โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินจากมะหาด

Anti-melanogenic compounds from *Artocarpus lacucha*

ชื่อนิสิต นางสาวพิมพ์ชนก ปัญญาไชยพัฒน์ เลขประจำตัว 6033072323

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินจากมะหาด

Anti-melanogenic compounds from *Artocarpus lacucha*

โดย

นางสาวพิมพ์ชนก ปัญญาไชยพัฒน์

รายงานนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการ สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินจากมะหาด

โดย นางสาวพิมพ์ชนก ปัญญาไชยพัฒน์

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ ประธานกรรมการ
2. ศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ ชัยลภากุล กรรมการ
3. ศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา พุดหอม อาจารย์ที่ปรึกษา

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม)
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. วรวีร์ โฮเว่น)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 27 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2564

ชื่อโครงการ สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินจากมะหาด
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวพิมพ์ชนก ปัญญาไชยพัฒน์ เลขประจำตัว 6033072323
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

ปัจจุบันทั่วโลกกำลังประสบกับปัญหาภาวะโลกร้อน ทำลายชั้นโอนโซนทำให้มีรูในชั้นโอโซน โดยชั้นโอโซนจะช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลตที่จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อผิวหนัง และรังสียูวียังเข้าทำลาย DNA ของเซลล์ผิวหนังได้โดยตรง ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้ งานวิจัยนี้สนใจศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ผิวหนัง B16 melanoma จากแก่นมะหาด (*Artocarpus lacucha*) ซึ่งมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีในเซลล์ B16 อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่เป็นฤทธิ์ของสารสกัดหยาบและสารองค์ประกอบหลัก oxyresveratrol ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเน้นแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดแก่นมะหาดและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16 ซึ่งจากการนำส่วนสกัดเมทานอลของสารสกัดแก่นมะหาดมาแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี และวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR spectroscopy ทำให้ได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิดได้แก่ 5,5′-(1*Z*)-1,2-ethenediylbis[1,3-benzenediol] (ACI), dihydroxyresveratrol และ resveratrol และเมื่อนำสารทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16 โดยมี arbutin เป็นสารควบคุม พบว่า 5,5′-(1*Z*)-1,2-ethenediylbis[1,3-benzenediol] (2C), dihydroxyresveratrol (2F) และ resveratrol (2G) ให้ปริมาณเมลานินที่ถูกผลิต (% melanin production) เท่ากับ 75.52%, 84.20% และ 47.08% ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 10 μM และ 55.10%, 19.16% และ 24.17% ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 50 μM ซึ่งจะเห็นได้ว่า resveratrol (2G) สามารถยับยั้งการผลิตเม็ดสีเมลานินได้ดีที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งมากกว่า 80% ที่ความเข้นข้น 50 μM นอกจากนี้ยังพบว่าสารทั้ง 3 ชนิด ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ B16 ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ 50 μM สารเหล่านี้จึงอาจนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นยาหรือเครื่องสำอางที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดสีเมลานินได้

คำสำคัญ: แก่นมะหาด, เมลานิน, ความเป็นพิษต่อเซลล์

Project Title Anti-melanogenic compounds from *Artocarpus lacucha*
Student Name Miss Pimchanok Panyachaiyaphat Student ID 6033072323
Advisor Name Professor Khanitha Pudhom, Ph.D.
Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2020

Abstract

Nowadays, global warming has emerged as one of the biggest environmental challenges facing the world. As a result, the ozone layer was destroyed which produced ozone holes. The ozone layer protects the harmful ultraviolet(UV) rays which affect our skin that probably leads to skin cancer as DNA in skin cells is directly damaged by UV rays. This research aimed to investigate anti-melanogenic compounds in B16 melanoma cells from *Artocarpus lacucha* heartwood, which was reported to possess anti-oxidant, anti-tyrosinase and anti-melanogenesis in B16 melanoma cells. However, only bioactivity of crude extractions and major compounds, oxyresveratrol, were reported. Therefore, this study focuses on isolation and characterization of pure compounds from *Artocarpus lacucha* extracts and evaluation of their anti-melanogenic activity in B16 cells. Methanol crude extract of *A. lacucha* was subjected to column chromatography to obtain three pure compounds, 5,5′-(1Z)-1,2-ethenediylbis[1,3-benzenediol] (ACI), dihydroxyresveratrol and resveratrol. Their structures were elucidated by NMR data analysis. All compounds were tested for their anti-melanogenic activity in B16 cells and arbutin was used as positive control. Results showed that 5,5′-(1Z)-1,2-ethenediylbis[1,3-benzenediol] (2C), dihydroxyresveratrol (2F) and resveratrol (2G) provided the melanin production of 75.52%, 84.20% and 47.08% respectively, at 10 μM, as well as 55.10%, 19.16% and 24.17% respectively, at 50 μM. Among compounds tested,resveratrol (2G) was the most potent activity with % melanin inhibition > 80% at 50 μM. In addition, all three compounds did not show any significant toxicity against B16 cells though at the highest concentration tested (50 μM). The results supported that these compounds might be developed to use as as medicinal drugs or cosmetics with anti-melanogenic activity.

Keywords: *Artocarpus lacucha* heartwood, Melanin, Cytotoxicity

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการสำหรับการให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการมอบเงินทุนบางส่วน เพื่อสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณนักวิจัยหลังปริญญาเอกและนักวิจัยร่วมห้องปฏิบัติการเคมีทุกท่านที่สำหรับการดูแล การให้คำแนะนำ การให้ความรู้ และความช่วยเหลือเสมอมา

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อบุคลากรทางการศึกษา และผู้ที่สนใจศึกษาค้นคว้าต่อไป

สารบัญรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1.1	แก่นมะหาด	2
1.2	ต้นมะหาด	2
1.3	ใบมะหาด	3
1.4	ดอกมะหาด	4
1.5	ผลมะหาด	4
1.6	บริเวณผิวหนังชั้นกำพร้าที่มีเซลล์เมลาโนไซต์	7
1.7	กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินภายในผิวหนัง	7
1.8	กระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน	8
2.1	การเตรียมสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาด	13
2.2	ปฏิกิริยาที่เกิดจาก MTT assay	15
3.1	โครงสร้างทางเคมีของสาร 5,5′-(1*Z*)-1,2-Ethenediylbis[1,3-benzenediol] (ACI)	19
3.2	โครงสร้างของสาร Dihydroxyresveratrol	19
3.3	โครงสร้างของสาร Resveratrol	20
3.4	กราฟแสดงผลของสารที่แยกได้ต่อ % melanin production และ cell viability ของเซลล์ B16F10	22
4.1	โครงสร้างสารที่แยกได้จากมะหาด	23

สารบัญภาคผนวก

รูปที่ **หน้า**

A.1 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร 5,5′-(1*Z*)-1,2-Ethenediylbis[1,3-benzenediol] (ACI) 36

A.2 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร Dihydroxyresveratrol 36

A.3 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร Resveratrol 37

อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

^{1}H-NMR	proton nuclear magnetic resonance
%	percent
TLC	thin layer chromatography
g	กรัม
mg	มิลลิกรัม
µg	ไมโครกรัม
mL	มิลลิลิตร
µM	ไมโครโมลาร์

สารบัญ

	หน้า
หน้าบทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญรูปประกอบ	ฉ
สารบัญภาคผนวก	ช
คำย่อและสัญลักษณ์ที่ใช้	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ	1
1.2 ข้อมูลทางพฤษศาสตร์ของมะหาด	2
1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1.3.1 มะหาด (*Artocarpus lacucha* Roxb.)	5
1.3.2 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanogenesis)	6
1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย	9
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
บทที่ 2 การทดลอง	
2.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง	10
2.2 รายการเครื่องมือ อุปกรณ์	10
2.2.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	10
2.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	10
2.3 รายการสารเคมี	11
2.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยก	11
2.3.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการพิสูจน์ทราบโครงสร้าง	11
2.3.3 สารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน	11
2.4 เซลล์ไลน์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	11
2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง	11
2.5.1 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography)	11
2.5.2 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography, TLC)	12

2.6 ขั้นตอนการทดลอง
2.6.1 การสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) 12
2.6.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบเมทานอลของแก่นมะหาด 12
2.6.3 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินบน 96-well plates 13
2.6.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay) ด้วยวิธี MTT assay 14

บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง
3.1 การแยกสารสกัดจากแก่นมะหาด 16
3.2 วิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ 18
3.3 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินบน 96-well plates (Anti-melanogenesis assay) 21
3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay) ด้วยวิธี MTT assay 22
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 23
เอกสารอ้างอิง 24
ภาคผนวก 36
ประวัติผู้วิจัย 38

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันทั่วโลกกำลังประสบกับปัญหาภาวะโลกร้อน ทำลายชั้นโอนโซนทำให้มีรูในชั้นโอโซน โดยชั้นโอโซนจะช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลตที่จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อผิวหนัง ทำให้ประชากรจำนวนมากมักเกิดปัญหาด้านผิวพรรณ จากการที่รังสีอัลตราไวโอเลตไปกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินขึ้นมาเป็นเกราะป้องกันผิวหนัง ส่งผลให้ผิวมีสีคล้ำขึ้น มีรอยเหี่ยวย่น และยังมีงานวิจัยอ้างว่ารังสียูวียังเข้าทำลาย DNA ของเซลล์ผิวหนังได้โดยตรง ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้[1] โดยกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน เรียกว่า melanogenesis ซึ่งเกิดจากรังสียูวีเป็นตัวกระตุ้นกระบวนการและมีเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นเมลานินที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกนำไปเก็บไว้ในเมลาโนโซมในลักษณะถุง (vesicle) แล้วขนส่งไปยังเคราติโนไซต์ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในชั้นกำพร้าชั้นล่างสุด[2] เมื่อมีกระบวนการกระตุ้นย่อมมีกระบวนการยับยั้งเพื่อปรับสมดุลของร่างกาย การใช้สารยับยั้งสร้างเม็ดสีได้ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรือในทางการแพทย์ และอาจมีศักยภาพในการใช้เป็น whitening agent ได้[3] เป็นสารที่ทำให้ผิวขาว ทำให้สีผิวสม่ำเสมอ สารยับยั้งเหล่านี้เป็นไปได้ทั้งสารสังเคราะห์และสารที่พบในธรรมชาติ เช่น พืช ซึ่งในปัจจุบันสารสกัดจากธรรมชาติเป็นที่น่าสนใจและถูกนำมาใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหลายรูปแบบ เช่น ครีม โลชั่น ในประเทศไทยเองก็มีการนำสมุนไพรที่เป็นพืชที่พบได้ง่ายและปลูกง่ายในท้องถิ่น เช่น มะหาด (*Artocarpus lacucha*) จากบทความและงานวิจัยต่างๆ มีการรายงานผลว่าสารสกัดจากแก่นมะหาด ซึ่งเป็นส่วนเปลือกของลำต้น (*A. lacucha* wood) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[4] และน่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน[5] ได้ไม่น้อยไปกว่าพืชสมุนไพรในต่างประเทศ สารสำคัญเหล่านั้น ได้แก่ อาร์บูติน ที่สามารถยับยั้งกระบวนการการสร้างเม็ดสีเมลานิน งานวิจัยนี้จึงสนใจสกัดและแยกสารบริสุทธิ์ที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีของสารสกัดจากแก่นมะหาด เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างและการออกฤทธิ์ของสาร การสกัดสารจากแก่นมะหาดทำได้โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายและคอลัมน์โครมาโตกราฟี จากนั้นนำมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน เพื่อคำนวณหาปริมาณเมลานินที่ถูกผลิต (% melanin production) ของสารตัวอย่าง และทดสอบความเป็นพิษของสารตัวอย่างต่อเซลล์ B16 melanoma cell ด้วย MTT assay[6-7] เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับนำไปพัฒนาให้ได้สารที่มีฤทธิ์ที่ดียิ่งขึ้นและไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์จนสามารถนำไปต่อยอดในการผลิตเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์เพื่อลดปัญหาผิวหน้าหมองคล้ำ จุดด่างดำ และรอยเหี่ยวย่น ต่อไป

1.2 ข้อมูลทางพฤษศาสตร์ของมะหาด

รูปที่ 1.1 แก่นมะหาด[8]

รูปที่ 1.2 ต้นมะหาด[8]

ชื่อวิทยาศาสตร์ : Artocarpus lakoocha
ชื่อวงศ์ : MORACEAE
ชื่อสามัญ : Lok hat
ชื่อพื้นเมืองอื่น : หาดหนุน (ภาคเหนือ) ; หาด (ทั่วไป) ; **มะหาด** (ภาคใต้) ; กาแย, ตาแปง (มลายู-นราธิวาส) ; มะหาดใบใหญ่ (ตรัง)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ :

- **ต้น** ขนาดกลางถึงใหญ่ สูงประมาณ 15-20 เมตร เรือนยอดเป็นพุ่มกลมทึบ เปลือกนอกของลำต้นมีสีเทาแกมน้ำตาลหรือน้ำตาลดำ แตกเป็นสะเก็ดเล็กๆ ทั่วไป เปลือกชั้นในสีน้ำตาลแกมแดง มักมียางสีขาวหรือสีขาวแกมเหลืองซึมออกมาตามรอยแตกตามยอดอ่อนมีขนนุ่มสีเทาถึงน้ำตาลปกคลุมหนาแน่น
- **ใบ** เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงสลับกัน ลักษณะใบรูปรี หรือรูปขอบขนานหรือรูปไข่ โคนใบมนหรือเว้าเป็นรูปหัวใจ ปลายใบแหลม ขอบใบแก่ เรียบแต่ขอบใบอ่อนหยักเป็นฟันเลื่อยเล็ก ๆ ท้องใบสาก เส้นแขนงใบมองเห็นได้ชัดเจนเป็นแบบร่างแห

รูปที่ 1.3 ใบมะหาด[8]

- **ดอก** ออกดอกเป็นช่อเล็กๆ ตามบริเวณง่ามใบ ตอนปลายกิ่ง ช่อดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน ช่อดอกเพศผู้รูปขอบขนาน กลีบดอกมี 2-4 หยัก ช่อดอกเพศเมียรูปเกือบกลม กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นหลอด ดอกมีสีเหลืองอ่อน

รูป 1.4 ดอกมะหาด[8]

- **ผล** ลักษณะรูปกลมใหญ่ เปลือกนอกมีผิวขรุขระ เป็นผลรวมซึ่งเกิดจากผลเล็กหลายๆ ผลเชื่อมติดกัน เนื้อค่อนข้างนุ่ม ผลอ่อนมีสีเขียว ผลแก่สีเหลืองอมส้ม รับประทานได้

รูปที่ 1.5 ผลมะหาด[8]

- **เมล็ด** ลักษณะรูปขอบขนานฝังอยู่ในเนื้อ

สรรพคุณทางยา :

- **ราก** รสร้อน แก้ไข้ แก้กระษัยเส้นเอ็น ขับพยาธิ แก้ไข้เพื่อฝีภายใน แก้พิษร้อน
- **แก่น** รสร้อน แก้จุกเสียดแน่น แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ขับลม ผายลม แก้ผื่นคัน แก้ตานขโมย เป็นยาระบาย ถ่ายพยาธิ
- **ปวกหาด** รสร้อนเมา ละลายน้ำดื่มขณะท้องว่างแล้วดื่มน้ำดีเกลือตามไป ขับพยาธิในท้องหรือละลายน้ำทาแก้ผื่นคัน

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.3.1 มะหาด (*Artocarpus lacucha*)

มะหาด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Artocarpus lacucha* จัดอยู่ในวงศ์ MORACEAE ต้นกำเนิดจากภูมิภาคเอเชียใต้ นิยมปลูกเอาไว้ใช้ประโยชน์ทุกส่วนของต้น สามารถเจริญเติบโตได้ในดินทราย, ดินร่วนปนทราย, ดินร่วน และ ดินเหนียว มีความทนทานต่อความแห้งแล้งได้ดีมาก ชอบ

บริเวณที่มีความชื้นสูงและแสงแดดเข้าถึงได้น้อย มักขึ้นกระจายตามป่าดิบทั่วไป มะหาดเป็นยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ ลำต้นตั้งตรง ความสูง 15-20 เมตร เปลือกสีน้ำตาลไหม้เป็นลายแตกละเอียด มีส่วนยอดเป็นพุ่มหนาและทึบ ใบเป็นใบเดี่ยว ขนาดวงรีจนถึงรูปไข่ กว้าง 5-20 เซนติเมตร ยาว 10-30 เซนติเมตร ที่ขอบใบมีริวขึ้นโดยรอบ มีขนขึ้นทั้ง 2 ด้านของใบ ดอกจะออกในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน และกลายเป็นผลในเดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม ลักษณะดอกจะมีสีขาวอมเหลืองมีขนาดเล็ก ผลเป็นผลรวมมีสีเขียว เมื่อสุกจะมีสีเหลือง รัศมีจากจุดศูนย์กลางยาว 2.5-5 เซนติเมตร รูปร่างกลมแป้นใหญ่ มีทรงบิ้วเบี้ยวเป็นบางลูก เปลือกนอกผิวขรุขระ เนื้อผลค่อนข้างนุ่ม แต่ละผลย่อยมีเมล็ด 1 เมล็ด รูปทรงรี ต้นมะหาดที่สามารถนำมาใช้ผลประโยชน์ได้นั้นจะต้องมีอายุไม่ต่ำกว่า 5 ปี[9] มีการศึกษาและวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของผักแขยงในด้านต่างๆดังนี้

ในปี 2014 Komutiban O. ได้ศึกษาสารสกัดเอทิลอะซิเตต, เมทานอล และเอทานอลของแก่นมะหาด พบว่าสกัดสารจากแก่นมะหาดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตตมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant activity) สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 53.71 mg/mL จากวิธี DPPH radical scavenging[10]

ในปี 2015 Laovachirasuwan P. และคณะ ได้ศึกษาสารสกัดเอทานอลของแก่นมะหาด พบว่าสารสกัดที่ได้มีปริมาณ oxyresveratrol 0.31±0.05mg/mL ของสารสกัดหยาบ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.63±1.02 mg/mL ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการนำสารสกัดแก่นมะหาดไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางเชิงพาณิชย์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป[11]

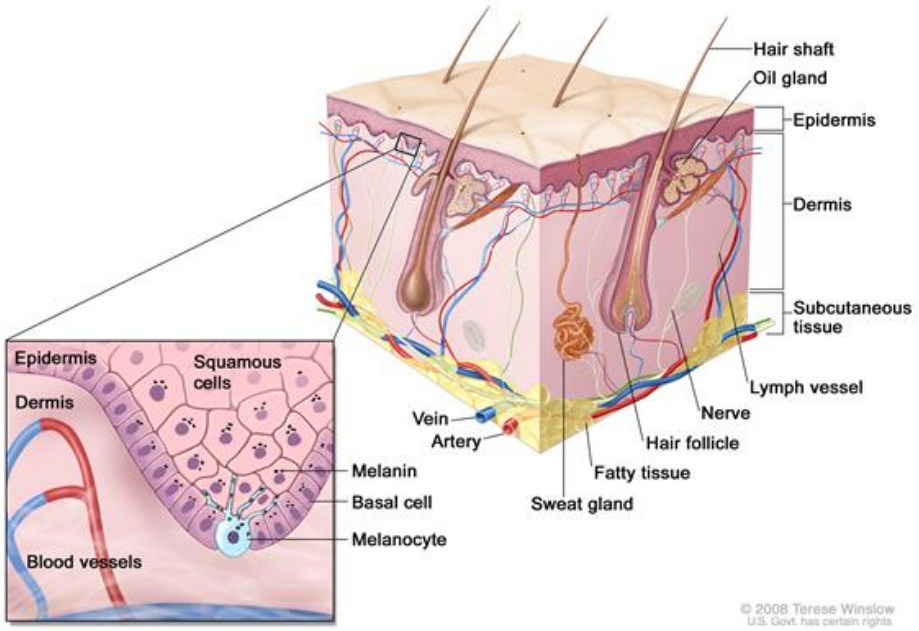
ตารางที่ 1.1 สารประกอบเคมีที่แยกได้จากมะหาด (*Artocarpus lacucha*) [12]

สารประกอบที่แยกได้	ส่วนของพืช
resveratrol	แก่น
2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene (oxyresveratrol)	แก่น
artocarpin	แก่น
norartocarpin	แก่น
cycloartocarpin	แก่น
norcycloartocarpin	แก่น
5,7-dihydroxyflavone-3-O-alpha-L-rhamnoside	เปลือกราก
galangin-3-O-alpha-L- rhamnoside	เปลือกราก

kaempferol-3-O-beta-L-xyloside	เปลือกราก
quercetin-3-O-alpha-L-rhamnoside	เปลือกราก
lakoochin A	ราก
lakoochin B	ราก
beta-amyrin acetate	เปลือกต้น
lupeol acetate	เปลือกต้น
5 - hydroxy - 2 ,4,7 - trimethoxy flavone - 2, 3, 4, 5, - tetrahydroxystilbene	ต้น

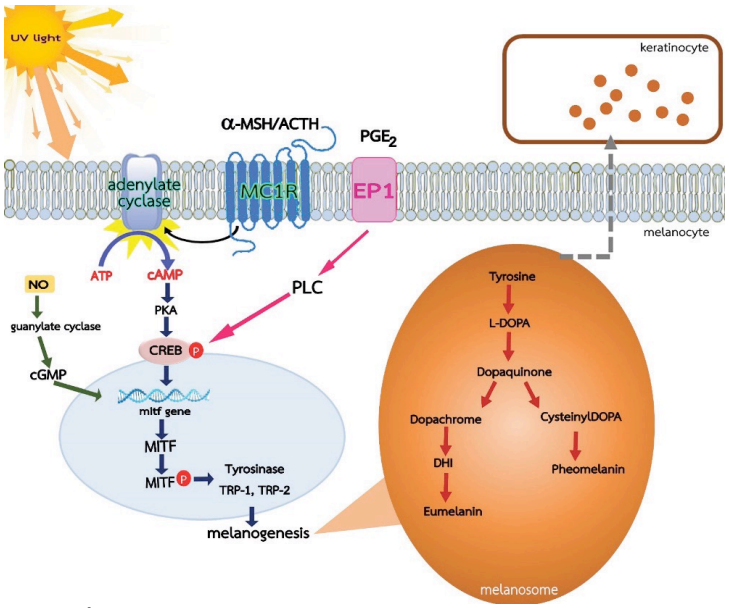
1.3.2 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanogenesis)

กระบวนการสร้างเม็ดสีเกิดขึ้นที่ผิวหนังชั้นล่างสุดของเอพิเดอร์มิสหรือชั้นหนังกำพร้าซึ่งเป็นบริเวณที่มีเคราติโนไซต์ (keratinocyte) โดยเซลล์เมลาโนไซต์ (melanocyte) จะทำหน้าที่ผลิตเม็ดสีเมลานินแล้วเก็บไว้ในเมลาโนโซม (melanosome) จากนั้นจึงส่งต่อไปยังเคราติโนไซต์

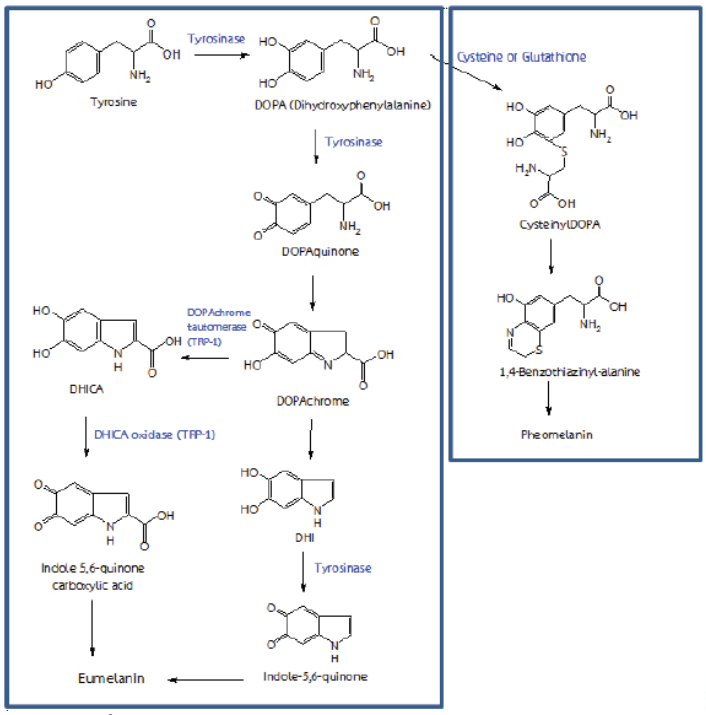


รูปที่ 1.7 บริเวณผิวหนังชั้นกำพร้าที่มีเซลล์เมลาโนไซต์[13]

กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินสามารถถูกกระตุ้นได้จากรังสีอัลตร้าไวโอเลต โดยผ่านกระบวนการดังรูปที่ 1.2 และ 1.3



รูปที่ 1.7 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินภายในผิวหนัง[14]



รูปที่ 1.8 กระบวนการชีวสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน[14]

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

รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ 2 วิธีได้แก่กระตุ้นผ่านเซลล์เมลาโนไซต์โดยตรง ทำให้เอนไซม์ไทโรซิเนสผลิตมากขึ้น ส่งผลให้เม็ดสีเมลานินมีจำนวนมากขึ้น ผิวจึงมีสีเข้มขึ้น อีกวิธีคือการกระตุ้นผ่านเซลล์เคราติโนไซต์ ทำให้หลั่งสารต่างๆออกมาได้แก่ โพรสตาแกลนดิน อี2 (prostaglandin E2, PGE2) และฮอร์โมนเมลาโนไซต์สติมูเลติง (**α**-melanocyte stimulating hormone, **α**-MSH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สร้างมาจากเซลล์เมลาโนไซต์ที่หลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนกลาง ฮอร์โมน **α**-MSH จะเร่งปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน โดยการกระตุ้นโปรตีนไคเนส เอ (proteinkinase A) ผ่าน cyclic AMP (cAMP) ซึ่งทำให้ยีนที่ควบคุมเซลล์เมลาโนไซต์ microphthalmiaassociated transcription factor (mitf gene) เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อผลิตเมลานินและเอนไซม์หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องได้แก่เอนไซม์ไทโรซิเนส TRP-1 และ TRP-2[21] โดยการสังเคราะห์เมลานินที่ผ่านการกระตุ้นทั้งสองแบบมีขั้นตอนที่เหมือนกันดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 กรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นในร่างกาย ถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มออกซิเดส (oxidase) ที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาไฮดรอกซิเลชั่น (hydroxylation) ทำให้ไทโรซีนเปลี่ยนเป็นแอลโดปา (L-DOPA, 3,4-dihydroxypheny-lalanine)

ขั้นตอนที่ 2 แอลโดปาจะถูกออกซิไดส์เป็นโดปาควิโนน (DOPAquinine) ผ่านกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) และกระบวนการโพลีเมอร์ไรซ์เซชั่น (polymerization) ก่อนที่จะกลายเป็นเมลานินทั้งสองชนิดได้แก่ ยูเมลานิน (eumelanin) ซึ่งเป็นเม็ดสีเมลานินสีน้ำตาลที่จะถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) และเอนไซม์ DOPAchrome tautomerase (DCT หรือ TRP-2) และฟีโอเมลานิน (pheomelanin) ซึ่งเป็นเม็ดสีเมลานินสีแดงหรือสีเหลืองที่จะถูกกระตุ้นด้วยการคอนจูเกตกันระหว่างโดปาควิโนนกับซีสเตอีน (cysteine) หรือกลูตาไธโอน (glutathione)

ขั้นตอนที่ 3 เมลานินที่ผลิตได้ถูกส่งไปเก็บที่เมลาโนโซม จากนั้นจะถูกส่งต่อไปยังเคราติโนไซต์ที่อยู่ใต้ผิวหนังเพื่อแทนที่เซลล์ผิวหนังเก่าที่จะถูกผลัดทุก 28-39 วัน[15]

1.4 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีของสารสกัดจากแก่นมะหาด ที่ได้จากพืชไทย

1.4.2 เพื่อหาโครงสร้างสารที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้สารจากมะหาด (*Artocarpus lacucha*) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน เพื่อนำไปใช้ในทางการแพทย์และเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางได้

1.5.2. เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรไทยซึ่งอาจนำไปใช้ในด้านการแพทย์และเวชสำอาง

บทที่ 2

การทดลอง

2.1 พืชที่ใช้ในการทดลอง

แก่นมะหาด (*Artocarpus lacucha* heartwood*)* หนัก 1 กิโลกรัม จากร้านสมุนไพรดีดี

2.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

2.2.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- บีกเกอร์
- หลอดทดลอง
- กระจกนาฬิกา
- สำลี
- ขวดไวแอล (Vial)
- กรวยแก้ว
- หลอดแคปิลลารี
- ไมโครเพลต 96 หลุม (96 well plates)
- ขวดรูปกรวย
- ขวดก้นกลม
- แท่งแก้วคนสาร
- ช้อนตักสาร
- หลอดหยด
- กระบอกตวง
- คอลัมน์โครมาโตกราฟี
- ไมโครปิเปต

2.2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary vaccum evaporator) รุ่น Eyela rotary evaporator N-1000 บริษัท Tokyo Rikaikai และ รุ่น Buchi rotavapor R-114, Switzerland
- เครื่องชั่งน้ำหนักรุ่น Sartorrius Basic บริษัท Scientific promotion
- Sonicator (Branson, USA)
- Safety Laboratory Hood (Asia chemical and engineering Co., Ltd, Thailand)
- เครื่องให้ความร้อน (Hot plate) ของบริษัท IKA Labortechnik
- Nuclear Magnetic Resonances Spectrophotometer YH 400 ของบริษัท Bruker

- โปรแกรม GraphPad Prism version 8.4.0

2.3 สารเคมี

2.3.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับการแยกสารบริสุทธิ์

- ซิลิกาเจล เบอร์ 9385 และเบอร์ 7734 จากบริษัท Merck
- Sephadex LH-20 จากบริษัท GE healthcare
- ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ เฮกเซน, ไดคลอโรมีเทน, เอทิลอะซิเตต, อะซิโตน และเมทานอล
- แอมโมเนียมโมลิบเดตใน 5% กรดซัลฟิวริก เป็นสารละลายที่ทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์บนแผ่น TLC เพื่อให้เห็นจุดของสารบนแผ่น TLC ได้ชัดเจน

2.3.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย NMR Spectrophotometer

- acetone-d_6

2.3.3 สารเคมีสำหรับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน

- Sodium phosphate dibasic anhydrous (Na_2HPO_4)
- Hydrochloric acid (HCl)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, yellow color)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO, cell culture grade)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO, AR grade)
- arbutin
- Milli Q water

2.4 เซลล์ไลน์สำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

- เซลล์ผิวหนัง B16F10 melanoma

2.5 เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

2.5.1 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (column chromatography)[16]

เป็นเทคนิคการแยกสารที่ผสมกันอยู่ออกจากจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างในการ กระจายตัวที่ไม่เท่ากันของสารในวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือตัวดูดซับ และวัฏภาคเคลื่อนที่

(mobile phase) หรือตัวทำละลาย ในงานวิจัยนี้ใช้ซิลิกาเจลเป็นตัวดูดซับ ซึ่งจะถูกบรรจุลงในคอลัมน์ แก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเหมาะสมกับปริมาณสารที่ต้องการแยก โดยวิธีบรรจุแบบเปียก (wet packing) จากนั้นจึงเติมสารผสมที่ต้องการแยกลงไปด้านบนของคอลัมน์ ซึ่งสารผสมจะผ่านคอลัมน์ อย่างช้าๆ ก่อนที่จะเติมตัวทำละลายที่เหมาะสมลงไปเพื่อเป็นตัวพาสารเคลื่อนที่ผ่านตัวดูดซับใน คอลัมน์ ทำให้เกิดการแยกของสารที่มีสภาพขั้วแตกต่างกันเป็นแถบสารขึ้น สารที่ถูกดูดซับไว้ได้ดี (สารมีขั้วสูง) จะออกมาจากคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับได้ไม่ดี (สารมีขั้วต่ำ) หลังจากนั้น เก็บองค์ประกอบของสารที่แยกได้

1.5.2 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography, TLC)[16]

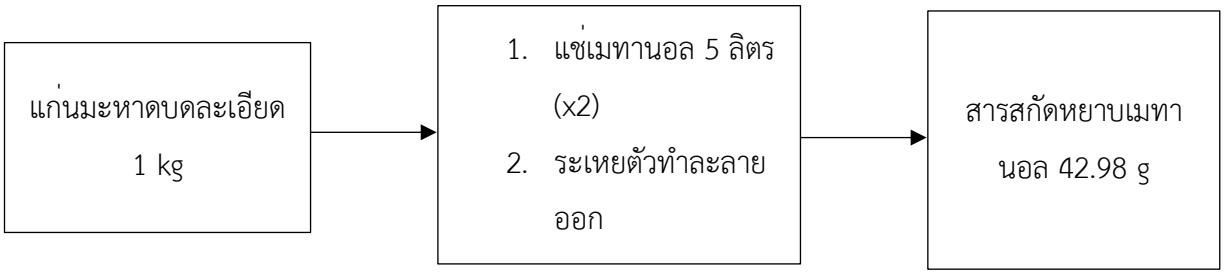
เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่รวดเร็วและสะดวก ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้นของสารระหว่างกระบวนการแยกสารในแต่ละขั้นตอน และใช้เพื่อหาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้ TLC aluminium sheets silica gel 60 F254 ตัดให้มีขนาดพอเหมาะ แล้วระบุระยะทางที่จะให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ ใช้หลอดแคปิลลารีแต้มสารลงไปบนแผ่น TLC ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากนั้นจึงนำแผ่นดังกล่าวไปวางลงในภาชนะปิดที่ใส่ตัวทำละลายที่เหมาะสมไว้อย่างเพียงเล็กน้อย ระดับตัวทำละลายไม่ ควรสูงเกินระดับที่แต้มสาร เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับด้วย capillary action ก็จะ พาสารขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารด้วยหลักการเดียวกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี คอยสังเกตรอย เปียกของตัวทำละลายที่ซึมขึ้นด้านบนของแผ่น TLC เมื่อมาถึงเกือบปลายด้านบนของแผ่น ห่างประมาณ 0.5 เซนติเมตร ก็ให้รีบเอาแผ่นออก ทิ้งให้แผ่น TLC แห้ง แล้วนำมาส่องกับแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เพื่อหาตำแหน่งการเคลื่อนที่ของสาร จากนั้นนำมาจุ่มสารละลายแอมโมเนียม โมลิบเดตใน 5% กรดซัลฟิวริก แล้วนำไปให้ความร้อนบนเตาให้ความร้อนประมาณ 1-2 นาที บันทึกตำแหน่งของสาร

2.6 ขั้นตอนการทดลอง

2.6.1 การสกัดหยาบด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

1. นำแก่นมะหาดที่ผ่านการตากแห้งและบดละเอียดแล้วทั้งหมด 1 กิโลกรัมมาแช่เมทานอล จำนวน 5 ลิตร เป็นเวลา 3 วัน และทำซ้ำอีกครั้ง

2. ใช้ผ้าขาวบางกรองเอาส่วนที่เป็นสารละลาย จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกไปโดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดหยาบเมทานอลหนัก 42.98 กรัม ดังแผนภาพที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากแก่นมะหาด

2.6.2 การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบเมทานอลของแก่นมะหาด เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมี โดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC)

1. แบ่งสารสกัดหยาบเมทานอลมาเล็กน้อย ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อทำการหาระบบของตัวทำละลายผสมหรือวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม สำหรับลงคอลัมน์เพื่อแยกองค์ประกอบทางเคมี โดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC)

2. นำสารสกัดหยาบเมทานอลทั้งหมด มาทำ quick column chromatography (QCC) โดย ใช้ซิลิกาเจลเป็นวัฏภาคนิ่ง ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่หรือตัวทำละลายคือ อะซิโตนในเฮกเซน อัตราส่วนตั้งแต่ 50-100% เพิ่มอัตราส่วนอะซิโตนขึ้นทีละ 10% จนสุดท้ายเป็นอะซิโตน 100%

3. เก็บส่วนย่อยที่ออกมาจากคอลัมน์ นำมาตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิค TLC แล้วนำส่วนย่อยที่มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกันมารวมกัน และระเหยตัวทำละลายออก ซึ่งได้ 8 ส่วนย่อย (a1-a8)

4. นำส่วนย่อย a3 มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้วัฏภาคอยู่กับที่คือเซฟาเดกซ์ (sephadex) และวัฏภาคเคลื่อนที่คือเมทานอล 100% แยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตนในเฮกเซน อัตราส่วน 70% ได้ผลลัพธ์เป็นส่วนย่อย 2A-2L และได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด ได้แก่ สารประกอบ 2C หนัก 5.70 มิลลิกรัม กับสารประกอบ 2G หนัก 9.50 มิลลิกรัม และพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR สเปกโทรสโกปี

5. นำส่วนย่อย 2F มาทำการแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยใช้วัฏภาคอยู่กับที่คือเซฟาเดกซ์ (sephadex) และวัฏภาคเคลื่อนที่คือเมทานอล 100% แยกเก็บแต่ละส่วนสกัดหยาบย่อยผ่านการทำ TLC โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ อะซิโตนในเฮกเซน อัตราส่วน 70% ได้ผลลัพธ์เป็น

ส่วนย่อย (2F-1) - (2F-3) และได้สารบริสุทธิ์ 1 ชนิด คือสารประกอบ 2F-2 หนัก 2.10 มิลลิกรัม และพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารด้วยเทคนิค NMR สเปกโทรสโกปี

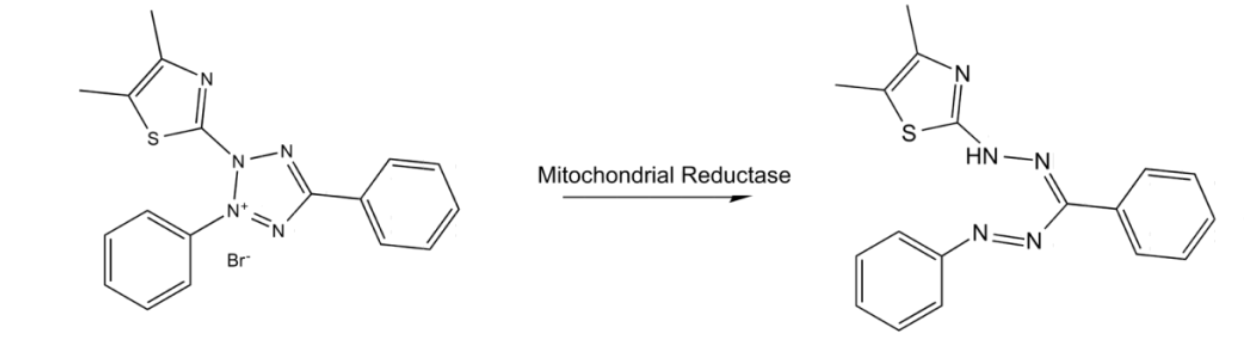
2.6.3 การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินบน 96-well plates

การทดสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินบน 96-well plates ซึ่งเป็นการวัดปริมาณการสร้างเม็ดสีเมลานินของเซลล์ B16F10 melanoma cell หลังจากการทดสอบด้วยสารที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของเม็ดสีเมลานินเทียบกับชุดควบคุม และสามารถคำนวณค่าเปอร์เซนต์ปริมาณของเมลานิน จากการนำข้อมูลมาพล็อตกราฟได้ โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมเซลล์ B16F10 melanoma cell ใน 24-well plates โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ หลุมละ $5x10^4$ cell/mL โดยใช้ปริมาตรหลุมละ 500 µL จากนั้นบ่มในสภาวะบรรยากาศที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2) นำสารที่ต้องการทดสอบความเข้มข้น 100 และ 10 µg/mL ปริมาตร 0.5 µL เติมลงไปในแต่ละหลุม จากนั้นบ่มในสภาวะบรรยากาศที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม และ Arbutin ที่ความเข้มข้น 1000 µM เป็น positive control)
3) ปิเปตอาหารจาก24-well plates หลุมละ 200 µL ใส่ลงใน 96-well plates เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 510 นาโนเมตร โดยใช้ Microplate reader
4) คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณของเมลานิน

2.6.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay) ด้วยวิธี MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นการวัดการเกิดรีดักชันของ MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) ด้วยเอนไซม์ Mitochondrial reductase ทำให้เกิดโครงสร้าง Formazan ที่มีสีม่วงเข้มขึ้น โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้นทำให้สามารถวัดปริมาณความอยู่รอดของเซลล์ได้[16]



รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาที่เกิดจาก MTT assay

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียมเซลล์ B16F10 melanoma cell ใน 24-well plates โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ หลุมละ $5x10^4$ cell/mL โดยใช้ปริมาตรหลุมละ 500 µL จากนั้นบ่มในสภาวะบรรยากาศที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) เติม MTT solution หลุมละ 10 µL บ่มในสภาวะบรรยากาศที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4) ปิเปตอาหารที่เติม MTT solution ออกแล้วเติม DMSO หลุมละ 250 µL

5) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ 570 นาโนเมตร โดยใช้ Microplate reader

6) คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์

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

OD_{test} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ใช้ทดสอบ

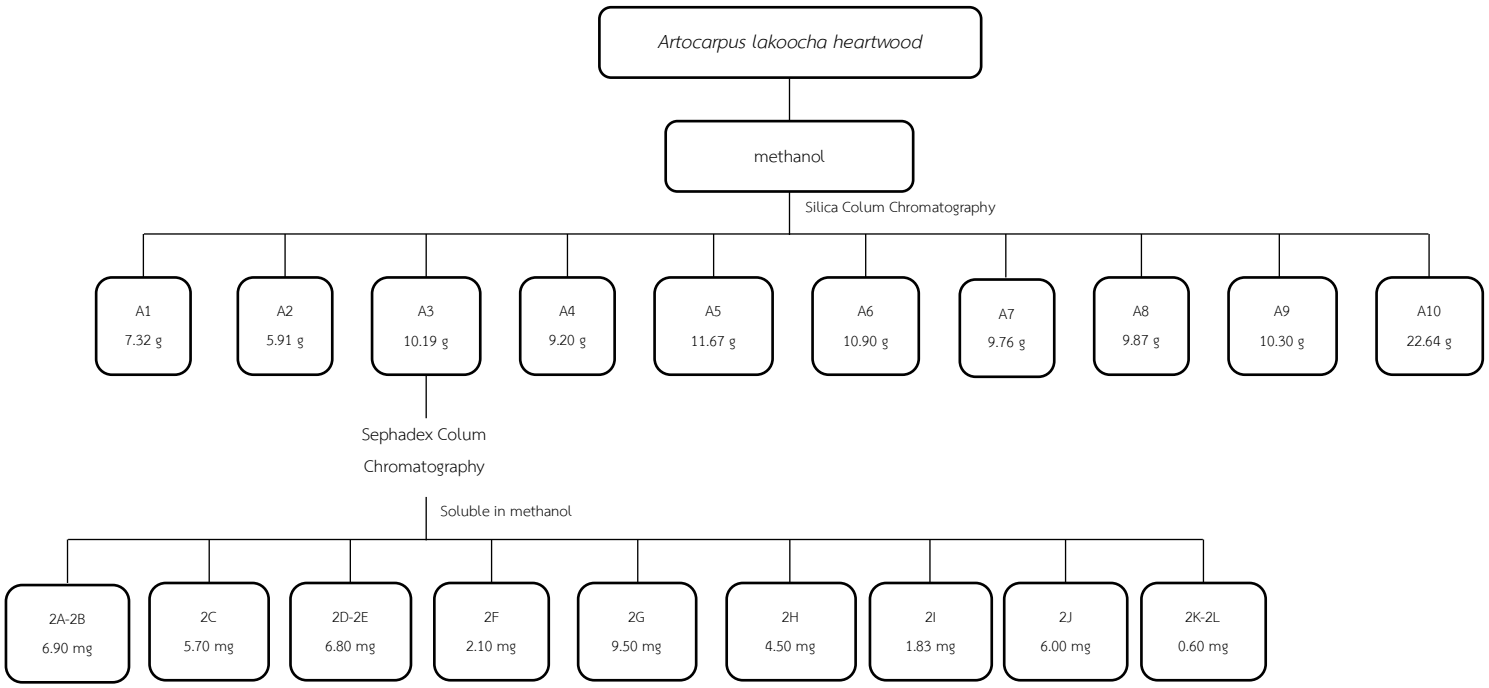
$OD_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

บทที่ 3
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การแยกสารสกัดจากมะหาด

จากการนำแก่นของมะหาดมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ได้สารสกัดหยาบปริมาณ 16.08 กรัม จากนั้นนำสารสกัดหยาบมาทำการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดังแผนภาพที่ 3.1

แผนภาพที่ 3.1 แสดงการสกัดแยกสารจากแก่นมะหาด



ได้ผลิตภัณฑ์เป็นส่วนสกัดหยาบย่อยที่ A1-A10 แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณของส่วนสกัดหยาบย่อยที่ A1-A10

ส่วนสกัดหยาบย่อยที่	ปริมาณ (g)
A1	7.32
A2	5.91
A3	10.19

A4	9.20
A5	11.67
A6	10.90
A7	9.76
A8	9.87
A9	10.30
A10	22.64

จากนั้นนำส่วนสกัดหยาบย่อยที่น่าสนใจจากการใช้เทคนิค TLC มาสกัดแยกต่อ ซึ่งได้แก่ส่วนสกัดหยาบย่อยที่ A3 มาทำการสกัดแยกสารต่อโดยใช้เทคนิค column chromatography ที่แตกต่างกัน ได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือ 2C, 2F และ 2G และส่วนสกัดหยาบย่อย 6 ส่วนดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณของส่วนสกัดหยาบย่อยที่ 2A-2L จากส่วนสกัด A3

ส่วนสกัดหยาบย่อยที่	ปริมาณ (mg)
2A-2B	6.90
2C (สารบริสุทธิ์)	5.70
2D-2E	6.80
2F (สารบริสุทธิ์)	2.10
2G (สารบริสุทธิ์)	9.50
2H	4.50
2I	1.83
2J	6.00

จากการสกัดแยกสารทั้งหมดได้ผลลัพธ์เป็นสารบริสุทธิ์จำนวน 3 ชนิด ซึ่งได้มาจากส่วนสกัดหยาบย่อย A3 ซึ่งสาร 2C คือ 5,5′-(1*Z*)-1,2-ethenediylbis[1,3-benzenediol] (ACI) ปริมาณ 5.70 มิลลิกรัม มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{14}H_{12}O_4$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 244.2460 กรัมต่อโมล, สาร 2F คือ dihydroxyresveratrol ปริมาณ 2.10 มิลลิกรัม มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{14}H_{14}O_4$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 246.2620 กรัมต่อโมล และสาร 2G คือ resveratrol ปริมาณ 9.50 มิลลิกรัม มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{14}H_{12}O_3$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 228.25 กรัมต่อโมล

3.2 การวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

จากการนำสารบริสุทธิ์ทั้ง 3ชนิดมาวิเคราะห์โครงสร้างโดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR Spectroscopy) ซึ่งได้แก่ โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (^{1}H-NMR) ได้ผลดังนี้

1) สาร 5,5′-(1*Z*)-1,2-Ethenediylbis[1,3-benzenediol] (ACI) (2C)

จาก ^{1}H NMR spectrum พบสัญญาณแบบ triplet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 3 และ 5 ที่ δ_H 6.95 ppm สัญญาณแบบ singlet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 2’ ที่ δ_H 6.32 ppm สัญญาณแบบ singlet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 4’ ที่ δ_H 6.31 ppm สัญญาณแบบ singlet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 6’ ที่ δ_H 6.29 ppm

จากข้อมูล ^{1}H NMR ของสารที่ได้ เมื่อเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อน[17] ทำให้ทราบว่าสารนี้คือ 5,5′-(1*Z*)-1,2-Ethenediylbis[1,3-benzenediol] (ACI) และมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 3.1

2) สาร dihydroxyresveratrol (2F)

จาก ^{1}H NMR spectrum พบสัญญาณแบบ triplet ของโปรตอนบนหมู่ hydroxy ตำแหน่งที่ 3, 5, 4’ และ 6’ ที่ δ_H 8.13 ppm (*J*=8.03, 7.96 Hz) สัญญาณแบบ doublet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 2’ ที่ δ_H 6.85 ppm สัญญาณแบบ singlet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 4’ δ_H 6.36 ppm สัญญาณแบบ singlet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 3’, 5’ และ 4 ที่ δ_H 6.21 ppm สัญญาณแบบ singlet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 2, 6 δ_H 6.14 ppm

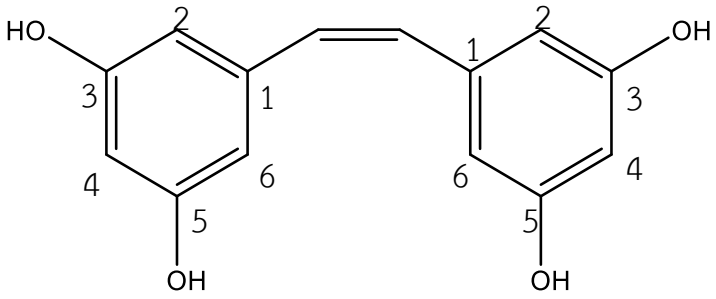
จากข้อมูล ^{1}H NMR ของสารที่ได้ เมื่อเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อน[18] ทำให้ทราบว่าสารนี้คือ dihydroxyresveratrol และมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 3.2

3) สาร resveratrol (2G)

จาก ^{1}H NMR spectrum พบสัญญาณแบบ doublet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 2’และ 6’ ที่ δ_H 7.40 ppm (*J*=7.38 Hz) สัญญาณแบบ doublet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 7 หรือ 88 ที่ δ_H 7.00 ppm (*J*=6.97 Hz) สัญญาณแบบ doublet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 7 หรือ 8 ที่ δ_H 6.83 ppm (*J*=6.81 Hz) สัญญาณแบบ doublet ของโปรตอนตำแหน่ง 3’ และ 5’ ที่ δ_H 6.80 ppm

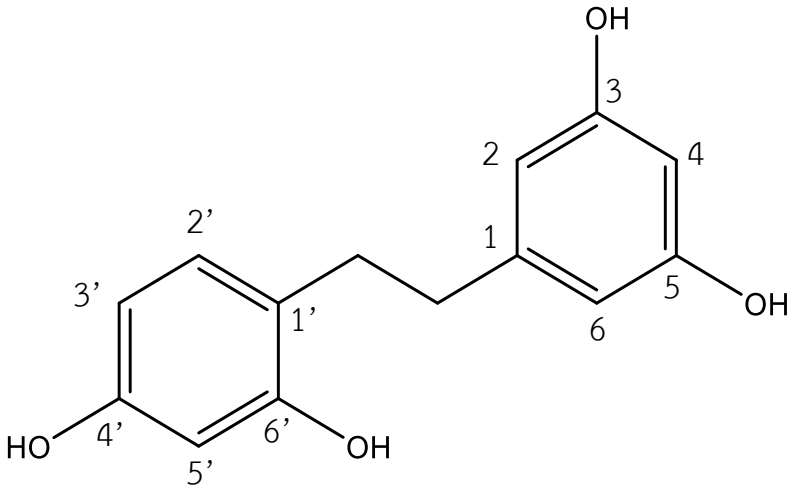
สัญญาณแบบ doublet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 2 และ 6 ที่ δ_H 6.51 ppm (*J*=6.50 Hz) สัญญาณแบบ singlet ของโปรตอนตำแหน่งที่ 4 ที่ δ_H 6.24 ppm (*J*=6.23 Hz)

จากข้อมูล ^{1}H NMR ของสารที่ได้ เมื่อเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานมาก่อน[19] ทำให้ทราบว่าสารนี้คือ resveratrol และมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 3.3



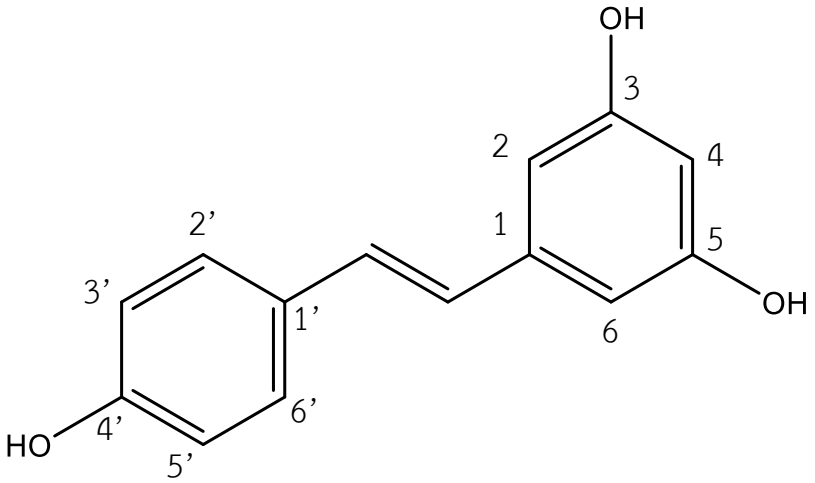
Chemical Formula: $C_{14}H_{12}O_4$
Molecular Weight: 244.2460

รูปที่ 3.1 โครงสร้างทางเคมีของสาร 5,5′-(1*Z*)-1,2-Ethenediylbis[1,3-benzenediol] (ACI)



Chemical Formula: $C_{14}H_{14}O_4$
Molecular Weight: 246.2620

รูปที่ 3.2 โครงสร้างของสาร dihydroxyresveratrol



Chemical Formula: $C_{14}H_{12}O_3$
Molecular Weight: 228.2470

รูปที่ 3.3 โครงสร้างของสาร resveratrol

3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน (anti - melanogenesis assay)

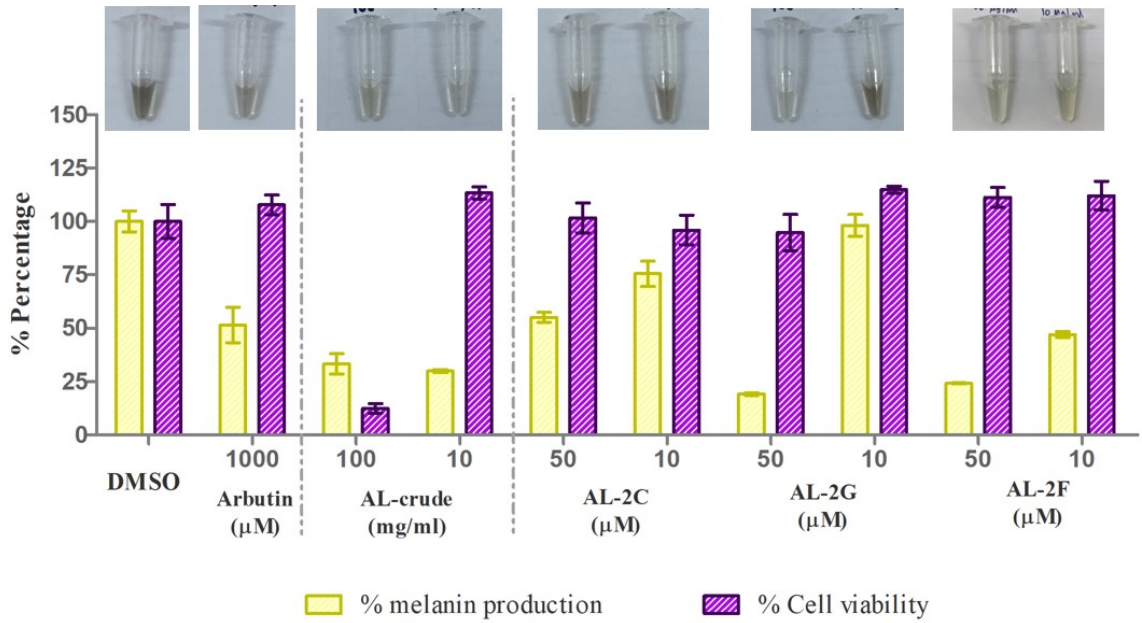
จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16 melanoma ของสารที่แยกได้จากแก่นมะหาด โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง สามารถคำนวณปริมาณเมลานินที่ถูกผลิต (% melanin production) โดยเปรียบเทียบกับ arbutin ที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก พบว่าผลของ arbutin ที่ทดสอบมีค่าการยับยั้งการผลิตเมลานินได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยอ้างอิง[20] แสดงว่าการทดลองที่ทำมีประสิทธิภาพในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน และเมื่อนำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบ พบว่าสารบริสุทธ์ 5,5′-(1*Z*)-1,2-ethenediylbis[1,3-benzenediol] (2C), dihydroxyresveratrol (2F) และ resveratrol(2G) มีปริมาณเมลานินที่ถูกผลิตที่น้อยกว่าหรือใกล้เคียงกับ arbutin แสดงว่าสารบริสุทธ์เหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับ arbutin โดยสาร 5,5′-(1*Z*)-1,2-ethenediylbis[1,3-benzenediol] (2C), dihydroxyresveratrol (2F) และ resveratrol (2G) โดยที่ความเข้มข้น 10 μM มีปริมาณเมลานินที่ถูกผลิต (% melanin production) เท่ากับ 75.52%, 84.20% และ 47.08% ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 50 μM เท่ากับ 55.10%, 19.16% และ 24.17% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า resveratrol (2G) สามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ดีที่สุด คือมากกว่า 80% ที่ความเข้นข้น 50 μM และยังพบว่าส่วนสกัดหยาบเมทานอล ที่ความเข้มข้น 100 μg/mL มีปริมาณเมลานินที่ผลิตน้อยกว่า arbutin ซึ่งมีสาเหตุมาจากการที่ส่วนสกัดหยาบมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเห็นได้จากเปอร์เซนต์

การรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) อยู่ที่ 12.42% แม้ว่าผลการทดสอบที่ได้พบว่า resveratrol (2G) ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดและเป็นสารที่ทราบอยู่แล่วว่ามีฤทธิ์นี้ แต่สารอีกสองตัวที่ได้ยังไม่มีการรายงาน และนอกจากนี้ยังมีสารอนุพันธ์ของกลุ่มนี้อีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้แยกออกมาและศึกษาฤทธิ์ เนื่องจากสถานการณ์โควิด ซึ่งชี้ให้เห็นว่าควรทำการศึกษาสารกลุ่มนี้และฤทธิ์ยับยั้งเมลานินของมะหาดต่อไป

3.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay) ด้วยวิธี MTT assay

เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารบริสุทธ์ที่แยกได้จากแก่นมะหาดต่อเซลล์ B16F10 โดยใช้วิธี MTT พบว่าความเข้มข้นทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ ที่ 48 ชั่วโมงสารบริสุทธ์ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แม้ที่ความเข้มข้น 50 μM ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ โดยพิจารณาจากเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% cell viability) มากกว่า 80% ยกเว้นสกัดหยาบ ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml

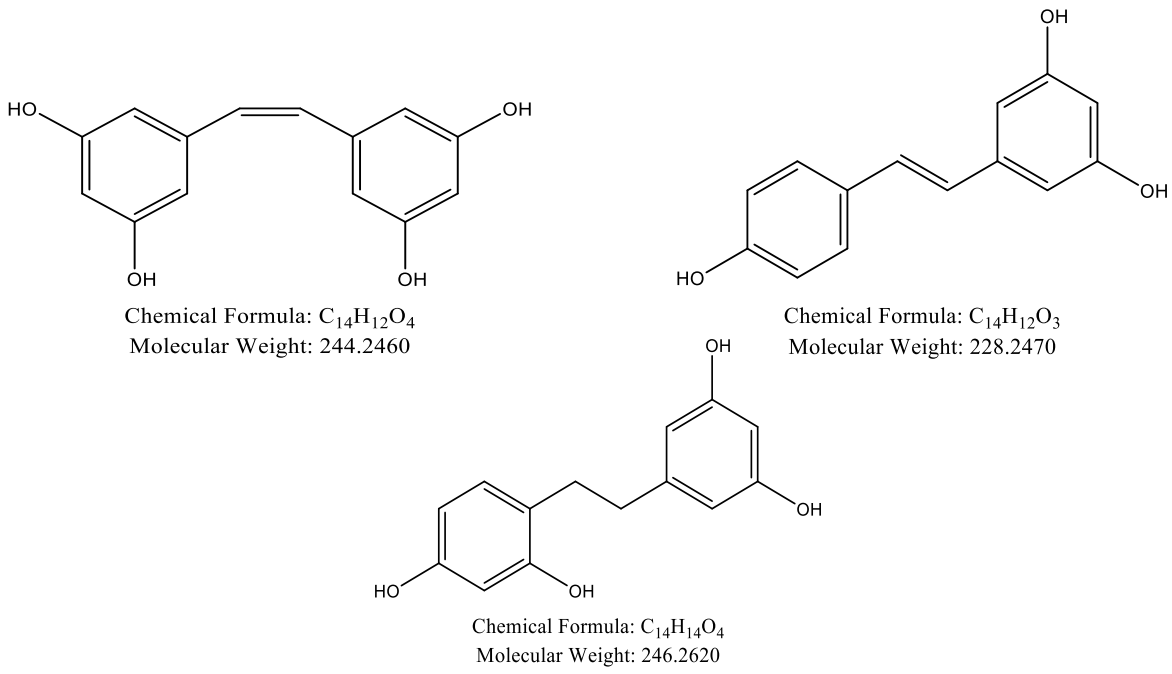
รูปที่ 3.4 กราฟแสดงผลของสารที่แยกได้ต่อ % melanin production และ cell viability ของเซลล์ B16F10



* Arbutin ใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวก(Positive control)

บทที่ 4
สรุปผลการทดลอง

จากการนำสารสกัดหยาบเมทานอลของแก่นมะหาด มาแยกให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคคอลัมน์โคมาโตกราฟี พบว่าได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิดคือ ได้แก่ 5,5′-(1*Z*)-1,2-ethenediylbis[1,3-benzenediol] (ACI) ปริมาณ 5.70 มิลลิกรัม dihydroxyresveratrol ปริมาณ 2.10 มิลลิกรัม และ resveratrol ปริมาณ 9.50 มิลลิกรัม โดยสารทั้งสามชนิดได้พิสูจน์ทราบโครงสร้างจากวิธีทางสเปคโตสโคปี



รูปที่ 4.1 โครงสร้างสารที่แยกได้จากแก่นมะหาด

เมื่อนำสารทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16 บน 96-well plates โดยมี arbutin เป็นสารควบคุม สารที่สกัดได้จากแก่นมะหาดทั้งสามชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินน โดย 5,5′-(1*Z*)-1,2-ethenediylbis[1,3-benzenediol] (2C), dihydroxyresveratrol (2F) และ resveratrol (2G) โดยที่ความเข้มข้น 10 μM มีปริมาณเมลานินที่

ถูกผลิต (% melanin production) เท่ากับ 75.52%, 84.20% และ 47.08% ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 50 μM เท่ากับ 55.10%, 19.16% และ 24.17% ตามลำดับ และเป็นไปได้ว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เนื่องจากเอนไซม์ไทโรซิเนสมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้ร่างกายผลิตเม็ดสีเมลานิน หากมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินให้ลดลงได้ เอนไซม์ไทโรซิเนสก็จะลดลงเช่นกัน โดยพบว่า resveratrol (2G) มีปริมาณเมลานินที่ถูกผลิต (% melanin production) ต่ำที่สุด แสดงว่าให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุด โดยมีค่า % melanin production เท่ากับ 19.16 % ที่ความเข้นข้น 50 μM นอกจากนี้ยังพบว่าสารทั้ง 3 ชนิด ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ B16 ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบ 50 μM แม้ว่าผลการทดสอบที่ได้พบว่า resveratrol ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดและเป็นสารที่ทราบอยู่แล่วว่ามีฤทธิ์นี้ แต่สารอีกสองตัวที่ได้ยังไม่มีการรายงาน นอกจากนี้จากการทำวิจัยยังมีสารอนุพันธ์ของกลุ่มนี้อีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้แยกออกมาและศึกษาฤทธิ์ เนื่องจากสถานการณ์โควิด ซึ่งชี้ให้เห็นว่าควรทำการศึกษาสารกลุ่มนี้และฤทธิ์ยับยั้งเมลานินของมะหาดต่อไปเพื่อเป็นข้อมูลที่จะนำไปต่อยอดการนำไปใช้เชิงเวชสำอางที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเม็ดสีเมลานินได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

[1] Schmid, T,; Charles, W. UV Radiation & Skin Cancer: The Science behind Age Restriction for Tanning Beds. Environmental Health Perspectives **2012**, 120, 310-313.

[3] Arung, E. T.; Shimizu, K.; Kondo, R. Artocarpus Plants as a Potential Source of Skin Whitening Agents. Natural Product Communications **2011**, 6, 1397-1402.

[4] Singhatong, S.; Leelarungrayub, D.; Chaiyasut, C. Antioxidant and toxicity activities of Artocarpus lakoocha Roxb. heartwood extract. Journal of Medicinal Plants Research *Volume*. **2010**, 4(10), 947-953.

[5] Rodboon, T.; Puchadapirom, P.; Okada, S.; Suwannalert, P. Oxyresveratrol from Artocarpus lakoocha Roxb. Inhibit Melanogenesis in B16 Melanoma Cells through the Role of Cellular Oxidants. Walailak Journal of Science and Technology **2016**, 13, 261-270.

[6] Namdaung, U.; Rassamee, K.; Siripong, P.; Suksamrarn, S. Cytotoxic activity against B16F10 metastatic melanoma cells of Artocarpus lacucha root. KKU Sci. J. **2017**, 45(2), 254-261.

[7] K. Hałdysa, W. Goldemanb, M. Jewgiskia, E. Woliskaa, N. Angerc, J. Rossowskac, R. and Latajka, Inhibitory properties of aromatic thiosemicarbazones on mushroom tyrosinase: Synthesis, kinetic studies, molecular docking and effectiveness in melanogenesis inhibition, *Bioorganic Chemistry,* **2018**, 81, 577-586.

[8] ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. “**มะหาด**” from. www.phargarden.com. (accessed 30.07.14).

[9] Gupta, A.K., Pathak, U., Medhi, M., Mastinu, A., Sikarwar, M.S. and Mishra, P. (). Botanical, Chemical and Pharmacological Properties of *Artocarpus lakoocha* (Monkey fruit), Agricultural Reviews, **2020**, 42(4), 1-12.

[10] Komutiban, O., Antioxidant Activity of Crude Extracts from the Heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb., SDU Res. Journal, **2014**, 7(2).

[11] Laovachirasuwan, P., Phadungkit, M., Namsawang, T., Khumphuwiang, J., Chaemphudsa, C., Oxyresveratrol content and tyrosinase inhibitory activity of Artocarpus lakoocha heartwood extract, Journal of Science and Technology Mahasarakham University, **2015**, 34(6), 547-50.

[12] Chemical Constituents of Artocarpus lakoocha Roxb. from. http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=187

[13] OHSU Knight Cancer Institute, Melanoma and Other Skin Cancers, Retrieved from. https://www.ohsu.edu/knight-cancer-institute/melanoma-and-other-skin-cancers (accessed 20.02.08).

[14] Insain, P., Inhibition of Melanogenesis from Thai Berries, EAU Heritage Journal Science and Technology, **2018**, 12(2), 69-82.

[15] Pillaiyar, T., Manickam, M., and Namasivayam, V., Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors, Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, **2017**, 32(1), 403-425.

[16] S. Rodrigues, A., Garcia, M., Rabi, J., Facile biomimetic synthesis of costunolide-1,10-epoxide, santamarin and reynosin, Phytochemistry, **1978**, 17, 953-954.

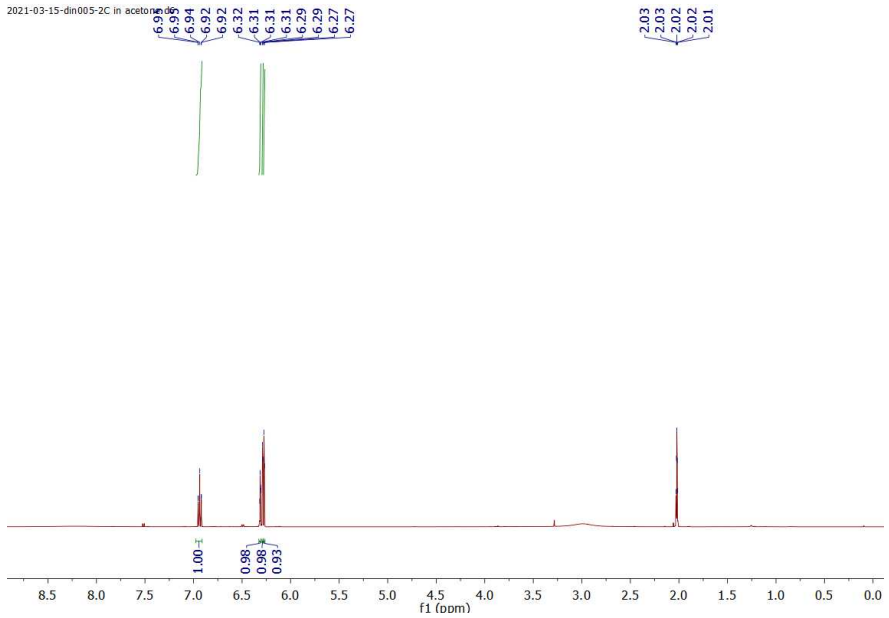
[17] Taima, M., Ishida, Y., and Arai, T., Intramolecular energy transfer and photoisomerization in stilbene dendrimers, Canadian Journal of Chemistry, **2017**, 95(9), 1013-1023.

[18] Tanaka, Y., Suzuki, M., Kodachi, Y., and ichi, K., Molecular design of potent, hydrophilic tyrosinase inhibitors based on the natural dihydrooxyresveratrol skeleton, Carbohydrate Research, **2019**, 472, 42-49.

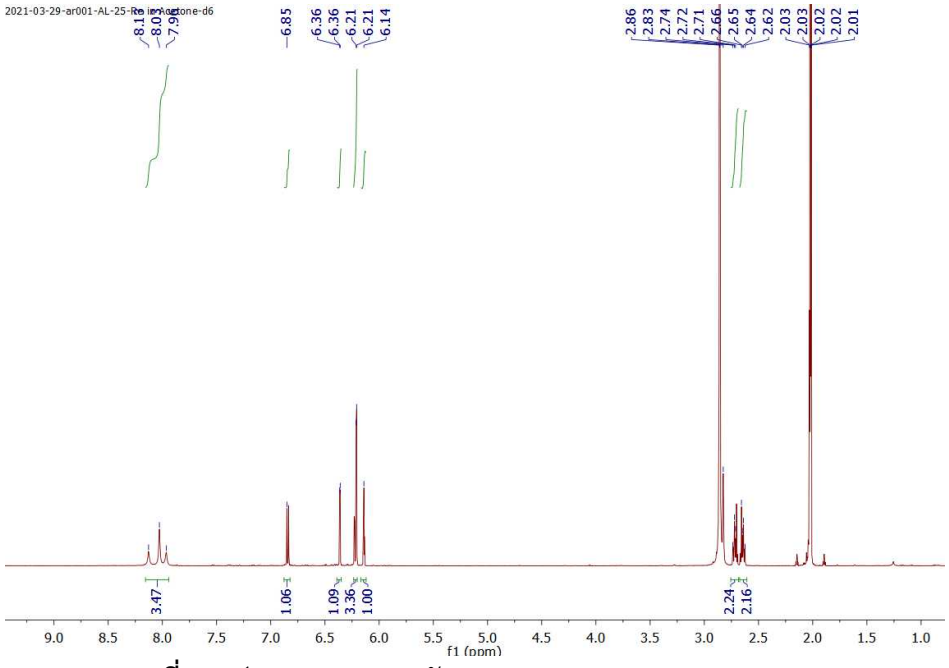
[19] B. Joseph A., and S. David A., Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence, Nature Reviews Drug Discovery, **2006**, 6(5), 493-506.

[20] Lim, Y. J., Lee, E. H., Kang, T. H., Ha, S. K., Oh, M. S., Kim, S. M., Yoon, T. J., Kang, C., Park, J. H., Kim, S. Y., Inhibitory Effects of Arbutin on Melanin Biosynthesis of **α**-Melanocyte Stimulating Hormone-induced Hyperpigmentation in Cultured Brownish Guinea Pig Skin Tissues, Arch Pharm Res, **2009**, 32(30), 367-373.

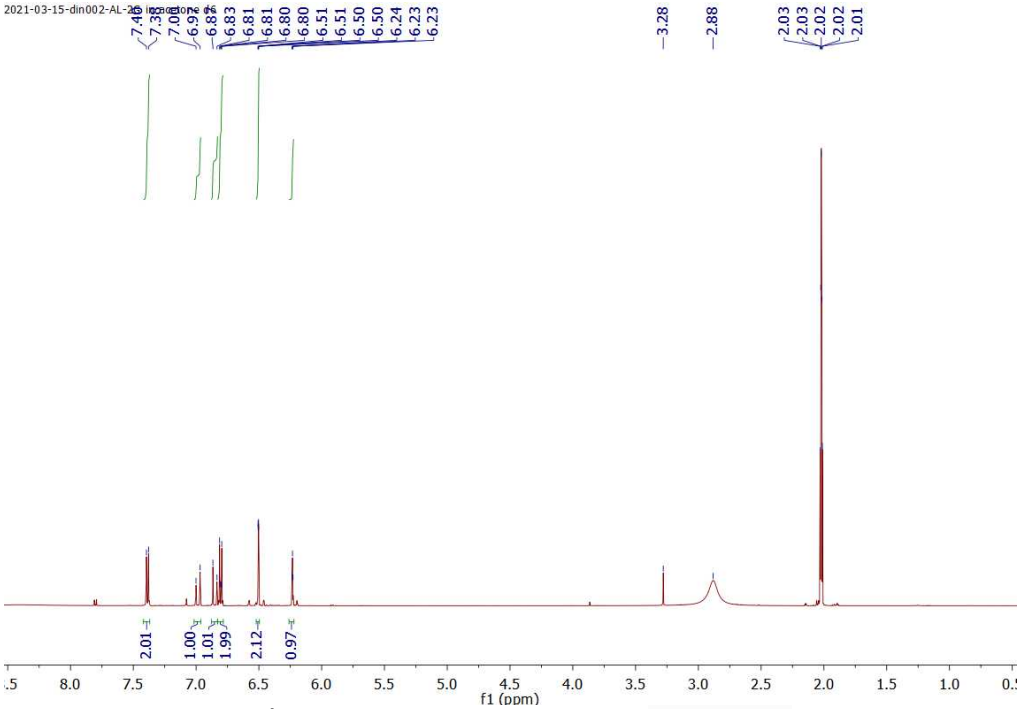
ภาคผนวก



รูปที่ A.1 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร 5,5′-(1*Z*)-1,2-Ethenediylbis[1,3-benzenediol] (ACI)



รูปที่ A.2 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร Dihydroxyresveratrol



รูปที่ A.3 ^{1}H-NMR สเปกตรัมของสาร Resveratrol

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวพิมพ์ชนก ปัญญาไชยพัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 25 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2542 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนนวมินทราชินูทิศ หอวังนนทบุรี จังหวัดนนทบุรี เมื่อปีการศึกษา 2559 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2560 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 153/40 ตำบลบ้านกลาง อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี รหัสไปรษณีย์ 12000 อีเมล kaopan.p@hotmail.com