

การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากใบมะรุมที่พบในชุมชนศรีภูมิในพื้นที่ฝั่งธนบุรี

บัลกีส มามะ¹, นูรีซัน นิสัน¹, ศุภรัตน์ ดวนใหญ่², สุชาดา มานอก^{2*}

¹ นิสิตปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

² อาจารย์, สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

* ติดต่อผู้พิมพ์ : สุชาดา มานอก คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Email: a_manok@hotmail.com

บทคัดย่อ

การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากใบมะรุมที่พบในชุมชนศรีภูมิในพื้นที่ฝั่งธนบุรี

บัลกีส มามะ¹, นูรีซัน นิสัน¹, ศุภรัตน์ ดวนใหญ่², สุชาดา มานอก^{2*}

ว. เกษตรศาสตร์อีสาน 2560; 13(2) : 80-89

รับบทความ : 14 พฤศจิกายน 2559

ตอบรับ : 31 พฤษภาคม 2560

ปัจจุบันประชาชนหันมาดูแลสุขภาพกันมากขึ้น และสนใจการใช้สมุนไพรเพื่อบำรุงผิว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสารสกัดสมุนไพรซึ่งพบในชุมชนศรีภูมิที่ให้การออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน วิธีดำเนินงานวิจัย: เตรียมสารสกัดจากสมุนไพร 4 ชนิด โดยการต้มและหมักด้วยเอทานอล ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์ด้วยวิธี FRAP คัดเลือกสารสกัดที่ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเพื่อพัฒนาตำรับเจล ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของตำรับ ได้แก่ ลักษณะ สี กลิ่น ความหนืด ความเป็นกรดต่าง ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อเก็บที่สภาวะเร่งและที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 3 เดือน ผลการศึกษารายละเอียด: สารสกัดใบมะรุมสกัดด้วยน้ำแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP สูงสุด ให้ค่า IC₅₀, VEAC และ FRAP value เท่ากับ 99.28 ± 3.47 µg/mL, 2.40 ± 0.01 mM ascorbic acid/g และ 14.80 ± 0.59 mM Fe²⁺/g ตามลำดับ ดังนั้นจึงนำสารสกัดน้ำจากใบมะรุมมาพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลบำรุงผิวด้านอนุมูลอิสระ และศึกษาความคงตัวของตำรับในสภาวะเร่ง ด้วยวิธี hot and cold temperature cycle และสภาวะเร่งระยะยาวที่อุณหภูมิ 45 °C พบว่า สภาวะเร่งในรอบที่ 8 ตำรับมีความคงตัวทางเคมีโดยให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันกับค่าเริ่มต้น (IC₅₀ = 138.04 ± 3.84 µg/mL) และในสภาวะเร่งระยะยาว ตำรับที่ผสมสารสกัดใบมะรุมมีความคงตัวทางเคมีและทางกายภาพดีเมื่อเทียบกับตำรับควบคุม มีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 97.72 - 123.89 µg/mL ในระหว่างเวลา 90 วัน โดย ณ วันที่ 90 ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของเจล (IC₅₀ = 104.71 ± 4.83 µg/mL) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเทียบกับเริ่มต้น (IC₅₀ = 97.72 ± 5.25 µg/mL) ดังนั้นตำรับนี้จึงมีความคงตัวในช่วงระยะเวลา 3 เดือน สรุปผลการวิจัย: สารสกัดน้ำจากใบมะรุมมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและมีความเหมาะสมในการพัฒนาตำรับเจลบำรุงผิวด้านอนุมูลอิสระ

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ, ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสมุนไพร, ความคงตัว

Development of Cosmetic Product from Leaves of *Moringa oleifera* Lam. Collected in Sripoom Community in Thonburi Area

Balkis Mamah¹, Nureesan Nisan¹, Supharat Duanyai², Suchada Manok^{2*}

¹ Undergraduate student, 4th year, Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Science and Technology,
Bansomdejchaopraya Rajabhat University

² Lecturer, Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University,
Thonburi, Bangkok, 10600

* **Corresponding author:** Suchada Manok, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University,
Email: a_manok@hotmail.com

Abstract

Development of Cosmetic Product from Leaves of *Moringa oleifera* Lam. Collected in Sripoom Community in Thonburi Area

Balkis Mamah¹, Nureesan Nisan¹, Supharat Duanyai², Suchada Manok^{2*}

IJPS, 2017; 13(2) : 80-89

Received : 14 November 2016

Accepted : 31 May 2017

Nowadays, people are more turning to health care and the use of herbs for skin care. The aims of this study were to develop the cosmetic product from herbal extract collected in Sripoom community. The antioxidant activity of the extract was tested before formulating. **Materials and Method:** The four herbal extracts were prepared by decoction and maceration by using ethanol. The antioxidant activity assays were performed using the DPPH, ABTS and reducing ability by FRAP assay. The highest antioxidant extract was selected to develop gel formulation. The physical and chemical properties of the gel formulation were studied including appearance, color, odor, viscosity, pH. DPPH antioxidant efficiency when stored at accelerated conditions was also conducted at 45 °C for 3 months. **Results:** The leaves of *Moringa oleifera* Lam. extracts by decoction showed the highest antioxidant activity based on DPPH, ABTS and FRAP assays. The IC₅₀, Vitamin C Equivalents Antioxidant Capacity (VEAC) and FRAP values were 99.28 ± 3.47 µg/mL, 2.40 ± 0.01 mM ascorbic acid/g and 14.80 ± 0.59 mM Fe²⁺/g, respectively. Therefore, the water extract from leaves of *Moringa oleifera* Lam. was further developed as an antioxidant skin gel. The stability by hot and cold temperature cycle method were evaluated at 45 °C. It was found that the accelerated condition in the 8th cycle was chemically stable and was not different from the beginning. (IC₅₀ = 138.04 ± 3.84 µg/mL) In long-term conditions at 45 °C, the formulations containing *Moringa* leaf extract showed good chemical and physical stability when compared to the control. The IC₅₀ values were ranged between 97.72 - 123.89 µg/mL during 90 days. On day 90, the antioxidant efficiency of gel (IC₅₀ = 104.71 ± 4.83 µg/mL) was significantly decreased (*p*<0.05) compared with day 0 (IC₅₀ = 97.72 ± 5.25 µg/mL). Therefore, this formula was expected to be stable in 3 months. **Conclusion:** The extract from leaves of *Moringa oleifera* Lam. possessed antioxidant activity and was suitable for developing gel formulations in skin care product.

Keywords: Antioxidant, Herbal cosmetic products, Stability

1. บทนำ

ปัจจุบันมนุษย์มีความใส่ใจในเรื่องสุขภาพและความงามมากขึ้น ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสารที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเสริมสุขภาพที่ดีของร่างกาย จึงได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย โดยจากการใช้ชีวิตประจำวันของมนุษย์ในยุคศตวรรษที่ 21 เรามักจะเห็นหรือได้รับผลกระทบจากอนุมูลอิสระ (free radicals) ในหลายรูปแบบซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (DNA) การเปลี่ยนสภาพโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น สิ่งเหล่านี้นับเป็นสาเหตุสำคัญของโรคหลากหลายชนิดตามมาในอนาคต (Jirum & Srihanam, 2011, Nakabeppu *et al.*, 2006, Valko *et al.*, 2007) อนุมูลอิสระเกิดขึ้นจากการใช้ออกซิเจนของกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ในเซลล์ รวมทั้งเกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่อยู่รอบๆ ตัว ได้แก่ มลพิษ การติดเชื้อโรค รังสียูวี (UV-ray) โอโซน (ozone) ควันทาจากท่อไอเสียรถยนต์ และควันบุหรี่ เป็นต้น (Scott *et al.*, 2005) โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้สามารถทำลายเซลล์ต่างๆ ในร่างกายรวมถึงเซลล์ผิวหนัง และอนุมูลอิสระสามารถถูกกำจัดหรือลดลงด้วยสารที่เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ซึ่งสามารถจับกับอนุมูลอิสระแล้วเกิดเป็นโมเลกุลใหม่ที่เสถียร ทำให้การเกิดอนุมูลอิสระตัวใหม่ลดลงหรือยับยั้งกลไกการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระลงได้ (Langseth, 1995)

เนื่องจากในปัจจุบันผิวมีโอกาสถูกทำลายจากอนุมูลอิสระอยู่ตลอดเวลา ทำให้เซลล์ผิวหนังมีความแข็งแรงของผนังเซลล์ลดลง โดยอนุมูลอิสระเป็นตัวการไปกระตุ้นให้คอลลาเจนใต้ผิวหนังสลายเร็วขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการรักษาความชุ่มชื้นและความยืดหยุ่นของผิวหนังลดลง จึงเกิดการเหี่ยวย่นและริ้วรอย ผิวแห้ง แตกปลาย หมองคล้ำ ทั้งหมดล้วนเป็นสาเหตุเกิดจากการทำลายของอนุมูลอิสระทั้งสิ้น ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสุขภาพผิว มีคุณสมบัติช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) ซึ่งเป็นตัวการทำลายผิวหนังทำให้เกิดรอยเหี่ยวย่นและริ้วรอยขึ้น จึงเป็นเหตุผลที่ประชาชนเริ่มหันมาใส่ใจดูแลร่างกายและผิวพรรณมากยิ่งขึ้น ทั้งการรับประทานอาหารและการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ครีม โลชั่น เจล ที่มีส่วนประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยในเรื่องของการลดริ้วรอยและบำรุงปกป้องผิวจากอนุมูลอิสระ (Panruksa & Jimtaisong, 2013) ซึ่งยุคปัจจุบันเครื่องสำอางจากสารสกัดพืชสมุนไพรกำลังเป็นที่นิยม สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงถูกนำมาศึกษาเป็นลำดับต้นๆ เพื่อใช้คัดเลือกหาสารสกัดสมุนไพรนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและยา

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในครั้งนี้เลือกการทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เนื่องจาก DPPH และ ABTS เป็นอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างเสถียร โดยอนุมูล DPPH[•] เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอิสระอยู่แล้ว ไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลอิสระเหมือนกับอนุมูล ABTS^{•+} วิธี DPPH เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระด้วยการให้อิโธโรเจนอะตอม ซึ่งเป็นวิธีเบื้องต้นที่นิยมใช้ในการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระทั่วไป ส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกไซด์ เนื่องจาก ABTS^{•+} เป็นอนุมูลอิสระที่สลายตัวแล้วให้อนุมูลเปอร์ออกไซด์ และการทดสอบทั้งสองวิธีนี้สามารถทำได้สะดวกโดยทำปฏิกิริยาในตัวกลางที่เป็นสารอินทรีย์ (Amornlerdpison *et al.*, 2006, Phansawan, 2011) นอกจากนี้ยังศึกษาสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของสารตัวอย่างแก่อนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นภายในระบบ โดยอาศัยการวัดปฏิกิริยารีดักชันของ Fe³⁺-TPTZ ไปเป็น Fe²⁺-TPTZ ด้วยวิธี FRAP ด้วย เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรที่ใช้ทดสอบค่อนข้างมีขั้วสูง เป็นสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธี ดังกล่าว คือ วิธี DPPH, ABTS และ FRAP จึงมีความเหมาะสมกับระบบสารละลายที่ใช้ในการทดสอบซึ่งเป็นสารละลายที่ค่อนข้างมีขั้วสูง

ในปัจจุบันมีการวิจัยที่เกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระในพืชผักและผลไม้ทั้งที่รับประทานกันอยู่ทั่วไปและที่พบในห้องถิ่น ซึ่งจากการสำรวจเบื้องต้น โดยศึกษาสภาพทั่วไปของชุมชนในพื้นที่แขวงหิรัญรุจี พบว่าเป็นพื้นที่ที่มีวิถีชีวิต ภูมิปัญญา วัฒนธรรม และความเชื่อที่หลากหลายสมควรได้รับการส่งเสริม อนุรักษ์ และพัฒนา รวมทั้งยังพบปัญหาทางด้านกายภาพ สิ่งแวดล้อม และเศรษฐกิจภายในชุมชน ส่วนใหญ่ยังขาดระบบการจัดการที่ดี ซึ่งจากการสำรวจเบื้องต้นนี้ พบว่าชุมชนศรีภูมิเป็นอีกชุมชนหนึ่งที่อยู่ในพื้นที่แขวงหิรัญรุจี เขตธนบุรี และอยู่ใกล้กับมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา อีกทั้งพื้นที่ส่วนใหญ่ในชุมชนยังมีการปลูกสมุนไพรเพื่อใช้ในครัวเรือน ทางคณะผู้วิจัยจึงได้บูรณาการโครงการวิจัยและพัฒนาเวชสำอางจากสมุนไพรสำหรับการบำรุงผิวต้านอนุมูลอิสระขึ้น โดยใช้สมุนไพรที่พบในชุมชนศรีภูมิ ได้แก่ ใบเตย ยอดอัญชัน มะรุม เป็นต้น ดังนั้นจึงได้นำสมุนไพรจำนวน 4 ชนิด มาสกัดและคัดเลือกสารสกัดที่เหมาะสมเข้าสู่กระบวนการ

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่มีประสิทธิภาพ และมีความคงตัว โดยศึกษาทดลองและผลิตเครื่องสำอางจากพืชที่พบในชุมชนและร่วมกันอนุรักษ์ใช้ประโยชน์จากสมุนไพรที่อยู่รอบตัวชุมชน เพื่อสร้างความมั่นใจของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาจากผลผลิตจากกระบวนการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ เพื่อสร้างภาพลักษณ์และอัตลักษณ์ที่ยกระดับมูลค่าทางความคิดแห่งภูมิปัญญาก่อให้เกิดการต่อยอดมูลค่าทางเศรษฐกิจในเชิงพาณิชย์ อีกทั้งยังเสริมสร้างความเข้มแข็งให้แก่ชุมชนบนฐานเศรษฐกิจพอเพียงด้วยการวิจัยแบบบูรณาการเชิงพื้นที่

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัยมีดังนี้ Carbomer 940, Disodium EDTA, Triethanolamine, Propylene glycol, Phenoxyethanol, FD&C Tartrazine, FD&C Brilliant blue (บริษัท วันรัต หน้าเขียน, ประเทศไทย) สารเคมีอื่นๆ เป็น analytical grade ดังนี้ Ethyl acetate, Hydrochloric acid (Ajex Finechem, Australia) L(+)-Ascorbic acid (Daejung, Korea) Dichloromethane, Hexane, Acetone (Burdick & Jackson, Korea) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-aldrich, Germany) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sul phonic acid) (Calbiochem, Germany) Ethanol, Methanol, Potassium peroxodisulfate, 2,4,6- tri(2- pyridyl)- 1,3,5- triazine (TPTZ), Acetic acid, Sodium acetate trihydrate, Iron (III) chloride hexahydrate, Iron (II) sulfate heptahydrate (Merck, Germany)

พืช

เตย (*Pandanus amaryllifolius* Roxb), มะรุม (*Moringa oleifera* Lam), ยอ (*Morinda citrifolia* L) และอัญชัน (*Clitoria tematea* L) ที่นำมาใช้ในการทดลอง เก็บเกี่ยวระหว่างเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม พ.ศ. 2558 จากชุมชนศรีภูมิ เขตธนบุรี จังหวัดกรุงเทพมหานคร

การเตรียมสารสกัด

ตัวอย่างสมุนไพรสดทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ใบเตย ใบมะรุม ใบยอ และดอกอัญชัน นำมาล้างให้สะอาด บดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างสมุนไพรสดแต่ละชนิดจำนวน 500 กรัม แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่หนึ่งนำไปสกัดโดยการแช่ (maceration) ในเอทานอลร้อยละ 95 เก็บในที่มืดทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 วัน อีกส่วนหนึ่งนำไปสกัดโดยการต้ม (decoction) ในน้ำเดือด นำสารละลายทั้งสองส่วนมาทำการกรองแยกกากออก แล้วนำ

สารละลายที่ได้ไปทำการระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งระบบสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ในลำดับต่อไป

การศึกษาการทำ TLC Screening เพื่อตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์ในการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น

นำสารสกัดทั้งหมดที่สกัดด้วยวิธีการต้มและวิธีการแช่มาละลายด้วยเอทานอลเตรียมสารละลายที่มีความเข้มข้น 2,000 µg/mL นำมา 0.05 mL ทำการจุดให้ชัดเจนลงบนแผ่น TLC โดยห่างจากขอบล่างแผ่นประมาณ 1 cm แล้วแช่ลงในระบบตัวทำละลาย Hexane : Acetone : Ethyl acetate : Dichloromethane ในอัตราส่วน 7 : 3 : 2 : 1 หลังจากนั้นนำออกมาทิ้งไว้ให้แห้งนำไปตรวจดูด้วยแสง UV light ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm นำสารละลาย DPPH เข้มข้น 100 mg / 100 mL พ่นลงบนแผ่น TLC ให้ทั่ว ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วบันทึกผล ณ ตำแหน่งของสารใดก็ตามที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบจะปรากฏการฟอกจางสีของ DPPH จากสีม่วงเป็นเหลือง จากนั้นคัดเลือกสมุนไพรที่แสดงผลบวกในการต้านอนุมูลอิสระชัดเจนที่สุดบนแผ่น TLC จากการทดสอบเบื้องต้น นำไปศึกษาปริมาณวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย DPPH assay

เตรียมสารละลาย methanolic DPPH radical เข้มข้น 0.2 mM และเตรียมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดเข้มข้น 10,000 µg/mL ละลายใน methanol จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 - 1,000 µg/mL นำสารละลายตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1 mL ผสมกับสารละลาย DPPH 9 mL ในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 nm นำค่า absorbance ที่ได้ไปคำนวณ % radical scavenging จากสมการ

$$\% \text{ radical scavenging} = 1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ผสมกับ DPPH

A_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH และตัวทำละลาย

Methanol

เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid โดยพล็อตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรกับ % radical scavenging จากนั้นหาค่า IC_{50} หรือความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้ง DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย ABTS assay

เตรียมสารละลาย ABTS เข้มข้น 7 mM และเตรียมสารละลาย potassium persulfate เข้มข้น 2.45 mM จากนั้นนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันในอัตราส่วน 1 : 0.5 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 12 - 16 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งานเพื่อตรวจสอบสารละลาย ABTS^{•+} ที่ได้ด้วย ethanol ให้มีค่า absorbance อยู่ในช่วง 0.70 ± 0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 nm จากนั้นเตรียมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดเข้มข้น 1,000 µg/mL ละลายใน ethanol นำสารตัวอย่างแต่ละชนิดมาอย่างละ 100 µL ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเติมสารละลาย ABTS^{•+} ลงไป 10 mL เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 6 นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 734 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid รายงานผลเป็นค่าเทียบเท่าในหน่วย mM ascorbic acid equivalent / g sample (ดัดแปลงจาก Re *et al.*, 1999)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดย FRAP assay

เตรียมสารละลาย FRAP reagent จาก 300 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl และ 20 mM FeCl₃•6H₂O โดยนำสารละลายทั้ง 3 มาผสมกันในอัตราส่วน 10 : 1 : 1 ตามลำดับ จากนั้นเตรียมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดเข้มข้น 100 µg/mL ละลายใน ethanol การวัดค่า absorbance จะประกอบด้วย 3 หลอดทดลอง แต่ละหลอดทดลองผสมสารดังตารางที่ 1 โดยปริมาตรสุดท้ายของทุกหลอดทดลองจะมีปริมาตร 10 mL

ตารางที่ 1 ส่วนผสมแต่ละหลอดในการทำ FRAP

Parameters	แต่ละหลอดทดลองประกอบด้วย
A (Sample)	Sample เข้มข้น 100 ppm 1 mL + FRAP reagent 9 mL
B (Blank)	Sample เข้มข้น 100 ppm 1 mL + Acetate buffer 9 mL
C (Control)	Ethanol 1 mL + FRAP reagent 9 mL

เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 4 นาที นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 593 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer คำนวณค่า absorbance จากสมการ

$$\text{Absorbance} = A - B - C$$

เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ferrous sulfate รายงานผลเป็นค่า FRAP value ในหน่วย mM Fe²⁺ / g sample (ดัดแปลงจาก Benzie & Strain, 1996)

การพัฒนาตำรับเจลจากสารสกัดสมุนไพร

คัดเลือกสมุนไพรที่ให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดจำนวน 1 ชนิด นำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลสารสกัดสมุนไพร ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบในการทำเจลสมุนไพร

ส่วนประกอบ	ตำรับ A (% w/w)	ตำรับ control (%) w/w)
Carbomer 940	1	1
Disodium EDTA	0.1	0.1
Propylene glycol	3	3
Phenoxyethanol	0.8	0.8
สารสกัดสมุนไพร	0.1	-
Triethanolamine	qs. pH = 6-7	qs. pH = 6-7
H ₂ O	qs. 100	qs. 100

นำน้ำทั้งหมดเติม disodium EDTA ตามอัตราส่วนดังตาราง จากนั้นแบ่งน้ำออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ทำการโปรย carbomer 940 จนขึ้นรูปเป็นเจล แล้วปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6-7 โดยการหยด triethanolamine ลงไป และน้ำในส่วนที่ 2 นำมาละลายสารสกัดสมุนไพรและ propylene glycol โดยที่ตำรับ control จะเป็นตำรับที่ไม่ใส่สารสกัด และตำรับ A จะเป็นตำรับที่เติมสารสกัด หลังจากนั้นเทส่วนที่ 2 ลงในเจล ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงเติมสารกันเสีย phenoxyethanol เป็นลำดับสุดท้าย พร้อมแต่งสีและกลิ่น

การศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีในสภาวะเร่งระยะยาว

นำตำรับทั้ง 2 ตำรับ มาทดสอบความคงสภาพแบบเร่ง (Rakwathin, 1997) โดยเก็บตำรับในขวดทึบแสง ที่ 2 สภาวะคือ (1) สภาวะทดสอบ hot and cold temperature cycling โดยเก็บในตู้เย็น (4 ± 1 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สลับกับการเก็บที่อุณหภูมิ 45 ± 1 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทดสอบ 6-8 รอบ (2) เก็บที่อุณหภูมิ 45 ± 1 °C เป็นเวลา 90 วัน โดยวิเคราะห์หาประสิทธิภาพของสารสกัดในการต้านอนุมูลอิสระที่เหลืออยู่ในตำรับ ที่เวลา 0, 15, 30, 60 และ 90 วัน สำหรับการประเมินการคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปจากเริ่มต้น ทำการหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่เหลืออยู่โดยใช้ UV-VIS spectrophotometer และตรวจสอบความเป็นกรด-ด่าง, ความหนืด, ลักษณะเนื้อสัมผัส, สี และกลิ่น

การวิเคราะห์ทางสถิติ

รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน (SD) จากข้อมูลผลการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และวิเคราะห์ ความแตกต่างระหว่างค่าทางสถิติ โดยใช้การเปรียบเทียบค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สันในการทดสอบฤทธิ์ต้าน ออกซิเดชันทั้ง 3 วิธี ในการทดสอบกับสารสกัดหยาบ และ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ที่ระดับ นัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 ($p < 0.05$) ในการวิเคราะห์ความ แตกต่างของการประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมี ของตำรับเจลโดยเปรียบเทียบระหว่างวันเริ่มต้น (day 0) กับเก็บ ผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นระยะเวลาในช่วง 90 วัน

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการศึกษาปริมาณของสารสกัด

การศึกษาปริมาณของสารสกัดในตัวทำละลายเอทานอลและน้ำ (ตารางที่ 3) พบว่าสารสกัดดอกอัญชันสกัดด้วยเอทานอลให้ร้อยละของสารสกัดมากที่สุด และสารสกัดใบเตยสกัด ด้วยน้ำให้ร้อยละของสารสกัดน้อยที่สุด โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 5.246 และ 0.895 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบปริมาณของ สารสกัดทั้ง 4 ชนิดที่ได้ พบว่าสมุนไพรแต่ละชนิดเมื่อทำการ สกัดด้วยเอทานอลจะให้ปริมาณมากกว่าการสกัดด้วยน้ำ แสดง ว่าสารสำคัญสามารถละลายออกมาได้ดีในตัวทำละลายที่ ก่อนข้างมีขี้

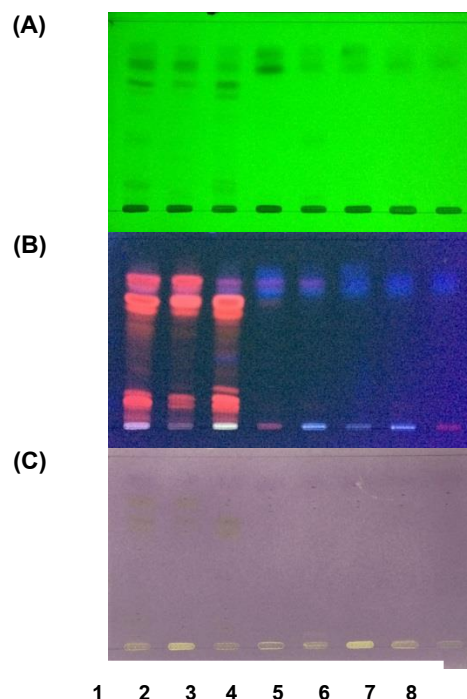
ตารางที่ 3 ร้อยละของสารสกัดสมุนไพร

ลำดับ	สมุนไพร	ร้อยละของสารสกัด	
		เอทานอล (%)	น้ำ (%)
1	เตย	1.555	0.895
2	มะรุม	4.620	2.466
3	ยอ	4.419	4.337
4	อัญชัน	5.246	2.276

ผลการตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์ในการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น

เมื่อนำสารสกัดทั้ง 8 ตัวอย่างไปตรวจสอบคุณภาพ วิเคราะห์ในการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นด้วยวิธี TLC (ภาพที่ 1) พบว่าสารสกัดบางชนิดมีการแยกได้ดี แต่ไม่พบการต้านอนุมูล อิสระจาก fraction ที่แยกได้ (ภาพที่ 1C) ดังนั้นจึงไม่สามารถ คัดเลือกสารสกัดที่แสดงผลบวกในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด บนแผ่น TLC ไปศึกษาปริมาณวิเคราะห์ได้ จึงต้องนำสารสกัด

ทั้ง 8 ตัวอย่าง ไปทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในเชิง ปริมาณวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP ทั้งหมด (ดัง ตารางที่ 4)



ภาพที่ 1 TLC โครมาโทแกรมของสารสกัดสมุนไพร เมื่อตรวจสอบด้วย (A) UV-254 nm, (B) UV-365 nm และ (C) สเปรย์ ด้วย DPPH reagent เมื่อใช้ mobile phase คือ Hexane : Acetone : Ethyl acetate : Dichloromethane (7 : 3 : 2 : 1) (เมื่อ 1-4 คือสารสกัดเอทานอล และ 5-8 คือสารสกัดน้ำ โดยที่ 1:เตย, 2:มะรุม, 3:ยอ, 4:อัญชัน, 5:เตย, 6:มะรุม, 7:ยอ และ 8: อัญชัน)

ผลการตรวจสอบปริมาณวิเคราะห์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP

จากการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดทั้ง 3 วิธี (ตารางที่ 4) พบว่า สารสกัดใบ มะรุมสกัดด้วยน้ำให้ปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ ความเข้มข้นของ DPPH ลดลงร้อยละ 50 ได้มากที่สุดวิธี DPPH มีค่า IC_{50} เท่ากับ $99.28 \pm 3.47 \mu\text{g/mL}$ ให้ค่า VEAC มากที่สุดในวิธี ABTS เท่ากับ $2.40 \pm 0.01 \text{ mM ascorbic acid/g}$ และมีค่า FRAP value มากที่สุดในวิธี FRAP เท่ากับ $14.80 \pm 0.59 \text{ mM Fe}^{2+}/\text{g}$ โดยจะพบว่าในการทดสอบด้วยวิธี DPPH สารสกัดสมุนไพรทั้งหมดมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ต่ำกว่าสารมาตรฐาน ascorbic acid ($IC_{50} = 4.01 \pm 0.99 \mu\text{g/mL}$) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 ผลการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด

ที่	สาร ตัวอย่าง	ผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ					
		DPPH assay		ABTS assay		FRAP assay	
		IC ₅₀ ± SD		VEAC ± SD		FRAP value ± SD	
		(µg/mL)		(mM ascorbic acid/g)		(mM Fe ²⁺ /g)	
		สารสกัด เอทานอล	สารสกัดน้ำ	สารสกัด เอทานอล	สารสกัด น้ำ	สารสกัด เอทานอล	สารสกัดน้ำ
1	เตย	224.23 ± 15.48 ^a	236.45 ± 12.76 ^{*.a}	1.51 ± 0.08	1.18 ± 0.05	7.45 ± 0.20	6.39 ± 0.02 [*]
2	มะรุ่ย	184.86 ± 6.46 ^a	99.28 ± 3.47 ^a	2.26 ± 0.07	2.40 ± 0.01	14.59 ± 0.51	14.80 ± 0.59
3	ยอ	1,853.23 ± 174.18 ^a	708.32 ± 28.57 ^a	0.36 ± 0.07	0.52 ± 0.08	4.58 ± 0.09	4.20 ± 0.26
4	อัญชัน	571.28 ± 19.98 ^a	358.57 ± 32.96 ^{*.a}	0.93 ± 0.10	1.94 ± 0.06	4.48 ± 0.14	9.37 ± 0.24 [*]
5	Ascorbic acid	4.01 ± 0.99		NT	NT	NT	NT

หมายเหตุ : NT = not tested, โดยเปรียบเทียบค่าสหสัมพันธ์แบบ Pearson เมื่อ * คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารตัวอย่างเดียวกัน ในตัวทาละลายชนิดเดียวกัน ภายในวิธีการทดสอบที่แตกต่างกัน และ a คือ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารตัวอย่างแต่ละชนิดกับสารมาตรฐาน Ascorbic acid เฉพาะภายในวิธี DPPH

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เมื่อเปรียบเทียบค่าสหสัมพันธ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน ระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 วิธีของสารตัวอย่างชนิดเดียวกัน ในตัวทาละลายเดียวกัน พบว่า ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 สารสกัดน้ำจากเตย เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH มีความสัมพันธ์ทางลบกับวิธี FRAP ในระดับสูงมาก ($r = -1.00$) นั่นคือ เมื่อค่า IC₅₀ เพิ่มขึ้นในวิธี DPPH ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากใบเตยลดลง จึงสัมพันธ์กันกับความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของใบเตยที่ลดลงด้วยวิธี FRAP ในขณะที่เดียวกันสารสกัดน้ำจากอัญชัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP มีความสัมพันธ์ทางบวกกับวิธี DPPH ในระดับสูงมาก ($r = 1.00$) ซึ่งเมื่อความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของอัญชันเพิ่มขึ้นในวิธี FRAP จะทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากอัญชันเพิ่มขึ้น ด้วยวิธี DPPH โดยที่ค่า IC₅₀ จะลดลง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระหว่างวิธี DPPH และ FRAP จะมีความสัมพันธ์กันในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทางด้านกลไก โดยจากการเปรียบเทียบสารสกัดทั้ง 4 ชนิด จะเห็นได้ว่าสารสกัดน้ำจากใบมะรุ่ยนั้นมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมในวิธี DPPH และกำจัดอนุมูลอิสระชนิดเปอร์ออกซีในวิธี ABTS ได้สูงสุดแล้ว ยังมีความสามารถในการต้าน

ออกซิเดชัน โดย อาศัยการวัดปฏิกิริยา reduction ของ Fe³⁺-TPTZ ไปเป็น Fe²⁺-TPTZ จากวิธี FRAP ได้อีกด้วย ดังนั้น จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้คัดเลือกสารสกัดน้ำจากใบมะรุ่ยมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เจลบำรุงผิวต้านอนุมูลอิสระและทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนถัดไป

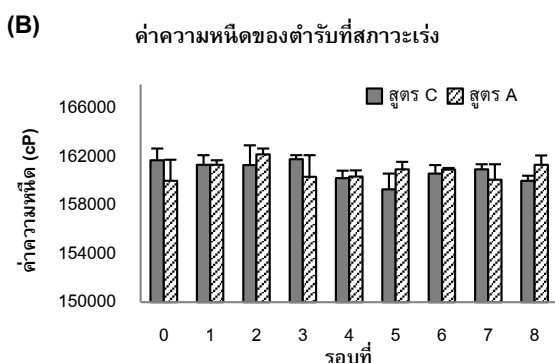
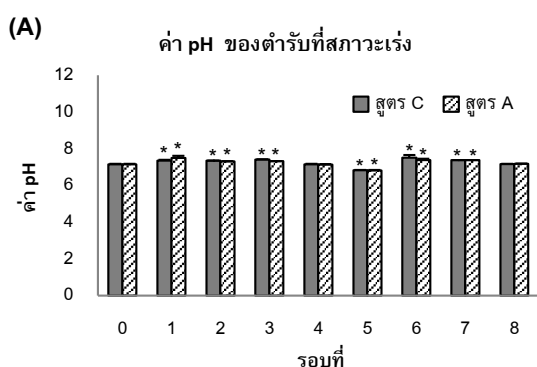
ผลการทดสอบความคงสภาพต่อสภาวะการเก็บต่าง ๆ

1) ผลการทดสอบความคงสภาพในสภาวะเร่ง

ผลการศึกษาความคงสภาพทางกายภาพ และ ทางเคมีในสภาวะเร่ง พบว่าตำรับมีความคงสภาพดีของ ปริมาณสารสำคัญในตำรับ เปรียบเทียบกับตำรับควบคุมแสดงผลการศึกษาดังตารางที่ 5 และภาพที่ 2 ในแต่ละรอบ การทดสอบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าตำรับเจลที่ผสมสารสกัดใบมะรุ่ยมีค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 104.71 - 162.18 µg/mL ในขณะที่ตำรับควบคุมซึ่งไม่มีสารสกัดให้ค่า IC₅₀ อยู่ที่ 204.17 - 295.12 µg/mL ทั้ง 2 ตำรับมีค่า pH และความหนืดใกล้เคียงกันในช่วง 6.80 - 7.50 และ 159,333 - 162,233 cP ตามลำดับ โดยลักษณะทางกายภาพของเนื้อเจลยังคงสภาพดี ไม่มีการแยกชั้น แต่สีจางลงปานกลาง (ภาพที่ 3B) และกลิ่นของเจลมีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยทั้ง 2 ตำรับ

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับเจลเมื่อเก็บที่สภาวะเร่งในแต่ละรอบ

รอบ ที่	ผลการต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} ; $\mu\text{g/mL}$)	
	ตำรับเจล ควบคุม	ตำรับเจลผสม สารสกัด
	(C) $\pm$ SD	(A) $\pm$ SD
เริ่ม	204.17 $\pm$ 1.67	138.04 $\pm$ 5.76
1	229.09 $\pm$ 2.08	131.83 $\pm$ 0.99
2	234.42 $\pm$ 0.40	109.65 $\pm$ 9.30
3	251.19 $\pm$ 6.69	107.15 $\pm$ 5.48
4	295.12 $\pm$ 11.90	162.18 $\pm$ 11.19
5	234.42 $\pm$ 3.07	123.03 $\pm$ 8.79
6	234.42 $\pm$ 1.02	104.71 $\pm$ 2.01
7	229.09 $\pm$ 2.15	107.15 $\pm$ 9.03
8	239.88 $\pm$ 1.89	138.04 $\pm$ 3.84



หมายเหตุ * คือ แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับแต่ละรอบกับการเก็บที่ก่อนเริ่มต้นสภาวะเร่งในตำรับเดียวกัน ($p < 0.05$)

ภาพที่ 2 ความคงตัวของตำรับ (A) ค่า pH และ (B) ค่าความหนืดของตำรับที่สภาวะเร่งด้วยอุณหภูมิในแต่ละรอบ

2) ผลการทดสอบความคงสภาพในสภาวะ 45 °C

ผลการศึกษาความคงสภาพทางกายภาพ และ ทางเคมี ในสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 45 $\pm$ 1 °C เป็นเวลา 90 วัน เมื่อประเมินการคงสภาพของตำรับ ณ วันที่ 0, 15, 30, 60 และ 90 วัน พบว่าตำรับมีความคงสภาพดีของปริมาณสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในตำรับ เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับควบคุม (ตารางที่ 6) เมื่อใช้เนื้อเจลที่ผสมสารสกัดใบมะรุมิวิเคราะห์หาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่เหลืออยู่ในเจลให้ค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 97.72 - 123.89 $\mu\text{g/mL}$ ในขณะที่ตำรับควบคุมซึ่งไม่มีสารสกัดให้ค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 239.88 - 288.40 $\mu\text{g/mL}$ โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า IC_{50} ระหว่างตำรับควบคุมกับตำรับที่ผสมสารสกัดใบมะรุมิในแต่ละเดือนแล้ว พบว่า ตำรับที่ผสมสารสกัดใบมะรุมิสามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้เป็นเท่าตัวของตำรับควบคุมเช่นเดียวกันกับการทดสอบในสภาวะเร่ง ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าการต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากผลิตภัณฑ์เจลนั้นมาจากสารสกัดใบมะรุมิที่เติมลงไปเป็นปริมาณ 0.1 เท่าของตำรับควบคุม และพบว่า ณ วันที่ 90 ประสิทธิภาพของเจลที่ผสมสารสกัดใบมะรุมิสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ลดลงเล็กน้อย (IC_{50} = 104.71 $\pm$ 4.83 $\mu\text{g/mL}$) เมื่อเทียบกับก่อนเก็บที่สภาวะ 45 °C ณ วันที่ 0 (97.72 $\pm$ 5.25 $\mu\text{g/mL}$) และผลการประเมินลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ค่า pH ความหนืดของตำรับ การสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเจล สี และกลิ่นของตำรับ พบว่าตำรับที่ผสมสารสกัดใบมะรุมิมีค่า pH อยู่ในช่วง 7.08 $\pm$ 0.01 – 7.71 $\pm$ 0.02 ผลการวัดความหนืดของตำรับที่สภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 45 °C มีการเปลี่ยนแปลงความหนืดจากเมื่อเตรียมตำรับเสร็จใหม่ๆ เพียงเล็กน้อย ส่วนการเปลี่ยนแปลงของสีและกลิ่นของตำรับพบว่ากลิ่นและสีจางลง ณ เวลา 90 วัน โดยที่สีของตำรับเป็นสีเขียวอ่อนลง (ภาพที่ 3C) เนื้อเจลกระจายตัวสม่ำเสมอดี ไม่มีการตกตะกอนของอนุภาคใดๆ

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีในสภาวะอุณหภูมิ 45 °C

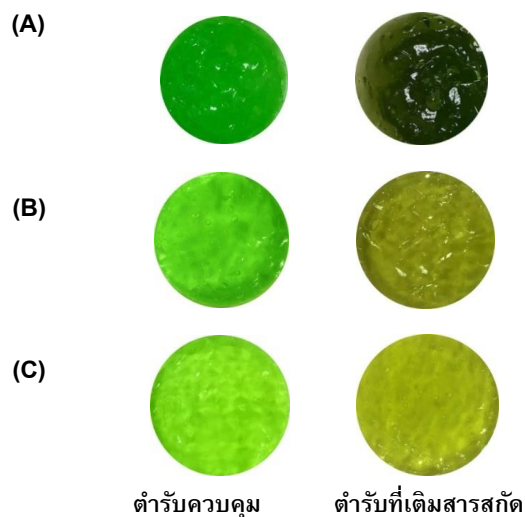
ระยะเวลาการเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 45 °C	ตำรับ	การประเมิน					
		ประสิทธิภาพของเจลในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC ₅₀ , µg/mL)	pH	ความหนืด (cP)	ลักษณะเจล	กลิ่น	สี
เริ่มต้น	C	288.40 ± 0.04	7.20 ± 0.02	161,733 ± 1703.92	++++	++++	++++
	A	97.72 ± 5.25	7.16 ± 0.02	160,033 ± 3027.10	++++	++++	++++
15 วัน	C	275.42 ± 5.75*	7.25 ± 0.07	160,233 ± 577.35	++++	++++	++++
	A	120.23 ± 19.28*	7.71 ± 0.03*	160,067 ± 251.66	++++	++++	++++
30 วัน	C	239.88 ± 6.78 ^a	7.03 ± 0.01	161,367 ± 650.64	++++	++++	++++
	A	123.89 ± 0.68*	7.41 ± 0.01 ^a	161,533 ± 3202.08	++++	+++	+++
60 วัน	C	239.88 ± 0.66 ^a	8.96 ± 1.74 ^{a,b}	163,500 ± 1153.26 ^{a,b}	++++	+++	+++
	A	112.20 ± 2.24 ^a	7.37 ± 0.04 ^a	160,700 ± 0.00	++++	++	+++
90 วัน	C	239.88 ± 12.01 ^a	7.49 ± 0.02 ^c	159,933 ± 635.09 ^c	++++	++	++
	A	104.71 ± 4.83 ^a	7.08 ± 0.03 ^{a,b,c}	161,200 ± 1053.57	++++	++	++

หมายเหตุ : ++++ หมายถึง ดีมาก, +++ หมายถึง ดี, ++ หมายถึง พอใช้, + หมายถึง ควรปรับปรุง, $p < 0.05$ เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย One-way ANOVA

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างก่อน และหลังการเก็บทดสอบความคงตัว (15, 30, 60 และ 90 วัน)

ภายในตำรับเดียวกัน

a, b และ c แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบการเก็บทดสอบความคงตัวที่ระยะเวลา 15, 30 และ 60 วันตามลำดับ ภายในตำรับเดียวกัน



ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบลักษณะเนื้อเจลและสีของตำรับ เมื่อ (A) ก่อนเก็บ (B) เมื่อเก็บที่สภาวะแรง (C) เมื่อเก็บที่สภาวะอ่อนอุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 90 วัน

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกสารสกัดสมุนไพรเพื่อนำมาพัฒนาผลิตภัณฑ์โดยการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำจากใบมะรุ่ยมีฤทธิ์ต้าน

อนุมูลอิสระที่ดี จากการทดสอบสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (IC₅₀ 99.28 ± 2.01 µg/mL) และ ABTS (2.40 ± 0.01 mM ascorbic acid/g) สอดคล้องกับการทดลองของ Chumark *et al.*, 2008 ที่ตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของมะรุ่ยโดยใช้ DPPH พบว่าสารสกัดสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 78.15 ± 0.92 µg/mL นอกจากนี้ยังศึกษาสมบัติการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (14.80 ± 0.34 mM Fe²⁺/g) พบว่าสารสกัดน้ำจากใบมะรุ่ยยังมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระเพื่อให้อยู่ในสภาวะที่เสถียร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kehinde & Abass, 2015 ที่ทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระจากส่วนต่างๆ ของมะรุ่ย ด้วยวิธี DPPH และ FRAP โดยพบว่าในส่วนของใบจะพบสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูงกว่าส่วนอื่นๆ และงานวิจัยของ Igbo *et al.*, 2015, Nigam *et al.*, 2016 ที่พบว่าสารสกัดใบมะรุ่ยที่สกัดด้วย ethyl acetate แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงเช่นเดียวกัน จากผลการทดสอบจะพบว่าสารสกัดหยابนั้นสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี แต่ fraction ที่แยกได้บนแผ่น TLC เมื่อสเปรย์ด้วย DPPH แล้ว ไม่พบการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากชนิดของ mobile phase ที่ใช้แยกนั้นอาจจะไม่เหมาะสม ทำให้ fraction ที่แยกออกมาได้ มีเฉพาะส่วนที่ไม่มีขั้ว จึงไม่พบการฟอกจากสีของ DPPH ในขณะ

ที่เมื่อนำสารสกัดหยาบทำปริมาณวิเคราะห์ จะพบว่าสามารถ
ต้านอนุมูลอิสระได้ หลังจากที้นำสารสกัดไปหมักรวมมาพัฒนาเป็น
ผลิตภัณฑ์เจลต้านอนุมูลอิสระและทดสอบความคงสภาพใน
สภาวะเร่ง และสภาวะ 45 °C นั้น มีความคงสภาพดีของสารต้าน
อนุมูลอิสระ ตลอดระยะเวลา 90 วัน ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดไป
หมักรวมที่ใช้เป็นสารสกัดหยาบ อาจจะประกอบด้วยสารสำคัญ
หลายชนิด ซึ่งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำจากใบหมักรวม
อาจมาจากสารจำพวก flavonoid, terpenoids, carbohydrate
และ phenol (Igbo, *et al.*, 2015) gallic acid (Fahey, 2005), (-)
-epicatechin, (+) -catechin (Charrouf & Guillaume, 2007)
เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและ
พัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาประจำปี
2558 ขอขอบคุณสาขาวิชาการแพทย์แผนไทยที่เอื้อเฟื้อสถานที่
เครื่องมือ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

References

- Amornlerdpison D, *et al.* Anti-oxidant activity of
Sargassum polycystum C. Agardh. *J Fisheries
Technology Res* 2006; 2(2): 96-103.
- Benzie IFF. and Strain JJ. The ferric reducing
ability of plasma (FRAP) as a measure of
“antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical
Biochemistry* 1996; 239: 70-76.
- Charrouf Z. and Guillaume D. Phenols and poly
phenols from *Argania spinosa*. *Am. J. Food Tech*
2007; 2(7): 679-683.
- Chumark P, Khunawat P, Sanvarinda Y, Phornchi-
rasilp S, Morales NP, Phivthong-ngame L,
Ratanachamnong P, Srisawatf S, Klai-upsorn S.
and Pongrapeeporn G. The *in vitro* and *ex vivo*
antioxidant properties, hypolipidaemic and
antiatherosclerotic activities of water extract of
Moringa oleifera Lam. leaves.
J Ethnopharmacology 2008; 116(3): 439-446.
- Fahey JW. *Moringa oleifera*: A review of the medi-
cal evidence for its nutritional, therapeutic,
and prophylactic properties. part 1. *TFL Journal*.
Retrieved August 8, 2016, from http://www.tfljournal.org/images/articles/20051201124931586_3.pdf
- Igbo UE, Igoli JO, Onyiriuka SO, Ejele AE, Ogukwe
CE, Ayuk AA, Elemo GN. and Gray AI.
Antitrypanosomal and antioxidant activities of
Moringa oleifera lam leaf extracts. *JPCBS* 2015;
3(1): 17-23.
- Jirum J. and Srihanam P. Oxidants and antioxi-
dants: sources and mechanism. *Acad. J. Kalasin
Rajabhat University* 2011; 1(1): 59-70.
- Kehinde I. and Abass OO. Compositional investiga-
tion of phytochemical and antioxidant properties of
various parts of *moringa oleifera* plant. *EJBAS*
2015; 2(2): 1-10.
- Langseth L. Oxidants, antioxidants, and disease
prevention. ILSI Europe; 1995.
- Nakabeppu Y, *et al.* Mutagenesis and carcinogene-sis
caused by the oxidation of nucleic acids. *J. Biol.
Chem* 2006; 387: 373-382.
- Nigam R, Ayachi A. and Verma KS. The antioxidant
potential of phenolic compounds from the leaves of
moringa oleifera collected from jabalpur (india) .
EJBPS 2016; 3(3): 532-536.
- Panruksa D. and Jimtaisong A. Antioxidant
efficiency by DPPH technique of serum with white
tea extract. Mae Fah Luang University; 2013.
- Phansawan B. Free radicals, antioxidants and
antioxidant activity determination. *J Science and
Technology* 2011; 21(3): 275-286.
- Rakwathin J. Approach for light stability testing of drugs.
Bangkok, Niyomvittaya 1997.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang
M. and Rice-Evans C. Antioxidant activity applying
an improved ABTS radical cation decolorization
assay. *J Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1231-
1237.
- Scott DA, *et al.* The in-fluence of vitamin C on
systemic markers of endothelial and inflammatory
cell activation in smokers and non-smokers.
J Inflamm Res 2005; 54: 138–144.
- Valko M, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal
physiological functions and human disease.
Intl J Biochem Cell Biol 2007; 39: 4484-4489.