การประเมินฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดรากหัวผักกาดขาวเพื่อการนำมาใช้ทางเครื่องสำอาง

นางสาว รัตนมณี จักรเมธากุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-3405-7

EVALUATION OF ANTITYROSINASE AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *RAPHANUS SATIVUS* ROOT EXTRACT FOR COSMETIC APPLICATIONS

Miss Rattanamanee Jakmatakul

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmaceutics
Department of Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

ISBN 974-14-3405-7

Thesis Title	Evaluation of antityrosinase and antioxidant activities of *Raphanus sativus* root extract for cosmetic applications
By	Miss Rattanamanee Jakmatakul
Field of Study	Pharmaceutics
Thesis Advisor	Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Rutt Suttisri, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Uthai Suvanakoot, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Rutt Suttisri, Ph.D.)

.....Member

(Angkana Tantituvanont, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Adisak Wongkajornsilp, Ph.D.)

รัตนมณี จักรเมธากุล: การประเมินฤทธิ์ ต้านไทโรซิเนส และ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดรากหัวผักกาดขาวเพื่อการนำมาใช้ทางเครื่องสำอาง. (EVALUATION OF ANTI-TYROSINASE AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *RAPHANUS SATIVUS* ROOT EXTRACT FOR COSMETIC APPLICATIONS)
อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนวย, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. รุทธ์ สุทธิศรี, 184 หน้า. ISBN 974-14-3405-7.

การนำพืชจากธรรมชาติมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อทำให้ผิวขาวขึ้นและลดเลือนริ้วรอยเป็นที่นิยมกันมาก เป็นเวลานานมาแล้วที่ผู้หญิงไทยนิยมนำรากหัวผักกาดขาวสดมาใช้ในการรักษาฝ้าแต่ยังไม่มีการศึกษาอย่างเป็นวิชาการ การศึกษานี้ทำการสกัดสารสกัด 2 ชนิดจากรากหัวผักกาดขาวด้วยน้ำและทำให้แห้งด้วยการ freeze dried และเมทานอลโดยเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกโดยรวม ฟลาโวนอยด์โดยรวมและวิตามินซีในสารสกัดทั้ง 2 ชนิด พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณฟีนอลิกโดยรวม ฟลาโวนอยด์โดยรวมและวิตามินซีต่อ 1 มิลลิกรัมน้ำหนักแห้งของสารสกัดมากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล โดยมีปริมาณเท่ากับ 10.09 ± 0.07, 0.51 ± 0.007 และ 24.11 ± 0.01 ไมโครกรัมสำหรับสารสกัดด้วยน้ำ และ 6.59 ± 0.05 , 0.33 ± 0.004 และ 8.28 ± 0.20 ไมโครกรัมสำหรับสารสกัดด้วยเมทานอล ตามลำดับ สำหรับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดเปรียบเทียบกับสารสกัดชะเอมและวิตามินซี พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล (ความเข้มข้นในการยับยั้งเอนไซม์ 50% เท่ากับ 3.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับสารสกัดด้วยน้ำและ 9.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับสารสกัดด้วยเมทานอล) แต่น้อยกว่าสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใช้เปรียบเทียบ สำหรับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดนั้นได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ 3 ชนิดคือ อนุมูลอิสระดีพีพีเอช ซูเปอร์ออกไซด์ และซิงเกลต ออกซิเจน เปรียบเทียบกับโทรลอกซ์และวิตามินซี พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจะให้ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดด้วยเมทานอลไม่ว่าจะเป็นอนุมูลดีพีพีเอช (ความเข้มข้นในการยับยั้งอนุมูลอิสระ 50% เท่ากับ 0.643 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับสารสกัดด้วยน้ำ และ 1.248 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับสารสกัดด้วยเมทานอล) ซูเปอร์ออกไซด์(ความเข้มข้นในการยับยั้งเอนุมูลอิสระ 50% เท่ากับ 4.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับสารสกัดด้วยน้ำ และ 6.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับสารสกัดด้วยเมทานอล) หรือ ซิงเกลต ออกซิเจน (ความเข้มข้นในการต้านออกซิเดชัน 50% เท่ากับ 1.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับสารสกัดด้วยน้ำและ 2.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับสารสกัดด้วยเมทานอล) แต่พบว่ายังน้อยกว่าสารต้านออกซิเดชันที่ใช้เปรียบเทียบ นอกจากนี้การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดต่อเซลล์ด้วยวิธีแอลดีเอช พบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ให้ความเป็นพิษที่ต่ำมากแม้ในความเข้มข้นที่สูง จากข้อมูลการศึกษานี้ จึงเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดด้วยน้ำซึ่งเตรียมได้ง่ายและราคาไม่แพง มาใช้เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและสารต้านออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไป

ภาควิชา	เภสัชกรรม	ลายมือชื่อนิสิต.....รัตนมณี จักรเมธากุล.....
สาขาวิชา	เภสัชกรรม	ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....Pakpoom Tengamnuay.....
ปีการศึกษา	2549	ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....รุทธ์ สุทธิศรี.....

##4676612333 : MAJOR PHARMACY
KEYWORD: *RAPHANUS SATIVUS*/RADISH/TYROSINASE INHIBITORS/FREE RADICAL SCAVENGING

RATTANAMANEE JAKMATAKUL: EVALUATION OF ANTI-TYROSINASE AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF *RAPHANUS SATIVUS* ROOT EXTRACT FOR COSMETIC APPLICATIONS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D.,THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. RUTT SUTTISRI, Ph.D. 184 pp. ISBN 974-14-3405-7.

There is considerable demand for skin whitening and anti-wrinkle/anti-aging from natural plants. Thai women have long used fresh white radish root as a treatment of melasma although no systematic study has been made. In this study, two extracts (freeze-dried water extract and methanol extract) from the root of Thai radish (*Raphanus sativus* L.) were compared and evaluated to determine their role in protection of skin against melasma and aging. The two extracts were assayed for total phenolics, total flavonoids and vitamin C content. The total phenolics, total flavonoids and vitamin C content of the two extracts expressed as per 1 mg on the extract weight basis were 10.09 ± 0.07, 0.51 ± 0.007 and 24.11 ± 0.01 µg for freeze-dried water extract and 6.59 ± 0.05, 0.33 ± 0.004 and 8.28 ± 0.20 µg for methanol extract, respectively. Data showed that freeze-dried water extract had higher total phenolics, total flavonoids and vitamin C content than methanol extract. Anti-tyrosinase activity of the two extracts was also measured and compared with that of licorice extract and L-ascorbic acid. Freeze-dried water extract apparently showed higher extent of tyrosinase inhibition than methanol extract (IC_{50} = 3.09 and 9.62 mg/ml, respectively) but generally lower anti-tyrosinase activity than other reference anti-tyrosinase agent. The antioxidant properties of the two extracts were also tested for their scavenging effect on DPPH radical, superoxide anion and singlet oxygen and compared with those of Trolox® and L-ascorbic acid. Freeze-dried water extract exhibited higher potency than methanol extract (IC_{50} = 0.643 and 1.248 mg/ml for antioxidant activity against DPPH, 4.20 and 6.28 mg/ml for superoxide anion scavenging activity and 1.42 and 2.40 mg/ml for singlet oxygen scavenging activity) but generally lower than other reference antioxidants. The *in-vitro* cytotoxicity of the two extracts were determined by LDH assay. Both the freeze-dried water extract and methanol extract showed mild cytotoxicity even at high concentrations. Considering its various properties, the inexpensive and easily available freeze-dried water extract has potential for use in both the pharmaceutical and cosmetic applications.

Department	Pharmacy	Student Signature Rattanamanee Jakmatakul
Field of Study	Pharmaceutics	Advisor's Signature Parkpoom Tengamnuay
Academic Year	2006	Co-advisor's Signature Rutt Suttisri

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Parkpoom Tengamnuay, for his helpful suggestion, good guidance, extremely valuable encouragement and understanding throughout the course of my study.

I am very grateful to Associate Professor Dr. Rutt Suttisri, my co-advisor, for his kindness, helpful comments, valuable advice and correction of this thesis.

I would like to thank Associate Professor Dr. Uthai Suvanakoot, Dr. Angkana Tantituvanont and Assistant Professor Dr. Adisak Wongkajornsilp for being my thesis committee.

Sincere thank goes to all staff members of Pharmacy Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences and Graduate School, Chulalongkorn University for granting partial financial support to fulfill this study. I would also like to express my thank to those whose names have not been mentioned but their assistance and encouragement firmly deserve acknowledgement.

Special thank goes to my lovely friends for their love and cheerfulness. Finally, the greatest thank and love go to my family for their love, inspiration, encouragement and continued support throughout these past few years until I have completed my study successfully.

CONTENTS

Page

LIST OF TABLES

Table **Page**

Table **Page**

Table **Page**

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

Figure **Page**

Figure **Page**

LIST OF ABBREVIATIONS

abs	=	absorbance
$AlCl_3$	=	aluminium chloride
°C	=	degree of Celsius
cm	=	centimeter
conc.	=	concentration
CV	=	coefficient of variation
DMEM	=	Dulbecco's modified eagle medium
e.g.	=	exempli gratia, for example
et al.	=	et alii, and other
g	=	gram
µg	=	microgram
µl	=	microliter
H_2O	=	water
H_2O_2	=	hydrogen peroxide
HO	=	hydroxyl radical
IC_{50}	=	median inhibitory concentration
LDH	=	lactate dehydrogenase
m	=	meter
MeOH	=	methanol
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mw	=	milliwatt
MW	=	molecular weight
nm	=	nanometer
no.	=	number
NaOCl	=	sodium hypochlorite
PBS	=	phosphate buffer solution
pH	=	The negative logarithm of the hydrogenion concentration
R^2	=	coefficient of determination
$^1O_2$	=	singlet oxygen

SD	=	standard deviation
UV	=	ultraviolet