รายงานการวิจัย

เรื่อง

ศึกษาฤทธิ์ของชะเอมเทศและมะหาดต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสี เพื่อพัฒนา whitening cream

Study of activities of *Glycyrrhiza glabra* and *Artocarpus lakoocha* to inhibit melanogenesis for developing whitening cream

รศ.ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล

ผศ.ดร.ประสิทธิ์ สุวรรณเลิศ

นายฤทธิพันธ์ รุ่งเรือง

นางสาวณัฐพร บุ๊ฮวด

นางสาวปิยวรรณ อยู่ดี

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ศึกษาฤทธิ์ของชะเอมเทศและมะหาดต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสี เพื่อพัฒนา whitening cream

Study of activities of *Glycyrrhiza glabra* and *Artocarpus lakoocha* to inhibit melanogenesis for developing whitening cream

รศ.ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล

(คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)

ผศ.ดร.ประสิทธิ์ สุวรรณเลิศ

(คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

นายฤทธิพันธ์ รุ่งเรือง

(คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)

นางสาวณัฐพร บุ๊ฮวด

(คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)

นางสาวปิยวรรณ อยู่ดี

(โรงเรียนการเรือน)

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2560)

หัวข้อวิจัย	ศึกษาฤทธิ์ของชะเอมเทศและมะหาดต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสี เพื่อพัฒนา whitening cream
ผู้ดำเนินการวิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสิทธิ์ สุวรรณเลิศ นายฤทธิพันธ์ รุ่งเรือง นางสาวณัฐพร บุ๊ฮวด นางสาวปิยวรรณ อยู่ดี
หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
ปี พ.ศ.	2561

มะหาดและชะเอมเทศ เป็นสมุนไพรที่มีรายงาน มีฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase และลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน การศึกษาฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารสกัดจากแก่นมะหาด(Al) และรากชะเอมเทศ (Gg) เป็นอีกแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร โดย Al และ Gg ถูกสกัดด้วย 70 % และ 95 % ethanol สารสกัดถูกวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ phenolic และflavonoid และตรวจวิเคราะห์สาร oxyresveratrol และ glabridin ด้วย Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ ฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase และการสร้างเม็ดสีในเซลล์เมลาโนมา B16 และศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดในการยับยั้ง tyrosinase และการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 นอกจากนี้ศึกษาความคงตัวของสารสกัดที่ถูกเก็บในอุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการทำงานของ mushroom tyrosinase และ cellular tyrosinase และยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ได้ดีกว่าสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และพบสาร oxyresveratrol ของสารสกัด Al 95 มีมากกว่าสารสกัด Al 70 สำหรับสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95) และสกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70) เมื่อเปรียบเทียบกัน สารสกัด Gg 95 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ mushroom tyrosinase ได้ดีกว่าสารสกัด Gg 70 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบ phenolic และflavonoid และพบสาร glabridin มากกว่าสารสกัด Gg 70 แต่ฤทธิ์ในการยับยั้ง cellular tyrosinase และลดการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ไม่แตกต่างกัน ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ B16 พบว่า สารสกัด Al 70 และ Al 95 ที่ความเข้มข้น ≤ 0.1 mg/ml และสารกสัด Gg 70 และ Gg 95 ที่ความเข้มข้น ≤ 0.8 mg/ml ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ B16 จึงได้เลือกสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ศึกษาฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้ง tyrosinase และลดการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 พบว่า การผสมสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยเฉพาะที่น่าสนใจฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารสกัด Al 95 และสารสกัด Gg 95 ในอัตราส่วน 9:1 สามารถลดการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ได้ถึง 53 % ดีกว่าการใช้สารสกัด Al 95 หรือ Gg 95 ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่ง

สารสกัด Al 95 ยับยั้งการสร้างเมลานินได้เพียง 39 % และ Gg 95 ไม่ยับยั้งการสร้างเมลานิน นอกจากนี้ยังพบว่า การเก็บสารสกัดไว้นาน 4 สัปดาห์ และอยู่ในที่อุณหภูมิสูงถึง 45 ^{o}C มีผลทำให้สารประกอบ phenolic และflavonoid และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้ง mushroom tyrosinase ของสารสกัดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) จึงแนะนำควรเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิต่ำ (≤ 4 ^{o}C) จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรก แสดงให้เห็นว่าสารสกัดแก่นมะหาดและสารสกัดรากชะเอมเทศสามารถออกฤทธิ์ร่วมกันได้ ซึ่งมีแนวโน้มนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไป

Research Title	Study of activities of *Glycyrrhiza glabra* and *Artocarpus lakoocha* to inhibit melanogenesis for developing whitening cream
Researcher	Assoc.Prof. Tasanee Panichakul, Ph.D. Asst.Prof. Prasit Suwannalert, Ph.D. Nattaporn Boohuad, M.Sc. Rittipun Rungruang, M.Sc. Piyawan Youdee, M.Sc.
Organization	Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University
Year	2018

Artocarpus lakoocha (Al) and *Glycyrrhiza glabra* (Gg) have been reported that these extracts had tyrosinase inhibitory activity and reduced melanin pigment. The study of combination of Al and Gg extracts is the one alternative approach for enhancing activity. Al and Gg were extracted in 70 and 95 % ethanol. These extracts were determined phenolic and flavonoid compounds and analyzed oxyresveratrol and glabridin by Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC), and tested cytotoxicity, cellular tyrosinase inhibitory activity and reduced melanin pigments in melanoma B16. In addition, the stability of Al and Gg extracts was also evaluated at 4, 25 and 45 ^{O}C for 4 weeks.

Results showed that Al 95 had significantly higher antioxidant, mushroom and cellular tyrosinase inhibitory activities, and more reduced melanin pigments in melanoma B16 than those of Al 70 ($p < 0.01$) which were relevant to the high levels of phenolic compounds and oxyresveratrol found in Al 95. For Gg extracts, the results showed that Gg 95 could significantly inhibit oxidative stress, mushroom tyrosinase better than that activities of Gg 70 ($p < 0.01$) and this was relevant to high levels of phenolic and flavonoid compounds and glabridin found in Gg 95. But cellular tyrosinase inhibitory activity and reduction of melanin pigments in B16 cells of Gg 95 and Gg 70 were not different. Cytotoxicity against B 16 cells was not found in testing with either Al at concentrations ≤ 0.1 mg/ml or Gg at concentrations ≤ 0.8 mg/ml. From these results, Al 95 and Gg 95 were selected to test the synergistic activity for reducing melanin pigments in B 16 cells. In combination between Al 95 and Gg 95 in various ratios at final concentration of 0.1 mg/ml, all combined Al 95 and Gg 95 were not cytotoxic to B 16 cells. Interestingly, the combined Al 95 and Gg 95 at ratio 9 : 1 in final concentration 0.1 mg/ml had significantly higher mushroom tyrosinase

inhibitory activities and more reduced melanin pigments up to 53 % in melanoma B16 ($p < 0.01$), compared to controls which 35 % melanin pigment reduction by 0.1 mg/ml of Al 95 and no reduction of melanin pigments by 0.1 mg/ml of Gg 95. In addition, Al and Gg extracts kept at 45 ^{O}C for 4 weeks, the levels of phenolic and flavonoid compounds, and antioxidant and tyrosinase inhibitory activities were significantly reduced ($p < 0.01$) and this suggests that extracts must be stored at low temperature (≤ 4 ^{O}C). This is the first study to show the synergistic activity of combined Al and Gg extracts to reduce melanin pigments in melanoma B16 and this will be an alternative way and useful for applying in cosmetic.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2560 มหาวิทยาลัยสวนดุสิต คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ที่สนับสนุนให้ใช้ห้องปฏิบัติการกลาง ห้องปฏิบัติการเคมี และห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง สำหรับการทำงานวิจัย ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย อาจารย์ เจ้าหน้าที่ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่มีส่วนช่วยเหลือและแนะนำในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ และในการสกัดสาร ขอขอบคุณ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในอนุเคราะห์การเพาะเลี้ยงเซลล์ ขอขอบคุณพ.ท.ศราวุธ จินดารัตน์ ภาควิชาเภสัชวิทยา วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า กรุณาอนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์สาร และขอขอบคุณอาจารย์หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ในการใช้ความร่วมมือช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่าง ๆ จึงทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ สุดท้ายขอขอบคุณครอบครัวที่ให้กำลังใจและดูแลในระหว่างทำงานวิจัยมาโดยตลอด

คณะผู้วิจัย
2561

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ค
กิตติกรรมประกาศ จ
สารบัญ ฉ
สารบัญตาราง ฌ
สารบัญภาพ ญ

บทที่ 1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญ 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
สมมุติฐานการวิจัย 2
ขอบเขตการวิจัย 3
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
มะหาด (Monkey jack) 5
กลุ่มสารที่พบในมะหาด 7
กลุ่มสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) 7
กลุ่มสติลบินอยด์ (stibenoids) 7
สารกลุ่มไทรเทอร์พินอยด์และสเตียรอยด์ (triterpenoids and steroids) 7
สารกลุ่มเลคติน (lectins) 7
ชะเอมเทศ (Liquorice หรือ Licorice) 8
กลุ่มสารประกอบที่พบในชะเอมเทศ 9
เอนไซม์ไทโรซิเนส 10
เมลานิน (Melanin) 10
ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดสมุนไพรในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับผิว 11
กรอบแนวคิดในการวิจัย 12

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 13
การสกัดแก่นของมะหาดและรากของชะเอมเทศ 13

หน้า

การทดสอบการละลายของสารสกัดแก่นมะหาดและรากชะเอมเทศ 13
การหาปริมาณสาร phenolics และ flavonoids 13
การวิเคราะห์สารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศโดยวิธี HPLC 14
การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 15
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาด ในการยับยั้ง tyrosinase 15
การทดสอบความคงตัวของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ 16
การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาด ต่อเซลล์ melanoma B16 16
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาดในการยับยั้ง การสร้างเมลานินในเซลล์เมลาโนมา B16 (melanoma B16) 16
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาดในการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ในเซลล์เมลาโนมา B16 17
การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ 18
วิเคราะห์ข้อมูล 18

บทที่ 4 ผลการวิจัย 19
ความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด (λmax) ของสารสกัดหยาบมะหาดและชะเอมเทศ 19
ความสามารถละลายของสารสกัดในตัวทำละลายน้ำ ethanol และ propylene glycol 20
ปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid พบในสารสกัดหยาบมะหาดและชะเอมเทศ 25
สารที่พบในสารสกัดหยาบมะหาดและชะเอมเทศวิเคราะห์โดย UHPLC 28
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดหยาบมะหาดและชะเอมเทศ 29
ฤทธิ์ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (mushroom tyrosinase) 30
ความคงตัวของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ 31
ความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดต่อเซลล์เมลาโนมา B16 (melanoma B16 cells) 35
ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) และการสร้างเม็ดสีในเซลล์เมลาโนมา B16 (melanoma B16 cells) 37

หน้า

	ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) และการสร้างเม็ดสีในเซลล์เมลาโนมา B16 (melanoma B16 cells)	39
บทที่ 5	**สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ**	43
	สรุปผลการวิจัย	43
	อภิปรายผล	44
	ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้	47
	ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป	47
บรรณานุกรม		48
	บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	48
ภาคผนวก		54
	ภาคผนวก เอกสารคำขอรับอนุสิทธิบัตร	55
ประวัติผู้วิจัย		63

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ปริมาณของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ได้คิดเป็นร้อยละ (% yield)	19
4.2	ความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด (λmax) ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV – Visible Spectrophotometer	20
4.3	ความเป็นกรดด่าง (pH) ของสารละลายของสารสกัดมะหาดและสารชะเอมเทศในตัวทำละลายน้ำ และ propyleneglycol	25
4.4	ปริมาณสารประกอบ phenolic ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ	26
4.5	ปริมาณสารประกอบ flavonoid ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ	27
4.6	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ	30
4.7	ฤทธิ์ของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	31

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แก่นมะหาด (ถ่ายภาพวันที่ 30 มิถุนายน 2559)	6
2.2	โครงสร้างทางเคมีของ oxyresveratrol และ resveratrol	6
2.3	รากชะเอมเทศ (ถ่ายภาพวันที่ 30 มิถุนายน 2559)	9
2.4	โครงสร้างทางเคมีของ glabridin, glabrene และ isoliquiritigenin	9
2.5	กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน	11
4.1	ความสามารถละลายของสารสกัดในน้ำ และ ethanol สารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศสกัดด้วย 95 และ 70 % ethanol ถูกละลายในน้ำ (A, C) และละลายใน absolute ethanol (B, D)	21
4.2	ความสามารถละลายของสารสกัดใน propyleneglycol (PG) สารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศสกัดด้วย 95 และ 70 % ethanol	22
4.3	กราฟการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λmax ของสารสกัดที่ละลายใน propyleneglycol (PG), A) สารสกัดมะหาดสกัดด้วย 95 และ 70 % ethanol, B) สารสกัดชะเอมเทศสกัดด้วย 95 และ 70 % ethanol	23
4.4	ความสามารถละลายของสารสกัดผสมกันระหว่างสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศใน propyleneglycol (PG) สารถูกสกัดด้วย 95 % ethanol (A-C), A) สารสกัดมะหาด, B) สารสกัดมะหาดผสมกับสารสกัดชะเอมเทศ และ C) สารสกัดชะเอมเทศ; สารสกัดด้วย 70 % ethanol (D-F), D) สารสกัดมะหาด, E) สารสกัดมะหาดผสมกับสารสกัดชะเอมเทศ และ F) สารสกัดชะเอมเทศ	24
4.5	กราฟมาตรฐานของสาร Gallic acid (standard curve of Gallic acid)	26
4.6	กราฟมาตรฐานของสาร Quercetin (standard curve of Quercetin)	27
4.7	Chromatogram ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ วิเคราะห์ด้วย UHPLC ที่ความยาวคลื่น 280 nm, A) แสดง chromatograms ของสารมาตรฐาน Gallic acid, Oxyresveratrol, Resveratrol และ Glabridin และ chromatograms ของสารสกัดมะหาดสกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95) และสกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70) พบ Gallic acid (1), Oxyresveratrol (2) และ Resveratrol (3); B) chromatograms ของสารมาตรฐาน Gallic acid, Oxyresveratrol, Resveratrol และ Glabridin และ chromatograms ของสารสกัดชะเอมเทศสกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95) และสกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70) พบ Gallic acid (1), และ Glabridin (2)	29

ภาพที่ หน้า

4.8 สารประกอบ phenolic ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ถูกเก็บในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Al 70 และ Al 95), และสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Gg 70 และ Gg 95) ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 32

4.9 สารประกอบ flavonoid ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ถูกเก็บในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Al 70 และ Al 95), และสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Gg 70 และ Gg 95) ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 33

4.10 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ถูกเก็บในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Al 70 และ Al 95), และสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Gg 70 และ Gg 95) ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 34

4.11 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ถูกเก็บในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Al 70 และ Al 95), และสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Gg 70 และ Gg 95) ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ 35

4.12 ความเป็นพิษของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศต่อเซลล์เมลาโนมา B16, A) สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Al 70 และ Al 95), B) สารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Gg 70 และ Gg 95), * ค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.01$ 36

4.13 ฤทธิ์ของสารสกัดมะหาดในการยับยั้งการสร้างเมลานิน และเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์เมลาโนมา B16, A) การยับยั้งการสร้างเมลานินของสารสกัดมะหาด, B) การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70) และสกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95), * ค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.01$ 38

4.14 ฤทธิ์ของสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งการสร้างเมลานิน และเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์เมลาโนมา B16, A) การยับยั้งการสร้างเมลานินของสารสกัดชะเอมเทศ, B) การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70)และสกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95) 39

4.15 ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส กราฟแสดงสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95) และสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95) ที่ถูกผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ สามารถยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนส, * ค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.01$ 40

4.16 ความเป็นพิษร่วมของสารสกัดมะหาด (Al 95) ผสมกับสารสกัดชะเอมเทศ (Gg 95) ต่อต่อเซลล์เมลาโนมา B16 41

ภาพที่ หน้า

4.17 ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งการสร้างเมลานินและเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์เมลาโนมา B16 A) ภาพเม็ดสีเมลานิน (สีดำ) สร้างจากเซลล์เมลาโนมา B16 (สีชมพู) ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดมะหาด (Al 95) และชะเอมเทศ (Gg 95) ภาพกำลังขยาย x 400, B) กราฟแสดงปริมาณของเม็ดสีเมลานินที่สร้างจากเซลล์เมลาโนมา B16 และ C) กราฟแสดงการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสภายในเซลล์เมลาโนมา B16 โดยเซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศที่ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ และในอาหารที่ไม่มีสารสกัด, * ค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.01$ 42

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญ

ความผิดปกติของสีผิว (hyperpigmentation disorder) ได้แก่ ฝ้า กระ จุดด่างดำที่ผิวเมื่ออายุมากขึ้น สาเหตุเกิดจากเมลาโนไซต์ที่สร้างเม็ดสี เรียกว่า เมลานิน (melanin) ถูกกระตุ้นจึงทำให้มีเมลานินมากเกินส่งผลทำให้สีผิวหมองคล้ำ ซึ่งเป็นปัญหาทางวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

เมลานินแบ่งออกได้เป็นสองชนิด ได้แก่ pheomelanin และ eumelanin ซึ่งกระบวนการสร้างเมลานินต้องใช้กรดอะมิโน tyrosine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ โดยมีเอ็นไซม์ tyrosinase ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน tyrosine ให้เป็น dihydroxyphenylalanine (DOPA) และเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น DOPA aquinone เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสาร pheomelanin และ eumelanin ซึ่งกลไกการสร้างเม็ดสีเกิดจากการทำงานของ tyrosinase จึงนำมาสู่ความพยายามลดการสร้างเม็ดสีโดยใช้สารเคมี ได้แก่ arbutin เป็นสารกลุ่ม glycoside ที่สามารถสกัดได้จากพืชหรือการสังเคราะห์ (Carmen et al., 2009) ซึ่ง arbutin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ tyrosinase และการสร้างเม็ดสี แต่มีรายงานวิจัย พบว่า arbutin เป็นสารก่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Li et al., 2011) จึงได้มีการศึกษาหาสารสกัดจากพืชชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน จากหลายงานวิจัยพบว่า สารสกัดจากชะเอมเทศ (Liquorice หรือ Licorice) ชื่อวิทยาศาสตร์: *Glycyrrhiza glabra* และมะหาด (Lakoocha หรือ Monkey jack) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Artocarpus lakoocha* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ tyroninase (Kim et al., 2010; Nguyen et al., 2012; Dej-Adisai et al., 2014; Lathiff et al., 2015) ซึ่งสารสกัดจากมะหาด พบสาร oxyresveratrol เป็นสารกลุ่ม stilbenoid และพบสารกลุ่ม flavonoid (Maneechai et al., 2012; Tengamnuay et al., 2006; Maneechai et al., 2009) สำหรับสารสกัดจากชะเอมเทศ พบสาร glabridin เป็นสาร isoflavane อยู่ในกลุ่มของสาร isoflavonoid (Somjen et al., 2004; Tamir et al., 2001) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase (Callender et al., 2011; Leyden et al., 2011) และสามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์เมลาโนมาบี 16 (melanoma B16 cells) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเมลานิน (Yamauchi et al., 2014; Lan et al., 2013; Jung et al., 2001) นอกจากนี้สารสกัดมะหาดและชะเอมเทศได้ถูกนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับลดสีผิว (Arung et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ลดฝ้า กระ จุดด่างดำ หรือสีผิวที่หมองคล้ำ มักพบปัญหาประสิทธิภาพไม่คงที่ (unstable) เนื่องจากสารสำคัญในผลิตภัณฑ์เสื่อมสภาพ สารสกัดจากมะหาดและชะเอมเทศอยู่ในกลุ่มของสาร phenolic และ flavonoid มีความไวต่อการสลายตัวเนื่องจาก

โครงสร้างของสารกลุ่มนี้ไวต่อพีเอช อุณหภูมิ แสง และสามารถรวมตัวกับสารอื่น จึงเป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์

ในการวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาสารประกอบของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาด โดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์ในการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) และลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin) ในเซลล์เมลาโนมา B16 (melanoma B16) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเมลานิน และที่น่าสนใจงานวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดชะเอมเทศและมะหาดในการยับยั้ง tyrosinase และการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16 นอกจากนี้ศึกษาความคงตัวของสารสกัดโดยวัดประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase ของสารสกัดเมื่อถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างกัน การศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเรียนรู้ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดชะเอมเทศและมะหาด เพื่อนำไปศึกษาในงานวิจัยปีที่ 2 ในการทำ encapsulation ของสารสกัดทั้งสองชนิด และงานวิจัยปีที่สาม การพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศ พร้อมการประเมินตำรับครีมต้นแบบในการลดสีผิวและความปลอดภัยในกลุ่มอาสาสมัคร จากการศึกษาครั้งนี้เป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและสามารถนำความรู้ไปต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพร

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์และฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาด เทียบกับฤทธิ์ชะเอมเทศหรือมะหาดอย่างเดียวในการยับยั้งการสร้างเมลานิน (งานวิจัยปีแรก)

2.2 การรักษาความคงตัวของสารสกัดชะเอมเทศและมะหาดโดยการทำ encapsulation (งานวิจัยปีที่สอง)

2.3 การพัฒนาตำรับครีมต้นแบบที่มีส่วนผสมของสารสกัดชะเอมเทศและมะหาดในรูป encapsulation (งานวิจัยปีที่สาม)

3. สมมุติฐานการวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีผิว และการรักษาฤทธิ์ของสารสกัดด้วยการทำ liposome encapsulation เพื่อนำไปพัฒนาตำรับครีมต้นแบบที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาดในรูป liposome เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและเป็นการลดการนำเข้าสารสกัดที่มีราคาแพง

4. ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้เป็นงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาการเรียนรู้เปรียบเทียบฤทธิ์และฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดชะเอมเทศและมะหาด การทำ liposome encapsulation เพื่อแก้ปัญหาการไม่คงตัวของสารและการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบครีมลดสีผิว พร้อมทั้งทำการประเมินตำรับครีมต้นแบบที่มีประสิทธิภาพในการลดสีผิวและความปลอดภัยในการใช้ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มอาสาสมัคร ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี โดยมีขอบเขตการดำเนินการวิจัยในปีแรก ดังนี้

ขอบเขตการดำเนินการปีที่ 1 การศึกษามีแนวทางดำเนินงานดังนี้ ใช้แก่นของมะหาดจากจังหวัดปราจีนบุรี เทียบกับตัวอย่าง *Artocarpus lakoocha* (SN241805) พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์พืช รากของชะเอมเทศซื้อจากร้านเวชพงศ์โอสถ ถนนจักรวรรดิ กรุงเทพฯ ซึ่งนำเข้าจากเมืองซินเกียง ประเทศสาธารณประชาชนจีน ผงแก่นมะหาดและผงรากชะเอมเทศถูกสกัดด้วย ethanol และการวิเคราะห์สารประกอบของสารสกัดด้วยเครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน เพื่อเน้นการตรวจหาปริมาณสาร Oxyresveratrol และสาร Glabridin เป็นสารสำคัญที่พบในสารสกัดหยาบมะหาดและชะเอมเทศ ตามลำดับ ในการสกัดแต่ละครั้ง ซึ่งเป็นการควบคุมคุณภาพของสารสกัด

นำสารสกัดที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติการละลาย และเปรียบเทียบฤทธิ์และฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาดในการยับยั้ง tyrosinase และการสร้างเมลานิน ดังนี้

- ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ tyrosinase ด้วยวิธี mushroom tyrosinase assay
- ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ melanoma B16 ด้วยวิธี cytotoxic
- ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานิน ด้วยวิธี melanin content assay ใน melanoma B16 cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเมลานิน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างเมลานิน

วิเคราะห์ผลและเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดมะหาดหรือชะเอมเทศ และส่วนผสมของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase และการสร้างเม็ดสีของเซลล์เมลาโนมา B16 และที่ความเข้มข้นนั้นไม่มีผลทำให้เซลล์เมลาโนมา B16 ตาย หลังจากนั้นนำไปพัฒนาทำ Liposome encapsulate ของสารสกัดในงานวิจัยปีที่ 2 และพัฒนาตำรับในปีที่สาม

5. คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

สารสกัดมะหาด หมายถึง สารสกัดที่ได้จากการสกัดผงแก่นมะหาด ซึ่งสารสกัดที่ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract)

สารสกัดชะเอมเทศ หมายถึง สารสกัดจากผงของรากชะเอมเทศ ซึ่งสารสกัดที่ได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract)

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

6.1 ได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบเพื่อต่อยอดในเชิงพาณิชย์
6.2 เผยแพร่ในวารสาร
6.3 การจดอนุสิทธิบัตรสูตรตำรับต้นแบบ
6.4 นำมาบูรณาการในการเรียนการสอนในเชิงปฏิบัติการกับนักศึกษาหลักสูตรเครื่องสำอาง
6.5 ผู้ประกอบการหรือผู้สนใจนำไปใช้ประโยชน์

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ฝ้า กระ จุดด่างดำที่ผิวทำให้ผิวที่หมองคล้ำเกิดจากเมลาโนไซต์ถูกกระตุ้นสร้างเม็ดสี เรียกว่า เมลานิน (melanin) มากเกินจนเป็นจุดบางพื้นที่ของผิว จึงเป็นปัญหาของผิวของหลายคน เมลานินแบ่งออกได้เป็นสองชนิด ได้แก่ pheomelanin และ eumelanin ซึ่งกระบวนการสร้างเมลานินนี้ต้องใช้กรดอะมิโน tyrosine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ โดยมีเอ็นไซม์ tyrosinase ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน tyrosine ให้เป็น dihydroxyphenylalanine (DOPA) และเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น DOPA aquinone เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสาร pheomelanin และ eumelanin ซึ่งกลไกการสร้างเม็ดสีเกิดจากการทำงานของ tyrosinase จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการสร้างเมลานิน หลายงานวิจัย พบว่า สารสกัดจากชะเอมเทศ (Liquorice หรือ Licorice) ชื่อวิทยาศาสตร์: *Glycyrrhiza glabra* และมะหาด (Lakoocha หรือ Monkey jack) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Artocarpus lakoocha* หรือ *Artocarpus lacucha* Roxb. มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ tyroninase (Kim et al., 2010; Nguyen et al., 2012; Dej-Adisai et al., 2014; Lathiff et al., 2015)

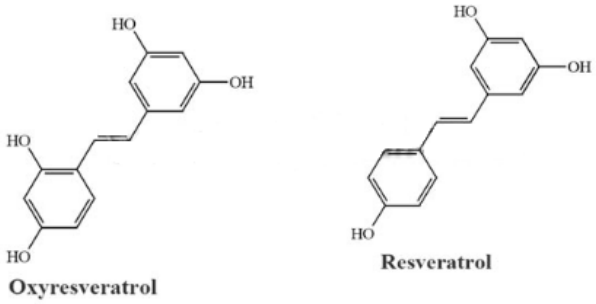
1. มะหาด (Monkey jack)

มะหาด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Artocarpus lakoocha* Roxb. อยู่ในวงศ์ Moraceae พบในหลายพื้นที่และมีชื่อเรียกต่างกัน ภาคเหนือเรียก หาดหนุน หรือ ปวกหาด ภาคใต้เรียก มะหาด และภาคกลางเรียกหาด มะหาดเป็นไม้ยืนต้น มีเปลือกสีน้ำตาลไหม้ ส่วนยอดเป็นพุ่มหนา ใบเดี่ยวขอบใบมีริ้วรอบและมีขน มีดอกสีขาวอมเหลือง และมีผลสีเขียวรูปร่างกลมแป้นใหญ่ ประโยชน์ของมะหาดส่วนแก่น (ภาพที่ 2.1) แก้ปวดหลัง ขับถ่ายตัวพยาธิ แก้อาการท้องผูก และทาแก้ผื่นคัน ส่วนรากใช้ลดอาการไข้และขับถ่ายพยาธิ และเปลือกใช้ลดอาการไข้ สารสกัดจากแก่นมะหาด ประกอบด้วยสารกลุ่มสติลบินอยด์ (stilbenoid) และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ในกลไกการสร้างเม็ดสี (melanogenensis) (Maneechai et al., 2012; Tengamnuay et al., 2006; Maneechai et al., 2009) สารสกัดจากใบมะหาด พบว่า มีสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids), 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-8-prenylflavanone, isobavachalcone, artocarpin pyranocyclo-artobiloxanthone A, chaplashin และ cycloartocarpin สารสกัดมะหาดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase (Lathiff et al., 2015) นอกจากนี้สารสกัดมะหาดยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส ต้านการอักเสบ และใช้ในการรักษาสิว สาร oxyresveratal, resveratrol แสดงในภาพที่ 2.2 เป็นสารสำคัญที่พบในสารสกัดมะหาด และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไทโรซิเนสและ

ยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Shin et al., 1998; Likhitwitayawuid, 2008) แต่สารเหล่านี้ พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) (Likhitwitayawuid et al., 2006) นอกจากมะหาด (*Artocarpus lakoocha*) ยังพบพืชชนิดอื่น ๆ ในสกุล Moraceae ที่สารสกัดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้แก่ *Maclura (Cudrania), Broussonetia, Milicia (Chlorophora)* และ *Ficus* ซึ่งสารที่สกัดได้จากพืชเหล่านี้ ได้แก่ สารคาลโชน (calchones) สารสติลบินอยด์ (stilbenoids) สารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และสารไทรเทอร์พิน (diterpenes) (Burlando et al., 2017)

ภาพที่ 2.1 แก่นมะหาด

ที่มา: ทัศนีย์ พาณิชย์กุล สร้างสรรค์เมื่อวันที่ 30 มิถุนายน 2559



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของ oxyresveratal และ resveratrol

ที่มา: Snpthai (2015)

2. กลุ่มสารที่พบในมะหาด

สารประกอบที่พบในมะหาด มีหลายชนิด ได้แก่ สารกลุ่ม flavonoids, stilbenoids, triterpenoids and steroids, lectins และสารอื่น ๆ

กลุ่มสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ในมะหาดพบ สารฟลาโวนอยด์ที่มีโครงสร้างหลักเป็น flavone ได้แก่ artocapin, noratocarpin cycloartocarpin, 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-8-prenylflavanone, isobavachalcone, pyranocycloartobiloxanthone A, artocarpin, chaplashin และ cycloartocarpin สารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase (Venkataraman., 1972; Lathiff et al., 2015)

กลุ่มสติลบินอยด์ (stilbenoids) สารที่พบในแก่นของต้นมะหาด ได้แก่ resveratrol และ oxyresveratrol (Venkataraman, 1972; Mongolsuk et al., 1957) และอาจพบสารที่เป็นอนุพันธุ์ของ resveratrol โดยมีหมู่ออกซิเจนอะตอมที่ตำแหน่ง 4, 3', 5' สารเหล่านี้มีฤทธิ์ชีวภาพหลายอย่าง เช่น ฤทธิ์ถ่ายพยาธิ (anthelmintic activity) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase (tyrosinase inhibitory activity) ฤทธิ์ต้านไวรัสเริม (antiherpetic activity) ฤทธิ์ปกป้องประสาท (neuroprotective activity) เป็นต้น สารที่พบในราก ได้แก่ lakoochin A และ lakoochin B ซึ่งมีโครงสร้างจัดเป็น benzofuran โดยมีหมู่ prenyl group (3-methyl-but-2-en-1-yl) เกาะอยู่ด้วย สารสองชนิดนี้มีฤทธิ์ปานกลางในการต้าน *Mycobacteria* (Puntumchai et al., 2004)

สารกลุ่มไทรเทอร์พินอยด์และสเตียรอยด์ (triterpenoids and steroids) เป็นกลุ่มสารที่พบในเปลือกต้นและเปลือกราก กลุ่มสารไทรเทอร์พินอยด์ (triterpenoids) ทุกชนิดที่พบ มีคาร์บอนในโครงสร้างหลัก (basic skeleton) ครบจำนวน 30 อะตอม และมีหมู่ออกซิเจนที่ตำแหน่ง 3 โครงสร้างหลักที่พบจัดเป็น oleanane lupine และ cycloartane สเตียรอยด์ ได้แก่ β-sitosterol และ stigmasterol (Chauhan & Kumari, 1979; Wetwitayaklung, 1994) มีประโยชน์ในการช่วยลดคลอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ลดคลอเรสเตอรอลชนิดเลว (LDL) และการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยสเตอรอลและสตานอลจะเข้ายับยั้งการดูดซึม ควบคุมปริมาณการละลายและการย่อยคลอเรสเตอรอลในลำไส้ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ของสาร คือ การดูดซึมกับคลอเรสเตอรอล ทำให้คลอเรสเตอรอลถูกดูดซึมไม่ได้ จึงใช้เป็นสารลดคลอเรสเตอรอล ป้องกันต่อมลูกหมากโต และผมร่วงจากกรรมพันธุ์ พบว่า Beta-sitosterol ร่วมกับ saw palmetto extract สามารถรักษาอาการผมร่วงที่มีสาเหตุมาจากเอนไซม์ 5-alpha reductase (5AR) เปลี่ยนฮอร์โมน Testosterone ไปเป็น Dihydrotestosterone (DHT) เป็นเหตุให้ต่อมรากผมหดตัวทั้งในผู้ชายและในผู้หญิงได้ผลอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อการทดลองผ่านไป 4 เดือน พบว่า 60% ของอาสาสมัครผู้เข้าร่วมทดลอง มีเส้นผมใหม่งอกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Chen et al., 2016)

สารกลุ่มเลคติน (lectins) สารกลุ่มนี้เป็น glycoproteins ที่พบในเมล็ดมะหาด สารชนิดแรกที่พบ คือ ALA เดิมเรียกว่า artocarpin (Chowdhury et al., 1991) ซึ่งบังเอิญเป็นชื่อซ้ำกันกับ

artocarpin ซึ่งเป็นกลุ่มฟลาโวนที่ได้มีการรายงานมาก่อน ในเวลาต่อมาจึงได้เปลี่ยนชื่อเรียกใหม่เป็น *Arotocarpus lakoocha* agglutinin หรือ ALA (Sigh et al., 2004)

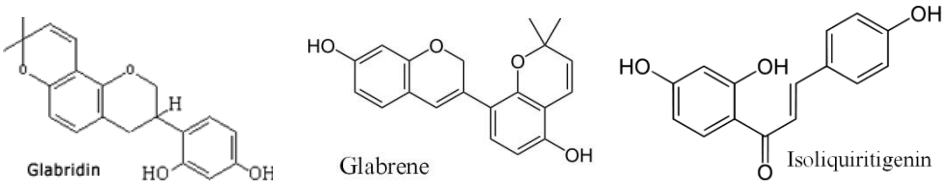
3. ชะเอมเทศ (Liquorice หรือ Licorice)

ชะเอมเทศ ชื่อวิทยาศาสตร์: *Glycyrrhiza glabra* L. อยู่ในวงศ์ Fabaceae ชื่อพื้นเมืองเรียกแตกต่างกัน ดังนี้ กำเช่า กำเช้า (จีน-แต้จิ๋ว), กันเฉ่า (จีนกลาง), ชะเอมจีน เป็นต้น ชะเอมเทศเป็นไม้ยืนต้น มีรากใหญ่แตกแขนง ใบเป็นรูปขนนก มีสีเขียวอมเหลือง ดอกเป็นช่อสีม่วงอ่อน และมีฝักแบน สรรพคุณของชะเอมเทศ ใช้ราก (ภาพที่ 2.3) และเปลือกของรากใช้เป็นยาบำรุงกำลัง ทำให้คลื่นเหียน อาเจียน ใบช่วยทำให้เสมหะแห้ง และดอกใช้รักษาพิษฝีดาษ ผลใช้เป็นยาบำรุงกำลังและทำให้คอชุ่มชื้น รากจะมีรสชุ่ม ใช้เป็นยาบำรุงปอด ขับเลือดที่เน่าในท้อง รักษาพิษยาหรือพืชพิษต่าง ๆ ชนิดคั่วแล้วรักษาอาการเบื่ออาหาร อ่อนเพลีย ตรากตรำทำงานหนัก ปวดท้อง ไอเป็นไข้ สงบประสาท บำรุงปอด ใช้รากสดรักษาอาการเจ็บคอ เป็นแผลเรื้อรัง ระบบการย่อยอาหารไม่ดี หรืออาหารเป็นพิษ และมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านโรคมะเร็ง และต้านอนุมูลอิสระ (Boqiang et al., 2005) รากแห้งของพืชชนิดนี้ใช้ทำยาระบายอ่อน ๆ หรือใช้ปรุงแต่งรส สารสกัดจากชะเอมเทศพบสารที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonids) ได้แก่ glycyrrhizic acid และ glabridin เป็นต้น (Yokota et al., 1998)

สาร glycyrrhizic acid เป็นสารที่พบมากที่สุดจากสารสกัดชะเอมเท ละลายน้ำให้รสหวาน จัดอยู่ในกลุ่ม saponin สูตรโครงสร้าง คือ C42H62O16 (Arase et al., 1997) มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λmax) เท่ากับ 254 นาโนเมตร (Patil et al., 2012) มีฤทธิ์ทางด้านชีวภาพต่าง ๆ เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) (Fujisawa et al., 2000) ป้องกันแผลในกระเพาะอาหาร (anti-ulcer) (Dehpour et al., 1995) และฤทธิ์ต้านไวรัส (antivirus activities) (Cinatl et al., 2003)

สาร glabridin glabrene และ isoliquiritigenin (ภาพที่ 2.4) อยู่ในกลุ่มของสาร isoflavonoid (Somjen et al., 2004; Tamir et al., 2001) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Tyrosinase (Callender et al., 2011; Leyden et al., 2011) และสามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีหรือเมลานินในเซลล์เมลาโนมา B16 (melanoma B16) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเมลานินและถูกเพาะเลี้ยงได้ในหลอดทดลอง จึงถูกนำมาใช้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหลายชนิด (Yamauchi et al., 2014; Lan et al., 2013; Jung et al., 2001) และยังพบว่า สาร glabridin สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยไม่ได้จับโดยตรงที่ active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งวิเคราะห์ผลได้จากการทำ molecular docking techniques (Chen et al., 2016) สารสำคัญที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน และนำมาใช้เป็นสารสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในกลุ่มผลิตภัณฑ์ไวท์เทนนิ่ง คือ สาร glabridin และ glabrene (Boqiang et al., 2005)

ภาพที่ 2.3 รากชะเอมเทศ
ที่มา: ทัศนีย์ พาณิชย์กุล สร้างสรรค์เมื่อวันที่ 30 มิถุนายน 2559



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ glabridin, glabrene และ isoliquiritigenin
ที่มา: Wikimedia commons (2015a, 2015b)

4. กลุ่มสารประกอบที่พบในชะเอมเทศ

กลุ่มสารที่พบในชะเอมเทศมีหลายชนิด สารที่พบส่วนใหญ่เป็นสารอยู่ในกลุ่ม triterpene saponins เป็นสารที่มีรสหวาน คือ สาร glycyrrhizin หรือ glycyrrhizic acid กลุ่มสาร flavonoids และ isoflavonoids ได้แก่สาร licoflavanol, kumatakenin, licoricone, glabrol, glyzarin, licoisoflavones A, B, licoisoflavone และสารอื่นๆได้แก่ glycerol, formonometin, liquirtigenin, liquiritin, neoliquirtin, polysaccharides, sterols, asparagin เป็นต้น (Van, 1977) กลุ่มสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งพบว่า สารในกลุ่ม isoflavones มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เพียงเล็กน้อย พบว่า 6, 7, 4’ trihydroxyisoflavones มีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูงกว่า (Somjen et al., 2004)

5. เอนไซม์ไทโรซิเนส

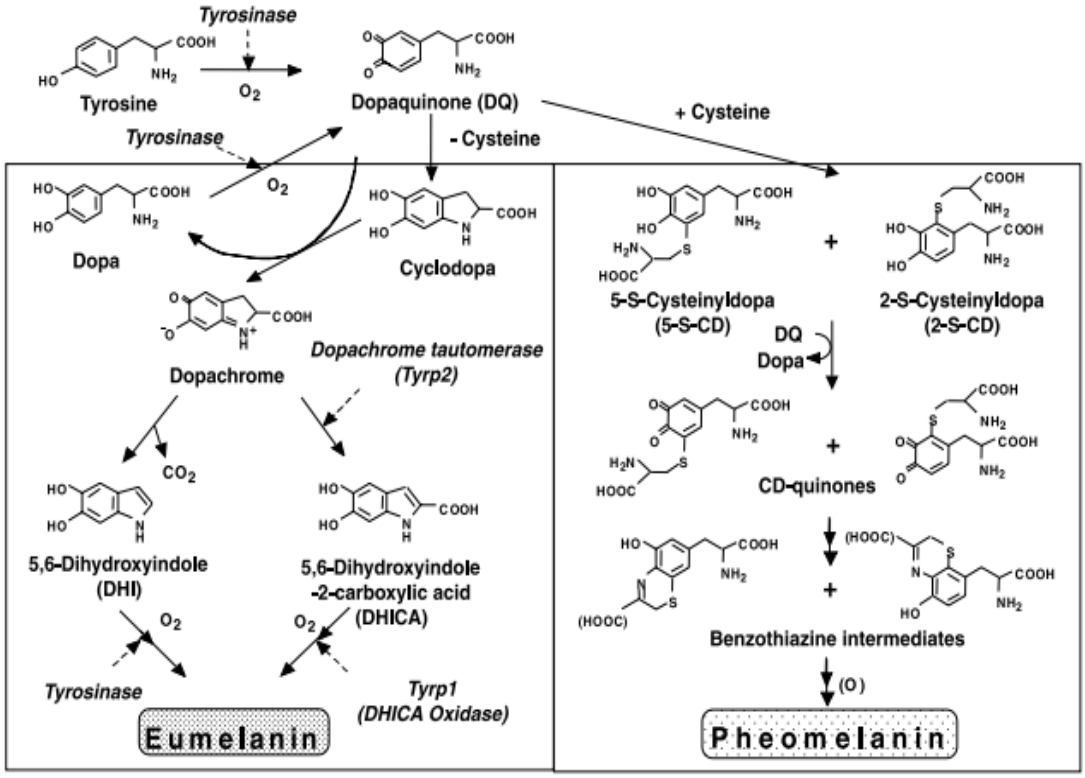
เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) เป็นเอนไซม์โมโนออกซิจิเนสที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล (copper monooxygenase enzyme) เอนไซม์นี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช เชื้อรา แมลง และสัตว์ เอนไซม์ไทโรซิเนสถูกสังเคราะห์ขึ้นใน Rough Endoplasmic Reticulum ในเซลล์เมลาโนไซท์ (melanocyte) ซึ่งเป็นเซลล์อยู่ที่บริเวณชั้นล่างสุดของหนังกำพร้า เอนไซม์ไทโรซิเนสมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างเม็ดสีเมลานินของผิวหนัง แสดงในภาพที่ 2.5 โดยทำหน้าที่เร่งการเปลี่ยนกรดอะมิโนชนิดไทโรซีน (tyrosine) ไปเป็นสารโดปาด้วยปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่น และเปลี่ยนโดปาไปเป็นโดปาควิโนน (dopaquinone) ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น จากนั้นโดปาควิโนนจะถูกเปลี่ยนผ่านสารตัวกลางอีกหลายตัว จนเกิดโพลีเมอไรเซชั่น ไปเป็นเม็ดสีเมลานิน (Ebanks et al., 2009) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นกลไกสำคัญและมีผลต่อการลดการสร้างเม็ดสีเมลานินได้

6. เมลานิน (Melanin)

เมลานิน (Melanin) เป็นเม็ดสีที่สร้างจากเซลล์เมลาโนไซต์ พบเมลานินในผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (epidermis) บริเวณรูขุมขน (hair forlicle) และในชั้นหนังแท้ (dermis layer) ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างชั้นบาเซล (basale) ที่ชั้นบาเซลพบเมลาโนไซต์ (melanocytes) ซึ่งภายในมีเมลาโนโซม (melanosome) ที่มีเม็ดสีเมลานิน กลไกการสร้างเม็ดสีเริ่มจากเอนไซม์ไทโรซิเนสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไทโรซีน (Tyrosine) ที่เป็นอะมีน (amine) อยู่ในผิวหนังเปลี่ยนเป็น indole-5,6-quinone และสารตัวกลาง (intermediates) อื่นๆ อีกหลายชนิดจะทำให้เกิดปฏิกิริยา polymerization ไปเป็น highly insoluble substance โดยสามารถรวมตัวเข้ากับโปรตีนในลักษณะเมลาโนโปรตีน (melanoprotein) อย่างหนาแน่นด้วยพันธะซัลไฟดร์ล (sulfhydryl linkage) เกิดเป็นเมลานิน เมลานินเป็นคิวนอยด์โพลีเมอร์ (quinoid polymers) สามารถแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ฟีโอเมลานิน (Phaeomelanins) ซึ่งมีสีแดงหรือสีเหลือง และยูเมลานิน (Eumelanins) ที่ประกอบด้วย indole-5,6-quinone และ intermediates ทำให้เกิดสารสีดำหรือน้ำตาล (Ebanks et al., 2009) แสดงในภาพที่ 2.5 เมื่อสร้างเม็ดสีแล้วจะถูกส่งไปยังเซลล์เคราติโนไซต์ (Keratinocyte) โดยทางร่างแห (dendritic process) ไปยังเซลล์ที่ผิวหนัง ทำให้เกิดสีผิว เมลานินทำหน้าที่ในการปกป้องแสงแดดถ้ามีมากเกินไปอาจทำให้ผิวคล้ำ เกิดฝ้า กระ

ความต่างของสีผิวหรือคนต่างเชื้อชาติกันจะมีรายละเอียดส่วนประกอบของเมลานินเหล่านี้ต่างกัน ทำให้เกิดสีผิวต่าง ๆ กันได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกรรมพันธุ์และฮอร์โมน MSH

(melanocyte stimulating hormone) และการสัมผัสกับแสงอัลตร้าไวโอเลต ฟีโอเมลานิน (pheomelanin) เป็นเม็ดสีที่มีสีแดงหรือสีเหลืองจะพบมากในบุคคลที่มีผิวขาว ยูเมลานิน (eumelanin) จะเป็นเม็ดสีที่มีน้ำตาลดำ คนที่ผิวคล้ำจะมีเม็ดสีชนิดนี้มากกว่าคนที่ผิวขาว



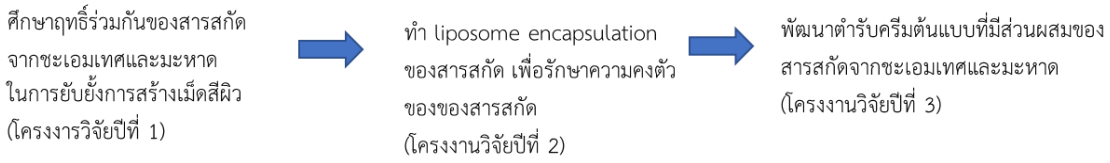
ภาพที่ 2.5 กระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน
ที่มา: Ito (2003)

7. ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดสมุนไพรในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับผิว

การศึกษาฤทธิ์ร่วมหรือการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรเป็นการประยุกต์ในการนำสมุนไพรมาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีคุณภาพ จากรายงานการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ร่วมของสารสกัดจาก *Ginkgo biloba* และ *Phorphyra umbilicalis* ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์ดูแลผิวที่มีประสิทธิภาพในการลดริ้วรอย (Gianeti & Maia Campos, 2014) ซึ่งสารสกัด *G. biloba* มีสารกลุ่ม flavonoids ได้แก่ rutin, quercetin, kaempferol และสารกลุ่ม biflavones และ terpenoids ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Draelos, 2001) และสารสกัดจาก *P. umbilicalis* มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่นกัน และการศึกษาฤทธิ์ร่วมกันในการปรับความยืดหยุ่นของผิว (skin elasticity) ของสารสกัดชาเขียว (Green tea) และ *G.biloba* ซึ่งสารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการต้าน

อนุมูลอิสระ (Maia Campos et al., 2014), การศึกษาฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนสในกลไกการสร้างเม็ดสีเมลานินจากสารสกัดจาก *Siberian larch* และสารสกัดจากผลทับทิม (pomegranate fruit) ซึ่งสารสกัดทับทิมมีสารกลุ่ม polyphenolic และสารสกัดจาก *S. larch* มีสาร Taxifolin ซึ่งสารสกัดทั้งสองมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และพบว่า สารสกัดจากสมุนไพรทั้งสองชนิดสามารถเสริมฤทธิ์กันในการลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน แต่ไม่เสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Diwakar et al., 2012) จากการศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัด *Salvia hispanica* และสารสกัดทับทิมพบว่า สารสกัดทั้งสองมีฤทธิ์ร่วมกันในการลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยมีฤทธิ์เสริมกันในการลดการแสดงออกของยีน Tyr, Tyrp1, and Mc1r ที่ควบคุมการสร้างเมลานิน (Diwakar et al., 2014) เห็นได้ว่า สารสกัดจากสมุนไพรต่างชนิดแต่มีฤทธิ์ในด้านเดียวกันสามารถออกฤทธิ์ร่วมกัน ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนสในกลไกการสร้างเม็ดสีเมลานินของสารสกัดจากมะหาดและชะเอมเทศ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ลดการหมองคล้ำของผิว

8. กรอบแนวคิดในการวิจัย



บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษามีแนวทางดำเนินงาน ดังนี้ ใช้แก่นของมะหาดได้จากจังหวัดปราจีนบุรี เทียบกับตัวอย่าง *Artocarpus lakoocha* (SN241805) พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กลุ่มวิจัยพฤกษศาสตร์และพิพิธภัณฑ์พืชสำหรับรากของชะเอมเทศซื้อจากร้านเวชพงศ์โอสถ ถนนจักรวรรดิ กรุงเทพฯ ซึ่งนำเข้าจากเมืองซินเกียง ประเทศสาธารณประชาชนจีน

1. การสกัดแก่นของมะหาดและรากของชะเอมเทศ

ในการทดลองการสกัดแก่นมะหาดและรากชะเอมเทศใช้วิธีหมักด้วยเปอร์เซ็นต์ ethanol ต่าง ๆ กัน ดังนี้ 70 และ 95 % วิธีการสกัดมีดังนี้ โดยเตรียมแก่นมะหาดและรากชะเอมเทศแห้งน้ำหนักอย่างละ 1 กิโลกรัม บดละเอียดด้วยเครื่องบด ทำการหมักในขวดแก้วสีชาที่มีฝาปิด แล้วเติม ethanol 70 และ 95 % ปริมาตร 3-4 ลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้ง 1 วัน หลังจากกรอง นำส่วนกากสมุนไพรสกัดซ้ำอีก 2 ครั้งตามวิธีที่กล่าวข้างต้น นำส่วนน้ำที่สกัดได้ทั้ง 3 ครั้งรวมกัน แล้วนำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator สารสกัดที่ได้ถูกนำไปเก็บไว้ที่ 4 °C

2. การทดสอบการละลายของสารสกัดแก่นมะหาดและรากชะเอมเทศ

การทดสอบการละลายของสารสกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ethanol และ propyleneglycol เพื่อเลือกสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างสารสกัดและตัวทำละลาย และตรวจวัดความเป็นกรดด่างของสารละลายของสารสกัด โดยทดสอบ ดังนี้

1. สารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศอย่างละ 5 มิลลิกรัม
2. สารสกัดมะหาด 2.5 มิลลิกรัม + ชะเอมเทศ 2.5 มิลลิกรัม

เติมตัวทำละลายน้ำ ethanol หรือ propyleneglycol ค่อยเติมทีละ 100 ไมโครลิตร สังเกตการละลาย เติมจนสารสกัดละลายหมด หลังจากนั้นวัดความเป็นกรดด่าง

3. การหาปริมาณสาร phenolics และ flavonoids

3.1 การหาปริมาณสาร phenolics

วิเคราะห์หาปริมาณสาร phenolics ของสารสกัดจากแก่นมะหาดและสารสกัดจากรากชะเอมเทศด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Rangsriwong et al. (2009)

ทำการทดสอบใน 96 จานหลุม (96-well plate) โดยใส่น้ำกลั่นปริมาตร 126 ไมโครลิตร เติมสารสกัดที่ละลายในเอทานอล ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร และเติม 2% Na_2CO_3 ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วเติม 50% Folin's Reagent ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Micro-plate reader (Biochrom รุ่น EZ Read 2000 ประเทศอังกฤษ) และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดแก่นมะหาดและสารสกัดรากชะเอมเทศ โดยเปรียบเทียบจาก calibration standard curve ของสาร Gallic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน โดยคิดเป็นหน่วย mg Gallic acid equivalent (mg GAE)/g extract)

3.2 การหาปริมาณสาร flavonoids

วิเคราะห์ปริมาณสาร flavonoids ของสารสกัดแก่นมะหาดและสารสกัดรากชะเอมเทศด้วยวิธี Aluminium chloride assay ดัดแปลงจากวิธีของ Meda et al. (2005) ทำการทดสอบใน 96 จานหลุม (96-well plate) โดยใส่สารสกัดที่ละลายในเอทานอล ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม 2% AlCl3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Micro – plate reader นำค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Quercetin ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน และวิเคราะห์ปริมาณสาร flavonoids เป็นหน่วย mg Quercetin equivalent/g extract

4. การวิเคราะห์สารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศโดยวิธี HPLC

สารสกัด Al 70, Al 95, Gg 70 และ Gg 95 ถูกนำมาวิเคราะห์หาสารประกอบด้วยวิธี UltraHigh Performance Liquid Chromatography (UHPLC) (Maneechai et al., 2009; Povichit et al., 2010) โดยใช้เครื่อง UHPLC รุ่น UltiMate 3000, ใช้ column รุ่น Hypersil GOLD™ aQ column (100 x 2.1 mm i.d., 1.9 µm, Thermo Scientific™) และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Thermo Scientific™ LCQUAN™ quantitative software โดยผลของสารสกัด Al 70 และ Al 95 จะถูกเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน oxyresveratrol, resveratrol, gallic acid และ glabridin โดยเตรียมสารสกัดและสารมาตรฐานละลายใน methanol ที่ความเข้มข้น 10 และ 1 mg/ml ตามลำดับ หลังจากนั้นฉีดสารด้วยปริมาตร 1 µl สารละลาย (solvent) ที่ใช้ในการแยกสารมี solvent A คือ 0.1% v/v formic acid ในน้ำ และ solvent B คือ 0.1% v/v formic acid ใน methanol กำหนดอัตราการไหล (flow rate) 0.5 ml/min แบบ gradient และ 30% solvent B linear ช่วงเวลา 0–4 นาที, 30–50% solvent B linear ช่วงเวลา 4–5 นาที, 50–70% sovent B linear ช่วงเวลา 5–8 นาที, 70–100% solvent B linear ช่วงเวลา 8–12 นาที, 100% solvent B ช่วงเวลา 12-15 นาที, 30% sovent B linear ช่วงเวลา 15–18 นาที และต่อเนื่องอีก 5 นาทีก่อนฉีด

ตัวอย่างใหม่ของสารสกัด โดยสารสกัดก่อนฉีดถูกกรองผ่านด้วย filter ขนาด 0.2 µm ใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 305 nm สำหรับสารสกัด Al 70, Al 95 และที่ความยาวคลื่น 280 nm สารสกัด Gg 70 และ Gg 95 ถูกวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน oxyresveratrol (326 nm), resveratrol (305 nm), gallic acid (272 nm) และ glabridin (280 nm)

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดแก่นมะหาดและสารสกัดรากชะเอมเทศด้วยวิธี DPPH assay ดัดแปลงมาจาก Itsarasook et al. (2014) ทำการทดสอบใน 96 จานหลุม (96-well plate) โดยใส่สารสกัดที่ละลายในเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.0156 – 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 75 ไมโครลิตร และ 0.2 mM Diphenyl - picryhydrazyl Radical (DPPH) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Micro-plate reader ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง L-Ascorbic acid เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ในการทดสอบนำผลที่ได้คิดเป็นค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสง คำนวณหาร้อยละในการต้านอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\%\ Free\ radical\ scavenging = \frac{OD_{control} - OD_{test\ sample}}{OD_{control}} \times 100$$

$OD_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

$OD_{test\ sample}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารสกัดผสมกับ DPPH

6. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาดในการยับยั้ง tyrosinase

การทดสอบใช้วิธี mushroom tyrosinase assay โดยดัดแปลงมาจาก Ko et al. (2013) ทำการทดสอบใน 96 จานหลุม (96-well plate) โดยใช้ mushroom tyrosinase (461.68 unit/ml) ในการทดสอบใส่ tyrosinase ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.0024 - 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติม 20 mM Phosphate Buffer 140 ไมโครลิตร หลังจากบ่มเป็นเวลา 10 นาที จึงเติมสาร 4 mM L-DOPA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm ด้วยเครื่อง Micro-plate reader ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง Kojic acid เป็นตัวควบคุมบวก (positive control) โดยวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการทำงานของ tyrosinase ร้อยละ 50 โดยเทียบกับหลุม control ที่ไม่มีสารสกัด

7. การทดสอบความคงตัวของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ

โดยใช้สารสกัด Al 70, Al 95, Gg 70 และ Gg 95 ปริมาณอย่างละ 500 mg ต่อขวด บรรจุในขวดที่ห่อฟอยด์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 28 วัน หลังจากครบ 7, 14, 21 และ 28 วัน นำสารสกัดมาวิเคราะห์ปริมาณ สารประกอบ phenolic และ flavonoid (ใช้วิธีทดสอบเหมือนข้อ 3 ในบทที่ 3) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ใช้วิธีทดสอบเหมือนข้อ 5 ในบทที่ 3) และยับยั้ง mushroom tyrosinase (ใช้วิธีทดสอบเหมือนข้อ 6 ในบทที่ 3) โดยวิเคราะห์ปริมาณสาร phenolic เป็นหน่วย mg Gallic acid equivalent (mg GAE)/g extract) และปริมาณสาร flavonoids เป็นหน่วย mg Quercetin equivalent/g extract สำหรับการวิเคราะห์การยับยั้งอนุมูลอิสระและการทำงานของ tyrosinase คิดเป็นร้อยละ 50 เปรียบเทียบกับหลุม control ที่ไม่มีสารสกัด

8. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศต่อเซลล์ melanoma B16

การทดสอบด้วยวิธี MTT cytotoxic assay (Stratigos & Katsambas, 2004) สารสกัดที่ได้นำมาทดสอบหาความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ความเป็นพิษทำให้เซลล์เมลาโนมา B16 (RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan) ตาย 50% (EC_{50}, effective concentration at 50 %) โดยเซลล์ B16 จำนวน 30,000 เซลล์ต่อหลุม ถูกเลี้ยงในอาหารอยู่ใน 96 หลุม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปบ่ม 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหาร แล้วเติมอาหารใหม่ 100 ไมโครลิตร ที่เติม 10 ไมโครลิตร ของ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร MTT นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากเปลี่ยนอาหาร แล้วเติม 100 ไมโครลิตร สาร DMSO เพื่อละลายสาร formazan นำไปวัดที่ ความยาวคลื่น 530 nm นำค่า OD มาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยเทียบกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัด แล้วรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต (% of cell viability)

9. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาดในการยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์เมลาโนมา B16 (melanoma B16)

การทดสอบด้วยวิธี melanin content assay (Bilodeau et al., 2001) โดยสารสกัดถูกทดสอบกับเซลล์เมลาโนมา B16 ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเมลานิน โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 150,000 เซลล์ต่อหลุม ในจานหลุมในอาหาร DMEM บ่ม 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำไปบ่ม 37 °C ต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์ถูกล้างด้วย

บัฟเฟอร์ (PBS buffer) และทำให้เซลล์แตกด้วยการเติม 100 ไมโครลิตร ของสารละลายของ 1 N NaOH, 1 % triton X-100 และ 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) และบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวัดที่ค่าดูดกลืนแสง 405 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (1420 Victor 2, Wallac, USA) โดยใช้ 20 mM hydroquinone เป็นสารควบคุมบวกในการยับยั้งการสร้างเมลานิน นำผลมาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นของเมลานินภายในเซลล์โดยการคำนวณเทียบกับเซลล์ในหลุม control ที่ไม่ใส่สารสกัด

การย้อมเซลล์ melanoma B16 ด้วยวิธี Masson-Fontana stain (Rodboon et al., 2015) โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 500,000 เซลล์ต่อหลุม ใน 6 จานหลุม ในอาหาร DMEM บ่ม 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำไปบ่ม 37 °C ต่อเนื่องเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นเซลล์ถูก fix ด้วย absolute ethanol และล้างด้วยน้ำ แล้วเซลล์ถูกแช่ใน ammoniacal silver solution เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำ หลังจากนั้นแช่ใน Sodium thiosulfate solution เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงย้อมเซลล์ด้วยสี Mayer's Carmalum stain เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ที่ถูกย้อมส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400x

10. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากมะหาดและชะเอมเทศในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ในเซลล์เมลาโนมา B16

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากมะหาดและชะเอมเทศในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์ melanoma B16 โดยวิธี dihydroxyphenylalanine (DOPA) (Lin et al., 2011) โดยเลี้ยงเซลล์จำนวน 150,000 เซลล์ต่อหลุม ใน 24 จานหลุม บ่ม 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำไปบ่ม 37 °C ต่อเนื่องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์ถูกล้างด้วยบัฟเฟอร์ (PBS buffer) และทำให้เซลล์แตกด้วยการเติม 100 ไมโครลิตร ของสารละลายของ 0.1% Triton X-100 และ 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (pH 7.5) หลังจากนั้นนำไปแช่แข็งที่ -20°C เป็นเวลา 120 นาทีและบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นความเร็วรอบ 12,000 g, ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ดูดน้ำส่วนใส 80 ไมโครลิตรต่อหลุม ใส่ลงในจาน 96 หลุม แล้วเติม 20 ไมโครลิตร ของ 20 mM L-DOPA บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวัดที่ค่าดูดกลืนแสง 492 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (1420 Victor 2, Wallac, USA) โดยใช้สาร 20 mM hydroquinone เป็นสารควบคุมบวกในการยับยั้ง tyrosinase วิเคราะห์เปอร์เซ็นของ tyrosinase ภายในเซลล์ โดยการคำนวณเทียบกับเซลล์ในหลุม control ที่ไม่ใส่สารสกัด

11. การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ

การศึกษาครั้งนี้เลือกสารสกัด Al 95 และ Gg 95 มาทดสอบฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมาB16 และฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานิน และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์ B16

1. การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ในการยับยั้ง mushroom tyrosinase โดยออกแบบการทดลองในการผสมสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ด้วยอัตราส่วน ดังนี้ 1:1, 3:1, 5:1, 7:1 และ 9:1 โดยแต่ละอัตราส่วนของสารผสมของสารสกัด Al 95 และ Gg 95 มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอ็นไซม์ tyrosinase ด้วยวิธี mushroom tyrosinase assay (ใช้วิธีทดสอบเหมือนข้อ 6 ในบทที่ 3) และวิเคราะห์ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดชะเอมเทศและมะหาดในการยับยั้งเอ็นไซม์ tyrosinase

2. การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ในการทดสอบความเป็นพิษ (ใช้วิธีทดสอบเหมือนข้อ 8 ในบทที่ 3) ฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเมลานิน (ใช้วิธีทดสอบเหมือนข้อ 9 ในบทที่ 3) และการยับยั้ง tyrosinase ในเซลล์ B16 (ใช้วิธีทดสอบเหมือนข้อ 10 ในบทที่ 3) โดยออกแบบการทดลองในการผสมสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ด้วยอัตราส่วนดังนี้ 1:1, 3:1, 5:1, 7:1 และ 9:1 โดยแต่ละอัตราส่วนของสารผสมของสารสกัด Al 95 และ Gg 95 มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml และสารสกัด Al 95 หรือ Gg 95 ที่ความเข้มข้นเดียวกันมาทดสอบกับเซลล์ B16 และวิเคราะห์ผลโดยคำนวณเทียบกับเซลล์ในหลุม control ที่ไม่ใส่สารสกัด

12. วิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลถูกนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลเชิงประมาณของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศ โดยใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ One way ANOVA กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-}value < 0.01$

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การสกัดสารจากแก่นมะหาด ชื่อวิทยาศาสตร์ *A. lakoocha* (Al) และรากชะเอมเทศ ชื่อวิทยาศาสตร์ *G. glabra* (Gg) โดยวิธีหมักด้วย 70 และ 95 % ethanol ปริมาณของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศที่ได้คิดเป็นร้อยละ (% yield) ของสมุนไพรก่อนสกัด ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากผลการสกัดสารทั้งแก่นมะหาดและรากชะเอมเทศด้วย70 และ 95 % ethanol พบว่า สารสกัดทั้งจากมะหาดและชะเอมเทศที่ถูกสกัดด้วย 70% ethanol ได้ปริมาณสารกัดมากกว่าสารสกัดที่ถูกสกัดด้วย 95 % ethanol

ตารางที่ 4.1 ปริมาณของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ได้คิดเป็นร้อยละ (% yield)

สารสกัด	% yield
มะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70)	9.703
มะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95)	8.675
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70)	8.460
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95)	8.153

1. ความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด (λ_{max}) ของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศ

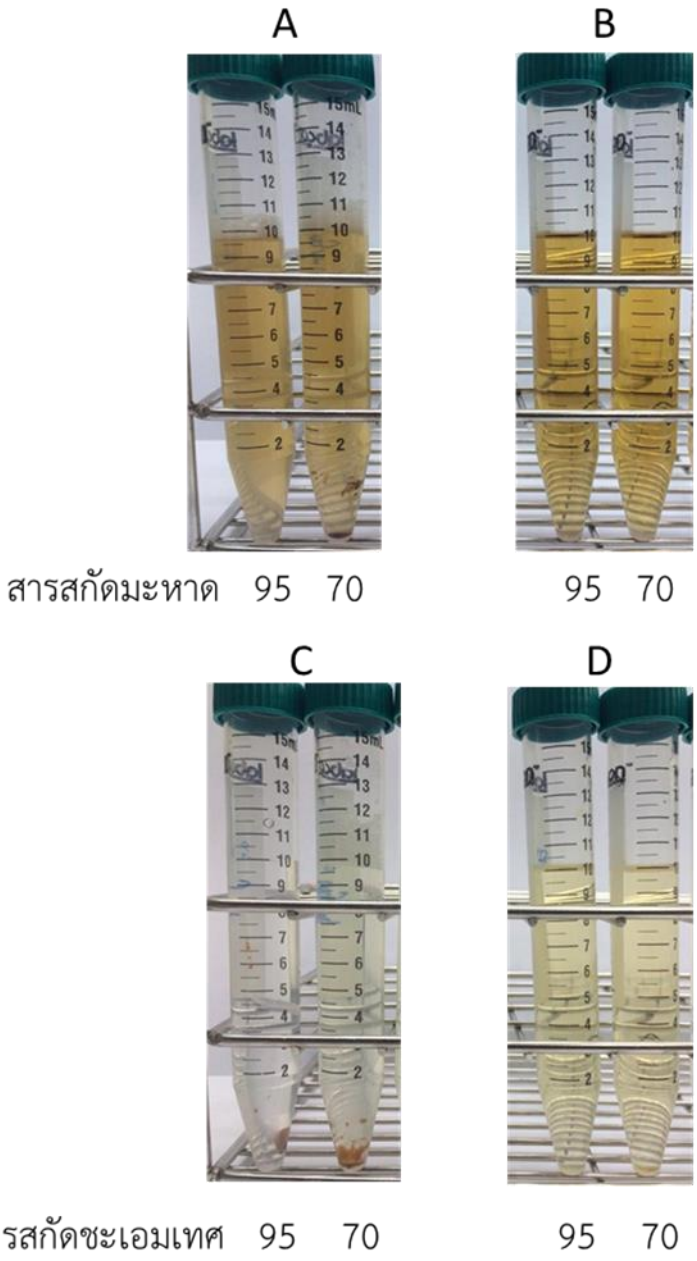
สารสกัดหยาบของมะหาดและชะเอมเทศที่ถูกสกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol ถูกนำมาวัดหาความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงมากที่สุดของสารสกัดหยาบ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัด Al 70 และ Al 95 สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด 2 ช่วงความยาวคลื่น ดังนี้ ความยาวคลื่น 326.5 nm และ 284 – 286 nm เมื่อสารละลายใน ethanol สำหรับสารสกัดชะเอมเทศสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 280 nm เมื่อสารสกัดละลายใน ethanol ยกเว้นสารสกัด Gg 95 สามารถดูดกลืนแสงมากที่สุดได้ 2 ความยาวคลื่น คือ ที่ความยาวคลื่น 312.5 และ 280 nm ในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวซึ่งใกล้เคียงกับสารที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบของ phenolic และ flavonoid (phenolic and flavonoid contents)

ตารางที่ 4.2 ความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด (λ_{max}) ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV – Visible Spectrophotometer

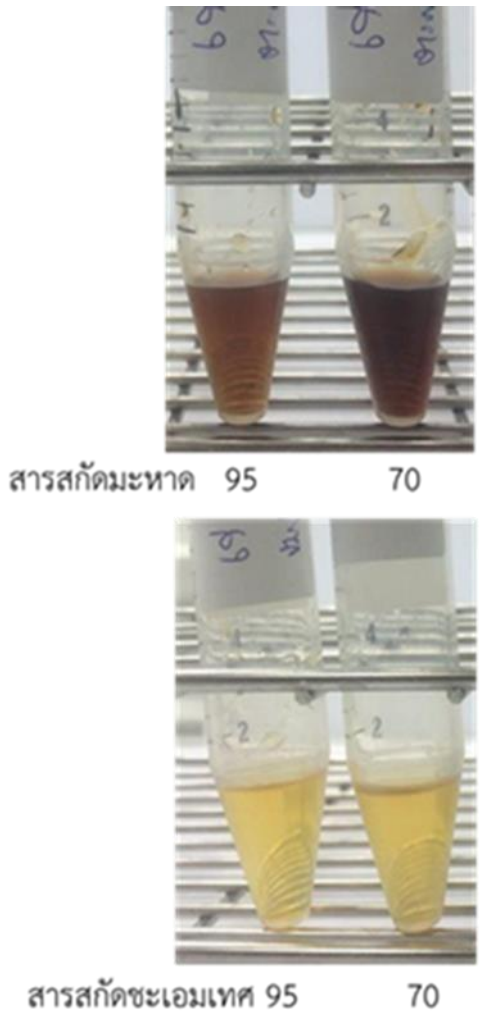
สารสกัด	Ethanol	
	$\lambda_{max\ 1}$	$\lambda_{max\ 2}$
มะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70)	326.5	284
มะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95)	326.5	286
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70)	-	280
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95)	312.5	280

2. ความสามารถละลายของสารสกัดในตัวทำละลายน้ำ ethanol และ propyleneglycol

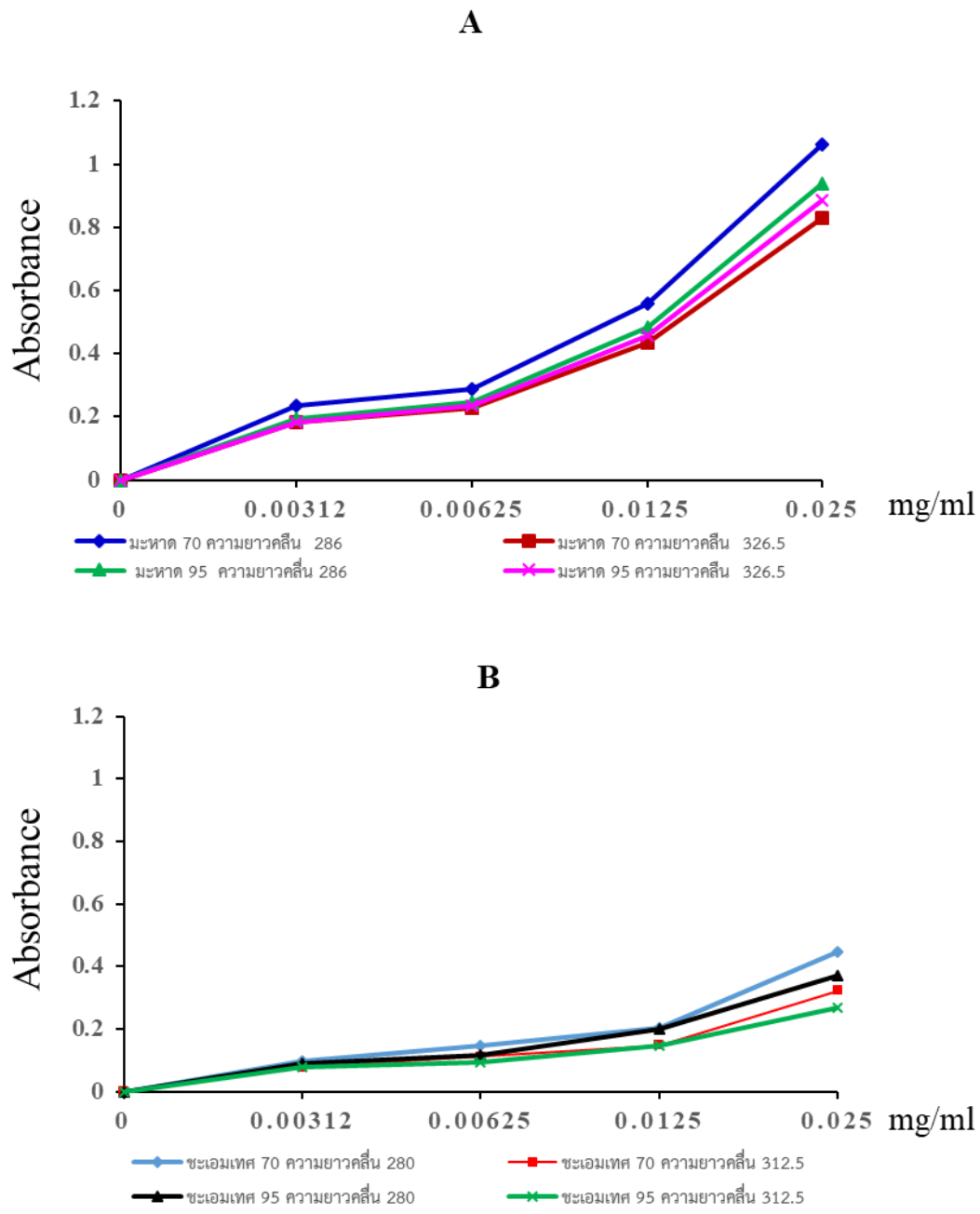
ในการทดสอบใช้สารสกัดมะหาดและชะเอมเทศปริมาณ 5 mg ถูกละลายในน้ำ และ absolute ethanol ดังแสดงในภาพที่ 4.1 พบว่า สารสกัด Al 95 ละลายหมดในน้ำ และ ethanol ด้วยปริมาตร 1 ml ส่วนสารสกัด Al 70 ละลายหมดใน ethanol ปริมาตร 1 ml แต่ละลายได้บางส่วนในน้ำ (ภาพที่ 4.1 A และ B) สำหรับสารสกัดชะเอมเทศ พบว่า สารสกัด Gg 95 ละลายได้หมดใน ethanol ปริมาตร 1 ml และละลายได้บางส่วนในน้ำ แต่สารสกัด Gg 70 ละลายได้บางส่วนทั้งในน้ำ และ ethanol แม้ว่าเติมตัวทำละลายปริมาตรถึง 10 ml (ภาพที่ 4.1 C และ D) ผลการทดสอบการละลายของสารสกัดทั้ง 4 ชนิด พบว่า สารสกัดละลายได้ในตัวทำละลายต่างกัน มีดังนี้ สารสกัด Al 95, Al 70 และ Gg 95 สามารถละลายได้ดีใน absolute ethanol และสารสกัด Al 95 สามารถละลายได้ในน้ำ ส่วนสารสกัด Gg 70 ความสามารถการละลายไม่ดีทั้งในน้ำ และ absolute ethanol ดังนั้นจึงได้เพิ่มการทดสอบการละลายของสารสกัดด้วยตัวทำละลาย propyleneglycol (PG) ดังแสดงผลในภาพที่ 4.2 พบว่า สารสกัดมะหาดและชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol ละลายได้หมดใน 1 ml propyleneglycol จึงนำสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศที่ละลายใน propyleneglycol มาเจือจางที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.00312 – 0.025 mg/ml แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λmax ของสารสกัดที่ละลายใน propyleneglycol ดังแสดงใน ภาพที่ 4.3 พบว่า สารสกัด Al 70 และ Al 95 วัดที่ความยาวคลื่น λmax ที่ 286 และ 326.5 nm มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มตามปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดที่ละลายใน propyleneglycol สำหรับสารสกัด Gg 70 และ Gg 95 เมื่อวัดที่ความยาวคลื่น λmax ที่ 280 และ 312.5 nm พบว่า มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มตามปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดเช่นกัน



ภาพที่ 4.1 ความสามารถละลายของสารสกัดในน้ำ และ ethanol สารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศสกัดด้วย 95 และ 70 % ethanol ถูกละลายในน้ำ (A, C) และละลายใน absolute ethanol (B, D)

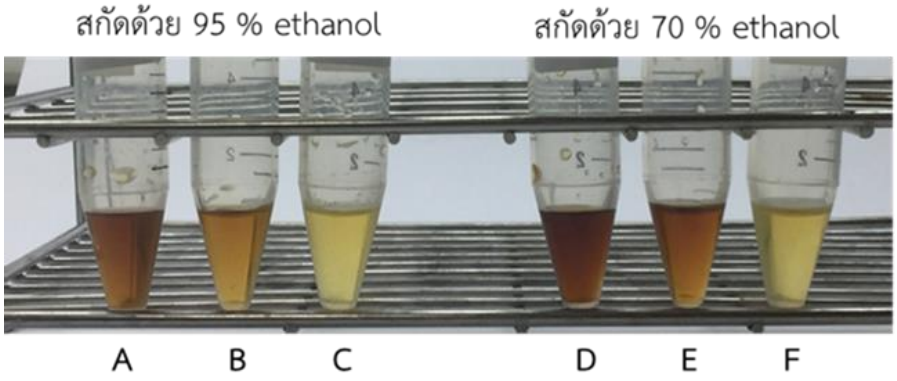


ภาพที่ 4.2 ความสามารถละลายของสารสกัดใน propyleneglycol (PG) สารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศสกัดด้วย 95 และ 70 % ethanol



ภาพที่ 4.3 กราฟการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λmax ของสารสกัดที่ละลายใน propylene glycol (PG), A) สารสกัดมะหาดสกัดด้วย 95 และ 70 % ethanol, B) สารสกัดชะเอมเทศสกัดด้วย 95 และ 70 % ethanol

จากการทดสอบการละลายทำให้ทราบว่า สารสกัดทั้ง 4 ชนิดนี้สามารถละลายได้หมดใน propylene glycol เท่านั้น จึงเลือก propylene glycol เป็นตัวทำละลายในการทดสอบการละลายผสมระหว่างสารสกัดมะหาดและสารชะเอมเทศ สารสกัดมะหาดและสารชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol ในตัวทำละลาย propylene glycol ดังแสดงในภาพที่ 4.4 พบว่า สารสกัดมะหาดและสารชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol สามารถละลายด้วยกันได้ และสารสกัดมะหาดและสารชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 % ethanol สามารถละลายด้วยกันได้เช่นกัน



ภาพที่ 4.4 ความสามารถละลายของสารสกัดผสมกันระหว่างสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศใน propyleneglycol (PG) สารถูกสกัดด้วย 95 % ethanol (A-C), A) สารสกัดมะหาด, B) สารสกัดมะหาดผสมกับสารสกัดชะเอมเทศ และ C) สารสกัดชะเอมเทศ; สารสกัดด้วย 70 % ethanol (D-F), D) สารสกัดมะหาด, E) สารสกัดมะหาดผสมกับสารสกัดชะเอมเทศ และ F) สารสกัดชะเอมเทศ

นำสารละลายของสารสกัดมะหาดและสารชะเอมเทศที่ละลายในน้ำ และ propyleneglycol วัดความเป็นกรดด่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า สารสกัด Al 95 และสารสกัด Al 70 ที่ละลายในน้ำมี pH เท่ากับ 5.6 และ 5.29 ตามลำดับ และเมื่อละลายใน propyleneglycol มี pH เท่ากับ 7.07 และ 6.56 ตามลำดับ สารสกัด Gg 95 และสารสกัด Gg 70 ละลายในน้ำมี pH เท่ากับ 6.09 และ 5.92 ตามลำดับ และเมื่อละลายใน propyleneglycol มี pH เท่ากับ 6.95 และ 6.83 ตามลำดับ พบว่า สารละลายของสารสกัดมะหาดใน propyleneglycol มีความเป็นกลาง แต่เมื่อละลายน้ำมีความเป็นกรดอ่อน ส่วนสารละลายของสารสกัดชะเอมเทศในน้ำ และ propyleneglycol เป็นความเป็นกรดอ่อน

ความเป็นกรดด่างของสารละลายผสมกันของสารสกัดมะหาดและสารชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol ในตัวทำละลาย propyleneglycol พบว่า สารละลายผสมระหว่างสารสกัด

มะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol มีค่า pH เท่ากับ 6.86 และสารละลายผสมของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 % ethanol มีค่า pH เท่ากับ 6.83 เห็นได้ว่า สารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศสามารถละลายได้ใน propyleneglycol และมีความเป็นกรดอ่อน

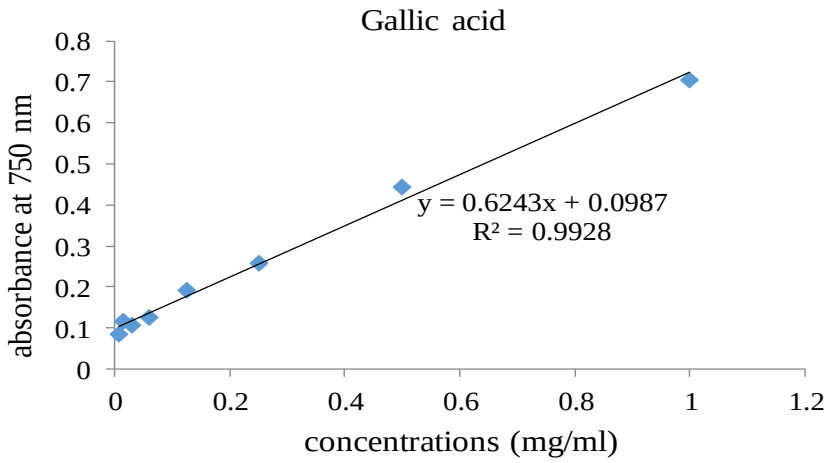
ตารางที่ 4.3 ความเป็นกรดด่าง (pH) ของสารละลายของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในตัวทำละลายน้ำ และ propyleneglycol

ตัวทำละลาย	pH			
	Al 95	Al 70	Gg 95	Gg 70
น้ำ	5.60	5.29	6.09	5.92
propylene glycol	7.07	6.56	6.95	6.83

pH ของ น้ำ = 6.01 และ pH ของ propylene glycol = 6.6, สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Al 70 และ Al 95), และสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Gg 70 และ Gg 95)

3. ปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid พบในสารสกัดหยาบมะหาดและชะเอมเทศ

3.1 ปริมาณสารประกอบ phenolic (phenolic content) ในสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศ การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ phenolic ของสารสกัดหยาบมะหาดและชะเอมเทศ โดยใช้สาร gallic acid เป็นสารมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 4.5 กราฟมาตรฐานของสาร Gallic acid สมการเส้นตรง $y = 0.6234x + 0.0987$ และ $R^2 = 0.9928$ การหาปริมาณสารประกอบ phenolic ของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศโดยวิเคราะห์จากกราฟสาร callic acid ผลดังแสดงในตารางที่ 4.4 สารสกัดมะหาดและชะเอมเทศที่ถูกสกัดด้วย 95 % ethanol มีปริมาณสารประกอบ phenolic เท่ากับ 398.44 ± 20.47 และ 215.07 ± 24.37 mg GAE/g extract ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสารที่ถูกสกัดด้วย 70 % ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P < 0.01$



ภาพที่ 4.5 กราฟมาตรฐานของสาร Gallic acid (standard curve of Gallic acid)

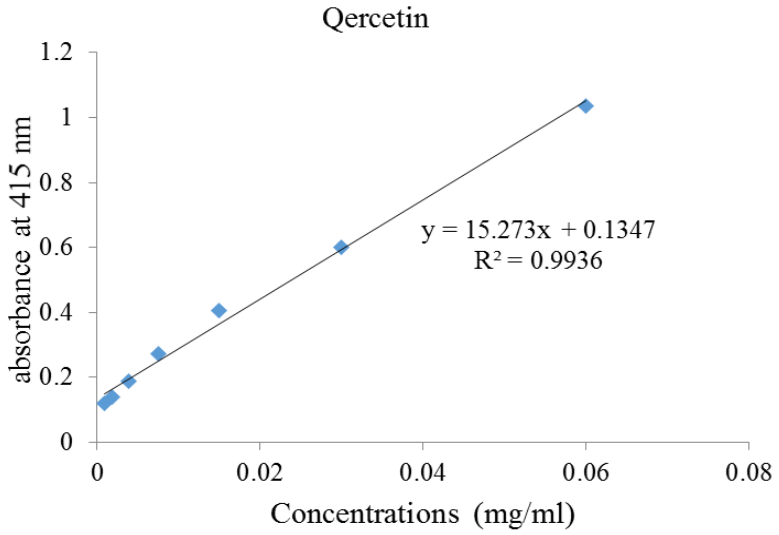
ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารประกอบ phenolic ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ

สารสกัด	**สารประกอบ phenolic เทียบกับสาร Gallic acid ใน 1 กรัมของสารสกัด (mg GAE/g extract)**
มะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70)	127.99 ± 5.22
มะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95)	398.44 ± 20.47*
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70)	90.76 ± 11.23
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95)	215.07 ± 24.37*

* $P < 0.01$

3.2 ปริมาณสารประกอบ flavonoid (total flavonoids content) ของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศ การวิเคราะห์สารประกอบ flavonoid ของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศ โดยใช้สารละลาย Quercetin เป็นสารมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 4.6 กราฟของสารมาตรฐาน Quercetin สมการเส้นตรง y = 15.273x + 0.1347 และ R^2 = 0.9936 การหาปริมาณสารประกอบ flavonoid ของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศ โดยวิเคราะห์จากกราฟสาร Quercetin ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า สารสกัด Al 95 และ Gg 95 มีปริมาณสารประกอบ flavonoid เท่ากับ 8.79 ± 0.40 และ 9.20 ± 0.84 mg Quercetin equivalent/g extract ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารที่ถูกสกัด

ด้วย 70 % ethanol พบว่า ที่สารที่ถูกสกัดด้วย 95 % ethanol มีปริมาณสารประกอบ flavonoid มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P < 0.01$



ภาพที่ 4.6 กราฟมาตรฐานของสาร Quercetin (standard curve of Quercetin)

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสารประกอบ flavonoid ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ

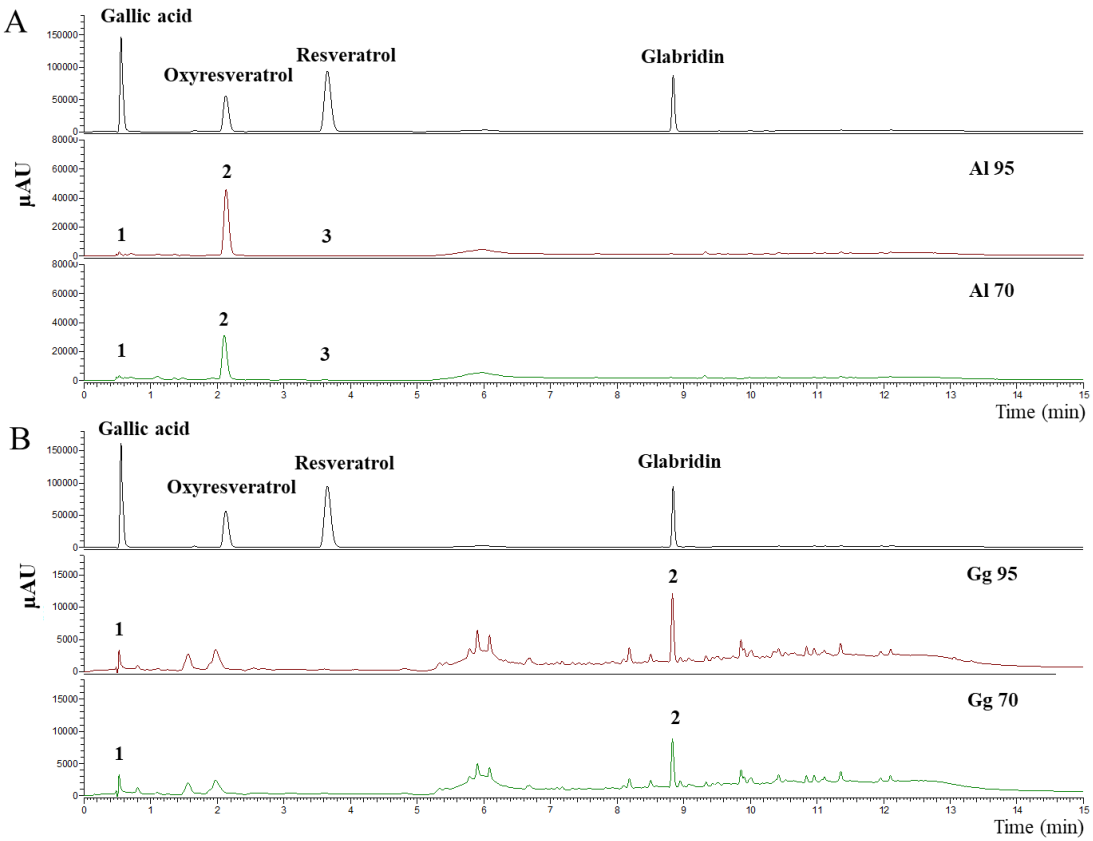
สารสกัด	**สารประกอบ flavonoid เทียบกับสาร Quercetin ใน 1 กรัมของสารสกัด (mg Quercetin equivalent/g extract)**
มะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70)	2.05 ± 0.09
มะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95)	8.79 ± 0.40*
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70)	5.87 ± 0.56
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95)	9.20 ± 0.84*

* $P < 0.01$

จากผลการหาปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid ที่พบในสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศ แสดงให้เห็นว่า การสกัดมะหาดและชะเอมเทศด้วย 95 % ethanol ได้ปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid มากกว่า การที่สารถูกสกัดด้วย 70% ethanol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าจะมี % yield ของสารสกัดต่ำกว่า

4. สารที่พบในสารสกัดหยาบมะหาดและชะเอมเทศวิเคราะห์โดย UHPLC

สารสกัดมะหาดและชะเอมเทศถูกวิเคราะห์ด้วย UHPLC โดยเทียบกับสารมาตรฐาน (standard compounds) ดังนี้ Gallic acid, Oxyresveratrol, Resveratrol และ Glabridin สำหรับวิเคราะห์สารสกัดมะหาด และ Glabridin สำหรับวิเคราะห์สารสกัดชะเอมเทศ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 จากผลการวิเคราะห์ด้วย UHPLC เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานดังกล่าว จากภาพที่ 4.7 A แสดง Chromatogram ของสารสกัด Al 70 และ Al 95 พบ Gallic acid, Oxyresveratrol, resveratrol ที่เวลา 0.56, 2.12 และ 3.75 นาที ตามลำดับ และสารสกัด Al 70 และ Al 95 มีปริมาณของสาร Gallic acid เท่ากับ 44.30 ± 1.56 และ 67.90 ± 1.73 mg/g of extract ตามลำดับ และปริมาณของสาร Oxyresveratrol เท่ากับ 113.10 ± 0.48 และ 149.58 ± 0.43 mg/g of extract ตามลำดับ และปริมาณของสาร Resveratrol เท่ากับ 11.41 ± 0.39 และ 21.80 ± 0.23 mg/g of extract ตามลำดับ จากผลแสดงให้เห็นว่า ทั้งสารสกัด Al 70 และ Al 95 พบสาร Oxyresveratrol ปริมาณมากที่สุด แต่สาร Gallic acid และ Resveratrol มีปริมาณต่ำ สำหรับผลการวิเคราะห์สารสกัดชะเอมเทศ (ภาพที่ 4.7 B) แสดง Chromatogram ของสารสกัด Gg 70 และ Gg 95 พบสาร Gallic acid และ Glabridin ที่เวลา 0.56 และ 8.84 นาที ตามลำดับ สารสกัด Gg 70 และ Gg 95 ปริมาณของสาร Gallic acid เท่ากับ 0.85 ± 0.03 และ 2.17 ± 0.03 mg/g of extract ตามลำดับ และมีปริมาณ Glabridin เท่ากับ 5.56 ± 0.11 และ 12.48 ± 0.48 mg/g of extract ตามลำดับ เห็นได้ว่า สารสกัด Gg 95 พบสาร Glabridin มากที่สุด จากผลการวิเคราะห์พบว่า การสกัดมะหาดและชะเอมเทศด้วย 95 % ethanol ได้สาร Oxyresveratrol และ Glabridin มากกว่าการสกัดด้วย 70 % ethanol และสาร Oxyresveratrol สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น (λmax) 326 nm และสาร Glabridin ดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น (λmax) 280 nm ซึ่งผลสอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์ความยาวคลื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุด (λmax) ของสารสกัดมะหาด 326.5 nm และสารสกัดชะเอมเทศ 280 nm



ภาพที่ 4.7 Chromatogram ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ วิเคราะห์ด้วย UHPLC ที่ความยาวคลื่น 280 nm, A) แสดง chromatograms ของสารมาตรฐาน Gallic acid, Oxyresveratrol, Resveratrol และ Glabridin และ chromatograms ของสารสกัดมะหาดสกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95) และสกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70) พบ Gallic acid (1), Oxyresveratrol (2) และ Resveratrol (3); B) chromatograms ของสารมาตรฐาน Gallic acid, Oxyresveratrol, Resveratrol และ Glabridin และ chromatograms ของสารสกัดชะเอมเทศสกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95) และสกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70) พบ Gallic acid (1), และ Glabridin (2)

5. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ

การทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศ โดย ascorbic acid เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากมะหาดและชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70% และ 95% ethanol ดังแสดงในตารางที่ 4.6 เมื่อวิเคราะห์ผล พบว่า สารสกัด Al 95 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ

0.074 ± 0.024 mg/ml ซึ่งสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารกัด Al 70 และสารสกัด Gg 95 และ Gg 70 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แต่เมื่อเทียบกับ ascorbic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0065 ± 0.0008 mg/ml สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 95% ethanol มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้น้อยกว่า

ตารางที่ 4.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ

สารสกัด	**IC_{50} (Mean ± SD) (mg/ml)**
มะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70)	0.081 ± 0.027
มะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95)	0.074 ± 0.024
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70)	0.365 ± 0.171
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95)	0.223 ± 0.072
ascorbic acid	0.0065 ± 0.0008

6. ฤทธิ์ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (mushroom tyrosinase)

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ และ Kojic acid ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70% และ 95% ethanol ดังแสดงในตารางที่ 4.7 โดยการวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% พบว่า สารสกัด Al 95 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.017 ± 0.0024 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัด Al 70, Gg 95 และ Gg 70 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และดีกว่า Kojic acid 29 เท่า สำหรับสารสกัด Gg 95 มีค่า IC50 เท่ากับ 0.074 ± 0.0011 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด Gg 70 พบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และดีกว่า Kojic acid 6.7 เท่า

ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์ของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารสกัด	IC_{50} (Mean ± SD) (mg/ml)
มะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70)	0.028 ± 0.0029
มะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95)	0.017 ± 0.0024*
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70)	0.114 ± 0.0057
ชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95)	0.074 ± 0.0011*
Kojic acid	0.495 ± 0.029

* $P < 0.01$

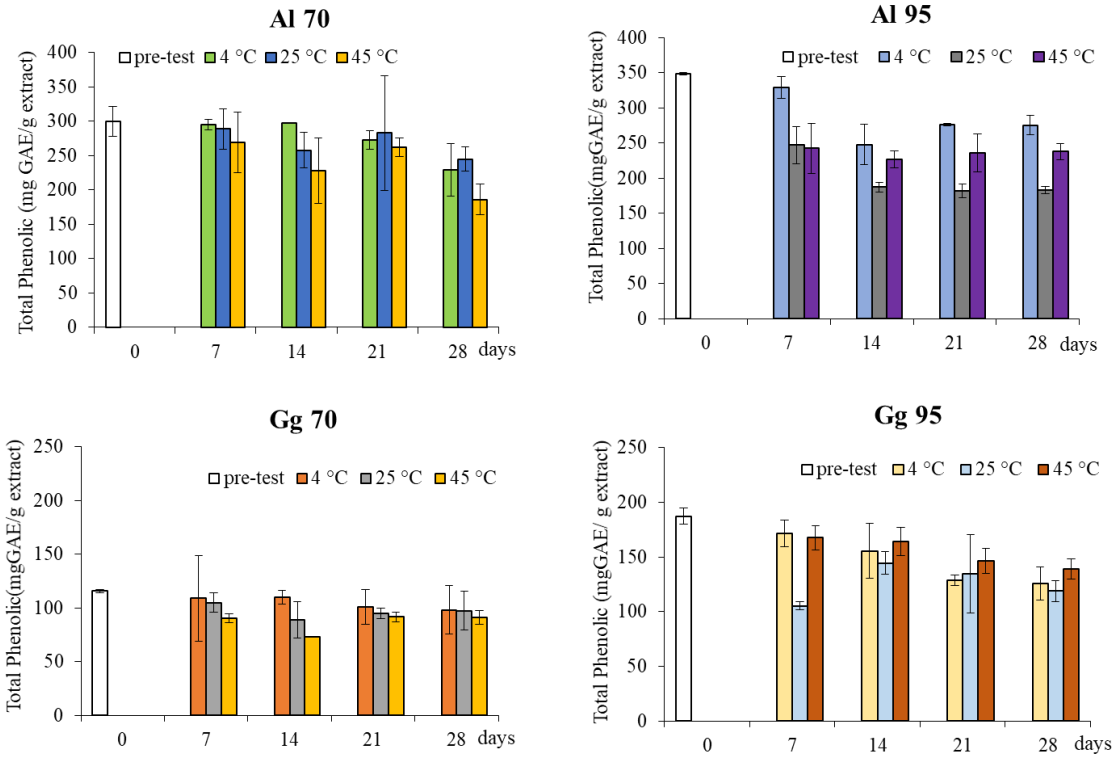
จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า แก่นมะหาดและรากชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95% ethanol จะได้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid สูงกว่า และพบสาร Oxyresveratrol และ Glabridin มากกว่าและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดทั้งสองชนิดที่สกัดด้วย 70% ethanol แม้ว่าการสกัดด้วย 70% ethanol จะได้ร้อยละผลผลิตมากกว่า แต่ปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสต่ำกว่า

7. ความคงตัวของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ

ในการศึกษาความคงตัวของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ มีการออกแบบโดยใช้สารสกัด Al 70, Al 95, Gg 70 และ Gg 95 ปริมาณอย่างละ 500 mg ต่อขวด บรรจุในขวดที่ห่อฟอยด์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำสารสกัดมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

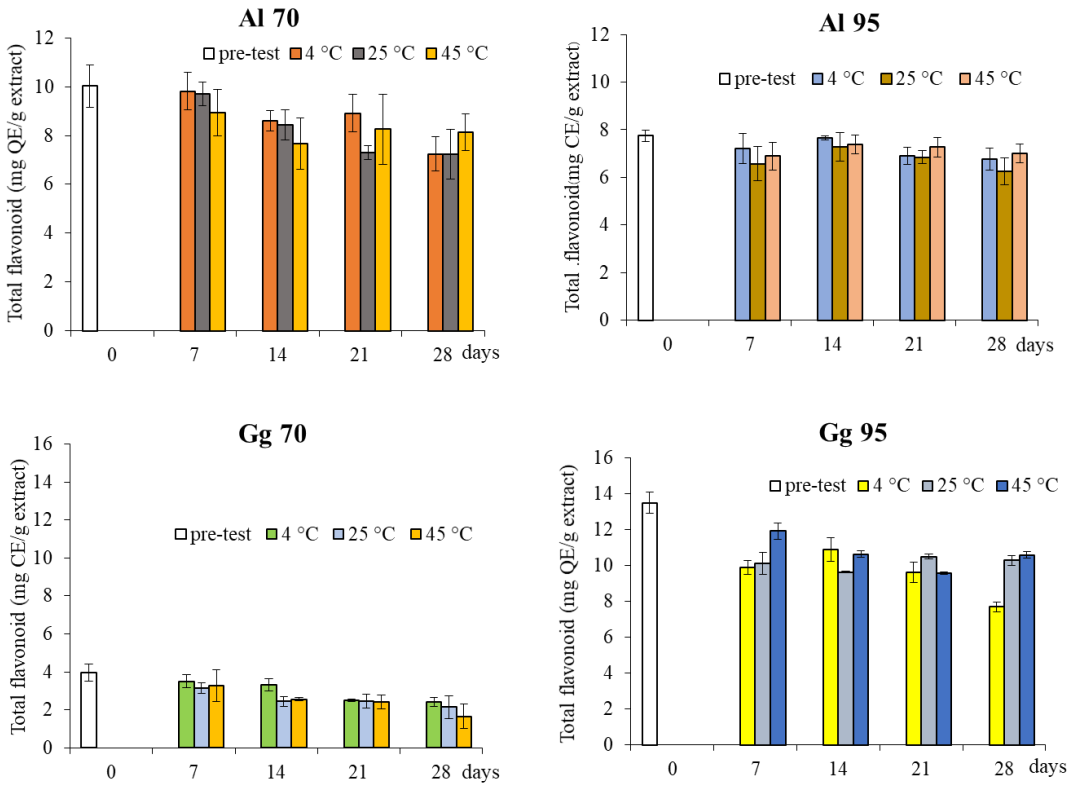
1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ถูกเก็บในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid หลังจากสารสกัด Al 70, Al 95, Gg 70 และ Gg 95 ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 28 วัน ดังแสดงในภาพที่ 4.8 และ 4.9 หลังจากวิเคราะห์สารประกอบ phenolic ของสารสกัดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C ทุก 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดก่อนทดสอบ (pre-test) พบว่า สารสกัด Al 70, Al 95, Gg 70 และ Gg 95 ถูกเก็บเป็นเวลา 28 วัน ที่อุณหภูมิ 25 และ 45 °C มีปริมาณ สารประกอบ phenolic ลดลง 0.3-0.4 เท่าเทียบกับสารสกัดก่อนทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยเฉพาะสารสกัด Al 95 มีปริมาณสารประกอบ phenolic ลดลง หลังเก็บตั้งแต่ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 และ 45 °C สำหรับสารสกัด Gg 70 พบว่าปริมาณสารประกอบ phenolic ลดลง 0.2 เท่า เทียบกับสารสกัดก่อนทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 4.8

แสดงให้เห็นว่า สารประกอบ phenolic ของสารสกัดมะหาดจะลดลงเมื่อถูกเก็บในที่อุณหภูมิสูงขึ้นและเวลานาน



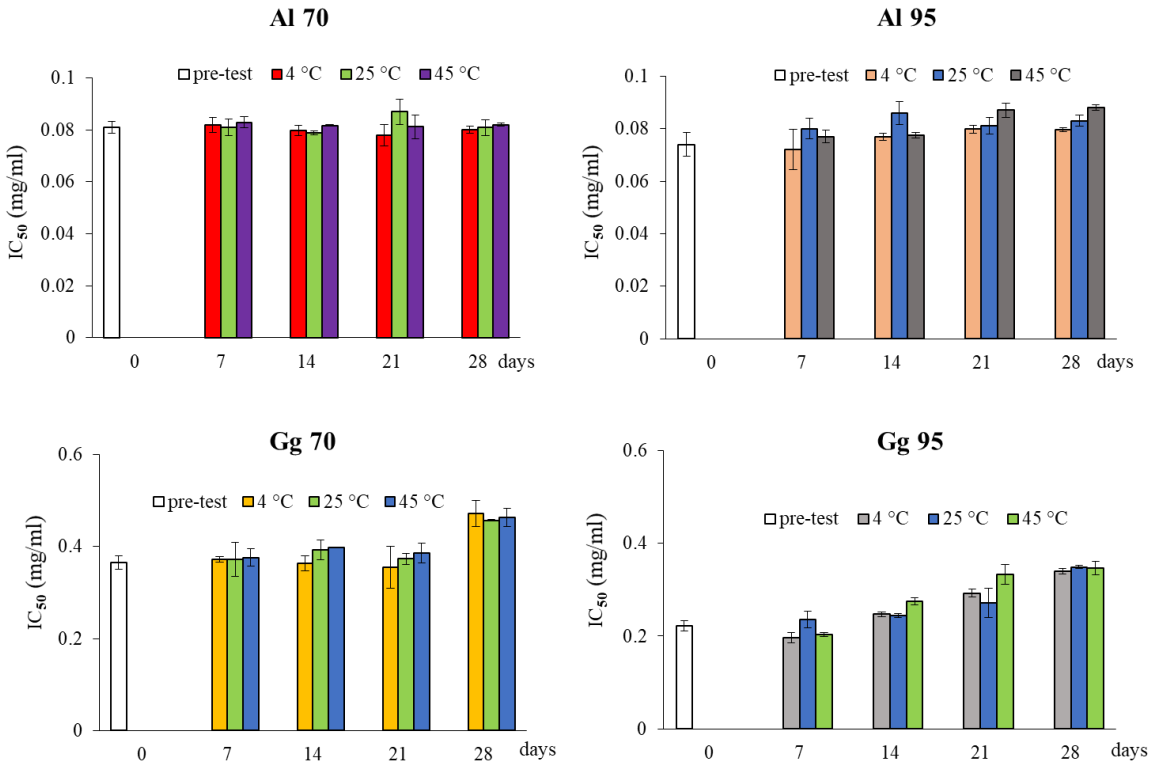
ภาพที่ 4.8 สารประกอบ phenolic ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ถูกเก็บในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Al 70 และ Al 95), และสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Gg 70 และ Gg 95) ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ flavonoid ของสารสกัด Al 70, Al 95, Gg 70 และ Gg 95 ที่ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 28 วัน ดังแสดงในภาพที่ 4.9 เมื่อเทียบกับสารสกัดก่อนทดสอบ (pre-test) พบว่า สารสกัด Al70, Gg 70 และ Gg 95 ที่ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 28 วัน มีปริมาณสารประกอบ flavonoid ลดลง 0.2 – 0.6 เท่าเทียบกับสารสกัดก่อนทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยเฉพาะสารสกัด Gg 95 มีปริมาณสารประกอบ flavonoid ลดลง หลังเก็บตั้งแต่ 7 วัน และที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C แต่ปริมาณสารประกอบ flavonoid ของสารสกัด Al 95 ลดลง 0.1 เท่า เทียบกับสารสกัดก่อนทดสอบ แสดงให้เห็นว่าสารประกอบ flavonoid ในสารสกัดชะเอมเทศลดลงเมื่อถูกเก็บในที่อุณหภูมิสูงขึ้นและเป็นเวลานาน



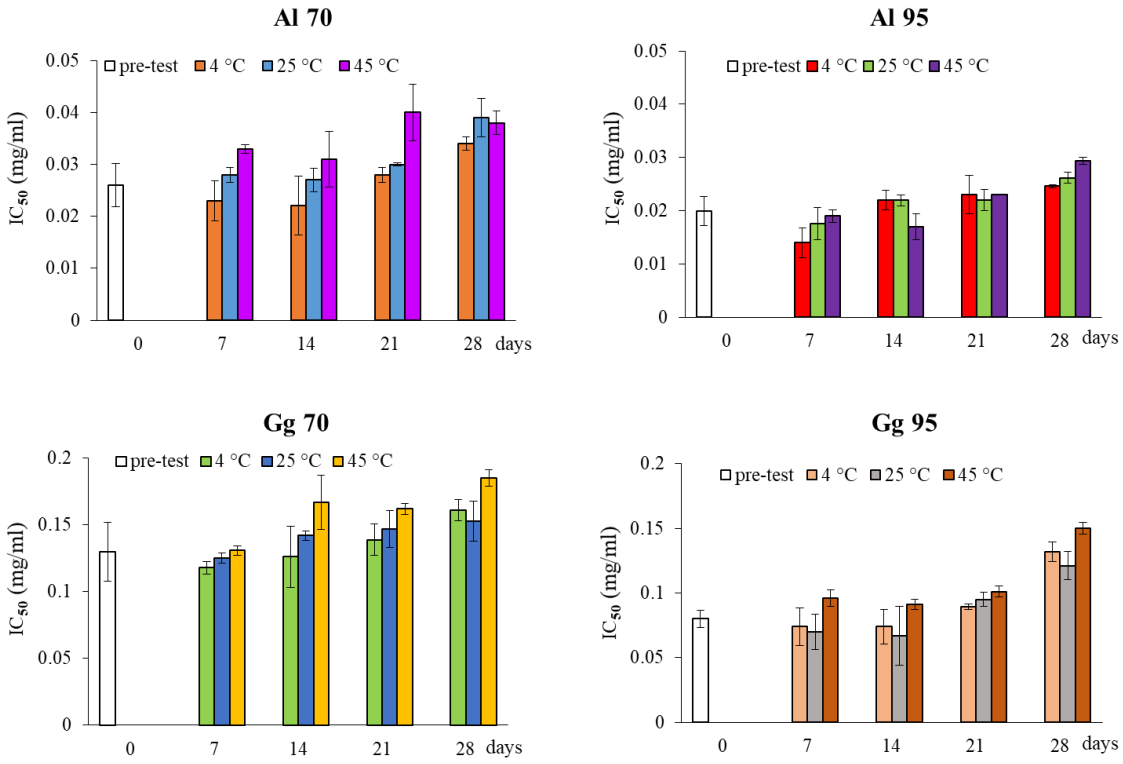
ภาพที่ 4.9 สารประกอบ flavonoid ของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ถูกเก็บในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Al 70 และ Al 95), และสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Gg 70 และ Gg 95) ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

2. การประเมินฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ถูกเก็บในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด Al 70, Al 95, Gg 70 และ Gg 95 ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 28 วัน โดยการเปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดก่อนทดสอบ (pre-test) กับสารสกัดหลังทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 4.10 และ 4.11 พบว่า สารสกัด Al 95, Gg 70 และ Gg 95 เมื่อถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 28 วัน มีค่า IC_{50} เพิ่มขึ้น 1.19 – 1.56 เท่า เทียบกับสารสกัดก่อนทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แสดงว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดลดลง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด Al 70 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.01 เท่าเทียบกับฤทธิ์สารสกัดก่อนทดสอบ (ภาพที่ 4.10) แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศลดลง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและเก็บไว้นาน



ภาพที่ 4.10 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ถูกเก็บในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Al 70 และ Al 95), และสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Gg 70 และ Gg 95) ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด Al 70, Al 95, Gg 70 และ Gg 95 เมื่อถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 28 วัน โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดก่อนทดสอบ (pre-test) กับสารสกัดหลังทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 4.11 พบว่าสารสกัด Al 70, Al 95, Gg 70 และ Gg 95 ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 28 วัน พบว่า มีค่า IC_{50} เพิ่มขึ้น 1.42 – 1.87 เท่า เมื่อเทียบกับฤทธิ์ของสารสกัดก่อนทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แสดงให้เห็นว่า ทั้งสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลงเมื่อถูกเก็บในที่อุณหภูมิสูงขึ้นและเป็นเวลานาน



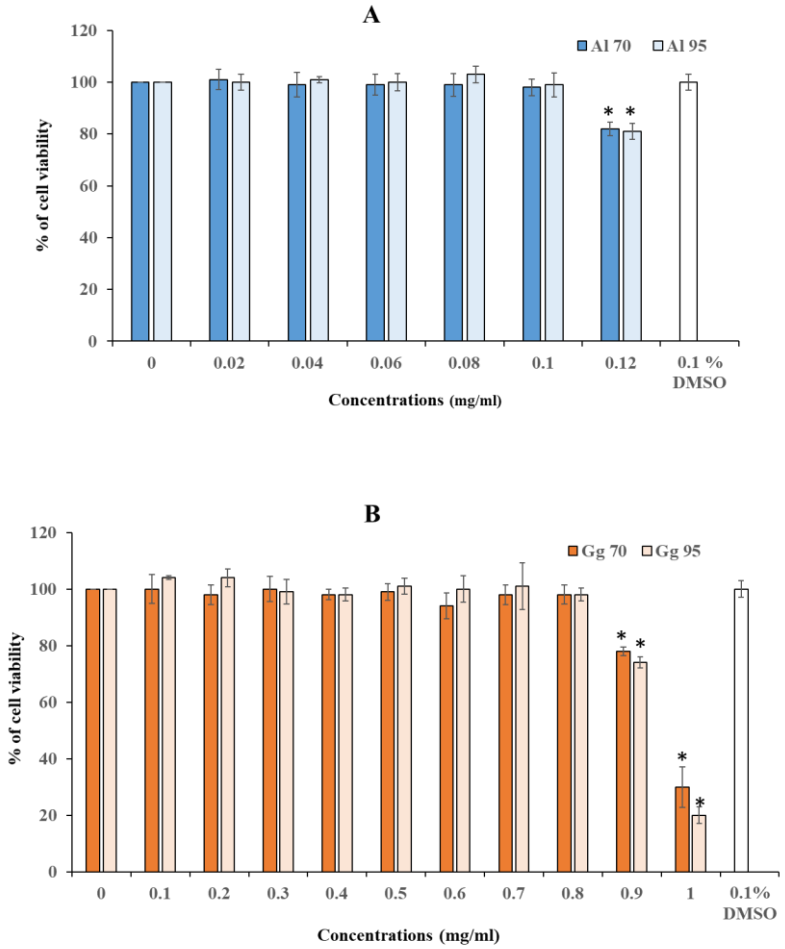
ภาพที่ 4.11 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่ถูกเก็บในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Al 70 และ Al 95), และสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Gg 70 และ Gg 95) ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 45 °C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศถูกเก็บในที่อุณหภูมิสูงขึ้นและเป็นเวลานานมีผลทำให้ปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสลดลง

8. ความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดต่อเซลล์เมลาโนมา B16 (melanoma B16 cells)

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากแก่นมะหาดและรากชะเอมเทศต่อเซลล์เมลาโนมา B16 ดังแสดงผลในภาพที่ 4.12 จากผลทดสอบ พบว่า เซลล์เมลาโนมา B16 ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัด Al 70 และ Al 95 ที่ความเข้มข้น 0.02 – 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เซลล์มีชีวิต (cell viability) 98-100 % เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัด ร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) แต่ที่ความเข้มข้น 0.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าเซลล์มีชีวิต 81-82 % เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัด ร้อยละของความมีชีวิต

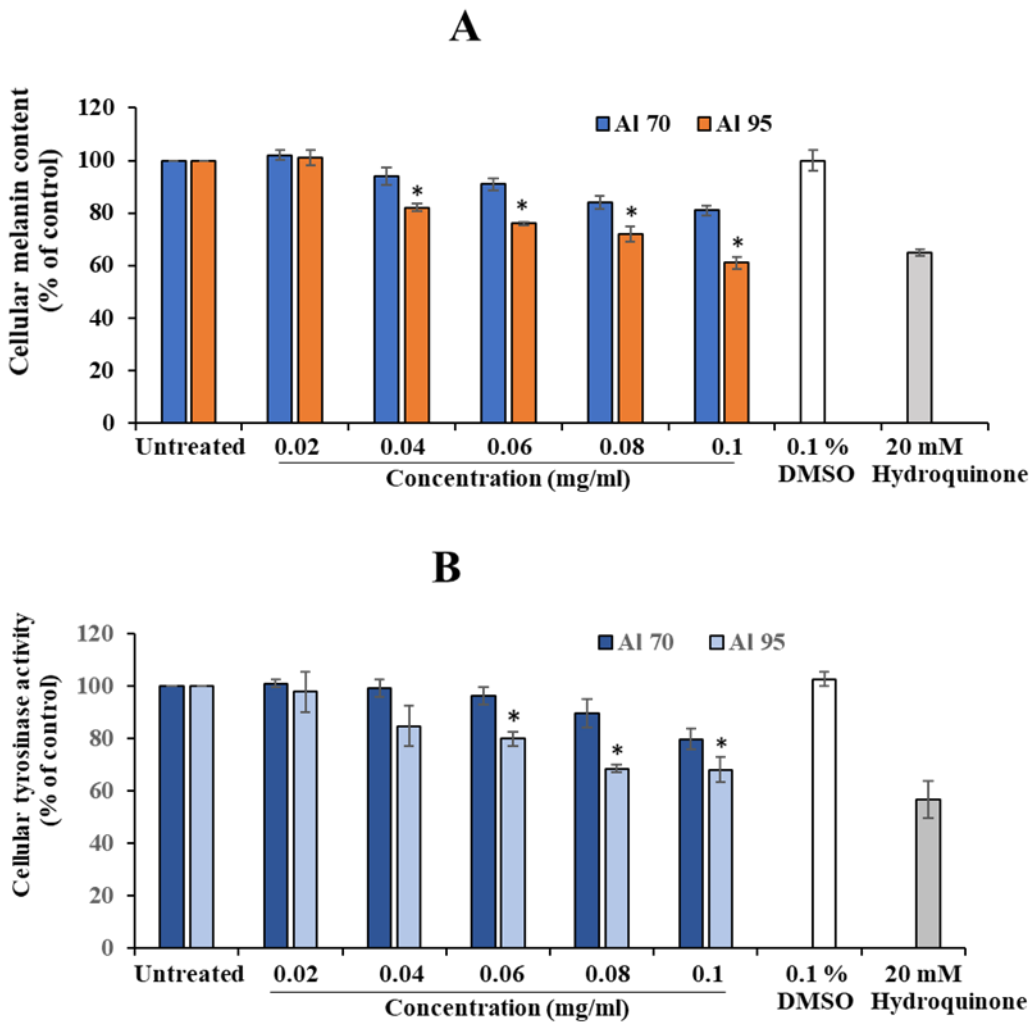
ของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) (ภาพที่ 4.12 A) แสดงว่า สารสกัด Al 70 และ Al 95 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่ทำให้เซลล์ตายแต่ที่ความเข้มข้น 0.12 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำให้เซลล์ตายได้บางส่วน สำหรับสารสกัด Gg 70 และ Gg 95 ที่ความเข้มข้น 0.1 – 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ถูกทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา B16 พบว่า เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.1 – 0.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เซลล์มีชีวิต 98 – 100 % แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เซลล์มีชีวิตเหลือ 74 – 78 % และความเข้มข้นเพิ่มเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เซลล์มีชีวิตเหลือเพียง 20 – 30 % (ภาพที่ 4.12 B) แสดงให้เห็นว่า สารสกัด Gg 70 และ Gg 95 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่า ร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ไม่ทำให้เซลล์ตาย แต่ที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 900 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลทำให้เซลล์ตาย ($p < 0.01$)



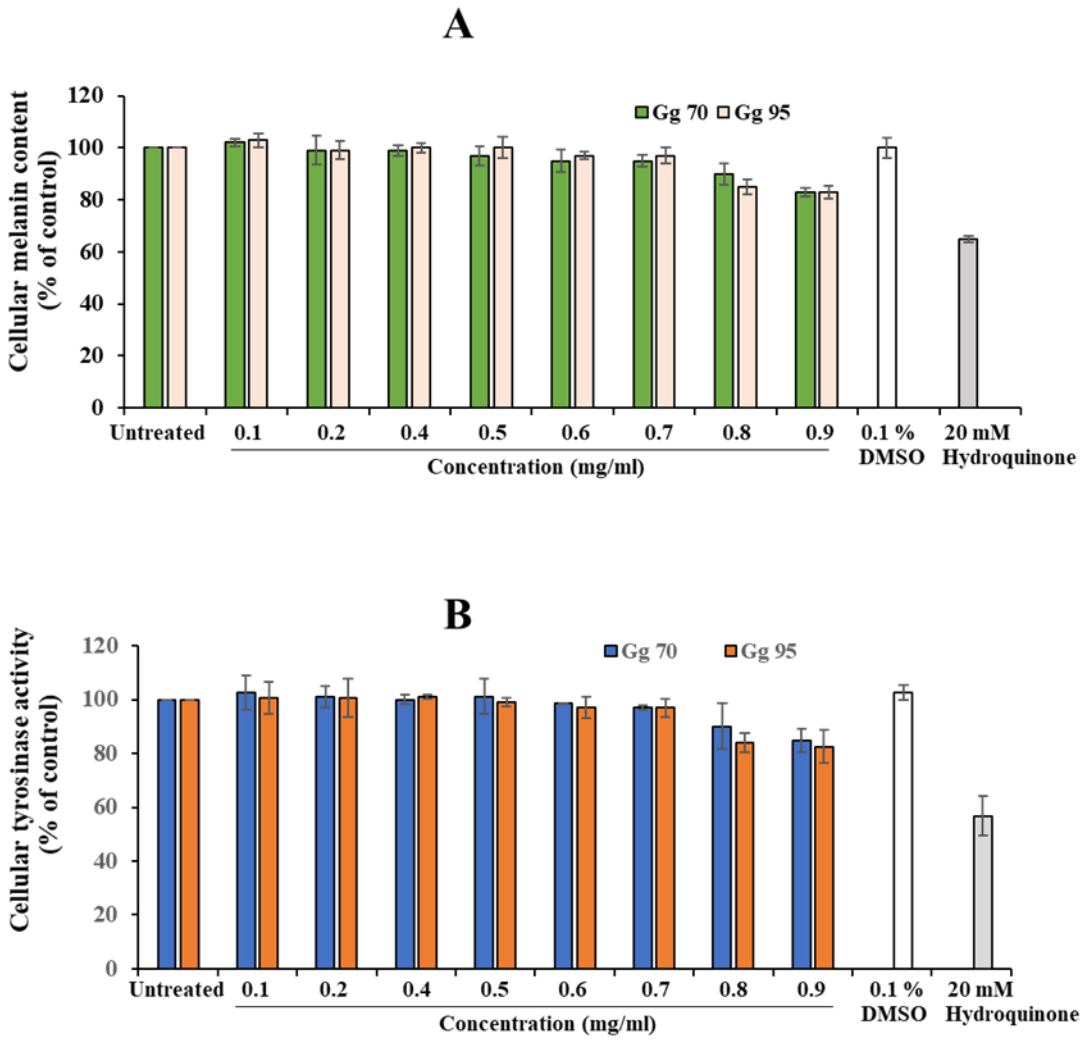
ภาพที่ 4.12 ความเป็นพิษของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศต่อเซลล์เมลาโนมา B16, A) สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Al 70 และ Al 95), B) สารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol (Gg 70 และ Gg 95), * ค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.01$

9. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) และการสร้างเม็ดสีในเซลล์เมลาโนมา B16 (melanoma B16 cells)

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจึงเลือกความเข้มข้นของสารสกัดที่ไม่เป็นพิษหรือไม่ทำให้เซลล์เมลาโนมา B16 ตาย นำมาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและการสร้างเมลานินในเซลล์เมลาโนมา B16 ดังแสดงผลในภาพที่ 4.13 และ 4.14 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศในการยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์เมลาโนมา B16 พบว่าเซลล์เมลาโนมาที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol ที่ความเข้มข้น 0.06, 0.08 และ 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีการสร้างเมลานินเท่ากับ 91, 84 และ 80 % ตามลำดับ สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol ที่ความเข้มข้น 0.06, 0.08 และ 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลทำให้เซลล์สร้างเมลานินเท่ากับ 92, 86, 82, และ 60 % ซึ่งการสร้างเมลานินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับเมลานินของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัด (ภาพที่ 4.13 A) และที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัด Al 95 สามารถยับยั้งการสร้างเมลานินลดลงถึง 40 % และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (ภาพที่ 4.13 B) ได้ดีกว่าฤทธิ์ของสารสกัด Al 70 สำหรับสารสกัดชะเอมเทศที่สกัด Gg 70 ที่ความเข้มข้น 0.7 และ 0.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลทำให้การสร้างเมลานินของเซลล์เมลาโนมาเท่ากับ 85 และ 83 % ตามลำดับ สารสกัด Gg 95 ที่ความเข้มข้น 0.7 และ 0.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีผลทำให้เซลล์มีสร้างเมลานินเท่ากับ 85 และ 84 % (ภาพที่ 4.14 A) และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่แตกต่าง (ภาพที่ 4.14 B) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมะหาดและชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินและเอนไซม์ไทโรซิเนส แต่สารสกัดมะหาดมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์เมลาโนมา B16 ได้ดีกว่าสารสกัดชะเอมเทศ โดยเฉพาะการสกัดด้วย 95 % ethanol



ภาพที่ 4.13 ฤทธิ์ของสารสกัดมะหาดในการยับยั้งการสร้างเมลานิน และเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์เมลาโนมา B16, A) การยับยั้งการสร้างเมลานินของสารสกัดมะหาด, B) การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70) และสกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95), * ค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.01$

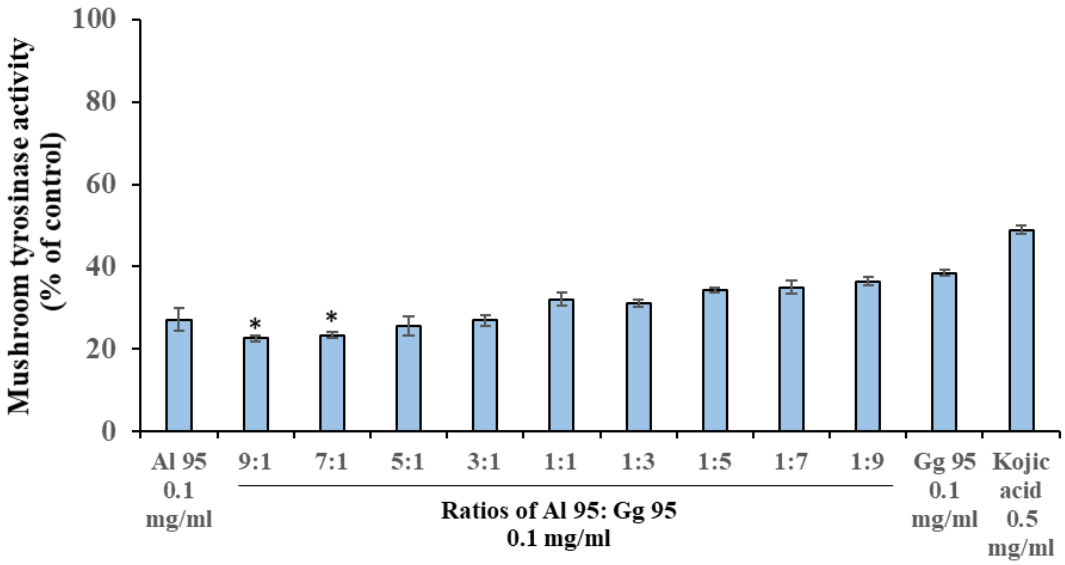


ภาพที่ 4.14 ฤทธิ์ของสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งการสร้างเมลานิน และเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์เมลาโนมา B16, A) การยับยั้งการสร้างเมลานินของสารสกัดชะเอมเทศ, B) การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70)และสกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95)

10. ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) และการสร้างเม็ดสีในเซลล์เมลาโนมา B16 (melanoma B16 cells)

10.1 การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (mushroom tyrosinase) จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (mushroom tyrosinase) พบว่า สารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95% ethanol มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วย 70% ethanol ดังนั้นจึงเลือกสารสกัด

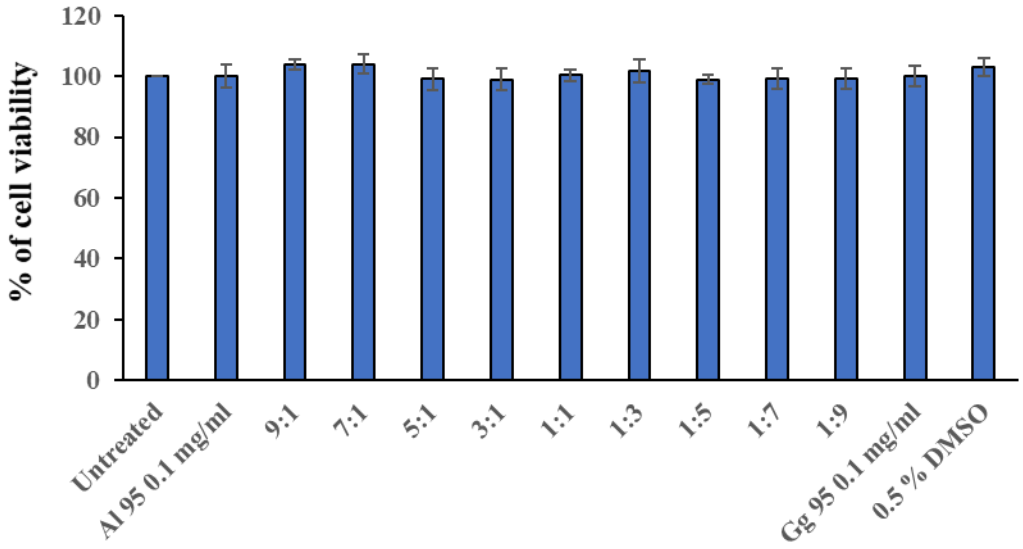
มะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95% ethanol คือ Al 95 และ Gg 95 มาศึกษาฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังแสดงในภาพที่ 4.15 โดยการผสมสารสกัด Al 95 : Gg 95 ตามอัตราส่วนดังนี้ 9:1, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5. 1:7 และ 1:9 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) เท่ากับ 0.1 mg/ml ผลการทดสอบ พบว่า สัดส่วนผสมของ Al 95 : Gg 95 ที่อัตราส่วน 7:1 และ 9:1 ให้ผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่า Al 95 หรือ Gg 95 อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) แสดงให้เห็นว่า การผสมสารสกัดมะหาด : สารสกัดชะเอมเทศในอัตราส่วนที่เพิ่มปริมาณสารสกัดมะหาดให้ผลการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าการเพิ่มปริมาณสารสกัดชะเอมเทศ และดีกว่าสารสกัดมะหาดหรือชะเอมเทศอย่างเดียว



ภาพที่ 4.15 ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส กราฟแสดงสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95) และสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95) ที่ถูกผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ สามารถยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนส, * ค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.01$

10.2 การวัดความเป็นพิษร่วมกันของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศต่อเซลล์ B16 การศึกษาฤทธิ์ความเป็นพิษร่วมของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศเซลล์ B16 โดยการเลือกสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ผสมกันในสัดส่วน Al 95 : Gg 95 มีดังนี้ 9:1, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 และ 1:9 โดยกำหนดที่ความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 0.1 mg/ml ดังแสดงในภาพที่ 4.16 ผลการทดลองพบว่า ทุกสัดส่วนการผสมของสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศมีร้อยละของมีชีวิต (% of cell viability) เท่ากับ 100 เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารสกัด แสดงว่า ทุกสัดส่วนการผสม

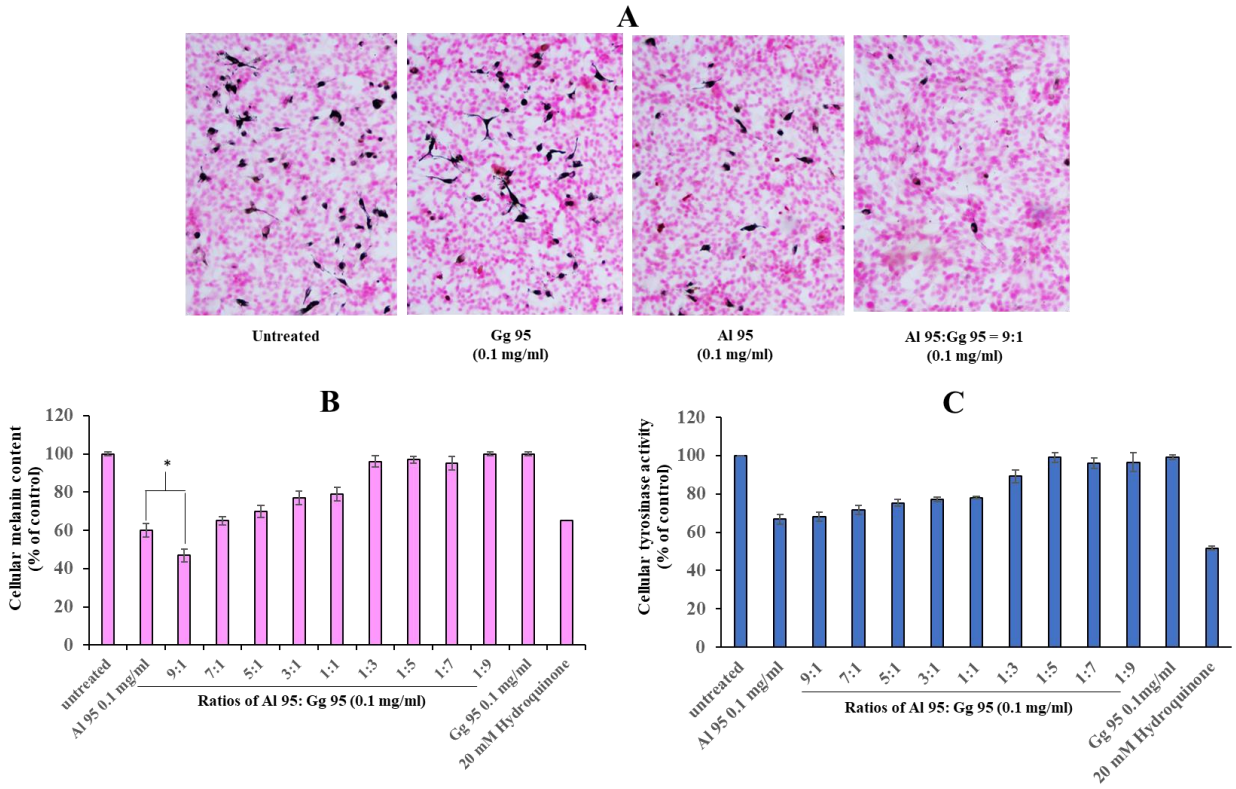
ของสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ B16 หรือไม่ทำให้เซลล์ตาย



ภาพที่ 4.16 ความเป็นพิษร่วมของสารสกัดมะหาด (Al 95) ผสมกับสารสกัดชะเอมเทศ (Gg 95) ต่อเซลล์เมลาโนมา B16

10.3 การประเมินฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งการสร้างเมลานินและเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์ B16 ผลจากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดผสมระหว่าง Al 95 และ Gg 95 ที่สัดส่วนระหว่าง Al 95 : Gg 95 เท่ากับ 9:1, 7:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 และ 1:9 โดยกำหนดที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml นั้น พบว่า ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ B16 จึงเลือกส่วนผสมของสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินและเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์ B16 ดังแสดงในภาพที่ 4.17 พบว่าสัดส่วนผสมสารสกัดระหว่าง Al 95 และ Gg 95 สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานิน (ภาพที่ 4.17 A และ B) ปริมาณเมลานินลดลงได้มากกว่าเมื่อเทียบกับฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัด Al 95 หรือ Gg 95 อย่างเดียว โดยเฉพาะที่สัดส่วนการผสมระหว่างสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ที่อัตราส่วน 9:1 และความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml สามารถยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ได้ 53 % ดีกว่าสารสกัด Al 95 หรือ Gg 95 ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยสารสกัด Al 95 อย่างเดียวสามารถยับยั้งการสร้างเมลานินได้เพียง 39 % และสารสกัด Gg 95 อย่างเดียว ไม่ยับยั้งการสร้างเมลานิน แสดงในภาพที่ 4.17 B แต่การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์ B16 ของสารสกัดผสม Al 95 : Gg 95 ไม่แตกต่างจากสารสกัด Al 95 อย่างเดียว ดังแสดงในภาพที่ 4.15 C แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol สามารถ

ออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งการสร้างเมลานิน แต่ไม่ได้ร่วมกันยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งอาจจะผ่านกลไกอื่นที่เสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเมลานิน ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่ต้องศึกษาต่อไป



ภาพที่ 4.17 ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศในการยับยั้งการสร้างเมลานินและเอนไซม์ไทโรซิเนสในเซลล์เมลาโนมา B16 A) ภาพเม็ดสีเมลานิน (สีดำ) สร้างจากเซลล์เมลาโนมา B16 (สีชมพู) ที่ถูกยับยั้งด้วยสารสกัดมะหาด (Al 95) และชะเอมเทศ (Gg 95) ภาพกำลังขยาย x 400, B) กราฟแสดงปริมาณของเม็ดสีเมลานินที่สร้างจากเซลล์เมลาโนมา B16 และ C) กราฟแสดงการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสภายในเซลล์เมลาโนมา B16 โดยเซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดมะหาดและชะเอมเทศที่ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ และในอาหารที่ไม่มีสารสกัด, * ค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.01$

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาสารสกัดจากแก่นมะหาด (Al) และรากชะเอมเทศ (Gg) ที่ถูกสกัดด้วย 70 % และ 95 % ethanol และวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase และศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีในเซลล์เมลาโนมา B16 ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเมลานิน และศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดในการยับยั้ง tyrosinase และการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 นอกจากนี้ศึกษาความคงตัวของสารสกัดโดยการประเมินสารประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase ของสารสกัดเมื่อถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างกัน ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Al 95) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการทำงานของ tyrosinase จาก mushroom tyrosinase และ cellular tyrosinase และยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ได้ดีกว่าสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol (Al 70) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และที่สำคัญยังตรวจพบสาร Oxyresveratrol ในสารสกัด Al 95 มีปริมาณมากกว่าสารสกัด Al 70 สำหรับสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95) และสกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70) เมื่อเปรียบเทียบกัน สารสกัด Gg 95 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการทำงานของ mushroom tyrosinase ได้ดีกว่าสารสกัด Gg 70 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และสาร Glabridin ที่พบในสารสกัด Gg 95 มีปริมาณมากกว่าสารสกัด Gg 70 แต่ฤทธิ์ในการยับยั้ง cellular tyrosinase และการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ไม่แตกต่างกัน ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ B16 พบว่า สารสกัด Al 70 และ Al 95 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1 mg/ml และสารสกัด Gg 70 และ Gg 95 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.8 mg/ml ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ B16 ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้ง cellular tyrosinase และการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 จึงเลือกสารสกัด Al 95 และ Gg 95 มาศึกษาฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้ง tyrosinase และการยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 พบว่า อัตราส่วนผสมสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ที่ 9:1 และความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถยับยั้งทั้ง mushroom tyrosinase และสามารถลดการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ได้ถึง 53 % ซึ่งดีกว่าการใช้สารสกัด Al 95 หรือ Gg 95 อย่างเดียว ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 mg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) นอกจากนี้ พบว่าการเก็บสารสกัดไว้นาน 4 สัปดาห์ และอยู่ในที่อุณหภูมิสูงถึง 45 °C มีผลทำให้สารประกอบ

phenolic และ flavonoid และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้ง mushroom tyrosinase ของสารสกัดลดลง ดังนั้นการเก็บสารสกัดที่อุณหภูมิต่ำน่าจะช่วยลดชะลอการลดลงของฤทธิ์ของสารสกัด

2. อภิปรายผล

การศึกษาสารสกัดจากแก่นมะหาด (Al) และรากชะเอมเทศ (Gg) ที่สกัดด้วย 70 และ 95 % ethanol และตรวจหาปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และวิเคราะห์ฤทธิ์สารสกัดในการยับยั้ง mushroom tyrosinase พบว่า สารสกัด Al 95 ที่สกัดด้วย 95 % ethanol มีปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid เท่ากับ 398.44 mg GAE equivalent /g extract และ 8.79 mg QE equivalent/g extract ตามลำดับ มีฤทธิ์ในการยับยั้ง mushroom tyrosinase ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.017 mg/ml ซึ่งมากกว่าสารสกัด Al 70 ที่สกัดด้วย 70 % ethanol มีปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid เท่ากับ 127.99 mg GAE equivalent /g extract และ 2.05 mg QE equivalent/g extract ตามลำดับ มีฤทธิ์ในการยับยั้ง mushroom tyrosinase ที่ค่า IC50 เท่ากับ 0.028 mg/ml การสกัด Al ด้วย 95 % ethanol ซึ่งให้ผลดีกว่าการสกัดด้วย propylene glycol ซึ่งมีปริมาณสารประกอบ phenolic เท่ากับ 8.05 mg GAE equivalent /g extract และมีฤทธิ์ในการยับยั้ง mushroom tyrosinase เท่ากับ 0.026 mg/ml (Teeranachaideekul et al., 2013) และสอดคล้องกับการสกัด Al ด้วย 80 % ethanol ได้ปริมาณสารประกอบ phenolic เท่ากับ 325.63 mg GAE equivalent /g extract (Singhatong et al., 2010) ซึ่งมีปริมาณสูงเช่นกัน และงานวิจัยของ Borah et al. (2017) ศึกษาเปรียบเทียบการใช้น้ำ methanol, ethanol, propanol และ butanol ในการสกัด Al พบว่า ethanol มีประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดเพื่อให้ได้สาร Oxyresveratrol ซึ่งเป็นสารสำคัญที่อยู่ในกลุ่มสารประกอบ phenolic สำหรับสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (Gg 95) และสกัดด้วย 70 % ethanol (Gg 70) เมื่อเปรียบเทียบกัน สารสกัด Gg 95 มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ mushroom tyrosinase ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.074 mg/ml ได้ดีกว่าสารสกัด Gg 70 ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.114 mg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid ของสารสกัด Gg 95 เท่ากับ 215.07 mg GAE equivalent /g extract และ 9.20 mg QE equivalent/g extract ตามลำดับ มีปริมาณมากกว่าที่พบในสารสกัด Gg 70 ปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid เท่ากับ 90.76 mg GAE equivalent /g extract และ 5.87 mg QE equivalent/g extract ตามลำดับ และสอดคล้องกับการสกัด Gg ด้วย 95 % ethanol ได้ปริมาณสารประกอบ phenolic เท่ากับ 9.2 mg GAE equivalent /100 mg extract และ flavonoid เท่ากับ 6.8 mg catechin equivalent /100 mg extract ซึ่งสูงกว่าการสกัด Gg ด้วยน้ำ (Mohammed, 2014) และสารสกัด Gg ที่สกัดด้วย acetone ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ mushroom tyrosinase ที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 53 µg/ml (Nerya et al., 2003) และการสกัดด้วย

ethanol ได้สารสำคัญ Glabribin และ Glycyrrhizic acid มากกว่าการสกัดด้วยน้ำ methanol acetonitrile และ chloroform (Tian et al., 2008) จากผลของการศึกษาความคงตัวของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศ โดยการวัดปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase ของสารสกัดเมื่อถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่า การเก็บสารสกัดไว้นาน 4 สัปดาห์ และอยู่ในที่อุณหภูมิสูงถึง 45 °C มีผลทำให้ปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้ง mushroom tyrosinase ของสารสกัดลดลง จากผลการทดสอบ จึงแนะนำการเก็บสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 °C

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดมะหาดและสารสกัดชะเอมเทศต่อเซลล์เมลาโนมา B16 พบว่า สารสกัด Al 70 และสารสกัด Al 95 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.1 mg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ B16 และสารสกัด Gg 70 และ Gg 95 ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.8 mg/ml ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ B16 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้ง cellular tyrosinase และยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 พบว่า สารสกัด Al 95 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ cellular tyrosinase และยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ดีกว่าสารสกัด Al 70 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบ phenolic, flavonoid และพบ Oxyresveratrol ของสารสกัด Al 95 มีมากกว่าสารสกัด Al 70 จากการศึกษาในอดีต รายงานมะหาดสายพันธุ์ *Artocarpus lakoocha* Roxb. มีฤทธิ์ยับยั้ง mushroom tyrosinase และสามารถลดเมลานินของผิวของอาสาสมัคร และพบว่า สารสำคัญในสารสกัดคือ Oxyresveratrol (Povichit et al., 2010) มีฤทธิ์ยับยั้ง mushroom tyrosinase ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 0.83 µg/ml จะเห็นว่า สารสกัดมะหาดประสิทธิภาพทำให้ผิวขาว ซึ่งมีแนวโน้มนำมาใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวขาว (Tengamnuay et al., 2006; Arung et al., 2011) และมีสารอื่น ๆ ที่แยกได้จาก *Artocarpus lakoocha* Roxb ได้แก่ Pinostilbene, Desoxyrhapontigenin, Pterostilbene และ Resveratrol (Chauhan & Kumari, 1979; Parao & Reutrakul, 1976) นอกจากนี้มีรายงานสารสำคัญที่วิเคราะห์จากสารสกัดของ *Artocarpus* สายพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ Artocarpanone มีฤทธิ์ยับยั้ง mushroom tyrosinase ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 80.8 µM และยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 89.1 µM ตามลำดับ (Arung et al., 2006a) และสารสำคัญที่แยกได้จากสารสกัดของ *Artocarpus heterophyllus* ได้แก่ Artocarpin, Cudraflavone C, 6-prenylapigninKuwanon C, Norartocarpin, Albanin A สามารถยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 และพบว่าสาร isoprenoid แยกได้จาก *Artocarpus heterophyllus* ช่วยเสริมฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 (Arung et al., 2006b) สารสกัดของสายพันธุ์ *Artocarpus incisus* ที่ถูกสกัดด้วย diethyl ether หรือ methanol พบสารสำคัญ คือ artocarpin เป็นสารหลัก ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้ง mushroom tyrosinase และยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16F1 (Donsing et al., 2008) สาร Norartocarpetin แยกได้จาก *Artocarpus communis* มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเมลานินและไม่เป็น

พิษต่อเซลล์ B16F1 และไม่ระคายผิวของหนูทดลอง (Ko et al., 2013) สำหรับสารสกัดชะเอมเทศในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สารสกัด Gg 95 มีปริมาณสารประกอบ phenolic และflavonoid และพบสาร Glabridin มากกว่าในสารสกัด Gg 70 แต่สามารถในการยับยั้ง cellular tyrosinase และลดการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ไม่แตกต่างกัน มีรายงานพบสาร Glycyrrhizic acid และสารกลุ่ม flavonoids เป็นสารสำคัญแยกได้จากสารสกัดชะเอมเทศ (Licorice) และสาร Glabridin มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ tyrosinase ในเซลล์ B16 และยับยั้ง mushroom tyrosinase ได้ดีกว่าสาร Kojic acid (Yokota et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องงานวิจัยครั้งนี้ สารสำคัญอื่น ๆ ที่พบใน Licorice ได้แก่ สาร Glabrene, Isoliqiritigeni (Nerya et al., 2003) มีฤทธิ์ยับยั้ง tyrosinase และการสร้างเมลานิน มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.5 และ 8.1 mM ตามลำดับ และพบสารสำคัญ Licuraside, isoliquiritin และ licochalcone A มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.072, 0.038, 0.0258 mM ตามลำดับ (Fu et al., 2005) มีการศึกษาความเป็นพิษของสาร Glabridin พบว่า ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนไซต์ของคน (Nerya et al., 2003) จึงได้นำ Glabridin ไปใช้เป็นสารสำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับลดสีผิว

จากผลการศึกษาครั้งนี้ จึงได้เลือกสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ที่ความเข้มข้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมลาโนมา B16 มาศึกษาฤทธิ์ร่วมในการยับยั้ง tyrosinase และลดการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 พบว่า ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัด Al 95 และ Gg 95 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ B16 และสามารถยับยั้งทั้ง mushroom tyrosinase และยับยั้งการสร้างเมลานิน โดยเฉพาะฤทธิ์ร่วมกันระหว่างสารสกัด Al 95 และสารสกัด Gg 95 ที่อัตราส่วน 9:1 และความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml สามารถยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ให้ดีกว่าการใช้สารสกัด Al 95 หรือ Gg 95 อย่างเดียว แต่ไม่เสริมฤทธิ์ในการยับยั้ง cellular tyrosinase ซึ่งมีรายงานการศึกษาฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนสในกลไกการสร้างเม็ดสีเมลานินจากสารสกัด *Siberian larch* และสารสกัดจากผลทับทิม (pomegranate fruit) พบว่า สารสกัดทั้งสองชนิดนี้ สามารถออกฤทธิ์ร่วมกันในการลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน แต่ไม่เสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Diwakar et al., 2012) จากการศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัด *Salvia hispanica* และสารสกัดทับทิม พบว่า สามารถลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยมีฤทธิ์เสริมกันในการลดการแสดงออกของยีน Tyr, Tyrp1, and Mc1r ที่ควบคุมการสร้างเมลานิน (Diwakar et al., 2014) เห็นได้ว่า สารสกัดจากสมุนไพรต่างชนิดแต่มีฤทธิ์ในด้านเดียวกันสามารถออกฤทธิ์เสริมกันได้

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรก ที่พบว่า สารสกัดแก่นมะหาดและสารสกัดรากชะเอมเทศสามารถออกฤทธิ์ร่วมกันได้ ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ร่วมกันเป็นเรื่องน่าสนใจที่ทำการศึกษาค้นคว้าต่อไป อย่างไรก็ตามการออกฤทธิ์เสริมกันของสารสกัดแก่นมะหาดและสารสกัดรากชะเอมเทศในการลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน เป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไป

3. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

3.1 การส่งเสริมนำผลงานวิจัยต่อยอดสู่เชิงพาณิชย์ โดยสนับสนุนการลงทุนร่วมกับหน่วยงานเอกชน

3.2 การส่งเสริมการรณรงค์การปลูกมะหาดและชะเอมเทศในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น

4. ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

4.1 การศึกษาวิธีการสกัดโดยวิธีอื่นที่ให้ได้สารประกอบที่มีฤทธิ์การยับยั้งการสร้างเมลานิน

4.2 การศึกษาวิเคราะห์สารประกอบชนิดอื่น ๆ และศึกษาฤทธิ์ด้านอื่น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อไป

4.3 การศึกษาสายพันธุ์มะหาดที่ปลูกในประเทศไทย และเปรียบเทียบสารประกอบและฤทธิ์ทางชีวภาพ

4.4 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารสประกอบชนิดอื่น ๆ

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

Arase, Y., Ikeda, K., Murashima, N., Chayama, K., Tsubota, A., Koida, I., Suzuki, Y., Saitoh, S., Kobayashi, M., & Kumuda, H. (1997). The longterm efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. **Cancer**, 79, 1494–500.

Arung, E.T., Shimizu, K., & Kondo, R. (2006a). Inhibitory effect of isoprenoid-substituted flavonoids isolated from *Artocarpus heterophyllus* on melanin biosynthesis. **Planta Medica**, 72, 847-50.

Arung, E.T., Shimizu, K., & Kondo, R. (2006b). Inhibitory effect of artocarpanone from Artocarpus heterophyllus on melanin biosynthesis. **Biol Pharm Bull**, *29*(9), 1966-9.

Arung, E.T., Shimizu, K., & Kondo, R. (2011). *Artocarpus* plants as a potential source of skin whitening agents. **Nat Prod Commun**, 6(9), 1397-402.

Bilodeau, M.L., Greulich, J.D., Hullinger, R.L., Bertolotto, C., Ballotti, R., & Andrisani, O.M. (2001). BMP-2 stimulates tyrosinase gene expression and melanogenesis in differentiated melanocytes. **Pigment Cell Res**, 14(5), 328-36.

Borah, H.J., Singhal, R., & Hazarika, S. (2017). Artocarpus lakoocha roxb: An untapped bioresource of resveratrol from North East India, its extractive separation and antioxidant activity. **Industrial Crops ans Products**, 95, 75-82.

Boqiang, F., Huan L., Xiaoru W., Frank S.C.L., & Shufen, C. (2005). Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 7408-14.

Burlando, B., Clericuzio, M., & Cornara, L. (2017). Moraceae plants with tyrosinase inhibitory activity: A review. **Mini Rev Med Chem**, 17(2), 108-21.

Callender, V.D., St Surin-Lord, S., Davis, E.C., & Maclin, M. (2011). Post inflammatory hyperpigmentation: etiologic and therapeutic considerations. **American Journal of Clinical Dermatology**, 12 (2), 87–99.

Cardozo, K.H.M., Vessechi, R., Carvalho, V.M., Pinto, E., Gates, P.J., Colepicolo, P., Galembeck, S.E., & Lopes, N.P. (2008). A theoretical and mass spectrometry study of the fragmentation of mycosporine-like amino acids. **Int. J. Mass Spectrom**, 273, 11–9.

Carmen, P., Laurian, V., & Mircea, T. (2009). Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania. **Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj**, 37 (1), 129–32.

Chauhan, J.S., & Kumari, G. (1979). A new glycoflavonol from the root bark of *Artocarpus lakoocha.* **Planta Med**, 37, 86-8.

Chen, L., Wang, J., Mouser, G., Li, Y.C., & Marcovici, G. (2016). Blockade of androgen mUsing a novel betasitosterol, thioctic acid and carnitine-containing compound in prostate and hair follicle cell-based assays. **Phytother Res**, 30(6), 1016-20.

Chen, J., Yu, X., & Huang Y. (2016). Inhibitory mechanisms of glabridin on tyrosinase. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, 168, 111-7.

Chowdhury, S., Ahmed, H. & Chatterjee, B.P. (1991). Chemical modification studies of Artocarpus lakoocha lectin artocarpin. **Biochimie**, 73(5), 563-71.

Cinatl, J., Morgenstern, B., & Bauer, G. (2003). Glycyrrhizin, an active component of liquorice roots, and replication of SARS-associated coronavirus. **Lancet**, 361, 2045–6.

Dehpour, A.R., Zolfaghari, M.E., & Samadian, T. (1995). Antiulcer activities of liquorice and its derivatives in experimental gastric lesion induced by ibuprofen in rats. **Int J Pharm**, 119, 133–8.

Dej-Adisai, S., Meechai, I., Puripattanavong, J., & Kummee, S. (2014). Antityrosinase and antimicrobial activities from Thai medicinal plants. **Arch Pharm Res**, 37(4), 473-83.

Diwakar, G., Rana, J., Saito, L., Vredeveld, D., Zemaitis, D., & Scholten, J. (2014). Inhibitory effect of a novel combination of *Salvia hispanica* (chia) seed and *Punica granatum* (pomegranate) fruit extracts on melanin production. **Fitoterapia**, 97, 164-71.

Diwakar, G., Rana, J., & Scholten, J.D. (2012). Inhibition of melanin production by a combination of *Siberian larch* and pomegranate fruit extracts. **Fitoterapia**, 83, 989–95.

Donsing, P., Limpeanchob, N., & Viyoch, J. (2008). Evaluation of the effect of Thai breadfruit's heartwood extract on melanogenesis-inhibitory and antioxidation activities. **J Cosmet Sci**, 59(1), 41-58.

Draelos, Z.D. (2001). Botanicals as topical agents. **Clin. Dermatol**, 19, 474–7.

Ebanks, J.P., Wickett, R.R., & Boissy, R.E. (2009). Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. **International Journal of Molecular Sciences**, 10, 4066-87.

Fujisawa, Y., Sakamoto, M., & Matsushita, M. (2000). Glycyrrhizin inhibits the lytic pathway of complement: possible mechanism of its anti-inflammatory effect on liver. **Microbiol Immunol**, 44, 799–804.

Fu, B., Li, H., Wang, X., Lee, F.S., & Cui, S. (2005). Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. **J Agric Food Chem**, 53, 7408–14.

Gianeti, M.D., & Maia Campos, P.M. (2014). Efficacy evaluation of a multifunctional cosmetic formulation: The benefits of a combination of active antioxidant substances. **Molecules**, 19, 18268-82.

Ito, S. (2003). A Chemist's view of melanogenesis. **Pigment cell**, 16, 230-6.

Itsarasook, K., Ingkaninan, K., & Viyoch, J. (2014). Artocarpin-enriched extract reverses collagen metabolism in UV-exposed fibroblasts. **Section Cellular and Molecular Biology**, 7, 943-51.

Jung, G.D., Yang, J.Y., Song, E.S., & Par, J.W. (2001). Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells. **Exp Mol Med**, 33(3), 131-5.

Kim, J.K., Kim, M., Cho, S.G., Kim, M.K., Kim, S.W., & Lim, Y.H. (2010). Biotransformation of mulberroside a from Morus alba results in enhancement of tyrosinase inhibition. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 37(6), 631–7.

Ko, H.H., Tsai, Y.T., Yen, M.H., Lin, C.C., Liang, C.J., Yang, T.H., Lee, C.W., & Yen, F.L. (2013). Norartocarpetin from a folk medicine *Artocarpus communis* plays a melanogenesis inhibitor without cytotoxicity in B16F10 cell and skin irritation in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 3, 348.

Lan, W.C., Tzeng, C.W., Lin, C.C., Yen, F.L., & Ko, H.H. (2013). Prenylated flavonoids from *Artocarpus altilis*: antioxidant activities and inhibitory effects on melanin production. **Phytochemistry**, 89, 78-88.

Lathiff, S.M., Jemaon, N., Abdullah, S.A., & Jamil, S. (2015). Flavonoids from *Artocarpus anisophyllus* and their bioactivities. **Nat Prod Commun**, 10(3), 393-6.

Leyden, J.J., Shergill, B., Micali, G., Downie, J., & Wallo, W. (2011). Natural options for the management of hyperpigmentation. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 25 (10), 1140–5.

Li, H., Jeong, Y.M., Kim, S.Y., Kim, M.K., & Kim, D.S. (2011). Arbutin inhibits TCCSUP human bladder cancer cell proliferation via up-regulation of p21. **Pharmazie**, 66(4), 306-9.

Likhitwitayawuid, K. (2008). Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. **Curr Sci**, 94, 44-52.

Likhitwitayawuid, K., Sornsute, A., Sritularak, B., & Ploypradith, P. (2006). Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. **Bioorg Med Chem Lett**, 16(21), 5650-3.

Lin, V.C., Ding, H.Y., Kuo, S.Y., Chin, L.W., Wu, J.Y., & Chang, T.S. (2011). Evaluation of in vitro and in vivo depigmenting activity of raspberry ketone from rheum officinale. **Int. J. Mol**, 12, 4819-35.

Maia Campos, P.M.B.G., Gianeti, M.D., Mercurio, D.G., & Gaspar, L.R. (2014). Synergistic effects of green tea and *Ginkgo Biloba* Extracts on the improvement of skin barrier function and elasticity. **J Drugs Dermatol**, 13(9), 1092-7.

Maneechai, S., De-Eknamkul, W., Umehara, K., Noguchi, H., & Likhitwitayawuid, K. (2012). Flavonoid and stilbenoid production in callus cultures of *Artocarpus lakoocha*. **Phytochemistry**, 81, 42-9.

Maneechai, S., Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B., Palanuvej, C., Ruangrungsi, N., & Sirisa-Ard, P. (2009). Quantitative analysis of oxyresveratrol content in *Artocarpus lakoocha* and 'Puag-Haad. Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University. **Health Science Centre**, 18(3), 223–7.

Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, 91, 571-7.

Mirela, D., Gianeti, M.D., & Maia, C.P.M.B.G. (2014). Efficacy Evaluation of a multifunctional cosmetic formulation: The benefits of a combination of active antioxidant substances. **Molecules**, 19, 18268- 82.

Mohammed, S.K. (2014). Antioxidative activities of aqueous and ethanolic extracts of licorice roots. **Pakistan J Nutrition**, 13(5), 267-70.

Mongolsuk, S., Robertson, A., & Towers, R. (1957). 2,4,3',5'-Tetrahydroxystilbene from *Artocarpus lakoocha*. **J Chem Soc**, 2231-3.

Nerya, O., Vaya, J., Musa, R., Izrael, S., Arie, B.R., & Tamir, S. (2003). Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(5), 1201–7.

Nguyen, N.T., Nguyen, M.H., Nguyen, H.X., Bui, N.K., & Nguyen, M.T. (2012). Tyrosinase inhibitors from the wood of *Artocarpus heterophyllus*. **J Nat Prod**, 75(11), 1951-5.

Nerya, O., Vaya, J., Musa, R., Izrael, S., Ben-Arie, R., & Tamir, S. (2003). Glabrene andisoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. **J Agric Food Chem**, 51, 1201–7.

Parao, J., & Reutrakul, V. (1976). New flavones in *Artocarpus lakoocha*. **Mahidol Uni J Pharm Sci,** 3, 161-6.

Patil, S., Salunkhe, V., & Mohite, S. (2012). Development and validation of UV spectrophotometric method for estimation of Glycyrrhetinic acid in hydro alcoholic extract of *Glycyrrhiza Glabra*. **IJPCBS**, 2, 617-21.

Povichit, N., Phrutivorapongkul, A., Suttajit, M., & Leelapornpisid, P. (2010). Antiglycation and antioxidant activities of oxyresveratrol extracted from the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb. **Maejo Int J Sci Technol**, 4(03), 454-61.

Puntumchai, A., Kittakoop, P., Rajviroongit, S., Vimuttipong, S., Likhitwitayawuid, K., & Thebtaranonth, Y. (2004). Lakoochins A and B, new antimycobacterial stilbene derivatives from *Artocarpus lakoocha*. **J Nat Prod**, 67(3), 485-6.

Rangsriwong, P., Rangkadilok, N., Satayavivad, J., Goto, M., & Shotipruk, A. (2009). Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from Terminalia chebula Retz. fruits. **Sep Purif Technol**, 66, 51–6.

Rodboon, T., Puchadapirom, P., Okada, S., & Suwannalert, P. (2015). Oxyresveratrol from Artocarpus lakoocha Roxb. Inhibit Melanogenesis in B16 Melanoma Cells through the Role of Cellular Oxidants. **Walailak Journal of Science and Technology**, 13 (4), 261-70.

Shin, N.H., Ryu, S.Y., Choi, E.J., Kang, S.H., Chang, I.M., Min, K.R., & Kim, Y. (1998). Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 243(3), 801-3.

Singh, T., Chatterjee, U., Wu, J.H., Chatterjee, B.P., & Wu, A.M. (2004). Carbohydrate recognition factors of a Talpha (Galbeta1-->3GalNAcalpha1-->Ser/Thr) and Tn (GalNAcalpha1-->Ser/Thr) specific lectin isolated from the seeds of *Artocarpus lakoocha*. **Glycobiology**, 15(1), 67-78.

Singhatong, S., Leelarungrayub, D., & Chaiyasut, C. (2010). Antioxidant and toxicity activites of *Artocarpus lakoocha* Roxb. Heartwood extract. **J Med Plants Res**, 4(10), 947-53.

Stratigos, A.J., & Katsambas, A.D. (2004). Optimal management of recalcitrant disorders of hyperpigmentation in dark-skinned patients. **Am J Clin Dermatol**, 5(3), 161-8.

Snpthai. (2015). **Mahaad Extract Liquid**. Retrieved November 24, 2015, from https://www. snpthai.com /th/node/308.

Somjen, D., Katzburg, S., Vaya, J., Kaye, A.M., Hendel, D., Posner, G.H., & Tamir, S. (2004). Estrogenic activity of glabridin and glabrene from licorice roots on human osteoblasts and prepubertal rat skeletal tissues. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 91 (4–5), 241–6.

Tamir, S., Eizenberg, M., Somjen, D., Izrael, S., & Vaya, J. (2001). Estrogen-like activity of glabrene and other constituents isolated from licorice root. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 78 (3), 291–8.

Teeranachaideekul, V., Nithitanakool, S., Junhunkit, T., Ponpanich, L., Nopporn, N., Detamornrat, U., & Chulasiri, M. (2013). Liposomes: A novel carrier system for *Artocarpus lakoocha* extract to improve skin whitening. **Journal of Asian Association of Schools of Pharmacy**, 2, 243-53.

Tengamnuay, P., Pengrungruangwong, K., Pheansri, I., & Likhitwitayawuid, K. (2006). *Artocarpus lakoocha* heartwood extract as a novel cosmetic ingredient: evaluation of the in vitro anti-tyrosinase and in vivo skin whitening activities. **Int. J. Cosmet. Sci**, 28, 269–76.

Tian, M., Yan, H., & Row, K.H. (2008). Extraction of Glycyrrhizic acid and Glabridin from licorice. **Int J Mol Sci**, 9, 571-7.

Van Hulle, C. (1977). The estrogenic action of licorice root. **Pharmzie**, 25(10), 620-1.

Venkataraman, K. (1972). Wood phenolics in the chemotaxonomy of the Moraceae. **Phytochem**, 11, 1571-86.

Wetwitayaklung, P. (1994). **Chemical constituents from the heartwood of *Artocarpus lakoocha* Roxb**. MS Thesis, Chulalongkorn University, Thailand.

Wikimedia commons (2015a). **Glabrene**. Retrieved November 24, 2015, from https://commons.wikimedia. org/wiki/File:Glabrene.svg.

Wikimedia commons (2015b). **Isoliquiritigenin**. Retrieved November 24, 2015 from https://commons.wikime dia.org/wiki/File:Isoliquiritigenin.svg.

Yamauchi, K., Mitsunaga, T., & Batubara, I. (2014). Synthesis of quercetin glycosides and their melanogenesis stimulatory activity in B16 melanoma cells. **Bioorg Med Chem**, 22(3), 937-44.

Yokota, T., Nishio, H., Kubota, Y., & Mizoguchi, M. (1998). The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. **Pigment Cell Research**, 11(6), 355-61.

ภาคผนวก

ภาคผนวก
เอกสารคำขอรับอนุสิทธิบัตร

สำเนา

แบบ สป/สผ/อสป/001-ก
หน้า 1 ของจำนวน 2 หน้า

คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☑ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535 และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่	
วันรับคำขอ – 9 มี.ค. 2561	เลขที่คำขอ
วันยื่นคำขอ – 9 มี.ค. 2561	1803000593
สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์ ประเภทผลิตภัณฑ์	
วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่	

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ สารสกัดระบบเอนไซม์และระบบตรวจต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสี

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่ -
ในจำนวน - คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ บุคคลธรรมดา ☑ นิติบุคคล ☐ หน่วยงานรัฐ ☐ มูลนิธิ ☐ อื่นๆ
ชื่อ มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
ที่อยู่ 295
ตำบล/แขวง ดุสิต อำเภอ/เขต ดุสิต จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10300 ประเทศ ไทย
อีเมล
☐ เลขประจำตัวประชาชน ☐ เลขทะเบียนนิติบุคคล ☑ เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร 0 9 9 4 0 0 0 4 6 2 2 8 6 ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)
ในกรณีที่กรมฯ สื่อสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง ☐ อีเมลผู้ขอ ☑ อีเมลตัวแทน

3.1 สัญชาติ ไทย
3.2 โทรศัพท์ 022445285
3.3 โทรสาร 022445286

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☑ ผู้รับโอน ☐ ได้รับสิทธิโดยเหตุอื่น

ยกเว้นค่าธรรมเนียม
ตามกฎกระทรวง พ.ศ. ... ว่าด้วยอัตราค่าธรรมเนียมและการยกเว้นค่าธรรมเนียม ... และประมวลจริยธรรมการสิทธิบัตร

5. ตัวแทน (ถ้ามี)
ชื่อ ณปกร เลี้ยวพ่ง
ที่อยู่ 295
ตำบล/แขวง ดุสิต อำเภอ/เขต ดุสิต จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10300 ประเทศ ไทย
อีเมล
เลขประจำตัวประชาชน 1 8 4 1 5 0 0 0 0 4 4 1 4 ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

5.1 ตัวแทนเลขที่ 2429
5.2 โทรศัพท์ 022445285
5.3 โทรสาร 022445286

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ ชื่อและที่อยู่เดียวกันกับผู้ขอ
ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล
ที่อยู่ มหาวิทยาลัยสวนดุสิต 295 ถนนสิรินธร
ตำบล/แขวง บางพลัด อำเภอ/เขต บางพลัด จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10700 ประเทศ ไทย
อีเมล -
เลขประจำตัวประชาชน 3 1 0 1 3 0 0 3 0 2 7 9 1 ☑ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร
เลขที่ วันยื่น เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ
☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

หมายเหตุ ในกรณีที่ไม่อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียดเพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

สำหรับเจ้าหน้าที่

จำแนกประเภทสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ กลุ่มวิศวกรรม
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ฟิสิกส์)

☐ กลุ่มเคมี
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เคมีเทคนิค)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ปิโตรเคมี)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เภสัชภัณฑ์)

สิทธิบัตรการออกแบบ
☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 1)
☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 2)
☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 3)

อนุสิทธิบัตร
☐ อนุสิทธิบัตร (วิศวกรรม)
☑ อนุสิทธิบัตร (เคมี)

8. การยื่นคำขอนอกราชอาณาจักร ☐ PCT ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				

8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย
☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้

9. การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด
วันแสดง _____ วันเปิดงานแสดง _____ ผู้จัด _____

10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ

10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ	10.2 วันที่ฝากเก็บ	10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ

11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้
โดยขอยื่นเป็นภาษา
☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่นๆ _____

12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่ _____
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข _____ ในการประกาศโฆษณา

13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย
ก. แบบพิมพ์คำขอ 2 หน้า
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 2 หน้า
ค. ข้อถือสิทธิ 1 หน้า
ง. รูปเขียน - รูป - หน้า
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์
☐ รูปเขียน - รูป - หน้า
☐ ภาพถ่าย - รูป - หน้า
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า

14. เอกสารประกอบคำขอ
☐ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
☑ หนังสือมอบอำนาจ
☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ
☐ เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย
☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ
☑ เอกสารอื่นๆ

15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า
☑ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน
☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก _____

16. ลายมือชื่อ
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☑ ตัวแทน
(_____)

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ใบต่อแบบท้าย แบบ สป/สผ/อสป/001-ก

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ (ต่อ)

2.นางสาวณัฐพร บุ้ยวด มหาวิทยาลัยสวนดุสิต เลขที่ 228/1-3 ถนนสิรินธร แขวงบางพลัด เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700
เลขประจำตัวประชาชน 3700700019918

3.ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสิทธิ์ สุวรรณเลิศ มหาวิทยาลัยมหิดล 272 ถนนพระรามที่ 6 แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
เลขประจำตัวประชาชน 3449900127740

4.นางสาวปิยวรรณ อยู่ดี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต เลขที่ 228/1-3 ถนนสิรินธร แขวงบางพลัด เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700
เลขประจำตัวประชาชน 3101900374092

5.นายฤทธิพันธ์ รุ่งเรือง มหาวิทยาลัยสวนดุสิต เลขที่ 228/1-3 ถนนสิรินธร แขวงบางพลัด เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700
เลขประจำตัวประชาชน 1709900578327

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

สารสกัดชะเอมเทศและมะหาดต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสี

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

วิทยาศาสตร์เคมีที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดชะเอมเทศและมะหาดต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสี

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

ความผิดปกติของสีผิว (hyperpigmentation disorder) ได้แก่ ฝ้า กระ จุดด่างดำที่ผิวเมื่ออายุมากขึ้น สาเหตุเกิดจากเมลาโนไซต์ที่สร้างเม็ดสี เรียกว่า เมลานิน (melanin) ถูกกระตุ้นจึงทำให้มีเมลานินมากเกินส่งผล ทำให้สีผิวหมองคล้ำ ซึ่งเป็นปัญหาทางวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

เมลานินแบ่งออกได้เป็นสองชนิด ได้แก่ pheomelanin และ eumelanin ซึ่งกระบวนการสร้างเมลานินต้องใช้กรดอะมิโน tyrosine เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ โดยมีเอ็นไซม์ tyrosinase ทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน tyrosine ให้เป็น dihydroxyphenylalanine (DOPA) และเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น DOPA aquinone เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสาร pheomelanin และ eumelanin ซึ่งกลไกการสร้างเม็ดสีเกิดจากการทำงานของ tyrosinase จึงนำมาสู่ความพยายามลดการสร้างเม็ดสีโดยใช้สารเคมี ได้แก่ arbutin เป็นสารกลุ่ม glycoside ที่สามารถสกัดได้จากพืชหรือการสังเคราะห์ (Carmen et al., 2009) ซึ่ง arbutin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ tyrosinase และการสร้างเม็ดสี แต่มีรายงานวิจัย พบว่า arbutin เป็นสารก่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Li et al., 2011) จึงได้มีการศึกษาหาสารสกัดจากพืชชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน จากหลายงานวิจัย พบว่า สารสกัดจากชะเอมเทศ (Liquorice หรือ Licorice) ชื่อวิทยาศาสตร์: Glycyrrhiza glabra และมะหาด (Lakoocha หรือ Monkey jack) ชื่อวิทยาศาสตร์ Artocarpus lakoocha มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ tyroninase (Kim et al., 2010; Nguyen et al., 2012; Dej-Adisai et al., 2014; Lathiff et al., 2015) ซึ่งสารสกัดจากมะหาด พบสาร oxyresveratrol เป็นสารกลุ่ม stilbenoid และพบสารกลุ่ม flavonoid (Maneechai et al., 2012; Tengamnuay et al., 2006; Maneechai et al., 2009) สำหรับสารสกัดจากชะเอมเทศ พบสาร glabridin เป็นสาร isoflavane อยู่ในกลุ่มของสาร isoflavonoid (Somjen et al., 2004; Tamir et al., 2001) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase (Callender et al., 2011; Leyden et al., 2011) และสามารถยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์เมลาโนมาบี 16 (melanoma B16 cells) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเมลานิน (Yamauchi et al., 2014; Lan et al., 2013; Jung et al., 2001) นอกจากนี้สารสกัดมะหาดและชะเอมเทศได้ถูกนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับลดสีผิว (Arung et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ลดฝ้า กระ จุดด่างดำ หรือสีผิวที่หมองคล้ำ มักพบปัญหาประสิทธิภาพไม่คงที่ (unstable) เนื่องจากสารสำคัญในผลิตภัณฑ์เสื่อมสภาพ สารสกัดจากมะหาดและชะเอมเทศอยู่ในกลุ่มของสาร phenolic และ flavonoid มีความไวต่อการสลายตัวเนื่องจากโครงสร้างของสารกลุ่มนี้ไวต่อพีเอช อุณหภูมิ แสง และสามารถรวมตัวกับสารอื่น จึงเป็นข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

สารสกัดชะเอมเทศและมะหาดต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสี ตามการประดิษฐ์นี้ อัตราส่วนสารประกอบของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาด โดยปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์ในการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) และลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin) ในเซลล์เมลาโนมา

B16 (melanoma B16) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเมลานินได้ และฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดชะเอมเทศและมะหาดในการยับยั้ง tyrosinase และการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16 จุดมุ่งหมายของการประดิษฐ์คือ เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเรียนรู้ฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดชะเอมเทศและมะหาด พัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและสามารถนำความรู้ไปต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพร

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

สารสกัดชะเอมเทศและมะหาดต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสี ที่ซึ่งประกอบด้วย อัตราส่วนผสมสารสกัดแก่นมะหาด 95 และสารสกัดรากชะเอมเทศ 95 เอกทานอล ที่ 9:1 และความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml

การศึกษาสารสกัดจากแก่นมะหาด และสารสกัดรากชะเอมเทศ ที่ถูกสกัดด้วย 70 % และ 95 % ethanol จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase และศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีในเซลล์เมลาโนมา B16 ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเมลานิน และศึกษาฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดในการยับยั้ง tyrosinase และการสร้างเมลานินในเซลล์ B16

นอกจากนี้ศึกษาความคงตัวของสารสกัดโดยการประเมินสารประกอบ phenolic และ flavonoid และฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase ของสารสกัดเมื่อถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างกัน ผลการศึกษา พบว่า สารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 95 % ethanol (แก่นมะหาด 95) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งการทำงานของ tyrosinase จาก mushroom tyrosinase และ cellular tyrosinase และยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ได้ดีกว่าสารสกัดมะหาดที่สกัดด้วย 70 % ethanol (แก่นมะหาด 70) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และที่สำคัญยังตรวจพบสาร Oxyresveratrol ในสารสกัดจากแก่นมะหาด 95 มีปริมาณมากกว่ารากชะเอมเทศ 70 สำหรับสารสกัดชะเอมเทศที่สกัดด้วย 95 % ethanol (รากชะเอมเทศ 95) และสกัดด้วย 70 % ethanol (รากชะเอมเทศ 70) เมื่อเปรียบเทียบกันสารสกัดรากชะเอมเทศ 95 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการทำงานของ mushroom tyrosinase ได้ดีกว่าสารสกัดรากชะเอมเทศ 70 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบ phenolic และ flavonoid และสาร Glabridin ที่พบในสารสกัดรากชะเอมเทศ 95 มีปริมาณมากกว่าสารสกัดรากชะเอมเทศ 70 แต่ฤทธิ์ในการยับยั้ง cellular tyrosinase และการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกสารสกัดแก่นมะหาด 95 และสารสกัดรากชะเอมเทศ 95 มาศึกษาฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้ง tyrosinase และการยับยั้งการสร้าง เมลานินในเซลล์ B16 พบว่า อัตราส่วนผสมสารสกัดแก่นมะหาด 95 และสารสกัดรากชะเอมเทศ 95 ที่ 9:1 และความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 mg/ml ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และสามารถยับยั้งทั้ง mushroom tyrosinase และสามารถลดการสร้างเมลานินในเซลล์ B16 ได้ถึง 53 %

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ได้เปิดเผยไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

ข้อถือสิทธิ

1. สารสกัดชะเอมเทศและมะหาดต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสี ที่ซึ่งประกอบด้วย อัตราส่วนผสมสารสกัดแก่นมะหาด 95 และสารสกัดรากชะเอมเทศ 95 เอทานอล ที่ 9:1 และความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 mg/ml

บทสรุปการประดิษฐ์

สารสกัดชะเอมเทศและมะหาดต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสี ตามการประดิษฐ์นี้ สารประกอบของสารสกัดจากชะเอมเทศและมะหาด ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) และลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin) ในเซลล์เมลาโนมา B16 (melanoma B16) ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเมลานินได้ และฤทธิ์ร่วมกันของสารสกัดชะเอมเทศและมะหาดในการยับยั้ง tyrosinase และการสร้างเม็ดสีเมลานินในเซลล์ B16 เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ และเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพร

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. รศ.ดร.ทัศนีย์ พาณิชย์กุล (Assoc.Prof. Tasanee Panichakul)

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

หน่วยงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ถนนสิรินทร แขวงบางพลัด เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

โทรศัพท์ 0-2423-9420-1, 085-1994988 Email: tasanee_p@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

จบปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปี 2528

จบปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล ปี 2532

จบปริญญาเอก ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาอายุรศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล ปี 2550

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

Microbiology, Cell biology, Hematopoietic stem cells, Immunology, Cell culture, Malaria culture

ประสบการณ์ด้านการวิจัย

1. ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย การศึกษาพื้นฐานฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร (Basic study on herbal extracts' activity)

2. หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง การควบคุมและป้องกันโรคติดต่อมือเท้าปากในเด็กปฐมวัยและตรวจหาเชื้อไวรัส (Control and prevention of Hand-foot-mouth disease in children and viruses detection) ทุนสนับสนุนโดยมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิตปี2552 (ดำเนินการลุล่วง100 %)

3. หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง ผลกระทบต่อการพัฒนาของเม็ดเลือดแดงที่เกิดจากการติดเชื้อมาลาเรียสายพันธุ์ Plasmodium vivax (Effect of Plasmodium vivax infection on erythropoietic development) ทุนสนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปี 2553-2555 (ดำเนินการลุล่วง 100 %)

4. ผู้ร่วมโครงการวิจัยเรื่อง การทดสอบรีคอมบิแนนท์แอนติเจน 2 ชนิดคือ MPT64 และ ESAT6 จากเชื้อ Mycobacterium tuberculosis ในการทำให้เกิด Delayed type hypersensitivity (DTH) responses ใน guiea pig ทุนสนับสนุนโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปี 2555 (ดำเนินการลุล่วง 100 %)

5. หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง กลไกความผิดปกติการสร้างเม็ดเลือดแดงจากการติดเชื้อ Plasmodium vivax: ศึกษาโดยใช้เซลล์ต้นกำเนิดของเม็ดเลือดของคนที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (Molecular basis of the dyserythropoiesis by *Plasmodium vivax* infection: An in vitro model study in human hematopoietic stem cells) ทุนสนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการ

การอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปี 2556-2558 (ดำเนินการลุล่วง 100 %)

6. หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาฤทธิ์สารสกัดของทองพันชั่งและบัวบกในการต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อพัฒนาสบู่ (Study of antibacterial activity of *Rhinacanthus nasutus* (L.) and *Centella asiatica* L. for developing soap) (สัญญาเลขที่ 582020) ทุนสนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี 2558 (ดำเนินการลุล่วง 100 %)

ผลงานด้านการตีพิมพ์เผยแพร่

1. Panichakul T., Thophon S. Hand, foot and mouth disease in children. J Public Health. 2009, 39: 214-223. (supported by University Suan Dusit Rajabhat University)

2. Panichakul T., Thophon S., Kakhai C., Patumasut P., Somboon S., Sukasem C., Srichanrusami C. Surveillance and prevention of enterovirus spreading and hand-foot-mouth disease occurrence in young children. J Public Health & Develop. 2010, 8: 173-185. (supported by University Suan Dusit Rajabhat University)

3. Ponnikorn S., Panichakul T., Sresanga K., Wongboriuth C., Roytrakul S., Hongeng S., Tungpradabkul S. Phosphoproteomic analysis of apoptotic hematopoietic stem cells from hemoglobin E/β-thalassemia. J. Translational Medicine. 2011, 9: 96. (supported by Mahidol University)

4. Chootong P., Panichakul T., Permmongkol C., Barnes S.J., Udomsangpetch R., Adams J.H. Characterization of inhibitory anti-Duffy binding protein II immunity: Approach to Plasmodium vivax vaccine development in Thailand. Plos One, 2012, 4: e35769.

5. Panichakul T., Payuhakrit W., Panburana P., Wongborisuth C., Hongeng S., Udomsangpetch R. Suppression of erythroid development in vitro by Plasmodium vivax. Malaria J, 2012, 11: 173. (supported by Thailand research fund, Commission on Higher Education, Ministry of Education and Suan Dusit Rajabhat University, Bangkok, Thailand, MRG5380092)

6. Panichakul T., Patumasut P., Somboon S. Absence from school reduces spreading of hand-foot-mouth disease in school. SDU Res. J. 2013, 5 (2): 1-14.

7. Panichakul T., Prompamor P., Boohaud N., Sriyam S., Kanganaprachachai A., Amyam M. Cytotoxic activity of Banaba's extracts against human melanoma cells: In vitro study. SDU Res. J. 2013, 6(2): 97-113.

8. Boohaud N., Prompamor P., Panichakul T., Wiriyasangjan J., Pramot P., Pisuraj P., Amyam M. Growth of melanoma cells in vitro culture with extracts of Queen's flower. SDU Res J. 2014, 7(1): 41-56.

9. Panichakul T., Ponnikorn S., Roytrakul S., Paemanee A., Kittisenachai S., Hongeng S., Udomsangpetch R. *Plasmodium vivax* inhibits erythroid cell growth through altered phosphorylation of the cytoskeletal protein ezrin. Malaria J, 2015, 14: 138.

10. Yindeeyoungyeon W., Rukseree K., Tungsudjai S., Panichakul T. Evaluation of recombinant Mycobacterium tuberculosis antigens MPT64, CFP10 and ESAT6 for delayed-type hypersensitivity responses in guinea pigs. Advances in Microbiology, 2015, 5: 586-598.

11. Payuhakrit W., Panichakul T., Charoenphon N., Chlermsaenyakorn P., Jaovisidha A., Wongborisuth C., Udomsangpetch R. In vitro production of functional immune cells derived from human hematopoietic stem cells. EXCLI Journal, 2015, 14: 1031-1039.

12. Panichakul T., Boohaud N., Jantre K., et al. Antibacterial activity of Rhinacanthus nasutus (L.) Kurz extract against bacteria with dermatologic relevance. SDU Res J., 2017, 10(2): 133-148.

อนุสิทธิบัตร

ทัศนีย์ พาณิชย์กุล. อนุสิทธิบัตรผลิตภัณฑ์สบู่เหลวที่มีส่วนประกอบสารสกัดทองพันชั่ง เลขที่คำขอ 1503001746 วันที่ขอรับอนุสิทธิบัตร 14 ตุลาคม 2558 ออกให้วันที่ 29 กันยายน 2559 หมดอายุวันที่ 13 ตุลาคม 2564.

ผลงานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

หัวหน้าโครงการวิจัยเรื่องชื่อโครงการศึกษาฤทธิ์ของชะเอมเทศและมะหาดต่อการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเพื่อพัฒนา whitening cream (Study of activities of *Glycyrrhiza glabra* and *Artocarpus lakoocha* to inhibit melanogenesis for developing whitening cream) (สัญญาเลขที่ 602036) ทุนสนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี 2560 (ดำเนินการลุล่วง 90 %)

2. นางสาวณัฐพร บู๊ฮวด
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
สถานที่ติดต่อ หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต 228-228/1-3 ถนนสิรินธร แขวงบางพลัด เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700
หมายเลขโทรศัพท์ 02 4239420-1
โทรศัพท์มือถือ 089 1416790
โทรสาร 02 4239409
E-mail : NATTAPORN2608@GMAIL.COM
ประวัติการศึกษา
1998-2001 B. Sc. (Environmental science) Silapakorn University, Nakornpathom
2005-2007 M. Sc. (Cosmetic science) MaeFahLaung University, Chaingrai
สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Cosmetic Science, Health Science
ประสบการณ์ด้านวิจัย
1 การเจริญของเซลล์เมลาโนมาในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดจากอินทนิลน้ำและยางเลือดมังกร (หัวหน้าโครงการวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 (ดำเนินการลุล่วง 100%)
2 ฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อเซลล์เมลาโนมาของคน (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 (ดำเนินการลุล่วง 100%)
3 การศึกษาพื้นฐานของการเลี้ยงเซลล์ของคนในหลอดทดลองและการจัดเก็บข้อมูลของสารเครื่องสำอาง (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 (ดำเนินการลุล่วง 100%)
ผลงานด้านการตีพิมพ์เผยแพร่
1 . Boohuad N., Prompamorn P., Panichakul T., Viriyasangjan J., Pramote P., Pisurat P. and Emyeam M. Growth of Melanoma Cells in Vitro Culture with Extracts of Queen’s Flower (Lagerstroemia speciosa (L.) Per.). SDU Res. J. 2014, 7(1)-4, 41-56.
2. Panichakul T., Prompamor P., Boohaud N., Sriyam S., Kanganaprachachai A., Amyam M. Cytotoxic activity of Banaba’s extracts against human melanoma cells: In vitro study. SDU Res. J. 2013, 6(2), 97-113.

3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประสิทธิ์ สุวรรณเลิศ

Academic Position: Assistant Professor

Office: Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Tel. +66 2 201-5550 Fax. +66 2 354-7158 Mobile: +66 8 3130-0220

E-mail: prasit.suw@mahidol.ac.th, parasit109@yahoo.com

Education/ training

Year	Institution	Country
1999-2002	B.Sc. (Medical Technology)	Naresuan University Thailand
2003-2005	M.Sc. (Medical Biochemistry)	Khon Kaen University Thailand
2007-2010	Ph.D. (Pathobiology)	Mahidol University Thailand
2012-2013	Postdoctoral research	Kumamoto University Japan

Research Topic: Free radicals and pathological changes

An imbalance between radicals and anti-radicals capacity has been proposed to play an important role in the progression of pathological changes. Oxidative stress is considered a major contributor to various pathologies including aging and cancers. The research is on the field of antioxidants and natural products prevent pathological changes of aging and cancers.

Scopes of the research: Antioxidants of natural products, Oxidative stress and cancer progression, Anti-melanogenesis

Scholarships/ Research grants:

1. 2014-present: Research Grant from National Research Council of Thailand (NRCT) “Fermented tea leaves (Miang) using probiotic starters for colon cancer prevention”.

2. 2014-present: New Researcher Grant from Faculty of Science, Mahidol University, Thailand “ The effects of unpolished Thai rice on apoptotic colon cancer cells through wnt/ b -catenin pathway and vitamin D receptor”.

3. 2013-2014: Research Grant from National Research Council of Thailand (NRCT) “ Gold nanoparticle conjugated with 5 -Fluorouracil for cancer therapy as targeted drug delivery”.

4. 2012-2013: Postdoctoral Fellow of Division of Hematopoiesis, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Japan.

5. 2012: Research Grant from National Research Council of Thailand (NRCT) “Potential of water lily flower extracts in various extraction on total phenolic, flavonoid, anthocyanin, proanthocyanidin contents and antioxidant activities”.

6. 2011-2012: New Researcher Grant from Mahidol University, Bangkok Thailand “The Extraction of Phenolics in Unpolished Thai Rice and Anti-oxidant Activity that Effect on Glutathione Level to Prevent Oxidative Stress in Caco-2 Cells”.

7. 2010-2011: Research Grant from National Research Council of Thailand (NRCT) “Inulin from Jerusalem Artichoke Against Colon Cancer in Albino Rat”.

8. 2007-2010: Scholarship from Thailand Commission on Higher Education (CHE-PhD-THA), Ministry of Education, Thailand.

9. 2006: Scholarship from International Free Radical Summer School, 2006 Scholarship (SFRR Europe), Spetses Island, Greece.

Publications (Full paper)

1. Achiraya Tammasakchai, Chaiyavat Chaiyasut, Suda Riengrojpitak, Prasit Suwannalert. Unpolished Thai Rice Prevents ACF Formation and Dysplastic Progression in AOM-Induced Rats and Induces Apoptosis Through Redox Alteration in CaCo-2 Cells. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2015; 16 (7), 2827-2832.

2. Pranom Puchadapirom, Wanwisa Himakhun, Patoomratana Tuchinda, Lakana Himakoun, Thidarat Koomsang, Prasit Suwannalert. The Effects of Cleistanthoside A Tetraacetate Synthesis on Acute Toxicity and Bone Marrow Micronucleus in ICR Mice. Walailak Journal of Science and Technology 2015; 12(7): 605-611.

3. Jureerut Daduang, Adisak Palasap, Sakda Daduang, Patcharee Boonsiri, Prasit Suwannalert, Temduang Limpaiboon. Gallic Acid Enhancement of Gold Nanoparticle Anticancer Activity in Cervical Cancer Cells. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2015; 16(1), 169-174.

4. Prasit Suwannalert, Ryusho Kariya, Ikuko Suzu, Seiji Okada. The Effects of Salacia reticulata on Anti-Cellular Oxidants and Melanogenesis Inhibition in α-MSH-stimulated and UV Irradiated B16 Melanoma Cells. Natural Product Communications 2014; 9(4), 551-554.

5. Sarawoot Palipoch, Chuchard Punsawad, Phanit Koomhin, Prasit Suwannalert. Hepatoprotective effect of curcumin and alpha-tocopherol against cisplatin-induced oxidative stress. BMC Complementary and Alternative Medicine 2014; 14:111.

6. Adisak Palasap, Temduang Limpaiboon, Patcharee Boonsiri, Suthasinee Thapphasaraphong, Sakda Daduang, Prasit Suwannalert, Jureerat Daduang. The cytotoxic effect of phytophenolics from Caesalpinia mimosoides Lamk. on cervcal carcinoma cell lines through apoptotic pathway. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2014; 15(1), 449-454.

7. Sarawoot Palipoch, Chuchard Punsawad, Dutsadee Chinnapun, Prasit Suwannalert. Amelioration of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats by Curcumin and α -Tocopherol. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2013; 12(6), 973-979.

8. Sarawoot Palipoch, Chuchard Punsawad, Dutsadee Chinnapun, Prasit Suwannalert. Histopathology of Small Intestine Induced by Cisplatin in Male Wistar Rats. Walailak Journal of Science and Technology 2013; 10(6), 657-663.

9. Sarawoot Palipoch, Chuchard Punsawad, Prasit Suwannalert. Thunbergia laurifolia, a new choice of natural antioxidant to prevent oxidative stress-related pathology: A review. Journal of Medicinal Plants Research 2013; 7(12), 698-701.

10. Achiraya Tammasakchai, Sareeya Reungpatthanaphong, Chaiyavat Chaiyasut, Sirichet Rattanachitthawat, Prasit Suwannalert. The red strain of Oryza sativa-unpolished Thai rice prevents oxidative stress and colorectal aberrant crypt foci (ACF) formation in rats. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2012; 13, 1929-1933.

11.Pranom Puchadapirom, Achiraya Tammasakchai, Sareeya Reungpatthanaphong, Lakana Himakoun, Suraphol Kongtim, Patoomratana Tuchinda, Prasit Suwannalert. Non-Mutagenic and Genotixic Doses of Cleistanthoside A Tetraacetate Isolated from Phyllanthus taxodiifolius Beille. Journal of Medicinal Plants Research 2012; 6(26), 4317-4320.

12. Prasit Suwannalert, Nasapol Povichit, Pranom Puchadapirom, Mutita Junking. Anti-Aging Activity and Non-Toxic Dose of Phytooxyresveratrol from Artocarpus lakoocha Roxb. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2012; 11(1), 69-74.

13.Prasit Suwannalert, Sirichet Rattanachitthawat. High Levels of Phytophenolics and Antioxidant Activities in Oryza sativa-Unpolished Thai Rice Strain of Leum Phua. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2011; 10 (4), 431-436.

14. Sirichet Rattanachitthawat, Prasit Suwannalert, Chaiyavat Chaiyasut, Suda Riengrojpitak, Somsak Pantuwatana. Phenolic Content and Antioxidant Activities in

Red Color of Unpolished Thai Rice Prevent Oxidative Stress in Rats. Journal of Medicinal Plants Research 2010; 4(9), 796-801.

15. Prasit Suwannalert, Sirichet Rattanachitthawat, Chaiyavat Chaiyasut, Suda Riengrojpitak. High levels of 25-Hydroxyvitamin D3 [25(OH)D3] and α-tocopherol prevent oxidative stress in rats that consume Thai brown rice. Journal of Medicinal Plants Research 2010; 4(2), 120-124.

16. Prasit Suwannalert, Patcharee Boonsiri, Tueanjit Khampitak, Kovit Khampitak, Pote Sriboonlue, Puangrat Yongvanit. The levels of lycopene, alpha tocopherol and a marker of oxidative stress in healthy northeastern Thai elderly. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 2007; 16(Suppl 1), 27-30.

17. Prasit Suwannalert, Patcharee Boonsiri, Tueanjit Khampitak. Lycopene and prevention of coronary heart disease and cancer. Bulletin of Medical Technology and Physical Therapy. 2005; 17, 33-38.

4. นางสาวปิยวรรณ อยู่ดี

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

สถานที่ติดต่อ หลักสูตรเทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร โรงเรียนการเรือน มหาวิทยาลัยสวนดุสิต 228-228/1-3 ถนนสิรินธร แขวงบางพลัด เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

โทรศัพท์ 0 2423 9435

โทรสาร 0 2423 9438

E-mail: piyawanyoudee@gmail.com

ประวัติการศึกษา

ปริญญาโท วิทยาศาสร์และเทคโนโลยีการอาหาร สถาบัน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. โครงการวิจัยการใช้แก่นตะวันทดแทนแป้งสาลีบางส่วนในผลิตภัณฑ์คุกกี้

ผู้ร่วมวิจัย

2. โครงการวิจัยการผลิตเนยแข็งสมุนไพรและการบำบัดน้ำเวย์เพื่อผลิตแซนแทนกัมและไบโอเซลลูโลส

3. โครงการพัฒนาข้าวตังพร้อมปรุงสู่ครัวโลก

4. พฤติกรรมการบริโภคอาหารต่อภาวะการมีอายุยืนของผู้สูงอายุไทย

ผลงานด้านการตีพิมพ์เผยแพร่

1. Piyawan, Y. and Varipat, A. 2013. Microencapsulation of Gac Aril Using Gelatin as Carrier. The 15th FOOD INNOVATION ASIA CONFERENCE 2013 (13 -14 June 2013), BITEC Bangna, Bangkok, Thailand.

2. Piyawan, Y. and Varipat, A. 2014. Microencapsulation of Gac Aril Using β-cyclodextrin as Wall Material. 1st Joint ACS AGFD- ACS ICSCT Symposium Thailand (March 4-5, 2014), Montien Riverside Hotel, Bangkok.

3. Piyawan, Y. and Varipat, A. 2014. Stability of Carotenoids in Spray-dried Gac Aril Powder Encapsulated with β-cyclodextrins. The 16th FOOD INNOVATION ASIA CONFERENCE 2014 (12 -13June 2014), BITEC Bangna, Bangkok, Thailand.

5 นายฤทธิพันธ์ รุ่งเรือง

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงาน หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต 228-228/1-3 ถนนสิรินธร แขวงบางพลัด เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

โทร 0-2423-9420

เบอร์มือถือ 086-527 5934

E-mail rittipun.rung@gmail.com, rittipuntop@gmail.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2556 - พ.ศ.2558 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวเคมี) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

พ.ศ.2552 - พ.ศ.2555 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Basic molecular technique, natural product, bioactive compounds, plant cell culture

ผลงานด้านการตีพิมพ์เผยแพร่

1. Rungruang, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., and Matta, F.B., 2015, The accumulation of total phenolic content and antioxidant activity in suspension culture of Glycine max by Methyl jasmonate, Agricultural Science Journal, Vol. 46(3) (Suppl.), pp. 81-84.

2. Rungruang, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., and Matta, F.B., 2014, Effect of methyl jasmonate on peroxidase and antioxidant activity of callus in grape Vitis vinifera cv. Pok Dum, Agricultural Science Journal, Vol. 45(2) (Suppl.), pp. 109-112.

3. Rungruang, R., Swadchaipong, N., Kangsadan, T., Kleesuwan, S., and Kongruang, S., 2014, Application of high electric field pulse technique for microbial inactivation in milk, Suranaree Journal, Science and Technology, Vol. 21(4), pp.293-300.