerland) ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

ชั่งสารสกัดหยาบแล้วละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 1 mg/ml เติมสารที่ต้องการทดสอบ 20 µl ลงใน 96-well plate จากนั้นใส่สารละลาย DPPH 180 µl เก็บไว้เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 570 nm โดยใช้ เครื่องมือ microplate reader คำนวณ % การต้านอนุมูลอิสระ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) โดยมี L-ascorbic acid เป็น positive control

3.4.2 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ชั่งสารสกัดหยาบหรือส่วนสกัด นำมาละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 1 mg/ml เติม L-DOPA 20 µl ลงใน 96-well plate ไปเปตสารที่ต้องการทดสอบ 20 µl เติมสารละลาย tyrosinase 20 µl บ่มที่อุณหภูมิ 32$\pm$2 ^{o}C นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 490 nm โดยใช้ microplate reader คำนวณ % การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) โดยใช้ Kojic acid เป็น positive control

3.5 การแยกสารบริสุทธิ์และการศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์จากกระดังงาจีน

นำสารสกัดหยาบของพืชมาทำการแยกจนได้สารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคทางโครมาโตกราฟีต่างๆ จากนั้นศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ และพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่ออกฤทธิ์ด้วยเทคนิคทางสเปคโทรเมทรี

3.5.1 การแยกสารสกัดชั้น Methanol จากใบ

นำสารสกัดชั้น methanol 30 g มาแยกให้เป็นส่วนสกัดย่อยด้วยเทคนิค adsorption column chromatography โดยใช้ silica gel เป็น stationary phase เริ่มต้นการชะสารด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate จากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นของตัวทำละลาย ดังนี้

Ethyl acetate 100

Ethyl acetate:Methanol 95:5

Ethyl acetate:Methanol 90:10

Ethyl acetate:Methanol 85:15

Ethyl acetate:Methanol 80:20

Ethyl acetate:Methanol 75:25

Ethyl acetate:Methanol 70:30

Ethyl acetate:Methanol 65:35

Ethyl acetate:Methanol 60:40

Ethyl acetate:Methanol 50:50

Ethyl acetate:Methanol 40:60

Ethyl acetate:Methanol 20:80

Ethyl acetate:Methanol 10:90

Methanol 100%

เก็บส่วนสกัดที่ถูกชะออกมาครั้งละ 250 ml เปรียบเทียบแต่ละส่วนสกัดด้วย TLC จากนั้นรวมส่วนสกัดที่มีรูปแบบ TLC (TLC patterns) ที่เหมือนกันไว้ด้วยกัน ดังนั้นจะได้ส่วนสกัดจากลำต้นทั้งหมด 7 ส่วนสกัด

3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของส่วนสกัดย่อย

นำส่วนสกัดย่อยทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase และทำการแยกต่อไปจนได้สารบริสุทธิ์

3.5.3 การแยกสารบริสุทธิ์ AH-1, AH-2, AH-3

3.5.2.1 การแยกสารจากส่วนสกัด A5

นำส่วนสกัดย่อย A5 (0.8 g) มาแยกสารบริสุทธิ์ด้วย column chromatography โดยแยกด้วย gel filtration column chromatography โดยใช้ sephadex LH 20 เป็น stationary phase ส่วน mobile phase ใช้ methanol รวมส่วนสกัดย่อยที่เหมือนกันโดย spot ส่วนสกัดย่อยต่างๆ บน TLC สังเกตผลจากการดูดกลืนแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 254 nm จะได้ส่วนสกัดย่อย 5 fractions นำส่วนสกัด A-53 (0.07 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography โดยใช้ C-18 reverse phase silica gel เป็น stationary phase และใช้ 40% water ใน methanol เป็น mobile phase จะได้สารประกอบ AH-1 (4 mg) และส่วนสกัด A-54 (0.05 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography โดยใช้ C-18 reverse phase silica gel เป็น stationary phase และใช้ 40% water ใน methanol เป็น mobile phase สารประกอบ AH-2 (4 mg)

3.5.2.2 การแยกสารจากส่วนสกัด A6

นำส่วนสกัดย่อยที่ A6 (1.0 g) มาแยกด้วย มาแยกสารบริสุทธ์ด้วย column chromatography โดยแยกด้วย gel filtration column chromatography โดยใช้ sephadex LH 20 เป็น stationary phase ส่วน mobile phase ใช้ methanol รวมส่วนสกัดย่อยที่เหมือนกันโดย spot ส่วนสกัดย่อยต่างๆ บน TLC สังเกตผลจากการดูดกลืนแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 254 nm จะได้ส่วนสกัดย่อย 4 fractions นำส่วนสกัด A-71 (0.17 g) มาแยกต่อด้วย column chromatography โดยใช้ C-18 reverse phase silica gel เป็น stationary phase และใช้ 40% water ใน methanol เป็น mobile phase จะได้สารประกอบ AH-3 (10 mg)

3.6 การหาค่า IC_{50}ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารบริสุทธิ์

สำหรับการหาค่า IC_{50} ของสารบริสุทธิ์ให้เตรียมสารความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นเจือจางต่ออีก 4-5 ความเข้มข้น ทำการทดสอบเช่นเดียวกับสารสกัด หาค่า IC_{50} ของสารด้วยโปรแกรม GraphPad (Prism, USA

บทที่ 4
ผลและการอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดใบโดยวิธีหมัก (Maceration)

สารสกัดหยาบชั้น methanol จากใบของกระดังงาจีนมีน้ำหนักหลังจากระเหยให้แห้ง 45.1 g

4.2 ผลการแยกสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดชั้น Methanol จากใบจำนวน 30 g มาแยกให้เป็นส่วนสกัดย่อยด้วยเทคนิค column chromatography ด้วย silica gel และใช้ตัวทำละลายผสม ethyl acetate : methanol (100:0-0:10) เป็นตัวชะสารจากนั้น รวมสารสกัดย่อยที่มีลักษณะเหมือนกันด้วย TLC จะได้ส่วนสกัดย่อย 7 ส่วนสกัดย่อย (fraction) น้ำหนักสารที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตาราง 1 น้ำหนักส่วนสกัดย่อยของสารสกัดหยาบชั้น methanol ที่แยกด้วย column chromatography

Fraction	น้ำหนักสารที่ได้ (g)
A-1	9.52
A-2	7.25
A-3	2.87
A-4	0.98
A-5	0.82
A-6	1.38
A-7	2.13

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบ

เมื่อนำส่วนสกัดย่อย 7 ส่วน ของใบกระดังงาจีนที่แยกได้มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส พบว่าที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ส่วนสกัดย่อย A5 แสดง % ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 21.48$\pm$8.89 และมี % ยับยั้ง tyrosinase 40.51$\pm$4.81 ขณะที่ส่วนสกัดย่อย A6 แสดง % ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 40.54$\pm$1.18 และมี % ยับยั้ง tyrosinase 43.60$\pm$7.49 ผลการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยทั้งหมดแสดงในตาราง 2

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ยับยั้ง Tyrosinase ของส่วนสกัดย่อยจากกระดังงาจีน

ส่วนสกัดย่อย	% DPPH scavenging activity (mean±S.D.)	% Tyrosinase inhibitory activity (mean±S.D.)
A1	19.98±2.64	10.66±8.58
A2	25.80±1.92	22.09±3.05
A3	30.01±2.54	19.48±0.54
A4	31.89±0.36	19.66±4.41
A5	21.48±8.89	40.51±4.81
A6	40.54±1.18	43.61±7.49
A7	26.03±1.11	13.03±12.41
L-ascorbic acid	72.06±1.24	-
Kojic acid	-	76.14±1.30

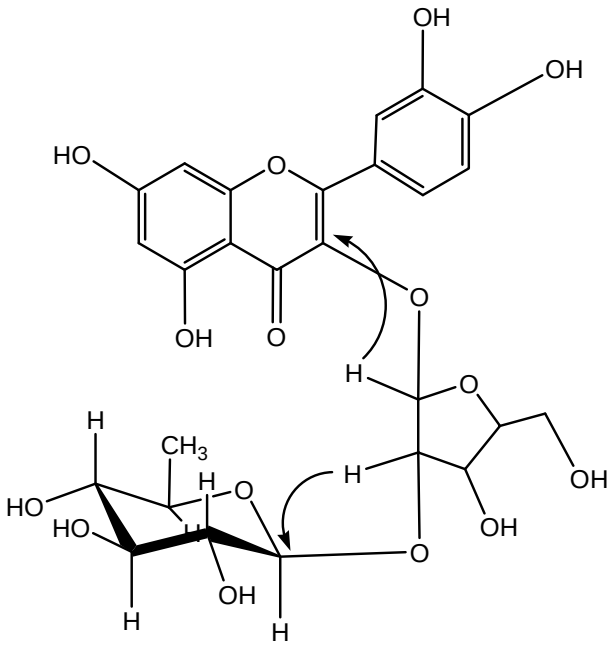
4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารบริสุทธิ์ที่แยกได้

นำส่วนสกัด A-5 และ A-6 จากใบกระดังงาจีนที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ มาแยกสารจากด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีต่างๆซึ่งได้สารบริสุทธิ์ทั้งหมด 3 ชนิด จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์สารเหล่านี้ด้วย เทคนิคทางสเปคโทรเมทรีได้แก่แมสสเปคโทรมิเตอร์ (Mass spectrometr), นิวเคลียร์แมกเนติคเรโซแนนซ์สเปคโทรมิเตอร์แบบ 1 มิติและ 2 มิติ (1D และ 2D NMR spectrometer)

4.4.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ AH-1

สารประกอบ AH-1 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ข้อมูล FAB-MS แสดง $[M+H]^+$ ที่ *m/z* 581 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{26}H_{28}O_{15}$ จากข้อมูลของ ^{1}H NMR แสดง meta coupling doublet protons ระหว่าง H-6 และ H-8 ที่ δ 6.19 และ 6.36 ppm (*J*=1.0 Hz, each) ส่วน ABX coupling type protons ที่ δ 6.89 (*J*= 8.4 Hz), 7.48 (*J*= 8.4, 1.6 Hz) และ 7.84 (*J*= 1.6 Hz) ppm ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้ได้แก่ H-5′, H-6′ และ H-2′ สูตรโครงสร้างนี้เป็น quercetin เป็นส่วนของ aglycone ค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 5.66 (H-1″), 4.42 (H-2″), 3.40 (H-3″), 3.88 (H-4″), 3.48 (H-5″) ppm แสดงถึงการมี arabinoseในสูตรโครงสร้าง และจาก ค่าcoupling constant ระหว่าง H-1″ และ H-2″ (*J*=1.0 Hz) แสดงให้เห็นถึง α-configuration ของ aabinofuranoside ส่วนของน้ำตาลอีก 1 โมเลกุลเมื่อพิจารณาค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 4.94 (H-1‴), 3.79 (H-2‴), 3.59 (H-3‴), 3.37 (H-4‴), 3.66 (H-5‴), 1.20

(CH_3-6‴) ppm แสดงถึงการมี rhamnoseในสูตรโครงสร้าง จาก ค่าcoupling constant ระหว่าง H-1″ และ H-2″ (*J*=1.6 Hz) แสดงให้เห็นถึง α-configuration ของ rhamnopyranoside จากการศึกษา HMBC spectrum ยืนยันตำแหน่งที่น้ำตาล arabinofuranose เกาะที่ตำแหน่ง C-3 ของ quercetin โดยสังเกตจาก correlation ระหว่าง H-1″ (δ_H 5.66 ppm) กับ C-3 (δ_C 134.8 ppm) ส่วนตำแหน่งที่ 1 ของน้ำตาล rhamnopyranose เกาะที่ตำแหน่ง 2 ของ arabinofuranose โดยสังเกตจาก correlation ระหว่าง H-2″ (δ_H 4.42 ppm) กับ C-1‴ (δ_C 101.3 ppm) ตำแหน่ง carbons และ protons ที่เหลือทั้งหมดยืนยันด้วย HSQC และ HMBC spectra ดังนั้นสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ AH-1 ได้ว่าเป็นสาร quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinofuranoside (**63**) (Li et al, 1997)



(**63**)

เอกลักษณ์ทางสเปคโทรเมทรีของสารประกอบ AH-1

FABMS: *m/z* (%) 581 ($[M+H]^+$, 1), 324 (33), 114 (100)

^{1}H NMR (500 MHz, methanol-d_4): แสดงในตารางที่ 3

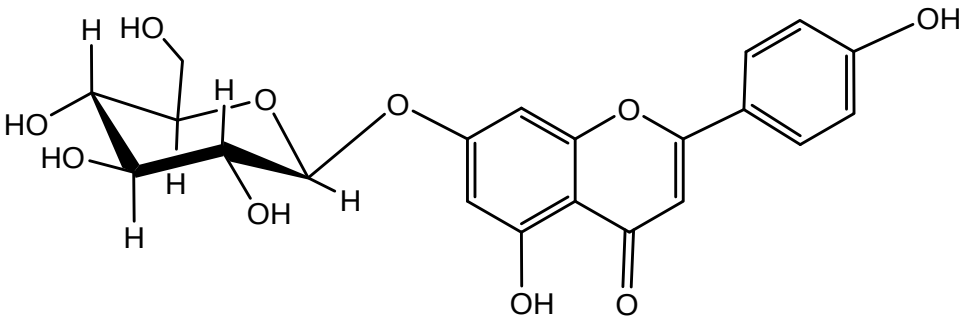
^{13}C NMR (125 MHz, methanol-d_4): แสดงในตารางที่ 3

ตาราง 3 The ^{1}H and ^{13}C NMR data of compound AH-1 in methanol–d_4

Position	**^{1}H δ (ppm), *J* (Hz)**	**^{13}C δ (ppm)**
2		149.9
3		134.8
4		179.7
5		163.0
6	6.19 (1H, *d*, 1.0)	100.1
7		166.9
8	6.36 (1H, *d*, 1.0)	94.9
9		158.6
10		107.7
1′		123.0
2′	7.84 (1H, *d*, 1.6)	117.1
3′		146.4
4′		158.9
5′	6.89 (1H, *d*, 8.4)	116.5
6′	7.48 (1H, *dd*, 8.4, 1.6)	122.9
1″	5.66 (1H, *d*, 1.0)	105.3
2″	4.42 (1H, *dd*, 1.0, 2.75)	88.4
3″	3.40 (1H, *dd*, 2.75, 4.34)	77.2
4″	3.88 (1H, *dd*, 4.34, 5.35)	87.7
CH_2-5″	3.48 (1H, *dd*, 4.34, 8.1)	62.4
1‴	4.94 (1H, *d*, 1.68)	101.3
2‴	3.79 (1H, *dd*, 1.68, 2.0)	72.3
3‴	3.59 (1H, *dd*, 2.0, 9.47)	72.1
4‴	3.37 (1H, *t*, 9.47)	73.9
5‴	3.66 (1H, *dd*, 9.47, 6.1)	70.4
CH_3-6‴	1.20 (3H, *d*, 6.1)	17.8

4.4.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ AH-2

สารประกอบ AH-2 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ข้อมูล EIMS แสดง $[M]^+$ ที่ *m/z* 432 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{21}H_{20}O_{10}$ จากข้อมูลของ ^{1}H NMR แสดง meta coupling doublet protons ระหว่าง H-6 และ H-8 ที่ δ 6.81 และ 6.49 ppm (*J*=2.1 Hz, each) ส่วน ABA′B′ coupling type protons ที่ δ 7.87 (*J*= 8.8 Hz) และ 6.91 (*J*= 8.8 Hz) ppm ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้ได้แก่ H-2′ , H-6′ และ H-3′, H-5′ และมี H-3 เป็น singlet proton ที่ δ 6.65 ppm สูตรโครงสร้างนี้เป็นส่วนของ aglycone คือ apigenin ส่วนของน้ำตาลแสดงค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 5.05 (H-1″), 3.50 (H-2″), 3.48 (H-3″), 3.38 (H-4″), 3.52 (H-5″), 3.69 และ 3.91 (H-6″) ppm แสดงถึงการมี glucoseในสูตรโครงสร้าง และจาก ค่าcoupling constant ระหว่าง H-1″ และ H-2″ (*J*=7.1 Hz) แสดงให้เห็นถึง β-configuration ของ glucopyranose ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เคยแยกสารชนิดนี้ได้ ดังนั้นสารประกอบ AH-2 จึงเป็นสาร apigenin 7-*O*-β-D-glucopyranoside (**81**) (Moussaoui et al, 2010), (Markham et al, 1978)



(**81**)

เอกลักษณ์ทางสเปคโทรเมทรีของสารประกอบ AH-2

EIMS: *m/z* (%) 432 ($[M]^+$, 5), 132 (100), 114 (65)

^{1}H NMR (500 MHz, methanol-d_4): แสดงในตาราง 4

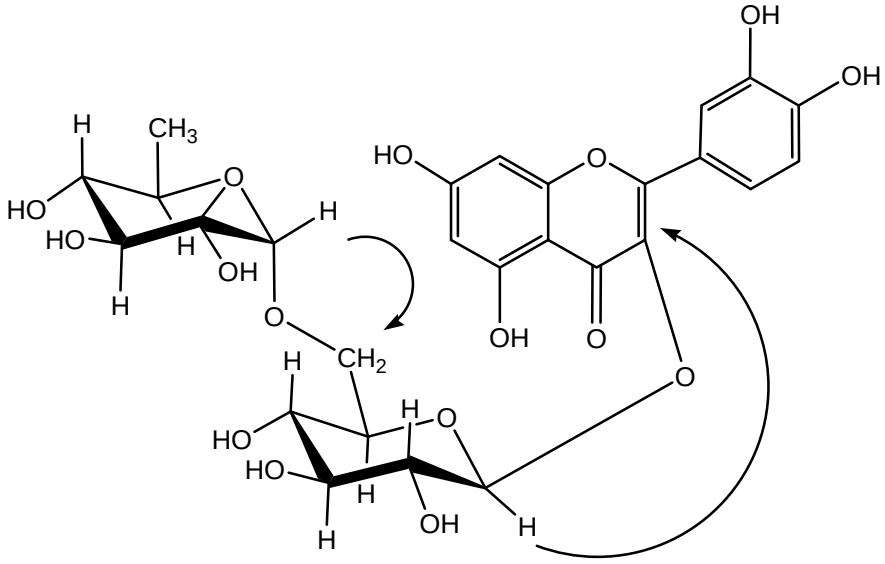
^{13}C NMR (125 MHz, methanol-d_4): แสดงในตาราง 4

ตาราง 4 The ^{1}H and ^{13}C NMR data of compound AH-2 in methanol–d_4

Position	**^{1}H δ (ppm), *J* (Hz)**	**^{13}C δ (ppm)**
2		166.7
3	6.65 (1H, *s*)	149.8
4		184.0
5		158.9
6	6.81 (1H, *d*, 2.1)	98.7
7		164.8
8	6.49 (1H, *d*, 2.1)	93.5
9		162.9
10		103.9
1′		123.0
2′	7.87 (1H, *d*, 8.8)	129.6
3′	6.91 (1H, *d*, 8.8)	117.0
4′		162.9
5′	6. 91 (1H, *d*, 8.8)	117.0
6′	7.87 (1H, *d*, 8.8)	129.6
1″	5.05 (1H, *d*, 7.1)	101.6
2″	3.50 (1H, *dd*, 9.1, 5.1)	77.8
3″	3.48 (1H, *dd*, 9.1, 8.4)	74.7
4″	3.38 (1H, *dd*, 8.4, 9.5)	71.2
5″	3.52 (1H, *m*)	78.3
6″α	3.91 (1H, *dd*, 2.09, 12.22)	62.4
6″β	3.69 (1H, *dd*, 5.8, 12.22)	

4.4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ AH-3

สารประกอบ AH-3 ที่แยกได้จะมีลักษณะเป็นของแข็งสีเหลือง ข้อมูล FAB-MS แสดง $[M+H]^+$ ที่ *m/z* 610 ตรงกับสูตรโมเลกุล $C_{27}H_{30}O_{16}$ จากข้อมูลของ ^{1}H NMR แสดงให้เห็นส่วน ABX coupling type protons ของ H-2′, H-5′ และH-6′ ที่ δ 7.65 (*J*= 2.1 Hz), 6.86 (*J*= 8.55 Hz) และ7.61 (*J*= 8.55, 2.1 Hz) ppm ตามลำดับ ส่วน H-6 และ H-8 ที่ δ 6.20 และ 6.39 ppm และมีค่า coupling constant (*J*) เท่ากับ 1.9 Hz เมื่อนำข้อมูลมาประกอบกันพบว่าคล้ายกับ aglycone ของ AH-1 นั่นคือมี quercetin แต่ส่วนของน้ำตาลแสดงค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 5.08 (H-1″), 3.30 (H-2″), 3.45 (H-3″), 3.25 (H-4″), 3.38 (H-5″), 3.36 และ 3.78 (H-6″) ppm แสดงถึงการมี glucoseในสูตรโครงสร้าง และจาก ค่า coupling constant ระหว่าง H-1″ และ H-2″ (*J*=7.6 Hz) แสดงให้เห็นถึง β-configuration ของ glucopyranose ส่วนของน้ำตาลอีก 1 โมเลกุลเมื่อพิจารณาค่า chemical shift ที่บริเวณ δ 4.51 (H-1‴), 3.62 (H-2‴), 3.52 (H-3‴), 3.29 (H-4‴), 3.43 (H-5‴), 1.10 (CH_3-6‴) ppm แสดงถึงการมี rhamnoseในสูตรโครงสร้าง จาก ค่าcoupling constant ระหว่าง H-1″ และ H-2″ (*J*=1.52 Hz) แสดงให้เห็นถึง α-configuration ของ rhamnopyranoside จากการศึกษา HMBC spectrum ยืนยันตำแหน่งที่น้ำตาล glucose เกาะที่ตำแหน่ง C-3 ของ quercetin โดยสังเกตจาก correlation ระหว่าง H-1″ (δ_H 5.08 ppm) กับ C-3 (δ_C 135.6 ppm) ส่วนตำแหน่งที่ 1 ของน้ำตาล rhamnopyranose เกาะที่ตำแหน่ง 6 ของ glucopyranose โดยสังเกตจาก correlation ระหว่าง H-6″ (δ_H 3.36 และ 3.78 ppm) กับ C-1‴ (δ_C 102.4 ppm) ตำแหน่ง carbons และ protons ที่เหลือทั้งหมดยืนยันด้วย HSQC และ HMBC spectra ดังนั้นสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์สารประกอบ AH-3 ได้ว่าเป็นสาร quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (**82**) (Abdullah et al, 2008)



(**82**)

เอกลักษณ์ทางสเปคโทรเมทรีของสารประกอบ AH-3

FABMS: *m/z* (%) 611 ($[M+H]^+$, 1), 324 (35), 132 (70), 114 (100)

^{1}H NMR (500 MHz, methanol-d_4): แสดงในตาราง 5

^{13}C NMR (125 MHz, methanol-d_4): แสดงในตาราง 5

ตาราง 5 The ^{1}H and ^{13}C NMR data of compound AH-3 in methanol–d_4

Position	**^{1}H δ (ppm), *J* (Hz)**	**^{13}C δ (ppm)**
2		149.7
3		135.6
4		179.3
5		162.9
6	6.20 (1H, *d*, 1.9)	99.9
7		166.0
8	6.39 (1H, *d*, 1.9)	94.8
9		158.4
10		105.5
1′		123.1
2′	7.65 (1H, *d*, 2.1)	117.6
3′		145.8
4′		159.3
5′	6.86 (1H, *d*, 8.55)	116.0
6′	7.61 (1H, *dd*, 8.55, 2.1)	123.5
1″	5.08 (1H, *d*, 7.6)	104.7
2″	3.30 (1H, *m*)	77.1
3″	3.45 (1H, *d*, 7.79)	75.7
4″	3.25 (1H, *m*)	71.3
5″	3.38	78.1
6″α 6″β	3.78 ((1H, *dd*, 11.3, 1.37) 3.36 (1H, *d*, 11.3)	68.5

ตาราง 5 The ^{1}H and ^{13}C NMR data of compound AH-3 in methanol–d_4 (ต่อ)

1‴	4.51 (1H, *d*, 1.52)	102.4
2‴	3.62 (1H, *dd*, 1.52, 3.36)	72.0
3‴	3.52 (1H, *dd*, 3.36, 9.62)	72.2
4‴	3.29 (1H, *m*)	73.9
5‴	3.43 (1H, *dd*, 8.4, 6.2)	69.7
CH_3-6‴	1.10 (3H, *d*, 6.2)	17.8

4.5 ผลการทดสอบและการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร AH-1, AH-2, AH-3

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของสาร AH-1, AH-2, AH-3พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ได้ดีที่สุดคือ สารประกอบ AH-2 ผลการทดสอบทั้งหมดแสดงในตารางที่ 7

จากผลการศึกษานี้ พบว่าสารประกอบทั้ง 3 ชนิดเป็นสารกลุ่ม flavonoids โดยที่สารประกอบ AH-1 และ AH-3 มีส่วน aglycone เป็น flavonol แต่สารประกอบ AH-2 ส่วน aglycone เป็น flavone AH-1 และ AH-3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าสารประกอบ AH-2 เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างเคมีกับการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 3 ชนิด พบว่าส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ flavonoids จะอยู่ที่การมี 3′,4′-ortho-dihydroxy ของ ring B ซึ่งจะพบในสารประกอบ AH-1 และ AH-3 แต่สารประกอบ AH-2 มีเพียง 4′-hydroxy บน ring B จึงทำให้สารประกอบมีฤทธิ์ไม่ดีเท่าสารประกอบ AH-1 และ AH-3 ส่วน ring A ไม่ค่อยมีผลต่อการออกฤทธิ์ ดังนั้นการมีน้ำตาลแทนที่อยู่ตำแหน่งที่ 7 จึงไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบ AH-2 (Rice-Evan et al, 1997)

ตาราง 6 ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสาร AH-1, AH-2, AH-3

สารประกอบ	Concentration (mg/ml)	% DPPH scavenging activity (Mean ± SD)	IC_{50} (μM)
AH-1	0.001	2.16 ± 2.75	13.39
	0.01	10.84 ± 3.64	
	0.1	58.50 ± 1.78	
	1.00	96.54 ± 0.88	
AH-2	0.001	0.85 ± 0.00	687.5
	0.01	1.63 ± 0.09	
	0.1	5.40 ± 1.16	
	1.00	35.37 ± 1.05	
AH-3	0.001	53.29 ± 1.07	11.25
	0.01	55.69 ± 1.08	
	0.1	58.49 ± 6.86	
	1.00	96.54 ± 0.88	
Ascorbic acid	0.001	9.46 ± 2.68	17.98
	0.01	10.79 ± 2.73	
	0.1	97.91 ± 0.17	
	1.00	99.27 ± 0.13	

4.6 ผลการทดสอบและการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของสาร AH-1, AH-2, AH-3

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของสาร AH-1, AH-2, AH-3พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ได้ดีที่สุดคือ สารประกอบ AH-2 ผลการทดสอบทั้งหมดแสดงในตารางที่ 7

สมมติฐานของกลไกหนึ่งของการออกฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของ flavonoids เนื่องจากเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อนำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase พบว่าสาร AH-2 ออกฤทธิ์ดีกว่าสาร AH-1 และ AH-3 เล็กน้อย ถึงแม้สารประกอบ AH-1 และ AH-3 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารประกอบ AH-2 อย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการมีจำนวนโมเลกุลของน้ำตาล และตำแหน่งที่แทนที่บน aglycone ที่ต่างกัน โดยที่ AH-1 และ AH-3 จะเป็น 3-*O*-diglycoside ส่วนสารประกอบ AH-2 จะเป็น 7-*O*-glycoside ซึ่งตำแหน่งการแทนที่และจำนวนโมเลกุลน้ำตาลอาจจะส่งผลรบกวนการเข้าจับกับ active site ของ tyrosinase ดังนั้นนอกจากสมมติฐานกลไกการออกฤทธิ์

ยับยั้ง tyrosinase ของ flavonoids ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังอาจจะออกฤทธิ์ผ่านกลไกการอื่นๆ เช่น การเป็น substrate ของ enzyme (No et al. 1999)

ตาราง 7 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของสาร AH-1, AH-2, AH-3

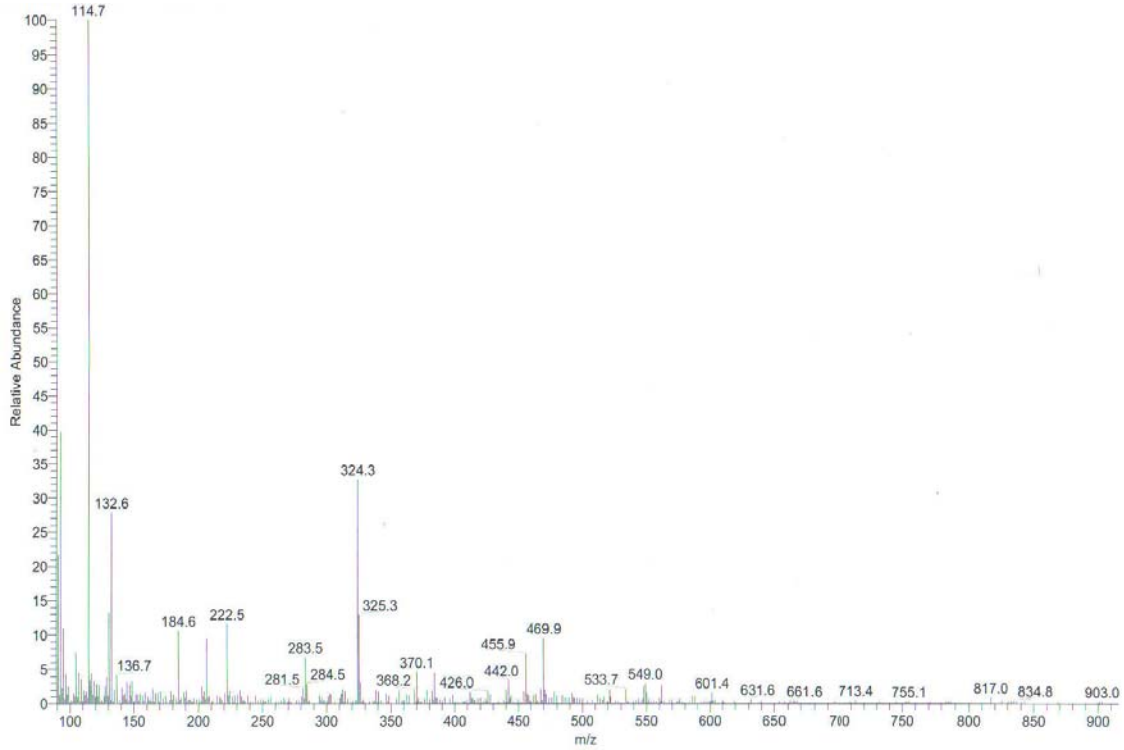
สารประกอบ	Concentration (mg/ml)	% Tyrosinase inhibotory activity (Mean ± SD)	IC_{50} (μM)
AH-1	0.001	3.10 ± 2.28	38.52
	0.01	9.30 ± 4.96	
	0.1	14.49 ± 3.08	
	1.00	41.79 ± 13.18	
AH-2	0.001	5.13 ± 7.41	23.15
	0.01	15.37 ± 3.44	
	0.1	32.02 ± 4.17	
	1.00	43.18 ± 7.23	
AH-3	0.001	8.31 ± 7.93	42.91
	0.01	5.46 ± 2.95	
	0.1	18.37 ± 4.35	
	1.00	40.64 ± 2.96	
Kojic acid	0.0005	42.66 ± 2.05	1.97
	0.005	68.87 ± 4.14	
	0.05	78.51 ± 1.38	
	0.5	90.05 ± 0.8	

บทที่ 5
สรุปผลการศึกษา

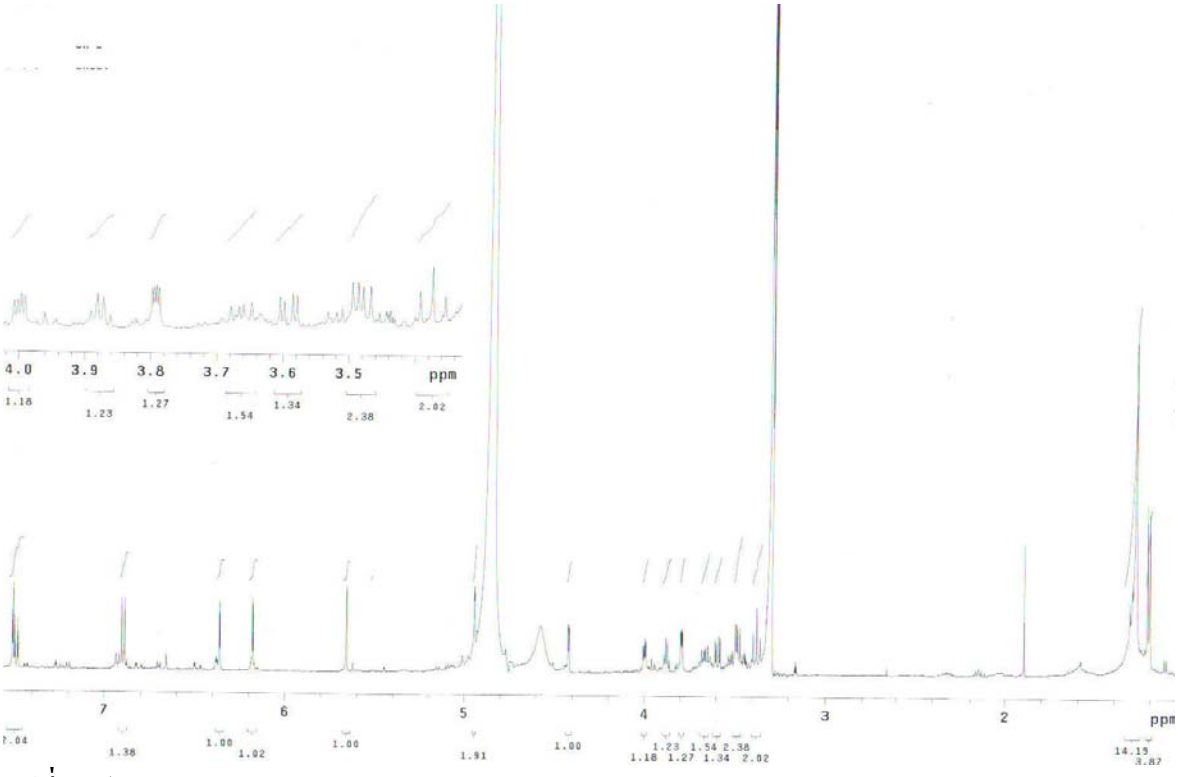
จากการนำใบของกระดังงาจีน *A.hexapetalus* มาทำแยกสารจากนั้นศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยการใช้วิธีการทางสเปคโทรเมตรี และนำสารเหล่านั้นทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส สารที่แยกได้ประกอบด้วยกลุ่มสาร flavonoid ได้แก่ quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinofuranoside, apigenin 7-*O*-β-D-glucopyranoside และ quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารบริสุทธิ์จากกระดังงาจีน พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุดคือ quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside ที่ IC_{50} 11.25μM รองลงมาได้แก่ quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinofuranoside ที่ IC_{50} 13.39 μM ซึ่งสารนี้เป็นสารที่ไม่เคยมีรายงานในพืชชนิดอื่นและยังไม่มีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

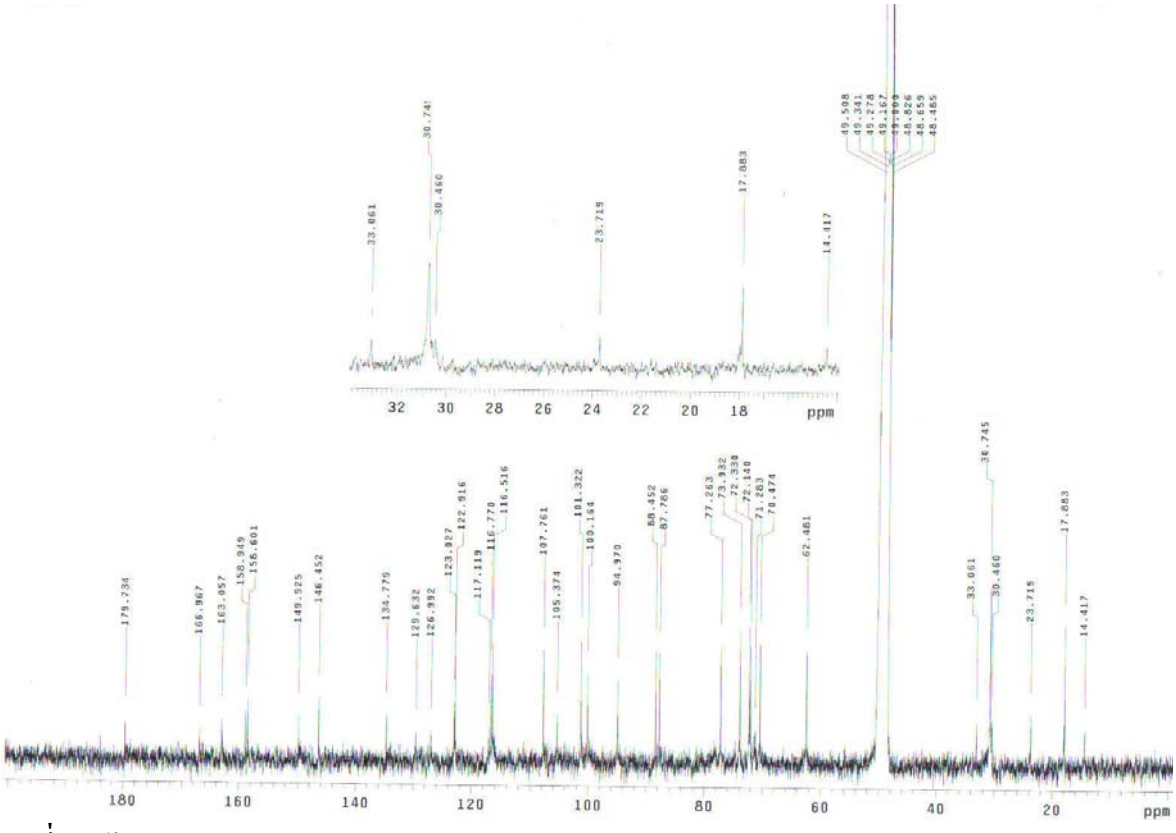
จากการทดสอบฤทธิ์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารบริสุทธิ์จากกระดังงาจีน พบว่าสารที่แสดงฤทธิ์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุดคือ apigenin 7-*O*-β-D-glucopyranoside ที่ IC_{50} 23.15 μM



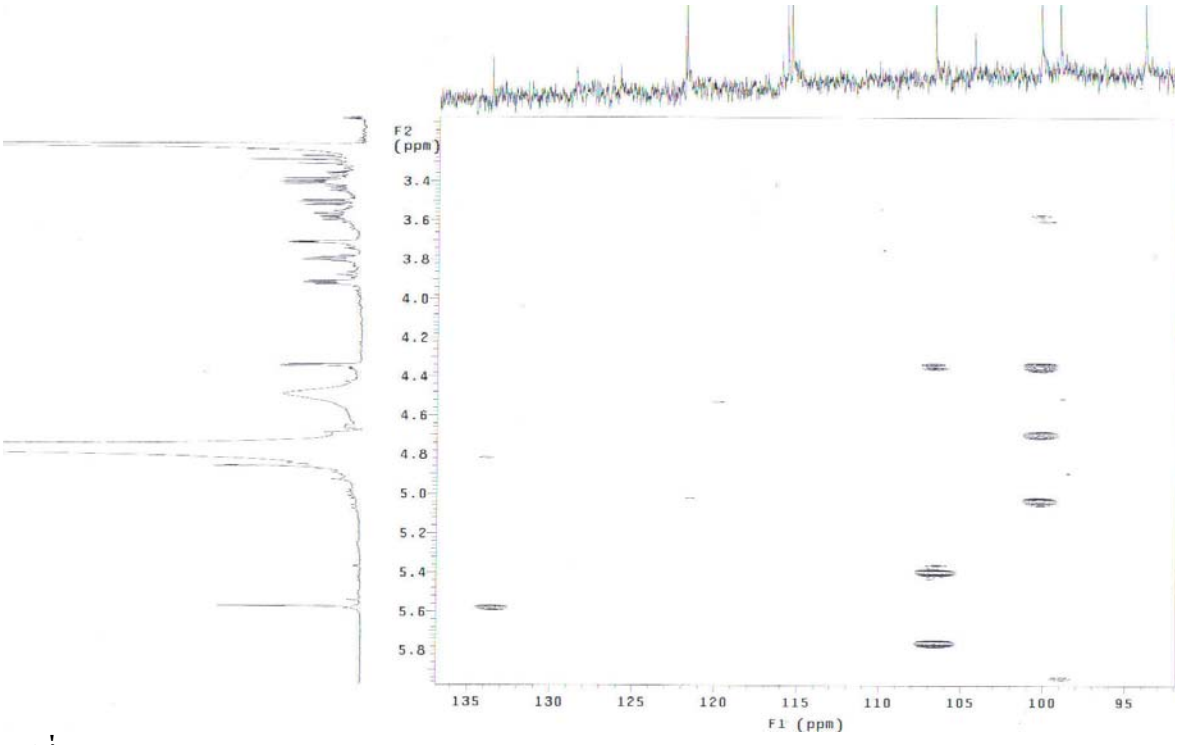
รูปที่ 13 FAB mass spectrum of compound AH-1



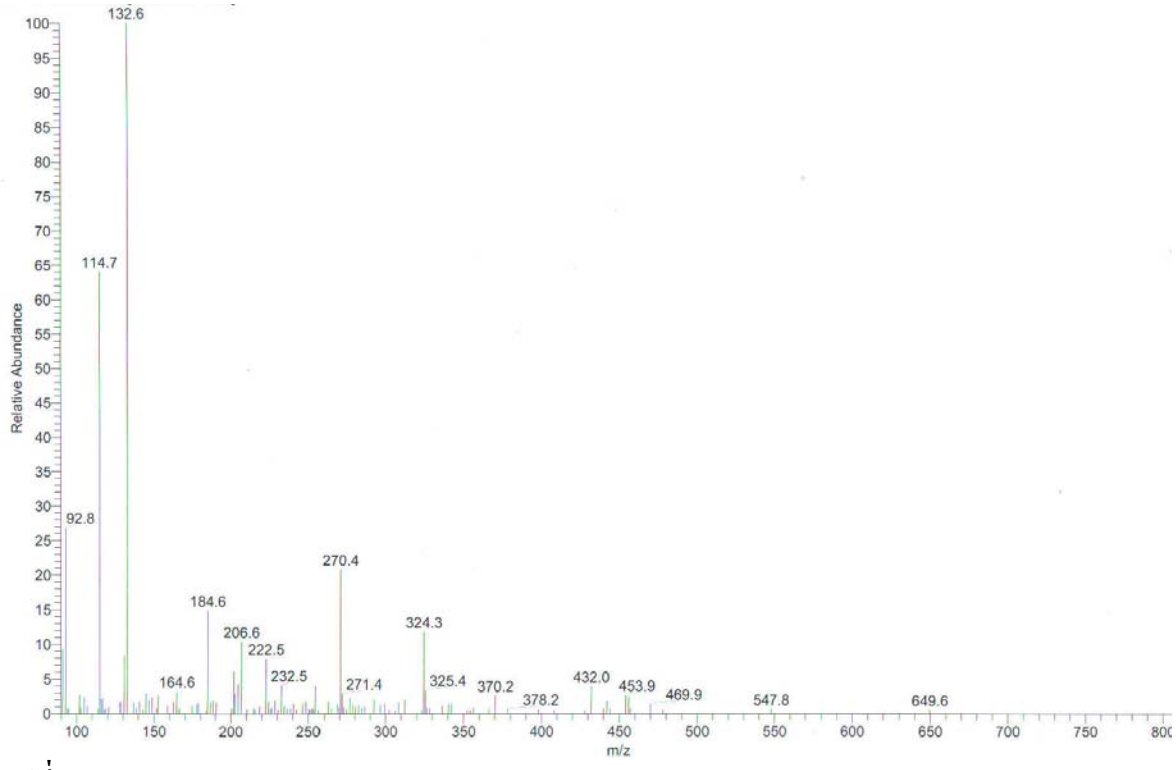
รูปที่ 14 ^{1}H NMR (500 MHz) of compound AH-1 (methanol-d_4)



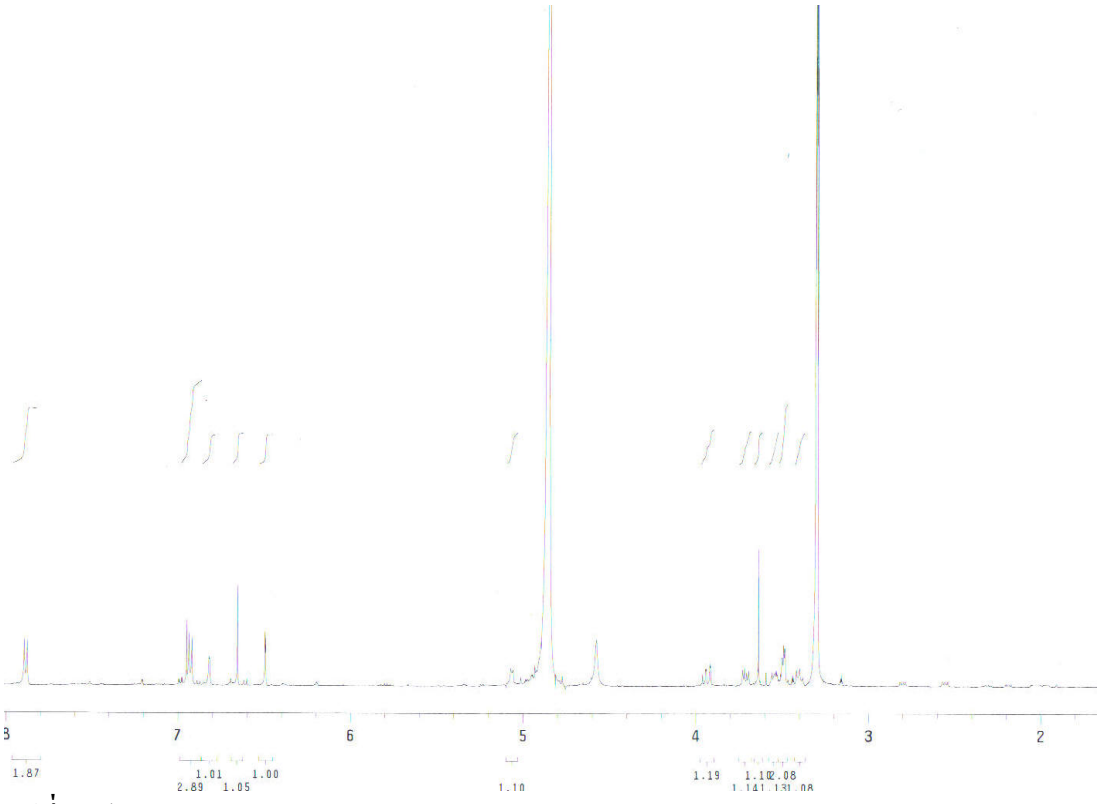
รูปที่ 15 ^{13}C NMR (125 MHz) of compound AH-1 (methanol-d_4)



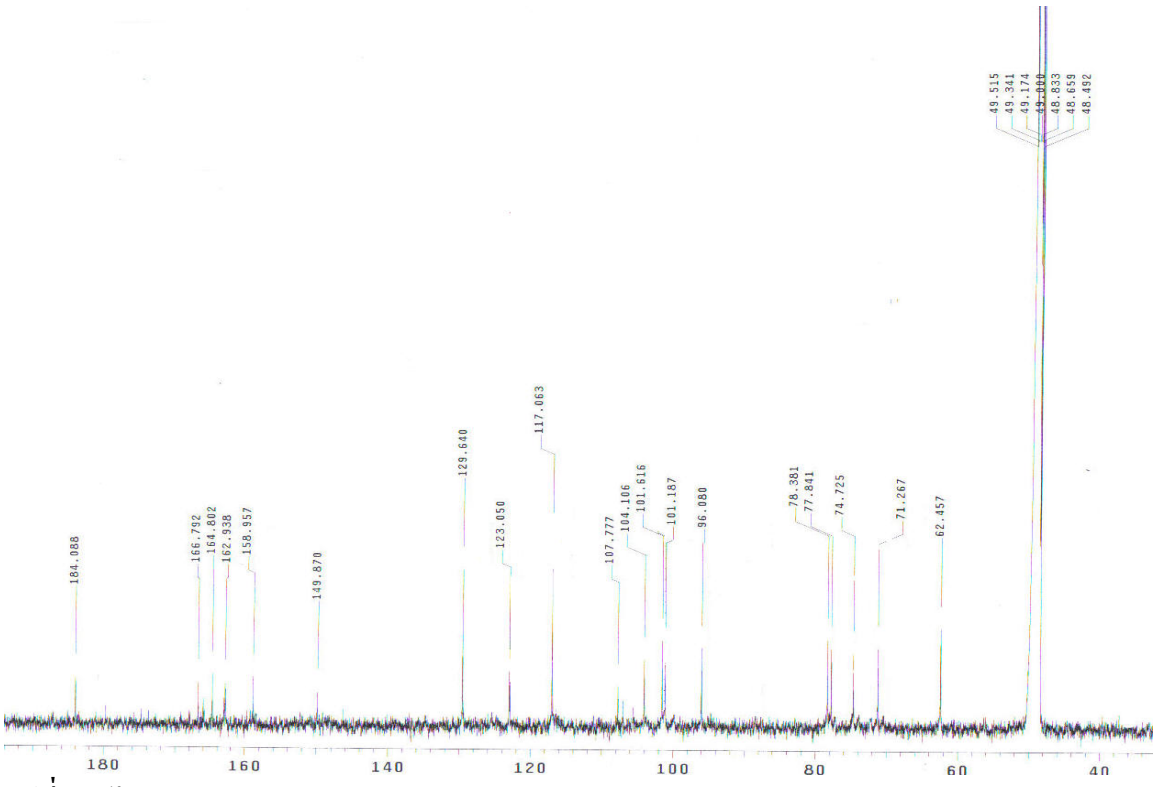
รูปที่ 16 HMBC correlation of compound AH-1



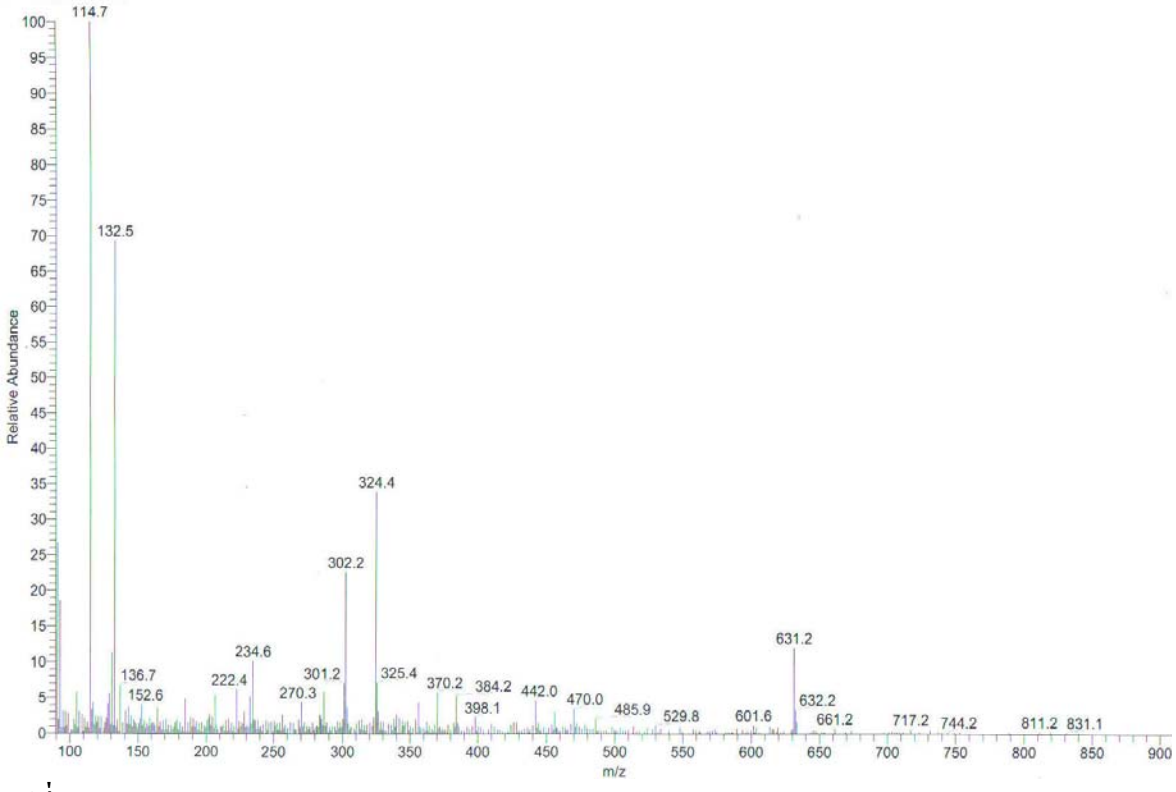
รูปที่ 17 EI mass spectrum of compound AH-2



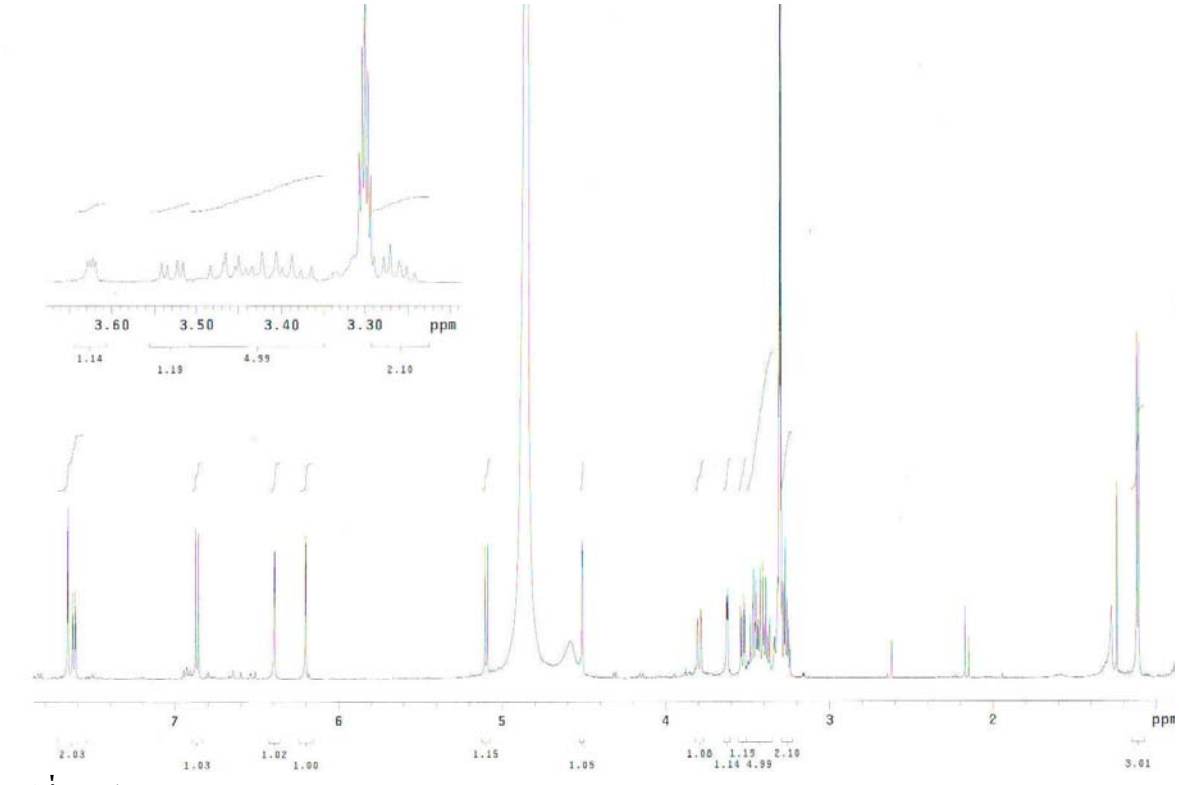
รูปที่ 18 ^{1}H NMR (500 MHz) of compound AH-2 (methanol-d_4)



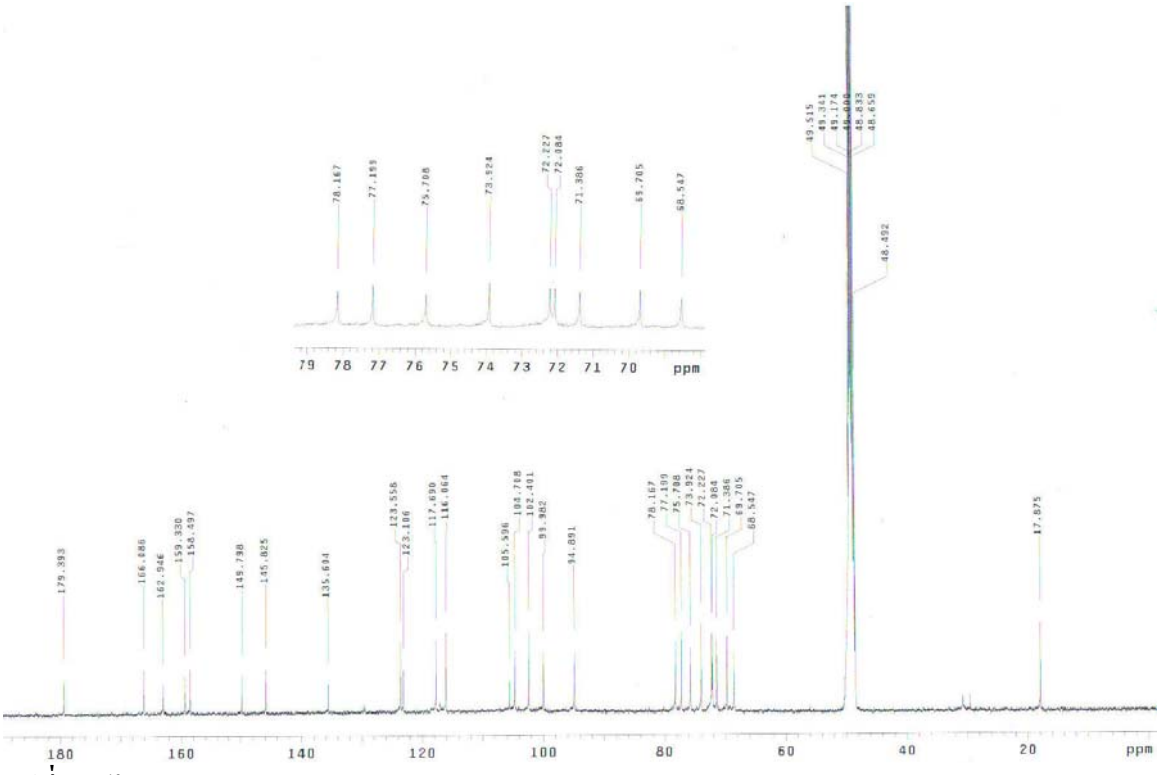
รูปที่ 19 ^{13}C NMR (125 MHz) of compound AH-2 (methanol-d_4)



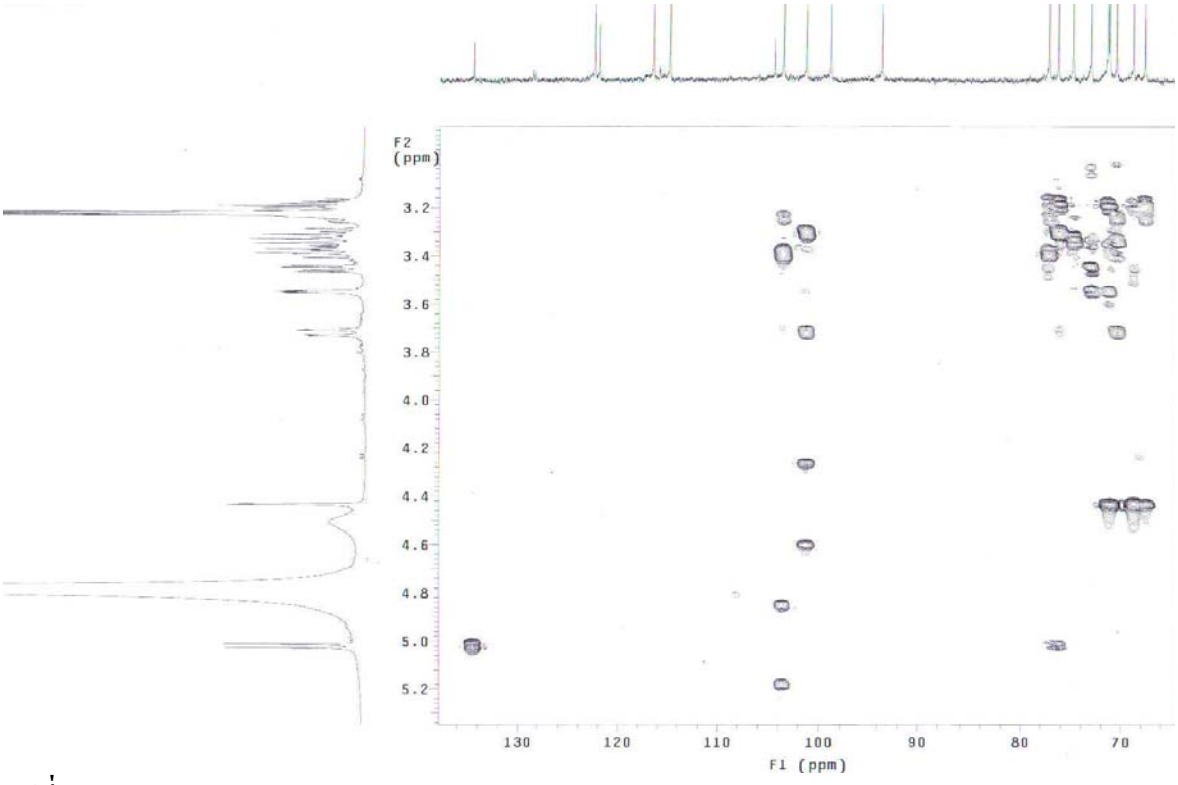
รูปที่ 20 FAB mass spectrum of compound AH-3



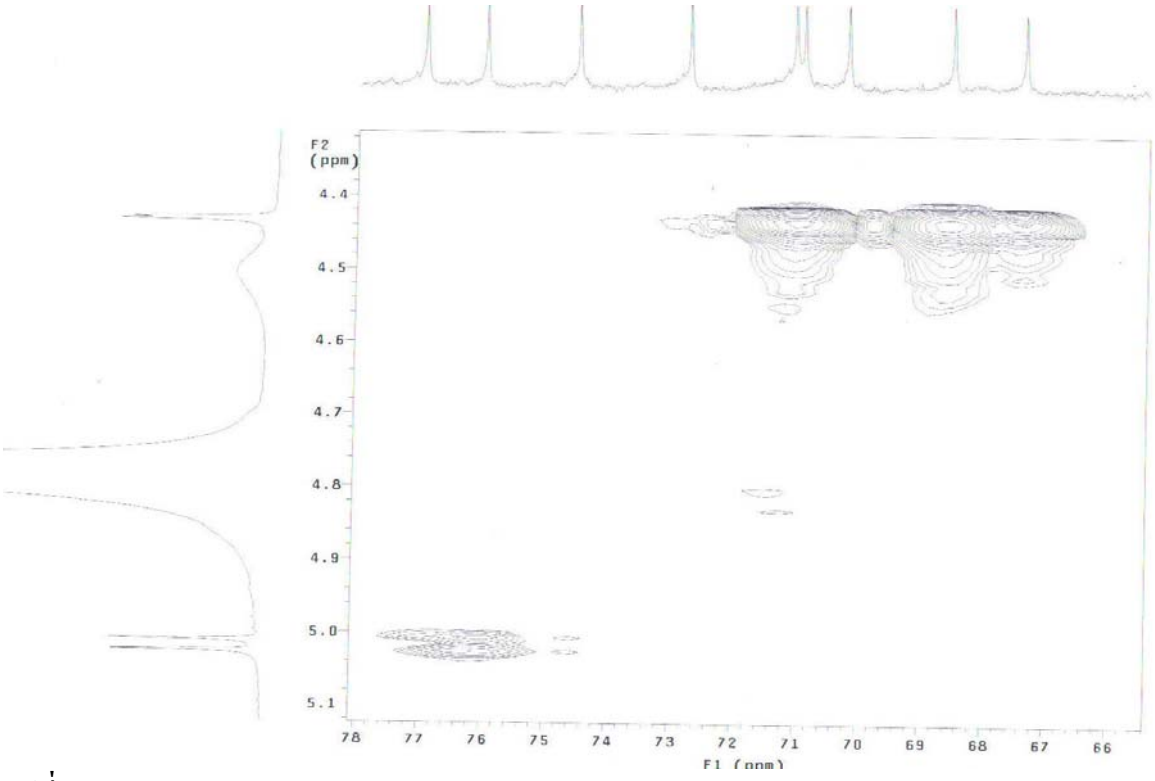
รูปที่ 21 ^{1}H NMR (500 MHz) of compound AH-3 (methanol-d_4)



รูปที่ 22 ^{13}C NMR (125 MHz) of compound AH-3 (methanol-d_4)



รูปที่ 23 HMBC correlation of compound AH-3



รูปที่ 24 HMBC correlation of compound AH-3

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการส่งออก กระทรวงพาณิชย์. เครื่องสำอางจากธรรมชาติและสมุนไพร. 2545. (http://www.depthai.go.th)

ดวงดาว ฉันทศาสตร์. เทคโนโลยีการพัฒนาตำรับเครื่องสำอางและการผลิตขั้นอุตสาหกรรม. กรุงเทพ: บริษัท ประชาชน จำกัด;2540.

บุญชู ศรีตุลารักษ์, วันชัย ดีอเนกนามกูล, กิตติศักดิ์ ลิขิตวิทยาวุฒิ. สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสจากมะหาด. **Thai J Pharm Sci**. 1998; 22:149-55.

ปรียา กุลละวณิชย์และประวิตร พิศาลบุตร. **Dermatology 2000 ตำราผิวหนังในเวชปฏิบัติปัจจุบัน**. กรุงเทพ:บริษัท โฮลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด;2548.

ปวีณา ดวงสุริยเนตร, สุพัตรา นาเมืองรักษ์. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกไม้ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (บทคัดย่อ). **Srinakharinwirot J. Pharm. Sci.** 2005;10:112.

ปิยะ เฉลิ่มกลิ่น. **พรรณไม้วงศ์กระดังงา**. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน;2544:

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. **เครื่องสำอางธรรมชาติ ผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนัง**. กรุงเทพ: โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์; 2547.

วิชิต ลีนุตพงษ์. **แสงแดดและผิวหนัง**. กรุงเทพ:บริษัท แอล.ที.เพรส. จำกัด;2547.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. ผลิตภัณฑ์สมุนไพรปี'48:มูลค่าตลาด 48,000 ล้านบาท 2548. (http://www.kasikornresearch.com/kr/search_result.jsp)

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. ตลาดเครื่องสำอางปี'49:เน้นคุณภาพสร้างความแตกต่างขยายตลาด 2549. (http://www.kasikornresearch.com/kr/search_result.jsp)

โอภา วัชระคุปต์. สารต้านอนุมูลอิสระ. กรุงเทพ: พี. เอส. พริ้นท์;2549.

Abdullah Y, Schneider, Petersen M. Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. **Phytochem. Lett**. 2008;4:199-203.

Bordoloi PK, Bhuyan PD, Boruah P, Bordoloi M, Rao PG. A long chain alkylated α-methylene-γ -butyrolactone from *Artabotrys odoratissimus* fruit. **Phytochem. Lett**. 2009;2: 22-4.

Cave A, Cassels BK, Hocquemiller R, Rasamizafy S, Leboeuf M, Roblot F, Devoust D, Deverre JK, Khan KC, Hadi HA. Artavenustine, a catecholic berberine from *Artabotrys venustus*. **J. Nat. Prod.** 1986;49:602-7.

Coomes MW. **Amino acid metabolism.** In Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. New York: Wiley-Liss Inc.;1997:445-8.

Cortes D, Yolanda TM, D'Ocon M, Pilar LCM, Cave A, Hadi A, Hamid A. Alkaloids of the Annonaceae. Part 94. Norstephalagine and atherospermidine, two smooth muscle-relaxing aporphines from *Artabotrys maingayi*. **J.Nat.Prod**. 1990;53:503-8.

Fleischer TC, Waigh RD, Waterman PG. Pogostrol *O*-methyl ether and artabotrol: two novel sesquiterpenes from the stem bark of *Artrabotrys stenopetalatus*. **J. Nat. Prod.** 1997;60:1054-6.

Giuseppe P. Melanins and Melanogenesis. **Cosmetics & Toiletries**. 1996;11:43-51.

Gupta C, Prasad S, Sahai M, Asai T, Hara N, Fujimoto Yi. Artabotryols A-E, New Lanostane Triterpenes from the Seeds of *Artabotrys odoratissimus*. **Helv. Chim. Acta** 2010;93:1925-32.

Han CR, Zhu GY, Chen GY, Zhang HY, Bi HP, Fang HX. Studies on tha alkaloids from stem of *Arabotrys hainanensis*. **Zhongguo Zhong Tao Za Ahi**. 2005;30:1660-2.

Hassan CM, Shahnaz S, Muhammad I, Gray AI, Waterman PG. Chemistry in the Annonaceae. XXIII. 24-Methylene-lanosta-7,9(11)-dien-3β-ol from *Artabotrys odorotissimus* stem bark. **J. Nat. Prod.** 1987;50:736-62.

Hsieh TJ, Chen CY, Kuo RY, Chang FR, Wu YC. Two new alkaloids from *Artrabotrys uncinatus*. **J. Nat. Prod.** 1999;62:1192-3.

Hsieh TJ, Chang FR, Chia YC, Chen CY, Lin HC, Chiu HF, Wu YC. The alkaloids of *Artabotrys uncinatus*. **J. Nat. Prod.** 2001;64:1157-61.

Iida K. Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officiasle*. **Planta Med**. 1995;61c:425-8.

Imokawa G, Miyagishi M, Yada Y. Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis. **J.Invest. Dermatol.** 1995;101:32-7.

Kim YM, Yun J, Lee CK, Lee H, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. **J. Biol. Chem.** 2002;277:16340-4.

Kubo I, kinst-Hori I. Tyrosinase inhibitors from anise oil. **J. Agric. Food Chem.** 1998;46:1268-71.

Lan YH, Wang HY, Wu CC, Chen SL, Chang CL, Chang FR, Wu YC. New constituents from stems of *Artabotrys uncinatus*. **Chem. Pharm. Bull**. 2007;55:1597-99.

Lee HS. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. **J. Agric. Food Chem.** 2002;50:1400-3.

Markham KR, Terni B, Stanley R, Mabry TJ. Carbon-13 NMR studied of Flavonoids III **Tetrahedron** 1978;34:1389-97.

Moussaoui F, Zellagui A, Segueni N, Touil A, Rhouati S. Flavonoid Constituents from Algerian *Launaea resedifolia* (O.K.), and their Antimicrobial Activity. **Rec. Nat. Prod**. 2010;4: 91-95.

Liang XT, Yu DQ, Wu WD. The structure of yingzhaosu A. **Huaxue Xuebao**. 1979;37:215-30.

Liang XT, Yu DQ, Pan WD. The structure of yingzhaosu B. **Huaxue Xuebao.** 1979;37:231-40.

Li CY, Wu TS. Constituents of the stigmas of *Crocus sativus* and their tyrosinase inhibitory activity. **J. Nat. Prod.** 2000;65:1452-6.

Lim JY, Ishiguro K, Kubo I. Tyrosinase inhibitor p-coumaric acid from ginseng leaves. **Phytother Res.** 1999;13:371-5.

Li T, Li WK, Yu JG. Flavonoids from *Arabotrys hexapetalus*. **Phytochemistry**. 1997;45:831-33.

Mishima Y, Imokawa G. Selective aberration and pigment loss in melanosomes of malignant melanoma cell in vitro by glycosylation inhibitors: premelanosomes as glycoprotein. **J. Invest. Dermatol**. 1983;81:106-14.

Miyazawa M, Oshima T, Koshio K, Itsuzaki Y, Anzait J. Tyrosinase from Black Rice Bran. **J. Agric. Food Chem**. 2003;51:6953-6.

Murphy BT, Cao S, Brodie PJ, Miller JS, Ratovoson F, Birkinshaw C, Rakotobe E, Rasamison VE, Tendyke K, Suh EM, Kingston D. Antiproliferative compounds of *Artabotrys madagascariensis* from the Madagascar rainforest. **Nat. Prod. Res**. 2008;22:1169-75.

Masuda M, Tejima T, Imokawa G. Skin lighteners. **Cosmetics & Toiletries**. 1996;111:65-67.

No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY. Inhibition of tyrosinase by green tea components. **Life Sci**. 1999;65:241-6.

Okazaki K. Transfer mechanism of melanosomes in epidermal cell culture. **J. Invest. Dermatol**. 1976;67:541-7.

Papas, MA. **Antioxidants status, Diet, Nutrition and Health**. New York: CRC Press; 1998.

Eloumi-Ropivia R, Beliveau J, Simon DZ. Isolation of a new alkaloid from *Artabotrys lastourvillensis*. **J. Nat. Prod**. 1985; 48: 460-2.

Rice-Evan C, Miller J, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med**. 1996;20:933-56.

Roh JS, Han JY, Kim JH, Hwang JK. Inhibition Effects of Active Compounds Isolate from Safflower Seed for Melanogenesis. **Biol. Pharm. Bull.** 2004;279:1976-8.

Rosdahl IK, Szabo G. Mitotic activity of epidermal melanocytes in UV-irradiated mouse skin. **J. Invest. Dermatol.** 1978;70:143-8.

Sagen AL, Sahpaz S, Mavi S, Hostettmann K. Isoquinoline alkaloids from *Artabotrys brachypetalus*. **Biochem. Sys. and Ecol**. 2003;31:1447-9.

Shimizu K, Kondo R. The inhibitory components from *Artocarpus incisus* on melanin biosynthesis. **Planta Med**. 1998;64: 408-412.

Singh AP, Sahai M. Isolation of flavonol glycosides from the leaves of *Artabotrys odoratissimus*. **Planta Med**. 1996;62:192.

Singh N, Sharma M, Jafri M, Mehta BK. Anthraquinones from *Artabotrys odoratissimus* (Leaves). **Indian J. Chem. Sec. B**. 2005;44B:1740-41.

Singh DK, Basha SA, Sarma BK, Pandey VB, Srivastava JS. Antifungal activity of a phytoterpenoid (AOS-A) isolated from *Artabotrytis odoratissimus* on spore germination of some fungi. **Mycobiology**. 2006;34:120-3.

Srichaem J, Ruksilp T, Worawalai W, Siripong P, Khumkratok S, Tip-Yang S. A new dimericaporphine from the roots of *Artabotrys spinosus*. **Fitoterapia**. 2011;82:422-5.

Stawiski MA. **Structure and function of the skin. In Pathophysiology**. Clinical concepts of disease processes. 4th ed. St. Louis: Mosby Year Book , Inc.; 1992.

Wijeratne EM, Gunatilaka AL, Kingston DG, Haltiwanger RC, Eggleston DS. Artabotrine, a new bioactive alkaloid from *artrabotrys zeylanicus*. **Tetrahedron**. 1995;51:7877-82.

Wijeratine EM, Hanakata Y, Tohru K, Yasuhiro T, Gunatilaka AL. A dioxoaporphine and other alkaloids of two annonaceous plants of Sri Lanka. **Phytochemistry**. 1996;42:1703-6.

Wong HF, Brown GD. β-Methoxy-γ-methylene-α,β -unsaturated-γ -butyrolactones from *Artabotrys hexapetalus*. **Phytochemistry**. 2002;59:99-104.

Wu YC, Chen CH, Yang TH, Lu ST, McPhail DR, McPhail AT, Lee KH. Antitumor agents. Part 101. Cytotoxic aporphines from *Artabotrys uncinatus* and the structure and stereochemistry of artacinatine. **Phytochemistry.** 1989;28: 2191-5.

Yada Y, Higuchi K, Imokawa G. Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. **J. Biol.Chem.** 1991;266:18352-7.

Zhang L, Zhou WS, Xu XX. A new sesquiterpene peroxide (yingzhaosu C) and sesquiterpenol (yingzhaosu D) from *Artabotrys unciatus* (L.) Meer. **J. Chem. Soc. Commun**. 1988;8:523-4.