

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ของสารสกัดสมุนไพรไทยพื้นบ้านบางชนิด เพื่อใช้สำหรับผมงอกก่อนวัย

กฤตติญารัตน์ สมวงศ์*, ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา

บทคัดย่อ

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ของสารสกัดสมุนไพรไทยพื้นบ้านบางชนิด
เพื่อใช้สำหรับผมงอกก่อนวัย

กฤตติญารัตน์ สมวงศ์*, ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา

บทนำ : การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของสารสกัดด้วยน้ำ เอธิลอะซิเตท เมทานอล และเฮกเซนของพืชสมุนไพรไทยพื้นบ้าน 5 ชนิด คือ ย่านาง บัวบก อัญชัน หม่อน และกวาวเครือขาว **วัสดุและวิธีการ :** การศึกษาเป็นแบบการทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro test) โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH, ABTS, FRAP assay และ total phenolic compound ฤทธิ์ป้องกันสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยวิธี MTT assay ส่วนฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ทำโดยศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนสารตั้งต้นไทโรซินให้เป็นเมลานิน ด้วยวิธี tyrosinase activity assay และศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลานোসัยท์ที่สร้างเม็ดสีเมลานิน โดยทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยง B₁₆F₁₀ ด้วยวิธี MTT assay **ผลการศึกษา :** ผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่า สารสกัดด้วยน้ำของย่านาง มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 72.12 ± 20.18 µg/ml มีค่า TEAC และ VEAC เท่ากับ 0.77 ± 0.03 และ 2.00 ± 0.03 ตามลำดับ ผลการทดสอบด้วยวิธี FRAP และหาค่า total phenolic compound พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของย่านาง มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด โดยมีค่า FRAP value และ GAE เท่ากับ 546.99 ± 0.01 mM และ 82.75 ตามลำดับ เมื่อทดสอบฤทธิ์ป้องกันสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า สารสกัดด้วยน้ำของหม่อน บัวบก ย่านาง และอัญชัน มีฤทธิ์ป้องกันเซลล์ดีที่สุดโดยมีค่าร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ เท่ากับ 88.29, 84.41, 83.14 และ 76.25 ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ทำโดยศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทของย่านาง มีฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุดโดยมีค่าร้อยละของการกระตุ้น (% stimulation) เท่ากับ 94.34 ส่วนฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลานোসัยท์ พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของอัญชันและสารสกัดด้วยน้ำของย่านาง มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลานোসัยท์ดีที่สุด โดยมีค่า P.I. (proliferation index) เท่ากับ 1.7 และ 1.6 ตามลำดับ **สรุปผล :** งานวิจัยนี้แสดงศักยภาพของสารสกัดสมุนไพรไทยพื้นบ้านโดยเฉพาะย่านางที่มีแนวโน้มสามารถนำไปพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบเวชสำอางสำหรับผมงอกก่อนวัยได้

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน สมุนไพรไทยพื้นบ้าน ผมงอกก่อนวัย

Abstract

Antioxidant and Melanogenesis Stimulating activities of Some Thai Traditional Medicinal Plant Extracts for Grey Hair Treatment

Somvong K*, Prasitpuriprecha C

Introduction : The objective of this study was to investigate antioxidant and melanogenesis stimulating activity of Thai traditional medicinal plant extracts included aqueous, ethyl acetate, methanol and hexane extracts of *Tiliacora triandra*, *Centella asiatica*, *Clitoria ternatea*, *Morus alba* and *Pueraria mirifica*. **Material and Method :** These extracts were determined for antioxidant activity by DPPH assay, ABTS assay, FRAP assay and also total phenolic compounds and determined for free radical protective activity of 2 mM hydrogen peroxide in mouse melanoma cells (B₁₆F₁₀) by colorimetric MTT assay. The melanogenesis stimulating activities were studied by the stimulation of tyrosinase enzyme activity by tyrosinase activity assay

*ติดต่อผู้พิมพ์ : โทร (66 45) 362421 E-mail : star_alis@hotmail.com

Corresponding author : Tel (66 45) 362421. E-mail : star_alis@hotmail.com



and melanocyte proliferation of these extracts at concentration of 0.75-800 µg/ml was evaluated using mouse melanoma cells (B₁₆F₁₀) by MTT assay. **Results** : For antioxidant activity. The aqueous extract of *T. triandra* exhibited strong antioxidant activity with the EC₅₀ of 72.12 ± 20.18 µg/ml, TEAC of 0.77 ± 0.03 and VEAC of 2.00 ± 0.03, respectively. While the methanolic extract of *T. triandra* illustrated strong antioxidant activity with the FRAP value of 546.99 ± 0.01 mM and possessed the highest quantity of total phenolic compounds with GAE of 82.75. These extracts were also determined for free radical protective activity of 2 mM hydrogen peroxide. The results showed that aqueous extracts of *M. alba*, *C. asiatica*, *T. triandra* and *C. ternatea* had strong activities with % of cell viability of 88.29, 84.41, 83.14 and 76.25%, respectively. The stimulating activity of tyrosinase enzyme. The ethyl acetate extract of *T. triandra* had the strongest stimulating activity with % stimulation of 94.34. The stimulating activity of melanocyte proliferation of these extracts showed that methanol extract of *C. ternatea* and aqueous extract of *T. triandra* had strong stimulating activities with proliferation index (P.I.) of 1.7 and 1.6, respectively. **Conclusion** : The effect of five Thai medicinal plant extracts had melanogenesis stimulation and able to improved for anti-gray hair cosmetic in the future.

Keyword : Hair graying, Melanin, Melanogenesis stimulation.

บทนำ

ภาวะผมหงอกก่อนวัย (Premature canities) เป็นปัญหาสุขภาพประการหนึ่งที่มีผลเสียต่อสุขภาพจิตและบุคลิกภาพ (Wood *et al.*, 2009; Tobin and Paus, 2000) สาเหตุอาจเกิดจากพันธุกรรม อายุที่เพิ่มขึ้น การลดจำนวนลงของเมลานินไซท์ (melanocytes) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin) การลดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน การขาดเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนสารตั้งต้นไทโรซีน (tyrosine) ให้เป็นเมลานินที่รากผม (Hideaki *et al.*, 2004) หรือ เกิดจากความเครียด (oxidative stress) ส่งผลให้ร่างกายสร้างสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณมาก ทำให้เซลล์เมลานินไซท์ลดจำนวนลง และตายอย่างรวดเร็ว (apoptosis) (Karin *et al.*, 2004; Petra *et al.*, 2006) ถึงแม้ผมหงอกก่อนวัย จะไม่มีอันตรายถึงชีวิต แต่ก็ใช่อุปสรรคที่บั่นทอนคุณภาพชีวิต ทำให้ขาดความมั่นใจ และไม่มีสมาธิส่งผลให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดลง ปัจจุบันยังไม่มียารักษาภาวะผมหงอกก่อนวัย มีเพียงการใช้ยาย้อมผมเพื่อปกปิดผมขาวชั่วคราว ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์ เช่น การระคายเคืองต่อตา จมูก และผิวหนังบริเวณที่สัมผัส และทำให้ผิวหนังและเส้นผมแห้ง (Hideaki *et al.*, 2004) หรือหากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ (mutation) และเกิดมะเร็งได้ (Kinlen *et al.*, 1977)

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นภูมิปัญญาพื้นบ้านมาใช้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีความปลอดภัย ราคาไม่แพง สรรพได้ในท้องถิ่น และสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพืชสมุนไพรในประเทศได้ งานวิจัยนี้เป็น

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสมุนไพรไทยที่ชาวบ้านนำมาใช้รักษาผมหงอกก่อนวัย จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ อัญชัน บัวบก ย่านาง หม่อน และกวาวเครือขาว เพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ยืนยันถึงสรรพคุณในการป้องกัน และรักษาผมหงอกก่อนวัย เป็นแนวทางในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง หรือนำไปใช้ต่อยอดงานวิจัยในระดับสูง

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และการป้องกันสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน โดยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์เมลานินไซท์ที่สร้างเม็ดสีเมลานิน ของสารสกัดด้วยน้ำ เอธิลอะซิเตท เมทานอล และเฮกเซนของพืชสมุนไพรไทยพื้นบ้าน 5 ชนิด คือ ย่านาง บัวบก อัญชัน หม่อน และกวาวเครือขาว

วิธีวิจัย

1. อุปกรณ์ และสารเคมี

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Ascorbic acid (vitamin C), α -tocopherol (vitamin E) Sodium acetate-3-hydrate (CH₃COONa), Glacial acetic acid, Sodium acetate-3-hydrate, Glacial acetic acid, Ferric chloride, TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine), Ferrous sulfate (FeSO₄), Hydrochloric acid, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), Dipotassium peroxodisulphate (K₂S₂O₈), Folin-Ciocalteu, Sodium carbonate (Na₂CO₃),

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT), UV-vis spectrophotometer, microplate reader

2. สมุนไพรและการสกัด

สมุนไพรที่นำมาวิจัยเป็นสมุนไพรที่ภูมิปัญญาพื้นบ้านใช้รักษาอาการผมหงอกก่อนวัย จำนวน 5 ชนิด รายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดของพืชสมุนไพรไทย 5 ชนิด

สมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	ส่วนที่ใช้
ย่านาง	<i>Tiliacora triandra</i> (Colebr.) Diels.	Menispermaceae	ใบ
บัวบก	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Apiaceae	ใบ
อัญชัน	<i>Clitoria ternatea</i>	Fabaceae	ดอก
หม่อน	<i>Morus alba</i> L.	Moraceae	ใบ
กวาวเครือขาว	<i>Pueraria mirifica</i> Airy Shaw et Suvatab	Leguminosae	หัวใต้ดิน

3. การสกัดสมุนไพร

สกัดสมุนไพรด้วยวิธี Percolation ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น เอธิลอะซิเตท (ethyl acetate) เมทานอล (methanol) และเฮกเซน (hexane) โดยนำสมุนไพรส่วนที่ใช้ มาอบให้แห้งและบดให้ละเอียด ชั่งผงสมุนไพรแห้ง 100 กรัม ทำให้เปียกด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด เทสมุนไพรที่เปียกกลงใน percolator ที่ละน้อย กดให้เรียงตัวเป็นชั้นๆ ปิดทับด้วยกระดาษกรองและทรายสะอาด เติมตัวทำละลายแต่ละชนิดให้เต็ม percolator ทิ้งไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บสารละลายแต่ละชนิดจนสารละลายที่ได้ไม่มีสี หรือเกือบใส นำสารสกัดที่ได้ไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator

4. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

4.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay (Kriengsak et al, 2006)

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 100 μ M ในสารละลาย absolute methanol และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 100 μ g/ml ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด (ใช้ 20 % DMSO ช่วยในการละลาย) นำสารละลาย DPPH และสารสกัดตัวอย่างผสมให้เข้ากัน โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2000 μ l ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Jenway 6305, UK) ที่ความยาวคลื่น 517 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ Vitamin C และ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control}} \times 100$$

นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า Effective concentration (EC_{50}) หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด กับ % inhibition

4.2 การทดสอบด้วยวิธี ABTS assay (Roberta et al., 1999)

เตรียมสารละลาย ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) โดยผสม 7 mM ABTS กับ 2.45 mM $K_2S_2O_8$ (Dipotassium peroxodisulphate) ให้เข้ากัน แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน ABTS : น้ำ เท่ากับ 1:4.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.7-0.9 ที่ความยาวคลื่น 734 nm และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด (ใช้ 20% DMSO ช่วยในการละลาย) ผสมสารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้ว กับสารสกัดตัวอย่างและตัวทำละลายแต่ละชนิด ผสมให้เข้ากัน โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,120 μ l วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ Vitamin C และ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และค่า Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VEAC) จากกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด กับค่า absorbance ของ Vitamin C และ Trolox

4.3 การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay (Ronald et al, 2005)

เตรียมสารละลาย FRAP (Ferric reducing antioxidant power) reagent โดยผสม 300 mM acetate buffer (pH 3.6) กับ 20 mM Ferric chloride solution และ 10 mM TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) solution ให้เข้ากัน เก็บ



โดยปราศจากแสง และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด (ใช้ 20% DMSO ช่วยในการละลาย) นำสารสกัดตัวอย่างผสมกับ FRAP reagent และน้ำกลั่น โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,040 µl ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงในนาที่ที่ 4 ที่ความยาวคลื่น 593 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Ferrous sulfate คำนวณหาปริมาณ Relative antioxidant activity (FRAP value) จากกราฟมาตรฐานของ FeSO_4 ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FeSO_4 กับค่า absorbance โดยต้องเจือจางสารสกัดตัวอย่างให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

4.4 การหาปริมาณ Total phenolic compound

(Onanong et al, 2011)

เตรียมสารละลาย 2N Folin-ciocalteu reagent และ 20% sodium carbonate (Na_2CO_3) และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/ml นำสารสกัดตัวอย่างผสมกับสารละลาย Folin-ciocalteu reagent และ Na_2CO_3 ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณ total phenolic compound (µg/ml) จากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Gallic acid และคำนวณให้อยู่ในหน่วยของ µg GAE/mg dry mass

5. การทดสอบฤทธิ์ป้องกันสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยวิธี MTT assay (Jitsanon et al., 2011; Kyung et al., 2007; Rong et al, 2006)

บ่มเซลล์เพาะเลี้ยง mouse melanoma cell ($\text{B}_{16}\text{F}_{10}$) ใน 96-well plate ปริมาณ 1.5×10^4 เซลล์/หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เพื่อให้เซลล์เกาะติดภาชนะ เจือจางสารสกัดตัวอย่างแบบ 2 เท่าด้วย Completed Medium DMEM ให้ได้ความเข้มข้น 800-0.75 µg/ml เติมสารสกัดตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น บ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม 2 mM H_2O_2 (ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50%) บ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง เติม MTT ความเข้มข้น 1 mg/ml หลุมละ 50 µl บ่มต่อ 4-6 ชั่วโมง ดูด supernatant ทั้ง ละลายส่วนที่เหลือด้วย DMSO ปริมาตร 100 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader (Dy nex /MRX microplate reader, Switzerland) ที่ความยาวคลื่น 570 nm คำนวณหาค่า cell viability (% of viability)

6. การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Tyrosinase activity assay (Jeon et al., 2005; Moon et al., 2010; Choi et al., 2008)

เจือจางสารสกัดตัวอย่างแบบ 2 เท่า ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดให้ได้ความเข้มข้น 50-0.75 mg/ml ผสมสารสกัดตัวอย่างกับเอนไซม์ tyrosinase ความเข้มข้น 100 u/ml ใน phosphate buffer pH 6.8 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 2 mM tyrosine แล้วบ่มอีก 40 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm โดยมี phosphate buffer pH 6.8 เป็นตัวควบคุม และใช้ Vitamin C และ Vitamin E เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาค่า tyrosinase stimulation จากสมการ

$$\% \text{ stimulation} = (A-B)/A \times 100$$

เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารสกัดตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมที่ไม่มีสารสกัดตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน

7. การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลานोไซท์ (Melanocyte proliferation) (Jung et al., 2001; Itoh and Furuichi 2005; Matsuda et al., 2004; Shin et al., 2010; Jeon et al., 2009)

บ่มเซลล์เพาะเลี้ยง mouse melanoma cell ($\text{B}_{16}\text{F}_{10}$) ใน 96-well plate ปริมาณ 1.5×10^4 เซลล์/หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เพื่อให้เซลล์เกาะติดภาชนะ เจือจางสารสกัดตัวอย่างแบบ 2 เท่าด้วย Completed Medium DMEM ให้ได้ความเข้มข้น 800-0.75 µg/ml เติมสารสกัดตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น หลุมละ 100 µl บ่มเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เติม MTT ความเข้มข้น 1 mg/ml หลุมละ 50 µl บ่มต่อเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ดูด supernatant ทั้ง ละลายส่วนที่เหลือด้วย DMSO 100 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm โดยใช้ theophylline 10 µg เป็นสารมาตรฐาน คำนวณหาค่า Proliferation Index (P.I.) จากสมการ

$$P.I. = \frac{\text{Mean OD of sample well}}{\text{Mean OD of control}} \times 100$$

Mean OD of control

การวิเคราะห์ทางสถิติ

แสดงผลเป็นค่า mean $\pm$ SD และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA ค่า $p < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการวิจัย

1. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่า สารสกัดย่านางด้วยเมทธานอลและน้ำ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด ดังตารางที่ 2



ตารางที่ 2 ค่า 50% Effective Concentration (EC₅₀) ของสารสกัดพืชสมุนไพร ด้วยวิธี DPPH assay

สารสกัด/ชั้น	EC ₅₀ (µg/ml)				
	ย่านาง	บัวบก	อัญชัน	หม่อน	กวาวเครือขาว
น้ำ	72.12 ± 20.18	170.291 ± 2.59	236.90 ± 7.34	138.65 ± 14.51	765.09 ± 2.14
เมทธานอล	61.80 ± 22.16	198.46 ± 9.54	247.07 ± 6.66	180.41 ± 8.29	706.15 ± 2.66
เอทิลอะซิเตท	129.49 ± 12.09	171.07 ± 9.29	259.89 ± 6.17	186.82 ± 9.20	205.93 ± 7.39
เฮกเซน	259.79 ± 6.45	1397.35 ± 1.72	742.96 ± 2.36	447.26 ± 3.93	2360.26 ± 2.32

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS assay พบว่า สารสกัดด้วยน้ำของอัญชัน บัวบก ย่านาง หม่อน และกวาวเครือขาว มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงดังตารางที่ 3

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP assay พบว่า สารสกัดด้วยน้ำ เมทธานอล และเอทิลอะซิเตท ของย่านาง มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และค่า Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VEAC) ของสารสกัดพืชสมุนไพร ด้วยวิธี ABTS assay

สารสกัดด้วย	ย่านาง		บัวบก		อัญชัน		หม่อน		กวาวเครือขาว	
	TVAC	VEAC	TVAC	VEAC	TVAC	VEAC	TVAC	VEAC	TVAC	VEAC
น้ำ	0.77 ± 0.03	2.00 ± 0.03	0.77 ± 0.06	2.01 ± 0.06	0.78 ± 0.08	2.01 ± 0.08	0.75 ± 0.04	1.99 ± 0.04	0.73 ± 0.03	1.95 ± 0.03
เมทธานอล	0.70 ± 0.06	0.73 ± 0.06	0.66 ± 0.06	0.68 ± 0.06	0.68 ± 0.06	0.67 ± 0.06	0.62 ± 0.06	0.61 ± 0.06	0.41 ± 0.07	0.60 ± 0.07
เอทิลอะซิเตท	0.15 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.05 ± 0.03
เฮกเซน	-0.04 ± 0.02	0.13 ± 0.02	-0.09 ± 0.04	0.07 ± 0.04	-0.08 ± 0.03	0.07 ± 0.03	-0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.02	-0.05 ± 0.05	0.13 ± 0.05

ตารางที่ 4 ค่า FRAP value ของสารสกัดพืชสมุนไพร ด้วยวิธี FRAP assay

สารสกัด/ชั้น	FRAP value (mM)				
น้ำ	ย่านาง	บัวบก	อัญชัน	หม่อน	กวาวเครือขาว
น้ำ	471.22 ± 0.01	289.02 ± 0.07	285.15 ± 0.07	340.21 ± 0.09	7.73 ± 0.03
เมทธานอล	546.99 ± 0.01	162.83 ± 0.02	95.80 ± 0.03	120.92 ± 0.02	19.18 ± 0.02
เอทิลอะซิเตท	479.32 ± 0.05	345.15 ± 0.05	255.22 ± 0.03	353.13 ± 0.04	343.66 ± 0.03
เฮกเซน	7.41 ± 0.03	-21.99 ± 0.02	-20.69 ± 0.02	-2.76 ± 0.01	-21.85 ± 0.03

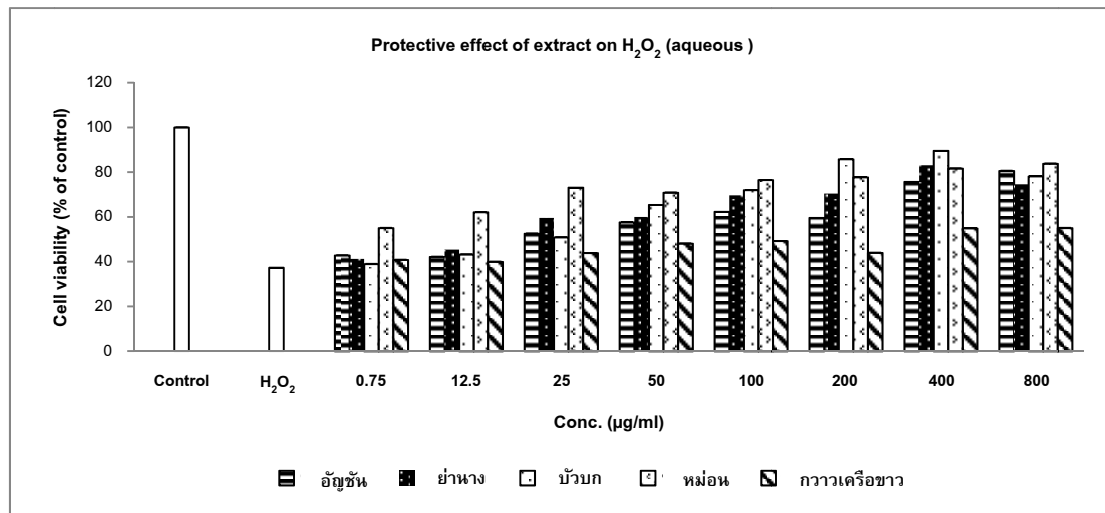
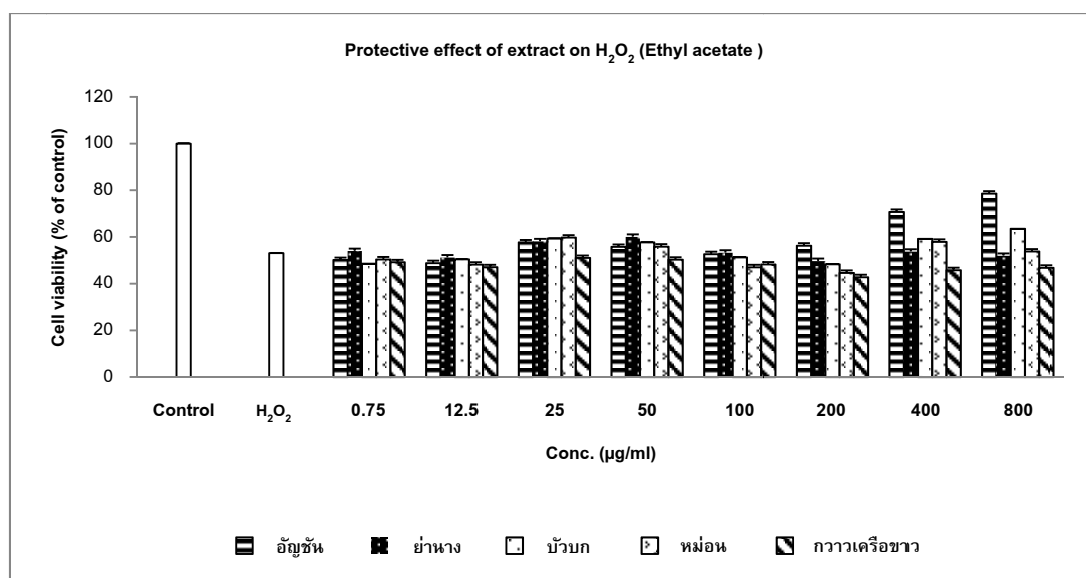
เมื่อหาปริมาณ Total phenolic compound ของสารสกัดสมุนไพร พบว่าสารสกัดด้วยเมทธานอล เอทิลอะซิเตท และ น้ำมีปริมาณ Total phenolic compound มากที่สุด ดังตารางที่ 5

ผลการทดสอบฤทธิ์ป้องกันสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ที่ความเข้มข้น 2 mM พบว่า สารสกัดด้วยน้ำของหม่อน บัวบก ย่านาง และอัญชัน มีฤทธิ์ป้องกันเซลล์

ดีที่สุด โดยมีค่าร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์ (% viability) เท่ากับ 88.29, 84.41, 83.14, และ 76.25 ตามลำดับ (รูปที่ 1) ส่วนสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทของอัญชัน ย่านาง บัวบก และหม่อน มีฤทธิ์ในการป้องกันสารอนุมูลอิสระรองลงมา คือ มีค่า % viability เท่ากับ 78.62, 60.09, 63.55 และ 59.77 ตามลำดับ (รูปที่ 2)

ตารางที่ 5 ค่า total phenolic compound ในหน่วย $\mu\text{g GAE/ mg dry mass}$

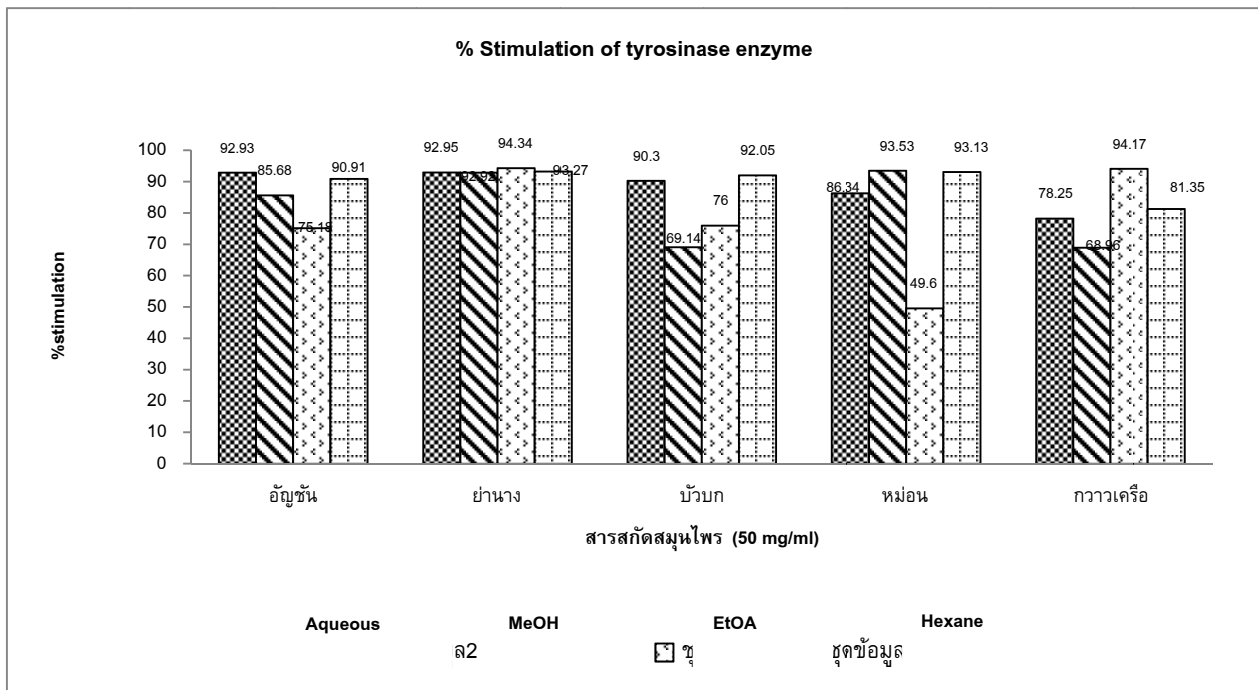
สารสกัด/ชั้น	$\mu\text{g GAE/ mg dry mass}$				
	ย่านาง	บัวบก	อัญชัน	หม่อน	กวาวเครือขาว
น้ำ	65.75 $\pm$ 0.02	57.25 $\pm$ 0.02	53.00 $\pm$ 0.01	60.50 $\pm$ 0.01	34.00 $\pm$ 0.02
เมทธานอล	82.75 $\pm$ 0.02	47.00 $\pm$ 0.01	52.75 $\pm$ 0.03	47.25 $\pm$ 0.04	34.75 $\pm$ 0.01
เอธิลอะซิเตท	80.50 $\pm$ 0.01	60.00 $\pm$ 0.02	61.75 $\pm$ 0.02	62.50 $\pm$ 0.06	45.25 $\pm$ 0.06
เฮกเซน	37.00 $\pm$ 0.01	35.50 $\pm$ 0.01	31.50 $\pm$ 0.01	34.00 $\pm$ 0.02	37.0 $\pm$ 0.01

รูปที่ 1ฤทธิ์ป้องกันสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของสารสกัดด้วยน้ำของอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว ที่ความเข้มข้นต่างๆรูปที่ 2ฤทธิ์ป้องกันสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของสารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทของอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว ที่ความเข้มข้นต่างๆ

นอกจากนี้ สารสกัดด้วยเมทธานอลของอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และสารสกัดด้วยเฮกเซน ของย่านาง หม่อน กวาวเครือขาว ยังคงมีฤทธิ์ในการป้องกันสารอนุมูลอิสระ รองลงมาตามลำดับ (ข้อมูลไม่แสดง)

2. ฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน

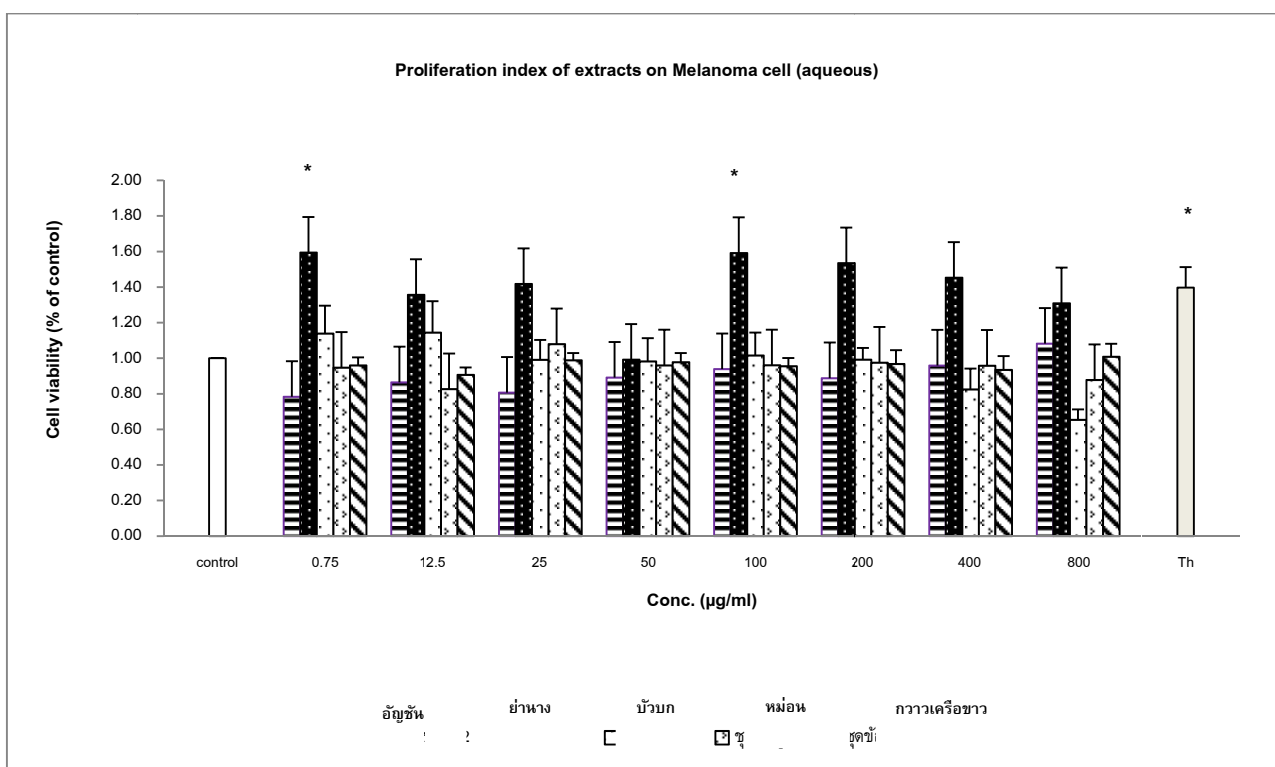
ผลการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สารสกัดสมุนไพรทุกตัวที่ความเข้มข้น 50 mg/ml มีฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส (รูปที่ 3)



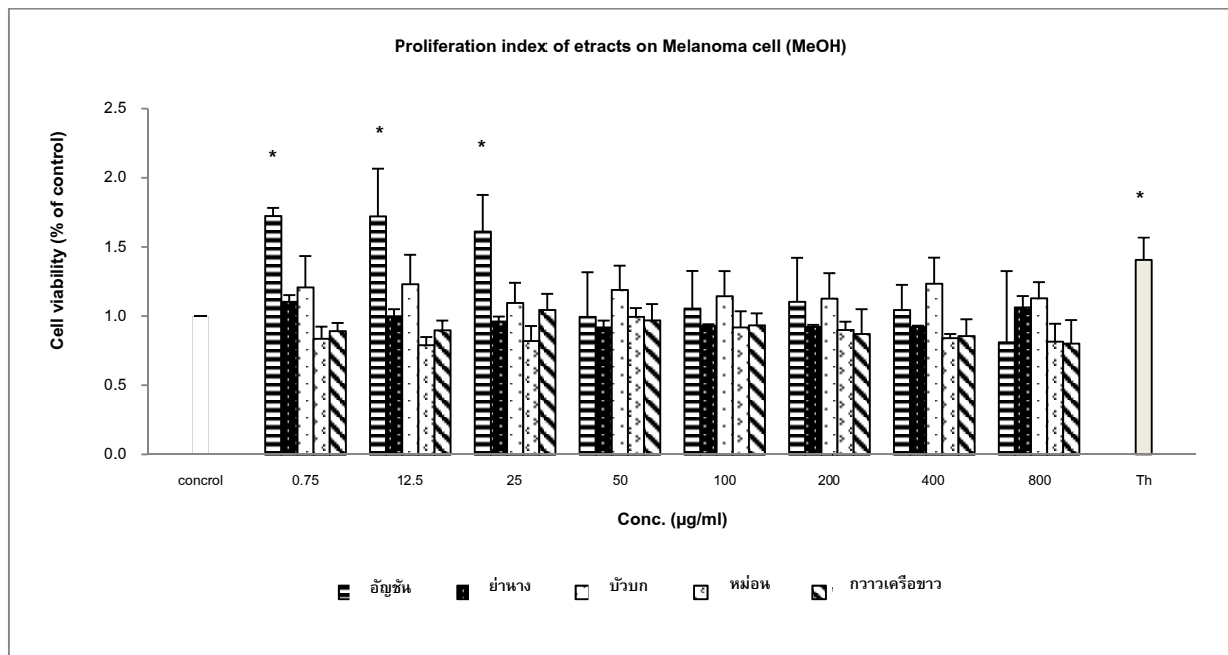
รูปที่ 3ฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดสมุนไพรที่ ความเข้มข้น 50 mg/ml (%Stimulating activity of tyrosinase enzyme)

ผลการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไมลาโนไซต์ พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของอัญชัน และสารสกัดด้วยน้ำของย่านาง ที่ความเข้มข้น 0.75 µg/ml มีฤทธิ์ดีที่สุด โดย

มีค่า proliferation index (P.I.) เท่ากับ 1.7 และ 1.6 ตามลำดับ และมีค่าสูงกว่า Theophylline ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน ($P < 0.05$) (รูปที่ 4 และ 5)



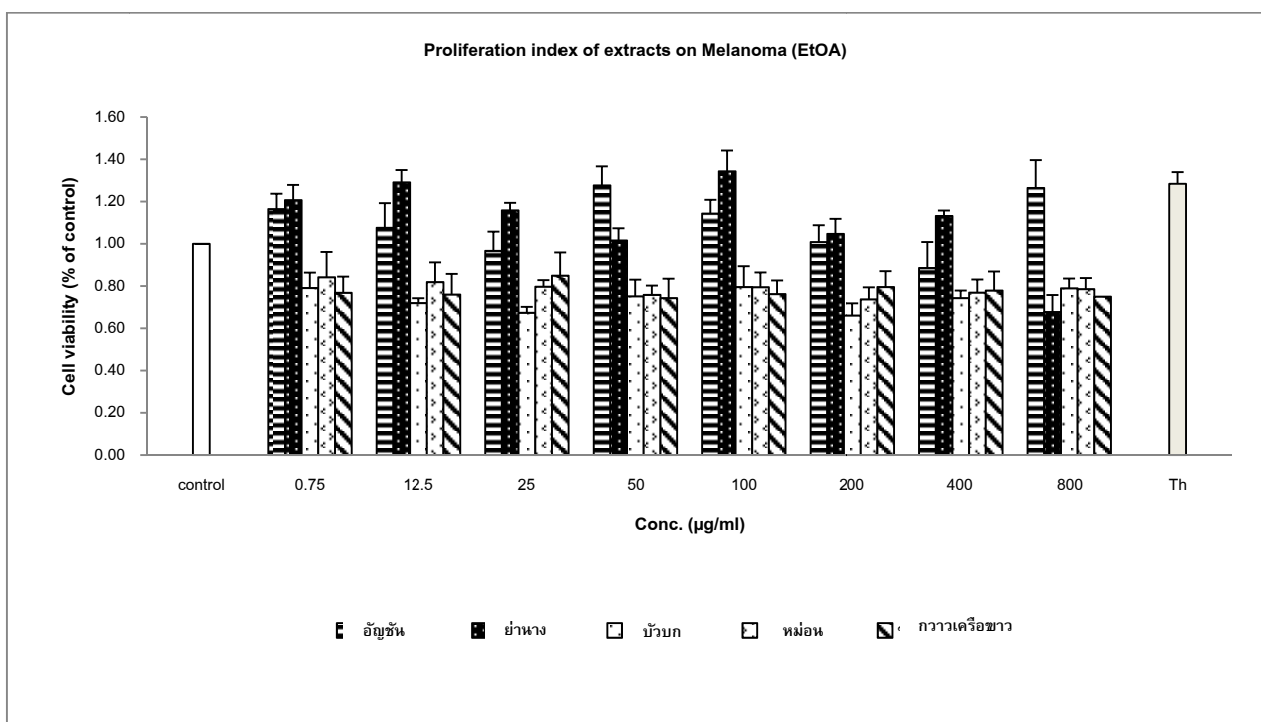
รูปที่ 4 ค่า proliferation index (P.I.) ของสารสกัดด้วยน้ำของอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และ กวาวเครือขาว ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ Theophylline (Th) (* $p < 0.05$)



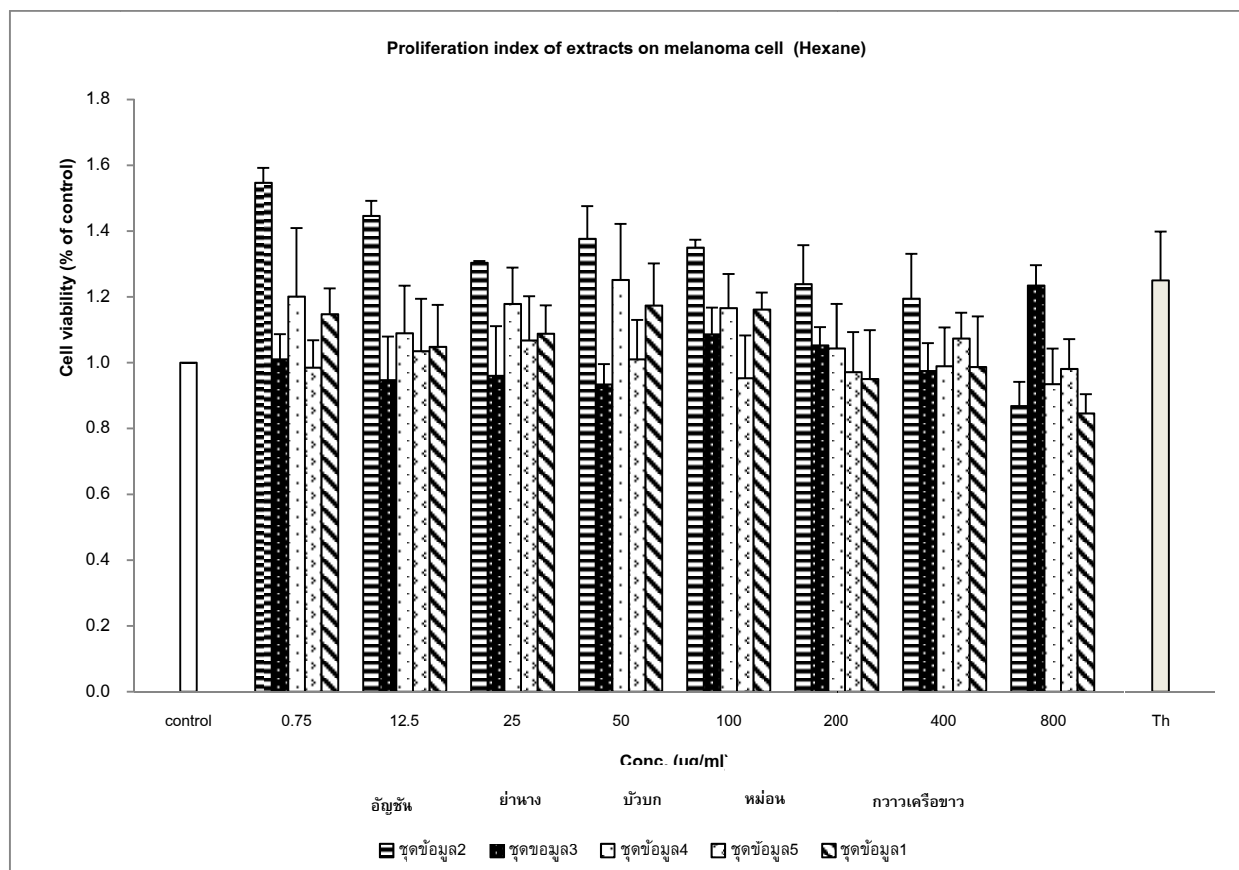
รูปที่ 5 ค่า proliferation index (P.I.) ของสารสกัดด้วยเมทานอลของอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ Theophylline (Th) (* $p < 0.05$)

นอกจากนี้ สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทของอัญชัน และ ย่านาง ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์เมลานโไซต์ ที่ความเข้มข้น 50 -100 µg/ml โดยมีค่า P.I. เท่ากับ 1.28 และ 1.29 ตามลำดับ (รูปที่ 6) ส่วนสารสกัดด้วยเฮกเซนของอัญชัน

ย่านาง บัวบก หม่อน และกลาวเครือขาว มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์เมลานโไซต์ ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.75-800 µg/ml โดยมีค่า P.I. เท่ากับ 1.50, 1.20, 1.25, 1.04 และ 1.17 ตามลำดับ (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 ค่า proliferation index (P.I.) ของสารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตทของอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อนและกวาวเครือขาว ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ Theophylline (Th) (* $p < 0.05$)



รูปที่ 7 ค่า proliferation index (P.I.) ของสารสกัดด้วยเฮกเซนของอัญชัน ย่านาง บัวบก หม่อน และกวาวเครือขาว ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ Theophylline (Th) (* p < 0.05)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ของสารสกัดสมุนไพรไทยพื้นบ้าน 5 ชนิด คือ อัญชัน บัวบก ย่านาง หม่อน และกวาวเครือขาว ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ เมทานอล เอธิลอะซิเตท และเฮกเซน ซึ่งเป็นการทดสอบในหลอดทดลอง (in vitro) พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของย่านาง มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS assay ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอลของย่านาง มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP assay และมีปริมาณ total phenolic compound มากที่สุดด้วย ผลการทดสอบฤทธิ์ป้องกันสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานินของหนู ($B_{16}F_{10}$) พบว่า สารสกัดด้วยน้ำของหม่อน บัวบก ย่านาง และอัญชัน มีฤทธิ์ป้องกันเซลล์ดีที่สุด ซึ่งผลการทดสอบสารสกัดอัญชันและย่านางด้วยน้ำและเมทานอลมีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ส่วนฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ที่ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า

สารสกัดสมุนไพรทั้ง 5 ชนิด มีฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยเฉพาะสารสกัดด้วยเอธิลอะซิเตทของย่านางมีฤทธิ์ดีที่สุด ในขณะที่ ฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลานocytes พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของอัญชันและสารสกัดด้วยน้ำของย่านาง มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลานocytes ที่ดีที่สุด

ผลการวิจัยสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า สารสกัดย่านาง และอัญชัน มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินดีที่สุด โดยเฉพาะสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอล ซึ่งสอดคล้องกับภูมิปัญญาชาวบ้านที่ใช้ใบสดของย่านาง คั้นกับน้ำตาลสุกแล้วดื่ม ส่วนอัญชันใช้ดอกบดกับน้ำแล้วนำไปชงดื่ม ผิซสมุนไพรทั้งสองชนิดมีศักยภาพที่จะนำไปศึกษาวิจัย เพื่อทดสอบกลไกการรักษาผมหงอกในสัตว์ทดลอง (in vivo) และพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบเวชสำอางสำหรับรักษาอาการผมหงอกก่อนวัยได้



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ สถานที่ และอำนวยความสะดวกจนทำให้งานวิจัยครั้งนี้ ประสบความสำเร็จ ลุล่วงได้เป็นอย่างดี

References

- Choi HK, Lim YS, Kim YS, *et al.* Free-radical-scavenging and tyrosinase-inhibition activities of Cheonggukjang samples fermented for various times. *Food chemistry* 2008; 106(-): 564-568.
- Hideaki M, Noriko H, Yoshiko K, *et al.* Melanogenesis stimulation in Murine B16 melanoma cells by *Piper nigrum* leaf extract and its lignan constituents. *Biol. Pharm. Bull* 2004; 27(-): 1611-1616.
- Itoh T and Furuichi Y. Hot-water extracts from Adzuki Beans (*Vigna angularis*) stimulate not only melanogenesis in cultured Mouse B16 Melanoma cells but also pigmentation of hair color in C3H mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 2005; 69(5): 873-882.
- Jeon SH, Kim KH, Koh JU, *et al.* Inhibitory Effects on L-Dopa Oxidation of Tyrosinase by Skin-whitening Agents. *Bull. Korean Chem.Soc* 2005; 26(7): 1135-1137.
- Jitsanon T, Khanobdee K, Piyachaturawat P, *et al.* Diarylheptanoid 7-(3,4 dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1E)-1-heptene from *Curcuma comosa* Roxb. protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress-induced cell death. *Toxicology in vitro* 2011; 25(-) : 167-176.
- Jung GD, Yang JY, Song SS, *et al.* Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells. *Exp. Mol. Med* 2001; 33(-): 131-135.
- Karin U, Schallreuter, Umar W, *et al.* Human phenylalanine hydroxylase is activated by H₂O₂: a novel mechanism for increasing the L-tyrosine supply for melanogenesis in melanocytes. *Biochemical and Biophysical Research* 2004; 322(-): 88-92.
- Kinlen LJ, Harris R, Garrod A, *et al.* Use for hair dyes by patients with breast cancer: a case-control study. *British medicinal Journal* 1977; 2(-): 366-368.
- Kriengsak T, Unaro JB, Kevin C, *et al.* Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006.19(-): 669-675.
- Kyung TK, Kyung MY, Jin WL, *et al.* Protective effect of steamed American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on V79-4 cells induced by oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 111(-): 443-450.
- Moon JY, Yim EY, Song G, *et al.* Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants. *EurAsian Journal of BioSciences* 2010; 4(-): 41-53.
- Onanong K, Sirithon S, Natthida W, *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *Journal of functional foods* 2011; 3(-): 88-99.
- Petra CA, Rupert O, Katharina S, *et al.* Towards a free radical theory of graying melanocyte apoptosis in the aging human hair follicle is an indicator of oxidative stress induced tissue damage. *The FASEB* 2006; 20(-): 908-920.
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine* 1999; 26(-) : 1231-1237.
- Ronald LP, Xianli W, Karen S, *et al.* Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of agricultural and food chemistry* 2005; 53(-): 4290-4302.
- Tobin DJ and Paus R. Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. *Experimental Gerontology* 2001; 36(-): 29-54.
- Wood JM, Decker H, Hartmann H, *et al.* Senile hair graying: H₂O₂-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair. *The FASEB* 2009; 23(-): 2065-2075.