



KKU SCIENCE JOURNAL

Journal Home Page : <https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/KKUSciJ>

Published by the Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand



ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินของสารสกัดดอกทองอุไรในเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานิน ชนิด B16F10

Anti-melanogenic Activity of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth Flower Extract in B16F10 Melanoma Cell Line

ปรีดา จันทพงษ์¹ พัฒเกียรติ มลาพันธ์¹ ปวีณา รังศรีศักดิ์¹ และ วุฒิพงษ์ มหาคำ^{1,2*}

Preeda Chanthapong¹, Patthakiat Malakhan¹, Paweena Rangrisak¹ and

Wuttipong Mahakham^{1,2*}

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

²ศูนย์วิจัยอนุกรมวิธานประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

¹Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

²Applied Taxonomic Research Center, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

บทคัดย่อ

ทองอุไร (*Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth) เป็นพืชที่นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ พบได้ในเขตร้อนรวมถึงประเทศไทย พืชชนิดนี้มีศักยภาพใช้เป็นยารักษาโรคได้ เนื่องจากมีสารออกฤทธิ์ชีวภาพหลายชนิดที่มีผลทางชีวภาพหลายด้าน เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง ต้านเบาหวาน ต้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทองอุไรต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินความเป็นพิษระดับเซลล์ของสารสกัดดอกทองอุไรที่สกัดด้วยเอธิลอะซีเตตต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานินชนิด B16F10 ที่มาจากผิวหนังหนูด้วยวิธี MTT นอกจากนี้ยังทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16F10 เปรียบเทียบกับ Kojic acid ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Depachrome โดยใช้สาร L-tyrosine เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ หลังจากให้นำสารสกัดดอกทองอุไร ความเข้มข้น 0.05 – 3.2 mg/ml มาทดสอบกับเซลล์ B16F10 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าความมีชีวิตของเซลล์ B16F10 มีค่าสูงกว่า 90% เมื่อทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.05 – 0.8 mg/ml แสดงว่าสารสกัดในความเข้มข้นดังกล่าวไม่แสดงความเป็นพิษอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม สารสกัดจากดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.8 mg/ml ยังแสดงประสิทธิภาพในการลดปริมาณเมลานินภายนอกเซลล์และเมลานินภายในเซลล์ B16F10 และออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลองได้ประมาณ 60% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม การศึกษาเป็นรายงานครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดดอกทองอุไรมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยที่ไม่แสดงผลเป็นพิษในระดับเซลล์ ดังนั้น สารสกัดดอกทองอุไรจึงมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นสารทำให้ผิวกระจ่างใสต่อไป

*Corresponding Author, E-mail: mwuthi@kku.ac.th

ABSTRACT

Yellow bells (*Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth) is a widespread ornamental plant extensively cultivated in tropical regions, including Thailand. It has potential therapeutic properties due to the presence of various bioactive compounds with many biological effects, such as anticancer, antidiabetic, antibacterial, and antioxidative activities. However, anti-melanogenic and anti-tyrosinase activities of yellow bell plant extract have not been previously explored. In this study, cytotoxicity of ethyl acetate extract of yellow bell flower towards murine B16F10 skin melanoma cell line was assessed using MTT assay. The flower extracts were also tested for their inhibitory effect on melanogenesis in B16F10 cells compared with kojic acid. Tyrosinase inhibition activity was evaluated using the dopachrome method with L-tyrosine as a substrate. After treatment with 0.05 – 3.2 mg/ml yellow bell flower extracts for 48 h, the viability of B16F10 cells was found to be higher than the 90% viability at 0.05 – 0.8 mg/ml, indicating that these concentrations showed no significant toxicity as compared with the control group. The yellow flower extract at 0.8 mg/ml also effectively decreased both extracellular and intracellular melanin contents in B16F10 cells and could inhibit mushroom tyrosinase activity *in vitro* by 60% compared with the control. This work has shown for the first time that yellow bell flower extract have anti-melanogenic properties without causing cytotoxicity. Thus, yellow bell flower extract can potentially be used as a source for the development of skin whitening agents in the future.

คำสำคัญ: การยับยั้งการสร้างเมลานิน การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส เซลล์เมลานोไซต์ ทองอุไร

Keywords: Anti-melanogenesis, Anti-tyrosinase Activity, Melanocytes, *Tecoma stans*

บทนำ

เมลานิน (Melanin) เป็นเม็ดสี (pigments) ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด พบเมลานินในเซลล์แบคทีเรียพืช และสัตว์ (Nishi *et al.*, 2020) ในมนุษย์เม็ดสีเมลานินกำหนดลักษณะสีตา ผม และผิว โดยพบว่าการสร้างเม็ดสีผิว (Skin pigmentation) เป็นกลไกการป้องกันทางสรีรวิทยาที่สำคัญของเซลล์ผิวเพื่อปกป้องผิวหนังจากอันตรายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต (รังสียูวี) โดยเฉพาะช่วยป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอถูกทำลายเนื่องจากรังสียูวี (Kim *et al.*, 2015; Kooltheat *et al.*, 2023) อีกทั้งยังช่วยปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ได้ด้วย (Kooltheat *et al.*, 2023) กระบวนการสร้างเมลานิน (melanogenesis) เป็นการสร้างเม็ดสีเมลานินในออร์แกเนลล์ชื่อเมลานโซม (Melanosomes) ที่อยู่ภายในเซลล์เมลานอไซต์ (Melanocytes) ซึ่งเป็นเซลล์ที่พบอยู่ในชั้นในสุดหรือชั้นฐาน (basal layer หรือ stratum basale) ของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ในชั้นฐานของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า ยังพบเซลล์เคราติโนไซต์ (Keratinocytes) เรียงติดกันกับเมลานอไซต์ โดยเซลล์เมลานอไซต์จะมีแขนง (dendrite) ยื่นออกไปชิดกับเซลล์เคราติโนไซต์ (Ando *et al.*, 2012) นักวิจัยพบว่าทั้งเซลล์เมลานอไซต์และเคราติโนไซต์ ล้วนเกิดปฏิกิริยาตอบสนองต่อรังสียูวี โดยรังสียูวีสามารถกระตุ้นให้เซลล์เคราติโนไซต์ ผลิตฮอร์โมน α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) เพิ่มสูงขึ้น จากนั้นฮอร์โมน α -MSH ที่ถูกผลิตขึ้นมาจะไปจับกับ Melanocortin 1 receptor (MC1R) ซึ่งเป็นรีเซปเตอร์ที่อยู่บนผิวพลาสมาเมมเบรนของเซลล์เมลานอไซต์ จากนั้นจะเกิดวิถีส่งสัญญาณ (cell signaling) เพื่อไปกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์เมลานิน เป็นผลทำให้เมลานโซมที่อยู่ภายในเซลล์เมลานอไซต์ เกิดการสังเคราะห์และสะสมเมลานินเพิ่มสูงขึ้น (Nguyen and Fisher, 2018)

ในขั้นตอนการขนส่งเมลานินที่อยู่ภายในเมลานโซม เกิดขึ้นได้ด้วยกระบวนการห่อหุ้ม (packaging) เมลาโนโซมให้เป็นทรงกลม (globule) ด้วยพลาสมาเมมเบรนของเซลล์เมลานโซइट จากนั้นเมลานโซมที่ถูกห่อหุ้มนี้จะถูกปล่อยออกมาทางแขนงของเซลล์เมลานโซइट เข้าไปสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ (extracellular space) ที่อยู่รอบ ๆ แขนงของเซลล์เมลานโซइटและเซลล์เคราติโนไซต์ จากนั้นเซลล์เคราติโนไซต์จะนำเอาเมลานโซมเข้ามาข้างในเซลล์ด้วยวิธีการกลืนกิน (Phagocytosis) เมลาโนโซมที่เข้ามาในเซลล์เคราติโนไซต์จะแพร่กระจายตัวรอบ ๆ บริเวณเพอรินิวเคลียร์ (Perinuclear area) ของนิวเคลียส ทำให้เมลานินช่วยปกป้องเซลล์เคราติโนไซต์จากการถูกทำลายด้วยรังสียูวีได้ (Ando *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตาม หากเซลล์ผิวหนังผลิตเมลานินมากเกินไป จะทำให้เกิดอาการผิดปกติของการสร้างเม็ดสีมากเกินไป (Hyperpigmented skin disorders) เช่น ฝ้า (melasma) กระ (freckles หรือ ephelides) จุดต่างตำแหน่งวัย (age spots) เมลาโนเดอร์มา (melanoderma) กระแดด (solar lentigo) และการสร้างเม็ดสีที่มากขึ้นเนื่องมาจากกระบวนการอักเสบของร่างกาย (Post-inflammatory hyperpigmentation) ซึ่งอาจจะเกิดบนใบหน้าหรือร่างกาย โดยปัญหาผิวหนังสร้างเม็ดสีมากเกินไปที่เกิดขึ้นกับใบหน้า มักทำให้ผู้ที่ประสบปัญหามีอาการวิตกกังวล บางรายมีความมั่นใจในตัวเองต่ำลง และมีอาการซึมเศร้าได้ (Neto *et al.*, 2022)

ในวิถีการสังเคราะห์เมลานินที่เกิดขึ้นในเซลล์ (Melanin biosynthesis) อาศัยเอนไซม์สำคัญ (key enzymes) 3 ชนิด คือ ไทโรซิเนส (Tyrosinase) Tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) และ Dopachrome tautomerase (DCT) โดยเอนไซม์หลักที่นักวิจัยสนใจค่อนข้างมาก คือ ไทโรซิเนส (EC 1.14.18.1) เพราะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสังเคราะห์เมลานินใน 2 ปฏิกิริยาแรกของวิถีการสังเคราะห์เมลานิน โดยไทโรซิเนสจะช่วยเร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (Hydroxylation) ของกรดอะมิโน L-tyrosine ให้กลายเป็นสารผลิตภัณฑ์ชื่อ L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ไม่เพียงเท่านั้น เอนไซม์ไทโรซิเนสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ L-DOPA ให้กลายเป็นสาร DOPAquinone (Nishi *et al.*, 2020) ดังนั้น นักวิจัยจึงเชื่อว่าหากสามารถหาสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitor) ได้ จะช่วยควบคุมให้เซลล์เมลานโซइटลดการสังเคราะห์เมลานินได้ด้วยเช่นกัน (Zolghadri *et al.*, 2019) จึงเป็นที่มาของการค้นหาสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส (anti-tyrosinase activity) เพื่อนำมาพัฒนาเป็นสารยับยั้งการสร้างเมลานินหรือใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอาง สำหรับแก้ไขปัญหาจุดต่างตำแหน่งวัยและช่วยลดปัญหาผิวหนังสร้างเม็ดสีมากเกินไป (Panzella and Napolitano, 2019)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ได้มีการนำเอาสารเคมีบางชนิดมาใช้เป็นสารลดการสร้างเมลานินบนผิวหนัง เช่น อาร์บูทีน (Arbutin) กรดโคจิก (Kojic acid) และไฮโดรควิโนน (Hydroquinone) แม้สารเคมีเหล่านี้จะมีประสิทธิภาพที่ดี แต่กลับมีผลข้างเคียงต่อผิวหนังด้วยเช่นกัน โดยมีรายงานว่าสารเคมีเหล่านี้ทำให้เกิดความเป็นพิษในระดับเซลล์ (Cellular toxicity) บางรายผิวเกิดผื่นแดง (Erythema) ผื่นแพ้สัมผัส (Contact dermatitis) หรือผิวเกิดสภาวะไวแสง (Photosensitization) และหากใช้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนาน อาจส่งผลให้เซลล์ผิวหนังเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้ (Alam *et al.*, 2018; Neto *et al.*, 2022; Petrillo *et al.*, 2016) เช่น Kojic acid หากใช้ในระยะเวลา อาจเสี่ยงกระตุ้นให้เกิดมะเร็ง และการเกิดผื่นแพ้ผิวหนัง (El-Nashar *et al.*, 2021) ส่วนสารอาร์บูทีนโดยธรรมชาติแล้วเป็นสารที่ไม่เสถียรเมื่ออยู่ในสภาวะมีแสง เมื่อเปลี่ยนรูปจะปลดปล่อยสารไฮโดรควิโนนซึ่งมีศักยภาพที่จะเป็นสารพิษต่อไขกระดูก (Güven *et al.*, 2023) ข้อด้อยอีกบางประการของสารเคมีเหล่านี้ คือ พบว่าเมื่อนำมาเป็นส่วนผสมกับครีมหรือเครื่องสำอางแล้ว ทำให้สารเคมีเกิดความไม่เสถียร ละลายตัวได้ไม่ดี และความสามารถในดูดซึมเข้าไปสู่เซลล์ (bioavailability) ได้น้อย (Neto *et al.*, 2022; Pillaiyar *et al.*, 2017) ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยจึงพยายามค้นหาสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural products) เช่น สารสกัดจากพืชมาใช้เป็นทางเลือกในการแก้ปัญหาผิวหนังสร้างเม็ดสีมากเกินไป เพราะมีรายงานว่าสารสกัดจากพืชบางชนิดมีสารพิษจากพืช (phytochemicals) เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งการสร้างเมลานินได้ดี (Kim *et al.*, 2015; Petrillo *et al.*, 2016) โดยที่ไม่มีผลข้างเคียงหรือ

มีผลข้างเคียงต่อเซลล์ผิวหนังอย่างมาก จึงเหมาะที่จะนำมาพัฒนาเป็นส่วนผสมครีมหรือเครื่องสำอางเพื่อทำให้ผิวกระจ่างใส และลดเลือนจุดด่างดำให้จางลงไป (Neto *et al.*, 2022)

ทองอุไร มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth จัดอยู่ในวงศ์ Bignoniaceae ทองอุไรจัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีสรรพคุณทางการแพทย์ สารพฤกษเคมีสำคัญที่พบในส่วนต่าง ๆ (ใบ ลำต้น ราก ดอก และผล) ของทองอุไร มีรายงานรวมกันแล้วมากกว่า 120 ชนิด (Anand and Basavaraju, 2021) โดยแบ่งเป็นสารพฤกษเคมีกลุ่มใหญ่ที่สำคัญ ได้แก่ โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ (alkaloids) ไฟโทสเตียรอล (phytosterols) ไกลโคไซด์ (glycosides) ซาโปนิน (saponins) และแทนนิน (tannins) (Al-Azzawi *et al.*, 2012; Bakr *et al.*, 2019; Larbie *et al.*, 2019; Anand and Basavaraju, 2021; Silva *et al.*, 2023) ในส่วนของดอกทองอุไร มีรายงานพบสารพฤกษเคมีที่เด่น ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ กลุ่มย่อยฟลาโวน (flavones) และฟลาโวนอล (flavonol) โมโนเทอร์พีนอัลคาลอยด์ (monoterpene alkaloids) และฟีนิลเอทานอยด์ไกลโคไซด์ (phenylethanoid glycosides) เป็นต้น (Goncalves *et al.*, 2022; Narayanan *et al.*, 2023) โดยพบว่าสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากดอกทองอุไร เช่น ฟลาโวนอยด์ ฟีนิลเอทานอยด์ และโมโนเทอร์พีนอัลคาลอยด์ แสดงผลฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Al-Azzawi *et al.*, 2012; Goncalves *et al.*, 2022) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (Marzouk *et al.*, 2006; Goncalves *et al.*, 2022; Narayanan *et al.*, 2023) และฤทธิ์ต้านการแบ่งตัวและยับยั้งเซลล์มะเร็งเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (Marzouk *et al.*, 2006; Narayanan *et al.*, 2023) นอกจากนี้เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานพบว่าเปปไทด์ธรรมชาติ (natural peptide) ที่สกัดจากดอกทองอุไรด้วยวิธีการสกัดด้วยน้ำร้อนความดันสูง (Pressurized hot water extraction) มีฤทธิ์ต้านการแบ่งตัว (anti-proliferative activity) ต้านการเคลื่อนที่ (anti-migration) และต้านการรุกราน (anti-invasion) ของเซลล์เยื่อบุผิวมะเร็งปอดชนิด A549 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะหลอดทดลอง โดยคาดว่าเปปไทด์ธรรมชาติไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่กระตุ้นให้เกิดเซลล์มะเร็ง ไม่เพียงเท่านั้นเปปไทด์ธรรมชาติที่สกัดจากดอกทองอุไรยังแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ทำให้ลดระดับสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) ในเซลล์เยื่อบุผิวมะเร็งปอดชนิด A549 ได้อีกด้วย (Krobthong *et al.*, 2022)

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าทองอุไรอุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ชีวภาพที่ดี จึงเหมาะที่จะนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการสร้างเมลานิน และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส เพราะจากการสืบค้นข้อมูลในฐานข้อมูลงานวิจัยต่าง ๆ ยังไม่พบมีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารสกัดดอกทองอุไรเป็นสารยับยั้งการสร้างเมลานิน และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงในแง่ต้นทุนการผลิต พืชชนิดนี้เป็นไม้ประดับที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น ปลูกได้ง่าย และเติบโตเร็ว จึงเหมาะที่จะนำมาปลูกและสกัดเอาสารสำคัญ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นนำเอาสารสกัดดอกทองอุไรที่สกัดด้วยสารละลายเอทิลอะซิเตทมาใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส และต้านการสร้างเมลานิน

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาดดอกทองอุไร

ทำการเตรียมสารสกัดหยาดจากดอกทองอุไร เริ่มจากนำดอกทองอุไรทั้งดอก (รวมกลีบดอกและกลีบเลี้ยง) มาทำล้างความสะอาดด้วยน้ำกลั่นอย่างน้อย 3 ครั้ง จากนั้นจึงนำดอกทองอุไรไปชั่งน้ำหนักออกด้วยกระดาษหิซุแบบหนา ก่อนนำมาแช่ในตัวทำละลาย (solvent) Ethyl acetate (EtOAc) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างพืชต่อตัวทำละลาย คือ 1:1 (w/v) (สารละลายท่วมตัวอย่าง) ปล่อยให้ตัวทำละลายย่อยตัวอย่างพืชเป็นเวลา 2 - 3 วัน แล้วจึงนำสารสกัดที่ได้ไปทำให้ระเหยโดยใช้เครื่อง Rotary evaporator จากนั้นจึงนำเอาสารสกัดที่ทำให้ระเหยแล้วไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer (LaboGene)

2. การตรวจหาสารพฤกษเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดดอกทองอุไรด้วยวิธีเชิงคุณภาพ

นำสารสกัดจากดอกทองอุไรมาตรวจวัดหาสารพฤกษเคมี กลุ่มฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ แทนนิน เทอร์พีนอยด์ และซาโปนินด้วยวิธีเชิงคุณภาพ (Qualitative screening of phytochemicals) โดยทำตามวิธีการของ Mahakham *et al.* (2016) โดยมีวิธีการ ดังนี้

ทดสอบหาสารพฤกษเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธี Shinoda's test และ Pew's test โดยการทดสอบด้วยวิธี Shinoda's test ให้นำสารสกัดดอกทองอุไรมา 2 ml เติมนลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl) ลงไป 0.5 ml จากนั้นจึงเติมผง Mg ลงไปเล็กน้อย ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู หรือแดงมะเขือเทศแสดงว่ามีฟลาโวนอยด์ ส่วนการทดสอบด้วยวิธี Pew's test ทำโดยการเติมสารสกัดดอกทองอุไร 2 ml ลงไปในหลอดทดลอง จากนั้นเติมผงสังกะสี (Zinc) ลงไป 0.1 g จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. Sulphuric acid) ลงไป 3 ml ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่ามีฟลาโวนอยด์

การตรวจหาอัลคาลอยด์ใช้วิธี Wagner's test โดยการเติมสารสกัดดอกทองอุไร 1 ml ลงไปในหลอดทดลอง จากนั้นค่อย ๆ เติม Wagner's reagent ลงไป 1 ml ถ้าสารละลายมีตะกอนสีเหลือง หรือสีน้ำตาลเกิดขึ้น แสดงว่ามีอัลคาลอยด์

การทดสอบหาแทนนิน ทำโดยการเติมสารสกัดดอกทองอุไร 1 ml ลงไปในหลอดทดลอง จากนั้นเติม 5% Ferric chloride ลงไป 2 ml เขย่าให้เข้ากัน ถ้าสารละลายเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือมีสีดำปนเขียว แสดงว่ามีแทนนิน

การทดสอบหาเทอร์พีนอยด์ ทำโดยเติมสารสกัดดอกทองอุไร 2 ml ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมคลอโรฟอร์ม (Chloroform) ลงไป 3 ml เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นค่อย ๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น อีก 3 ml สังเกตเห็นการแยกชั้นของสารละลาย และมีสีน้ำตาลแดงเกิดขึ้น แสดงว่ามีเทอร์พีนอยด์

การทดสอบหาซาโปนิน ทำโดยการเติมสารสกัดดอกทองอุไร 2 ml ลงไปในกระบอกตวง จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไป 2 ml นำกระดาษอะลูมิเนียมปิดฝากระบอกตวงให้แน่น เขย่ากระบอกตวงไปมาให้แรง ๆ เพื่อให้สารละลายกระจายตัวเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงตั้งกระบอกตวงทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ถ้าเกิดขึ้นฟองขึ้นมาประมาณ 1 เซนติเมตร แสดงว่ามีซาโปนินในสารสกัดพืช

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์เมลานोไซต์ของหนูที่เกิดมะเร็งผิวหนังชนิด B16F10

เซลล์เพาะเลี้ยงเมลานोมาชนิด B16F10 ที่มาจากผิวหนังหนู (murine melanoma B16F10 CRL-6475™) ที่ใช้ในการทดลองได้รับตัวอย่างและผ่านการเซ็นสัญญาการแลกเปลี่ยนตัวอย่าง (Material Transfer Agreement: MTA) ระหว่างสถาบัน American Type Culture Collection (ATCC) ประเทศสหรัฐอเมริกากับผู้วิจัย ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ B16F10 ในอาหารสูตร Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่มี 10% FBS และ 1% Penicillin/Streptomycin เพาะเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีแหล่งให้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ incubator) 5% และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส (Freshney, 2010)

4. การวัดความมีชีวิตของเซลล์ B16F10

ทำการเตรียมสารสกัดดอกทองอุไรเพื่อทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยนำเอาสารสกัดดอกทองอุไรที่ผ่านการทำให้แห้งด้วยวิธี Freeze drying มาละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.05 – 3.2 mg/L โดยในการใช้งานทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ต้องเจือจางให้ DMSO ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เป็น 0.1% (v/v)

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเซลล์และทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ทำภายใต้ตู้ปลอดเชื้อชีวนิรภัยระดับ 2 พร้อมกับเทคนิคปลอดเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ B16F10 ใน culture flask แบบ T75 ให้ได้ 80% confluency จึงทำขั้นตอน Trypsinization โดยใช้ Dissociation reagent TrypLE™ Express Enzyme (Gibco™) เพื่อเอาเซลล์ออกมาจาก culture

flask ภายในระยะเวลาไม่เกิน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย Complete DMEM จากนั้นจึงย้ายเซลล์ลงหลอด Snap tube ปริมาตร 15 ml ทำการตกตะกอนเซลล์ด้วยแรงเหวี่ยงไม่เกิน 200 x g จากนั้น resuspend เซลล์ด้วย DMEM แล้วทำการตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยสารละลายสี Trypan blue ร่วมกับการใช้ Neubauer Haemocytometer Cell Counting Chamber เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยจะต้องใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีชีวิตอย่างน้อย 95% จึงนำมาใช้ในการทดลอง ทำการ seed เซลล์ให้ได้ 1×10^4 cell/ml ต่อช่อง 96-well plate โดยให้มีปริมาตร 100 μ l บ่ม plate ที่ไว้ 48 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีแหล่งให้คาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อให้เกิด Cell adhesion เมื่อครบเวลาดูดเอาอาหารเพาะเลี้ยงเก่าออก แล้วล้างเซลล์ด้วย Phosphate-buffered saline (PBS) จึงทำการเติมสารสกัดดอกทองอุไรที่เจือจางในความเข้มข้นต่าง ๆ (0.05 – 3.2 mg/ml) ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 100 μ l จากนั้นนำ plate ไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการล้างเซลล์ด้วย PBS โดยระมัดระวังการดูดเอาเซลล์ออกไป จากนั้นเติมสารละลาย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma) ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วนำ plate ไปบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการละลาย Formazan crystal ตามคู่มือของ Freshney (2010) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm และ 630 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader (SpectraMax M5) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับเซลล์ B16F10 กลุ่มควบคุม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร DMEM ที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากดอกทองอุไร

5. การวัดปริมาณเมลานินภายนอก และเมลานินภายในเซลล์

ทำการวัดปริมาณเมลานินภายนอกเซลล์ (extracellular melanin) และเมลานินภายในเซลล์ (intracellular melanin) ที่ผลิตโดยเซลล์ B16F10 โดยทำตามวิธีการของ Junlatat *et al.* (2018) เริ่มต้นโดยการนำเซลล์ B16F10 มา seed ลงบน 12 well-plate ให้ได้เซลล์ 1×10^4 cell/well เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีแหล่งให้คาร์บอนไดออกไซด์ 5% และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดดอกทองอุไรที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.05 – 0.8 mg/ml และ Kojic acid (Sigma) ความเข้มข้น 0.1 mg/ml (หลุมสารมาตรฐานเพื่อใช้อ้างอิง) ส่วนกลุ่มควบคุมใช้ DMEM ที่ไม่เติมสารสกัดจากพืชหรือ Kojic acid นำ plate ไปบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงต่อ 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการดูดเอาอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ออกมาใส่ 96 well plate อย่างระมัดระวังและไม่ให้กระทบกระเทือนเซลล์ที่ยังอยู่ใน 12-well plate ในขั้นตอนนี้เป็นการวัดปริมาณเมลานินภายนอกเซลล์ (extracellular melanin) โดยจะนำ 96-well plate ที่มีสารละลายอาหารที่เจือปนด้วยเมลานินภายนอกเซลล์ไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (SpectraMax M5)

สำหรับการวัดปริมาณเมลานินภายในเซลล์ หลังบ่มเซลล์ร่วมกับสารสกัดดอกทองอุไรหรือ Kojic acid เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการล้างเซลล์ด้วย PBS จากนั้นจึงนำเซลล์ออกจาก 12-well plate ด้วยวิธี Trypsinization โดยใช้ Dissociation reagent TrypLE™ Express Enzyme (Gibco™) เป็นเวลา 5 นาที เมื่อย้ายเซลล์ออกมาแล้ว ทำให้เซลล์แตก (Cell lysis) ด้วยสารละลาย 1 N NaOH ใน 10% DMSO ปริมาตร 800 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาส่วนสารละลายด้านบน (Supernatant) ออกจากเศษเซลล์ ดูดเอา Supernatant ปริมาตร 100 μ l ไปเติมลงใน 96-well plate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยใช้เครื่อง Microplate reader (SpectraMax M5)

6. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Rangkadilok *et al.* (2007) ที่อาศัยอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร L-tyrosine โดยมีสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาในหลุมตัวอย่าง (sample) มีดังนี้ Tyrosinase solution (Sigma) 200 units/ml ปริมาตร 40 μ l สารละลาย Phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 80 μ l สารสกัดดอกทองอุไรความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 40 μ l และ 10 mM L-tyrosine 40 μ l เติมสารต่าง ๆ ลงใน 96 well plate และ

ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader (SpectraMax M5) การทดลองนี้ใช้ Kojic acid ความเข้มข้น 0.1 mg/L เป็นกลุ่ม positive control เพื่อใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง

นอกจากการเตรียมปฏิกิริยาการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลุมตัวอย่างแล้ว จำเป็นต้องเตรียมปฏิกิริยาของหลุมควบคุม (control) หลุม blank control และ blank sample ควบคู่กันไปด้วย โดยปฏิกิริยาของหลุม control ทำเช่นเดียวกับหลุมตัวอย่าง (sample) แต่ใช้สารละลาย DMSO ปริมาตร 40 μ L แทนตัวอย่างสารสกัดดอกทองอุไร ส่วนปฏิกิริยาของหลุม blank control ทำคล้ายกับหลุม control แต่ไม่เติมสารตั้งต้น L-tyrosine ลงไป จึงเพิ่มปริมาตรของ Phosphate buffer เป็น 120 μ L สำหรับปฏิกิริยาของ blank sample ทำคล้ายกับหลุม sample แต่ไม่เติมเอนไซม์ Tyrosinase ลงไป ให้เพิ่มปริมาตรของ phosphate buffer เป็น 120 μ L แทน

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยสูตรด้านล่างนี้

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(\text{control} - \text{blank control}) - (\text{sample} - \text{blank sample})]}{(\text{control} - \text{blank control})} \times 100$$

7. การวิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

การทดสอบความเป็นพิษระดับเซลล์ การวิเคราะห์หาปริมาณเมลานิน และกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แบบ Independent experiment จากนั้นนำมาวิเคราะห์ข้อมูลสถิติเพื่อแสดงร้อยละ (percentage) ของข้อมูล ค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี One-Way ANOVA และ Duncan Post hoc test ด้วยโปรแกรม SPSS ver.20

ผลการวิจัย

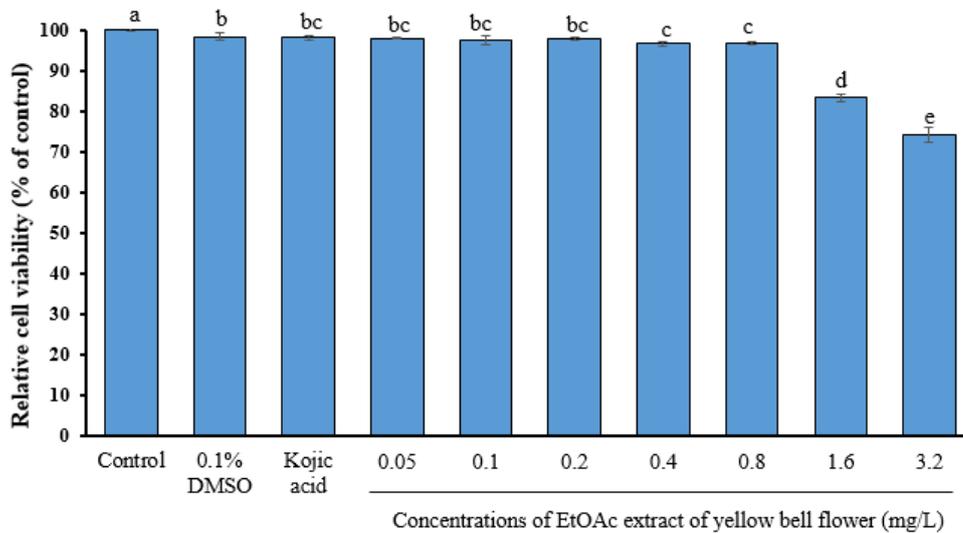
1. การตรวจสอบหาสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาดดอกทองอุไรด้วยวิธีเชิงคุณภาพ

จากการตรวจสอบหาสารพฤกษเคมีของสารสกัดหยาดจากดอกทองอุไรที่สกัดด้วยตัวทำละลาย EtOAc ด้วยวิธีเชิงคุณภาพ พบสารพฤกษเคมีกลุ่มฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ และแนนิน แต่ไม่พบสารพฤกษเคมีกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ และซาโปนิน

2. การประเมินความเป็นพิษระดับเซลล์

การประเมินความเป็นพิษระดับเซลล์ของสารสกัดดอกทองอุไรที่สกัดด้วย EtOAc ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0.05 – 3.2 mg/L) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานิน B16F10 ด้วยวิธีการ MTT พบว่าสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 – 0.8 mg/ml มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุม (มีเฉพาะ DMEM medium) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มที่บ่มร่วมกับ Kojic acid ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ($p \geq 0.05$) (รูปที่ 1) ในขณะที่กลุ่มที่บ่มร่วมกับสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 1.6 และ 3.2 mg/ml เริ่มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ B16F10 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์น้อยกว่า 85% และแตกต่างจากกลุ่มทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ

จากข้อมูลเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานิน B16F10 ที่บ่มร่วมกับสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.05 – 0.8 mg/ml ไม่แตกต่างทางสถิติจากกลุ่มที่บ่มร่วมกับ Kojic acid อีกทั้งยังมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์สูงมากกว่า 95% จึงเลือกใช้สารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.05 - 0.8 mg/ml สำหรับทดสอบผลของสารสกัดดอกทองอุไรต่อการสร้างเมลานินในเซลล์ B16F10



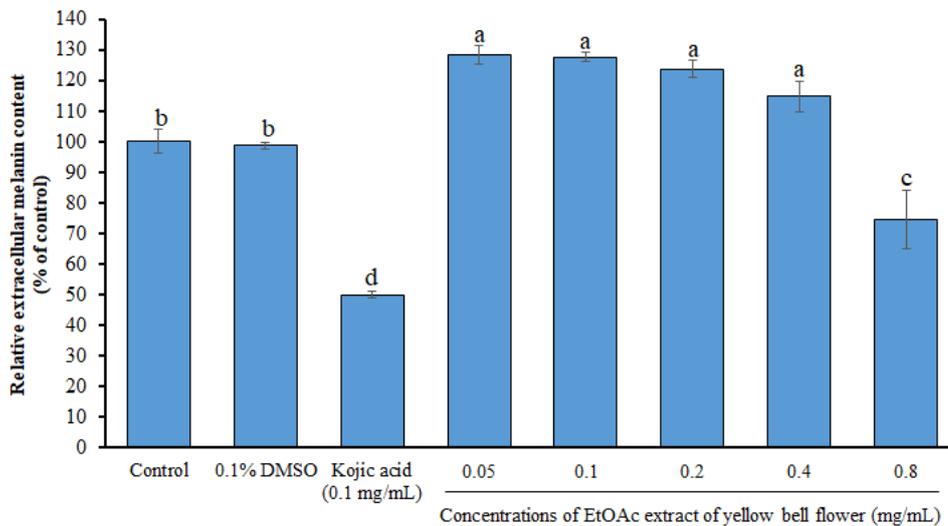
รูปที่ 1 เปรียบเทียบการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานินมาชนิด B16F10 เมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดดอกทองอุไร ที่ความเข้มข้น 0.05 – 3.2 mg/ml เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มควบคุม (control) กลุ่มที่บ่มร่วมกับ 0.1% DMSO และกลุ่มที่ได้รับ Kojic acid ความเข้มข้น 0.1 mg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ข้อมูลที่แสดงในกราฟเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แบบ Independent experiment ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนกราฟระบุตำแหน่ง หมายถึงกลุ่มทดสอบมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบด้วย Duncan's multiple-range test

3. ผลของสารสกัดดอกทองอุไรต่อการสร้างเมลานินภายนอกเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานินมาชนิด B16F10

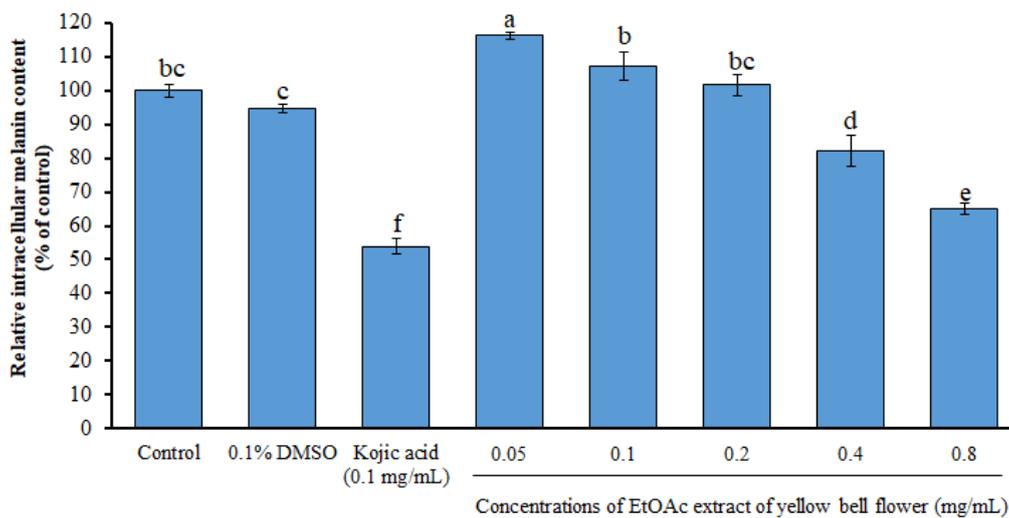
เมื่อนำเอาสารสกัดดอกทองอุไร ความเข้มข้น 0.05 0.1 0.2 0.4 และ 0.8 mg/ml มาบ่มร่วมกับเซลล์เพาะเลี้ยง B16F10 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ Kojic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใช้ยับยั้งการสร้างเมลานิน ในความเข้มข้นเท่ากัน ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.8 mg/ml เท่านั้นที่แสดงผลยับยั้งการสร้างเมลานินแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยยับยั้งได้ประมาณ 25% ในขณะที่สารสกัดดอกทองอุไร ความเข้มข้น 0.05 – 0.4 mg/ml ให้ผลกระตุ้นการสร้างเมลานินภายนอกมากกว่าชุดควบคุม (รูปที่ 2) ในทางตรงกันข้าม Kojic acid ความเข้มข้น 0.1 mg/ml แสดงผลยับยั้งการสร้างเมลานินภายนอกแตกต่างจากทุกกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

4. ผลของสารสกัดดอกทองอุไรต่อการสร้างเมลานินภายในเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานินมาชนิด B16F10

ผลการวัดปริมาณเมลานินภายในเซลล์ของเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานินมาชนิด B16F10 หลังจากที่ได้รับสารสกัดดอกทองอุไรที่สกัดด้วย EtOAc เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.8 mg/ml และ 0.4 mg/ml สามารถยับยั้งการสร้างเมลานินภายในเซลล์ได้ประมาณ 35.10% และ 17.87% ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วน Kojic acid ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml แสดงผลยับยั้งการสร้างเมลานินได้ดีกว่าทุกกลุ่มทดลอง (46.11%) (รูปที่ 3)



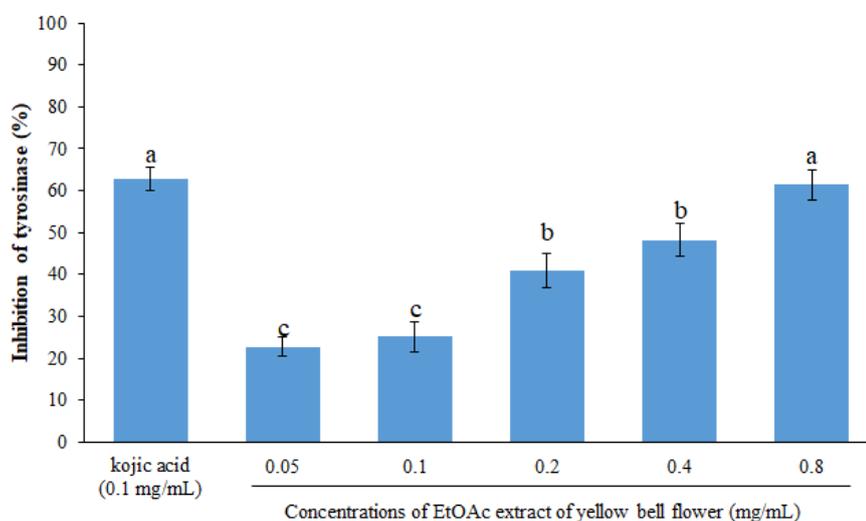
รูปที่ 2 ปริมาณเมลานินภายนอกเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด B16F10 เมื่อได้รับสารสกัดดอกทองอุไรความเข้มข้น 0.05 – 0.8 mg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ Kojic acid ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดดอกทองอุไร ข้อมูลที่แสดงในกราฟเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แบบ Independent experiment ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนกราฟรูปแท่ง หมายถึง กลุ่มทดสอบมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบด้วย Duncan's multiple-range test



รูปที่ 3 ปริมาณเมลานินภายในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด B16F10 เมื่อได้รับสารสกัดดอกทองอุไรความเข้มข้น 0.05 – 0.8 mg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ Kojic acid ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัดดอกทองอุไร ข้อมูลที่แสดงในกราฟเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แบบ Independent experiment ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันบนกราฟรูปแท่ง หมายถึง กลุ่มทดสอบมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบด้วย Duncan's multiple-range test

5. ผลของสารสกัดดอกทองอุไรต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง

เมื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 – 0.8 mg/ml โดยใช้สาร L-tyrosine เป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยา พบว่าฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสนั้นมีแนวโน้มขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดดอกทองอุไร (dose-dependent manner) โดยสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 mg/ml ให้ผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสน้อยที่สุด (ประมาณ 20%) (รูปที่ 4) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดดอกทองอุไร เป็น 0.2 – 0.4 mg/ml พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มขึ้น และแตกต่างจากกลุ่มที่บ่มร่วมกับสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 mg/ml อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ยังคงผลยับยั้งน้อยกว่ากลุ่มที่บ่มร่วมกับ Kojic acid ในขณะที่สารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.8 mg/ml ให้ผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด (ประมาณ 60%) โดยแตกต่างจากกลุ่มที่บ่มร่วมด้วยสารสกัดดอกทองอุไรความเข้มข้นอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ และให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มที่บ่มร่วมกับ Kojic acid ($p > 0.05$)



รูปที่ 4 ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.05 – 0.8 mg/ml เปรียบเทียบกับ Kojic acid ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ข้อมูลที่แสดงในกราฟเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แบบ Independent experiment ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในกราฟรูปแท่ง หมายถึง กลุ่มทดสอบมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบด้วย Duncan's multiple-range test

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในการศึกษานี้ได้ทดลองนำเอาสารสกัดหยาบจากดอกทองอุไรที่สกัดด้วย EtOAc มาใช้ทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด B16F10 ซึ่งเป็นเซลล์เมลาโนไซต์ที่ได้จากผิวหนังหนูที่เป็นมะเร็งผิวหนัง เซลล์ B16F10 นิยมนำมาใช้ทดสอบหาสารยับยั้งเมลานินหรือสารทำให้ผิวกระจ่างใส (Lee *et al.*, 2019) โดยในขั้นแรกต้องทำการประเมินความเป็นพิษระดับเซลล์ก่อนว่าสารสกัดที่นำมาทดสอบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ B16F10 หรือไม่ หรือเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้นเท่าใด จากนั้นจึงทำการเลือกเอาความเข้มข้นของสารสกัดดอกทองอุไรที่ไม่เป็นพิษ มาใช้ทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินกับเซลล์ B16F10 ต่อไป โดยในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดดอกทองอุไรนั้น ได้ละลายสารสกัดหยาบด้วย DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายสากล (universal solvent) ที่สามารถละลายสารประกอบทั้งแบบมีขี้ผึ้งและแบบไม่มีขี้ผึ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Galvao *et al.*, 2014) เมื่อละลายสารสกัดหยาบด้วย DMSO บริสุทธิ์แล้ว จึงเจือจางให้ DMSO มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 0.1% (v/v) เพราะมีรายงานว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 0.1% จะไม่แสดงผลเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงหรือแสดงผลความเป็นพิษต่ำมาก

(Hajighasemi and Tajik, 2017) แต่แสดงผลเป็นพิษต่อเซลล์หลายชนิดที่ความเข้มข้นมากกว่า 1% (Galvao *et al.*, 2014) ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าเซลล์ B16F10 ที่บ่มร่วมกับ 0.1% DMSO (อาหารเพาะเลี้ยง DMEM มีส่วนผสมของ 0.1% DMSO) มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงว่าการใช้ 0.1% DMSO เป็นตัวทำละลาย ไม่แสดงผลความเป็นพิษต่อเซลล์ B16F10

เมื่อศึกษาผลของสารสกัดดอกทองอุไรความเข้มข้น 0.05 – 3.2 mg/ml มาทดสอบความเป็นพิษระดับเซลล์ โดยประเมินความมีชีวิตของเซลล์ B16F10 ด้วยวิธี MTT หลังจากบ่มร่วมกับสารสกัดดอกทองอุไรเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดดอกทองอุไรทุกความเข้มข้น มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม เซลล์ B16F10 ที่บ่มร่วมกับสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.05 – 0.8 mg/ml มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์สูงกว่า 95% และเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มร่วมกับ Kojic acid พบว่ากลุ่มที่บ่มร่วมกับสารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.05 – 0.8 mg/ml มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงเลือกสนใจใช้สารสกัดดอกทองอุไรที่ความเข้มข้น 0.05 – 0.8 mg/ml ในการทดสอบลดระดับปริมาณเมลานินและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสต่อไป

กุญแจสำคัญของวิถีการสังเคราะห์เมลานินอยู่ที่เอนไซม์ไทโรซิเนส เพราะเป็นเอนไซม์สำคัญที่เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนกำหนดอัตรา (rate-limiting step) ของวิถีการสังเคราะห์เมลานิน จึงถือว่าเป็นเอนไซม์ขั้นกำหนดอัตรา (rate-limiting enzyme) ที่ควบคุมและปฏิกิริยาชีวเคมีในภาพรวมของการสังเคราะห์เมลานินในเซลล์เมลานোসิต (Panzella and Napolitano, 2019) เอนไซม์นี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันของไทโรซีนให้เป็นสาร DOPA และยังสามารถคะตะไลซ์ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร DOPA ให้เป็น DOPA chrome ได้ด้วย (El-Nashar *et al.*, 2021) ดังนั้น หากมีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะทำให้ป้องกันไม่ให้เกิดการสะสมเมลานินในผิวหนังได้ ด้วยเหตุนี้ การค้นหาสารสกัดจากพืชที่มีคุณสมบัติยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ จึงเป็นหนึ่งในกุญแจสำคัญในการนำสารสกัดจากพืชมาใช้เป็นส่วนผสมเครื่องสำอางและสารทำให้ผิวกระจ่างใส (Lee *et al.*, 2019)

เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าเอนไซม์ที่จัดให้อยู่ในกลุ่มโปรตีนคอปเปอร์ประเภทที่ 3 (type-3 copper protein) ซึ่งหมายความว่า เป็นโปรตีนที่มีธาตุทองแดงเป็นองค์ประกอบ จำนวน 2 อะตอม จัดเรียงอยู่ตรงศูนย์กลางในบริเวณเร่ง (active site) โดยธาตุทองแดงทั้งสองอะตอมนี้เป็นหมู่พรอสเทติก (prosthetic group) ที่ยึดจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยพันธะโควาเลนต์ เพื่อส่งอิเล็กตรอนจากสารตั้งต้นไปยังโมเลกุลของออกซิเจน ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนปลายทาง (terminal electron acceptor) (Buchert *et al.*, 2007; Pillaiyar *et al.*, 2017; Panzella and Napolitano, 2019) ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเมทัลโลเอนไซม์ (Metalloenzyme) ที่มีไอออนทองแดงทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงขึ้นอยู่กับทองแดงที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ชนิดนี้ (Zolghadri *et al.*, 2019) นักวิจัยได้เสนอกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารพฤษเคมีแบบที่เรียกว่าตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) โดยสารพฤษเคมีจะแข่งขันกับสารตั้งต้นเพื่อเข้าไปจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ไทโรซิเนส สารพฤษเคมีที่มีบทบาทเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน อาจจะเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นตัวคีเลตทองแดง (Copper chelator) อนุพันธ์ของสารที่ไม่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม (non-metabolizable analogs) หรืออนุพันธ์ของสารตั้งต้นที่แท้จริง (Derivatives of the true substrate) (Chang, 2009) โดยกลไกที่กล่าวถึงกันมาก คือ สารพฤษเคมีบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารคีเลต (Chelating agent) สามารถเข้าไปจับไอออนทองแดงซึ่งมีประจุบวกได้ (Cu^{2+}) จึงทำให้เข้าไปจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสอิสระที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ ดังนั้น เมื่อเกิดการคีเลต (Chelation) ระหว่างโมเลกุลของสารพฤษเคมีกับทองแดง เอนไซม์จึงไม่สามารถทำงานได้หรือมีกิจกรรมลดลง เพราะสารตั้งต้นเข้าไปจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้น้อยลง จึงทำให้อัตราการสังเคราะห์เมลานินลดต่ำลง (Riha *et al.*, 2014; Panzella and Napolitano, 2019) ตัวอย่างของสารพฤษเคมีสำคัญที่มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน

คือ สารประกอบฟีนอลิก กลุ่มต่าง ๆ ได้แก่ (1) สารฟีนอลิกอย่างง่าย (simple phenolics) เช่น แคทาคอล (catechol) และ ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) และ (2) สารโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ที่โครงสร้างวงแหวนเบนซีนที่สามารถคีเลตไอออนทองแดงได้ (Zolghadri *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2023) โดยมีรายงานว่าหมู่ 3-hydroxy-4-keto ของฟลาโวนอยด์ และหมู่ 5,6,7-trihydroxyl ของฟลาโวน (flavones) เป็นตำแหน่งที่สามารถคีเลตไอออนทองแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด (Riha *et al.*, 2014) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า จำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ในวงแหวน B ของฟลาโวนอยด์จะมีผลอย่างมากต่อความสามารถในการคีเลตไอออนทองแดง (El-Nashar *et al.*, 2021) นอกจากสารฟลูคาเอมิมีบทบาทเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันแล้ว ยังมีกลไกอื่น ๆ อีก 3 รูปแบบ ได้แก่ สารฟลูคาเอมิเป็นตัวยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (uncompetitive inhibitor) โดยตัวยับยั้งแบบนี้จะไม่เข้าไปจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้โดยตรง แต่สามารถเข้าไปจับกับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้น (Enzyme-substrate complex: ESC) ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างซับซ้อนระหว่าง ESC กับตัวยับยั้ง (inhibitor) เกิดเป็น Enzyme-substrate-inhibitor complex (ESI) ซึ่งจะทำให้สารตั้งต้นไม่สามารถเปลี่ยนแปลงกลายเป็นผลิตภัณฑ์ได้ (Chang, 2009; Zolghadri *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2023) ตัวอย่างของสารฟลูคาเอมิที่เป็นตัวยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรงต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้แก่ Luteolin (สารฟลาโวนอยด์ กลุ่มย่อยฟลาโวน) และ Sophorcarpidine (สารฟลูคาเอมิกลุ่ม flavonoid glycoside) (Kim *et al.*, 2023)

กลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยสารฟลูคาเอมิอีกกลไกที่มีการกล่าวถึง คือ สารฟลูคาเอมิเป็นตัวยับยั้งแบบผสมผสาน (mixed competitive and uncompetitive inhibitor) ในกลไกนี้สารฟลูคาเอมิบางชนิดอาจจะยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอิสระได้ (การยับยั้งแบบแข่งขัน) และยังสามารถเข้าไปจับกับ ESC เกิดเป็น ESI ได้ด้วย (การยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง) จึงทำให้ไทโรซิเนสทำงานไม่ได้ หรือสารตั้งต้นไม่เปลี่ยนแปลงเป็นสารผลิตภัณฑ์ ตัวยับยั้งแบบนี้มีค่าคงที่สมดุล (equilibrium binding constant) ที่แตกต่างกันระหว่างปฏิกิริยาการยับยั้งแบบแข่งขันและปฏิกิริยาการยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้โดยตรง (Chang, 2009; Zolghadri *et al.*, 2019) สารฟลูคาเอมิที่มีฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งแบบผสมผสาน ได้แก่ Proanthocyanidin (โพลีฟีนอล กลุ่มแทนนิน) Procyanidin (โพลีฟีนอล กลุ่มแทนนิน) Isosilybin A/B (โพลีฟีนอล กลุ่ม flavonolignan) และ 3-Phenylbenzoic acid (กรดฟีนอลิก) เป็นต้น (Kim *et al.*, 2023) สำหรับกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบสุดท้าย คือ สารฟลูคาเอมิทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitors) โดยสามารถเข้าไปจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสที่อยู่เป็นอิสระ (ทำงานคล้ายกับตัวยับยั้งแบบแข่งขัน) แต่มักจับกับบริเวณอื่นของเอนไซม์ที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง เพราะตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน มีโครงสร้างโมเลกุลแตกต่างจากสารตั้งต้น เมื่อเข้าไปจับกับเอนไซม์แล้วจะทำให้โครงรูปของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ทำให้สารตั้งต้นไม่สามารถเข้าไปจับกับบริเวณเร่งได้ นอกจากนี้ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันยังสามารถจับกับ ESC ได้ด้วย จนเกิดเป็น ESI ขึ้นมา แม้ว่าตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันจะทำงานคล้ายกับตัวยับยั้งแบบผสมผสาน แต่จะมีค่าคงที่สมดุลของการเข้าไปจับกันระหว่างเอนไซม์ไทโรซิเนสอิสระ กับ ESC ได้เท่า ๆ กัน (Chang, 2019; Kim *et al.*, 2023) ตัวอย่างของสารฟลูคาเอมิที่มีบทบาทเป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน ได้แก่ อนุพันธ์ของ Thiazoles (Zolghadri *et al.*, 2019) และฟลาโวนอยด์ กลุ่มไอโซฟลาโวน ชนิดย่อยที่เป็นอนุพันธ์ของ 8-Prenylkaempferol Glabridin และ 3,4-dihydroglabridin เป็นต้น (Kim *et al.*, 2023)

จากกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้ง 4 แบบข้างต้น จะเห็นว่าสารประกอบฟีนอลิก กลุ่มฟลาโวนอยด์มีบทบาทเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ด้วยกลไกทั้ง 4 แบบ โดยเฉพาะบทบาทเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขันที่มีโอกาสเกิดขึ้นมาก (El-Nashar *et al.*, 2021) ในการศึกษาี้ได้ทำการตรวจสอบหาสารฟลูคาเอมิเชิงคุณภาพ พบว่าสารสกัดดอกทองอุไรที่สกัดด้วย

EtOAc มีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ อีกทั้งยังพบสารแทนนินด้วย ข้อมูลในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สอดคล้องกับข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมา ที่ได้มีการวิเคราะห์หาสารพฤกษเคมีที่พบในสารสกัดดอกทองอุไรด้วยเทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าสารสกัดดอกทองอุไรที่สกัดด้วย EtOAc อุดมไปด้วยฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารเด่น (Narayanan *et al.*, 2023) ส่วนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid chromatography coupled to a diode array detector and mass spectrometer (LC-DAD-MS) พบว่าสารสกัดดอกทองอุไรประกอบไปด้วยสารกลุ่มอัลคาลอยด์ เช่น Tecomine Tecostamine และ Coumaroyl-spermidine analogs และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ กลุ่มย่อย flavonols และ O-glycosylated flavones เป็นต้น (Goncalves *et al.*, 2022) ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดดอกทองอุไรที่ตรวจพบในงานวิจัยนี้ อาจจะเกี่ยวข้องกับสารฟลาโวนอยด์ที่พบในดอกทองอุไร ที่มีบทบาทเป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน โดยจะเข้าไปจับกับไอออนทองแดงที่เป็นองค์ประกอบในบริเวณเร่งของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ตามกลไกการยับยั้งแบบแข่งขันที่กล่าวไว้ข้างต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าสารสกัดจากดอกไม้อุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น สารสกัดดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta* L.) (Vallisuta *et al.*, 2014) สารสกัดจากดอกคูน (*Cassia fistula* L.) (Limtrakul *et al.*, 2016) สารสกัดดอกเทียนบ้านหรือเทียนดอก (*Impatiens balsamina* L.) วงศ์ Balsaminaceae สารสกัดดอก *Rhanterium suaveolens* วงศ์ดาวเรือง (Asteraceae) (Chelly *et al.*, 2021) และสารสกัดดอก *Asphodelus microcarpus* Brot. วงศ์ Asphodelaceae (Petrillo *et al.*, 2016) เป็นต้น สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการรายงานครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดดอกทองอุไรมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16F10 ได้ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง

สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาดดอกทองอุไรที่สกัดด้วยตัวทำละลาย Ethyl acetate เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้น 0.8 mg/ml สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์เมลานोไซต์เพาะเลี้ยงชนิด B16F10 ได้ โดยที่ไม่แสดงผลความเป็นพิษในระดับเซลล์ นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง โดยผลที่ได้แม้จะยังไม่เทียบเท่ากับ Kojic acid แต่หากนำมาศึกษาเพิ่มเติม เช่น นำเอาสารสกัดหยาดดอกทองอุไรมาทำให้เป็นสารบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ และประเมินว่าสารบริสุทธิ์ใดแสดงผลฤทธิ์ชีวภาพที่เฉพาะเจาะจงต่อการยับยั้งการสร้างเมลานิน และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในระดับเซลล์ได้ จะเป็นการต่อยอดงานวิจัยที่จะนำไปสู่การใช้ประโยชน์สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากดอกทองอุไร โดยเฉพาะการนำไปใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางเพื่อผิวกระจ่างใสต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนสนับสนุนกิจกรรมกองทุนวิจัย นวัตกรรม และบริการวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

เอกสารอ้างอิง

Alam, M.B., Ahmed, A., Motin, M.A., Kim, S. and Lee, S.H. (2018). Attenuation of melanogenesis by *Nymphaea nouchali* (Burm. f) flower extract through the regulation of cAMP/CREB/MAPKs/MITF and proteasomal degradation of tyrosinase. *Scientific Reports* 8: 13928. doi: 10.1038/s41598-018-32303-7.

- Al-Azzawi, A.M., Al-Khateeb, E., Al-Sameraei, K. and Al-Juboori, A.G. (2012). Antibacterial activity and the histopathological study of crude extracts and isolated tecomine from *Tecoma stans* Bignoniaceae in Iraq. *Pharmacognosy Research* 4: 37 - 43. doi: 10.4103/0974-8490.91033.
- Anand, M. and Basavaraju, R. (2021). A review on phytochemistry and pharmacological uses of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Ethnopharmacology* 265: 113270. doi: 10.1016/j.jep.2020.11327.
- Ando, H., Niki, Y., Ito, M., Akiyama, K., Matsui, M.S., Yarosh, D.B. and Ichihashi, M. (2012). Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *Journal of Investigative Dermatology* 132: 1222 - 1229. doi: 10.1038/jid.2011.413.
- Bakr, R.O., Fayed, M.A.A., Salem, M.A. and Hussein, A.S. (2019). *Tecoma stans*: alkaloid profile and antimicrobial activity. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 11(4): 341–347. doi: 10.4103/jpbs.JPBS_79_19.
- Buchert, J., Selinheimo, E., Kruus, K., Mattinen, M.L., Lantto, R. and Autio, K. (2007). Using crosslinking enzymes to improve textural and other properties of food. In: Rastall, R. (ed.). *Novel Enzyme Technology for Food Applications*. Cambridge: Woodhead Publishing. pp. 101 – 139.
- Chang, T.S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 2440 - 2475. doi: 10.3390/ijms10062440.
- Chelly, S., Chelly, M., Occhiuto, C., Cimio, F., Cristani, M., Saija, A., Molonia, M.S., Ruberto, G., D'Angelo, V., Germano, M.P., Siracusa, L., Bouazia-Ketata, H. and Speciale, A. (2021). Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and antityrosinase potential of extracts from different aerial parts of *Rhanterium suaveolens* from Tunisia. *Chemistry & Biodiversity* 18: e2100316. doi: 10.1002/cbdv.202100316.
- El-Nashar, H.A.S., El-Din, M.I.G., Hritcu, L. and Eldahshan, O.A. (2021). Insights on the inhibitory powder of flavonoids on tyrosinase activity: a survey from 2016 to 2021. *Molecules* 26: 7546. doi: 10.3390/molecules26247546.
- Freshney, R.I. (2010). *Culture of animal cells: a manual of basic techniques and specialized applications*. 6th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M.R. and Cordeiro, M.R. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB Journal* 28: 1317-1330. doi: 10.1096/fj.13-235440.
- Goncalves, T.P.R., Parreira, A.G., Zanucio, V.S.S, Farias, K.S., Silva, D.B. and Lima, L.A.R.S. (2022). Antibacterial and antioxidant properties of flowers from *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Bignoniaceae). *South African Journal of Botany* 144: 156 - 165. doi: 10.1016/j.sajb.2021.08.028.
- Güven, Z.B., Saracoglu, I., Nagatsu, A., Yilmaz, M.A. and Basaran, A.A. (2023). Anti-tyrosinase and antimelanogenic effect of cinnamic acid derivatives from *Prunus mahaleb* L.: Phenolic composition, isolation, identification and inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 310: 116378. doi: 10.1016/j.jep.2023.116378.

- Hajighasemi, F. and Tajik, S. (2017). Assessment of cytotoxicity of dimethyl sulfoxide in human hematopoietic tumor cell lines. *Iranian Journal of Blood and Cancer* 9: 48 - 53.
- Junlatat, J., Fangkrathok, N. and Sripanidkulchai, B. (2018). Antioxidative and melanin production inhibitory effects of *Syzygium cumini* extracts. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 40 (5): 1136 - 1143.
- Kim, H.D., Choi, H., Abekura, F., Park, J.Y., Yang, W.S., Yang, S.H. and Kim, C.H. (2023). Naturally-occurring tyrosinase inhibitors classified by enzyme kinetics and copper chelation. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 8226. doi: 10.3390/ijms24098226.
- Kim, M., Shin, S., Lee, J.A., Park, D., Lee, J. and Jung, E. (2015). Inhibition of melanogenesis by *Gaillardia aristata* flower extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15: 449. doi: 10.1186/s12906-015-0972-1.
- Kooltheat, N., Tedasen, A., Yamasaki, K. and Chatatikun, M. (2023). Melanogenesis inhibitory activity, chemical components and molecular docking studies of *Prunus cerasoides* Buch.-Ham. D. Don. flowers. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine* doi: 10.1177/2515690X231152928.
- Krobthong, S., Yingchutrakul, Y., Sittisaree, W., Tulyananda, T., Samutrtai, P., Choowongkamon, K. and Laoon, U. (2022). Evaluation of potential anti-metastatic and antioxidative abilities of natural peptides derived from *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth in A549 cells. *PeerJ* 10: e13693. doi: 10.7717/peerj.13693.
- Larbie, C., Nyarkoh, C.O. and Adjei, C.O. (2019). Phytochemical and safety evaluation of hydroethanolic leaf extract of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 7417624. doi: 10.1155/2019/7417624.
- Lee, C.J., Park, S.K., Kang, J.Y., Kim, J.M., Yoo, S.K., Han, H.J., Kim, D.O. and Heo, H.J. (2019). Melanogenesis regulatory activity of the ethyl acetate fraction from *Arctium lappa* L. leaf on α -MSH-induced B16/F10 melanoma cells. *Industrial Crops and Products* 135: 111581. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111581.
- Limtrakul, P., Yodkeeree, S., Thippraphan, P., Punfa, W. and Srisomboon, J. (2016). Anti-aging and tyrosinase inhibition effects of *Cassia fistula* flower butanolic extract. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 16: 497. doi: 10.1186/s12906-016-1484-3.
- Mahakham, W., Theerakulpisut, P., Maensiri, S., Phumying, S., Sarmah, A.K. (2016). Environmentally benign synthesis of phytochemicals-capped gold nanoparticles as nanopriming agent for promoting maize seed germination. *Science of The Total Environment* 573: 1089 - 1102.
- Marzouk, M.S.A., Gamal-Eldeen, A.M., Mohamed, M.A. and El-Sayed, M.M. (2006). Antioxidant and anti-proliferative active constituents of *Tecoma stans* against tumor cell lines. *Natural Product Communications* 1: 735 - 743.

- Narayanan, M., Gothandapani, A., Venugopalan, R., Rethinam, M., Pitchai, S., Alahmadi, T.A., Almoallim, H.S., Kandasamy, S. and Brindhadevi, K. (2023). Antioxidant and anticancer potential of ethyl acetate extract of bark and flower of *Tecoma stans* (Linn) and in silico studies on phytoligands against Bcl 2 and VEGFR2 factors. *Environmental Research* 231: 116112. doi: 10.1016/j.envres.2023.116112.
- Neto, C.F.G., do Nascimento, P., da Silveira, C.V., de Mattos, A.B.N. and Bertol, C.D. (2022). Natural sources of melanogenic inhibitors: A systematic review. *International Journal of Cosmetic Science* 44: 143 - 153. doi: 10.1111/ics.12763.
- Nguyen, N. and Fisher, D.E. (2018). MITF and UV responses in skin: From pigmentation to addiction. *Pigment Cell & Melanoma Research* 32: 224 - 236. doi: 10.1111/pcmr.12726.
- Nishi, K., Mori, M., Nakayama, D., Sato, J., Kim, I.H., Kim, M., Kim, S. and Sugahara, T. (2020). Anti-melanogenic activity of methanolic extract from leaves of *Sorbaria sorbifolia* var. *stellipila* Max. on α -MSH-stimulated B16 melanoma 4A5 cells. *Biomedical Dermatology* 4: 7. doi: 10.1186/s41702-020-0061-z.
- Panzella, L. and Napolitano, A. (2019). Natural and bioinspired phenolic compounds as tyrosinase inhibitors for the treatment of skin hyperpigmentation: Recent advances. *Cosmetics* 6: 57. doi: 10.3390/cosmetics6040057.
- Petrillo, A.D., González-Paramás, A.M., Era, B., Medda, R., Pintus, F., Santos-Buelga, C. and Fais, A. (2016). Tyrosinase inhibition and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* extracts. *BMC Complementary Alternative Medicine* 16: 453. doi: 10.1186/s12906-016-1442-0.
- Pillaiyar, T., Manickam, M. and Namasivayam, V. (2017). Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 32: 403 - 425. doi: 10.1080/14756366.2016.1256882.
- Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M. and Satayavivad, J. (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chemical Toxicology* 42: 328-336. doi: 10.1016/j.fct.2006.08.022.
- Riha, M., Karlickova, J., Filipicky, T., Jahodar, L., Hrdina, R. and Mladenka, P. (2014). *In vitro* copper-chelating properties of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 74: S46. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.807.
- Silva, A.L., Azevedo, L.S., Goncalves, T.P.R., Coimbra, M.C., Siqueira, E.P., Alves, S.N. and Lima, A.R.S. (2023). Larvicidal activity of hexane extractm fatty acids, and methyl esters from *Tecoma stans* pericarps against *Culex quinquefasciatus*. *Natural Product Research* 37: 4227 - 4231.
- Vallisuta, O., Nukookarn, V., Mitrevej, A., Sarista, N., Leelapornpisid, P., Phrutivorpongkul, A. and Sinchaipanid, N. (2014). *In vitro* studies on the cytotoxicity, and elastase and tyrosinase inhibitory

activities of marigold (*Tagetes erecta* L.) flower extracts. *Experimental and Therapeutic Medicine* 7: 246 - 250. doi: 10.3892/etm.2013.1373.

Zolghadri, S., Bahrami, A., Khan, M.T.H., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F. and Saboury, A.A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 34: 279 - 309. doi: 10.1080/14756366.2018.1545767.

