

บทความวิจัย

การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ จากผงขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.)

พัชรี ขุนหลัด* ยงยุทธ ตัณฑุลเวสส ธารรัตน์ สุภศิริ และ วราดูล นัทรทอง

บทคัดย่อ

สารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ เป็นสารที่สกัดได้จากผงของเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ซึ่งเป็นสารประกอบจำพวกไดเฟอรูโลอีลมีเทน ประกอบด้วยสารฟีนอลิก 3 ชนิด คือ เคอร์คิวมิน ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน และบีสดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน ผลการวิจัยพบว่า เคอร์คิวมินมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด รองลงมา คือ ดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.0 และ 35.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนบีสดีเมทอกซีเคอร์คิวมินมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่อ่อนมาก

คำสำคัญ: ขมิ้นชัน เคอร์คิวมินอยด์ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

Tyrosinase Inhibitory Activity of Curcuminoids from Powder of Turmeric (*Curcuma longa* Linn.)

Patcharee Khunlad*, Yongyuth Tundulawessa, Thararat Supasiri
and Waradoon Chutrtong

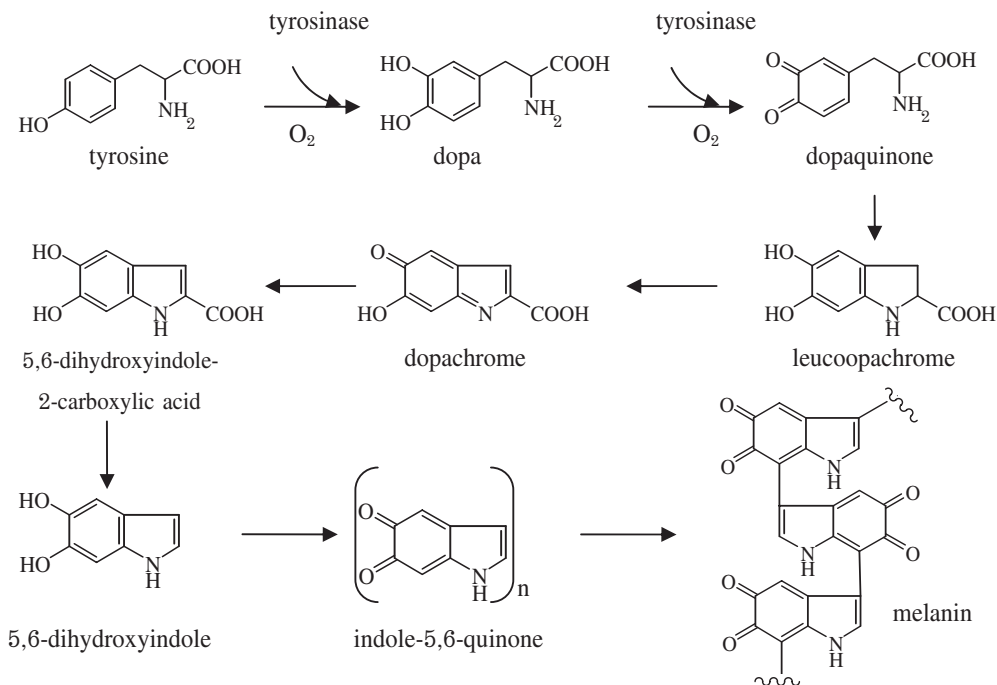
ABSTRACT

The curcuminoids, diferuloylmethane compounds which were extracted from powder of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) composed of three phenolic compounds: Curcumin, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin. Curcumin and Demethoxycurcumin displayed tyrosinase inhibitory activity at IC₅₀ 22.0 and 35.05 µg/mL, respectively. The Bisdemethoxycurcumin was less effective inhibitory in tyrosinase activity.

Keywords: *Curcuma longa* Linn., curcuminoids, tyrosinase inhibitors

บทนำ

เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ ซึ่งพบได้ทั้งในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก พืช และสัตว์ ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดเอนไซม์ไทโรซิเนสจะมีบทบาทแตกต่างกันออกไป โดยเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยา hydroxylation ของสารประกอบไทโรซีนไปเป็น o-diphenols และปฏิกิริยา oxidation ของ o-diphenols ไปเป็น o-quinones เป็นขบวนการปกติในการสังเคราะห์สารประกอบเมลานิน (melanin) ที่เป็นรงควัตถุในรูปสีน้ำตาลหรือสีดำในสิ่งมีชีวิต [1] ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 การสังเคราะห์เมลานิน [2]

สำหรับในมนุษย์เอนไซม์ไทโรซิเนสจะทำหน้าที่ในการสร้างเมลานิน ซึ่งจะพบมากที่บริเวณผิวหนัง ทำหน้าที่ในการปกป้องร่างกายจากสิ่งแวดล้อม การมีเมลานินมาสะสมที่ผิวหนังมากจะทำให้ผิวหนังส่วนนั้นมีสีคล้ำ เรียกว่า hyperpigmentation [3] ในกิ้ง ปู และแมลงต่างๆ เอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ในกระบวนการสร้างเปลือกแข็งหลังมีการลอกคราบ ทำให้กระดองของสัตว์เหล่านี้มีสีคล้ำ [4] ส่วนในผักและผลไม้หลายชนิด เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นตัวการที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล ทำให้อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ที่ผ่านกระบวนการแปรรูปขึ้นต่ำสั้นลง [3]

ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงเป็นการป้องกันการสังเคราะห์เมลานินได้ทั้งในผัก ผลไม้ สัตว์และในมนุษย์ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรค รวมทั้งการทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อผิวขาวได้

ปัจจุบันสารสังเคราะห์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ขจัดสีผิวมีหลายประเภท แต่สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส หรือยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินจะนิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ขจัดฝ้าและทำให้ผิวขาว (whitening agent) เนื่องจากขจัดสีผิวได้ดีกว่าชนิดอื่น รวมทั้งใช้ได้ผลดีในเวลาที่ยาวนานกว่า โดยสารที่นิยมนำมาใช้ใน

ผลิตภัณฑ์ขจัดฝ้าและทำให้ผิวขาว ได้แก่ กรดโคจิก (kojic acid) กรดอะเซเลอิก (azelaic acid) อาร์บูติน (arbutin) วิตามินซีและอนุพันธ์ สารสกัดจากปอสา (paper mulberry) และกลาบรีดิน (glabridin) ซึ่งเป็นสารสกัดจากรากชะเอม (licorice extract) [5]

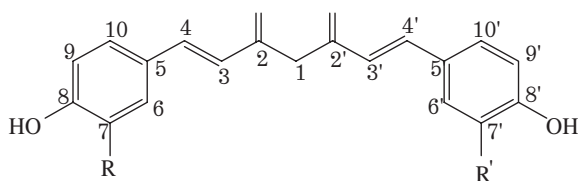
การศึกษาวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการศึกษาโครงสร้างของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์และการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลและสารบริสุทธิ์แต่ละชนิดซึ่งยังไม่ปรากฏรายงานชัดเจน

เคอร์คิวมินอยด์ เป็นสารที่สกัดได้จากผงของเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เป็นสารจำพวก Diferuloylmethane ซึ่งมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองเข้มสะสมอยู่ในเซลล์พาราเรโนโคมาของชั้นคอร์เท็กซ์ในเหง้า เป็นสารที่มีกลิ่นและคุณสมบัติเฉพาะตัว ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ ประกอบด้วยสารฟีนอลิก 3 ชนิด [6-8] (รูปที่ 2) ได้แก่

1. Curcumin มีชื่อเรียกตามโครงสร้างเคมีว่า 1,6-Heptadiene-3,5-dione,1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{21}H_{20}O_6$ มีน้ำหนักโมเลกุล 368.39 เป็นผลึกขนาดเล็กสีส้มปนน้ำตาล มีจุดหลอมเหลวประมาณ 183 องศาเซลเซียส

2. Demethoxycurcumin มีชื่อเรียกตามโครงสร้างเคมีว่า 1,6-Heptadiene-3,5-dione,1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{20}H_{18}O_5$ ผลึกมีสีเหลือง มีจุดหลอมเหลวประมาณ 168 องศาเซลเซียส

3. Bisdemethoxycurcumin มีชื่อเรียกตามโครงสร้างเคมีว่า 1,6-Heptadiene-3,5-dione, 1,7-bis(4-hydroxyphenyl) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{19}H_{16}O_4$ ผลึกมีสีเหลืองเข้ม มีจุดหลอมเหลวประมาณ 224 องศาเซลเซียส



	R	R'
Curcumin	OCH ₃	OCH ₃
Demethoxycurcumin	H	OCH ₃
Bisdemethoxycurcumin	H	H

รูปที่ 2 โครงสร้างของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์

มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของขมิ้นชันทั้งในและต่างประเทศมากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) [9, 10] ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (antipeptic ulcer) [11] ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (anti-bacterial) [12, 13] ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (anti-fungal) [13, 14] ฤทธิ์ต้านการเกิดเนื้องอกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-tumor and antioxidant activity) [15] ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer) [16] นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากเหง้าขมิ้นชันไม่มีฤทธิ์ก่อให้เกิดการ

กลายพันธุ์ แต่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (anti-mutagenic) [17] และจากการทดสอบความเป็นพิษ (toxicity) [18] พบว่าผงขมิ้นในขนาด 2.5 และ 5.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน ทำให้อัตราการเจริญเติบโตและการกินอาหารของหนูเพศผู้ลดลงเล็กน้อยแต่ไม่มีผลต่อหนูเพศเมีย รวมทั้งไม่พบความผิดปกติของค่าทางโลหิตวิทยาหรือชีวเคมี และไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพต่ออวัยวะภายในของหนูทั้ง 2 เพศ

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ ซึ่งเป็นสารสกัดจากเหง้าขมิ้นชันจะใช้วิธี Dopachrome method โดยใช้สารละลาย L-DOPA เป็นสารตั้งต้น สารนี้จะถูกออกซิไดส์เป็น Dopachrome intermediate โดยการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งสารดังกล่าวจะดูดกลืนแสงในช่วงที่มองเห็น (Visible light, 400-700 nm)

สารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากเหง้าขมิ้นชัน มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งจะทำให้ Dopachrome intermediate ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์มีคุณสมบัติในการถูกออกซิไดส์ได้เร็วกว่า ทำให้สาร Dopachrome ลดต่ำลง โดยในการทดลองนี้จะวัดค่าการดูดกลืนแสงของ Dopachrome ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader [2]

วิธีการทดลอง

การสกัดสารบริสุทธิ์จากผงขมิ้น

นำผงของเหง้าขมิ้นชันที่สุ่มซื้อจากร้านจำหน่ายสมุนไพร (เมษายน 2550) 1 กิโลกรัม แขนในตัวทำละลายเฮกเซน (commercial grade) 1.5 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน นำสารละลายที่ได้มากรองกากที่เหลือนำไปแช่ในเฮกเซนอีก 2 ครั้ง กรองสารละลายชั้นเฮกเซนออก นำกากที่เหลือจากการแช่ด้วยเฮกเซนมาแช่ด้วยตัวทำละลายเมทานอล (commercial grade) 3 ครั้ง เช่นเดียวกับการสกัดด้วยเฮกเซน ระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่อง rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114) ได้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล แบ่งสารสกัดหยาบ 1 กรัม มาแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบางที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล (silica gel 60 GF₂₅₄, Batch No. 1298230, Merck, Germany) โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทน-เมทานอลอัตราส่วน 95: 5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ชุดแถบสารแต่ละแถบที่ดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตในช่วงความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร ละลายสารที่เคลือบอยู่บนตัวดูดซับซิลิกาเจลด้วยเอทิลอะซิเตต (analytical grade, Merck, Germany) กรองซิลิกาเจลออก แล้วนำสารละลายที่กรองได้ไประเหยแห้ง และนำไปตกผลึกซ้ำด้วยเมทานอล (analytical grade, Merck, Germany) จะได้สารบริสุทธิ์ นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาหาจุดหลอมเหลวด้วยเครื่องหาจุดหลอมเหลว (Griffin, UK) และนำไปทำการวิเคราะห์โดยวิธีทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) ได้แก่ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (Bruker Avance 300, Switzerland)

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การเตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบ

ซังสารสกัดหยาบ สารสกัดบริสุทธิ์ และกรดโคจิก (Acros Organics, Belgium) 1 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล (Analytical grade, Merck, Germany) 5 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางจนได้สารทดสอบ (test sample) ที่มีความเข้มข้น 150, 100, 70, 50, 30, 10, 5 และ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

สารละลายที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย

สารละลาย sodium phosphate buffer (pH 6.8) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (Sigma Chemical Co Ltd., Germany) ความเข้มข้น 50 หน่วย/มิลลิลิตร

สารละลาย L-DOPA (Acros Organics, Belgium) ความเข้มข้น 0.85 มิลลิโมลาร์

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของกรดโคจิกและสารสกัด

เติมสารละลายที่ใช้ทดสอบลงในหลุมของ Microtiter plate โดยแบ่งชุดทดสอบเป็น 4 ชุด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชุดทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ชุดทดสอบ	20 mM phosphate buffer pH 6.8	tyrosinase solution (50 units/mL)	test sample	methanol
ชุด a (control)	120 μ L	40 μ L	-	20 μ L
ชุด b (blank of control)	160 μ L	-	-	20 μ L
ชุด c (test sample)	120 μ L	40 μ L	20 μ L	-
ชุด d (blank of test sample)	160 μ L	-	20 μ L	-

ผสมสารในแต่ละหลุมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA ความเข้มข้น 0.85 มิลลิโมลาร์ จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมทิ้งไว้ 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร [2] ด้วยเครื่อง Microplate Reader (Multiskan EX, Finland)

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

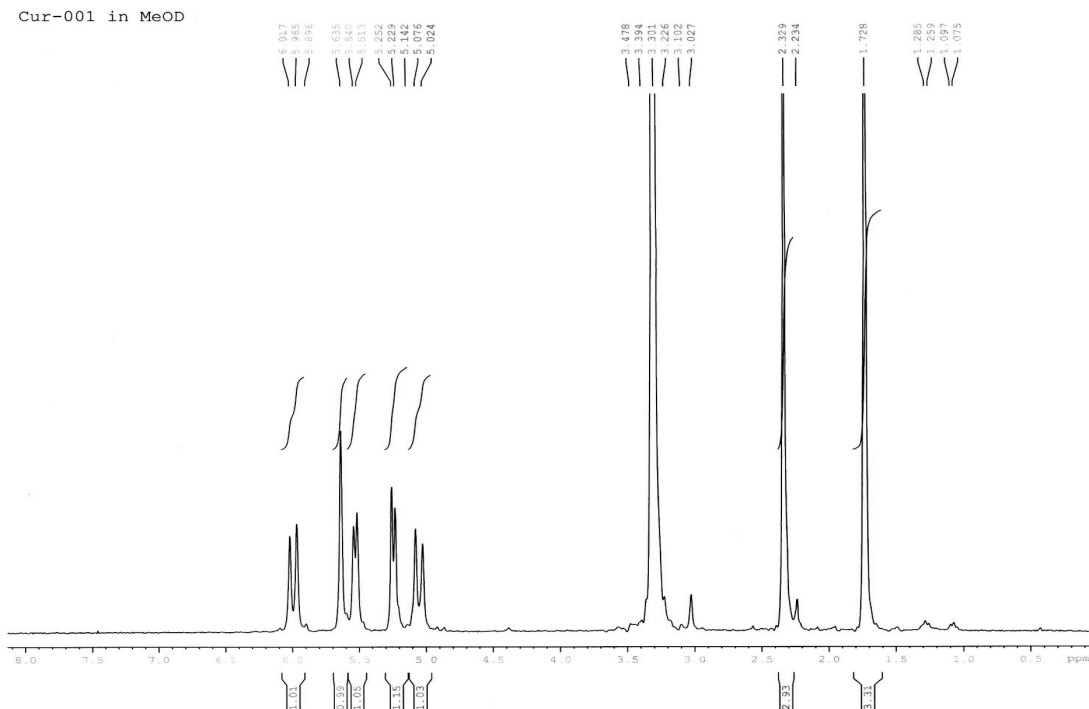
D คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารทดสอบแต่ไม่มีเอนไซม์

หาค่า IC₅₀ ของสารทดสอบต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกับความเข้มข้นต่างๆ ของสารทดสอบที่เวลา 20 นาที

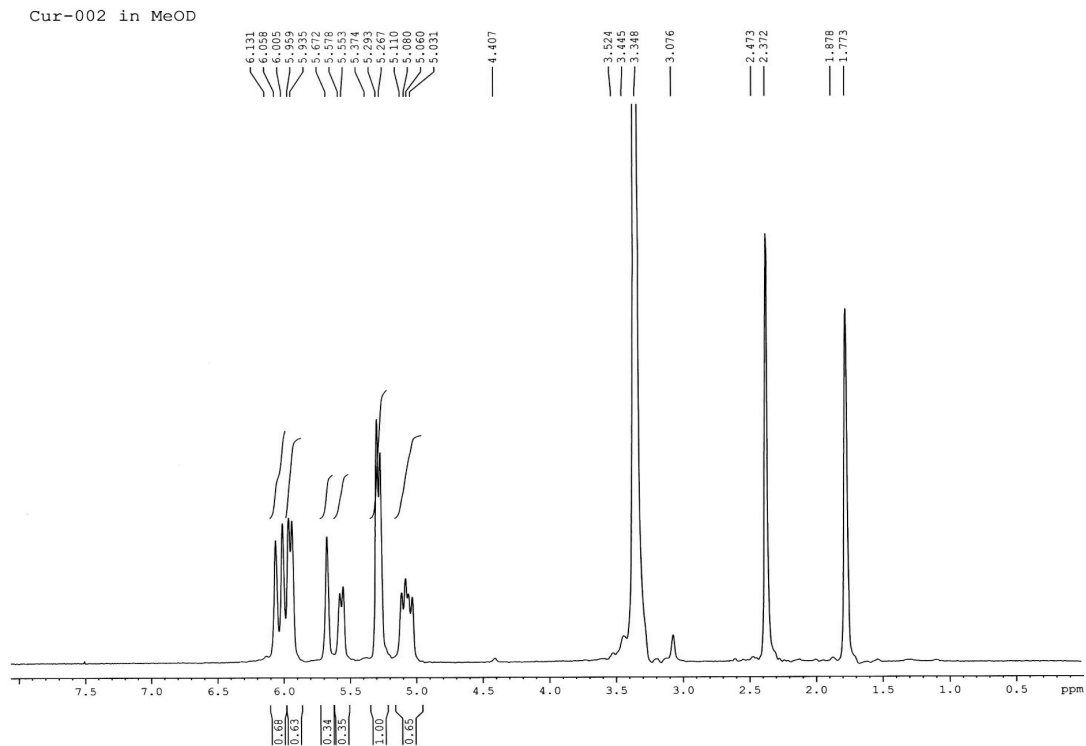
ผลการทดลอง

ผลการสกัดสารบริสุทธิ์จากผงขมิ้น

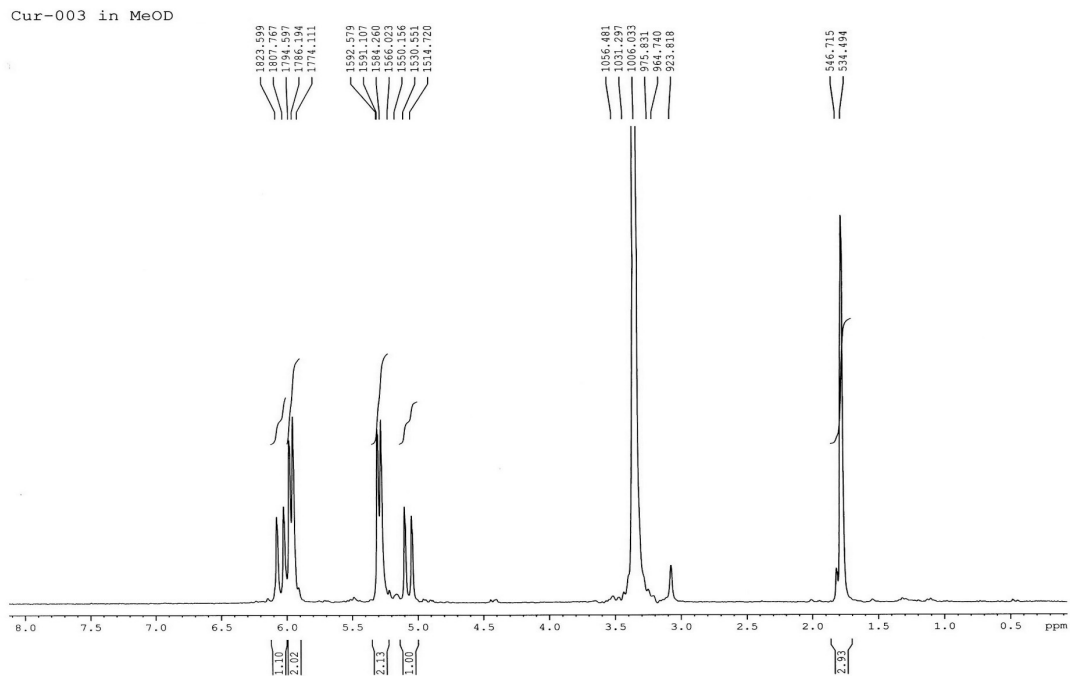
ผลการสกัดผงขมิ้นชั้นด้วยเมทานอลได้สารสกัดหยาบหนัก 49.95 กรัม และเมื่อนำสารสกัดหยาบ 1 กรัม มาสกัดแยกสารบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบางและตกผลึกซ้ำด้วยเมทานอลได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือ สารบริสุทธิ์ 1 (Curcumin) เป็นผลึกรูปเข็มสีส้มปนน้ำตาล มีจุดหลอมเหลว 182-183 องศาเซลเซียส หนัก 335.8 มิลลิกรัม ($R_f = 0.57$, ไคคลอโรมีเทน: เมทานอล; 95: 5) สารบริสุทธิ์ 2 (Demethoxycurcumin) เป็นผลึกสีเหลือง มีจุดหลอมเหลว 167-169 องศาเซลเซียส หนัก 98.6 มิลลิกรัม ($R_f = 0.33$, ไคคลอโรมีเทน: เมทานอล; 95: 5) สารบริสุทธิ์ 3 (Bisdemethoxycurcumin) เป็นผลึกมีสีเหลืองเข้ม มีจุดหลอมเหลว 224-226 องศาเซลเซียส หนัก 100.5 มิลลิกรัม ($R_f = 0.25$, ไคคลอโรมีเทน: เมทานอล; 95: 5) ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) ของสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด ปรากฏ $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ดังรูปที่ 3, 4 และ 5



รูปที่ 3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารบริสุทธิ์ 1



รูปที่ 4 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารบริสุทธิ์ที่ 2



รูปที่ 5 $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CD_3OD , 300 MHz) ของสารบริสุทธิ์ที่ 3

ตารางที่ 2 ข้อมูล ^{13}C -NMR และ ^1H -NMR ของสารบริสุทธิ์ 1 และ Curcumin [19]

C-position	^{13}C -NMR (ppm)		^1H -NMR (ppm)	
	สารบริสุทธิ์ 1 ^a	Curcumin ^b [19]	สารบริสุทธิ์ 1 ^a	Curcumin ^b [19]
1	46.09	100.9	1.73 (s, 2H)	5.98 (s, 1H)
2, 2'	181.88	183.2	-	16.41 (d, 1H)
3, 3'	119.37	121.1	5.05 (d, $J=15.6$ Hz, 2H)	6.71 (d, $J=16$ Hz, 2H)
4, 4'	139.23	140.7	5.99 (d, $J=15.6$ Hz, 2H)	7.60 (d, $J=16$ Hz, 2H)
5, 5'	125.69	126.4	-	-
6, 6'	108.86	111.4	5.63 (s, 2H)	7.33 (d, $J=1.8$ Hz, 2H)
7, 7'	146.53	148.0	-	-
8, 8'-OH	147.58	149.4	-	8.2 (s, 2H)
9, 9'	113.68	115.7	5.24 (d, $J=7.5$ Hz, 2H)	6.89 (d, $J=8$ Hz, 2H)
10, 10'	121.21	123.1	5.53 (d, $J=7.5$ Hz, 2H)	7.19 (dd, $J_{9,10}=8$ Hz, $J_{6,10}=1.8$ Hz, 2H)
7, 7'-OCH ₃	53.57	55.7	2.28 (s, 6H)	3.92 (s, 6H)

หมายเหตุ: ^a บันทึกใน CD₃OD (300 MHz)

^b บันทึกใน DMSO-*d*₆ (50 MHz)

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารบริสุทธิ์ 2 และ Demethoxycurcumin [19]

C-position	$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)		$^1\text{H-NMR}$ (ppm)	
	สารบริสุทธิ์ 2 ^a	DMC ^b [19]	สารบริสุทธิ์ 2 ^a	DMC ^b [19]
1	46.07	100.9	1.77 (s, 2H)	6.02 (s, 1H)
2, 2'	181.78, 181.99	183.2, 183.1	-	-
3, 3'	119.34, 119.08	121.1, 120.8	5.08 (d, $J=15$ Hz, 1H), 5.05 (d, $J=15$ Hz, 1H)	6.67 (d, $J=15.8$ Hz, 2H)
4, 4'	138.96, 139.18	140.7, 140.4	6.09 (d, $J=15$ Hz, 2H)	7.53 (d, $J=15.8$ Hz, 2H)
5, 5'	125.09, 125.68	126.4, 125.8	-	-
6, 6'	128.23, 108.82	111.2, 130.4	5.95 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 5.67 (s, 1H)	7.31 (d, $J=1.6$ Hz, 2H)
7, 7'	113.97, 147.54	148.0, 115.7	5.28 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), -	-
8, 8'-OH	158.17, 146.50	149.8, 159.8	-	-
9, 9'	113.97, 113.65	115.9, 115.7	5.28 (d, $J=7.6$ Hz, 2H)	6.81 (d, $J=8.3$ Hz, 2H)
10, 10'	128.23, 121.18	123.2, 123.1	5.95 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 5.56 (d, $J=7.6$ Hz, 1H)	7.19 (dd, $J_{9,10}=8.3$ Hz, $J_{6,10}=1.6$ Hz, 2H)
7'-OCH ₃	53.54	55.7	2.37 (s, 3H)	3.82 (s, 3H)

หมายเหตุ: ^a บันทึกใน CD₃OD (300 MHz)

^b DMC = Demethoxycurcumin; บันทึกใน DMSO-*d*₆ (50 MHz)

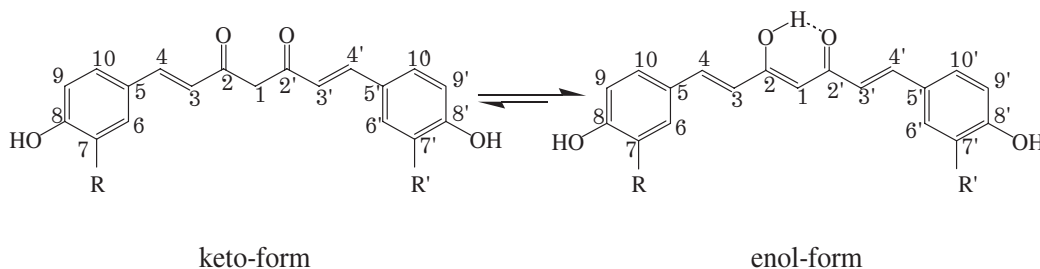
ตารางที่ 4 แสดงข้อมูล $^{13}\text{C-NMR}$ และ $^1\text{H-NMR}$ ของสารบริสุทธิ์ 3 และ Bisdemethoxycurcumin [19]

C-position	$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm)		$^1\text{H-NMR}$ (ppm)	
	สารบริสุทธิ์ 3 ^a	BDMC ^b [19]	สารบริสุทธิ์ 3 ^a	BDMC ^b [19]
1	46.08	100.9	1.79 (d, $J=12.2$ Hz, 2H)	5.99 (s, 1H)
2, 2'	181.92	183.2	-	-
3, 3'	119.09	121.1	5.05 (d, $J=15.8$ Hz, 2H)	6.67 (d, $J=15.8$ Hz, 2H)
4, 4'	138.93	140.1	6.03 (d, $J=15.8$ Hz, 2H)	7.61 (d, $J=15.8$ Hz, 2H)
5, 5'	125.12	126.8	-	-
6, 6'	128.22	130.0	5.95 (d, $J=8.4$ Hz, 2H)	7.57 (d, $J=8.5$ Hz, 2H)
7, 7'	113.98	115.9	5.28 (d, $J=8.3$ Hz, 2H)	6.91 (d, $J=8.5$ Hz, 2H)
8, 8'-OH	158.17	159.7	-	-
9, 9'	113.98	115.9	5.28 (d, $J=8.3$ Hz, 2H)	6.91 (d, $J=8.5$ Hz, 2H)
10, 10'	128.22	130.0	5.95 (d, $J=8.4$ Hz, 2H)	7.57 (d, $J=8.5$ Hz, 2H)

หมายเหตุ: ^a บันทึกใน CD_3OD (300 MHz)

^b BDMC = Bisdemethoxycurcumin; บันทึกใน $\text{DMSO}-d_6$ (50 MHz)

จากตารางที่ 2, 3 และ 4 สารบริสุทธิ์ 1, 2 และ 3 พบค่า δ ของ $^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) ที่ 46.06, 46.07 และ 46.08 ตามลำดับ ซึ่งเป็นชนิดคาร์บอนแบบเมทิลีน (methylene carbon) โดยแตกต่างจากผลการวิจัยที่ผ่านมาที่พบค่า δ ที่ 100.9 (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) [19] ซึ่งเป็นชนิดคาร์บอนแบบไวนิล (vinyl carbon) เพราะเกิด Tautomerization จากโครงสร้างแบบคีโต (keto-form) เป็นโครงสร้างแบบอินอล (enol form) ดังรูปที่ 6



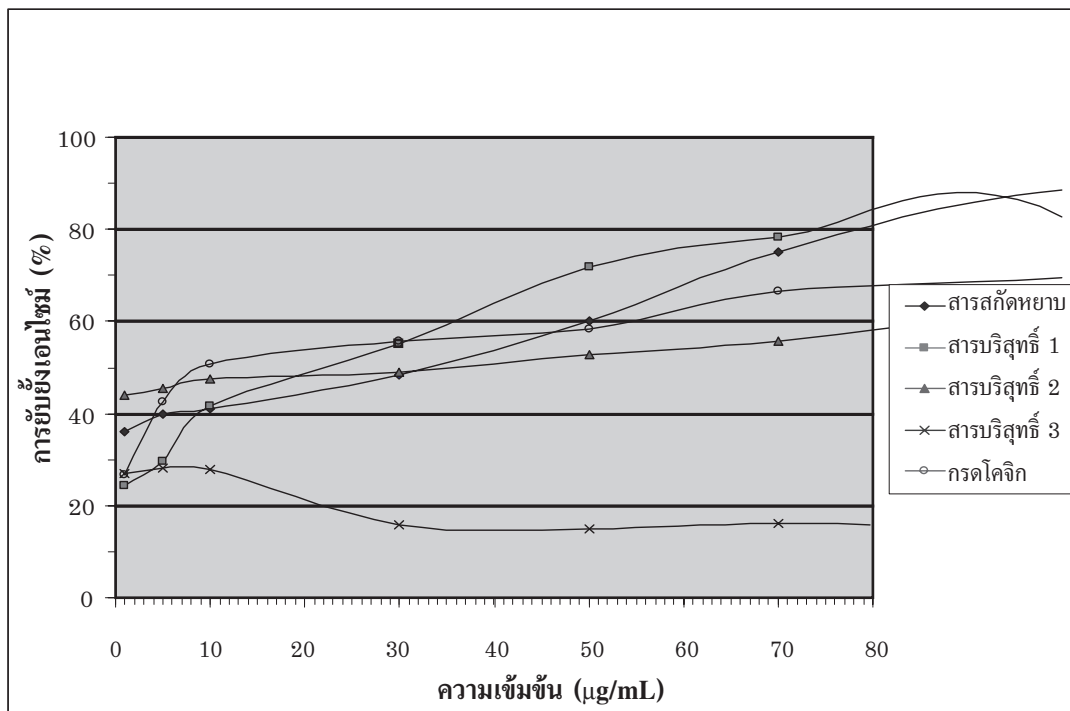
รูปที่ 6 การเกิด tautomerization ของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์

ผลการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ทำการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดและกรดโคจิกที่ความเข้มข้นต่างๆ 8 ความเข้มข้นเพื่อหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (ตารางที่ 5) และค่า IC_{50} ของสารทดสอบ (รูปที่ 7)

ตารางที่ 5 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบ สารบริสุทธิ์ และกรดโคจิก

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/mL}$)	การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%) ($\bar{x} \pm \text{SD}$, n=3)				
	สารสกัดหยาบ	สารบริสุทธิ์ 1	สารบริสุทธิ์ 2	สารบริสุทธิ์ 3	กรดโคจิก
150	91.26 \pm 4.43	-4.48 \pm 2.11	70.84 \pm 1.54	10.61 \pm 2.23	78.34 \pm 2.53
100	88.51 \pm 2.87	82.78 \pm 3.51	62.72 \pm 1.94	14.71 \pm 4.52	69.51 \pm 2.90
70	75.17 \pm 3.64	78.41 \pm 2.77	55.73 \pm 1.65	16.20 \pm 3.35	66.49 \pm 1.94
50	60.00 \pm 2.39	71.85 \pm 3.52	52.93 \pm 0.90	15.08 \pm 4.47	58.47 \pm 1.77
30	48.51 \pm 2.11	55.20 \pm 2.13	48.91 \pm 0.77	15.83 \pm 2.81	55.76 \pm 2.02
10	41.15 \pm 2.87	41.58 \pm 3.27	47.43 \pm 0.77	27.74 \pm 3.59	50.82 \pm 1.45
5	39.77 \pm 2.11	29.51 \pm 2.15	45.58 \pm 0.65	28.12 \pm 3.41	42.42 \pm 3.14
1	36.09 \pm 3.98	24.33 \pm 3.06	43.93 \pm 1.72	27.02 \pm 3.41	26.81 \pm 2.44



รูปที่ 7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกับความเข้มข้นต่างๆ ของสารทดสอบ

สรุปผลการทดลอง

การแยกสารบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของผงขมิ้นชันด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบางโดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนต่อเมทานอล อัตราส่วน 95: 5 เป็นเฟสเคลื่อนที่ได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิด คือ สารบริสุทธิ์ 1 (Curcumin) สารบริสุทธิ์ 2 (Demethoxycurcumin) และ สารบริสุทธิ์ 3 (Bisdemethoxycurcumin) คิดเป็นร้อยละ 33.58, 9.86 และ 10.05 ตามลำดับ จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าสารบริสุทธิ์ 1 และ 2 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 22.0 และ 35.05 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่ง IC_{50} ของสารบริสุทธิ์ 1 มีค่าใกล้เคียงกับที่ Shirota และคณะเคยรายงานไว้ [20] ($IC_{50} = 17.4$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยสารบริสุทธิ์ 1 และ 2 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอ่อนกว่ากรดโคจิกเล็กน้อย ($IC_{50} = 8.8$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) แต่มีฤทธิ์แรงกว่าอาร์บูตินมาก ($IC_{50} = 1,687$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) [2] ส่วนสารบริสุทธิ์ 3 มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่อ่อนมากจากการทดลองนี้พบว่าสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากเหง้าขมิ้นชัน มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยจะว่องไวต่อเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าไทโรซีน [20] ทำให้ dopachrome intermediate ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ สาร Dopachrome จึงลดต่ำลง จากการทดลองชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของหมู่ OCH_3 ที่ตำแหน่ง 7 และ 7' ในโครงสร้างของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์ (รูปที่ 2) สารที่มี OCH_3 มากกลุ่มจะมีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมาก สารบริสุทธิ์ 1 จึงมีฤทธิ์ยับยั้งสูงต่างจากสารบริสุทธิ์ 2 และ 3

สารประกอบเคอร์คิวมินอยด์เหล่านี้เป็นสารที่มีโครงสร้างไม่เสถียร สามารถเกิดขบวนการ tautomerization จากสารโครงสร้างแบบคีโต (keto-form) เปลี่ยนเป็นแบบอินอล (enol-form) จึงทำให้โครงสร้างของสารประกอบเหล่านี้มีสีเหลืองเข้มจัดถึงสีเหลืองอ่อน การพัฒนาสารประกอบตระกูลนี้เป็นเครื่องสำอางเพื่อผิวขาว (whitening agent) จึงเป็นสิ่งที่ควรได้รับการแก้ไข

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญาโทสำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษา จากงบประมาณเงินรายได้ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี พ.ศ. 2550

เอกสารอ้างอิง

1. Zhang, J. P., Chen, Q. X, Song, K. K. and Xie, J. J. 2006. Inhibitory Effects of Salicylic Acid Family Compounds on the Diphenolase Activity of Mushroom Tyrosinase. *Food Chemistry* 95: 579-584.
2. Likhitwitayawuid, K. 2000. Tyrosinase Inhibitors from Plants. The Asahi Glass Foundation, Japan and Faculty of Engineering, Chulalongkorn University. Bangkok. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. Photocopied.
3. Friedman, M. 1996. Food Browning and Its Prevention: An Overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(3): 631-653.

4. มยุรี จัยวัฒน์. 2547. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพปฏินิมหลังการเก็บเกี่ยว. ได้จาก [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). 1 มิถุนายน 2549.
5. พิมพ์ ลิลาพรพิสิฐ. 2544. เครื่องสำอางธรรมชาติ ผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหน้า. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. โอ เอส พริ้นติ้ง เฮ้าส์. หน้า 239-266.
6. ทรงยศ อนุปรีชา และพรงาม ลิ้มตระกูล. 2548. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย ผลของเคอร์คิวมินต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนดีเอชเอและยีนอีทีทูเอมอร์-1 ในเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยลิวดีเมีย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย. เชียงใหม่. คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ฉบับอัดสำเนา.
7. Pothitirat, W. 2006. Standardization and Antioxidant Activity of *Curcuma longa* Rhizome Extract. M.Sc. Thesis in Pharmaceutical Chemistry and Phytochemistry. Bangkok. Faculty of Graduate studies, Mahidol University. Photocopied.
8. โฆษิต ประเสริฐสุด. 2547. อิทธิพลของระดับความสูงของพื้นที่และอายุการเก็บเกี่ยวต่อผลผลิตปริมาณ น้ำมันหอมระเหย และสารเคอร์คิวมินในขมิ้นชัน. ปรียญฐานิพนธ์ วท.ม. (พืชสวน). ขอนแก่น. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ฉบับอัดสำเนา.
9. Srimal, R. C. and Dhawan, B. N. 1973. Pharmacology of Diferuloyl Methane (Curcumin), A Non-Steroidial Anti-Inflammatory Analogs in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 25(6): 447-452.
10. Ammon, H. P. T., Anazodo, M. I., Safayhi, H., Dhawan, B. N. and Srimal, R. C. 1992. Curcumin: A Potent Inhibition of Leukotriene B4 Formation in Rat Peritoneal Polymorphonuclear Neutrophils (PMNL). *Planta Medica* 58: 226.
11. อุไรวรรณ เพิ่มพิพัฒน์ อัญชลี จุฑะพุทธิ และนียดา เกียรติยิ่งอังสุลี. 2539.ฤทธิ์ของขมิ้นชันในการต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหารหนูขาว. *ไทยเภสัชสาร* 20(1): 27-38.
12. Mahady, G. B., Pendland, S. L., Stoia, A. and Hamill, F. A. 2006. *In vitro* Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Botanicals Used Traditionally for Treatment of Gastrointestinal Disorders. *Phytomedicine* Suppl II: 95.
13. Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T. and Perumalsamy, P. L. 2001. Antimicrobial Activity of Certain Indian Medicinal Plants Used in Folkloric Medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 74: 217-220.
14. Roth, G. N., Chandra, A. and Nair, M. G. 1998. Novel Bioactivities of *Curcuma longa* Constituents. *Journal of Natural Products* 61: 542-545.
15. Soudamini, K. K. 1989. Inhibition of Chemical Carcinogenesis by Curcumin. *Journal of Ethno-pharmacology* 27: 227-233.
16. อรกัญญา วิบูลย์สวัสดิ์ วุฒิชัย นุตกุล และธงชัย สุนทรภา. 2546. การพัฒนาการรักษาข้ออักเสบรูมาตอยด์จากขมิ้นชัน. *วารสารแลป ทุเดย์* กรกฎาคม: 69-73.

17. บังอร ศรีพานิชกุลชัย อัญชลี ตัตตะวะศาสตร์ พิสมัย เหล่าภัทรเกษม และอารมณั ตัตตะวะศาสตร์. 2000. ฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ของสมุนไพรท้องถิ่น 8 ชนิด. *วารสารวิจัย มช* 6(1): 23-33.
18. Sittisomwong, N., Leelasangaluk, V., Chivapat, S., Wangmad, A., Ragsaman, P. and Chuntarachaya, C. 1990. Acute and Subchronic Toxicity of Turmeric. *Bulletin of the Department of Medical Sciences* 32(3): 101-111.
19. Peter-Almeida, L., Cherubino, A. P. F., Alves, R. J., Dufosse, L. and Gloria, M. B. A. 2005. Separation and Determination of the Physico-Chemical Characteristics of Curcumin, Demethoxy-curcumin and Bisdemethoxycurcumin. *Food Research International* 38: 1039-1044.
20. Shiota, S., Miyazaki, K., Aiyama, R., Ichioka, M. and Yokokura, T. 1994. Tyrosinase Inhibitors from Crude Drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 17(2): 266-269.

ได้รับบทความวันที่ 22 ตุลาคม 2550

ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2551

