**โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์**

**เรื่อง**

# การพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมและป้องกันผมหงอกจากสารสกัดใบฝรั่ง

(Development of Hair care product for grey hair prevention from *Psidium guajava* L. leaf extract)


**โดย**

| | | |
|---|---|---|
| นสภ. ธนวรรธน์ | วิวัฒนมงคลกุล | 57210080 |
| นสภ. ดิษย์ชิต | ประยูรพีรพุฒิ | 57210177 |
| นสภ. ธีรเมธ | กัลยาวัฒนเจริญ | 57210186 |


**โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร**
**ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561**
**คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา**

**โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์**

**เรื่อง**

# การพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมและป้องกันผมหงอกจากสารสกัดใบฝรั่ง

(Development of Hair care product for grey hair prevention from *Psidium guajava* L. leaf extract)

**โดย**

| | | |
|---|---|---|
| นสภ. ธนวรรธน์ | วิวัฒนมงคลกุล | 57210080 |
| นสภ. ดิษย์ชิต | ประยูรพีรพุฒิ | 57210177 |
| นสภ. ธีรเมธ | กัลยาวัฒนเจริญ | 57210186 |


**โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร**
**ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2561**
**คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา**

# คำนำ

การเกิดผมร่วงและผมหงอกเป็นปัญหาสำคัญที่พบได้ในคนทุกเพศทุกวัย เนื่องจากปัจจัยหลายอย่างที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้ผมร่วงไม่ว่าจะปัจจัยทางด้านอารมณ์ พันธุกรรม ผลข้างเคียงของยา หรือความผิดปกติของฮอร์โมนต่างๆในร่างกาย ทำให้ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ช่วยในการบำรุงเส้นผมเพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้

ผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมในปัจจุบันมีหลายรูปแบบ เช่น ซีรัม แชมพู หรือครีมนวดผม เป็นต้น โดยแต่ละรูปแบบจะมีวิธีการใช้หรือ ข้อดีข้อเสียของแต่ละวิธีที่แตกต่างกันออกไป ตามความสะดวกและความชื่นชอบของผู้ใช้ ในปัจจุบันคนส่วนใหญ่เริ่มให้ความสำคัญกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้บำรุงเส้นผม ที่สกัดได้มาจากการสกัดจากธรรมชาติ ทั้งนี้สารสกัดจากธรรมชาติจะช่วยลดการระคายเคืองต่อร่างกาย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม จึงเป็นเหตุผลหนึ่งในการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมจากสารสกัดใบฝรั่ง โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัด ชนิดของใบฝรั่งที่นำมาใช้สกัดและนำสารสกัดที่ได้ไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส จากนั้นจึงเลือกสารสกัดที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุด เพื่อนำไปพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมต่อไป

คณะผู้จัดทำ

โครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2561

เรื่อง **การพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมและป้องกันผมหงอกจากสารสกัดใบฝรั่ง**

ผู้จัดทำโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ. ธนวรรธน์ วิวัฒนมงคลกุล 57210080

2. นสภ. ดิษย์ชิต ประยูรพีรพุฒิ 57210177

3. นสภ. ธีรเมธ กัลยาวัฒนเจริญ 57210186

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. ภญ. ดร.เนตรชนก เจียงสืบชาติวีระ

## บทคัดย่อ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบฝรั่งและเปรียบเทียบวิธีการสกัดสารจากใบฝรั่งอ่อนและแก่ โดยแบ่งการสกัดเป็น 2 วิธี ได้แก่ วิธีต้มกับน้ำและวิธีหมักกับ 70%เอทานอล จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH scavenging assay พบว่าสารสกัดน้ำจากใบอ่อน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด $IC_{50}$ เท่ากับ 0.12 ± 0.00 mg/mL และมีฤทธิ์เท่ากับสารมาตรฐานtrolox ส่วนการทดสอบด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay พบว่าสารสกัดน้ำจากใบอ่อน และสารสกัดเอทานอลจากใบแก่ มีฤทธิ์สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 8.90 mg/g trolox equivalent antioxidant capacity นอกจากนี้ พบว่า สารสกัดทุกตัวมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยสารสกัดน้ำจากใบอ่อน ที่ความเข้มข้น 5000 µg/mL สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ มากที่สุดคือ 72.78 ± 4.16 % เมื่อนำเอาสารสกัดใบฝรั่งทุกชนิดมาพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมในรูปแบบซีรัมโดยมีส่วนประกอบของ guava leaf extract, vitamin B5, glycerin, PG, Tween 20 , Luviquat® และphenoxyethanol และนำตำรับไปศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าตำรับที่มีสารสกัดเอทานอลจากใบแก่ มีความคงตัวดีที่สุดจากผลการศึกษาทั้งหมดนี้ สามารถนำสารสกัดใบฝรั่งไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมอื่นต่อไปในอนาคต

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก.....

Senior Project Academic Year 2018

: **Development of Hair care product for grey hair prevention from *Psidium guajava* L. leaf extract.**

By

1.Mr.Tanawat Wiwattanamongkolgul ID 57210080

2.Mr.Ditsachid Prayoonpeeraput ID 57210177

3.Mr.Teeramate Kallayawatthanajareon ID 57210187

Advisor:

Dr. Nadechanok Jiangseubchatveera

ABSTRACT

This study was performed to evaluate the biological activities of the *Psidium guajava* L. leaves extract and compare the extraction methods of young and old leaves. The extraction methods are the decoction and the maceration with 70%ethanol.The water extract of young leaves showed ($IC_{50}$ 0.12 ± 0.00 mg/mL), the highest antioxidant activity which is equal to the standard trolox using DPPH scavenging assay. Whereas the ABTS radical cation scavenging assay found the water extract of young leaves and the ethanolic extract of old leaves showed the highest antioxidant activity with 8.90 mg/g trolox equivalent antioxidant capacity. In addition, all extract had antityrosinase activity.The water extract of young leaves (5,000 µg/mL) exhibited the highest antityrosinase activity with 72.78 ± 4.16 %. After that all extracts were developed to a hair serum product which consisted of guava leaf extract, vitamin B5, glycerin, propylene glycol, Tween 20, Luviquat® and phenoxyethanol. The stability test of all formulations were performed at the different temperatures. The formulation with the ethanolic extract of old leaves showed the best stability at all temperatures. From all results, the guava leave extracts could be developed to other hair care products in the future.

Major Advisor.....

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจาก ภญ. ดร.เนตรชนก เจียงสืบชาติวีระ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือ ในทุกปัญหาการวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณ ภก. ผศ. ดร. บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์ และ นางสาวกนกพร ก้อนทรัพย์ สำหรับคำแนะนำและสารเคมีในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำโครงงานวิจัยในครั้งนี้ให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้อย่างสะดวกบรรลุวัตถุประสงค์

คณะผู้จัดทำ

| | | |
|---|---|---|
| นสภ. ธนวรรธน์ | วิวัฒนมงคลกุล | 57210080 |
| นสภ. ดิษย์ชิต | ประยูรพีรพุฒิ | 57210177 |
| นสภ. ธีรเมธ | กัลยาวัฒนเจริญ | 57210186 |

# สารบัญ


| หัวข้อ | หน้า |
|---|---|
| คำนำ | ข |
| บทคัดย่อ | ค |
| Abstract | ง |
| กิตติกรรมประกาศ | จ |
| สารบัญตาราง | ซ |
| สารบัญรูปภาพ | ฌ |
| บทที่ 1 | 1 |
| ความสำคัญและที่มาของปัญหา | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 2 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| กรอบแนวคิด | 3 |
| นิยามศัพท์ | 3 |
| บทที่ 2 | 5 |
| 2.1 โครงสร้างของเส้นผม | 5 |
| 2.2 วงจรการงอกของเส้นผม | 5 |
| 2.3 ผมร่วง | 6 |
| 2.4 ผมหงอก | 9 |
| 2.5 Antioxidant | 9 |
| 2.6 ความสัมพันธ์ของสารต้านอนุมูลอิสระกับเส้นผม | 10 |
| 2.7 ข้อมูลพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการทดลอง | 10 |
| 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 15 |
| 2.9 วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชหรือสมุนไพรในปัจจุบัน | 16 |
| 2.10 การทดสอบสาร Antioxidant | 18 |
| 2.11 การเลือกสารสำหรับพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม | 19 |
| บทที่ 3 | 21 |
| 3.1 วัตถุดิบและสารเคมี | 21 |

หน้า

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองและอุปกรณ์ 22
3.3 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดใบฝรั่ง 22
3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบฝรั่ง 23
3.5 การเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม 25
3.6 การศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับ 26
บทที่ 4 27
4.1 ปริมาณของสารสกัด 27
4.2 การทดสอบสาร antioxidant ด้วยวิธี DPPH 28
4.3 การทดสอบ ABTS radical cation scavenging assay 34
4.4 การทดสอบ antityrosinase activity 35
4.5 การปรับสูตรตำรับสารสกัด 37
4.6 การประเมินรูปแบบผลิตภัณฑ์ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ 39
4.7 การประเมินรูปแบบเภสัชภัณฑ์หลังนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆเวลา 7 วัน 41
บทที่ 5 45
5.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้ 45
5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฝรั่ง 45
5.3 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบฝรั่ง 46
5.4 การเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งในรูปของซีรัม 46
เอกสารอ้างอิง 48

# สารบัญตาราง


| หัวข้อ | หน้า |
|---|---|
| ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของสารที่ใช้ในพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม | 20 |
| ตารางที่ 2 แสดงการเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม | 25 |
| ตารางที่ 3 แสดงร้อยละของสารสกัดด้วยวิธีต่างๆของใบฝรั่งอ่อนและแก่ | 27 |
| ตารางที่ 4 แสดง %inhibition ของสารสกัดใบฝรั่งและสารมาตรฐานด้วยวิธี DPPH | 30 |
| ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ย $IC_{50}$ ของสารสกัดใบฝรั่งและสารมาตรฐานด้วยวิธี DPPH | 34 |
| ตารางที่ 6 แสดง Antioxidant activities โดย ABTS assay | 34 |
| ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบ antityrosinase activity ของสารสกัด | 35 |
| ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบ antityrosinase activity ของ Kojic acid | 36 |
| ตารางที่ 9 แสดงคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับที่ 1 | 37 |
| ตารางที่ 10 แสดงคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับที่ 2 | 37 |
| ตารางที่ 11 แสดงคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับที่ 3 | 38 |
| ตารางที่ 12 แสดงการประเมินรูปแบบผลิตภัณฑ์ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ | 39 |
| ตารางที่ 13 แสดงสูตรตำรับที่ 3 ของสารสกัด YE หลังนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ | 41 |
| ตารางที่ 14 แสดงสูตรตำรับที่ 3 ของสารสกัด OE หลังนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ | 42 |
| ตารางที่ 15 แสดงสูตรตำรับที่ 3 ของสารสกัด YF หลังนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ | 43 |
| ตารางที่ 16 แสดงสูตรตำรับที่ 3 ของสารสกัด OF หลังนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ | 44 |

# สารบัญรูปภาพ


| หัวข้อ | หน้า |
|---|---|
| รูปที่ 1 แสดงวงจรการงอกของเส้นผม (hair growth cycle) | 6 |
| รูปที่ 2 แสดงลักษณะของใบและลูกฝรั่ง | 10 |
| รูปที่ 3 แสดงองค์ประกอบ Percolation | 16 |
| รูปที่ 4 แสดงองค์ประกอบเครื่องมือ Soxhlet Extractor | 17 |
| รูปที่ 5, 6 แสดงกราฟ %inhibitor ของ YE ครั้งที่ 1, 2 | 30 |
| รูปที่ 7 แสดงกราฟ %inhibitor ของ YE ครั้งที่ 3 | 31 |
| รูปที่ 8, 9, 10 แสดงกราฟ %inhibitor ของ OE ครั้งที่ 1, 2, 3 | 31 |
| รูปที่ 11, 12 แสดงกราฟ %inhibitor ของ YF ครั้งที่ 1, 2 | 31 |
| รูปที่ 13 แสดงกราฟ %inhibitor ของ YF ครั้งที่ 3 | 32 |
| รูปที่ 14, 15, 16 แสดงกราฟ %inhibitor ของ OF ครั้งที่ 1, 2, 3 | 32 |
| รูปที่ 17, 18 แสดงกราฟ %inhibitor ของ vitamin c ครั้งที่ 1, 2 | 32 |
| รูปที่ 19 แสดงกราฟ %inhibitor ของ vitamin c ครั้งที่ 3 | 33 |
| รูปที่ 20, 21, 22 แสดงกราฟ %inhibitor ของ Trolox ครั้งที่ 1, 2, 3 | 33 |
| รูปที่ 23 แสดงกราฟ % inhibitor ของ trolox ด้วยวิธี ABTS | 35 |
| รูปที่ 24 แสดงกราฟ %inhibition ของ kojic acid | 36 |
| รูปที่ 25 แสดงคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับของตำรับที่ 1 | 37 |
| รูปที่ 26 แสดงคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับของตำรับที่ 2 | 38 |
| รูปที่ 27 แสดงรูปแบบผลิตภัณฑ์ OF ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ | 39 |
| รูปที่ 28 แสดงรูปแบบผลิตภัณฑ์ YF ก่อนนำไปนำทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ | 39 |
| รูปที่ 29 แสดงรูปแบบผลิตภัณฑ์ OE ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ | 40 |
| รูปที่ 30 แสดงรูปแบบผลิตภัณฑ์ YE ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ | 40 |
| รูปที่ 31 แสดงสารสกัด YE ที่ อุณหภูมิห้อง | 41 |
| รูปที่ 32 แสดงสารสกัด YE ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง) | 41 |

หน้า

รูปที่ 33 แสดงสารสกัด YE ที่ อุณหภูมิ 4°C 41
รูปที่ 34 แสดงสารสกัด YE ที่ อุณหภูมิ 45°C 41
รูปที่ 35 แสดงสารสกัด OE ที่ อุณหภูมิห้อง 42
รูปที่ 36 แสดงสารสกัด OE ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง) 42
รูปที่ 37 แสดงสารสกัด OE ที่ อุณหภูมิ 4°C 42
รูปที่ 38 แสดงสารสกัด OE ที่อุณหภูมิ 45°C 42
รูปที่ 39 แสดงสารสกัด OE ที่ อุณหภูมิห้อง 43
รูปที่ 40 แสดงสารสกัด OE ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง) 43
รูปที่ 41 แสดงสารสกัด YF ที่ อุณหภูมิ 4°C 43
รูปที่ 42 แสดงสารสกัด YF ที่อุณหภูมิ 45°C 43
รูปที่ 43 แสดงสารสกัด OE ที่ อุณหภูมิห้อง 44
รูปที่ 44 แสดงสารสกัด OE ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง) 44
รูปที่ 45 แสดงสารสกัด OF ที่ อุณหภูมิ 4°C 44
รูปที่ 46 แสดงสารสกัด OF ที่อุณหภูมิ 45°C 44

# บทที่ 1
# บทนำ

## ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันมีประชากรจำนวนมากที่มีปัญหาเรื่องเส้นผมทั้งปัญหาเรื่องผมร่วงและปัญหาเรื่องผมหงอก ซึ่งสามารถเกิดได้ทั้งในผู้ชายและผู้หญิง โดยธรรมชาติของเส้นผมจะหลุดร่วงเป็นปกติวันละ 25 - 100 เส้น แต่ถ้าผมร่วงเกินกว่านี้ ก็อาจถือว่ามีปัญหาผมร่วงได้ ซึ่งสาเหตุของการเกิดผมร่วงและผมหงอกมีอยู่หลายสาเหตุด้วยกัน เช่น พันธุกรรม ความเครียด อายุที่เพิ่มขึ้น ฮอร์โมนต่างๆ หรืออาจเกิดจากผลข้างเคียงของยาหรือการรักษาทางการแพทย์ เช่น ยารักษาโรคมะเร็ง การได้รับเคมีบำบัด เป็นต้น ปัญหาผมร่วงนี้อาจส่งผลต่อเรื่องภาพลักษณ์และบุคลิกภาพได้ เนื่องจากสมัยนี้คนส่วนใหญ่มักจะใส่ใจในเรื่องภาพลักษณ์เป็นสำคัญ อาจทำให้เกิดความไม่มั่นใจในตัวเองขึ้นมาได้ และส่งผลต่อกิจกรรมต่างๆได้ เช่น การสมัครงาน การพบปะสังสรรค์กับผู้คน เป็นต้น เป็นเหตุให้ผู้คนเริ่มใส่ใจในการดูแลเส้นผมมากยิ่งขึ้นและทำให้ผลิตภัณฑ์รักษาหรือบำรุงเส้นผมได้รับความสำคัญและมีความนิยมเพิ่มขึ้น (1)

ผลิตภัณฑ์ในการบำรุงเส้นผมมีหลายรูปแบบ เช่น แชมพู ซีรัม ครีมนวดผม เป็นต้น ซึ่งองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์เหล่านี้โดยส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์ (2) อาจก่อให้เกิดอันตราย หรือการแพ้แก่ผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ในปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้แทนสารสังเคราะห์ เนื่องจากสารสกัดทางธรรมชาติโดยส่วนใหญ่ ไม่เป็นพิษต่อร่างกายและสิ่งแวดล้อม โดยเลือกใช้สมุนไพรที่ช่วยในการบำรุงเส้นผมที่มีการใช้ในสมัยโบราณ หรือจากภูมิปัญญาท้องถิ่นมาใช้ในผลิตภัณฑ์ ตัวอย่างสมุนไพรที่นิยมใช้ ได้แก่ มะกรูด-ทำให้ผมเรียบและเงามัน (3) มะคำดีควาย-ใช้เพื่อขจัดรังแกและรักษาชันนะตุ (4) อัญชัน-ใช้แก้ผมร่วงและทำให้ผมดกดำ (3) เป็นต้น รวมถึงพืชที่มีสาร ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ย่านาง บัวบก อัญชัน หม่อน ฝรั่ง และกวาวเครือขาว เป็นต้น (5)

จากการสืบค้นหาข้อมูลพบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความเกี่ยวข้องกับการรักษาอาการผมร่วงและการเกิดผมหงอก โดยช่วยเพิ่มความแข็งแรงของ disulfide bonds ในโปรตีนของเส้นผมและเพิ่มความชุ่มชื้นแก่เส้นผม (6) เนื่องจากใบฝรั่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และหาได้ง่ายในจังหวัดชลบุรี อีกทั้งการศึกษาสารสกัดใบฝรั่งในการป้องกันผมร่วงและผมหงอกมีน้อย ด้วยเหตุนี้ทางกลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำใบฝรั่งพันธุ์กิมจูมาสกัด และนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวถาพ

ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน และนำสารสกัดใบฝรั่งที่ได้นี้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ซีรัม เพื่อนำมาใช้บำรุงเส้นผมและป้องกันการเกิดผมหงอกต่อไป

## วัตถุประสงค์

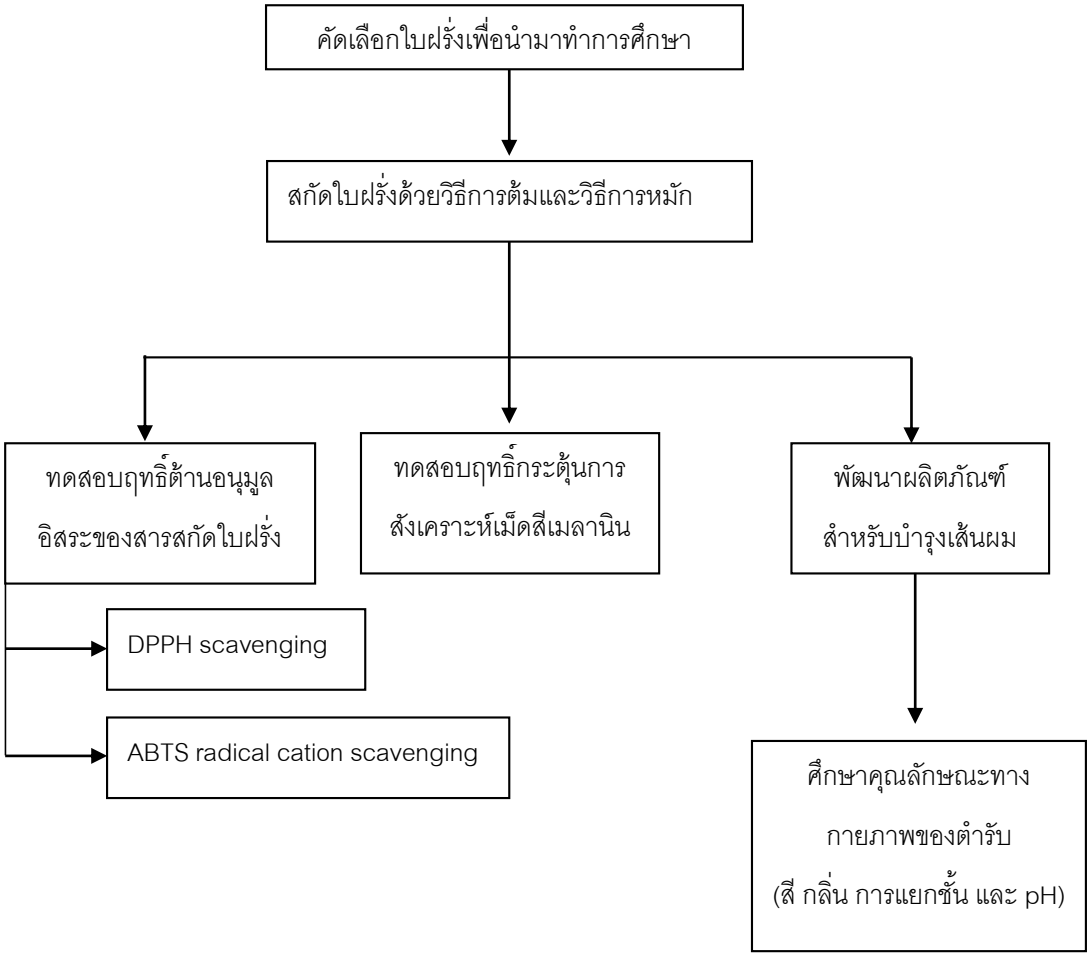
1. เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้จากวิธีการสกัดและชนิดของใบฝรั่งที่แตกต่างกัน
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของสารสกัดใบฝรั่ง
3. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผมและป้องกันการเกิดผมหงอกจากสารสกัดใบฝรั่ง

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและชนิดของใบฝรั่งที่ให้สารสกัดมีฤทธิ์ทางชีวภาพดีที่สุด
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของสารสกัดใบฝรั่ง
3. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ในการบำรุงเส้นผมและป้องกันการเกิดผมหงอกจากสารสกัดใบฝรั่ง
4. เพื่อนำผลที่ได้จากงานวิจัยไปเผยแพร่เพื่อเป็นข้อมูลให้ผู้ที่สนใจสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

## กรอบแนวคิด

เพื่อต้องการนำสารสกัดจากใบฝรั่งมาทำผลิตภัณฑ์เพื่อบำรุงเส้นผมและป้องกันผมหงอก




## นิยามศัพท์

1. Aloepicia หมายถึง ภาวะที่มีอาการผมร่วง เกิดจากทั้งจากแผลเป็นและ ไม่ได้เกิดจากแผลเป็น (7)

2. Hair keratin หมายถึง เส้นใยที่ถูกพบในชั้นนอกของเส้นผม (8)

3. Flavonoid หมายถึง สารที่เป็น secondary metabolite ของพืช มีฤทธิ์ในการปกป้องแสงแดดและการป้องกันการติดเชื้อจุลชีพ (9)

4. Antioxidant (สารต้านอนุมูลอิสระ) หมายถึง สารที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) เช่น การเกิดออกซิเดชันของลิพิด (lipids oxidation) (10)

5. สารสกัดใบฝรั่ง (Guavas leaves extract) หมายถึง การเอาชิ้นใบฝรั่งมาบดหรือปั่นให้เป็นผงละเอียดแล้วนำมาเข้ากระบวนการต้ม หรือการหมัก แล้วจึงกรองแยกเอากากออก จากนั้นนำมาระเหยตัวทำละลายออก

# บทที่ 2
# วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

## การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (informaiton) ที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างของเส้นผม

เส้นผมเป็นส่วนหนึ่งของหนังกำพร้า (epidermis) ซึ่งประกอบด้วย sulfur-rich keratin ที่สร้างมาจากเซลล์ของ hair matrix ซึ่งเส้นผมชุดแรกจะเกิดขึ้นในทารกที่อยู่ในครรภ์เรียกว่า lanugo hair มีลักษณะเป็นขนเส้นเล็กๆ มักจะไม่มีสีและไม่มี hair medulla ปกติจะหลุดไปก่อนคลอด 3-4 สัปดาห์ หลังจากนั้น เส้นผมที่เกิดขึ้นต่อมาจะมี 2 ลักษณะ คือ

2.1.1 Vellus hair เป็นขนอ่อนๆ ตามตัวและใบหน้า ไม่มี hair medulla ปกติจะไม่มีสี แต่บางครั้งก็มีสีอ่อนๆ มีความยาวไม่เกิน 2 เซนติเมตร

2.1.2 Terminal hair เป็นผมที่เส้นใหญ่ หยาบ มีความยาวกว่า vellus hair มีสีและมี hair medulla พบได้บริเวณหนังศีรษะ ขนตามรักแร้และหัวหน่าว

โดยช่วงที่เข้าสู่วัยหนุ่มสาวจะเกิด secondary sexual hair พบได้ที่บริเวณรักแร้และหัวหน่าว ซึ่งปริมาณของเส้นขนนี้ขึ้นอยู่กับฮอร์โมนเอสโตรเจนและแอนโดรเจนแต่หากพบบริเวณหนวด เครา บริเวณเหนือหัวหน่าวและแนวเส้นกลางท้อง เส้นขนเหล่านี้จะขึ้นกับฤทธิ์ของฮอร์โมนแอนโดรเจนเท่านั้น (11)

2.2 วงจรการงอกของเส้นผม

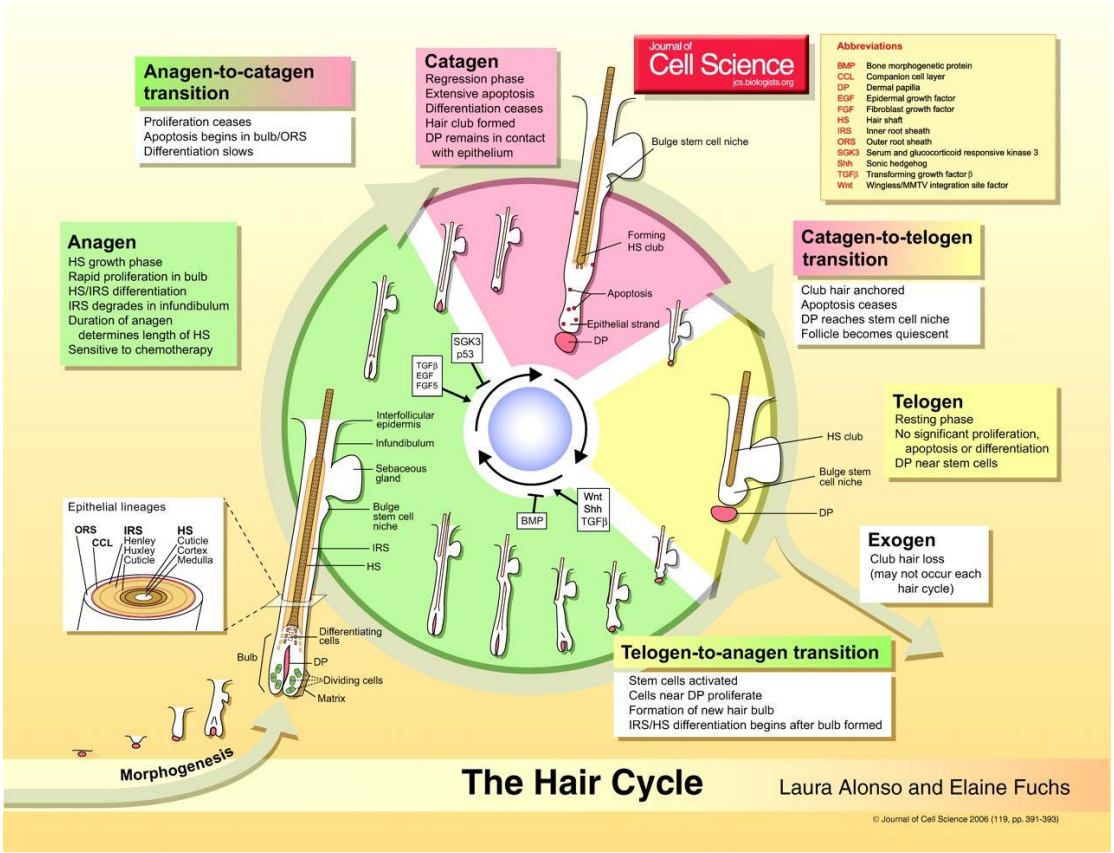
วงจรการงอกของเส้นผม (hair growth cycle) (12)

แบ่งเป็น 3 ระยะ คือ anagen phase (growing phase), catagen phase (transitional phase) และ telogen phase (resting phase) ดังแสดงในรูปที่ 1

2.2.1 Anagen phase (ระยะเจริญเติบโต) เป็นระยะที่ต่อมผมอยู่ลึกในชั้นเดอร์มิสมีสีเข้ม มีเลือดมาหล่อเลี้ยงจำนวนมาก ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 1,000 วัน หรือ 3 ปี ซึ่งเป็นผมส่วนใหญ่ (85-90%) บนหนังศีรษะ

2.2.2 Catagen phase (ระยะที่มีการเปลี่ยนแปลง) เป็นระยะที่ต่อมผมจะเลื่อนสูงขึ้นและสีเริ่มจางลง มีการแยกตัวออกจากเส้นเลือดที่มาหล่อเลี้ยง ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 10 วัน หรือ 2-3 สัปดาห์ พบเส้นผมในระยะนี้จำนวนน้อยมาก

2.2.3. Telogen phase (ระยะหยุดเจริญเติบโต) เป็นระยะที่ต่อมผมจะเลื่อนตัวขึ้นอยู่ต่ำกว่าช่องเปิดต่อมไขมันเพียงเล็กน้อยโดยมีลักษณะเป็น club hair และจะถูกเส้นผมระยะ anagen ที่เกิดใหม่ มาแทนที่และดันให้หลุดร่วงไป ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 100 วันหรือ 3 เดือน




รูปที่ 1 แสดงวงจรการงอกของเส้นผม (hair growth cycle) (13)

2.3 ผมร่วง

ผมร่วง (alopecia) เป็นอาการที่ผมร่วงที่เกิดขึ้นจากการมีบาดแผลหรือไม่มีบาดแผลบริเวณหนังศีรษะก็ได้และสามารถเกิดได้เป็นบริเวณกว้างหรือเกิดเฉพาะที่ ซึ่งอาการผมร่วงนี้มีทั้งแบบที่สามารถรักษาให้กลับมาเป็นปกติและเป็นอาการแบบถาวร

2.3.1 สาเหตุของการเกิดผมร่วงแบ่งออกเป็น 8 ประเภทดังนี้ (7)

1. Androgenic alopecia เป็นสาเหตุที่พบบ่อยสุดเนื่องจากการมีฮอร์โมนแอนโดรเจนมากกว่าปกติโดยจะเริ่มผมร่วงจากบริเวณหน้าผาก (frontoparietal scalp) จนถึงกลางกระหม่อม

2. Alopecia areata เป็นสาเหตุที่พบรองลงมาจาก androgenic alopecia ซึ่งสาเหตุการเกิดไม่แน่ชัด มีอาการผมร่วงเป็นหย่อมๆ
3. Telogen effuvium (ผมบาง) เกิดจากเหตุการณ์บางอย่างที่ทำให้ระยะ Telogen ของ วงจรเส้นผมถูกกระตุ้นให้หลุดร่วงเร็วกว่าปกติเช่น การผ่าตัด ความเครียด ยา เป็นต้น โดยจะเกิดผมร่วงหลังจากเกิดเหตุการณ์เหล่านี้ประมาณ 3 เดือน
4. Anogen effluvium เกิดจากสารเคมีที่ได้รับ โดยสารเคมีจะไปรบกวนการเจริญเติบโตของเส้นผม
5. Traction alopecia อาการผมร่วงที่เกิดจากการสัมผัสกับเส้นผมโดยตรง เช่น การถักเปีย การใช้ที่ม้วนผมแบบร้อน ซึ่งพบมากในคนผิวดำ สามารถพัฒนาและทำให้เกิด scarring alopecia ได้
6. Cicatricial alopecia (scarring alopecia) การเกิดแผลเป็นโดยการทำลายรากผม
7. Tinea capitis เกิดอาการผมร่วงจากการติดเชื้อรา
8. Alopecia neoplastica เกิดผมร่วงจาก tumors

2.3.2 การรักษาผมร่วง

1. Standard treatment

- Topical corticosteroid: ควรพิจารณาใช้ยาในกลุ่ม moderate strength ขึ้นไป วันละ 1-2 ครั้ง

- Topical minoxidil 3-5 %: ทาวันละ 2 ครั้ง อาจใช้เพียงตัวเดียวหรือใช้ร่วมกับ topical steroid หรือ anthralin Immunostimulator มักใช้ในรายที่ผมร่วงเกิน 50% ของหนังศีรษะหรือ alopecia totalis

- Immunostimulator

Topical irritant ที่ใช้กันมากคือ anthralin โดยทำให้เกิดการระคายเคืองของหนังศีรษะ ซึ่งจะมีผล ทำให้ผมขึ้นใหม่ได้ ใช้ยาขนาดความเข้มข้น 0.5- 1% ทาทิ้งไว้นาน 10 – 60 นาทีทุกวัน เริ่มจากระยะเวลาสั้นๆก่อนเพื่อให้หนังศีรษะเกิดอักเสบเล็กน้อย หากหนังศีรษะไม่แสดงปฏิกิริยาการอักเสบก็เพิ่มระยะเวลาให้ยาวขึ้น ถ้าอักเสบมากเกินไปก็ลดระยะเวลาทายาลง หลังจากนั้นให้สระผมด้วยแชมพูอ่อนๆ เพื่อล้างยาออก พบว่าผมมักขึ้นภายใน 3 เดือน

Topical immunogens หลักการคือทำให้ผู้ป่วยแพ้สาร immunogens ก่อน (sensitization) แล้วจึงนำ immunogen นี้ไปทาที่บริเวณหนังศีรษะ กระตุ้นให้

เกิด allergic contact dermatitis ซึ่งจะกระตุ้นให้ผมขึ้นได้ โดย immunogens ที่ใช้บ่อย ได้แก่ Diphenylcyclopropenone (DCP), Squaric acid dibutylester (SADBA) และ Dinitro-chlorobenzene (DNCB) เริ่มจากกระตุ้นให้ผู้ป่วยแพ้ immunogen โดยใช้ยาความเข้มข้นสูง เช่น 2% DCP in acetone ทาหนังศีรษะขนาดประมาณ 5 x 5 เซนติเมตร หลังทาประมาณ 2 วันผู้ป่วยจะเกิดผื่นอักเสบแบบ eczema ขึ้น เมื่อผื่น eczema หายไป แล้วจึงทายาขนาดความเข้มข้นต่ำ เช่น 0.001% DCP in acetone ที่ข้างหนึ่งของหนังศีรษะก่อนทาสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยจำเป็นต้องเพิ่มขนาดยาขึ้นเรื่อยๆ เพื่อกระตุ้นให้หนังศีรษะเกิด mild eczematous reaction ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยรู้สึกคันเป็นผื่นแดงหรือลอกเล็กน้อย อาจพบต่อมน้ำเหลืองหลังหูโตได้จึงจำเป็นต้องอธิบายให้ผู้ป่วยเข้าใจว่าจะเกิดเหตุการณ์นี้ขึ้น โดยผมมักขึ้นเองภายใน 8 – 12 สัปดาห์ หลังจากนั้นจึงรักษาอีกข้างหนึ่งของศีรษะ

2. Alternative treatment

พิจารณาใช้ในรายที่มีอาการรุนแรงหรือรักษาแบบมาตรฐาน แล้วไม่ได้ผลหรือในรายที่มีข้อจำกัดในการใช้ยามาตรฐาน ทำให้ใช้ยามาตรฐานในการรักษาเป็นตัวแรกไม่ได้ เนื่องจากการรักษาด้วยวิธีนี้มีผลข้างเคียงสูง ดังนั้นการใช้ยานี้ควรอยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์ผู้เชี่ยวชาญเท่านั้น (14)

- Systemic Corticosteroid ใช้ในรายที่ผมร่วงเกิน 50% ของหนังศีรษะขึ้นไปหรือ alopecia totalis เป็นส่วนใหญ่ จะใช้ยาขนาด 1 mg/kg/day เมื่อผมขึ้นแล้วปรับลดขนาดยาลง หากลดขนาดยาลงแล้วผมร่วงมากขึ้นควรพิจารณาใช้ยาอื่นทดแทน เพราะการใช้ systemic corticosteroid เป็นเวลานานมีผลเสียมากกว่าผลดีที่ได้รับ

- Psoralen plus ultraviolet light (PUVA) ส่วนใหญ่ใช้ในรายที่ผมร่วงเกิน 50% ของหนังศีรษะขึ้นไปหรือ alopecia totalis โดยให้ผู้ป่วยรับประทานยา psoralen ขนาด (0.6 mg/kg) แล้วฉายแสง UVA บริเวณผมร่วงทำสัปดาห์ละ 2-3 ครั้งจนผมขึ้น

3. การรักษาทางเลือกอื่นๆ

เลือกใช้ในรายซึ่งรักษาด้วยวิธีอื่นๆ แล้วไม่ได้ผล การรักษานี้ควรอยู่ภายใต้การดูแลของแพทย์ผู้ชำนาญเท่านั้น

- Immunomodulator เช่น inosiplex, cyclosporin และazathioprine มีรายงานว่าทำให้ผมขึ้นได้ แต่เนื่องจากรายงานผลการใช้งานยังมีน้อยจึงควรพิจารณาให้ดีก่อนใช้ในการรักษา

2.4 ผมหงอก (14)

ผมหงอกเป็นปัญหาสุขภาพที่มีผลเสียต่อสุขภาพจิตและบุคลิกภาพของคนโดยส่วนใหญ่และทำให้เป็นปัญหาใหญ่ในสังคมปัจจุบัน

2.4.1 สาเหตุของการเกิดผมหงอก

1. พันธุกรรม
2. อายุที่เพิ่มขึ้น
3. การลดลงของจำนวนเมลาโนไซต์ (melanocytes) เมลาโนไซต์เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin) สำหรับทำให้ผมดกดำ
4. การขาดเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase enzyme) โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสจะเปลี่ยนสารตั้งต้นไทโรซิน (tyrosine) ให้เป็นเมลานินที่รากผม
5. การมีความเครียด (oxidative stress) ส่งผลให้ร่างกายสร้างสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณมาก ทำให้เซลล์เมลาโนไซต์ลดจำนวนลงและตายอย่างรวดเร็ว

2.4.2 การรักษาผมหงอก

ในปัจจุบันยังไม่มียารักษาอาการผมหงอกมีเพียงการใช้ยาย้อมผมเพื่อปกปิดผมขาวชั่วคราว ส่วนผสมในยาย้อมผมส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายได้เช่น การระคายเคืองต่อตา จมูกและผิวหนังบริเวณที่สัมผัส ทำให้ผิวหนังและเส้นผมแห้ง หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์และเกิดมะเร็งได้

ปัจจุบันจึงมีการนำสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่เป็นภูมิปัญญาพื้นบ้านมาใช้ประโยชน์ในการรักษาอาการผมร่วงและผมหงอกมากเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากมีความปลอดภัย ราคาไม่แพง สามารถหาในท้องถิ่นได้ง่ายและลดการใช้ยาที่เป็นสารเคมี ตัวอย่างสมุนไพรที่นำมาใช้ เช่น มะกรูด, ว่านหางจระเข้, ดอกอัญชัน, ทองพันชั่ง เป็นต้น (5)

2.5 Antioxidant

สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระได้ สารเหล่านี้มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบเช่น ดัก

จับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ หรือเข้าจับ (chelate) กับโลหะเพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระมีมากในพืชผักและผลไม้บางชนิด จึงได้มีการสนับสนุนให้รับประทานสิ่งเหล่านี้เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากสารเคอร์ซีติน (quercetin) ต้านอนุมูลอิสระมีบทบาทที่สำคัญในการป้องกันการเกิดโรคและชะลอการเสื่อมสภาพของร่างกายจึงทำให้นักวิจัยค้นหาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในรูปของสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์จากพืชแทนการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

2.6 ความสัมพันธ์ของสารต้านอนุมูลอิสระกับเส้นผม

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น สาเหตุหลัก ของผมหงอกและผมร่วงเกิดจากสารออกซิเดชันและสารเมลานินที่ลดลง แหล่งที่พบสารทั้งสองชนิดนี้คือผลไม้ซึ่งผลไม้ต่างๆที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถช่วยในการป้องกันการสลายตัวของโปรตีนในเส้นผมได้ โดยเส้นผมของมนุษย์เรามี keratin ประมาณ 80% และในเส้นผมยังมี tryptophan ซึ่งเป็น amino acid ซึ่งสามารถสลายได้ง่ายด้วยแสงแดดโดยเฉพาะ UVB นอกจากนี้แสงแดดยังไปทำลาย disulfide bonds ของโปรตีนในเส้นผมและ สารต้านอนุมูลอิสระ ยังช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่เส้นผม ด้วยเนื่องจากโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระมีความชื้นสูง และเส้นผมยังมีไขมันเป็นองค์ประกอบประมาณ 1.9-5 % ที่มีความสำคัญในการส่งออกสารต่างๆเข้าออกเซลล์ โดยสารต้านอนุมูลอิสระ มีผลในการเพิ่ม lipid peroxidation และทำให้ผิวของเส้นผมดูเรียบยิ่งขึ้นเมื่อทำการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์ scanning electron microscope (SEM) อีกทั้งยังเพิ่มความเปล่งปลั่งให้กับเส้นผมที่ผ่านกระบวนการย้อมสี (6)

2.7 ข้อมูลพืชสมุนไพรที่นำมาใช้ในการทดลอง

ฝรั่ง (Guava) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Psidium guajava* L. เป็นผลไม้ในวงศ์ Myrtaceae มีชื่อท้องถิ่นว่า เปียวออย (เมี่ยน) ลักกาโพ (กะเหรี่ยงเชียงใหม่) และจ๊กเทาะ (ม้ง)

รูปที่ 2 แสดงลักษณะของใบและลูกฝรั่ง (15)

2.7.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลักษณะของต้นเป็นไม้พุ่ม สูงประมาณ 3-5 เมตร ใบเดี่ยว ใบหนาและแข็ง ใบออกเป็นแบบตรงข้าม (opposite) รูปใบรี ปลายใบและโคนใบมน หลังใบมีขนอ่อนนุ่ม ท้องใบหยาบ เส้นใบรูปร่างแหอย่างชัดเจน ผิวใบมีสีเขียวอมเทา เปลือกต้นเรียบ ยอดอ่อนมีขนอ่อนสั้นๆ ดอกออก เป็นช่อบริเวณส่วนยอดของกิ่งก้าน ช่อละ 2-3 ดอก ดอกมีสีขาว มีเกสรตัวผู้จำนวนมากและมีกลิ่นหอม ผลกลมโต ผลดิบมีสีเขียวเมื่อสุกจะมีสีเขียวปนเหลือง

2.7.2 สรรพคุณที่นำมาใช้ทางพื้นบ้าน (16)

- ใบสด ฉีกแล้วแช่ในน้ำเปล่าดื่มแก้อาหารท้องร่วง
- ผลแก่สามารถทำเป็นสมุนไพรช่วยระงับกลิ่นปาก แต่งกลิ่นอาหารได้
- ใช้เป็นยาห้ามเลือด โดยจะใช้ใบสดล้างน้ำให้สะอาด ตำให้ละเอียดพอกแผลที่มีเลือดออก
- ช่วยระงับกลิ่นปาก ใช้ใบสด 3-5 ใบ เคี้ยวและคายกากออกทิ้ง
- เป็นยากันหรือแก้โรคลักปิดลักเปิดเพราะผลของฝรั่งเป็นแหล่งของวิตามินซี

2.7.3 สาระสำคัญในใบฝรั่ง (17)

สารที่พบในใบฝรั่ง ได้แก่ quercetin และ quercetin-3-arabinoside ออกฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ quercetin 3-*O*-β-L-arabinoside (guajavarin), quercetin 3-*O*-β-D-glucoside (isoquercetin), quercetin 3-*O*-β-D-galactoside (hyperin), quercetin 3-*O*-β-L-rhamnoside (quercitrin) และ quercetin 3-*O*-β-gentiobioside นอกจากนี้ ในผลพบ tannin ซึ่งมีฤทธิ์ฝาดสมานใช้แก้อาการท้องเสีย

2.7.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

1. ฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้ แก้ท้องเสีย

จากการวิจัยพบว่าการให้ยาเม็ดแคปซูลใบฝรั่งครั้งละ 500 มิลลิกรัม ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน กับผู้ป่วยที่เป็นโรคอุจจาระร่วง 122 คน สามารถลดจำนวนครั้งของการถ่ายอุจจาระ ระยะเวลาที่ถ่ายอุจจาระ และจำนวนน้ำเกลือที่ให้ทดแทนได้ (18) การให้ยาเม็ดแคปซูลฝรั่งขนาด 500 มิลลิกรัม (ที่มีสารฟลาโวนอยด์ 1 มิลลิกรัม/แคปซูล 500 มิลลิกรัม) ทุก 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วันในผู้ป่วยที่มีอาการท้องเสีย ปวดท้อง จำนวน 50 คน จะสามารถลดการบีบตัวของลำไส้และลดระยะเวลาปวดท้องได้ (19) การให้ยาต้มของฝรั่งในผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคลำไส้อักเสบจากเชื้อไวรัส (*Rota virus*) 62 คน ทำ

ให้อาการดีขึ้นภายใน 3 วัน ระยะเวลาท้องเสียสั้นลง และไม่พบเชื้อ *Rota virus* ในอุจจาระมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (20)

สารสกัดใบฝรั่งด้วยคลอโรฟอร์ม เฮกเซน เมทานอล และน้ำ สามารถลดการเคลื่อนไหว และการหดเกร็งของลำไส้เล็กของหนูตะเภาและหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการเคลื่อนไหวมากขึ้นด้วยอะเซทิลโคลีน (21,22) สารสกัดใบฝรั่งด้วยเอทานอล ร้อยละ 50 สามารถยับยั้งการหดตัวของลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้หดตัวด้วยกระแสไฟฟ้า อะเซทิลโคลีน และแบเรียมคลอไรด์ได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถยับยั้งอาการท้องเสียในหนูเม้าส์ที่ถูกชักนำให้เกิดอาการท้องเสียด้วยน้ำมันละหุ่ง โดยฝรั่งจะไปเพิ่มการดูดซึมน้ำในลำไส้และลดการบีบตัวของลำไส้ (23) สารสกัดด้วยน้ำของใบฝรั่งสดสามารถยับยั้งอาการท้องเสียได้ โดยลดจำนวนครั้งของการอุจจาระในหนูซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอาการท้องเสียด้วยยา microlax ได้ (24)

ส่วนสกัดของสารกลุ่ม polyphenolic, saponin และ alkaloid จากใบฝรั่ง สามารถยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้เล็กของหนูตะเภาที่เหนี่ยวนำให้หดเกร็งด้วยอะเซทิลโคลีนและโปตัสเซียมคลอไรด์ได้ (25) สาร quercetin และ quercetin-3-arabinoside จากใบฝรั่ง สามารถต้านการหดตัวของลำไส้เล็กที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอะเซทิลโคลีน ทำให้ลำไส้มีการเคลื่อนไหวน้อยลง (26) นอกจากนี้สาร quercetin ในใบฝรั่งยังสามารถยับยั้งการหดเกร็งของลำไส้เล็กในหนูแรทและหนูตะเภาซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดอาการหดเกร็งด้วยสารละลายโปตัสเซียม อะเซทิลโคลีน แบเรียมคลอไรด์ ฮีสตามีน และซีโรโทนินได้ (27,28) และสามารถลดความสามารถในการซึมผ่านของๆ เหลวของหลอดเลือดฝอยบริเวณท้องซึ่งมีผลช่วยรักษาอาการท้องเสีย (29) สาร quercetin 3-*O*-β-L-arabinoside (guajavarin), quercetin 3-*O*-β-D-glucoside (isoquercetin), quercetin 3-*O*-β-D-galactoside (hyperin), quercetin 3-*O*-β-L-rhamnoside (quercitrin) และ quercetin 3-*O*-gentiobioside จากใบฝรั่ง สามารถลดการหดเกร็งของลำไส้เล็กหนูเม้าส์ได้ (30) สาร asiatic acid จากใบฝรั่งมีผลทำให้กล้ามเนื้อลำไส้เล็กส่วนปลายของกระต่ายคลายตัว (31) สารสกัดผลฝรั่งดิบด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านการหลั่งอะเซทิลโคลีนในลำไส้เล็กของหนูแรทและหนูตะเภาได้ แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าอะโทรปีน โดยฝรั่งมีผลทำให้ลำไส้

มีการเคลื่อนไหวน้อยลง ทำให้รักษาอาการท้องเสียได้ (32) สารสกัดฝรั่ง (ไม่ระบุส่วน) สามารถลดการบีบตัวของลำไส้เล็กของหนูแรทได้ (33)

2. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

สารสกัดเปลือกต้นและใบฝรั่งด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอุจจาระร่วง คือ *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus* แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* ในจานเลี้ยงเชื้อ (34) สารสกัดใบฝรั่งด้วยเอทานอลร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Shigella dysenteriae*, *Sh. Flexneri*, *E. coli* และ *S. typhimurium* ในจานเลี้ยงเชื้อได้ แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *Salmonella enteritidis* (35) สารสกัดด้วยทิงเจอร์ร้อยละ 10 ของฝรั่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *V. cholerae* ที่เป็นสาเหตุของอหิวาตกโรคในจานเลี้ยงเชื้อได้ผลปานกลาง (36) สารสกัดใบฝรั่งด้วยเมทานอลสามารถต้านเชื้อ *E. coli* (37) , *Sh. flexneri*, *Sh. virchow* และ *Sh. dysenteriae* (38) ในจานเลี้ยงเชื้อได้ นอกจากนี้สารสกัดใบฝรั่งด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ความเข้มข้น 1มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus faecalis* ในจานเลี้ยงเชื้อได้ แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *E. coli* และ *S. typhimurium* (39)

สารสกัดใบฝรั่งด้วยน้ำสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Sh. dysenteriae* (40,36), *V. cholerae*, *S. typhi* (36) และ *E. coli* (41) ในจานเลี้ยงเชื้อได้ นอกจากนี้สารสกัดใบฝรั่งด้วยน้ำร้อนยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย Vibrio 23 สายพันธุ์ ที่แยกจากกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นโรคได้ (42) สารสกัดด้วยน้ำและเอทานอลจากใบฝรั่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* 6 สายพันธุ์จากการศึกษาในจานเลี้ยงเชื้อ โดยสารสกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอล (43) สารสกัดผลดิบของฝรั่งด้วยเมทานอลสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *Sh. dysenteriae*, *Sh. dysenteriae*, *Sh. dysenteriae*, *Sh. dysenteriae* และ *V. cholerae* ในจานเลี้ยงเชื้อได้ (32)

น้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* แต่ไม่มีผลต่อเชื้อ *Bacillus subtilis*, *E. coli*, และ *S. typhimurium* ใน

จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (44) ซึ่งพบว่าสาร morin 3-O-lyxoside และสาร morin 3-O-arabinoside จากใบฝรั่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. enteritidis* และ *Bacillus cereus* ดีกว่าสาร guaijaverin และ quercetin (45)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดใบฝรั่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสิว 3 ชนิด ได้แก่ *Propionibacterium acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ในจานเลี้ยงเชื้อ (46)

3.ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

จากการศึกษาทางคลินิกในผู้ป่วย 70 คน ที่มีเหงือกอักเสบ พบว่าน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากใบฝรั่งสามารถลดการอักเสบได้ร้อยละ 19.8 และลดรอยโรคที่ความรุนแรง ได้ร้อยละ 40 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปากที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัดจากใบฝรั่งหลังจากใช้เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (47)

สารสกัดใบฝรั่งด้วยน้ำขนาด 50-800 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เมื่อฉีดเข้าช่องท้องพบว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันเมื่อทดสอบกับอุ้งเท้าหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยไข่ขาวสด (48) นอกจากนี้เมื่อฉีดน้ำมันหอมระเหยจากใบฝรั่งเข้าทางช่องท้องของหนูแรทในขนาด 0.8 มิลลิลิตร/กิโลกรัม พบว่าสามารถยับยั้งการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร carrageenan ได้ (49)

สารสกัดจากผลฝรั่งด้วยเมทานอลเมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูแรท พบว่าสามารถยับยั้งการอักเสบของอุ้งเท้าหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบด้วยสาร carrageenan, kaolin และ formaldehyde ได้ นอกจากนี้สารสกัดผลฝรั่งด้วยเมทานอลเมื่อฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูเม้าส์จะสามารถยับยั้งการอักเสบและลดอาการเจ็บปวดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย acetic acid ได้ดีกว่าแอสไพรินที่ให้ในขนาดเท่ากันเล็กน้อย (50)

เมื่อนำใบฝรั่งมาหมักกับราและแบคทีเรียได้แก่ *Phellinus linteus* (ส่วนเส้นใย) *Lactobacillus plantarum* และ *Saccharomyces cerevisiae* แล้วนำมาสกัดด้วยเอทานอล พบว่าสารสกัดที่ได้มีฤทธิ์ต้านการอักเสบโดยยับยั้งการสร้างสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบคือ ไนตริกออกไซด์และ prostaglandin E2 (51) ในหลอดทดลอง นอกจากนี้สารสกัดฝรั่งด้วยเอทานอลและน้ำยังออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไนตริกออกไซด์ (51)

สารสกัดใบฝรั่งด้วยเอทิลอะซีเตตมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ และแก้แพ้ โดยยับยั้งการตอบสนองต่อแอนติเจนที่ชักนำให้เกิดการแพ้และการอักเสบ (52)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ Fang Wang Y-HC และคณะ ในการสกัดส่วนต่างๆของฝรั่งเช่น ผล ใบ เมล็ด พบว่าได้สารที่มีฤทธิ์ Bioactivities มากมาย เช่น Antioxidant, Antibacterial, anti-diarrhoeal เป็นต้น โดยในส่วนของใบฝรั่งจะประกอบด้วยสารหลักสำคัญคือเคอร์ซีติน (quercetin) และพบสารแทนนิน (tannins) เป็นองค์ประกอบด้วย มีฤทธิ์ในด้านการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งพบว่าในใบของฝรั่งนั้น มีสารต้านอนุมูลอิสระ มากกว่าส่วนที่เป็นผลและเมล็ด (53) และใบฝรั่งยังเต็มไปด้วยวิตามินหลากหลายชนิด เช่น vitamin B2, B6, C และ A

จากงานวิจัยของ Francesco D'Agostini และคณะในประเทศอิตาลี ได้นำหนูมาทดลองโดยการฉีดยา chemotherapy agent มีชื่อว่า doxorubicin ซึ่งเป็นยารักษาโรคมะเร็ง ที่มีผลข้างเคียงทำให้เกิดผมร่วงได้รุนแรง และผู้วิจัยได้ใช้ L-cysteine, amino acid และ vitamin B6 โดยปรับขนาดที่แตกต่างกันให้หนูแต่ละตัว พบว่าหนูที่ได้รับ L-cysteine และ vitamin B6 ขนาดสูงมีการงอกของขนมากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ vitamin B6 ในการช่วยในการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในการช่วยฟื้นฟูร่างกายและเส้นผม (54)

จากงานวิจัยของ Jun-Bo Simและคณะ ได้มีการศึกษาการใช้ผลิตภัณฑ์สารสกัดจากธรรมชาติ ป้องกันผมร่วงในที่เป็น alopecia ซึ่งมีการศึกษาในคนที่มีอายุอยู่ระหว่าง 20-60 ปี ซึ่ง สารสกัดจากธรรมชาติประกอบไปด้วยสารสกัดหลายชนิดโดยเฉพาะใบฝรั่ง และให้อาสาสมัครใช้เป็นเวลา 60 วันแล้วพบว่า ใช้แล้วสามารถป้องกันผมร่วงได้ถึง 82.67 % และอาสาสมัครมีความพึงพอใจ (55)

จากงานวิจัยของ Sushmita Choudhury และ M.P. Sinha เป็นงานวิจัยที่ศึกษาระดับของฮอร์โมน testosterone และ serum lipid profile ใน Albino Rats ที่ได้รับ *Psidium guajava* aqueous extract (สารสกัดใบฝรั่ง) ทำการทดลองโดยแบ่ง Albino Rats เป็น 3 กลุ่ม กลุ่ม 1 (baseline)ได้รับ 1mL distilled water orally กลุ่มที่ 2 ได้รับสารสกัดใบฝรั่ง 250 mg/kg orally กลุ่มที่ 3 ได้รับสารสกัดใบฝรั่ง 500 mg/kg orally พบว่า กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 เมื่อทำการเจาะตรวจค่า total cholesterol พบว่า กลุ่มทดลองที่ 2 และกลุ่มทดลองที่3 สามารถลด total cholesterol ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ baseline และเมื่อทำการเจาะตรวจค่า testosterone พบว่า testosterone มีค่าลดลงจาก baseline

โดยกลุ่มที่3 ที่ได้รับสารสกัดใบฝรั่ง 500 mg/kg สามารถลดระดับ testosterone ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ baseline ซึ่ง ฮอร์โมน testosterone เป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดผมร่วงได้ (56)

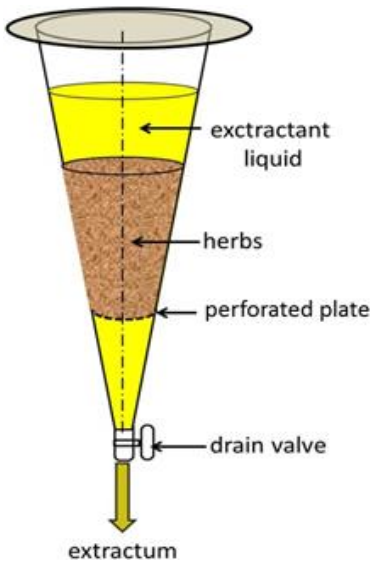
2.9 วิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชหรือสมุนไพรในปัจจุบัน (57)

1. Maceration

เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิดสนิทแล้วทิ้งไว้ 3 วัน เขย่าหรือคนบ่อยๆ เมื่อครบกำหนดเวลา จึงบีบเอาสารละลายออกมาจากกากให้มากที่สุดแล้วนำสารละลายที่ได้ไปกรอง

2. Percolation

เป็นวิธีสกัดสารสำคัญโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Percolator โดยนำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้นแล้วตั้งทิ้งไว้ จากนั้นค่อยๆ บรรจุผงยาทีละน้อยเป็นชั้นลงใน Percolator แล้วทำการเติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพรเล็กน้อย ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มไขสารสกัดออกโดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรไว้อย่าให้แห้ง จากนั้นทำการเก็บสารสกัดและบีบกากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำเอาสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันแล้วนำไปกรอง



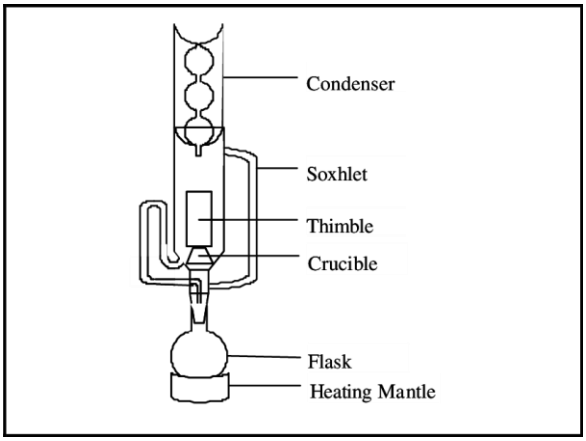

รูปที่ 3 แสดงองค์ประกอบ Percolation (58)

3. Decoction

เป็นวิธีการสกัดสารโดยการต้มสารสกัดในน้ำแล้วที่ให้เย็น จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปกรองซึ่งในกระบวนการนี้สารสกัดจะต้องละลายในน้ำและทนความร้อน

4. Soxhlet extractor

เป็นวิธีการสกัดสารโดยใช้ Soxhlet extractor ซึ่งจะทำการสกัดอย่างต่อเนื่องจากการใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายใน flask ระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ จนกระทั่งสารละลายสูงถึง siphon tube แล้วสารสกัดที่ได้จะไหลกลับเข้าไปใน flask อีกครั้ง ตัวทำละลายจะระเหยขึ้นไปเพื่อสกัดสมุนไพรซ้ำ




รูปที่ 4 แสดงองค์ประกอบเครื่องมือ Soxhlet Extractor (59)

จากการสืบค้นวิธีการสกัดสารจากใบฝรั่งจึงได้พบงานวิจัยที่ทำการสกัดสารเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ ดังนี้

M.R.V. Fernandesa และคณะ ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดใบฝรั่ง เริ่มจากนำใบฝรั่งไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 45°C แล้วนำไปบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปหมักด้วยวิธี maceration โดยใช้อัตราส่วนสารละลายเป็น ethanol : water 70% ที่อุณหภูมิ 50°C และใช้อัตราส่วนพืชต่อสารละลายเป็น 1:10 (w/v) นำสารสกัดที่ได้ไปกรองและระเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaorator ที่อุณหภูมิ 50°C ภายใต้ความดัน 650 mmHg จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay เมื่อดูค่าจาก $IC_{50}$ และ %inhibition พบว่าเท่ากับ 3.34 และ88.48 ตามลำดับ ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ กับเชื้อ *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* โดยเทียบกับการใช้ยา Fluconazole และ Chloramphenicol เพื่อดูค่า $MIC_{50}$ พบว่าสารสกัดจากใบฝรั่งมีฤทธิ์ antimicrobial สำหรับเชื้อ *C. glabrata*, *S. aureus* (60)

Jongkwon Seo, Soojung Lee และคณะ ทำการหาตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารจากใบฝรั่งที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุด โดยเปรียบเทียบ น้ำ, hydroethanolic ในแต่ละสัดส่วน 70:30, 50:50, 30:70, and 10:90 (v/v) ซึ่งเตรียมสารสกัดโดย การต้มใบฝรั่งสดในน้ำ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงแล้วจากนั้นนำไปกรองและระเหยด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60 °C จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง freeze dry เพื่อให้ได้สารสกัดแห้ง ส่วนวิธีการหมักจะนำhydroethanolic ในแต่ละสัดส่วนไป หมักใบฝรั่งเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำไปกรองและระเหยด้วย rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 °C และนำไปเข้าเครื่อง freeze dry เพื่อให้สารสกัดแห้ง จากนั้นนำสารสกัดทั้งสองไปทดสอบหาสาร phenolic compound, flavonoid, DPPH และ ABTS ผลการทดลองพบว่าตัวทำละลาย hydroethanolic สามารถสกัดสาร phenolic compound ได้มากกว่า น้ำ 50% (61)

2.10 การทดสอบสาร Antioxidant

1.DPPH assay (62)

เป็นการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (diphenylpicryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay) เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระก็คืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH$^{\cdot}$ , diphenyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้ เครื่องสเปกโตโฟโตรมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH$^{\cdot}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลงจนเป็นสีเหลือง ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้ ข้อดีของวิธีนี้คือง่าย สะดวกและรวดเร็ว ส่วนข้อเสียคือ DPPH$^{\cdot}$ ค่อนข้างเสถียรไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริงจึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริงและต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้

2.ABTS assay (62)

เป็นการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS radical cation decolorization assay) เพื่อวัดความสามารถในการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS$^{\cdot+}$,2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid) radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น

734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ $ABTS^{\bullet+}$ ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงจึงต้องทำการเจือจาง $ABTS^{\bullet+}$ ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์จากนั้นนำ $ABTS^{\bullet+}$ ไปทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วยเอทานอลเจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลงและตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาแล้วจึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้ ข้อดีของวิธีการนี้คือ $ABTS^{\bullet+}$ ละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วและทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง ส่วนข้อเสียคือ $ABTS^{\bullet+}$ ไม่เป็นสารธรรมชาติที่พบในร่างกายหรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต

3. Antityrosinase assay (63)

เป็นการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นคือ L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ซึ่งจะถูกเอนไซม์ tyrosinase เปลี่ยนเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาลซึ่งสารละลายนี้จะดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร ถ้าสารตัวอย่างสามารถยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ได้สูง ความเข้มข้นของสารละลายสีน้ำตาลก็จะลดลง

2.11 การเลือกสารสำหรับพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม

| สาร | คุณสมบัติ |
|---|---|
| Propylene glycol (64) | ละลายใน น้ำ, ethanol, acetone และ chloroform ไม่ละลายใน fixed oils หน้าที่ในตำรับเป็นได้ทั้ง flavoring agent, plasticizers, solvents , viscosity adjustors, moisturizers |
| Glycerin(65) | ละลายใน ethanol slightly soluble ใน ethyl ether แต่ไม่ละลายใน benzene, carbon tetrachloride, chloroform, carbon disulfide, petroleum ether หน้าที่ในตำรับเป็นได้ทั้ง stabilizer, emulsifier, emollient, humectant, solvents, surfactant |
| Pantothenic Acid (vitamin B 5) (66) | ละลายได้ใน water, benzene, ethyl ether, acetic acid moderately soluble ใน ether, amyl alcohol. practically insoluble ใน benzene, chloroform หน้าที่ในตำรับเป็น skin conditioning agents, humectant |

| | |
|---|---|
| Luviquat® (Polyquaterium – 44) (67) | มีประสิทธิภาพในการปรับสภาพเส้นผม และ ทำให้ผมเงางาม |
| Polysorbate 20 (Tween 20) (68) | ละลายใน water, ethanol, methanol, ethyl acetate และ dioxane ไม่ละลายใน mineral oil และ petroleum ether หน้าที่ในตำรับ surfactant, emulsifier |
| Phenoxyethanol (69) | ละลายใน alcohol, ether, alkali, chloroform และ sodium hydroxide, water หน้าที่ในตำรับเป็น preservative, surfactant |

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติของสารที่ใช้ในพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม

# บทที่ 3
# วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 ใบฝรั่งสดพันธุ์กิมจู จากสวนฝรั่งหนองข้างคอกในอำเภอเมือง ตำบลหนองข้างคอก อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย

3.1.2 Absolute ethanol (RCI Labscan Limited)

3.1.3 Vitamin B5 (เคมีภัณฑ์)

3.1.4 Glycerin (เคมีภัณฑ์)

3.1.5 Propylene glycol (เคมีภัณฑ์)

3.1.6 Luviquat (เคมีภัณฑ์)

3.1.7 Phenoxyethanol (เคมีภัณฑ์)

3.1.8 Citric acid (เคมีภัณฑ์)

3.1.9 ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenthiazoline-6-sulphonic acid)](Sigma)

3.1.10 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)(Aldrich)

3.1.11 Trolox (6-hydroxyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)(Aldrich)

3.1.12 Tyrosinase enzyme (Sigma)

3.1.13 Vitamin C (Sigma-Aldrich)

3.1.14 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)(Aldrich)

3.1.15 Sodium phosphate buffer (Merch)

3.1.16 Potassium persulfate (Merch)

3.1.17 Kojic acid (Aldrich)

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองและอุปกรณ์

1. Evaporator (V-750, Buchi)

2. Freeze dryer (LCC-1-7382030, LABACONCO)

3. Hot air oven (100-800, Beschickung)

4. pH meter (Professional pH meter, SevenMulti$^{TM}$S40 , METTLERTOLEDO, Switzerland)

5. ตู้แช่แข็ง (-20 °C) (L5-2065N, Lucky star)

6. Sonicate (WUC-D22H, Wiseclean)

7. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (DYC-116, Laboratory equipment manufactures)

8. UV-Vis spectrophotometer (2J1-0004, Hitachi, Japan)

9. Micropipete (20µL, 200 µL, 1000 µL) (Manual Pipettes, Lite$^{TM}$XLS$^{TM}$, METTLER-TOLEDO, Switzerland)

10. Buchner funnel

11. Microplate reader (M965+, Metertech)

12. Beaker ขนาด 20, 50, 100, 250 และ 400 มิลลิลิตร (SCHOTT®, Germany)

13. Foil (DIAMOND®, China)

14. Cylinder 5 mL (SCHOTT®, Germany)

15. Cylinder 10 mL, 100mL, 1000 mL (WITEG®, Germany)

3.3 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดใบฝรั่ง

3.3.1 การเก็บตัวอย่างใบฝรั่งสด

นำใบฝรั่งที่ได้มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น คัดแยกใบแก่และใบอ่อนชั่งน้ำหนักใบฝรั่งที่ได้ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่งบันทึกน้ำหนักที่ได้ แล้วนำใบฝรั่งไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อเก็บสารสำคัญในใบฝรั่งให้คงอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ สำหรับรอการสกัดในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การสกัดด้วยวิธีการหมัก

นำใบฝรั่งทั้งใบแก่และใบอ่อนจากข้อ 3.3.1 มาทำให้แห้งโดยอบในเครื่องตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 45 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำใบฝรั่งแห้งแต่ละชนิดมาบด

ให้ละเอียด ชั่งใบฝรั่งแห้งที่ได้อย่างละ 100.00 g มาหมักด้วย 70%ethanol 800 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยเครื่อง Buchner funnel แล้วเอาสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งด้วยเครื่องevaporator ที่อุณหภูมิ 45°C แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อรอทดสอบต่อไป

3.3.3 การสกัดด้วยวิธีการต้ม

นำใบฝรั่งสดทั้งใบแก่และใบอ่อน ที่ผ่านการบดละเอียดมาอย่างละ 100.00 g จากนั้นนำไปต้มในน้ำ 1,000 mL เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วย Buchner funnel แล้วนำไปแช่แข็งในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เมื่อสารสกัดเป็นน้ำแข็งแล้วให้นำไปเข้าเครื่อง freeze dryer จนแห้ง แล้วเก็บสารสกัดที่ได้ 4°C เพื่อรอทดสอบต่อไป

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบฝรั่ง

3.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

วิธีดีพีพีเอช (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (DPPH) radical scavenging assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Jiangseubchatveera N และคณะ (26) โดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระคืออนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH$^{\cdot}$, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวละมีสีม่วง เมื่อ DPPH$^{\cdot}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันที่ละลายด้วยเอทานอล จะทำให้สีม่วงจางจนกลายเป็นสีเหลือง การเตรียมสารละลายดีพีพีเอช โดยชั่งดีพีพีเอช 6.6 mg ละลายใน absolute ethanol 100 mL ทำการทดสอบสารตัวอย่าง โดยผสมสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.3 mg/mL ปริมาณ 20 µL กับสารละลายดีพีพีเอช 180 µL ใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 nm โดยใช้โทรลอกซ์และวิตามินซีเป็นสารมาตรฐานแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการ

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

$A_{blank}$คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

$A_{sample}$คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจะแสดงเป็นค่า $IC_{50}$ คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50%

3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

วิธีเอบีทีเอส (ABTS radical cationdecolorization assay) ดัดแปลงจากวิธีของบัณฑรวรรณ และคณะ (70) โดยเตรียม ABTS ชั่ง 0.0192 g ละลายน้ำกลั่น 5 mL และชั่ง potassium persulfate 0.0042 g ละลายในน้ำกลั่น 6.25 mL จากนั้น ผสมสารละลาย ABTS มา 5 mL เข้ากับสารละลาย potassium persulfate 2.5 mL แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 16 ชั่วโมง นำสารละลาย ABTS มาละลายใน DI water วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ให้มีค่า 0.700±0.070 โดยใช้เครื่อง UV visible spectrophotometer นำสารตัวอย่างมาละลายใน ethanol ให้มีความเข้มข้น 10 mg/mL และ Trolox ความเข้มข้น (0.005-0.640 mg/mL) การทดสอบทำโดยผสมสารตัวอย่าง 20 µL กับสารละลาย 100 µL ใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร โดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐานแต่ละตัวอย่างทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการ

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

$A_{blank}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ ABTS

$A_{sample}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

และนำไป plot กราฟระหว่าง %Inhibition กับความเข้มข้นของ trolox และรายงานผลเป็นค่า trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

นำสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน kojic acid ปริมาตร 20 ไมโครลิตรมาผสมกับเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ละลายใน 20 mM sodium phosphate buffer pH 6.8 จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 500 units/mL ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และเติม 20 mM sodium phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที หลังจากนั้นเติม L-DOPA ที่ละลายใน 20 mM sodium phosphate

buffer pH 6.8 จนได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.85 mM ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มซ้ำที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm แต่ละตัวอย่างทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง สามารถคำนวณหาร้อยละในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสูตร

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

Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมที่ไม่มีสารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง หรือสารมาตรฐานที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรซิเนส

Ab คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง หรือสารมาตรฐานที่ไม่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.5 การเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม

| Formular / Ingredients | 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|
| Guava leaf extract (g) | 1 | 1 | 1 |
| Vitamin B5 (mL) | 10 | 10 | 10 |
| Glycerin (mL) | 5 | 10 | 10 |
| Propylene glycol (mL) | 5 | 20 | 40 |
| Tween 20 (mL) | - | - | 20 |
| Luviquat® (mL) | 3 | 10 | 10 |
| Phenoxyethanol (mL) | 1 | 1 | 1 |
| Water qs to (mL) | 100 | 100 | 100 |

ตารางที่ 2 แสดงการเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม

วิธีการทดลองเตรียมตำรับที่ 50 mL

เตรียมสารใน Phase A, Phase B และ Phase C

1.Phase A - ชั่งสารสกัดใบฝรั่ง 0.5 g มาละลายด้วยน้ำ 10 mL

2.Phase B - ตวง vitamin B5 5 mL

3.Phase C - นำ glycerin 2.5 ml มาผสมกับ propylene glycol 2.5 mL (เติม Tween20 10 mL เพิ่มในตำรับที่ 3) ตามด้วย Luviquat® 1.5 mL โดยใช้ Stirring rod คนให้เข้ากัน

ขั้นตอนการผสม

เติม Phase B ลงใน Phase A โดยใช้ Stirring rod คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปผสมลงใน Phase C แล้วแล้วเติม Phenoxyethanol 0.5 mL ลงไปในตำรับแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำจนได้ 50 mL

3.6 การศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับ

ศึกษาสี กลิ่น การแยกตัวและ pH ของตำรับ จากนั้นเลือกตำรับที่ดีที่สุด นำมาศึกษาความคงตัวในสภาวะต่างๆที่ อุณหภูมิ 4°C, อุณหภูมิห้อง และ 45 °C เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาศึกษาคุณลักษณะเบื้องต้นเปรียบเทียบกับตำรับที่เตรียมได้ครั้งแรก

# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

4.1 ปริมาณของสารสกัด

| วิธีการสกัด | สารสกัด | น้ำหนัก(g) | % Yield | ลักษณะสารสกัดที่ได้ |
|---|---|---|---|---|
| วิธีการต้ม | สารสกัดน้ำใบอ่อน (YF) | 5.03 | 5.03 | เป็นเกล็ดเล็กๆ สีน้ำตาลอ่อน |
| | สารสกัดน้ำใบแก่ (OF) | 8.03 | 8.03 | เป็นเกล็ดเล็กๆ สีน้ำตาลอ่อน |
| วิธีการหมักด้วย 70% ethanol | สารสกัดเอทานอลใบอ่อน (YE) | 13.84 | 14.01 | มีลักษณะเหนียว สีน้ำตาลเข้ม |
| | สารสกัดเอทานอลใบแก่ (OE) | 17.81 | 17.79 | เป็นเกล็ดแห้งๆ แข็ง สีน้ำตาลเข้ม |

ตารางที่ 3 แสดงร้อยละของสารสกัดด้วยวิธีต่างๆของใบฝรั่งอ่อนและแก่

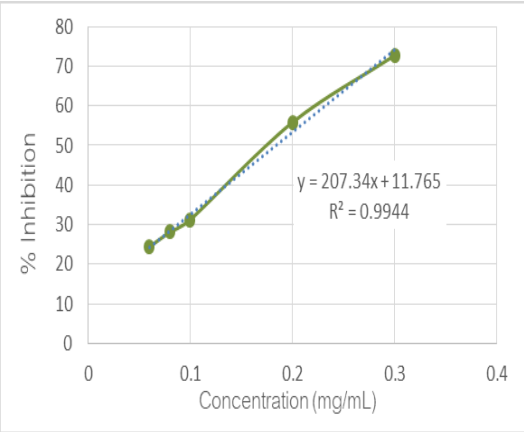
4.2 การทดสอบสาร Antioxidant ด้วยวิธี DPPH

| Sample | Concentration (mg/mL) | Final concentration (mg/mL) | %Inhibition | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| YE | 1 | 0.06 | 24.38 | 23.11 | 19.46 |
| | | 0.08 | 28.12 | 26.76 | 24.60 |
| | | 0.1 | 31.26 | 32.90 | 30.95 |
| | | 0.2 | 55.81 | 54.91 | 51.51 |
| | | 0.3 | 72.69 | 73.54 | 71.34 |
| | | 0.4 | 84.34 | 85.42 | 83.47 |
| | | 0.5 | 90.23 | 90.11 | 88.31 |
| | | 0.6 | 90.88 | 90.87 | 90.89 |
| | | | | | |
| OE | 1 | 0.06 | 15.43 | 17.31 | 14.65 |
| | | 0.08 | 16.97 | 17.24 | 18.33 |
| | | 0.1 | 24.11 | 25.70 | 26.41 |
| | | 0.2 | 44.67 | 44.50 | 43.57 |
| | | 0.3 | 65.98 | 64.95 | 64.65 |
| | | 0.4 | 78.36 | 77.34 | 77.47 |
| | | 0.5 | 84.10 | 85.51 | 86.37 |
| | | 0.6 | 88.30 | 89.44 | 89.87 |
| | | | | | |
| YF | 1 | 0.06 | 28.38 | 29.55 | 29.85 |
| | | 0.08 | 34.29 | 35.40 | 36.67 |
| | | 0.1 | 44.62 | 45.03 | 44.09 |

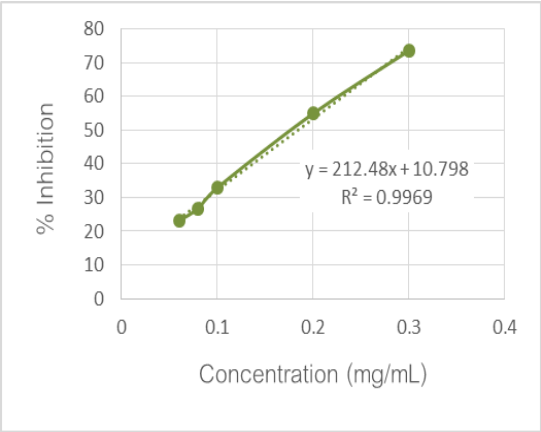
| Sample | Concentration (mg/mL) | Final concentration (mg/mL) | %Inhibition | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| | | 0.12 | 49.29 | 53.08 | 53.00 |
| | | 0.14 | 61.15 | 61.00 | 62.55 |
| | | 0.16 | 60.61 | 68.38 | 66.67 |
| | | 0.2 | 77.53 | 77.25 | 75.86 |
| | | 0.3 | 87.82 | 87.77 | 85.48 |
| | | | | | |
| OF | 1 | 0.06 | 18.33 | 27.32 | 27.94 |
| | | 0.08 | 30.79 | 35.41 | 32.80 |
| | | 0.1 | 38.36 | 40.20 | 39.29 |
| | | 0.12 | 43.31 | 41.74 | 41.96 |
| | | 0.14 | 52.80 | 51.04 | 53.41 |
| | | 0.16 | 55.80 | 57.65 | 54.46 |
| | | 0.2 | 71.97 | 69.56 | 69.58 |
| | | 0.3 | 84.01 | 80.08 | 83.00 |
| | | | | | |
| Vitamin C | 0.2 | 0.01 | 10.24 | 5.180 | 10.50 |
| | | 0.02 | 18.56 | 16.22 | 18.01 |
| | | 0.04 | 33.23 | 32.83 | 33.79 |
| | | 0.06 | 55.03 | 55.81 | 51.21 |
| | | 0.08 | 75.09 | 74.85 | 72.30 |
| | | 0.1 | 87.44 | 86.35 | 86.67 |
| | | 0.3 | 95.00 | 94.82 | 94.54 |
| | | 0.5 | 95.93 | 95.82 | 95.64 |

| Sample | Concentration (mg/mL) | Final concentration (mg/mL) | %Inhibition | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 |
| | | | | | |
| Trolox | 2 | 0.01 | 5.36 | 10.03 | 8.19 |
| | | 0.02 | 16.60 | 16.60 | 15.52 |
| | | 0.04 | 32.39 | 31.36 | 34.07 |
| | | 0.06 | 41.30 | 45.25 | 44.69 |
| | | 0.08 | 48.27 | 51.29 | 46.55 |
| | | 0.1 | 56.57 | 60.83 | 59.39 |
| | | 0.3 | 73.68 | 73.02 | 73.12 |
| | | 0.5 | 80.11 | 81.35 | 84.11 |

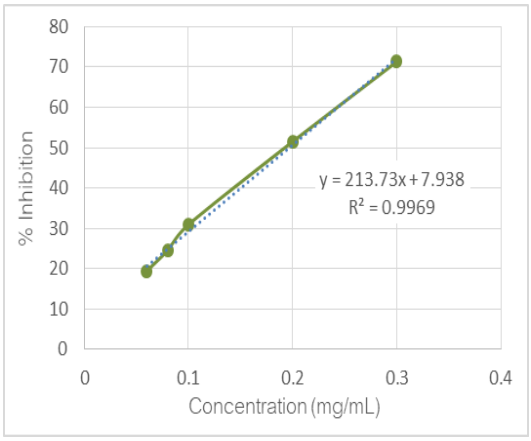
ตารางที่ 4 แสดงค่า %inhibition ของสารสกัดใบฝรั่งและสารมาตรฐานจากการทดสอบวิธี DPPH



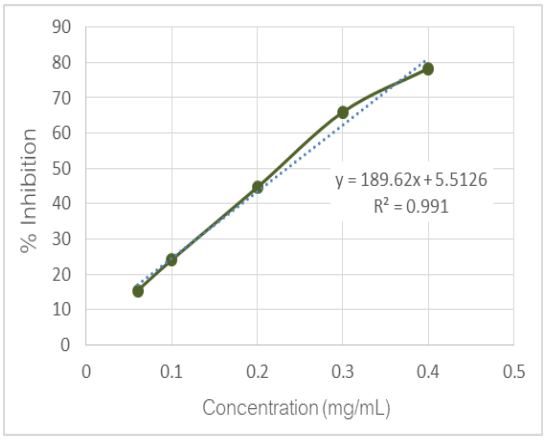

รูปที่ 5 แสดงกราฟ %inhibition ของ YE ครั้งที่ 1



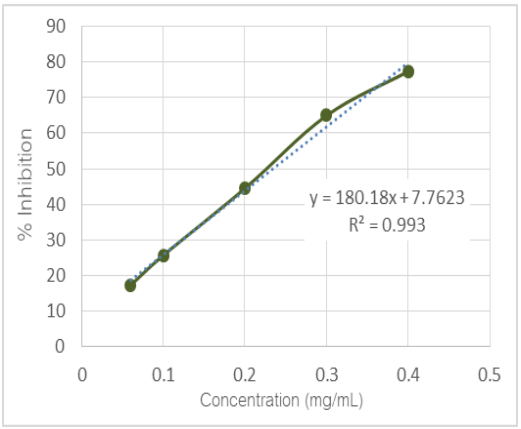

รูปที่ 6 แสดงกราฟ % inhibition ของ YE ครั้งที่ 2



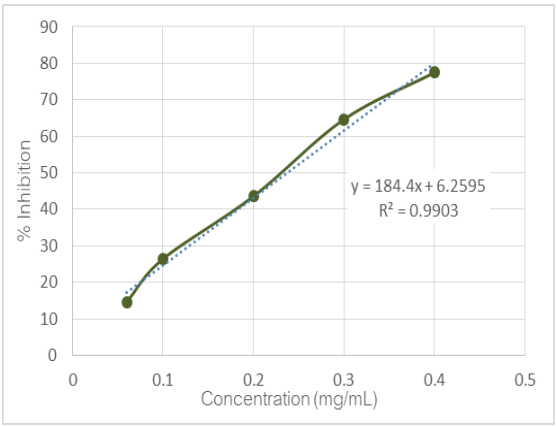

รูปที่ 7 แสดงกราฟ %inhibition ของ YE ครั้งที่ 3



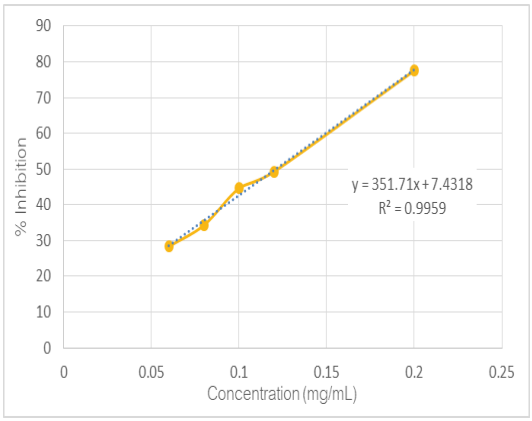

รูปที่ 8 แสดงกราฟ %inhibition ของ OE ครั้งที่ 1



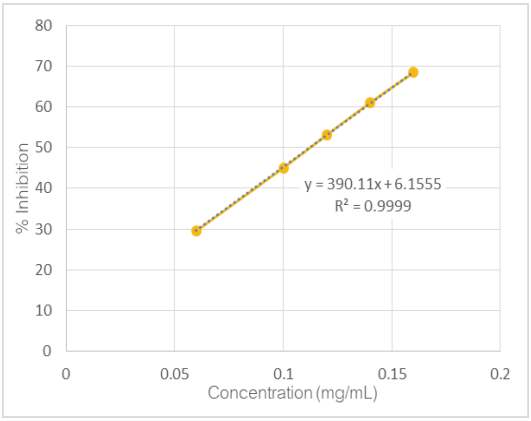

รูปที่ 9 แสดงกราฟ %inhibition ของ OE ครั้งที่ 2



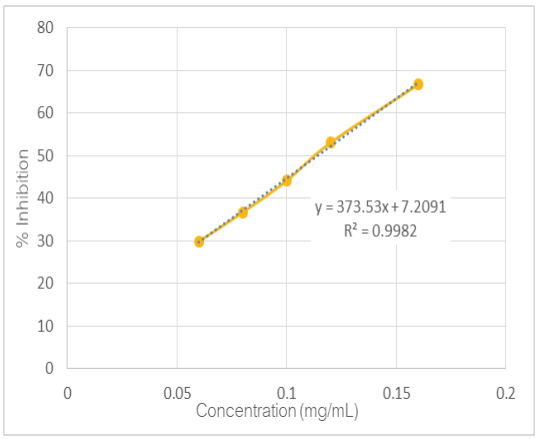

รูปที่ 10 แสดงกราฟ % inhibition ของ OE ครั้งที่ 3



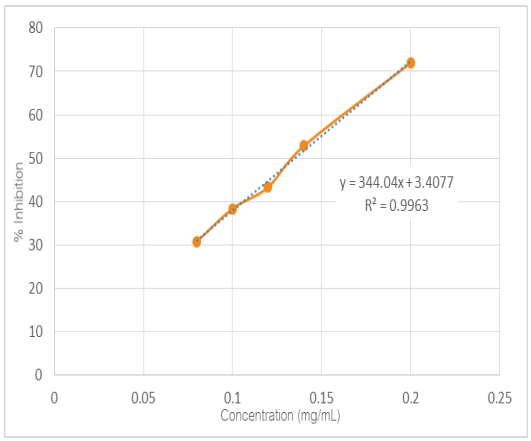

รูปที่ 11 แสดงกราฟ %inhibition ของ YF ครั้งที่ 1



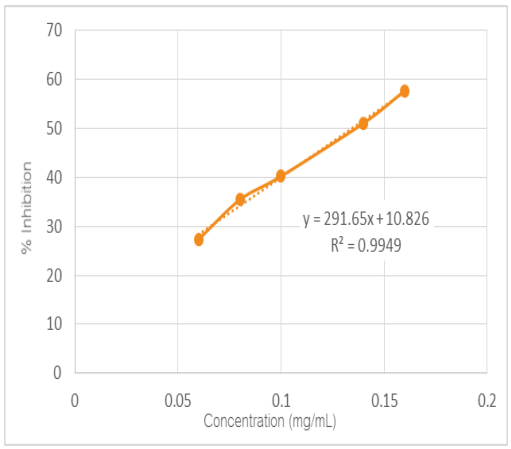

รูปที่ 12 แสดงกราฟ %inhibition ของ YF ครั้งที่ 2



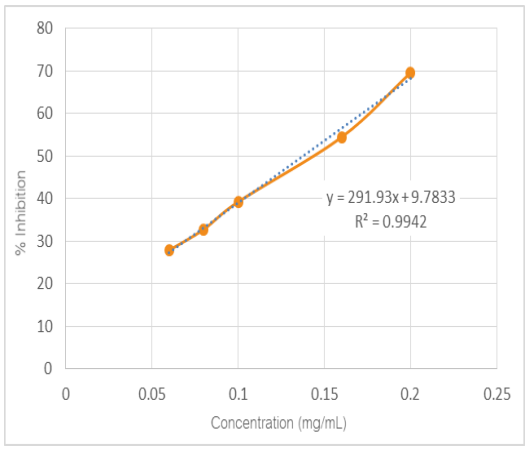

รูปที่ 13 แสดงกราฟ %inhibition ของ YF ครั้งที่ 3



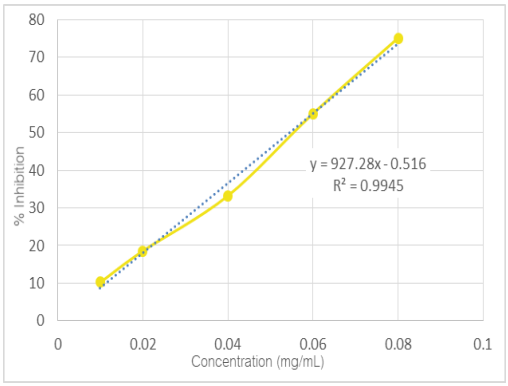

รูปที่ 14 แสดงกราฟ %inhibition ของ OF ครั้งที่ 1



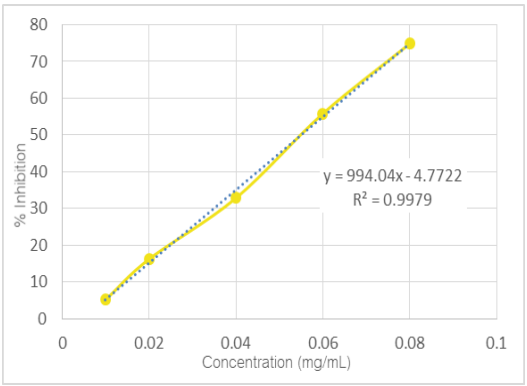

รูปที่ 15 แสดงกราฟ %inhibition ของ OF ครั้งที่ 2



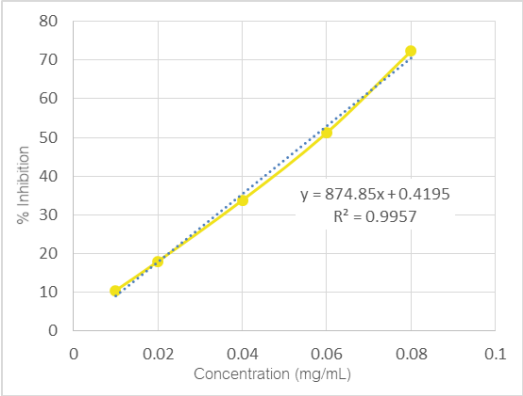

รูปที่ 16 แสดงกราฟ %inhibition ของ OF ครั้งที่ 3



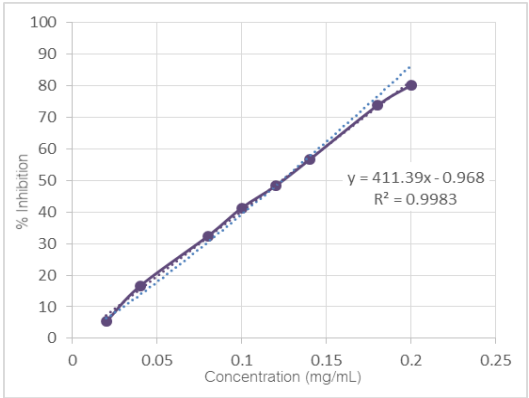

รูปที่ 17 แสดงกราฟ %inhibition ของ vitamin c ครั้งที่ 1



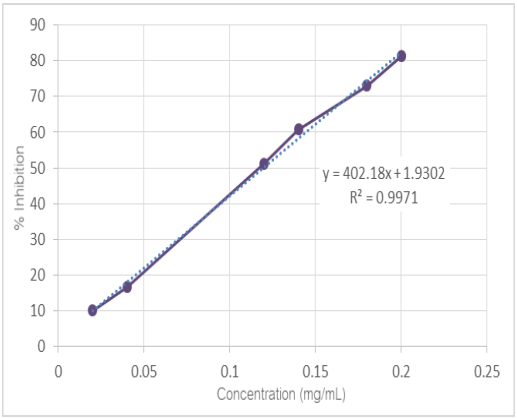

รูปที่ 18 แสดงกราฟ %inhibition ของ vitamin c ครั้งที่ 2



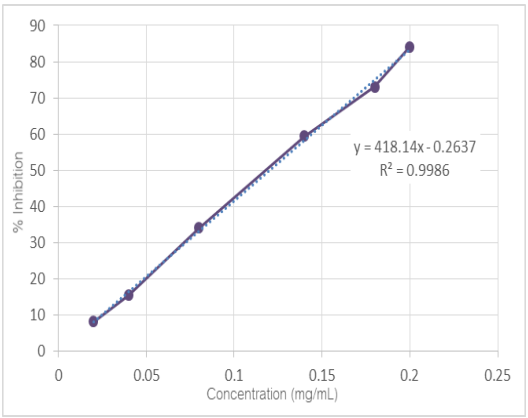

รูปที่ 19 แสดงกราฟ %inhibition ของ vitamin c ครั้งที่ 3




รูปที่ 20 แสดงกราฟ %inhibition ของ trolox ครั้งที่ 1




รูปที่ 21 แสดงกราฟ %inhibition ของ trolox ครั้งที่ 2




รูปที่ 22 แสดงกราฟ %inhibition ของ trolox ครั้งที่ 3

จาก calibration curve ของ สารสกัดแต่ละชนิดและสารมาตรฐาน trolox และ vitamin c สามารถคำนวณหาค่า $IC_{50}$ โดยอาศัยสมการเส้นตรงได้ผลดังต่อไปนี้

| สารสกัด / สารมาตรฐาน | $IC_{50}$ (mg/mL) | | | ค่าเฉลี่ย $IC_{50}$ (mg/mL) |
|---|---|---|---|---|
| YE | 0.18 | 0.18 | 0.20 | 0.19±0.01 |
| OE | 0.23 | 0.23 | 0.24 | 0.24±0.00 |
| YF | 0.12 | 0.11 | 0.11 | 0.12±0.00 |
| OF | 0.14 | 0.13 | 0.14 | 0.14±0.00 |
| Vitamin C | 0.05 | 0.06 | 0.06 | 0.06±0.00 |
| Trolox | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 0.12±0.00 |

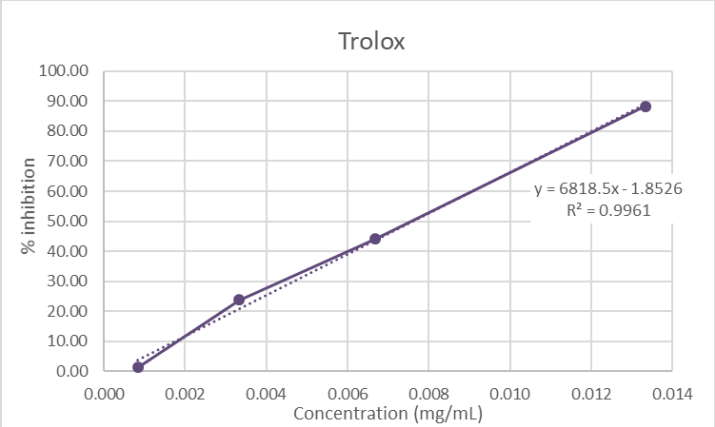
ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ย $IC_{50}$ ของสารสกัดใบฝรั่งและสารมาตรฐานจากการทดสอบด้วยวิธี DPPH

4.3 การทดสอบ ABTS radical cation scavenging assay

| Sample | Concentration (mg/mL) | Final concentration (mg/mL) | % Inhibition | (mgTEAC*/g extract) |
|---|---|---|---|---|
| OF | 10 | 1.67 | 98.11±0.97 | 8.80 |
| YF | 10 | 1.67 | 99.36±0.65 | 8.91 |
| OE | 10 | 1.67 | 99.36±0.08 | 8.91 |
| YE | 10 | 1.67 | 98.99±0.42 | 8.87 |

*TEAC = trolox equivalent antioxidant capacity

ตารางที่ 6 แสดง Antioxidant activities โดย ABTS assay




รูปที่ 23 แสดงกราฟ % inhibition ของ trolox ด้วยวิธี ABTS

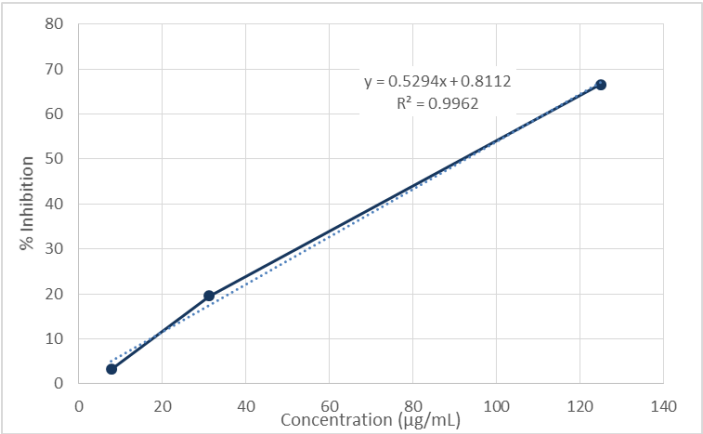
4.4 การทดสอบ antityrosinase activity

| สารสกัด | Concentration (mg/mL) | Final concentration (µg/mL) | % Inhibition |
|---|---|---|---|
| YE | 5 | 500 | 39.10±3.7 |
| OE | 10 | 1000 | 42.40±3.58 |
| YF | 10 | 1000 | 54.63±1.24 |
| | 50 | 5000 | 72.78±4.61 |
| OF | 10 | 1000 | 44.69±1.13 |
| | | | |
| | 50 | 5000 | 54.22±0.45 |

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดสอบ antityrosinase activity ของสารสกัด

| สาร (standard) | Concentration (µg/mL) | %Inhibition | $IC_{50}$ |
|---|---|---|---|
| Kojic acid 10 (mg/mL) | 1000 | 86.19±0.25 | 92.91 |
| | 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 | |
| | 15.625 | 3.27±0.38 | |
| | 7.8125 | 3.19±0.00 | |

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบ antityrosinase activity ของสารมาตรฐาน Kojic acid




รูปที่ 24 แสดงกราฟ %inhibition ของ kojic acid

4.5 การปรับสูตรตำรับสารสกัด

สูตรตำรับที่1

| สารสกัด / ลักษณะทางกายภาพ | YE | OE | YF | OF |
|---|---|---|---|---|
| สี | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลอ่อน | น้ำตาลอ่อน |
| กลิ่น | กลิ่นคล้ายน้ำมัน | | | |
| ตะกอน | มีตะกอนมาก | | | |
| ความหนืด | หนืดน้อย(+) | | | |

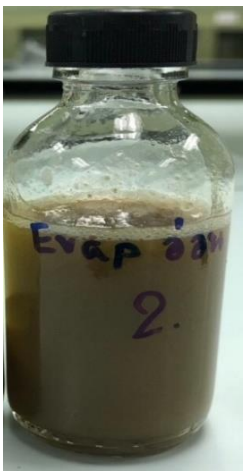
ตารางที่ 9 แสดงคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับที่ 1

รูปที่ 25 แสดงคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับของตำรับที่ 1

สูตรตำรับที่ 2

| สารสกัด / ลักษณะทางกายภาพ | YE | OE | YF | OF |
|---|---|---|---|---|
| สี | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลอ่อน | น้ำตาลอ่อน |
| กลิ่น | กลิ่นคล้ายน้ำมัน | | | |
| ตะกอน | ไม่มีตะกอน(แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้แล้วตกตะกอน) | | | |
| ความหนืด | หนืดปานกลาง(++) | | | |

ตารางที่ 10 แสดงคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับที่ 2




รูปที่ 26 แสดงคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับของตำรับที่ 2

สูตรตำรับที่ 3

| สารสกัด / ลักษณะทางกายภาพ | YE | OE | YF | OF |
|---|---|---|---|---|
| สี | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลอ่อน | น้ำตาลอ่อน |
| กลิ่น | กลิ่นคล้ายน้ำมัน | | | |
| ตะกอน | ไม่มีตะกอน | | | |
| ความหนืด | หนืดปานกลาง(++) | | | |

ตารางที่ 11 แสดงคุณลักษณะเบื้องต้นของตำรับที่ 3

เลือกตำรับที่ 3 เนื่องจากมีการใส่ tween20 ลงไปเพื่อเพิ่มความคงตัวทำให้ไม่มีตะกอน และตำรับมีความหนืดปานกลาง

4.6 การประเมินรูปแบบผลิตภัณฑ์ของสูตรตำรับที่ 3 ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ

| ตำรับ | YE | OE | YF | OF |
|---|---|---|---|---|
| สี | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลเข้ม | น้ำตาลอ่อน | น้ำตาลอ่อน |
| กลิ่น | กลิ่นคล้าย น้ำมัน | กลิ่นคล้าย น้ำมัน | กลิ่นคล้าย น้ำมัน | กลิ่นคล้าย น้ำมัน |
| การแยกตัวของสารสกัดในตำรับ | ไม่แยกชั้น | ไม่แยกชั้น | ไม่แยกชั้น | ไม่แยกชั้น |
| หลังปรับ pH | 5.88 | 5.64 | 5.92 | 5.56 |

ตารางที่ 12 แสดงการประเมินรูปแบบผลิตภัณฑ์ของสูตรตำรับที่3 ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ

รูปที่ 27 แสดงรูปแบบผลิตภัณฑ์สารสกัด OF ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ

รูปที่ 28 แสดงรูปแบบผลิตภัณฑ์สารสกัด YF ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ

รูปที่ 29 แสดงรูปแบบผลิตภัณฑ์สารสกัด OE ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ

รูปที่ 30 แสดงรูปแบบผลิตภัณฑ์สารสกัด YE ก่อนนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ

4.7 การประเมินรูปแบบเภสัชภัณฑ์สูตรตำรับที่ 3 หลังนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 7 วัน

4.7.1 ตำรับของสารสกัดใบอ่อนฝรั่งจากการสกัดด้วยวิธีการหมัก (YE)

| ลักษณะทางกายภาพ | อุณหภูมิห้อง | อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง) | 4°C | 45°C |
|---|---|---|---|---|
| สี | น้ำตาลเข้ม | | | |
| กลิ่น | กลิ่นจางลงกว่าเดิม | | | กลิ่นแรงกว่าเดิม |
| การแยกตัวของสารสกัดในตำรับ | ไม่แยกชั้น | | | ตะกอนมาก(เมื่อเขย่าแล้วสามารถกลับเป็นเหมือนเดิม) |
| pH | 5.86 | 5.89 | 6.16 | 5.21 |

ตารางที่ 13 แสดงสูตรตำรับที่ 3 ของสารสกัดใบอ่อนฝรั่งจากการสกัดด้วยวิธีการหมัก (YE) หลังนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ

รูปที่ 31 แสดงสารสกัด YE ที่ อุณหภูมิห้อง

รูปที่ 32 แสดงสารสกัด YE ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง)

รูปที่ 33 แสดงสารสกัด YE ที่ อุณหภูมิ 4°C

รูปที่ 34 แสดงสารสกัด YE ที่ อุณหภูมิ 45°C

4.7.2 ตำรับของสารสกัดใบแก่ฝรั่งจากการสกัดด้วยวิธีการหมัก (OE)

| ลักษณะทางกายภาพ | อุณหภูมิห้อง | อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง) | 4°C | 45°C |
|---|---|---|---|---|
| สี | น้ำตาลเข้ม | | | |
| กลิ่น | กลิ่นจางกว่าเดิม | | | กลิ่นแรงกว่าเดิม |
| การแยกตัวของสารสกัดของตำรับ | ไม่แยกชั้น | | | |
| pH | 5.72 | 5.83 | 5.55 | 5.68 |

ตารางที่ 14 แสดงสูตรตำรับที่ 3 ของสารสกัดใบแก่ฝรั่งจากการสกัดด้วยวิธีการหมัก (OE) หลังนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ

รูปที่ 35 แสดงสารสกัด OE ที่ อุณหภูมิห้อง

รูปที่ 36 แสดงสารสกัด OE ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง)

รูปที่ 37 แสดงสารสกัด OE ที่ อุณหภูมิ 4°C

รูปที่ 38 แสดงสารสกัด OE ที่อุณหภูมิ 45°C

4.7.3 ตำรับของสารสกัดใบอ่อนฝรั่งจากการสกัดด้วยวิธีการต้ม (YF)

| ลักษณะทางกายภาพ | อุณหภูมิห้อง | อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง) | 4°C | 45°C |
|---|---|---|---|---|
| สี | น้ำตาลอ่อน | | | |
| กลิ่น | กลิ่นจางกว่าเดิม | | | กลิ่นแรงกว่าเดิม |
| การแยกตัวของสารสกัดของตำรับ | ตะกอนมาก(เมื่อเขย่าแล้วกลับมาเป็นเหมือนเดิม) | | | |
| pH | 5.74 | 5.78 | 5.83 | 5.25 |

**ตารางที่ 15 แสดงสูตรตำรับที่ 3 ของสารสกัดใบอ่อนฝรั่งจากการสกัดด้วยวิธีการต้ม (YF) หลังนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ**

รูปที่ 39 แสดงสารสกัด YF ที่ อุณหภูมิห้อง

รูปที่ 40 แสดงสารสกัด YF ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง)

รูปที่ 41 แสดงสารสกัด YF ที่ อุณหภูมิ 4°C

รูปที่ 42 แสดงสารสกัด YF ที่อุณหภูมิ 45°C

4.7.4 ตำรับของสารสกัดใบแก่ฝรั่งจากการสกัดด้วยวิธีการต้ม (OF)

| ลักษณะทางกายภาพ | อุณหภูมิห้อง | อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง) | 4°C | 45°C |
|---|---|---|---|---|
| สี | น้ำตาลอ่อน | น้ำตาลอ่อน | น้ำตาลอ่อน | น้ำตาลอ่อน |
| กลิ่น | กลิ่นจางกว่าเดิม | | | กลิ่นแรงกว่าเดิม |
| การแยกตัวของสารสกัดของตำรับ | ตะกอนน้อย(เมื่อเขย่าแล้วกลับมาเป็นเหมือนเดิม) | | | |
| pH | 5.46 | 5.45 | 5.54 | 5.35 |

ตารางที่ 16 แสดงสูตรตำรับที่ 3 ของสารสกัดใบแก่ฝรั่งจากการสกัดด้วยวิธีการต้ม (OF) หลังนำไปทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ

รูปที่ 43 แสดงสารสกัด OF ที่ อุณหภูมิห้อง

รูปที่ 44 แสดงสารสกัด OF ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันแสง)

รูปที่ 45 แสดงสารสกัด OF ที่ อุณหภูมิ 4°C

รูปที่ 46 แสดงสารสกัด OF ที่อุณหภูมิ 45°C

# บทที่ 5

# สรุปผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

## อภิปรายผลการทดลอง

5.1 ปริมาณสารสกัดที่ได้

จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบอ่อน (YE)และใบแก่ (OE) และสารสกัดน้ำจากใบอ่อน (YF)และใบแก่ (OF) มีค่า %yield เท่ากับ 14.01, 17.81, 5.03 และ 8.03% ตามลำดับ โดยสารสกัด OE ให้ %yield มากที่สุด

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบฝรั่ง

5.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเอทานอลใบอ่อน (YE) และใบแก่ (OE) และสารสกัดน้ำใบอ่อน (YE) และใบแก่ (OF) ด้วยวิธี DPPH assay พบค่า $IC_{50}$ เท่ากับ 0.19±0.01, 0.24±0.00, 0.12±0.00 และ 0.14±0.00 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดน้ำจากใบอ่อน (YF) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดน้ำใบแก่ (OF), สารสกัดเอทานอลใบอ่อน (YE) และใบแก่ (OE) ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำใบอ่อนมีค่าเท่ากับสารมาตรฐาน trolox ($IC_{50}$เท่ากับ 0.12±0.00 mg/mL) แต่ยังมีฤทธิ์ด้อยกว่า vitamin C ($IC_{50}$เท่ากับ 0.06±0.00 mg/mL)

5.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical cation scavenging assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด โดยนำค่า %inhibition ของสารสกัดไปเทียบกับ calibration curve ของสารมาตรฐาน trolox พบว่าที่ความเข้มข้น 1.67 mg/mL ของสารสกัดน้ำใบแก่ (OF) และใบอ่อน (YF) สารสกัดเอทานอลใบแก่ (OE) และใบอ่อน (YE) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 8.80, 8.91, 8.91 และ 8.87 mg trolox equivalent antioxidant

capacity/g โดยสารสกัดน้ำใบอ่อน (YF) และสารสกัดเอทานอลใบแก่ (OE) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาเป็น สารสกัดเอทานอลใบอ่อน (YE) และสารสกัดน้ำใบแก่ (OF) ตามลำดับ

5.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบฝรั่ง

การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดเอทานอลใบอ่อน (YE) ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL มีค่า %inhibition เท่ากับ 39.01±0.37 % ความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะทำให้การละลายของสารสกัดลดลงจึงไม่สามารถทำการวัดค่าได้ ขณะที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL ของสารสกัดเอทานอลใบแก่ (OE) สารสกัดน้ำใบอ่อน (YF) และใบแก่ (OF) สามารถต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 42.40±3.58, 54.63±1.24 และ 44.69±1.13 % ตามลำดับ ดังนั้นสารสกัดน้ำใบอ่อน (YF) มีฤทธิ์ดีที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดน้ำใบแก่ (OF) และสารสกัดเอทานอลใบแก่ (OE) ตามลำดับ เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดน้ำใบอ่อน (YF) และใบแก่ (OF) เป็น 5000 µg/mL พบว่ามีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มขึ้นเป็น 72.78±4.61 และ 54.22±0.45 % ตามลำดับ และยังคงพบว่าสารสกัดน้ำใบอ่อน (YE) ยังคงมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด

จากผลการทดสอบพบว่า ไม่มีสารสกัดชนิดใดที่มีฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังนั้นฤทธิ์ยับยั้งการเกิดผมหงอกของสารสกัดใบฝรั่ง อาจไม่ได้เป็นผลจากกลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

5.4 การเตรียมผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบฝรั่งในรูปของซีรัม

จากการพัฒนาสูตรตำรับของสารสกัดเอทานอลใบอ่อน(YE) และใบแก่(OE) สารสกัดน้ำใบอ่อน (YF) และใบแก่ (OE) พบว่า สูตรตำรับที่1 เกิดการแยกชั้น มีตะกอนมาก และมีความหนืดน้อย เมื่อเพิ่มปริมาณ propyleneglycol และ Luviquat® ในสูตรตำรับที่2 พบว่าไม่มีตะกอน แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ยังตกตะกอน แต่มีความหนืดที่เหมาะสมและเมื่อเพิ่มปริมาณ tween20 ในสูตรตำรับที่ 3 พบว่าไม่มีตะกอน และมีความหนืดที่เหมาะสม จึงเลือกเอาตำรับที่ 3 มาทดสอบความคงตัวของตำรับโดยการสังเกตสี กลิ่น pH และการแยกตัวของสารสกัดในตำรับที่อุณหภูมิห้อง 4°Cและ 45°C พบว่า สีของทุกตำรับไม่เปลี่ยนแปลง กลิ่นของตำรับสารสกัดเอทานอลจากใบอ่อน (YE)และใบแก่ (OE) ที่อุณหภูมิห้อง 4°Cและ 45°C มีกลิ่นจางลงกว่าเดิม และกลิ่นของตำรับสารสกัดน้ำจากใบอ่อน (YF) และใบแก่ (OF) ที่อุณหภูมิห้อง และ 4°C พบว่ากลิ่นจางลงกว่าเดิม แต่ที่อุณหภูมิ 45°C พบว่ากลิ่นของตำรับแรงขึ้นกว่าเดิม สำหรับการแยกตัวของตำรับพบว่าตำรับสารสกัดเอทานอลจากใบอ่อน (YE) ที่อุณหภูมิห้อง และ 4°C ไม่แยกชั้นและไม่พบตะกอน แต่ที่อุณหภูมิ 45°C พบตะกอนมาก แต่เมื่อเขย่าก็สามารถกลับมาคงตัว ส่วนตำรับสารสกัดเอทานอลจากใบแก่ (OE)

ที่อุณหภูมิห้อง 4°Cและ 45°C ไม่แยกชั้นและไม่พบตะกอน ตำรับสารสกัดน้ำจากใบอ่อน (YF) ที่อุณหภูมิห้อง 4°Cและ 45°C พบการแยกชั้นและเกิดตะกอนเล็กน้อย เมื่อเขย่าก็สามารถกลับมาคงตัว สำหรับตำรับสารสกัดน้ำจากใบแก่ (OF)ที่อุณหภูมิห้อง 4°C และ 45°C พบการแยกชั้นและเกิดตะกอนมาก แต่เมื่อเขย่าก็สามารถกลับมาคงตัวได้ ส่วนการทดสอบ pH พบว่า ทุกตำรับที่เก็บไว้ในสภาวะอุณหภูมิต่างๆจะมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.21-6.16 เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นค่า pH จะลดลง ยกเว้นในตำรับสารสกัดเอทานอลใบแก่ (OE) มีค่า pH ที่สูงขึ้น เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพทั้งหมดของตำรับที่มีสารสกัดที่4ชนิด พบว่าตำรับของสารสกัดเอทานอลจากใบแก่ (OE) มีความคงตัวมากที่สุด

## สรุปผลการทดลอง

สารสกัดใบฝรั่งทั้งใบแก่และใบอ่อนที่สกัดด้วยวิธีการต้มด้วยน้ำและวิธีสกัดด้วย 70% เอทานอลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเมื่อทดสอบด้วย DPPH และ ABTS assays ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้จะช่วยชะลอการเกิดผมร่วงได้ แต่พบว่าสารสกัดทุกตัวไม่มีฤทธิ์กระตุ้นเอนไซม์ไทโรซิเนส แสดงว่าสารสกัดใบฝรั่งไม่สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานินในเส้นผม ซึ่งกลไกในการลดการเกิดผมหงอกของใบฝรั่งอาจมาจากกระบวนการอื่น ในการพัฒนาตำรับซีรัมที่มีองค์ประกอบของสารสกัดเอทานอลใบแก่ มีความคงตัวมากที่สุด เมื่อเก็บไว้ในสภาวะ อุณหภูมิ ที่แตกต่างกันโดยมีองค์ประกอบอื่นของตำรับ เป็น vitamin B 5, glycerin, propylene glycol, tween20, Luviquat® และ phenoxyethanol การศึกษาวิจัยนี้สามารถนำไปต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม โดยเฉพาะการแก้ผมร่วงต่อไป สำหรับข้อเสนอแนะในงานวิจัยนี้ คือ ควรใช้ใบฝรั่งรอบเดียวกันมาใช้สกัด ควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเกิดผมหงอกเพิ่มเติม อีกทั้งควรมีการศึกษาความความคงตัวของตำรับที่นานกว่า7วัน

## เอกสารอ้างอิง

1. Jean L, Bolognia MD, Julie V. Schaffer MD. Section 11 hair, nails, and mucous membranes: Alopecias. Bolognia JL, Schaffer JV, Cerroni L, et al. Dermatology 4th edition. Elsevier; 2018, p.1162-87.

2. Draelos ZD. Section 22 cosmetic surgery: Cosmetics and Cosmeceuticals. Bolognia JL, Schaffer JV, Cerroni L, et al. Dermatology 4th edition. Elsevier; 2018, p. 2578-92.

3. Chaiwipassatorn P, Hochuntuk M. Effects of crude extract from fruits of Porcupine Orange (*Citrus hystrix* DC) and other chemicals on hair treatment. [Internet]. 1997. [cited 2018 Mar 31]. Available from: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/medplantdatabase/dtl_research.asp?hidKeyLink=19970097

4. มะคำดีควาย [Internet]. ฐานข้อมูลเครื่องยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2010 [cited 2018 Mar 31]. Available from: http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=103

5. กฤตติญารัตน์ สมวงศ์, ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของสารสกัดสมุนไพรไทยพื้นบ้านบางชนิด เพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย. การจัดประชุมและนำเสนอผลงานทางวิชาการระดับชาติ The 4th Annual Northeast Pharmacy Research Conference of 2012 “Pharmacy Profession in Harmony”; 11 – 12 กุมภาพันธ์2555; คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2555. หน้า 125-134.

6. Fernandez E, Martinez-Teipel B, Armengol R, Barba C, Coderch L. Efficacy of antioxidants in human hair. J Photochem Photobiol B. 2012;117:146-56.

7. Alopecia [Internet]. Elsevier. 2011 [cited 2018 Mar 31]. Available from: https://www.clinicalkey.com/#!/content/medical_topic/21-s2.0-1014848.

8. Etienne Wang, David de Berker, Angela M. Christiano. Section 11 hair, nails, and mucous membranes: Biology of hair and nails. Bolognia JL, Schaffer JV, Cerroni L, et al.

9. Kaakoush NO, Morris MJ. More flavor for flavonoid-based interventions.Trends Mol Med. 2017;23(4):293-5.

10. Mason JB. Vitamins, Trace Minerals, and Other Micronutrients. Goldman's Cecil Medicine2012. p. e47-e56.

11. Patient with Alopecia [Internet]. [cited 31/03/61]. Available from: https://med.mahidol.ac.th/med/sites/default/files/public/pdf/medicinebook1/Ptn-Alopecia.pdf)

12. Thaichinda S. Alopecia. Division of Dermatology, Department of Medicine, Hat Yai Hospital, Songkhla, 90110, Thailand Songkla Med J. 2008;26(6):587-599

13. Alonso L, Fuchs E. The hair cycle. J Cell Sci. 2006;119(Pt 3):391-3.

14. Alopecia areata. [Internet]. สถาบันโรคผิวหนัง [cited 31/3/18]. Available from: http://inderm.go.th/inderm/file/1.Alopecia%20areata.pdf.

15. Pierce S. Guava Tree Fertilizer: How to feed a Guava tree [Internet]. Gardening Know How. 2018 [cited 19 November 2018]. Available from: https://www.gardeningknowhow.com/edible/fruits/guava/feeding-guava-trees.htm

16. ฝรั่ง [Internet]. สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สวนจิตรลดา. 2001. [cited 2018 Mar 31]. Available from: http://www.rspg.or.th/plants_data/herbs/herbs_07_6.htm

17. ฝรั่ง [Internet]. Medplant.mahidol.ac.th. 2018 [cited 19 November 2018]. Available from: http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/psidium.html

18. ปัญจางค์ ธนังกูล, ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ. การศึกษาผลทางคลินิกของใบฝรั่งในโรคอุจจาระร่วง. สารศิริราช 2530;39(5):263-6.

19. Ghosh TK, Sen T, Das A, Dutta AS, Nag Chaudhuri AK. Antidiarrhoeal activity of the methanolic fraction of the extract of unripe fruits of *Psidiun guajava* Linn. Phytother Res. 1993;7:431-3.

20. Wei L, Li Z, Chen B. Clinical study on treatment of infantile rotaviral enteritis with *Psidium guajava* L. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 2000;20(12):893-5.

21. มาลิน จุลศิริ และคณะ. สารสกัดจากพืชเพื่อแก้โรคท้องร่วง ท้องเดิน. รวมบทคัดย่องานวิจัย การแพทย์แผนไทยและทิศทางการวิจัยในอนาคต สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2543.

22. อัมพวัน อภิสริยะกุล. การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพรบางชนิดต่อลำไส้เล็กของหนูขาว. เชียงใหม่เภสัชสาร 2527;3(1):8-16.

23. วันชัย ไอรารัตน์ วีรพล คู่รงวิริยพันธุ์ จินตนา สัตยาศัย. การศึกษาฤทธิ์ต้านอาการท้องร่วงของน้ำสกัดใบฝรั่งและเปลือกผลทับทิมตากแห้งในสัตว์ทดลอง. ศรีนครินทร์เวชสาร 2543;15(1):3-

24. Lutterodt GD. Inhibition of microlax-induced experimental diarrhoea with narcotic-like extracts of *Psidium gaujava* leaf in rats. J Ethnopharmacol. 1992;37:151-7.

25. Tona L, Kambu K, Ngimbi N, et al. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. Phytomedicine. 2000;7(1):31-8.

26. Lutterodt GD. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholene by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal disease. J Ethnopharmacol. 1989;25(3):235-47.

27. Morales MA, Tortoriello J, Meckes M, Paz D, Lozoya X. Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava* L. Arch Med Res 1994;25(1):17-21

28. อัมพวัน อภิสริยะกุล นุชนารถ ชัยชนะ และ วิลาสินี อยู่สุข. การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเคอร์ซิทิน (Quercetin) ซึ่งพบในใบฝรั่ง (*Psidium guajava*, Myrtaceae) ต่อการหดตัวของลำไส้เล็กหนูขาวและหนูตะเภา. วารสารเภสัชวิทยา 2536;14-15:35-40.

29. Zhang W, Chen B, Wang C, Zhu Q, Mo Z. Mechanism of quercetin as an antidiarrheal agent. Diyi Junyi Daxue Xuebao. 2003;23(10):1029-31.

30. Lozoya X, Meckes M, Abou-Zaid M, Tortoriello J, Nozzolillo C, Arnason JT. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. Arch Med Res. 1994;25(1):11-5.

31. Begum S, Hassan SI, Siddiqui BS, et al. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. Phytochemistry. 2002;61:399-403.

32. Ghosh TK, Sen T, Das A, Dutta AS, Nag Chaudhuri AK. Antidiarrhoeal activity of the methanolic fraction of the extract of unripe fruits of *Psidiun guajava* Linn. Phytother Res. 1993;7:431-3.

33. ดาวฤกษ์ เล่ห์มงคล และคณะ. การศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรต่อการบีบตัวของลำไส้หนูขาว. รวมบทคัดย่องานวิจัย การแพทย์แผนไทยและทิศทางการวิจัยในอนาคต สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2543.

34. Gritsanapan W, Chulasiri M. A primary study of antidiarrheal plants: I, antibacterial activity. Mahidol Univ J Pharm Sci. 1983;10(4):119-23.

35. Caceres A, Torres MF, Ortiz S, Cano F, Jauregui E. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. IV. Vibriocidal activity of five American plants used to treat infections. J Ethnopharmacol. 1993;39:73-5.

36. Chah KF, Eze CA, Emuelose CI, et al. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. J Ethnopharmacol 2006;104:164-7.

37. Kanbutra P, Porntrakulpipat S, Borisutpeth P, et al. Anti-bacterial activity of Thai medicinal plants on *Escherichia coli* (F18+). The 2nd International Conference on Medicinal Mushroom and The International Conference on Biodiversity and Bioactive Compounds, 17-19 July, Pattaya, Thailand, 2003.

38. Direkbusarakom S, Aekpanithanpong U. The efficiency of the crude extract from the leaf of guajava (*Psidium guajava L.*) on Vibrio spp. isolated from disease tiger prawn (Peanaeus monodon). First Joint Seminar: Advance in research on pharmacologically active substances from natural sources, 3-5 December, Chiang Mai, Thailand, 1992.

39. Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, et al. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic escherichia coli O157:H7. J Ethnopharmacol. 2004;94:49-

40. Caceres A, Cano O, Samayoa B, Aguilar L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. I. Screening of 84 plants against enterobacteria. J Ethnopharmacol. 1990;30:55-73.

41. Chariandy CM, Seaforth CE, Phelps RH, Pollard GV and Khambay BPS. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. J Ethnopharmacol. 1999;64:265-70.

42. สุรีย์ ประเสริฐสุข, มรกต สุกโชติรัตน์. ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคบิด. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 12, กรุงเทพฯ, 2529.

43. จริยา สินเดิมสุข สมเกียรติ ตีกิจเสริมพงศ์ วีณา จารุบรีชาชาญ. เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรักษาโรคอุจจาระร่วงระหว่าง ใบฝรั่งและเปลือกมังคุด. วารสารเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2532:16(2):32-5.

44. Roengsumran S, Petsom A, Thaniyavarn S, Pornpakakul S, Khantahiran S. Antibacterial activity of some essential oils. J Sci Res Chula Univ. 1997;22(1):13-9.

45. Danno G, Arima H. Antibacterial flavonoid glycosides from guava. Patent: Jpn Kokai Tokkyo Koho Jp 2004250406. 2004:12pp.

46. Qa'dan F, Thewaini A, Afifi DA Ali. Rana, Elkhawad A and Matalka KZ. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and Juglans regia leaf extracts to acne-developing organisms. Am J Chinese Med. 2005;33(2):197-204.

47. ชลธิชา อมรฉัตร เทอดพงษ์ ตรีรัตน์ เพชรรัตน์ ไกรวพันธ์. ผลของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมสารสกัดใบฝรั่งต่อการอักเสบของเหงือก. หนังสือรวบรวมผลงานการวิจัย โครงการพัฒนาการใช้สมุนไพร และยาไทยทางคลินิก (2525-2536) โดยคณะกรรมการโครงการพัฒนาการใช้สมุนไพรและยาไทยทางคลินิก มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า105-113.

48. Ojewole J A O. Antiinflammatory and analgesic effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2006;28(7):441-6.

49. Kavimani S, Karpagam R, Jaykar B. Anti-inflammatory of volatile oil of *Psidium guajava*. Ind J Pharm Sci. 1997;59(3):142-4.

50. HussamTS, Nasralla SH, Chaudhuri AKN. Studies on the antiinflammatory and related pharmacological activities of *Psidium guajava*: A preliminary report. Phytother Res. 1995;9(2):118-22.

51. Choi SY, Hwang JH, Park SY, Jin YJ, Ko HC, Moon SW, Kim SJ. Fermented guava leaf extract inhibits LPS-induced COX2 and iNOS expression in mouse

macrophage cells by inhibition of transcription factor NF-kB. Phytother Res. 2008;22:1030-4.

52. Han EH, Hwang YP, Kim HG, et al. Ethyl acetate extract of *Psidium guajava* inhibits IgE-mediated allergic responses by blocking FceRI signaling. Food Chem Toxicol. 2011;49:100-8.

53. Fang Wang Y-HC, Yu-Jie Zhang, Gui-Fang Deng, Zhi-Fei Zou, A-NL. Chemical Components and Bioactivities of *Psidium guajava*. [Internet]. 2014 [cited 2018 Mar 31]. Available from: http://modernscientificpress.com/Journals/ViewArticle.aspx?6ZIT7oAL6Lqarm6Ljqm1AAxP30a97ugrPxLcENGR3R//uHsKHg1MC9pBPxmjKUtY

54. D'Agostini F e. Chemoprevention of doxorubicin-induced alopecia in mice by dietary administration of L-cystine and vitamin B6. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 20 November 2018]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22699427

55. Sim J, Park S, Park B, Noh G. Research article effect of natural plant extracts on hair loss prevent in people with alopecia [Internet]. Docsdrive.com. 2018 [cited 17 November 2018]. Available from: http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/ajd/2016/8-13.pdf

56. Choudhury S, Sinha M. Effects of *Psidium guajava* aqueous extract on testosterone and serum lipid profile of Albino rats [Internet]. Idosi.org. 2018 [cited 17 November 2018]. Available from: https://www.idosi.org/mejsr/mejsr21(10)14/30.pdf

57. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants [Internet]. Unido.org. 2018 [cited 18 November 2018]. Available from: https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf

58. Dévay A. The theory and practice of pharmaceutical technology|Digitális Tankönyvtár [Internet]. Tankonyvtar.hu. 2018 [cited 20 November 2018]. Available from: https://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011-0016_01_the_theory_and_practise_of_pharmaceutical_technology/ch14.htm

59. Soxhlet [Internet]. researchgate.net. 2018 [cited 19 November 2018]. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Soxhlet-apparatus-setup_fig7_241979019

60. Fernandes M, Dias A, Carvalho R, Souza C, Oliveira W. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts [Internet]. sciencedirect. 2018 [cited 17 November 2018]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/275723083_Antioxidant_and_antimicrobial_activities_of_Psidium_guajava_L_spray_dried_extracts

61. Seo J, Lee S, Elam M, Johnson S, Kang J. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 19 November 2018]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3959964/pdf/fsn30002-0174.pdf

62. Jiangseubchatveera N, Teerawutgulrag A, Santiarworn D, Pyne SG, Liawruangrath B. Phytochemical screening, phenolic and flavonoid contents, antioxidant and cytotoxic activities of *Graptophyllum pictum* (L.) Griff. Chiang Mai J Sci. 2017:193-202.

63. สมวงศ์ กฤติตญารัตน์, ประสทธิ์ ภูรีปริชา. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์ เม็ดสีเมลานินของสารสกัดสมุนไพรไทยพื้นบ้านบางชนิด เพื่อใช้สำหรับผมหงอกก่อนวัย [Internet]. Pharm.kku.ac.th. 2018 [cited 19 November 2018]. Available from: https://pharm.kku.ac.th/isan-journal/journal/volumn8-no1/4annual/016-UBU_Pages_125-134.pdf?fbclid=IwAR3oFZSPk5mRAYGt6apsbNxz2fkgnmcA9bQGpNV9aGV7WTuLb0YOOxG8wgo

64. Propylene glycol [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 17 November 2018]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2-propanediol#section=Use-and-Manufacturing

65. Glycerin [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 17 November 2018]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glycerol#section=Industry-Uses

66. Pantothenic acid [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 17 November 2018]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glycerol#section=Industry-

Useshttps://www.chemipan.com/a/index.php?option=com_virtuemart&view=productdetails&virtuemart_product_id=9604&virtuemart_category_id=131&lang=th-th

67. Luviquat Ultracare (ลูวิควอท อัลตราแคร์) : ร้านเคมีภัณฑ์ [Internet]. Chemipan.com. 2018 [cited 17 November 2018]. Available from: https://www.chemipan.com/a/index.php?option=com_virtuemart&view=productdetails&virtuemart_product_id=9340&virtuemart_category_id=131&lang=th-th

68. Polysorbate 20 [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 19 November 2018]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/443314#section=Physical-Description

69. Phenoxyethanol [Internet]. Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. 2018 [cited 19 November 2018]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-phenoxyethanol#section=Use-and-Manufacturing

70. บัณฑรวรรณ ธุระพระ, จันทนา บุญยะรัตน์, เยาวเรศ ชูลิขิต, สุภาวดี ดาวดี. การวิเคราห์ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส้มโอ. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2559 กุมภาพันธ์; 11:80-91.