

บทความวิจัย (Research Article)

ฤทธิ์ลดการสร้างเม็ดสีเมลานินของสารสกัดไหมข้าวโพด
Effect of Reducing Melanin Pigmentation with Corn Silk Extract

ภัทรชล อภิสิทธิ์วิทยา¹, ประทีป วรณิสสร² และ เนตรนภิส วรณิสสร^{1,3*}

¹ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

²ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

³คณะแพทยศาสตร์ สถาบันพระบรมราชชนก กระทรวงสาธารณสุข

Pattarachon Apisitwittaya¹, Prateep Warnnissorn² and Netnaphis Warnnissorn^{1*}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University

²Department of Medicine, Faculty of Medicine, Naresuan University

³Faculty of Medicine, Praboromarajchanok Institute, Minister of Public Health

*Corresponding author, E-mail: netnaphisw@nu.ac.th

Received: March 12, 2024/ Revised: May 22, 2024/ Accepted: May 27, 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อัตราการรอดชีวิต การสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์มะเร็งผิวหนัง B16F10 เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดไหมข้าวโพดสดที่สกัดด้วยน้ำ และการจำลองการจับกันผ่านเทคนิค Molecular docking โดยผลสรุปพบว่า สารสกัดไหมข้าวโพดมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT สารสกัดไหมข้าวโพดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ B16F10 ที่ความเข้มข้น 10% โดยปริมาตร เป็นต้นไป มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ความเข้มข้น 0.625% โดยปริมาตร อีกทั้งยังสามารถลดการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16F10 ที่ความเข้มข้น 0.3%-1.25% โดยปริมาตร ได้อีกด้วย ผลวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดไหมข้าวโพดสดที่สกัดด้วยน้ำ (LC-MS/MS) พบสารออกฤทธิ์ที่น่าสนใจทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ Nicotinic acid (Vitamin B3), Tranexamic acid, Citric acid, L-leucine, L-isoleucine และ Coumaric acid ซึ่งเป็นสารที่น่าสนใจต่อการยับยั้งไทโรซิเนสในกระบวนการลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน ผลการจำลองการจับกันผ่านเทคนิค Molecular docking พบว่า การจับกันของไทโรซิเนสและสารออกฤทธิ์ในสารสกัดไหมข้าวโพดทั้ง 6 ชนิด สามารถจับกันได้ด้วยพันธะไฮโดรเจนเป็นหลัก จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าสารสกัดไหมข้าวโพดอาจจะไปส่งเสริมการออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินได้

คำสำคัญ: สารสกัดไหมข้าวโพด ฤทธิ์ลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ

Abstract

This research aims to study the antioxidant, cell viability, melanin production, and anti-inflammatory in the B16F10 melanoma cell line when stimulated with Corn Silk Extract and In silico. The result shows Corn Silk Extract has shown antioxidant, cytotoxicity at a concentration of 10%,

anti-inflammatory, and can also reduce melanin in B16F10 cells at a concentration of 0.3%-1.25%. The analysis of active compounds in Corn Silk Extract using LC-MS/MS found 6 compounds of interest that have the potential for inhibition of tyrosinase in melanogenesis. The result of molecular docking was found that tyrosinase and 6 active compounds can bind by hydrogen bonds. The researcher expects that these active compounds will promote the action of inhibition the melanogenesis.

Keywords: Corn Silk Extract, Melanin reduction, Antioxidant, Anti-inflammation

บทนำ

ผลผลิตเหลือใช้จากเกษตรกรรมหรือกากจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรม เช่น ฟางข้าว กากอ้อย ชังข้าวโพด กะลามะพร้าว บางอย่างถูกนำไปทิ้งสะสมเป็นขยะเน่าเสีย เกิดเป็นมลภาวะต่อโลก รวมถึงไหมข้าวโพด ไหมข้าวโพดจัดเป็นของเหลือใช้จากการนำไปประกอบอาหาร ปกติผลผลิตข้าวโพดส่วนที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์จะเป็นส่วนเมล็ดเป็นส่วนใหญ่ ไหมข้าวโพดจึงถูกมองข้ามบ่อยครั้ง และถูกนำไปกำจัดในที่สุด แต่ในปัจจุบันมีการนำไหมข้าวโพดมาทำการศึกษาถึงประโยชน์ในด้านอื่นๆ เพิ่มมากขึ้นเพื่อช่วยลดผลผลิตเหลือใช้จากเกษตรกรรม (Tengkaew & Wiwattanadate, 2014)

ไหมข้าวโพด หรือฝอยข้าวโพด (Corn silk) เป็นส่วนของยอดเกสรตัวเมียของข้าวโพดที่มีลักษณะเป็นเส้นเล็กๆ จัดเป็นส่วนที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต โดยทั่วไปจะทิ้งหรือนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ (อมร บุญสมบัติ, 2559) จากการรายงานของ Nawaz et al. (2019) พบสารสำคัญจากไหมข้าวโพดได้แก่ ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แทนนิน และอื่น ๆ นอกจากนี้ ยังมีรายงานที่กล่าวถึงสรรพคุณของไหมข้าวโพดในด้านสุขภาพอีกมากมาย เช่น Choi et al. (2014) กล่าวว่า ไหมข้าวโพดมีฤทธิ์ลดการระคายเคืองผิวหนัง ช่วยยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินที่ผิวหนัง ลดการแสดงออกของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์ มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไหมข้าวโพด (Ebrahimzadeh et al., 2008; Eman, 2011; Sarepoua et al., 2013) พบว่าในไหมข้าวโพดมีสารประกอบฟีนอลิกสำคัญที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ในรายงานของ Choi et al. (2014) กล่าวว่า ไหมข้าวโพดมีเมซิน ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกสำคัญที่สามารถป้องกันการเกิดโรคสมองเสื่อมได้ และสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดในระดับสัตว์ทดลองได้ ไหมข้าวโพดมีสารฟลาโวนอยด์และเทอร์ปีนอยด์หลายชนิด (Hasanudin et al., 2012)

เมลานิน (Melanin) เป็นเม็ดสีที่สร้างจากเซลล์ผิวหนัง ทำหน้าที่ในการป้องกันผิวจากแสงแดด แต่หากเกิดการผลิตเม็ดสีเมลานินที่มากเกินไป อาจทำให้เกิดฝ้า กระ และจุดด่างดำได้ (Miyamura, 2006; Choi et al., 2010) โดยสามารถป้องกันหรือปรับปรุงผิวคล้ำได้ด้วยสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยใช้กรดโคจิก อาร์บูติน หรือสารสกัดจากชะเอมเทศ ได้รับการพัฒนาขึ้นมาแก้ปัญหาต่าง ๆ เช่น ผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์และมีประสิทธิภาพต่ำ (García-Gavín et al., 2010) ดังนั้นการพัฒนาสารยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินใหม่จึงเป็นเรื่องสำคัญ และการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรของพืชเศรษฐกิจ เช่น ไหมข้าวโพด จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการนำมาพัฒนาเป็นสารยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินที่มีศักยภาพในการเพิ่มมูลค่าในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดไหมข้าวโพด

สารสกัดไหมข้าวโพดได้รับอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร. ลีรลักษณ์ ชัยจำรัส อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยสกัดจากไหมข้าวโพดหวานพันธุ์อินทรี 2 จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา โดยทำการสกัดไหมข้าวโพดสดแบบต้มด้วยน้ำร้อนตามวิธีการดังนี้ แช่ไหมข้าวโพดสดในสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 10 กรัม/กิโลกรัม (ตามที่กำหนดไว้ข้างของ) ในน้ำ 2 ลิตร แช่ทิ้งไว้ 10 นาที ล้างออกด้วยน้ำสะอาด 3 ลิตร/ครั้ง ประมาณ 2-3 ครั้ง ผึ่งให้สะเด็ดน้ำก่อนนำไปใช้ จากนั้นนำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง เก็บในถุงพลาสติกพอลิเอทิลีนในตู้ดูดความชื้น ที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะใช้ในการทดลอง จากนั้นต้มไหมข้าวโพดแห้ง 5 กรัม ในน้ำ 150 มิลลิลิตร นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นเก็บส่วนน้ำใสใน Sterile tube ขนาด 15 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH)

เตรียมสารสกัดไหมข้าวโพด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 100% Methanol ปริมาตร 850 ไมโครลิตร ลงใน 96 well-plate และเติมสารสกัดไหมข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ลงใน 96 well-plate จากนั้นเติม DPPH radical solution ความเข้มข้น 0.12 มิลลิโมลาร์ 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำ 96 well-plate ที่เติมสารเรียบร้อยแล้วในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหา % inhibition (Boskou et al., 2006)

$$\% \text{ inhibition} = [(OD_{517\text{blank}} - OD_{517\text{sample}}) / OD_{517\text{blank}}] \times 100$$

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay (ABTS)

เตรียมสารสกัดไหมข้าวโพด ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 7 mM ABTS ปริมาตร 198 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปผสมสารละลายให้เข้ากัน เพื่อให้แต่ละหลุมมีปริมาตรทั้งหมด 200 ไมโครลิตร และบ่มตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหา % inhibition Bafna Mayur, 2010

$$\% \text{ inhibition} = [(OD_{734\text{blank}} - OD_{734\text{sample}}) / OD_{734\text{blank}}] \times 100$$

การเพาะเลี้ยงเซลล์ B16F10

เซลล์ B16F10ได้รับความอนุเคราะห์จากศาสตราจารย์ ดร. ภญ. จารุภา วิโยชน์ อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เพาะเลี้ยงเซลล์ B16F10 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งผิวหนังเมลาโนมาที่เกิดขึ้นในหนูเมาส์ (Chan, 2011) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium ที่มี FBS 10% เซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Cell tissue culture dish) บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide assay (MTT)

นำเซลล์ B16F10 ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 70-80% เพาะเลี้ยงลงถาดเพาะเลี้ยง 96 well plate ความหนาแน่น 10,000 เซลล์/หลุม บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยระบบ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารสกัดใหม่ข้าวโพดที่ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15 และ 0.07% โดยปริมาตร บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยระบบ 5% CO₂, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการใส่ MTT solution (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยระบบ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และถ่าย MTT solution ที่ จากนั้นละลายผลึกฟอร์มazan (formazan) ด้วย DMSO ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (%cell viability) (Kanpipit, 2022)

$$\% \text{ Cell viability} = (\text{OD}_{540\text{sample}} / \text{OD}_{540\text{blank}}) \times 100$$

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดใหม่ข้าวโพดผ่านการแสดงออกของ nuclear factor-kappaB ด้วยวิธี Luciferase

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดใหม่ข้าวโพดผ่านการแสดงออกของ Nuclear factor-kappaB ด้วยวิธี Luciferase ถูกอ้างอิงจากบริษัท Promega นำเซลล์ B16F10 ที่มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 70-80% เพาะเลี้ยงลงถาดเพาะเลี้ยง 96 well-plate ความหนาแน่น 10,000 เซลล์/หลุม บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยระบบ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการทรานส์เฟกชันพลาสมิด เข้าสู่เซลล์ โดยนำพลาสมิด pNF-R luciferase ผสมกับสารละลาย GeneJuice® หยอด 8 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มต่อในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยระบบคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กระตุ้นด้วย ตัวกระตุ้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดดูด สารกระตุ้นทิ้งไป ล้างเซลล์ด้วย 100 ไมโครลิตร 1xPBS แล้วดูดทิ้งไป จากนั้นจึงเติม 1x PLB lysis buffer 20 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ 350 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำมาศึกษาการทำงานของ NF-kappaB ด้วยชุด Kit Dual-Luciferase Reporter Assay System และวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Luminometer ทำการทดลอง 3 หลุมต่อ หนึ่งตัวกระตุ้น และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

เครื่อง Luminometer จะทำการวัดการแสดงออกของการเปล่งแสงสองครั้งตามการเติมสับสเตรท โดยครั้งที่หนึ่งจะทำการวัดค่า Relative of Luciferase 1 (RLUs1) คือค่าที่ได้มาจากยีน Firefly Luciferase เป็นผลของการทำงานของ NF-kappaB และในการเติมสับสเตรทครั้งที่สอง จะทำการวัดค่า Relative of Luciferase 2 (RLUs2) เป็นค่าที่เกิดจาก *Renilla reniformis* หรือการเปล่งแสงที่มีอยู่แล้วภายในเซลล์นั่นเอง ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาคำนวณหาค่า Ratio จากสูตร $\text{Ratio} = \text{RLUs1} / \text{RLUs2}$

จากนั้นนำค่า Ratio ของแต่ละตัวกระตุ้นมาคำนวณต่อเพื่อหาค่า Relative of NF-kappaB หรือค่าการทำงานของ NF-kappaB ของแต่ละตัวกระตุ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีตัวกระตุ้น ซึ่งจะนำมาคำนวณหาค่า Relative of NF-kappaB จากสูตร $\text{Relative of NF-kappaB} = \text{Ratio of sample group} / \text{Ratio of control group}$

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดใหม่ข้าวโพดด้วยวิธี Lipoxxygenase

การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบ

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดใหม่ข้าวโพดด้วยวิธี Lipoxxygenase (Eshwarappa, 2016) เติมสารละลายต่าง ๆ ตามขั้นตอนดังตารางที่ 1 จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 การทดสอบเอนไซม์ไลพอกซีจีเนส

Reagent	Blank (µl)	Solvent (µl)	Sample (µl)
10 mM phosphate buffer pH8	980	955	955
15-LOX	-	20	20
DMSO	-	5	-
Sample	-	-	5
บ่ม 5 นาที ณ อุณหภูมิห้อง			
substrate	20	20	20
Total	1,000	1,000	1,000

หมายเหตุ : เตรียมปริมาตรของ Solvent ตามปริมาตรของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบทุกครั้ง

หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร ที่ได้มาคำนวณค่า %inhibition ดังสูตรต่อไปนี้

% inhibition = [(OD/minsolvent – OD/minsample)/OD/minsolvent] x 100

การศึกษาการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน

การศึกษาการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน เลี้ยงเซลล์ B16F10 ลงถาดเพาะเลี้ยง 24-well-plate ความหนาแน่น 100,000 เซลล์ต่อหลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบ่มด้วยสารสกัดใหม่ข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.07, 0.15, 0.315, 0.625, 1.25% โดยปริมาตร ต่ออีก 72 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และเติม 1 M NaOH ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร เพื่อทำการละลายเมลานิน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคล้ายกับอัตราอดชีวิตข้างต้นได้เป็นอัตราการผลิตเมลานินเป็นร้อยละเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Choi et al., 2014)

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดใหม่ข้าวโพดโดยเทคนิค LC-MS/MS

ผู้วิจัยนำสารสกัดใหม่ข้าวโพดไปส่งตรวจวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดใหม่ข้าวโพด ด้วยเครื่อง Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ที่ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

การศึกษาการจำลองการจับกัน 3 มิติด้วยโปรแกรม Molecular Docking

ทำการศึกษาโครงสร้างอนุพันธ์และการจำลองการจับกันแบบ 3 มิติระดับโมเลกุล เพื่อแสดงการเกิด Interactions และอันตรกิริยาที่จับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสกับสารสกัดในไหมข้าวโพด โดยเลือกสารออกฤทธิ์ในสารสกัดไหมข้าวโพดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ Nicotinic acid (Vitamin B3), Tranexamic acid, Citric acid, L-leucine, L-isoleucine และ Coumaric acid นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GOLD 2022.2.0 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. เกียรติวิ ขวรงค์โกมล อาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) โดยโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ไทโรซิเนสในเห็ด *Agaricus bisporus* (PDB ID: 2Y9X) โครงสร้างผลึกของเอนไซม์ไทโรซิเนสในมนุษย์ (PDB ID: 5M8L) ได้มาจาก RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/>)

เนื่องจากไม่มีโครงสร้างสามมิติสำหรับไทโรซิเนสในหนู (*Mus musculus tyrosinase*) ในขณะนี้ ดังนั้นจึงสร้างแบบจำลองโครงสร้างสามมิติ โดยอ้างอิงจากลำดับกรดอะมิโนของยีนไทโรซิเนสในหนูจากศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ฐานข้อมูลลำดับโปรตีนและโครงสร้างผลึกของเอนไซม์ไทโรซิเนสในหนู ได้มาจาก Phyre2 (Protein Homology/analog Y Recognition Engine V 2.0) รหัส PDB (PDB : c5m8pA)

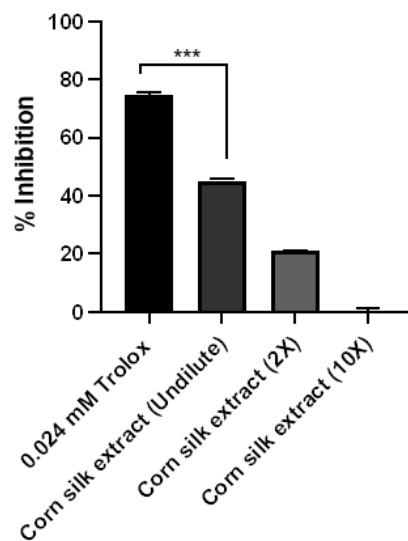
สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Graphpad ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยนเรศวร ทำการทดลอง 3 ซ้ำและทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยสถิติแบบ ANOVA เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ ข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (mean, $n=3$); ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS : ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

นำสารสกัดไหมข้าวโพด มาทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH ที่วัดความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดมาคำนวณหา %inhibition จากผลการทดลองดังภาพที่ 1 แสดงให้เห็นถึงสารสกัดไหมข้าวโพด มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH เมื่อเทียบสารสกัดไหมข้าวโพดและสารมาตรฐาน โดยสารสกัดไหมข้าวโพดที่ไม่ได้เจือจาง มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ DPPH^+ ได้ถึง $45\% \pm 0.32$ ส่วนสารสกัดไหมข้าวโพดที่ทำการเจือจางที่ 2 และ 10 เท่า มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ DPPH^+ $21\% \pm 0.007$ และ $0.0996\% \pm 0.03$ ตามลำดับ

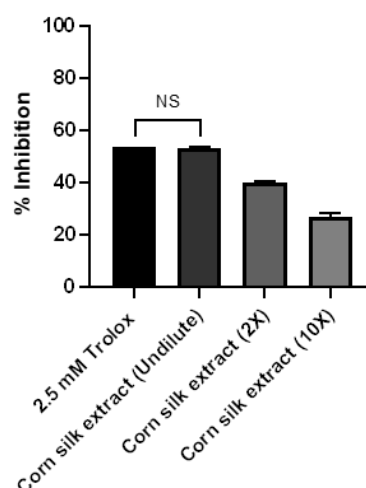


ภาพที่ 1ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดไหมข้าวโพดด้วยวิธี DPPH assay

หมายเหตุ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดไหมข้าวโพดและสารมาตรฐาน (Trolox) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3); *** p<0.001

ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

นำสารสกัดไหมข้าวโพด มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหา %inhibition จากผลการทดลองดังภาพที่ 2 แสดงให้เห็นถึงสารสกัดไหมข้าวโพด มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS เมื่อเทียบสารสกัดไหมข้าวโพดและสารมาตรฐาน โดยสารสกัดไหมข้าวโพดที่ไม่ได้รับการเจือจาง มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ได้ถึง 53% $\pm$ 0.44 ส่วนสารสกัดไหมข้าวโพดที่ทำการเจือจางที่ 2 และ 10 เท่า มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ABTS⁺ 39% $\pm$ 0.72 และ 25% $\pm$ 1.55 ตามลำดับ

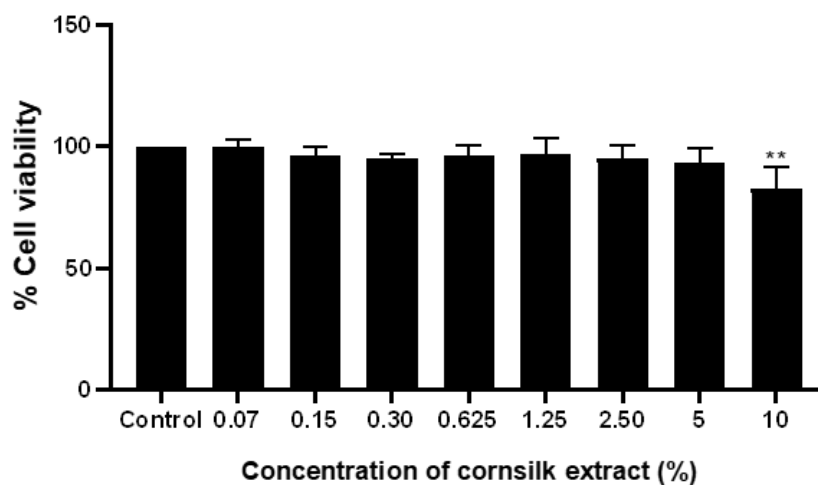


ภาพที่ 2ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดไหมข้าวโพดด้วยวิธี ABTS assay

หมายเหตุ แสดงถึงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดไหมข้าวโพดและสารมาตรฐาน (Trolox) ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3); NS : ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ B16F10 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดไหมข้าวโพด

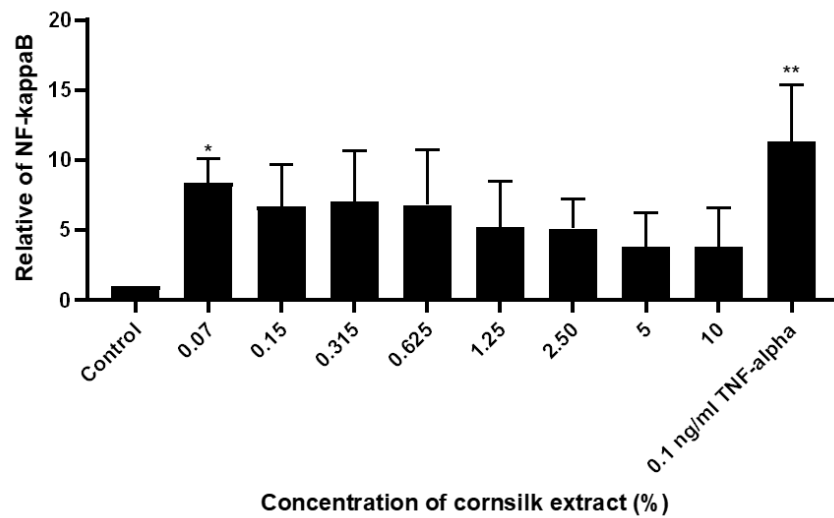
ทำการทดสอบอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ B16F10 ด้วยสารสกัดไหมข้าวโพด บ่มเพื่อให้เซลล์มีการสร้างผลิตภัณฑ์มาซัน หลังบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากผลการทดลองดังภาพที่ 3 แสดงให้เห็นถึงเซลล์ B16F10 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดไหมข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 0.07, 0.15, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10% โดยปริมาตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ เท่ากับ 99.65 ± 3.30 , 96.29 ± 3.49 , 94.95 ± 1.96 , 96.59 ± 3.71 , 97.14 ± 6.50 , 95.35 ± 5.04 , 93.27 ± 5.76 และ 82.79 ± 8.69 ตามลำดับ พบว่าที่ความเข้มข้นสารสกัดไหมข้าวโพดที่ 10% มีอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 3 ผลแสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ B16F10 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดไหมข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หมายเหตุ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดไหมข้าวโพดและกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3); **p<0.01

ผลการตรวจสอบการทำงานและการแสดงออกของ nuclear factor-kappaB ด้วยวิธี Luciferase assay

การทำงานของ nuclear factor-kappaB เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดไหมข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในเซลล์ B16F10 ร่วมกับกลุ่มการทดลอง TNF-alpha 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าด้วยเครื่อง luminometer ด้วยชุด Luciferase assay Kit จากผลการทดลองดังภาพที่ 4 TNF-alpha สามารถกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor-kappaB ได้อย่างปกติ และเมื่อกระตุ้น TNF-alpha 0.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารสกัดไหมข้าวโพด แสดงค่าการทำงาน NF-kappaB ของ TNF-alpha ที่ 11.33 ± 4.068 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่กระตุ้น TNF-alpha ร่วมกับสารสกัดไหมข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5 และ 10% โดยปริมาตร แสดงค่า Relative of NF-KB หรือค่าแสดงการทำงานของ NF-kappaB ที่ 8.41 ± 1.69 , 6.70 ± 3.00 , 7.07 ± 3.61 , 6.81 ± 3.94 , 5.23 ± 3.21 , 5.12 ± 2.08 , 3.82 ± 2.42 และ 3.84 ± 2.77 ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดไหมข้าวโพดสูงขึ้น ส่งผลให้มีการทำงานของ NF-kappaB ที่ลดน้อยลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงถึงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของสารสกัดไหมข้าวโพด



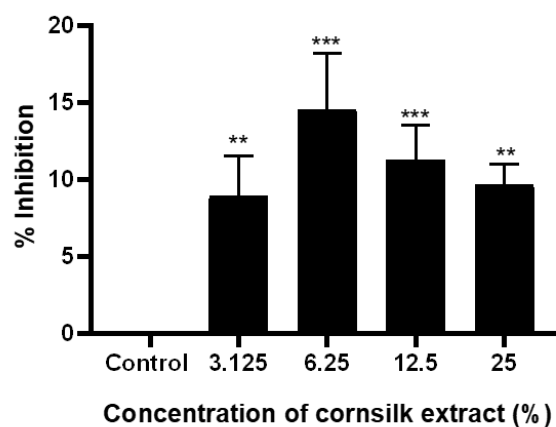
ภาพที่ 4 ผลแสดงการทำงานของ nuclear factor-kappaB ในเซลล์ B16F10 เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TNF-alpha ร่วมกับสารสกัดไหมข้าวโพด

หมายเหตุ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดไหมข้าวโพดและกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SD (n=3); * p<0.05, **p<0.01

ผลการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดไหมข้าวโพดด้วยวิธี Lipoxxygenase

ทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดไหมข้าวโพด โดยดูการทำงานของเอนไซม์ lipoxxygenase ด้วยวิธี lipoxxygenase assay นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 234 นาโนเมตร นำไปหาค่า %Inhibition จากนั้นนำค่า %Inhibition มาจัดทำกราฟระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นต่างๆ

จากผลการทดลองดังภาพที่ 5 สารสกัดไหมข้าวโพดเมื่อทดสอบฤทธิ์ในการต้านการอักเสบโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxxygenase โดยสารสกัดไหมข้าวโพดที่ความเข้มข้น 3.12, 6.25, 12.5 และ 25% โดยปริมาตร มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบที่ 8.93±2.58, 14.57±3.64, 11.29±2.21 และ 9.65±1.38% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดไหมข้าวโพดที่ความเข้มข้น 6.25% มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ lipoxxygenase ที่สูงที่สุด

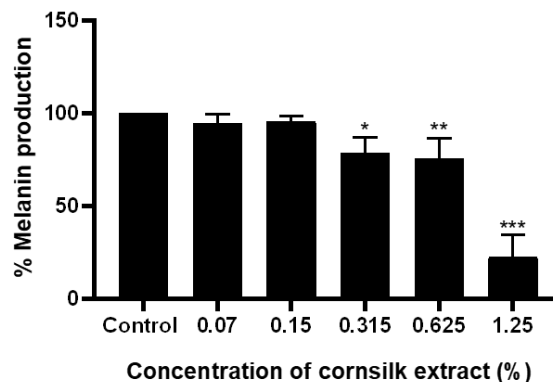


ภาพที่ 5 ผลแสดงฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดไหมข้าวโพดด้วยวิธี Lipoxxygenase

หมายเหตุ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดไหมข้าวโพดและกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SD (n=3); ***p<0.01, ****p<0.001

ผลการศึกษาผลของสารสกัดไหมข้าวโพดต่อการผลิตเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16F10

ทำการเลี้ยงเซลล์ B16F10 ร่วมกับสารสกัดไหมข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงใน 24 well-plate เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากผลการทดลองดังภาพที่ 6 สารสกัดไหมข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.07, 0.15, 0.3, 0.6, 1.25% โดยปริมาตร มีการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่ 94.81 ± 3.90 , 95.62 ± 2.45 , 78.56 ± 6.74 , 75.71 ± 8.71 และ 22.55 ± 9.59 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดไหมข้าวโพดมีฤทธิ์ในการลดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่ลดน้อยลง ตามลำดับความเข้มข้นของสารสกัดไหมข้าวโพดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 6 การสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16F10 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดไหมข้าวโพด
หมายเหตุ แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดไหมข้าวโพดและกลุ่มควบคุม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD (n=3); *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดไหมข้าวโพดโดยเทคนิค Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

จากผลวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดไหมข้าวโพดโดยเทคนิค LC-MS/MS พบสารออกฤทธิ์ที่มีปริมาณสารที่ออกฤทธิ์หลักอยู่ 6 ชนิด ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้คือมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ด้านการอักเสบและฤทธิ์ในการลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน เป็นต้น เพื่อนำมาศึกษาในคอมพิวเตอร์ต่อไป ได้แก่ Nicotinic acid (Vitamin B3), Tranexamic acid, Citric acid, L-leucine, L-isoleucine และ Coumaric acid

ผลการศึกษาการจำลองการจับกันของโมเลกุลไทโรซิเนส และสารออกฤทธิ์ในสารสกัดไหมข้าวโพด

การสร้างโครงสร้างโปรตีนไทโรซิเนส โดยใช้ ไทโรซิเนสในเห็ด (PDB : 2Y9X) ในมนุษย์ (PDB : 5M8L) และในหนู (PDB : c5m8pA) เป็นโครงสร้างต้นแบบ ทำการศึกษาโครงสร้างอนุพันธ์และการจำลองการจับกันแบบ 3 มิติระดับโมเลกุล เพื่อแสดงการ interactions และอันตรกิริยาที่จับกับบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสกับสารออกฤทธิ์จากไหมข้าวโพดทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ Nicotinic acid (Vitamin B3), Tranexamic acid, Citric acid, L-leucine, L-isoleucine และ Coumaric acid นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม GOLD 2022.2.0 โดยที่แสดงพันธะไฮโดรเจนเป็นหลักเนื่องจากพันธะไฮโดรเจนเป็นพันธะที่ให้ความแข็งแรงใน การจับกันของโมเลกุลที่มากที่สุด เมื่อโครงสร้างสามารถจับกับโมเลกุลจับจำเพาะที่มีการจับด้วย พันธะไฮโดรเจนยิ่งมาก ซึ่งหมายความว่ามีความสามารถในการจับกับโมเลกุลจับจำเพาะได้แข็งแรง มากขึ้นเท่านั้น

ตารางที่ 2 สรุปค่าพลังงานในการจับกันและพันธะที่กระทำระหว่างไทโรซิเนสในเห็ด (2Y9X), ในมนุษย์ (5M8L), ในหนู (c5m8pA)

Active compound from Corn Silk Extract	PLP Fitness score			Hydrogen bond		
	2Y9X	5M8L	c5m8pA	2Y9X	5M8L	c5m8pA
Nicotinic acid	32.3915	35.1943	38.4297	Arg321, Ala246, His251, Asn243	Asn104	Ser279, Gln378
Tranexamic acid	36.4098	39.8221	37.1270	Asn81, Tyr65, His85	Ala121, Cys122, Arg417	Ser277, Gln376, Ser279
Citric acid	40.9781	41.1493	32.1699	His244, Asn81, Cys83, His85	Ser423, Gly103, Arg114, Asn104	Ser277, Thr373
L-ileucine	40.2797	39.2592	36.0122	Cys83, His85, Glu322	Cys101, Phe105, Gly103	Ser279, Gln378, Cys276
L-isoleucine	41.5887	38.1952	35.1891	Cys83, His85, Glu322	Ala121	Ser279, Cys276
Coumaric acid	33.8647	41.1088	38.0853	Cys83	Arg417, Cys122	ILE275

อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษางานวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดไหมข้าวโพด ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดไหมข้าวโพดมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ DPPH⁺ ได้ถึง 45%±0.32 มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ABTS⁺ 53%±0.44 ผลของสารสกัดไหมข้าวโพดให้ผลที่คล้ายงานวิจัยที่รายงานก่อนหน้านี้ (Ebrahimzadeh et al., 2007) โดยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในสารสกัดไหมข้าวโพดที่สกัดจากเอทานอล ที่ความเข้มข้น 1.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH⁺ ที่ 92.6% Rahman et al. (2014) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ในสารสกัดไหมข้าวโพดในระยะต้นอ่อนและระยะโตเต็มที่ โดยทำการสกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 0.1-1.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าไหมข้าวโพดในระยะต้นอ่อนและโตเต็มที่ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ที่ 35.35% และ 64.22% ตามลำดับ

ผลิตภัณฑ์ที่จะนำมาใช้กับผิวหนังต้องได้รับการทดสอบพิษต่อผิวหนัง เพื่อป้องกันการเกิดโรค รวมไปถึงการเกิดอาการแพ้ต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นกับผิวหนัง ในการทดลองนี้ทำการทดสอบอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ร่วมกับสารสกัดไหมข้าวโพด พบว่าที่ความเข้มข้นสารสกัดไหมข้าวโพดที่ 0.07-5% โดยปริมาตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง ซึ่งมีผลไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาในปี 2014 ของ Choi et al. (2014) ซึ่งทำการทดสอบอัตรา

การมีชีวิตรอดของเซลล์ Melan-A ซึ่งเป็นเซลล์เมนาโนไซต์ปกติร่วมกับสารสกัดใหม่ข้าวโพดที่สกัดด้วยตัวทำละลายจากน้ำ ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ppm ซึ่งจากผลการทดลองมีอัตราการรอดชีวิตที่ 97.5%, 95.0% และ 96.9%

การเกิดปัญหาของผิวหนัง เช่น ฝ้า กระ จุดด่างดำ ไปจนปัญหาร้ายแรง คือมะเร็งผิวหนัง ล้วนเป็นผลมาจากสารอนุมูลอิสระที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของรังสีอัลตราไวโอเลตประเภทรังสียูวีเอและยูวีบี เมื่อรังสียูวีที่กระทบลงบนผิวหนัง ทำให้เกิดการผลิต ROS หรือสารอนุมูลอิสระที่มากขึ้น แล้วไปกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ โดยไปกระตุ้นการส่งสัญญาณ NF-kappaB จากนั้น ไปกระตุ้นการทำงานของ TNF-alpha ส่งผลให้เกิดการอักเสบบนผิวหนัง (Wang et al., 2019)

ผู้วิจัยจึงสนใจในการศึกษาการทำงานของ NF-kappaB เมื่อกระตุ้นด้วย TNF-alpha ร่วมกับสารสกัดจากใหม่ข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.07%-10% โดยปริมาตร จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดใหม่ข้าวโพดมีผลไปลดการทำงานของ NF-kappaB ที่ความเข้มข้นสูงที่สุดลงมาตามลำดับ ซึ่งมีผลไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษาในปี 2017 ของ Ho et al., (2017) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของใหม่ข้าวโพดในการต้านการอักเสบ โดยจากผลการทดลองในงานวิจัยในครั้งนี้ ใหม่ข้าวโพดมีบทบาทสำคัญในการยับยั้ง IKK beta ในการกระตุ้นการอักเสบ NF-kappaB โดยใหม่ข้าวโพดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ NF-kappaB ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

นอกจากรังสีอัลตราไวโอเลตจะมีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (Fabian et al., 2015) การบริโภคอาหารประจำวันก็สามารถก่อให้เกิดอาการอักเสบขึ้นได้เช่นกัน Omega 6 เป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่หลายตำแหน่ง เช่น Linoleic acid จะพบมากในเนื้อสัตว์ และเมล็ดธัญพืช เมื่อปรุงอาหารด้วยความร้อนสูง หรือร่างกายได้รับมากเกินไป อาจจะทำให้ส่งผลเสียกับร่างกาย โดยจะทำให้ไขมันเกิดการออกซิไดซ์ สร้างความเสียหายต่อ DNA ทำให้เพิ่มการผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ และความเสี่ยงต่อมะเร็งหลายชนิด (Fabian et al., 2015) เอนไซม์ Lipoxxygenase เป็น Oxidative enzyme โดยมีสารตั้งต้นคือ Linoleic acid โดยเมื่อถูกเอนไซม์ Lipoxxygenase oxidize แล้ว Linoleic acid จะเปลี่ยนเป็นสารในกลุ่ม Hydroperoxide จะเป็นสารตั้งต้นในกลุ่ม Pro-inflammatory ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (Fabian et al., 2015) ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาการทำงานของเอนไซม์ Lipoxxygenase จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดใหม่ข้าวโพดที่ความเข้มข้น 6.25% โดยปริมาตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Lipoxxygenase ที่ $14.57\% \pm 3.63$

มีการรักษาด้วยสารที่ให้ความขาวหลายประเภท และมีผู้บริโภคจำนวนไม่น้อยเกิดอาการแพ้ และเป็นโรคผิวหนังจากการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ให้ความขาวหลายชนิด เช่น Hydroquinone สารปรอท วิตามิน A จะมีฤทธิ์ในการทำให้เซลล์เม็ดสีเมลานินไม่ทำงาน หากใช้ระยะยาวจะก่อให้เกิดผลเสียต่อใบหน้า เช่น การเกิดโรคผิวหนังหน้าหมองคล้ำ ซึ่งเกิดจากการหยุดใช้สารที่ให้ความขาว โดยเม็ดสีเมลานินที่ถูกยับยั้งไม่ให้เกิดการทำงานเกิดการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้ผิวหนังเปลี่ยนเป็นสีด่างอย่างรวดเร็ว และผิวสีเทาอาจเกิดจากการใช้สารให้ความขาวปริมาณที่เข้มข้นอย่างต่อเนื่อง สิวบางส่วนเช่นบริเวณที่เป็นฝ้า จะเปลี่ยนเป็นสีเทาถาวรแทน

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินเมื่อทำการกระตุ้นด้วยสารสกัดใหม่ข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.07, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25% โดยปริมาตร มีการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่ 94.81 ± 3.90 , 95.62 ± 2.45 , 78.56 ± 6.74 , 75.71 ± 8.71 และ 22.55 ± 9.59 ตามลำดับแสดงให้เห็นว่า สารสกัดใหม่ข้าวโพดมีฤทธิ์ในการลดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่ลดน้อยลงตามลำดับความเข้มข้นของสารสกัดใหม่ข้าวโพดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากมีการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสลดน้อยลง จากการรายงานในปี 2014 ของ Choi et al. (2014) ได้ทำการทดสอบสารสกัดจากใหม่ข้าวโพดในการลดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดใหม่ข้าวโพดที่ 1, 10, 100 ppm มีฤทธิ์ในการลดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่ 100%, 90.8% และ 62.8% ตามลำดับ และยังได้ผลลัพธ์ที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับอาร์บูติน ส่งผลให้โครงสร้างบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูญเสียการทำงานไปทำให้ลดการสร้างเม็ดสีเมลานินลงมีผลให้ผิวกระจ่างใสขึ้น

ซึ่งจากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นสารสกัดใหม่ข้าวโพดที่ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต่างๆ มีผลในการลดการสังเคราะห์เมลานินได้ อย่างไรก็ตามสารสกัดใหม่ข้าวโพดอาจมีการเข้าจับ Cu^{2+} ในโมเลกุลบริเวณ

เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส ส่งผลให้โครงสร้างบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูญเสียการทำงานไป ทำให้ลดการสร้างเม็ดสีเมลานินลงมีผลให้ผิวกระจ่างใสขึ้น

ผู้วิจัยสนใจสารออกฤทธิ์จากสารสกัดใหม่ข้าวโพดแต่ละชนิดที่ส่งผลให้สารสกัดใหม่ข้าวโพดมีฤทธิ์ในการลดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน จึงได้ทำการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง LC-MS/MS พบสารสกัดออกฤทธิ์ในสารสกัดใหม่ข้าวโพดที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการลดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน คือ Nicotinic acid (Vitamin B3), Tranexamic acid, Citric acid, L-leucine, L-isoleucine และ Coumaric acid

มีการรายงานว่าการสังเคราะห์เมลานินโดยเอนไซม์ไทโรซิเนสในพืงใจและในมนุษย์มีความคล้ายคลึงกัน ในปัจจุบันสารประกอบส่วนใหญ่ได้รับการทดสอบโดยใช้เอนไซม์ไทโรซิเนสที่แยกได้จากเห็ด *Agaricus bisporus* (mTyr) ซึ่งเป็นเอนไซม์ไทโรซิเนสแอกทีฟเพียงชนิดเดียวที่มีจำหน่ายในท้องตลาดและเป็นส่วนผสมของไอโซเอนไซม์ไทโรซิเนสหลายชนิด ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์ไทโรซิเนสของมนุษย์ (hTyr) มีข้อมูลด้านจลนพลศาสตร์หรือโครงสร้างน้อยมาก อาจเพราะปริมาณ hTyr ที่ได้รับมีปริมาณไม่เพียงพอจากแหล่งธรรมชาติหรือมีการแสดงออกที่แตกต่างกัน (Olivares et al., 2002) และข้อมูลโครงสร้างสามมิติของ hTyr หรือข้อมูลจลนศาสตร์ของสารยับยั้ง hTyr ยังคงหายไ้ ดังนั้นจากผลงานวิจัยที่ผ่านมาจึงชี้ให้เห็นว่าการศึกษายับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในกลุ่มของเห็ด อาจไม่เพียงพอ ผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องทดสอบกลุ่มเอนไซม์จากมนุษย์และในหนูเพิ่มเติม

สรุปผล

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ใหม่ข้าวโพดมีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ถึง 45%±0.32 และมีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} 53%±0.44 และที่ระดับความเข้มข้นสารสกัดใหม่ข้าวโพดที่ 0.07%-5% ไม่มีความเป็นพิษกับเซลล์ สารสกัดใหม่ข้าวโพดมีฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยลดการทำงานของ NF-kappaB และ สารสกัดใหม่ข้าวโพดมีฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยสามารถลดการทำงานของเอนไซม์ Lipoyxygenase ที่ 14.57%±3.63 สารสกัดใหม่ข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.07-1.25% โดยปริมาตร แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใหม่ข้าวโพดมีฤทธิ์ในการลดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่ลดน้อยลงตามลำดับความเข้มข้นของสารสกัดใหม่ข้าวโพดที่มากขึ้น ผลการจำลองการจับกันของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด มนุษย์ และหนู กับสารออกฤทธิ์ในสารสกัดใหม่ข้าวโพดคาดว่ามีความสามารถในการเข้าจับ Cu²⁺ ในโมเลกุลบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนส ส่งผลให้โครงสร้างบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไทโรซิเนสสูญเสียการทำงานไป ทำให้สารสกัดใหม่ข้าวโพดมีฤทธิ์ในการลดการสร้างเม็ดสีเมลานินลง ดังนั้นผลการทดลองในครั้งนี้อาจใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใหม่ข้าวโพด เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ผิวเกิดความกระจ่างใสหรือการรักษาโรคต่อไปได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปีงบประมาณ 2565

เอกสารอ้างอิง

- อมร บุญสมบัติ. (2559). ผลของวิธีการคั่วต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในใหม่ข้าวโพดแห้งเพื่อการผลิตชา. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร บัณฑิต วิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Boskou, G. (2010). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. In *Olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 925-934). Academic Press.
- Chan, Y. Y., Kim, K. H., & Cheah, S. H. (2011). Inhibitory effects of Sargassum polycystum on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(3), 1183-1188.

- Choi, S.Y., Lee, Y., Kim, S.S., Ju, H.M., Baek, J.H., Park, C.S., & Lee, D.H. (2014). Inhibitory effect of corn silk on skin pigmentation. *Molecules*, 19(3), 2808-2818.
- Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., & Hafezi, S. (2008). Antioxidant activities of Iranian corn silk. *Turkish Journal of biology*, 32(1), 43-49.
- Eshwarappa, R. S. B., Ramachandra, Y. L., Subaramaihha, S. R., Subbaiah, S. G. P., Austin, R. S., & Dhananjaya, B. L. (2016). Anti-lipoxygenase activity of leaf gall extracts of *Terminalia chebula* (Gaertn.) Retz. (Combretaceae). *Pharmacognosy Research*, 8(1), 78.
- Fabian, C.J., Kimler, B.F., & Hursting, S.D. (2015). Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Research*, 17(1), 1-11.
- García-Gavín, J., González-Vilas, D., Fernández-Redondo, V., & Toribio, J. (2010). Pigmented contact dermatitis due to kojic acid. a paradoxical side effect of a skin lightener. *Contact Dermatitis*, 62(1), 63-4.
- Hasanudin, K., Hashim, P., & Mustafa, S. (2012). Corn silk (*Stigma maydis*) in healthcare: a phytochemical and pharmacological review. *Molecules*, 17(8), 9697-9715.
- Kanpipit, N., Nualkaew, N., & Thapphasaraphong, S. (2022). The potential of purple waxy corn cob (*Zea mays* L.) extract loaded-sericin hydrogel for anti-hyperpigmentation, UV protection and anti-aging properties as topical product applications. *Pharmaceuticals*, 16(1), 35.
- Mayur, B., Sandesh, S., Shruti, S., & Sung-Yum, S. (2010). Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of *Carpesium abrotanoides* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(15), 1547-1553.
- Miyamura, Y., Coelho, S. G., Wolber, R., Miller, S. A., Wakamatsu, K., Zmudzka, B. Z., ... & Hearing, V. J. (2007). Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. *Pigment Cell Research*, 20(1), 2-13.
- Nawaz, H., Aslam, M., & Muntaha, S. T. (2019). Effect of solvent polarity and extraction method on phytochemical composition and antioxidant potential of corn silk. *Free radicals and antioxidants*, 9(1), 5-11.
- Olivares, C., García-Borrón, J.C., & Solano, F. (2002). Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry*, 41(2), 679-686.
- Rahman, N.A., & Rosli, W.I.W. (2014). Nutritional compositions and antioxidative capacity of the silk obtained from immature and mature corn. *Journal of King Saud University-Science*, 26(2), 119-127.
- Sarepoua, E., Tangwongchai, R., Suriharn, B. O. R. O. N., & Lertrat, K. (2013). Relationships between phytochemicals and antioxidant activity in corn silk. *International Food Research Journal*, 20(5), 2073-2079.
- Tengkaew, S., & Wiwattanadate, D. (2014). Study of source and potential of biomass from field corn in Thailand. *Princess of Naradhiwas University Journal*, 6(3), 102-111. (In Thai)