

การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์
จากผงขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

ปริญญาานิพนธ์
ของ
พัชรี ชุนหัด

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กุมภาพันธ์ 2551

การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์
จากผงขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

ปริญญาานิพนธ์
ของ
พัชรี ชุนหัด

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กุมภาพันธ์ 2551
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์
จากผงขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

บทคัดย่อ
ของ
พัชรี ชุนหัด

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กุมภาพันธ์ 2551

พัชรี ขุนหัด. (2551). การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากผงขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.). ปริญญาานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ ดร.ยงยุทธ ตันกุลเวสส, รองศาสตราจารย์ ดร.ธารวรัตน์ สุภศิริ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วราดุล ฉัตรทอง.

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อนำสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ที่สกัดได้จากผงของเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) มาทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา Hydroxylation ของสารประกอบไทโรซีนไปเป็น o-diphenols และปฏิกิริยา Oxidation ของ o-diphenols ไปเป็น o-quinones ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบเมลานินที่เป็นรงควัตถุในรูปสีน้ำตาลหรือสีดำในสิ่งมีชีวิต ผลการวิจัยพบว่าเมื่อนำผงขมิ้นชันมาสกัดด้วยเฮกเซนและเมทานอลตามลำดับ แล้วนำสารสกัดชั้นเมทานอลมาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล (95:5) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ทำให้ได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือ Curcumin Demethoxycurcumin และ Bisdemethoxycurcumin ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า Curcumin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด รองลงมาคือ Demethoxycurcumin โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 59.72 และ 105.20 μM ตามลำดับ ซึ่ง Curcumin มีฤทธิ์ยับยั้งที่แรงกว่ากรดโคจิก ($IC_{50} = 61.97 \mu\text{M}$) ส่วน Bisdemethoxycurcumin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่อ่อนมาก

THE TYROSINASE INHIBITORY EFFECT OF CURCUMINOIDS
FROM POWDER OF TURMERIC (*Curcuma longa* Linn.)

AN ABSTRACT

BY

PATCHAREE KHUNLAD

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Education Degree in Chemistry
at Srinakharinwirot University

February 2008

Patcharee Khunlad. (2008). *The tyrosinase inhibitory effect of Curcuminoids from powder of turmeric (Curcuma longa Linn.)*. Master thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Dr. Yongyuth Tundulawessa, Assoc. Prof. Dr. Thararat Supasiri, Assist. Prof. Waradoon Chutrtong.

The purpose of this research was to apply the curcuminoid compounds, from *Curcuma longa* Linn. to inhibit enzyme tyrosinase. The function of tyrosinase enzyme is involving the hydroxylation of tyrosine into o-diphenols and the oxidation of o-diphenols into o-quinones, that cause the dark brownish pigment of melanin synthesis process in the surface of human skin. In this study, powder of *Curcuma longa* Linn. was extracted with hexane in order to remove undesirable wax and non-polar compounds, followed by methanol extraction. The crude methanol extract was purified by thin layer chromatography, using CH₂Cl₂:MeOH (95:5) as eluant. Three compounds were obtained: Curcumin, Demethoxycurcumin, and Bisdemethoxycurcumin.

The tyrosinase inhibitory effect of the curcuminoids showed that Curcumin had better tyrosinase inhibitory activity than Demethoxycurcumin. The IC₅₀ of Curcumin and Demethoxycurcumin were at 59.72 and 105.20 μM, respectively. The result show that the Curcumin was stronger than kojic acid (IC₅₀ = 61.97 μM). The Bisdemethoxycurcumin found the weakly enzyme tyrosinase inhibitor.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากผงขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

ของ

พัชรี ขุนหลัด

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญสิริ จีระเดชากุล)

วันที่..... เดือน..... พ.ศ. 2551

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.ยงยุทธ ตันฑกุลเวสส)

(รองศาสตราจารย์ สมพล มงคลพิทักษ์สุข)

..... กรรมการ

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรวัตน์ ศุภศิริ)

(รองศาสตราจารย์ ดร.ยงยุทธ ตันฑกุลเวสส)

..... กรรมการ

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วราดูล ฉัตรทอง)

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธรรวัตน์ ศุภศิริ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วราดูล ฉัตรทอง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุรชัย สนธยานนท์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญาบัตรฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาเป็นอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ยงยุทธ ตันตกุลเวสส ประธานควบคุมปริญญาบัตร รองศาสตราจารย์ ดร. ธารรัตน์ ศุภศิริ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ วราดุล ฉัตรทอง กรรมการควบคุมปริญญาบัตร ที่ได้อุทิศ เวลาอันมีค่าให้คำปรึกษาและแนะแนวทางในการทำวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอด ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์สมพล มงคลพิทักษ์สุข และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มะญูไช้ะ ภูโน ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบเค้าโครงปริญญาบัตร และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์บุรชัย สนธยานนท์ ที่ให้ความเป็นกรุณาในการเป็นกรรมการสอบปากเปล่า ปริญญาบัตร ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ ทำให้ปริญญาบัตรฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบพระคุณศูนย์เครื่องมือกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องอ่านไมโครเพลท ในการอ่านค่าการดูดกลืนแสงของสารเพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเคมีทุกท่านที่ให้ความรู้ ความเมตตาแก่ผู้วิจัยในการศึกษาตามหลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต และคำแนะนำเพิ่มเติมต่างๆ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเคมี และเพื่อนๆ นิสิตปริญญาโททุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำดูแลช่วยเหลืออำนวยความสะดวกและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด

ท้ายสุดนี้คุณค่าและประโยชน์ใดๆ อันเกิดจากปริญญาบัตรฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่บิดามารดา ครู อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

พัชรี ขุนหลัด

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	7
ความสำคัญของการวิจัย.....	7
ขอบเขตของการวิจัย.....	7
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	7
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
เอนไซม์ไทโรซิเนส.....	8
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	9
ขมิ้นชัน (Turmeric).....	13
ข้อกำหนดคุณภาพสมุนไพรขมิ้นชัน.....	17
เคอร์คิวมินอยด์.....	23
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเคอร์คิวมินอยด์.....	25
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	30
สารเคมี และอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	30
การสกัดสารจากผงขมิ้นชัน.....	31
การแยกและการทำสารสกัดให้บริสุทธิ์.....	31
การศึกษาสมบัติทางกายภาพและวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	31
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	32
4 ผลการวิจัย.....	36
ผลการสกัดสารจากผงขมิ้นชัน.....	36
ผลการแยกและการทำสารสกัดให้บริสุทธิ์.....	36
ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพและการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์.....	36
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	45

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	51
ข้อเสนอแนะ.....	53
บรรณานุกรม.....	54
ภาคผนวก.....	60
อภิธานศัพท์.....	79
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	82

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่างๆ ในสกัดเมทานอลจากเหง้าขมิ้นชัน...	22
2 สมบัติของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์.....	24
3 แสดงชุดทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	33
4 แสดงข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของ Curcumin (23) และสารประกอบ A.....	38
5 แสดงข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ A.....	38
6 แสดงข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของ Demethoxycurcumin (24) และสารประกอบ B.....	40
7 แสดงข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ B.....	41
8 แสดงข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของ Bisdemethoxycurcumin (25) และสารประกอบ C.....	43
9 แสดงข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ C.....	44
10 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเมทานอล.....	45
11 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบ A.....	46
12 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบ B.....	48
13 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบ C.....	49
14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของกรดโคจิก.....	50

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 เม็ดสีผิวและเซลล์สร้างเม็ดสีในชั้นล่างสุดของหนังกำพร้า.....	1
2 การเกิดเม็ดสี Eumelanins และ Phaeomelanins จาก Tyrosine หรือ DOPA.....	2
3 สูตรโครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	4
4 สูตรโครงสร้างของสารที่นิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ขจัดฝ้าและทำให้ผิวขาว	6
5 โครงสร้างและบริเวณ Active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	8
6 สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากแก่นของต้นมะหาด.....	9
7 สูตรโครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แยกได้จากเนื้อไม้สาเก.....	10
8 สูตรโครงสร้างของ Mulberroside F tran-resveratrol และ Artocarpone.....	13
9 ลักษณะของขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i> Linn.).....	16
10 จุลกายวิภาคของเหง้าขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i> Linn.).....	19
11 จุลกายวิภาคของผงขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i> Linn.).....	20
12 Thin-layer chromatogram ของสารสกัดเมทานอลจากเหง้าขมิ้นชัน.....	21
13 โครงสร้างของ Curcumin Demethoxycurcumin และ Bisdemethoxycurcumin.....	23
14 การเติมชุดทดสอบใน Microtiter plate ขนาด 96 หลุมที่ใช้ในการทดลอง.....	34
15 ขั้นตอนการดำเนินการสกัด และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	35
16 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ A.....	37
17 โครงสร้างของสารประกอบ B.....	40
18 โครงสร้างของสารประกอบ C.....	42
19 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	46
20 แสดงค่า IC_{50} ของสารประกอบ A ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	47
21 แสดงค่า IC_{50} ของสารประกอบ B ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	48
22 แสดงค่า IC_{50} ของสารประกอบ C ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	49
23 แสดง IC_{50} ของกรดโคจิกต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส.....	50
24 แสดงการเกิด Tautomerization ของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์.....	51
25 การสังเคราะห์เมลานิน.....	53
26 แสดง 1H -NMR spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ A.....	61
27 แสดง ^{13}C -NMR spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ A.....	62

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

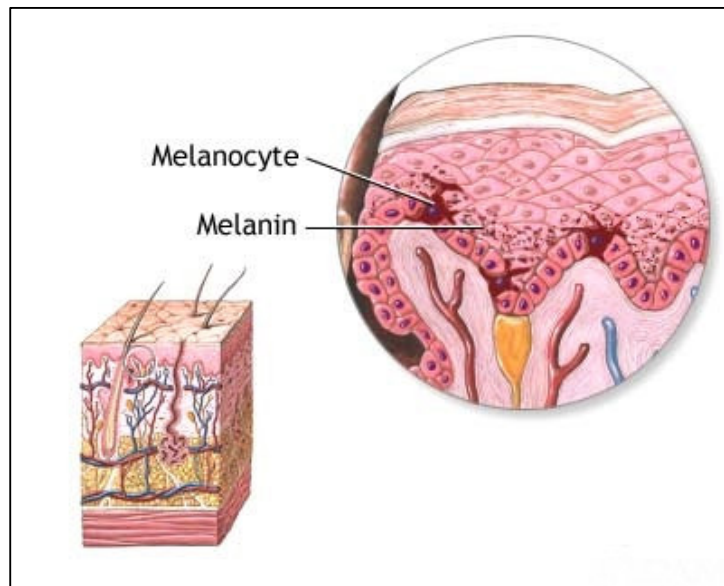
ภาพประกอบ	หน้า
28 แสดง DEPT spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ A	63
29 แสดง COSY spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ A.....	64
30 แสดง HMBC spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ A.....	65
31 แสดง HMQC spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ A.....	66
32 แสดง ¹ H-NMR spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ B.....	67
33 แสดง ¹³ C-NMR spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ B.....	68
34 แสดง DEPT spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ B	69
35 แสดง COSY spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ B.....	70
36 แสดง HMBC spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ B.....	71
37 แสดง HMQC spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ B.....	72
38 แสดง ¹ H-NMR spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ C.....	73
39 แสดง ¹³ C-NMR spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ C.....	74
40 แสดง DEPT spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ C.....	75
41 แสดง COSY spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ C.....	76
42 แสดง HMBC spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ C.....	77
43 แสดง HMQC spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) ของสารประกอบ C.....	78

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

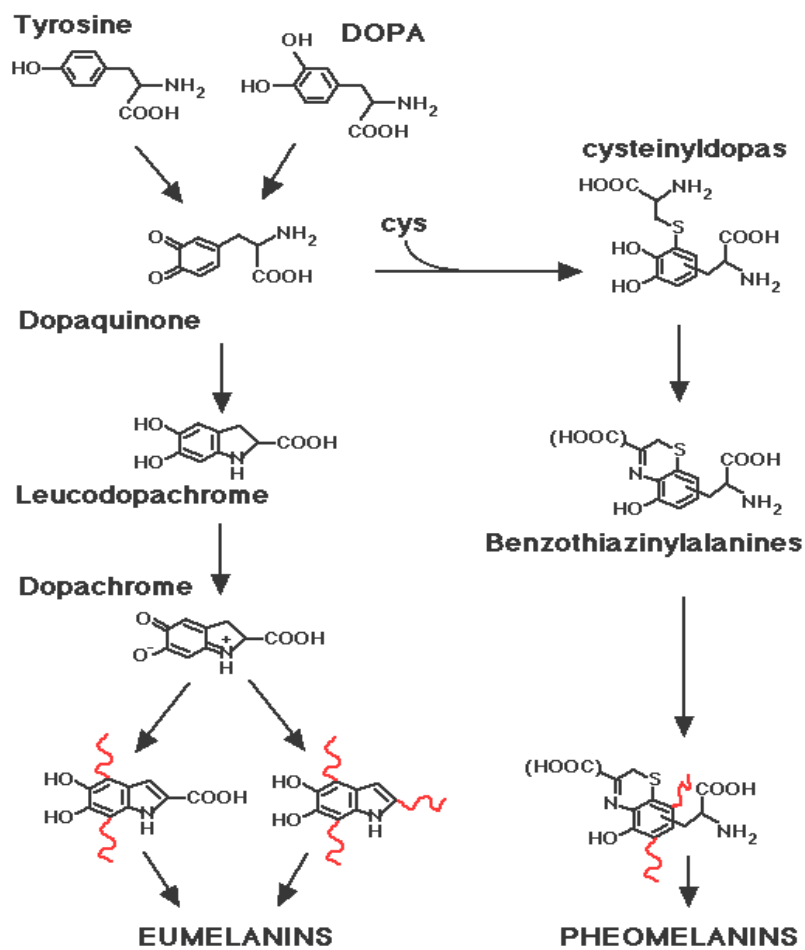
การจัดสีผิวหรือการทำให้ผิวขาวเป็นเรื่องของความงาม โดยสังคมเอเชียมีค่านิยมชื่นชอบผิวขาวเพราะแลดูสะอาดตาและน่ามอง นำมาซึ่งเสน่ห์ดึงดูดใจต่อเพศตรงข้าม ไม่ว่าจะชายหรือหญิง ดังนั้นจึงมีหลายคนที่พยายามเปลี่ยนแปลงสีผิวของตนเองให้ขาวขึ้น แต่สีผิวของคนเราที่ปรากฏให้เห็นเกิดจากองค์ประกอบของเม็ดสีผิว (Melanin) ฮีโมโกลบินในเลือด (Haemoglobin) และสารคาโรทีนอยด์ (Carotenoids) ในผิวหนังปนกัน แต่ส่วนใหญ่เกิดจากเม็ดสีผิว โดยปกติผิวหนังจะมีการสร้างเม็ดสีผิวตามธรรมชาติโดยเซลล์สร้างเม็ดสี (Melanocytes) ซึ่งอยู่ในชั้นล่างสุดของหนังกำพร้า (ภาพประกอบ 1) เม็ดสีที่ถูกสร้างจะถูกส่งมายังชั้นบนเพื่อทำหน้าที่ปกคลุม และปกป้องร่างกายจากสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะรังสีเหนือม่วง (Ultraviolet) ซึ่งมีอยู่ในแสงแดด เพื่อมิให้เกิดการอักเสบวมแดงหรือผิวไหม้ ดังนั้นคนที่ผิวสีเข้มหรือคล้ำเป็นเพราะมีการสร้างเม็ดสีมากกว่าคนผิวขาว จึงเกิดอันตรายจากแดดเผาได้น้อยกว่า (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. 2544ก: 257)



ภาพประกอบ 1 เม็ดสีผิวและเซลล์สร้างเม็ดสีในชั้นล่างสุดของหนังกำพร้า

ที่มา: Berman K. (2006). *Medical Encyclopedia: Melanin*. (Online).

กระบวนการสร้างเม็ดสีจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไทโรซีน (Tyrosine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีอยู่ในผิวหนัง ไปเป็น Dihydroxyphenylalanine (DOPA) แล้วเปลี่ยน DOPA เป็น Dopaquinone และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันผ่านสารมัธยันต์ (Intermediate) อีกหลายขั้นตอนจนได้เม็ดสี 2 ชนิด คือ ยูเมลานิน (Eumelanins) ซึ่งมีสีน้ำตาลหรือดำ และฟีโอเมลานิน (Pheomelanins) ซึ่งมีสีแดงหรือเหลือง (พิมพ์ร ลิลาพรพิสิฐ. 2544ก: 257) ปฏิกิริยากระบวนการสร้างเม็ดสีทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 การเกิดเม็ดสี Eumelanins และ Pheomelanins จาก Tyrosine หรือ DOPA

ที่มา: Jacques S. (2007). *Optical absorption of melanin*. (Online).

กระบวนการสร้างเม็ดสีทั้ง 2 ชนิดนี้จะมากขึ้นน้อยแตกต่างกันในแต่ละคนหรือเชื้อชาติ จึงทำให้เกิดสีผิวที่แตกต่างกันได้ในหลายระดับ เช่น ผิวดำแดง ดำเหลือง ขาวเหลือง หรือขาวอมชมพู เป็นต้น ซึ่งสีเหล่านี้ขึ้นกับปัจจัยทางกรรมพันธุ์ ฮอร์โมน MSH (Melanocyte stimulating hormone) และการสัมผัสแสงยูวี เป็นตัวกำหนดให้เกิดกระบวนการสร้างเม็ดสีได้ต่างกัน เช่น คนชาติเอเชียมักมีผิวขาวอมเหลือง คนชาติอเมริกันหรือยุโรปมีผิวขาวอมชมพู คนนิโกร ออฟริกาที่มีผิวดำ เป็นต้น เหล่านี้เป็นปัจจัยทางกรรมพันธุ์ ส่วนปัจจัยทางฮอร์โมนนั้น เมื่อภาวะร่างกายเปลี่ยนแปลง เช่นการตั้งครรภ์ การรับประทานยาคุมกำเนิด จะกระตุ้นฮอร์โมน MSH ให้หลังมากขึ้น การสร้างสีผิวก็จะมากขึ้นด้วย ส่วนปัจจัยภายนอกที่สำคัญได้แก่ รังสียูวีซึ่งมีมากในแสงแดดหรือแม้แต่หลอดไฟตามบ้าน จะสามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีมากขึ้นด้วย ผู้ที่โดนแสงแดดจะมีผิวสีคล้ำขึ้นเพราะกลไกตามธรรมชาติในการป้องกันผิวหนึ่งจากอันตรายดังกล่าว (พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ. 2544ก: 257)

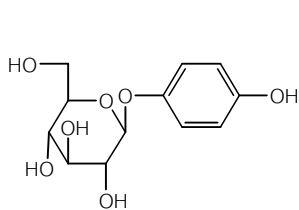
สารสังเคราะห์เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์ขจัดสีผิว แบ่งเป็น 4 ประเภทใหญ่ๆ คือ (พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ. 2544ข: 123)

1. สารเคลือบคลุม (Opacifying or Covering agent) ทำหน้าที่เคลือบคลุม กลบเกลื่อนสีผิวเดิมเอาไว้ สารเหล่านี้มักมีสีขาวซึ่งเคลือบผิวติดได้ เป็นการทำให้ผิวขาวโดยทางอ้อม
2. สารลดการสร้างสีผิว (Depigmentating agent) ได้แก่สารที่ใช้รบกวนเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่ให้ทำหน้าที่ได้
3. สารป้องกันแสงแดด (Sunscreen agent) ได้แก่สารซึ่งทำหน้าที่ดูดซับหรือเปลี่ยนรังสียูวีให้กลายเป็นรังสีที่มีช่วงคลื่นยาวกว่า ซึ่งไม่ทำอันตรายต่อผิวหนึ่งหรือไม่เกิดการกระตุ้นการสร้างเมลานิน
4. สารออกซิไดเซอร์ (Oxidizing agent) ทำหน้าที่ฟอกสีผิวโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน

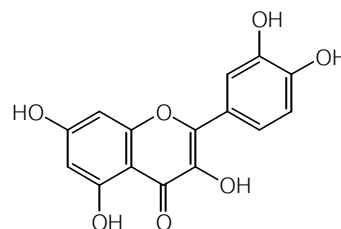
ปัจจุบันสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส หรือยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน จะนิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ขจัดฝ้าและทำให้ผิวขาว เนื่องจากขจัดสีผิวได้ดีกว่าชนิดอื่น รวมทั้งใช้ได้ผลในเวลาที่ยาวกว่า ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สามารถแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ตามโครงสร้างเคมีได้ดังนี้ (Likhitwitayawuid. 2000: 3-10)

1. สารกลุ่ม Quinone เช่น Arbutin (1) ($IC_{50} = 6.2 \mu M$)
2. สารกลุ่ม Flavonoids เช่น Quercetin (2) ($IC_{50} = 60 \mu M$)
3. สารกลุ่ม Stilbenoids เช่น Artocarbene (3) ($IC_{50} = 2.45 \mu M$)
4. สารกลุ่ม Phnylpropanoids เช่น Ferulic acid (4) ($IC_{50} = 45 \mu M$)

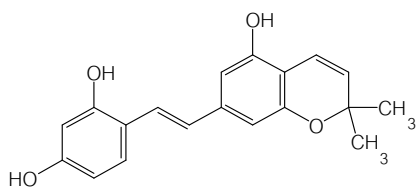
5. สารกลุ่ม Phenolics เช่น 5-[8(Z),11(Z),14-Pentadecatrienyl]resorcinol (5)
($IC_{50} = 40 \mu M$)
6. สารกลุ่ม Cyclic peptides เช่น Pseudostellarin A (6) ($IC_{50} = 131 \mu M$)



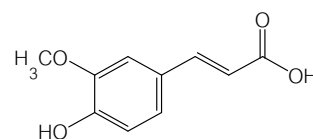
Arbutin (1)



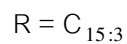
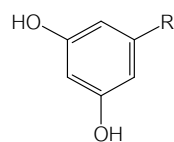
Quercetin (2)



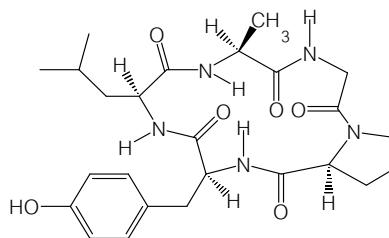
Artocarbene (3)



Ferulic acid (4)



5-[8(Z),11(Z),14-Pentadecatrienyl] resorcinol (5)



Pseudostellarin A (6)

ภาพประกอบ 3 สูตรโครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารที่นิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์จัดฝ้าและทำให้ผิวขาว ได้แก่ (พิมพร สี่ลาพรพิสิฐ. 2544ก: 259-260; 2544ข: 131-135; นุช ภิรมณ. 2548: 58-59)

1. กรดโคจิก (Kojic acid) (7) เป็นสารที่เกิดจากกระบวนการเมตาโบลิซึมของเชื้อรา *Aspergillus*, *Penicillium* และแบคทีเรีย *Acetobacter* สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้ลดการสร้างเม็ดสี Eumelanin นอกจากนี้ยังสามารถดูดซับรังสียูวีได้ด้วย

2. กรดอะเซเลอิก (Azelaic acid) (8) เป็น Saturated straight-chain dicarboxylic acid (C_9) ซึ่งเป็นสารที่พบได้ตามธรรมชาติในเมล็ดข้าวสาลี ข้าวไรน์และข้าวบาเลย์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์สร้างสีที่ผิดปกติ เช่นการเกิดฝ้า แต่ไม่มีผลต่อเซลล์สร้างสีที่ทำงานปกติ

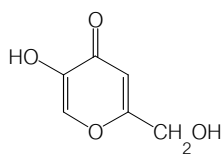
3. อาร์บูติน (Arbutin) (1) เป็น Hydroquinone glycoside เดิมสกัดได้จากพืชในตระกูลเบอรรี่ที่ชื่อ Bearberry แต่ปัจจุบันสังเคราะห์ได้ สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้แรงกว่ากรดโคจิกและวิตามินซี โดยใช้ในความเข้มข้น 3-7% มีคุณสมบัติละลายน้ำได้

4. วิตามินซี (Vitamin C หรือ Ascorbic acid) (9) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายน้ำได้ดี ช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์ใหม่ และซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายจากรังสียูวีเอ (UV-A) ช่วยให้ผิวขาวขึ้น แต่เสื่อมสภาพได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศ แสงแดด หรือความร้อน

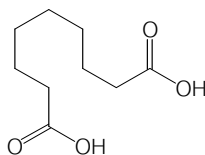
5. Magnesium ascorbyl phosphate (MAP) (10) เป็นอนุพันธ์ที่คงตัวของวิตามินซี ที่ความเข้มข้น 10% สามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีในคนที่เปื้อนฝ้าได้ และยังลดการทำลายของผิวหนังจากรังสียูวีได้ด้วย MAP สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็นวิตามินซีที่ผิวหนังได้

6. Kazinol F (11) ซึ่งเป็นสารสกัดจากปอสา (Paper mulberry) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้แรงกว่ากรดโคจิก วิตามินซี และไฮโดรควิโนน นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการจับกับอนุมูลอิสระ จึงใช้ในการรักษาฝ้าได้ และระคายผิวน้อยที่ความเข้มข้น 1%

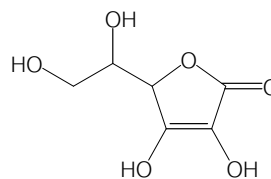
7. กลาบรีดิน (Glabridin) (12) เป็นสารสกัดจากรากชะเอม (Licorice extract) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้แรงกว่ากรดโคจิกและวิตามินซี โดยไม่ทำลายเซลล์ และลดการทำลายผิวหนังจากรังสียูวีบี (UV-B) ได้



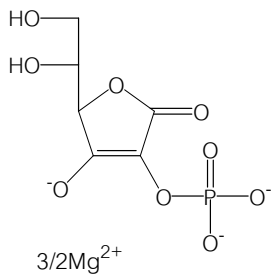
Kojic acid (7)



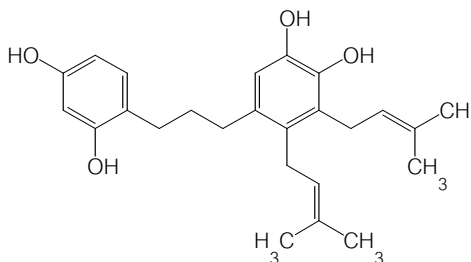
Azelaic acid (8)



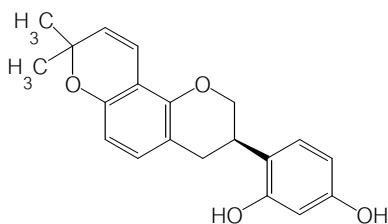
Ascorbic acid (9)



MAP (10)



Kazinol F (11)



Glabridin (12)

ภาพประกอบ 4 สูตรโครงสร้างของสารที่นิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ขจัดฝ้าและทำให้ผิวขาว

จากเหตุผลดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีความมุ่งหวังที่จะศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากผงขมิ้นชันต่อฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดสีผิวที่ไม่พึงปรารถนา โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาอาจใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นเครื่องสำอางเพื่อผิวขาวต่อไปได้ในอนาคต

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัด การแยกสาร และการทำสารให้บริสุทธิ์จากผงขมิ้นชัน
2. เพื่อวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้ทราบเทคนิคการสกัด การแยกสาร และการทำสารให้บริสุทธิ์จากผงขมิ้นชัน
2. ทำให้ทราบสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
3. ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดผงขมิ้นชัน อาจเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

1. ใช้ผงขมิ้นชันที่ซื้อจากร้านเจ้ากรมเปือ (เมษายน 2550)
2. การสกัดสาร ใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และเมทานอล ตามลำดับ
3. การแยกและการทำสารให้บริสุทธิ์จะทำเฉพาะสารสกัดชั้นเมทานอล
4. การศึกษาสูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่ได้จะใช้เฉพาะวิธีทางนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR)
5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จะทดสอบกับเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (Mushroom Tyrosinase, EC. 1.14.18.1) ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

นิยามศัพท์เฉพาะ

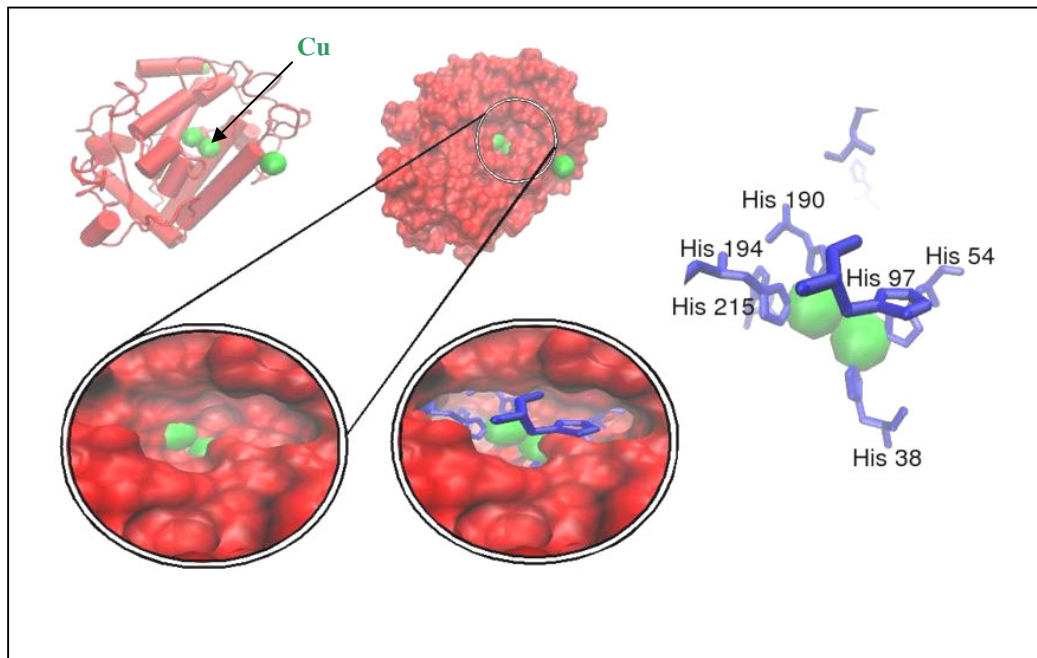
1. IC_{50} หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลองที่ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลงครึ่งหนึ่ง
2. สารสกัดหยาบ หมายถึง สารสกัดชั้นเมทานอล

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ (ภาพประกอบ 5) พบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก พืช และสัตว์ ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดเอนไซม์ไทโรซิเนสจะมีบทบาทแตกต่างกันออกไป โดยเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา Hydroxylation ของกรดอะมิโนไทโรซีน ซึ่งเป็น Monophenol ไปเป็น o-diphenol (หรือ DOPA) และปฏิกิริยา Oxidation ของ o-diphenol ไปเป็น o-quinone (หรือ Dopaqueinone) เป็นขบวนการปกติในการสังเคราะห์สารประกอบเมลานินที่เป็นรงควัตถุในรูปสีน้ำตาลหรือสีดำในสิ่งมีชีวิต (Zhang; et al. 2006: 579)



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างและบริเวณ Active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส

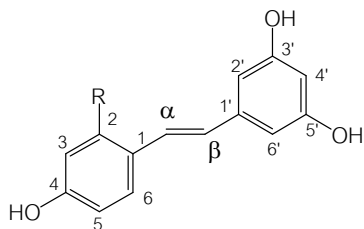
ที่มา: Wikipedia. (2007). *Tyrosinase from wikipedia*. (Online).

สำหรับในมนุษย์ เอนไซม์ไทโรซิเนสจะทำหน้าที่ในการสร้างเมลานิน ซึ่งเป็นสารที่พบมากที่บริเวณผิวหนัง ทำหน้าที่ในการปกป้องร่างกายจากสิ่งแวดล้อม การมีเมลานินมาสะสมที่ผิวหนังมาก จะทำให้ผิวหนังส่วนนั้นมีสีคล้ำ เรียกว่า Hyperpigmentation (Friedman. 1996: 631-653) ในกุ้ง ปู และ แมลงต่างๆ เอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ในกระบวนการสร้างเปลือกแข็งหลังมีการลอกคราบ ทำให้กระดองของสัตว์เหล่านี้มีสีคล้ำ (มยุรี จัยวัฒน์. 2547: 9-16) ส่วนในผักและผลไม้หลายชนิด เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวการที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล ทำให้อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปขั้นต่ำสั้นลง (Friedman. 1996: 631-653)

ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงเป็นการป้องกันการสังเคราะห์เมลานินได้ทั้งในผัก ผลไม้ สัตว์และในมนุษย์ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรค รวมทั้งการทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อผิวขาวได้ (Whitening agent)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

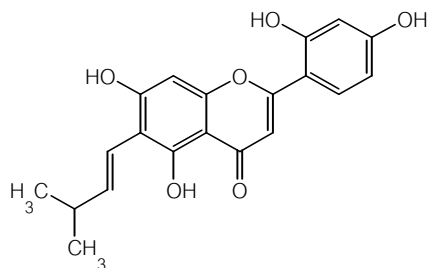
บุญชู ศรีตุลารักษ์ และคนอื่นๆ (2541: 149-155) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากพืช พบว่าสารสกัดที่ได้จากแก่นของต้นมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) ซึ่งอยู่ในวงศ์ Moraceae มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 92.17% ที่ระดับความเข้มข้น 3 $\mu\text{g/mL}$ และสามารถสกัดสารบริสุทธิ์ออกมาได้ 2 ชนิดคือ 2, 4, 3', 5'-tetrahydroxystilbene (13) และ 4, 3', 5'-trihydroxy-stilbene (14) ดังภาพประกอบ 6 เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 38.5 และ 946.6 μM ตามลำดับ นั่นคือสาร 13 มีความแรงประมาณ 25 เท่าของสาร 14 และมีฤทธิ์อ่อนกว่ากรดโคจิกเล็กน้อย แต่แรงกว่าอาร์บูติน



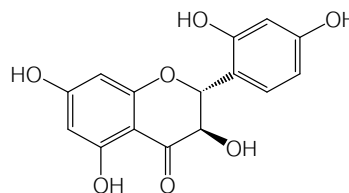
ภาพประกอบ 6 สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากแก่นของต้นมะหาด

นอกจากนี้บุญชู ศรีตุลารักษ์ และคนอื่นๆ (2541: 149-155) ยังพบว่าสารสกัดจากหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa*) สารสกัดจากต้นขำมะเลียง (*Lepisanthes fruticosa*) และสารสกัดจากเปลือกของต้นพญาป่า (*Hesperetusa crenulata*) ที่ระดับความเข้มข้น 3 $\mu\text{g/mL}$ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 55.61% 30.40% และ 33.91% ตามลำดับ

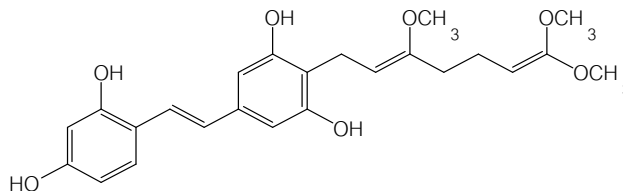
ชิมิซึ และคนอื่นๆ (Shimizu; et al. 1998: 408-412) พบว่าสารสกัดจากเนื้อไม้สาเก (*Artocarpus incisus* Linn. F.) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยความแรงเท่ากับกรดโคจิก ($\text{IC}_{50} = 8.66 \mu\text{M}$) เมื่อทดลองในหลอดทดลอง และมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน เมื่อศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง (B16 melasma cell) ด้วยความแรงเท่ากับกรดโคจิกเช่นเดียวกัน โดยไม่มีผลต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทดลองบนผิวหนังหนูตะเภาสีน้ำตาลซึ่งทำให้สีผิวคล้ำด้วยแสง UV-B พบว่าสารสกัดจากเนื้อไม้สาเกสามารถทำให้สีผิวจางลงโดยไม่ก่ออาการอักเสบต่อผิวหนัง นอกจากนี้ยังได้แยกสารบริสุทธิ์จากเนื้อไม้สาเก และพบว่ามีสารสำคัญ 7 ชนิด (ภาพประกอบ 7) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ในหลอดทดลอง คือ Isoartocarpesin (15), (+)-Dihydromorin (16), Chlorophorin (17), (+)-Norartocarpanone (18), 4-Prenyloxyresveratrol (19), Artocarbene (3) และ Artocarpesin (20)



Isoartocarpesin (15)

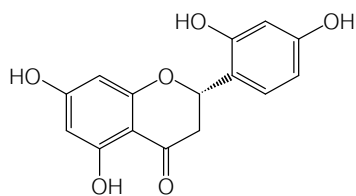


(+)-Dihydromorin (16)

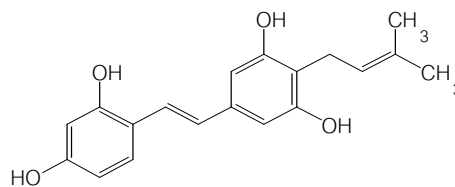


Chlorophorin (17)

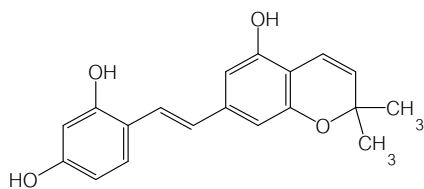
ภาพประกอบ 7 สูตรโครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แยกได้จากเนื้อไม้สาเก



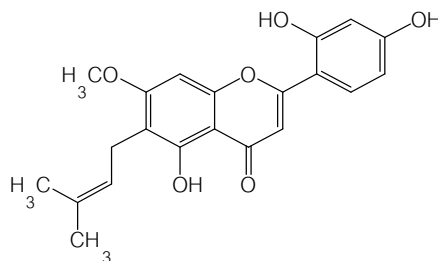
(+)-Norartocarpanone (18)



4-Prenyloxyresveratrol (19)



Artocarbene (3)



Artocarpesin (20)

ภาพประกอบ 7 (ต่อ) สูตรโครงสร้างของสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แยกได้จากเนื้อไม้สาเก

นิรุสลีนิน มะเต๊ะ และ รัศมี วัฒนานนท์ (2545: บทคัดย่อ) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสมุนไพรไทย 4 ชนิด คือ ต้นชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.) เถาบอระเพ็ด (*Tinospora tuberculata*) เหง้าว่านชักมดลูก (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) และผลส้มแขก (*Garcinia atroviridis* Griff.) พบว่าสารสกัดชะเอมเทศมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสแรงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.47 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งแรงเป็น 3 เท่าของกรดโคจิก ($IC_{50} = 25.12 \mu\text{g/mL}$) ส่วนสารสกัดของเถาบอระเพ็ด เหง้าว่านชักมดลูก และผลส้มแขก มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสอ่อนกว่ากรดโคจิก

บัวริน และคนอื่นๆ (Baurin; et al. 2002: 155-158) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของพืชในเขตร้อน โดยใช้ส่วนผสม Propylene glycol ต่อ น้ำ (50:50) จากพืช 67 ชนิด และใช้สารสกัดจากใบหม่อน (*Morus alba*) เป็น positive control พบว่ามีพืช 5 ชนิดที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้มากกว่า 90% คือ สารสกัดจากกิ่ง *Entada Africana* (94%) สารสกัดจากใบ *Portulaca pilosa* (93%) สารสกัดจากกิ่ง *Prosopis Africana* (91%) สารสกัดจากกิ่ง

Stryphnodendron barbatimao (90%) สารสกัดจากใบ *Cariniana brasiliensis* (90%) และสารสกัดจากใบหม่อนสามารถยับยั้งได้ 97%

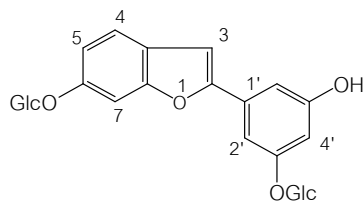
ลี และคนอื่นๆ (Lee; et al. 2002: 1045-1048) พบว่าสารสกัดใบหม่อน (*Morus alba*) ด้วย 85% Methanol มีผลยับยั้งการสังเคราะห์เมลานิน โดยไปยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ($IC_{50} = 0.29 \mu\text{g/mL}$) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน DOPA ไปเป็น Dopachrome ในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน และพบว่าสารที่มีฤทธิ์ดังกล่าวคือ Mulberroside F หรือ Morcin M-6, 3'-di-O- β -D-glucopyranoside (21) (ภาพประกอบ 8) และยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้อีกด้วย แต่มีฤทธิ์อ่อนกว่ากรดโคจิก ($IC_{50} = 1.3 \mu\text{g/mL}$)

ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ (2546: 27-29) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากพืช 11 ชนิด พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ สารสกัดในชั้นเอทานอลของใบการเวก (*Artabotrys hexapetalus*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงสุดคือ 89.37% นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดในชั้นเอทิลอะซิเตทของเมื่อย (*Gnetum latifolium*) และสารสกัดในชั้นเอทานอลของเปลือกและต้นพอก (*Parinari anamense*) สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 79.52% 75.85% และ 79.49% ตามลำดับ

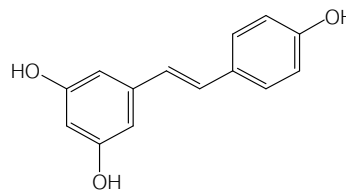
อ้อมบุญ ล้วนรัตน์ และ พรรณวิภา กฤษฏาพงษ์ (2548: บทคัดย่อ) ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดแอลกอฮอล์ของกิ่งหม่อนไทย (*Morus alba* sericulture N60) โดยใช้สารสกัดความเข้มข้น 1,000-5,000 ppm พบว่าสารสกัดหม่อนที่เตรียมขึ้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 60-70% ซึ่งยับยั้งได้มากกว่าอาร์บูติน กรดโคจิก tran-resveratrol (22) และสารสกัดหม่อนที่มีขายอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งมีค่ายับยั้งสูงสุดคือ 40% 78% 41% และ 60% ตามลำดับ และจากการตรวจสอบด้วย TLC และ HPLC พบว่าสารสกัดกิ่งหม่อนไทยมีสาร tran-resveratrol อยู่เพียงเล็กน้อย แสดงว่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสขึ้นอยู่กับสารตัวอื่น

อรุณ และคนอื่นๆ (Arung; et al. 2006: 1966-1969) พบว่าสาร Artocarpanone (23) (ภาพประกอบ 8) ที่แยกได้จากเปลือกต้นขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 melanoma ได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 80.8 และ 89.1 μM ตามลำดับ ซึ่ง Artocarpanone จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแรงกว่าอาร์บูติน แต่อ่อนกว่ากรดโคจิก และมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินได้ดีกว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้ และพบว่า Artocarpanone มีความเป็นพิษต่อเซลล์ B16 melanoma ต่ำ

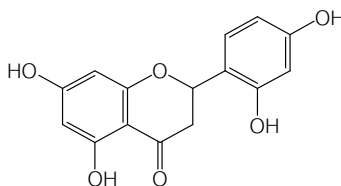
นุชนาถ รงคดิลก และคนอื่นๆ (Rongkadilok; et al. 2007: 328-336) พบว่าเมล็ดลำไย (*Euphoria longana* Lam.) ทั้งสดและแห้งสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.9 และ 3.2 mg/mL ตามลำดับ แต่มีฤทธิ์อ่อนกว่ากรดโคจิกซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.9 $\mu\text{g/mL}$



Mulberroside F (21)



trans-resveratrol (22)



Artocarpanone (23)

ภาพประกอบ 8 สูตรโครงสร้างของ Mulberroside F trans-resveratrol และ Artocarpanone

ขมิ้นชัน (Turmeric)

ขมิ้นชัน เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแพร่กระจายสู่แถบต่างๆ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า เคอร์คูมา ลองกา (*Curcuma longa* Linn.) อยู่ในวงศ์ขิงขมิ้น (Zingiberaceae) ในประเทศไทยมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป คือ ขมิ้น (ทั่วไป) ขมิ้นแกง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว (เชียงใหม่) ขี้มัน หมิ้น (ใต้) ตายอ (กะเหรี่ยง-กำแพงเพชร) สะยอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) (ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้. 2544: 160)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ขมิ้นชัน เป็นพืชที่มีลำต้นใต้ดินเช่นเดียวกับขิงและไพล โดยมากมักจะเรียกส่วนที่เป็นลำต้นนี้ว่าเหง้า (Rhizome) มีเหง้าหลักที่เจริญชูตั้งรูปไข่ หรือรูปไข่แกมรี บางครั้งเรียกเหง้าหลักว่าหัว ด้านข้างของเหง้าหลักแตกแขนงในแนวระนาบ แต่ละแขนงมักแตกย่อยออกไปได้อีก 1-2 ครั้ง เหง้าแขนงรูปคล้ายทรงกระบอก หรือคล้ายนิ้วมือ ตรงหรือโค้งเล็กน้อย บางครั้งเรียกเหง้าแขนงว่าแงง เนื้อเหง้าสีส้มและมีกลิ่นเฉพาะ ลำต้นส่วนที่เหนือดินเป็นลำต้นเทียมที่มีส่วนของกาบใบเรียงซ้อนอัดแน่น มีความสูงประมาณ 1 m ใบมีสีเขียว มี 6-10 ใบต่อต้น ใบเดี่ยวออกสลับที่ กาบใบยาว 40-60 cm แผ่นใบรูปรี

หรือรีแกมขอบขนาน กว้าง 10-20 cm ยาว 30-70 cm โคนใบสอบแคบหรือมนคล้ายใบพุทธรักษา ปลายใบแหลม (สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2544: 25)

ดอกมีสีขาวแกมเหลือง มีใบประดับจำนวนมาก รูปรีแกมขอบขนานเรียงเวียนถี่รอบแกน ช่อดอก ใบประดับที่โคนช่อดอกมีสีเขียวอ่อนหรือสีขาวแกมเขียว ยาว 5-6 cm กว้าง 2-3 cm ขอบ โคนใบประดับประกบติดกับใบประดับที่อยู่ใกล้เคียงและติดกับแกนช่อดอกเกิดเป็นชอกคล้ายกระเปาะ ใบประดับที่อยู่บริเวณปลายช่อดอกมีสีขาวแกมเขียวอ่อน ปลายใบประดับมีแถบสีเขียวอ่อนหรือแถบสี ชมพูอ่อน โคนใบประดับไม่ประกบติดกันเป็นกระเปาะ ดอกออกในชอกใบประดับ 3-5 ดอกต่อชอก และทยอยบาน ดอกยาวประมาณ 5 cm กลีบเลี้ยงสีขาวใส ติดกันเป็นหลอดสั้น ปลายหยักไม่เท่ากัน กลีบดอกสีขาว โคนติดกันเป็นหลอดยาว ปลายผาย และแยกเป็น 3 กลีบ เกสรตัวผู้ที่เป็นหมันแก่กลีบ ขนาดใหญ่ 3 กลีบ กลีบกลางรูปไข่กลับ สีเหลืองอ่อน และมีแถบสีเหลืองเข้มบริเวณกลางกลีบ สองกลีบข้างรูปรีแกมขอบขนานสีเหลืองอ่อน เกสรตัวผู้ที่สมบูรณ์มีก้านสั้น อับเรณูเล็กเรียวยาวและมี ฝอย โอบรอบก้านชูเกสรตัวเมีย รังไข่ 3 ห้อง ผลกลมหรือรี แต่มักไม่ติดผล (สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2544: 25)

การนำไปใช้ประโยชน์

ขมิ้นชันเป็นเครื่องเทศที่ใช้กันมานานแล้ว โดยนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ มากมาย จากหลักฐาน ที่ได้ค้นพบ พบว่าขมิ้นชันได้มีใช้กันในชาวแอสซีเรียน (Assyrian) ตั้งแต่ 600 ปีก่อนพุทธศักราช การใช้ขมิ้นชันส่วนใหญ่จะใช้เป็นเครื่องเทศในการแต่งกลิ่น สี และรส ในอาหารหลายชนิด เช่น แกงเหลือง แกงกะหรี่ ข้าวหมกไก่ ขนมห้างญวน และไก่ย่าง โดยปกติชาวอินเดีย ชาวมาเลเซีย และ อินโดนีเซีย นิยมปรุงอาหารผสมผงกะหรี่ ซึ่งผงกะหรี่มีขมิ้นชันเป็นส่วนประกอบสำคัญ นอกจากนี้ ขมิ้นชันยังมีสรรพคุณในการแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ธาตุพิการ อาหารไม่ย่อย กระเพาะอาหารอ่อนแอ ชาวอินเดียจึงจัดขมิ้นชันเป็นยาประจำบ้าน ส่วนชาวมาเลเซียและอินโดนีเซีย มักใช้ขมิ้นชันร่วมกับยา ตัวอื่นในการรักษาโรคดังกล่าว ในขณะที่ชาวจีนซึ่งไม่นิยมใช้ขมิ้นชันในการปรุงอาหาร แต่จะใช้ในการ แก้อาการปวดเสียดในท้อง ปวดหน้าอก ปวดท้องและใช้เป็นยาขับลมด้วย (พิมพ์สุดา เนตรดาว. 2539: 62)

ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่ถูกนำมาในตำรับยาสมุนไพรอย่างมากมาย โดยใช้รักษาโรคกลาก โรค หวัด ชันนะตุ อาการตกเลือดของผู้หญิง โรคท้องร่วง โรคบิด อาการท้องอืดท้องเฟ้อ อาการน้ำกัดเท้า นิ้ว อาการปวดฟัน อาการผื่นคันตามร่างกาย รักษาแผลสด นอกจากนี้ยังใช้ขมิ้นชันเป็นยาถ่ายพยาธิ แก้วพิษมดกัด แก้วฟกช้ำ ทากันยุง รักษาฟัน ลมพิษ หิด (สุพจน์ อัสวพันธ์ธนกุล. 2533: 6-10) การใช้ ขมิ้นผสมดินสอพองทาท้องหญิงมีครรภ์ตั้งแต่ท้องเริ่มขยายจนหลังคลอด จะทำให้ท้องสวยเหมือน ยังสาว ส่วนชาวอินเดียใช้ขมิ้นชันปรุงเป็นยาทาท้องสตรีหลังคลอดบุตรใหม่ๆ (พิมพ์สุดา เนตรดาว.

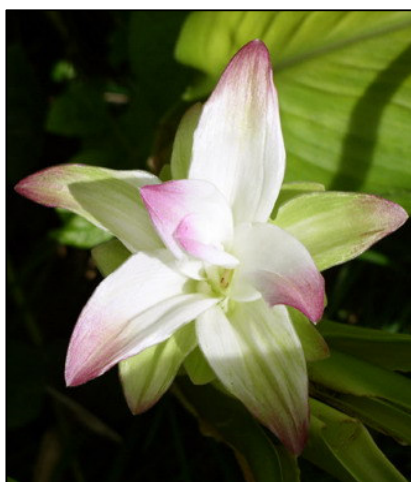
2539: 63) ส่วนเหง้าไปต้มให้สุกแล้วบดให้ละเอียด นำไปทาแก้โรคผิวหนัง ทาตามซอกอับของร่างกาย เพื่อบำบัดกลิ่นที่ไม่พึงปรารถนา (บัญญัติ สุขศรีงาม. 2543: 60)

นอกจากจะใช้ประโยชน์ดังกล่าวมาแล้ว ยังนำไปใช้เป็นสีย้อมและเครื่องสำอาง โดยการย้อมสีจะพบมากในอินเดีย จีน และบางส่วนของยุโรป ส่วนการใช้เป็นเครื่องสำอางนั้นจะพบมากในแถบตอนใต้ของเอเชีย และในหลายประเทศแถบตะวันออก โดยใช้ขมิ้นทาผิวหนัง จะทำให้ผิวหนังนุ่มนวล ในมาเลเซียใช้ผสมน้ำสำหรับใช้อาบเพื่อให้ร่างกายสะอาด ส่วนในอินเดียใช้ทาผิวหนังของผู้หญิงเพื่อป้องกันขนงอก (บัญญัติ สุขศรีงาม. 2543: 60) การเพิ่มปูนขาวเข้าไปในขมิ้นชันจะได้วัตถุสีน้ำตาลแดงเรียกว่า Kum-Kum ซึ่งเป็นสิ่งที่ผู้หญิงชาวอินเดียใช้ในการทำสัญลักษณ์บนหน้าผาก และในช่วงสมัยฟาโรห์ ขมิ้นชันใช้เป็นส่วนผสมของขี้ผึ้ง และเป็นส่วนผสมในการทำยาเตรียมดวงศพมัมมี่ของชาวอียิปต์ (โฆษิต ประเศษฐสูต. 2547: 11) ส่วนในทางพุทธศาสนา หลังโกนศีรษะเรียบร้อยแล้วจะต้องมีการชำระล้างสิ่งสกปรกออกไปเพื่อให้หนังศีรษะเกลี้ยงเกลา จากนั้นจะนำขมิ้นชันมาโขลกแล้วนำไปทาศีรษะเพื่อเพิ่มสง่าราศีให้แก่ภาค ก่อนเข้าพิธีการอุปสมบทเป็นพระภิกษุ (กองบรรณารักษกรรมไพร่เพื่อสุขภาพ. 2545: 67)

ในชนบทของประเทศไทยนิยมใช้ขมิ้นชันทั้งเหง้าสดและผงแห้ง โดยนำมาทาตามร่างกายของทารกแรกเกิดเพื่อช่วยรักษาโรคผิวหนังอันเนื่องมาจากการล้างน้ำคร่ำออกจากตัวทารกไม่หมด ทำให้เกิดอาการคันระดุดตามผิวหนัง และมักนิยมเลี้ยงไก่ชน ภายหลังการชนไก่ จะนำขมิ้นมาฝนกับน้ำขมิ้นตามตัวไก่เพื่อรักษาบาดแผลให้หายเร็วขึ้น (สุชาติพ ภมรประวัติ. 2540: 29-32)



ก



ข



ค



ง

ภาพประกอบ 9 ลักษณะของขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

ก. ใบ ข. ดอก ค. หัวหรือเหง้า ง. ผงขมิ้นชัน

ข้อกำหนดคุณภาพสมุนไพรขึ้น

เอกลักษณ์ทางเภสัชเวช

ลักษณะมหภาค

เหง้าขึ้นมีรูปกลมรีเกือบเป็นรูปไข่ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 cm ยาวประมาณ 3 cm ผิวนอกมีสีน้ำตาลปนเทา มีรอยเป็นวงรอบๆ และมีรอยแผลเป็นของรากที่หลุดออกไป แขนงของเหง้าเป็นรูปทรงกระบอก เรียวตรงปลายเล็กน้อย เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 cm ผิวนอกของแขนงมีสีเหลืองถึงน้ำตาลเหลือง มีรอยเป็นวงรอบๆ เมื่อหันตามขวางจะเห็นเนื้อในสีเหลืองส้มถึงเหลือง เห็นวงของเอนโดเดอริมีส (Epidermis) ชัดเจน (สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2544: 42)

ลักษณะทางจุลภาค

เหง้าขึ้นภาคตัดขวาง พบเนื้อเยื่อต่างๆ ดังนี้

- 1) เนื้อเยื่อชั้นผิว (Epidermis) ประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงตัวแถวเดียว รูปร่างเกือบเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีขนแบบเซลล์เดี่ยวปลายแหลม (unicellular trichome) ยาวประมาณ 280 μm ในส่วนของเหง้าแก่จะพบเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว (Hypodermis) 3-6 แถว อยู่บริเวณใต้เนื้อเยื่อชั้นผิว
- 2) คอร์ก (Cork) ประกอบด้วยเซลล์รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าประมาณ 4-6 แถว
- 3) คอร์เท็กซ์ (Cortex) ประกอบด้วยพาเรนไคมา (Parenchyma) ผนังบาง มีกลุ่มมัดท่อลำเลียง (Vascular bundle) กระจายทั่วภายในพาเรนไคมาพบเม็ดแป้ง (Starch grain) จำนวนมาก บางเซลล์มีสารสีน้ำตาลปนส้ม
- 4) เนื้อเยื่อชั้นในสุด (Endodermis) เป็นเซลล์แถวเดียว เซลล์มีผนังบาง
- 5) สเตล (Stele) ประกอบด้วยพาเรนไคมาเหมือนในคอร์เท็กซ์ แต่มีมัดท่อลำเลียงมากกว่า โดยเฉพาะได้แนวเนื้อเยื่อชั้นในสุด

เอกลักษณ์ของผงขมิ้น

ลักษณะผงขมิ้นขึ้น เป็นผงสีส้ม มีกลิ่นเฉพาะ มีรสมันปนเผ็ดและขมเล็กน้อย ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบเนื้อเยื่อและเซลล์ชนิดต่างๆ มากน้อยตามลำดับดังนี้

- 1) พาเรนไคมา รูปร่างค่อนข้างกลม พบเป็นจำนวนมาก ภายในมีเม็ดแป้งและสารสีเหลือง
- 2) เม็ดแป้งจำนวนมากที่หลุดออกมาจากเซลล์ อยู่เดี่ยว รูปร่างกึ่งรูปไข่ รูปรี และรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่มีเจอยตรงปลาย มีลายตามขวางจางๆ บางอันมองไม่ชัด เม็ดแป้งมีขนาดยาว 9-40 μm กว้าง 7-20 μm
- 3) ส่วนของเซลล์ท่อน้ำเลี้ยง มีทั้งแบบชั้นบันได แบบเกลียวกึ่งวงแหวน และแบบร่างแห ไม่มีลิกนิน มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30-45 μm

- 4) ส่วนของเนื้อเยื่อชั้นผิวด้านพื้นผิว รูปร่างหลายเหลี่ยม และด้านหน้าตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยม มักอยู่ติดกับเซลล์ผิว
- 5) ส่วนของคอร์กด้านพื้นผิว เซลล์ผนังเรียบเรียงเป็นระเบียบ รูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้าถึงหลายเหลี่ยม
- 6) ขนชนิดเซลล์เดี่ยวปลายแหลม
- 7) ส่วนของเนื้อเยื่อชั้นผิว เนื้อเยื่อชั้นรองผิวด้านตัดตามขวาง

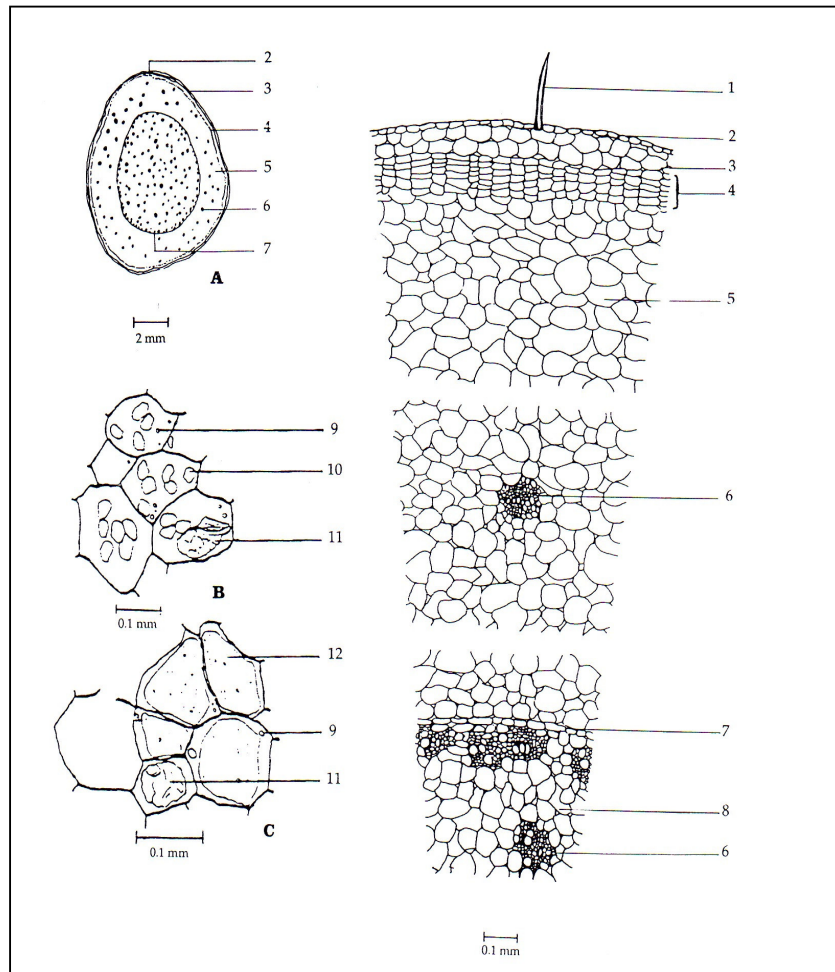
เอกลักษณ์ทางเคมี

การตรวจสอบเบื้องต้น

สกัดผงสมุนไพรขมิ้นชัน 10 mg ด้วย acetic anhydride 2 mL แล้วหยดกรดกำมะถันเข้มข้นลงไป 2-3 หยด เขย่า สังเกตสีภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 nm จะให้สีแดงเลือดนกเรืองแสง (สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2544: 46)

การตรวจสอบด้วย Thin layer chromatography (TLC)

โดยการใช้แผ่นกระจกขนาด 5 x 20 cm ฉาบด้วย Silica gel G หนา 0.25 mL เป็นตัวดูดซับ และใช้สารละลาย Benzene:Chloroform:Methanol (49:49:2) เป็นตัวเคลื่อนที่ นำโครมาโทแกรมที่ได้ส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 nm แล้วพ่นด้วยสารละลาย 10% กรดฟอสโฟโมลิบดิกในเอทานอล นำไปอบที่ 105 °C นาน 5 นาที จะได้โครมาโทแกรมดังภาพประกอบ 1 ตำแหน่งของจุดสีต่างๆ บนแผ่นกระจกฉาบสารดูดซับ จะแสดงด้วยค่า R_f (100Rf) ดังตาราง 1 (สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2544: 46-47)



ภาพประกอบ 10 จุลกายวิภาคของเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

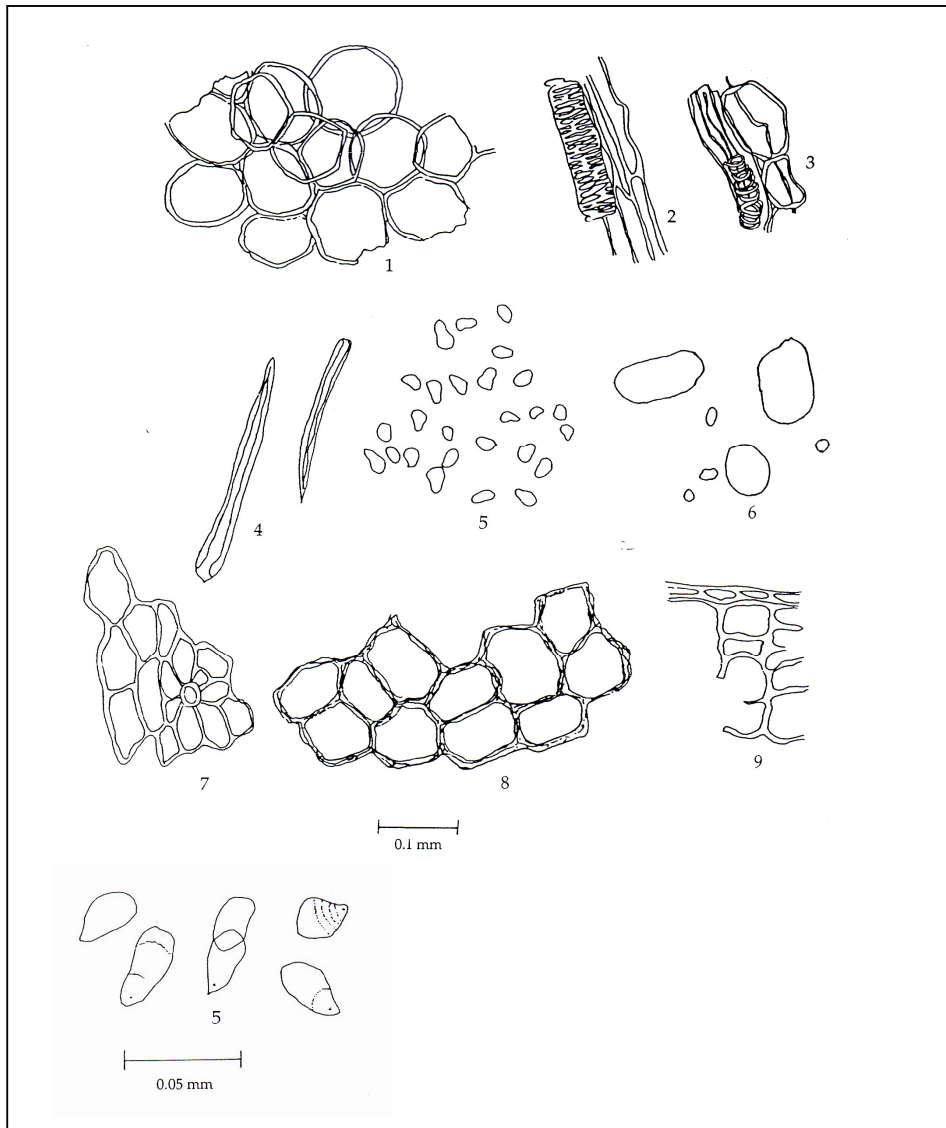
A. ไตอะแกรมภาคตัดขวาง

B. พาเรนไคมาของเหง้าสด

C. พาเรนไคมาของขมิ้นชัน

- | | |
|-----------------------------|------------------------|
| 1. ขนแบบเซลล์เดี่ยวปลายแหลม | 7. เนื้อเยื่อชั้นในสุด |
| 2. เนื้อเยื่อชั้นผิว | 8. พาเรนไคมาของสตีล |
| 3. เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว | 9. หยดน้ำมัน |
| 4. คอร์ก | 10. เม็ดแป้ง |
| 5. พาเรนไคมาของคอร์เท็กซ์ | 11. สารสีเหลืองส้ม |
| 6. กลุ่มมัดท่อลำเลียง | 12. ก้อนแป้งสีเหลือง |

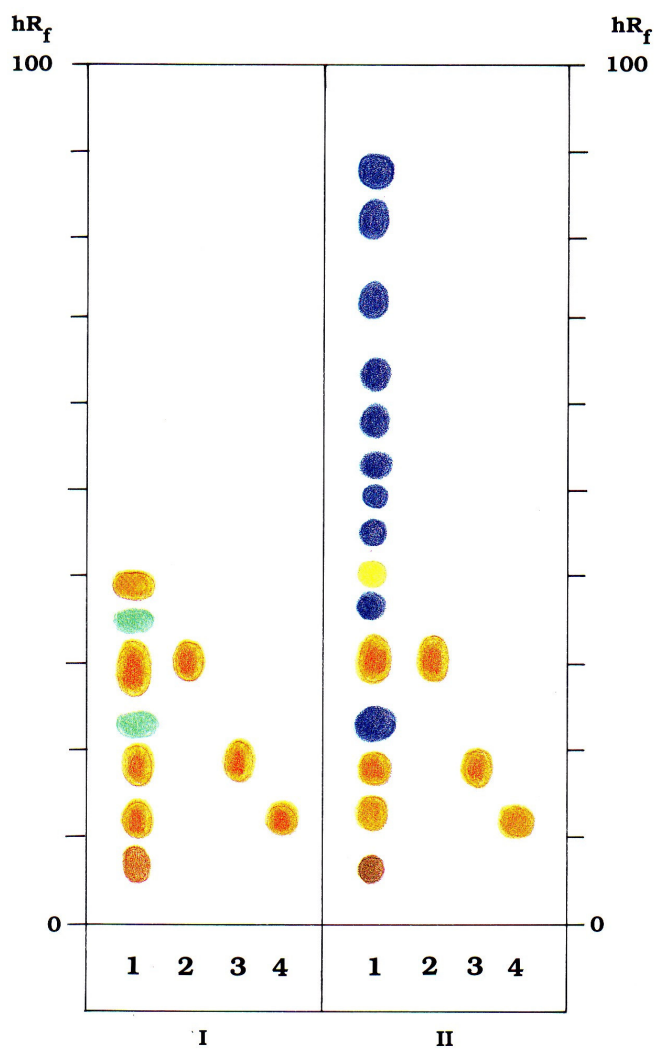
ที่มา: Prachachon. (1995). *Thai Herbal Pharmacopocia Vol. 1.* p. 40.



ภาพประกอบ 11 จุลกายวิภาคของผงขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

- | | |
|-----------------------------|------------------------|
| 2. พาเรนไคมา | 6. เม็ดแป้ง |
| 3. เซลล์ท่อน้ำแบบตาข่าย | 7. เซลล์ผิวด้านพื้นผิว |
| 4. เซลล์ท่อน้ำแบบวง | 8. เซลล์คอร์ก |
| 5. ขนแบบเซลล์เดี่ยวปลายแหลม | 9. เซลล์ผิวตัดตามขวาง |
| 6. เม็ดแป้ง | |

ที่มา: Prachachon. (1995). *Thai Herbal Pharmacopocia* Vol. 1. p. 40.



ภาพประกอบ 12 Thin-layer chromatogram ของสารสกัดเมทานอลจากเหง้าขมิ้นชัน

- I = เมื่อตรวจภายใต้แสง UV 366 nm
 II = เมื่อพ่นด้วยสารละลาย 10% กรดฟอสโฟโมลิบดิกในเอทานอล
 1 = 0.3% w/v ของสารละลายตัวอย่างในเมทานอล (5 μ l)
 2 = 1 mg ของ Curcumin ในเมทานอล 1 ml (5 μ l)
 3 = 0.1% w/v ของสารละลาย Demethoxycurcumin ในเมทานอล (5 μ l)
 4 = 0.1% w/v ของสารละลาย Bisdemethoxycurcumin ในเมทานอล (5 μ l)

ที่มา: Prachachon. (1995). *Thai Herbal Pharmacopocia Vol. 1*. p. 40.

ตาราง 1 ค่า hR_f และผลการตรวจสอบสารสำคัญชนิดต่างๆ ในสารสกัดเมทานอลจากเหง้าขมิ้นชัน

จุดสี*	ค่า hR_f	การตรวจสอบ	
		UV 366	10% Phosphomolybdic acid
1	5-8	น้ำตาลอ่อน	น้ำตาล
2	11-15	เหลืองอมน้ำตาล	ส้ม
3	17-20	เหลืองอมน้ำตาล	ส้มอมน้ำตาล
4	21-24	เขียวอมฟ้า	ฟ้า
5	28-34	เหลืองอมน้ำตาล	ส้มอมน้ำตาล
6	35-38	เขียวอมฟ้า	ฟ้า
7	39-42	เหลือง	เหลืองอ่อน
8	44-46	-	ฟ้า
9	48-51	-	ฟ้า
10	52-53	-	ฟ้า
11	57-60	-	ฟ้า
12	62-66	-	ฟ้า
13	71-74	-	ฟ้า
14	80-85	-	ฟ้า
15	87-90	-	ฟ้า

* 2 = Bisdemethoxycurcumin

3 = Demethoxycurcumin

5 = Curcumin

10 = Curcumol

14 = *d*-turmerone

15 = *ar*-curcumene

ที่มา : สถาบันวิจัยสมุนไพร. (2544). *ขมิ้นชัน (Curcuma longa L)*. หน้า 49.

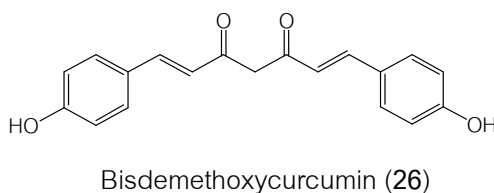
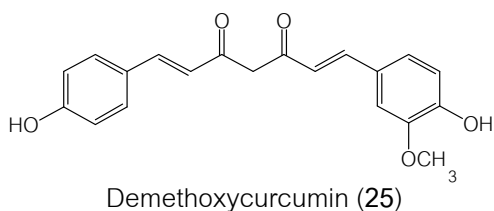
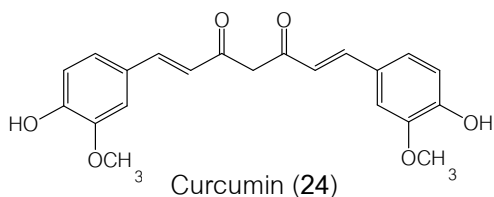
เคอร์คิวมินอยด์

เคอร์คิวมินอยด์ เป็นสารที่สกัดได้จากเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เป็นสารจำพวก Diferuloylmethane ซึ่งมีลักษณะเป็นสารสีเหลืองเข้ม (Crystalline yellow substance) ละลายได้ใน เซลล์พาราเรนโคมาของชั้นคอร์เท็กซ์ในเหง้า เป็นสารที่มีกลิ่นและคุณสมบัติเฉพาะตัว ไม่ละลายน้ำ แต่ ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ ประกอบด้วยสารฟีนอลิก 3 ชนิด (ภาพประกอบ 13) ได้แก่ (Pothitirat. 2006, โฆษิต ประเสริฐสุต. 2547, ทรงยศ อนุปรีชา; และ พงาม ลิมตระกูล. 2548)

1. Curcumin (24) มีชื่อเรียกตามโครงสร้างเคมีว่า 1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{21}H_{20}O_6$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 368.38 เป็นผลึกขนาดเล็กสีส้มปนน้ำตาล (Orange prism) มีจุดหลอมเหลวประมาณ 183°C

2. Demethoxycurcumin (25) มีชื่อเรียกตามโครงสร้างเคมีว่า 1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{18}O_5$ มีน้ำหนักโมเลกุล 338.39 ผลึกมีสีเหลือง (Orange yellow amorphous) มีจุดหลอมเหลวประมาณ 168°C

3. Bisdemethoxycurcumin (26) มีชื่อเรียกตามโครงสร้างเคมีว่า 1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1,7-bis(4-hydroxyphenyl) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{19}H_{16}O_4$ มีน้ำหนักโมเลกุล 308.33 ผลึก มีสีเหลืองเข้ม (Dark yellow plate) มีจุดหลอมเหลวประมาณ 224°C



ภาพประกอบ 13 โครงสร้างของ Curcumin Demethoxycurcumin และ Bisdemethoxycurcumin

ตาราง 2 สมบัติของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์

สมบัติทางเคมี	Curcumin	Demethoxycurcumin	Bisdemethoxycurcumin
สูตรโมเลกุล	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	C ₁₉ H ₁₆ O ₄
น้ำหนักโมเลกุล	368.385	338.395	308.333
จุดหลอมเหลว (°C)	183	168	224
ลักษณะผลึก	Orange prism	Orange yellow amorphous	Dark yellow plate
% Methoxy	16.88	9.18	-
ความสามารถในการละลาย			
- ไม่ละลาย	H ₂ O, Hexane, Light Petroleum	H ₂ O, Hexane, Light Petroleum	H ₂ O, Hexane, Light Petroleum
- ละลายได้ปานกลาง	Benzene, Ether, Chloroform	Benzene, Ether, Chloroform	Benzene, Ether, Chloroform
- ละลายได้ดี	Alcohol, Acetone, Glacial acetic acid	Alcohol, Acetone, Glacial acetic acid	Alcohol, Acetone, Glacial acetic acid
การเกิดปฏิกิริยากับต่าง	Red color	Red color	Red color
การเกิดปฏิกิริยากับกรด	Light yellow color	Light yellow color	Light yellow color

ที่มา: Pothitirat W. (2006). *Standardization and antioxidant activity of Curcuma longa rhizome extract*. p. 22.

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเคอร์คิวมินอยด์

1. ฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

ซรีมาล และดาห์วัน (Srimal; & Dhawan. 1973: 447-452) ได้ทดลองโดยการให้สารสกัดขมิ้น 160 mg ต่อน้ำหนักตัว 1 kg กรอกเข้าสู่กระเพาะอาหารของหนูขาว พบว่าเคอร์คิวมินจากขมิ้นชันลดการอักเสบของบาดแผลได้ดี โดยยับยั้งการอักเสบได้ร้อยละ 29.5 ซึ่งต่อมา อัมมอนและคนอื่นๆ (Ammon; et al. 1992: 226) พบว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์คือเคอร์คิวมิน โดยสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ Leukotriene B₄ ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ รวมทั้งสามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ 5-lipoxygenase เมื่อทดสอบกับเม็ดเลือดขาว (neutrophils) ของหนูขาว และยับยั้งการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ 12-lipoxygenase และ cyclooxygenase ในเกล็ดเลือดของมนุษย์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ จะทำงานเมื่อเกิดการอักเสบ (Ammon; et al. 1993: 113-119) นอกจากนี้ ชามาและคนอื่นๆ (Sharma; et al. 1972: 1210-1214) ยังพบว่าเคอร์คิวมินนอกจากจะมีฤทธิ์ด้านการอักเสบแล้ว ยังมีผลทำให้การสะสมของ lipid peroxide เพิ่มขึ้นโดยดับ เนื่องจากเกิด lysosome และจะเกิดเมื่อให้ร่วมกับคาราจีเนน แสดงว่าเคอร์คิวมินไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์นี้ของคาราจีเนน แต่ป้องกันการอักเสบได้

อัญชลี จุฑะพุทธิ และอุไรวรรณ เพิ่มพิพัฒน์ (2537: 197-209) ได้ศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของเหง้าขมิ้นชันในหนูขาวใหญ่เมื่อได้รับสารคาราจีเนน พบว่าน้ำคั้นขมิ้นชันขนาดโดสต่ำที่สุดที่สามารถออกฤทธิ์ต้านอักเสบได้มีขนาดเท่ากับเหง้าสด 0.5 g/kg เมื่อให้ทางช่องท้อง และ 20 g/kg เมื่อให้ทางปาก ส่วนผงขมิ้นชันขนาดโดสต่ำที่สุดที่ออกฤทธิ์เมื่อให้ทางปากคือ 2 g/kg หรือเทียบเท่าขมิ้นชันสด 14.8 g/kg นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัด 95% เอทานอล และเฮกเซน แสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบเมื่อให้ทางปากและช่องท้อง โดยขนาดต่ำสุดที่แสดงฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ มีขนาดเทียบเท่าผงขมิ้นชันเมื่อให้ทางช่องท้องคือ 1.1 และ 0.8 g/kg ตามลำดับ เมื่อให้ทางปากคือ 2.2 และ 3.3 g/kg ตามลำดับ

2. ฤทธิ์ด้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (Antipeptic ulcer)

จากการทดลองของ อุไรวรรณ เพิ่มพิพัฒน์ และคนอื่นๆ (2539: 27-38) โดยใช้ น้ำคั้นเหง้าขมิ้นสด ผงขมิ้นส่วนที่สกัดด้วยแอลกอฮอล์ ส่วนสกัดแอลกอฮอล์ที่ละลายในเฮกเซน และส่วนสกัดแอลกอฮอล์ที่ไม่ละลายในเฮกเซน รักษาหนูขาวที่ถูกกระตุ้นให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยวิธีต่างๆ 3 วิธี คือ การทำให้เครียดด้วยความเย็น การให้กรดเกลือ และการให้แอสไพริน พบว่าส่วนสกัดต่างๆ ยกเว้นส่วนสกัดแอลกอฮอล์ที่ไม่ละลายในเฮกเซน สามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ นอกจากนี้ ซรีมาล และดาห์วัน (Srimal; & Dhawan. 1973: 447-452) ยังพบว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ทำให้เกิดบาดแผลในกระเพาะอาหารได้น้อยกว่า phenylbutazone และป้องกันการอักเสบโดย

เหนี่ยวนำให้ระดับ serum glutamic oraloacete transaminase (SGOT) และ serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีฤทธิ์แก้ปวดและลดไข้ ขนาดที่รับประทานแล้วทำให้เกิดอันตรายจากการทดลองในหนูถีบจักรคือ มากกว่า 2 g/kg

3. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Anti-bacterial)

พรชัย โรจนสิทธิตักดี และคนอื่นๆ (2005: 165-177) พบว่าสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ ทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโอ ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งทะเล โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโอ (MIC) ที่ 50% และ 90% เท่ากับ 256 $\mu\text{g/ml}$ และ 512 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ ลูโตมสกี และคนอื่นๆ (Lutomski; et al. 1974: 9-19) พบว่าน้ำมันหอมระเหย สารสกัดแอลกอฮอล์ และเคอร์คิวมิน สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียจำพวก *Staphylococcus*, *Streptococcus* และ *Bacillus* ได้หลายชนิด ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ก่อให้เกิดการเน่าจุกเสียด หรือท้องเสีย รวมทั้งสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococci* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนังได้อีกด้วย ซึ่งต่อมา มหดี และคนอื่นๆ (Mahady; et al. 2000: 95) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากเหง้าขมิ้นร่วมกับเหง้าขิงในอัตราส่วน 1:1 มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นต้นเหตุสำคัญในการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร โดยมีค่า MIC_{50} เท่ากับ 50 $\mu\text{g/ml}$ ส่วน ศรีนิวาสน์ และคนอื่นๆ (Srinivasan; et al. 2001: 217-220) พบว่าน้ำสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella partyphi* และ *S.typhi*

4. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Anti-fungal)

ขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น เชื้อ *Rhizopus penicillium* และ เชื้อ *Aspergillus* (บัญญัติ สุขศรีงาม. 2543: 61) นอกจากนี้ โรท และคนอื่นๆ (Roth; et al. 1998. 542-545) ยังพบว่าสารสกัดเฮกเซนจากใบขมิ้นชัน และน้ำสกัดจากเหง้าขมิ้นชัน (Srinivasan; et al. 2001: 217-220) สามารถยับยั้งเชื้อราชนิด *Candida albicans* ได้

5. ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (Anti-viral)

บาร์เทเลมี และคนอื่นๆ (Barthelemy; et al. 1998: 43-52) พบว่าอนุพันธ์เคอร์คิวมินสามารถยับยั้ง Tat-transactivation ของ HIV1-LTR LacZ ใน Hela cell ได้สูงสุดถึง 70% แต่เคอร์คิวมินสามารถยับยั้งได้เพียง 30% ในขณะที่ มาซุมเดอร์ และคนอื่นๆ (Mazumder; et al. 1995: 1165-1170) พบว่าสารเคอร์คิวมินสามารถยับยั้งเชื้อไวรัส HIV-1 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 40 μM

6. ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Anti-cancer)

อรกัญญา วิบูลย์สวัสดิ์ และคนอื่นๆ (2546: 69-73) ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเยื่อบุชนิด fibroblast-like synoviocyte (FLA) ที่แยกได้จากเยื่อข้อของผู้ป่วยข้ออักเสบรูมาตอยด์ ซึ่ง FLA ในข้ออักเสบรูมาตอยด์นี้มีลักษณะคล้ายเซลล์มะเร็ง พบว่าสารสกัดหยาบ สารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ จำพวกมีขี้ และสารสกัดหยาบกึ่งบริสุทธิ์จำพวกไม่มีขี้จากขมิ้นชัน สามารถยับยั้งการงอกขยายของ FLA ได้โดยไม่ได้ลดความสามารถในการผลิตหรือหลั่ง TIMP-1 ซึ่งเป็นสารที่ช่วยยับยั้งเอนไซม์ MMP นอกจากนี้ ทรงยศ อนุปรีชา และ พวงาม ลิ้มตระกูล (2548: บทคัดย่อ) ยังพบว่าเคอร์คิวมินสามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน WT-1 mRNA และลดการเกิดการดื้อยาในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยลิวคีเมียได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ลิ้มตระกูล และคนอื่นๆ (Limtrakul; et al. 1997: 197-203) ที่ทดลองโดยใช้สารเคอร์คิวมินรักษาหนูถีบจักรที่ถูกกระตุ้นให้เกิดมะเร็งผิวหนังด้วย 7, 12-dimethylbenz[α]anthracene และ 12-O-tetradecanoylprorbol-13-acetate พบว่าเมื่อผสมสารเคอร์คิวมิน 1% ลงไปในอาหารให้หนูกินเป็นระยะเวลา 26 สัปดาห์แก่หนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง มีผลทำให้หนูที่เป็นมะเร็งผิวหนังลดลง แต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวของหนูทั้งสองกลุ่ม

7. ฤทธิ์ต้านการเกิดเนื้องอก (Anti-tumor)

โซดามินิ (Soudamini. 1989: 227-233) พบว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ในการต้านเนื้องอก โดยได้ทำการทดลองกับหนูถีบจักรซึ่งได้รับสารเคอร์คิวมิน 0.8% ที่ผิวหนังก่อนที่จะกระตุ้นด้วยสารเคมีเพื่อทำให้หนูเกิดเนื้องอก พบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารเคอร์คิวมินเกิดเนื้องอก 88% ส่วนหนูที่ได้รับเคอร์คิวมินเกิดเนื้องอกเพียง 33% นอกจากนี้ รูบี้ และคนอื่นๆ (Ruby; et al. 1995: 79-83) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเซลล์ การต้านการเกิดเนื้องอก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเคอร์คิวมิน I, II และ III โดยพบว่าเคอร์คิวมิน III มีฤทธิ์ในด้าน cytotoxic agent มากกว่าเคอร์คิวมิน I และ II และสามารถยับยั้ง Ehrlich ascites tumor ในหนูถีบจักรได้ และยังพบว่าเคอร์คิวมินทั้ง 3 ชนิด สามารถใช้เป็นสารต้านการเกิดเนื้องอกได้ โดยความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้ง lipid peroxidation ที่ 50% คือ 20, 14 และ 11 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนความเข้มข้นในการยับยั้ง superoxide ที่ 50% คือ 6.25, 4.25 และ 1.9 $\mu\text{g/mL}$ และ hydroxyl radical คือ 2.3, 1.8 และ 1.8 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ คาร์ และคนอื่นๆ (Khar; et al. 1995: 165-168) ที่พบว่าเคอร์คิวมินมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ histiocytic tumor (AK-5) โดยผ่าน caspase-3

8. ฤทธิ์ป้องกันตับจากสารพิษ (Anti-hepatotoxic)

คิโซ และคนอื่นๆ (Kiso; et al. 1983: 185-187) พบว่าสารสกัดจากเหง้าขมิ้นชันสามารถป้องกันการเป็นพิษของตับที่เกิดโดย CCl_4 และ D-galactosamine ได้ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง ซึ่งเมื่อนำสารสกัดนี้มาแยกได้จะสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ 3 ชนิด คือ Curcumin, p-coumaroylferuloylmethane และ di-p-coumaroylmethane ซึ่งเมื่อนำสารเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิด ไปวิเคราะห์ในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์ของตับที่นำมาเพาะเลี้ยงแล้วทำให้เป็นพิษโดย CCl_4 และ D-galactosamine พบว่าเคอร์คิวมินอยด์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีฤทธิ์ในการต้านพิษได้ดี

9. ฤทธิ์ต้านโรคมาลาเรีย (Anti-malarial)

เรดดี และคนอื่นๆ (Reddy; et al. 2005: 472-474) พบว่าเคอร์คิวมินสามารถยับยั้ง *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นเชื้อโปรโตซัวชนิดที่ก่อให้เกิดโรคมาลาเรียในคน โดยมีค่า IC_{50} ประมาณ $5 \mu\text{M}$ และจากการให้สารเคอร์คิวมินทางปากแก่หนูถีบจักรที่ติดเชื้อปรสิต *Plasmodium berghei* พบว่าสามารถลดเชื้อปรสิตในกระแสเลือดได้ถึง 80-90%

10. ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (Anti-mutagenic)

บังอร ศรีพานิชกุลชัย และคนอื่นๆ (2001: 23-33) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสมุนไพรท้องถิ่น 8 ชนิดคือ กระเทียม ขมิ้นชัน ตะไคร้ คำฝอย มังคุด ว่านหางจระเข้ ฟ้าทะลายโจร และหญ้าปากกิ้ง โดยใช้ส่วนสกัด 50% เมทานอล มาทดสอบฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ และฤทธิ์กลายพันธุ์ด้วยวิธี preincubation short-term assay กับเชื้อ *Salmonella typhimurium* TA 98 และ TA 100 พบว่าสมุนไพรทั้ง 8 ชนิด โดยเฉพาะขมิ้นชัน ไม่มีฤทธิ์ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ แต่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์จาก 2-aminoanthracene (2-AA) ในภาวะที่มี metabolic activation หรือ S9 mix และมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์จาก 2-(2-furyl-3(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF2) ในภาวะที่ไม่มี metabolic activation ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ นากาบุซัน และคนอื่นๆ (Nagabhushan; et al. 1987: 545-547) ที่พบว่าเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ แต่ไม่มีฤทธิ์ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์

11. ความเป็นพิษ (Cytotoxic)

นาถฤดี สิทธิสมวงศ์ และคนอื่นๆ (Sittisomwong; et al. 1990: 101-111) พบว่าเมื่อให้ผงขมิ้นชันแก่หนูถีบจักรทางปาก 10 g/kg ไม่พบอาการผิดปกติใดๆ และจากการศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังของผงขมิ้นชันในหนูขาว 96 ตัว เป็นเวลา 6 เดือน โดยให้ในขนาด 0.03 2.5 และ 5 g/kg/วัน พบว่าผงขมิ้นชันในขนาด 2.5 และ 5.0 g/kg/วัน ทำให้อัตราการเจริญเติบโตและการกินอาหารของหนูเพศผู้ลดลงเล็กน้อย แต่ไม่มีผลต่อหนูเพศเมีย รวมทั้งไม่พบความผิดปกติของค่าทางโลหิตวิทยาหรือชีวเคมี และไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะภายในของหนูทั้ง 2 เพศ

เดชพันเด และคนอื่นๆ (Deshpande; et al. 1998: 183-193) ได้ศึกษาพิษกึ่งเรื้อรังในหนูถีบจักรและหนูขาวเพศเมีย โดยการใช้ผงขมิ้นและสารสกัดเอทานอล ผสมลงในอาหารให้หนูกินนาน 14 และ/หรือ 90 วัน พบว่าผงขมิ้นในขนาดสูงคือ 5% ระยะเวลา 90 วัน จะทำให้หนูมีน้ำหนักลดลง เป็นพิษต่อตับ มีกลุ่มเซลล์ที่เน่าตาย (necrosis) และผงขมิ้นในขนาดน้อยคือ 0.2 หรือ 1% เป็นเวลา 14 วัน จะพบความเป็นพิษต่อตับในหนูถีบจักรมากกว่าหนูขาว ส่วนสารสกัดเอทานอลในขนาดที่ทำให้ไม่พบความเป็นพิษ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ บราวานี และคนอื่นๆ (Bravani; et al. 1980: 73-75) ที่พบว่าผงขมิ้นชั้นในขนาด 2.5 g/kg หรือส่วนสกัดแอลกอฮอล์ในขนาด 3 mg/kg ไม่ทำให้เกิดพิษเฉียบพลันในหนูขาวเมื่อป้อนทางปาก

การ์ก (Garg. 1974: 226-227) พบว่าเมื่อป้อนสารสกัดเอทานอล สารสกัดจากน้ำ และสารสกัดจากปิโตรเลียมอีเทอร์ของขมิ้นชั้นขนาด 200 mg/kg แก่หนูขาวและกระต่ายเพศเมีย พบว่าไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของตัวอ่อน ส่วน คุเรชี และคนอื่นๆ (Qureshi; et al. 1992: 124-126) พบว่าเมื่อกรอกสารสกัดเอทานอลให้หนูถีบจักรเพศผู้ในขนาด 100 mg/kg/วัน จะไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว แต่ทำให้น้ำหนักของปอดและหัวใจเปลี่ยนแปลง น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์เพิ่มขึ้น จำนวนการตายของอสุจิเพิ่มขึ้น แต่ไม่ถึงขั้นแสดงความเป็นพิษต่ออสุจิ และระดับเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวลดลง

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ ซึ่งเป็นสารสกัดจากผงขมิ้นชั้น จะใช้วิธี Dopachrome method โดยใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น สารนี้จะถูกออกซิไดส์เป็น Dopachrome intermediate โดยการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งสารดังกล่าวจะดูดกลืนแสงในช่วงที่มองเห็น (Visible light, 400-700 nm)

ผู้วิจัยคาดหวังเบื้องต้นว่า สารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชั้น มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งจะทำให้ Dopachrome intermediate ไม่สามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากขมิ้นชั้นมีคุณสมบัติในการถูกออกซิไดส์ได้เร็วกว่า ทำให้สาร Dopachrome ลดต่ำลง โดยในการทดลองนี้จะวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Dopachrome ที่ความยาวคลื่น 492 nm (Likhitwitayawuid. 2000: 19-21) ด้วยเครื่อง microplate reader (Multiskan EX)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

1. การสกัดสารจากผงขมิ้นชัน
2. การแยกและการทำสารสกัดให้บริสุทธิ์
3. การศึกษาสมบัติทางกายภาพและวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้
4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์

สารเคมี และอุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

วัสดุและสารเคมี

1. ผงขมิ้น (เจ้ากรมเป็อ, เมษายน 2550)
2. ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Ethylacetate Hexane และ Methanol
3. Kojic acid (Analytical grade; Acros Organics)
4. Methanol (Analytical grade; Merck)
5. Mushroom Tyrosinase (EC 1.14.18.1, 5,370 unit/mg, Sigma)
6. L-3,4-dihydroxyphenylalanine (Analytical grade; Acros Organics)
7. Disodium hydrogen phosphate (Analytical grade; Merck)
8. Sodium dihydrogen phosphate (Analytical grade; Merck)
9. Silica gel 60 GF₂₅₄ สำหรับ Thin-layer chromatography (Merck 107730)
10. Precoated TLC aluminium sheets of silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck 1.05554)

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. อุปกรณ์เครื่องแก้วพื้นฐาน
2. หลอดอัลตราไวโอเล็ต (Spectroline Model CM-10)
3. เครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin)
4. ขวดวัดปริมาตรขนาด 5, 10 และ 100 mL
5. Glass Drying Oven (Buchi B-580)
6. Rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114)
7. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker Avance 300)

8. Microplate reader (Multiskan EX)
9. Microtiter plate (96 wells)
10. Micropipet (Rainin Classic) ขนาด 20, 100, 200 และ 1000 μL
11. Micro tube ขนาด 2 mL

ขั้นตอนการวิจัย

1. การสกัดสารจากผงขมิ้นชัน

1.1 นำผงขมิ้นชัน 986.22 g แช่ในเฮกเซน 1.5 L เป็นเวลา 7 วัน เพื่อแยกสารประกอบที่ไม่มีขี้ขั้ว กรองสารละลายชั้นเฮกเซนออก กากที่เหลือนำไปแช่ในเฮกเซนอีก 2 ครั้ง

1.2 นำกากที่เหลือจากการแช่ด้วยเฮกเซนมาแช่ด้วยเมทานอล 3 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน เช่นเดียวกับการสกัดด้วยเฮกเซน ระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลหนัก 49.95 g

2. การแยกและการทำสารสกัดให้บริสุทธิ์

2.1 แบ่งสารสกัดหยาบเมทานอล 1.15 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง โดยใช้แผ่นกระดาษขนาด 20 x 20 cm เคลือบด้วยซิลิกาเจล ซี (Silica gel 60 GF₂₅₄) เป็นตัวดูดซับ โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทน-เมทานอล อัตราส่วน 95:5 เป็นตัวเคลื่อนที่

2.2 ส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ช่วงความยาวคลื่น 254 และ 365 nm

2.3 ขูดแถบสารแต่ละแถบที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ช่วงความยาวคลื่น 254 และ 365 nm

2.4 ละลายสารที่เคลือบอยู่บนตัวดูดซับซิลิกาเจลด้วยเอทิลอะซิเตต

2.5 กรองซิลิกาเจลออกด้วยกรวยบุชเนอร์

2.6 นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator

2.7 นำสารที่ได้ไปตกผลึกซ้ำด้วยเมทานอล (Analytical grade)

3. การศึกษาสมบัติทางกายภาพและวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาจุดหลอมเหลว และศึกษาโครงสร้างโดยวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากเทคนิคทางสเปกโทรสโคปี (Spectroscopy) ได้แก่ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR)

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method โดยใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น และใช้ microplate reader วัดค่าการดูดกลืนแสงของ Dopachrome ที่ความยาวคลื่น 492 nm (Likhitwitayawuid. 2000: 19-21)

4.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบ

4.1.1 การเตรียม 20 mM phosphate buffer pH 6.8

- 1) ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ หนัก 0.3120 g ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 mL
- 2) ชั่ง Na_2HPO_4 หนัก 0.2839 g ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 mL
- 3) เติมสารละลาย Na_2HPO_4 ปริมาตร 28.5 mL ลงในสารละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 71.5 mL จะได้สารละลาย 20 mM phosphate buffer ที่มี pH เท่ากับ 6.8

4.1.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 50 units/mL

- 1) ชั่งเอนไซม์ไทโรซิเนสหนัก 0.9 mg ละลายด้วยสารละลาย 20 mM phosphate buffer pH 6.8 แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 mL
- 2) ปิเปตสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 mL ลงในขวดวัดปริมาตร 10 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 20 mM phosphate buffer pH 6.8 จะได้สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้นประมาณ 50 units/mL

4.1.3 การเตรียม 0.85 mM L-DOPA

ชั่ง L-DOPA น้ำหนัก 1.7 mg ละลายใน 20 mM phosphate buffer pH 6.8 แล้วปรับปริมาตรจนครบ 10 mL จะได้สารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 0.85 mM

4.1.4 การเตรียมสารทดสอบ (Test sample) ของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์

- 1) เตรียม stock solution ของสารทดสอบความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 5 mL โดยชั่งสารสกัดหนัก 1 mg ละลายด้วยเมทานอล (Analytical grade) ปริมาตร 5 mL
- 2) ทำการเจือจาง stock solution จนได้สารละลายของสารทดสอบที่มีความเข้มข้น 150, 100, 70, 50, 30, 10, 5 และ 1 $\mu\text{g/mL}$

4.1.5 การเตรียมสารทดสอบกรดโคจิก (Kojic acid)

- 1) เตรียม stock solution ของกรดโคจิกความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ ปริมาตร 5 mL โดยชั่งกรดโคจิก 1 mg ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 5 mL

2) ทำการเจือจาง stock solution จนได้สารละลายกรดโคจิกที่มีความเข้มข้น 150, 100, 70, 50, 30, 10, 5 และ 1 $\mu\text{g/mL}$

4.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

4.2.1 เติมสารละลายที่ใช้ทดสอบลงในหลุมของ Microtiter plate (ภาพประกอบ 14) โดยแบ่งชุดทดสอบเป็น 4 ชุด (ชุด A, B, C และ D) ดังตาราง 3

ตาราง 3 แสดงชุดทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ชุดทดสอบ	20 mM phosphate buffer pH 6.8	Tyrosinase solution (50 units/ml)	Test sample/ Kojic acid	Methanol
ชุด A (Control)	120 μL	40 μL	-	20 μL
ชุด B (Blank of control)	160 μL	-	-	20 μL
ชุด C (Test sample/ Kojic acid)	120 μL	40 μL	20 μL	-
ชุด D (Blank of Test sample)	160 μL	-	20 μL	-

4.2.2 ผสมสารในแต่ละหลุมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 10 นาที

4.2.3 เติม 0.85 mM L-DOPA จำนวน 20 μL ลงในทุกหลุม ที่ไว้ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 nm

4.2.4 คำนวณร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Tyrosinase inhibition)

จากสูตร

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

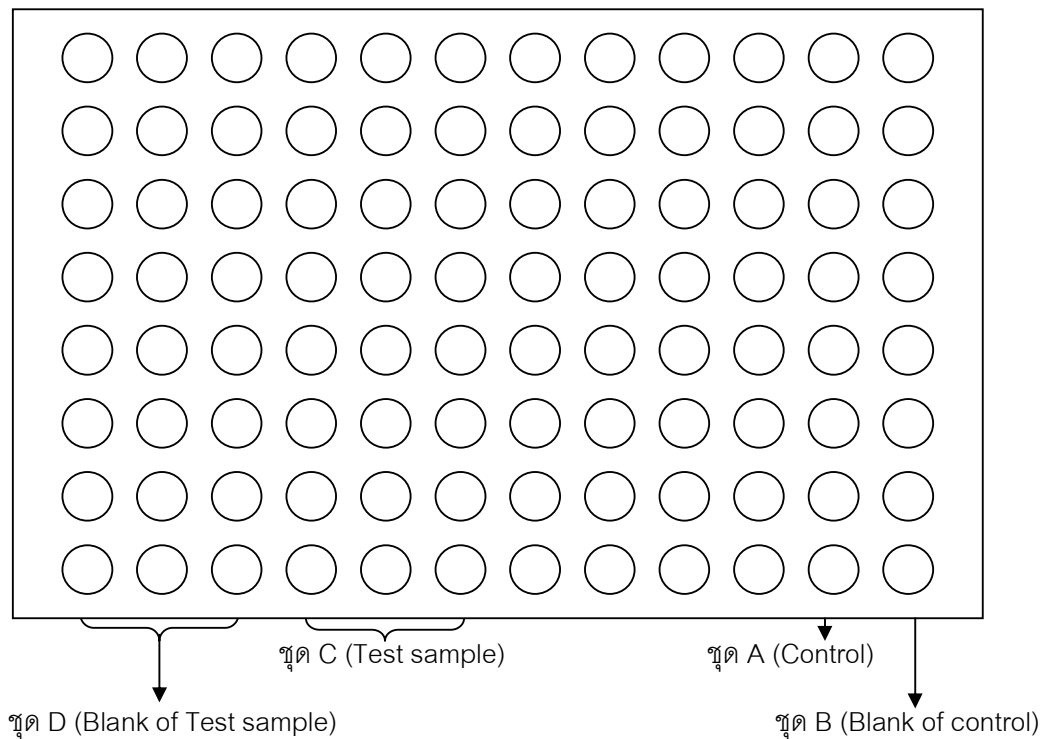
เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสารทดสอบแต่มีเอนไซม์

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสารทดสอบและไม่มีเอนไซม์

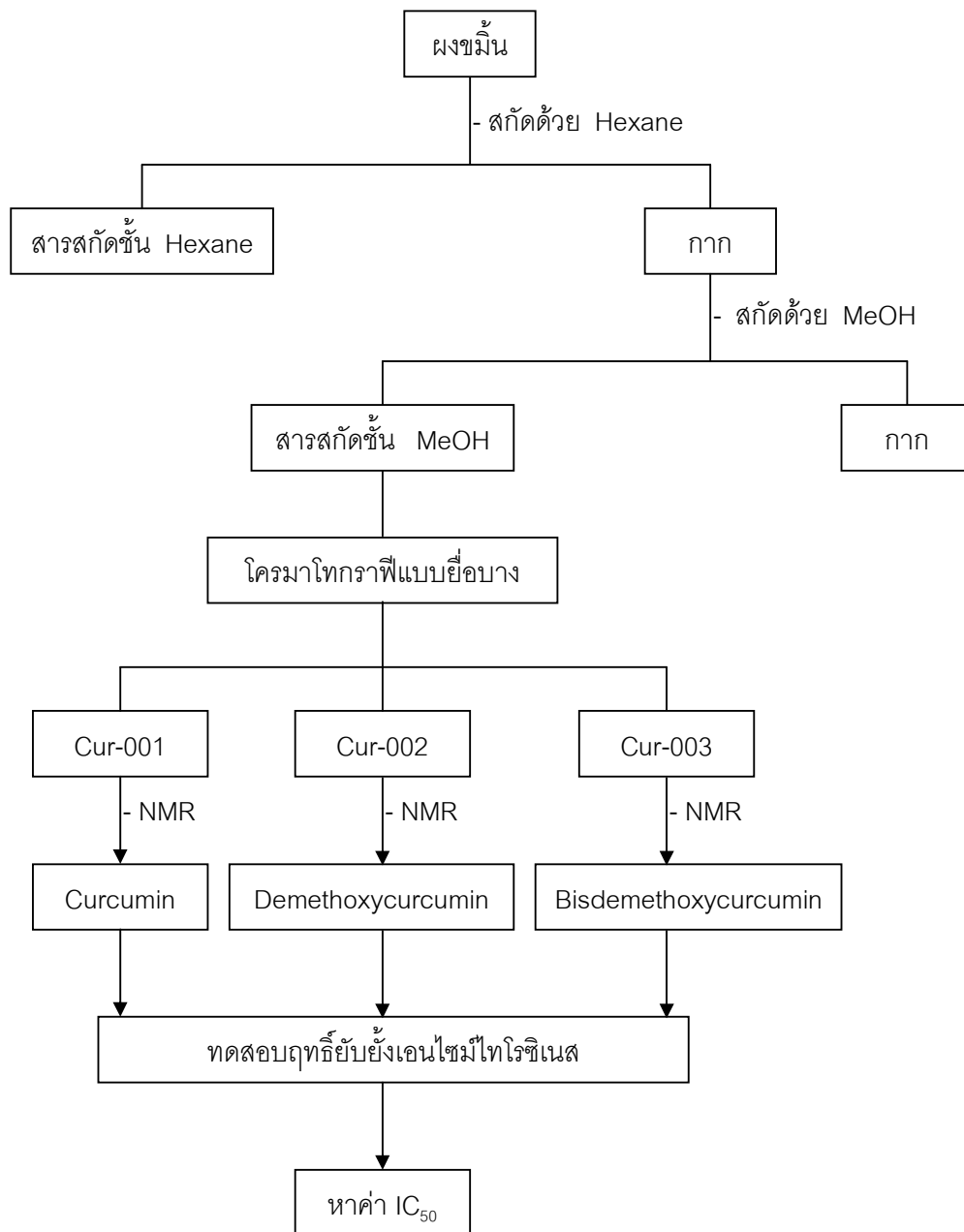
C คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารทดสอบและเอนไซม์

D คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารทดสอบแต่ไม่มีเอนไซม์

4.2.5 หาค่า IC_{50} ของสารทดสอบต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกับความเข้มข้นต่างๆ ของสารทดสอบที่เวลา 20 นาที อ่านค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลงครึ่งหนึ่ง (IC_{50})



ภาพประกอบ 14 การเติมชุดทดสอบใน Microtiter plate ขนาด 96 หลุมที่ใช้ในการทดลอง



ภาพประกอบ 15 แสดงขั้นตอนการดำเนินการสกัด และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการสกัดสารจากผงขมิ้นชัน

นำผงขมิ้นชัน 986.22 g มาสกัดด้วยเฮกเซน 3 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน กรองส่วนสกัดเฮกเซนออก เพื่อแยกเอาส่วนประกอบที่ไม่มีหัวออกไป จากนั้นนำกากที่เหลือตากให้แห้ง แล้วนำมาสกัดต่อด้วย เมทานอล 3 ครั้ง ครั้งละ 7 วัน กรองกากออกแล้วนำส่วนสกัดเมทานอลมาระเหยให้แห้ง ได้สารสกัดมีลักษณะเป็นผงสีส้มหนัก 49.95 g

ผลการแยกและการทำสารสกัดให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดเมทานอล 1.15 g มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทน-เมทานอล อัตราส่วน 95:5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ได้แถบสารสีเหลืองส้ม 3 แถบซึ่งดูคลื่อนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm และเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 365 nm เมื่อขูดสารแต่ละแถบไปละลายด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต และตกผลึกซ้ำด้วยเมทานอล ได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือ สารประกอบ A สารประกอบ B และสารประกอบ C หนัก 335.8 98.6 100.5 mg หรือคิดเป็นร้อยละ 29.2 8.57 8.74 ตามลำดับ

ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพการวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาศึกษาสมบัติทางกายภาพและพิสูจน์สูตรโครงสร้าง โดยวิเคราะห์ข้อมูลทางสเปกโทรสโคปี และเปรียบเทียบข้อมูลสเปกโทรสโคปีกับที่เคยมีผู้รายงานไว้

สารประกอบ A (Curcumin)

สารประกอบ A มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีส้ม ค่า $R_f = 0.57$ ($\text{CHCl}_2:\text{MeOH}$, 9.5:0.5) จุดหลอมเหลว 182-183 °C (จุดหลอมเหลวของ Curcumin = 184 °C, Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044)

จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบสัญญาณของ methylene proton ที่ δ 1.73 (2H, s, H-1) พบสัญญาณของหมู่ methine proton ทั้งหมด 5 สัญญาณที่ δ 5.05 (2H, d, $J = 15.6$ Hz, H-3 และ H-3'); 5.99 (2H, d, $J = 15.6$ Hz, H-4 และ H-4'); 5.63 (2H, s, H-6 และ H-6'); 5.24 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-9 และ H-9'); 5.53 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-10 และ H-10') และพบสัญญาณของหมู่ methoxy ที่ δ 2.28 (6H, s) ดังตาราง 4 และภาพประกอบ 26

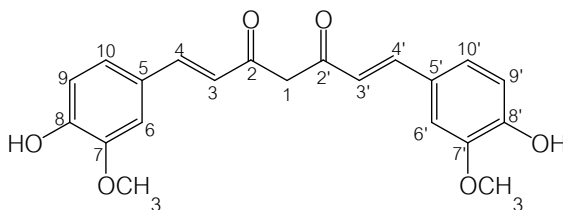
จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ DEPT spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบสัญญาณทั้งหมด 11 สัญญาณ เป็นของ 21 คาร์บอนที่มีลักษณะสมมาตรกัน โดยพบ methine carbon 5 สัญญาณที่ δ 119.37, 139.23, 108.86, 113.68 และ 121.21 พบ quaternary carbon 4 สัญญาณ ที่ δ 181.88, 125.69, 146.53 และ 147.58 และพบ methylene carbon ที่ δ 46.06 แตกต่างผลการวิจัยที่ผ่านมา ที่พบค่า δ ที่ 100.9 ซึ่งเป็น vinyl carbon (Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044) ดังตาราง 4 และภาพประกอบ 28

COSY spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-3 กับ H-4; H-3' กับ H-4'; H-9 กับ H-10 และ H-9' กับ H-10' ดังตาราง 5 และภาพประกอบ 29

HMBC spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบความสัมพันธ์ระหว่าง δ_{H} 5.05 (H-3, H-3') กับ δ_{C} 181.88 (C-2, C-2') และ 125.69 (C-5, C-5') ดังแสดงในตาราง 5 และภาพประกอบ 30 และพบ δ_{H} 2.28 ($-\text{OCH}_3$) สัมพันธ์กับ δ_{C} 146.53 (C-7, C-7') และ 147.58 (C-8, C-8')

HMQC spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบความสัมพันธ์ระหว่าง H-1 กับ C-1 แสดงให้เห็นว่าเป็นตำแหน่งของ methylene proton (ตาราง 5 และภาพประกอบ 31)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของสารประกอบ A กับ Curcumin (Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044) จึงสรุปได้ว่าสารประกอบ A คือ 1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) หรือ Curcumin (24)



ภาพประกอบ 16 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ A

ตาราง 4 แสดงข้อมูล ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของ Curcumin (23) และสารประกอบ A

ตำแหน่ง	Curcumin ^a		สารประกอบ A ^b	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	100.9	5.98 (1H, s)	46.09	1.73 (2H, s)
2, 2'	183.2	16.41 (1H, d)	181.88	-
3, 3'	121.1	6.71 (2H, d, $J = 16$ Hz)	119.37	5.05 (2H, d, $J = 15.6$ Hz)
4, 4'	140.7	7.60 (2H, d, $J = 16$ Hz)	139.23	5.99 (2H, d, $J = 15.6$ Hz)
5, 5'	126.4	-	125.69	-
6, 6'	111.4	7.33 (2H, d, $J = 1.8$ Hz)	108.86	5.63 (2H, s)
7, 7'	148.0	-	146.53	-
8, 8'-OH	149.4	8.2 (2H, s)	147.58	-
9, 9'	115.7	6.89 (2H, d, $J = 8$ Hz)	113.68	5.24 (2H, d, $J = 7.5$ Hz)
10, 10'	123.1	7.19 (2H, dd, $J_{9,10} = 8$ Hz, $J_{6,10} = 1.8$ Hz)	121.21	5.53 (2H, d, $J = 7.5$ Hz)
7, 7'(-OCH ₃)	55.7	3.92 (6H, s)	53.57	2.28 (6H, s)

^aบันทึกใน DMSO- d_6 , 50 MHz (Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044)

^bบันทึกใน CD₃OD, 300 MHz

ตาราง 5 แสดงข้อมูล ^1H -NMR COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ A บันทึกใน CD₃OD

ตำแหน่ง	δ_{H} (ppm)	COSY	HMQC	HMBC
1	1.73 (2H, s)	-	46.09	-
3	5.05 (1H, d, $J = 15.6$ Hz)	H-4	119.37	C-2, C-5
4	5.99 (1H, d, $J = 15.6$ Hz)	H-3	139.23	C-2, C-6, C-10
6	5.63 (1H, s)	-	108.86	C-4, C-7, C-8, C-10
9	5.24 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	H-10	113.68	C-5, C-7, C-8
10	5.53 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	H-9	121.21	C-4, C-6, C-8
7-OCH ₃	2.28 (3H, s)	-	53.57	C-7, C-8
3'	5.05 (1H, d, $J = 15.6$ Hz)	H-4'	119.37	C-2', C-5'
4'	5.99 (1H, d, $J = 15.6$ Hz)	H-3'	139.23	C-2', C-6', C-10'
6'	5.63 (1H, s)	-	108.86	C-4', C-7', C-8', C-10'
9'	5.24 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	H-10'	113.68	C-5', C-7', C-8'
10'	5.53 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)	H-9'	121.21	C-4', C-6', C-8'
7'-OCH ₃	2.28 (3H, s)	-	53.57	C-7', C-8'

สารประกอบ B (Demethoxycurcumin)

สารประกอบ B มีลักษณะเป็นผลึกสีส้ม มีค่า $R_f = 0.33$ ($\text{CHCl}_2:\text{MeOH}$, 9.5:0.5) จุดหลอมเหลว $167-169^\circ\text{C}$ (จุดหลอมเหลวของ Demethoxycurcumin = 172°C , Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044)

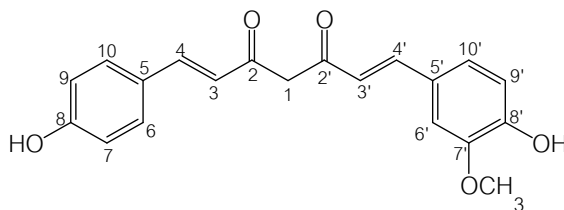
จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบสัญญาณของ methylene proton ที่ δ 1.77 (2H, s, H-1) พบสัญญาณของหมู่ methine proton ทั้งหมด 7 สัญญาณที่ δ 5.09 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-3); 5.04 (1H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3'); 6.09 (2H, d, $J = 15.7$ Hz, H-4 และ H-4') 5.95 (2H, d, $J = 7$ Hz, H-6 และ H-10); 5.67 (1H, s, H-6'); 5.28 (3H, d, $J = 7.6$ Hz, H-7, H-9 และ H-9') 5.56 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-10') และพบสัญญาณของหมู่ methoxy ที่ δ 2.37 (3H, s) ดังตาราง 6 และภาพประกอบ 32

จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ DEPT spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบสัญญาณทั้งหมด 18 สัญญาณ เป็นของ 20 คาร์บอนที่มีลักษณะสมมาตรกัน โดยพบ methylene carbon ที่ δ 46.07 แตกต่างผลการวิจัยที่ผ่านมาที่พบค่า δ ที่ 100.9 ซึ่งเป็น vinyl carbon (Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044) พบ methine carbon 9 สัญญาณที่ δ 139.18, 138.96, 128.23, 121.18, 119.34, 119.08, 113.97, 113.65 และ 108.82 พบ quaternary carbon 7 สัญญาณ ที่ δ 181.99, 181.78, 158.17, 145.54, 146.50, 125.68 และ 125.09 ดังตาราง 6 และภาพประกอบ 34

HMBC spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบความสัมพันธ์ระหว่าง δ_{H} 5.08 (H-3) กับ δ_{C} 181.78 (C-2) และ 125.09 (C-5); δ_{H} 5.05 (H-3') กับ δ_{C} 181.99 (C-2') และ 125.68 (C-5'); δ_{H} 5.28 (H-7, H-9, H-9') กับ δ_{C} 125.09 (C-5), 158.17 (C-8), 113.97 (C-7, C-9), 125.68 (C-5'), 147.54 (C-7') และ 146.50 (C-8') และพบ δ_{H} 2.37 ($-\text{OCH}_3$) สัมพันธ์กับ δ_{C} 147.54 (C-7') และ 146.50 (C-8') ดังแสดงในตาราง 7 และภาพประกอบ 35 นอกจากนี้ COSY spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบความสัมพันธ์ของ δ_{H} 5.08 (H-3, d, $J = 15$ Hz) กับ 6.09 (H-4, d, $J = 15$ Hz) และ 5.29 (H-6, d, $J = 7.6$ Hz) (ตาราง 7 และภาพประกอบ 36)

HMQC spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบว่า H-1 สัมพันธ์กับ C-1 แสดงให้เห็นว่าเป็น methylene proton (ตาราง 6 และภาพประกอบ 37)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของสารประกอบ B กับ Demethoxycurcumin (Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044) จึงสรุปได้ว่าสารประกอบ B คือ 1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl) หรือ Demethoxycurcumin (25)



ภาพประกอบ 17 โครงสร้างของสารประกอบ B

ตาราง 6 แสดงข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของ Demethoxycurcumin (25) และสารประกอบ B

ตำแหน่ง	Demethoxycurcumin ^a		สารประกอบ B ^b	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	100.9	6.02 (1H, s)	46.07	1.77 (2H, s)
2, 2'	183.2, 183.1	-	181.78, 181.99	-
3, 3'	121.1, 120.8	6.67 (2H, d, $J = 15.8$ Hz)	119.34, 119.08	5.08 (1H, d, $J = 15$ Hz), 5.05 (1H, d, $J = 15$ Hz)
4, 4'	140.7, 140.4	7.53 (2H, d, $J = 15.8$ Hz)	138.96, 139.18	6.09 (2H, d, $J = 15$ Hz)
5, 5'	126.4, 125.8	-	125.09, 125.68	-
6, 6'	111.2, 130.4	7.31 (2H, d, $J = 1.6$ Hz)	128.23, 108.82	5.95 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 5.67 (1H, s)
7, 7'	148.0, 115.7	-	113.97, 147.54	5.28 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), -
8, 8'-OH	149.8, 159.8	-	158.17, 146.50	-
9, 9'	115.9, 115.7	6.81 (2H, d, $J = 8.3$ Hz)	113.97, 113.65	5.28 (2H, d, $J = 7.6$ Hz)
10, 10'	123.2, 123.1	7.19 (2H, dd, $J_{9,10}=8.3$ Hz, $J_{6,10}=1.6$ Hz)	128.23, 121.18	5.95 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 5.56 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)
7'-OCH ₃	55.7	3.82 (3H, s)	53.54	2.37 (3H, s)

^a บันทึกใน DMSO- d_6 , 50 MHz (Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044)

^b บันทึกใน CD₃OD, 300 MHz

ตาราง 7 แสดงข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ B บันทึกใน CD_3OD

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$	COSY	HMQC	HMBC
1	1.77 (2H, d, $J = 12$ Hz)	-	46.07	-
3	5.08 (1H, d, $J = 15$ Hz),	H-4	119.34	C-2, C-5
4	6.09 (1H, d, $J = 15$ Hz)	H-3	138.96	C-2, C-6, C-10
6	5.29 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)	H-7, H-9	128.23	C-4, C-8, C-10
7	5.28 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)	H-6, H-10	113.97	C-5, C-8, C-9
9	5.28 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)	H-6, H-10	113.97	C-5, C-7, C-8
10	5.95 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)	H-7, H-9	128.23	C-4, C-6, C-8
3'	5.05 (1H, d, $J = 15$ Hz)	H-4'	119.08	C-2', C-5'
4'	6.09 (1H, d, $J = 15$ Hz)	H-3'	139.18	C-2', C-6', C-10'
6'	5.67 (1H, s)	-	108.82	C-4', C-7', C-8', C-10'
9'	5.28 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)	H-10'	113.65	C-5', C-7', C-8'
10'	5.56 (1H, d, $J = 7.6$ Hz)	H-9'	121.18	C-4', C-6', C-8', C-9'
7'-OCH ₃	2.37 (3H, s)	-	53.54	C-7', C-8'

สารประกอบ C (Bisdemethoxycurcumin)

สารประกอบ C มีลักษณะเป็นผลึกสีส้ม จุดหลอมเหลว 224-226 °C (จุดหลอมเหลวของ Bisdemethoxycurcumin = 222 °C, Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044) มีค่า $R_f = 0.25$ ($\text{CHCl}_2:\text{MeOH}$, 9.5:0.5)

จากข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบสัญญาณของ methylene proton ที่ δ 1.79 (2H, d, $J = 12.2$ Hz, H-1) และพบสัญญาณของ methine proton ทั้งหมด 4 สัญญาณที่ δ 5.05 (2H, d, $J = 15.8$ Hz, H-3 และ H-3'); 6.03 (2H, d, $J = 15.8$ Hz, H-4 และ H-4'); 5.95 (4H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6, H-6', H-10 และ H-10'); 5.28 (4H, d, $J = 8.3$ Hz, H-7, H-7', H-9 และ H-9'); ดังตาราง 8 และภาพประกอบ 38

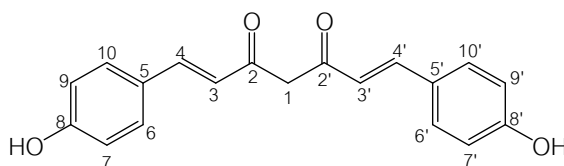
จากข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ DEPT spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบสัญญาณทั้งหมด 8 สัญญาณ เป็นของ 19 คาร์บอนที่มีลักษณะสมมาตรกัน (ตาราง 8 และภาพประกอบ 40) โดยพบ methine carbon 4 สัญญาณที่ δ 119.07, 138.93, 128.22 113.98 พบ quaternary carbon 3 สัญญาณ ที่ δ 181.92, 158.17 และ 125.12 นอกจากนี้พบ methylene carbon ที่ δ 46.08

แตกต่างผลการวิจัยที่ผ่านมาที่พบค่า δ ที่ 100.9 ซึ่งเป็น vinyl carbon (Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044)

HMBC spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบความสัมพันธ์ระหว่าง δ_{H} 5.05 (H-3) กับ δ_{C} 181.92 (C-2) และ 125.12 (C-5); δ_{H} 5.05 (H-3') กับ δ_{C} 181.92 (C-2') และ 125.12 (C-5') ดังแสดงในตาราง 9 และภาพประกอบ 42

HMQC spectrum (CD_3OD , 300 MHz) พบว่า H-1 สัมพันธ์กับ C-1 แสดงให้เห็นว่าเป็น methylene proton (ตาราง 9 และภาพประกอบ 43)

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลของสารประกอบ 3 กับ Bisdemethoxycurcumin (Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044) จึงสรุปได้ว่าสารประกอบ 3 คือ 1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1,7-bis(4-hydroxyphenyl) หรือ Bisdemethoxycurcumin (26)



ภาพประกอบ 18 โครงสร้างของสารประกอบ C

ตาราง 8 แสดงข้อมูล ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของ Bisdemethoxycurcumin (26) และสารประกอบ C

ตำแหน่ง	Bisdemethoxycurcumin ^a		สารประกอบ C ^b	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)
1	100.9	5.99 (1H, s)	46.08	1.79 (2H, d, $J = 12.2$ Hz)
2, 2'	183.2	-	181.92	-
3, 3'	121.1	6.67 (2H, d, $J = 15.8$ Hz)	119.09	5.05 (2H, d, $J = 15.8$ Hz)
4, 4'	140.1	7.61 (2H, d, $J = 15.8$ Hz)	138.93	6.03 (2H, d, $J = 15.8$ Hz)
5, 5'	126.8	-	125.12	-
6, 6'	130.0	7.57 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	128.22	5.95 (2H, d, $J = 8.4$ Hz)
7, 7'	115.9	6.91 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	113.98	5.28 (2H, d, $J = 8.3$ Hz)
8, 8'-OH	159.7	10.3	158.17	-
9, 9'	115.9	6.91 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	113.98	5.28 (2H, d, $J = 8.3$ Hz)
10, 10'	130.0	7.57 (2H, d, $J = 8.5$ Hz)	128.22	5.95 (2H, d, $J = 8.4$ Hz)

^a บันทึกใน DMSO- d_6 , 50 MHz (Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044)

^b บันทึกใน CD₃OD, 300 MHz

ตาราง 9 แสดงข้อมูล $^1\text{H-NMR}$ COSY HMQC และ HMBC ของสารประกอบ C บันทึกใน CD_3OD

ตำแหน่ง	$^1\text{H-NMR}$	COSY	HMQC	HMBC
1	1.79 (2H, d, $J = 12.2$ Hz)	-	46.08	-
3	5.05 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)	H-4	119.09	C-2, C-5
4	6.03 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)	H-3	138.93	C-2, C-5, C-6, C-10
6	5.95 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	H-7, H-9	128.22	C-4, C-8, C-10
7	5.28 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	H-6, H-10	113.98	C-5, C-8, C-9
9	5.28 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	H-6, H-10	113.98	C-5, C-7, C-8
10	5.95 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	H-7, H-9	128.22	C-4, C-6, C-8
3'	5.05 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)	H-4'	119.09	C-2', C-5'
4'	6.03 (1H, d, $J = 15.8$ Hz)	H-3'	138.93	C-2', C-5', C-6', C-10'
6'	5.95 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	H-7', H-9'	128.22	C-4', C-8', C-10'
7'	5.28 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	H-6', H-10'	113.98	C-5', C-8', C-9'
9'	5.28 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	H-6', H-10'	113.98	C-5', C-7', C-8'
10'	5.95 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	H-7', H-9'	128.22	C-4', C-6', C-8'

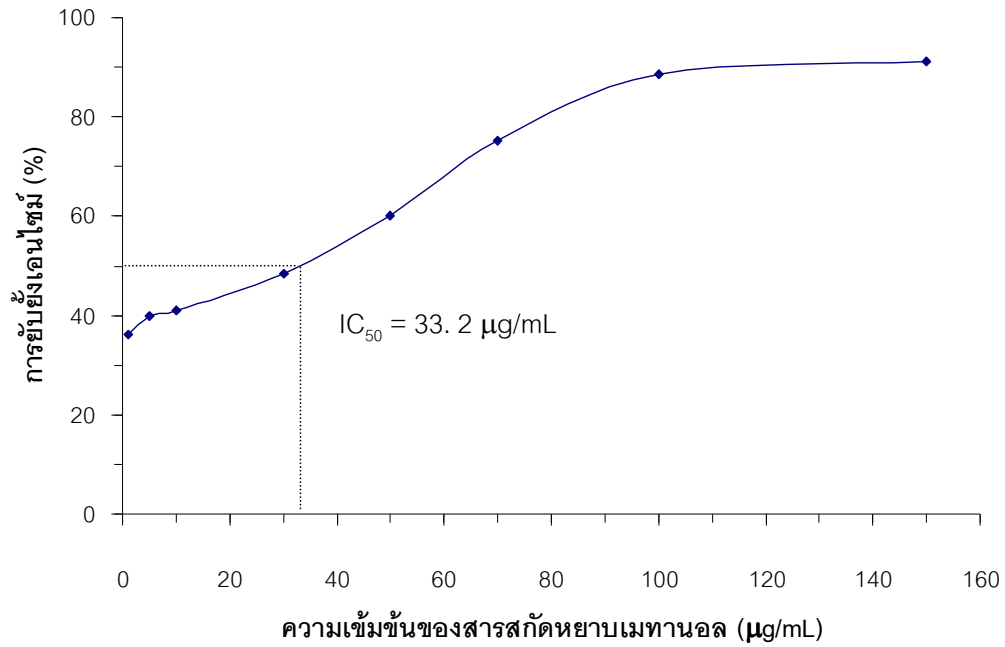
ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเมทานอล สารประกอบ A สารประกอบ B สารประกอบ C และกรดโคจิก ด้วยวิธี Dopachrome method โดยใช้เครื่อง Microplate reader วัดค่าการดูดกลืนแสงของ Dopachrome ที่ความยาวคลื่น 492 nm ที่เวลา 20 นาที แสดงดังตาราง 10, 11, 12, 13, และ 14 ตามลำดับ

ตาราง 10 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบเมทานอล

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
150	94.48	86.21	93.10	91.26	4.43
100	91.72	87.59	86.21	88.51	2.87
70	77.93	71.03	76.55	75.17	3.65
50	62.76	58.62	58.62	60.00	2.39
30	46.21	50.34	48.97	48.51	2.11
10	37.93	43.45	42.07	41.15	2.87
5	42.07	37.93	39.31	39.77	2.11
1	40.69	33.79	33.79	36.09	3.98

จากตาราง 10 พบว่าค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดหยาบเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 150 สามารถยับยั้งได้สูงสุด และจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (ภาพประกอบ 19) พบค่า IC_{50} เท่ากับ $33.2 \mu\text{g/mL}$

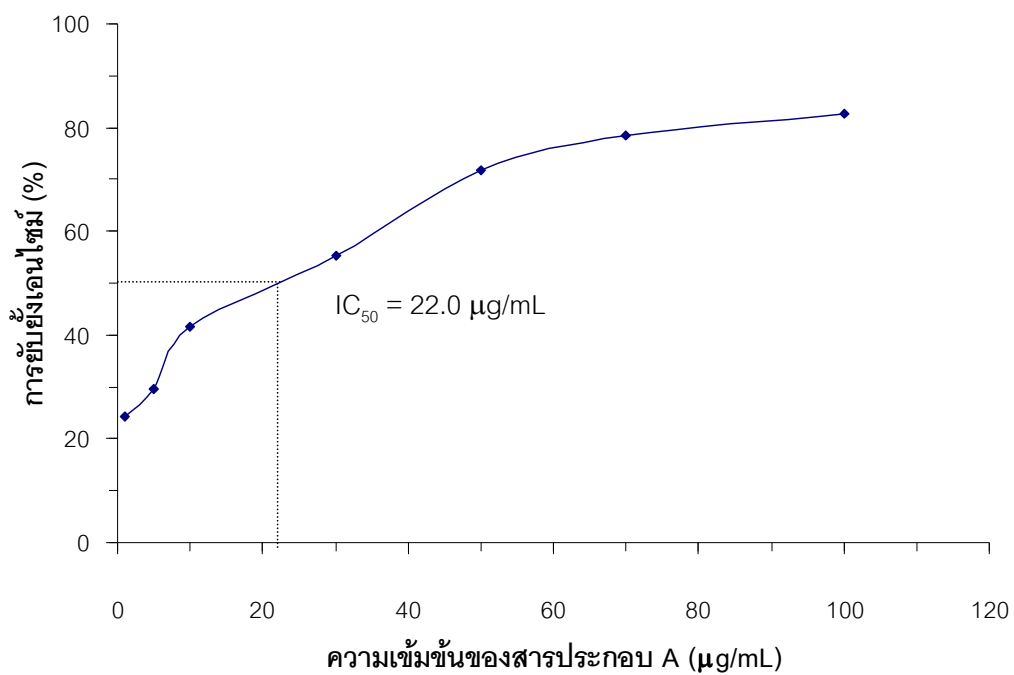


ภาพประกอบ 19 แสดงค่า IC_{50} ของสารสกัดหยาบต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตาราง 11 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบ A

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
150	-2.33	-6.54	-4.56	-4.48	2.11
100	80.14	86.76	81.44	82.78	3.51
70	79.53	80.46	75.25	78.41	2.78
50	69.30	70.37	75.87	71.85	3.53
30	53.05	55.24	57.31	55.20	2.13
10	44.62	42.00	38.13	41.58	3.27
5	27.77	31.91	28.85	29.51	2.15
1	25.96	26.24	20.80	24.33	3.06

จากตาราง 11 เมื่อคำนวณค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบ A พบว่าค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบ A เพิ่มขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น (150 $\mu\text{g/mL}$) สารละลายจะมีสีเข้มขึ้น จึงมีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของ Dopachrome ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงขึ้นด้วย เมื่อคำนวณค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงได้เป็นค่าลบ จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกับความเข้มข้นของสารประกอบ A ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 22.0 $\mu\text{g/mL}$ ดังภาพประกอบ 20

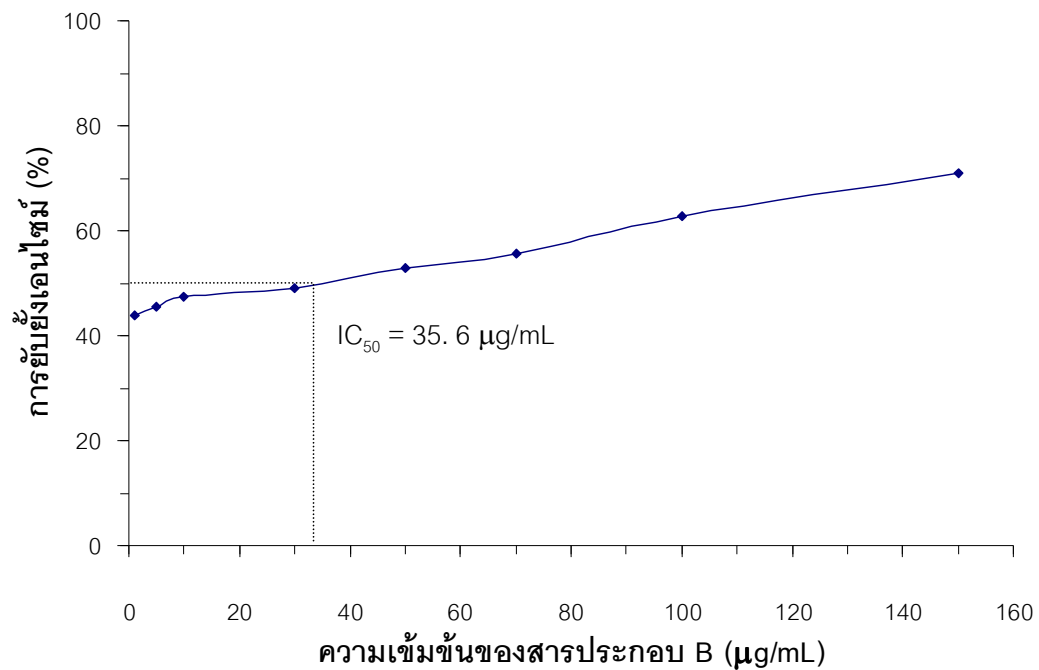


ภาพประกอบ 20 แสดงค่า IC_{50} ของสารประกอบ A ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตาราง 12 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบ B

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
150	70.37	72.56	69.59	70.84	1.54
100	62.31	64.84	61.01	62.72	1.94
70	54.78	57.64	54.78	55.73	1.65
50	51.92	53.65	53.22	52.93	0.90
30	48.02	49.38	49.32	48.91	0.77
10	46.98	48.32	46.98	47.43	0.77
5	44.90	45.65	46.20	45.58	0.65
1	42.04	44.32	45.42	43.93	1.72

จากตาราง 12 เมื่อคำนวณค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบ B จะพบว่าค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบ B เพิ่มขึ้น และพบค่า IC_{50} เท่ากับ $35.6 \mu\text{g/mL}$ แสดงดังภาพประกอบ 21

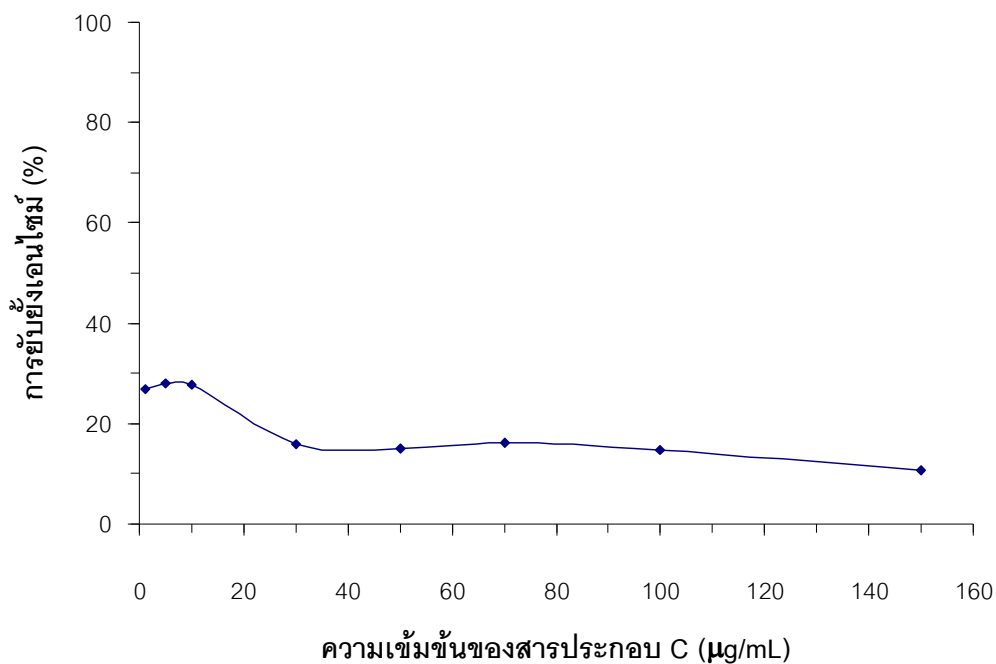


ภาพประกอบ 21 แสดงค่า IC_{50} ของสารประกอบ B ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตาราง 13 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบ C

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
150	10.61	8.38	12.85	10.61	2.23
100	19.55	13.97	10.61	14.71	4.52
70	16.20	19.55	12.85	16.20	3.35
50	19.55	15.08	10.61	15.08	4.47
30	12.85	16.20	18.44	15.83	2.81
10	26.26	25.14	31.84	27.75	3.59
5	31.84	27.37	25.14	28.12	3.41
1	24.02	30.73	26.26	27.00	3.41

จากตาราง พบว่าสารประกอบ C สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้

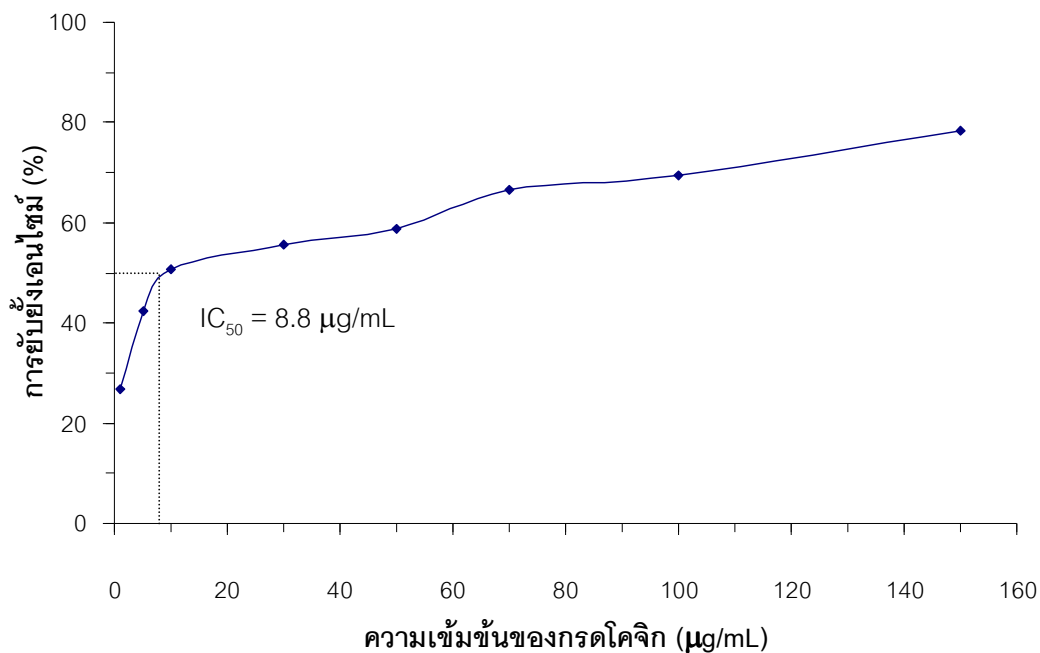


ภาพประกอบ 22 แสดงค่า IC_{50} ของสารประกอบ C ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตาราง 14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของกรดโคจิก

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	ร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	SD
150	75.66	80.69	78.75	78.37	2.54
100	67.55	72.85	68.13	69.51	2.91
70	64.84	68.63	66.00	66.49	1.94
50	57.27	60.78	58.57	58.87	1.78
30	55.10	54.15	58.03	55.76	2.03
10	52.40	50.53	49.54	50.82	1.45
5	42.12	45.70	39.44	42.42	3.14
1	26.44	29.41	24.57	26.81	2.44

จากตาราง 14 เมื่อคำนวณค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของกรดโคจิก ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในเครื่องสำอางเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าค่าการยับยั้งเอนไซม์จะสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดโคจิกเพิ่มขึ้น และพบค่า IC_{50} เท่ากับ $8.8 \mu\text{g/mL}$



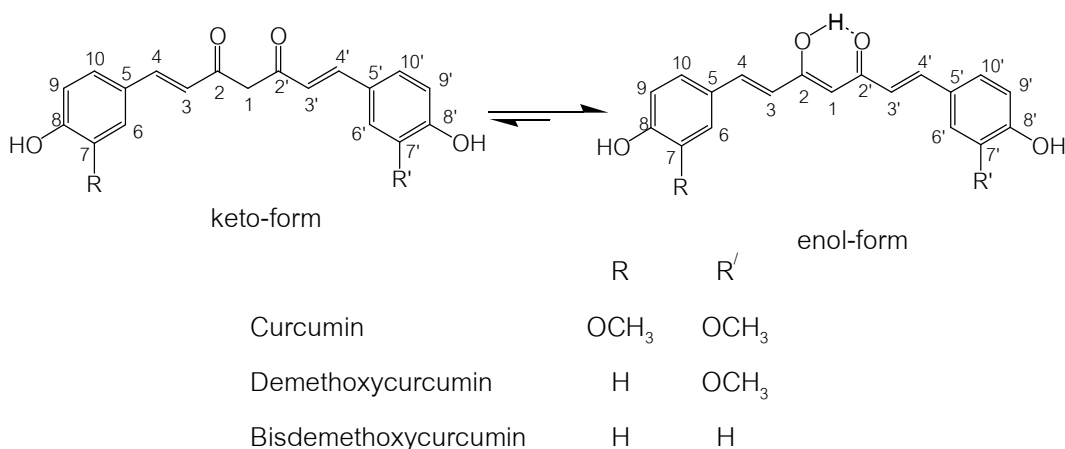
ภาพประกอบ 23 แสดง IC_{50} ของกรดโคจิกต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากผงขมิ้นชัน โดยนำผงขมิ้นชันมาสกัดด้วยเฮกเซนและเมทานอล ตามลำดับ จากนั้นนำสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง โดยใช้ซิลิกาเจลเคลือบบนแผ่นกระจกขนาด 20 x 20 cm เป็นตัวดูดซับ และใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล อัตราส่วน 95:5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด ที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 nm และเรืองแสงที่ความยาวคลื่น 365 nm คือ สารประกอบ A มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีส้ม สารประกอบ B มีลักษณะเป็นผลึกสีส้ม และสารประกอบ C มีลักษณะเป็นผลึกสีส้ม โดยคิดเป็นร้อยละ 29.2 8.57 8.74 ตามลำดับ

จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพและวิเคราะห์สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยใช้ข้อมูลทางเทคนิคทางสเปกโทรสโคปีพบว่าสารประกอบ A คือ 1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) หรือ Curcumin สารประกอบ B คือ 1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl) หรือ Demethoxycurcumin สารประกอบ C คือ 1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1,7-bis(4-hydroxyphenyl) หรือ Bisdemethoxycurcumin ซึ่งจากรายงานของรายงานของวีระยุทธ โพธิ์ฐิติรัตน์ (Pothitirat. 2006: 115-121) และ ปีเตอร์ แอล เมตา และคนอื่นๆ (Peter-Almeida; et al. 2005: 1039-1044) พบโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นอินอล (enol-form) เนื่องจากเกิดกระบวนการ Tautomerization ของสารประกอบ แต่ในการวิจัยนี้พบโครงสร้างเป็นแบบคีโต (keto-form) ดังภาพประกอบ 24

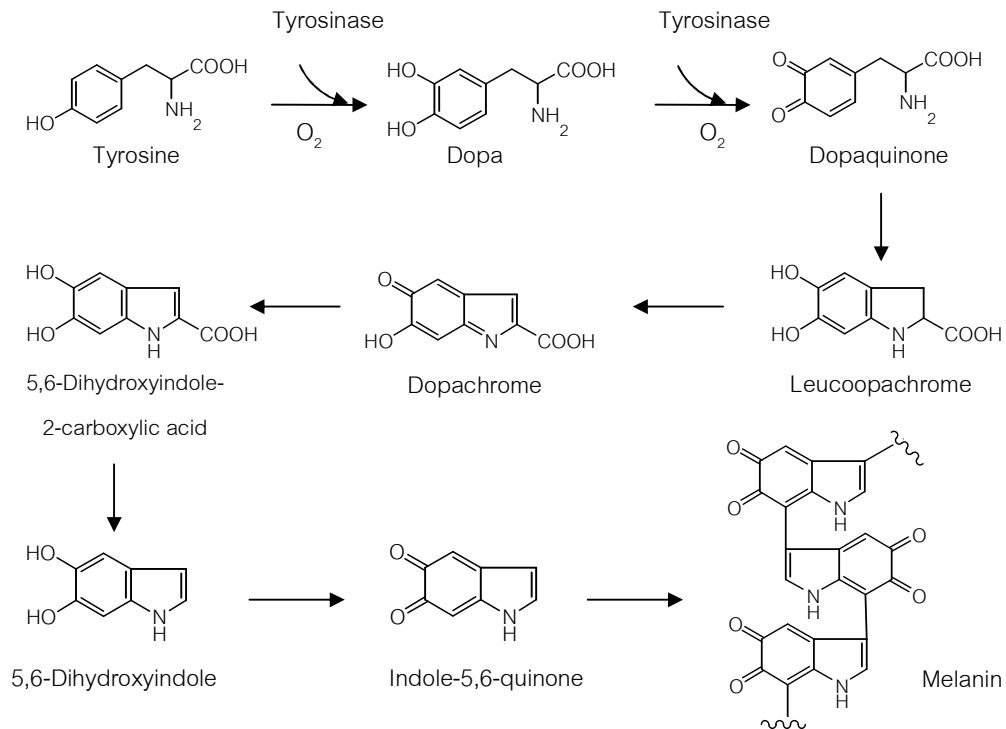


ภาพประกอบ 24 แสดงการเกิด Tautomerization ของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ ซึ่งเป็นสารสกัดจากผงขมิ้นชัน ด้วยวิธี Dopachrome method โดยใช้ เครื่อง Microplate reader (Multiskan EX) วัดค่าการดูดกลืนแสงของ Dopachrome ที่ความยาวคลื่น 492 nm ในการทดลองพบว่าหากใช้สารสกัดในความเข้มข้นที่สูงจะไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ เนื่องจากสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิดมีสีที่เข้มมาก ทำให้มีผลบดบังต่อค่าการดูดกลืนแสงของ Dopachrome ในการทดลองจึงได้เตรียมสารทดสอบของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ที่มีความเข้มข้นลดต่ำลงตั้งแต่ 150, 100, 70, 50, 30, 10, 5 และ 1 $\mu\text{g/mL}$ และเตรียมสารทดสอบของกรดโคจิกที่มีความเข้มข้นในระดับเดียวกัน

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์จากผงขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดย Curcumin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุดคือมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.0 $\mu\text{g/mL}$ (59.72 μM) รองลงมาคือ Demethoxycurcumin มีค่า IC_{50} 35.6 $\mu\text{g/mL}$ (105.20 μM) ซึ่ง IC_{50} ของ Curcumin มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ ชิโรตะ และคนอื่นๆ (Shirota; et al. 1994: 266-269) ($\text{IC}_{50} = 47 \mu\text{M}$) Curcumin และ Demethoxycurcumin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสใกล้เคียงกับกรดโคจิก ($\text{IC}_{50} = 8.8 \mu\text{g/mL}$ หรือ 61.97 μM) แต่มีฤทธิ์แรงกว่าอาร์บูตินมาก ($\text{IC}_{50} = 6,200 \mu\text{M}$) (Likhitwitayawuid. 2000: 3) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกับความเข้มข้นต่างๆ ของสารทดสอบ จะเห็นว่า Curcumin และ Demethoxycurcumin มีฤทธิ์ยับยั้งสูงขึ้นตามความเข้มข้น แต่เนื่องจากสีที่เข้มมาก จึงทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงตามไปด้วย มีผลให้ค่าการยับยั้งที่คำนวณได้เป็นผลลบ ส่วน Bisdemethoxycurcumin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่อ่อนมากจึงไม่สามารถหาค่า IC_{50} ได้

จากการทดลองนี้ พบว่าสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากผงขมิ้นชันมีคุณสมบัติว่องไวต่อเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าไทโรซิน ทำให้ Dopachrome intermediate ในกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (ภาพประกอบ 25) ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ สาร Dopachrome จึงลดต่ำลง สอดคล้องกับรายงานของ ชิโรตะ และคนอื่นๆ (Shirota; et al. 1994: 266-269) ที่พบว่า Curcumin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสแบบแข่งขัน จากการทดลองชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของหมู่ OCH_3 ที่ตำแหน่ง C-7 และ C-7' ในโครงสร้างของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ โดยสารที่มี OCH_3 มากกลุ่มจะมีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมาก ดังนั้นสารประกอบ Curcumin จึงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงต่างจากสารประกอบ Demethoxycurcumin และ Bisdemethoxycurcumin



ภาพประกอบ 25 การสังเคราะห์เมลานิน

ที่มา: Likhitwitayawuid, K. (2000). *Tyrosinase inhibitors from plants*. p. 22

ข้อเสนอแนะ

1. สารประกอบ Curcumin และ Demethoxycurcumin มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ใกล้เคียงกับกรดโคจิกในหลอดทดลอง ดังนั้นจึงควรนำไปศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง
2. สารประกอบเคอร์คิวมินอยด์เป็นสารที่มีสีเหลืองเข้มและเป็นสารที่มีโครงสร้างไม่เสถียร การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางจึงเป็นสิ่งที่ควรได้รับการแก้ไข

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กองบรรณาธิการสมุนไพรเพื่อสุขภาพ. (2545, กุมภาพันธ์). ขมิ้น ยอดสมุนไพรบำบัดโรค. *วารสารสมุนไพรเพื่อสุขภาพ*. 2(16): 67-76.
- โฆษิต ประเสริฐสุด. (2547). อิทธิพลของระดับความสูงของพื้นที่และอายุการเก็บเกี่ยวต่อผลผลิตปริมาณน้ำมันหอมระเหย และสารเคอร์คิวมินในขมิ้นชัน. *ปริญญาานิพนธ์ วท.ม (พืชสวน)*.
ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ถ่ายเอกสาร.
- ทรงยศ อนุปรีชา; และ พรงาม ลิ้มตระกูล. (2548). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย ผลของเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนดีอียาและยีนไวรัสทงูเมอร์-1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยลิวคีเมีย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย. เชียงใหม่: คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ถ่ายเอกสาร.
- นิสากร ปานประสงค์. (2548, มกราคม). ขมิ้น สมุนไพรทองของไทย. *วารสารอพเด็ด*. 20(208): 50-52.
- นิรุสลีนิน มะเต๊ะ; และ รัศมี วัฒนานนท์. (2545). *ฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสมุนไพรไทย*. โครงการพิเศษ ปริญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ถ่ายเอกสาร.
- นุช ภิรมณ์. (2548, มกราคม). ไวท์เทนนิ่งหน้าขาว. *วารสารไกลด์หมอ*. 29(1): 58-59.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. (2543, กรกฎาคม). ขมิ้น. *วารสารไกลด์หมอ*. 24(7): 59-61.
- บุญชู ศรีตุลาภักษ์; วันชัย ดีเอกนามกุล; และ กิตติศักดิ์ ลิขิตวิฑูวาดี. (2541, ตุลาคม-ธันวาคม). สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากมะหาด. *ไทยเภสัชสาร*. 22(4): 149-155.
- บังอร ศรีพานิชกุลชัย; และคนอื่นๆ. (2001, มกราคม-มิถุนายน). ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสมุนไพรท้องถิ่น 8 ชนิด. *วารสารวิจัย มข*. 6(1): 23-33.
- ประนอม เดชวิศิษฎ์สกุล; และ ภัสตรา เงินดี. (2531). การศึกษาทางเภสัชเวชของเหง้าขมิ้นชัน. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. 30(4): 267-274
- พิมพ์สุดา เนตรดาว, บรรณาธิการ. (2359). *สมุนไพรชาวบ้าน โดยโครงการสมุนไพรเพื่อการพึ่งตนเอง*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: ประพันธ์สาส์น.
- พิมพ์พร ลีลาพรพิสิฐ. (2544ก). *เครื่องสำอางธรรมชาติ ผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหน้า*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- (2544ข). *เครื่องสำอางสำหรับผิวหน้า*. ฉบับปรับปรุง. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.

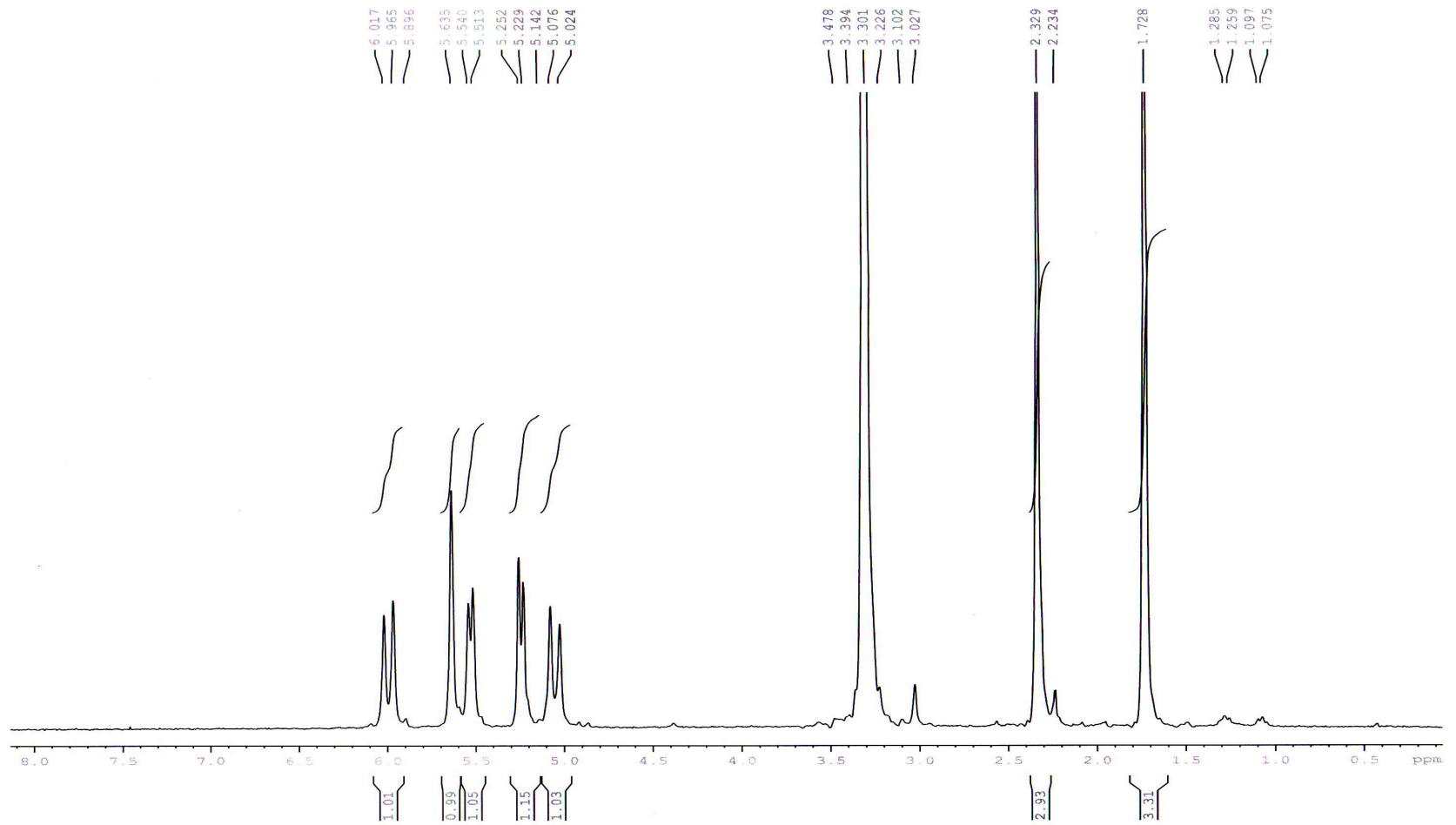
- พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์; และคนอื่นๆ. (2005). ผลของสารสกัดขมิ้นชันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ
ไวรัสโคโรนาโรคในกึ่งทะเล. *ไทยเภสัชสาร*. 29(3-4): 165-177.
- มยุรี จัยวัฒน์. (2547). การเปลี่ยนแปลงคุณภาพพืชน้ำหลังการเก็บเกี่ยว. สืบค้นเมื่อ 1 มีนาคม
2549, จาก [http://naffi.trf.or.th/News%20on%20web/news%2028%20\(9-16\).pdf](http://naffi.trf.or.th/News%20on%20web/news%2028%20(9-16).pdf)
- ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์. (2546). รายงานการวิจัยการศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้าน
ออกซิเดชัน และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากพืชสมุนไพรจังหวัดอุบลราชธานี.
อุบลราชธานี: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ถ่ายเอกสาร.
- สถาบันวิจัยสมุนไพร. (2544). ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L). นนทบุรี: สถาบันวิจัยสมุนไพร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.
- สุชาติภพ ภมรประวัติ. (2540). ขอบถี่ใกล้ตัว ขมิ้นชัน. *วารสารคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล*.
10: 29-32.
- สุพจน์ อัครพินธุ์ธกุล, บรรณานิการ. (2533). ขมิ้นชัน รักษาโรคกระเพาะ ทางเลือกใหม่สำหรับคุณ.
พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: เอดิสันเพรส โปรดักส์.
- ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้. (2544). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไข
เพิ่มเติม). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ประชาชน
- อัญชลี จุฑะพุทธิ; และ อุไรวรรณ เพิ่มพิพัฒน์. (2537). ฤทธิ์ด้านการอักเสบจากเหง้าขมิ้นชัน.
วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 36(4): 197-209.
- อุไรวรรณ เพิ่มพิพัฒน์; อัญชลี จุฑะพุทธิ; และ นิยดา เกียรติยิ่งอังศุลี. (2539). ฤทธิ์ของขมิ้นชันในการ
ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหารหนูขาว. *ไทยเภสัชสาร*. 20(1): 27-38.
- อรกัญญา วิบูลย์สวัสดิ์; วุฒิชัย นุตกุล; และ ธงชัย สุนทรภา. (2546, กรกฎาคม). การพัฒนารักษา
ข้ออักเสบรูมาตอยด์จากขมิ้นชัน. *วารสารแลปทูเดย์*: 69-73.
- อ้อมบุญ ถ้วนรัตน์; และ พรรณวิภา กฤษภาพงษ์. (2548, กรกฎาคม-ธันวาคม). การยับยั้งเอนไซม์
ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกิ่งหม่อนในประเทศไทย และครีมีลดความคล้ำ. *วารสารสำนักงาน
คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ*. 37(2): 83-101.
- Ammon, H. P. T.; et al. (1992). Curcumin: a potent inhibition of Leukotriene B₄ formation in
rat Peritoneal Polymorphonuclear Neutrophils (PMNL). *Planta Medica*. 58: 226.
- Ammon, H. P. T.; et al. (1993). Mechanism of antiinflammatory action of curcumin and
boswellic acids. *Journal of Ethnopharmacology*. 38: 113-119.

- Arung, E. T.; Shimisu, K.; & Kondo, K. (2006). Inhibition effect of Artocarpanon from *Artocarpus heterophyllus* on melanin biosynthesis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 29(9): 1966-1969.
- Barthelemy, S.; et al. (1998). Curcumin and curcumin derivatives inhibit Tat-mediated transactivation of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Research in Virology*. 149(1): 43-52.
- Baurin, N.; et al. (2002). Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 82: 155-158.
- Berman, K. (2006). *Medical Encyclopedia: Melanin*. Retrieved February 2, 2007, from <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/9620.htm>
- Bhavani, K. T. N.; et.al. (1980). Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guinea pigs, and monkeys. *Indian Journal of Experimental Biology*. 18: 73-75.
- Deshpande, S. S.; et al. (1998). Subchronic oral toxicity of turmeric and ethanolic turmeric extract in female mice and rats. *Toxicology Letters*. 95: 183-193.
- Friedman, M. (1996). Food browning and its prevention: an overview. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 44(3): 631-53.
- Garg, S. K. (1974). Effect of *Curcuma longa* (Rhizome) on fertility in experimental animals. *Planta Medica*. 26: 226-227.
- Khar, A; et al. (1995). Antitumor activity of curcumin is mediated through the induction of apoptosis in AK-5 tumor cells. *FEBS Letters*. 445: 165-168.
- Kiso, Y.; et al. (1983). Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* rhizome. *Planta Medica*. 49: 185-187.
- Jacques, S. (2007). *Optical absorption of melanin*. Retrieved February 2, 2007, from <http://omlc.ogi.edu/spectra/melanin/index.html>
- Lee, S. H.; et al. (2002). Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 25(8): 1045-1048.

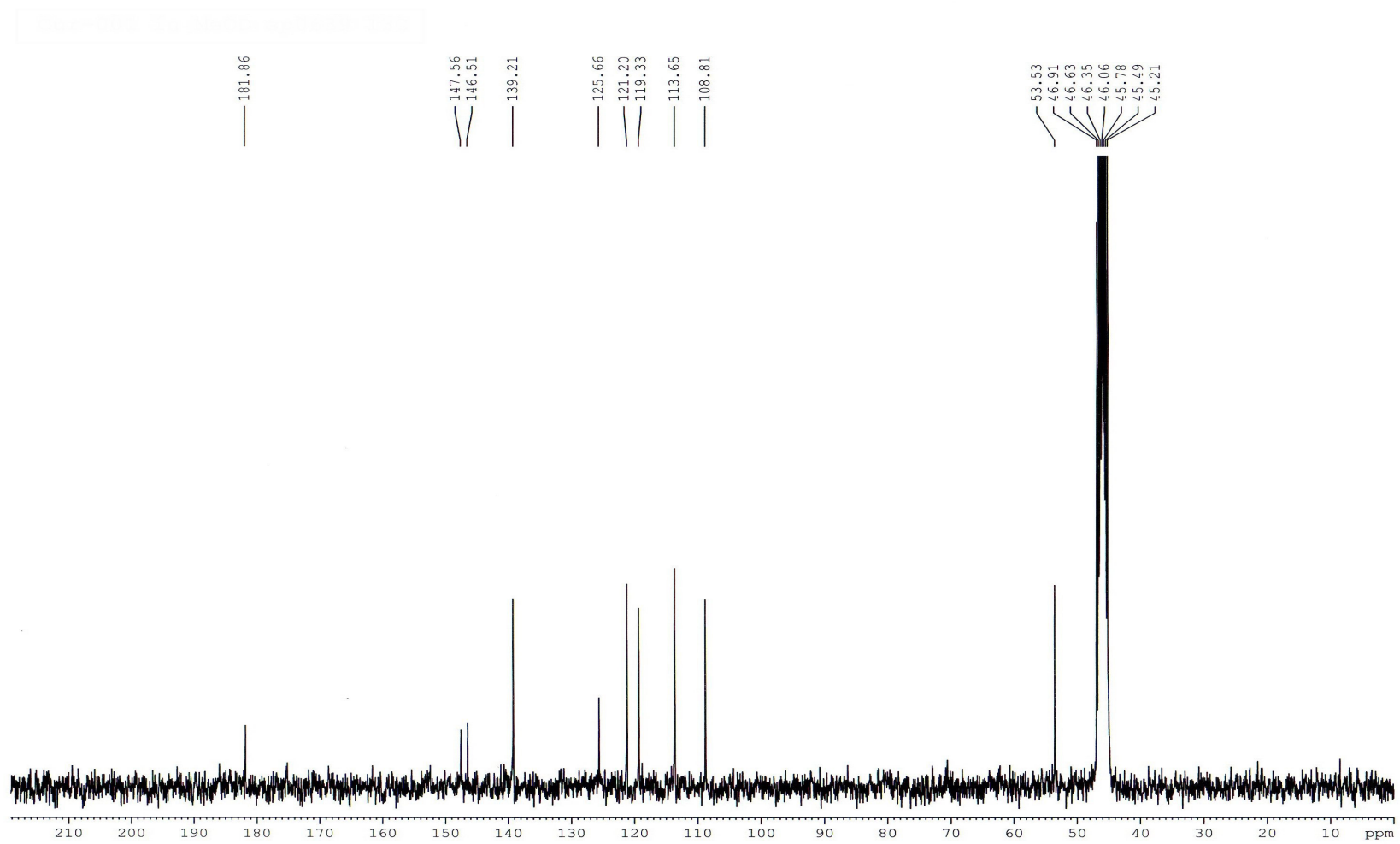
- Likhitwitayawuid, K. (2000). *Tyrosinase inhibitors from plants*. Project [The Asahi Glass Foundation, Japan and Faculty of Engineering, Chulalongkorn University]. Bangkok: Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. Photocopied.
- Limtrakul, P.; et al. (1997). Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Letters*. 116: 197-203.
- Lutomski, J.; Kedzia, B.; & Debska, W. (1974). Effect of alcohol extract an active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria an fungi. *Planta Medica*. 26: 9-19.
- Mahady, G. B.; et al. (2000). *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanicals used traditionally for treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*. Suppl II: 95.
- Mazumder, A.; et al. (1995). Inhibition of immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochemical Pharmacology*. 49(8): 1165-1170.
- Nagabhushan, M.; Amonkar A. J.; & Bhide, S. V. (1987). In vitro antimutagenicity of curcumin agent environmental mutagens. *Food and Chemical Toxicology*. 25(7): 545-547.
- Peter-Almeida, L.; et al. (2005). Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Research International*. 38: 1039-1044.
- Pothitirat, W. (2006). *Standardization and antioxidant activity of Curcuma longa rhizome extract* [M.Sc. Thesis in Pharmaceuycal chemistry and Phytochemistry]. Bangkok: Faculty of Graduate studies, Mahidol University. Photocopied.
- Prachachon. (1995). *Thai Herbal Pharmacopocia Vol. 1*. Bongkok: Prachachon.
- Qureshi, S.; Shah, A. H.; & Ageel, A. M. (1992). Toxicity studies on *Alpinia galangal* and *Curcuma longa*. *Planta Medica*. 58:124-126.
- Reddy, R. C.; et al. (2005). Curcumin for malaria therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 326: 472-474.
- Rongkadilok, N; et al. (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chemical Toxicology*. 45: 328-336.

- Roth, G. N.; Chandra, A.; & Nair, M. G. (1998). Novel bioactivities of *Curcuma longa* constituents. *Journal of Natural Products*. 61: 542-545.
- Ruby, A. J.; et al. (1995). Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Letters*. 94: 79-83.
- Sittisomwong, N.; et al. (1990). Acute and subchronic toxicity of turmeric. *Bulletin of the Department of Medical Sciences*. 32(3): 101-111.
- Sharma, S. C.; et al. (1972). Lipid peroxide formation in experimental inflammation. *Biochemical Pharmacology*. 21: 1210-1214.
- Shimizu, K.; et al. (1998). The inhibition components from *Artocarpus incisus* on melanin biosynthesis. *Planta Medica*. 64: 408-412.
- Shirota, S.; et al. (1994). Tyrosinase inhibitors from crude drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 17(2): 266-269.
- Soudamini, K. K. (1989). Inhibition of chemical carcinogenesis by Curcumin. *Journal of Ethnopharmacology*. 27: 227-233.
- Srinivasan, D.; et al. (2001). Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 74: 217-220.
- Srimal, R. C.; & Dhawan, B. N. (1973). Pharmacology of diferuloyl methan (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory analogs in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 25(6): 447-452.
- Wikipedia. (2007). *Tyrosinase from wikipedia*. Retrieved January 2, 2008, from <http://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosinase>
- Zhang, J. P.; et al. (2006). Inhibitory effects of salicylic acid family compounds on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry*. 95: 579-584.

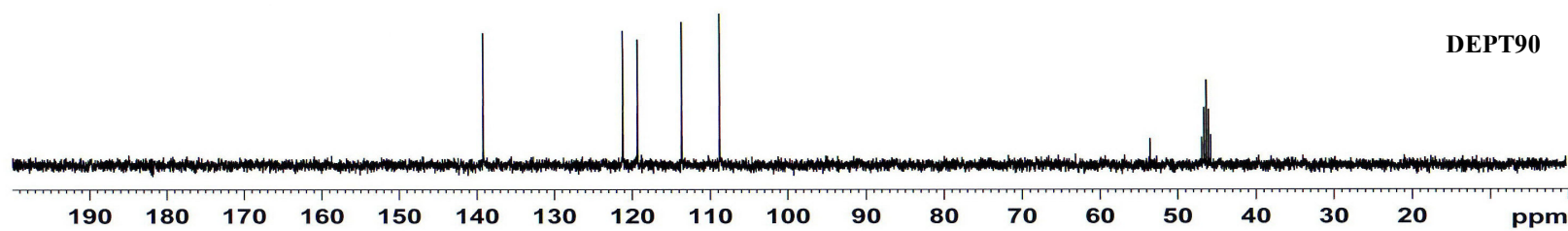
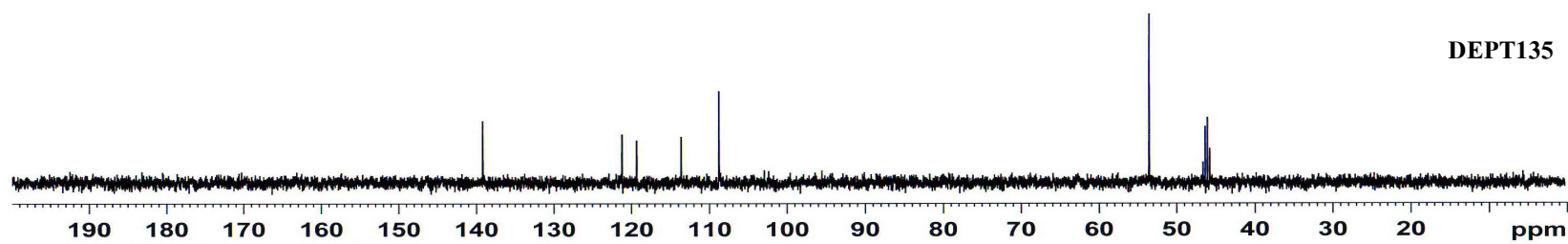
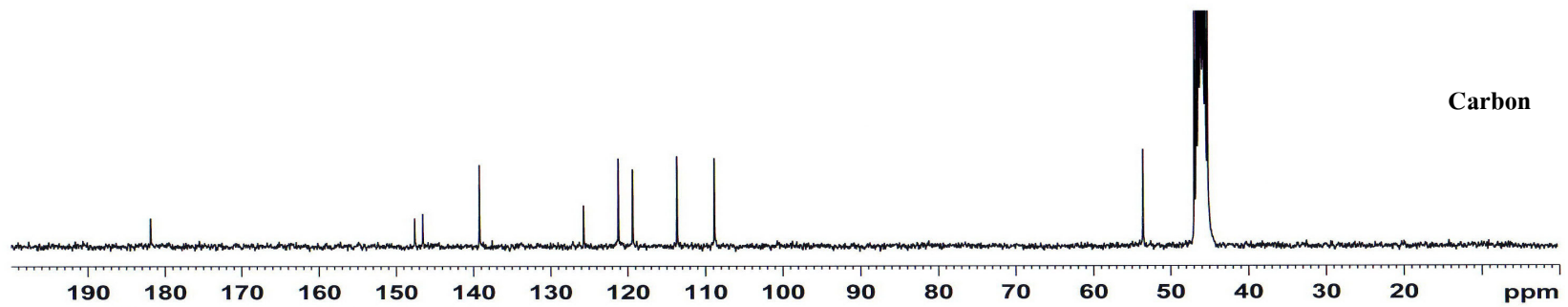
ภาคผนวก



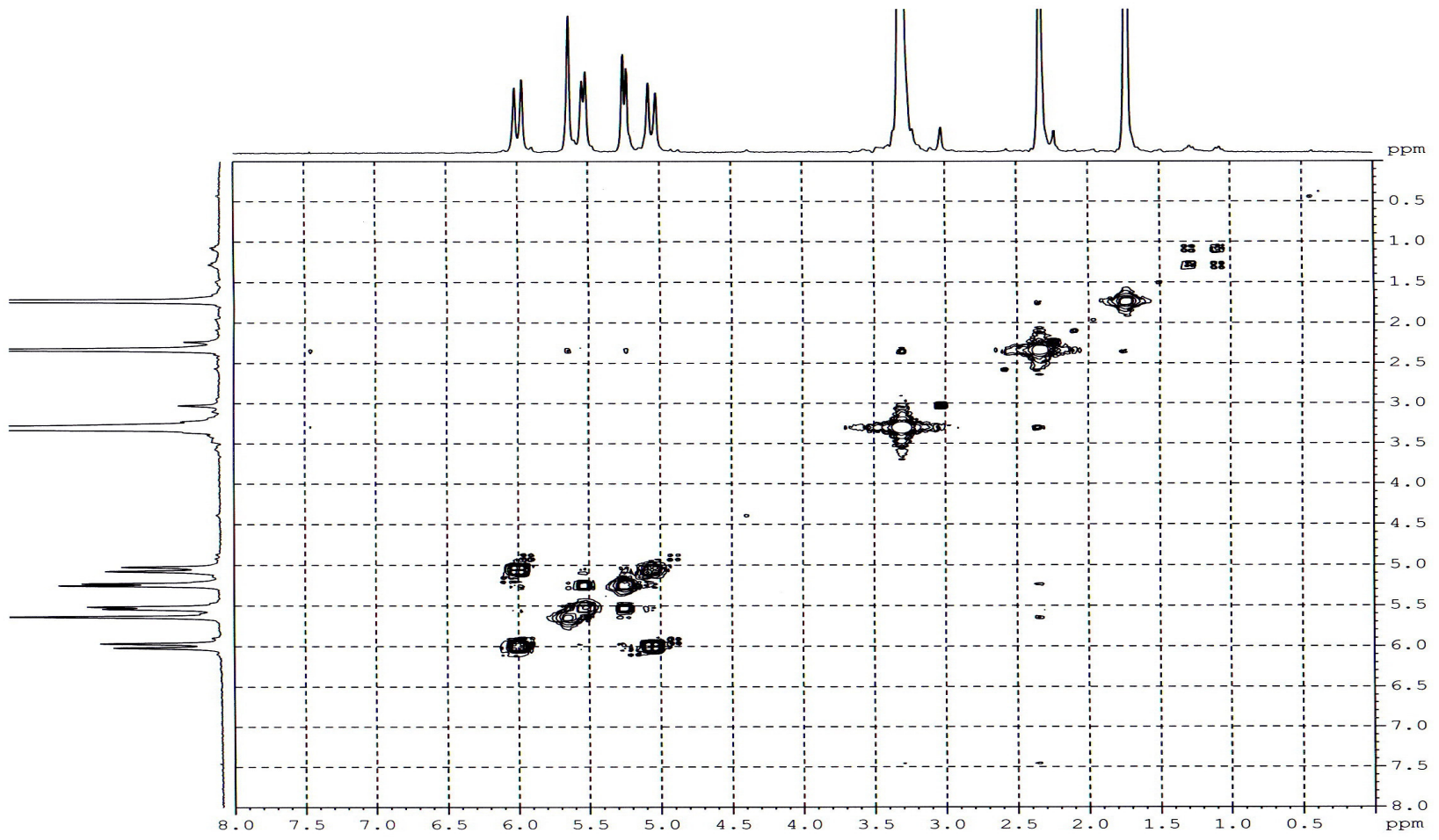
ภาพประกอบ 26 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ A



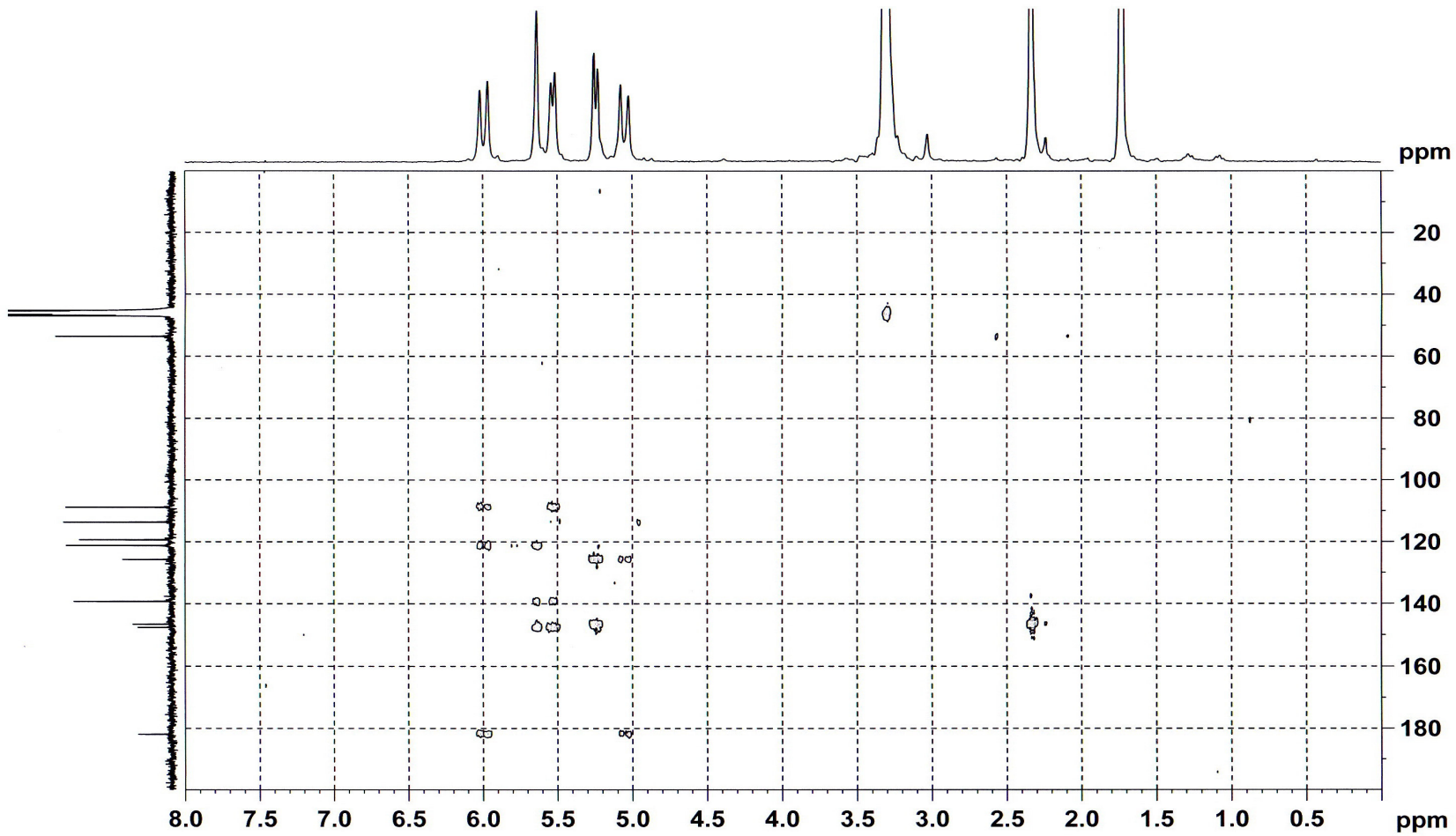
ภาพประกอบ 27 แสดง ^{13}C -NMR spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ A



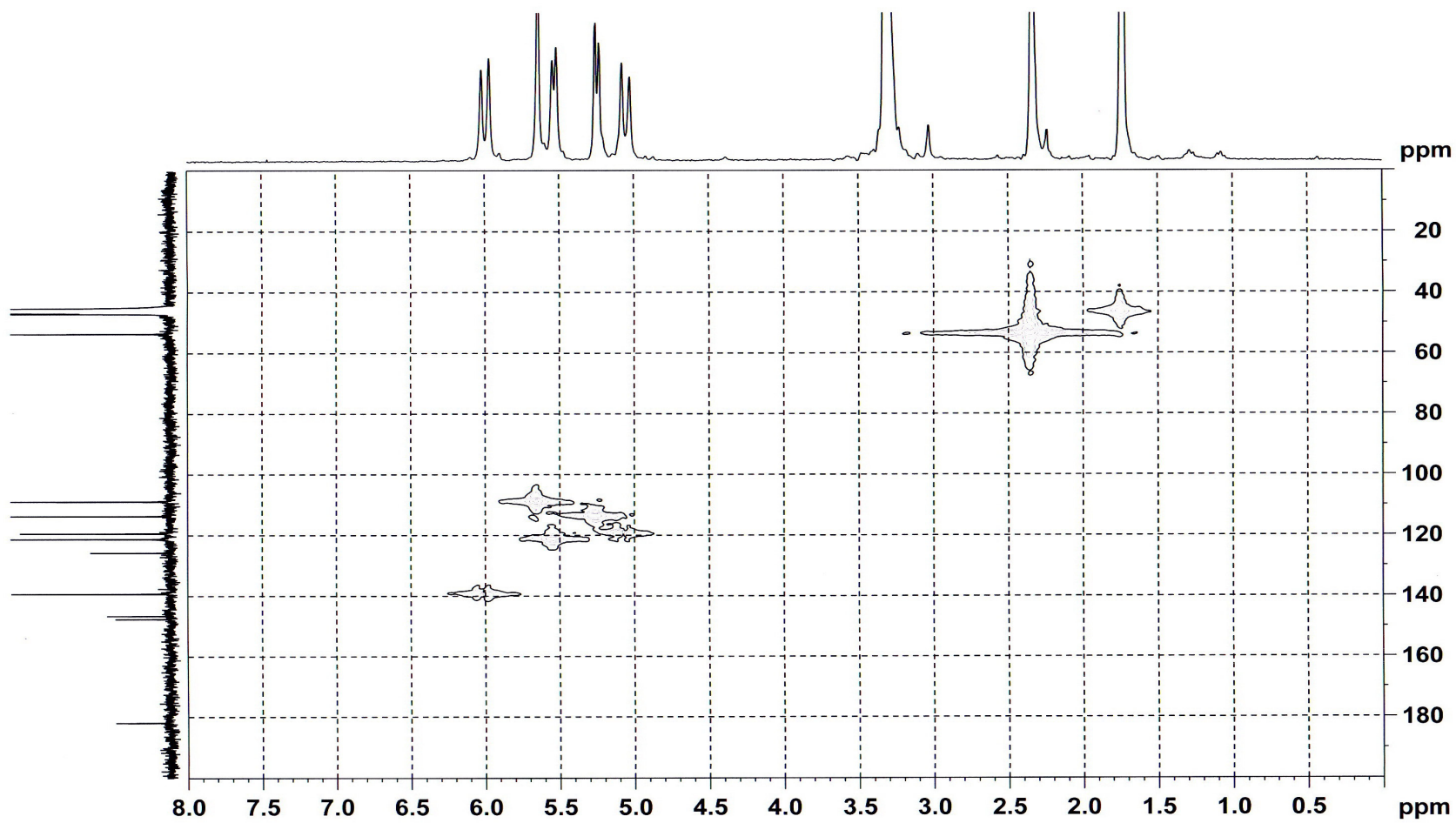
ภาพประกอบ 28 แสดง DEPT spectrum (CD₃OD, 300 MHz) ของสารประกอบ A



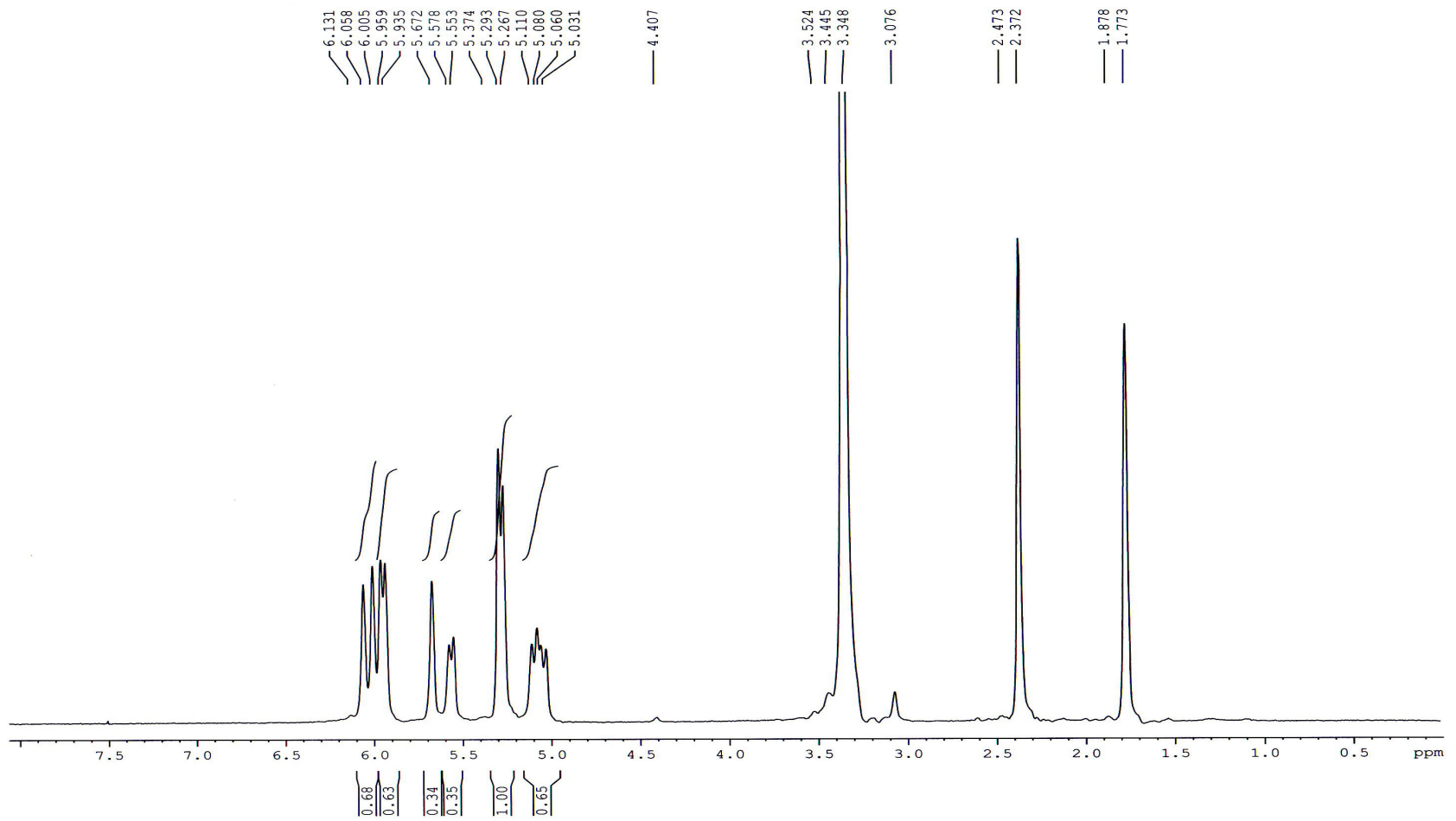
ภาพประกอบ 29 แสดง COSY spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ A



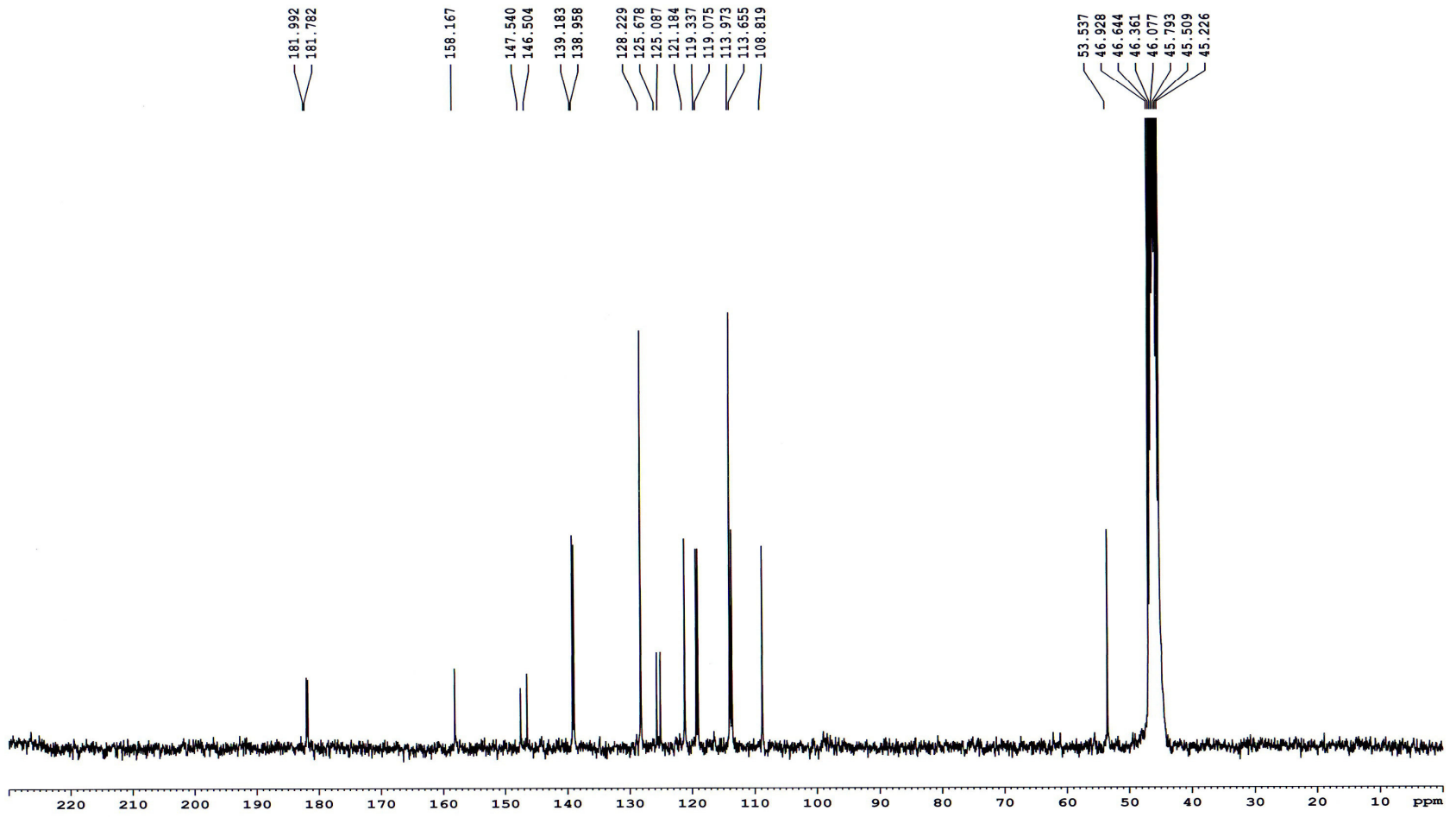
ภาพประกอบ 30 แสดง HMBC spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ A



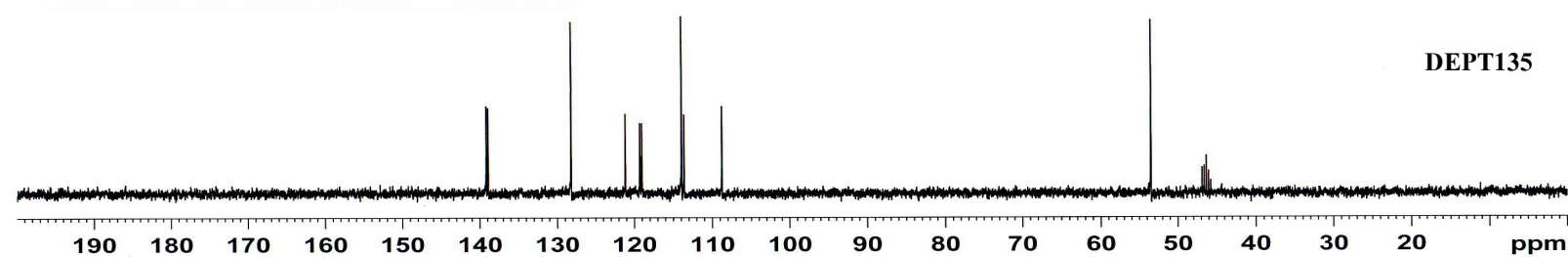
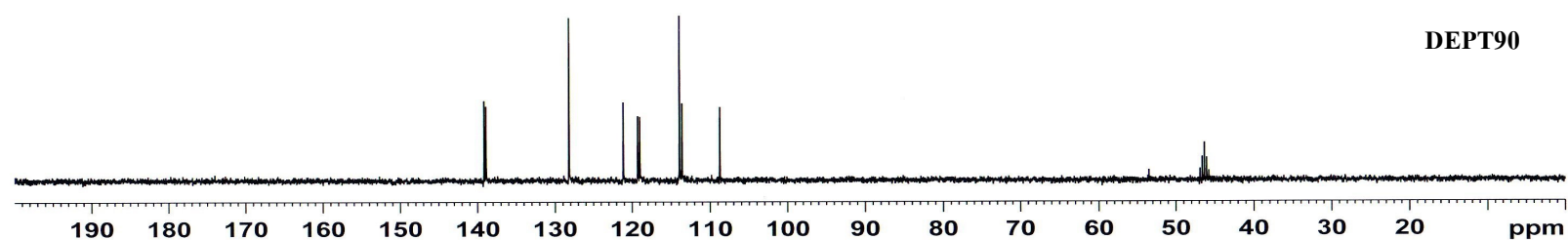
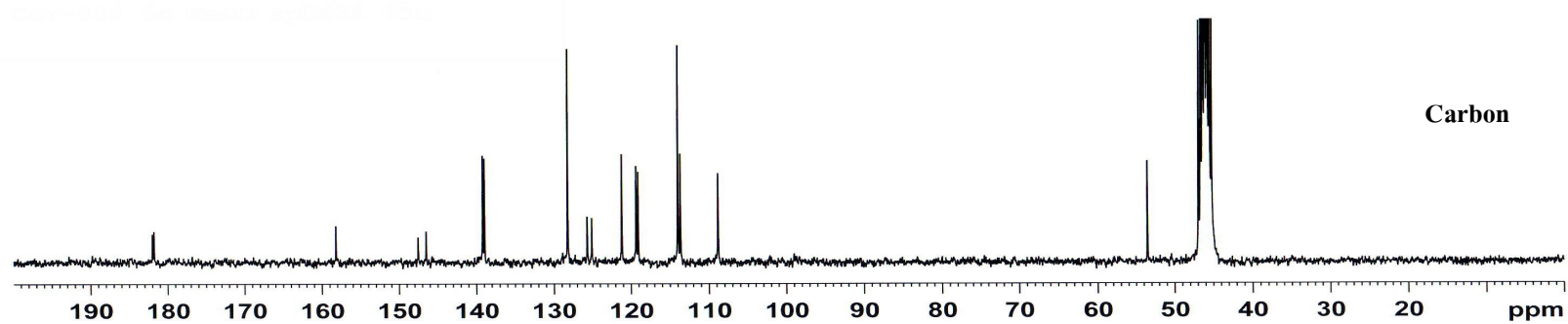
ภาพประกอบ 31 แสดง HMQC spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ A



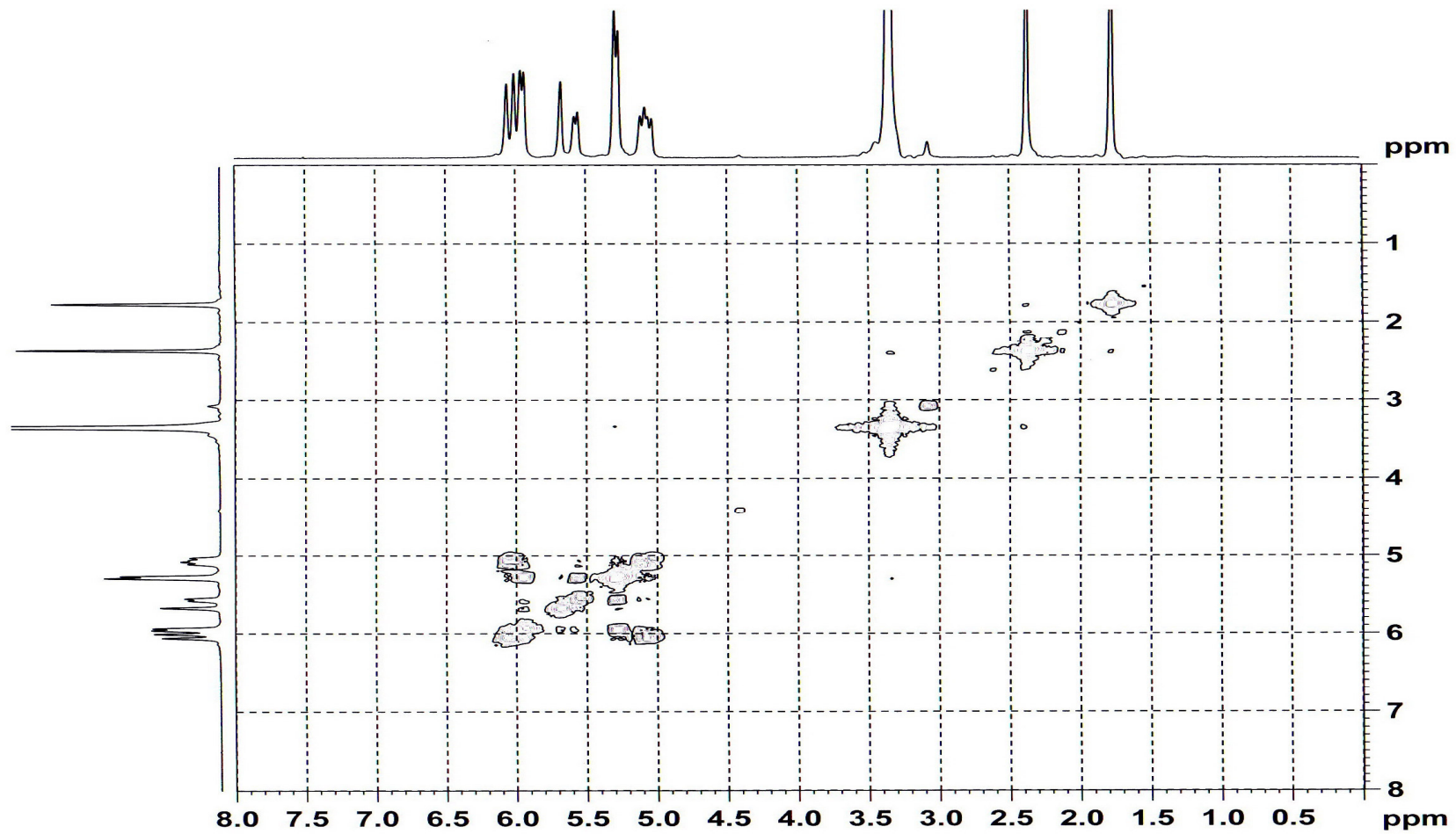
ภาพประกอบ 32 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum(CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ B



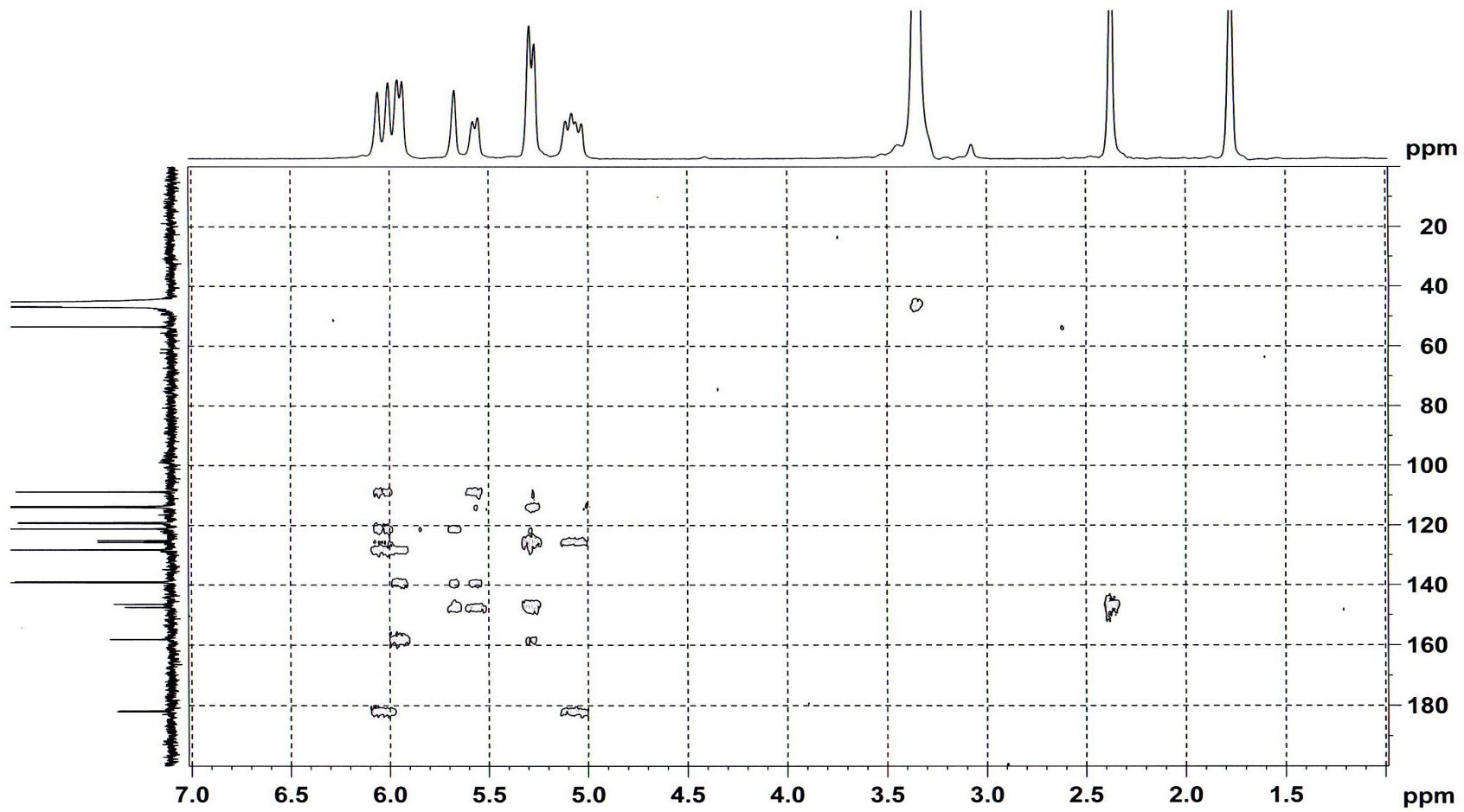
ภาพประกอบ 33 แสดง ^{13}C -NMR spectrum(CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ B



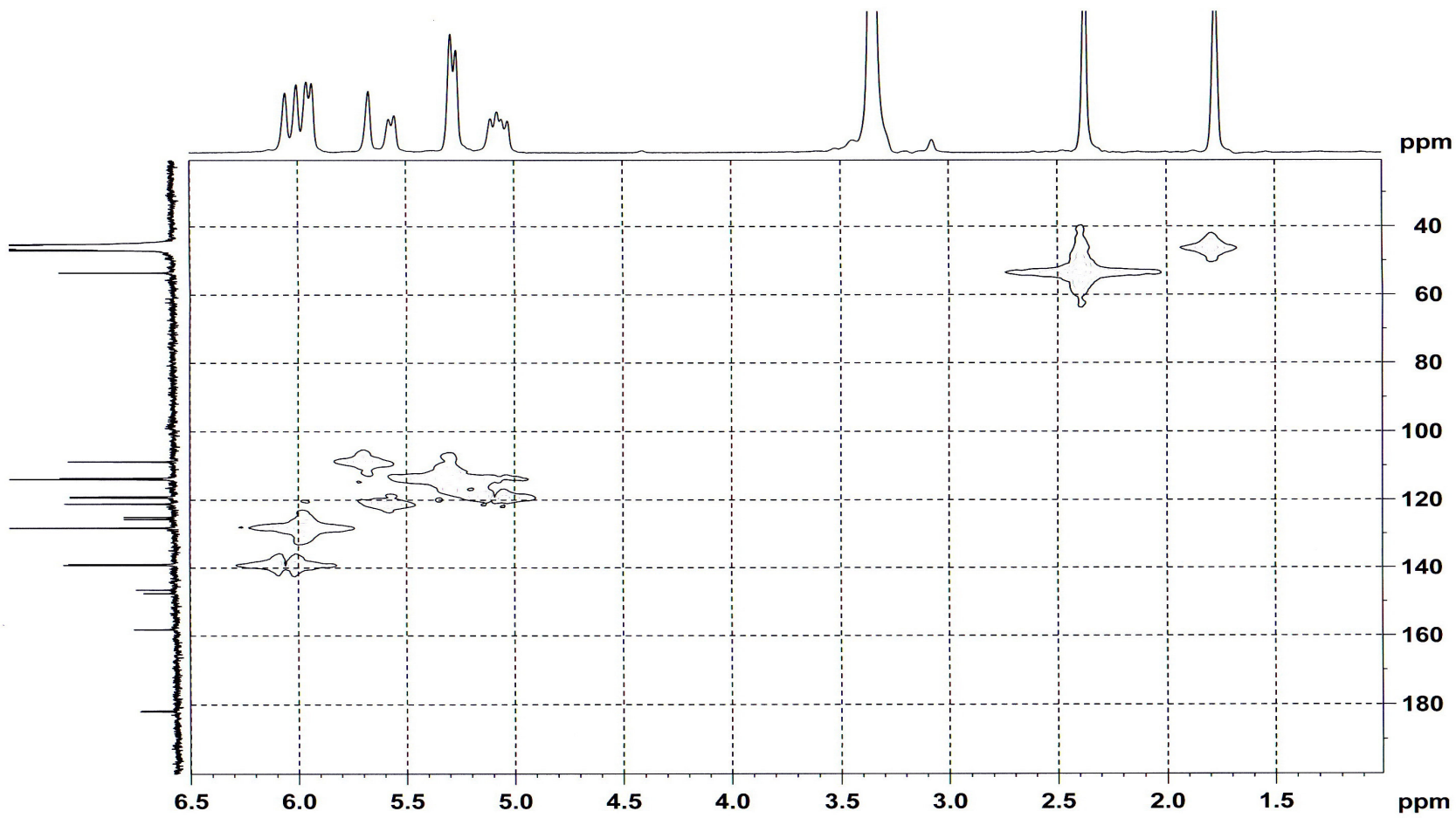
ภาพประกอบ 34 แสดง DEPT spectrum (CD₃OD, 300 MHz) ของสารประกอบ B



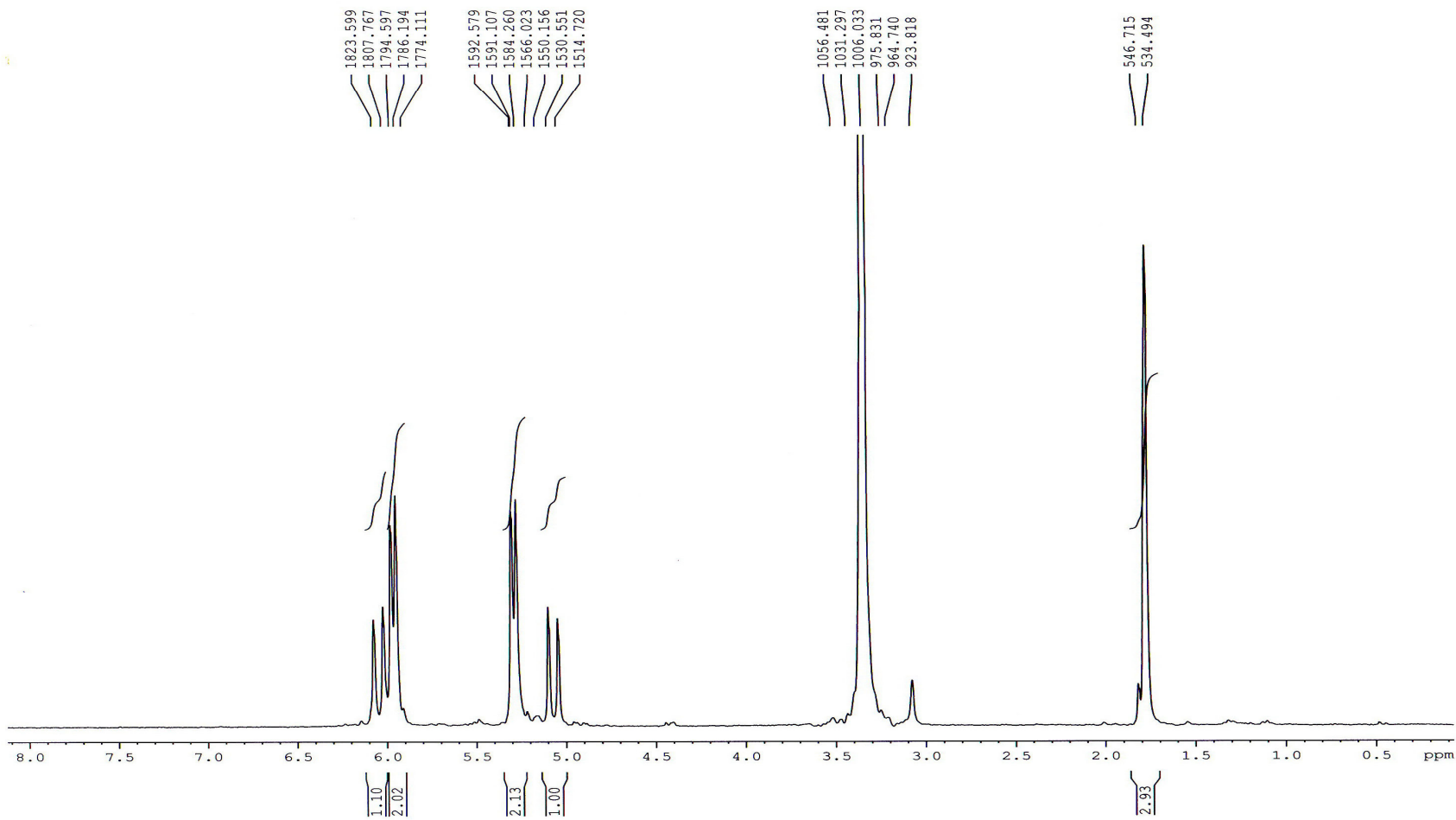
ภาพประกอบ 35 แสดง COSY spectrum (CD₃OD, 300 MHz) ของสารประกอบ B



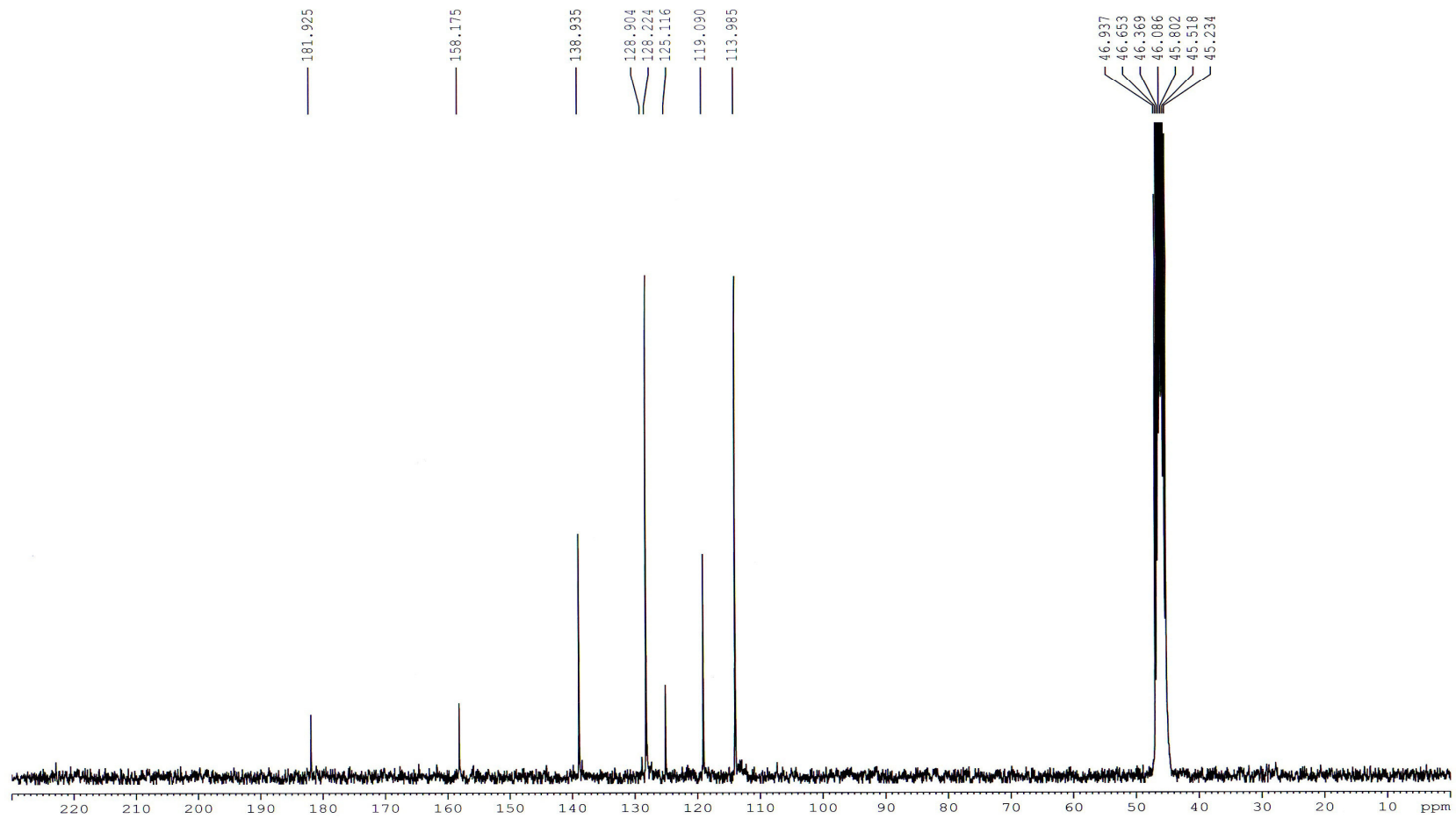
ภาพประกอบ 36 แสดง HMBC spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ B



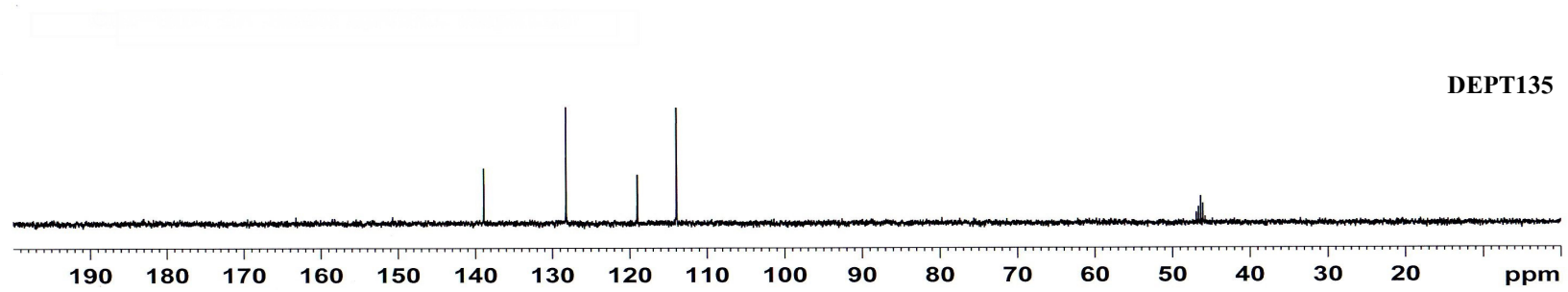
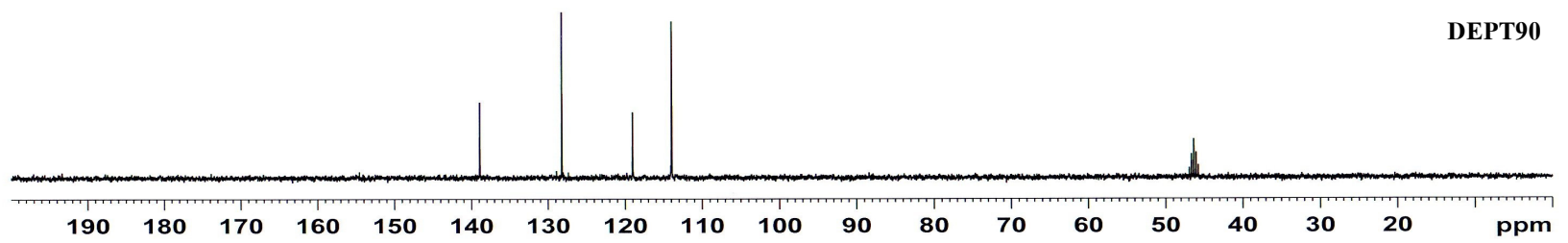
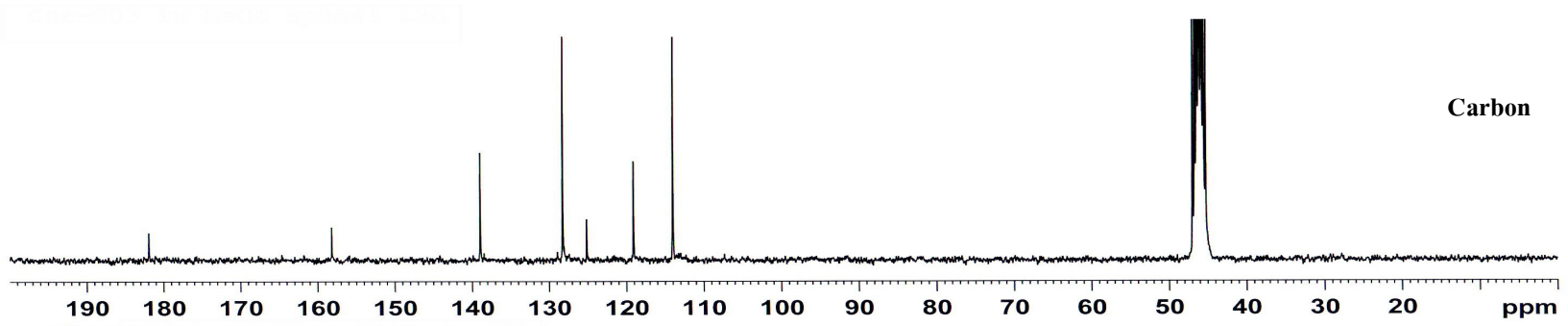
ภาพประกอบ 37 แสดง HMQC spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ B



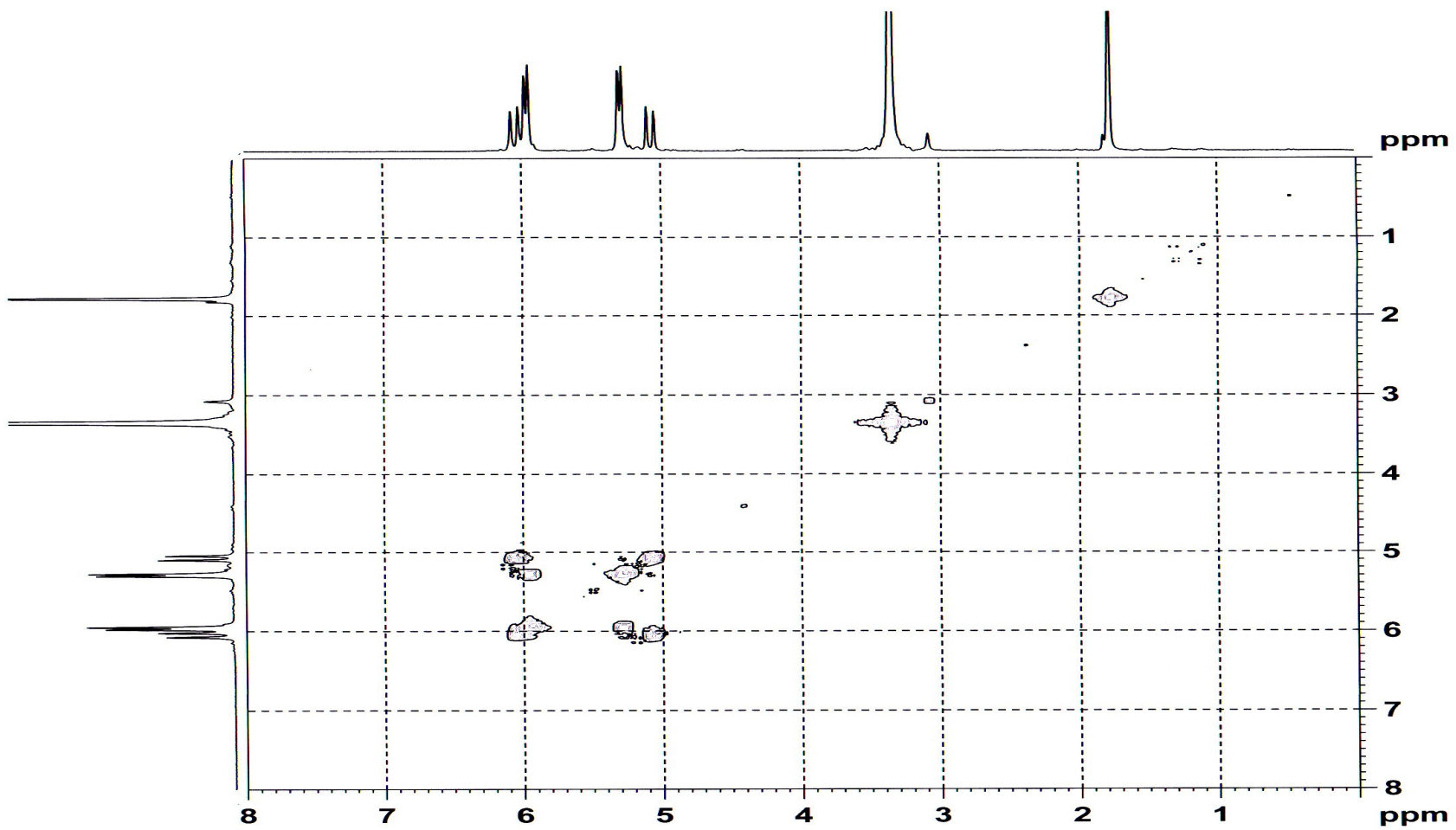
ภาพประกอบ 38 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ C



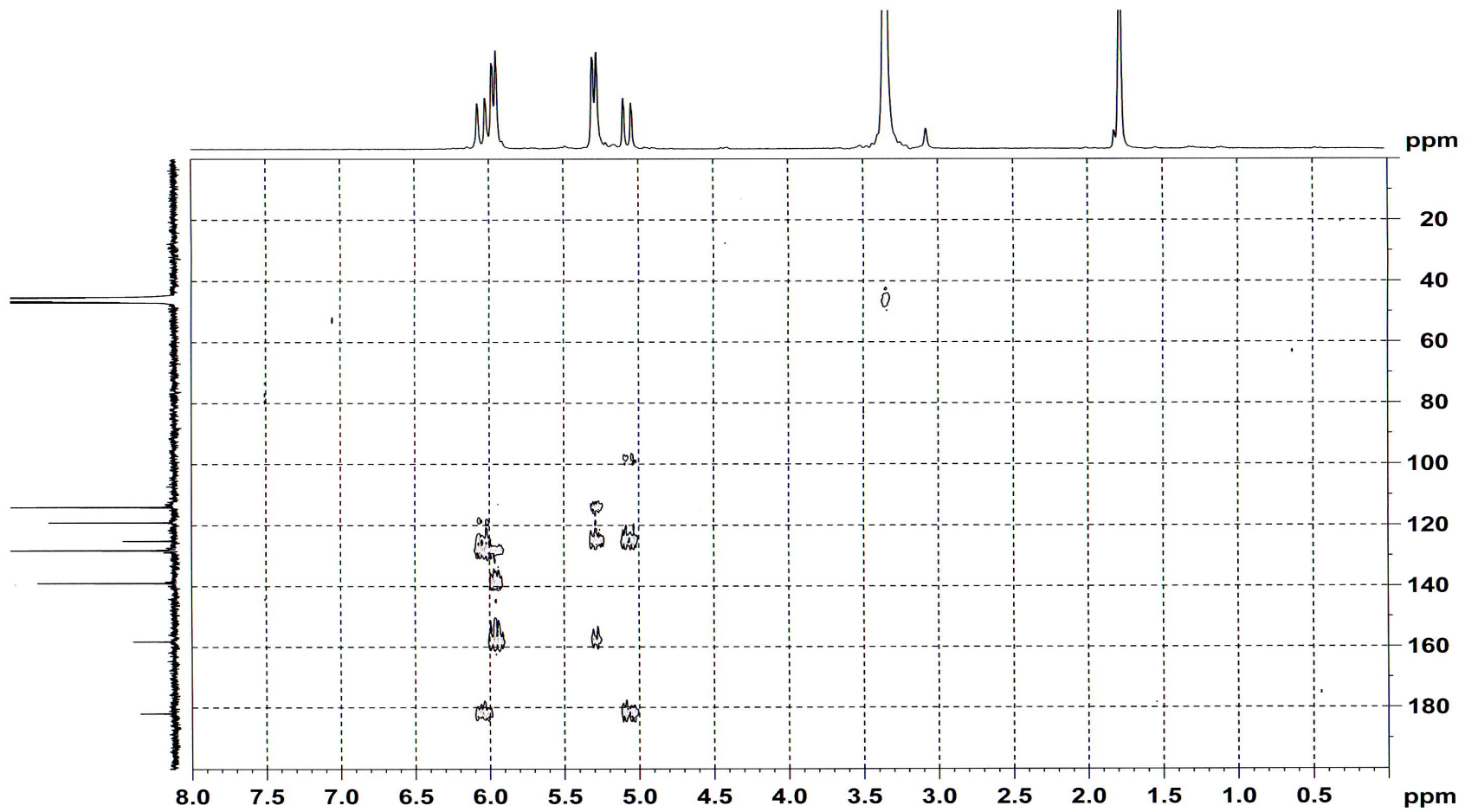
ภาพประกอบ 39 แสดง ^{13}C -NMR spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารประกอบ C



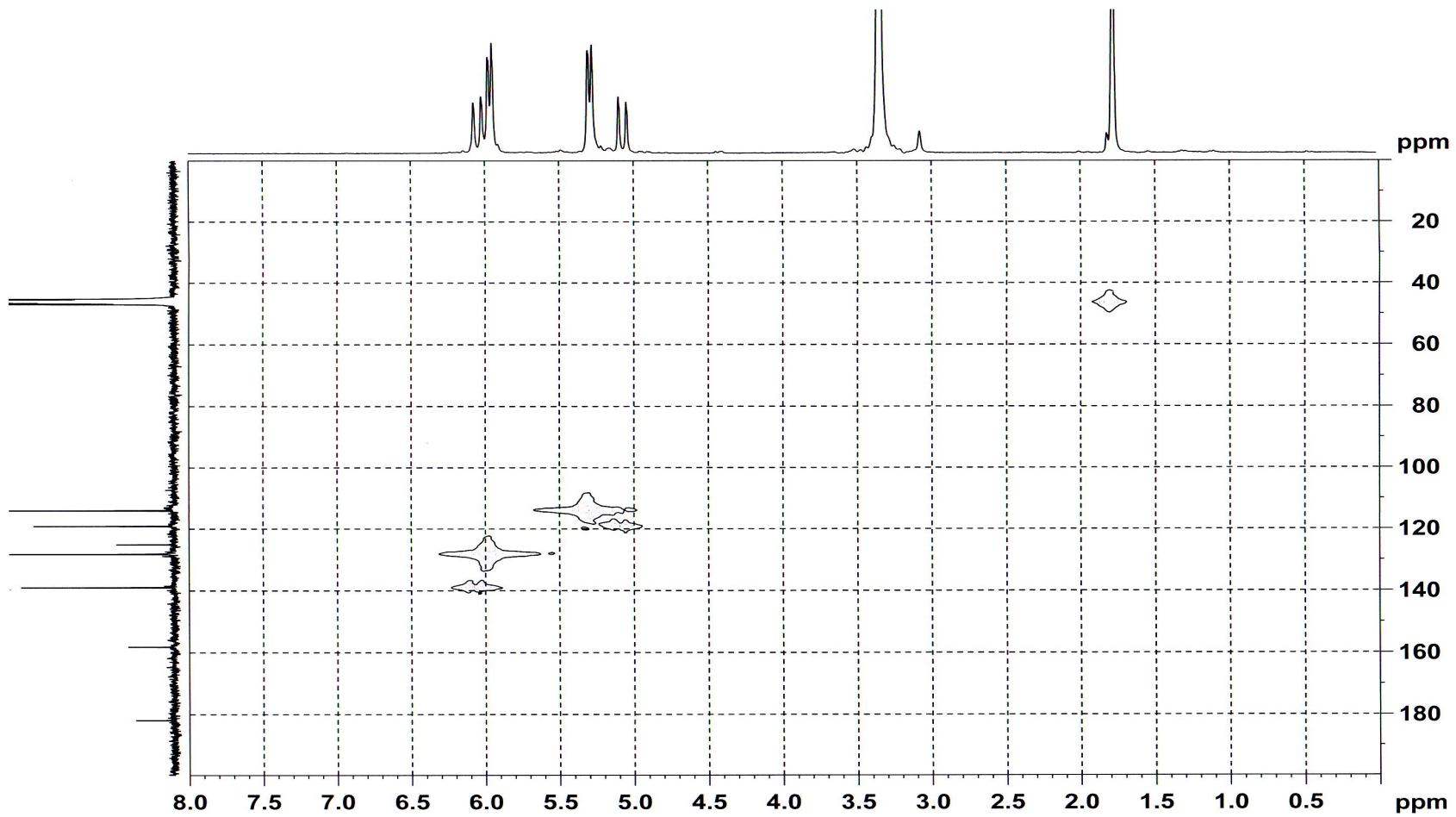
ภาพประกอบ 40 แสดง DEPT spectrum (CD₃OD, 300 MHz) ของสารประกอบ C



ภาพประกอบ 41 แสดง COSY spectrum (CD₃OD, 300 MHz) ของสารประกอบ C



ภาพประกอบ 42 แสดง HMBC spectrum (CD₃OD, 300 MHz) ของสารประกอบ C



ภาพประกอบ 43 แสดง HMQC spectrum (CD₃OD, 300 MHz) ของสารประกอบ C

อภิธานศัพท์

อภิธานศัพท์

เคอร์คิวมิน I	= Curcumin
เคอร์คิวมิน II	= Demethoxycurcumin
เคอร์คิวมิน III	= Bisdemethoxycurcumin
¹³ C-NMR	= carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
cm	= เซนติเมตร
d	= doublet (for NMR spectra)
dd	= doublet of doublet (for NMR spectra)
DOPA	= L-3,4-dihydroxyphenylalanine
°C	= degree Celsius
δ	= chemical shift
FLA	= Fibroblast-like synoviocyte
g	= กรัม
¹ H-NMR	= proton Nuclear Magnetic Resonance
HMBC	= ¹ H-detected Heteronuclear multiple Bond Coherence
HPLC	= High Performance Liquid Chromatography
L	= ลิตร
IC ₅₀	= ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 50%
<i>J</i>	= coupling constant
kg	= กิโลกรัม
L-DOPA	= L-3,4-dihydroxyphenylalanine
m	= เมตร
mL	= มิลลิลิตร
mg	= มิลลิกรัม
μg	= ไมโครกรัม
μL	= ไมโครลิตร
μM	= ไมโครโมลาร์
μm	= ไมโครเมตร
MIC	= ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 100%

MIC ₅₀	= ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 50%
MMP	= matrix metalloproteinase
NMR	= Nuclear Magnetic Resonance
Na ₂ HPO ₄	= disodium hydrogen phosphate
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	= sodium dihydrogen phosphate
NOESY	= proton-proton correlation through space
s	= singlet (for NMR spectra)
SGOT	= serum glutamic oraloacete transaminase
SGPT	= serum glutamic pyruvic transaminase
TIMP	= tissue inhibitor of metalloproteinase
TLC	= Thin-layer chromatography
UV	= ultraviolet

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวพัชรี ชุนหัด
วันเดือนปีเกิด	30 มีนาคม 2521
สถานที่เกิด	อำเภอดอนสัก จังหวัดสุราษฎร์ธานี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	36/7 หมู่ 6 ถนนดอนสัก-ขนอม ตำบลดอนสัก อำเภอดอนสัก จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84220
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ.2539	มัธยมศึกษาตอนปลาย (วิทย์-คณิต) จาก โรงเรียนสุราษฎร์พิทยา
พ.ศ.2543	วท.บ (เคมี) จาก มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
พ.ศ.2551	กศ.ม (เคมี) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ