

ฤทธิ์ทางชีวภาพและการดั่งตำรับโลชันจากสารสกัดคราม

กมลวรรณ จงจิตต์^{*§}, อีระพงษ์ นิลละอ[†], พัชรมน สอนเจริญ[‡]

^{*} สาขาแพทย์แผนไทย คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร ตำบลแร่ อำเภอน้ำโสม จังหวัดสกลนคร 47160

[†] หลักสูตรการแพทย์แผนไทยบัณฑิต คณะวิทยาการสุขภาพและการกีฬา มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93210

[‡] สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

[§] ผู้รับผิดชอบบทความ: opposite1888@gmail.com

บทคัดย่อ

บทนำและวัตถุประสงค์: คราม (*Indigofera tinctorial* L.) เป็นไม้พุ่มกึ่งไม้ ใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับ ใบย่อยรูปรี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ด้านการอักเสบ ยับยั้งการเกิดมะเร็ง ปอด และป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต มีการนำครามมาย้อมผ้า และเริ่มมีงานวิจัยที่นำสารสกัดจากครามมาทำเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากคราม การดั่งตำรับโลชัน และทดสอบความคงตัวทางกายภาพและเคมี

วิธีการศึกษา: ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-ciocalteu colorimetry และหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม โดยวิธี Aluminum chloride colorimetry นำครามสดในส่วน ของยอด ใบอ่อน ใบแก่ และส่วนผสมทั้งสามส่วนในอัตราส่วน 1:1:1 สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล นำผลฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ดีที่สุดมาดั่งตำรับโลชัน และศึกษาฤทธิ์ ดังกล่าวในตำรับโลชันที่ดีที่สุด โดยใช้สถิติ One way ANOVA เพื่อหาฤทธิ์และปริมาณกลุ่มสารสำคัญ

ผลการศึกษา: สารสกัดครามที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดคือมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.12 ± 0.01 mg/mL ได้แก่สาร สกัดส่วนยอด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดคือ 114.93 ± 11.44 mg GAE/g extract ได้แก่สารสกัดส่วนใบ อ่อน และสารสกัดส่วนผสมทั้งสามส่วนของครามมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดคือ 763.00 ± 42.26 mg QE/g extract จากการศึกษาดั่งตำรับโลชัน พบว่าตำรับที่ 3 ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดครามเท่ากับ 0.12 %w/w ของสารสกัด ส่วนต่าง ๆ ของครามมีลักษณะความคงตัวทางกายภาพและเคมีที่ดี โดยโลชันที่มีส่วนผสมสารสกัดส่วนยอด มีฤทธิ์ ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 42.23 ± 0.02 mg/mL

อภิปรายผล: จากงานวิจัยนี้พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมไม่ได้มีความ สัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการเลือกส่วนของพืชมาทำการทดสอบ เพื่อให้ผลตรงกับประโยชน์ของการนำไปใช้ เช่น ผลิตภัณฑ์ที่ช่วยลดการอักเสบ ลดริ้วรอย อาจต้องเลือกใช้ส่วนของ

พืชที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ: สารสกัดธรรมชาติที่มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระดีที่สุดคือสารสกัดส่วนยอด โลชันที่มีส่วนผสมสารสกัดส่วนยอดมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระดีที่สุด การตั้งตำรับโลชันที่มีส่วนผสมจากสารสกัดธรรมชาติเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เป็นการนำประโยชน์ของธรรมชาติมาใช้เพิ่มเติมจากการย้อมผ้าคราม ในงานวิจัยต่อไปอาจทำการทดสอบหาสารสำคัญชนิดอื่นจากสารสกัดธรรมชาติ การทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง และอาจทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในทางยา เช่น ลดการอักเสบ ซึ่งเป็นการเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภคได้ใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมสมุนไพรธรรมชาติ และเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรในเชิงพาณิชย์ต่อไป

คำสำคัญ: คราม, ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ, สารประกอบฟีนอลิกรวม, ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม, โลชัน

Bioactive Compounds of *Indigofera tinctorial* L. Extract and Lotion Formulation

Kamolwan Jongjitt^{*,§}, Theeraphong Ninlaor[†], Pacharamon Soncharoen[‡]

^{*} Thai Traditional Medicine Department, Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan Sakonnakhon Campus, Rae Subdistrict, Phang khon District, Sakon Nakhon 47160

[†] Bachelor of Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Health and Sports Science, Thaksin University, Phatthalung Campus, Ban Phrao Subdistrict, Pa Phayom District, Phatthalung 93210

[‡] Applied Thai Traditional Medicine Department, Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Talat Subdistrict, Mueang District, Maha Sarakham 44000, Thailand.

[§] Corresponding author: opposite1888@gmail.com

Abstract

Introduction & Objectives: *Indigofera tinctorial* L. (indigo) is a broad shrub with alternate pinnate leaves and elliptic leaflets that have compounds with antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activities, which inhibit the development of lung cancer, and protect against ultraviolet radiation. Indigo has been used to dye fabric, and there has been research on indigo extracts being used to develop cosmetic products. This research aimed to study the biological properties of indigo extract, formulate lotions and test their physical and chemical stability.

Methodology: The antioxidant activity of indigo extract was studied using a DPPH assay, and its phenolic content was determined using the Folin-ciocalteu colorimetry method and flavonoid content using the aluminum chloride colorimetry method. Fresh indigo from the shoot tips, young leaves, mature leaves, and all three parts in a ratio of 1:1:1 was extracted with methanol solvent. The extract that exhibited the best antioxidant activity, phenolic content, and flavonoid content was selected to develop lotion, and the best lotion was tested for antioxidant activity, phenolic content, and flavonoid content by using one-way ANOVA for the effects of such substances.

Results: The indigo extracts from shoot tips had the best antioxidant activity at IC₅₀ of 0.12 ± 0.01 mg/mL, from young leaves had the highest phenolic content (114.93 ± 11.44 mg GAE/g extract), and from all three parts had the highest flavonoid content (763.00 ± 42.26 mg QE/g extract). As for the lotion formulation, the third formula with 0.12 %w/w all-part indigo extract had good physical and chemical stability characteristics; while the formula using shoot-tip extract had the best antioxidant activity at IC₅₀ of 42.23 ± 0.02 mg/mL.

Discussion: This study found that the total phenolic and flavonoid contents did not positively correlate with antioxidant activity. This could be a guideline for selecting the plant parts for testing to match the application's benefits. For example, to produce a product for reducing inflammation and wrinkles, the plant part with the highest

antioxidant activity may be used.

Conclusions and Recommendations: The extract from shoot tip had the highest antioxidant content. The lotion formula with an extract from shoot tips had the highest antioxidant activity. Formulating a lotion with indigo extract as a cosmetic product was an additional use of indigo other than for fabric dyeing. Other important substances from indigo extract and toxicity testing in animal models should be further studied. It may also be made into a medicinal product for reducing inflammation. That was an additional choice for consumers to use products with natural herbal ingredients, leading to the development of commercial herbal products

Key words: *Indigofera tinctoria* L., antioxidant activity, phenolic content, flavonoids content, lotions

บทนำและวัตถุประสงค์

คราม (*Indigofera tinctoria* L.) มีชื่อสามัญคือ Indigo เป็นสายพันธุ์ครามฝักตรง ลักษณะไม้พุ่มขนาดเล็ก ขนาดพุ่มกว้าง 200 เซนติเมตร แตกกิ่งก้านสาขามาก ใบรี เรียงสลับแบบขนนก กลีบดอกสีชมพู ผลเป็นฝักเล็ก ๆ ออกเป็นกระจุก ฝักสีเขียวตรง มีขน มีความสูงของต้นประมาณ 4-6 ฟุต ชอบแสงแดด ทนทานต่ออากาศร้อน ฝน และดินเค็มได้ดี^[1] สารสกัดครามมีรายงานในหลอดทดลองว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา คือ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด พบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์มะเร็งปอดลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดคราม^[2] กลุ่มสารสำคัญที่อยู่ในคราม เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซาโปนิน (saponins) แทนนิน (tannins) สเตียรอยด์ (steroids) ฟีนอลิก (phenolics) แอนโทราควิโนน (anthroquinones) เป็นต้น^[3] ภูมิปัญญาของชาวบ้านโพนแพง ตำบลดินจี่ อำเภอลำม่วง จังหวัดกาฬสินธุ์ ได้นำครามมาย้อมผ้า และใช้เป็นสมุนไพรรักษาแผลของสัตว์ โดยการทาบริเวณที่เป็นแผลให้ทั่ว ควบรวมถึงมีรายงานการใช้ในอายุรเวทของครามในการปลูกผม^[4] และมีการต้มใบครามใช้บรรเทาอาการ

ปวดจากแมลงสัตว์กัดต่อย รักษาแผลไฟไหม้และน้ำร้อนลวก^[5] ประกอบกับพบความเป็นพิษต่ำในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์ในสารสกัดใบแก่ ใบอ่อน และเมล็ด^[6] การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับครามที่ผ่านมา นอกจากจะนำมาใช้ในการย้อมผ้าคราม^[7] พบว่ามีการนำสารสกัดจากครามมาทำเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง^[8] และจากรายงานการใช้ครามในการปลูกผมและการใช้ในทางยา พบว่าสารสกัดครามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ด้วยคุณสมบัติและความปลอดภัยของครามดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำสารสกัดจากครามมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โลชั่น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวม จากครามสดในส่วนยอด ใบอ่อน ใบแก่ และส่วนผสมทั้งสามส่วน (ยอด ใบอ่อน ใบแก่ ในอัตราส่วน 1:1:1) นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล^[3] นอกจากนั้นงานวิจัยนี้ยังทำการตั้งตำรับโลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดคราม โดยศึกษาความคงตัวทางกายภาพและเคมีของตำรับโลชั่นจากสาร

สกัดคราม และนำตำรับที่ดีที่สุดมาหาฤทธิ์ทางชีวภาพนั้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสมุนไพรต่อไป

ระเบียบวิธีศึกษา

รูปแบบการศึกษา

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยในห้องปฏิบัติการ (laboratory research) โดยนำครามสดจากส่วนของยอด ใบอ่อน ใบแก่ และส่วนผสมทั้งสามส่วนในอัตราส่วน 1:1:1 มาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และนำส่วนของสารสกัดครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ดีที่สุดมาตั้งตำรับโลชั่น จากนั้นนำตำรับที่ดีที่สุดมาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม รวมถึงทดสอบความคงตัว

ทางกายภาพและเคมีของตำรับโลชั่นจากสารสกัดคราม

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

1.1 ครามสด (*Indigofera tinctorial* L.) สายพันธุ์ครามฝักตรง จากทั้ง 4 ส่วน ประกอบด้วย ส่วนยอด (shoot tip) คือ ส่วนของยอดเล็ก ๆ ที่ยังไม่เป็นใบอ่อน ส่วนใบอ่อน (young leaves) คือ ส่วนของใบเขียวอ่อนที่ตัดจากส่วนยอดออกมา ส่วนใบแก่ (mature leaves) คือ ส่วนของใบสีเขียวเข้มที่แผ่ใบเต็มที่ และส่วนผสมทั้งสามส่วน (all three parts) คือ ส่วนของยอด ใบอ่อน ใบแก่ ในอัตราส่วน 1:1:1 แสดงใน Figure 1 โดยเก็บตัวอย่างครามจากแหล่งเดียวกันในเขตอำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร พ.ศ. 2563 คัดแยกสายพันธุ์ครามโดย ดร.วาสนา แผลติตะ อาจารย์ประจำสาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร

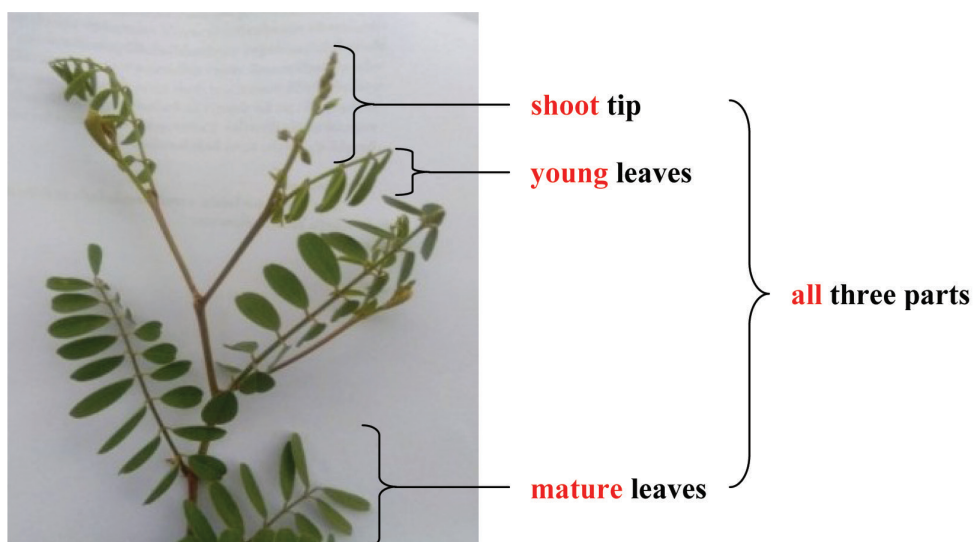


Figure 1 The parts of indigo (*Indigofera tinctorial* L.).

2. อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์

2.1 เครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (rotary evaporator R201, BUCHI, Switzerland)

2.2 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-spectrophotometer T80, PG, United Kingdom)

2.3 เครื่องอบลมร้อน (hot air oven รุ่น D11907 Schwabach ยี่ห้อ Memmert)

2.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge รุ่น Digen 21R บริษัทไซแอนติฟิคโปรดักส์ จำกัด)

2.5 เครื่องวัดความหนืด (brookfield viscometer รุ่น NDJ-8S ยี่ห้อ T-BOTA)

2.6 เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH meter รุ่น FT2200-F ยี่ห้อ OHAUS)

3. สารเคมี

3.1 เมทานอล (methanol) Analytical Reagent Grade (AR) บริษัทคิวเร็กซ์ จำกัด

3.2 DPPH (2, 2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) Analytical Reagent Grade (AR) บริษัทชิกมา จำกัด

3.3 Folin-Ciocalteu reagent, Analytical Reagent Grade (AR) บริษัทโลบา จำกัด

3.4 วิตามินซี (ascorbic acid) Analytical Reagent Grade (AR) บริษัทชิกมา จำกัด

3.5 กรดแกลลิก (gallic acid) Analytical Reagent Grade (AR) บริษัทชิกมา จำกัด

3.6 เคอร์ซีทิน (quercetin) Analytical Reagent Grade (AR) บริษัทชิกมา จำกัด

3.7 Mineral oil, Cosmetic Grade ห้างหุ้นส่วนจำกัด สิ้นไทยเคมีภัณฑ์และการค้า

3.8 Jojoba oil, Cosmetic Grade ห้างหุ้นส่วนจำกัด สิ้นไทยเคมีภัณฑ์และการค้า

3.9 Carbopol 940, Cosmetic Grade ห้าง

หุ้นส่วนจำกัด สิ้นไทยเคมีภัณฑ์และการค้า

3.10 Isopropyl myristate, Cosmetic Grade ห้างหุ้นส่วนจำกัด สิ้นไทยเคมีภัณฑ์และการค้า

3.11 Dimethicone, Cosmetic Grade ห้างหุ้นส่วนจำกัด สิ้นไทยเคมีภัณฑ์และการค้า

3.12 Cetomacrogol 1000, Cosmetic Grade ห้างหุ้นส่วนจำกัด สิ้นไทยเคมีภัณฑ์และการค้า

3.13 White soft paraffin, Cosmetic Grade ห้างหุ้นส่วนจำกัด สิ้นไทยเคมีภัณฑ์และการค้า

3.14 Cetostearyl alcohol, Cosmetic Grade ห้างหุ้นส่วนจำกัด สิ้นไทยเคมีภัณฑ์และการค้า

3.15 Glycerin, Cosmetic Grade ห้างหุ้นส่วนจำกัด สิ้นไทยเคมีภัณฑ์และการค้า

3.16 Glydant plus, Cosmetic Grade ห้างหุ้นส่วนจำกัด สิ้นไทยเคมีภัณฑ์และการค้า

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมวัตถุดิบ

นำยอด ใบอ่อน ใบแก่ ทั้งสามส่วนในอัตราส่วน 1:1:1 ของสายพันธุ์ครามฝักตรง (*Indigofera tinctoria* L.) ที่เก็บในเขตอำเภอมะนัง จังหวัดสงขลา นำมาตากแห้ง แล้วอบที่อุณหภูมิ 50 °C แล้วนำมาบดจนละเอียด จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 100

2. การสกัดตัวอย่างแห้งด้วยตัวทำละลาย

สมุนไพรรอบที่บดละเอียดนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล^[3] ในอัตราส่วน 1:10 โดยแช่ไว้เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำไประเหยเอาตัว

ทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (rotary evaporator) โดยใช้อุณหภูมิที่ 40 °C ความดัน 200 mbar สารสกัดที่ได้นำไปอบที่ตู้อบความร้อน 50 °C และนำมาพริชทราย เพื่อระเหยตัวทำละลายออกให้หมด จนได้สารสกัดแห้งเป็น crude extract จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอทำการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดคราม

3.1 การทดสอบหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

สารสกัดครามทำการทดสอบหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Renukadevi และ Sultana (2011)^[2] ซึ่งใช้วิตามิน

ซี (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้นร้อยละ 0.004 และตัวอย่างสารสกัดที่มีความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 mg/mL โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย แล้วดูดตัวอย่างสารสกัดปริมาตร 0.15 mL เติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 4.5 mL หลีกเลียงการถูกแสง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นตั้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยเครื่อง UV-spectrophotometer ทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ดังสมการ

$$\text{ร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ} = \frac{\text{Control OD} - \text{Sample OD}}{\text{Control OD}} \times 100$$

โดย Control OD = ค่าดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุมสารมาตรฐาน

Sample OD = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดในสารละลาย DPPH

และรายงานผลเป็นค่า IC₅₀ ซึ่งหมายถึงปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลงร้อยละ 50 (IC₅₀, 50% of Inhibitory Concentration) โดยคำนวณหาค่า IC₅₀ จากสมการของกราฟคือ $y = 1830.4x - 6.7592$ ซึ่งมีค่า $R^2 = 0.9971$ เมื่อ y คือ ร้อยละฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ x คือ ความเข้มข้นของวิตามินซี (ascorbic acid) mg/mL

3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ทำการทดสอบโดยวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Loipiman และคณะ (2011)^[9] โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ทดสอบด้วย Folin-Ciocalteu Colo-

rimetry method โดยดูดตัวอย่างสารสกัดครามความเข้มข้น 0.1 mg/mL ปริมาตร 200 μ L เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu 400 μ L และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 7.5 ปริมาตร 1 mL จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2 mL เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm โดยเครื่อง UV-spectrophotometer นำค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) ทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณโดยใช้สมการ $y = 5.581x - 0.2577$ ซึ่งมีค่า $R^2 = 0.9979$ เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm และ x คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิก (gallic acid) mg/mL

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์

รวม

ทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม โดย Aluminum chloride colorimetry method ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Prommuak และคณะ (2008)^[10] เตรียมตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 0.1 mg/mL โดยซึ่งตัวอย่างสารสกัด 1 g ละลายด้วยเมทานอลแล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 10 mL ดูดสารสกัดตัวอย่าง 150 μ L เติมร้อยละ 10 ของอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) 1.5 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 4.5 mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 nm และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากกราฟมาตรฐานเคอร์ซีทิน (quercetin) ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ คำนวณโดยใช้สมการ $y = 2.4822x - 0.2913$ ซึ่งมีค่า $R^2 = 0.9996$ เมื่อ y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 nm และ x คือ ความ

เข้มข้นของสารละลายเคอร์ซีทิน (quercetin) mg/mL

4. การตั้งตำรับโลชั่นจากสารสกัดคราม

นำส่วนของสารสกัดคราม (indigo extract) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก รวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ดีที่สุด มาตั้งตำรับตัวอย่างละ 5 ตำรับ ในแต่ละตำรับมีความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, และ 0.20 %w/w ตามลำดับ รวมทั้งหมด 15 ตำรับ ปริมาณตำรับละ 100 g ส่วนประกอบของตำรับแสดงใน Table 1 การเตรียมโลชั่นเตรียมโดยแบ่งออกเป็นสองภูมิภาค คือ ภูมิภาคน้ำมัน (ส่วนที่ 1) และภูมิภาคน้ำ (ส่วนที่ 2) เชื่อมด้วยตัวอิมัลซิไฟเออร์ทำให้โลชั่นเป็นเนื้อเดียวกัน โดยนำส่วนที่ 1 หลอมให้มีอุณหภูมิ $70^{\circ}C$ และอุ่นส่วนที่ 2 ให้มีอุณหภูมิ $75^{\circ}C$ นำส่วนที่ 1 เทลงส่วนที่ 2 คนไปทิศทางเดียวกันด้วยความเร็วสม่ำเสมอ เมื่ออุณหภูมิลดลงที่ $45^{\circ}C$ เติมส่วนที่ 3 ลงไป คนต่อไปจนเกิดเนื้อโลชั่น

Table 1 Percentage of ingredients in lotion formula from 3 parts of indigo extracts.

Part	Substance name	Functions	Percentage (weight by weight)
1	Mineral oil	Emollient	2.00
	Jobba oil	Emollient	1.00
	Carbopol 940	Thickening agent	0.50
	Isopropyl myristate	Emollient	2.00
	Dimethicone	Skin protection	1.00
	Cetomacrogol 1000	Emulsifier	15.00
	White soft paraffin	Emollient	3.00
	Cetostearyl alcohol/Auxiliary	Emulsifier	2.00
2	Glycerin	Humectant	5.00
	DI water	Solvent	qs. to 100.00
3	Glydant plus	Preservative	0.50
	3 parts of indigo extract (shoot tip, young leaves, all three parts)	Active ingredient	0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 (recipes 1–5 in order)

5. ขั้นตอนการทดสอบความคงตัวทางกายภาพ และเคมีของตำรับโลชันจากสารสกัดคราม

5.1 ทดสอบตำรับโลชันจากสารสกัดคราม

ก่อนและหลังการทำ Heating and cooling cycle (การนำโลชันที่เตรียมไว้ มาใส่ในตู้เย็น 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอบในตู้อบลมร้อน 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ) ทำซ้ำ 7 รอบ ทำการทดสอบในหัวข้อต่าง ๆ ดังนี้

- 1) ทดสอบสีด้วยตาเปล่า
- 2) ทดสอบสี ด้วย Color Chart^[11]
- 3) ทดสอบค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter^[12]
- 4) ทดสอบค่าความหนืด ด้วยเครื่อง Brookfield viscometer (LV2 spindle) รุ่น NDJ-8S ยี่ห้อ T-BOTA ในความเร็วรอบ 2, 3 และ 4 rpm
- 5) การทดสอบการแยกชั้น ด้วยเครื่อง Centrifuge ในความเร็วรอบ 6,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C^[13]

5.2 การทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโลชัน

เตรียมโลชัน 6 g เจือจางด้วยเมทานอล 120 mL เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที (ดัดแปลงจากวิธีของ Berna, Rosmala และ Muhammad (2013)^[14] แล้วนำไป Centrifuge เอาเฉพาะส่วนใสด้านบนไปวิเคราะห์ จากนั้นทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่นเดียวกับการทดสอบในหัวข้อที่ 3.1

5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

เตรียมโลชัน 6 g เจือจางด้วยเมทานอล 120 mL เขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไป Centrifuge เอาเฉพาะส่วนใสด้านบนไปวิเคราะห์ จากนั้นทำการ

ทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมตามขั้นตอนและวิธีการในหัวข้อที่ 3.2

5.4 การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

เตรียมโลชัน 6 g เจือจางด้วยเมทานอล 120 mL เขย่าเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไป Centrifuge เอาเฉพาะส่วนใสด้านบนไปวิเคราะห์ จากนั้นทำการทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมตามขั้นตอนและวิธีการในหัวข้อที่ 3.3

การวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากสารสกัดคราม โดยใช้สถิติ One-way ANOVA สำหรับการเปรียบเทียบลักษณะความคงตัวของตำรับโลชันก่อนและหลังการทดสอบโดยใช้สถิติ Paired sample *t*-test โดยกำหนดช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

ผลการศึกษา

จากการนำครามสดในส่วนของยอด ใบอ่อน ใบแก่ และส่วนผสมทั้งสามส่วนในอัตราส่วน 1:1:1 มาสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล นำมาคำนวณหาร้อยละผลผลิต ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และนำส่วนของสารสกัดครามที่มีฤทธิ์ดีที่สุดในแต่ละการทดสอบมาตั้งตำรับโลชัน ส่วนละ 5 ตำรับรวม 15 ตำรับ จากนั้นนำตำรับที่ดีที่สุดมาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมอีกครั้ง รวมถึงทดสอบความคงตัวทางกายภาพและเคมีของตำรับโลชันจากสารสกัดคราม ผลการศึกษา พบว่า

1. ร้อยละผลผลิต (%yield)

จากผลการคำนวณหาร้อยละผลผลิต(%yield) พบว่าส่วนผสมทั้งสามส่วน มีร้อยละผลผลิตสูงสุด

เท่ากับ 5.57 g หรือ 11.14 %w/w และน้อยที่สุดคือ สารสกัดยอดครามเท่ากับ 3.33 g หรือ 6.66 %w/w (Table 2)

Table 2 Percentage of dry weight from the parts of indigo extracts.

Parts of indigo	Solvent	Weight of indigo powder (g)	Extract weight (g)	%yield (w/w)
Shoot tip	Methanol	50.00	3.33	6.66
Young leaves	Methanol	50.00	3.53	7.06
Mature leaves	Methanol	50.00	4.07	8.14
All three parts	Methanol	50.00	5.57	11.14

2.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และใช้วิตามินซี (ascorbic acid) เป็นสารละลายมาตรฐานพบว่าสารสกัดส่วนยอดครามสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.12 ± 0.01 mg/mL และสารสกัดส่วนใบแก่ มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระน้อยที่สุดมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.23 ± 0.01 mg/mL ในขณะที่ค่า IC_{50} ของสารละลายมาตรฐานวิตามินซี (ascorbic acid) เท่ากับ 0.02 ± 0.00 mg/mL (Table 3)

3. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

ผลการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-ciocalteu colorimetry พบว่าสาร

สกัดส่วนใบอ่อนของครามมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดคือ 114.93 ± 11.44 mg GAE/g extract และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่น้อยที่สุดคือส่วนผสมทั้งสามส่วน เท่ากับ 87.16 ± 2.74 mg GAE/g extract (Table 3)

4. ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

จากการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมโดยวิธี Aluminum chloride colorimetry (Table 3) พบว่าสารสกัดครามที่มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดคือส่วนผสมทั้งสามส่วน เท่ากับ 763.00 ± 42.26 mg OE/g extract และปริมาณน้อยที่สุด คือส่วนของใบแก่เท่ากับ 425.59 ± 18.70 mg OE/g extract

Table 3 Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents of indigo extracts.

Biological activities	Shoot tip	Young leaves	Mature leaves	All three parts	Standard substance
Antioxidant activity by DPPH method	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.23 ± 0.01	0.14 ± 0.04	Ascorbic acid 0.02 ± 0.00
Phenolic content	94.92 ± 5.05	114.93 ± 11.44	99.93 ± 5.17	87.16 ± 2.74	Gallic acid
Flavonoid content	488.16 ± 45.46	488.70 ± 12.24	425.59 ± 18.70	763.00 ± 42.26	Quercetin

Note: Formulate the lotion using the indigo extract, which has the best antioxidant activity, phenolic content, and flavonoid content.

5. การทดสอบทางกายภาพและเคมีของโลชั่น จากสารสกัดคราม

การพัฒนาโลชั่นได้จากการนำส่วนของสารสกัดครามที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่ดีที่สุดคือสารสกัดครามส่วนยอด ใบอ่อน และส่วนผสมทั้งสามส่วน ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดส่วนใบแก่ไม่มีฤทธิ์ที่ดีที่สุด จึงไม่นำมาใช้ในการพัฒนาโลชั่น โดย

ในแต่ละส่วนนำมาพัฒนาส่วนละ 5 ตำรับ รวมเป็น 15 ตำรับ ผลปรากฏว่าสูตรตำรับที่ 3 ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดครามเท่ากับ 0.12 %w/w จากทุกส่วนมีความคงตัวดีที่สุด ซึ่งผลการทดสอบทางกายภาพและเคมีก่อนและหลังการทดสอบของโลชั่นสูตรตำรับที่ 3 จากสารสกัดครามส่วนยอด ใบอ่อน และส่วนผสมทั้งสามส่วน แสดงใน Table 4

Table 4 Physical and chemical stability before and after testing of the 3rd formula lotion.

Feature of the 3 rd formula lotion	Before heating and cooling cycle			After heating and cooling cycle			p-value
	Shoot tip	Young leaves	All three parts	Shoot tip	Young leaves	All three parts	
Color	Off white	Off white	Off white	Off white	Off white	Off white	-
Stickiness	Not sticky	Not sticky	Not sticky	Not sticky	Not sticky	Not sticky	-
pH	5.18 ± 0.01	5.15 ± 0.03	5.33 ± 0.01	5.16 ± 0.01	5.15 ± 0.05	5.30 ± 0.01	$p > 0.05$
Viscosity (cP)	4597 ± 21.22	4341 ± 119.53	4561 ± 139.39	4448 ± 130.06	4249 ± 106.79	4347 ± 66.95	$p > 0.05$
Separation	No separation	No separation	No separation	No separation	No separation	No separation	-

Note: $p > 0.05$ means there is no statistically significant difference.

จากผลการทดสอบโลชั่นจากสารสกัดส่วนยอด ใบอ่อน และส่วนผสมทั้งสามส่วน พบว่าตำรับที่ 3 ของส่วนต่าง ๆ เป็นตำรับที่ดีที่สุด เนื่องจากเนื้อโลชั่นไม่มีการแยกชั้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ค่า pH และค่าความหนืดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยตำรับที่ 2, 4 และ 5 ของส่วนยอด และตำรับที่ 1, 2, 4 และ 5 จากส่วนใบอ่อน และจากส่วนผสมทั้งสามส่วน มีค่า pH แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงใน Table 5 และตำรับที่ 1 จากส่วนผสมทั้งสามส่วน และตำรับที่ 2 ของส่วนยอดมีค่าความหนืดแตกต่างกันอย่างมีนัย

สำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงใน Table 6

การทดสอบลักษณะทางกายภาพและเคมีของโลชั่นจากสารสกัดคราม ก่อนและหลังการทดสอบด้วยวิธี Heating and cooling cycle พบว่าสีจากการสังเกตด้วยตาเปล่า ก่อนการทดสอบ ลักษณะสีเป็นสีขาวนวลค่อนข้างไปน้ำตาล หลังการทดสอบทุกตำรับมีสีจางลงเล็กน้อยเป็นสีขาวนวล (Figure 2) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงหลังการทดสอบทั้ง 15 ตำรับ การทดสอบสีด้วย Color chart พบว่ามีสีขาวนวลค่อนข้างไปทางน้ำตาลอ่อน ๆ และไม่มีมีการเปลี่ยนแปลงของสี (Figure 2) การทดสอบค่า pH (Table 5) ด้วย

เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH meter) พบว่า ค่า pH ของสารสกัดโหลชันจากครามตำรับที่ 1, 2, 4 และ 5 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) การทดสอบลักษณะทางกายภาพ ค่าความหนืด (Table 6) โดยการใช้เครื่องวัดความหนืด (brookfield viscometer) ที่ความเร็ว 1 rpm ก่อนและหลังการทดสอบในตำรับที่ 2 ของส่วนยอด พบว่ามีความแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และสารสกัดส่วนผสมทั้งสามส่วนในตำรับที่ 1 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) การทดสอบลักษณะทางกายภาพการแยกชั้นโดยการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ในความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที พบว่าโหลชันทั้ง 15 ตำรับไม่มีการแยกชั้น

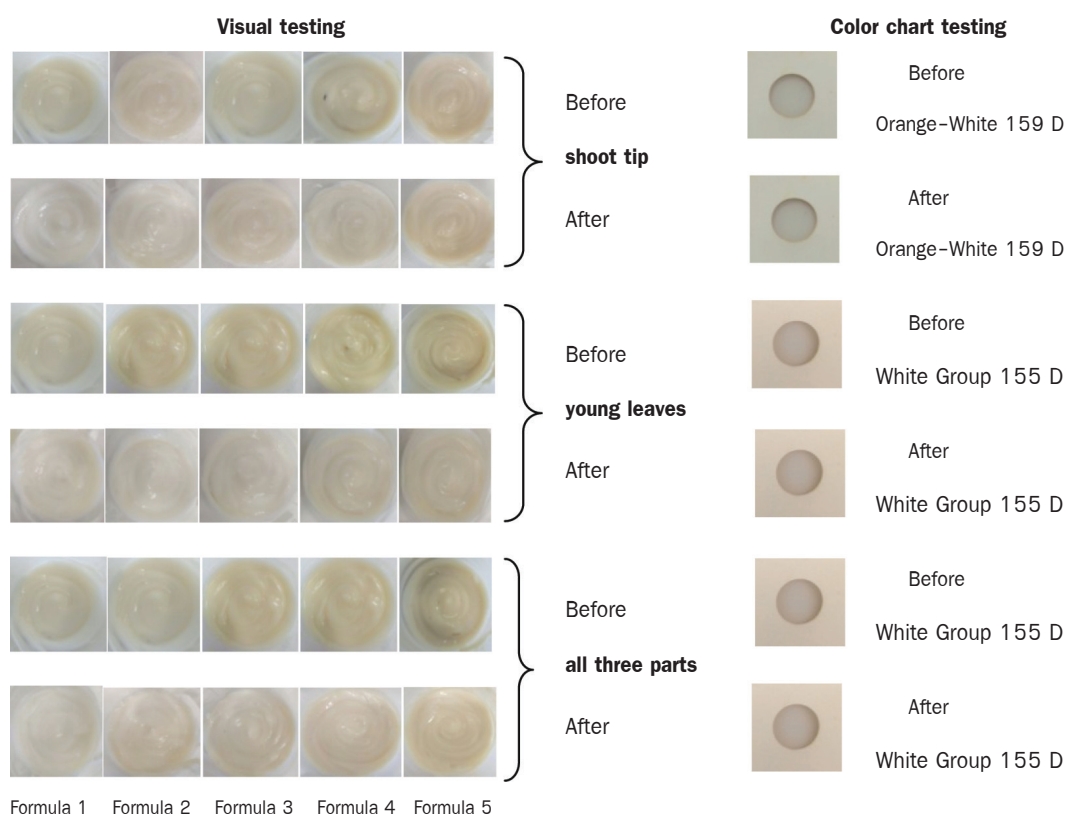


Figure 2 The color of lotion preparations was observed by the naked eye and tested with a Color chart comparing before and after testing 15 formulas.

Table 5 The pH values of lotion preparations were tested by comparing before and after 15 formulas.

Formulations: F	Before	After	Bh – Ah	
	Heating and cooling cycle: Bh (Mean ± S.D.)	Heating and cooling cycle: Ah (Mean ± S.D.)	(Mean ± S.D.)	p-value
Shoot tip				
F1	4.82 ± 0.01	4.77 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.057
F2	5.18 ± 0.01	5.09 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.012*
F3	5.31 ± 0.02	5.20 ± 0.02	0.13 ± 0.06	0.059
F4	4.95 ± 0.02	4.87 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.002*
F5	5.13 ± 0.01	5.05 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.038*
Young leaves				
F1	5.14 ± 0.01	5.04 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.001*
F2	5.21 ± 0.01	5.07 ± 0.05	0.15 ± 0.06	0.047*
F3	5.15 ± 0.03	5.15 ± 0.05	-0.01 ± 0.09	0.952
F4	5.29 ± 0.02	5.17 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.016*
F5	5.17 ± 0.01	5.08 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.012*
All three parts				
F1	5.20 ± 0.01	5.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.001*
F2	5.23 ± 0.01	5.13 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.001*
F3	5.33 ± 0.01	5.28 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.056
F4	5.31 ± 0.04	5.21 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.001*
F5	5.21 ± 0.01	5.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.001*

Note: *Means $p \leq 0.05$. There is a statistically significant difference.

Table 6 The viscosity of lotion preparations was tested by comparing the before and after of 15 formulas.

Formulations: F	Before	After	Bh – Ah	
	Heating and cooling cycle: Bh (cP, Mean ± S.D.)	Heating and cooling cycle: Ah (cP, Mean ± S.D.)	(Mean ± S.D.)	p-value
Shoot tip				
F1	4642 ± 34.12	4459 ± 112.01	183.67 ± 103.01	0.091
F2	4595 ± 35.72	4252 ± 103.12	346.00 ± 134.75	0.047*
F3	4597 ± 21.22	4448 ± 130.06	143.67 ± 104.10	0.139
F4	4597 ± 68.00	4381 ± 100.48	215.67 ± 105.94	0.072
F5	4469 ± 121.13	4222 ± 83.50	247.33 ± 179.26	0.139
Young leaves				
F1	4456 ± 67.41	4504 ± 94.12	-48.33 ± 101.42	0.496
F2	4254 ± 110.94	4287 ± 110.95	-60.67 ± 82.92	0.333
F3	4341 ± 119.53	4249 ± 106.79	92.33 ± 69.15	0.147
F4	4443 ± 82.40	4372 ± 105.62	71.00 ± 75.32	0.244
F5	4477 ± 148.46	4351 ± 94.97	124.33 ± 105.12	0.177
All three parts				
F1	4514 ± 86.28	4384 ± 130.31	130.00 ± 48.88	0.044*
F2	4391 ± 167.21	4240 ± 147.05	151.33 ± 136.54	0.195
F3	4561 ± 139.39	4347 ± 66.95	68.33 ± 276.87	0.711
F4	4172 ± 178.22	4056 ± 109.20	94.00 ± 174.85	0.450
F5	4605 ± 65.18	4592 ± 46.23	13.00 ± 165.64	0.904

Note: *Means $p \leq 0.05$. There is a statistically significant difference.

6.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของโลชันตำรับที่ 3

จากผลการทดสอบสูตรตำรับทั้ง 15 ตำรับ พบว่า สูตรตำรับที่ 3 ของสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของครามเป็นตำรับที่ดีที่สุด เนื่องจากเนื้อโลชันไม่มีการแยกชั้น ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี (Figure 2) ค่า pH (Table 5) และค่าความหนืด (Table 6) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ประกอบกับการเลือกผลการศึกษาจากส่วนของครามที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีที่สุดในด้านนั้น ๆ ของสูตรตำรับที่ 3 มาทดสอบ ดังนั้นจึงนำเฉพาะโลชันตำรับที่ 3 ที่มีส่วนผสมสารสกัดส่วนยอดมาทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นำโลชันที่มีสารสกัดส่วนใบอ่อนมาทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และนำโลชันที่มีส่วนผสมทั้งสามส่วน มาทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ดังนี้

6.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโลชันตำรับที่ 3 ที่มีส่วนผสมสารสกัดส่วนยอดของคราม มีค่า IC_{50} เท่ากับ 42.23 ± 0.02 mg/mL

6.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของโลชันตำรับที่ 3 ที่มีส่วนผสมสารสกัดส่วนใบอ่อนของคราม พบว่าที่ความเข้มข้น 50 mg/mL มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมเท่ากับ 2.61 ± 0.01 mg GAE/g lotion

6.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของโลชันตำรับที่ 3 ที่มีส่วนผสมสารสกัดส่วนผสมทั้งสามส่วน พบว่าที่ความเข้มข้น 50 mg/mL มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 6.29 ± 0.01 mg OE/g lotion

อภิปรายผล

จากผลการทดสอบ จะเห็นได้ว่า สารสกัดส่วนยอดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด ส่วนสารสกัดจากใบอ่อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด และสารสกัดส่วนผสมทั้งสามส่วนในอัตราส่วน 1:1:1 มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ของสารสกัดจากครามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ongaj (2015)^[15] ที่พบว่าเมื่อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่สูง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระก็จะสูงตามด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารมาตรฐานที่ใช้ ชนิดอายุ ส่วนที่ใช้ แหล่งที่มา วิธีการสกัด และวิธีการวิเคราะห์ของตัวอย่าง

จากงานวิจัยของ Kim และคณะ (2012)^[16] พบว่าสารสกัดครามสายพันธุ์ *Polygonum tinctorium* Ait. จากส่วนใบแก่โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ทดสอบด้วยวิธี ABTS, FRAP, CUPRAC และ DPPH พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับใบอ่อน เมล็ด และโปรลิปิด ส่วนสารสกัดครามจากเมล็ดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด ในขณะที่งานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดส่วนยอด ด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด สารสกัดส่วนใบอ่อนมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงที่สุด และสารสกัดจากส่วนผสมทั้งสามส่วนมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด ทั้งนี้ความแตกต่างของฤทธิ์ทางชีวภาพในแต่ละงานวิจัยอาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ตามการรายงานของ Josuttis และคณะ (2012)^[17] และถิ่นกำเนิดที่แตกต่างกัน^[18]

จากผลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์

รวมที่ดีที่สุด พบว่า สารสกัดครามส่วนยอด ใบอ่อน และส่วนผสมทั้งสามส่วน มีฤทธิ์ดีที่สุด ตามลำดับ จึงเลือกทั้ง 3 ส่วน (ยอด ใบอ่อน และส่วนผสมทั้งสามส่วน) ดังกล่าวมาพัฒนาเป็นสูตรโลชั่น ส่วนละ 5 ตำรับ รวมเป็น 15 ตำรับ ซึ่งใน 5 ตำรับมีส่วนประกอบเหมือนกัน แตกต่างกันแค่ปริมาณของสารสกัด และสูตรตำรับที่ดีที่สุดของทุกส่วนที่นำมาทดสอบ คือสูตรตำรับที่ 3 ที่มีความเข้มข้นของสารสกัดครามเท่ากับ 0.12 %w/w เนื่องจากผลการทดสอบทางกายภาพ และเคมี ทั้งก่อนและหลังการทดสอบของโลชั่นตำรับที่ 3 มีความคงตัวในทุกหัวข้อการทดสอบ ค่าความเข้มข้นของการเติมสารสกัดอยู่ในช่วงผลของฤทธิ์ทางชีวภาพโดยคำนึงถึงความน่าใช้ของสีโลชั่นด้วย และผลการทดสอบลักษณะความคงตัว สำหรับค่า pH จะเห็นได้ว่าการทดสอบมีค่าอยู่ระหว่าง 5.15 - 5.30 ซึ่งเป็นค่าใกล้เคียงกับ pH ของผิวมากที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thantong และคณะ (2011)^[19] ได้ทำการศึกษา ค่า pH ที่เหมาะสมของผิวหนังเป็นกรดอ่อน มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.50 - 6.50

ผลการพัฒนาโลชั่นทั้ง 15 ตำรับ พบว่า สูตรที่ดีที่สุดจากสารสกัดครามส่วนยอด ใบอ่อน และส่วนผสมทั้งสามส่วน คือ สูตรตำรับที่ 3 เนื่องจากมีความคงตัวในทุกสภาวะที่ทดสอบ ทำให้โลชั่นที่ได้มีคุณสมบัติที่มีศักยภาพสำหรับการนำไปต่อยอดจากการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดมีคุณสมบัติในการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ โรคกระเพาะ และช่วยชะลอวัย^[20] ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระประกอบด้วยวิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี สารประกอบฟีนอลิกรวม และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน^[21] และมีการศึกษาวิจัยคุณสมบัติของสารสกัดคราม พบว่ามีฤทธิ์

ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี^[2] และวิตามินอี^[3] นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องและเป็นประโยชน์ต่อการนำมาพัฒนาเป็นเครื่องสำอางด้วย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่ง Sharma และ Agarwal (2015)^[3] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบด้วยวิธียับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ พบว่าความที่สกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบที่ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.709 mg/mL และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดย Yartchimplee และคณะ (2021)^[22] ได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสารสกัดครามส่วนของใบและเมล็ด พบว่าสาร phytol, stearic acid, oleic acid และ vitamin E จากสารสกัดทั้งสองส่วนสามารถเข้าจับเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก

นอกจากนี้มียางานการทดสอบความเป็นพิษในเซลล์มะเร็งปอด โดยที่เปอร์เซ็นต์ของเซลล์มะเร็งลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดคราม^[3] การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนังมนุษย์พบว่า สารสกัดใบแก่ ใบอ่อน และเมล็ด มีค่า ED_{50} (half maximal effective dose) เป็น 1.14×10^3 , 1.55×10^3 และ $4.26 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ^[6] ทำให้สารสกัดครามมีความปลอดภัย ประกอบกับฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่มีอยู่ในสารสกัดคราม ดังนั้นครามนอกจากจะนำมาใช้ในการย้อมผ้าคราม^[7] แล้ว ยังมีศักยภาพในการต่อยอดนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้อีกด้วย^[8] ซึ่งในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้นำสารสกัดครามมาพัฒนาเป็นตำรับโลชั่นโดยการสกัดครามด้วยตัวทำละลายเมทานอล สืบเนื่องมาจากงานวิจัยของ Sharma และ Agarwal (2015)^[3]

การสกัดความด้วยเมทานอลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า ascorbic acid ผู้วิจัยจึงใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายในงานวิจัยนี้ และทำการระเหยสารละลายออกให้หมดด้วยการพริชตราย และในงานวิจัยต่อไปอาจทำการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง การปกป้องแสงแดด การหาสารสำคัญชนิดอื่นจากสารสกัดความเพิ่มเติมด้วยตัวทำละลายหลายชนิด และอาจทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในทางยา เช่น ลดการอักเสบ ซึ่งเป็นการเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภคได้ ใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมสมุนไพรธรรมชาติ และเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรในเชิงพาณิชย์ต่อไป

ข้อสรุป

ผลการศึกษาสารสกัดของความจากส่วนของยอด ใบอ่อน ใบแก่ และส่วนผสมทั้งสามส่วน ด้วยตัวทำละลายเมทานอล พบว่าในสารสกัดส่วนผสมทั้งสามส่วน ได้ร้อยละผลผลิตที่ดีที่สุด เท่ากับ 5.57 g หรือ 11.14 %w/w การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รายงานเป็นค่า IC_{50} พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด คือ สารสกัดส่วนยอด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.12 ± 0.01 mg/mL นอกจากนี้การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม พบว่าสารสกัดความที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุด คือ สารสกัดส่วนใบอ่อน มีค่าเท่ากับ 114.93 ± 11.44 mg GAE/g extract และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม พบว่าในสารสกัดส่วนผสมทั้งสามส่วน มีค่ามากที่สุด เท่ากับ 763.00 ± 42.26 mg OE/g extract และการตั้งตำรับโลชั่นพบว่า ตำรับที่ 3 ของสารสกัดส่วนต่างๆ ของความมีลักษณะความคงตัวที่ดี โดยโลชั่นที่มีส่วนผสมสารสกัดส่วนยอด พบว่าฤทธิ์

ต้านอนุมูลอิสระ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 42.23 ± 0.02 mg/mL โลชั่นที่มีส่วนผสมสารสกัดส่วนใบอ่อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 2.61 ± 0.01 mg GAE/g lotion และโลชั่นจากส่วนผสมทั้งสามส่วน มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 6.29 ± 0.06 mg OE/g lotion จากผลการทดสอบทางกายภาพและทางเคมีของโลชั่นจากสารสกัดส่วนยอด ใบอ่อน และส่วนผสมทั้งสามส่วน พบว่าตำรับที่ 3 เป็นตำรับที่ดีที่สุด เนื่องจากเนื้อโลชั่นมีสีขาวนวล ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีหลังการทดสอบ ไม่มีการแยกชั้น มีค่า pH และความหนืดที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากสารสกัดส่วนยอด ใบอ่อน และส่วนผสมทั้งสามส่วน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุด ตามลำดับ และนำมาตั้งตำรับเป็นโลชั่นที่มีส่วนผสมจากสารสกัดความ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้กับผู้บริโภคได้ใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมสมุนไพรธรรมชาติต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบ คุณ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำการวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณ ดร.วาสนา แผลติตะ อาจารย์ประจำสาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนครที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการคัดแยกสายพันธุ์ของความ

References

1. Tem Smitinand. Thai Plant Names. Forest Botany Division, Forest Academic Office, Royal Forest Department. 2nd ed. (revised edition). Bangkok: Prachachon Company Limited; 2001.
2. Renukadevi KP, Sultana SS. Determination of Antibacterial, Antioxidant and Cytotoxicity Effect of *Indigofera tinctoria* on Lung Cell Line NCI-h69. International Journal of Pharmacology. 2011;7(3):356-62.
3. Sharma R, Agarwal A. Physicochemical and Antioxidant Assays of Methanol and Hydromethanol Extract of Ariel Parts of *Indigofera tinctoria* Linn. International Journal of Cancer Research. 2015;4(3):71-80.
4. Joy PP, Thomas J, Mathew S, Skaria BP. Medical Plants. Medical Plant Research Station. 1998:73-4.
5. Stepp JR. The role of weeds as source of pharmaceuticals. Journal of ethnopharmacology. 2004;92:163-6.
6. Poonkasem Y, Damrianant S, Sakkayawong N. Antioxidant Activities and Cytotoxicity Screening of the Extracts from Indigo (*Indigofera tinctoria*). Thai Journal of Science and Technology. 2021;10(5):571-86. (in Thai)
7. Saithong A. The pattern creation and the dyeing process of Indigo fabric of Phu Tai people in Thailand, Laos and Vietnam. Final report (Thai), Sakon Nakhon: Sakon Nakhon Rajabhat University; 2017.
8. Poonkasem Y. Preparation of cosmetic product prototype from *Indigofera tinctoria* L. extracts and powdered indigo. Master of Science (Thai), Bangkok: Thammasat University; 2021.
9. Loipiman P, Phasakul T, Mongkoltai R. Comparison with antioxidants and total Phenolic compound of peel fruit. Journal of Science. 2011;42(2):233-6. (in Thai)
10. Prommuak C, D-Eknamkul W, Shotipruk A. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extract. Separation and Purification Technology. 2008;62:444-8. (in Thai)
11. Buabang R, Thongbunjo K, Inchaithep S. Stroke Risk Assessment Using Color Chart in Patients with Diabetes Mellitus and Hypertension, Ngao District Hospital, Lampang Province. Journal of Boromarajonani College of Nursing, Surin. 2024;14(1):144-59.
12. Webster D. pH-principles and measurement. Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. 2003:4501-07.
13. Jaitham A. Optimization of formulation for enhancing stability of silicone emulsion containing karanda fruit extract. Master of Science (Thai), Bangkok: Srinakharinwirot University; 2022.
14. Berna E, Rosmala D, Muhammad H. Antioxidant Cream of *Solanum lycopersicum* L. International Journal of Pharm Tech Research. 2013;5(1):233-8.
15. Ongaj C. Antioxidant properties of local vegetables in Phra Nakhon Si Ayutthaya Province. Journal of Agriculture. 2015;46(3):321-4. (in Thai)
16. Kim KS, Hwang WG, Jang HG, Heo BG, Suhaj M, Leontowicz H, Leontowicz M, Jastrzebski Z, Tashma Z, Gorinstein S. Assessment of Indigo (*Polygonum tinctorium* Ait.) water extracts' bioactive compounds and their antioxidant and antiproliferative activities. Journal of Food Science and Technology. 2012;46(2):500-10.
17. Josuttis M, Carlen C, Crespo P, Nestby R, Toldam-Andersen TB, Dietrich H, Kryger E. A comparison of bioactive compounds of Strawberry fruit from Europe affected by genotype and latitude. Journal of Berry Research. 2012;2(2):73-95.
18. Prathanturak S. Encyclopedia of Herbs, Volume 1. Bangkok: Sirirukachart Herb Garden, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University. 2000.
19. Thantong S, Malaluk P, Limsuk N. Development of skin care products from Tamarind. Final report (Thai), Phetchabun: Phetchabun Rajabhat University; 2011.
20. Pandey KB, Rizvi SI. Plant Polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. International Journal oxidative medicine and cellular. 2009;2(5):270-78.
21. Moeykhang N. Finding the quantity Phenolic compounds and antioxidant activity juice drink. Final report (Thai), Khon Kaen: Khon Kaen University; 2014.
22. Yartchimplee A, Khumphaiand P, Sakkayawong N, Sompark C. Antioxidant activities of the indigo extracts and prediction of tyrosinase inhibition by molecular docking. Thai Journal of Science and Technology. 2021;10(4):469-86.