

ผลของสารสกัดสมุนไพรไทยสี่ชนิดต่อการสังเคราะห์เมลานิน

นางฉัตร เทียนสุวรรณ¹, บังอร ศรีพานิชกุลชัย², นภกิต ใจภักดิ์³

บทคัดย่อ

บทนำ: เมลานินเป็นเม็ดสีที่ทำให้ผิวหนังและเส้นผมมีสีแตกต่างกันไป ภาวะที่มีความผิดปกติหรือสร้างเมลานินน้อยทำให้เกิดสีผิวจางลงและผมหงอกได้ ตำรายาไทยมีการอ้างสรรพคุณสมุนไพรหลายชนิดว่าแก้ผมหงอกได้ แต่ยังคงขาดข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์สนับสนุน **วัตถุประสงค์:** การศึกษานี้ต้องการศึกษาผลของสารสกัด 50% เอทานอลของสมุนไพรไทย 4 ชนิด ได้แก่ กะเม็ง (*Eclipta prostrata* L.) ขิง (*Zingiber officinale* Roscoe.) เทียนกิ่ง (*Lawsonia inermis* L.) ทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz.) ต่อการสร้างเมลานิน **วิธีดำเนินการวิจัย:** ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay (DPPH) และ Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) ฤทธิ์ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง และผลต่อการบวนการสร้างเมลานินด้วยวิธีวัดปริมาณเมลานินในเซลล์เมลานोไซต์ชนิด B16F10 ของสารสกัดสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด **ผลการวิจัย:** พบว่าสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดสมุนไพร มีปริมาณเท่ากับ 68.86±5.61 - 170.21±14.69 มิลลิกรัม/กรัม tannic acid equivalent ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพร ด้วยวิธี DPPH มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 9.93±2.38 - 96.31±6.51 µg/ml และวิธี FRAP มีค่า FRAP value เท่ากับ 72.45±9.4- 733.13±154.62 มิลลิกรัม/กรัมสำหรับฤทธิ์ต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดกะเม็ง และสารสกัดขิง ที่ความเข้มข้น 150 µg/ml สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี (129.21±5.36% และ 144.65±2.68%ตามลำดับ) แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดที่ความเข้มข้น 31.25 - 250 µg/ml ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ B16F10 และเมื่อทดสอบฤทธิ์ต่อการสร้างเมลานินในเซลล์เมลานोไซต์พบว่า สารสกัดกะเม็ง เทียนกิ่ง ทองพันชั่ง ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml และสารสกัดขิง ที่ความเข้มข้น 62.5 µg/ml สามารถเพิ่มปริมาณเม็ดสีเมลานินได้ดี (118.92±5.22%, 129.41±8.17%, 288.97±14.67% และ 117.05±10.47%ตามลำดับ) **สรุปผลการวิจัย:** สารสกัด 50% เอทานอลของสมุนไพรที่ศึกษานี้มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์เมลานोไซต์ได้ ซึ่งอาจสามารถนำมาใช้ช่วยบำรุงเส้นผมให้มีผมหงอกน้อยลงได้

คำสำคัญ: เมลานิน กะเม็ง ขิง เทียนกิ่ง ทองพันชั่ง สารสกัดสมุนไพร

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2559; 11(ฉบับพิเศษ): 33-42

¹นักศึกษานิเทศศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

²ศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

³ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

*ติดต่อผู้พิมพ์: ศ.ดร.บังอร ศรีพานิชกุลชัย ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002 โทรศัพท์/โทรสาร +66-43202521 Fax +66-43202521 E-mail : bungorn@kku.ac.th

Effect of four herb extracts on melanin synthesis

Navachat Teansuwan¹, Bangorn Sripanidkulchai^{2*}, Napaphak Jaipakdee³

Abstract

Introduction: Melanin is a pigment that gives rise to the color of skin and hair. The abnormality of melanin synthesis, resulted in the decrease of melanin contents can cause gray hair. **Objective:** This study aimed to investigate the effect of the 50% ethanolic extracts of *Eclipta prostrata* L.(EP), *Zingiber officinale* Roscoe.(ZO), *Lawsonia inermis* L.(LI) and *Rhinacanthus nasutus* (L.) Kurz.(RN) on melanin synthesis. **Methods:** These extracts were determined for total phenolic content, antioxidant activity by Radical Scavenging Assay(DPPH) and Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP), tyrosinase activity and melanin content in B16F10 melanocyte cells. **Results:** The results showed that the plant extracts had total phenolic content at 68.86±5.61-170.21±14.69 mg/g tannic acid equivalent, antioxidant activity by DPPH assay with IC₅₀ at 9.93±2.38 - 96.31±6.51 µg/ml and FRAP values of 72.45±9.4- 733.13±154.62 mg/g. When compared to the control, tyrosinase activities of ZO and EP extracts at a concentration of 150 µg/ml significantly increased (144.65±2.68 % and 129.21±5.36, respectively at p-value <0.05). All plant extracts at concentrations of 31.25-250 µg/ml had no cytotoxicity to B16F10 cells. EP, LI and RN extracts at a concentration of 250 µg/ml and ZO extract at a concentration of 62.5 µg/ml increased melanin contents (118.92±5.22%, 129.41±8.17%, 288.97±14.67% and 117.05±10.47%, respectively). **Conclusion:** Aqueous-ethanolic extracts of these four plants increased melanin contents in melanocytes and may be used as hair treatment to decrease gray-hair.

Keywords: Melanin, *Ecliptaprostrata*, *Zingiber officinale*, *Lawsonia inermis*, *Rhinacanthus nasutus*

IJPS 2016; 11(Supplement): 33-42

¹Master Student of Faculty of Pharmaceutical Sciences, KhonKaen University, KhonKaen 40002

²Professor, Center for Research and Development of Herbal Health Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KhonKaen University, KhonKaen 40002

³Assistant Professor, Lecturer, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KhonKaen University, KhonKaen 40002

***Corresponding author:** Bangorn Sripanidkulchai Center for Research and Development of Herbal Health Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, KhonKaen University, KhonKaen 40002 Tel +66-43202521 Fax +66-43202521
E-mail: bungorn@kku.ac.th

บทนำ

ภาวะผมหงอกเป็นภาวะคุกคามที่ทำให้ผู้มีผมหงอกมีบุคลิกภาพที่ไม่ดี และ ดูแก่กว่าวัย เพื่อให้มีบุคลิกภาพที่ดีขึ้น ผู้ที่มีผมหงอกจึงปกปิดผมหงอกด้วยการย้อมผม ในปัจจุบันมีความพยายามใช้สารจากธรรมชาติมาช่วยย้อมผมมากขึ้น ในตำรายาแผนโบราณของประเทศไทยมีการอ้างถึงสรรพคุณของสมุนไพรที่ใช้บำรุงรักษาผมหลายชนิด เช่น ขิง มะกรูด ส้มป่อย เทียนกิ่ง ทองพันชั่ง (Chaichantipyuthet *et al.*, 1982; Gritsanapan, 1994; Hiranramded, 1991; Kaiserin, 2003; Karvevoravot, 2001; Ketikajon, 1983; Medical Plant Research Institute, 1997; Nasongkhla, 1982) นอกจากนั้นยังมีการวิจัยเชิงวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสมุนไพรไทยที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของผม เช่น กะเม็ง คำฝอย ขิง (Datta *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2012) การสร้างเม็ดสีเมลานินของเส้นผมนั้น ถูกสร้างขึ้นในส่วนที่เรียกว่าเมลานโซม (melanosome) ในกระบวนการสร้างเม็ดสีนั้นมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) และ tyrosinase-related protein 2 (TRP-2) โดยเอนไซม์ tyrosinase มีหน้าที่เติมหมู่ไฮดรอกซี (Hydroxylation) ให้สาร Tyrosine เกิดเป็น Dihydroxyphenylalanine (DOPA) และต่อมาเกิด Oxidation DOPA ได้เป็น Dopaquinone ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็น Eumelanin ที่มีสีดำหรือสีน้ำตาล และ Phenomelanin ซึ่งมีสีบรอนซ์หรือสีแดงในที่สุด (Filipe *et al.*, 2013; Johnson, 1997) การเกิดผมหงอก เกิดจากเซลล์เมลานโอไซต์ที่รากผมไม่สร้างเม็ดสี หรือสร้างได้ลดลง มีสาเหตุมาจากหลายๆ อย่างรวมกัน เช่น อายุที่เพิ่มขึ้น พันธุกรรม ป่วยเป็นโรคบางอย่าง เช่น ไทรอยด์ โลหิตจาง โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน ได้รับยาบางชนิด หรือ ขาดสารอาหาร ความเครียด สุนัขเห็บ และปัจจัยอื่นๆ (Mirmirani, 2015; Shin *et al.*, 2015)

การศึกษานี้ได้เลือกสมุนไพรที่มีการใช้ในตำรายาแผนโบราณของไทยและมีรายงานการวิจัยเชิงวิทยาศาสตร์ว่าเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของผมมา 4 ชนิด ได้แก่ กะเม็ง ขิง

เทียนกิ่ง และทองพันชั่ง โดยกะเม็งมีรายงานว่าสารสกัดกะเม็งที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถกระตุ้นการงอกของขนในหนู C57/BL6 ได้ (Datta *et al.*, 2009) ซึ่งมีการนำมาใช้รักษาผมร่วงในตำรายาแผนโบราณของไทยโดยนำขิงมาตัดเป็นแว่นใช้ทาบริเวณที่ผมร่วง (Hiranramded, 1991) และมีรายงานว่าสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 5-reductase ในหลอดทดลอง (Kuma *et al.*, 2012) เทียนกิ่งมีการใช้ในตำรายาแผนโบราณของไทย โดยส่วนใบใช้ย้อมผม ทำให้ผมดำ (Chaichantipyuthet *et al.*, 1982; Ketikajon, 1983; Yusuf *et al.*, 2011) และทองพันชั่งมีการใช้ในตำรายาแผนโบราณของไทยโดยส่วนใบใช้รักษาโรคบนผิวหนังและศีรษะที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหนึ่งของผมร่วง (Gritsanapan, 1994; Nasongkhla, 1982) โดย มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของสารสกัดสมุนไพร ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรในด้านการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์เมลานโอไซต์ และการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสในหลอดทดลอง ผลที่ได้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการเลือกใช้สมุนไพรเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับผมในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1.สารเคมี

ferric chloride, ferrous sulfate; potassium dihydrogen phosphate, sodium acetate trihydrate, sodium carbonate, sodium hydroxide (Ajax Finechem, Australia); ethanol (AnalaR Normapur, France); ascorbic acid (Caro erba, Italy); dimethyl sulfoxide (DMSO); methanol (Fisher scientific, UK); Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin, trypsin-EDTA (Gibco, USA); 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Invitrogen, USA); Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Germany); glacial acetic acid, hydrochloric acid (RCI labscan, Thailand); α -melanocyte-stimulating hormone,

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), L-tyrosine, melanin, mushroom tyrosinase, tannic acid (Sigma, Germany); 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (Tokyo Kasei Kogyo Co.Ltd, Japan)

2.การเตรียมสารสกัดสมุนไพร

นำตัวอย่างสมุนไพรส่วนที่ใช้ศึกษา ทั้ง 4 ชนิดที่เก็บจากจังหวัดขอนแก่น โดยกะเม็งเก็บในเดือน กุมภาพันธ์ 2557 ชิงและเทียนกิ่งเก็บในเดือน มีนาคม 2557 และทองพันชั่งเก็บในเดือน มกราคม 2557 (ตารางที่ 1) มาทำความสะอาดและตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนแห้ง จากนั้นบดเป็นผง และนำไปสกัดโดยการหมักด้วย 50% เอทานอล หลังจากกรอง นำส่วนใสไปทำให้แห้งด้วย Rotary evaporator (HB10, IKA, Laboratory Equipment, Malaysia) และทำให้แห้งต่อด้วยเครื่อง Freeze dryer (Martin Christ, Gamma 1-6LS, Germany) จนได้สารสกัดสมุนไพรที่เป็นผงแห้ง และเก็บในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ศึกษาต่อไป

3.การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Makkar *et al.* (1992) โดยใช้กรดแทนนิกเป็นสารมาตรฐาน ทดสอบโดยนำสารสกัดสมุนไพรที่ละลายใน 50% เอทานอลที่มีความเข้มข้น 1mg/ml ปริมาตร 5-75 μ l มาเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ความเข้มข้นร้อยละ 20) ปริมาตร 937.5 μ l จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent (ความเข้มข้น 1N) ปริมาตร 187.5 μ l ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม จากนั้นคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดสมุนไพร โดยเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน และแสดงค่าสารประกอบฟีนอลิกรวมของสารสกัดสมุนไพรในหน่วย มิลลิกรัม สมดุลของกรดแทนนิก (tannic acid equivalent, TAE) ต่อสารสกัดสมุนไพร 1 กรัม

4.การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

4.1 DPPH Radical Scavenging Assay

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Woisky *et al.* (1998) โดยทำการละลายสารสกัดสมุนไพรใน 50 % เอทานอล จากนั้นนำมาทดสอบโดยใช้ปริมาตร 50-100 μ l มาเติม 1 mM DPPH ปริมาตร 14 μ l ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยใช้เมทานอลเป็นตัวควบคุม และใช้วิตามินซีเป็นสารมาตรฐานบวก คำนวณความเข้มข้นที่ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่ 50% (50%inhibition concentration, IC₅₀)

4.2 Ferric Reducing Ability of Plasma

(FRAP)

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Lado *et al.* (2004) โดยนำสารละลายสารสกัดสมุนไพรที่ละลายใน 50 % เอทานอล ความเข้มข้น 1mg/ml ปริมาตร 5-10 μ l มาเติม FRAP reagent (300 mM acetate buffer pH 3.6: 10 mM TPTZ solution: 20mM FeCl₃ solution, 10:1:1) ปริมาตร 180 μ l ทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพร โดยเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นของกราฟมาตรฐาน เฟอร์รัสซัลเฟต และแสดงค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรในรูป FRAP value ในหน่วยมิลลิกรัมสมดุลของเฟอร์รัสซัลเฟตต่อสารสกัดสมุนไพร 1 กรัม

5.การทดสอบผลของสมุนไพรต่อการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

การศึกษาผลของสมุนไพรต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Guan *et al.* (2008) โดยเติมสารละลายสารสกัดสมุนไพรที่ละลายใน 50 % เอทานอล (ความเข้มข้น 0.625 - 10

mg/ml) ปริมาตร 70 μ l ลงในสารละลายไทโรซีนที่ละลายใน 50 mM phosphate buffer pH 6.5 (ความเข้มข้น 2 mM) ปริมาตร 110 μ l จากนั้นเติมเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ดที่ละลายใน 50 mM phosphate buffer pH 6.5 (ความเข้มข้น 167 unit/ml) ปริมาตร 30 μ l จากนั้นทิ้งไว้ให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm โดยใช้สารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นต่างๆเป็นตัวควบคุมจากนั้นคำนวณหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น และแสดงค่าเป็น % control

6.การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ที่ใช้ศึกษาเป็นเซลล์มะเร็งเมลาโนไซต (melanocyte) จากผิวหนังของหนู (*Mus musculus*) ชนิด B16F10 (ATCC, USA) โดยเลี้ยงเซลล์ใน dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย 10% FBS เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน CO₂ incubator ที่มี 5% CO₂ และทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์ ใช้วิธีการ MTT (Zhou *et al.* (2012) โดยนำเซลล์ (2x10⁵ cell/ml) มาบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายสารสกัดสมุนไพรที่ละลายด้วย DMEM นำไปบ่มเลี้ยงต่อใน CO₂ incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาเติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 0.05 mg/ml ที่ละลายใน 10 mM phosphate buffer pH 7.4) หลุมละ 50 μ l วางไว้ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออก เติม DMSO หลุมละ 0.1 ml ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm จากนั้น

คำนวณหา % cell viability และแสดงค่า inhibition concentration at 50% (IC₅₀)

7.การทดสอบผลของสมุนไพรต่อปริมาณเมดิสีเมลานิน

การหาปริมาณเมดิสีเมลานินใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Zhou *et al.* (2012) โดยนำเซลล์ (2x10⁵ cell/ml) มาบ่มเลี้ยงใน CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายสารสกัดสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ และใช้ α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) ที่ความเข้มข้น 12.5 mg/ml เป็นสารมาตรฐานบวกและบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย 10 mM phosphate buffer pH 7.4 จำนวนสองครั้ง เติม 0.25% trypsin หลุมละ 0.250 ml และบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน CO₂ incubator เป็นเวลา 5 นาที ดูดเซลล์ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออก เติม 1 M NaOH หลอดละ 0.1 ml นำไปอุ่นบน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และวัดการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 405 nm คำนวณหาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น และแสดงค่าเป็นปริมาณเมลานินในหน่วย % of control

ผลการวิจัย

1. % yield ของสารสกัดสมุนไพร

สารสกัด 50 % เอทานอล ของสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดที่ได้มีลักษณะเป็นผงแห้ง มี %yield แตกต่างกัน โดยเทียบกึ่งให้ปริมาณสูงสุด รองลงมาคือ ทองพันชั่ง ชิงและกะเม็งตามลำดับ (ตารางที่1)

ตารางที่ 1 ชื่อสมุนไพร ส่วนที่ใช้ในการศึกษา ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด 50% เอทานอล และ ปริมาณที่สกัดได้ (%yield)

ชื่อสมุนไพร	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ส่วนที่ใช้	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด 50% ethanol	Percent yield
กะเม็ง	<i>Eclipta prostrata</i> L.	ASTERACEAE	ส่วนเหนือดิน	ผงแห้ง สีเขียวเข้ม	7.35
ขิง	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	ZINGIBERACEAE	เหง้า	ผงแห้ง สีเหลือง	15.71
เทียนกิ่ง	<i>Lawsonia inermis</i> L. <i>Rhinacanthus nasutus</i> (L.)	LYTHRACEAE	ใบ	ผงแห้ง สีเหลืองส้ม	36.55
ทองพันชั่ง	Kurz.	ACANTHACEAE	ใบ	ผงแห้ง สีเขียวเข้ม	17.9

2. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

พบว่าสารสกัดสมุนไพรมีสารฟีนอลิกรวมเท่ากับ 68.86 ± 5.61 ถึง 170.21 ± 14.69 มิลลิกรัม/กรัม TAE โดยสารสกัดเทียนกิ่งมีสารประกอบฟีนอลิกรวม

มากที่สุด รองลงมาคือ ทองพันชั่ง ขิง และกะเม็ง ตามลำดับ สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP พบว่า สารสกัดเทียนกิ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดทองพันชั่ง ขิง และกะเม็ง ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

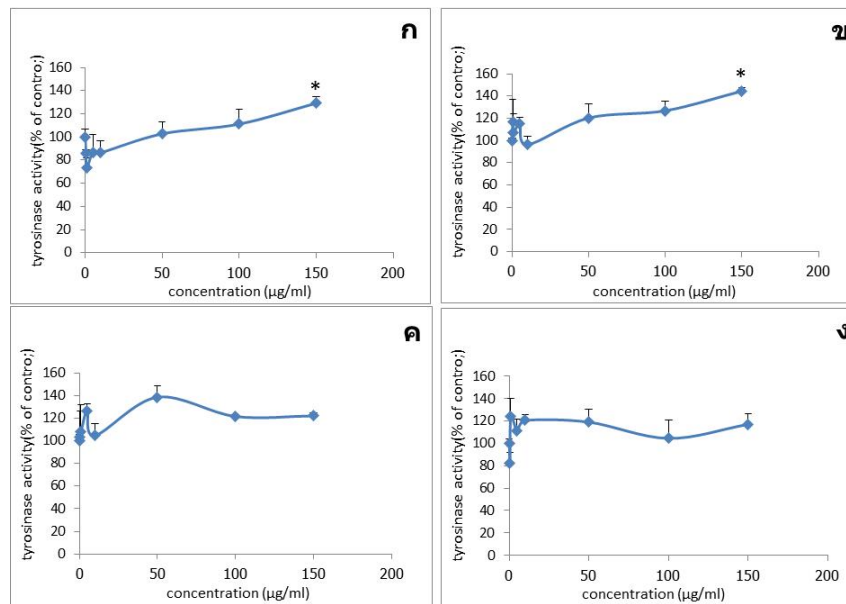
สมุนไพร	total phenolics (mg TAE/g)	Antioxidative activity	
		DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	FRAP value (mg/g)
กะเม็ง	68.86 ± 5.61	96.31 ± 6.51	72.45 ± 9.4
ขิง	76.8 ± 3.14	69.57 ± 4.55	205.68 ± 20.02
เทียนกิ่ง	170.21 ± 14.69	9.93 ± 2.38	733.13 ± 154.62
ทองพันชั่ง	125.25 ± 9.69	55.56 ± 7.71	215.19 ± 20.69
วิตามินซีมาตรฐาน	-	2.92 ± 0.16	-

*แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SD (n=3)

3. ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส

การศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า สารสกัดกะเม็งที่ความเข้มข้นต่ำมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เล็กน้อย และเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นที่ 150 µg/ml สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (129.21 ± 5.36 % of control) สารสกัดขิงที่ความเข้มข้นต่ำ ไม่มีผลต่อ

การทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น โดยเฉพาะที่ 150 µg/ml สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (144.65 ± 2.68 % of control) สารสกัดเทียนกิ่งและทองพันชั่งที่ความเข้มข้นที่ทดสอบ (0.5-150 µg/ml) ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (รูปที่ 1)

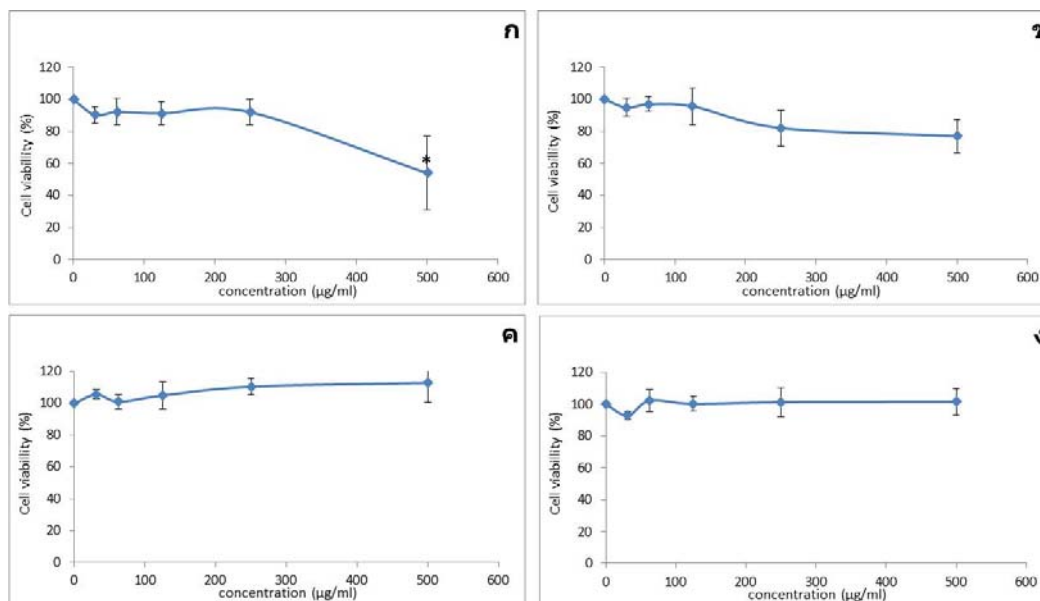


รูปที่ 1 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อเอนไซม์ไทโรซิเนส ก=กะเม็ง, ข=ขมิ้น, ค=เทียนกิ่ง และ ง =ทองพันชั่ง แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SE(n=3), *= แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$

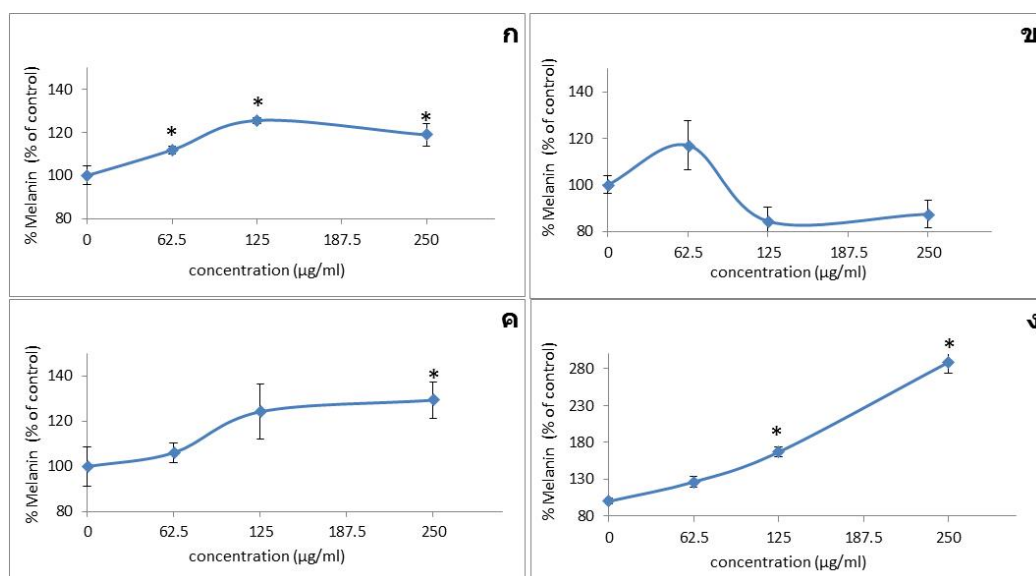
4. ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อปริมาณเมลานินในเซลล์เพาะเลี้ยง

เมื่อทดสอบความเป็นพิษของสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง B16F10 โดยใช้วิธี MTT พบว่า สารสกัดสมุนไพรเมื่อบ่มเพาะเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 31.25 - 250 µg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (รูปที่ 2) ดังนั้นจึงทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่อปริมาณเมลานินที่ความเข้มข้น 62.5-250 µg/ml พบว่าสารสกัดกะเม็งสามารถเพิ่มปริมาณเม็ดสีเมลานินได้ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (111.88 ± 1.95 - $125.62 \pm 1.26\%$ of control) สารสกัดขมิ้นสามารถเพิ่ม

ปริมาณเม็ดสีเมลานินได้ที่ความเข้มข้น 62.5 µg/ml ($117.05 \pm 10.47\%$ of control) และที่ความเข้มข้นสูง ขึ้น (125-250 µg/ml) ลด การ ส ร ้าง เม ล า นิน (84.37 ± 6.18 - $87.48 \pm 6.05\%$ of control) ส่วนสารสกัดเทียนกิ่งและทองพันชั่งสามารถเพิ่มปริมาณเม็ดสีเมลานินได้ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (106.14 ± 4.46 - $129.41 \pm 8.17\%$ และ 126.29 ± 7.56 - $288.97 \pm 14.67\%$ of control) การทดสอบนี้ใช้ α -MSH เป็นสารมาตรฐาน พบว่าที่ความเข้มข้น 12.5 µg/ml สามารถเพิ่มปริมาณเมลานินได้ $115.40 \pm 14.37\%$ (รูปที่ 3)



รูปที่ 2 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงเมลานोไซต์ เมื่อได้รับสารสกัดสมุนไพรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก=กะเม็ง, ข=ขมิ้น, ค=เทียนกิ่ง, ง=ทองพันชั่ง แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SE(n=3), * = แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$



รูปที่ 3 ผลของสารสกัดสมุนไพรต่อปริมาณเมดสีเมลานินในเซลล์เพาะเลี้ยงก=กะเม็ง, ข=ขมิ้น, ค=เทียนกิ่งและ ง=ทองพันชั่ง แสดงค่าเป็น mean $\pm$ SE(n=3), * = แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ $p < 0.05$

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดมีความสามารถในการเพิ่มปริมาณเมลานินของเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด B16F10 ได้ดี โดยพบว่าสารสกัดกะเม็ง เทียนกิ่ง และทองพันชั่งสามารถเพิ่มปริมาณเม

ลานินได้ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบคือ (62.5-250 µg/ml) ส่วนสารสกัดขมิ้นสามารถเพิ่มเมลานินได้ที่มีความเข้มข้นต่ำ แสดงถึงสารสำคัญที่แตกต่างกันของสมุนไพรเหล่านี้ เมื่อเปรียบเทียบกับพบว่าทองพันชั่งมีฤทธิ์สูงสุด รองลงมาคือ เทียนกิ่ง กะเม็ง และขมิ้น

ตามลำดับ สำหรับผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่พบว่ากะเม็งและขิงสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ได้ บ่งชี้ว่าสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเพิ่มเมลานินได้ผ่านการการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส นอกเหนือจากนี้ยังเคยมีรายงานว่ากะเม็งสามารถกระตุ้นการงอกของขนในหนู C57/BL6 (Datta *et al.*, 2009) และขิงสามารถยับยั้งเอนไซม์ 5 α -reductase ซึ่งเป็นสาเหตุของผมร่วงและศีรษะล้าน (Kumar *et al.*, 2012) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนับสนุนว่าทั้งกะเม็งและขิงนอกจากมีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นผมแล้วยังมีผลเพิ่มปริมาณเมลานินได้อีกด้วย จึงสนับสนุนการใช้สมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับเส้นผมสำหรับทองพันชั่งที่มีการใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับเส้นผมและไม่เคยมีรายงานเชิงวิทยาศาสตร์มาก่อนนั้น งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่แสดงให้เห็นว่าทองพันชั่งสามารถเพิ่มเมลานินได้และอาจทำงานผ่านกลไกอื่น ๆ นอกจากเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งควรได้มีการพิสูจน์และศึกษาต่อไป เช่นเดียวกับเทียนกิ่งซึ่งเป็นพืชที่นิยมมาใช้อยู่ในผมพบว่าเพิ่มเมลานินได้โดยไม่มีผลเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเช่นกัน จึงควรได้ศึกษาในรายละเอียดต่อไป งานวิจัยนี้ยังได้พบว่าสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 4 ชนิดนี้มีสารสำคัญในกลุ่มสารฟีนอลิกสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ จึงควรได้ศึกษาหาสารสำคัญที่มีผลเหล่านี้ในสมุนไพรแต่ละชนิดต่อไป อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้สนับสนุนการใช้สมุนไพรในผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับเส้นผม ทั้งในด้านกระตุ้นการเจริญของผม ป้องกันผมร่วงและทำให้ผมมีสีดำได้ จึงควรได้มีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบที่เหมาะสมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี ใน การวิจัยนี้

References

- Chaichan tipyuth C, Poonsook K, Harntokoon M, Rengsomrang S. *Herbals* vol 1, 2nd. Vorasanemunechon, Bangkok 1982.
- Datta K, Singh AT, Mukherjee A, Bhat B, Ramesh B, Burman AC. *Eclipta alba*. extract with potential for hair growth promoting activity. *J Ethnopharmacol* 2009; 124(3): 450-456.
- Filipe D, Moura L. Mechanisms regulation melanogenesis. *An Bras Dermatol* 2013; 88(1): 76-83.
- Gritsanapan W. *About Herbs*. Chulalongkorn University Printing House, Bangkok 1994.
- Guan S, Su W, Wang N, Li P, Wang Y. A Potent Tyrosinase Activator from *Radix Polygonimultiflora* and its Melanogenesis Stimulatory Effect in B16 Melanoma Cells. *Phytother Res* 2008; 22(5): 660-663.
- Hiranramded S. *Local Herbal*. Chiang Mai University Printing House, Chiang Mai 1991. Johnson DH. (Eds.), *Hair and Hair Care*. CRC Press, London 1997.
- Kaiserin K. *Herb for Beauty Health*. Thammasan Printing, Bangkok 2003.
- Karvevoravot C. *Handbook of Herbals and Medicines*. Chulalongkorn University Printing House, Bangkok 2001.
- Ketikajon S. *Handbook of Thai Traditional herbal medicines*. Akson Thai Printing, Bangkok 1983.
- Kumar N, Rungseewijitprapa W, Narkkhong NA, Suttajit M, Chaiyasut C. 5 α -reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment. *J Ethnopharmacol* 2012; 139(3): 765-771.

- Lado C, Then M, Varga I, Szoke E, Szentmihalyi K. Antioxidant Property of Volatile Oils Determined by the Ferric Reducing Ability. *Z Naturforsch C*2004; 59(5-6): 354-358.
- Makkar HPS, Blummel K, Borowy NK, Becker k. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J Sci Food Agric* 1992; 61(2): 161-165.
- Medical Plant Research Institute. traditional herbals, 3rd. Paliving Printing, Bangkok 1997.
- Mirmirani P. Age-related hair changes in men: Mechanisms and management of alopecia and graying. *Maturitas* 2015; 80(1): 58-62.
- NaSongkhla B. Thai herbals vol 1, 2nd. Publisher Funny Pubbiting, Bangkok 1982.
- Shin H, Ryu HH, Yoon J, et al. Association of premature hair graying with family history, smoking and obesity: A cross-sectional study. *J Am AcadDermatol*.2015; 72(2): 321-327.
- Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apic Res* 1998; 37(2): 99-105.
- Yusuf M, Shahid M, Khan MI, Khan S, Khan MA. Mohammad, F., 2011.Dyeing studies with henna and madder: A research on effect of tin (II) chloride mordant.*J SaudiChem Soc.* 19(1), 64-72.
- Zhou J, Shang J, Ping F, Zhao G. Alcohol extract from *Vernoniaanthelmintica* (L.) willd seed enhances melanin synthesis through activation of the p38 MAPK signaling pathway in B16F10 cells and primary melanocytes. *J Ethnopharmacol* 2012; 143(2): 639-647.