



ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเปลือกยางนา

Total phenolic and flavonoid contents, antioxidative and anti-tyrosinase
activity of *Dipterocarpus alatus* bark extracts

สุพิชญา ฤดาวัลย์¹ นาถิตา วีระปรียากร^{1,2} เพลินทิพย์ ภูทองกิ่ง¹ และ แคทรียา สุทธานุษ^{1,2,*}

¹สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมืองขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

²Research Institute for Human High Performance and Health Promotion, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

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

Received: 5 July 2019 | Revised: 24 September 2019 | Accepted:

บทคัดย่อ

ยางนา (*Dipterocarpus alatus*) เป็นไม้ยืนต้นที่มีประโยชน์หลากหลาย โดยเฉพาะการนำน้ำมันจากต้นยางนาไปใช้เป็นพลังงานทดแทน และนอกจากนี้ส่วนเปลือกต้นยางนาก็มีความน่าสนใจ เนื่องจากเป็นส่วนที่มีการสะสมสารทุติยภูมิที่คาดว่าน่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย แต่มีรายงานทางวิทยาศาสตร์ที่จำกัดในส่วนของศักยภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นเพื่อเป็นข้อมูลหลักฐานสนับสนุนการนำไปใช้ประโยชน์ งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษเพื่อวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ TBARS assay และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากเปลือกยางนาที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล โดยศึกษาในหลอดทดลอง ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเปลือกยางนามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงเท่ากับ 179.94 ± 0.45 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และปริมาณฟลาโวนอยด์เท่ากับ 2.64 ± 0.86 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมสารสกัด มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น โดยให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 42.98 ± 0.62 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี DPPH assay และ IC_{50} ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 36.69 ± 1.85 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นศักยภาพของสารสกัดเปลือกยางนาที่มีแนวโน้มที่นำไปใช้ประโยชน์และพัฒนาเป็นสารสกัดเวชสำอางทางเลือกได้

ABSTRACT

“Yang-Na” (*Dipterocarpus alatus*) is a tree with a wide range of beneficial utilization, in particularly alternative energy area. Beside this, the bark part is of interest as a major deposited source of secondary metabolites that potentially have beneficial biofunctions, yet the limit of related scientific evidence is encountered. Therefore, to establish the supporting evidence for rationale utilization thereof, this research investigated the phytochemical contents and biological effects including determination of total phenolics and flavonoids, antioxidative (using DPPH and TBARS assays) and anti-tyrosinase activity in methanolic crude extract of Yang-Na bark (YNBE) using *in vitro* models. The results showed that YNBE highly contained phenolics with contents of 179.94 ± 0.45 mg GAE/g extract,

while, the flavonoid contents was low as 2.64 ± 0.86 mg QE/g extract. Significantly, the good antioxidative and anti-tyrosinase effects were detected with concentration-dependent manner and IC_{50} of 42.98 ± 0.62 μ g/mL in DPPH assay and of 36.63 μ g/mL for anti-tyrosinase activity, respectively. This data evidenced the potential in developing and utilizing of the YNBE as an alternative cosmeceutical agent.

คำสำคัญ: ยางนา สารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Keywords: *Dipterocarpus alatus*, Phenolics, Flavonoids, Antioxidation, Anti-tyrosinase

บทนำ

การบำรุงผิวพรรณให้ขาวกระจ่างใส เป็นค่านิยมที่มีมาตั้งแต่สมัยโบราณจนถึงปัจจุบันโดยเฉพาะชาวเอเชีย เนื่องจากมีความเชื่อว่าการมีผิวขาวทำให้ดูสวยและอ่อนเยาว์กว่าคนผิวสี ทำให้มีความต้องการผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ผิวขาวกระจ่างใส (skin-whitening product) ในตลาดมากขึ้น ส่งผลให้ผู้วิจัยพยายามศึกษาวิจัยเพื่อหาสารจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติทำให้ผิวขาวเพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งมีรายงานอาการข้างเคียงต่างๆ และข้อควรระวังในการใช้ในระยะเวลา เช่น สารไฮโดรควิโนน กรดแอลฟาไฮดรอกซี (Sheth, 2011)

ยางนา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dipterocarpus alatus* Roxb. ในวงศ์ Dipterocarpaceae เป็นพืชมีขนาดใหญ่ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปเอเชีย ในประเทศไทย ต้นยางนา เป็นไม้เอนกประสงค์ แทบทุกส่วนมีประโยชน์ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม อาทิ เป็นแหล่งอาหารป่า แหล่งนันทนาการ สมุนไพร และเนื้อไม้สำหรับใช้สอยทั่วไป ตำรายาไทยนำเปลือกมาต้มเป็นยาบำรุงร่างกาย ฟอกเลือด บำรุงโลหิต แก้ตับอักเสบ น้ำมันยางใช้ผสมกับเมล็ดกัญชายนำมาคั่วให้เกรียม บดให้ละเอียดใช้เป็นยาอุดฟันแก้ฟันผุ (ฐานข้อมูลสมุนไพร, 2559) อย่างไรก็ตามข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์เวชสำอางจากพืชยางนายังมีน้อยและค่อนข้างจำกัด แต่มีรายงานว่าสารสกัดเอทานอลจากส่วนดอก ใบ เปลือก เนื้อไม้ และรากยางนา มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและอาจใช้ป้องกันโรคต่างๆ ได้ และมีสารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดยางนา (นิภาพร และคณะ, 2558) เช่น สาร Resveratrol ซึ่งพบว่าเป็นสารหลักที่พบในพืชตระกูลยางนา และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญสำหรับต้านโรคเอดส์, เป็นพืชต่อเซลล์บางชนิด, ต้านการอักเสบ, ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Aslam, Ahmad & Mamat, 2015) มีการรายงานว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งมีบทบาทสำคัญใน

กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanogenesis) (Newton et al., 2007) ซึ่งจากการศึกษาที่ก่อนหน้านี้ ได้รายงานฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ที่พบได้ในสารสกัดสมุนไพรหลายชนิด และมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ด้วย (No et al., 1999) เช่น สารสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง (กล่าวขวัญ และคณะ, 2553) สารสกัดเอทิลอะซิเตตจากผลมะขามป้อม (จันทิมา และคณะ, 2554) เป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์เวชสำอางของสารสกัดจากส่วนเปลือกของต้นยางนา ประกอบด้วย ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อพิสูจน์ให้ทราบถึงศักยภาพและฤทธิ์เวชสำอาง สำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงสุขภาพและเพิ่มมูลค่าในเชิงพาณิชย์ให้กับส่วนเปลือกของต้นยางนา ซึ่งจะเป็นทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางสารสกัดธรรมชาติสำหรับบำรุงผิวให้ขาวกระจ่างใส ที่มีความปลอดภัยสำหรับการใช้ในระยะเวลา

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีและพืช

Methanol AR grade, butanol, potassium chloride (KCl), sodium lauryl sulfate (SLS), sodium carbonate (Na_2CO_3), iron (II) sulfate ($FeSO_4$), aluminum chloride ($AlCl_3$), acetic acid (CH_3COOH), dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Ajax Finechem Pty Ltd., AUS), ascorbic acid, gallic acid, quercetin, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), butylated hydroxytoluene (BHT), thiobarbituric acid (TBA), folin reagent, tyrosinase from

mushroom, L-tyrosine, (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA).

เปลือกต้นยางนา (*Dipterocarpus alatus* Roxb.) เก็บในบริเวณพื้นที่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น และจำแนกชนิดของพืช โดย ผศ.ดร. ภญ. เฟลีนทิพย์ ภูทองกิ่ง เมื่อเดือนมิถุนายน 2559 (อ้างอิง Voucher specimen KKU No. 14458 ซึ่งเก็บไว้ที่ Herbarium of Khon Kaen University)

2. การเตรียมสารสกัด

วัตถุดิบ (เปลือกยางนา) นำไปทำความสะอาดด้วยน้ำและแช่ใน 70%เอทานอล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมงจนตัวอย่างแห้งสนิท บดเป็นผงละเอียด นำไปสกัดด้วยเทคนิคการแช่อยู่ (maceration) ในตัวทำละลาย 95% เอทานอล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกสารละลายใส โดยการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที (Kubota® , Japan) นำส่วนผงเปลือกยางนาที่เหลือไปสกัดซ้ำ จนครบทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นรวมของเหลวที่ได้จากการสกัดและนำไประเหยแห้งตัวทำละลายออกด้วยวิธีการระเหย (rotary evaporation) (BÜCHI Rotavapor® R-3, Flawil, Switzerland) และทำให้แห้งเป็นผงด้วยเครื่อง freeze dryer (Scanvac CoolSafe™, Lynge, Denmark) จนได้ สารสกัดหยาบ คำนวณปริมาณร้อยละผลผลิตสกัดหยาบที่สกัดได้ (%yield)

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การหาปริมาณสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิก ดัดแปลงจาก Chaiittianan et al., (2016) ทำการทดสอบโดยละลายสารสกัดเปลือกยางนาในน้ำปราศจากไอออนความเข้มข้น 62.5-1000 µg/mL ปริมาตร 50 µL เติมสารละลาย 20% sodium carbonate ปริมาตร 125 µL และ 50% folin reagent ปริมาตร 25 µL จากนั้นผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm โดยใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-100 µg/mL) จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน ความสัมพันธ์เชิงเส้น ($y = ax$) ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงไปกับปริมาณสารมาตรฐาน gallic acid สำหรับเทียบหาปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่าง และรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลกับกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg gallic acid equivalence (GAE)/g extract)

4. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์

การหาปริมาณสารสำคัญในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ดัดแปลงจาก Chaiittianan et al. (2016) โดยผสมสารละลายสารสกัดเปลือกยางนาในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 250 µg/mL ปริมาตร 100 µL กับสารละลาย 5% Aluminum chloride ปริมาตร 200 µL จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 437 nm โดยใช้สารเคอร์ซีติน (quercetin) เป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-100 µg/mL) จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์เชิงเส้น ($y = ax$) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณสารมาตรฐาน quercetin สำหรับเทียบหาปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในตัวอย่าง และรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลกับสารเคอร์ซีตินต่อกรัมสารสกัด (mg quercetin equivalence (QE)/g extract)

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดัดแปลงจาก Chaiittianan et al. (2016) โดยศึกษาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน วิตามิน ซี (ascorbic acid; vitamin C) เริ่มจากการเตรียมละลายสารมาตรฐาน และสารละลายสกัดเปลือกยางนาในตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ปิเปตสารละลายแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 150 µL เพื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ปริมาตร 50 µL ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (% inhibition) ดังสมการที่ 1 นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น ระหว่างร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) และความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง เพื่อประมาณการค่าความเข้มข้นที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) และปริมาณสมมูลกับสารมาตรฐาน วิตามินซีต่อกรัมสารสกัด (mg Vit C eq/g extract) สมการที่ 1 แสดงร้อยละการยับยั้ง

$$\% \text{ inhibition} = [(A[0]-A[t])/A[0]] \times 100 \quad (1)$$

โดยที่ A[0] คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 0 µg/mL, A[t] คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆ

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TBARS

การทดสอบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดในชั้นไขมัน ซึ่งทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) ดัดแปลงจาก Fauconneau et al. (1997) โดยเตรียมสารละลายสารสกัดเปลือกยางนาในตัวทำละลายเมทานอล ความเข้มข้น 250 µg/mL จากนั้นปิเปต ปริมาตร 90 µL ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายไข่แดง ความเข้มข้น 30% w/v ใน Potassium chloride (KCl) 1.5% v/v ปริมาตร 90 µL และ 1 M Iron (II) sulfate (FeSO₄) ปริมาตร 60 µL ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 20% v/v ปริมาตร 300 µL ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้นเติมสารละลาย thiobarbituric acid (TBA) ความเข้มข้น 0.8% w/v ในสารละลาย Sodium lauryl sulfate (SLS) 1.1% w/v ปริมาตร 300 µL ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมนิวทอนอลและแยกส่วนใสนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm โดยมีสาร Butylated hydroxytoluene (BHT) เป็นสารมาตรฐาน (0.625-10 µg/mL) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นของสารมาตรฐานที่พล็อตระหว่างร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) (ดังสมการที่ 2) และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน เพื่อให้ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้น นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเปลือกยางนาแทนค่าในสมการเชิงเส้น และคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชั้นไขมัน โดยรายงานผลเป็นค่า IC₅₀ และปริมาณสมมูลกับ BHT ต่อกรัมสารสกัด (mg BHT eq /g extract)

สมการที่ 2 แสดงการคำนวณร้อยละการยับยั้ง

$$\% \text{ inhibition} = [(A[0]-A[t])/A[0]] \times 100 \quad (2)$$

โดยที่ A[0] คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 0 µg/mL, A[t] คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆ

6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ทดสอบด้วยวิธี dopachrome method โดยดัดแปลงมาจากการศึกษาของ Momtaz et al. (2008) ใน 96 well plate model โดยใช้สารแอล-ไทโรซีน (L-tyrosine) เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์เป็นสารประกอบโดปาควิโนน (dopaquinone) และถูกเปลี่ยนเป็นโดปาโครม (dopachrome) ซึ่งมีสีม่วงแดง โดยใช้สารกรดโคจิก (kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-25 µg/mL) ทำการทดลองโดยเติมสารละลาย

เอนไซม์ไทโรซิเนส ปริมาตร 50 µL ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ผสมระหว่าง dipotassium hydrogen phosphate และ disodium hydrogen phosphate pH 6.5) ปริมาตร 50 µL จากนั้นเติมสารละลายสารสกัดเปลือกยางนาที่ความเข้มข้น 0-50 µg/mL ปริมาตร 50 µL แล้วเติมสารละลาย L-tyrosine ปริมาตร 50 µL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 479 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (Varioskan Flash microplate reader, Canada, USA) คำนวณร้อยละการยับยั้ง (%Inhibition) ดังสมการที่ 3 และนำมาพล็อตกราฟระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายสารสกัดเปลือกยางนา เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่า IC₅₀ สมการที่ 3 แสดงร้อยละการยับยั้ง

$$\% \text{ inhibition} = [(A[0]-A[t])/A[0]] \times 100 \quad (3)$$

โดยที่ A[0] คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้น 0 µg/mL, A[t] คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นต่างๆ

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ในแต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยและค่าความแปรปรวนของข้อมูล (mean ± SD) และเปรียบเทียบกับความแตกต่างของข้อมูลแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติ One-Way ANOVA และ LSD test (SPSS 17.0) โดยมีช่วงความเชื่อมั่นที่ 95% (p-value < 0.05)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การเตรียมสารสกัด

สารสกัดเปลือกยางนาที่สกัดด้วยวิธี maceration ด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลแดง ได้น้ำหนักสารสกัดเท่ากับ 65.84 กรัม คิดเป็น %yield เท่ากับ 5.49 ผลแสดงดังตารางที่ 1

2. การหาปริมาณโดยรวมของสารประกอบฟีนอลิกและประกอบฟลาโวนอยด์

ปริมาณโดยรวมสารประกอบฟีนอลิก (Total Phenolic content) ในสารสกัดเปลือกยางนา โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent ที่เทียบจากกราฟมาตรฐาน gallic acid ($y = 0.0052x$, $R^2 = 0.9875$) เท่ากับ 179.94 ± 0.45 mg GAE/g extract แสดงดังตารางที่ 2 และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid content) ของสารสกัดเปลือก

ยางนามีค่าเท่ากับ 2.64 ± 0.86 mg QE/g extract โดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน quercetin ($y = 0.0343$, $R^2 = 0.9757$)

จากการศึกษารายงานวิจัยพบว่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก (Kwak et al., 2007) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Korkina and Afanas'ev, 1997) และสารพฤกษเคมีต่างๆ มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยเฉพาะสารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืช (Pietta, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าสารฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกที่มีความสำคัญในการต้านการเกิดออกซิเดชัน และคุณสมบัติในการจับกับโลหะที่เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันนั้นลดหรือหยุดลง (Korkina and Afanas'ev, 1997) โดยจากการศึกษาหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดเปลือกยางนาพบว่ามีปริมาณสูง เนื่องจากโครงสร้างหลักของสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) และมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) อยู่ในโครงสร้าง ซึ่งสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระได้ จึงมีความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันหรืออนุมูลอิสระได้ (Husain et al., 1996) และเป็นสารที่มีขั้ว จึงละลายในตัวทำละลายน้ำและแอลกอฮอล์ได้ดี (Nakai et al., 2003) ซึ่งสอดคล้องกับสารสกัดเปลือกยางนาที่สกัดด้วยวิธี maceration ด้วยตัวทำละลายเมทานอล

3. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ TBARS assay

สารอนุมูลอิสระเป็นสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล (reactive oxygen species, ROS) ที่เกิดขึ้นจาก mitochondria และ peroxisomes ในกระบวนการเผาผลาญหรือกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ และเกิดจากสภาวะกระตุ้นอื่น เช่น การอักเสบ (inflammation) รังสียูวี (UV) และสารเคมี (chemicals) เป็นต้น (Denat et al., 2014) ส่งผลให้มีการผลิตเม็ดสีเมลานินของเซลล์เมลานโนไซต์ด้วย โดยเฉพาะผิวหนังที่เป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุด มีทั้งน้ำและไขมันเป็นส่วนประกอบ ที่กระตุ้นให้เกิด ROS โดยแสงแดด โดยความสามารถของสารสกัดเปลือกยางนาในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ในระบบ ลดลง 50% (IC_{50}) เท่ากับ 42.98 ± 0.62 $\mu\text{g/mL}$ โดยเทียบกับสารมาตรฐาน vitamin c (IC_{50}

$= 14.47 \pm 0.33$ $\mu\text{g/mL}$) จากกราฟมาตรฐาน $y = 3.4883x$, $R^2 = 0.9945$ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกยางนา เทียบเป็นปริมาณสมมูลกับ vitamin c เท่ากับ 0.043 ± 0.62 mg Vit C eq/g extract (ดังตารางที่ 2) และพบว่าสารสกัดเปลือกยางนามีความสามารถในยับยั้ง lipid peroxidation ซึ่งพบว่าการยับยั้ง lipid peroxidation ในระบบให้ได้อ้อยละ 50 ต้องใช้ความเข้มข้นสารสกัดเปลือกยางนามากกว่า 250 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50} > 250$ $\mu\text{g/mL}$) โดยหากเทียบกับสารมาตรฐาน BHT ($IC_{50} = 2.39 \pm 0.01$ $\mu\text{g/mL}$) จากกราฟมาตรฐาน $y = 75.997x + 24.30$, $R^2 = 0.9915$ ความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation เป็นปริมาณสมมูลกับ BHT เท่ากับ 6.84 ± 3.30 mg BHT eq/g extract (นั่นหมายถึงว่าหากต้องการให้เกิดการยับยั้ง lipid peroxidation ได้อ้อยละ 50 ในระบบ ต้องใช้สารสกัดเปลือกยางนาความเข้มข้นประมาณ 300 $\mu\text{g/mL}$ จึงจะมีประสิทธิผลได้เทียบเท่ากับ BHT 2.39 $\mu\text{g/mL}$) แสดงดังตารางที่ 2

การศึกษานี้ทำให้ทราบฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกยางนาในการต้านอนุมูลอิสระ ในระบบที่ละลายได้ดีในน้ำ (DPPH assay) และระบบที่ละลายได้ดีในไขมัน (TBARS assay) ที่มีความแตกต่างกัน พบว่าสารสกัดเปลือกยางนามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งในระบบที่ละลายในน้ำ และระบบที่ละลายในไขมัน แต่ประสิทธิผลดีในระบบที่ละลายได้ดีในน้ำ ซึ่งน่าจะสัมพันธ์กับชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่พบว่าเป็นสารหลักในสารสกัดเปลือกยางนา ดังแสดงด้วยค่า total phenolic content ที่สูงกว่าปริมาณสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์ (ตารางที่ 2) ซึ่งสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก มีสารกลุ่มที่มีขั้ว ที่มีโครงสร้างทางเคมีที่มีวงอะโรมาติกและมีหมู่ไฮดรอกซิลเกาะอยู่ในโมเลกุล ซึ่งสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ ทำให้ละลายในน้ำได้ดี และสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระด้วยกลไกการให้โปรตอนกับโมเลกุลของอนุมูลอิสระ โดยที่ไม่เสียเสถียรภาพของโครงสร้างโมเลกุลทุติยภูมิ (stabilized intermediate molecules) (Nakai et al., 2003) ซึ่งผลที่พบในการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้าเกี่ยวกับบทบาทสำคัญของกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (Kwak et al., 2007) และฟลาโวนอยด์ (Korkina and Afanas'ev, 1997) ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในพืชและสมุนไพร รวมถึงกรณีสารสกัดเปลือกยางนา

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารสกัดเปลือกยางนาสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี มีความสามารถในการยับยั้งมีแปรผันโดยตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารมาตรฐานกรดโคจิก (kojic acid) โดยความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 ของทั้งหมดในระบบการทดลอง (IC_{50}) คือ $36.69 \pm 1.85 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีฤทธิ์ต่ำกว่า kojic acid (IC_{50} $20.47 \pm 0.63 \mu\text{g/mL}$) เพียงเล็กน้อย (ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 1) ซึ่งน่าอธิบายได้ด้วยหลักฐานข้อมูลองค์ประกอบหลักสำคัญในพืชตระกูลเดียวกับยางนา พบว่ามีสารกลุ่ม resveratrol oligomers ในปริมาณมาก (Aslam et al., 2015) โดยเฉพาะสารที่มีรายงานฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและถูกใช้เป็นส่วนออกฤทธิ์ในเวชสำอาง เช่น สาร resveratrol ที่พบได้ในพืช *Veratrum album var. grandiflorum Maxim* พบในองุ่นมีฤทธิ์ลดปริมาณเม็ดสีเมลานินในเซลล์ผิวหนังของหนู (murine melanocyte) และอนุพันธ์ของสาร resveratrol ได้แก่ สาร Oxyresveratrol จากมอลเบอร์รี่ (Kim et al., 2002) โดยผ่านกลไกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (mushroom tyrosinase) (Yanagihara et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆ ของยางน่านำมาใช้ผลิตเวชสำอางมีความสามารถในด้านอนุมูลอิสระยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *P. acne* ที่

ทำให้เกิดสิว ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ทำให้เกิดฝ้าและกระ และไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (นิภาพร และคณะ, 2558) รวมทั้งพบฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ได้แก่ สาร Dipterocarpol [20(s)-dammar-24-en-3-one] สารกลุ่ม Dammarane-type triterpenoid สารนี้และอนุพันธ์มีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Scholz et al., 2004) สาร R-viniferin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและเชื้อรา สาร Dipterocarpol และอนุพันธ์มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (Akihisa et al., 2004) และสารสกัดจากใบยางนามีศักยภาพที่จะนำไปศึกษาผลต่อการป้องกันโรคฟันผุ (ปิยะวรรณ และคณะ, 2554) และส่วนน้ำมันจากต้นยางนา ซึ่งเป็นเรซิน (resin) ใช้เป็นสารช่วยในการเตรียมตำรับเครื่องสำอาง เช่น เพิ่มความเข้มของสี (color saturation) หรือเพิ่มความมันเงา (gloss enhancement) (Burger et al., 2011)

และจากฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ดีของสารสกัดเปลือกยางนาที่พบ แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารสกัดเปลือกยางนาเป็นสารเวชสำอางจากธรรมชาติทางเลือก โดยควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดของสารที่เป็นส่วนประกอบทางเคมีและอนุพันธ์ของสารสกัดเปลือกยางนา เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำควบคุมคุณภาพสารสกัด และการนำไปใช้ประโยชน์และการขยายผลในเชิงพาณิชย์ได้อย่างเป็นรูปธรรมต่อไป

ตารางที่ 1 น้ำหนักและร้อยละผลผลิตจากการสกัดเปลือกยางนา

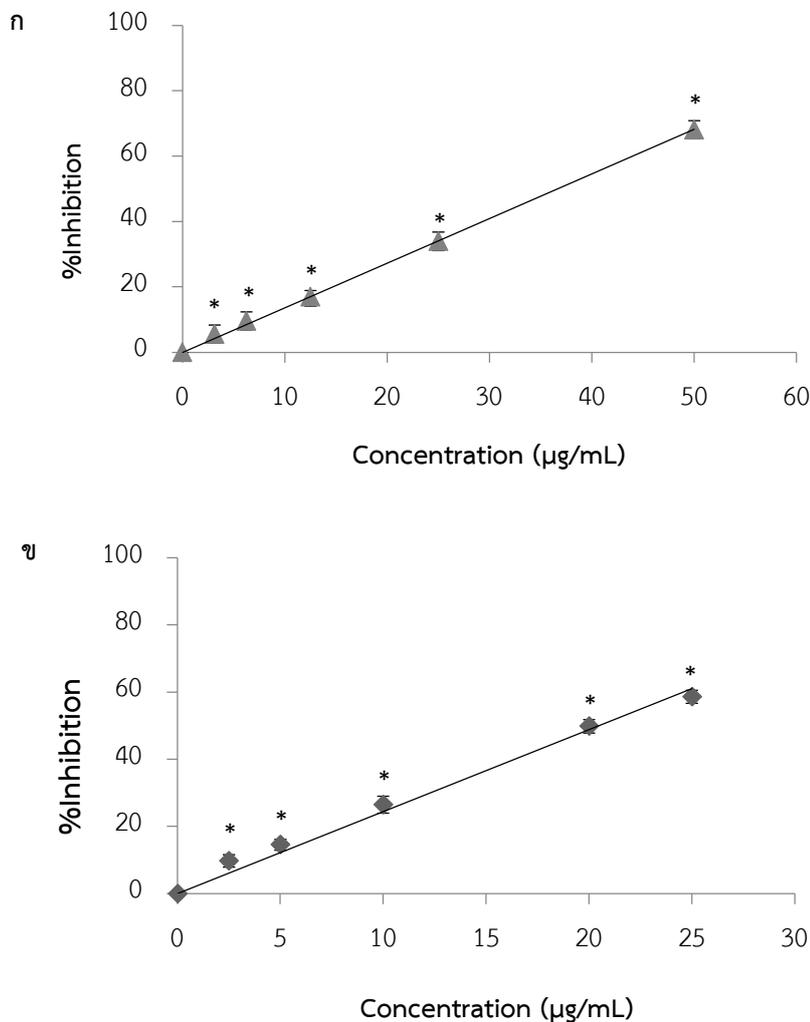
ชนิดสารสกัด	สารสกัดเปลือกยางนา*
น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	65.84
ร้อยละผลผลิตจากการสกัด (%yield)	5.49

*น้ำหนักแห้งของเปลือกยางนา 11.992 กรัม

ตารางที่ 2 ปริมาณสารสำคัญฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกยางนา

		สารสกัดเปลือกยางนา	สารมาตรฐาน
ปริมาณสารสำคัญ	ฟีนอลิก (mg GAE/g extract)	179.94 ± 0.45	gallic acid**
	ฟลาโวนอยด์ (mg QE /g extract)	2.64 ± 0.86	Quercetin ^{##}
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	DPPH assay (mg Vit C eq/g extract)	0.043 ± 0.62	
	DPPH assay (IC ₅₀ , µg/mL)	42.98 ± 0.62	vitamin c***
			14.47 ± 0.33
	TBARS assay (mg BHT eq/g extract)	6.84 ± 3.30	
	TBARS assay (IC ₅₀ , µg/mL)	> 250	BHT ^{####}
			2.39 ± 0.01
ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	IC ₅₀ (µg/mL)	36.69 ± 1.85	kojic acid
			20.47 ± 0.63

** $y = 0.0052x$ ($R^2 = 0.9875$), ^{##} $y = 0.0343x$ ($R^2 = 0.9757$), *** $y = 3.4883x$ ($R^2 = 0.9945$), ^{####} $y = 75.997x + 24.3$ ($R^2 = 0.9915$)



รูปที่ 1 กราฟแสดงผลร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกยางนา (IC₅₀ 36.69 ± 1.85 µg/mL) (ก) และสารมาตรฐาน kojic acid (IC₅₀ 20.47 ± 0.63 µg/mL) (ข) แสดงค่าเป็น mean ± SD (n=3) และ * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากเปลือกยางนาแสดงศักยภาพและฤทธิ์เวชสำอางที่น่าสนใจ โดยเป็นสารสกัดธรรมชาติที่เป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลิก และมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ดังนั้นสารสกัดเปลือกยางนาจึงเป็นพืชท้องถิ่นที่มีคุณค่า และควรจะได้รับ การอนุรักษ์และพัฒนาด้วยการศึกษาวิจัย เพื่อสนับสนุนการนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารเวชสำอางทางเลือกและเพิ่มมูลค่าและคุณค่าในเชิงพาณิชย์ ให้กับทรัพยากรท้องถิ่น อีกทั้งการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ โดยคาดว่าจะช่วยลดปัญหาเรื่องอาการข้างเคียงจากการใช้ผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่มีสารเคมีสังเคราะห์เป็นส่วนประกอบ ลดการนำเข้าสารเคมีกลุ่มสารออกฤทธิ์เวชสำอางจากต่างประเทศ และเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ที่ครอบคลุมมากกว่าการทำให้ผิวขาวได้

เอกสารอ้างอิง

กล่าวขวัญ ศรีสุข ปรีดาพรรณ สาลี เยาวลักษณ์ เจริญสุข และเอกรัฐศรีสุข. (2553). ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนสกัดจากเหง้าของว่านสาวหลง. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 2(ฉบับพิเศษ): 143-150.

จันทิมา ทอมกลบ สุพนิดา วินิจฉัย หทัยรัตน์ ริมศิริ นคร เหลืองประเสริฐ และวิชัย หฤทัยธนาสันต์. (2554). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากผลมะขามป้อมจากแหล่งในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48, 3-5 กุมภาพันธ์ 2554, กรุงเทพมหานคร.

ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. (2559). ยางนา, แหล่งข้อมูล <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=274>. ค้นเมื่อวันที่ 1 เมษายน 2560.

นิภาพร นาโสก นาถธิดา วีระปรียากร และสมพร เกษแก้ว. (2558). การศึกษาคุณสมบัติของยางนาเพื่อการประยุกต์ใช้ทางเวชสำอาง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

ปิยะวรรณ เอมอัมมอานันต์ ปิยะมาศ เอมอัมมอานันต์ และสุวิมล ทวีชัยคุภพงษ์. (2554). ผลของสารสกัดผักคราดหัวแหวนและใบยางนาต่อการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* (Inhibitory effect of

Acamella oleracea and *Dipterocarpus alatus* Roxb. Extracts to *Streptococcus mutans*). กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

- Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Suzuki, T., Enjo, F., Koike, K., Nikaido, T., Nishino, H. (2004). 3-Epicabraleahydroxylactone and Other Triterpenoids from Camellia Oil and Their Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(1): 153-156.
- Aslam, M., Ahmad, M. S., and Mamat, A. (2015). A Phytochemical, Ethnomedicinal and Pharmacological review of genus *Dipterocarpus*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7(4): 27-38.
- Burger, P., Charrié-Duhaut, A., Connan, J., and Albrecht, P. (2011). Taxonomic characterisation of fresh Dipterocarpaceae resins by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS): Providing clues for identification of unknown archaeological resins. *Archaeological and Anthropological Sciences* 3(2): 185-200.
- Chaiittianan, R., Chayopas, P., Rattanathongkom, A., Tippayawat, P., and Sutthanut, K. (2016). Anti-obesity potential of corn silks: Relationships of phytochemicals and antioxidation, anti-pre-adipocyte proliferation, anti-adipogenesis, and lipolysis induction. *Journal of Functional Foods* 23: 497-510.
- Denat, L., Kadekaro, A. L., Marrot, L., Leachman, S. A., and Abdel-Malek, Z. A. (2014). Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress. *Journal of Investigative Dermatology* 134(6): 1512-1518.
- Fauconneau, B., Waffo-Tegu, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., and Merillon, J.-M. (1997). Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. *Life Sciences* 61(21): 2103-2110.
- Kim, Y. M., Yun, J., Lee, C. K., Lee, H., Min, K. R., and Kim, Y. (2002). Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry* 277(18): 16340-16344.
- Korkina, L. G., and Afanas'ev, I. B. (1997). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Advances in pharmacology* 38: 151-163.
- Kwak, C. S., Lee, M. S., and Park, S. C. (2007). Higher antioxidant properties of Chungkookjang, a fermented soybean

- paste, may be due to increased aglycone and malonylglycoside isoflavone during fermentation. *Nutrition Research* 27(11): 719-727.
- Momtaz, S., Mapunya, B. M., Houghton, P. J., Edgerly, C., Hussein, A., Naidoo, S., and Lall, N. (2008). Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *Journal of Ethnopharmacology* 119(3): 507-512.
- Nakai, M., Harada, M., Nakahara, K., Akimoto, K., Shibata, H., Miki, W., and Kiso, Y. (2003). Novel antioxidative metabolites in rat liver with ingested sesamin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(6): 1666-1670.
- Newton, R. A., Cook, A. L., Roberts, D. W., Leonard, J. H., and Sturm, R. A. (2007). Post-transcriptional regulation of melanin biosynthetic enzymes by cAMP and resveratrol in human melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 127(9): 2216-2227.
- No, J. K., Soung, D. Y., Kim, Y. J., Shim, K. H., Jun, Y. S., Rhee, S. H., Yokozawa, T., and Chung, H. Y. (1999). Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sciences* 65(21): PL241-PL246.
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* 63(7): 1035-1042.
- Rafat Husain, S., Cillard, J., and Cillard, P. (1987). Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26(9): 2489-2491.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20(7): 933-956.
- Scholz, D., Baumann, K., Grassberger, M., Wolff-Winiski, B., Rihs, G., Walter, H., and Meingassner, J. G. (2004). Synthesis of dammarane-type triterpenoids with anti-inflammatory activity *in vivo*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14(11): 2983-2986.
- Sheth, V. M., and Pandya, A. G. (2011). Melasma: A comprehensive update Part II. *Journal of the American Academy of Dermatology* 65(4): 699-714.
- Yanagihara, M., Yoshimatsu, M., Inoue, A., Kanno, T., Tatefuji, T., and Hashimoto, K. (2012). Inhibitory effect of gnetin C, a resveratrol dimer from melinjo (*Gnetum gnemon*), on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 35(6): 993-996.

