การพัฒนาโลชั่นบำรุงผิวจากสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสา

ณพัฐอร บัวฉุน[1*] เยาวนารถ งามนนท์[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสา โดยนำรากชะเอมไทยและผลพิลังกาสามาสกัดด้วยเอทานอล ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดระหว่างสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และนำสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์โลชั่น ผลการวิจัยพบว่า สารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบพิลังกาสามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 55.20 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และ 52.81 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิคต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ปริมาณแทนนินทั้งหมดเท่ากับ 35.20 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร และ 17.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสาพบสารประกอบกลุ่มสารหลักคือ สารฟลาโวนอยด์ แต่ตรวจไม่พบกลุ่มสารสเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ และ สารอัลคาลอยด์ สารสกัดหยาบชะเอมไทยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ในขณะที่ BHA และ BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.54 และ 12.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารสกัดหยาบผลพิลังกาสามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.94 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, BHA และ BHT มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.54 และ 12.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ อัตราส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด คือ อัตราส่วนที่ 1 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิวจากสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสา พบว่า โลชั่นมีเนื้อเป็นสีขาว ลักษณะทางกายภาพคงตัวที่ดี ไม่มีกลิ่น และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.6

คำสำคัญ : สารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด องค์ประกอบทางเคมี ชะเอมไทย พิลังกาสา

[1]สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

[2] ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

** e-mail: send2duang@hotmail.com*

DEVELOPMENT OF SKIN LOTION FROM *ALBIZIA MYRIOPHYLLA* BENTH. AND *ARDISIA ELLIPTICA THUMB*. CURED EXTRACTS

Napattaorn Buachoon[1*] Yawanart Ngamnon[2]

ABSTRACT

The objective of this research was to study the chemical composition and antioxidant activity of crude extract from of *Albizia myriophylla* Benth and *Ardisia elliptica* Thunb *Albizia myriophylla* Benth and *Ardisia elliptica* Thunb were extracted with ethanol. The optimum ratio between crude extract from of *Albizia myriophylla* Benth and *Ardisia elliptica* Thunb after that, the optimum antioxidant of crude extract was used to prepare the antioxidant lotion. The result showed that crude extract of *Albizia myriophylla* Benth and *Ardisia elliptica* Thunb had total phenolic contents 55.20 and 52.81 milligram gallic acid/100 g FW; respectively, total tannin content 35.20 and 17.80 micrograms per milliliter. There were steroid-terphene alkaloid and flavonoids in the crude extract of *Albizia myriophylla* Benth and *Ardisia elliptica* Thunb. The crude extract of *Albizia myriophylla* Benth had antioxidant activity (IC_{50}) 12.02 micrograms per milliliter, whereas BHA and BHT had IC_{50} 12.54 and 12.86 micrograms per milliliter respectively. The crude extract of *Ardisia elliptica* Thunb had antioxidant activity (IC_{50}) 12.94 micrograms per milliliter, whereas BHA and BHT had IC_{50} 12.54 and 12.86 µg/ml respectively. The best of a ratio for antioxidant activity with 1 ratio had IC_{50} 13.09 micrograms per milliliter. The lotion was odorless, and their physical properties and stability of formulation were investigated and with positive potential of the pH 7.6

Keywords : Antioxidant activity, Total phenolic, Chemical Composition, *Albizia myriophylla* Benth, *Ardisia elliptica* Thunb

[1] Chemistry Program , Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage

2 Science center, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage

** Corresponding author, e-mail: send2duang@hotmail.com*

บทนำ

อนุมูลอิสระ (Free radical) คือ โมเลกุล หรือไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีในลักษณะที่เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่รอบข้างได้ในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์ต่างๆ ภายในร่างกาย เช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) การเปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ จนทำให้การทำงานของโปรตีนหรือ เอนไซม์เหล่านั้นเกิดความผิดปกติได้ เป็นสาเหตุสำคัญการเกิดโรคได้ (Nakabeppu *et al*., 2006;) อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถถูกกำจัดหรือลดความรุนแรงด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ที่สามารถดักจับกับอนุมูลอิสระ แล้วเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่มีความเสถียรกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ สารปริมาณน้อยที่สามารถป้องกันหรือช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระได้ (Halliwell, 2009,1991) โดยมีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระได้หลายแบบ เช่น การดักจับ (scavenge) อนุมูลอิสระโดยตรง ยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระหรือเข้าจับ (chelate) กับโลหะ เพื่อป้องกันการสร้างอนุมูลอิสระ (Sies, 1991) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถพบได้ในธรรมชาติ เช่น สารประกอบฟีนอลลิก (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compounds) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) สารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญคือ ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในร่างกาย (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554) จากความสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระจึงทำให้องค์กรที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหาร และยา ได้พยายามศึกษาค้นคว้า วิจัย พัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติ เช่น สาหร่ายทะเล แบคทีเรีย เชื้อรา และพืชชั้นสูง (Chattopadhyay *et al*., 2010)

เครื่องสำอางจากสารสกัดพืชสมุนไพรในปัจจุบันกำลังเป็นที่นิยมเป็นอย่างมากเนื่องจากมีความปลอดภัยค่อนข้างสูง โดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงถูกนิยมนำมาศึกษาเป็นลำดับต้นๆ เพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบหลักในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (ณพัฐอร บัวฉุน, 2558) ทั้งผลิตภัณฑ์ต่อต้านริ้วรอยและผลิตภัณฑ์ช่วยให้ผิวขาว พืชสมุนไพรที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารกลุ่ม Flavonoids, Phenylpropanoids หรือสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเกี่ยวข้องการสร้างเม็ดสีของผิวหนัง เช่น สารจำพวก Phenolic Compounds เป็นต้น

สารสกัดจากชะเอมไทย (*Albizia myriophylla* Benth Extract) จะพบ Glabridin ที่เป็นสารประกอบในกลุ่ม Lyphenolic Isoflavonoid โดยพบเป็นสารประกอบหลักใน Hydrophobic Fraction มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ลดการไหม้แดง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดูดซับรังสียูวีให้ มีความเข้มน้อยลงเมื่อผ่านไปสู่ผิวหนัง และมีคุณสมบัติที่ช่วยทำให้ผิวขาวขึ้น ดังนั้น สารสกัดจากชะเอมเทศจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในการนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม เครื่องสำอางบำรุงผิว ยา และเวชสำอาง จากการศึกษาในงานวิจัยจากสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากสารสกัดนี้พบว่าสามารถลดการสร้างเมลานินโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Tyrosinase ของเซลล์สร้างเมลานินซึ่งจะไม่ส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ DNA (Yokota, Nishio, Kubota & Mizoguchi, 1998)

สารสกัดพิลังกาสา (*Ardisia Elliptica* Thunb Extract) จะพบสารประกอบ Embelin ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Quinone มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Joshi, *et al.,* 2007) จากการศึกษาพบว่าได้มีการนำสารสกัดพิลังกาสามาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำชะเอมไทยและพิลังกาสามาทำการสกัดเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสา และนำผลที่ได้ไปศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดของสารสกัดหยาบเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบ

ชะเอมไทยและพิลังกาสาเพื่อใช้ในการบำรุงผิว และเพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับสมุนไพรไทยและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาขั้นสูงต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสา
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสา
3. เพื่อศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดระหว่างสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
4. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสา ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ สมบัติทางกายภาพ สมบัติทางเคมี และ ความคงตัวของผลิตภัณฑ์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากชะเอมไทยโดยวิธีการแช่ยุ่ย (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

นำรากชะเอมไทยมาหั่นเป็นแว่นบางๆ สับให้เป็นชิ้นบาง ๆ หรือชิ้นเล็ก ๆ นำไปตากแดดจนแห้ง แล้วนำไปบดละเอียด ชั่งน้ำหนักรากชะเอมไทยประมาณ 3 กิโลกรัม แช่ในทำละลายเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ปิดภาชนะทิ้งไว้ 6-7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนด นำไปกรองแยกสารสกัดหยาบด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองโดยเครื่องกรองสุญญากาศ ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 นำสารที่สกัดได้มาระเหยตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) นำมาทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบเยือกแข็ง จะได้สารสกัดหยาบ ชั่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้

2. การเตรียมสารสกัดหยาบจากผลพิลังกาสา (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

ผลพิลังกาสา (*Ardisia elliptica* Thunb) โดยสวนสมุนไพรจังหวัดระยอง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำให้สะอาด ตากให้แห้งนำไปอบในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้ง นำไปบดให้เป็นผงละเอียด นำผงแห้งที่บดแล้วของผลพิลังกาสา มาสกัดด้วยเติมตัวทำละลายเอทานอล สกัดโดยการแช่ในขวดโหล ปิดภาชนะทิ้งไว้ 6-7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนด นำไปกรองแยกสารสกัดหยาบด้วยผ้าขาวบาง แล้วกรองโดยเครื่องกรองสุญญากาศ ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 นำสารที่สกัดได้มาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Rotary Evaporator) นำมาทำให้แห้งอีกครั้งด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบเยือกแข็งจะได้สารสกัดหยาบ ชั่งน้ำหนักของสารที่สกัดได้

3. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินทั้งหมด (Leite & Dourado, 2013: Lingkard & Singlaton, 1977)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกและแทนนิกเข้มข้น 1,000 ppm และ 100 ppm และเจือจางจนมีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกและแทนนิก นำสารละลายที่เตรียมได้ในแต่ละความเข้มข้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (A_{760}) หลังจากนั้นวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินทั้งหมดในสารสกัดหยาบชะเอมไทยและในสารสกัดหยาบผลพิลังกาสา

4. การตรวจเอกลักษณ์สารสำคัญของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา

การแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบรงคเลขผิวบาง ประกอบด้วย กลุ่มหลักดังนี้ สารสเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ สารอัลคาลอยด์ และสารฟลาโวนอยด์

4.1 การวิเคราะห์หาสารกลุ่มสเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์

4.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน ชั่ง เบตา-ซิโตสเตอรอล 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ในคลอโรฟอร์ม

4.1.2 เตรียมน้ำยาวานิลลิน-กรดซัลฟูริก ละลายวานิลลิน 3 กรัม ในสารละลาย Absolute เอทานอล 100 มิลลิลิตร และกรดซัลฟูริก 0.5 มิลลิลิตร

4.1.3 ชั่งสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา อย่างละ 5 กรัม เติมเฮกเซน 25 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 ชะล้างกระดาษกรองด้วยเฮกเซน 5 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไประเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส

4.1.4 นำสารสกัดที่ได้ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่าง

4.1.5 นำสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน Spot บนแผ่น TLC แล้วใส่ลงถังทำ TLC ที่มี Mobile Phase คือ Ethyl Acetate: Hexane ตั้งทิ้งให้ Mobile Phase ซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร นำแผ่น TLC พ่นด้วยน้ำยาวานิลลิน-กรดซัลฟูริก (Vanillin- H_2SO_4) ตรวจดูแถบสารภายใต้รังสียูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

4.2 การวิเคราะห์หาสารกลุ่มอัลคาลอยด์

4.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานควินินซัลเฟต ชั่งควินินซัลเฟต 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอล

4.2.2 เตรียมน้ำยาดราเจนดอร์ฟ สารละลาย A: บิสมัส(III)ไนเตรต 0.85 กรัม ในสารละลายที่มีกรดอะซิติก 99.70 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร และน้ำ 40 มิลลิลิตร สารลาย B: สารละลายโปตัสเซียมไอโอไดด์ 8 กรัม ด้วยน้ำ 20 มิลลิลิตร Stock Solution: ผสมสารละลาย A และ B ในอัตราส่วนที่เท่ากัน วิธีใช้ ผสม Stock Solution 1 มิลลิลิตร กับกรดอะซิติก 99.70 เปอร์เซ็นต์ 2 มิลลิลิตร และน้ำ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปพ่นบนแผ่น TLC

4.2.3 สารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา อย่างละ 5 กรัม เติม 0.1 นอร์มัล กรดซัลฟูริก 100 มิลลิลิตร เขย่า 20 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ ชะล้างกระดาษกรองด้วย 0.1 นอร์มัล กรดซัลฟูริก 10 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ทำให้เป็นด่าง โดยเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 จนได้ pH 8-9 สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (3 ครั้ง ปริมาตรครั้ง 40 มิลลิลิตร ครั้งละ 10 นาที) ในกรวยแยก รวมสารสกัดในชั้นคลอโรฟอร์มมากำจัดน้ำที่ปนอยู่ โดยกรองผ่านโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสบนกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วนำสารสกัดที่ได้ไประเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียส

4.2.4 นำสารสกัดที่ได้ละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่าง

4.2.5 นำสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน Spot บนแผ่น TLC แล้วใส่ลงในถังทำ TLC ที่มี Mobile Phase คือ Chloroform: Methanol: Water ตั้งทิ้งให้ Mobile Phase ซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร นำแผ่น TLC พ่นด้วยน้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's Reagent) ตรวจดูแถบสารภายใต้รังสียูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

4.3 การวิเคราะห์หาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

4.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานรูทิน ชั่ง รูทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเมทานอล

4.3.2 เตรียมน้ำยาเนเจอรัลโปรดักส์-โพลีเอธิลลีนไกลคอล สารละลาย A: ละลายไดฟินิลโบริลิดซีเอธิลมีน 1 กรัม ด้วยเมทานอล 100 มิลลิลิตร สารลาย B: สารละลายโพลีเอธิลลีนไกลคอล 5 กรัม ด้วยเอทานอล 100 มิลลิลิตร วิธีใช้ ฉีดพ่นสารละลาย A แล้วตามด้วยสารละลาย B

4.3.3 ชั่งสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา อย่างละ 10 กรัม เติมเมทานอล 40 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทิ้งให้เย็น กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 42 ชะล้างกระดาษกรองด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไประเหยสุญญากาศแบบหมุนที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียส

4.3.4 นำสารสกัดที่ได้ละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่าง

4.3.5 นำสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน Spot บนแผ่น TLC แล้วใส่ลงในถังทำ TLC ที่มี Mobile Phase คือ Ethanol: Formic: Acetic Acid: water ตั้งทิ้งให้ Mobile Phase ซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร นำแผ่น TLC ตรวจดูแถบ สารภายใต้รังสียูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

5. การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสาโดยการวัดสมบัติในการยับยั้ง DPPH Radical

5.1 ชั่งสารละลายมาตรฐาน (BHT และ BHA) 0.0125 กรัมละลายด้วย 99.99% เอทานอล ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol จนได้สารละลาย BHT และ BHA ที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (BHT และ BHA) ที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol จะได้สารละลาย BHT ที่มีความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

5.3 ชั่งสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา อย่างละ 0.0125 กรัม ละลายด้วย 99.99% เอทานอล ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol จนได้สารละลายสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา ที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา ที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย Absolute Ethanol จะได้สารละลายสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา อย่างละ ที่มีความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, และ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

5.4 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (BHT และ BHA) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เติมสารละลาย DPPH $6x10^{-5}$ โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.5 ปิเปตสารละลายสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เติมสารละลาย DPPH $6x10^{-5}$ โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5.6 คำนวณหา % inhibition

5.7 พล็อตกราฟหาค่า IC_{50} เปรียบเทียบกับ BHA, BHT สารสกัดหยาบชะเอมไทย และสารสกัดหยาบผลพิลังกาสา

6. การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเป็นขั้นตอนเพื่อตรวจสอบว่าสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา มีคุณสมบัติเสริมฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีขั้นตอนดังนี้

1. นำสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสาผสมกันในอัตราส่วนที่ต่างกันจำนวน 3 อัตราส่วน

2. นำสารสกัดทั้ง 3 อัตราส่วน ไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามขั้นตอนข้างต้น โดยดำเนินการทดสอบ 3 ซ้ำ

7. การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์สัตว์

นำสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสามาทดสอบความเป็นพิษของเซลล์สัตว์ โดยส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค)

8. การทำผลิตภัณฑ์โลชั่น

นำสารสกัดที่มีประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบผลพิลังกาสา มาทำผลิตภัณฑ์โลชั่น ทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ บางประการ เช่น สี กลิ่น การแยกชั้นของเนื้อโลชั่น คุณสมบัติทางเคมีบางประการโดย วัดความเป็นกรด-ด่าง และความคงตัวของผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารจากชะเอมไทยและผลพิลังกาสา

ผลการสกัดสารจากสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสา โดยวิธีการหมักด้วย เอทานอล มีลักษณะทางกายภาพและร้อยละผลผลิต (% Yield) แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสาที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย

ตัวทำละลาย	ชนิดพืช	ลักษณะของสารสกัด
เอทานอล	ชะเอมไทย	ยางเหนียวหนืดสีน้ำตาลเข้ม
เอทานอล	ผลพิลังกาสา	ยางเหนียวหนืดสีน้ำตาลแดง

จากตารางที่ 1 พบว่า สารสกัดหยาบชะเอมไทยมีลักษณะเป็นยางเหนียวหนืด สีน้ำตาลเข้ม และสารสกัดหยาบผลพิลังกาสามีลักษณะเป็นยางเหนียวหนืดสีน้ำตาลแดง

ตารางที่ 2 ร้อยละของผลผลิตของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา

ชนิดพืช	น้ำหนักก่อนการสกัด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ร้อยละผลผลิต (% Yield)
ชะเอมไทย	1,000	118.9	11.89
ผลพิลังกาสา	1,000	11.92	1.192

จากตารางที่ 2 พบว่า ร้อยละผลผลิตพบว่าสารสกัดหยาบชะเอมไทย มีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 11.89 และสารสกัดหยาบพิลังกาสา มีร้อยละผลผลิตเท่ากับ 1.192

2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินทั้งหมด

ผลการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบผลพิลังกาสา โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ผลการทดลองดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและแทนนินทั้งหมด

สารสกัดหยาบ	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)	ปริมาณแทนนินทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
ชะเอมไทย	55.20	35.20
ผลพิลังกาสา	52.81	17.80

จากตารางที่ 3 พบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบพิลังกาสา เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกเท่ากับ 55.20 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง และ 52.81 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และ ปริมาณแทนนินทั้งหมดของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบพิลังกาสา เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแทนนิกเท่ากับ 35.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 17.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3. ผลการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี

การตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบผลพิลังกาสา ด้วยเทคนิค TLC Fingerprints พบว่า ในสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบผลพิลังกาสา มีสารสำคัญกลุ่มสารฟลาโวนอยด์ ทำการวิเคราะห์โดยใช้ระบบตัวทำละลายเอทิลแอซิเตต:กรดฟอร์มิก: กรดอะซิติก: น้ำ (10:1:1:2) ได้ค่า R_f ของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบพิลังกาสา เท่ากับ 0.41 และ 0.85 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานรูทินซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.43 และ 0.83 ตามลำดับ และการตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของสารกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบพิลังกาสา พบว่า ไม่พบกลุ่มสารสเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ และสารอัลคาลอยด์

4. ผลการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบผลพิลังกาสา โดยการวัดสมบัติในการยับยั้ง DPPH Radical Scavenging

จากการทดลองสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบพิลังกาสา ทดสอบโดยเทคนิค DPPH Radical Scavenging และจากการทดสอบการยั้งยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยอาศัยหลักการจับอนุมูลอิสระด้วย DPPH Radical Scavenging เมื่อทำการละลายในเอทานอลจะเห็นเป็นสารละลายสีม่วง เมื่อ DPPH รับอิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนเรดิคัล จะทำให้มีค่าเสถียรมากขึ้นและเป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง

ผู้วิจัยวัดสมบัติการยับยั้ง DPPH Radical Scavenging แล้วนำมาหาค่าความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 31-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า % inhibition ของสารสกัดหยาบผลพิลังกาสา และสารสกัดหยาบชะเอมไทย เท่ากับ 95.9486 - 131.1569 % และ 23.9447 - 77.1543% ตามลำดับ และนำมาหาค่า IC_{50} ของ BHT BHA สารสกัดหยาบผลพิลังกาสา และสารสกัดหยาบชะเอมไทย ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่า IC_{50} ของ BHT BHA สารสกัดหยาบผลพิลังกาสา และสารสกัดหยาบชะเอมไทย

สารตัวอย่าง	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
BHT	12.86
BHA	12.54
สารสกัดหยาบผลพิลังกาสา	12.94
สกัดหยาบชะเอมไทย	12.02

จากตารางที่ 4 ที่ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า ค่า IC_{50} ของ BHT , BHA สารสกัดหยาบผลพิลังกาสา และสารสกัดหยาบชะเอมไทย เท่ากับ 12.86 12.54 12.94 และ 12.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

5. การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์สัตว์

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ โดยนำสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสาไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์ พบว่าสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสาไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์สัตว์

6. การศึกษาอัตราส่วนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาอัตราส่วนของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จำนวน 3 อัตราส่วน และทำการวัดสมบัติการยับยั้ง DPPH Radical Scavenging แล้วนำมาหาค่าความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 31-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบอัตราส่วนของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BHT และ BHA

Treatment	IC_{50} (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
อัตราส่วนที่ 1	13.09
อัตราส่วนที่ 2	13.11
อัตราส่วนที่ 3	13.31
BHT	12.86
BHA	12.54

ทั้งนี้ผู้วิจัยเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมในฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ อัตราส่วนที่ 1 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมีค่า IC_{50} ต่ำสุด และนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิวจากสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา

7. ผลการพัฒนาผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิวจากสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา

นำสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา มาพัฒนาผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิว และทำการทดสอบประสิทธิภาพทางเคมีและประสิทธิภาพทางกายภาพ

7.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพทางกายภาพของโลชั่นบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา พบว่า โลชั่นมีเนื้อเป็นสีขาว มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน และไม่มีกลิ่น

7.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพทางเคมีของโลชั่นบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา พบว่า มีค่าความเป็น pH เท่ากับ 7.6

7.3 ผลการทดสอบความคงตัวของของโลชั่นบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบชะเอมไทยและผลพิลังกาสา พบว่า โลชั่นมีลักษณะคงตัวที่ดี

อภิปรายผล

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ฟีนอลิก แทนนิน และ ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากชะเอมไทยและผลพิลังกาสา พบว่าสารสกัดหยาบชะเอมไทยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 55.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดหยาบพิลังกาสามีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 52.81 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณแทนนินทั้งหมดของสารสกัดหยาบชะเอมไทย เท่ากับ 35.20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณแทนนินทั้งหมดของสารสกัดหยาบพิลังกาสา เท่ากับ 17.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี โดยการนำสารสกัดหยาบชะเอมและพิลังกาสาไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ด้วยเทคนิค TLC Fingerprints พบสารประกอบกลุ่มสารหลัก คือ สารฟลาโวนอยด์ แต่ตรวจไม่พบกลุ่มสารสเตอรอยด์-เทอร์ปีนส์ และสารอัลคาลอยด์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ มนสิชา ขวัญเอกพันธ์ และคณะ (2555) ที่ได้สกัดจากส่วนเถาชะเอมไทย พบว่า สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายร้อยละ 80 เมทานอล และร้อยละ 80 เอทานอล มีร้อยละของสารสกัด คือ 3.23 และ 6.12 และพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยรวมเท่ากับ 10.54 และ 10.18 มิลลิกรัมแกลลิกแอซิดต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และการวิจัยของ พิชยา ประเสริฐแสง และ วรินทร ชวศิริ (2545) ที่ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผลพิลังกาสา พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบพิลังกาสา เมื่อทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสาร

สกัดหยาบพิลังกาสามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Joshi, *et al.* (2007) ที่ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดหยาบพิลังกาสา (*Ardisia Elliptica* Thunb) และพบว่า ในสารสกัดพิลังกาสามี Embelin เป็นสารประกอบในกลุ่ม Quinone โดยพบเป็นสารประกอบหลัก ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านมะเร็ง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาจะเห็นได้ว่า สารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบพิลังกาสามีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบอยู่จึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐานบีเฮชเอและบีเฮชที และงานวิจัยที่ศึกษา พบว่าพืชที่มีสารประกอบฟีนอลิกจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น งานวิจัยของ สุธาทิพย์ อินทรกำธรชัย และคณะ (2555) ได้ทำการสกัดและประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากดอกมะลิลา พบว่าจากการสกัดสารออกฤทธิ์จากดอกมะลิลาด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ให้ผลผลิตสารสกัดร้อยละ 39.64 และ 21.24 สำหรับดอกแห้งและ ดอกสด ตามลำดับ สารสกัดดอกมะลิลามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 56.05 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมตัวอย่าง (mg GAE/g) ซึ่งสูงกว่าปริมาณฟีนอลิกที่พบในสารสกัดทางการค้าคือ สารสกัดเปลือกเมล็ดลำไย เมล็ดทับทิม และเปลือกมังคุด 77, 140 และ 2.1 เท่า ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดดอกมะลิลาพบค่า IC_{50} เท่ากับ 0.87 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผู้วิจัยนำสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบผลพิลังกาสามาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ อัตราส่วนที่ 1 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.09 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าอัตราส่วนที่ 2 และ 3 เนื่องจากในสารทั้งสองชนิดมีสารออกฤทธิ์ในกลุ่มเดียวกันคือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก ซึ่งค่า IC_{50} ของอัตราส่วนระหว่างสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบผลพิลังกาสา นำสารสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบผลพิลังกาสาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โลชั่น และทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีบางประการ พบว่า โลชั่นมีเนื้อเป็นสีขาว มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีกลิ่น มีลักษณะคงตัวที่ดีมี และมีค่า pH เท่ากับ 7.6 ดังนั้นอาจนำสารสกัดหยาบชะเอมไทยและสารสกัดหยาบผลพิลังกาสาไปพัฒนาเพื่อต่อยอดในเชิงพาณิชย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ณพัฐอร บัวฉุน. (2558). **สารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากพิลังกาสา**. การประชุมวิชาการระดับชาติ ราชภัฏวิจัย ครั้งที่ 3. นครศรีธรรมราช (45-50).

ณพัฐอร บัวฉุน. (2558). สารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากชะเอมไทย. **วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์**. 10(2), 78-95.

พิชยา ประเสริฐแสง และ วรินทร ชวศิริ. (2545). **องค์ประกอบทางเคมีของผลพิลังกาสา (*Ardisia colorata* Roxb.) และฤทธิ์ทางชีวภาพ**. ปริญญานิพนธ์วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. วิทยาศาสตร์ (เคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มนสิชา ขวัญเอกพันธ์ และคณะ. (2555). **ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากส่วนเถาชะเอมไทย**. เชียงราย : มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยใหม่.

สุธาทิพย์ อินทรกำธรชัย และคณะ. (2555). **การพัฒนาครีมชะลอวัยผสมสารสกัดดอกมะลิลา**.เชียงราย: มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

Chattopadhyay, K. and Chattopadhyay, B. D. (2008). Effect of nicotine on lipid profile, peroxidation & antioxidant enzymes in female rats with restricted dietary protein. **Journal of research and education in Indian medicine**. 127, 571-576.

Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical, Free Radical Biology and Medicine, **American Journal of Medicine**. 46, 531-542.

Halliwell, B. (1991). Reactive Oxygen Species in Living Systems : Source, Biochemistry and Role in Hormone Disease. **American Journal of Medicine**. 91, 14 – 22.

Joshi R, Passner JM, Rohs R, Jain R, Sosinsky A, Crickmore MA, Jacob V, Aggarwal AK, Honig B, Mann RS. (2007). Functional specificity of a Hox protein mediated by the recognition of minor groove structure. **Cell**. 131. 530–543.

Nakabeppu, Y. *et al*. (2006). Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids, Journal of Biological Chemistry, vol. 387, pp. 373-382.

Yokota, T., Nishio, H., Kubota, Y. & Mizoguchi, M. (1998). The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. **Pigment Cell Res.11**. 355-361.