ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากใบและผลของผลไม้สดและอบแห้ง และการผลิตครีมบำรุงผิว

Antioxidant Activity and Tyrosinase Inhibition Activity from Fresh and Dried Leaves and Fruits and Nourishing Cream Production

ปรานอม ขาวเมฆ[1*] และ วิลาวัลย์ จันทนู[2]

Pranorm Khaomek[1*] and Wilawan Jantanu[2]

[1*]*อาจารย์ประจำ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000*

[2]*นักศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000*

[1*]*Lecturer of Chemistry Department, Faculty of Science, Rangsit University, Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumtanee, Thailand 12000*

[2]*Graduate student in Bachelor of Science (Applied Chemistry) of Science Faculty, Rangsit University, Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumtanee, Thailand 12000*

[*]*Corresponding author, E mail: kpranorm@hotmail.com*

บทคัดย่อ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบและผลของผลไม้สดและอบแห้ง ที่สกัดด้วย 95 % เอทานอล จำนวน 24 ตัวอย่าง เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี FCR โดยใช้วิตามินซีเป็นสารเปรียบเทียบ พบว่า สารสกัดจากจากใบและผลของผลไม้สดและอบแห้งที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดคือ เปลือกทับทิมสดและใบทับทิมแห้ง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.81 ppm และ 2.40 ppm ตามลำดับ ส่วนวิตามินซีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.57 ppm สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยใช้ Folin-Ciocalteu reaction (FCR) พบว่า สารสกัดจากใบและผลของผลไม้สดและอบแห้งที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุดคือ เปลือกทับทิมสด และใบทับทิมแห้ง มีค่าเท่ากับ 8.11 mg GAE/g extract และ 6.60 mg GAE/g extract ตามลำดับ เมื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Modified dopachrome พบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมสดนั้น มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02 ppt ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าวิตามินซีคือ 0.06 ppt งานวิจัยนี้จึงนำเปลือกทับทิมสดไปผลิตครีมบำรุงผิว และนำไปทดสอบการระคายเคืองและความชุ่มชื้นต่อผิวหนังในอาสาสมัคร 22 คน พบว่าไม่มีอาการระคายเคืองต่อผิวหนัง โดยครีมบำรุงผิวที่ผสมสารสกัดจากเปลือกทับทิมสด 3% เพิ่มความชุ่มชื้นผิวได้ดีที่สุด มีค่าความชุ่มชื้นอยู่ในช่วง 27.5 ± 0.0 ถึง 74.3 ± 0.3 % ส่วนครีมที่ไม่ได้ผสมสารสกัดจากเปลือกทับทิมสดมีค่าความชุ่มชื้นอยู่ในช่วง 23.7 ± 0.0 ถึง 60.0 ± 0.2 %

คำสำคัญ: *ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ วิธีดีพีพีเอช ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (เอฟ ซี อาร์) ฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ไทโรซิเนส*

Abstract

The antioxidant activity of 95% ethanol extract of fresh and dried leaves and fruits from 24 samples were determined using free radical scavenging method (DPPH method) and Folin-Ciocalteu reaction (FCR assay) in comparison with vitamin C. We found that crude ethanol extracts of fresh pomegranate peel showed the highest antioxidant activity with DPPH at IC_{50} 1.81 ppm and dry pomegranate leaves showed the highest antioxidant activity with DPPH at IC_{50} 2.40 ppm. While vitamin C that was used as the control, showed IC_{50} at 1.57 ppm. The total phenolic content using FCR assay for crude ethanol extracts of fresh pomegranate peel showed the highest total phenolic content at 8.11 mg GAE/g extract and dry pomegranate leaves showed the highest total phenolic content at 6.60 mg GAE/g extract. Tyrosinase inhibition activity for all of sample, which had the highest antioxidant activity, showed that pomegranate peel had higher activity than control with IC_{50} at 0.02 ppt while vitamin C had IC_{50} 0.06 ppt. Pomegranate peel was selected for nourishing cream production. The skin irritation testing showed that the nourishing skin cream did not cause any skin erythematic or edema of the inner arm. The moisture content study of nourishing cream production using Digital Moisture Monitor for skin showed that the mixture of pomegranate peel extract with nourishing cream had higher moisture content than pure nourishing cream. The mixture of pomegranate peel extract with nourishing cream showed moisture content in range of 27.5 ± 0.0 to 74.3 ± 0.3 %, while pure nourishing cream had moisture content in range of 23.7 ± 0.0 to 60.0 ± 0.2 %.

Keywords: *Antioxidant activity, DPPH method, Total phenolic compounds (FCR), Tyrosinase inhibition activity*

1. บทนำ

คนส่วนมากต้องการมีผิวพรรณที่สดใส อ่อนเยาว์ ไร้ริ้วรอย แต่ด้วยสภาพของร่างกายที่ร่วงโรยตามกาลเวลาเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงได้ยาก อย่างไรก็ตามถ้ามีวิธีการที่จะช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงความเสื่อมโทรมนั้นได้ นับว่าเป็นสิ่งที่น่าสนใจยิ่งนัก ปัญหาเกี่ยวกับผิวพรรณมีหลายอย่าง แต่ที่พบได้บ่อยคือ การเกิดริ้วรอย จุดด่างดำ ความหมองคล้ำ และกระ บริเวณผิวหนังโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ผิวหน้า เนื่องจากอายุที่เพิ่มขึ้นแล้วยังเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น แสงแดด มลภาวะ การทำงานหน้าจอคอมพิวเตอร์เป็นเวลานาน และความเครียด เป็นต้น (โอภา วัชระคุปต์, 2549) สิ่งต่างๆ เหล่านี้เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารธรรมชาติจึงได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Chantree, 2015) สารสกัดจากธรรมชาติจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ส่งผลให้การสร้างเมลานินในผิวหนังลดลงและทำให้ผิวพรรณกระจ่างใสขึ้นกว่าเดิม (บุปผาชาติ, 2549 และ Tachakittirungrod, 2007)

อนุมูลอิสระก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย นำไปสู่โรคบางโรคหรือทำให้เซลล์ผิดปกติ โรคที่เกิดจากร่างกายที่มีปริมาณอนุมูลอิสระสะสมอยู่ในปริมาณมาก เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคเกี่ยวกับระดับภูมิคุ้มกันทำงานผิดปกติ เป็นต้น ภาวะต่างๆ เหล่านี้สามารถควบคุมได้โดยอาศัย สารต้านอนุมูลอิสระ ที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดกระบวนการสำคัญที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ โดยช่วยยับยั้งอนุมูล

อิสระไม่ให้ทำลายเซลล์ (Halliwell, 1999 and Zuidhoff, 2001)

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากใบและผลของผลไม้ไทยชนิดต่างๆ ทั้งจากสดและอบแห้ง เนื่องจากประเทศไทยเป็นเมืองเขตร้อนที่มีผลไม้เป็นจำนวนมาก เมื่อถึงหน้าฤดูกาลของผลไม้ ผลไม้จะออกมาล้นตลาด ทำให้ราคาผลไม้ตกต่ำ และเมื่อจำหน่ายไม่หมดก็จะทำให้ผลไม้เน่า รวมทั้งมีส่วนของเปลือกผลไม้บางชนิด ที่กลายเป็นขยะปริมาณมาก หากงานวิจัยนี้สามารถศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของผลไม้สดและผลไม้แห้งได้ จะสามารถนำผลไม้ไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้ เช่น การพัฒนาเป็นส่วนประกอบสำคัญของเครื่องประทินผิว (ผลิตภัณฑ์เสริมความงามในธุรกิจสปา เพื่อลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้ผลไม้ไทย และส่วนที่ไม่ได้นำไปรับประทานได้อีกด้วย

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความแตกต่างของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบและผลของผลไม้ชนิดต่างๆ ทั้งผลไม้สดและผลไม้อบแห้งด้วยวิธี DPPH และวิธี FCR

2. เพื่อศึกษาความแตกต่างของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โรซิเนส ของของใบและผลของผลไม้ชนิดต่างๆ ทั้งผลไม้สดและผลไม้อบแห้ง

3. เพื่อนำผลไม้ที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ดีที่สุดมาผลิตเป็นครีมบำรุงผิว

4. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานให้ผู้ที่สนใจในผลไม้นำไปศึกษาวิจัยต่อยอด และเพิ่มมูลค่าให้กับผลไม้ไทย

3. วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างผลไม้ซื้อจากตลาดรังสิต ตำบลประชาธิปัตย์ อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2558 ผลไม้ที่ซื้อมา 7 ชนิดคือ แอปเปิ้ลแดง แอปเปิ้ลฟูจิ แอปเปิ้ลเขียว แก้วมังกรขาว ทับทิม ฝรั่งแป้น และฝรั่งขี้นก ส่วนที่ใช้ทำการทดลอง ได้แก่ เนื้อแอปเปิ้ลแดง เปลือกแอปเปิ้ลแดง เนื้อแอปเปิ้ลฟูจิ เปลือกแอปเปิ้ลฟูจิ เนื้อแอปเปิ้ลเขียว เปลือกแอปเปิ้ลเขียว เนื้อแก้วมังกรขาว เปลือกแก้วมังกรขาว เปลือกทับทิม ใบทับทิม ใบฝรั่งแป้น และใบฝรั่งขี้นก

3.1 อุปกรณ์

1. UV-Visible Spectroscopy (Shimadzu)
2. Rotary evaporator (BUCHI Thailand Ltd.)
3. Micropipette, Test tube, Volumetric flask
4. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง

3.2 สารเคมี

1. 95% Ethanol (Lab Grade, RCl lab-scan Ltd.)
2. Methanol (AR grade, RCl lab-scan Ltd.)
3. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Fluka)
4. L-Ascorbic acid (Vitamin C) (L-(+) - Ascorbic Acid) (J.T. Baker)
5. Tyrosinase from mushroom (Sigma)
6. L-DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine) (Sigma)
7. Disodium hydrogen phosphate dehydrate (Unilab)
8. Sodium dihydrogen phosphate hydrate (Merck)
9. Folin-ciocalteu's reagent
10. Gallic acid และ Sodium carbonate

3.3 การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบและผลของผลไม้สดและอบแห้ง

นำใบและผลของผลไม้มาล้างทำความสะอาดและหั่นให้มีขนาดเล็ก จดบันทึกน้ำหนัก และแช่ด้วยเอทานอล (ให้มีปริมาตรเป็น 3 เท่าของสารตัวอย่าง) 3 ครั้ง ครั้งละ 3 วัน กรองแล้วนำไประเหยแห้งโดยใช้เครื่อง rotary evaporator บันทึกน้ำหนักของสารสกัดจากใบและผลของผลไม้สดที่สกัดได้ ส่วนใบและผลของผลไม้อบแห้งนั้น ทำเช่นเดียวกับจากใบและผลของผลไม้สดแต่ก่อนการแช่ด้วยเอทานอล จะนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 ^{o} C ก่อน

3.4 การหาความยาวคลื่นที่ DPPH สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด (λ_{max}) และการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

1. นำสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.10 mM มาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-Visible Spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 400 – 800 nm เพื่อหาค่าความยาวคลื่นที่สารละลาย DPPH สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด (λ_{max})

2. เตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.10 mM ใน methanol โดยชั่ง DPPH มา 0.0390 g ละลายด้วย methanol และปรับปริมาตรเป็น 100 mL

3. เตรียมสารละลายตัวอย่างทั้งหมด และวิตามินซี ที่ความเข้มข้น 1000 ppm (stock solution)

4. เตรียมสารละลายตัวอย่างทั้งหมด และวิตามินซีจาก stock solution ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 10 50 100 และ 500 ppm ใน methanol

5. ปิเปตสารละลายแต่ละความเข้มข้น จากข้อ 3 ใส่หลอดทดลองหลอดละ 1.60 mL โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

6. ปิเปตสารละลาย DPPH 2.40 mL เติมลงในหลอดทดลองในข้อ 4 เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที

7. เมื่อครบ 30 นาที นำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 516 nm แล้วนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) ดังสมการ

$$\%\text{inhibition} = \frac{(\text{A control} - \text{A sample})}{\text{A control}} \times 100$$

โดย A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน

8. สร้างกราฟความสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดกับ % inhibition และคำนวณหา ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH) ได้ 50% (IC_{50})

3.5 การหาความยาวคลื่นของสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด (λ_{max}) และ การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอกลิกทั้งหมด ด้วยวิธี FCR

1. ผสมสารละลาย Gallic acid (GA) ที่มีความเข้มข้น 10 μg/mL กับ Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 1.5 mL ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติม 20% Na_2CO_3 ปริมาตร 4 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 mL ทิ้งไว้ 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง UV-Visible Spectroscopy

2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน GA ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL (stock solution) ชั่ง GA 0.10 g ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 mL ในขวดปรับปริมาตร

3. เจือจางสารละลายมาตรฐาน GA จาก stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 0.4 0.7 1 3 5 และ 7 μg/mL แล้วเติม FCR ปริมาตร 1.5 ml ทิ้งไว้ 5 นาที

4. เติม 20% Na_2CO_3 ปริมาตร 4 mL เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 mL ทิ้งไว้ 30 นาที (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 758 nm

5. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน GA (standard curve) ซึ่งจะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง จากนั้นหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน เพื่อนำไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด จากตัวอย่างสารสกัดผลไม้ที่นำไปวิเคราะห์

6. เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยชั่งสารตัวอย่าง 0.1250 g ละลาย และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 mL ในขวดวัดปริมาตร

7. ปิเปตสารละลายจากข้อ 1 มา 0.2 mL เติม FCR ปริมาตร 1.5 mL ทิ้งไว้ 5 นาที

8. เติม 20% Na_2CO_3 ปริมาตร 4 mL เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 mL ในขวดวัดปริมาตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 758 nm

9. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้สมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย GA

3.6 การหาความยาวคลื่นของ Tyrosinase ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด (λ_{max}) และ การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

1. นำสารละลาย Tyrosinase ความเข้มข้น 314.8 unit/mL มาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-VIS spectroscopy ที่ความยาวคลื่น 400-800 nm

2. เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.02 M Sodium Phosphate Buffer (pH 6.8) โดยชั่ง $Na_2HPO_4.2H_2O$ 1.76 g และ $NaH_2PO_4.H_2O$ 0.69 g ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 1000.00 mL โดยปรับค่า pH ให้ได้ 6.8

3. เตรียมสารละลาย เอนไซม์ไทโรซิเนส (314.8 unit/mL) โดยชั่งเอนไซม์ไทโรซิเนสมา 10 mg และปรับปริมาตรด้วย 0.02 M ของ Sodium Phosphate Buffer (pH 6.8) ให้มีปริมาตรเป็น 250.00 mL

4. เตรียมสารละลายตัวอย่างทั้งหมด และวิตามินซีให้มีความเข้มข้น 0.01 0.05 0.1 0.5 และ 1 mg/mL ใน methanol

5. เตรียมสารละลาย L-DOPA 0.34 mM โดยชั่ง L-DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine) 16 mg ละลายด้วย 250.00 ml ของ 0.02 M Sodium Phosphate Buffer (pH 6.8)

6. นำสารละลายตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ Dopachrome method เทียบกับสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ดังนี้เติมสารละลาย control (สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 500 μL Sodium Phosphate Buffer 0.02 M (pH 6.8) 1500 μL และ Methanol 500 μL) และ sample (สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 500 μL Sodium Phosphate Buffer 0.02 M (pH 6.8) 1500 μL และสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน 500 μL) แยกกันลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5.00 mL เขย่าให้สารละลายผสมกัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA 500 μL ลงในแต่ละขวด ปรับปริมาตรด้วย methanol เขย่า และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 495 nm (absorbance, A_{495}) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ต่ออีก 2 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่นเดิม (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

7. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (%inhibition) ดังสมการ

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

8. สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกับ% inhibition เพื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (IC_{50})

3.7 การเตรียมผลิตภัณฑ์ครีมบำรุงผิวจากสารสกัดเปลือกทับทิม

วิธีการเตรียมครีมบำรุงผิว

1. นำส่วนประกอบต่างๆ ที่ต้องการสำหรับใช้ในการผลิตครีมบำรุงผิวค่อยๆ เติมทีละน้อย แล้วค่อยๆ คนจนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

2. สำหรับงานวิจัยนี้ เตรียมครีมบำรุงผิวที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด 3 สูตรคือ A B และ C ดังนี้

A คือ ครีมบำรุงผิวที่ไม่มีสารสกัดจากเปลือกทับทิม (control)

B คือ ครีมบำรุงผิวที่มีสารสกัดจากเปลือกทับทิม 1%

C คือ ครีมบำรุงผิวที่มีสารสกัดจากเปลือกทับทิม 3%

3. เมื่อเติมสารต่างๆ ครบทั้งหมดแล้ว กวนครีมให้เข้ากัน จะได้ครีมบำรุงผิวผสมสารสกัดจากเปลือกทับทิมสด บรรจุลงบรรจุภัณฑ์

3.8 การทดสอบการระคายเคืองและค่าความชุ่มชื้นต่อผิวหนังของอาสาสมัครที่ใช้ครีมบำรุงผิวจากสารสกัดของเปลือกทับทิม

การทดสอบการระคายเคืองผิวหนังในอาสาสมัคร จำนวน 22 คน โดยให้อาสาสมัครทาครีมบำรุงผิวลงบริเวณท้องแขนหลังอาบน้ำ วันละ 2 ครั้ง เช้า–เย็น เป็นประจำทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน ประเมินการระคายเคืองและความชุ่มชื้นของผิว โดยสังเกตอาการแดง (erythema) ของผิว และตรวจวัดความความชุ่มชื้นผิว ด้วยเครื่องวัดสภาพความชุ่มชื้น ประเมินผลการทดสอบและสรุปผล ความชุ่มชื้นผิวด้วยเครื่องวัดทดสอบและสรุปผล

4. ผลการวิจัย

4.1 ความยาวคลื่นที่ DPPH สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบและผลของผลไม้ที่นำมาศึกษา ด้วยวิธี DPPH

1. นำสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.10 mM มาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometer พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด (λ_{max}) เท่ากับ 516 nm

2. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบและผลของผลไม้สดและอบแห้งที่นำมาศึกษาโดยการสกัดด้วยเอทานอลเปรียบเทียบกับวิตามินซี ทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH ซึ่งค่าดูดกลืนแสงที่ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 516 nm และคำนวณหา ความเข้มข้นของสารสกัด ที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (DPPH) ได้ 50% (IC_{50}) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 1

จากตาราง 1 แสดงให้เห็นว่าใบและผลของผลไม้สดและอบแห้งที่ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH โดยใช้วิตามินซีเป็นสารเปรียบเทียบที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.57 ppm พบว่าในผลไม้ที่มีค่า IC_{50} มากกว่าสารเปรียบเทียบแต่น้อยกว่า 10 ppm ได้แก่ เปลือกทับทิม ใบทับทิม ใบฝรั่งแป้น และใบฝรั่งขี้นก ในผลไม้ทั้งสดและอบแห้งมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 1.81 ถึง 2.72 และ 2.40 ถึง 3.57 ppm ตามลำดับ ส่วนใบและผลของผลไม้สดและอบแห้งที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 10 ppm แต่น้อยกว่า 50 ppm ได้แก่ เปลือกแอปเปิ้ลแดงสด เปลือกแอปเปิ้ลฟูจิสด เปลือกแอปเปิ้ลเขียวสด มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 12.73 ถึง 27.66 ppm และใบและผลของผลไม้สดและอบแห้งที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 50 ppm แต่น้อยกว่า 100 ppm คือเปลือกแอปเปิ้ลแดงอบแห้ง ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 57.08 ppm

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH จากใบและผลของผลไม้สดและอบแห้ง

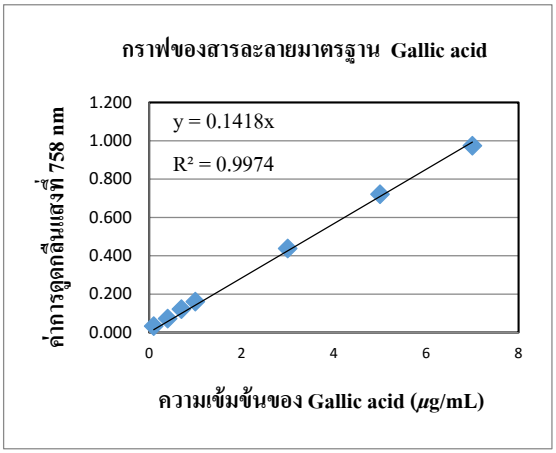
ลำดับ	ผลไม้	IC_{50} (ppm)	
		สด	อบแห้ง
1	เนื้อแอปเปิลแดง	457.27	>500
2	เปลือกแอปเปิลแดง	12.73	57.08
3	เนื้อแอปเปิลฟูจิ	>500	>500
4	เปลือกแอปเปิลฟูจิ	23.82	440.53
5	เนื้อแอปเปิลเขียว	486.92	>500
6	เปลือกแอปเปิลเขียว	27.66	243.93
7	เนื้อแก้วมังกรขาว	>500	>500
8	เปลือกแก้วมังกรขาว	>500	>500
9	เปลือกทับทิม	1.81	2.69
10	ใบทับทิม	1.94	2.40
11	ใบฝรั่งแป้น	2.54	3.57
12	ใบฝรั่งขี้นก	2.72	3.15
สารเปรียบเทียบ			
วิตามินซี		1.57	

นอกจากนี้ในตารางที่ 3 นั้นยังพบว่าส่วนใบและผลของผลไม้สดและอบแห้งที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 100 ppm แต่น้อยกว่า 500 ppm เนื้อแอปเปิ้ลแดงสด เปลือกแอปเปิ้ลฟูจิแห้ง เนื้อแอปเปิลเขียวสด เปลือกแอปเปิลเขียวอบแห้ง มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 243.93 ถึง 486.92 ppm ขณะที่ใบและผลของผลไม้สดและอบแห้งที่มีค่า IC_{50} มากกว่า 500 ppm ได้แก่ เนื้อแอปเปิลแดงอบแห้ง เนื้อแอปเปิลฟูจิทั้งสดและอบแห้ง เนื้อแอปเปิลเขียวอบแห้ง เนื้อแก้วมังกรขาวทั้งสดและอบแห้ง เปลือกแก้วมังกรทั้งสดและอบแห้ง ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากใบและผลของผลไม้สดและอบแห้งนั้น แสดงให้เห็นว่าในผลไม้สดมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าในผลไม้อบแห้ง

4.2 ความยาวคลื่นของสารประกอบฟีนอลิกที่สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี FCR

1. นำสารละลาย Gallic acid ที่ความเข้มข้น 10 μg/mL ปริมาตร 0.1 ml กับ FCR ปริมาตร 1.5 mL ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 20% Na_2CO_3 ปริมาตร 4 mL แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 mL ในขวดวัดปริมาตร ทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometer พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดเท่ากับ 758 nm

2. จากกราฟของสารละลายมาตรฐาน GA ที่ความเข้มข้น 0.10, 0.40, 0.70, 1.00, 3.00, 5.00 และ 7.00 μg/mL แล้วเติม FCR ปริมาตร 1.5 mL ทิ้งไว้ 5 นาทีจากนั้นเติม 20% Na_2CO_3 ปริมาตร 4 mL เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 mL ในขวดวัดปริมาตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 758 nm เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสาร GA มาสร้างกราฟเส้นตรง จะได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 กราฟของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid

3. การวิเคราะห์หาปริมาณของ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยวิธี FCR ซึ่งในการทดลองใช้ GA เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยวิธีนี้จะนำสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ FCR และ 20% Na_2CO_3 โดยสารละลาย

FCR ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีน้ำเงิน นำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง ไปคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยการใช้กราฟของสารละลายมาตรฐาน Gallic acid ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่2 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี FCR

ลำดับ	ผลไม้	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/g extract)	
		สด	อบแห้ง
1	เนื้อแอปเปิ้ลแดง	0.25	0.21
2	เปลือกแอปเปิ้ลแดง	1.04	0.47
3	เนื้อแอปเปิ้ลฟูจิ	0.14	0.08
4	เปลือกแอปเปิ้ลฟูจิ	0.73	0.29
5	เนื้อแอปเปิ้ลเขียว	0.18	0.17
6	เปลือกแอปเปิ้ลเขียว	0.43	0.38
7	เนื้อแก้วมังกรขาว	0.21	0.19
8	เปลือกแก้วมังกรขาว	0.46	0.30
9	เปลือกทับทิม	8.11**	4.33*
10	ใบทับทิม	6.65*	6.60*
11	ใบฝรั่งแป้น	3.95*	2.71*
12	ใบฝรั่งขี้นก	4.20*	2.92*
สารเปรียบเทียบ			
	วิตามินซี	8.97**	

หมายเหตุ * เจือจางสาร 5 เท่า ** เจืองจาง 10 เท่า

จากตารางที่ 2 พบว่าในสารสกัดจากใบและผลของผลไม้สดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ เปลือกทับทิม รองลงมาคือ ใบทับทิม ใบฝรั่งขี้นก ใบฝรั่งแป้น เปลือกแอปเปิลแดง เปลือกแอปเปิ้ลฟูจิ เปลือกแก้วมังกรขาว เปลือกแอปเปิ้ลเขียว เนื้อแอปเปิ้ลแดง เนื้อแก้วมังกรขาว เนื้อแอปเปิ้ลเขียว และเนื้อแอปเปิ้ลฟูจิ ตามลำดับ ส่วนในสารสกัดจากใบและผลของผลไม้อบแห้ง สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด คือ ใบทับทิม รองลงมาคือ เปลือกทับทิม ใบฝรั่งขี้นก ใบฝรั่งแป้น เปลือกแอปเปิ้ลแดง เปลือกแอปเปิ้ลเขียว เปลือกแก้วมังกรขาว เปลือกแอปเปิ้ลฟูจิ เนื้อแอปเปิ้ลแดง เนื้อแก้วมังกรขาว เนื้อแอปเปิ้ลเขียว และเนื้อแอปเปิ้ลฟูจิ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งโดยวิธี FCR ในสารสกัดจากผลไม้สดและผลไม้อบแห้งนั้น ยืนยันได้ว่า สารสกัดผลไม้สด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าสารสกัดจากผลไม้อบแห้ง 4.3 ความยาวคลื่นที่ Tyrosinase สามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุด และ การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากใบและผลของผลไม้สดและผลไม้อบแห้ง

1. เมื่อนำสารละลาย Tyrosinase ความเข้มข้น 314.8 unit/ml มาวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometer พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด (λ_{max}) เท่ากับ 495 nm

2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากผลไม้สด และผลไม้อบแห้ง เมื่อนำแต่ละตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Modified Dopachrome เปรียบเทียบกับวิตามินซี และคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (IC_{50}) ได้ผลแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซท์ไทโรซิเนสของผลไม้สด และผลไม้แห้ง

ลำดับ	ผลไม้	IC_{50}	
		สด	อบแห้ง
1	เปลือกทับทิม	0.02	0.09
2	ใบทับทิม	0.07	0.09
3	ใบฝรั่งแป้น	0.07	0.12
4	ใบฝรั่งขี้นก	0.09	0.09
สารเปรียบเทียบ			
	วิตามินซี	0.06	

จากตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดจากผลไม้ทั้งสดและอบแห้ง 8 ตัวอย่าง พบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิมสดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.02 ppt เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ซึ่งมีฤทธิ์การยับยั้งที่น้อยกว่าวิตามินซีมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.06 ppt

4.4 การทดสอบความชุ่มชื้นต่อผิวหนังของอาสาสมัครที่ได้ใช้ครีมบำรุงผิวจากสารสกัดจากเปลือกทับทิม

ทดสอบความชุ่มชื้นของผิวด้วยเครื่องตรวจวัดความชุ่มชื้นผิว (digital moisture monitor for skin) ทั้งหมด 4 จุด คือบริเวณที่ไม่ได้ทาครีม ครีมไม่ผสมสารสกัดจากเปลือกทับทิม ครีมผสมสารสกัดจากเปลือกทับทิม 1% และครีมผสมสารสกัดจากเปลือกทับทิม 3% โดยอาสาสมัครต้องทาบริเวณท้องแขนเป็นประจำเช้า-เย็น เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าครีมบำรุงผิวที่ผสมสารสกัดจากเปลือกทับทิมสด3 % สามารถเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิวได้ดีที่สุด มีค่าความชุ่มชื้นอยู่ในช่วง 27.5 ± 0.0 ถึง 43.5 ± 0.0 % ส่วนครีมที่ไม่ได้ผสมสารสกัดจากเปลือกทับทิมมีค่าความชุ่มชื้นอยู่ในช่วง 23.7 ± 0.0 ถึง 32.2 ± 0.0 % และไม่พบการระคายเคืองของผิวหนังอาสาสมัคร

5. การอภิปรายผล

เมื่อนำสารสกัดจากผลไม้สดและผลไม้อบแห้งทั้งหมด 24 ตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี FCR และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method ซึ่งใช้วิตามินซีเป็นสารเปรียบเทียบ พบว่าผลไม้สด และผลไม้อบแห้งที่ให้ผลต่อการทดสอบทั้งหมดได้ดีที่สุด คือ สารสกัดจากเปลือกทับทิมสด จึงนำสารสกัดนี้มาผลิตครีมบำรุงผิว เมื่อนำไปทดสอบการระคายเคืองและทดสอบความชุ่มชื้นต่อผิวหนังในอาสาสมัคร 22 คน พบว่าไม่มีอาการระคายเคืองหรืออาการแดงต่อผิวหนัง ผลการทดสอบความชุ่มชื้นพบว่า ครีมที่มีการผสมสารสกัดจากเปลือกทับทิม 3% จะสามารถเพิ่มความชุ่มชื้นกับผิวได้ดีที่สุด โดยมีค่าความชุ่มชื้นอยู่ในช่วง 27.5 ± 0.0 ถึง 43.5 ± 0.0 % ส่วนครีมที่ไม่ได้ผสมสารสกัดจากเปลือกทับทิมมีค่าความชุ่มชื้นอยู่ในช่วง 23.7 ± 0.0 ถึง 32.2 ± 0.0 % ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกทับทิมสดจึงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางได้

6. บทสรุป

เปลือกทับทิมสดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ควรมีการศึกษาฤทธิ์และองค์ประกอบทางเคมีให้กว้างขวาง เพื่อนำไปพัฒนา ใช้ในอุตสาหกรรมด้านสุขภาพ และความสวยงาม การผลิตครีมผิวขาวและลดรอยเหี่ยวย่น ต่อไปในอนาคต

7. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ให้การสนับสนุนการทำวิจัย สถานที่ในการทดลอง ตลอดจนอนุเคราะห์สารเคมี รวมทั้งอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

8. เอกสารอ้างอิง

บุปผาชาติ พดด้วง และมณีรัตน์ มีพลอย. 2549. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ของเถาสิริธรวัลลี (สามสิบสองประดง). วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.21(3): 69-78.

โอภา วัชระคุปต์. 2549. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ: พี.เอส.พริ้นท์.

Chantree, K. 2015. Formulation of Whitening Cosmetics from *Lakoocha* Extract: SDU Res. J. 8(1): Jan-April 2015.

Halliwell, B. 1999. Antioxidant defense mechanism: from the beginning to the end. Society or Free Radical Biology and Medicine. 31: 261-272.

Tachakittirungrod, S. et al. 2007. Study on antioxidant activity of certain plans in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. Food Chemistry. (103): 381-388.

Zuidhoff, H. W. and Rijishergen, J. M. 2001. Whitening Effecacy of Frequently Used Whitening. Ingredients. Cosmet. Toil. 116: 53-67.

มหาวิทยาลัยรังสิต