

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาดใบฝรั่ง

ณพัชร บัวฉวน^{1*}

Received : October 15, 2019

Revised : April 20, 2020

Accepted : April 24, 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพฤษทางเคมีเบื้องต้น ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินรวม ฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาดใบฝรั่ง โดยนำมาทำการสกัดด้วยเอทานอล ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวม ฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH radical scavenging และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method จากการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาดเอทานอลของใบฝรั่งพบสารพฤษเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และ โพลบาแทนนิน สารสกัดหยาดเอทานอลของใบฝรั่งมีปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินรวม และ ปริมาณฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 138.89 ± 0.04 mg GAE/g, 157.56 ± 0.02 mg TAE/g และ 145.29 ± 0.05 mg QE/g ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่าสารสกัดหยาดเอทานอลของใบฝรั่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 10.09 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method พบว่ามีสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 10.09 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ใบฝรั่ง

¹ อาจารย์ประจำหลักสูตรสาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

*ผู้เขียนหลัก อีเมล: send2duang@hotmail.com

ANTIOXIDATION ACTIVITY AND TYROSINASE INHIBITION ACTIVITY FROM CRUDE EXTRACTS OF *PSIDIUM GUAJAVA* L.

Napattaorn Buachoon^{1*}

Abstract

The aim of present study is to screen the phytochemical, total phenolic content, total tannin content, total flavonoid content antioxidant activity and tyrosinase inhibition activity of guava leaves (*Psidium guajava* L.). The guava leaves were extraction by ethanol. The crude extracts from guava leaves were analyzed total phenolic content, total tannin content, total flavonoid content, antioxidant activity using DPPH radical scavenging method and tyrosinase inhibition activity using dopachrome method. In this study, the phytochemical screening of guava leaves extracts were flavonoids, coumarns, saponins, tannins and phlobatannins. The extracts showed the highest total phenolic content and total flavonoid content which was of about 138.89 ± 0.04 mg GAE/g, 157.56 ± 0.02 mg TAE/g 45.29 ± 0.05 mg QE/g, respectively. The antioxidant activity using DPPH radical scavenging method extracts of guava leaves showed the highest antioxidant activity with EC_{50} values of 12.11 ± 0.08 mg/mL. Tyrosinase inhibition activity using dopachrome method extracts showed tyrosinase inhibition activity with EC_{50} values of 10.09 ± 0.04 mg/mL.

Keywords: Antioxidant activity, Tyrosinase Inhibition activity, *Psidium guajava* L.

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

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

บทนำ

อนุมูลอิสระ (Free radicle) เป็นโมเลกุลหรืออะตอมที่ไม่เสถียรเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน ซึ่งโดยปกติในร่างกายของเรามีโมเลกุลหรืออะตอมที่มีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนมาก ในกรณีที่ร่างกายมีการสูญเสียอิเล็กตรอนจากการถูกอนุมูลอิสระแย่งจับ จะทำให้โมเลกุลของเซลล์ในร่างกายไม่เสถียร ขาดความสมดุล ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์ร่างกายเสียหายได้ แหล่งของอนุมูลอิสระ ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนโตรออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น คิวบิตรี อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา และแหล่งภายใน ได้แก่อนุมูลอิสระที่ร่างกายสร้างขึ้น ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ ได้แก่ อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Pisocchi & Negulesc, 2011) เมื่ออนุมูลอิสระเข้าไปในร่างกายจะเข้าไปทำลายเซลล์ หากร่างกายไม่สามารถผลิตหรือได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอที่จะไปยับยั้งหรือไปจับอนุมูลอิสระได้ภายในเซลล์ของร่างกาย ผลคือทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและนำไปสู่การเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง หัวใจและหลอดเลือด แก่ก่อนวัย ต้อกระจก และโรคอื่นๆ เช่น อนุมูลอิสระไปทำลายผนังหลอดเลือดแดง และเมื่อมีไขมันไปสะสมอยู่ในบริเวณหลอดเลือดแดงที่ถูกทำลาย จะทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดในที่สุด หากได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพียงพอ (Ramadan et al., 2003; ณพัชร บัวฉวน และเยวานารถ งามนร, 2561) สารต้านอนุมูลอิสระเข้าไปป้องกันหรือแย่งที่จับกับอนุมูลอิสระ และนำอนุมูลอิสระเหล่านั้นไปทิ้งนอกเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่ถูกทำลาย ร่างกายจึงมีกลไกที่จะกำจัดสารอนุมูลอิสระได้ 2 วิธี คือ การใช้เอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อจับกับอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เอนไซม์ Catalase glutathione peroxidase แต่ร่างกายมักสร้างไม่เพียงพอ เซลล์จึงเกิดการบาดเจ็บขึ้น และเมื่อคนเรามีอายุมากขึ้น การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระจะลดลง ในขณะที่อัตราการเกิดอนุมูลอิสระยังเท่าเดิม ผลที่ตามมาคือ ทำให้เกิดโรคต่างๆมากมาย และการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหาร เช่น วิตามิน อี เบต้าแคโรทีน แอนโทไซยานิน (Anthrocyanidin) สารประกอบโพลีฟีนอลต่าง ๆ เช่น แทนนิน แคทชิน เป็นต้น (Liyan-Pathirana et al., 2006)

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) หรือ Monophenol oxidase, Monophenol monooxygenase, Phenolase และ Cresolase, (Anonymous, 2006) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) โดยทั่วไปเอนไซม์ ไทโรซิเนสจะพบใน เนื้อสัตว์ และพืช ถูกสังเคราะห์ขึ้นใน Rough endoplasmic reticulum ภายในโครงสร้างของเอนไซม์มีทองแดง (Cu) ซึ่งมีหน้าที่ทำงานร่วมกับออกซิเจนเพื่อเร่งให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกระบวนการสร้างเม็ดสี (Melanogenesis) ซึ่งกระบวนการนี้ทำให้ผิวหนังมีสีหมองคล้ำลง โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งปฏิกิริยาในขั้นเริ่มต้นของกระบวนการคือเร่งปฏิกิริยาของ L-Tyrosine และ 3, 4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) ให้เป็น DOPAquinone (Ebanks et al., 2009) ดังนั้นการป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างเมลานินได้วิธีหนึ่งคือ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยโลหะ Cu สองอะตอมโดยแต่ละอะตอมของ Cu จะมีสามตำแหน่งจับกับอะตอม N ของ Histidine ในสายโซ่ของ amino acids และอีกสองตำแหน่งจับกับอะตอม O ของน้ำ (H₂O) ตำแหน่ง Active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยโลหะ Cu จะใช้ตำแหน่งที่ว่างอยู่อีกหนึ่งตำแหน่งไปจับกับ L-Dopa ซึ่งเป็น Substrate ของเอนไซม์ชนิดนี้เพื่อย่อยสลายและเกิดเป็นเมลานินในที่สุด ดังนั้นหากมีสารที่สามารถจับกับโลหะ Cu ได้ดีกว่า L-Dopa ก็จะทำให้โลหะ Cu ของเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่สามารถไปจับกับ L-Dopa หรือจับได้ไม่ดีก็จะเป็นการทำให้ไม่สามารถเกิดการย่อยสลายได้และทำให้เกิดการสร้างเมลานินได้ลดลง (Ramsden & Riley, 2014)

ฝรั่ง ชื่อวิทยาศาสตร์ *Psidium guajava* L. จัดอยู่ในวงศ์ชมพู่ (Myrtaceae) เป็นผลไม้ที่นิยมนำมารับประทานสด ๆ ก็ได้แก่ฝรั่งกิมจู ฝรั่งเวียดนาม ฝรั่งแป้นสีทอง ฝรั่งไร้เมล็ด ฝรั่งกลมสาส์ เป็นต้น เป็นผลไม้ที่

อุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด ฝรั่งเป็นผลไม้เพื่อสุขภาพที่เหมาะสมมากสำหรับผู้ที่ต้องการลดความอ้วน ลดน้ำหนัก หรือผู้ที่กำลังควบคุมน้ำหนัก เนื่องจากอุดมไปด้วยกากใยอาหาร ช่วยปรับระดับการใช้ไขมันของร่างกายให้เหมาะสม และกากใยยังช่วยล้างพิษโดยรวมได้อีกด้วย จึงส่งผลทำให้ผิวพรรณดูเปล่งปลั่งสดใส เป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงโดยเฉพาะวิตามินซีนอกจากนี้ Jime nez-Esrig et al., (2001) พบว่า เปลือก และเนื้อไม้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และจากการวิจัยของ Okonogi et al. (2007) ได้ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากสมุนไพรไทยจำนวน 25 ชนิด เช่น ใบฝรั่ง ใบสะระแหน่ เปลือกผลทับทิม ใบทับทิม และใบรางจืด พบว่าสารสกัดแยกส่วนจากใบฝรั่งมีสาร Quercetin ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากที่สุด และไม่เป็นพิษต่อ เซลล์เม็ดเลือดขาวปกติ (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดใบฝรั่ง มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียหลายชนิด อาจด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้ใช้แก้อาการท้องเสียได้ และใบฝรั่งยังหาได้ง่าย เนื่องจากพบทั่วไปทางภาคเหนือและภาคกลางของประเทศ เก็บได้ตลอดฤดูกาล นอกจากนี้ยังพบว่า ใบฝรั่งแป้น และใบฝรั่งขึ้นก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (ปรานอม ขาวเมฆ และวิลาวัลย์ จันทนุ, 2559)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะนำใบฝรั่งมาทำการสกัดเพื่อหาฟลักซ์เคมีเบื้องต้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบแทนนินรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง เพื่อนำไปเป็นฐานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการสนับสนุนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง เป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับพืชสมุนไพรไทยและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาขั้นสูงต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดของฟลักซ์เคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง
2. เพื่อศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกรวม ปริมาณสารประกอบแทนนินรวม และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบ

ใช้ใบฝรั่งพันธุ์แป้นสีทอง โดยเลือกใบอ่อนนับจากยอดลงมา เลือกใบที่ดี มีสีเขียวอ่อน เก็บจากสวนในจังหวัดปทุมธานี ที่ไม่มีการใช้ยาฆ่าแมลง นำมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และปั่นให้เป็นผง ซึ่งน้ำหนักแห้งเทียบกับน้ำหนักสดตั้งต้น และนำผงใบฝรั่งแห้งจำนวน 400 กรัม มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 95% เอทานอล 600 มิลลิลิตร โดยวิธีการแช่หมัก (Maceration) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน หลังจากครบกำหนดทำการกรองสารละลาย โดยใช้การกรองด้วยสุญญากาศ โดยทำการสกัดเพียงครั้งเดียว นำสารละลายที่กรองได้ไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ซึ่งน้ำหนักสารสกัดหยาบแต่ละตัวอย่างที่ได้ เก็บรักษาสารสกัดในภาชนะปิดที่แสงที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบใบฝรั่งโดยแบ่งการทดสอบสารทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โพลีฟีนอล เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Ayoola et al., 2008; Koleva et al., 2002) แต่ละการทดสอบทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ดังนี้

2.1 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50% เอทานอล เขย่ากรองส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกรอง ใส่หลอดแมกนีเซียมชิ้นเล็กๆ ลงไป และหยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เขย่าแล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

2.2 การตรวจสอบแอนทราควิโนน (Anthraquinones)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมสารละลาย 10% H_2SO_4 เขย่านำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก แล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำของเหลวที่ได้จากการกรองไปเติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีชมพูแดงเกิดขึ้นแสดงว่าพบแอนทราควิโนน

2.3 การตรวจสอบคูมาริน (Coumarins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วย 50 %เอทานอล เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (6 M NaOH) เขย่า ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้มแสดงว่าพบคูมาริน

2.4 การตรวจสอบซาโปนิน (Saponins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น นำไปอุ่นบนเครื่อง อังน้ำ 5 นาที เขย่าอย่างแรง ถ้าปรากฏฟองถาวรเกิดขึ้นในหลอดทดลองแสดงว่าพบซาโปนิน

2.5 การตรวจสอบแทนนิน (Tannins)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรองเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 5 หยด เขย่า ถ้าปรากฏสารละลายสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

2.6 การตรวจสอบโพลีฟีนอล (Polyphenols)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม เติมน้ำกลั่น นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที กรองส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกรองเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (10% HCl) เขย่า แล้วนำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ 5 นาที ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบโพลีฟีนอล

2.7 การตรวจสอบเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออก นำของเหลวที่ได้จากการกรอง ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบเทอร์ปีนอยด์

2.8 การตรวจสอบสเตียรอยด์ (Steroids)

ชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์มเขย่ากรองส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมกรดแกลลิกแอซิดิกเขย่าแล้วเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ถ้าปรากฏสารละลายเป็นสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียวแสดงว่าพบสเตียรอยด์

2.9 การตรวจสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (Cardiac glycosides)

ซึ่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายด้วยคลอโรฟอร์ม เขย่า กรองส่วนที่ไม่ละลายออกนำของเหลวที่ได้จากการกรอง เติมน้ำละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (1% FeCl_3) เขย่า เติมน้ำกรดกลีเซอลแอซิดิก เขย่าและค่อยๆ เติมน้ำกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ลงไป ถ้าปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารสกัดกับกรดซัลฟิวริกแสดงว่าพบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์

3. การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (ดัดแปลงวิธีจาก Tsai et al., 2005)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก ให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำละลาย Folin-ciocalteu ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีและเติมโซเดียมคาร์บอเนต (7% Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร วาดกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรง ทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับสารสกัดเพื่อหาปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกและนำเสนอในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg GAE/g extract) โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4. การหาปริมาณแทนนินรวม (ดัดแปลงวิธีจาก Tsai et al., 2005)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และเติมน้ำละลาย Folin-ciocalteu ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีและเติมโซเดียมคาร์บอเนต (7% Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร วาดกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรง ทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับสารสกัดเพื่อหาปริมาณแทนนินในสารสกัดจากกราฟมาตรฐานของกรดแทนนิกและนำเสนอในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแทนนิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg TAE/g extract) โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids content) (ดัดแปลงวิธีจาก Prommuak, et al., 2008)

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium trichloride colorimetric โดยใช้เคอร์ซีตินเป็นสารมาตรฐาน เมื่อทำการผสมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซีติน ให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ (1% AlCl_3) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร วาดกราฟเพื่อหาสมการเส้นตรง ทำการทดสอบเช่นกันกับสารสกัดเพื่อหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซีตินและนำเสนอค่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมรวมในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซีตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg QE/g extract)

6. การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงวิธีจาก Prommuak et al., 2008)

เตรียมสารละลายสารมาตรฐาน BHT, BHA หรือสารสกัดหยาบใบฝรั่งที่มีความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, และ 31.25 $\mu\text{g/mL}$ ปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย DPPH 6×10^{-5} โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยแต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหา % Radical scavenging จากสูตร

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100$$

โดย Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

ค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า Effective concentration (EC_{50}) หรือค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% จากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับ % Radical scavenging

7. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

เตรียมสารละลายตัวอย่างและวิตามินซีที่มีความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.10, 0.5 และ 1 mg/mL ใน Methanol นำสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ Dopachrome method เทียบกับสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ดังนี้เติมสารละลาย Control (สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 500 μ L Sodium phosphate buffer 0.02 M (pH 6.8) 1500 μ L และ Methanol 500 μ L) และ sample (สารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 500 μ L Sodium phosphate buffer 0.02 M (pH 6.8) 1500 μ L และสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน 500 μ L) แยกกันลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5.00 mL เขย่าให้สารละลายผสมกัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย L-DOPA 500 μ L ลงในแต่ละขวด ปรับปริมาตรด้วย Methanol เขย่า และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 495 nm (Absorbance, A_{495}) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ต่ออีก 2 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้ง ที่ความยาวคลื่นเดิม (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% Inhibition) ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของสารสกัดกับ % Inhibition เพื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (EC_{50})

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดสารจากใบฝรั่ง

ผลการสกัดสารจากสารสกัดหยาบใบฝรั่ง โดยวิธีการหมักด้วยเอทานอล พบว่า สารสกัดหยาบเอทานอลของใบฝรั่งที่ได้มีลักษณะสีเขียวเข้มหนืด เมื่อนำมาหาร้อยละของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง (% Yield) พบว่าสารสกัดที่ได้จากการสกัดมีน้ำหนักคิดเป็นร้อยละสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักพืชแห้ง เท่ากับ 23.68

2. การทดสอบสารพิษเฉียบพลัน

การทดสอบสารพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ ฟลาไวโนอยด์ แอนทราควิโนน คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน โพลีฟีนอล เทอร์ปีนอยด์ สเตียรอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ อาศัยปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน พบว่าสารพิษเฉียบพลันของสารสกัดหยาบใบฝรั่งมี 5 ชนิด คือ ฟลาไวโนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน โพลีฟีนอล และแทนนิน ผลการทดลอง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การทดสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเอทานอลของใบฝรั่ง

สารพิษเคมีเบื้องต้น	สารสกัดหยาบเอทานอลของใบฝรั่ง
ฟลาโวนอยด์	+
แอนทราควิโนน	-
คูมาริน	+
ซาโปนิน	+
แทนนิน	+
โพลีฟีนอล	+
เทอร์ปีนอยด์	-
สเตียรอยด์	-
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	-
หมายเหตุ - หมายถึง ทดสอบไม่พบสาร + หมายถึง ทดสอบพบสาร	

3. ผลการหาปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวม และฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบของใบฝรั่ง

เมื่อนำสารสกัดหยาบเอทานอลของใบฝรั่งมาทำการหาปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวม และฟลาโวนอยด์รวม จะพบว่า สารสกัดหยาบเอทานอลของใบฝรั่งจะมีปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวม และฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 138.89 ± 0.04 mg GAE/g, 157.56 ± 0.02 mg TAE/g และ 145.29 ± 0.05 mg QE/g ตามลำดับ ผลการทดลอง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกรวม แทนนินรวม และฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง

สารสำคัญ	สารสกัดหยาบเอทานอลของใบฝรั่ง
ปริมาณฟีนอลิกรวม (mg GAE/g extract)	138.89 ± 0.04
ปริมาณแทนนินรวม (mg TAE/g extract)	157.56 ± 0.02
ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mg QE/g extract)	145.29 ± 0.05

4. ผลการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ผลการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบใบฝรั่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 12.11 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHA และ BHT สารสกัดหยาบเอทานอลของใบฝรั่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐาน ผลแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบฝรั่ง

สาร	EC ₅₀ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
BHT	16.21±0.01
BHA	15.24±0.05
สารสกัดหยาบไฝฝรั่ง	12.11±0.08

5. ผลการหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบไฝฝรั่ง โดยนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Modified dopachrome เปรียบเทียบกับวิตามินซี และคำนวณหาความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (EC₅₀) พบว่า สารสกัดหยาบไฝฝรั่งสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 10.09±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบไฝฝรั่ง

สารสกัด	EC ₅₀ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
วิตามินซี	13.21±0.02
สารสกัดหยาบไฝฝรั่ง	10.09±0.04

อภิปรายผล

จากการศึกษาการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบไฝฝรั่ง โดยวิธีการหมัก ทำการตรวจหาฟลักซ์ทางเคมีเบื้องต้นพบสารรวม 5 กลุ่มคือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และ โพลีฟีนอล ซึ่งสารกลุ่มดังกล่าวเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Venkatesh & Dorai, 2015) และณพัชร บัวฉวน (2558) เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณแทนนินรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบว่าสารสกัดหยาบไฝฝรั่งมีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 138.89±0.04 mg GAE/g, 157.56±0.02 mg TAE/g และ 145.29±0.05 mg QE/g ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Duduku et al. (2013) ที่ทำการสกัดไฝฝรั่งโดยใช้ตัวทำละลายคือเมทานอล และพบว่าสารสกัดไฝฝรั่งมีปริมาณฟีนอลิกเท่ากับ 43.18 mg GAE/10 g และงานวิจัยของ ณิชภัทร และคณะ (2558) ที่พบว่า ผลฝรั่งพันธุ์แป้นสีทองมีสารประกอบฟีนอลิกสูงอยู่ในช่วง 136.8-157.7 มิลลิกรัม/100 กรัม ซึ่งผลจากการศึกษาจะเห็นได้ว่า สารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์พบได้ในส่วนของใบ ทั้งนี้เนื่องจากในพืชใบจำเป็นต้องมีการสะสมสารประกอบโพลีฟีนอลในปริมาณมาก เพื่อที่จะใช้ในการป้องกันและกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดมาจากความเข้มแสงที่พืชได้รับ (Chua, 2016)

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูล DPPH ของสารสกัดแป้นตรงกับความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมักแสดงด้วยค่า EC₅₀ คือความเข้มข้นของตัวอย่างพืชที่ส่งผลให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ (DPPH) ลดลงครึ่งหนึ่งค่า EC₅₀ ที่ต่ำจึงแสดงถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูง โดยสารสกัดหยาบไฝฝรั่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงโดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 12.11±0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Fernandes et al. (2014) ที่ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด

ใบฝรั่งพบว่า มีฤทธิ์ยับยั้งอยู่ในช่วง 7.96 ถึง 8.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร งานวิจัยของณิชาภัทร พงเทพ และคณะ (2558) พบว่าฝรั่งพันธุ์แป้นสีทองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในช่วง 9.6-11.3 ไมโครโมล/กรัม และสอดคล้องกับงานวิจัยของ ปรานอม ขาวเมฆ และวิลาวัลย์ จันทู (2559) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH โดยใช้วิตามินซีเป็นสารเปรียบเทียบพบว่า ใบฝรั่งแป้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 3.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ใบฝรั่งขึ้นก็มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย มีค่า EC_{50} เท่ากับ 3.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบใบฝรั่ง ด้วยวิธี Dopachrome method เปรียบเทียบกับวิตามินซี พบว่า สารสกัดหยาบใบฝรั่งสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 10.09 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสอดคล้องกับงานวิจัยของปรานอม ขาวเมฆ และวิลาวัลย์ จันทู (2559) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากใบฝรั่งด้วยวิธี Modified dopachrome เปรียบเทียบกับวิตามินซี พบว่า ใบฝรั่งแป้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ใบฝรั่งขึ้นก็มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดย มีค่า EC_{50} เท่ากับ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลที่พบในตัวอย่างของพืช เช่น Kojic acid, Kaempferol และ Quercetin จัดเป็นสารที่ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Kim & Uyama, 2005; Solano et al., 2006)

สรุป

จากการศึกษาการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบใบฝรั่ง พบสารรวม 5 กลุ่มคือ ฟลาโวนอยด์ คูมาริน ซาโปนิน แทนนิน และ โพลีทาแทนนิน มีปริมาณฟีนอลิกรวม 138.89 ± 0.04 mg GAE/g ปริมาณแทนนินรวม 157.56 ± 0.02 mg TAE/g และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 145.29 ± 0.05 mg QE/g มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 12.11 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 10.09 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข้อเสนอแนะ

1. ผลจากการวิจัยสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการพัฒนาเครื่องสำอางจากใบฝรั่งฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนต่าง ๆ ของฝรั่ง และหลากหลายพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

- ณพัชร บัวฉวน. (2558). สารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลิกรวมของสารสกัดจากชะเอมไทย, วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 10(2), 78-95.
- ณพัชร บัวฉวน, และเยาวนารถ งามนันท. (2561). การพัฒนาโลชั่นบำรุงผิวจากสารสกัดหยาบชะเอมไทยและพิลังกาสง, วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 13(2), 74-85.
- ณิชาภัทร พงเทพ, ปรียาพร ยอดรัก, และเกรียงศักดิ์ ไทยพงษ์. (2558). คุณภาพผลและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในฝรั่งพันธุ์แป้นสีทองเกรดต่าง ๆ, วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 46(3)(พิเศษ), 505-508.

- ปรานอม ขาวเมฆ, และวิลาวัลย์ จันทนุ. (2559). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากใบและผลของผลไม้สดและอบแห้งและการผลิตครีมบำรุงผิว**. การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปี 2559 (RSU National Research Conference 2016) 29 เมษายน 2559. 75-84.
- Anonymous (2006). Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. **Geneva**: International organisation of standardization.
- Ayoola, G. A., Coker, H. A. B., Adesegun, S. A., Adepoju-Bello, A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., & Atangbayila, T. O. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in southwestern nigeria, **Journal of pharmaceutical research**, 7(3), 1019–1024.
- Chua, L. S. (2016). Untargeted MS-based small metabolite identification from the plant leaves and stems of *Impatiens balsamina*. **Plant physiol biochem**, 106:16-22
- 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(9), 4066–4087.
- Fernandes, M. R. V, Dias, A. L. T., Carvalho, R. R., Souza, C. R. F., & Oliverira, W. P. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts, **Industrial crops and products**, 60, 39-44.
- Jime nez-Escrig, A., Rinco, M., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) as a New Source of Antioxidant Dietary Fiber, **Journal of agricultural and food chemistry**, 49, 5489-5493.
- Kim, Y-J., & Uyama. H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic source: structure, inhibition mechanism and prospective for the future. **Cell. Mol. Life Sci**. 62: 1707-1723
- Koleva, I. I., BeeK, T., Linseen, J. P. H., Groot, A., & Evstatieva, L. N. (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, **Phytochemical analysis**, 13(1), 817-821.
- Liyana-Pathirana, C. M., Shahidi, F., & Alasalvar, C. (2006) Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis roem.*) and its concentrated juice, **Food chemistry**, 99, 121-128.
- Okonogi, S., Duangrat, C., Chowwanapoonpohn, S., & Anuchapreeda, S. (2007). **Research of antioxidant from thai medicinal plants**, National research council of thailand.
- Pisoschi, A. M., & Negulesc, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review, **Biochemistry and analytical biochemistry**, 1(1), 1-10.

- Prommuak, C., D-Eknamkul, W., & Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from thai silk waste and antioxidant activity of extract, **Separation and purification technology**, 62, 444-448.
- Ramadan, M. F., Kroh, L. W., & Moersel, J. T. (2003). Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils and oil fractions, **Journal of agricultural and food chemistry**, 51, 6961-6969.
- Ramsden, C. A., & Riley P. A. (2014). Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation, **Bioorganic and medicinal**, 22(8), 2388–2395.
- Solano, F., Briganti, S., Picardo, M., & Ghanem, G. (2006). Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. **Pigment Cell Res**, 19: 550-571.
- Tsai, C. C., Chen, H. S., Chen, S. L., Ho, Y. P., Ho, K. Y., & Wu, Y. M. (2005). Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis, **Journal periodontal**, 40, 378–384.
- Venkatesh, B., & Dorai, A. (2015). **Antibacterial and antioxidant potential of white and pink nelumbo nucifera gaertn flowers**. In Proceeding of international conference on bioscience, biochemistry and bioinformatics IPCBEE, 213-217.