ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของฟลาโวนอยด์จากกระดังงาจีน

Free Radical Scavenging and Tyrosinase Inhibitory activities of flavonoids from *Artabotrys hexapetalus*

นุตติยา วีระวัธนชัย และ ระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์*

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

*E-mail: rawiwun@yahoo.com

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสในสารสกัดเมธานอลของใบกระดังงาจีนและแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีและพิสูจน์เอกลักษณ์โครงสารที่แยกได้ด้วยวิธีทางสเปคโตรสโคปี ได้เป็นฟลาโวนอยด์ 3 ชนิด เมื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (**3**) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 11.25 μM ส่วน apigenin 7- *O*-β-D-glucopyranoside (**2**) ออกยับยั้งไทโรซิเนสได้ที่ดีที่สุด แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 23.15 μM

คำสำคัญ : กระดังงาจีน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส ฟลาโวนอยด์

Abstract

In this study, methanol extract from leaves of *Artabotrys hexapetalus* were evaluated for free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities. Three flavonoids were isolated by chromatographic techniques and their structures were identified by spectroscopic methods. Their biological activities were evaluated. Quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (**3**) showed the highest DPPH free radical scavenging activity at IC_{50} 11.25 μM. Apigenin 7- *O*-β-D-glucopyranoside (**2**) exhibited the best tyrosinase inhibitory activity with IC_{50} 23.15 μM.

Keywords : *Artabotrys hexapetalus*, free radical scavenging, tyrosinase inhibitory, flavonoids

1. บทนำ

อนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นสารที่ไม่เสถียร จึงมีความว่องไว สามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดไขมัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของร่างกายได้ ปกติร่างกายจะมีระบบกำจัดอนุมูลอิสระ แต่บางภาวะ เช่น ร่างกายเจ็บป่วย การได้รับมลภาวะจากภายนอกจะทำให้ร่างกายกำจัดอนุมูลอิสระไม่หมดซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะ oxidative stress หากมีภาวะเช่นนี้ต่อเนื่องนานๆ จะทำให้เกิดโรค เช่น มะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด หรือโรคทางสมองบางชนิด เช่น Alzheimer รวมทั้งทำให้ผิวหนังเกิดการแก่ (skin aging) [1] ดังนั้น สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น α-tocopherol, catechin, L-ascorbic acid จึงนิยมใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอาง

เมลานิน (Melanins) เป็นเม็ดสีของผิวหนัง ทำให้มนุษย์มีสีผิวที่ต่างกัน เมลานินทำหน้าที่ป้องกันผิวจากแสงแดด แต่หากมีเมลานินมากเกินไปจะทำให้ผิวหนังมีสีคล้ำ ทำให้เกิดฝ้า และภาวะเม็ดสีมาก กระบวนการสร้างเมลานินเกิดขึ้นโดยมีไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์จำกัดอัตรา ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาระหว่าง tyrosine กับ oxygen ได้เป็น dopa และช่วยเร่งปฏิกิริยาระหว่าง dopa กับ oxygen ได้เป็น dopaquinone ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อจนได้เมลานิน [2] สารที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส เช่น arbutin, kojic acid จึงนำมาใช้รักษาภาวะสีผิวปกติ [3] ปัจจุบันยังเป็นส่วนผสมสำคัญในเครื่องสำอางที่ทำให้ผิวขาวด้วย [4] อนุมูลอิสระมีความเกี่ยวข้องกับการสร้างเมลานิน เนื่องจากอนุมูลอิสระเหนี่ยวนำให้เพิ่มการสร้างเมลานิน [5] และสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้ง tyrosinase ได้ [6]

กระดังงาจีนหรือ Climbling ylang ylang (*Artabotrys hexapetalus* (L.f.) Bhandari, *A. odoratissimus* R. Br., *A. uncinatus* (Lam.) Merr) เป็นพืชในวงศ์กระดังงา

(Annonaceae) ปลูกมากทางจีนตอนใต้ และปลูกเป็นไม้ประดับแพร่หลายในไทย ตำรายาจีนใช้รากและผลเพื่อรักษาโรคมาลาเรียและวัณโรคชนิด scrofula การศึกษาทางพฤกษ-เคมีพบสารกลุ่ม terpenes, steroids, alkaloids, flavonoids, acetogenins [7] น้ำมันหอมระเหย [8] anthraquinones [9] และ lignans [10] การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพพบฤทธิ์ต้านจุลชีพและฤทธิ์ต้านเชื้อรา [11] ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด [12] และฤทธิ์ต้านมาลาเรีย [13] จากการทดสอบเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยพบว่า สารสกัดหยาบชั้น methanol จากใบกระดังงาจีน แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจแยกและศึกษาสารออกฤทธิ์จากสารสกัดหยาบชั้น methanol ของใบกระดังงาจีน

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

L-DOPA, kojic acid (Acros Organics, USA), methanol A.R. grade (Carlo Erba, Italy), mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich, USA), L-ascorbic acid (Carlo Erba, Italy), hexane, ethyl acetate, methanol commercial grade (อิตัลมาร์ ประเทศไทย), Sephadex LH 20 (Pharmacia, Sweden), silica gel 60 (E. Merck, Germany), C-18 reverse phase silica gel (E. Merck, Germany), microplate reader (Dynex, USA), NMR spectrometer (Bruker 500 spectrometer, USA), mass spectrometer (MATT 95 XL spectrometer, Thermo finnigan, USA), rotary evaporator (Buchi, Switzerland)

ตัวอย่างพืช

เก็บพืชตัวอย่างจาก อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี นำมาตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ โดยเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้แห้งในหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

วิธีการสกัดและแยกสาร

นำส่วนใบของกระดังงาจีนล้างให้สะอาด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 $^{\circ}$ C นำใบแห้ง 1.2 kg ที่บดแล้วมาสกัดตัวทำละลาย methanol (3X2 L) นำสารสกัดไประเหยให้แห้งโดยใช้เครื่องมือ rotary evaporator นำสารสกัดหยาบจากใบชั้น methanol 30 g มาแยกให้เป็นส่วนสกัดย่อยด้วยเทคนิค column chromatography โดยใช้ silica gel 60 เป็น stationary phase และใช้ตัวทำละลายผสมระหว่าง ethyl acetate:methanol (100:0-0:100) เป็น mobile phase รวมสารที่มีรูปแบบการเคลื่อนที่บน normal phase TLC เหมือนกัน จะได้ส่วนสกัดย่อย (fraction) ทั้งหมด 7 ส่วน นำส่วนสกัดย่อยทั้งหมดไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ และแยกด้วยวิธีทาง column chromatography ต่างๆ ต่อไปจนได้สารบริสุทธิ์

แยกส่วนสกัด A5 (0.8 g) ด้วย gel filtration column chromatography โดยใช้ Sephadex LH 20 เป็น stationary phase ส่วน mobile phase ใช้ methanol จากนั้นแยกต่อไปด้วย column chromatography โดยใช้ C-18 reverse phase silica gel เป็น stationary phase และใช้ 40% water ใน methanol เป็น mobile phase จะได้สารประกอบ (**1**) (4 mg) และสารประกอบ (**2**) (4 mg) นำส่วนสกัดย่อยที่ A6 (1.0 g) มาแยกด้วย Sephadex LH-20 gel column chromatography แยกต่อไปด้วย C-18 reverse phase column chromatography โดยใช้ acetonitrile:water (60:40) เป็น mobile phase จะได้สารประกอบ (**3**) (10 mg) ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่แยกได้โดยใช้เทคนิค mass spectrometry, 1D และ 2D NMR spectrometry

วิธีการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ชั่งส่วนสกัดแล้วนำมาละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 1 mg/ml เติมสารที่ต้องการทดสอบ 20 µl ลงใน 96-well plate จากนั้นใส่สารละลาย DPPH 180 µl เก็บไว้เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm โดยใช้เครื่องมือ microplate reader คำนวณ % การต้านอนุมูลอิสระ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมี L-ascorbic acid เป็น positive control [14] สำหรับการหาค่า IC_{50} ของสารบริสุทธิ์ทำโดยเตรียมสารความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นเจือจางต่ออีก 4-5 ความเข้มข้น ทำการทดสอบเช่นเดียวกับสารสกัด หาค่า IC_{50} ของสารด้วยโปรแกรม GraphPad (Prism, USA)

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ชั่งส่วนสกัดแล้วนำมาละลายด้วย methanol ปรับปริมาตรให้ได้ 1 mg/ml เติม L-DOPA 20 µl ลงใน 96-well plate ไปเปตสารที่ต้องการทดสอบ 20 µl เติมสารละลาย tyrosinase 20 µl บ่มที่อุณหภูมิ 32$\pm$2 $^{\circ}$ C นำไปวัดค่าการดูดกลืนที่ 490 nm โดยใช้ microplate reader คำนวณ % การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ kojic acid เป็น positive control [15] สำหรับการหาค่า IC_{50} ของ

สารบริสุทธิ์โดยเตรียมสารความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นเจือจางต่ออีก 4-5 ความเข้มข้น ทำการทดสอบเช่นเดียวกับสารสกัด หาค่า IC_{50} ของสารด้วยโปรแกรม GraphPad (Prism, USA)

3. ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลการศึกษาสารที่แยกได้โดยวิธีสเปคโตรสโคปี

Quercetin 3-*O*-α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinofuranoside (**1**)

FABMS: m/z (%) 581 ($[M+H]^+$), 324 (33), 144 (100); ^{1}H NMR (500 MHz, methanol-d_4): δ 6.19 (1H, d, *J* = 1.0 Hz, H-6), 6.36 (1H, d, *J* = 1.0 Hz, H-8), 7.84 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-2′), 6.89 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5′), 7.48 (1H, dd, *J* = 1.6, 8.4 Hz, H-6′), 5.66 (1H, d, *J* = 1.0 Hz, H-1″), 4.42 (1H, dd, *J* = 1.0, 2.8 Hz, H-2″), 3.40 (1H, dd, *J* = 2.8, 4.3 Hz, H-3″), 3.88 (1H, dd, *J* = 4.3, 5.4 Hz, H-4″), 3.48 (2H, dd, J = 4.3, 8.1 Hz, H-5″), 4.94 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-1‴), 3.79 (1H, dd, *J* = 1.7, 2.0 Hz, H-2‴), 3.59 (1H, dd, *J* = 2.0, 9.5 Hz, H-3‴), 3.37 (1H, t, *J* = 9.5 Hz, H-4‴), 3.66 (1H, dd, *J* = 6.1, 9.5 Hz, H-5‴), 1.20 (3H, d, *J* = 6.1 Hz, CH_3-6‴); ^{13}C NMR (125 MHz, methanol-d_4): δ 149.9 (C-2), 134.8 (C-3), 179.7 (C-4), 163.0 (C-5), 100.1 (C-6), 166.9 (C-7), 94.9 (C-8), 158.6 (C-9), 107.7 (C-10), 123.0 (C-1′), 117.1 (C-2′), 146.4 (C-3′), 158.9 (C-4′), 116.5 (C-5′), 122.9 (C-6′), 105.3 (C-1″), 88.4 (C-2″), 77.2 (C-3″), 87.7 (C-4″), 62.4 (C-5″), 101.3 (C-1‴), 72.3 (C-2‴), 72.1 (C-3‴), 73.9 (C-4‴), 70.4 (C-5‴), 17.8 (CH_3-6‴).

Apigenin 7-*O*β-D-glucopyranoside (**2**)

EIMS: *m/z* (%) 432 ($[M]^+$, 5), 132 (100), 114 (65) ^{1}H NMR (500 MHz, methanol-d_4): δ 6.65 (1H, s, H-3), 6.81 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 6.49 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 7.87 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2′), 6.91 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, H-3′), 6.91 (1H, d, *J* = 8.9 Hz, H-5′), 7.87 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-6′), 5.05 (1H, d, *J* = 7.1 Hz, H-1″), 3.50 (1H, dd, *J* = 5.1, 9.1 Hz, H-2″), 3.48 (1H, dd, *J* = 8.4, 9.1 Hz, H-3″), 3.38 (1H, dd, *J* = 8.4, 9.5 Hz, H-4″), 3.52 (1H, m, H-5″), 3.91 (1H, dd, *J* = 2.1, 12.2 Hz, H-6″), 3.69 (1H, dd, *J* = 5.8, 12.2 Hz, H-6″); ^{13}C NMR (125 MHz, methanol-d_4): δ 166.7 (C-2), 149.8 (C-3), 184.0 (C-4), 158.9 (C-5), 98.7 (C-6), 164.8 (C-7), 93.5 (C-8), 162.9 (C-9), 103.9 (C-10), 123.0 (C-1′), 129.6 (C-2′), 117.0 (C-3′), 162.9 (C-4′), 117.0 (C-5′), 129.6 (C-6′), 101.6 (C-1″), 77.8 (C-2″), 74.7 (C-3″), 71.2 (C-4″), 78.3 (C-5″), 62.4 (C-6″)

Quercetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (**3**)

FABMS: *m/z* (%) 611 ($[M+H]^+$, 1), 324 (35), 132 (70) ^{1}H NMR (500 MHz, methanol-d_4): δ 6.20 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-6), 6.39 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-8), 7.65 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2′), 6.86 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5′), 7.61 (1H, dd, *J* = 2.1, 8.6 Hz, H-6′), 5.08 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1″), 3.30 (1H, m, H-2″), 3.45 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, H-3″), 3.25 (1H, m, H-4″), 3.38 (1H, m, H-5″), 3.78 (1H, dd, *J* = 1.4, 11.3, Hz, H-6″), 3.36 (1H, d, *J* = 11.3 Hz, H-6″), 4.51 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-1‴), 3.62 (1H, dd, *J* = 1.5, 3.4 Hz, H-2‴), 3.52 (1H, dd, *J* = 3.4, 9.6 Hz, H-3‴), 3.29 (1H, m, H-4‴), 3.43 (1H, dd, *J* = 6.2, 8.4 Hz, H-5‴), 1.10 (3H, d, *J* = 6.2 Hz, CH_3-6‴); ^{13}C NMR (125 MHz, methanol-d_4): δ 149.7 (C-2), 135.6 (C-3), 179.3 (C-4), 162.9 (C-5), 99.9 (C-6), 166.0 (C-7), 94.8 (C-8), 158.4 (C-9), 105.5 (C-10), 123.1 (C-1′), 117.6 (C-2′), 145.8 (C-3′), 159.3 (C-4′), 116.0 (C-5′), 123.5 (C-6′), 104.7 (C-1″), 77.1 (C-2″), 75.7 (C-3″), 71.3 (C-4″), 78.5.4 (C-5″), 68.5 (C-6″), 102.4 (C-1‴), 72.0 (C-2‴), 72.2 (C-3‴), 73.9 (C-4‴), 69.7 (C-5‴), 17.8 (CH_3-6‴)

ผลการศึกษาสารที่แยกได้ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase

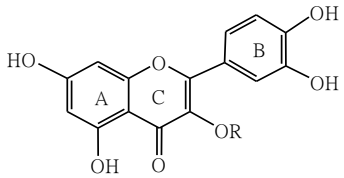
เมื่อนำสารสกัดหยาบชั้น methanol ของใบกระดังงาจีนมาแยกได้เป็นส่วนสกัดย่อย 7 ส่วน (A1-A7) นำส่วนสกัดย่อยทั้งหมดมาศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase พบว่าที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ส่วนสกัดย่อย A5 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 21.48±8.89 % และมีฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase 40.51±4.81 % ขณะที่ส่วนสกัดย่อย A6 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 40.54±1.18 % และแสดงฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase 43.60±7.49 % ผลการทดสอบฤทธิ์ของส่วนสกัดย่อยทั้งหมดแสดงในตาราง **1** จากนั้นนำส่วนสกัดย่อย A5 และ A6 แยกต่อไปเพื่อให้ได้สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ด้วยเทคนิคทาง chromatography พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารที่แยกได้โดยใช้เทคนิค mass spectrometry, 1D และ 2D NMR spectrometry และนำค่าที่ได้เปรียบเทียบข้อมูล

จากเอกสารอ้างอิงพบว่า สารประกอบที่แยกได้ทั้งหมดเป็นสารกลุ่ม flavonoid glycosides โดยสารประกอบ (**1**) คือ quercetin3-*O*–α–L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinofuranoside หรือ arapetaloside A เป็นสารที่ยังไม่มีรายงานการพบในพืชอื่น และยังไม่พบรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ [16], [17] ส่วนสารประกอบ (**2**) เป็น apigenin 7-*O*–β–D-glucopyranoside [18] และสารประกอบ (**3**) ได้แก่ quercetin 3-*O*–α–L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside หรือ rutin [19] สูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ **1**

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยทำการเปรียบเทียบความแรงของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารที่แยกได้ทั้ง 3 ชนิด พบว่า ค่า IC_{50} ของสารประกอบ (**2**) > สารประกอบ (**1**) > สารประกอบ (**3**) แสดงว่าสารประกอบ (**3**) ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดและเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase พบว่าค่า IC_{50} ของสารประกอบ (**3**) > สารประกอบ (**1**) > สารประกอบ (**2**) แสดงว่าสารประกอบ (**2**) ออกฤทธิ์ฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ได้ดีที่สุด (ตารางที่ **2**)

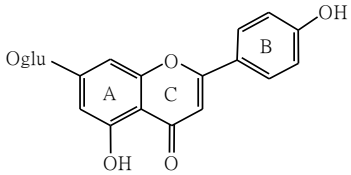
Flavonoids เป็นสารธรรมชาติกลุ่มหนึ่งที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี จากผลการศึกษานี้พบว่า สารประกอบ (**1**) และ (**3**) มีส่วน aglycone เป็น flavonol แต่สารประกอบ (**2**) ส่วน aglycone เป็น flavone สารประกอบ (**1**) และ (**3**) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าสารประกอบ (**2**) เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างเคมีกับการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 3 ชนิด พบว่าส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ flavonoids จะอยู่ที่การมี 3′,4′-ortho-dihydroxy ของ ring B ซึ่งจะพบในสารประกอบ (**1**) และ (**3**) แต่สารประกอบ (**2**) มีเพียง 4′-hydroxy บน ring B จึงทำให้สารประกอบ (**2**) แสดงฤทธิ์ไม่ดีเท่าสารประกอบ (**1**) และ(**3**) ส่วน ring A ไม่ค่อยมีผลต่อการออกฤทธิ์ ดังนั้นการมีน้ำตาลแทนที่อยู่ตำแหน่งที่ 7 จึงไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบ (**3**) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Rice-Evans และคณะเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างของ flavonoids กับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [20]

กลไกหนึ่งของการออกฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของ flavonoids เกิดจากการเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [6] นอกจากนั้นรายงานการศึกษาอื่นๆ พบว่า flavonoid glycosides ออกฤทธิ์ได้ไม่ดีเท่า flavonoid aglycones [21] เมื่อนำสารที่แยกได้ทั้งหมดมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase พบว่าสารประกอบ (**2**) ออกฤทธิ์ดีกว่าสารประกอบ (**1**) และ (**3**) เล็กน้อย ถึงแม้สารประกอบ (**1**) และ (**3**) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารประกอบ (**2**) อย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องจากการมีจำนวนโมเลกุลของน้ำตาล และตำแหน่งที่แทนที่บน aglycone ที่ต่างกัน โดยที่สารประกอบ (**1**) และ (**3**) จะเป็น 3-*O*-diglycoside ส่วนสารประกอบ (**2**) จะเป็น 7-*O*-glycoside ซึ่งตำแหน่งการแทนที่และจำนวนโมเลกุลน้ำตาลอาจจะส่งผลรบกวนการเข้าจับกับ active site ของ tyrosinase ดังนั้นนอกจากสมมติฐานกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของ flavonoids ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว ยังอาจจะออกฤทธิ์ผ่านกลไกการอื่นๆ เช่น การเป็น alternative substrate ของ tyrosinase หรือเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเมลาโนไซต์ซึ่งเป็นผลทำให้เพิ่มการสร้างเมลานิน [22]



(1) R=α-L-rham-(1→2)-α-L-ara

(2) R=α-L-rham-(1→6)-β-D-glu



(3)

รูปที่ 1 สารประกอบ 1, 2 และ 3 ที่แยกจากกระดังงาจีน

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของส่วนสกัดย่อยจากกระดังงาจีน

ส่วนสกัดย่อย	% DPPH scavenging activity (mean±S.D.)	% Tyrosinase inhibitory activity (mean±S.D.)
A1	19.98±2.64	10.66±8.58
A2	25.80±1.92	22.09±3.05
A3	30.01±2.54	19.48±0.54
A4	31.89±0.36	19.66±4.41
A5	21.48±8.89	40.51±4.81
A6	40.54±1.18	43.61±7.49
A7	26.03±1.11	13.03±12.41
L-ascorbic acid	72.06±1.24	-
Kojic acid	-	76.14±1.30

ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ของสารประกอบ 1, 2 และ 3 ที่แยกได้จากส่วนสกัดย่อยของกระดังงาจีน

สารประกอบ	IC_{50} ของ DPPH scavenging activity (μM)	IC_{50} ของ Tyrosinase inhibitory activity (μM)
1	13.39	38.52
2	687.50	23.15
3	11.25	42.91
L-ascorbic acid	17.98	-
Kojic acid	-	0.19

4. สรุปและเสนอแนะ

นำสารสกัดหยาบชั้น methanol จากใบกระดังงาจีนมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase สามารถแยกสารออกฤทธิ์ได้เป็น flavonoids 3 ชนิด ได้แก่ quercetin 3-*O*–α–L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinofuranoside (**1**) apigenin 7-*O*–β–D-glucopyranoside (**2**) และquercetin 3-*O*–α–L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside (**3**) โดยสารประกอบ (**1**) และ (**3**) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารประกอบ (**2**) แต่สารประกอบ (**2**) ยับยั้ง tyrosinase ได้ดีกว่าสารประกอบ (**1**) และ (**3**)

ขั้นตอนต่อไปที่ควรทำการศึกษาคือ นำสารประกอบทั้ง 3 ชนิด ไปทดสอบฤทธิ์เหล่านี้กับเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) และหาความพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase ในเซลล์ และความเป็นพิษของสารที่แยกได้

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. 1993. “Antioxidants, and the degenerative diseases of aging”. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 90 (17): 7915-7922.

[2] Hearing, V.J. 2005. “Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function”. **J. Dermatol. Sci.** 37(1): 3-14.

[3] Seo, S.Y., Sharma, V.K. and Sharma, N. 2003. “Mushroom tyrosinase: recent prospects”. **J. Agric. Food Chem.** 51(10): 2837-2853.

[4] Funasaka, Y., Komoto, M. and Ichihashi, M. 2000. “Depigmenting effect of alpha-tocopheryl ferulate on normal human melanocytes”. **Pigment Cell Res.** 13 (suppl 8): 170-174.

[5] Wood, J.M. and Schallreuter, K.U. 1991. “Studies on human tyrosinase superoxide anion, hydrogen peroxide and thiols”. **Biochem Biophys Acta.** 1074(3): 378-385.

[6] No, J.K. and et al. 1999. “Inhibition of tyrosinase by green tea components”. **Life Sci.** 65(21): 241-246.

[7] Wong, H.F. and Geoffrey, D. 2002. ”β-Methoxy-γ-methylene-α,β-unsaturated-γ-butyrolactones from *Artabotrys hexapetalus*”. **Phytochemistry.** 59 (1): 99-104.

[8] Phan, G.M., Phan, S.T. and Koenig, W.A. 2007. “Chemical composition of the flower essential oil of *Artabotrys hexapetalus* of Vietnam”. **J. Essential Oil Res.** 19(6): 523-524.

[9] Singh, N. and et al. 2005. “Anthraquinones from *Artabotrys odoratissimus* (Leaves)”. **Indian J. Chem. Sec B.** 44B(8): 1740-1741.

[10] Yu, J.G. and et al. 2002. “Neo-lignans and hemiterpenoid from the seeds of *Artabostrys hexapetalus* (Annonaceae)”. **J. Chinese Pharm Sci.** 11(1): 4-10.

[11] Singh, D.K. and et al. 2006. “Antifungal activity of a phytoterpenoid (AOS-A) isolated from *Artabotrytis odoratissimus* on spore germination of some fungi”. **Mycobiology.** 34(3): 120-123.

[12] Wu, Y.C. and et al. 1989. “Cytotoxic aporphines from *Artabotrys uncinatus* and the structure and stereochemistry of artacinatine”. **Phytochemistry.** 28(8): 2191-2195.

[13] Xu, X.X. and et al. 1991. “Total synthesis of (+)-Yingzhaosu A”. **Tetrahedron Lett.** 32(41): 5785-5788.

[14] Kumar, U.S. and et al. 2005. “Free radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory constituents from *Stereospermum personatum*”. **J. Nat. Prod.** 68(11): 1615-1621.

[15] Lee, H.S. and et al. 2002. “Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis”. **Biol. Pharm. Bull.** 25(8): 1045-1048.

[16] Li, T.M. and et al. 1997. “Flavonoids from *Artabotrys hexapetalus*”. **Phytochemistry.** 45(4): 831-833.

[17] Anderson M.O. and Markham, K.R. 2006. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.** New York: CRC Press.

[18] Moussaoui, F. and et al. 2010. "Flavonoid Constituents from Algerian *Launaea resedifolia* (O.K.), and their Antimicrobial Activity". **Rec. Nat. Prod.** 4(1): 91-95.

[19] Abdullah, Y., Schneider, B. and Petersen, M. 2008. "Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species". **Phytochemistry Lett.** 2008, 1(4): 199-203.

[20] Rice-Evan, C., Miller, J. and Paganga, G. 1996. "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids". **Free Rad. Biol. Med.** 20(7): 933-956.

[21] Nugroho, A. and et al. 2009. "Two new flavonol glycosides from *Lamium amplexicaule* L. and their in vitro free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities". **Planta Med.** 75(4): 364–366.

[22] Yamakoshi, J. and et al. 2003. "Lightening Effect on Ultraviolet-Induced Pigmentation of Guinea Pig Skin by Oral Administration of a Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seeds". **Pigment Cell Res.** 16(6): 629-638.