



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

Development of Skin care product from *Carissa carandas* fruit extract

โดย

- | | | |
|-----------------|-----------|----------------------------|
| 1. นสภ. ธิษัตรี | เทพจันทร์ | รหัสประจำตัวนิสิต 57210248 |
| 2. นสภ. นภัสกร | ยะคะเรศ | รหัสประจำตัวนิสิต 57210249 |
| 3. นสภ. เปรมกมล | นิธิธนกุล | รหัสประจำตัวนิสิต 57210253 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

Development of Skin care product from *Carissa carandas* fruit extract

โดย

- | | | |
|-----------------|-----------|----------------------------|
| 1. นสภ. ธีรชิตี | เทพจันทร์ | รหัสประจำตัวนิสิต 57210248 |
| 2. นสภ. นภัสกร | ยะคะเรศ | รหัสประจำตัวนิสิต 57210249 |
| 3. นสภ. เปรมกมล | นิธิธนกุล | รหัสประจำตัวนิสิต 57210253 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่ได้จากธรรมชาติเป็นที่นิยมมากขึ้นและมีแนวโน้มนิยมมากขึ้นไปเรื่อยๆ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารเคมีน้อย อ่อนโยนต่อผิว และไม่มีสารตกค้างที่ทำให้เกิดอันตรายต่อผิว การศึกษาวิจัยนี้จึงเลือกผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มาเพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่และทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในรูปแบบของโทนเนอร์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและมีผลยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งมีผลช่วยลดการเกิดริ้วรอยบนผิว ช่วยลดรอยหมองคล้ำและช่วยให้ผิวกระจ่างใสได้ คณะผู้จัดทำหวังว่างานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์และสามารถนำไปต่อยอดงานด้านอื่นต่อไปได้ในอนาคต

คณะผู้จัดทำ

- | | | |
|-----------------|-----------|----------------------------|
| 1. นสภ. อริษตรี | เทพจันทร์ | รหัสประจำตัวนิสิต 57210248 |
| 2. นสภ. นภัสกร | ยะคะเรศ | รหัสประจำตัวนิสิต 57210249 |
| 3. นสภ. เปรมกมล | นิธิณกุล | รหัสประจำตัวนิสิต 57210253 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2561

เรื่อง การพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

Development of Skin care product from *Carissa carandas* fruit extract

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. ธีระตรี เทพจันทร์ รหัส 57210248
2. นสภ. นกัศกร ยะคะเวศ รหัส 57210249
3. นสภ. เปรมกมล นิธิธนกุล รหัส 57210253

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภาณุ. ดร.เนตรชนก เจียงสืบชาติวีระ
2. ภาณุ. ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเมื่อวันที่ 1 สิงหาคม ถึง 20 พฤศจิกายน 2561 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay พบว่าสารสกัดมีค่า $IC_{50} = 8.86$ ซึ่งบอกได้ว่าต้องใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 8.86 mg/mL จึงจะต้านอนุมูลอิสระได้ 50% การทดสอบด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 4.77 mg TEAC/g และ 5.90 mg VCEC/g การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method จากการทดสอบจะพบว่า %inhibition ของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/mL} = 6.55 \pm 0.25 \mu\text{g/mL}$ และความเข้มข้น 5,000 $\mu\text{g/mL} = 83.52 \pm 2.93 \mu\text{g/mL}$ เห็นว่าที่ความเข้มข้นมากขึ้นจะสามารถยับยั้งได้มากขึ้น แต่ฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่าสารมาตรฐานเมื่อเทียบกับ kojic acid พบว่าค่า IC_{50} ของ Kojic acid = 109.75 $\mu\text{g/mL}$ และการทดสอบด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay ดำรับไทนเนอร์โดยป้องกันแสงเก็บที่ 4°C, อุณหภูมิห้อง และ 45°C คือ 18.12, 18.21 และ 18.37 mgTEAC/g ส่วนไม่ป้องกันแสงเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และอุณหภูมิห้องได้ 18.21 และ 18.24 mg TEAC/g สรุปได้ว่าตำรับที่ป้องกันแสงและไม่ป้องกันแสงผลไม่แตกต่างกัน ตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิสูง

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2018

Development of skin care product from *Carissa carandas* fruit extract

By

- | | |
|-------------------------------|-------------|
| 1. Miss Taritstree Thepjuntra | ID 57210248 |
| 2. Miss Napatsakorn Yakharet | ID 57210249 |
| 3. Miss Premkamol Nititanakul | ID 57210253 |

Advisor:

- | | |
|---------------------------------------|-----------------------|
| 1. Miss Nadechanok Jiangseubchatveera | Ph.D. (Major advisor) |
| 2. Miss Thanchanok Sirirak | Ph.D. (Co-advisor) |

ABSTRACT

This aims of this study was antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity of *Carissa carandas* fruit extract. To develop skincare products from *Carissa carandas* fruit extract. The experiment was conducted from August 1, 2561 to November 20, 2561. The test of DPPH scavenging assay found IC_{50} of extract is 8.86 mg/mL. ABTS radical cation scavenging assay found antioxidant activity 4.77 mg TEAC/g and 5.90 mg VCEC/g. Dopachrome method found %inhibition of extract at concentration 1,000 mcg/ml is 6.55 ± 0.25 μ g/mL and 5,000 mcg/mL is 83.52 ± 2.93 μ g/mL showed that higher concentrations would be more inhibited. The ABTS radical cation scavenging assay of Toner found antioxidant activity of foil at temperature 4°C, 25°C and 45°C is 18.12, 18.21, 18.37 mg TEAC/g and no foil at 4°C and 25°C is 18.21, 18.24 mg TEAC/g. Conclusion of toner that foil and no foil are not different and at low temperature have antioxidant activity more than high temperature

Major Advisor

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากเภสัชกรหญิง ดร. เนตรชนก เจียงสืบชาติวิระ และ เภสัชกรหญิง ดร.ธัญชนก ศิริรักษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ที่คอยให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการทำโครงการวิจัยครั้งนี้จึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ที่ให้ความเชื่อเพื่อในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือและสถานที่ในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ ทำให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้อย่างสะดวกสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

คณะผู้จัดทำ

- | | | |
|-----------------|-----------|----------------------------|
| 1. นสภ. ธิษัตรี | เทพจันทร์ | รหัสประจำตัวนิสิต 57210248 |
| 2. นสภ. นกัศกร | ยะคะเรศ | รหัสประจำตัวนิสิต 57210249 |
| 3. นสภ. เปรมกมล | นิธิธนกุล | รหัสประจำตัวนิสิต 57210253 |

๑

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
คำนำ	ข
บทคัดย่อ	ค
ABSTRACT	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
กรอบแนวคิด	3
บทที่ 2 วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	14
3.1 วัตถุประสงค์และสารเคมี	14
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	15
3.3 การสำรวจแหล่งจำหน่ายผลมะม่วงหาวมะนาวโห่และคัดเลือกผลมะม่วงหาวมะนาวโห่	16
3.4 การสกัดสารสำคัญในผลมะม่วงหาวมะนาวโห่	16
3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่	16
3.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่	18
3.7 ขั้นตอนการพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ในรูปแบบของโทนเนอร์	19
3.8 การศึกษาลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของตำรับโทนเนอร์	20
3.9 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์โทนเนอร์	21

สารบัญ(ต่อ)

หัวข้อ	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	21
4.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้	21
4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่	21
4.3 ผลการเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในรูปแบบโทนเนอร์	29
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay ของตำรับโทนเนอร์	30
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	34
5.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้	34
5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่	34
5.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผลมะม่วงหาวด้วยวิธี Dopachrome method	35
5.4 ผลการเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในรูปแบบโทนเนอร์	35
5.5 ผลการทดสอบความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในรูปแบบโทนเนอร์	35
5.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay ของตำรับโทนเนอร์	36
สรุปผลการวิจัย	36
ข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	44

สารบัญตาราง

หัวข้อ	หน้า
ตารางที่ 1 ตารางแสดงองค์ประกอบสารในตำรับโทนเนอร์	20
ตารางที่ 2 ค่า %inhibition ของ trolox ด้วยวิธี DPPH scavenging assay	21
ตารางที่ 3 ค่า %inhibition ของ vitamin C ด้วยวิธี DPPH scavenging assay	22
ตารางที่ 4 ค่า % inhibition ของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วยวิธี DPPH scavenging assay	23
ตารางที่ 5 แสดงค่า %inhibition ของ vitamin C โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay	25
ตารางที่ 6 ตารางแสดงค่า %inhibition ของ Trolox โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay	26
ตารางที่ 7 แสดง % inhibition ของ kojic acid โดยวิธี Dopachrome method	28
ตารางที่ 8 แสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับโทนเนอร์ในสภาวะต่างๆเป็นเวลา 7 วัน	30
ตารางที่ 9 แสดงค่า % Inhibition ของ Ascorbic acid ของตำรับ โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay	30
ตารางที่ 10 แสดงค่า %Inhibition trolox ของตำรับ โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay	31
ตารางที่ 11 %Inhibition ของตำรับมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay	32
ตารางที่ 12 แสดงค่า antioxidant activities ของตำรับโทนเนอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay	33

ณ

สารบัญรูปภาพ

หัวข้อ	หน้า
ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดของงานวิจัย	3
ภาพที่ 2 ต้นมะม่วงหาวมะนาวโห่	5
ภาพที่ 3 ผลและดอกของต้นมะม่วงหาวมะนาวโห่	5
ภาพที่ 4 กราฟแสดงค่าระหว่าง %inhibition และ ความเข้มข้นของ Trolox ด้วยวิธี DPPH scavenging assay	22
ภาพที่ 5 กราฟแสดงค่าระหว่าง %inhibition และความเข้มข้นของ vitamin C ด้วยวิธี DPPH scavenging assay	23
ภาพที่ 6 กราฟแสดงค่าระหว่าง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ ด้วยวิธี DPPH scavenging assay	24
ภาพที่ 7 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ vitamin C ด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay	26
ภาพที่ 8 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ Trolox ด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay	27
ภาพที่ 9 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ kojic acid ใน Dopachrome method	28
ภาพที่ 10 แสดงภาพตำรับโทนเนอร์จากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่เก็บในสภาวะ อุณหภูมิ 4°C อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 45°C โดยเรียงจากซ้ายไปขวา	29
ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่า %Inhibition ของ vitamin C ของตำรับ ด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay	31
ภาพที่ 12 กราฟแสดงค่า % Inhibition ของ Trolox ใน ABTS radical cation scavenging assay	32
ภาพที่ 13 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ vitamin C ใน DPPH scavenging assay	45
ภาพที่ 14 กราฟแสดงค่า %inhibition ของ Trolox ใน DPPH scavenging assay	46
ภาพที่ 15 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ Trolox ใน ABTS radical cation scavenging assay	49
ภาพที่ 16 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ vitamin C ใน ABTS radical cation scavenging assay	51
ภาพที่ 17 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ kojic acid ใน Dopachrome method	52

บทที่ 1

บทนำ

เรื่องสุขภาพและความงามมีความสำคัญกับคนในสังคมไทยเป็นอย่างมากไม่ว่าจะเป็นผู้ชายหรือผู้หญิง เนื่องจากมนุษย์ทุกคนมีความต้องการให้ตัวเองมีสุขภาพที่ดีและมีบุคลิกภาพที่ดี มีความสวยงามทั้งรูปร่าง หน้าตา และผิวพรรณ หรือเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ต่างๆไม่ว่าจะเป็น เสื้อผ้า รองเท้า เครื่องประดับ จึงทำให้ผู้บริโภคให้ความสนใจและใส่ใจในการเลือกซื้อเลือกใช้ สรรหาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่างๆเพิ่มมากขึ้นเพื่อมาสนองความต้องการของตนเอง ปัจจุบันธุรกิจเกี่ยวกับเครื่องสำอางมีบทบาทมากขึ้น โดยเครื่องสำอางสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท (1) ได้แก่ 1. ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางแต่งหน้า (Make up) เพื่อแต่งเติมสีสันให้สะอาดตา เช่น อายแชโดว์ บรัชออน และลิปสติก 2. ผลิตภัณฑ์บำรุงรักษาผิวพรรณ ได้แก่ ครีม โลชั่นและโทนเนอร์ 3. ผลิตภัณฑ์เครื่องหอม เช่น น้ำหอม เป็นต้น พบว่าองค์ประกอบของเครื่องสำอางบางชนิดก่อให้เกิดอันตราย เช่น ปรอกไฮโดรควิโนนและสเตียรอยด์ (2,3) แม้ให้ผลลัพธ์อย่างเช่น ผิวขาวขึ้นอย่างรวดเร็วแต่มีผลเสียร้ายแรง ทำให้ผิวเกิดรอยไหม้ดำที่แผ่กว้าง รอยแดง ผื่นแพ้ ผิวหน้าบางลง เกิดติดเชื้อง่าย ซึ่งต้องเสียเวลาและเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาสุขภาพผิวให้กลับมาสู่สภาวะปกติ และในบางรายอาจเป็นแผลเป็นถาวร ไม่สามารถรักษาให้กลับสู่สภาพปกติได้ จากผลเสียที่เกิดจากสารเคมีเหล่านี้ และความตื่นตัวในการรักษาสุขภาพของตน จึงทำให้ผู้คนสนใจเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบจากสารธรรมชาติมากยิ่งขึ้น โดยมีความเชื่อว่าสารที่ได้จากธรรมชาติมีความปลอดภัยต่อผิวมากกว่าสารเคมี ตัวอย่างผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่ผสมสารสกัดจากธรรมชาติ (4,5) เช่น ครีมขัดหน้าจากสารสกัดชาเขียว ช่วยลดรอยดำ รอยแดง บนใบหน้า ขจัดสิ่งสกปรกในรูขุมขน ทำให้ผิวกระจ่างใสอ่อนวัย ครีมบำรุงผิวจากว่านหางจระเข้ เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิว เซรั่มจากสารสกัดทับทิม ช่วยชะลอริ้วรอย ผิวหน้ากระจ่างใส เป็นต้น

มะม่วงหาวมะนาวโห่ ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Carissa carandas* Linn. เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย นำส่วนต่างๆมาใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมาย เช่น รากนำมาใช้เป็นยาขับพยาธิ เปลือกลำต้นนำมาใช้บรรเทาอาการทางผิวหนังเนื้อไม้บำรุงกำลัง ลดอาการอ่อนเพลีย ใบใช้บรรเทาอาการท้องเสีย น้ำคั้นจากผลนำมาใช้ล้างแผลเพื่อป้องกันการติดเชื้อและบรรเทา

อาการคันที่ผิวหนัง (6) พบสารต้านอนุมูลอิสระในผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ เช่น โปีโอฟลาวานอยด์ แอนโทไซยานิน (9,10) จึงช่วยในการชะลอวัยและริ้วรอยได้ ทั้งยังสามารถเพิ่มความกระชุ่มกระชวยให้กับร่างกาย

จากสรรพคุณและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ได้กล่าวไปข้างต้น เป็นเหตุให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำเอาผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มาสกัด เพื่อหาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และนำสารสกัดที่ได้นี้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวในรูปแบบโทนเนอร์ ให้มีคุณลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของตำรับโทนเนอร์ที่เหมาะสม และยังคงมีประสิทธิภาพของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด

ผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

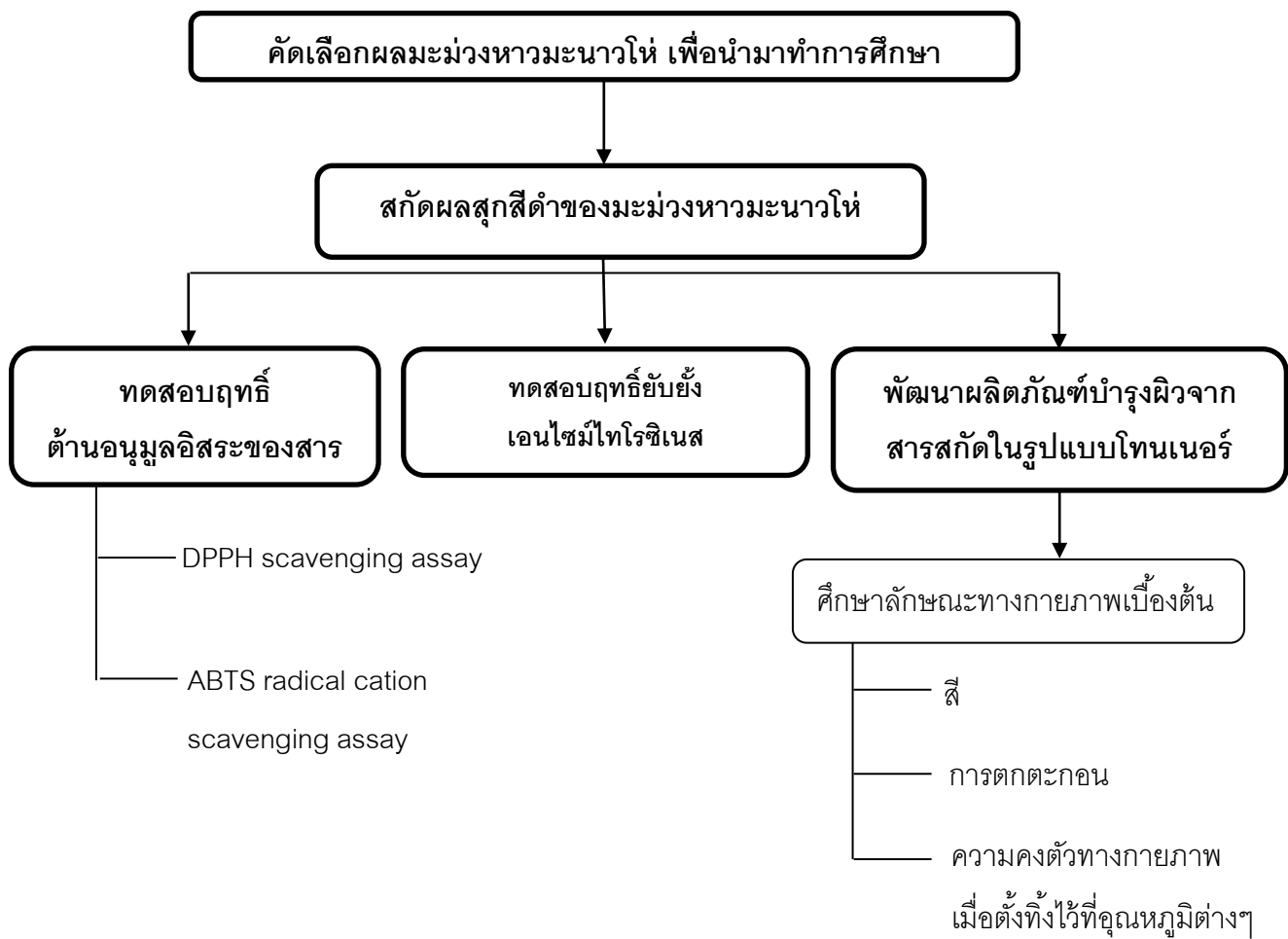
2. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่
2. สามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวในรูปแบบโทนเนอร์จากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ ให้มีคุณลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นที่เหมาะสม

กรอบแนวคิด

เพื่อต้องการนำสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่มาทำผลิตภัณฑ์บำรุงผิวแบบใหม่ให้ผู้บริโภคที่สนใจและก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดของงานวิจัย

บทที่ 2

พรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

มะนาวโห่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Carissa carandas* L. อยู่ในวงศ์ Apocynaceae มีชื่อสามัญคือ Karanda, Carunda และ Christ's thorn (15) มีชื่ออื่นๆ เช่น มะนาวไม่รู้โห่ (ภาคกลาง) มะนาวโห่ (ภาคใต้) หนามขี้แฮด (เชียงใหม่) หนามแดง (กรุงเทพฯ) เป็นต้น สามารถเก็บเกี่ยวผลได้ตลอดทั้งปี (16) แต่จะมีมากในช่วงประมาณ เดือนพฤษภาคม - กรกฎาคม (15) มีลักษณะเป็นไม้พุ่มรอเลื้อย หรือ ไม้ต้นขนาดเล็ก เป็นไม้ไม่ผลัดใบ มีสีเขียวตลอดปี มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (15) ดังนี้ ลำต้นสูง 2-3 เมตร แต่อาจสูงถึง 5 เมตร มียางขาว เปลือกมีสีเทาอ่อน มีกิ่งจำนวนมากโดย กิ่งมีลักษณะแข็ง และกระจายไปทั่วต้น การแตกกิ่งจะแตก ออกเป็น 2 กิ่งตรงคู่กัน มีหนามทั้งแบบหนามเดี่ยว หรือเป็นคู่ อาจยาวได้ถึง 5 เซนติเมตร หนามจะพบบริเวณมุมใบ หรือตามข้อของกิ่ง กิ่งแขนงมักจะมีหนามที่แข็ง และคม ใบเดี่ยว ออกตรงข้าม รูปขอบขนาน หรือรูปไข่ ไม่มีหูใบ ความกว้าง 1.5 - 4 เซนติเมตร ความยาว 3 - 7 เซนติเมตร ปลายมน หรือเว้ามน มีก้านใบเดี่ยว เส้นใบมีลักษณะเป็นร่างแห มีผิวใบเรียบเป็นมัน มีสีเขียวเข้ม หรือสีเขียวอมเทา ช่อดอกออกตามซอกใบ มีลักษณะเรียง เป็นแบบช่อเชิงหลั่น เป็นกระจุกกันอยู่ ใบประดับตรง ดอก: ดอกมีกลิ่นหอม (คล้ายดอกมะลิ) ขนาดยาวประมาณ 3.5-5.5 เซนติเมตร กลีบดอกสีขาว หรือ สีชมพู รวมกันเป็นช่อ 2-3ดอก ไม่มีใบประดับย่อย มีก้านดอกย่อย เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ดอกสมบูรณ์ ตามรัศมี มีกลีบดอก 5 กลีบ กลีบเลี้ยงมีขนาดเล็ก มีลักษณะเป็นขน โคนเชื่อมเป็นหลอด ยาว 16-21.5 มิลลิเมตร ปลายแยกเป็นแฉก 5 แฉก มีขนสั้นขนาดเล็กวง กลีบดอกเชื่อมกัน 5 กลีบเป็นวง รูปใบหอก สีขาวมีขนสั้นขนาดเล็กนุ่ม มีลักษณะยาว และขยายตรงฐานรองดอก มีขนสั้นนุ่มเช่นเดียวกัน มีละอองเกสรตัวผู้จำนวนมาก ปลายยอดเกสรตัวผู้มียางค์ อับเรณูติดอยู่ตรงฐาน มีลักษณะหั่นเข้าอับเรณูแตกทางยาว มีเกสรตัวเมีย 1 อัน รังไข่มีลักษณะกลมรี มีวงเกสรตัวเมีย 2 วง เชื่อมกันอยู่ รังไข่เป็น syncarpous มีหลาย locule placenta อยู่ที่แกนกลางของรังไข่มี carpel และ locule 2 อัน ยอดเกสรตัวเมียมีลักษณะเป็นเส้นใย ปลายแยกเป็น 2 แฉก ผลมีเนื้อสด (fleshy fruit) มี pericarp เป็นเนื้อนุ่มรับประทานได้ ผลเป็นแบบ drupe (ผลไม้ที่มีเมล็ดแข็ง) ลักษณะรูปไข่ ขนาดกว้าง 12-17 มิลลิเมตร ยาว 15-23 มิลลิเมตร ผลเป็นผลเดี่ยวออกรวมกัน

เป็นข้อ ผลอ่อนจะมีสีชมพูอ่อนๆ และค่อยๆเข้มขึ้นกลายเป็นสีแดง กระทั่งสุกจึงกลายเป็นสีดำ มีรสชาติเปรี้ยว เมื่อผลสุกจะมี 2-4 เมล็ด เมล็ดมี ลักษณะแบน รูปไข่ เอนโดสเปิร์มเป็นแบบเนื้อ (fleshy endosperm) มีลักษณะว่า ระยะเวลาการออกดอกและติดผลตั้งแต่เดือนมิถุนายน – ตุลาคม



ภาพที่ 2 ต้นมะม่วงหาวมะนาวโห่



ภาพที่ 3 ผลและดอกของต้นมะม่วงหาวมะนาวโห่

ต้นมะม่วงหาวมะนาวโห่มีการใช้ประโยชน์ได้มากมาย ทั้งการใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้าน และการวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติที่มีประโยชน์มากมายทางการแพทย์ ดังมีรายละเอียดดังนี้

1) ยาพื้นบ้าน (traditional medicinal uses) มะนาวโห่เป็นพืชที่ปลูกทั่วไปตามรั้วบ้าน ที่มีสรรพคุณเป็นยารักษาหรือบรรเทาอาการเจ็บป่วย (17, 18, 19) ดังนี้

ราก: ยาถ่ายพยาธิ บรรเทาอาการปวดท้อง ด้านโรคหลักปิดลักเปิด รักษาอาการผิดปกติในกระเพาะอาหาร เช่น อาการกรดเกิน ท้องอืด รักษาพยาธิที่อยู่ในลำไส้ รักษาโรคหิด แผลเรื้อรัง แผลจากโรคเบาหวาน บรรเทาอาการคัน อาการหนองใน อาการไข้ อาการอาหารไม่ย่อย

อาการอาเจียน อาการผิปกติที่กระเพาะปัสสาวะ และยังใช้พอกแผลเพื่อป้องกันแมลงตอมแผล นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นสารขับไล่แมลง

เปลือกลำต้น: บรรเทาอาการของโรคผิวหนัง แก้บิด ขับน้ำเหลืองเสีย แก้ท้องเสีย แก้กามโรค ทำยาอมรักษาแผลในปาก แก้ปวดฟัน พอกดับพิษ

เนื้อไม้: บำรุงไขมันในร่างกาย บำรุงธาตุ แก้อ่อนเพลีย บำรุงกำลัง

ใบ: นำต้มจากใบใช้บรรเทาอาการไข้ อาการท้องเสีย อาการปวดหู อาการเจ็บคอ เจ็บในปาก อาการเจ็บจากโรคซิฟิลิส และยังสามารถบรรเทาอาการไข้เป็นๆหายๆ

ผล: ผลดิบ มีรสขมและเปรี้ยว ใช้เป็นยาสมานแผล ดับกระหายคลายร้อน ใช้เป็นอาหารเรียกน้ำย่อย ที่กินก่อนอาหารจานหลัก แก้อาการท้องผูก ลดไข้ ละลายเสมหะ ไข้กับผู้มีอาการ เบื่ออาหาร ท้องเสีย อาการไข้ขึ้นสมอง และ อาการอาเจียนเป็นเลือด ส่วนผลสุกมีรสหวานและมีสรรพคุณเย็น ใช้เป็นผลไม้เรียกน้ำย่อย บรรเทาอาการลักปิดลักเปิด ไข้กับผู้มีอาการอาเจียน มีเสมหะ ภาวะเบื่ออาหาร แผลไหม้ โรคหิด อาการคัน และอาการอื่นๆจากโรคผิวหนัง นอกจากนี้ยังบรรเทาภาวะโลหิตจาง และช่วยถอนพิษ ในตำราแพทย์พื้นบ้านกล่าวว่าผลสุกสามารถกระตุ้นอารมณ์ทางเพศของผู้หญิงและฆ่าพยาธิในลำไส้ได้ นอกจากนี้ผลสุกยังมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ และเชื้อราได้ น้ำคั้นจากผลยังสามารถใช้ล้างแผลเพื่อป้องกันการติดเชื้อ และบรรเทาอาการคันที่ผิวหนัง และยังสามารถบรรเทาอาการวิกลจริตได้

เมล็ด: แก้กกลากเกลื้อน แก้เนื้อหงายในโรคเรื้อน แก้โรคผิวหนัง แก้ตาปลา แก้เนื้องอก บำรุงไขข้อ บำรุงกระดูก บำรุงเส้นเอ็น บำรุงกำลัง บำรุงผิวหนัง

น้ำยาง: ทำลายตาปลา กัดทำลายเนื้อที่ด้านเป็นปุ่มโต แก่เลือดออกตามไรฟัน รักษาหูด รักษาซีกกลาก แผลเนื้องอก โรคเท้าช้าง

ยอดอ่อน: รักษาริดสีดวงทวาร

2) คุณสมบัติที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ (pharmacological activities) ได้มีการศึกษาสรรพคุณของ มะม่วงหาวมะนาวโห่ดังต่อไปนี้

2.1) ฤทธิ์ในการปกป้องความเป็นพิษต่อตับ

ตับเป็นอวัยวะสำคัญ ถ้าสูญเสียการทำงานจะส่งผลให้เกิดอาการผิดปกติต่างๆ ขึ้นที่สำคัญ คือ อาการทางสมอง อาการเลือดออกง่าย ตัวเหลือง ตีช้ำ มีน้ำในท้อง และการติดเชื้อรุนแรงของร่างกาย สาเหตุที่ทำให้เซลล์ตับบาดเจ็บเสียหายมีได้หลายประการที่พบได้บ่อย ได้แก่ การติดเชื้อ พิษของสุรา พิษในอาหาร พิษของโลหะหนัก พิษของยาที่พบได้บ่อย คือ การกินยาแก้ปวดพาราเซตามอล (Paracetamol) เกินขนาดหรือใช้ยาต่อเนื่องนานเกินไป (20) จากการศึกษาพบว่าสารสกัดเอทานอลจากรากมะม่วงหาวมะนาวโห่มีฤทธิ์ในการป้องกันความเป็นพิษต่อตับที่เกิดจากการใช้ยาพาราเซตามอลได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลมาจากการที่สารสกัดนี้ไปยับยั้งฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพิษที่เกิดขึ้นกับตับ (21)

2.2) ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง

การศึกษาถึงผลของสารสกัดมะนาวโห่ที่มีผลต่อเซลล์มะเร็งรังไข่ เซลล์มะเร็ง Caov-3 และเซลล์มะเร็งปอด โดยทำการสกัดสารจาก ใบ ผลดิบ และผลสุก พบว่าสารสกัดคลอโรฟอร์มจากใบสามารถต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง Caov-3 ได้ดี ในขณะที่สารสกัดเฮกเซนจากผลดิบสามารถต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดได้ (22) นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสารตัวใหม่ที่มีอยู่ในใบของมะนาวโห่ชื่อสาร carandinol ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของ triterpene ซึ่งเมื่อนำมาประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) การสร้างภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) สารต่อต้านไกลเคชัน (antiglycation) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าสารนี้สามารถก่อกำหนดความเป็นพิษได้กับเซลล์มะเร็งทุกชนิดที่ทำการทดสอบได้แก่ HeLa, PC-3 และ 3T3 โดยจะมีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มากที่สุดซึ่งจัดเป็นการศึกษาแรกๆ ที่ทำการแยกสารกลุ่ม isohopane triterpene จากใบมะนาวโห่ (23)

2.3) ฤทธิ์ในการต้านอาการชัก อากาศปวด และอาการไข้

มีการนำสารสกัดจากผลแห้งมาทำการทดสอบความสามารถในการต้านอาการชักในหนู พบว่าสารสกัดเมทานอลมีความสามารถในการต้านอาการชักในหนูได้ลดลงถึง 76.12% จึงนำสารสกัดนี้มาใช้เป็นส่วนประกอบของยาที่ใช้ต้านอาการชักได้ (24) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยนำสารสกัดจากใบมะนาวโห่มาใช้เพื่อต้านอาการชักและลดไข้ในหนู พบว่าสารสกัดให้กับหนูที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถต้านอาการชักจากการบวมที่อุ้งเท้าของหนู ได้สูงถึง 72.10% ส่วนความสามารถในการลดอาการไข้ พบว่าที่ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถลดอุณหภูมิที่เกิดจากอาการไข้ลงได้อย่างมีนัยสำคัญ และสามารถลดอาการได้นานถึง 4 ชั่วโมงหลังจากให้สารสกัด (25)

2.4) ฤทธิ์ในการต้านอาการชัก โรคลมชัก (Epilepsy)

การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอาการชักที่เกิดจากการกระตุ้นสมองด้วยกระแสไฟฟ้าและการกระตุ้นด้วยสารเคมี (pentylenetetrazole, picrotoxin, bicuculline และ *N*-methyl-dl-aspartic acid) ในหนูโดยใช้สารสกัดเมทานอลจากรากมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าสารสกัดทั้ง 4 ความเข้มข้นสามารถลดระยะเวลาการชักในหนูได้ พบเฉพาะความเข้มข้นที่ 200 และ 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัมเท่านั้นที่ป้องกันอาการชักได้ และที่ความเข้มข้นนี้ยังสามารถป้องกันอาการชักจากการกระตุ้นด้วย pentylenetetrazole และชะลอการเกิดอาการชักจากการกระตุ้นด้วยสาร picrotoxin และ *N*-methyl-dlaspartic acid แต่ไม่มีผลป้องกันอาการชักจากการกระตุ้นด้วยสาร bicuculline (21)

2.5) ฤทธิ์ในการบำรุงหัวใจ

มีรายงานการศึกษาพบว่าสารสกัดจากรากมะนาวโห่มีฤทธิ์ในการบำรุงหัวใจและช่วยลดความดันโลหิตลงได้ โดยสาร atnorphous water-soluble polyglycoside ที่สกัดได้นี้สามารถบำรุงหัวใจได้อย่างมีนัยสำคัญ (15)

2.6) ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

มีการศึกษาพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ tetracycline (26) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของเนื้อผลมะนาวให้โดยพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 100 µg/100 µL มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดสาร aflatoxin ได้ (27)

2.7) ฤทธิ์ในการต้านเบาหวาน

ในตำรายาโบราณบอกว่า มะนาวให้มีสรรพคุณในการต้านอาการเบาหวานได้จึงมีการศึกษาสารสกัดจากผลดิบของมะม่วงหาวมะนาวโห่ พบว่าการสกัดด้วยเมทานอลและเอทิลอะซิเตตที่ความเข้มข้น 400 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดลงได้อย่างมีนัยสำคัญถึง 48 และ 64.5% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยาด้านเบาหวานแผนปัจจุบัน (28)

2.8) ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

มะม่วงหาวมะนาวโห่เป็นพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะในผล พบว่าในผลสุกที่มีสีม่วงจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าผลดิบ (ผลสีเขียว) และผลกึ่งสุก (ผลสีแดง) และยังพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในผลสุกสูงกว่าผลดิบและผลกึ่งสุกด้วยเช่นเดียวกัน (29,30) การสกัดผลมะนาวโห่ ด้วยคลอโรฟอร์มและน้ำทำให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์มากที่สุด ส่งผลให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (scavenging DPPH, superoxides, hydroxyl, hydrogen peroxide และ ABTS radicals) มากที่สุดเช่นเดียวกัน และยังทำให้มีความสามารถในการจับไอออนของเหล็กได้อย่างดีอีกด้วย (31) นอกจากนี้ยังพบว่าในรากมีสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ตั้งแต่ 1.79-4.35 mg GAE (gallic acid equivalents)/g

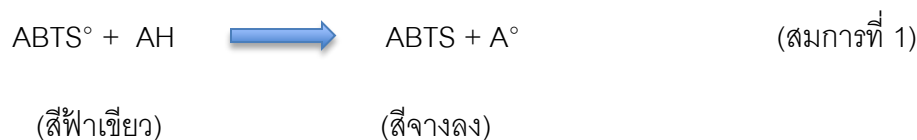
ของตัวอย่างแห้ง ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ระหว่าง 1.91-3.76 mg CE (catechin equivalents)/g ของตัวอย่างแห้ง มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งปฏิกิริยา peroxidation ของ linoleic acid ระหว่าง 12.53-84.82% และ 41.0 - 89.21% ตามลำดับ (32) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นผลจากการมีสารประกอบฟีนอลิกและกรดแอสคอบิก (ปริมาณฟีนอลิกจาก Folin-Ciocalteu's method = $188.75 \pm 0.43 \mu\text{gGAE/mg}$, ปริมาณแอสคอบิก = $62.93 \pm 0.35 \text{ mg/100mL}$, $\text{IC}_{50} = 27.45 \pm 0.43 \mu\text{g/mL}$) (29) ทั้งนี้พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระพบได้ที่ผลสด ซึ่งระยะการสุกของผลสดส่งผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและสอดคล้องกับสีของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ โดยนำผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ทั้ง 3 ระยะ คือ ผลดิบ (ผลสีแดง) ผลห่าม (ผลสีแดงอมดำ) และผลสุก (ผลสีดำ) มาประเมินค่าสีด้วยเครื่องวัดสี (colorimeter) และนำน้ำคั้นของตัวอย่างมาวัด ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total Soluble Solid: TSS) พบว่า ผลสุกจะมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Penpun Wetwitayaklung และคณะ (33) ที่ศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลไม้ไทย 21 ชนิด พบว่าสารสกัดจากผลสุกของมะนาวโห่มีปริมาณฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดจากผลดิบ (1.22 ± 0.22 และ $0.53 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของวชิราภรณ์ ฝิว่องและคณะ (34) ที่ศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ใน 3 ระยะ คือ ดิบ กึ่งสุก และสุก พบว่าผลสุกให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ($2.42 \pm 0.41 \text{ mg AAE/g}$) ปริมาณฟีนอลิกรวม ($4.67 \pm 0.41 \text{ mg GAE/g}$) และปริมาณแอนโทไซยานินสูงที่สุด ($54.80 \pm 6.07 \text{ mg/L}$)

2.8.1 แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นรงควัตถุในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) พบในแวคิวโอลของเซลล์ในส่วนต่าง ๆ ของใบและผลของพืช มีอิทธิพลอย่างมากต่อสีที่เกิด โดยสีที่ให้อยู่ในช่วงสีแดง ชมพู ม่วงและน้ำเงิน มีคุณสมบัติละลายดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ และแอลกอฮอล์ การสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินจะสูงมากขึ้นเมื่อผลไม้เริ่มแก่และเพิ่มสูงขึ้นเมื่อผลสุกเต็มที่ ซึ่งแอนโทไซยานินที่พบมากในปัจจุบันจะมีอยู่ 6 ชนิดคือเพลาโกนินิดิน (pelargonidin) ไชยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) พีโอนิดิน (peonidin) เพทูนิดิน (petunidin) และมอลวิดิดิน (malvidin) ซึ่งแต่ละชนิดจะแยกความแตกต่างกันได้จากการตำแหน่ง 3' หรือ 5'

ว่ามีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) หรือ เมทอกซิล (methoxyl) (35) สำหรับแอนโทไซยานินที่พบในผลสุกของมะม่วงหาวมะนาวโห่ คือ cyanidine – 3 - glucoside จากงานวิจัยของจุฑามาศ สือประสารและคณะ (36) พบว่าจากการสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่สุกเต็มที่โดยใช้ตัวทำละลายไฮโดรคลอริก 1% ในเอทานอลในอัตราส่วนตัวทำละลาย ต่อวัตถุดิบเท่ากับ 20:1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนักเป็นเวลา 120 นาที ได้ปริมาณแอนโทไซยานิน 444.29 mg ของ cyanidine-3-glucoside ต่อ 100 g น้ำหนัก

2.8.3 สารอนุมูลอิสระคือ สารที่มีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนอยู่เพียง 1 ตัวในวงโคจรรอบนอกสุด ซึ่งปกติจะมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นคู่ ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากขบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ เป็นสารที่ไม่เสถียรทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ว่องไว ถ้าประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระในร่างกายน้อยลง ภาวะที่อนุมูลอิสระมากเกินไปจะก่อให้เกิดอันตรายแก่ร่างกาย เรียกภาวะนี้ว่า oxidative stress ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหลายชนิด เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน เป็นสาเหตุรวมในการเกิดโรคมะเร็ง ทำให้ผิวหนังเกิดรอยเหี่ยวย่น สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่ช่วยยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชัน การวัดความสามารถโดยรวมในการต้านอนุมูลอิสระหรือต้านออกซิเดชัน (total antioxidant capacity, TAC) เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีที่นิยม ได้แก่ หลักการทดสอบอนุมูลอิสระ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณมีหลายวิธี ได้แก่ DPPH assay, ABTS assay และ FRAP assay โดยวิธีดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากการดูดกลืนแสง (37)

ABTS เป็นวิธีวัดทางอ้อมโดยใช้สาร 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) หรือ ABTS เป็นอนุมูลที่มีสีฟ้า-เขียววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm เมื่อเติมสารที่ต้องการทดสอบที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สีจางลง (ดังสมการที่ 1) และคำนวณ %inhibition ได้ตามสูตรคำนวณที่ 1 สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากก็จะทำให้สีจางลงมากและมี %inhibition สูง



DPPH เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารเคมีสารสกัดจากธรรมชาติต่างๆ โดยใช้สาร DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่มีความยาวคลื่น 517 nm เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ จะมีความเข้มของสีลดลงหรือเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (ดังสมการที่ 2) ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากก็จะทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลงมาก (37)



การรายงานผลทำได้โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานเช่น วิตามินซี และ trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) โดยคำนวณ %inhibition ดังสูตรคำนวณที่ 1 สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากจะมีค่า %inhibition สูง (37)

$$\% \text{Inhibition} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100 \quad (\text{สูตรคำนวณที่ 1})$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง หรือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง

2.8.4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) หรือ cresolase, monophenol oxidase, phenolase, monophenol monooxygenase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกระบวนการสร้างเม็ดสีซึ่งกระบวนการนี้ทำให้ผิวหนังมีสีหมองคล้ำลงได้ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สามารถใช้วิธี dopachrome 96 well microtiter plate เป็นการอาศัยการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นคือ L-3,4 dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ซึ่งจะถูเอนไซม์ไทโรซิเนสเปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาลซึ่งสารละลายนี้จะดูดกลืนคลื่นแสงที่ 492 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูง ความเข้มข้นของสารละลายสีน้ำตาลจะลดลง การรายงานค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นค่า IC_{50}

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

- 3.1.1 สารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่
- 3.1.2 Glycerine (บริษัท เคมีภัณฑ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด)
- 3.1.3 Propylene glycol (บริษัท เคมีภัณฑ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด)
- 3.1.4 Tween / Polysorbate 20 (บริษัท เคมีภัณฑ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด)
- 3.1.5 Triethanolamine (บริษัท เคมีภัณฑ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด)
- 3.1.6 70% Sorbital (บริษัท เคมีภัณฑ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด)
- 3.1.7 Allantoin (บริษัท เคมีภัณฑ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด)
- 3.1.8 Phenoxyethanol (บริษัท เคมีภัณฑ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด)
- 3.1.9 Deionized water
- 3.1.10 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) (Sigma)
- 3.1.11 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Aldrich)
- 3.1.12 Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Aldrich)
- 3.1.13 Absolute ethanol (RCI-Labscan)
- 3.1.14 Tyrosinase enzyme (Sigma)
- 3.1.15 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) (Aldrich)

3.1.16 Sodium phosphate buffer (Merck)

3.1.17 Vitamin C (Sigma-aldrich)

3.1.18 Potassium persulfate (Merck)

3.1.19 Kojic acid (Aldrich)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 เครื่องปิเปตสารขนาด 100 ไมโครลิตรถึง 1 มิลลิลิตร (Manual Pipettes, Lite™ XLS™, METTLER-TOLEDO, Switzerland)

3.2.2 เครื่องปิเปตสารขนาด 10 ไมโครลิตรถึง 100 ไมโครลิตร (Manual Pipettes, Lite™ XLS™, METTLER-TOLEDO, Switzerland)

3.2.3 เครื่องวัด pH (Professional pH meter, SevenMulti™ S40, METTLER-TOLEDO, Switzerland)

3.2.4 เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิทัลทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance, MS 204, METTER TOLEDO, Switzerland)

3.2.5 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer, 2J1-0004, Hitachi, Japan)

3.2.6 เครื่อง microplate reader (M965+, Meterech)

3.2.7 เครื่อง Freeze dryer (LCC-1-7382030, LABACONCO)

3.2.8 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (DYC-116, Laboratory equipment manufactures)

3.3 การสำรวจแหล่งจำหน่ายผลมะม่วงหาวมะนาวโห่และคัดเลือกผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

3.3.1 คัดเลือกผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีผลสุกเต็มที่สีดำมาจาก ตำบลบ้านเล่า อำเภอเมือง จังหวัดชัยภูมิ

3.4 การสกัดสารสำคัญในผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

นำเนื้อผลของมะม่วงหาวมะนาวโห่มาทำการปั่นผสมกับน้ำให้ละเอียดแล้วทำการกรองเพื่อแยกส่วนของน้ำและกากใยออก จากนั้นนำสารสกัดน้ำที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization (การทำแห้งแบบแช่แข็ง) และนำสารสกัดแห้งที่ได้ไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้สำหรับการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

3.5.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay

3.5.1.1 ชั่ง DPPH 6.6 mg นำมาละลายด้วย absolute ethanol 100 mL

3.5.1.2 เตรียมสารละลายมะม่วงหาวมะนาวโห่ ที่ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 mg/mL

3.5.1.3 นำสารละลายมะม่วงหาวมะนาวโห่ในแต่ละความเข้มข้นจำนวน 20 μ L ผสมสารละลาย DPPH 180 μ L ใน 96-well microtiter plate จากนั้นทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometrically (Multimode Detector, Beckman Coulter DTX 880) ใช้ trolox และ ascorbic ใช้เป็น reference standard ที่ความเข้มข้นช่วง 0.01 - 0.3 mg/mL โดยแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 ครั้ง

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ DPPH scavenging activity โดยใช้สมการ

$$[(A_c - A_s) / A_c] \times 100$$

A_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control

A_s คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample

3.5.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay

3.5.2.1 ชั่ง ABTS 0.0192 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 5 mL และชั่ง potassium persulfate 0.0042 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 6.25 mL

3.5.2.2 นำ ABTS stock solution 5 mL (7 mM) ผสมกับ Potassium persulfate 2.5 mL (2.4 mM) เก็บไว้ในที่มืด 16 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

3.5.2.3 เจือจางสารละลาย ABTS ด้วยน้ำกลั่น แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 0.700 ± 0.020 โดยใช้ UV-Visible spectrophotometer

3.5.2.4 นำสารละลายมะม่วงหาวมะนาวโห่ 20 μ L ผสมกับ ABTS ที่เจือจาง 2 mL รอให้ทำปฏิกิริยาประมาณ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.5.2.5 โดย trolox (ความเข้มข้น 0.13-0.63 mg/mL) และ ascorbic acid (ความเข้มข้น 0.09-0.44 mg/mL) เป็นสารมาตรฐาน นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ inhibition จากสมการ % inhibition = $[(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

3.6 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

3.6.1 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method

3.6.1.1 นำสารละลายตัวอย่าง (10 และ 50 mg/mL) หรือสารละลายมาตรฐาน kojic acid (4mg/mL) ปริมาตร 20 μ L มาผสมกับเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ละลายใน 20 mM sodium phosphate buffer pH 6.8 จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 500 units/mL ปริมาตร 40 μ L และเติม 20 mM sodium phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 100 μ L แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที

3.6.1.2 เติม L-DOPA ที่ละลายใน 20 mM sodium phosphate buffer pH 6.8 จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.85 mM ปริมาตร 40 μ L แล้วนำไปบ่มซ้ำที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm แต่ละตัวอย่างทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง สามารถคำนวณหาร้อยละในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[Ac - (As - Ab)]}{Ac} \times 100$$

เมื่อ Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมที่ไม่มีสารสกัดตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง หรือสารมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรซิเนส

Ab คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง หรือสารมาตรฐานที่ไม่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.7 ขั้นตอนการพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวจากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในรูปแบบของโทนเนอร์

3.7.1 ผสม deionized water 50 mL กับ Allantoin 0.25 g ในปิกเกอร์คนให้เข้ากัน

3.7.2 ผสม deionized water 20 mL กับ สารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ 1 g คนให้เข้ากันในปิกเกอร์

3.7.3 ผสมสารละลายในข้อ 3.7.1 และ 3.7.2 ให้เข้ากัน

3.7.4 เติม 70% sorbitol , phenoxyethanol, glycerin , Tween 20 และ propylene glycol ลงในข้อ 3.7.3 คนจนเข้ากันจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 mL วัดค่า pH ของตำรับ

3.7.5 ปรับ pH ของตำรับ ถ้าเป็นกรดให้ปรับด้วย triethanolamine ถ้าเป็นเบสให้ปรับด้วย citric acid ให้ได้ pH 5.5 จากนั้น บรรจุในภาชนะปิดให้สนิท

ตารางที่ 1 ตารางแสดงองค์ประกอบสารในตำรับโทนเนอร์

สาร \ ตำรับที่	1	2	3	4	5
Glycerin (mL)	5	1	1	2	1
70% Sorbitol (mL)	1	5	1	3	4
Propylene Glycol (mL)	1	1	5	2	2
Tween 20 (mL)	1				
Allantoin (g)	0.25				
Phenoxyethanol (mL)	1				
สารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ (g)	1				
Deionized water	q.s to 100 mL				

จากตำรับ 5 ตำรับข้างต้น ได้เลือกตำรับที่ดีที่สุดคือตำรับที่ 5 โดยเลือกจากการมีผิวสัมผัสที่ดี และซึมเข้าสู่ผิวได้เร็ว ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมแก่การใช้เป็นโทนเนอร์ จากนั้นนำตำรับที่ 5 มาศึกษา ลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นต่อไป

3.8 การศึกษาลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของตำรับโทนเนอร์

3.8.1 ลักษณะภายนอก สังเกตดูความใส สี กลิ่น pH และการแยกของสารสกัด

3.8.2 ความคงตัวทางกายภาพ

3.8.3 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.8.4 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (ทั้งการไม่ป้องกันแสงและป้องกันแสง)

3.8.5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.8.6 เมื่อครบกำหนดเวลานำตัวรับมาสังเกตลักษณะภายนอกเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นโดยเทียบกับหลังการเตรียมผลิตภัณฑ์เสร็จใหม่

3.9 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์โทนเนอร์

3.9.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay โดยทำการทดสอบด้วยขั้นตอนเดียวกันกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging (3.5.2)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้

จากการสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ได้สารสกัดผงสีชมพูน้ำหนัก 42.68 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 6.83%

4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

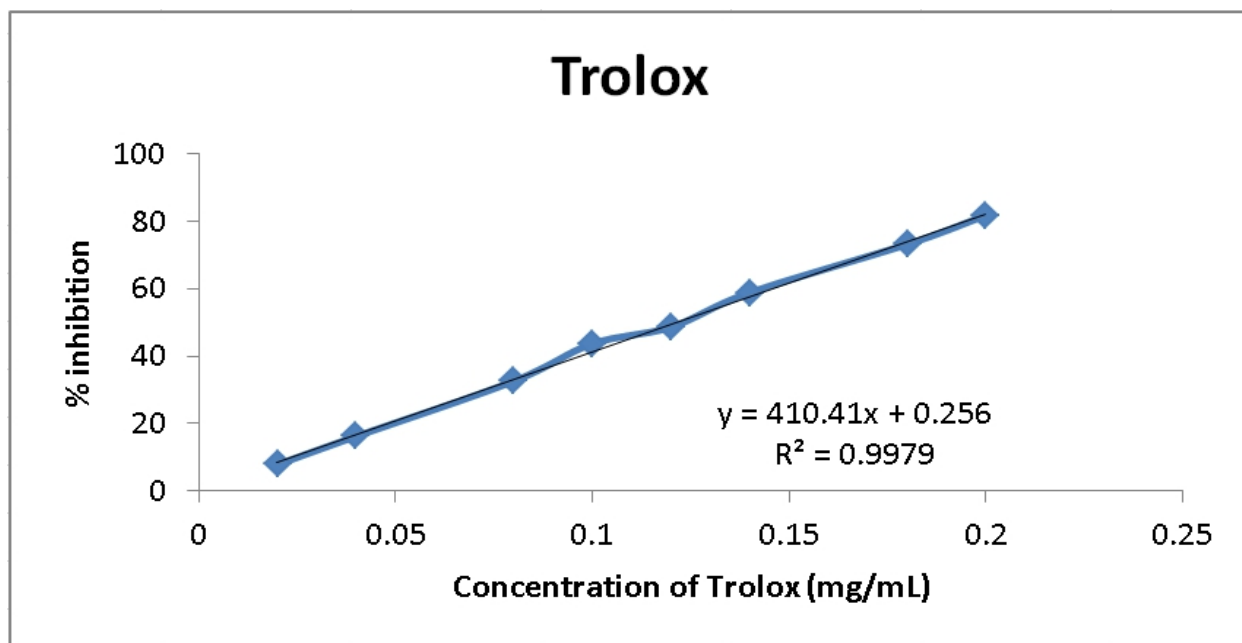
4.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay

ตารางที่ 2 ค่า %inhibition ของ trolox ด้วยวิธี DPPH scavenging assay

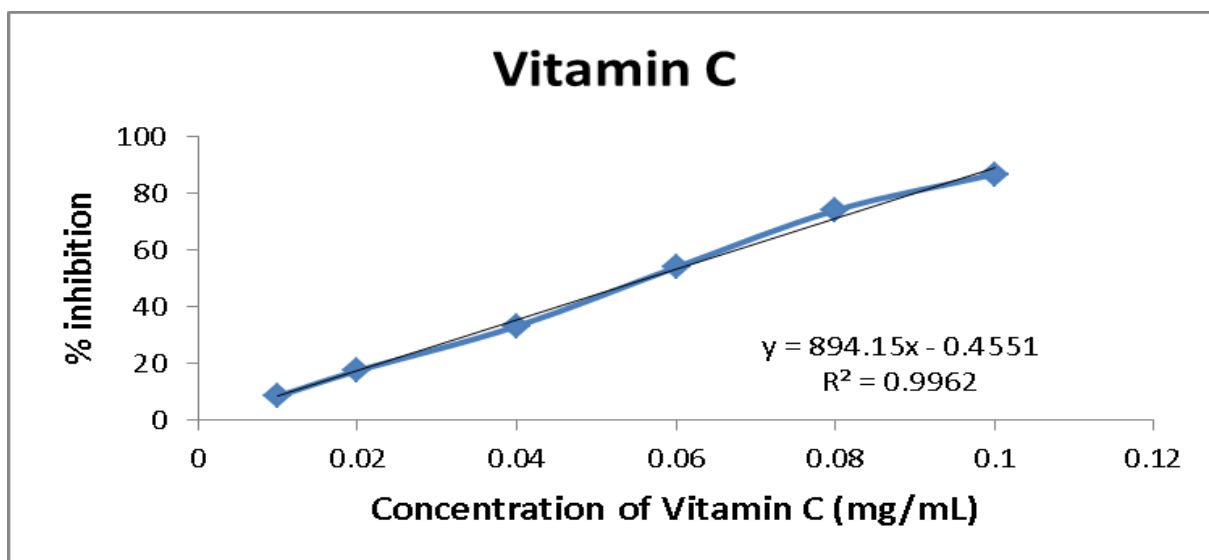
Concentration (mg/mL)	%inhibition
0.20	81.85±2.05
0.18	73.27±0.36
0.14	58.93±2.17
0.12	48.70±2.40
0.10	43.74±2.14
0.08	32.61±1.37
0.04	16.24±0.62
0.02	7.86±2.35

ตารางที่ 3 ค่า %inhibition ของ vitamin C ด้วยวิธี DPPH scavenging assay

Concentration (mg/mL)	%inhibition
0.50	95.80±0.15
0.30	94.79±0.23
0.10	86.82±0.55
0.08	74.08±1.54
0.06	54.02±2.46
0.04	33.29±0.47
0.02	17.60±1.19
0.01	8.65±2.97



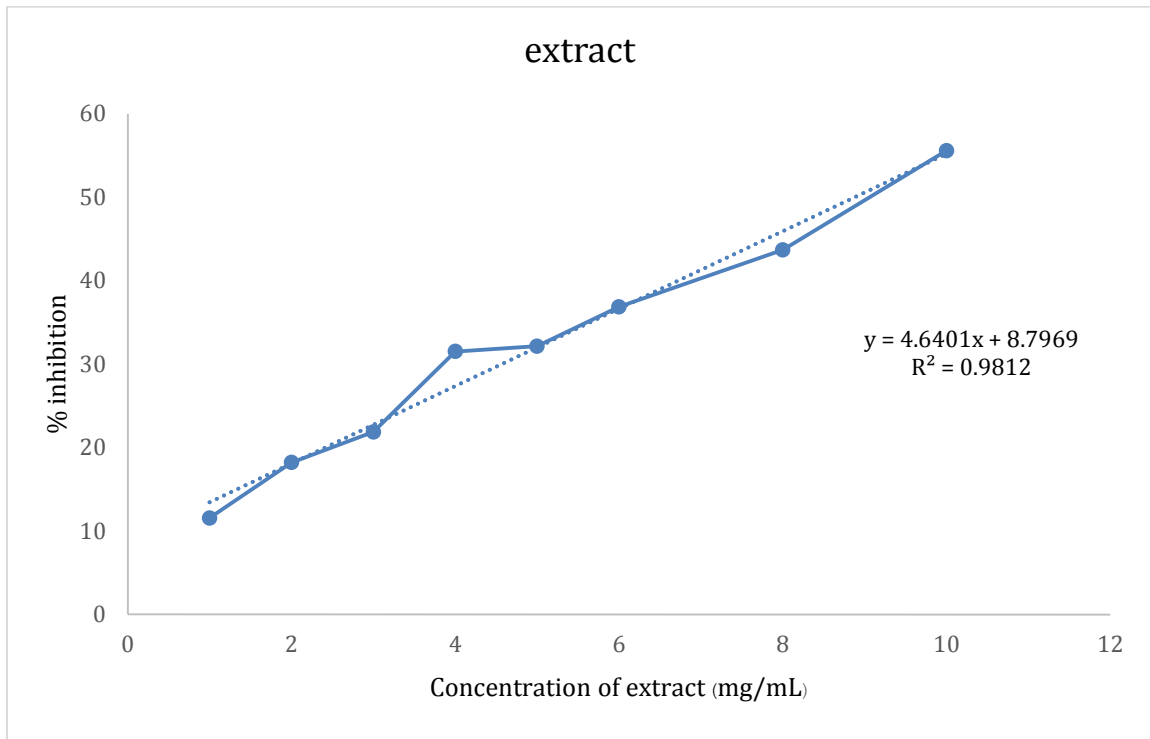
ภาพที่ 4 กราฟแสดงค่าระหว่าง %inhibition และ ความเข้มข้นของ Trolox ด้วยวิธี DPPH scavenging assay



ภาพที่ 5 กราฟแสดงค่าระหว่าง %inhibition และความเข้มข้นของ vitamin C ใน DPPH scavenging assay

ตารางที่ 4 ค่า % inhibition ของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วยวิธี DPPH scavenging assay

Concentration (mg/mL)	%Inhibition
10	55.56 ± 2.42
8	43.67 ± 1.47
6	36.85 ± 1.52
5	32.14 ± 1.68
4	31.50 ± 3.64
3	21.86 ± 3.18
2	18.21 ± 3.50
1	11.55±1.93



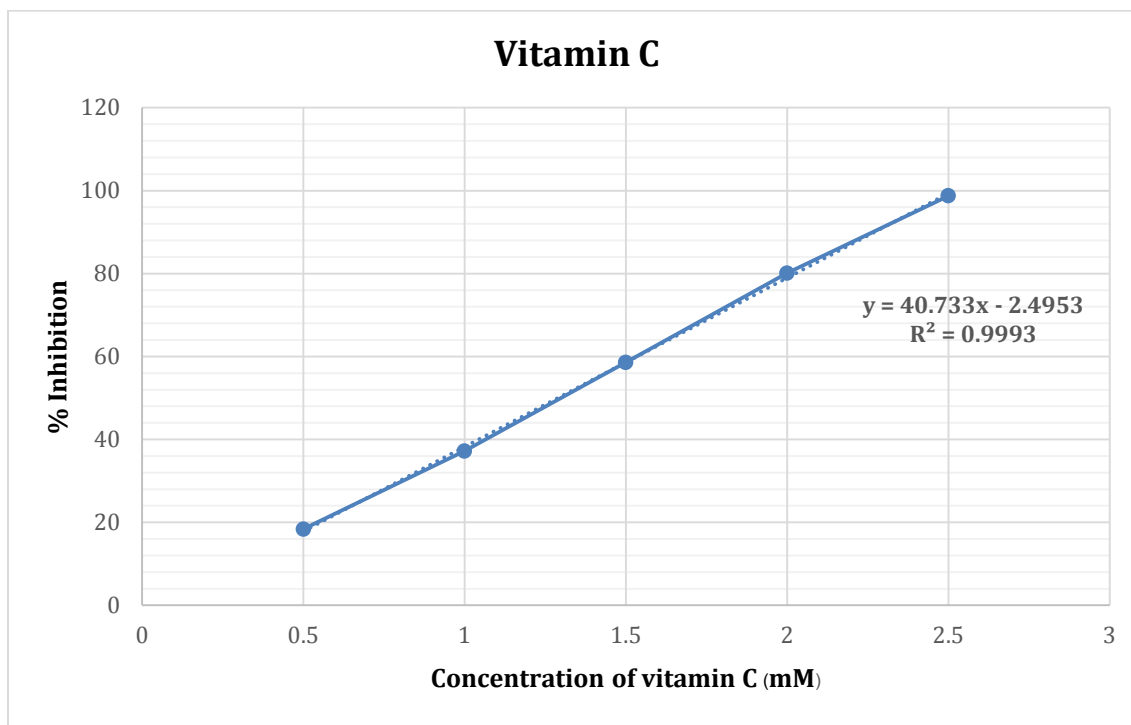
ภาพที่ 6 กราฟแสดงค่าระหว่าง % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วยวิธี DPPH scavenging assay

จากกราฟที่ได้สามารถคำนวณค่า IC_{50} ของ trolox และ vitamin C ได้เท่ากับ 0.12 mg/mL และ 0.06 mg/mL ตามลำดับ และสามารถหาค่า IC_{50} ของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ เท่ากับ 8.86 mg/mL

4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay

ตารางที่ 5 แสดงค่า %inhibition ของ vitamin C โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay

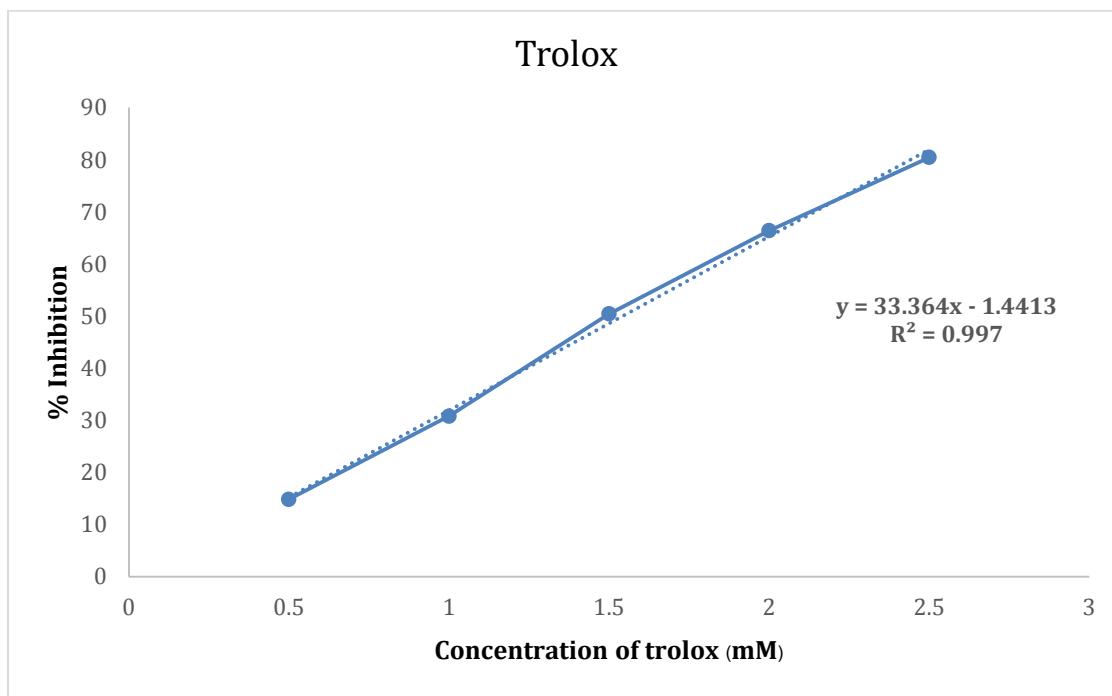
Concentration	% Inhibition
2.5	98.74 ± 1.00
2.0	80.12 ± 2.48
1.5	58.58 ± 0.94
1.0	37.20 ± 0.99
0.5	18.37 ± 1.04



ภาพที่ 7 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ vitamin C ด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay

ตารางที่ 6 ตารางแสดงค่า %inhibition ของ Trolox โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay

Concentration	%Inhibition
2.5	80.47 ± 3.70
2.0	66.42 ± 1.68
1.5	50.45 ± 1.36
1.0	30.82 ± 1.55
0.5	14.86 ± 0.17



ภาพที่ 8 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ Trolox ด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay

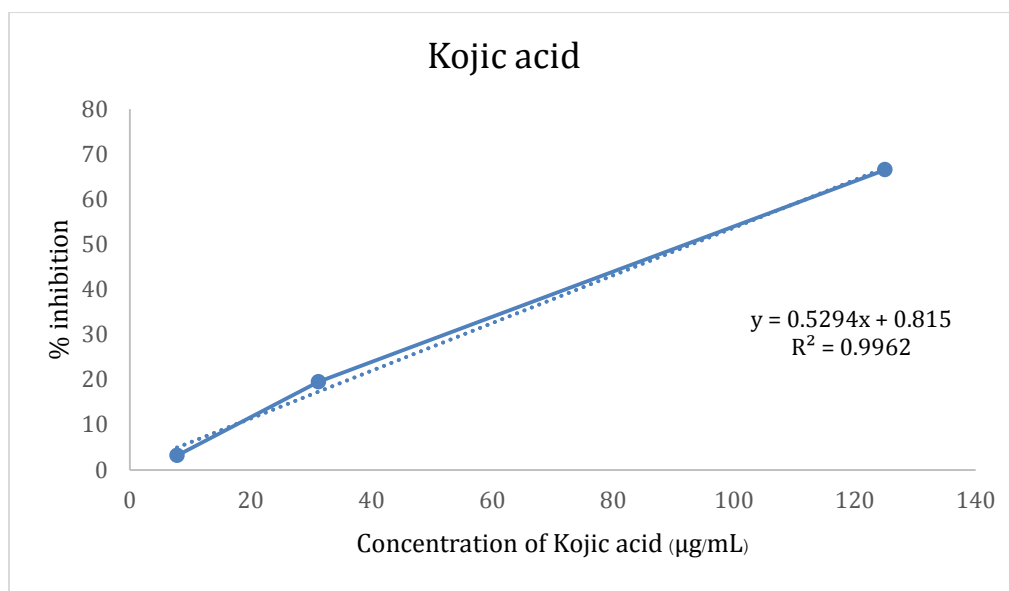
%inhibition ของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ความเข้มข้น 0.206 mg/mL มีค่าเท่ากับ $5.52 \pm 1.57\%$ ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณหาค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจาก calibration curve ของ trolox และ vitamin C โดยใช้สมการ $y = 33.364x - 1.4413$ และ $y = 40.733x - 2.4953$ ตามลำดับ โดยแสดงผลเป็น mg trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)/ g of extract และ mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity (VCEC) / g of extract ได้ว่าสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 4.77 ± 0.02 mg TEAC/g extract และ 5.90 ± 0.02 mg VCEC/g extract ตามลำดับ

4.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วยวิธี

Dopachrome method

ตารางที่ 7 แสดง % inhibition ของ kojic acid โดยวิธี Dopachrome method

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	%inhibition
1000	86.19 ± 0.25
500	82.92 ± 0.63
250	74.51 ± 0.25
125	66.55 ± 0.00
62.5	47.96 ± 0.50
31.25	19.56 ± 1.88
15.652	3.27 ± 0.38
7.8125	3.19 ± 0.00



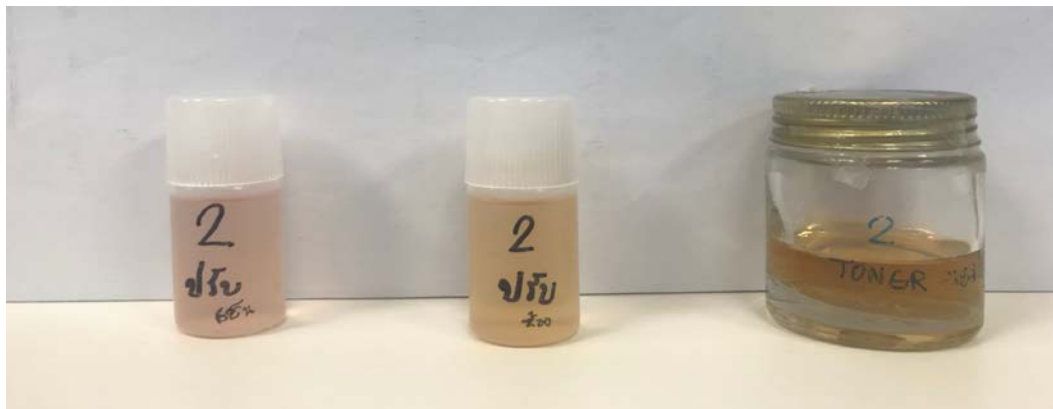
ภาพที่ 9 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ kojic acid ใน Dopachrome method

จากผลการทดสอบได้ค่า IC_{50} ของ Kojic acid เท่ากับ 92.91 $\mu\text{g/mL}$ และค่า %inhibition ของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 5000 $\mu\text{g/mL}$ มีค่าเท่ากับ 6.55 ± 0.25 และ 83.52 ± 2.93 % ตามลำดับ

4.3 การเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในรูปโทนเนอร์

4.3.1 จากการเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ทั้ง 5 ตำรับมีลักษณะทางกายภาพเหมือนกัน ทั้ง 5 ตำรับ คือสารละลายใส มีสีชมพู ค่า pH ก่อนปรับมีค่าเท่ากับ 3.25, 3.25, 3.26, 3.28 และ 3.30 ตามลำดับ หลังปรับ pH ด้วย triethanolamine ได้ค่า pH เท่ากับ 5.54, 5.53, 5.52, 5.51 และ 5.50 ตามลำดับ และหลังการปรับ pH สารละลายมีสีที่เปลี่ยนไป กลายเป็นสีชมพูอมส้ม

4.3.2 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพ



ภาพที่ 10 แสดงภาพตำรับโทนเนอร์จากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่เก็บในสภาวะ อุณหภูมิ 4°C อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 45°C โดยเรียงจากซ้ายไปขวา

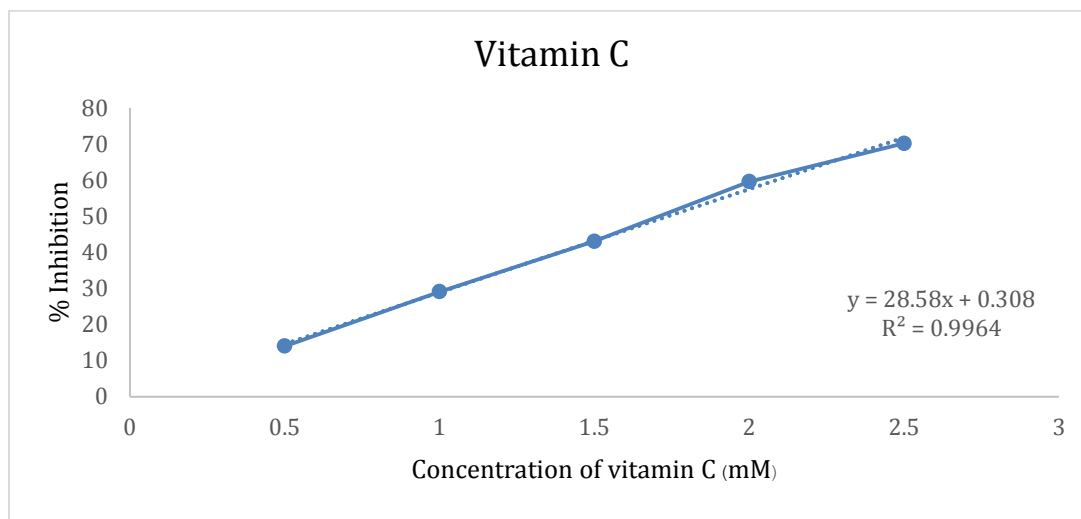
ตารางที่ 8 แสดงลักษณะทางกายภาพของตำรับโทนเนอร์ในสภาวะต่างๆเป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิที่ใช้เก็บตำรับโทนเนอร์	ลักษณะทางกายภาพ
1. อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส	สารละลายสีชมพูอ่อน ไม่มีตะกอน pH 5.5
2. อุณหภูมิห้อง	สารละลายสีชมพูออกเหลือง ไม่มีตะกอน pH 5.5
3 อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง)	สารละลายสีชมพูออกเหลือง ไม่มีตะกอน pH 5.5
4. อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส	สารละลายสีเหลือง ไม่มีตะกอน pH 5.5

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay ของตำรับโทนเนอร์

ตารางที่ 9 แสดงค่า % Inhibition ของ Ascorbic acid ของตำรับ โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay

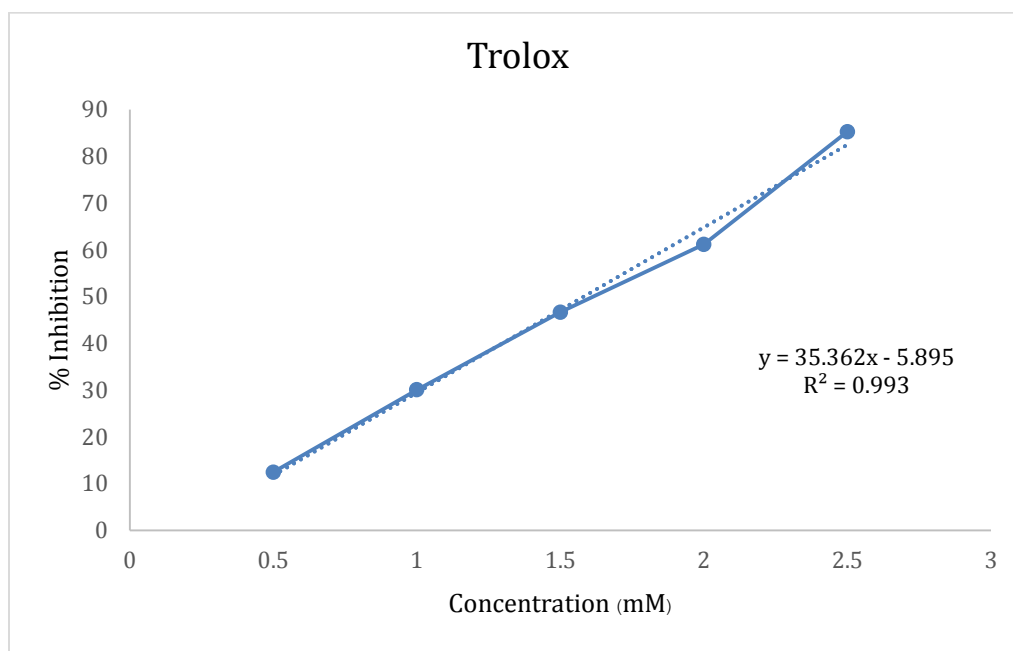
Concentration (mM)	% Inhibition
2.5	70.20 ± 0.00
2.0	59.61 ± 0.00
1.5	43.04 ± 0.02
1.0	29.07 ± 0.00
0.5	14.07 ± 0.01



ภาพที่ 11 กราฟแสดงค่า %Inhibition ของ vitamin C ของตำรับใน ABTS radical cation scavenging assay

ตารางที่ 10 แสดงค่า %Inhibition trolox ของตำรับ โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay

Concentration (mM)	% Inhibition
2.5	85.29 ± 0.00
2.0	61.96 ± 0.02
1.5	46.67 ± 0.02
1.0	30.20 ± 0.01
0.5	12.45 ± 0.01



ภาพที่ 12 กราฟแสดงค่า % Inhibition ของ Trolox ใน ABTS radical cation scavenging assay

ตารางที่ 11 %Inhibition ของตำรับมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ
โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay

อุณหภูมิ	Concentration (mg/mL)	% Inhibition
4°C	10	24.56 ± 0.06
อุณหภูมิห้อง	10	20.10 ± 0.03
อุณหภูมิห้อง(ป้องกันแสง)	10	10.93 ± 0.00
45°C	10	19.85 ± 0.01

จาก % inhibition ของตำรับโชนเนอร์ที่เก็บที่อุณหภูมิต่างๆสามารถคำนวณหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจาก calibration curve ของ trolox และ vitamin C จากสมการ $y = 35.362x - 5.895$ และ $y = 28.58x + 0.30$ ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 15

ตารางที่ 12 แสดงค่า antioxidant activities ของตำรับโชนเนอร์ที่อุณหภูมิต่างๆโดย ABTS radical cation scavenging assay

อุณหภูมิ	(mg TEAC [*] /g extract)	(mg VCEC ^{**} /g extract)
4 °C (ป้องกันแสง)	18.12 ± 0.16	0.72 ± 0.19
อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง)	18.21 ± 0.07	0.82 ± 0.09
45 °C	18.37 ± 0.02	1.03 ± 0.05
4 °C	18.21 ± 0.02	0.83 ± 0.03
อุณหภูมิห้อง	18.24 ± 0.02	0.86 ± 0.02

*TEAC = Trolox equivalent antioxidant capacity

**VCEC = Ascorbic acid equivalent antioxidant capacity

บทที่ 5

สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

5.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้

การสกัดผลสุกของมะม่วงหาวมะนาวโห่ได้สารสกัดเป็นผงสีชมพู มีน้ำหนัก 42.68 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 6.83%

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

5.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay ของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.86 mg/mL ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าสารมาตรฐาน trolox และ vitamin C ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.12 mg/mL และ 0.06 mg/mL ตามลำดับ

5.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay ของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน trolox และ vitamin C โดยมีค่าเท่ากับ 4.77 ± 0.02 mg TEAC/g extract และ 5.90 ± 0.02 mg VCEC/g extract ตามลำดับ

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีข้างต้น พบว่าสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่เกี่ยวกับผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่ผ่านมา ดังนั้นสามารถนำสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ไปใช้ในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเพื่อช่วยชะลอความชราและความเหี่ยวของผิวได้

5.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ด้วยวิธี Dopachrome method

จากการทดสอบจะพบว่าสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 5,000 $\mu\text{g/mL}$ สามารถยับยั้งยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ %inhibition เท่ากับ $6.55 \pm 0.25 \%$ และ $83.52 \pm 2.93 \%$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มที่ความเข้มข้นสูงขึ้นสารสกัดจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากขึ้น ซึ่งช่วยลดการสร้างเม็ดสีของผิว ทำให้ผิวแลดูกระจ่างใสได้ แต่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดยังมีค่าน้อยกว่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ kojic acid ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 92.91%

5.4 การเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในรูปโทนเนอร์

จากการเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์โทนเนอร์จากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ทั้ง 5 ตำรับ ที่มีองค์ประกอบของ glycerin, 70% sorbitol, propylene glycol, tween20, allantoin, สารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ และ น้ำกลั่น ที่มีอัตราส่วนของสารที่แตกต่างกัน พบว่าทั้ง 5 ตำรับมีลักษณะทางกายภาพเหมือนกัน คือ สารละลายใส มีสีชมพูอ่อน pH อยู่ในช่วง 3.25 – 3.35 เมื่อทำการปรับ pH อยู่ในช่วง 5.45 – 5.55 และสารละลายมีการเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูอ่อนอมส้ม จากนั้นได้เลือกตำรับที่ดีที่สุดคือ ตำรับที่ 5 เนื่องจากหลังการทดสอบโดยทาผลิตภัณฑ์ไปบนผิวหนังแล้วรู้สึกไม่เหนียว และซึมเข้าสู่ผิวได้เร็วที่สุด จึงนำมาทดสอบความคงตัวทางกายภาพต่อไป

5.5 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ในรูปโทนเนอร์

จากการทดสอบทางกายภาพของผลิตภัณฑ์โทนเนอร์พบว่าผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ที่เก็บในอุณหภูมิต่ำ (4°C) มีสีชมพูอ่อนอมส้มซึ่งใกล้เคียงกับสีของตำรับหลังทำเสร็จแสดงว่ามีความคงตัวที่ดี แต่ตำรับที่เก็บในอุณหภูมิห้อง มีการเปลี่ยนสีเล็กน้อยและตำรับที่เก็บในอุณหภูมิสูง (40°C) มีการเปลี่ยนแปลงจากสีชมพูอ่อนเป็นสีเหลือง แสดงว่าผลิตภัณฑ์โทนเนอร์คงตัวไม่ดีในอุณหภูมิสูง ซึ่งทั้ง 3 สภาวะไม่มีการตกตะกอนหรือแยกชั้นของตำรับ

5.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay ของตำรับโพนเนอร์

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทดสอบด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay ของตำรับโพนเนอร์ พบว่าตำรับโพนเนอร์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน trolox โดยตำรับมะม่วงหาวมะนาวโห่ที่มีการป้องกันแสงเก็บที่ 4 °C, อุณหภูมิห้องและ 45 °C มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 18.12, 18.21 และ 18.37 mg TEAC/g extract ตามลำดับ ส่วนตำรับที่ไม่ป้องกันแสงเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C และที่อุณหภูมิห้องได้ 18.21 และ 18.24 mg TEAC/g extract ตามลำดับ จากผลการทดสอบสามารถกล่าวได้ว่าตำรับที่ป้องกันแสงและไม่ป้องกันแสงให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าแสงไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับ และเมื่อเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับโพนเนอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่ามีค่าสูงกว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ (4.77 ± 0.02) ประมาณ 3 เท่า ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นผลมาจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบอื่นในตำรับ หรืออาจเกิดจากสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบในตำรับเกิดเป็นสารประกอบใหม่ซึ่งต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมและทำสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบต่อไป

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดน้ำจากผลสุกของมะม่วงหาวมะนาวโห่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH scavenging assay และ ABTS radical cation scavenging assay อีกทั้งยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เมื่อนำสารสกัดมาเตรียมตำรับบำรุงผิวในรูปแบบโพนเนอร์ พบว่าตำรับยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีความคงตัวที่ดีที่อุณหภูมิ 4 °C และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะมีการเปลี่ยนแปลงของสีเล็กน้อย จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำเอาสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเพื่อช่วยชะลอความชราของผิว ชะลอความเหี่ยวย่น ลดเลือนริ้วรอยก่อนวัยและชะลอการสร้างเม็ดสีเพื่อให้ผิวกระจ่างใสได้ และผลิตภัณฑ์โพนเนอร์ที่พัฒนานี้ สามารถนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ และพัฒนาตำรับเพิ่มเติมเพื่อนำไปต่อยอดจำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวต่อไปในอนาคตได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเก็บตัวอย่างโหนดในสภาวะต่างๆ เป็นระยะเวลานานกว่า 1 สัปดาห์เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างโหนดให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนสมบูรณ์
2. ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง เทียบกับ ตัวอย่างควบคุม (ไม่มีสารสกัด)
3. ควรทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging assay และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome method ในตัวอย่างโหนดที่เก็บไว้ในสภาวะต่างๆ และตัวอย่างที่ไม่มีสารสกัด เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาตัวอย่างต่อไปในอนาคต
4. ควรมีการทดสอบการระคายเคืองผิวและความพึงพอใจของอาสาสมัคร

เอกสารอ้างอิง

1. จิรฐาพร ธีระเกียรติกังวาน และ คณะ, “การศึกษาการรับรู้ตำแหน่งทางการตลาดและปัจจัยในการตัดสินใจเลือกซื้อเครื่องสำอางนำเข้าจากต่างประเทศ”. วารสารหลักสูตรบริหารธุรกิจมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2549):1-2.
2. ธงชัย พุ่มพวง, ประพันธ์ ชานนท์, พิมพิไล ทองประโคน, กัลยาณี วรรณศรี, ดำรงเกียรติ มาลา และ พรประภา รัตนแดง. 2556. มะม่วงหาว มะนาวโห่ ผลไม้ในวรรณคดีไทยที่มากมายด้วยคุณค่าและราคาดี. นิตยสารเกษตรโพกัส. 2(20): 24-39.
3. สกุลกานต์ สิมลา. 2559. มะนาวโห่: พืชในวรรณคดีไทยที่มากมายด้วยประโยชน์. KHON KAEN AGR. J. 44 (3) : เกษตร 44 (3) : 557-566.
4. สกุลกานต์ สิมลา, สุรศักดิ์ บุญแต่ง และพัชรี สิริตระกูลศักดิ์. 2556. การประเมินปริมาณสารพฤกษเคมีบางประการและกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระใน *Carissa carandas* L. เกษตร 41(ฉบับพิเศษ 1): 602-606.
5. Philippine Medicinal Plants, 2012; Maheshwari et al., 2012; Kumar et al., 2013; Kittipanan, 2555
6. MedThai.เอนไซม์ (Enzyme) คืออะไร? ประโยชน์ของเอนไซม์ 11 ข้อ[Internet].2014.[เข้าถึงเมื่อ 2018/03/25].เข้าถึงได้จาก <https://medthai.com/เอนไซม์/>
7. Honestdocs.สารต้านอนุมูลอิสระ กำจัดสารพิษ ทำให้อายุยืน ช่วยต้านมะเร็ง[Internet].[เข้าถึงเมื่อ 2018/03/25].เข้าถึงได้จาก <https://www.honestdocs.co/antioxidants-longevity>
8. MedThai.โตนเนอร์ยี่ห้อไหนดีที่เป็นโตนเนอร์ที่ดีที่สุดสำหรับคุณ[Internet].2013.[เข้าถึงเมื่อ 2018/03/25].เข้าถึงได้จาก.<https://medthai.com/โตนเนอร์ยี่ห้อไหนดี/>
9. Jiangseubchatveera N, Liawruangrath S, Teerawutgulrag A, Santiarworn D, Pyne SG, Liawruangrath B. Phytochemical screening, phenolic and flavonoid contents, antioxidant

and cytotoxic activities of *Graptophyllum pictum* (L.) Griff . Chaing Mai J Sci . 2017; 44(1) : 193-202.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

10. Sungthong B, Phadungkit M. Anti-tyrosine and DPPH radical scavenging activities of Thai herbal extracts traditionally used as skin toner . Phcog J. 2015 ; 7(2) : 97-101
11. กองพัฒนาศักยภาพผู้บริโภค สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. อย. เตือน อย่าซื้อ อย่าใช้ เครื่องสำอางอันตราย 34 รายการ เสี่ยง! หน้าพัง . 2010 July. Available from:
http://www.fda.moph.go.th/www_fda/data_center/ifm_mod/nw/%E0%B8%82%E0%B9.
12. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. รายชื่อชุดทดสอบกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และสถานที่ติดต่อสั่งซื้อ / ตัวแทนจำหน่ายของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2013 Sep [เข้าถึงเมื่อ 2018 มิถุนายน 20]; เข้าถึงได้จาก : http://dmsc2.dmsc.moph.go.th/testkit/index.php?option=com_content&view=a.
13. จุฑามาศ สื่อประสาร ,การศึกษาสภาพที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารแอนโทไซยานินสำหรับหนามแดง 2556. [เข้าถึงเมื่อ 2018 มิถุนายน 30] เข้าถึงได้จาก : <http://puechkaset.com>.
14. อ้อมบุญ วัลลิสุต, ผ่องพรรณ ศิริพงษ์. (2552) การพัฒนาสารสกัดหม่อนที่มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง. มหาวิทยาลัยมหิดล:ม.ป.ท.
15. Kumar, S., P. Gupta, and V. Gupta K.L. 2013. A critical review on Karamarda (Carissa carandas Linn.). Int J Pharm Bio Arch. 4(4): 637 -642.
16. ธงชัย พุ่มพวง, ประพันธ์ ชานนท์, พิมพีใจ ทรงประโคน, กัลยาณี วรรณศรี, ดำรงเกียรติ มาลา และพรประภา รัตนแดง. 2556. มะม่วงหาว มะนาวโห่ ผลไม้ในวรรณคดีไทยที่ มากมายด้วยคุณค่าและราคาดี. นิตยสารเกษตรโฟกัส. 2(20): 24-39.
17. Philippine Medicinal Plants. 2012. Caranda. Available: <http://goo.gl/kBShxE>. Accessed Aug. 6, 2018.

18. Maheshwari, R., A. Sharma, and D. Verma. 2012. Phyto-therapeutic Significance of Karaunda. B Environ Pharmacol Life Sci. 1(12): 6-34.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

19. Kittipanan (นามแฝง). 2555. มะนาวไม่รู้โห่สมุนไพรช่วยซ่อม ร่างกาย. แหล่งข้อมูล: <http://goo.gl/Musd2d>. ค้นเมื่อ 18 สิงหาคม 2561.
20. D'Agata, I.D., and W.F. Balistreri. 1999. Evaluation of liver disease in the pediatric patient. *Pediatr Rev*, 20(11): 376-389.
21. Hegde, K., and A.B. Joshi. 2009. Hepatoprotective effect of *Carissa carandas* Linn root extract against CCl₄ and paracetamol induced hepatic oxidative stress. *Indian J. Exp Biol.* 47: 660-667.
22. Sulaiman, S.F., W.S. Teng, O.K. Leong, S.R. Yusof, and T.S.T. Muhammad. (n.d.). Anticancer study of *Carissa carandas* extracts. Available: <http://goo.gl/W2WjSG>. Accessed May 16, 2018.
23. Begum, S., S.A. Syed, B.S. Siddiqui, S.A. Sattar, and M.I. Choudhary. 2013. Carandinol: First isohopane triterpene from the leaves of *Carissa carandas* L. and its cytotoxicity against cancer cell lines. *Phytochem Lett.* 6: 91-95.
24. Anupama, N., G. Madhumitha, and K. S. Rajesh. 2014. Role of Dried Fruits of *Carissa carandas* as AntiInflammatory Agents and the Analysis of Phytochemical Constituents by GC-MS. *BioMed Research International*. Available: <http://goo.gl/kApdEC>. Accessed Aug. 11, 2014.

25. Hati, M., B.K. Jena, S. Kar, and A.K. Nayak. 2014. Evaluation of anti-inflammatory and anti-pyretic activity of *Carissa carandas* L. leaf extract in rats. *J. Pharm Chem Bio Sci.* 1(1): 18-25.
26. Agarwal, T., R. Singh, A.D Shukla, and I. Waris. 2012. In vitro study of antibacterial activity of *Carissa carandas* leaf extracts. *Asian J Plant Sci Res.* 2(1): 36-40.
27. Siddiqi, R., S. Naz, S. Ahmad, and S.A. Sayeed. 2011. Antimicrobial activity of the polyphenolic fractions derived from *Grewia asiatica*, *Eugenia jambolana* and *Carissa carandas*. *Int J Food Sci Tech.* 46(2): 250-256.

เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

28. Itankar, P.R., S.J. Lokhande¹, P.R. Verma, S.K. Arora, R.A. Sahu, and A.T. Patil. 2011. Antidiabetic potential of unripe *Carissa carandas* Linn. fruit extract. *J. Ethnopharmacol.* 135: 430-433.
29. สกุลกานต์ สิมลา, สุรศักดิ์ บุญแต่ง และพัชรี สิริตระกูลศักดิ์. 2556. การประเมินปริมาณสารพฤกษเคมีบางประการและ กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระใน *Carissa carandas* L. แก่นเกษตร. 41(ฉบับพิเศษ 1): 602-606.
30. Chai, X.F., and P. Ding. 2013. Postharvest quality and antioxidant activity of Karanda (*Carissa carandas*) fruit. P.177-181. In: Proceeding of the 7th International Postharvest Symposium. June 25-29 2012, Kuala Lumpur, Malaysia.
31. Sahreen, S., M.R. Khan, and R.A. Khan. 2010. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem.* 122: 1205-1211.

32. Aslam, F., N. Rasool, M. Riaz, M. Zubair, K. Rizwan, M. Abbas, T.H. Bukhari, and I.H. Bukhari. 2011. Antioxidant, haemolytic activities and GC-MS profiling of *Carissa carandas* roots. *Int J Phytomedicine*. 3: 567-578.
33. Penpun Wetwitayaklung, Juree Charoenteeraboon, Chutima Limmatvapirat & Thawatchai Phaechemud. (2551). Antioxidant activities of some Thai and exotic fruits cultivated in Thailand. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3(1), 12-21.
34. วชิราภรณ์ ผิวล่อง, สุรศักดิ์ สัจจนุต, ศิริลักษณ์ สิงห์เพชร และจารุรัตน์ เอี่ยมศิริ. (2556). อิทธิพลของระยะเวลาสุกต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของมะม่วงหาวมะนาวโห่. *ว.วิทย์.เกษตร* 44(2) (พิเศษ), 337-340.
35. อรุษา เชาวนลิขิต. (2554). การสกัดและวิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน. ว.มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี), 3(6), 26-36.

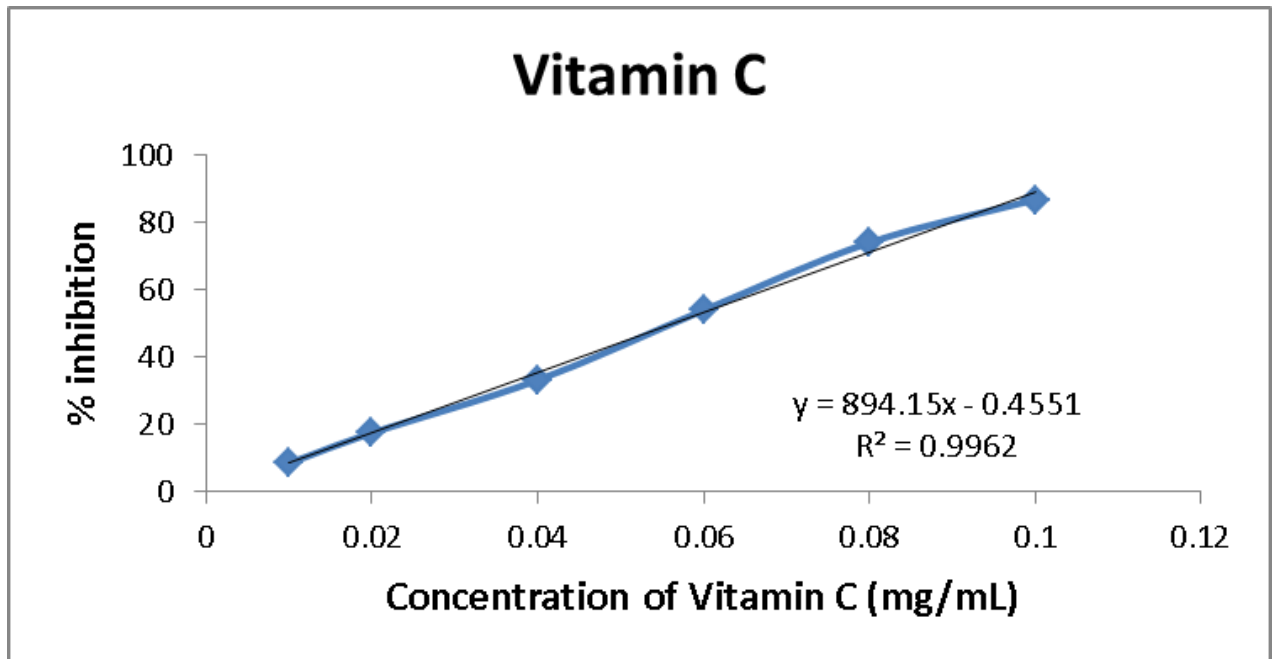
เอกสารอ้างอิง(ต่อ)

36. จุฑามาศ สือประสาร ทานตะวัน พิรัชและศิริพร เรียบร้อย. (2556). การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารแอนโทไซยานินจากผลหนามแดง. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่51: สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์, สาขา อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
37. บุหรีน พันธุ์สุวรรณ.(2556).อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระและวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.21(3).275-286.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การหาค่า IC_{50} ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH



ภาพที่ 13 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ vitamin C ใน DPPH scavenging assay

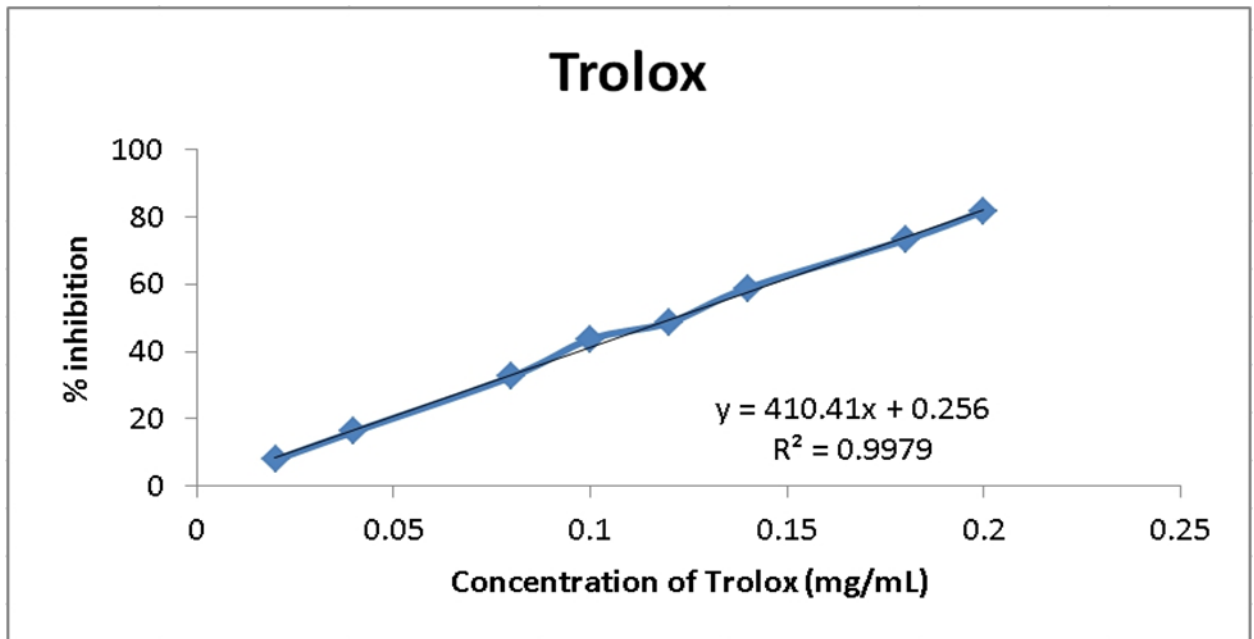
1. การหาค่า IC_{50} ของ Ascorbic acid

จากสมการ $y = 894.15x - 0.4551$; $R^2 = 0.9962$

แทนค่า $y = 50$; $x = (50 + 0.4551) / 894.15$

$$X = 0.056$$

ดังนั้น ความเข้มข้นสารที่ $IC_{50} = 0.056$ mg/mL



ภาพที่ 14 กราฟแสดงค่า %inhibition ของ Trolox ใน DPPH scavenging assay

2. การหาค่า IC_{50} ของ Trolox

จากสมการ $y = 410.41x + 0.256$; $R^2 = 0.9979$

แทนค่า $y = 50$; $x = (50 - 0.256) / 410.41$

$$X = 0.1212$$

ดังนั้น ความเข้มข้นสารที่ $IC_{50} = 0.1212$ mg/mL

3. การหาค่า IC_{50} ของ ผลสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่

จากสมการ $y = 4.397x + 8.8034$; $R^2 = 0.812$

แทนค่า $y = 50$; $x = (50 - 8.8034) / 4.379$

$$X = 9.4077$$

ดังนั้น ความเข้มข้นสารที่ $IC_{50} = 9.4077$ mg/mL

การหาค่า Antioxidant โดยวิธี ABTS radical cation scavenging assay ของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่

1. การหาค่า Trolox (mg TEAC/g extract)

ของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

จากสมการ $y = 33.364x - 1.4413$ $R^2 = 0.997$

โดยแทนค่า y ด้วย ค่า Absorbance ของความเข้มข้นของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ในแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ 0.624, 0.639 และ 0.619

$$y = 0.624$$

$$y = 33.364x - 1.4413$$

$$0.624 = 33.364x - 1.4413$$

$$X = 0.062 \text{ นำไปหารด้วยน้ำหนักสารสกัด (g) ได้ } = 0.062 / 0.013 = 4.79$$

จากสมการ $y = 33.364x - 1.4413$ $R^2 = 0.99$

$$y = 0.639$$

$$y = 33.364x - 1.4413$$

$$0.639 = 33.364x - 1.4413$$

$$X = 0.062 \quad \text{นำไปหารด้วยน้ำหนักรสสกัด (g) ได้} = 0.062/0.013 = 4.79$$

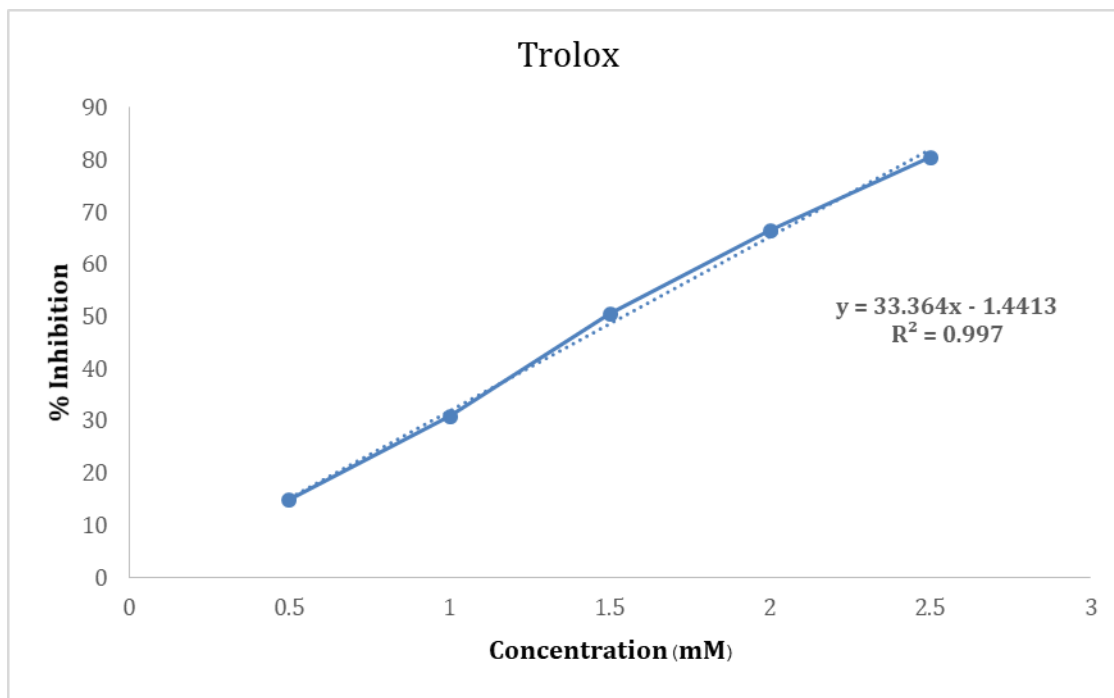
$$y = 0.619$$

$$y = 33.364x - 1.4413$$

$$0.619 = 33.364x - 1.4413$$

$$X = 0.061 \quad \text{นำไปหารด้วยน้ำหนักรสสกัด (g) ได้} = 0.061/0.013 = 4.75$$

$$\text{ค่าเฉลี่ย} = 4.79 + 4.79 + 4.75 / 3 = 4.77$$



ภาพที่ 15 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ Trolox ใน ABTS radical cation scavenging assay

2. การหาค่า Vitamin C (mg VEAC/g extract)

ของสารสกัดผลมะม่วงหาวมะนาวโห่

จากสมการ $y = 40.733x - 2.4953$ $R^2 = 0.9993$

โดยแทนค่า y ด้วย ค่า Absorbance ของความเข้มข้นของสารสกัดมะม่วงหาวมะนาวโห่ในแต่ละความเข้มข้น ได้แก่ 0.624, 0.639 และ 0.619

$$y = 0.624$$

$$y = 40.733x - 2.4953$$

$$0.624 = 40.733x - 2.4953$$

$$X = 0.077 \quad \text{นำไปหารด้วยน้ำหนักสารสกัด (g) ได้} = 0.077/0.013 = 5.92$$

$$y = 0.639$$

$$y = 40.733x - 2.4953$$

$$0.639 = 40.733x - 2.4953$$

$$X = 0.077 \quad \text{นำไปหารด้วยน้ำหนักสารสกัด (g) ได้} = 0.077/0.013 = 5.92$$

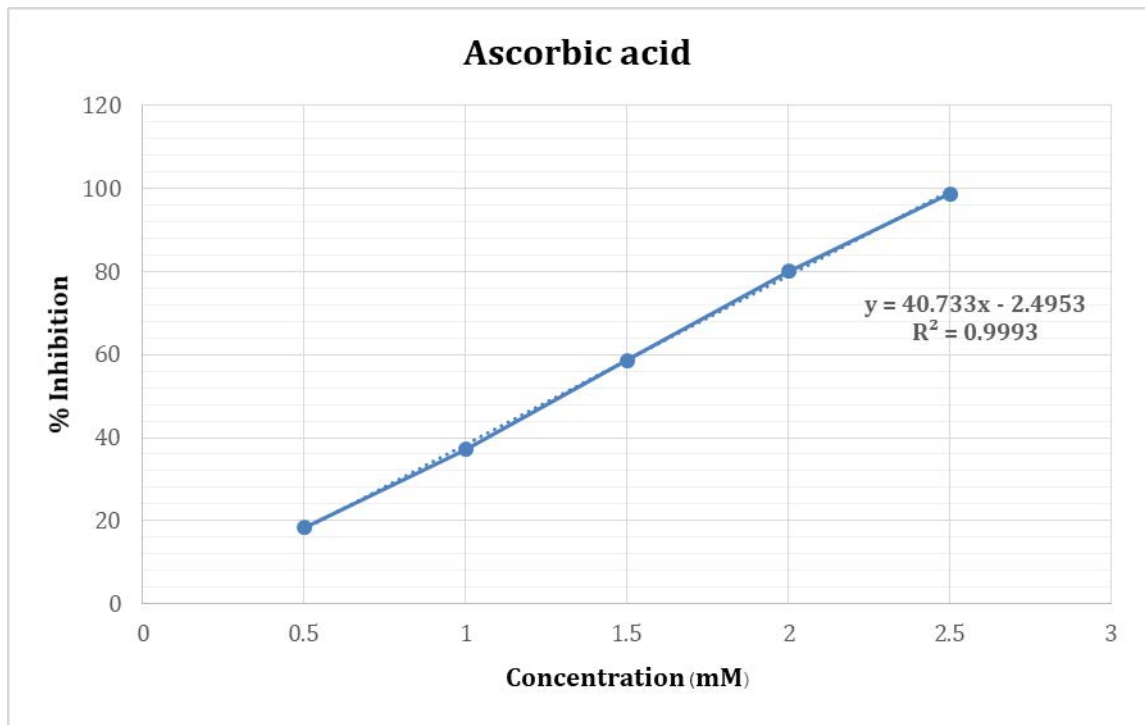
$$y = 0.619$$

$$y = 40.733x - 2.4953$$

$$0.619 = 40.733x - 2.4953$$

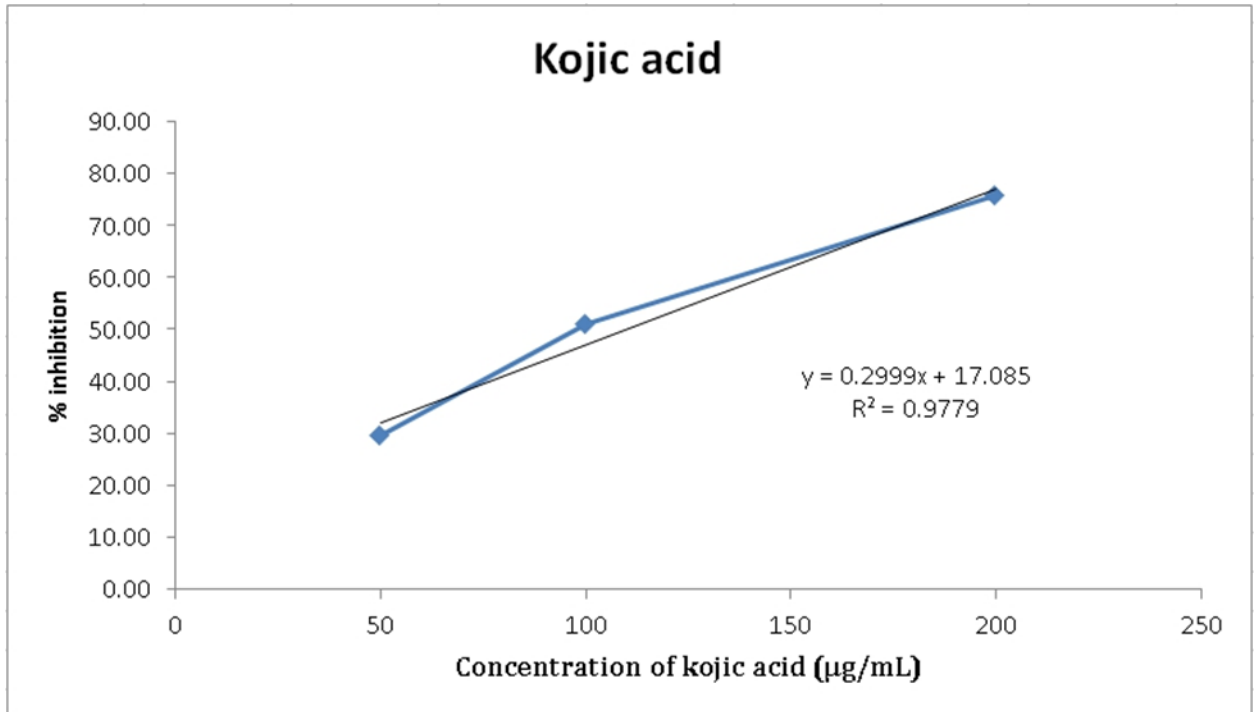
$$X = 0.0764 \quad \text{นำไปหารด้วยน้ำหนักสารสกัด (g) ได้} = 0.0764/0.013 = 5.88$$

$$\text{ค่าเฉลี่ย} = 5.92 + 5.92 + 5.88 / 3 = 5.90$$



ภาพที่ 16 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ vitamin C ใน ABTS radical cation scavenging assay

การหาค่า IC_{50} ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส



ภาพที่ 17 กราฟแสดงค่า%inhibition ของ kojic acid ใน Dopachrome method

1. การหาค่า IC_{50} ของ kojic acid

จากสมการ $y = 0.2999x + 17.085$; $R^2 = 0.9779$

แทนค่า $y = 50$; $x = (50 - 17.085) / 0.2999$

$$X = 109.75$$

ดังนั้น ความเข้มข้นสารที่ $IC_{50} = 109.75 \mu\text{g/mL}$