



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

ฤทธิ์ทางชีวภาพของมะไฟจีนสำหรับใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

Biological activities of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels
for development as cosmetic products

โดย

นสภ. กิรติกานต์	ประกอบเพียง	59210005
นสภ. รัตนวดี	หวานจริง	59210196
นสภ. ชีวนันท์	ทาปัญญา	59210231

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

ฤทธิ์ทางชีวภาพของมะไฟจีนสำหรับใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง
Biological activities of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels
for development as cosmetic products

โดย

นสภ. กীরติกานต์	ประกอบเพียง	59210005
นสภ. รัตนาดี	หวานจริง	59210196
นสภ. ชีวนันท์	ทาปัญญา	59210231

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2563

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

ในปัจจุบันการศึกษาพืชสมุนไพรพื้นบ้านเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง นอกจากจะนำไปใช้ในการประกอบอาหารแล้ว พืชสมุนไพรพื้นบ้านหลากหลายชนิดยังมีประโยชน์ในแง่ของการรักษาและป้องกันโรคต่าง ๆ เนื่องด้วยสารสำคัญออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรแต่ละชนิดมีความโดดเด่นที่แตกต่างกัน การศึกษาวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาสมุนไพรพื้นบ้านโดยเฉพาะมะไฟจีนซึ่งเป็นผลไม้ท้องถิ่นประจำจังหวัดน่าน ที่มีการนำไปใช้แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมอาหาร อีกทั้งยังมีการศึกษาเกี่ยวกับกลุ่มสารสำคัญในการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย จึงได้เลือกมะไฟจีนมาทำการทดสอบเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จากการทดสอบดังกล่าวพบฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนส ดังนั้นคณะผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับนำไปพัฒนาต่อยอดทางด้านเครื่องสำอางและเพื่อยกระดับสมุนไพรพื้นบ้านให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป

คณะผู้จัดทำ

นสภ. กীরติกานต์ ประกอบเพ็ญ
 นสภ. รัตนาดี หวานจริง
 นสภ. ชีวนันท์ ทาปัญญา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2563

เรื่องฤทธิ์ทางชีวภาพของมะไฟจีนสำหรับใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

- | | | |
|---------------------|-------------|---------------|
| 1. นสภ. กิริติกานต์ | ประกอบเพียง | รหัส 59210005 |
| 2. นสภ. รัตน์วดี | หวานจริง | รหัส 59210196 |
| 3. นสภ. ชีวันนท์ | ทาปัญญา | รหัส 59210231 |

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยเภสัชศาสตร์

- | | |
|----------------------|---------|
| 1. ผศ.ดร.ณิกานต์ | ภีระคำ |
| 2. ทนพญ.ดร.สุดารัตน์ | หาดเพชร |

บทคัดย่อ

มะไฟจีนมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Clausena lansium* (Lour.) Skeels ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH, ABTS และ FRAP) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้ผิวหมองคล้ำและริ้วรอย (Tyrosinase และ collagenase) และทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนต่าง ๆ ของมะไฟจีน ได้แก่ ใบ (A), กิ่ง (B), ก้านใบ (C), ผล (D) และเมล็ด (E) โดยทุกส่วนของมะไฟจีนถูกนำมาสกัดด้วยเอทานอล โดยวิธีการหมัก จากนั้นทำการตรวจสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ผลการทดสอบพบว่าทุกส่วนของสารสกัดมะไฟจีนมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP ที่แตกต่างกัน โดยฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด A-E อยู่ในช่วง 23.14% - 90.75% ABTS อยู่ในช่วง 93.67% - 99.80% และยังมีคุณสมบัติเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing agent) เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Trolox อยู่ในช่วง 223.32 - 512.17 มิลลิกรัม Trolox /กรัมของสารสกัด ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดทุกส่วนยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนส โดยสารสกัด B, E และ D มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง มีค่าอยู่ในช่วง 76.99% - 74.34% นอกจากนั้นสารสกัด B ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้สูงที่สุด คือ 97.42 % ซึ่งใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน EGCG (99.41 %)

ดังนั้นจากผลการศึกษาดังกล่าวเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษาและพัฒนาต่อยอดสมุนไพรสำหรับประยุกต์ใช้ทางเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์สุขภาพอื่น ๆ ในอนาคตต่อไป

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.ณิกานต์ ภีระคำ

Senior Project Academic Year 2020

: Biological activities of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels for development as cosmetic products.

By

1. Miss. Geeratigarn Prakobtiang ID59210005
2. Miss. Ratanavadee Wanjing ID 59210196
3. Miss. Shewanun Thapanya ID 59210231

Advisor :

1. Dr. Nichakan Peerakam
2. Dr. Sudarat Hadpech

ABSTRACT

The Scientific name of wampee is *Clausena lansium* (Lour.) Skeels. This research aimed to study anti-oxidant (DPPH, ABTS, and FRAP), enzymatic inhibition effect on tyrosinase and collagenase and comparison of their biological activities from different parts of wampee including leaf (A), branch (B), petiole (C), fruit (D) and seed (E). All parts of wampee were macerated with ethanol to obtain crude extracts. Then crude extracts were examined the biological activities. The results showed that all crude extracts presented the anti-oxidant activity in all assay. The percentage of inhibition of crude extract A-E were 23.14% - 90.75% on DPPH and on ABTS assay. Moreover, all crude extract exhibited the ability to be reducing agent in FRAP assay equivalent to Trolox standard were 223.32 – 512.17 mg Trolox /g ext. Furthermore, all crude extracts showed the activity to inhibit tyrosinase and collagenase. Crude extracts B,E and D exhibited high level of anti-tyrosinase were 76.99% - 74.34%. Interestingly, crude extracts B revealed the highest of anti-collagenase activity was 97.42 % similar to EGCG standard (99.41%).

Therefore, the information from this study will be a good guidance for more research leading to application for cosmetic and other health care products.

Dr. Nichakan Peerakam

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร. ณิชกานต์ ภิระคำ และ ทนพญ.ดร.สุดารัตน์ หาดเพชร เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ที่คอยให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ จึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนในการวิจัยและเอื้อเพื่อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำโครงการวิจัย และขอขอบพระคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้คอยช่วยเหลืออำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการทำวิจัยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

นสภ. กิรติกานต์ ประกอบเที่ยง

นสภ. รัตน์วดี หวานจริง

นสภ. ชีวนันท์ ทาปัญญา

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
Abstract	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ฌ
สารบัญแผนภูมิ	ญ
สารบัญกราฟ	ฎ
สารบัญตารางภาคผนวก	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์	2
3. สมมติฐาน	2
4. กรอบแนวคิด	2
5. นิยามศัพท์เฉพาะ	3
6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
1. มะไฟจีน	4
2. ผีวหนัง	5
3. ความเสื่อมสภาพของผีวหนัง	5
4. วิถีชีวสังเคราะห์ melanin	6
5. อนุมูลอิสระและสารยับยั้งอนุมูลอิสระ	7
6. Tyrosinase และ tyrosinase inhibitor	7
7. Collagenase และ collagenase inhibitor	7
8. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
1. ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา	10
2. เครื่องมือและอุปกรณ์สารเคมี	10
3. การเตรียมพืชตัวอย่าง	11
4. วิธีการสกัดพืช	12
5. Phytochemical screening	12
6. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	14
7. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	15
8. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส	16

	หน้า
บทที่ 4	
1. การสกัดพืช	18
2. การตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญเบื้องต้นของสารสกัด (Phytochemical screening)	18
3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ	19
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	
1. อภิปรายผลการทดลอง	23
2. สรุปผลการทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง	27
ภาคผนวก	31

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตของการสกัดมะไฟจีนในส่วนต่าง ๆ	18
ตารางที่ 2 การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัด	18
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml	20
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์	22

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของมะไฟจีน	4
รูปที่ 2 โครงสร้างทางผิวหนัง	5
รูปที่ 3 วิธีชี้วัดสังเคราะห์ melanin	6

สารบัญแผนภูมิ

	หน้า
แผนภูมิที่ 1 % inhibition ของมะไฟจีนแต่ละส่วน โดยวิธี DPPH และ ABTS	20
แผนภูมิที่ 2 แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระส่วนของพืชมะไฟจีนเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox	21
แผนภูมิที่ 3 แสดง % inhibition Anti-tyrosinase และ Anti-collagenase ของมะไฟจีน	22

สารบัญกราฟ

กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่า Absorbance ของสารละลายมาตรฐาน	หน้า 21
--	------------

สารบัญตารางภาคผนวก

	หน้า
ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตของการสกัดมะไฟจีนในส่วนต่าง ๆ	31
ตารางที่ 2 แสดงการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัด	31
ตารางที่ 3 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ วิธี DPPH radical scavenging activity	33
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity	33
ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นและค่า Absorbance ของสารละลายมาตรฐาน Trolox	33
ตารางที่ 6 แสดงความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของส่วนสารสกัดเอทานอลมะไฟจีน	34
ตารางที่ 7 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ วิธี Anti-tyrosinase ที่สารตัวอย่างความเข้มข้น 400 µg/ml	34
ตารางที่ 8 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Anti-collagenase inhibitory activity)	34

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชและมีความแตกต่างกันไปในแต่ละเขตพื้นที่ตามลักษณะภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และสิ่งที่น่าสนใจ คือ พืชสมุนไพรพื้นบ้าน ในแต่ละท้องถิ่นมีคุณสมบัติเป็นเอกลักษณ์ของตนเอง ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในการประกอบอาหารเป็นเครื่องเทศ เพื่อปรุงแต่ง สี กลิ่น รส และเป็นส่วนประกอบในยาสมุนไพรพื้นบ้านที่มีการใช้ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันซึ่งยังได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย พืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีหลักฐานการใช้ประโยชน์และได้บรรจุไว้ในสมุนไพรไทยในสารานุกรมสมุนไพรฐานปรากฏเป็นข้อมูลสำหรับประชาชนให้นำมาใช้รักษาโรคเบื้องต้น หรือบางชนิดยังใช้เป็นส่วนผสมในตำรายาแผนโบราณซึ่งถูกบรรจุไว้ในบัญชียาหลักแห่งชาติดังมีให้เห็นในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อบำรุงสุขภาพด้วย ผลของการใช้สมุนไพรที่มีบทบาททั้งในแง่ของการรักษาและการป้องกันโรคนั้นมีตัวชี้วัดที่สำคัญ คือ องค์ประกอบทางเคมีของสารสำคัญที่พืชสร้างขึ้นตลอดจนฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพร เนื่องจากเป็นสิ่งที่บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพและประสิทธิผลในการใช้สมุนไพร

พืชสมุนไพรเป็นผลผลิตจากธรรมชาติที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้เป็นประโยชน์และมีบทบาทในการดูแลสุขภาพของผู้บริโภคทั้งในด้านการป้องกันโรค และการรักษาโรคต่าง ๆ ยกตัวอย่างสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นยา เช่น ฟาโทะลายโจร ซึ่งมีสารสำคัญออกฤทธิ์ คือ สารกลุ่มแลคโตน (lactone) ได้แก่ andrographolide มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันในร่างกาย อีกทั้งยังช่วยระงับการอักเสบและด้านการติดเชื้อต่าง ๆ ได้⁽¹⁾ นอกจากนี้การนำสมุนไพรมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ อาทิ มัลเบอร์รี่ มะเฒ่า มะขามป้อม มะยม ซึ่งเป็นผลไม้กลุ่มเบอร์รี่ไทย โดยพืชกลุ่มนี้มีความสามารถในการลดกระบวนการชีวสังเคราะห์ของการสร้างเมลานินที่ผิวหนัง⁽²⁾ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ ดังนั้น จะเห็นได้ว่าสมุนไพรไทยนั้นนอกจากจะมีการใช้เพื่อรักษาและป้องกันโรคแล้วยังมีคุณสมบัติอื่น ๆ ที่น่าสนใจศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มศักยภาพการใช้สมุนไพรไทยให้เกิดประโยชน์สูงสุด

พืชวงศ์ Rutaceae เป็นที่รู้จักกันดีในประเทศไทยคือ วงศ์ส้ม ได้แก่ ส้ม มะนาว มะตูม เป็นต้น ซึ่งเป็นสมุนไพรไทยที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย ส่วนใหญ่จะนำมาประกอบอาหารและใช้ในรักษาโรคบางชนิด โดยพืชวงศ์นี้ มีสรรพคุณต่าง ๆ มากมายที่สามารถนำมาใช้เป็นยารักษาโรค นอกจากนี้ ยังมีการสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยจากพืชไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น น้ำหอม ยากันยุง และจากการสืบค้นงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าพืชกลุ่มนี้ เช่น มะแขว่น พญาบาท มะตูม และใบจันทน์หอม มีสารสำคัญที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง โดยมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเป็นส่วนใหญ่ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และคอลลาจีเนส จึงช่วยลดการสร้างเม็ดสีที่ผิวหนัง ป้องกันริ้วรอย (anti-aging) ช่วยให้ผิวขาว (whitening agent) และกระตุ้นการสร้าง procollagen ที่มีผลต่อการสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังอีกด้วย^{(3),(4),(5),(6)}

นอกจากนี้ พืชอีกชนิดหนึ่งที่ที่น่าสนใจและเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Rutaceae เช่นกัน คือ มะไฟจีน (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels) มีชื่อสามัญ คือ Wampee ลักษณะลำต้นจัดเป็นไม้ผลขนาดใหญ่ กิ่งก้านสาขาทรงพุ่มค่อนข้างทึบ ลักษณะผลคล้ายกับผลของมะไฟ (Burmese Grape : *Baccaurea ramiflora* วงศ์ Phyllanthaceae) มีถิ่นกำเนิดและเพาะปลูกในประเทศจีนตอนใต้ สำหรับประเทศไทยจัดเป็นพืชสมุนไพรประจำท้องถิ่นทางภาคเหนือโดยพบได้มากที่สุดที่ ตำบลท่าหน้าว อำเภอภูเพียง จังหวัดน่าน ซึ่งมีพื้นที่ติดกับบริเวณริมแม่น้ำน่านเหมาะแก่การเจริญเติบโตของมะไฟจีน จัดเป็นผลไม้เอกลักษณ์ประจำจังหวัด

นาน⁽⁷⁾ โดยมีการแปรรูปมะไฟจีนด้วยการทำเป็นมะไฟจีนเชื่อมแห้ง นอกจากจะนำมาบริโภคแล้ว มะไฟจีนยังมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง เช่น ส่วนผลมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ มะเร็งปอด⁽⁸⁾ ส่วนลำต้นมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (ant inflammatory effects) ส่วนใบ ใช้รักษาอาการไอ โรคหอบหืดและโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร และส่วนรากใช้แก้อาการปวดตามข้อและกล้ามเนื้อ ทั้งนี้จากการศึกษาข้อมูลคุณสมบัติทางเคมีของสารสกัดหยาบมะไฟจีน พบสารสำคัญเป็นสารกลุ่มเอไมด์ (amides) กลุ่มคาบาโซล แอลคาลอยด์ (carbazole alkaloids) กลุ่มคูมาริน (cumarins) ไตรเทอร์ปีนอยด์ (triterpenoids) และน้ำมันหอมระเหย (essential oils) จากการศึกษาฤทธิ์ต่าง ๆ นั้นพบว่ามะไฟจีนมีสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้านการเกิดออกซิเดชันหลายชนิด และสารต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคลหลายสายพันธุ์⁽⁹⁾ จากคุณสมบัติดังกล่าว มะไฟจีนเป็นพืชสมุนไพรที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งเพราะนอกจากจะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในเชิงอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารแล้ว ยังมีความโดดเด่นในเรื่องของคุณสมบัติทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นที่น่าสนใจ ควรค่าแก่การเพาะปลูก นำไปศึกษาวิจัยและพัฒนาต่อไป

ดังนั้นคณะผู้วิจัย มีความสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้ผิวหมองคล้ำและริ้วรอยของสมุนไพรนี้ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาต่อยอดในอนาคตสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นสารสำคัญออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอางซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพของการใช้มะไฟจีนให้เกิดประโยชน์สูงสุดได้

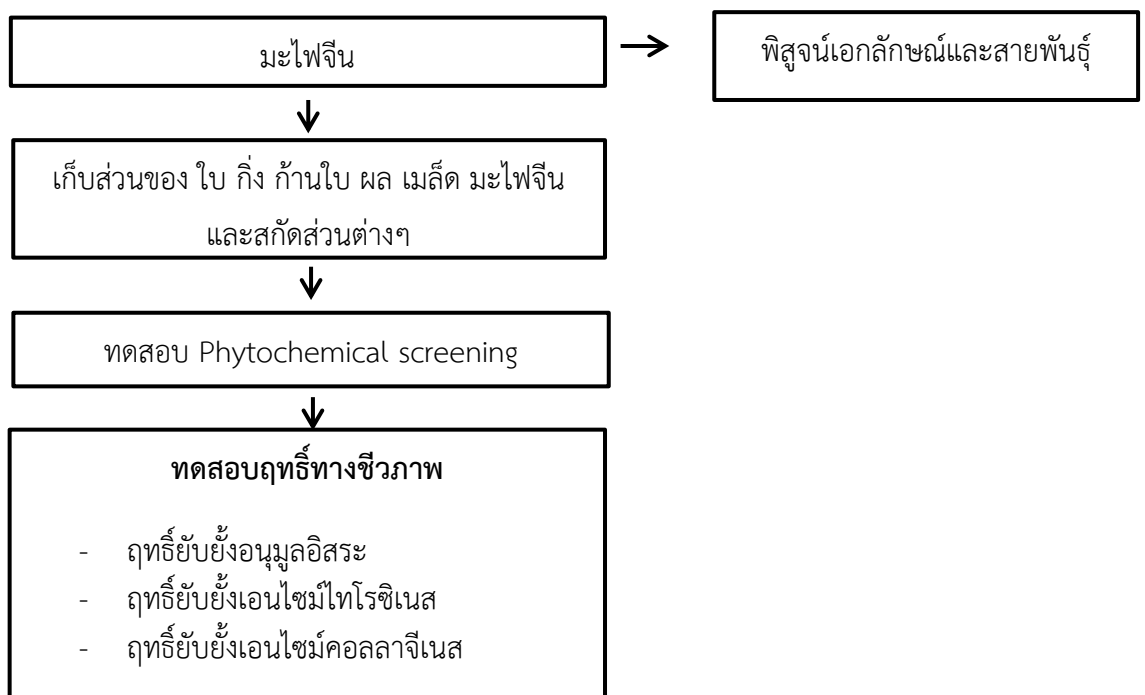
2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้ผิวหมองคล้ำและริ้วรอยของมะไฟจีน
2. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนต่าง ๆ ของมะไฟจีน

3. สมมติฐาน

มะไฟจีนเป็นพืชวงศ์ Rutaceae น่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้ผิวหมองคล้ำและริ้วรอย เหมือนพืชชนิดอื่นในวงศ์เดียวกันที่มีการรายงานมาแล้ว

4. กรอบแนวคิด



5. นิยามศัพท์เฉพาะ

- DI คือ Deionizationwater
 DW คือ Distilled water
 DPPH คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
 ABTS คือ 2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)
 FRAP คือ Ferric reducing antioxidant power

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 6.1 สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาต่อยอดการพัฒนาและประยุกต์ใช้มะไฟจีนสำหรับเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางในอนาคต
- 6.2 ได้ข้อมูลฤทธิ์ทางชีวภาพจากส่วนต่าง ๆ ของมะไฟจีน

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. มะไฟจีน

มะไฟจีน มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Clausena lansium* (Lour.) Skeels ชื่อสามัญ Wampee จัดอยู่ในวงศ์ Rutaceae มีถิ่นกำเนิดและแหล่งเพาะปลูกในประเทศจีนตอนใต้ในเขตมณฑลฝูเจี้ยน (Fujian), มณฑลกว่างตุง (Guangdong), มณฑลกว่างสี (Guangxi), มณฑลกุ้ยโจวใต้ (South Guizhou), มณฑลไหหลำ (Hainan), มณฑลเสฉวน (Sichuan), มณฑลยูนนานทางตะวันออกเฉียงใต้ (South East Yunnan) และทางตอนเหนือถึงตอนกลางของเวียดนาม (North to Central Vietnam)⁽¹⁰⁾ สำหรับประเทศไทยพบที่จังหวัดน่าน⁽⁷⁾

สำหรับลักษณะสัณฐานวิทยาของมะไฟจีน (รูปที่ 1) พบว่าลำต้นจัดเป็นไม้พุ่ม (shrub) หรือไม้ต้นขนาดเล็กสูง 3-12 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นขนาด 40 เซนติเมตร เปลือกลำต้นสีน้ำตาลเทา ใบประกอบขนนก ชั้นเดียว สีเขียวเข้ม ยาว 10-30 เซนติเมตร เรียงตัวแบบเวียน (spiral) ออกแบบสลับ (alternate) รูปร่างใบเป็นรูปไข่ (elliptic leaflets) ขนาด 2-6 มิลลิเมตร โคนใบมนปลายเรียวรีแหลม มีก้านใบขนาดสั้น (petiolules) ใบมันวาว ดอกออกเป็นช่อ มีตา (bud) แบ่งเป็น 5 แฉกในรัศมีเท่า ๆ กัน (pentamerous) กว้าง 14 มิลลิเมตร วงกลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ ขนาดเล็ก มีขน (pubescent) กลีบดอกเป็นสีขาวถึงสีเหลืองอ่อนปนเขียวเป็นรูปรี (oblong) ขนาด 5 มิลลิเมตร เกสรตัวผู้ยาวมี 10 อัน 9 อันเชื่อมติดกันและอีก 1 อันเป็นแยกเป็นอิสระ รังไข่มี 5-loculed กลมและมีขนที่หนาและสั้น ผล มีลักษณะเป็นผลอ่อนสีเขียว เมื่อสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนหรือสีน้ำตาลอมเหลือง ลักษณะผลกลมโต ทรงรีรูปไข่หรือรูปวงรีกว้าง ขนาด 1.5–3 × 1–2 เซนติเมตร มีขนและ glandular dotted (เมล็ด มีขนาด 10-15 มิลลิเมตร สีเขียวสดใสมีปลายสีน้ำตาล เนื้อของเมล็ดมีลักษณะเป็นเมือก ฉ่ำ กิ่งโปร่งแสง รสชาติหวานถึงเปรี้ยวอมหวาน⁽¹⁰⁾



ลำต้น



ใบ



ดอก

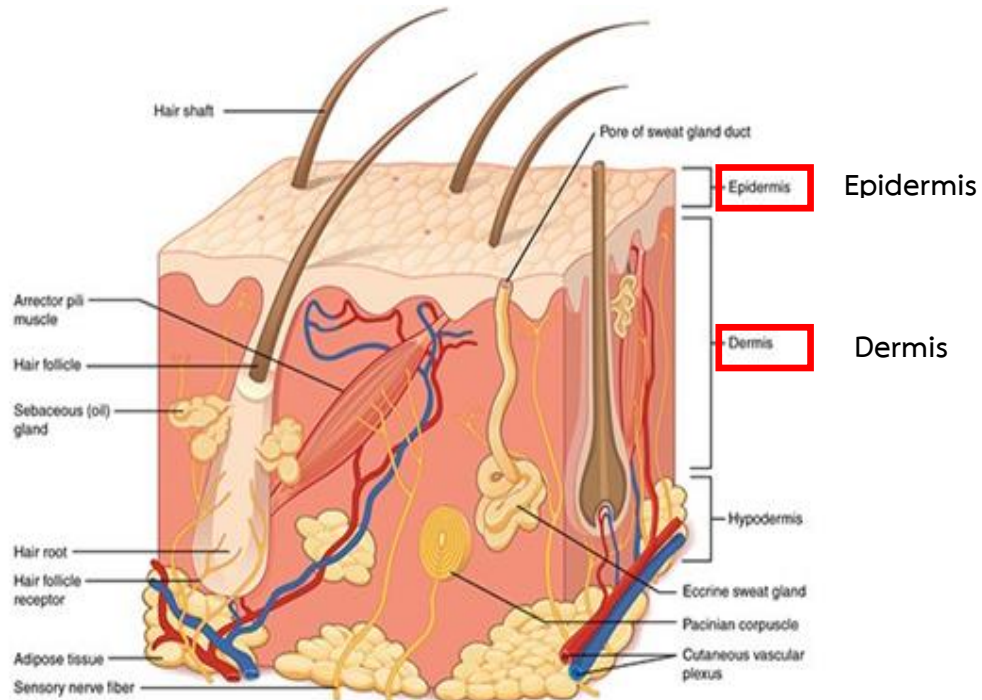


ผล

รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของมะไฟจีน⁽¹⁰⁾

2. ผิวหนัง

คือ อวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของร่างกาย เป็นสิ่งที่ปกคลุมร่างกายไม่ได้รับอันตรายจากสิ่งต่าง ๆ จากภายนอก เช่น แสงแดด สารเคมี เป็นต้น ซึ่งโครงสร้างของผิวหนัง⁽¹²⁾ (รูปที่ 2) ประกอบด้วย 3 ชั้น ได้แก่



รูปที่ 2 โครงสร้างทางผิวหนัง⁽¹²⁾

3. ความเสื่อมสภาพของผิวหนัง⁽¹³⁾

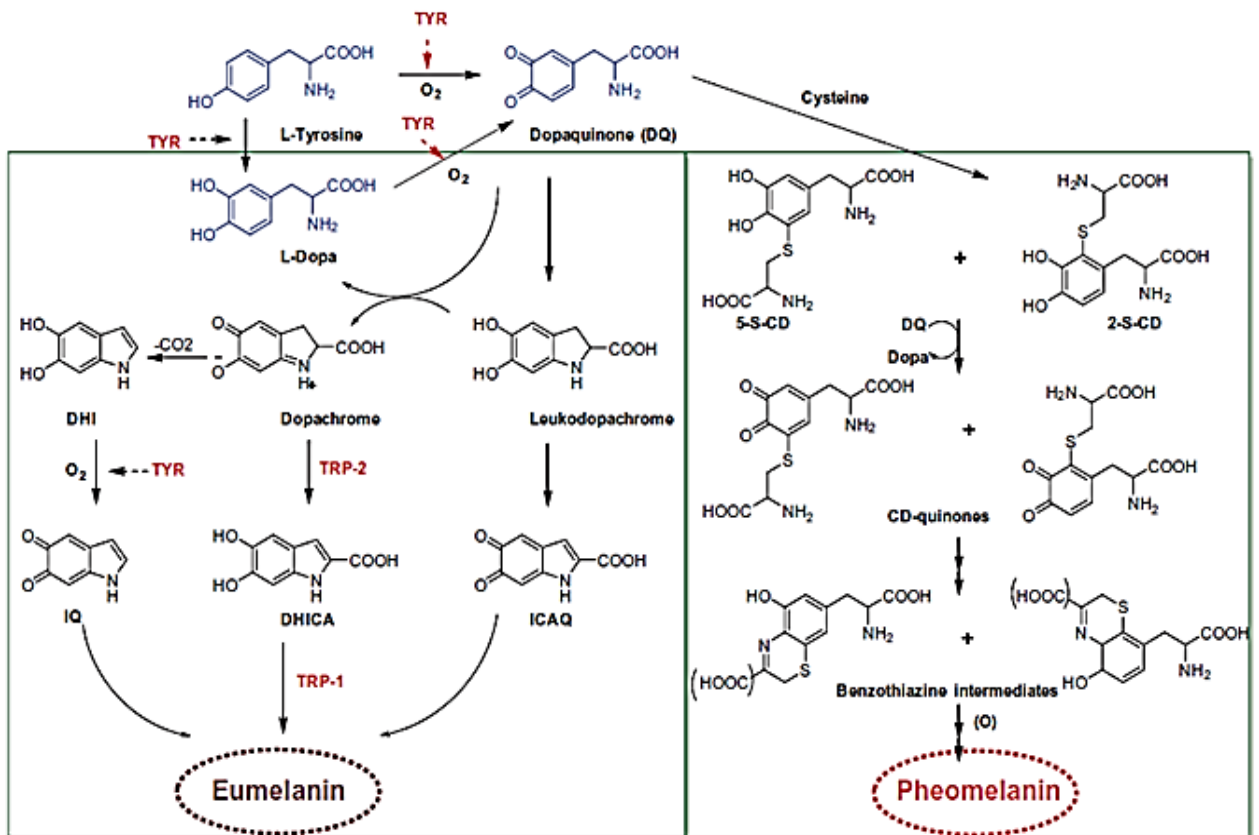
3.1 ปังจัยภายใน

การเกิดความเสื่อมสภาพของผิวหนังที่เกิดจากปังจัยภายในมีความสัมพันธ์กับพันธุกรรม ความเครียด ฮอรโมน เป็นต้น โดยพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น ได้แก่ ชั้นหนังกำพร้าและชั้นหนังแท้เสื่อมสภาพ และบริเวณรอยต่อระหว่างชั้นหนังแท้กับชั้นหนังกำพร้าเกิด flattening หรือมีความแฟบมากขึ้นเนื่องจากการสร้างเซลล์ผิวหนังลดลง เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย collagen เกิดความไม่สมดุลและมีปริมาณเพิ่มขึ้น นอกจากนี้จำนวนเซลล์ fibroblasts ในชั้นหนังแท้มีจำนวนลดลงทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์ matrix ที่อยู่นอกเซลล์ลดลง เช่นกันส่งผลทำให้ปริมาณ collagen, elastin และ glycosaminoglycan ของชั้นหนังแท้ลดลง

3.2 ปังจัยภายนอก

การเกิดความเสื่อมของผิวหนังที่เกิดจากปังจัยภายนอกส่วนใหญ่เกิดจากการสัมผัสแสงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet, UV) จากแสงแดด มีรายงานว่า การเกิดริ้วรอยบนใบหน้ามากกว่า 80% เกิดจากการสัมผัสแสงแดดหรือเรียกว่า photo aging ในทางคลินิก photo aging มีลักษณะปรากฏให้เห็นเด่นชัด คือ ผิวขาดความยืดหยุ่น ผิวหยาบแห้ง เกิดการสร้างเม็ดสีที่ผิดปกติ เกิดร่องลึกหรือริ้วรอย ชั้น epidermis หนาขึ้น (hyperplasia) และเกิดการเปลี่ยนแปลงของ matrix ที่อยู่นอกเซลล์ในชั้น dermis ได้แก่ collagen, elastin และ glycosaminoglycan

4. วิธีชีวสังเคราะห์ melanin



รูปที่ 3 วิธีชีวสังเคราะห์ melanin⁽¹²⁾

วิธีชีวสังเคราะห์ melanin (รูปที่ 3) เกิดจาก melanocyte ซึ่งทำหน้าที่สร้างเม็ดสี melanin เก็บไว้ใน melanosome แล้วส่งต่อไปยัง keratinocytes ที่ชั้นล่างสุดของชั้นหนังกำพร้า กระบวนการสร้าง melanin เกิดจากแสงแดดหรือรังสียูวีเป็นตัวกระตุ้น ทำให้ fibroblast หลั่งสารออกมา รวมถึงการกระตุ้นให้เซลล์ melanocyte สร้าง nitric oxide มากขึ้น ก่อให้เกิดการสร้างเม็ดสี melanin โดยการส่งสัญญาณภายในเซลล์ต่อกันเป็นทอด ๆ ผ่าน tyrosinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม oxidase ที่มี copper เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างของโปรตีนที่บริเวณเร่งและทำหน้าที่เป็น cofactor ของเอนไซม์ดังกล่าว tyrosinase สังเคราะห์มาจากไรโบโซมที่พบบน endoplasmic reticulum ชนิดหยาบเมื่อสังเคราะห์ได้ melanin จะส่งไปกักเก็บไว้ใน melanosome ซึ่งมีลักษณะเป็นถุง วิธีการสังเคราะห์ melanin มีดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Tyrosinase เร่งปฏิกิริยา hydroxylation เปลี่ยน L-tyrosine ไปเป็น 3,4-dihydroxyphenylalanine, L-DOPA

ขั้นตอนที่ 2 L-DOPA ถูก oxidize ไปเป็น dopaquinone จากนั้นจึงสังเคราะห์ต่อเป็น melanin ซึ่งมีด้วยกันสองชนิด ได้แก่ eumelanin และ pheomelanin ทั้งนี้เม็ดสีเมลานินทั้งสองชนิดมีวิธีการสังเคราะห์ที่แตกต่างกันโดย

- Eumelanin ซึ่งเป็น melanin สีน้ำตาลหรือสีคล้ำจะอาศัยโปรตีนที่เรียกว่า tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) และเอนไซม์ DOPachrome tautomerase (DCT หรือ TRP-2)

- Pheomelanin ซึ่งเป็น melanin มีสีเหลืองอาศัยจากการ conjugate ระหว่าง dopaquinone กับ cysteine หรือ glutathione

ขั้นตอนที่ 3 เม็ดสี melanin เหล่านี้จะถูกขนส่งไปเก็บไว้ยัง melanosome จากนั้นจะถูกขนส่งไปตาม dendrite เพื่อส่งเม็ดสีเหล่านี้ไปที่ keratinocytes ซึ่งอยู่ใต้ชั้นผิวหนังโดยปกติผิวหนังของคนเราจะมีรอบในการผลิตเซลล์ผิวประมาณ 28-39 วัน จากนั้นจะเกิดการสร้างเซลล์ผิวหนังขึ้นมาใหม่ เพื่อให้เกิดความกระจ่างใสของผิว ถ้าหากไม่เป็นไปตามรอบนั้นจะทำให้เกิดความหมองคล้ำขึ้น

5. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

5.1 อนุมูลอิสระ⁽¹⁵⁾ คือ โมเลกุลหรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ 10^{-3} - 10^{-10} วินาที จึงจัดว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี โดยสามารถตรวจวัดด้วย electron spin resonance (ESR) molecule ไอออนชนิดนี้เป็นตัวก่อให้เกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ ตัวอย่างอนุมูลอิสระได้แก่ superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radicle ($OH^{\cdot}$), peroxy radicle (ROO) และ hydrogen Peroxide (H_2O_2) โดยปกติสารเหล่านี้เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายอยู่แล้วและร่างกายมีระบบของสารต้านอนุมูลอิสระที่กำจัดสารพิษได้ แต่ถ้าร่างกายได้รับอนุมูลอิสระหรือเกิดการกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระจากภายนอกมากเกินไปหรือในภาวะที่สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายลดลง ทำให้มีอนุมูลอิสระมากเกินไปซึ่งก่อให้เกิดอันตรายได้และเพิ่มอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลายชนิด ได้แก่ โรคหลอดเลือดตีบและแข็งตัว โรคมะเร็ง โรคความจำเสื่อม โรคไขข้ออักเสบ และทำให้ผิวหนังเกิดรอยเหี่ยวย่น (wrinkle) เป็นต้น

นอกจากนี้อนุมูลอิสระเกิดจากสภาพแวดล้อมรอบตัว เช่น แสง ฝุ่น ควัน เป็นต้น จะเข้ามาทำลายโครงสร้างและหน้าที่ของผนังเซลล์ในร่างกาย ทำให้เซลล์ถูกทำลายและเสื่อมได้ทำให้อ่อนวัยและเกิดโรคได้ง่าย

5.2. สารต้านอนุมูลอิสระ⁽¹⁶⁾ (antioxidant substance) สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ได้ด้วยการให้หรือรับอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระไม่ต้องการอิเล็กตรอนจากเซลล์ของร่างกาย

6. Tyrosinase และ tyrosinase inhibitor⁽¹⁷⁾

6.1 Tyrosinase เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ตั้งแต่แบคทีเรีย รา พืชชั้นสูง รวมทั้งสัตว์ ช่วยเร่งปฏิกิริยาการสร้างสารสีน้ำตาลดำซึ่งเกี่ยวข้องกับความหมองคล้ำของสีผิวและผักผลไม้ ในสัตว์พวกแมลงบางชนิดเอนไซม์นี้มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตจากตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัย เอนไซม์ tyrosinase ในมนุษย์สังเคราะห์จาก ribosome พบที่ rough endoplasmic reticulum และถูกขนส่งด้วย golgi ไปยัง melanosome ซึ่งมีหน้าที่สังเคราะห์ melanin ดังนั้น จึงเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสีดำหรือสีน้ำตาลของผิวหนังหรือเส้นผม โดยเอนไซม์นี้มีการทำงานใน 2 ลักษณะ โดยใช้ออกซิเจนในรูปโมเลกุล (molecular oxygen) ดังนี้

1. Monophenolase activity เป็นการเร่งปฏิกิริยา *ortho*-hydroxylation ของ substrate ที่มีโครงสร้างเป็น monophenol ให้เป็น *ortho*-dihydroxyphenol

2. Diphenolase activity เป็นการเร่งปฏิกิริยา oxidation ของ *ortho*-dihydroxyphenol ให้เป็น *ortho*-quinone

6.2 Tyrosinase inhibitor คือ สารที่ยับยั้งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเม็ดสี melanin ตัวอย่างเช่น hydroquinone, arbutin เป็นต้น ปกติ tyrosinase เป็นเอนไซม์ที่สร้างเม็ดสี melanin มี 2 ชนิด ได้แก่ eumelanin เป็นเม็ดสีที่มีสีน้ำตาลหรือสีคล้ำ และ pheomelanin เป็นเม็ดสีที่มีสีเหลือง สารดังกล่าวจะทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างเม็ดสี melanin ทำให้สีผิวไม่คล้ำหรือทำให้สีผิวกระจ่างใสมากขึ้น

7. collagenase และ collagenase inhibitor⁽⁵⁾

7.1 collagenase หรือ MMPs : matrix metalloproteinases เป็นเอนไซม์ในร่างกายที่ย่อยสลายคอลลาเจน มีหน้าที่ย่อยสลาย matrix ที่อยู่นอกเซลล์ของผิวหนังโดยมี calcium และ zinc เป็น co-factor ที่ช่วยเร่งการทำงานของเอนไซม์ MMPs ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสลายของเซลล์มีดังนี้⁽⁵⁾

- MMP-1 หรือเรียกอีกอย่างว่า collagenase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย collagen type I และ III
- MMP-2 หรือเรียกอีกอย่างว่า gelatinase-A ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อย collagen ที่กระจายอยู่ในบริเวณรอยต่อผิวหนังชั้นหนังแท้กับหนังกำพร้า (dermal-epidermal junction)
- MMP-3 หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า stromelysin-1 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย collagen ต่อจาก MMP-1
- MMP-9 หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า gelatinase-B ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลาย collagen ต่อจาก MMP-1 เหมือนกับ MMP-3

ซึ่ง MMPs สามารถพบได้หลายชนิด แต่ MMPs ที่สำคัญที่สุดที่น่าสนใจ คือ MMP-1 ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลาย collagen type I และ III จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการฝ่อของผิวหนังชั้นหนังแท้ (dermal atrophy) และทำให้เกิด photo-aging skin ได้

7.2 Collagenase inhibitor เป็นสารที่ทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส เช่น metalloproteinase-1 inhibitor ซึ่งหากมีสารยับยั้งคอลลาจีเนสน้อยเกินไป จะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดการลดลงของเส้นใยคอลลาเจนได้ ตัวอย่างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ได้แก่ quercetin, epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG), curcumin เป็นต้น

8 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

8.1 การวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ⁽¹⁸⁾

8.1.1 ความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH[•]

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) คือ อนุมูลอิสระที่มีความเสถียร (stable free radical) เป็นสารที่นิยมนำไปใช้เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารที่สนใจ ใช้หลักการของ DPPH[•] ในรูปของอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารละลายซึ่งจะมีสีม่วงเข้มและดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร การสูญเสียอิเล็กตรอนอิสระให้กับโมเลกุลอื่นโดยรับอิเล็กตรอนคือสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารสกัดจากสมุนไพรมะนาว จะเกิดการเปลี่ยนแปลงอนุมูลอิสระ DPPH[•] ให้อยู่ในรูปออกซิไดซ์ (DPPH) ซึ่งการลดลง

ของอนุมูลอิสระดังกล่าวจะสังเกตได้จากการจางลงของสีม่วงในสารละลาย สามารถวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่นที่ 515 นาโนเมตร เป็นตัวชี้วัดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เนื่องจากเกิดการลดลงของ DPPH[•] ที่มีผลมาจากสารยับยั้งอนุมูลอิสระ

8.1.2 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+}

2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) ใช้หลักการเหมือนกับการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH แต่ในกรณี ABTS^{•+} เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุเป็นบวก ในสารละลายจะมีสีเขียวเข้มและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) หลายค่า ได้แก่ 415, 645, 734 และ 815 นาโนเมตร โดยทั่วไปแล้วจะนิยมใช้ความยาวคลื่นที่ 415 และ 743 นาโนเมตร ในการติดตามปฏิกิริยา โดยในการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นดังกล่าว จะใช้เป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (สีเขียวของสารละลายจางลง) ในการเตรียมอนุมูลอิสระของ ABTS^{•+} เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระจะมีขั้นตอนที่ยากกว่าวิธี DPPH คือ ต้องนำสารละลาย ABTS ไปผสมกับ potassium persulfate ด้วยอัตราส่วน 1: 0.5 (stoichiometry ratio) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้ได้อนุมูลอิสระที่เป็นประจุบวกของ ABTS^{•+} ก่อนนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

8.1.3 การวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

หลักการของวิธีนี้คือการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารยับยั้งอนุมูลอิสระ (คุณสมบัติเป็น reductant) ซึ่งจะแตกต่างจากวิธีการที่กล่าวไปแล้วข้างต้น โดยในสารละลาย FRAP ประกอบด้วย Fe^{3+} และ 2,4,6-tri (2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) ในสถานะที่เป็นกรด โดย Fe^{3+} ใน FRAP reagent จะรับอิเล็กตรอนจากสารยับยั้งอนุมูลอิสระมาตรฐาน หรือจากสารสกัดจากสมุนไพรแล้วเปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+} -TPTZ ที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร การวัดความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธีนี้จะวัดจากการเพิ่มขึ้นของสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+} -TPTZ โดยค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่เพิ่มขึ้นนี้จะใช้เป็นตัวชี้วัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนั่นเอง

8.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

วิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส แบ่งเป็น 2 วิธีใหญ่ คือ

8.2.1 วิธีทดสอบในหลอดทดลอง (*In-vitro* test) เอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบทาง *In-vitro* เช่น mushroom tyrosinase inhibitory assay และ cellular tyrosinase inhibitory assay

8.2.2 การทดสอบในสัตว์ทดลอง (*In-vivo* test) เป็นการทดสอบ depigmenting activity ในสิ่งมีชีวิต ยกตัวอย่างเช่น mouse model system, zebrafish model system และ human skin เป็นต้น

8.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Anti-collagenase inhibitory activity)⁽¹⁹⁾

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส จะใช้ N-(3-[2-Furyl]-acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) เป็น substrates โดยอาศัยการดูดซับของสารที่ลดลงหลังจากการทำปฏิกิริยาเมื่อเติมเอนไซม์ ซึ่งวัดในช่วงความยาวคลื่น 324-345 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ FALGPA ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ช่วง 0.5-1.0

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

มะไฟจีน (*Clausena lansium* (Lour.) Skeels) จากบ้านอาฮาม ตำบลท่าวังผา อำเภท่าวังผา จังหวัดน่าน เก็บในช่วงเดือนพฤษภาคม - กรกฎาคม พ.ศ. 2563 โดยใช้ส่วน ใบ กิ่ง และ ผลแก่เต็มที่แต่ยังไม่สุก

ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เบื้องต้น โดยส่งตรวจสอบสายพันธุ์โดยนักพฤกษศาสตร์ผู้เชี่ยวชาญ ที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2. เครื่องมือและอุปกรณ์สารเคมี

2.1 สารเคมี

- 2.1.1 Ethanol
- 2.1.2 Ethyl acetate
- 2.1.3 Ethanol
- 2.1.4 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 2.1.5 2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) ABTS
- 2.1.6 Acetate buffer
- 2.1.7 2,4,6-tri (2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ)
- 2.1.8 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 2.1.9 L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
- 2.1.10 Phosphate buffer
- 2.1.11 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- 2.1.12 Mushroom tyrosinase
- 2.1.13 N-(3-[2-Furyl]-acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA)
- 2.1.14 Sodium Chloride (NaCl)
- 2.1.15 Calcium Chloride (CaCl_2)
- 2.1.16 Collagenase ที่ได้จาก *Clostridium histolyticum*
- 2.1.17 Chloroform
- 2.1.18 Sulfuric acid (H_2SO_4)
- 2.1.19 Magnesium
- 2.1.20 Hydrochloric acid (HCl)
- 2.1.21 Dragendoff's agent
- 2.1.22 Kraut's reagent

- 2.1.23 Mayer's reagent
- 2.1.24 Hager's reagent
- 2.1.25 Tannic acid
- 2.1.26 Wagner's reagent
- 2.1.27 Sodium hydroxide (NaOH)

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 2.2.1 Water bath
- 2.2.2 Evaporation dish
- 2.2.3 Aluminium foil
- 2.2.4 Erlenmeyer flask
- 2.2.5 กระจกทรง เบอร์ 1
- 2.2.6 สำลี
- 2.2.7 Beaker 50 ml, 250 ml, 500 ml
- 2.2.8 Erlenmeyer flask 250 ml
- 2.2.9 หลอดทดลอง
- 2.2.10 Rotary evaporator
- 2.2.11 Spectrophotometer
- 2.2.12 Microplate Reader
- 2.2.13 Hammer mill
- 2.2.14 Sonicator
- 2.2.15 Incubator
- 2.2.16 Hot air oven
- 2.2.17 Shaker
- 2.2.18 Micropipette

3. การเตรียมพืชตัวอย่าง

3.1 พืช

- 3.1 คัดเลือกส่วนของพืชที่แห้ง เปื่อย ไม่สมบูรณ์ออก
- 3.2 ล้างด้วยน้ำสะอาด เพื่อชำระดิน โคลน ฝุ่นผง และสิ่งเจือปนอื่น ๆ ออก
- 3.3 นำพืชอบโดยใช้เครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 3.4 บดด้วยเครื่อง Hammer mill จนพืชตัวอย่างเป็นผงละเอียด
- 3.5 บรรจุผงตัวอย่างในถุงพลาสติก ปิดปากถุง เขียนฉลากระบุข้อมูลตัวอย่าง

4. วิธีการสกัดพืช

4.1 ขั้นตอนสกัดหยาบ

1. ชั่งน้ำหนักผงส่วนใบ กิ่ง ก้านใบ ผลและเมล็ดของมะไฟจีนใส่ลงใน Erlenmeyer flask
2. ทำการหมัก (maceration) โดยเติมตัวทำละลาย 99% ethanol ลงไปประมาณ 200 ml
3. ปิดปาก flask ด้วย aluminium foil ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-7 วัน เขย่าบ่อย ๆ
4. นำสารสกัดที่ได้กรองผ่านสำลีก่อน หากมีตะกอนทำการกรองผ่านกระดาษกรองอีกครั้ง
5. นำสารสกัดไประเหยภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) จนได้สารสกัดเข้มข้น
6. ชั่งน้ำหนักสารสกัด คำนวณร้อยละปริมาณสารสกัด (% yield) ที่ได้ บันทึกผล

5. Phytochemical screening

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัด 7 กลุ่ม ได้แก่ terpenoids, flavonoids, saponins, tannins, alkaloids, coumarins และ cardiac glycosides จะใช้ปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน ด้วยน้ำยาทดสอบ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

5.1 การตรวจสอบ Terpenoids

ชั่งตัวอย่าง 2 g เติม 99% ethanol 10 ml reflux บน water bath นาน 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 จากนั้นนำสารสกัด 1 ml ใส่ถ้วยตะไล ระเหยบน water bath จนสารสกัดแห้ง แล้วเติม acetic anhydride ประมาณ 2 หยด จากนั้นเติม conc. H_2SO_4 3-5 หยด สังเกตสีที่ปรากฏ ซึ่งถ้าสารละลายสีแดงหรือม่วง แสดงว่าพบ terpenoids

5.2 การตรวจสอบ Flavonoids ชั่งผงพืช 2 g เติม 99% ethanol 10 ml reflux บน water bath นาน 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 หลังจากนั้นแบ่งสารสกัดไปทดสอบ ดังนี้

Cyanidin test

- นำสารสกัด 2 ml ใส่ลงในหลอดทดลองแล้ว ใส่ลวด Magnesium ชิ้นเล็ก ๆ ลงไป 1-2 ชิ้น จากพื้นหยด conc. HCl 5 หยด สังเกตสีของสารละลายหากผลเป็นบวกจะปรากฏสีชมพู

Phenolic compound

- นำสารสกัด 2 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้น เติม 1% $FeCl_3$ ประมาณ 3 หยด สังเกตสีของสารละลายที่เกิดขึ้นหากผลเป็นบวกจะปรากฏสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำ

Deoxysugar

- นำสารสกัด 2 ml เติม 5% α -naphthol 3-4 หยด เติม conc. H_2SO_4 20 หยด สังเกตรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลายหากผลเป็นบวกจะปรากฏวงแหวนสีม่วง-แดง

5.3 การตรวจสอบ Saponins ชั่งตัวอย่าง 0.5 g เติมน้ำร้อน 10 ml เขย่าแรง ๆ อย่างน้อย 1 นาที แล้วกรอง นำสารสกัดที่กรองเล็ก 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด แล้วเติมน้ำกลั่น 10 ml ทำการเขย่าแรง ๆ ต่อเนื่องกัน 1 นาที จากนั้นสังเกตเกิดฟองที่คงตัวโดยทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นเติม 2 N HCl 1-2 หยด แล้วทำการเขย่าอีกครั้งตั้งทิ้งไว้ สังเกตฟองที่เกิดขึ้นอีกครั้ง หากยังมีฟองปรากฏอยู่แสดงว่าพบ saponins

5.4 การตรวจสอบ Tannins ชั่งตัวอย่าง 0.6 g เติมน้ำกลั่น 3 ml และ 99% ethanol 3 ml นำไปอุ่นบน water bath 10 นาที แล้วกรอง นำสารสกัดที่กรองเหลือ มาทดสอบดังนี้

ทดสอบ True Tannins

- แบ่งสารสกัด 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง หลังเติม 1% gelatin สังเกตการเปลี่ยนแปลง หากพบตะกอนขาว แสดงว่า เป็น true tannins หากไม่เป็นตะกอนขาว แสดงว่า เป็น pseudo-tannins

ทดสอบ Hydrolysable tannins

- แบ่งสารสกัด 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง หลังเติม 1% FeCl_3 สังเกตการเปลี่ยนแปลง หากพบตะกอนสีน้ำเงินถึงดำ แสดงว่า เป็น Hydrolysable tannins
- แบ่งสารสกัด 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง หลังเติมน้ำกลั่น 3 ml หยด lime water สังเกตการเปลี่ยนแปลง หากพบตะกอนสีเหลืองเหลืองเทา แสดงว่า เป็น Hydrolysable tannins

ทดสอบ Condensed tannins

- แบ่งสารสกัด 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง หลังเติม 1% FeCl_3 สังเกตการเปลี่ยนแปลง หากพบตะกอนสีเขียวเข้มถึงน้ำตาล แสดงว่า เป็น condensed tannins
- แบ่งสารสกัด 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง หลังเติม vanillin TS 1-2 หยด สังเกตการเปลี่ยนแปลง หากปรากฏสีแดงหรือชมพูทันที แสดงว่า เป็น condensed tannins

5.5 การตรวจสอบ Alkaloids ชั่งตัวอย่าง 2 g เติม 99% ethanol 10 ml reflux บน water bath นาน 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 นำของเหลวที่กรองไปทดสอบด้วย น้ำยา Dragendorff's reagent , Kraut's reagent, Mayer's reagent, Hager's reagent, Tannic acid, Wagner's reagent หากปรากฏตะกอนสีต่าง ๆ กับน้ำยาทดสอบประมาณ 70% ของจำนวนน้ำยาทั้งหมดที่ใช้ แสดงว่าพบ alkaloids

5.6 การทดสอบ Coumarins ชั่งตัวอย่าง 2 g เติม 99% ethanol 10 ml แล้วนำไป reflux บน water bath นาน 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 นำของเหลวที่กรองหยดลงบนกระดาษกรองจากนั้นหยดสารละลาย 10% NaOH 1 หยด นำไปส่องภายใต้ UV 365 nm หากเรืองแสงแสดงว่า พบ coumarins

5.7 การตรวจสอบ Cardiac glycoside ชั่งตัวอย่าง 2 g เติม 99% ethanol 10 ml จากนั้น reflux บน water bath นาน 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง เบอร์ 1 นำสารสกัดใส่กรวยแยก แล้วเติมน้ำกลั่น 5 ml จากนั้นนำมาสกัดด้วย dichloromethane 5 ml แล้วนำส่วนสารสกัด dichloromethane มาทำการทดสอบ ดังนี้

ทดสอบ unsaturated lactone

- นำสารสกัด 1 ml มาระเหยแห้งในถ้วยตะไล เติม Kedde's reagent A ตามด้วย Kedde's reagent B สังเกตสีที่ปรากฏ หากผลเป็นบวกจะปรากฏสีม่วงชมพูหรือม่วงน้ำเงิน

ทดสอบ steroid nucleus

- นำสารสกัด 1 ml ใส่ลงในถ้วยตะไล แล้วระเหยให้แห้ง แล้วเติม acetic anhydride 2 หยด ตามด้วย conc. H_2SO_4 1 หยด หากผลเป็นบวกจะปรากฏสีน้ำเงินปนเขียว หรือสีออกม่วง หรือสีเหลือง

ทดสอบ deoxysugar

- นำสารสกัด 1 ml เติม $FeCl_3$ in acetic acid หลังจากนั้นค่อย ๆ เติม conc. H_2SO_4 ลงไปประมาณ 1 ml หากผลเป็นบวกจะปรากฏวงแหวนสีม่วงแดงหรือน้ำตาลตรงบริเวณรอยต่อ

6. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

6.1 ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

6.1.1 DPPH radical scavenging activity⁽²¹⁻²²⁾

- 1) เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.06 mM โดยชั่ง DPPH[•] 1.2 mg ละลายด้วย ethanol ปรับปริมาตรจนครบ 50 ml ด้วย ethanol ได้สารละลาย DPPH[•] นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.700 ± 0.020
- 2) เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1000 $\mu g/ml$
- 3) ปิเปตสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น 20 μl ใส่ลงใน microplate 96 well plate เติมสารละลาย DPPH[•] ปริมาตร 180 μl ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด
- 4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer
- 5) คำนวณค่า % radical scavenging activities หรือ % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

$$A_{\text{control}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม}$$

$$A_{\text{sample}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง}$$
 ใช้สารมาตรฐาน Trolox สำหรับเปรียบเทียบ
- 6) นำไปทดสอบสถิติโดยใช้ ANOVA ต่อไป

6.1.2 ABTS radical scavenging activity⁽²³⁾

- 1) เตรียมสารละลาย ABTS^{•+} ความเข้มข้น 14 mM โดยละลาย ABTS 38.4 mg ในน้ำ 5 ml จากนั้นนำมาผสมกับ 4.9 mM potassium persulfate (โดยละลาย potassium persulfate 6.6 mg ในน้ำ 5 ml) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นระยะเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางด้วย ethanol และวัดค่าดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วงเท่ากับ 0.700 ± 0.020 ก่อนนำมาใช้ทดสอบ
- 2) เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1000 $\mu g/ml$
- 3) ปิเปตสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 20 μl ใส่ลงใน microplate 96 well plate เติมสารละลาย ABTS^{•+} 180 μl ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที ในที่มืด

- 4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer
- 5) คำนวณค่า % radical scavenging activities หรือ % Inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

$$A_{\text{control}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม}$$

$$A_{\text{sample}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง}$$
 ใช้สารมาตรฐาน Trolox สำหรับเปรียบเทียบ
- 6) นำไปทดสอบสถิติโดยใช้ ANOVA ต่อไป

6.1.3 Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay⁽³¹⁾

- 1) เตรียมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้
 - (1.1) เตรียม Acetate buffer 300 mM , pH 3.6
ละลาย sodium acetate trihydrate 4.09 g ใน DI 85 ml ปรับ pH ด้วย glacial acetic acid ให้ได้ pH ประมาณ 4 ปรับปริมาตรจนครบ 100 ml
 - (1.2) เตรียม TPTZ solution 10 mM TPTZ ใน 40 mM/HCl
ชั่ง TPTZ 31.232 mg ละลายใน 37% HCl 10 ml
 - (1.3) เตรียม 20 mM FeCl₃ · 6H₂O
FeCl₃ 0.5 ml ปรับปริมาตร DI 10 ml
- 2) เตรียมสารละลาย FRAP สารละลายต่าง ๆ ในข้อ 1.1, 1.2 และ 1.3 เพื่อใช้ในการทดสอบในอัตราส่วน 10 : 1 : 1
- 3) เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1000 mg/ml
- 4) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 µl ใส่ลงใน microplate 96 well แล้วเติม FRAP reagent 180 µl ทิ้งไว้ 30 นาที
- 5) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV/VIS Spectrophotometer
- 6) คำนวณค่า FRAP value โดยการเปรียบเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน trolox

7.ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส⁽²⁹⁾

- 7.1 เตรียม phosphate buffer pH 6.8 โดยนำ NaH₂PO₄ · 1H₂O 0.15 g และ NaHPO₄ 0.13 g ผสมใน distillation water ปริมาตรให้ครบ 100 ml แล้ววัด pH ให้ได้ 6.8 ด้วย NaOH
- 7.2 เตรียมสารละลาย 0.85 mM L-DOPA โดยนำ L-dopa มา 167.61 mg ละลายใน phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 10 ml
- 7.3 เตรียม 561.2 unit/ml tyrosinase โดยนำ 0.55 mg mushroom tyrosinase enzyme ละลายใน phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 2 ml
- 7.4 เตรียมสารตัวอย่างให้ได้ความเข้มข้น 400 µg/ml

- 7.5 ปิเปตสารตัวอย่าง 40 μl ผสม phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 80 μl และ tyrosinase solution 40 μl หลังจากนั้นนำไป pre-incubated ที่ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที
- 7.6 เติม 0.85 mM L-DOPA ปริมาตร 40 μl แล้วนำไป incubated ที่ 37 °C เป็นเวลา 20 นาทีอีกครั้ง
- 7.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader
- 7.8 คำนวณ % Tyrosinase inhibition ด้วยสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Tyrosinase inhibitory activity} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม

A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

ใช้สารมาตรฐาน Kojic สำหรับเป็นตัวเปรียบเทียบ

- 7.9 นำไปทดสอบสถิติโดยใช้ ANOVA ต่อไป

8.ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส⁽³⁰⁾

- 8.1 เตรียม Tricine buffer pH 7.5 (5 M NaCl และ 100 mM CaCl_2)

การเตรียมสารละลาย

- A. Tricine 2.24 g ละลายในน้ำ DI 190 ml (tricine solution)
 - B. ชั่ง NaCl 29.22 g ละลายในน้ำ DI 100 ml (ความเข้มข้น 5 M)
 - C. ชั่ง CaCl_2 1.47 g ละลายในน้ำ DI 100 ml (CaCl_2 solution)
- ขึ้นผสม

- (1) เติมสารละลาย B ปริมาตร 20 ml ลงใน สารละลาย A แล้วปรับ pH ด้วย 1 M NaOH ให้ได้ pH 7.5 (tricine buffer pH 7.5)
- (2) เติม สารละลาย C ปริมาตร 25 ml ลงใน tricine buffer pH 7.5
- (3) ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ประมาณ 240 ml
- (4) ปรับ pH ให้ได้ 7.5 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ครบ 250 ml

- 8.2 เตรียมสารละลายเอนไซม์ collagenase (ที่ได้จาก *Clostridium histolyticum*) ที่ความเข้มข้น 2 U/ml ในน้ำเย็น

- 8.3 เตรียม substrate คือ N-(3-[2-Furyl]-acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) ที่ความเข้มข้น 1 mM โดยชั่ง FALGPA 0.48 mg ละลายใน tricine buffer pH 7.5 ปริมาตร 1 ml คน 30 นาที ให้ละลาย

- 8.4 เตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$ โดยใช้ tricine buffer เป็นตัวทำละลาย

- 8.5 นำสารละลายเอนไซม์ collagenase ปริมาตร 30 μl ผสมกับ Tricine buffer pH 7.5 และสารตัวอย่าง 30 μl

- 8.6 นำของผสมไป incubated ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที

8.7 เติม FALGPA 1 mM ใน Tricine buffer ปริมาตร 20 μ l ลงไปแล้ทั้งไว้ 5 นาที

8.8 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

8.9 คำนวณค่า % collagenase inhibitor ด้วยสมการ

$$\% \text{ collagenase inhibitor} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

$$A_{\text{control}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม}$$

$$A_{\text{sample}} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง}$$

ใช้สารมาตรฐาน EGCG สำหรับเปรียบเทียบ

8.10 นำไปทดสอบสถิติโดยใช้ ANOVA ต่อไป

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การสกัดพืช

ตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของมะไฟจีน ได้แก่ ใบ (A), กิ่ง (B), ก้านใบ (C), ผล (D) และ เมล็ด (E) ผ่านการหมัก (maceration) ด้วยตัวทำละลาย เอทานอล แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วย Rotary evaporator ผลสารสกัด ดังแสดงในตารางที่ 1

จากสารสกัดตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของมะไฟจีน พบว่า สารสกัด A มีสีเขียวเข้ม คิดเป็น %yield เท่ากับ 3.71%, ส่วน B และ ส่วน C มีสีเขียว คิดเป็น %yield เท่ากับ 5.01%, 1.58% ตามลำดับ, ส่วนสารสกัด D มีสีน้ำตาลเข้ม คิดเป็น %yield เท่ากับ 1.08% และส่วน E มีสีเหลืองอ่อน คิดเป็น %yield เท่ากับ 0.36% ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตของการสกัดมะไฟจีนในส่วนต่าง ๆ

ตัวอย่าง	รายละเอียด	สีของสารสกัด	% yield
A	ใบ	เขียวเข้ม	3.71
B	กิ่ง	เขียว	5.01
C	ก้านใบ	เขียว	1.58
D	ผล	น้ำตาลเข้ม	1.08
E	เมล็ด	เหลืองอ่อน	0.36

2. การตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญเบื้องต้นของสารสกัด (Phytochemical Screening)

จากการตรวจสอบสารสกัดมะไฟจีน ทุกส่วนถูกนำมาตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญ ได้แก่ terpenoid, saponin, cardiac glycoside, alkaloid, flavonoid, coumarin และ tannin โดยสาร 7 กลุ่มให้ผลการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัด

การทดสอบ	ตัวอย่าง				
	A	B	C	D	E
Terpenoid	√	√	√	√	√
Saponin	√	-	-	√	-
Cardiac glycoside					
Kedde'reagent	-	-	-	-	-
Keller	-	√	√	-	-
Liebermann-Bruchard	√	√	√	√	√

ตารางที่ 2 การตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัด (ต่อ)

การทดสอบ	ตัวอย่าง				
	A	B	C	D	E
Alkaloid					
Kraut's	✓	✓	-	-	✓
Mayer's	✓	✓	-	-	✓
Hager's	✓	✓	✓	✓	✓
Tannic acid	-	-	-	-	✓
Wagner's	✓	-	-	-	✓
Dragendorff	✓	✓	-	-	✓
Flavonoid					
Cyaniding test	-	✓	✓	✓	✓
1% FeCl ₃	-	✓	✓	-	-
Molisch's	✓	✓	✓	✓	✓
Coumarin	✓	✓	✓	✓	✓
Tannin					
Gelatin	✓	✓	✓	✓	✓
1% FeCl ₃	✓	✓	✓	-	-
Lime	-	✓	✓	-	✓
Vanilin TS	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : ✓ หมายถึง ตรวจพบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด
 - หมายถึง ตรวจไม่พบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด

3. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

3.1 ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH , ABTS และ FRAP

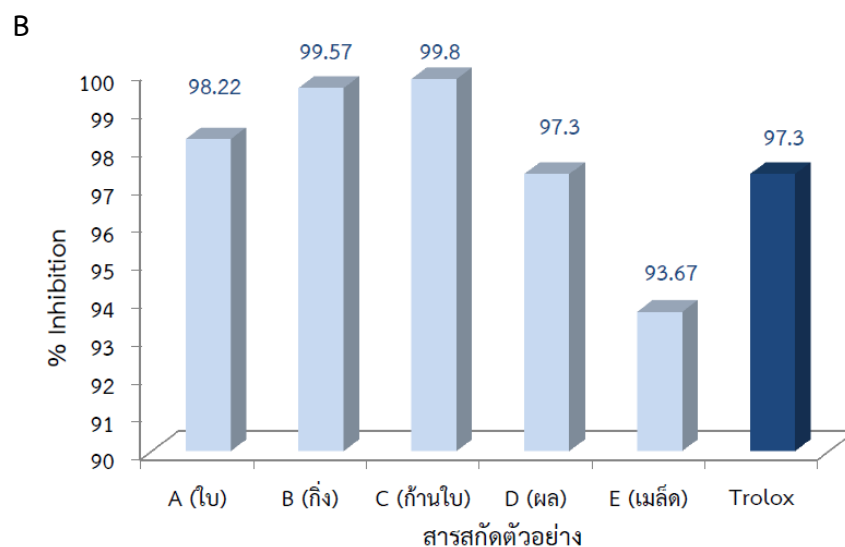
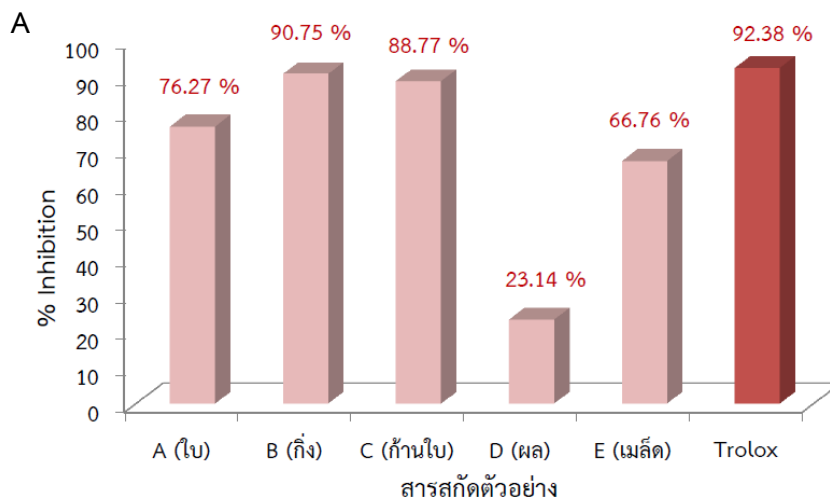
การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระจากส่วนต่าง ๆ ของมะไฟจีนที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 99.9% เอทานอล ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP วัดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร, 734 นาโนเมตรและ 593 นาโนเมตรตามลำดับ โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml เพื่อหาค่า % inhibition ซึ่งพบว่า สารสกัดทุกส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ, มีความสามารถในการให้โปรตอนและอิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระและยังมีความสามารถเป็น reducing agent ด้วย ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml

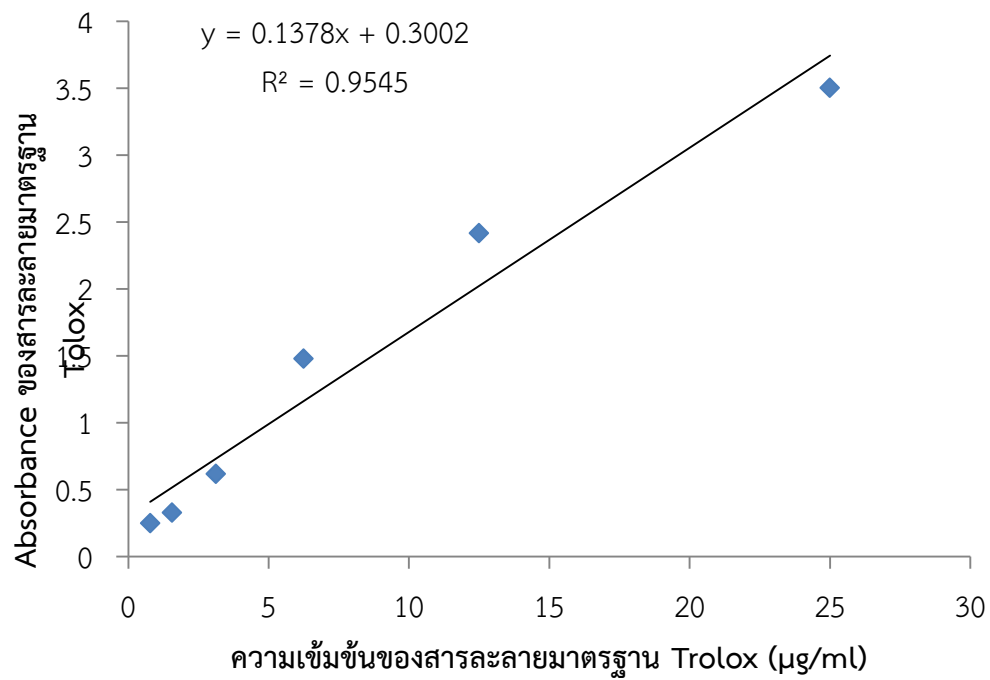
ตัวอย่าง	%Inhibition		FRAP Value mg Trolox/g ext
	DPPH	ABTS	
A	76.27±1.23*	98.22±0.78	346.14
B	90.75±0.21*	99.57±0.23*	512.17
C	88.77±0.23*	99.80±0.18*	223.32
D	23.14±1.16*	97.30±0.14	380.92
E	66.76±7.27	93.67±0.93	337.99
Trolox	92.38±0.21	97.30±0.28	-

หมายเหตุ : * หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

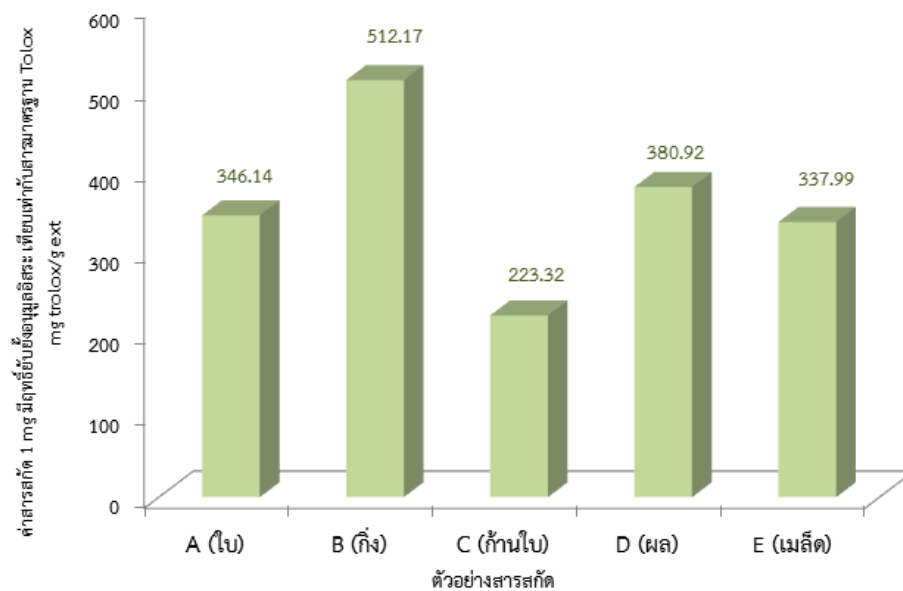
แผนภูมิที่ 1 % inhibition ของมะไฟจีนแต่ละส่วน โดยวิธี DPPH (A) และ ABTS (B)



กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่า Absorbance ของสารละลายมาตรฐาน



แผนภูมิที่ 2 แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระส่วนของพืชมะไฟจีนเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox



3.2ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจีเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (anti-tyrosinase) และเอนไซม์คอลลาจีเนส (anti-collagenase) ของมะไฟจีนที่มีผลต่อความหมองคล้ำและริ้วรอยของผิวหนัง ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดทุกส่วนของมะไฟจีนมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์

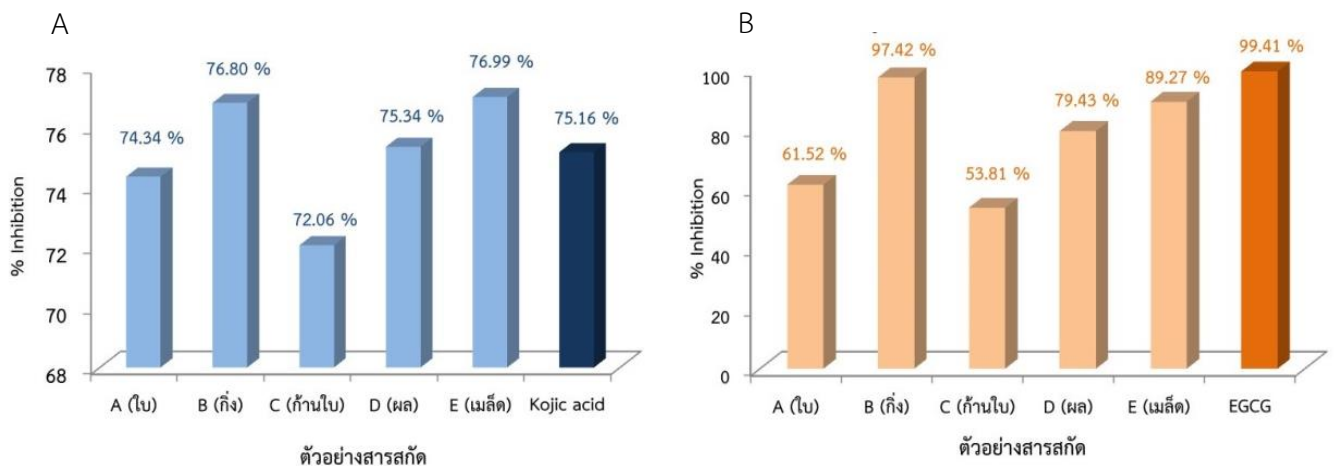
ตัวอย่าง	%Inhibition	
	Tyrosinase	Collagenase
A	74.34±1.24	61.52±3.33*
B	76.80±1.35	97.42±4.44
C	72.06±0.82	53.81±1.12*
D	75.34±1.53	79.43±1.56*
E	76.99±1.71	89.27±1.06*
Kojic	75.16±0.32	-
EGCG	-	99.41±3.50

หมายเหตุ : สารสกัดตัวอย่างที่ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ความเข้มข้น 400 µg/ml

สารสกัดตัวอย่างที่ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml

* หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

แผนภูมิที่ 3 แสดง % inhibition Anti-tyrosinase (A) และ Anti-collagenase (B) ของมะไฟจีน



บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

1. อภิปรายผลการทดลอง

1.1 การสกัดพืช (Crude extraction) และการตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญเบื้องต้นของสารสกัด (Phytochemical Screening)

จากการสกัดส่วนต่าง ๆ ของมะไฟจีน โดยใช้วิธีการหมัก (maceration) ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ได้ร้อยละของสารสกัด โดยคิดเป็น % yield ในแต่ละส่วนใกล้เคียงกันดังต่อไปนี้ สารสกัดส่วนใบ (A) 3.71%, สารสกัดส่วนกิ่ง (B) 5.01%, สารสกัดส่วนก้านใบ (C) 1.58%, สารสกัดส่วนผล (D) 1.08% และสารสกัดส่วนเมล็ด (E) 0.36% ตามลำดับ จากนั้นสารสกัดพืชตัวอย่างทุกส่วนได้ถูกนำมาตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญ 7 กลุ่ม ได้แก่ terpenoid, saponin, cardiac glycoside, alkaloid, flavonoid, coumarin และ tannin ผลการศึกษาพบว่า

กลุ่มสารประกอบเทอร์พีนอยด์และคูมารินส์ (Terpenoids, Coumarins) สารสกัดตัวอย่าง A-E พบสารในกลุ่ม coumarins และ terpenoids เนื่องจากให้ผลบวกกับการทดสอบกลุ่มสารดังกล่าว ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาของ จุฑารัตน์ โจนขำ⁽³²⁾ รายงานถึงกลุ่มสารที่สกัดได้จากใบมะไฟจีนที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเรณิดชนิดที่ 1 ได้แก่ สารในกลุ่มเอไมด์ (amides) คาร์บาโซล แอลคาลอยด์ (carbazole alkaloids) คูมารินส์ (coumarins) ไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoids) รวมทั้งสารกลุ่มน้ำมันหอมระเหย (essential oils)

กลุ่มสารประกอบซาโปนินส์ (Saponins) จากการตรวจสอบพบสารกลุ่มดังกล่าวในตัวอย่าง A และ E ซึ่งในการตรวจสอบเป็นการทดสอบสารที่มีส่วนโครงสร้างของ aglycone จำพวก steroids หรือ triterpenoids ซึ่งจะจับกับส่วนของน้ำตาลได้เป็นสารประกอบ saponin glycoside ที่มีคุณสมบัติเกิดฟองคล้ายสบู่

กลุ่มสารประกอบแอลคาลอยด์ (Alkaloids) เป็นการทดสอบสารที่มีอะตอมไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง จึงมีคุณสมบัติเป็นด่าง อะตอมไนโตรเจนสามารถเกิด double salt กับสารประกอบโลหะหนักได้หลายชนิด ในสถานะที่เป็นกลางหรือกรดอ่อน จึงเห็นเป็นตะกอนสีต่าง ๆ ได้แก่ ตะกอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับ oxygen-containing acid ในการทดสอบ Tannic acid ตะกอนกลุ่ม halogenated compound ในการทดสอบ Wagner's ตะกอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับอะตอมไนโตรเจนของแอลคาลอยด์ ในการทดสอบ Mayer's และ Dragendorff ตะกอนหรือเกลือที่เกิดจากแอลคาลอยด์ทำปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์ ในการทดสอบ Hager's ซึ่งในการทดสอบต้องให้ผลบวก 70% กับน้ำยาทดสอบทั้งหมดถึงจะสรุปได้ว่าสารสกัดตัวอย่างมีสารกลุ่ม alkaloids⁽³³⁾ จากการตรวจสอบสารกลุ่มดังกล่าวในส่วนต่าง ๆ ของมะไฟจีนพบว่า สารสกัด A และ B ให้ผลบวกกับ Kraut's, Mayer's, Hager's, Wagner's และ Dragendorff โดยให้ตะกอนสีขาว ตะกอนสีขาวครีม ตะกอนสีเหลือง ตะกอนสีน้ำตาลแดงและตะกอนสีแดงอิฐ ตามลำดับ ส่วนสารสกัด E ให้ผลบวกกับทุกน้ำยาทดสอบ คือ ให้ผลบวกกับ Kraut's ได้ตะกอนสีขาว, Mayer's ได้ตะกอนสีขาวครีม, Hager's ได้ตะกอนสีเหลือง, Wagner's ได้ตะกอนสีน้ำตาลแดง, Dragendorff ได้ตะกอนสีแดงอิฐ และ Tannic acid ให้ตะกอนสีขาวเหลือง ตามลำดับ จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัด A, B และ E พบสารประกอบกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นองค์ประกอบ

กลุ่มสารประกอบคาร์ดิแอ็ก กลัยโคไซด์ (Cardiac glycosides) เป็นการทดสอบโครงสร้างที่ประกอบด้วยสาร 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนแรก เป็นโครงสร้างหลักเรียกว่า aglycone เป็น steroidal nucleus ส่วนที่สองเป็นน้ำตาล เรียกว่า glycoside (glycone) โดยจะต่อกับโครงสร้าง aglycone ที่ตำแหน่ง C-3 ส่วนใหญ่เป็น deoxy sugar ส่วนที่สามเป็น α - หรือ β -unsaturated lactone ต่อกับโครงสร้าง aglycone ตรงตำแหน่ง C-17 ซึ่งในการทดสอบกลุ่มสารดังกล่าวจะแบ่งเป็น 3 การทดสอบ คือ ส่วนที่เป็น unsaturated lactone ring ที่ตำแหน่ง C-17 ทดสอบกับน้ำยา Kedde's reagent (3,5-dinitrobenzoic acid) โดยน้ำยาจะทำปฏิกิริยากับ active methylene group ใน unsaturated lactone ring ให้ผลบวกเป็นสีม่วงชมพู ส่วนที่เป็น steroid nucleus ทดสอบกับ Liebermann-Burchard (acetic anhydride-sulfuric acid) ให้ผลบวกเป็นสีน้ำเงินปนเขียวหรือสีม่วง ส่วนที่เป็น deoxy sugar moiety ทดสอบกับน้ำยา Keller-Kiliani's reaction (ferric chloride-acetic acid)⁽³³⁾ ให้ผลบวกปรากฏสีม่วงที่รอยต่อของสารสกัด จากการตรวจสอบกลุ่มสารดังกล่าว พบว่า สารสกัด B และ C ให้ผลบวกกับน้ำยา Keller-Kiliani's และ Liebermann-Burchard แต่ให้ผลลบกับน้ำยา Kedde's reagent และสารสกัดอื่น ๆ ก็ให้ผลลบกับทั้ง 3 การทดสอบ ดังนั้นจึงไม่พบสารกลุ่มนี้ในตัวอย่างทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ

กลุ่มประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) มีทั้งรูป aglycone และ glycoside เป็นสารมีสี มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ (antioxidant) ทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางในการชะลอความแก่ (anti-aging) และมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง มีคุณสมบัติสามารถละลายในตัวทำละลายที่มีเอทานอลผสมกับน้ำ การทดสอบนิยมแบ่งเป็น 3 การทดสอบ ได้แก่ การทดสอบ Cyanidin ใช้ตรวจสอบโครงสร้าง γ -benzopyrone ring (benzo- γ -pyrone, benzopyran-4-one) ทำปฏิกิริยารีดอกซ์ (oxidation-reduction) ระหว่างแมกนีเซียมและกรดเกลือเข้มข้นทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็น สีแดง สีชมพู หรือส้ม การทดสอบด้วย ferric chloride เป็นการตรวจสอบสารกลุ่ม phenolic ให้ผลบวกเป็นสีน้ำเงิน เขียว น้ำตาลหรือดำ การทดสอบโดยวิธี Molisch's เป็นการตรวจสอบน้ำตาลที่เชื่อมอยู่ในโครงสร้าง ให้ผลบวกเป็นวงแหวนสีม่วงตรงบริเวณรอยต่อของสารสกัดกับกรดซัลฟูริกเข้มข้น จากผลการทดสอบ พบว่า สารสกัด B และ C ให้ผลบวกกับทั้ง 3 การทดสอบ แสดงว่าตัวอย่าง B และ C พบสารประกอบกลุ่มฟลาโวนอยด์

กลุ่มสารประกอบแทนนิน (Tannins) เป็นกลุ่มสารที่มีโครงสร้างแบบ polyphenols ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม hydrolysable tannin จะประกอบด้วย phenolic acid และน้ำตาล กลุ่ม condensed tannins มีโครงสร้างเป็น oligomer หรือ polymer และ pseudotannin เป็นสารประกอบเชิงเดี่ยวมีโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งในการทดสอบสารกลุ่มนี้นิยมแบ่งการทดสอบเป็น 3 การทดสอบ ได้แก่ การทดสอบด้วยสารละลาย Gelatin เป็นการตรวจสอบสารประกอบกลุ่ม true tannin ซึ่งจะเกิดตะกอนคั่งตัว การทดสอบด้วยสารละลาย ferric chloride เป็นการตรวจสอบโครงสร้าง phenolic compounds โดยถ้าเป็นสารประกอบกลุ่ม hydrolysable tannins จะให้ตะกอนสีน้ำเงินถึงดำ และถ้าเป็นสารประกอบกลุ่ม condensed tannins จะให้ตะกอนสีเขียวเข้มหรือสีน้ำตาลถึงดำ และการทดสอบด้วย Lime water เป็นการตรวจสอบเฉพาะสารกลุ่ม hydrolysable tannins ซึ่งจะให้ตะกอนสีเหลืองเหลืองเทา นอกจากนี้สามารถทดสอบเพื่อยืนยันสารกลุ่ม hydrolysable tannins โดยทดสอบด้วยน้ำยา Vanilin TS จะให้สีม่วงแดงทันที จากการตรวจสอบสารกลุ่มนี้ในตัวอย่างมะไฟจีนพบว่า สารสกัด B และ C ให้ผลบวกทั้ง 3 การทดสอบ แสดงว่า สารสกัดดังกล่าวพบสารประกอบกลุ่มแทนนิน

ดังนั้นจากการตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญทั้ง 7 ชนิด ในสารสกัดตัวอย่างจากส่วนต่าง ๆ ของมะไฟจีนจึงพอสรุปได้ดังนี้ สารสกัด A พบสารประกอบ terpinoids, coumarin, saponin และ alkaloid สารสกัด B

พบสารประกอบ terpenoid, coumarin, cardiac glycoside, alkaloid, flavonoid และ tannin สารสกัด C พบสารประกอบ terpenoid, coumarin, cardiac glycoside, alkaloid, flavonoid และ tannin สารสกัด D พบสารประกอบ terpenoid, coumarin, saponin, flavonoid และ coumarin สารสกัด E พบสารประกอบ terpenoid, coumarin, alkaloid และ flavonoid (ดังตารางที่ 2)

1.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.2.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ

สารสกัดทุกส่วนของมะไฟจีนถูกนำมาประเมินฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยทำการตรวจสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ซึ่งผลการทดสอบพบว่า การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เป็นการวัดความสามารถของสารประกอบมะไฟจีนที่มีผลต่อ DPPH[•] ซึ่งจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีที่จางลง และสามารถวัดได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างมะไฟจีนพบว่า สารสกัดทุกส่วนมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระนอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดส่วน B มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด (90.75%) รองลงมาเป็นสารสกัด C (88.77 %), A (76.27%), E (66.76%) และ D (23.14 %) ตามลำดับจากการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox พบว่าสารสกัด B มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Trolox (92.38%) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การศึกษานี้สอดคล้องกับการรายงานการวิจัยของ อนันต์ ศรีปริชาศักดิ์ ที่มีการรายงานว่าฤทธิ์ทางชีวภาพทุกส่วนของพืชสกุล *Clausena* ได้แก่ ส่วนใบ กิ่ง เปลือก ลำต้น และราก ของส่องฟ้าตง (*C. harmandiana*), ส่องฟ้า (*C. guillauminii*) และสันโสก (*C. excavate*) มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH⁽³⁴⁾

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS^{•+} ของสารสกัดตัวอย่างมะไฟจีนโดยอาศัยหลักการลดลงของสีของสารละลายที่จาง ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร จากผลการทดสอบพบว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ของสารสกัด B (99.57%) และ C (99.80%) มีฤทธิ์ใกล้เคียงกันและสูงที่สุด รองลงมาคือ A (98.22%), D (97.30%) และ E (93.67%) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox พบว่าสารสกัด A, B และ C มีฤทธิ์สูงกว่าสารมาตรฐาน Trolox (97.30%) โดยสารสกัด B และ C แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานดังกล่าว ในขณะที่สารสกัด D มีฤทธิ์เท่ากับสารมาตรฐาน Trolox จากการรายงานที่ผ่านมาที่มีการระบุถึงพืชบางชนิดได้แก่ มะตูมอ่อน (*Aegle marmelos*) ที่อยู่ในวงศ์ Rutaceae เช่นเดียวกับมะไฟจีนมีผลในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS เช่นกัน⁽³⁵⁾

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ซึ่งอาศัยหลักการให้อิเล็กตรอนของสารยับยั้งอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing agent) แก่สารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} -TPTZ เป็น Fe^{2+} -TPTZ และสามารถตรวจสอบได้ที่ความยาวคลื่น 593 nm ในการทดสอบนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถของการเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing agent) ของสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value (mg Trolox/g ext.) พบว่า สารสกัดตัวอย่าง B มีค่า FRAP value สูงที่สุด (512.17 mg Trolox/g ext.) รองลงมาเป็นสารสกัด D (380.92 mg Trolox/g ext.), A (346.14 mg Trolox/g ext.), E (337.99 mg Trolox/g ext.) และ C (223.32 mg Trolox/g ext.) ตามลำดับ โดยสอดคล้องกับการรายงานผลของ ปฐมพงษ์ เผือกดี ที่พบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ในพืชบางชนิดได้แก่ มะตูมอ่อน (*Aegle marmelos*) ที่อยู่ในวงศ์ Rutaceae⁽³⁵⁾

1.2.2 การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารตั้งต้น Tyrosine ให้เป็น L-DOPA จากนั้นจะเปลี่ยน L-DOPA เป็นสาร intermediate ที่ชื่อ Dopakinone เพื่อเปลี่ยนเป็นเม็ดสีเมลานิน ซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินที่ผิวหนังและเป็นสาเหตุทำให้เกิดความหมองคล้ำของผิวหนัง ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงเป็นการป้องกันการเกิดกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ซึ่งในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะอาศัยหลักการที่สารสกัดตัวอย่างจะต้องมีความสามารถในการจับกับโลหะคอปเปอร์ซึ่งเป็นองค์ประกอบในเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า L-DOPA เพื่อไม่ให้ L-DOPA ไปจับกับเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินลดลง⁽³⁶⁾ โดยสามารถตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 492 nm. ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดทุกส่วนของมะไฟจีนมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสารสกัด B (76.80%) และ E (76.99%) มีฤทธิ์ยับยั้งสูงที่สุด รองลงมาเป็น D (75.34 %), A (74.34 %) และ C (72.06 %) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Kojic acid (75.16 %) และพบว่าสาร B และ E มีความสามารถยับยั้งได้ดีกว่าสารมาตรฐานดังกล่าวซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์ ที่มีรายงานว่า พืชบางชนิดได้แก่ มะสัง (*Feroniella lucida*) ในวงศ์ Rutaceae มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส⁽³⁷⁾ เช่นเดียวกัน

เอนไซม์คอลลาจีเนสเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดริ้วรอย เนื่องจากทำให้ผิวหนังถูกทำลายส่งผลทำลายคอลลาเจนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของผิว โดยมีการรายงานว่าการประกอบฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสเนื่องจากสารในเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็น Chelator ที่สามารถจับกับ Zn^{2+} มีผลทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ⁽³⁸⁾ จึงอาศัยคุณสมบัตินี้ในการนำมาทดสอบสารสกัดจากธรรมชาติซึ่งสามารถตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่น 335 nm จากผลการทดลองพบว่า สารสกัด B (97.42 %) มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน EGCG (99.41 %) รองลงมา E (89.27 %), D (79.43 %), A (61.52 %) และ C (53.81 %) ตามลำดับ และสารสกัด A, C, D และ E มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานผลของฤทธิ์พันธุ์ รุ่งเรือง ที่รายงานว่าสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส⁽³⁸⁾ ดังนั้น มะไฟจีนที่มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบจึงมีผลในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้

2. สรุปผล

จากการศึกษาวิจัยนี้สารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของมะไฟจีนมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ FRAP ที่แตกต่างกัน และยังสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์คอลลาจีเนส ที่มีผลทำให้ผิวเกิดความหมองคล้ำและริ้วรอย ดังนั้น ข้อมูลเหล่านี้จึงเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับใช้เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยต่อยอดสมุนไพรนี้ เพื่อประยุกต์ใช้ในทางเครื่องสำอางต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. ชนโชติ ธรรมชาติ. ฟ้าทะลายโจร. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน [cited 20 มิถุนายน 2563]. Available from: http://eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/herb_gar/ฟ้าทะลายโจร.pdf.
2. ประไพพิศ อินเสน. การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพืชกลุ่มเบอร์รี่ไทย. EAU Heritage Journal Science and Technology. 2018;12(2):69-82.
3. สุวดี โพธิ์วิจิตร , ปิยานี รัตนขำนอง , อุดมลักษณ์ มาตย์สถิตย์และวีระศักดิ์ อัสววงศ์อารยะ.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยพื้นบ้านสะค้านและมะแขว่นในเขตท้องถื่นภาคเหนือ. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. 2562;18(1):2561-289.
4. อัจฉรา รักสัตย์ , ชลพิสุทธิ์ ตันตาปกุล , วิษณุ มณีรัตน์และสุรัตน์ ละภูเขียว. องค์ประกอบทางเคมีจากใบของจันทร์หอม. วารสารวิทยาศาสตร์มข. 2560;45(2):287-297.
5. สุพัตรา ม่วงงาม. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบบัญญาและลูกเดือยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส. วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร ฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 5. 261-268.
6. ปฐมพงษ์ เผือกลี , ภาณุรัฐ เดชะยนต์ , จิตพิสุทธิ์ จันทร์ทองอ่อนและอรุณพร อิฐรัตน์. ฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมอ่อน. ธรรมชาติเวชสาร. 2561;18(3):349-57.
7. สุระพงษ์ รัตนโกศล. โครงการพัฒนาผลิตภัณฑ์มะไฟจีนที่มีคุณภาพดีสม่ำเสมอ [โครงการวิจัย]. กรมวิชาการเกษตร. 2563.
8. ศรีโสภา เรืองหนู , รุจิลักษณ์ รัตตะมัยและอรุณพร อิฐรัตน์. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งของรากมะม่วง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท). 2562;6(1):38-51.
9. Nam V, Teruhisa F, Hirofumi T, Hiroshi K, Khoi N, Dung L, et al. Chemical Composition of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels Leaves and Antifungal Activity. Natural Product Sciences. 2016;22:35.
10. Lim TK. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Springer, Dordrecht; 2012. 871-83 p.
11. Nam V, Teruhisa F, Hirofumi T, Hiroshi K, Khoi N, Dung L, et al. Chemical Composition of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels Leaves and Antifungal Activity. Natural Product Sciences. 2016;22:35.

12. Eucerin. รู้จักโครงสร้างและหน้าที่ของผิว 2020 [cited 2563 4 พฤษภาคม]. Available from: <https://www.eucerin.co.th/about-skin/basic-skin-knowledge/skin-structure-and-function>.
13. รุ่งสรวง น. ความแก่ของผิวหนัง:กลไกการเกิดระดับโมเลกุล การป้องกัน/การรักษาและสารธรรมชาติที่ใช้ในการต่อต้านความแก่ของผิวหนัง. อาคารสภาวิชาชีพ ชั้น 8 กระทรวงสาธารณสุข
14. ประนอม สุขเกื้อ.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากพืชท้องถิ่น (โสน, *Sesbania javiaca* Mig.): คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ; 2557.
15. ศุทธิเกียรติ สิริวรกุล , ผกามาศ สีเมือง , ศุภกัญญา ไพศาลจิตอาทร. การพัฒนาสูตรตำรับครีมชะลอริ้วรอยที่มีส่วนผสมของสารสกัดเมล็ดลำไย (Development of Anti-aging Cream containing Longan Seed Extract) [Senior Project]: เกษศาตร์บัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2555.
16. ทักษอร รัตนยุวัน. การพัฒนาตัวพออนุภาคนาโนไขมันที่บรรจุสารสกัดดอกดาวเรืองเพื่อยับยั้งฤทธิ์เอนไซม์ไทโรซิเนส: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2557.
17. กิตติพัฒน์ โสภิตธรรมคุณ , ปานทิพย์ รัตนศิลป์กัลชาญ. การสกัดและวิธีวัดความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของในพืชสมุนไพร. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 2017;3(1):85-93.
18. ขวัญจิต อิศระสุข.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบลองกอง. Journal of Food Health and Bioenvironmental Science. 2015;8(3):81-96.
19. รพีกานต์ ศักดาวัฒนกุล. สมบัติทางชีวภาพแบบนอกกายของสารสกัดมะขามป้อม ละครูด และมะขามป้อมผสมละครูด สำหรับการประยุกต์ใช้ทางเครื่องสำอาง: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2559.
20. Van Wart HE, Steinbrink DR. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. Analytical biochemistry. 1981;113(2):356-65.
21. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis. 2006;19(6):669-75.
22. Zhu K., H. Zhou and H. Qian. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. Process Biochemistry. 4:1296–1302.
23. Re R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine. 26: 1231-1237.

24. Kubola J., and S. Siriamornpun 2008. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf stem and fruit fraction extracts in vitro. Food Chemistry, 110: 881–890.
25. Kubo I., I. Kinst-Hori, S. K. Chaudhri, Y. Kubo, Y. Sanchez and T. Ogura. 2000. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 8: 1749-1755
26. Saewan N., S. Koyasomboon and K. Chantrapromma. 2011. Anti-tyrosinase and Anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC. JMPR. 5(6): 1018-1025
27. Van Wart, H.E. and D.R. Steinbrink. 1981. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. Analytical Biochemistry 113(2): 356-365.
28. Mandrone M, Lorenzi B, Venditti A, Guarcini L, Bianco A, Sanna C, et al. Antioxidant and anti-collagenase activity of *Hypericum hircinum* L. Industrial Crops and Products. 2015;76:402-8.
29. Dej-Adisai S, Meechai I, Puripattanavong J, Kummee S. Antityrosinase and antimicrobial activities from Thai medicinal plants. Arch Pharm Res. 2014 Apr;37(4):473-83. doi: 10.1007/s12272-013-0198-z. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23835832.
30. Utami S, Sachrowardi Q, Andri N, Syarif I, Nafik S, Arrahmani B, et al. Antioxidants, anticollagenase and antielastase potentials of ethanolic extract of ripe sesoot (*Garcinia picrorrhiza* Miq.) fruit as antiaging. Journal of HerbMed Pharmacology. 2018;7:88-93.
31. Fernandes RPP, Trindade MA, Tonin FG, Lima CG, Pugine SMP, Munekata PES, et al. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. J Food Sci Technol. 2016;53(1):451-60.
32. จุฑารัตน์ โจนขำ, อัฐพร ใจสุข. ผลของสารสกัดหยาดจากใบมะไฟจีนต่อการยับยั้งเชื้อไวรัสก่อโรคเริ่มชนิดที่ 1 วารสารทันตแพทย์ขอนแก่น. 2559;19(2):99-106.
33. วิณา จิรจรรย์กุล. ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2534
34. อนันต์ อธิพรชัย, ภรณ์ ศรีปรีชาศักดิ์, สุวรรณา เสมศรี. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสกุล Clausena สำหรับการรักษาโรคเบาหวาน: มหาวิทยาลัยบูรพา; 2562.

35. ปฐมพงษ์ เผือกกลี, ภาณุรัฐ เดชะยนต์และคณะ. ฤทธิ์ต้านการแพ้ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลมะตูมอ่อน. ธรรมชาติศาสตร์เวชสาร. 2561;18(3):349-57.
36. สุชาดา จันทร์พรหมมา. การสังเคราะห์และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารอนุพันธ์ Chalcones และ bischalcones: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; 2554.
37. ระวีวรรณ แก้วอมตวงศ์,ทรงพร จิงมันคง. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากพืชสมุนไพรจังหวัดอุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี; 2547.
38. ฤทธิพันธ์ รุ่งเรือง, จรัสฟ้า โหมดสุวรรณ, อมรรัตน์ สีสุทอง. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านริ้วรอยของสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพสำหรับประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางบำรุงผิวหน้า. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 2562;42(1): 95-107.

ภาคผนวก

1. ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ 1 ร้อยละผลผลิตของการสกัดมะไฟเงินในส่วนต่าง ๆ

ตัวอย่าง	สีของสารสกัด	น้ำหนักพืชก่อนสกัด (g)	น้ำหนักพืชหลังสกัด (g)	% yield
A	เขียวเข้ม	167.94	6.24	3.71
B	เขียว	84.32	4.23	5.01
C	เขียว	226.97	3.6	1.58
D	น้ำตาลเข้ม	245.27	2.67	1.08
E	เหลืองอ่อน	205.85	0.76	0.36

ตารางที่ 2 แสดงการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัด

การทดสอบ	ส่วนต่าง ๆ ของพืช				
	A	B	C	D	E
Terpenoid					
	+	+	+	+	+
ลักษณะสาร	น้ำตาลแดง	น้ำตาลแดง	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล
Saponin					
	+	-	-	+	-
Cardiac glycoside					
Kedde's reagent	-	-	-	-	-
Keller	-	+	+	-	-
ลักษณะสาร		ม่วง	ม่วง		
Liebermann-Bruchard	+	+	+	+	+
ลักษณะสาร	น้ำเงินเขียว	น้ำเงินเขียว	น้ำเงินเขียว	น้ำเงินเขียว	น้ำเงินเขียว
Alkaloid					
Kraut's	+	+	-	-	+
ลักษณะสาร	ตะกอนขาว	ตะกอนขาวขุ่น			ตะกอนขาวขุ่น
Mayer's	+	+	-	-	+
ลักษณะสาร	ตะกอนขาว	ตะกอนขาว			ตะกอนขาวขุ่น
Hager's	+	+	+	+	+
ลักษณะสาร	ตะกอนเหลือง	ตะกอนเหลือง	ตะกอนเหลือง	ตะกอนเหลือง	ตะกอนเหลือง
Tannic acid	-	-	-	-	+
ลักษณะสาร					ตะกอนขาวขุ่น
Wagner's	+	-	-	-	+
ลักษณะสาร	ตะกอนน้ำตาล				ตะกอนน้ำตาล

ตารางที่ 2 แสดงการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัด (ต่อ)

การทดสอบ	การทดสอบ				
	A	B	C	D	E
Dragendorff	+	+	-	-	+
ลักษณะสาร	ตะกอนสีส้ม	ตะกอนสีส้ม			ตะกอนดำ
Flavonoid					
Cyanidin test	-	+	+	+	+
ลักษณะสาร	เขียวเข้ม	ชมพู	ชมพู	ชมพูโอรส	ชมพูอ่อน
1% FeCl ₃	-	+	+	-	-
ลักษณะสาร	น้ำตาล	น้ำเงินเข้ม	น้ำเงินเข้ม	น้ำตาล	น้ำตาล
Molisch's	+	+	+	+	+
ลักษณะสาร	ม่วงแดง	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	ม่วงน้ำตาล	ม่วง
Coumarin	+	+	+	+	+
ลักษณะสาร	เรืองแสงสีเขียวอ่อน	เรืองแสงสีเขียวอ่อน	เรืองแสงสีเขียวอ่อน	เรืองแสงสีเขียวอ่อน	เรืองแสงสีเขียวอ่อน
Tannin					
Gelatin	+	+	+	+	+
ลักษณะสาร	ตะกอนคงตัว	ตะกอนคงตัว	ตะกอนคงตัว	ตะกอนคงตัว	ตะกอนคงตัว
Lime	-	+	+	-	+
ลักษณะสาร		ตะกอนเหลือง เหลืองเทา	ตะกอนเหลือง เหลืองเทา		ตะกอนเหลือง เหลืองเทา
1% FeCl ₃	+	+	+	-	-
ลักษณะสาร	ตะกอนน้ำเงิน ดำ	ตะกอนน้ำเงิน ดำ	ตะกอนน้ำเงิน ดำ		
Vanilin TS	-	-	-	-	-
ลักษณะสาร					

หมายเหตุ : + หมายถึง ให้ผลบวกกับน้ำยาทดสอบ, - หมายถึง ให้ผลลบกับน้ำยาทดสอบ

ตารางที่ 3 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ วิธี DPPH radical scavenging activity ของสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (µg/ml)	Absorbance ของพืช			Absorbance ของ blank	% inhibition
		ตัวอย่าง				
		1	2	3		
A	1000	0.202	0.220	0.209	0.035	76.27±1.23
B	1000	0.102	0.103	0.105	0.035	90.75±0.21
C	1000	0.119	0.116	0.119	0.035	88.77±0.23
D	1000	0.071	0.073	0.068	0.032	23.14±1.16
E	1000	0.353	0.269	0.253	0.046	66.76±7.27
Trolox	1000	0.087	0.089	0.086	0.031	92.38±0.21

หมายเหตุ : A (ใบ), B (กิ่ง), C (ก้านใบ), D (ผล) และ E (เมล็ด)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity ของสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ug/ml)	Absorbance ของพืชตัวอย่าง			Absorbance ของ blank	% inhibition
		1	2	3		
A	1000	0.042	0.034	0.051	0.023	98.22±0.78
B	1000	0.033	0.03	0.035	0.028	99.57±0.23
C	1000	0.034	0.036	0.032	0.021	99.80±0.18
D	1000	0.059	0.061	0.058	0.03	97.30±0.14
E	1000	0.083	0.1	0.101	0.026	93.67±0.93
Trolox	1000	0.050	0.048	0.044	0.018	97.30±0.28

หมายเหตุ : A (ใบ), B (กิ่ง), C (ก้านใบ), D (ผล) และ E (เมล็ด)

ตารางที่ 5 แสดงความเข้มข้นและค่า Absorbance ของสารละลายมาตรฐาน Trolox

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (µg/ml)	Absorbance ของสารละลายมาตรฐาน Trolox
25	3.5
12.5	2.416
6.25	1.476
3.125	0.616
1.563	0.327
0.781	0.247

ตารางที่ 6 แสดงความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml

ตัวอย่าง	Absorbance ของพืชตัวอย่าง	Absorbance ของ Blank	Absorbance ของพืชตัวอย่าง - Blank	สารสกัด 1 mg มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Trolox (mg Trolox/g ext)
A	1.327	0.043	1.284	346.14
B	1.937	0.042	1.895	512.17
C	0.876	0.044	0.832	223.32
D	1.464	0.052	1.412	380.92
E	1.298	0.044	1.254	337.99

หมายเหตุ : A (ใบ), B (กิ่ง), C (ก้านใบ), D (ผล) และ E (เมล็ด)

ตารางที่ 7 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ วิธี Anti-tyrosinase ของสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 400 µg/ml

ตัวอย่าง	Absorbance ของพืชตัวอย่าง			Absorbance ของ blank	% inhibition
	1	2	3		
A	0.137	0.128	0.133	0.039	74.34±1.24
B	0.116	0.124	0.125	0.037	76.80±1.35
C	0.127	0.130	0.133	0.028	72.06±0.82
D	0.123	0.103	0.130	0.034	75.34±1.53
E	0.127	0.115	0.124	0.038	76.99±1.71
Kojic acid	0.136	0.134	0.134	0.044	75.16±0.32

หมายเหตุ : A (ใบ), B (กิ่ง), C (ก้านใบ), D (ผล) และ E (เมล็ด)

ตารางที่ 8 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Anti-collagenase inhibitory activity) ของสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml

ตัวอย่าง	ความ เข้มข้น (µg/ml)	Absorbance ของพืชตัวอย่าง			Absorbance ของ blank	% inhibition
		1	2	3		
A	1000	0.663	0.676	0.688	0.531	61.52±3.33
B	1000	0.990	0.980	0.945	0.965	97.42±4.44
C	1000	0.706	0.708	0.714	0.534	53.81±1.12
D	1000	0.671	0.669	0.660	0.589	79.43±1.56
E	1000	0.620	0.616	0.612	0.576	89.27±1.06
EGCG	1000	1.028	1.020	1.001	1.014	99.41±3.50

หมายเหตุ : A (ใบ), B (กิ่ง), C (ก้านใบ), D (ผล) และ E (เมล็ด)

2. การคำนวณ

การคำนวณ DPPH

1. สารละลาย DPPH 0.06 mM

จาก $\text{mol} = \frac{g}{MW}$, มวลโมเลกุลของ DPPH 394.32 g/mol

คำนวณ $\text{mg DPPH} = 0.06 \text{ mM} \times 394.32 \text{ g/mol}$
 $\text{mg DPPH} = 23.66 \text{ mg}$

ใน ethanol 1000 ml มี DPPH 23.66 mg

ใน ethanol 50 ml มี DPPH 1.18 mg

การคำนวณ ABTS

1. สารละลาย ABTS^{•+} 14 mM

จาก $\text{mol} = \frac{g}{MW}$, มวลโมเลกุลของ ABTS 548.68 g/mol

คำนวณ $\text{mg ABTS} = 14 \text{ mM} \times 548.68 \text{ g/mol}$
 $\text{mg ABTS} = 7680 \text{ mg}$

ในน้ำ 1000 ml มี ABTS^{•+} 7680 mg

ในน้ำ 5 ml มี ABTS^{•+} 38.4 mg

2. สารละลาย Potassium persulfate ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$) 4.9 mM

จาก $\text{mol} = \frac{g}{MW}$, มวลโมเลกุลของ $\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$ 270.32 g/mol

คำนวณ $\text{mg K}_2\text{O}_8\text{S}_2 = 4.9 \text{ mM} \times 270.32 \text{ g/mol}$
 $\text{mg K}_2\text{O}_8\text{S}_2 = 1324.57 \text{ mg}$

ในน้ำ 1000 ml มี ABTS 1324.57 mg

ในน้ำ 5 ml มี ABTS 6.6 mg

การคำนวณ FRAP

1. สารละลาย Acetate buffer 300 mM

จาก $\text{mol} = \frac{g}{MW}$, มวลโมเลกุลของ sodium acetate trihydrate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_5$) 136.08 g/mol

คำนวณ $\text{g C}_2\text{H}_3\text{NaO}_5 = 300 \text{ mM} \times 136.08 \text{ g/mol}$
 $\text{g C}_2\text{H}_3\text{NaO}_5 = 40.82 \text{ g}$

ในน้ำ DI 1000 ml มี $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_5$ 40.82 g

ในน้ำ DI 100 ml มี $\text{C}_2\text{H}_9\text{NaO}_5$ 4.08 g

2. สารละลาย TPTZ 10 mM

จาก $\text{mol} = \frac{g}{MW}$, มวลโมเลกุลของ TPTZ 312.33 g/mol

คำนวณ mg TPTZ = 10 mM x 312.33 g/mol

$$\text{mg TPTZ} = 3123.3 \text{ mg}$$

ใน 37% HCl 1000 ml มี TPTZ 3123.3 mg

ใน 37% HCl 1 ml มี TPTZ 3.12 mg

3. สารละลาย $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$$20 \text{ mM} \times 10 \text{ ml} = 400 \text{ mM} \times V_2$$

$$V_2 = 0.5 \text{ ml}$$

การคำนวณ Anti-tyrosinase

1. 20 mM Sodium phosphate buffer pH 6.8

มวลโมเลกุลของ NaHPO_4 142.0 g / mol

มวลโมเลกุลของ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 138.0 g / mol

จาก $\text{mol} = \frac{g}{MW}$

$$g \text{ NaHPO}_4 = (20 \times 10^{-3} \text{ M}) \times (142.0 \text{ g / mol})$$

$$= 2.84 \text{ g ในน้ำ 1000 ml}$$

ในน้ำ 1000 ml ใช้ NaHPO_4 2.84 g

ในน้ำ 100 ml ใช้ NaHPO_4 0.284 g

$$g \text{ NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = (20 \times 10^{-3} \text{ M}) \times (138.0 \text{ g / mol})$$

$$= 2.76 \text{ ในน้ำ 1000 ml}$$

ในน้ำ 1000 ml ใช้ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.76 g

ในน้ำ 100 ml ใช้ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.276 g

2. เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase enzyme)

1 ขวด มี tyrosinase enzyme 22448 unit

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$$(22448 \text{ unit}) \times (50 \text{ } \mu\text{L}) = C_2 \times (2000 \text{ } \mu\text{L})$$

$$C_2 = 561.2 \text{ unit}$$

3. สารตั้งต้นแอลโดปา 0.85 mM (L-DOPA substrate)

มวลโมเลกุล L-DOPA 197.9 g / mol

จาก $\text{mol} = \frac{g}{MW}$

$$g \text{ L-DOPA} = (0.85 \times 10^{-3} \text{ M}) \times 197.9 \text{ g / mol}$$

$$= 0.168 \text{ g / L}$$

ใน sodium phosphate buffer 1000 ml มี L-DOPA 0.168 g

ใน sodium phosphate buffer 10 ml มี L-DOPA 0.00168 g หรือ 1.68 mg

การคำนวณ Anti-collagenase

1. สารละลาย Tricine buffer pH 7

- สารละลาย Sodium chloride (NaCl) 5 M

จาก $\text{mol} = \frac{g}{MW}$, มวลโมเลกุลของ NaCl 58.5 g / mol

$$G \text{ NaCl} = 5 \text{ M} \times 58.5 \text{ g / mol}$$

$$= 292.5 \text{ g / L}$$

ในน้ำ DI 1000 ml มี NaCl 292.5 g

ในน้ำ DI 100 ml มี NaCl 29.25 g

- สารละลาย Calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2\text{H}_4\text{O}_2$) 100 mM

จาก $\text{mol} = \frac{g}{MW}$, มวลโมเลกุลของ CaCl_2 147.0 g / mol

$$g \text{ NaCl} = (100 \times 10^{-3} \text{ M}) \times (147.0 \text{ g / mol})$$

$$= 14.7 \text{ g / L}$$

ในน้ำ DI 1000 ml มี $\text{CaCl}_2\text{H}_4\text{O}_2$ 14.7 g

ในน้ำ DI 100 ml มี $\text{CaCl}_2\text{H}_4\text{O}_2$ 1.47 g

2. สารตั้งต้น FALGPA (FALGPA substrate) 1 mM

จาก $\text{mol} = \frac{g}{MW}$, มวลโมเลกุลของ FALGPA 476.52 g / mol

$$g \text{ FALGPA} = (1 \times 10^{-3} \text{ M}) \times (476.52 \text{ g / mol})$$

$$= 0.476 \text{ g / L หรือ } 476 \text{ mg / L}$$

ใน tricine buffer 1000 ml มี FALGPA 476 mg

ใน tricine buffer 1 ml มี FALGPA 0.476 mg

3. เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase enzyme) 2 unit / ml
Collagenase enzyme 125 unit / mg

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

$$(125 \text{ unit}) \times V_1 = (2 \text{ unit}) \times (10 \text{ ml})$$

$$V_1 = 0.8 \text{ ml}$$

3. การคำนวณค่าทางสถิติ

3.1 การคำนวณทางสถิติของ DPPH

กำหนดให้

X คือ สารสกัด โดย $X_{1.00}$ = สารสกัดส่วนใบ (A), $X_{2.00}$ = สารสกัดส่วนกิ่ง (B), $X_{3.00}$ = สารสกัดส่วนก้านใบ (C), $X_{4.00}$ = สารสกัดส่วนผล (D), $X_{5.00}$ = สารสกัดส่วนเมล็ด (D) และ $X_{6.00}$ = สารมาตรฐาน Trolox
Y คือ % inhibition

→ **Oneway**

Descriptives

Y								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	76.2733	1.22460	.70702	73.2313	79.3154	74.97	77.40
2.00	3	90.7533	.20404	.11780	90.2465	91.2602	90.53	90.93
3.00	3	88.7667	.23671	.13667	88.1786	89.3547	88.63	89.04
4.00	3	23.1400	1.15637	.66763	20.2674	26.0126	22.06	24.36
5.00	3	66.7567	7.26658	4.19536	48.7055	84.8079	58.46	71.99
6.00	3	92.3767	.20841	.12032	91.8590	92.8944	92.15	92.56
Total	18	73.0111	24.89551	5.86793	60.6309	85.3914	22.06	92.56

Test of Homogeneity of Variances

Y			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
10.456	5	12	.000

ANOVA

Y					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10424.810	5	2084.962	224.265	.000
Within Groups	111.562	12	9.297		
Total	10536.372	17			

Post cohort test

Dunnett T3	1.00	2.00	-14.48000*	.71677	.009	-20.7250	-8.2350
		3.00	-12.49333*	.72011	.011	-18.6421	-6.3445
		4.00	53.13333*	.97243	.000	48.1002	58.1665
		5.00	9.51667	4.25452	.549	-27.5013	46.5347
		6.00	-16.10333*	.71719	.007	-22.3360	-9.8707
	2.00	1.00	14.48000*	.71677	.009	8.2350	20.7250
		3.00	1.98667*	.18043	.003	1.0429	2.9305
		4.00	67.61333*	.67795	.000	61.7488	73.4779
		5.00	23.99667	4.19702	.125	-14.8782	62.8716
		6.00	-1.62333*	.16839	.005	-2.4935	-.7532
	3.00	1.00	12.49333*	.72011	.011	6.3445	18.6421
		2.00	-1.98667*	.18043	.003	-2.9305	-1.0429
		4.00	65.62667*	.68148	.000	59.8614	71.3920
		5.00	22.01000	4.19759	.146	-16.8448	60.8648
		6.00	-3.61000*	.18209	.000	-4.5594	-2.6606
	4.00	1.00	-53.13333*	.97243	.000	-58.1665	-48.1002
		2.00	-67.61333*	.67795	.000	-73.4779	-61.7488
		3.00	-65.62667*	.68148	.000	-71.3920	-59.8614
		5.00	-43.61667*	4.24815	.036	-80.8247	-6.4086
		6.00	-69.23667*	.67839	.000	-75.0884	-63.3849
	5.00	1.00	-9.51667	4.25452	.549	-46.5347	27.5013
		2.00	-23.99667	4.19702	.125	-62.8716	14.8782
		3.00	-22.01000	4.19759	.146	-60.8648	16.8448
		4.00	43.61667*	4.24815	.036	6.4086	80.8247
		6.00	-25.62000	4.19709	.111	-64.4924	13.2524
	6.00	1.00	16.10333*	.71719	.007	9.8707	22.3360
		2.00	1.62333*	.16839	.005	.7532	2.4935
		3.00	3.61000*	.18209	.000	2.6606	4.5594
		4.00	69.23667*	.67839	.000	63.3849	75.0884
		5.00	25.62000	4.19709	.111	-13.2524	64.4924

* The mean difference is significant at the .05 level

3.2 การคำนวณทางสถิติของ ABTS

กำหนดให้

X คือ สารสกัด โดย $X_{1.00}$ = สารสกัดส่วนใบ (A), $X_{2.00}$ = สารสกัดส่วนกิ่ง (B), $X_{3.00}$ = สารสกัดส่วนก้านใบ (C), $X_{4.00}$ = สารสกัดส่วนผล (D), $X_{5.00}$ = สารสกัดส่วนเมล็ด (D) และ $X_{6.00}$ = สารมาตรฐาน Trolox
Y คือ % inhibition

→ Oneway

Descriptives

Y								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	98.2200	.78543	.45347	96.2689	100.1711	97.42	98.99
2.00	3	99.5700	.23643	.13650	98.9827	100.1573	99.35	99.82
3.00	3	98.8033	.18502	.10682	98.3437	99.2630	98.62	98.99
4.00	3	97.2967	.14295	.08253	96.9416	97.6518	97.14	97.42
5.00	3	93.6733	.93351	.53896	91.3544	95.9923	93.09	94.75
6.00	3	97.2967	.27934	.16128	96.6027	97.9906	97.05	97.60
Total	18	97.4767	1.98566	.46802	96.4892	98.4641	93.09	99.82

Test of Homogeneity of Variances

Y	Levene Statistic			
	df1	df2	Sig.	
	3.494	5	12	.035

ANOVA

Y	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	63.674	5	12.735	45.565	.000
Within Groups	3.354	12	.279		
Total	67.028	17			

Post cohort test

Dunnett T3	1.00	2.00	-1.37000	.47315	.366	-5.0361	2.2961
		3.00	-.59333	.46567	.888	-4.4286	3.2419
		4.00	.91333	.46070	.631	-3.0550	4.8817
		5.00	4.53667*	.70421	.025	.8369	8.2364
		6.00	.91333	.48109	.653	-2.6074	4.4340
	2.00	1.00	1.37000	.47315	.366	-2.2961	5.0361
		3.00	.77667	.17276	.086	-.1445	1.6979
		4.00	2.28333*	.15889	.003	1.3564	3.2103
		5.00	5.90667*	.55580	.028	1.3967	10.4166
		6.00	2.28333*	.21082	.004	1.1760	3.3907
	3.00	1.00	.59333	.46567	.888	-3.2419	4.4286
		2.00	-.77667	.17276	.086	-1.6979	.1445
		4.00	1.50667*	.13499	.004	.7834	2.2299
		5.00	5.13000*	.54944	.041	.4569	9.8031
		6.00	1.50667*	.19345	.018	.4162	2.5971
	4.00	1.00	-.91333	.46070	.631	-4.8817	3.0550
		2.00	-2.28333*	.15889	.003	-3.2103	-1.3564
		3.00	-1.50667*	.13499	.004	-2.2299	-.7834
		5.00	3.62333	.54524	.087	-1.1718	8.4184
		6.00	.00000	.18117	1.000	-1.1397	1.1397
	5.00	1.00	-4.53667*	.70421	.025	-8.2364	-.8369
		2.00	-5.90667*	.55580	.028	-10.4166	-1.3967
		3.00	-5.13000*	.54944	.041	-9.8031	-.4569
		4.00	-3.62333	.54524	.087	-8.4184	1.1718
		6.00	-3.62333	.56257	.075	-7.9837	.7371
	6.00	1.00	-.91333	.48109	.653	-4.4340	2.6074
		2.00	-2.28333*	.21082	.004	-3.3907	-1.1760
		3.00	-1.50667*	.19345	.018	-2.5971	-.4162
		4.00	.00000	.18117	1.000	-1.1397	1.1397
		5.00	3.62333	.56257	.075	-.7371	7.9837

* The mean difference is significant at the .05 level

3.3 การคำนวณทางสถิติของ anti-tyrosinase

กำหนดให้

X คือ สารสกัด โดย $X_{1.00}$ = สารสกัดส่วนใบ (A), $X_{2.00}$ = สารสกัดส่วนกิ่ง (B), $X_{3.00}$ = สารสกัดส่วนก้านใบ (C), $X_{4.00}$ = สารสกัดส่วนผล (D), $X_{5.00}$ = สารสกัดส่วนเมล็ด (D) และ $X_{6.00}$ = สารมาตรฐาน Kojic acid
Y คือ % tyrosinase inhibition

Post cohort test

→ **Oneway**

Descriptives

Y					95% Confidence Interval for Mean			
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
1.00	3	74.3400	1.23746	.71445	71.2660	77.4140	73.15	75.62
2.00	3	76.8033	1.35486	.78223	73.4377	80.1690	75.89	78.36
3.00	3	72.0533	.82501	.47632	70.0039	74.1028	71.23	72.88
4.00	3	75.3433	1.52395	.87985	71.5576	79.1290	73.70	76.71
5.00	3	76.9867	1.70697	.98552	72.7463	81.2270	75.62	78.90
6.00	3	75.1567	.31754	.18333	74.3678	75.9455	74.79	75.34
Total	18	75.1139	1.99875	.47111	74.1199	76.1078	71.23	78.90

Test of Homogeneity of Variances

Y	Levene Statistic			
	df1	df2	Sig.	
	5	12	.294	

ANOVA

Y	Sum of Squares				
	df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	5	9.829	6.284	.004	
Within Groups	12	1.564			
Total	17				

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Y

			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) X	(J) X	Lower Bound				Upper Bound	
Scheffe	1.00	2.00	-2.46333	1.02114	.381	-6.4874	1.5607
		3.00	2.28667	1.02114	.457	-1.7374	6.3107
		4.00	-1.00333	1.02114	.959	-5.0274	3.0207
		5.00	-2.64667	1.02114	.311	-6.6707	1.3774
		6.00	-.81667	1.02114	.983	-4.8407	3.2074
	2.00	1.00	2.46333	1.02114	.381	-1.5607	6.4874
		3.00	4.75000*	1.02114	.018	.7260	8.7740
		4.00	1.46000	1.02114	.834	-2.5640	5.4840
		5.00	-.18333	1.02114	1.000	-4.2074	3.8407
		6.00	1.64667	1.02114	.757	-2.3774	5.6707
	3.00	1.00	-2.28667	1.02114	.457	-6.3107	1.7374
		2.00	-4.75000*	1.02114	.018	-8.7740	-.7260
		4.00	-3.29000	1.02114	.139	-7.3140	.7340
		5.00	-4.93333*	1.02114	.013	-8.9574	-.9093
		6.00	-3.10333	1.02114	.178	-7.1274	.9207
	4.00	1.00	1.00333	1.02114	.959	-3.0207	5.0274
		2.00	-1.46000	1.02114	.834	-5.4840	2.5640
		3.00	3.29000	1.02114	.139	-.7340	7.3140
		5.00	-1.64333	1.02114	.758	-5.6674	2.3807
		6.00	.18667	1.02114	1.000	-3.8374	4.2107
	5.00	1.00	2.64667	1.02114	.311	-1.3774	6.6707
		2.00	.18333	1.02114	1.000	-3.8407	4.2074
		3.00	4.93333*	1.02114	.013	.9093	8.9574
		4.00	1.64333	1.02114	.758	-2.3807	5.6674
		6.00	1.83000	1.02114	.672	-2.1940	5.8540
6.00	1.00	.81667	1.02114	.983	-3.2074	4.8407	
	2.00	-1.64667	1.02114	.757	-5.6707	2.3774	
	3.00	3.10333	1.02114	.178	-.9207	7.1274	
	4.00	-.18667	1.02114	1.000	-4.2107	3.8374	
	5.00	-1.83000	1.02114	.672	-5.8540	2.1940	

* The mean difference is significant at the .05 level

3.4 การคำนวณทางสถิติของ anti-collagenase

กำหนดให้

X คือ สารสกัด โดย $X_{1.00}$ = สารสกัดส่วนใบ (A), $X_{2.00}$ = สารสกัดส่วนกิ่ง (B), $X_{3.00}$ = สารสกัดส่วนก้านใบ (C), $X_{4.00}$ = สารสกัดส่วนผล (D), $X_{5.00}$ = สารสกัดส่วนเมล็ด (D) และ $X_{6.00}$ = สารมาตรฐาน EGCG
Y คือ % collagenase inhibition

→ Oneway

Descriptives

Y	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	3	61.5233	3.32578	1.92014	53.2616	69.7850	58.24	64.89
2.00	3	97.4167	4.44038	2.56365	86.3862	108.4472	93.85	102.39
3.00	3	53.4567	1.10328	.63698	50.7160	56.1974	52.22	54.34
4.00	3	79.4333	1.56129	.90141	75.5549	83.3118	78.28	81.21
5.00	3	89.2733	1.06500	.61488	86.6277	91.9189	88.21	90.34
6.00	3	99.4100	3.49211	2.01617	90.7351	108.0849	96.47	103.27
Total	18	80.0856	18.03984	4.25203	71.1146	89.0566	52.22	103.27

Test of Homogeneity of Variances

Y			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.039	5	12	.145

ANOVA

Y					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5436.888	5	1087.378	136.600	.000
Within Groups	95.523	12	7.960		
Total	5532.411	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Y

			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) X	(J) X	Lower Bound				Upper Bound	
Scheffe	1.00	2.00	-35.89333*	2.30366	.000	-44.9714	-26.8152
		3.00	8.06667	2.30366	.094	-1.0114	17.1448
		4.00	-17.91000*	2.30366	.000	-26.9881	-8.8319
		5.00	-27.75000*	2.30366	.000	-36.8281	-18.6719
		6.00	-37.88667*	2.30366	.000	-46.9648	-28.8086
	2.00	1.00	35.89333*	2.30366	.000	26.8152	44.9714
		3.00	43.96000*	2.30366	.000	34.8819	53.0381
		4.00	17.98333*	2.30366	.000	8.9052	27.0614
		5.00	8.14333	2.30366	.090	-.9348	17.2214
		6.00	-1.99333	2.30366	.976	-11.0714	7.0848
	3.00	1.00	-8.06667	2.30366	.094	-17.1448	1.0114
		2.00	-43.96000*	2.30366	.000	-53.0381	-34.8819
		4.00	-25.97667*	2.30366	.000	-35.0548	-16.8986
		5.00	-35.81667*	2.30366	.000	-44.8948	-26.7386
		6.00	-45.95333*	2.30366	.000	-55.0314	-36.8752
	4.00	1.00	17.91000*	2.30366	.000	8.8319	26.9881
		2.00	-17.98333*	2.30366	.000	-27.0614	-8.9052
		3.00	25.97667*	2.30366	.000	16.8986	35.0548
		5.00	-9.84000*	2.30366	.031	-18.9181	-.7619
		6.00	-19.97667*	2.30366	.000	-29.0548	-10.8986
	5.00	1.00	27.75000*	2.30366	.000	18.6719	36.8281
		2.00	-8.14333	2.30366	.090	-17.2214	.9348
		3.00	35.81667*	2.30366	.000	26.7386	44.8948
		4.00	9.84000*	2.30366	.031	.7619	18.9181
		6.00	-10.13667*	2.30366	.025	-19.2148	-1.0586
	6.00	1.00	37.88667*	2.30366	.000	28.8086	46.9648
		2.00	1.99333	2.30366	.976	-7.0848	11.0714
		3.00	45.95333*	2.30366	.000	36.8752	55.0314
		4.00	19.97667*	2.30366	.000	10.8986	29.0548
		5.00	10.13667*	2.30366	.025	1.0586	19.2148

* The mean difference is significant at the .05 level

แบบฟอร์มรายงานการเงิน

รายงานสรุปการเงิน

โครงการวิจัยจัดประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ทางชีวภาพของมะไฟจีนสำหรับใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร.ณิชากรนต์ ภิระคำ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1/5/2563 ถึงวันที่ 28/2/2564

ระยะเวลาดำเนินการ 9 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1/5/2563 - 28/2/2564

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 9,000 บาท เมื่อวันที่ 3/2/2564

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงิน คงเหลือ/เกิน
1. ค่าสมุนไพร	2,000 บาท	1,250 บาท	เหลือ 750 บาท
2. ค่าสารเคมีและอุปกรณ์ สำหรับปฏิบัติการ	6,000 บาท	15,000 บาท	เกิน 9,000 บาท
3. ค่าไปสเตอร์	500 บาท	500 บาท	0 บาท
4. ค่าพิมพ์เอกสาร	500 บาท	405 บาท	เหลือ 95 บาท
รวม	9,000	17,155	เกิน 8,155 บาท

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย