โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของสารประกอบทางเคมีต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
Effect of Chemical Compounds on Tyrosinase Inhibition

ชื่อนิสิต นายภูวนัย เวฬุวนารักษ์ **เลขประจำตัว** 5932042923

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของสารประกอบทางเคมีต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Effect of Chemical Compounds on Tyrosinase Inhibition

นายภูวนัย เวฬุวนารักษ์

อาจารย์ที่ปรึกษา
ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีชา ภูวไพรศิริศาล

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	:	ผลของสารประกอบทางเคมีต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	:	นายภูวนัย เวฬุวนารักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	:	รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ภูวไพรศิริศาล
ภาควิชา	:	ชีววิทยา

บทคัดย่อ

เมลานิน (melanin) เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการสร้างเม็ดสี (pigmentation) เพื่อตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมโดยกระบวนการสร้างเม็ดสีในผิวหนังและดวงตาของมนุษย์ ซึ่งถูกสร้างขึ้นภายในเมลาโนไซต์ (melanocytes) ในชั้นผิวหนังกำพร้า (epidermis) เพื่อตอบสนองต่อรังสี UVB กระบวนการสังเคราะห์เมลานินเรียกว่า melanogenesis จะเก็บเมลานินที่สังเคราะห์ขึ้นไว้ในเมลาโนโซม (melanosome) เพื่อขนส่งไปยัง keratinocyte ข้างเคียงในชั้นหนังกำพร้า การสร้างเมลานินที่มากจนเกินไปจะทำให้เกิดปัญหาทางผิวหนัง เช่น จุดด่างดำ หรืออาจพัฒนาไปเป็นมะเร็งผิวหนังได้ นอกจากนี้การได้รับรังสียูวีอย่างต่อเนื่องทำให้ดีเอ็นเอเสียหาย (DNA damage) การเกิดมิวเทชันของยีน ระบบภูมิคุ้มกันแย่ลง หรือเกิดการทำลายผิวหนังจากแสงแดด (photoaging) จึงนำมาสู่งานวิจัยนี้เพื่อหาตัวยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์จำกัดอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่สำคัญในการเร่งการสังเคราะห์เมลานิน ด้วยการใช้สารสกัดบริสุทธิ์ 3 ชนิด มาทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการยับยั้งไทโรซิเนส และคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์ที่ร้อยละ 50 (IC_{50}) จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส เมื่อเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวกโกจิกแอซิดที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.588 มิลลิโมลาร์ และร้อยละในการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามความเข้มของโกจิกแอซิดอย่างเป็นเส้นตรง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อหาตัวยับยั้งไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพดีกว่าโกจิกแอซิด และผลข้างเคียงน้อย

คำสำคัญ: โกจิกแอซิด, ตัวยับยั้งไทโรซิเนส, ไทโรซิเนส, เมลานิน, สารสกัดบริสุทธิ์

Research title	:	Effect of Chemical Compounds on Tyrosinase Inhibition
Student name	:	Mr. Phuwanai Weluwanaruk
Advisor	:	Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.
Co-advisor	:	Associate Professor Preecha Phuwapraisirisan, Ph.D.
Department	:	Biology

Abstract

Melanin is a substance that is produced from the pigmentation process. To respond to the environment by the pigment production process in the skin and human eyes which is created within melanocytes in the epidermis to respond for UVB by melanin production process called melanogenesis. Store melanin in melanosome to transport to neighboring keratinocyte in the epidermis. Excessive production of melanin can cause skin problems such as dark spots or may develop into skin cancer. In addition, continuous exposure to UV radiation can cause DNA damage, gene mutations. The immune system getting worse or photoaging. Leading to this research to find tyrosinase inhibitors. Tyrosinase is an enzyme that is rate-limiting enzyme and catalyzes melanin synthesis. By using 3 pure extracts. The bioactive activity was tested for tyrosinase inhibition and to find concentration for the enzyme inhibition was 50% (IC_{50}). The results showed that all 3 pure extracts were ineffective in inhibiting tyrosinase activity when compared to the positive control of kojic acid with an IC50 value of 0.588 mM. The percentage of inhibition increased linearly with kojic acid concentration. Therefore, further research may be needed in the future to find tyrosinase inhibitors that are more effective than kojic acid and have few side effects.

Keywords: Kojic acid, melanin, pure extracts, tyrosinase, tyrosinase inhibitors

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญจันทร์เจ้า อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ทั้งในส่วนการช่วยสรรหาหัวข้องานวิจัยและการวิเคราะห์ข้อมูลการทดลอง ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีชา ภูวไพรศิริศาล อาจารย์ภาควิชาเคมี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการนำสารสกัดบริสุทธิ์จากพืชมาให้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ถ่ายทอดองค์ความรู้และประสบการณ์การทำงาน ทำให้ผู้เขียนสามารถนำความรู้ และทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์มาประยุกต์ใช้ในการทำโครงการครั้งนี้ได้อย่างเต็มที่

ขอขอบคุณพี่พงษ์ลดา แสดงฤทธิ์ นิสิตปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา ที่ได้ช่วยแนะนำแนวทางในการทำการทดลอง และช่วยฝึกหัดฝีมือในการทำการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์และการแปรผลข้อมูล

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ นักเรียนแลกเปลี่ยนภาควิชาชีววิทยาจากประเทศอินโดนีเซีย ที่ได้ทำการฝึกทำการทดลองร่วมกัน และให้ความช่วยเหลือกันและกันในด้านต่าง ๆ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำการทดลองและแปรผลข้อมูล

ขอขอบคุณสำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกคอมพิวเตอร์แก่นิสิตสำหรับการค้นคว้าข้อมูลงานวิจัย และการแปรผลข้อมูล

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสาหรับการทาโครงการในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัว และเพื่อน ๆ ที่ให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านการศึกษา ให้คำปรึกษาทางวิชาการ เป็นกำลังใจในการทำงานโดยตลอด ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....ข

Abstract.....ค

กิตติกรรมประกาศ.....ง

สารบัญตาราง.....ช

สารบัญภาพ.....ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการดำเนินงาน.....1

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม 2

2.1 การค้นพบและประวัติศาสตร์ของไทโรซิเนส.....2

2.2 การควบคุมการสังเคราะห์เมลานิน (Regulation of melanogenesis) 2

2.3 ไทโรซิเนส และบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์เมลานิน 4

2.4 ตัวยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส 5

2.5 ตัวยับยั้งไทโรซิเนสเห็ด (Mushroom tyrosinase inhibitors) 6

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน 8

3.1 สารสกัดบริสุทธิ์สำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ 8

3.2 สารเคมี 8

3.3 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitory assay) 8

3.3.1 การจัดเตรียมสารตัวอย่าง 8

3.3.2 การเตรียมสารเคมี 9

3.3.3 เติมสารเคมี และสารสกัดลงในหลุม (well) 9

3.3.4 การเติมไทโรซิเนส 10

3.3.5 การวัดการดูดกลืนแสงของสารละลาย 10

3.3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง 11

บทที่ 4 ผลการศึกษา 12

4.1 การรายงานผลการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสด้วยโกจิกแอซิด 12

4.2 การรายงานผลการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P01 13

4.3 การรายงานผลการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P02 14

4.4 การรายงานผลการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P03 15

บทที่ 5 อธิปรายผลการศึกษา 16

บทที่ 6 สรุปผล และข้อเสนอแนะ 17
6.1 สรุปผลการศึกษา 17
6.2 ประเด็นที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต 17
เอกสารอ้างอิง 18
ภาคผนวก 19
ภาคผนวกที่ 1 ตัวอย่างการคำนวณร้อยละการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยโกจิกแอซิด 20

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4-1 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด5วยโกจิกแอซิด 12
ตารางที่ 4-2 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด5วยสารสกัดบริสุทธิ์ P01 13
ตารางที่ 4-3 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด5วยสารสกัดบริสุทธิ์ P02 14
ตารางที่ 4-4 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด5วยสารสกัดบริสุทธิ์ P03 15

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2-1 เส้นทางการสังเคราะห์เมลานิน (Melanogenesis pathway) 3
รูปที่ 2-2 โครงสร้างคริสตอลกำลังในการแยกภาพสูง (1.8 Å) ของไทโรซิเนสจากพืช (Yasuyuki และ คณะ, 2006) และตำแหน่งเร่ง (active site) ของเอนไซม์ประกอบด้วยคอปเปอร์ 2 ไอออน 5
รูปที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของสารยับยั้งไทโรซิเนสที่เป็นที่รู้จักกันดีในฐานะสารช่วยให้ผิวกระจ่างใส 6
รูปที่ 3-1 แสดงการเก็บสารภายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C 8
รูปที่ 3-2 แสดงการเติมสารต่าง ๆ ลงในหลุม 9
รูปที่ 3-3 แสดงคอลัมน์ที่ต้องเติมไทโรซิเนส 10
รูปที่ 3-4 การวัดค่าการดูดกลืนแสง และแสดงการตั้งค่าโปรแกรม Magellan™ 10
รูปที่ 4-1 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยโกจิกแอซิด 12
รูปที่ 4-2 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P01 13
รูปที่ 4-3 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P02 14
รูปที่ 4-4 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P03 15

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ผิวหนังของมนุษย์มีความเข้มเข้มที่หลากหลายตั้งแต่มีผิวเข้มไปจนถึงเกือบจะไม่มีสี อาจมีสีแดงระเรื่อได้บ้าง เนื่องมาจากการไหลเวียนของเลือด (blood supply) สีผิวของมนุษย์ถูกกำหนดได้ด้วยจำนวนและชนิดของเมลานิน (melanin) ซึ่งพันธุกรรมมีผลต่อความแปรผันของสีผิวโดยตรง นอกจากนี้ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น แสงแดด ก็สามารถส่งผลให้สีผิวหมองคล้ำได้ ความแตกต่างของสีผิวนี้มนุษย์สามารถที่จะรับรู้ฟีโนไทป์ (phenotype) ของประชากรได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งบ่งบอกถึงการปรับตัวเชิงวิวัฒนาการมาตั้งแต่อดีต ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ความเป็นเชื้อชาติ ความแตกต่างทั้งสีผิวและสีผมนี้สามารถจำแนกความแตกต่างกันได้อย่างชัดเจน จากการศึกษาที่หลากหลายทางด้านวิวัฒนาการ พันธุศาสตร์ และชีววิทยาการเจริญ ช่วยในการอธิบายกลไกพื้นฐานในการสร้างเม็ดสีของผิวหนังได้ (Emanuela และคณะ, 2016)

การสังเคราะห์เม็ดสีที่มากกว่าปกติ (hyperpigmentation) เป็นสภาวะทางผิวหนัง (skin condition) ที่พบได้ทั่วไปในผิวหนังทุกประเภท รวมถึงฝ้า (melasma), กระแดด (solar lentigines) และการสังเคราะห์เม็ดสีมากกว่าปกติหลังการอักเสบ (postinflammatory hyperpigmentation) ซึ่งได้รับผลกระทบมาจากหลากหลายสภาวะ เช่น สิว สภาวะการอักเสบผิวหนังฉับพลัน โรคผิวหนังอักเสบ หรือการบาดเจ็บ ความผิดปกติจากการได้รับรังสียูวี (ultraviolet) ที่ยากต่อการรักษา นำมาซึ่งผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายทั้งการบำบัดรักษาโดยแพทย์ รวมไปถึงการนำมาใช้ทางด้านความงาม (cosmetic) ในการบำบัดรักษาภาวะการสร้างเม็ดสีมากผิดปกติ (hyperpigmentation) เป็นที่น่าสนใจและท้าทายมากในปัจจุบัน ในปัจจุบันสารมาตรฐานการรักษา (gold standard treatment) คือไฮโดรควิโนน (hydroquinone) แต่อย่างไรก็ตามสารนี้ก็นำมาซึ่งผลกระทบต่าง ๆ รวมถึงการระคายเคืองผิวหนัง ผิวหนังอีกเสบ การหมองคล้ำคล้ายกับการถูกปกคลุมด้วยเขม่า (exogenous ochronosis) ในกลุ่มประชากรที่มีผิวพรรณดำคล้ำ เวชสำอาง (Cosmeceuticals) มักจะมีส่วนผสมของสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ซึ่งจะช่วยในการปรับปรุงรูปโฉมของผิวหนัง และทำให้เพิ่มทางเลือกเวชสำอาง สารสกัดจากพืช (phytochemicals) ซึ่งมีการออกฤทธิ์ที่หลากหลายให้เลือกใช้ในการรักษาแต่ละโรค (Ashley และคณะ, 2016)

1.2 วัตถุประสงค์ของการดำเนินงาน

เพื่อศึกษาผลของสารประกอบทางเคมีในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

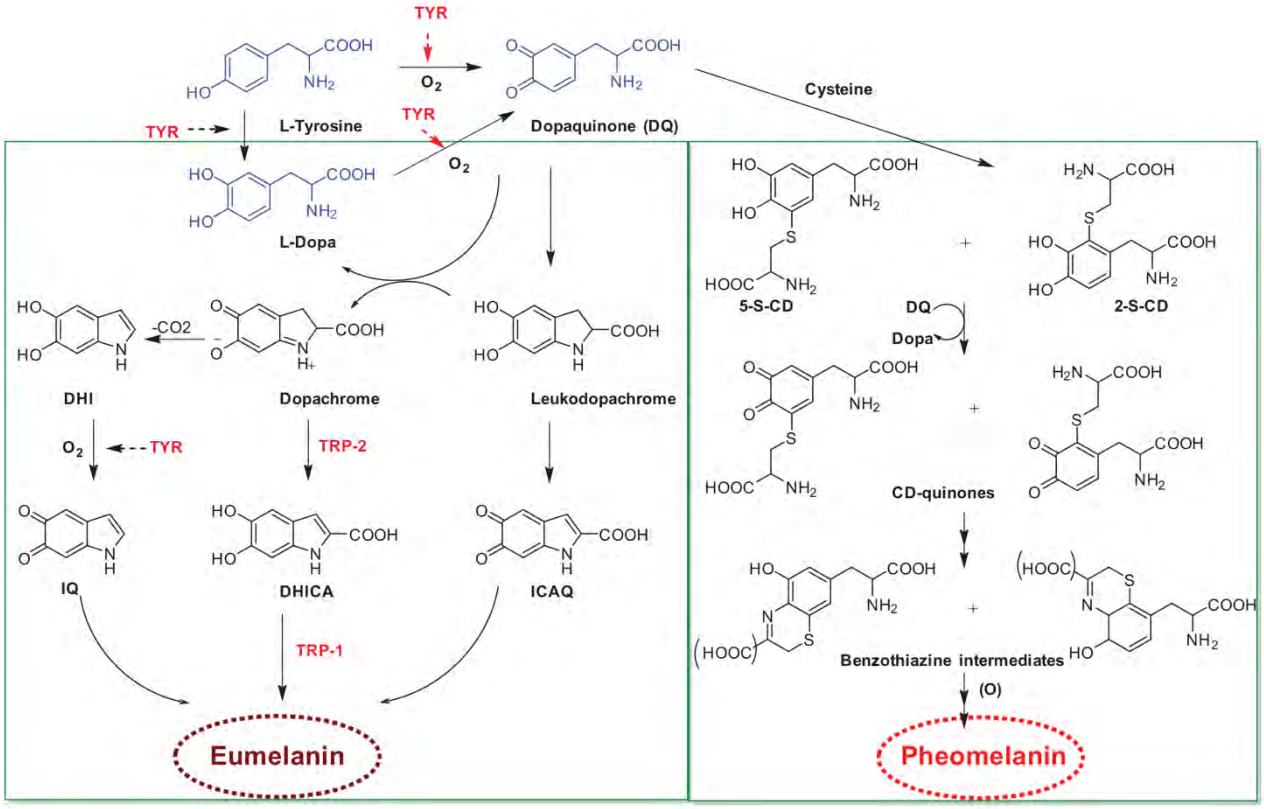
บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 การค้นพบและประวัติศาสตร์ของไทโรซิเนส

จากการรายงานครั้งแรกเกิดขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1856 ได้มีความสนใจเกี่ยวกับเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase) เมื่อ Schoenbein ได้ทำการระบุสาร Boletus luridus (oxygen-activating agent) โดยสารนี้ให้เม็ดสีสีน้ำเงิน เนื่องมาจากการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) สำหรับวัสดุบางอย่างของพืช นับความเป็นก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์อย่างยิ่งใหญ่ เมื่อนักวิทยาศาสตร์ชื่อว่า Yoshida ได้มีการค้นพบเอนไซม์แลคเคส (Laccase) ในยางไม้ของต้นครั่ง (Yoshida, 1883) หลังจากนั้น Bertand ก็ได้มีการค้นพบเอนไซม์ในไทโรซิเนสในเห็ด นำมาสู่การพัฒนาอย่างก้าวกระโดด Bourquelot ก็ได้มีความสนใจในการศึกษาในเห็ดเช่นเดียวกัน โดยมีการศึกษาการเกิดออกซิเดชันใน *Rissila foetms* ที่ได้มีการเปลี่ยนสีไปเป็นสีแดงและในท้ายที่สุดกลายเป็นสีน้ำตาลดำ ที่น่าสนใจไปกว่านั้นคือ สารสกัดจาก *R. nigricans* ที่ได้มีการแยกสารตกผลึกออกมา (crystalline substance) ซึ่งสารนี้พบในบริเวณที่มีเอนไซม์ออกซิเดส จากการเกิดออกซิเดชันภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน จะได้สารละลายที่มีสีแดงก่อน ท้ายที่สุดจะได้ผลิตภัณฑ์สีคล้ำรวมกันเป็นเมลานิน ซึ่ง Bertrand ก็ได้แสดงให้เห็นว่าสารนี้เป็นกรดอะมิโนชื่อว่าไทโรซีน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาและแสดงให้เห็นการเร่งปฏิกิริยาของการเกิดออกซิเดชันแบบใช้ออกซิเจนของสารประกอบอื่น ๆ เมื่อสารประกอบไม่มีหมู่ไฮดรอกซี เอนไซม์ออกซิเดสก็ไม่สามารถที่จะดำเนินการเกิดออกซิเดชันได้ จากนั้นงานวิจัยจึงมุ่งเน้นไปที่เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาของไทโรซีน และมีความเชื่อมโยงกับการสร้างเม็ดสี (pigmentations) ในพืชและสัตว์ ซึ่งพบว่ามีการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนของ aromatic monohydric phenols หลาย ๆ ชนิด นอกจากไทโรซีนอีกด้วย เช่น p-hydroxyphenyl ethyl aminc, p-hydroxyphenyl methyl amine, p-hydroxyphenyl amine, p-hydroxyphenyl propionic acid, p-hydroxyphenyl acetic acid, p-cresol และ phenol นอกจากนี้เมื่อสารประกอบดังกล่าวที่กล่าวมาไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล เอนไซม์ออกซิเดสก็ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ซึ่งภายหลังการศึกษาเอนไซม์ก็ได้เบี่ยงเบนความสนใจมาที่ไทโรซีน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดเมลานิน (melanin formation) ซึ่งมีความเชื่อมโยงกันทั้งพืชและสัตว์

2.2 การควบคุมการสังเคราะห์เมลานิน (Regulation of melanogenesis)

การสังเคราะห์เมลานิน (melanogenesis) เป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนที่มีความเกี่ยวข้องกับการรวมตัวกันระหว่างเอ็นไซม์และปฏิกิริยาเคมี โดยเมลาโนไซต์ (melanocytes) จะมีการสร้างเมลานินจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ ยูเมลานิน (eumelanin) ให้สีดำน้ำตาล และโฟโอเมลานิน (pheomelanin) ให้สีแดงเหลือง ซึ่งเกิดขึ้นจากการคอนจูเกต (conjugation) ระหว่างซีสเตอิน (cysteine) และกลูตาไทโอน (glutathione) (Thanigaimalai และคณะ, 2015)



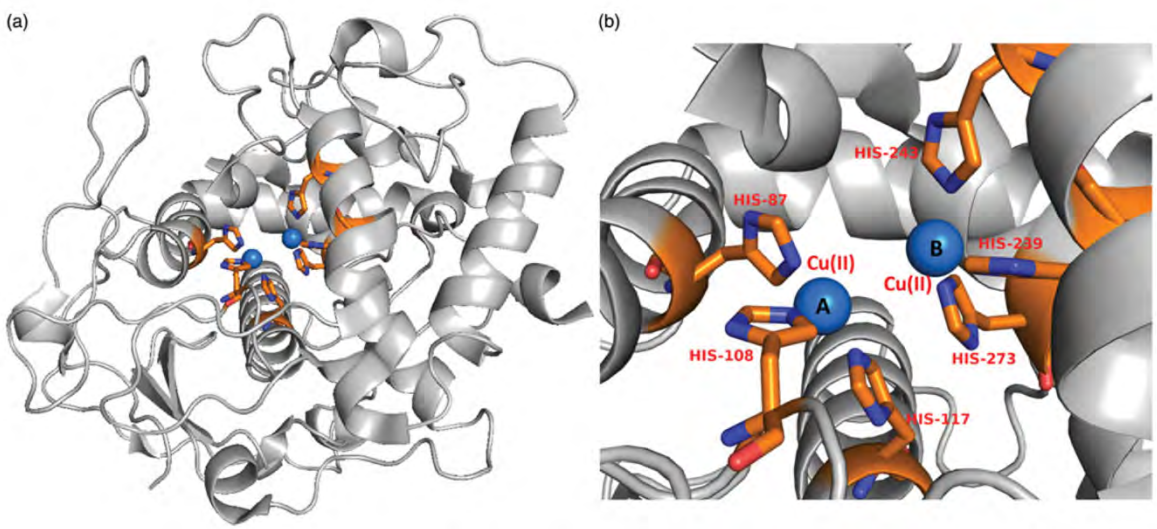
รูปที่ 2-1 เส้นทางการสังเคราะห์เมลานิน (Melanogenesis pathway) : การสร้างยูเมลานิน และฟีโอเมลานิน (Tyr: tyrosinase; DQ: dopaquinone; L-Dopa: L-3:4-dihydroxyphenylalanine; DHICA: 5,6-dihydroxyindole-2 carboxylic acid; DHI: 5,6-dihydroxyindole; ICAQ: indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone; IQ: indole-5,6-quinone; HBTA: 5-hydroxy-1,4- benzothiazinylalanine) (Thanigaimalai และคณะ, 2015)

กระบวนการในการสังเคราะห์เมลานิน (melanogenesis process) เริ่มต้นด้วยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ของ *L*-tyrosine ไปเป็น dopaquinone (DQ) โดยเอนไซม์สำคัญ (key enzyme) คือเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) (TYR) ผลที่เกิดขึ้นคือควิโนน (quinone) จะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น (substrate) สำหรับการสังเคราะห์ยูเมลายนิน และฟีโอเมลานิน (Vincent และ Mercedes, 1987) การเกิด DQ จัดเป็นขั้นกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยา (rate-limiting step) ในการสังเคราะห์เมลานิน เพราะว่าสิ่งที่เหลืออยู่ของลำดับปฏิกิริยาสามารถที่จะเกิดขึ้นได้เองที่ค่า pH ปกติของสรีรวิทยา (Halaban และคณะ, 2002) หลังจากสร้าง DQ เสร็จแล้ว จะมีการดำเนินการสร้างวงภายในโมเลกุล (intramolecular cyclizatin) เพื่อสร้างอินโดลีน (indoline) จัดเป็น leukodopachrome (cyclodopa) ซึ่งเป็นปฏิกิริยารีดอกซ์ระหว่าง leukodopachrome และ DQ นำไปสู่การเกิดโดพาโครม (dopachrome) และมี L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) เป็นสารตั้งต้นสำหรับ TYR และจะถูกออกซิไดซ์กลับไปเป็น DQ อีกครั้งด้วยเอนไซม์ โดยโดพาโครม (Dopachrome) จะค่อย ๆ สลายตัวกลายเป็น dihydroxyindole (DHI) และ dihydroxyindole-2-carboxylicacid (DHICA) ขั้นตอนหลังจากนี้จะถูกเร่งปฏิกิริยาโดย TRP-2

ซึ่งปัจจุบันรู้กันในชื่อ dopachrome tautomerase (DCT) ท้ายที่สุดแล้ว dihydroxyindoles เหล่านี้ (DHI และ DHICA) จะถูกออกซิไดซ์กลายเป็นยูเมลานิน (eumelanin) TRP-1 ถูกเชื่อว่าช่วยในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ DHICA ไปเป็นยูเมลานิน (eumelanin) ในขณะเดียวกัน DQ ก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็น 5-S-cysteinyldopa หรือ glutothionyldopa ในสภาวะที่มี cysteine และ glutathione หลังจากนั้นจะเกิดสารมัธยันต์ชื่อว่า benzothiazine และท้ายที่สุดแล้วจะได้ฟีโอเมลานิน (pheomelanin) แม้ว่ามี 3 เอนไซม์ คือ TYR, TRP-1 และ TRP-2 ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์เมลานิน (melanogenesis pathway) และเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวผูกขาดสำหรับการสังเคราะห์เมลานิน (melanogenesis)

2.3 ไทโรซิเนส และบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์เมลานิน

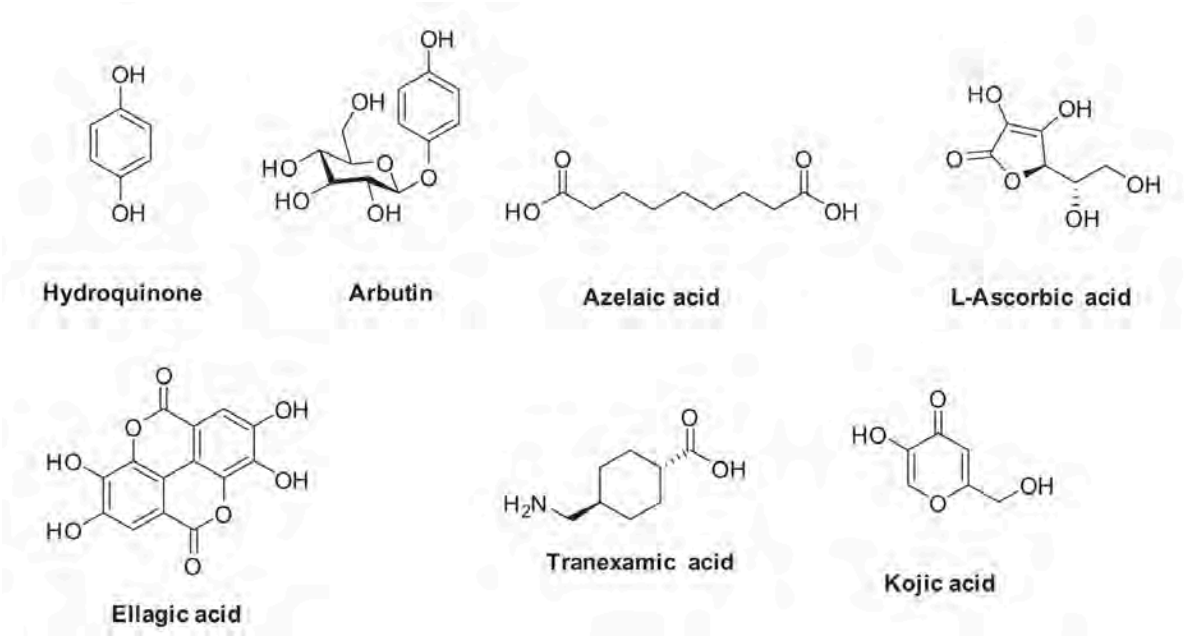
ไทโรซิเนส (monophenol or o-diphenol, oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1, syn.polyphenol oxidase) เป็นไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยทองแดงจับกับเยื่อเมมเบรนที่มีหน้าที่หลากหลาย ซึ่งตั้งอยู่ในเยื่อเซลล์ของเมลาโนโซม (melanosome) (Alvaro และคณะ, 1995) โดยไทโร-ซิเนสถูกสร้างขึ้นจากแค่ในเซลล์สร้างเมลานิน (melanocyte cell) ทั้งกระบวนการสร้างและขั้นตอนต่าง ๆ จากเอนโดพลาสมิก เรติคิวลัม (endoplasmic reticulum) และกอลจิบอดี้ (golgi body) หลังจากนั้นก็จะถูกลำเลียงในรูปของเมลาโนโซม (melanosome) ซึ่งประกอบด้วยเม็ดสีเมลานินที่ผ่านการสังเคราะห์ขึ้นมาจากมุมมองเชิงโครงสร้าง คอปเปอร์ไอออน 2 โมเลกุล ถูกล้อมรอบโดยโมเลกุลที่ได้รับการดัดแปลงจากฮิสทิดีน (histidine residues) ซึ่งทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาของไทโรซิเนส ดังรูปที่ 2-2 ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยา (active site) มี 3 รูปแบบ คือ oxy, met และ deoxy ในการสังเคราะห์เม็ดสี (pigmentation) โดยเฉพาะที่ตำแหน่งนั้น คอปเปอร์ไอออนจะทำอันตรกิริยากับไดออกซิเจน (dioxygen) จนเกิดเป็นสารมัธยันต์ที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก ที่มีส่วนร่วมโดยตรงในการเติมหมู่ไฮดรอกซี (hydroxylation) ของโมโนฟีนอล (monophenols) ไปเป็นไดฟีนอล (monophenolase activity) และในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโอไดฟีนอล (*o*-diphenols) ไปเป็นโอควิโนน (*o*-quinone) (diphenolase activity) (Heinz และ Felix, 2000), (Mercides และคณะ, 2005) นอกจากนี้ไทโรซิเนสยังทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างนิวโรเมลานิน (neuromelanin) ซึ่งเกิดจากออกซิเดชันของโดปามีน (dopamine) สร้างโดปาควิโนน (dopaquinones) แต่อย่างไรก็ตามหากมีการสร้างขึ้นมามากเกินไปของโดปาควิโนน (dopaquinones) อาจทำให้เกิดความเสียหายของเซลล์ประสาท (neuronal damage) และเซลล์ตายได้ แสดงว่าให้เห็นว่าไทโรซิเนสมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดนิวโรเมลานินในสมองของมนุษย์ และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสลายของเซลล์ประสาท โรคพาคินสัน (Parkinson’s disease) และโรคฮันทิงทัน (Huntington’s disease) (Ercole และคณะ, 2002) นอกจากนี้ไทโรซิเนสยังมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (browning) ของพืชพรรณ และผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวนำไปสู่การสลายตัวอย่างรวดเร็ว (Yi และคณะ, 2009) การประยุกต์ใช้ไทโรซิเนสยังมีการใช้ในกระบวนการลอกคราบของแมลง (Szu-Hsiu และคณะ, 2007) ดังนั้นการควบคุมการสังเคราะห์เมลานินโดยการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นแรงกระตุ้นหลักของนักวิจัยในบริบทของการเกิดการสร้างเมลานินที่มากกว่าปกติ (hyperpigmentation)



รูปที่ 2-2 (a) โครงสร้างคริสตอลกำลังในการแยกภาพสูง (1.8 Å) ของไทโรซิเนสจากพืช (Yasuyuki และคณะ, 2006) (b) ตำแหน่งเร่ง (active site) ของเอนไซม์ประกอบด้วยคอปเปอร์ 2 ไอออน A และ B ที่ประสานกันโดยมี 6 สารดัดแปลงจากฮิวทิดีน (histidine residues) ได้แก่ His87, His108, His117 สำหรับ CuII (A) และ His239, His243, His273 สำหรับ CuII(B) ตามลำดับ และแสดงในรูปแบบแผ่นบาง ๆ

2.4 ตัวยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส

ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์เมลานินผ่านกระบวนการเมลาโนเจนเนซิส (melanogenesis) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่โดดเด่นที่สุด และเป็นเป้าหมายที่ประสบความสำเร็จอย่างมากในการทำการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาโดยตรง เครื่องสำอางส่วนใหญ่หรือสารที่ทำให้ผิวหนังขาวต่าง ๆ ในทางการค้าคือตัวยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส (tyrosinase inhibitors) ในความเป็นจริงคือตัวยับยั้งมีเป้าหมายที่สำคัญคือไทโรซิเนส มีความจำเพาะในการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (melanogenesis) ในเซลล์โดยปราศจากผลข้างเคียง นั่นคือไทโรซิเนสถูกสร้างขึ้นเฉพาะในเมลาโนไซต์ (melanocyte) โดยตัวยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสมีหลายตัว เช่น hydroquinone (HQ), arbutin, kojic acid, azelaic acid, L-ascorbic acid, ellagic acid และ tranexamic acid ที่ได้มีการใช้เป็นสารช่วยให้ผิวหนังขาวกระจ่างใส ดังรูปที่ 2-3



รูปที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของสารยับยั้งไทโรซิเนสที่เป็นที่รู้จักกันดีในฐานะสารช่วยให้ผิวกระจ่างใส

ไฮโดรควิโนน (HQ) มีศักยภาพในการทำให้เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเกิดมิวเทชัน และมีความเชื่อมโยมกับปฏิกิริยาที่หลากหลาย รวมถึงโรคผิวหนังอักเสบ การระคายเคืองผิวหนัง ผิวหนังแดง (transient erythema) ผิวหนังเกิดการไหม้ ริ้วร้อย ผิวหนังสีขาว (Leukoderma) และโรคโลหิตจาง (hypochromia) อาบูทิน (Arbutin) จัดเป็นสารโปรดรัก (prodrug) ของไฮโครควิโนน (hydroquinone) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ช่วยลด หรือยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินโดยการยับยั้งไทโรซิเนส แต่อย่างไรก็ตามรูปแบบตามธรรมชาติของอาบูทินเป็นสารเคมีที่ไม่มีความเสถียร และสามารถปลดปล่อยไฮโดรควิโนนที่ซึ่งจะถูกแคแทบไลซ์ไปเป็นสารกลุ่มเบนซีนซึ่งมีความเป็นพิษต่อไขกระดูก (Hongfei และคณะ, 2009)

2.5 ตัวยับยั้งไทโรซิเนสเห็ด (Mushroom tyrosinase inhibitors)

ไทโรซิเนสจากเห็ด *Agaricus bisporus* มักจะถูกใช้เป็นต้นแบบเอนไซม์ในหลอดทดลอง สำหรับการพัฒนาสารให้ความขาวกระจ่างแก่ผิวหนังซึ่งมีเป้าหมายเป็นไทโรซิเนสของมนุษย์ เพราะเอนไซม์นี้ถูกใช้ในงานวิจัยเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเป็นสินค้าที่หาได้ง่าย (commercial availability of mushroom tyrosinase (mTAR)) สำหรับการตรวจสอบคัดกรองหาสารประกอบในการยับยั้งไทโรซิเนสนั้น จะใช้โกจิกแอซิต (kojic acid) อาบูติน (arbutin) หรือไฮโดรควิโนน (hydroquinone) เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) จากงานวิจัยต่าง ๆ ที่ผ่านมา มีตัวยับยั้งไทโรซิเนสจำนวนมหาศาลจากแหล่งธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ที่ได้รับการค้นพบและระบุชนิดสาร ความสามารถหรือความแรงในการยับยั้งจะแสดงในรูปค่า IC_{50} (IC_{50} value) ที่ความเข้มข้นของตัวยับยั้งที่จำเป็นในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ที่ร้อยละ 50 ในสภาวะที่ทำการทดลอง ค่า K_i ช่วยสะท้อนให้เห็นถึงความสามารถในการจับกันของเอนไซม์ K_i ที่

มีค่าต่ำกว่าหมายถึงมีความสามารถในการจับเอนไซม์ที่สูงกว่า ในทางตรงกันข้าม K_i ที่มีค่ามากกว่า หมายถึงมีความสามารถในการจับกับเอนไซม์ที่ต่ำกว่า ค่า K_i

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1 สารสกัดบริสุทธิ์สำหรับทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ได้รับสาร 3 ชนิด จากอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมคือ รศ. ดร.ปรีชา ภูวไพรศิริศาล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่สาร P01, P02 และ P03 เป็นสารประกอบบริสุทธิ์สกัดจากพืช ทำการละลายสารใน DMSO เพื่อเก็บรักษาสารโดยเก็บไว้ตู้เต็นที่อุณหภูมิ -20 °C โดยยังไม่ทราบโครงสร้างสารและน้ำหนักโมเลกุล

รูปที่ 3-1 แสดงการเก็บสารภายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C

3.2 สารเคมี

โกจิกแอซิด (kojic acid) สำหรับใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control), ไทโรซิเนส(EC 1.14.18.1) จากเห็ด (165 U/mL), L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยา DMSO ใช้สำหรับใช้เป็นตัวทำละลายสารตัวอย่าง, Phosphate-buffered saline (PBS) ที่ค่า pH เท่ากับ 6.8

3.3 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitory assay)

3.3.1 การจัดเตรียมสารตัวอย่าง

ทำการเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยสารตัวอย่างคือ Kojic acid สำหรับใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และสารสกัดบริสุทธิ์ต่าง ๆ ได้แก่ P01, P02 และ P03 โดยสารละลายจะใช้ที่ความเข้มข้น 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mM ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายสารสกัด และคำนวณหาความเข้มข้นที่ต้องการด้วยสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ และทำการลดความเข้มข้นของสารละลายตามลำดับ (serial dilution)

3.3.2 การเตรียมสารเคมี

3.3.2.1 การเตรียมบัฟเฟอร์ PBS ที่ความเข้มข้น 80 mM สำหรับทำละลาย L-Dopa และใช้ทำปฏิกิริยาปริมาตรรวม 20 ml

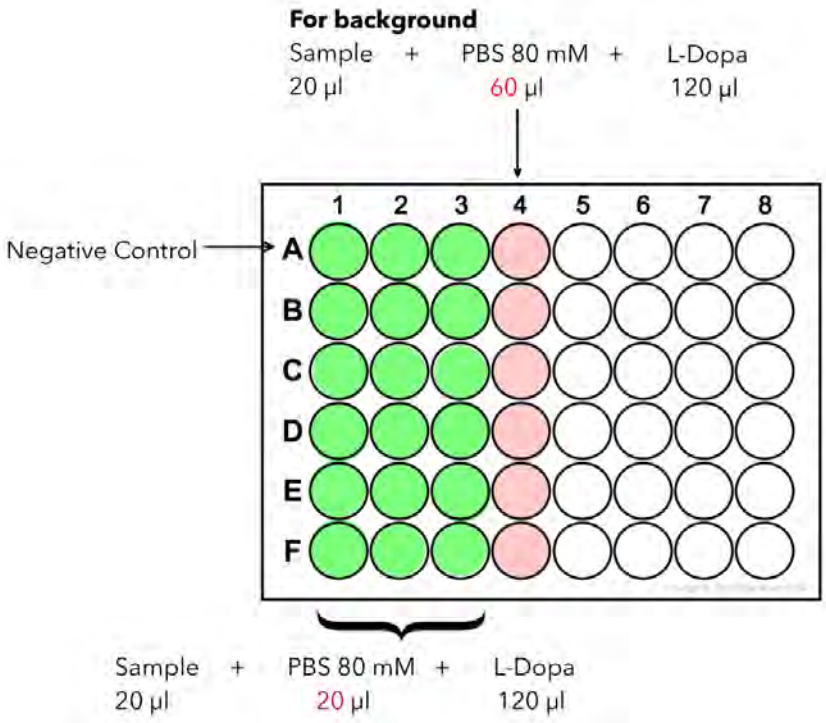
3.3.2.2 การเตรียมบัฟเฟอร์ PBS ที่ความเข้มข้น 50 mM สำหรับทำละลายไทโรซิเนสจากเห็ดปริมาตร 800 µl

3.3.2.3 การเตรียมสารละลายไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 165 U/ml จำนวน 800 µl ต่อการทำการทดลองหนึ่งครั้ง

3.3.2.4 การเตรียม L-Dopa เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นปฏิกิริยาที่ความเข้มข้น 1.5 mM

3.3.3 เติมสารเคมีและสารสกัดลงในหลุม (well)

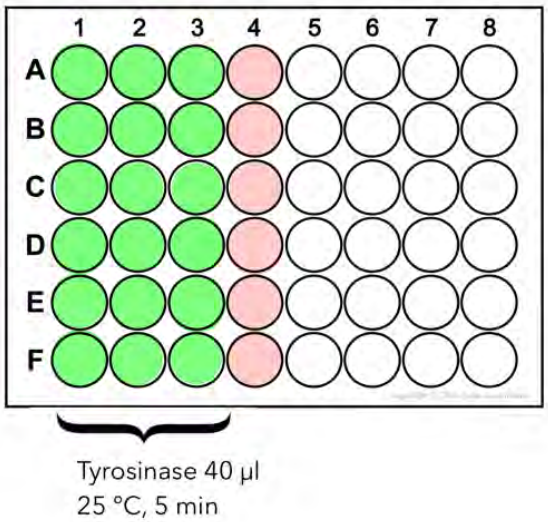
เติมสารต่าง ๆ ดังรูปที่ 3-2 ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 15 นาที



รูปที่ 3-2 แสดงการเติมสารต่าง ๆ ลงในหลุม แต่ละแถวได้แก่ A-F แทนสารชนิดเดียวกันในแต่ละความเข้มข้น คอลัมน์ที่ 4 ใช้เป็นชุดการทดลองควบคุมที่ใช้วัดสีพื้นหลังเพื่อใช้ในการหักลบหลังการวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.3.4 การเติมไทโรซิเนส

ทำการเติมเอนไซม์ลงไปในสามคอลัมน์แรก จำนวน 40 µl และรอเป็นเวลา 5 นาที เพื่อเอนไซม์มีเวลาทำงานได้เต็มที่ หลังจากเติมสารทุกอย่างครบจะได้ปริมาตรในแต่ละหลุมรวม 200 µl



รูปที่ 3-3 แสดงคอลัมน์ที่ต้องเติมไทโรซิเนสได้แก่สามคอลัมน์แรก จำนวน 40 µl

3.3.5 การวัดการดูดกลืนแสงของสารละลาย

ทำการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm ด้วยโปรแกรม Magellan™ พร้อมกับเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

รูปที่ 3-4 (ซ้าย) แสดงจานหลุมที่พร้อมวัดค่าการดูดกลืนแสง (ขวา) แสดงการตั้งค่าโปรแกรม Magellan™ ก่อนการวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ทำการวิเคราะห์โดยการร่างกราฟด้วยโปรแกรมไมโครซอฟท์ เอกซ์เซล โดยดูรูปแบบกราฟและตีความข้อมูล หากข้อมูลมีผลไปในทางยับยั้งไทโรซิเนส จะต้องทำการคำนวณหาค่า IC_{50} โดยการทำนายจากสมการเส้นตรง เพื่อบ่งระบุค่าความเข้มข้นของสารในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสที่ร้อยละ 50 และเปรียบเทียบผลการยับยั้งกับตัวควบคุมเชิงบวก โดยการคำนวนหาร้อยละการยับยั้งไทโรซิเนสจากสมการ

$$\text{inhibition } (\%) = \frac{(A-B)-(C-D)}{A-B} \times 100$$

A: ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุมเชิงลบหลังจากการบ่มปฏิกิริยา (incubation)

B: ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุมเชิงลบก่อนการบ่มปฏิกิริยา (incubation)

C: ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างหลังจากการบ่มปฏิกิริยา (incubation)

D: ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างก่อนการบ่มปฏิกิริยา (incubation)

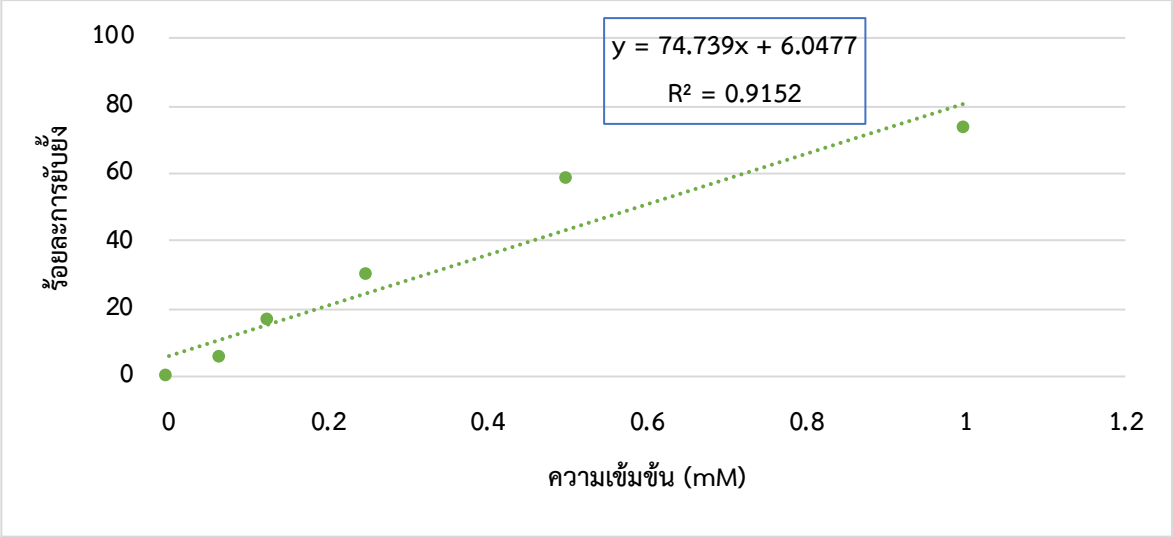
บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 การรายงานผลการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสด้วยโกจิกแอซิด

การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยโกจิกแอซิดเพื่อหาแนวโน้มและร้อยละการยับยั้ง เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และใช้เปรียบเทียบกับผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธ์ โดยทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง เพื่อลดความคลาดเคลื่อนของข้อมูล จากการทดลองพบว่าโกจิกแอซิดมีค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้น 0.588 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 4-1 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยโกจิกแอซิด

ความเข้มข้นของโกจิกแอซิด (mg/ml)	ความเข้มข้นของโกจิกแอซิด (mM)	ร้อยละการยับยั้งไทโรซิเนสเฉลี่ย
DMSO	0	0
0.00888	0.065	5.189
0.01776	0.125	16.249
0.03553	0.25	29.287
0.07106	0.5	57.868
0.14211	1	72.687



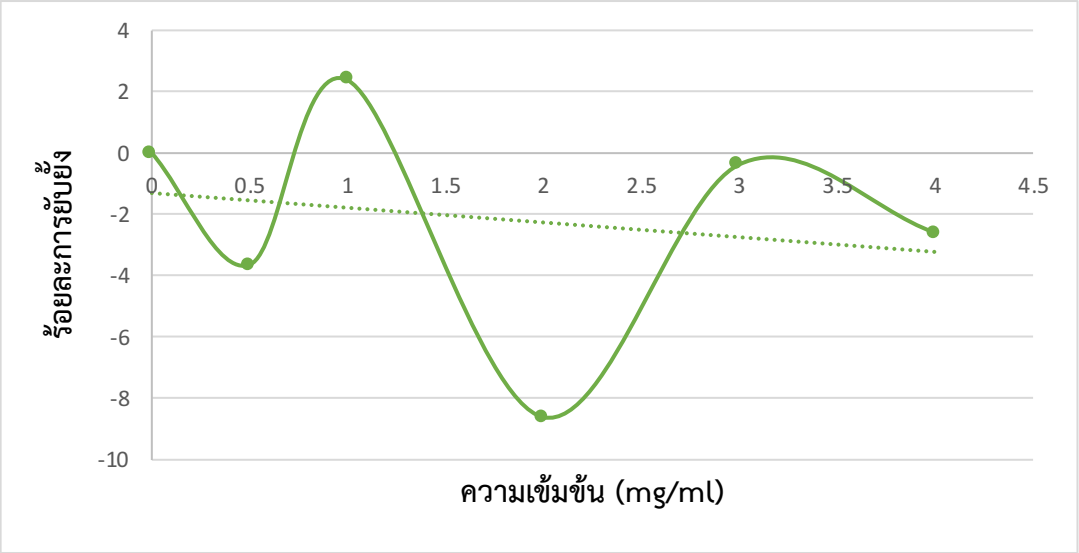
รูปที่ 4-1 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยโกจิกแอซิด

4.2 การรายงานผลการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P01

การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P01 เพื่อหาแนวโน้ม และร้อยละการยับยั้งจากการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น ค่าร้อยละในการยับยั้งไทโรซิเนสไม่ได้เพิ่มขึ้นตามแนวโน้มที่ควรจะเป็น โดยแนวโน้มของเส้นกราฟพบว่าเป็นเส้นในแนวนอน หากสารมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส ปริมาณสารสกัดที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับร้อยละการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจากรูปที่ 4-2 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสารสกัดบริสุทธิ์ P01 ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส

ตารางที่ 4-2 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P01

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการทำงานไทโรซิเนส
0	0
0.5	-3.638
1	2.376
2	-8.612
3	-0.371
4	-2.598



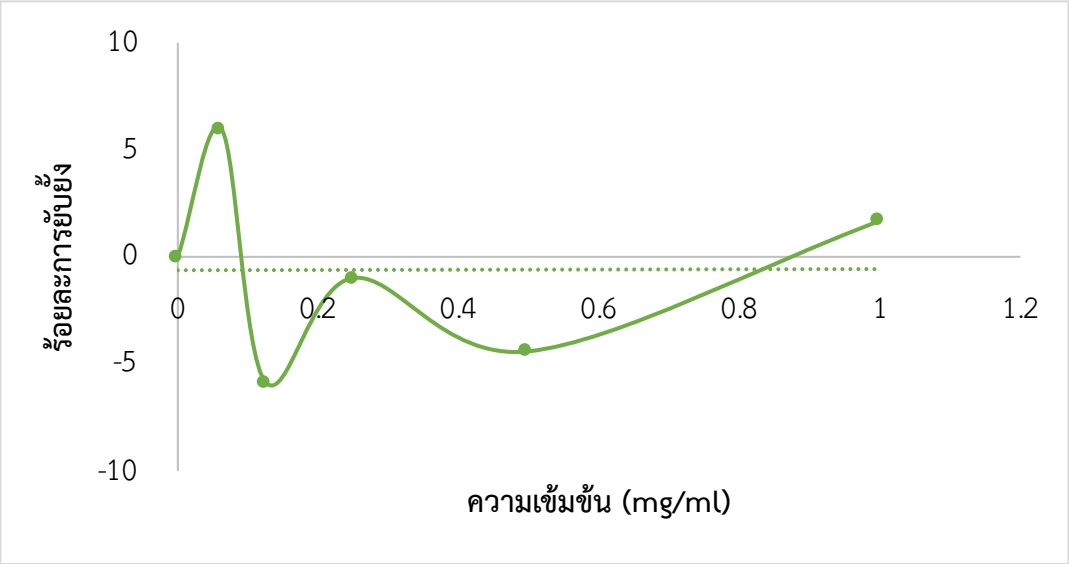
รูปที่ 4-2 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P01

4.3 การรายงานผลการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P02

การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P02 เพื่อหาแนวโน้ม และร้อยละการยับยั้ง จากการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น ค่าร้อยละในการยับยั้งไทโรซิเนสไม่ได้เพิ่มขึ้นตามแนวโน้มที่ควรจะเป็น โดยแนวโน้มของเส้นกราฟพบว่าเป็นเส้นในแนวนอน หากสารมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส ปริมาณสารสกัดที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับร้อยละการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจากรูปที่ 4-3 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสารสกัดบริสุทธิ์ P02 ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส

ตารางที่ 4-3 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P02

ความเข้มข้นสารสกัด(mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส
0	0
0.0625	5.941
0.125	-5.864
0.25	-0.990
0.5	-4.417
1	1.676



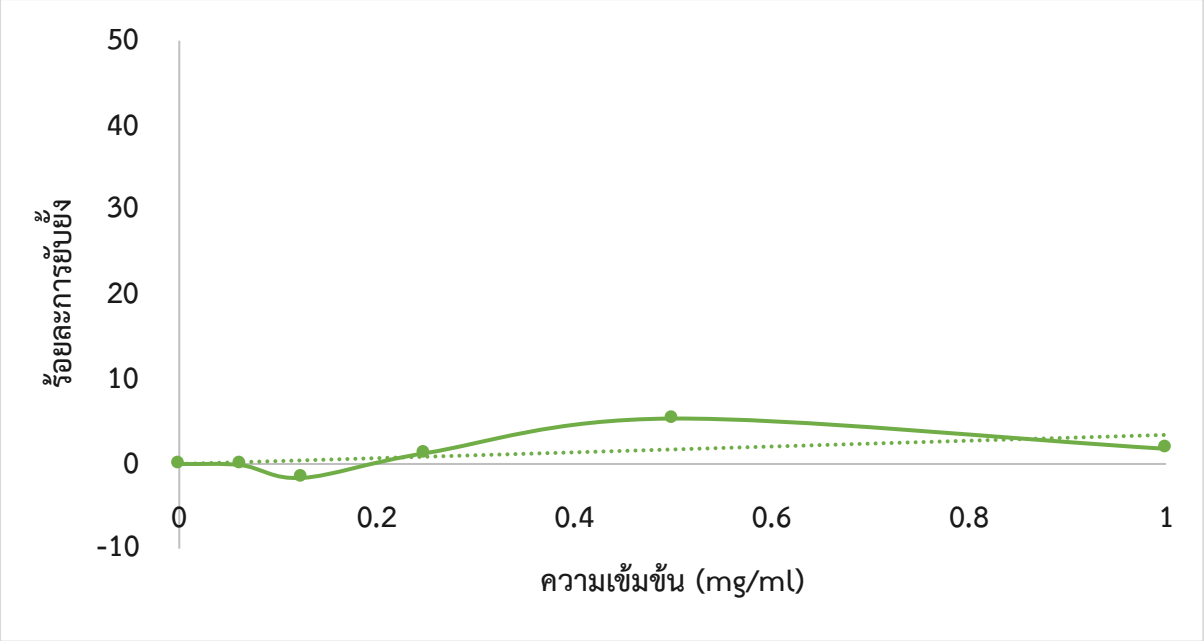
รูปที่ 4-3 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P02

4.4 การรายงานผลการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P03

การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P03 เพื่อหาแนวโน้ม และร้อยละการยับยั้งจากการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น ค่าร้อยละในการยับยั้งไทโรซิเนสไม่ได้เพิ่มขึ้นตามแนวโน้มที่ควรจะเป็น โดยแนวโน้มของเส้นกราฟพบว่าเป็นเส้นในแนวนอน หากสารมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส ปริมาณสารสกัดที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับร้อยละการยับยั้งที่เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจากรูปที่ 4-4 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าสารสกัดบริสุทธิ์ P03 ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส

ตารางที่ 4-4 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P03

ความเข้มข้น (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส
0	0
0.0625	-0.143
0.125	-1.644
0.25	1.287
0.5	5.361
1	1.787



รูปที่ 4-4 การรายงานผลการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ P03

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

จากการศึกษาตัวควบคุมเชิงบวกโกจิกแอซิด สารสกัดบริสุทธิ์ 3 ชนิด ได้แก่ P01 P02 และ P03 พบว่ามีเพียงตัวควบคุมเชิงบวกเท่านั้นที่มีผลการยับยั้งไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพ สามารถยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสร้อยละ 50 ได้ที่ความเข้มข้น 0.588 มิลลิโมลาร์ และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสก็เพิ่มมากขึ้น โดยมีเส้นแนวโน้มเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับเส้นตรงมาก นอกจากนี้ยังใช้สารโกจิกแอซิดในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถยับยั้งไทโรซิเนสได้ดีมาก

จากการทดลองหาสารยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสด้วยสารสกัดบริสุทธ์ P01 P02 และ P03 พบว่าเมื่อทำปฏิกิริยาระหว่างไทโรซิเนสและสารสกัดบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด โดยสารแต่ละชนิดจะให้ความเข้มข้นของสารละลายจำนวน 5 ความเข้มข้นที่แตกต่างกันพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส ไม่มีความสัมพันธ์กันกับความเข้มข้นของสารสกัดบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากในตัวควบคุมเชิงบวกเมื่อความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างเพิ่มมากขึ้น ร้อยละหรือประสิทธิภาพในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย จากการทดลองด้วยสารสกัดบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น ค่าร้อยละในการยับยั้งไทโรซิเนสไม่ได้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นสารสกัดอย่างเป็นเส้นตรง แต่กลับมีความสามารถในการยับยั้งที่ต่ำมากทุกความเข้มข้น แสดงให้เห็นว่าสารสกัดบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสอย่างเห็นได้ชัด จึงไม่สามารถคำนวณหาค่า IC_{50} และสมการเส้นตรงเพื่อนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารสกัดบริสุทธิ์ต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถจัดทำตารางเปรียบเทียบระหว่างตัวควบคุมเชิงบวก และสารสกัดทั้ง 3 ชนิดได้เนื่องจากผลจากการทำการทดลองอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เพราะผลการทดลองทำให้ทราบว่าสารไม่มีความสามารถในการยับยั้งแล้วจึงไม่จำเป็นต้องทำการทดลองให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นเดียวกัน

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาสามารถสรุปผลได้ว่า สารสกัดบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างเม็ดสี (pigment) เนื่องจากร้อยละการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส และความเข้มข้นของสารสกัดบริสุทธิ์ไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง จึงไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสที่ร้อยละ 50 ได้ จึงไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของสารสกัดบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดบริสุทธิ์ดังกล่าวไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส

6.2 ประเด็นที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

สำหรับประเด็นที่ควรศึกษาในอนาคตคือการคัดกรองหาสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนได้ดีกว่าโกจิกแอซิด ทั้งในด้านต้นทุน ปริมาณสารที่ต้องใช้ในการยับยั้ง และผลข้างเคียงในการใช้สาร นอกจากนี้หากมีการค้นพบสารสกัดมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนสได้ ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมกับเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย เพื่อตรวจสอบผลกระทบและประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกับสภาพเซลล์ตามความเป็นจริงมากขึ้น หากผลการทดลองเป็นไปอย่างน่าพึงพอใจอาจจะต้องมีการนำมาทดสอบกับผิวหนังมนุษย์จริง ๆ เพื่อยืนยันผลการทดลองก่อนนำไปใช้จริงอย่างกว้างขวางในอนาคต เพราะสภาพผิวหนังมนุษย์อาจมีความแตกต่างจากเซลล์เพาะเลี้ยงในหลาย ๆ ปัจจัย

เอกสารอ้างอิง

Alvaro, S., Jose, N, R., Francis, G. and Francis, G. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. Journal of Biochemistry and Biophysics. 1247: 1-11.

Ashley, K, C. and Raja, K, S. 2016. Phytochemicals in the treatment of hyperpigmentation. Botanics:Targets and Therapy. 6: 89-96.

Emanuela, B., Daniela, K. and Mauro, P. 2016. Skin Pigmentation and Pigmentary Disorders: Focus on Epidermal/Dermal Cross-Talk. Annals of Dermatology. 28: 279-289.

Ercole, L, C., Kai-Ming, L., Muhammud, S., Prabu, D., Sheila, H., John, Z., Micheal, L, G. and Eleanor, G, R. 2002. Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. 23: 1071-1077.

Hongfei, Z., Jadwiga, K, K., David, S., Shigenori, M., Yuji, H. and David, R. 2009. Benzene Metabolite Hydroquinone Up-Regulates chondromodulin-I and Inhibits Tube Formation in Human Bone Marrow Endothelial Cells. 76: 579-587.

Mercedes, J., Josefa, E., Juana, C., Fernando, G. and Francisco, G. 2005. Oxidation of the flavonoid eriodictyol by tyrosinase. Plant Physiology and Biochemistry. 43: 866-873.

Ruth, H., Robin, S, P., Elaine, C., Sherri, S., Sergio, T., Miriam, L, W., Stephen, A. and Daniel, N, H. 2002. Abnormal Acidification of Melanoma Cells Induces Tyrosinase Retention in the Early Secretory Pathway. The journal of biological chemistry. 277: 14821-14828.

Szu-Hsiu, L., I-Horng, P. and I-Ming, C. 2007. Inhibitory Effect of P-Hydroxybenzyl Alcohol on Tyrosinase Activity and Melanogenesis. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 30: 1135-1139.

Thanigaimalai, P., Manoj, M. and Sang-Hun, J. 2015. Inhibitors of melanogenesis: a patent review (2009 – 2014). Patent Review. 25: 775-788.

Yasuyuki, M., Takanori, K., Aiko, Y., Hironori, Y. and Masanori, S. 2006. Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible During Catalysis. Journal of Biological Chemistry. 281: 8981-8990.

Yi, W., Cao, R., Peng, W., Wen, H., Yan, Q., Zhou, B., Ma, L. and Song, H. 2010. Synthesis and biological evaluation of novel 4-hydroxybenzaldehyde derivatives as tyrosinase inhibitors. Europian Journal of Medicinal Chemistry. 45: 639- 646.

Yoshida, H. 1883. Chemistry of Lacquer (Urushi) Part 1. Journal of the Chemical Society. 43: 472-486.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ตัวอย่างการคำนวณร้อยละการยับยั้งไทโรซิเนสด้วยโกจิกแอซิด

การทดลองครั้งที่ 1	**จำนวนซ้ำที่ 1**	**จำนวนซ้ำที่ 2**	**จำนวนซ้ำที่ 3**	**ค่าการดูดกลืนแสงพื้นหลัง**	**ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง**	**ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงและพื้นหลัง**	**ร้อยละการยับยั้ง**
DMSO	0.457	0.454	0.437	0.042	0.449	0.407	0
KJ 0.065 mM	0.427	0.412	0.421	0.051	0.42	0.369	9.41
KJ 0.125 mM	0.395	0.389	0.388	0.052	0.390	0.338	16.86
KJ 0.25 mM	0.367	0.315	0.332	0.06	0.338	0.278	31.75
KJ 0.5 mM	0.25	0.252	0.226	0.057	0.24	0.185	54.42
KJ 1 mM	0.164	0.174	0.163	0.055	0.167	0.112	72.51
การทดลองครั้งที่ 2	**จำนวนซ้ำที่ 1**	**จำนวนซ้ำที่ 2**	**จำนวนซ้ำที่ 3**	**ค่าการดูดกลืนแสงพื้นหลัง**	**ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง**	**ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงและพื้นหลัง**	**ร้อยละการยับยั้ง**
DMSO	0.506	0.525	0.441	0.052	0.491	0.439	0
KJ 0.065 mM	0.487	0.522	0.47	0.065	0.493	0.428	2.43
KJ 0.125 mM	0.516	0.416	0.418	0.085	0.45	0.365	16.79
KJ 0.25 mM	0.433	0.398	0.354	0.091	0.395	0.304	30.69
KJ 0.5 mM	0.339	0.266	0.338	0.065	0.314333333	0.249333333	43.16
KJ 1 mM	0.201	0.168	0.168	0.066	0.179	0.113	74.24

การทดลองครั้งที่ 3	**จำนวนซ้ำที่ 1**	**จำนวนซ้ำที่ 2**	**จำนวนซ้ำที่ 3**	**ค่าการดูดกลืนแสงพื้นหลัง**	**ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง**	**ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงและพื้นหลัง**	**ร้อยละการยับยั้ง**
DMSO	0.528	0.532	0.49	0.053	0.516	0.463	0
KJ 0.065 mM	0.476	0.509	0.451	0.044	0.478	0.434	6.25
KJ 0.125 mM	0.446	0.43	0.44	0.045	0.438	0.393	15.10
KJ 0.25 mM	0.32	0.338	0.303	0.046	0.320	0.274	40.83
KJ 0.5 mM	0.223	0.23	0.194	0.045	0.215	0.170	63.19
KJ 1 mM	0.137	0.122	0.101	0.047	0.12	0.073	84.25
การทดลองครั้งที่ 3	**จำนวนซ้ำที่ 1**	**จำนวนซ้ำที่ 2**	**จำนวนซ้ำที่ 3**	**ค่าการดูดกลืนแสงพื้นหลัง**	**ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง**	**ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงและพื้นหลัง**	**ร้อยละการยับยั้ง**
DMSO	0.677	0.623	0.62	0.042	0.64	0.598	0
KJ 0.065 mM	0.618	0.613	0.6	0.041	0.610	0.569	4.79
KJ 0.125 mM	0.595	0.579	0.545	0.041	0.573	0.532	11.04
KJ 0.25 mM	0.588	0.513	0.459	0.042	0.52	0.478	20.07
KJ 0.5 mM	0.529	0.453	0.4	0.042	0.460	0.418	29.99
KJ 1 mM	0.296	0.308	0.29	0.052	0.298	0.246	58.86

การทดลองครั้งที่ 3	**จำนวนซ้ำที่ 1**	**จำนวนซ้ำที่ 2**	**จำนวนซ้ำที่ 3**	**ค่าการดูดกลืนแสงพื้นหลัง**	**ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง**	**ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงและพื้นหลัง**	**ร้อยละการยับยั้ง**
DMSO	0.518	0.59	0.548	0.043	0.552	0.509	0
KJ 0.065 mM	0.535	0.519	0.533	0.043	0.529	0.486	4.52
KJ 0.125 mM	0.465	0.521	0.486	0.041	0.490	0.449	11.65
KJ 0.25 mM	0.41	0.454	0.401	0.042	0.421	0.379	25.40
KJ 0.5 mM	0.264	0.258	0.273	0.041	0.265	0.224	55.99
KJ 1 mM	0.176	0.188	0.191	0.039	0.185	0.146	71.31