

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผลลำหิ่ง (*Dillenia parviflora* Griff.)

นรินทร์ กาทะมูม แสงสิทธิ์ กฤษฏี วรรณิ พรหมด้าว กิตติศักดิ์ แคล้วจันทร์สุข ปภาวี สุขดี
สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

Received: June 16, 2024

Revised: August 21, 2024

Accepted: August 28, 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผลลำหิ่ง *Dillenia parviflora* Griff. (Dp) โดยการตรวจวิเคราะห์ต่างๆ ดังนี้ การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging Assay ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทส, เอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมโครฟาจ (RAW 264.7) ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (LPS) และการทดสอบประสิทธิภาพของการสมานแผลในเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (HaCaT cell) ผลการวิจัยพบว่า ปริมาณเฉลี่ยของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่าง Dp มีค่าเท่ากับ 28.14 ± 0.97 มิลลิกรัมเทียบเท่ากรดแกลลิกต่อกรัมของตัวอย่าง (mg GAE/g) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าวิตามินซีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.019$) ความเข้มข้นของ Dp ที่ 1 มก./มล. มีฤทธิ์ต้านการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงแมโครฟาจ (RAW 264.7) น้อยกว่ายาต้านการอักเสบไตรแอมซิโนโลนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p=0.003$) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส $IC_{50} > 1,000$ (mg/ml) น้อยกว่าวิตามินซี มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ elastase น้อยกว่า EGCG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.016$) แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ทั้งนี้ ความเข้มข้นของ Dp ที่ 1 มก./มล. สามารถกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังของมนุษย์เคลื่อนเข้าหากันเร็วกว่ากลุ่มควบคุม แต่ช้ากว่าวิตามินซี 1 มก./มล. ($p=0.049$) การศึกษาในอนาคตควรศึกษาสารสำคัญในการออกฤทธิ์ การศึกษาทางคลินิก เพื่อให้เกิดประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นนวัตกรรมจากสมุนไพร

คำสำคัญ: ลำหิ่ง; การต้านอนุมูลอิสระ; การต้านการอักเสบ; การหายของแผล

ผู้สนับสนุนประสานงาน:

นรินทร์ กาทะมูม

สาขาการแพทย์แผนไทยประยุกต์ วิทยาลัยสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา
111/1-3 ถนนพระราม 2 หมู่ 7 ตำบลบางแก้ว อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม 75000
อีเมล: narin.ka@ssur.ac.th

Antioxidant and biological activity of *Dillenia parviflora* Griff. fruits

Narin Kakatum, Saengsit Kritsadee, Wannee Promdao, Kittisak Klaew Chansuk, Paphawee Sukdee

Department of Applied Thai Traditional Medicine, College of Allied Health Sciences,
Suan Sunandha Rajabhat University

Abstract

This study aimed to evaluate the antioxidant and biological activities of *Dillenia parviflora* Griff. (Dp) extract through various analyses, including the determination of total phenolic content, DPPH radical scavenging assay for antioxidant activity, and inhibition of elastase, tyrosinase, and hyaluronidase enzymes. The study also assessed the inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophage (RAW 264.7) cells and evaluated the wound healing efficacy in human keratinocyte (HaCaT) cells. The results showed that the average total phenolic content in Dp was 28.14 ± 0.97 mg GAE/g. The antioxidant activity of Dp was significantly lower compared to vitamin C ($p=0.019$). A concentration of 1 mg/mL of Dp demonstrated anti-inflammatory effects in RAW 264.7 cells, which were significantly less potent than those of triamcinolone acetonide ($p=0.003$). The inhibitory effect of Dp on tyrosinase was characterized by an $IC_{50} > 1,000$ mg/mL, which was less effective than vitamin C. Dp also showed slight inhibition of elastase activity, but this effect was significantly weaker than that of EGCG ($p=0.016$). However, Dp did not inhibit hyaluronidase activity. The wound healing assay indicated that 1 mg/mL Dp could stimulate human skin cell migration faster than the control but slower than vitamin C ($p=0.049$). Future studies should focus on identifying the active compounds responsible for these effects and conducting clinical trials to explore potential applications in herbal innovations.

Keywords: *Dillenia parviflora*; antioxidant activity; anti-inflammatory; wound healing

Corresponding Author:

Narin Kakatum

Department of Applied Thai Traditional Medicine, College of Allied Health Sciences,
Suan Sunandha Rajabhat University

111/1-3 Rama 2 Road, Village No.7, Bangkaew Sub-district, Meuang District, Samutsongkhram 75000, Thailand
E-mail: narin.ka@ssru.ac.th

บทนำ

ส้านหึ่ง *Dillenia parviflora* Griff. จัดอยู่ในวงศ์ Dilleniaceae ประกอบด้วยพืช 100 สายพันธุ์ที่กระจายอยู่ในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน¹ ส้านหึ่ง หลายสายพันธุ์ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น มะเร็งบาดแผล และโรคเบาหวาน² การศึกษาทางพฤกษเคมีได้ระบุว่าพบ ฟลาโวนอยด์, ไตรเทอร์พีนอยด์ และสารประกอบอื่นๆ โดยบางชนิดแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติต้านจุลชีพ ด้านการอักเสบ และเป็นพิษต่อเซลล์³ แม้จะมีการใช้งานแบบดั้งเดิมและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีแนวโน้มของสารบางสายพันธุ์ แต่ก็จำเป็นต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อสำรวจศักยภาพในการรักษาอย่างเต็มที่และการศึกษาทางคลินิกในอาสาสมัคร

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพของส้านหึ่ง สายพันธุ์ *D. suffruticosa* มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ โดยสารสกัดจากเมทานอลแสดงฤทธิ์สูงสุด^{4,5}

เปลือกลำต้นของ *D. serrata* แสดงฤทธิ์ยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระและแซนทีนออกซิเดส โดยสารสกัดชั้นเมทานอลฤทธิ์การยับยั้งสูงสุด⁶ ส่วนใบ *D. suffruticosa* มีอัลคาลอยด์, สเตียรอยด์, ฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์ และซาโปนิน สารสกัดชั้นไดเอทิลอีเธอร์และเอทิลอะซิเตท มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดรวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้ยังแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก⁷ การค้นพบเหล่านี้เน้นย้ำถึงศักยภาพของสายพันธุ์ส้านหึ่งในฐานะแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำหรับการใช้งานทางเภสัชกรรม

เพื่อให้มั่นใจในประสิทธิภาพของสารสกัดผลส้านหึ่งและเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องสำอาง เวชภัณฑ์หรือยาในอนาคต จึงได้ทำการทดลองฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผลส้านหึ่ง *Dillenia parviflora* Griff. (Dp) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

2. เพื่อการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดผลส้านหึ่ง *Dillenia parviflora* Griff. (Dp)

3. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทส, เอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ของสารสกัดผลส้านหึ่ง *Dillenia parviflora* Griff. (Dp)

4. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแมโครฟาจ (RAW 264.7) ที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ (LPS) ของสารสกัดผลส้านหึ่ง *Dillenia parviflora* Griff. (Dp) เปรียบเทียบกับยาไตรแอมซิโนโลน

5. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการสมานแผลในเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (HaCaT cell) ของสารสกัดผลส้านหึ่ง *Dillenia parviflora* Griff. (Dp) เปรียบเทียบกับวิตามินซี

วิธีการศึกษา

นำผลแก่ของส้านหึ่ง หั่นครึ่ง อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำมาบดหยาบแช่ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 3 วัน นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง rotary evaporater เก็บสารสกัดที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การหาปริมาณฟีนอลทั้งหมด

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ⁸

เตรียมตัวอย่าง Dp ปริมาณ 10 มก. ปริมาณ 10 มล. ละลายในเอทานอลเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.1 มก./มล. ละลายกรดแกลลิกใน DMSO เพื่อให้ได้ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.00012, 0.00024, 0.00049, 0.00098, 0.00195 และ 0.00391 มก./มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร จากนั้นสร้างสมการการถดถอยเชิงเส้นของกรดแกลลิกและคำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเป็นมิลลิกรัมของกรดแกลลิกที่เทียบเท่าต่อกรัมของตัวอย่าง (mg GAE/g) โดยอิงจากสมการการถดถอยเชิงเส้น

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ของ Dp ที่ 50%

การเตรียมตัวอย่างทดสอบ^{9,10}

ละลาย Dp ปริมาณ 10 มก. ปริมาณ 1 มล. ในเอทานอล 99.8% ส่วนวิตามินซีละลายในน้ำกลั่น จากนั้นจึงเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 มก./มล. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธีกำจัดอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในไมโครเพลท จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ 50% (SC_{50})

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ Dp ที่ 50%

วิธีการเตรียมและทดสอบตัวอย่าง¹¹

ละลาย Dp ปริมาณ 10 มก. ใน DMSO 10% ในปริมาณ 1 มล. ส่วนกรดโคจิกถูกละลายในน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 มก./มล. นำสารละลายเหล่านี้มาทดสอบการยับยั้งต่อเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้วิธีดีปาคิโรมในไมโครเพลท ต่อจากนั้นคำนวณความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ที่ 50% (IC_{50})

การทดสอบผลการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทสของ Dp ที่ 50%

วิธีการเตรียมตัวอย่างและการทดสอบ¹²

ละลาย Dp ปริมาณ 10 มก. ใน 10% DMSO ปริมาณ 1 มล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.0075, 0.075, 0.75, 7.5 และ 75 มก./มล. (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 มก./มล.) และละลายสารประกอบมาตรฐาน epigallocatechin gallate (EGCG) ในบัฟเฟอร์ Tris-HCl เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.00075, 0.0075, 0.075, 0.75 และ 7.5 มก./มล. (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 1 มก./มล.) จากนั้นนำสารละลายเหล่านี้มาทดสอบผลการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทสในไมโครเพลท

โดยการวัดปริมาณของ p-nitroanilide ที่ถูกไฮโดรไลซ์จากซับสเตรต N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide ด้วยเอนไซม์อีลาสเทสและใช้ EGCG เป็นสารประกอบมาตรฐานที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทส ค่าการดูดกลืนแสงวัดที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเทส ที่ 50% (IC_{50})

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่ 50% วิธีการเตรียมและทดสอบตัวอย่าง¹³

ละลาย Dp ปริมาณ 10 มก. ใน 10% DMSO ปริมาณ 1 มล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.008, 0.08, 0.8, 8 และ 80 มก./มล. (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 มก./มล.) และละลายไดโซเดียมโครโมโกลูเคต (DSCG) ในน้ำกลั่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.0008, 0.008, 0.08, 0.8 และ 8 มก./มล. (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 1 มก./มล.) จากนั้นบ่มตัวอย่างเหล่านี้ด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและสารละลายกรดไฮยาลูโรนิก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร และคำนวณความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่ 50% (IC_{50})

การทดสอบผลด้านการอักเสบของ Dp เปรียบเทียบกับยาไทรแอมซิโนโลนในเซลล์เพาะเลี้ยงแมโครฟาจ (RAW 264.7)

วิธีการเตรียมและทดสอบตัวอย่าง¹⁴

ละลาย Dp และยาต้านการอักเสบไทรแอมซิโนโลน ปริมาณ 10 มก. ใน 10% DMSO ปริมาณ 1 มล. ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM จากนั้นจึงฆ่าเชื้อสารละลายโดยการกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน สารละลายจะถูกเจือจางเพิ่มเติมจนได้ความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 มก./มล. จากนั้นสารละลายตัวอย่างจะถูกนำมาใช้เพื่อทดสอบการยับยั้งการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์ที่เกิดจาก LPS ตามที่

อธิบายโดย Torres-Rodríguez และคณะ, 2016¹⁸ การหาปริมาณไนตริกออกไซด์ดำเนินการโดยใช้รีเอเจนต์ Griess และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไนตริก ส่วนการผลิตออกไซด์คำนวณโดยการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การทดสอบประสิทธิภาพของการสมานแผลของ Dp เปรียบเทียบกับวิตามินซี ในเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (HaCaT cell)¹⁵

ละลาย Dp ปริมาณ 10 มก. ใน 10% DMSO ปริมาณ 10 มล. ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEN (ความเข้มข้น 1 มก./มล.) จากนั้นกรองสารละลายผ่านเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ตัวอย่างที่เตรียมไว้จะไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อและเชื้อจุลินทรีย์ตามความเข้มข้นที่ต้องการโดยใช้ 10% DMSO ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEN ใช้สารละลายนี้เพื่อประเมินความเป็นพิษของเซลล์โดยใช้วิธีการย้อมสีซัลฟอรัสอดามิน บี (SRB) เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์คำนวณโดยการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเลือกความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษที่เหมาะสมที่สุดมาทดสอบการสมานแผล โดยวิเคราะห์ระยะห่างของช่องว่างที่เกิดขึ้นหลังการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ตอบสนองต่อตัวอย่างที่ทดสอบ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและ

กลุ่มที่ได้รับวิตามินซีซึ่งเป็นสารมาตรฐาน โดยตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ในระยะเวลา

สถิติและการวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้ซอฟต์แวร์สถิติโปรแกรม SPSS 22.0 (version 22.0, SPSS Inc., USA) คำนวณผลแสดงเป็นค่า mean±standard deviation ($\bar{X} \pm SD$) สำหรับการเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดลองระหว่างกลุ่มใช้ independent-samples *t*-test ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ผลการศึกษา

การหาปริมาณฟีนอลทั้งหมด

จากผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกราฟกรดแกลลิกมาตรฐาน ดังรูปที่ 1 (Figure 1) ที่มีสมการการถดถอยเชิงเส้นระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Y) และความเข้มข้นของกรดแกลลิก (X) คือ $Y = 77.442x + 0.0017$ และมีค่า r^2 เท่ากับ 0.9998 ปริมาณฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 28.14 ± 0.97 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกเทียบเท่ากับต่อกรัมของตัวอย่าง (mg GAE/g) ดังแสดงในตารางที่ 1 (Table 1)

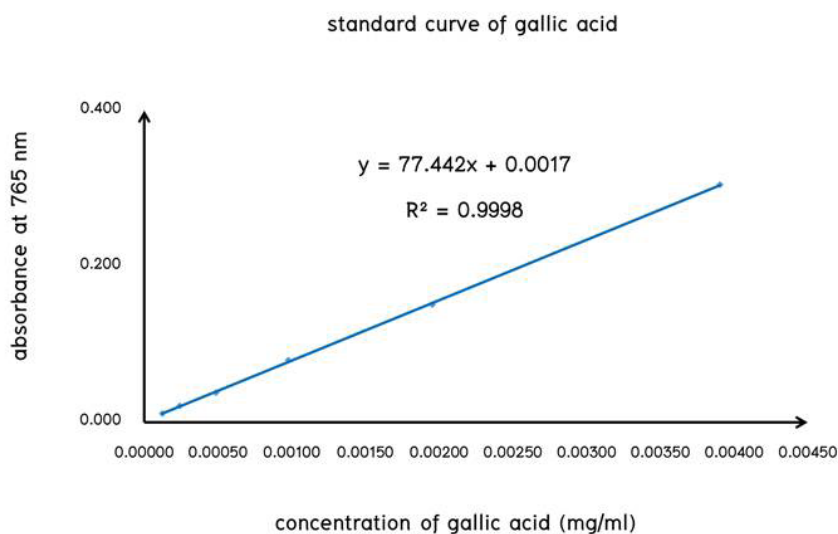


Figure 1 Linear regression of Gallic acid

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรสำหรับตัวอย่าง Dp (การวัดครั้งแรก) ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.224 คำนวณสมการการถดถอยเชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิกกับการดูดกลืนแสง $Y = 77.442x + 0.0017$ จึงสามารถหาปริมาณของกรดแกลลิกในตัวอย่างได้ เมื่อคำนวณ

จากสมการการถดถอยเชิงเส้น ปริมาณกรดแกลลิก คือ $(0.224 - 0.0017) \times 77.442 = 0.002870$ มก./มล. เมื่อคำนวณเพิ่มเติมสำหรับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจะเท่ากับ 28.70 มก. ของกรดแกลลิกเทียบเท่าต่อกรัมของตัวอย่าง (mg GEA/g)

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ของ Dp เปรียบเทียบกับวิตามินซี ที่ 50%

Table 1 Free radical scavenging activity of of Dp compare vitamin c

Sample	The concentration inhibits 50% of free radical scavenging activity (SC_{50} , mg/ml)	p-value
Dp	0.05±0.00	0.019
Vitamin c	0.01±0.00	-

Note: Dp is the extract of *Dillenia parviflora* Griff fruit. Values are presented as the mean±SD from three independent experiments.

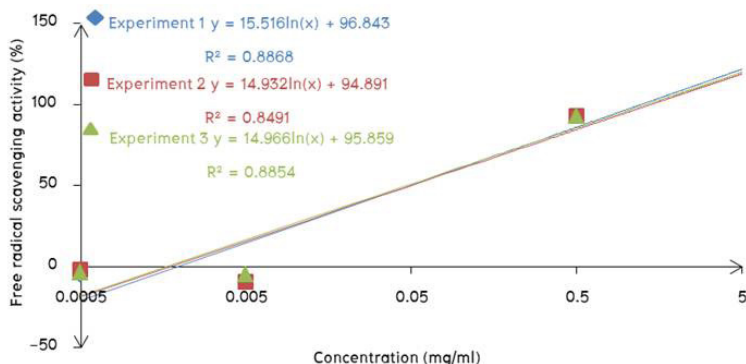


Figure 2 Percentage of free radical scavenging activity of Dp

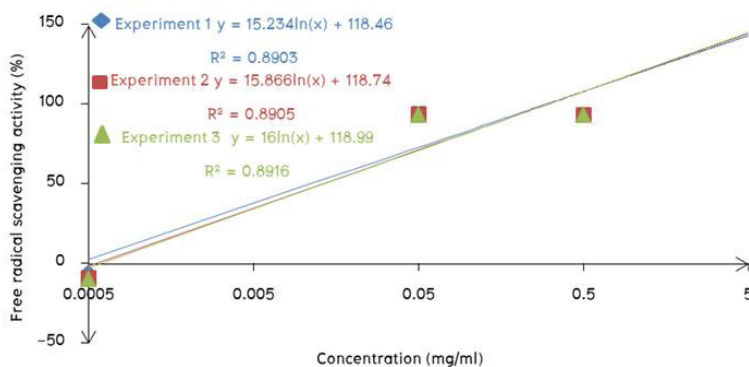


Figure 3 Percentage of free radical scavenging activity of vitamin c

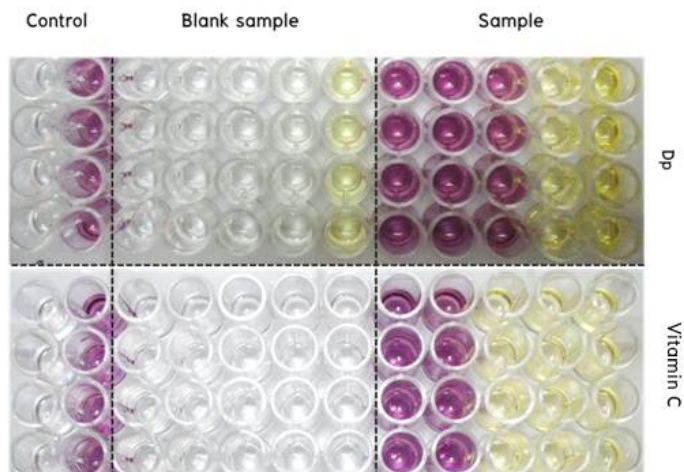


Figure 4 Free radical scavenging activity of Dp and vitamin c in microwell plates

ผลการทดสอบ

Dp มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าวิตามินซี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ค่า p เท่ากับ 0.019

ผลการยับยั้งของ Dp เปรียบเทียบกับกรดโกจิกต่อการทดสอบเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ 50%

Table 2 The results tyrosinase enzyme Inhibition

Sample	The concentration inhibits 50% of tyrosinase enzyme activity (IC ₅₀ , mg/mL) (mean±SD)
Dp	>1,000
Kojic acid	0.005±0.00

Note: Dp is the extract of *Dillenia parviflora* Griff fruit. Values are presented as the mean±SD from three independent experiments.

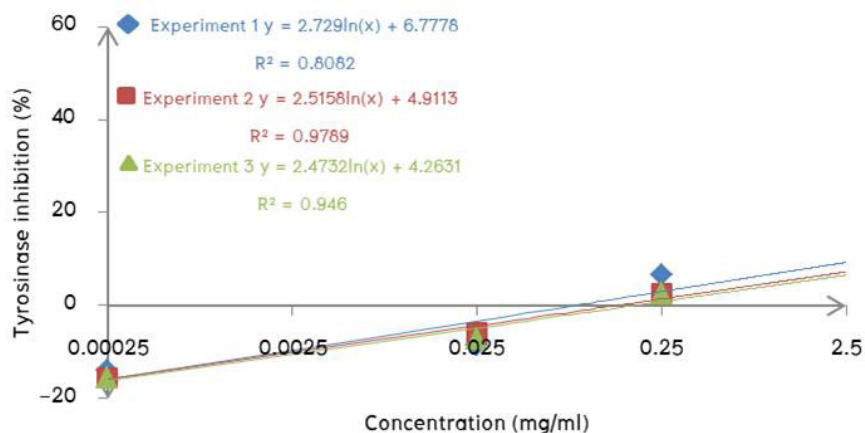


Figure 5 Percentage of tyrosinase Inhibition of Dp

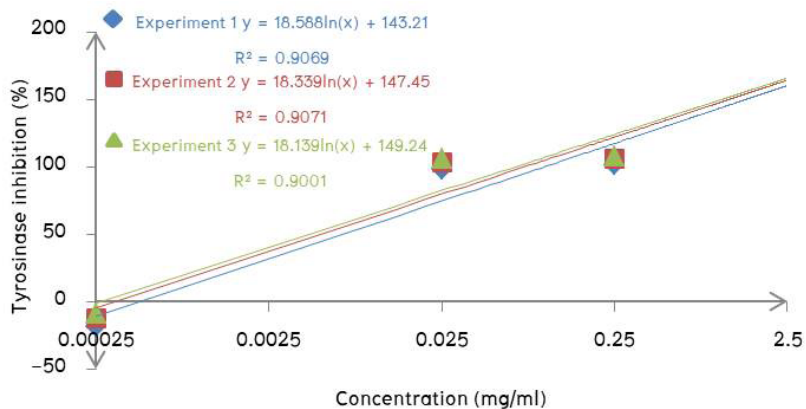


Figure 6 Percentage of tyrosinase Inhibition of kojic acid

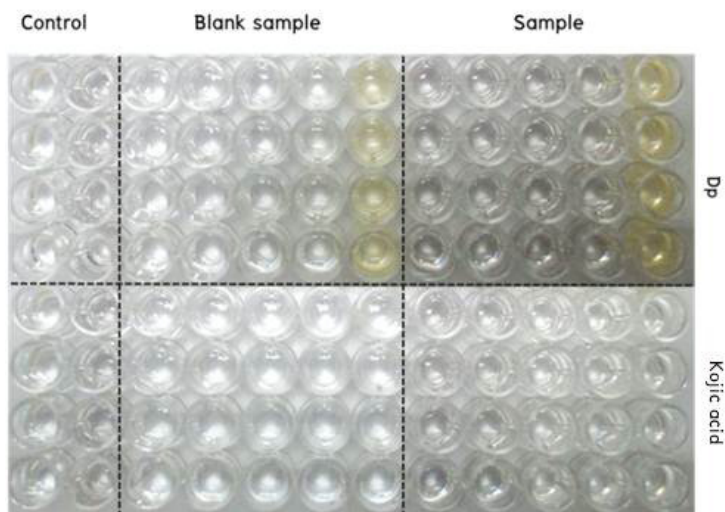


Figure 7 The Inhibition of tyrosinase enzyme of Dp and kojic acid

ผลการทดสอบ

Dp มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส $IC_{50} > 1,000$ (mg/ml) น้อยกว่าวิตามินซี

การทดสอบผลการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทส ที่ 50%

Table 3 The results elastase enzyme Inhibition

Sample	The concentration inhibits 50% of elastase enzyme activity (IC_{50} , mg/mL) (mean $\pm$ SD)	p-value
Dp	0.16 $\pm$ 0.02	0.016
Epigallocatechin gallate (EGCG)	0.05 $\pm$ 0.01	-

Note: Dp is the extract of *Dillenia parviflora* Griff fruit. Values are presented as the mean $\pm$ SD from three independent experiments.

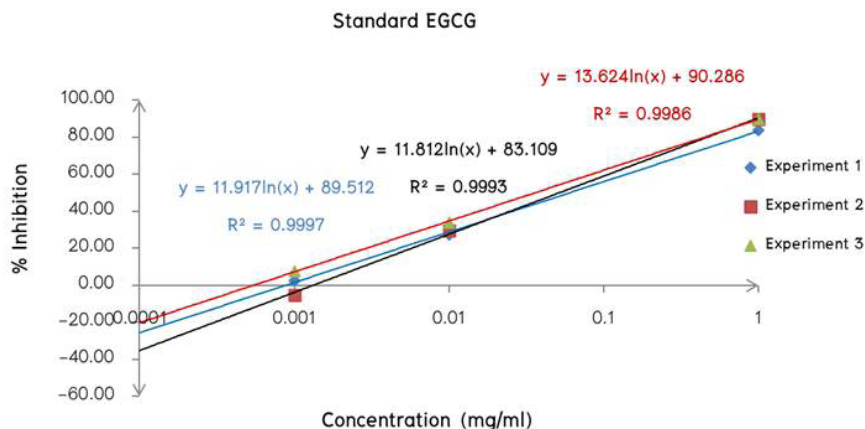


Figure 8 Percentage of Elastase Inhibition and EGCG concentration

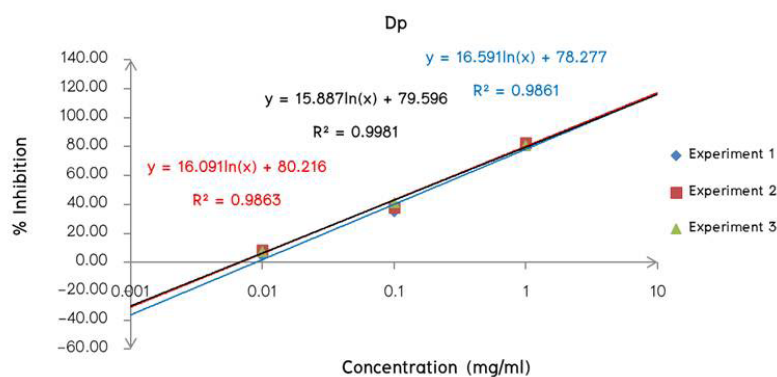


Figure 9 Percentage of Elastase Inhibition and Dp Concentration

ผลการทดสอบ

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทสน้อยกว่า อีพิกัลโลคาเทชินกัลเลต (EGCG) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p=0.016$)

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่ 50%

Table 4 The results hyaluronidase enzyme Inhibition

Sample	The concentration inhibits 50% of hyaluronidase enzyme activity (IC ₅₀ , mg/mL) (mean±SD)
Dp	NA
Disodium cromoglycate (DSCG)	0.024±0.004

Note: Dp is the extract of *Dillenia parviflora* Griff fruit. Values are presented as the mean±SD from three independent experiments. NA is No inhibitory activity observed.

Dp ไม่มีผลยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ในขณะที่ไดโซเดียมโครโมไกลเลต (DSCG) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่มีค่า IC₅₀ 0.024±0.004 มก./มล.

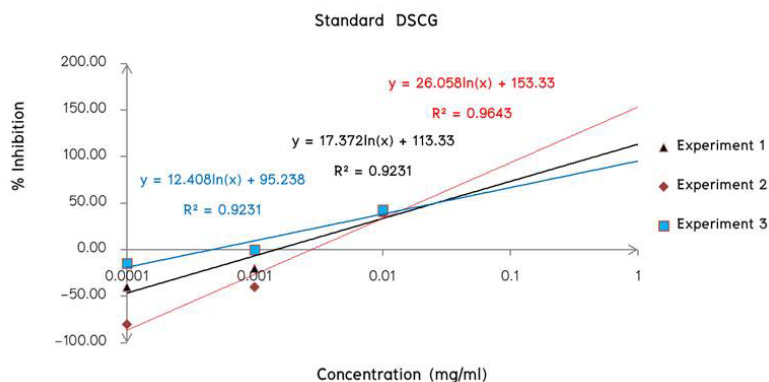


Figure 10 Percentage of hyaluronidase enzyme Inhibition and concentration of Disodium cromoglycate (DSCG)

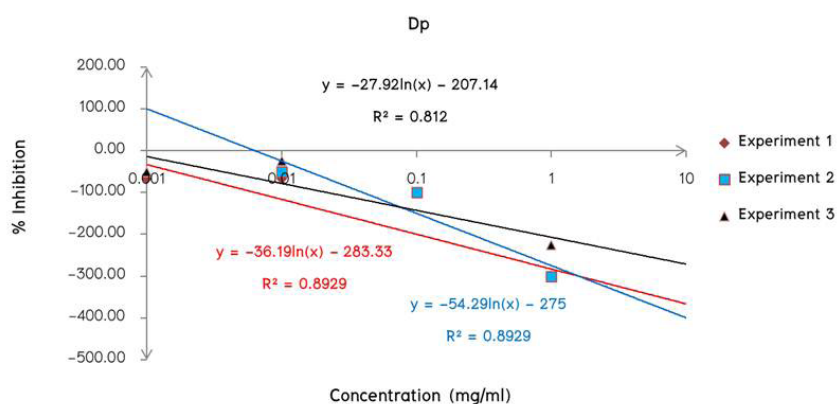


Figure 11 Percentage of hyaluronidase enzyme Inhibition and concentration of Dp

ผลการทดสอบผลด้านการอักเสบของ Dp เปรียบเทียบกับไตรแอมซิโนโลนในเซลล์เพาะเลี้ยงแมโครฟาจ (RAW 264.7)

Table 5 Inhibition of nitric oxide of Dp compare triamcinolone acetoneide

Sample	Percentage of inhibition of nitric oxide (mean±SD)					
	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10
Dp	NA	10.99±2.37	9.89±2.37	9.89±2.37	20.05±3.95	1.37±1.65*
Triamcinolone acetoneide	23.46±2.81	26.54±4.60	27.09±3.46	29.05±5.28	31.56±1.91	NA

Note: Dp is the extract of *Dillenia parviflora* Griff fruit. Values are presented as the mean±SD from three independent experiments. *The color of the sample interferes with the measured absorbance value, NA = Not tested, *p-value indicates statistical significance at the 0.05 level.

ความเข้มข้นของ Dp ที่ 1 มก./มล. มีฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงแมโครฟาจ (RAW 264.7) น้อยกว่า ยาต้านการอักเสบไตรแอมซิโนโลนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p=0.003$)

การทดสอบประสิทธิภาพของการสมานแผลของ Dp เปรียบเทียบกับวิตามินซีในเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (HaCaT cell)

Dp และวิตามินซีไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (HaCaT cell) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.001 ถึง 1 มก./มล. เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ตกอยู่ในช่วง 79.19-86.05% สำหรับ Dp และ 79.13-84.18% สำหรับวิตามินซี ตามลำดับ¹⁵ ดังตารางที่ 6 (Table 6) ดังนั้น จึงเลือก Dp และวิตามินซีที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. เพื่อทดสอบการสมานแผล

Table 6 Percentage of cell viability of Dp compare vitamin C

Sample	Cell viability (mean±SD)				
	0.0001	0.001	0.01	0.1	1
Dp	86.05±2.72	85.52±1.31	85.03±1.13	83.32±3.56	79.19±2.80
Vitamin C	84.18±3.23	82.02±0.90	80.46±1.88	79.82±2.35	79.13±3.54

Note: The values shown are the results of 4 repeated experiments (mean±SD)

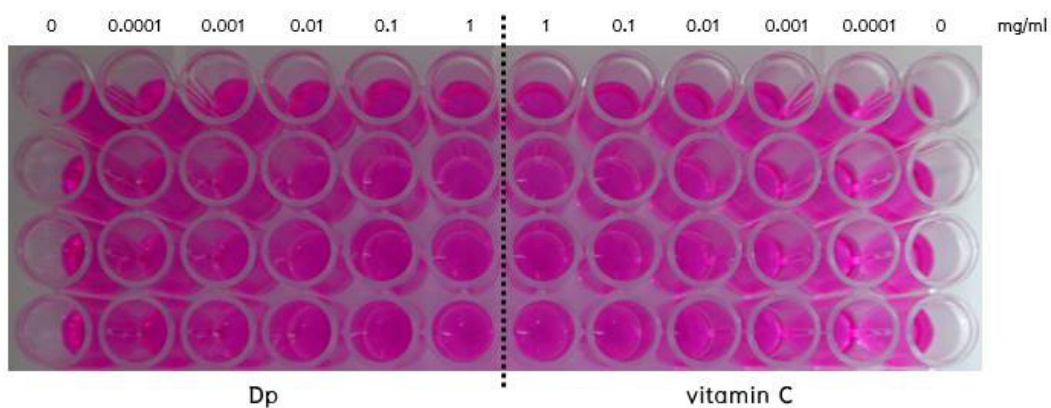


Figure 12 Cytotoxicity assessment of Dp compare vitamin c on human skin cells using sulforhodamine B staining in a microplate

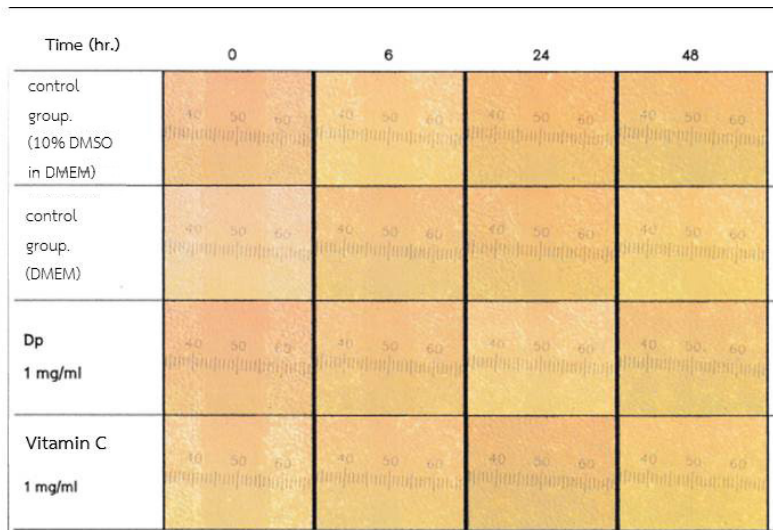


Figure 13 Morphological characteristics of human skin cell migration in the wound area exposed to test samples (40x magnification)

ตารางแสดงถึงคุณลักษณะที่สังเกตได้ของการเคลื่อนไหวของเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ในบริเวณแผลหลังจากสัมผัสกับตัวอย่างทดสอบ Dp ที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. เริ่มการเคลื่อนไหวของเซลล์หลังจาก 24 ชั่วโมง กระตุ้นการเคลื่อนไหวที่ประสานกันโดยมีระยะห่างของช่องว่างลดลงหลังจาก 48 ชั่วโมง วิตามินซีที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. เริ่มการเคลื่อนไหวของเซลล์หลังจาก 6 ชั่วโมง และกระตุ้นการเคลื่อนไหวของเซลล์ที่มีการประสานงานหลังจาก 24 ชั่วโมง กลุ่มควบคุม (10% DMSO ใน DMEM และ DMEM) แสดงการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่จำกัดโดยไม่มีการเชื่อมต่อที่แน่นหนาหลังจาก 48 ชั่วโมง

อภิปรายผล

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกในสารสกัด Dp

ในการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรของสารสกัด *Dillenia parviflora* วัดได้เท่ากับ 0.224 โดยใช้สมการการถดถอยเชิงเส้น $Y=77.442x+0.0017$ ทำให้สามารถคำนวณปริมาณกรดแกลลิกในสารสกัดได้เป็น 0.002870 มก./มล. ซึ่งนำไปสู่การคำนวณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดได้เท่ากับ 28.70 (mg GEA/g) ซึ่งสอดคล้องกับวิธีการที่ใช้ในงาน

ของ Biju J และคณะ⁷ Mongkolsilp S และคณะ⁸ แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณฟีนอลิกโดยใช้รีเอเจนต์ Folin-Ciocalteu ซึ่งให้เห็นว่า *Dillenia parviflora* มีปริมาณฟีนอลิกที่สำคัญ ซึ่งอาจมีบทบาทในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ Dp เปรียบเทียบกับวิตามินซีโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay

Dp มีการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าวิตามินซีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p=0.019$) แสดงว่าสารสกัด Dp มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ แต่ยังมีประสิทธิภาพน้อยกว่าวิตามินซี ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง ผลการวิจัยนี้มีความสำคัญเนื่องจากช่วยเพิ่มความเข้าใจในความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากธรรมชาติเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่แล้ว เช่น วิตามินซี นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นถึงความจำเป็นในการสำรวจเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารประกอบที่มีผลต้านอนุมูลอิสระใน Dp และวิธีที่สารเหล่านี้มีปฏิสัมพันธ์กับอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พอเหมาะเมื่อเปรียบเทียบกับ

วิตามินซีแสดงให้เห็นว่า Dp อาจมีประโยชน์ในฐานะเป็นแหล่งสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ แต่จำเป็นต้องใช้ร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระอื่นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพที่เทียบเท่ากับวิตามินซีในทางการแพทย์ Goh M.P. และคณะ⁴ Yakop F และคณะ⁵

ฤทธิ์ด้านการอักเสบของ Dp เปรียบเทียบกับ ไตรแอมซิโนโลนในเซลล์แมโครฟาจ RAW 264.7

Dp ที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. มีฤทธิ์ด้านการอักเสบในเซลล์เพาะเลี้ยงแมโครฟาจ (RAW 264.7) น้อยกว่ายาต้านการอักเสบไตรแอมซิโนโลนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.005 ($p=0.003$) สิ่งนี้บ่งชี้ว่า Dp มีคุณสมบัติด้านการอักเสบอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่า จะไม่มีศักยภาพเท่ากับไตรแอมซิโนโลน การศึกษาแสดงถึงศักยภาพของ Dp ในฐานะสารต้านการอักเสบตามธรรมชาติที่สามารถใช้เป็นทางเลือกหรือการรักษาเสริมในสภาวะการอักเสบ สอดคล้องกับงานของ Torres-Rodríguez M.T. และคณะ¹⁸ อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับไตรแอมซิโนโลนชี้ให้เห็นว่า Dp อาจเหมาะสำหรับการตอบสนองต่อการอักเสบที่ไม่รุนแรงหรือสามารถใช้ร่วมกับสารต้านการอักเสบอื่นๆ เพื่อให้ได้ผลการรักษาที่ต้องการ ควรวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ด้านการอักเสบ และศักยภาพในการใช้ทางคลินิก

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, อีลาสเทส, ไฮยาลูโรนิเดสของส้านหึง Dp ที่ 50%

Dp มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทส น้อยกว่า EGCG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p=0.016$) ชี้ให้เห็นว่า Dp อาจมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เป็นตัวเลือกที่มีศักยภาพสำหรับสูตรผลิตภัณฑ์ดูแลผิวต่อต้านริ้วรอย ซึ่งการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทสมีความสำคัญต่อการป้องกันการย่อยสลายของอีลาสตินในผิวหนัง อย่างไรก็ตาม Dp แสดงการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้น้อย ซึ่งเป็น

เอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์เมลานิน บ่งชี้ว่า ศักยภาพในการใช้งานในการรักษารอยด่างอาจถูกจำกัด สอดคล้องกับงานของ Lee S-H และคณะ¹² โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Dp ไม่ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสซึ่งเกี่ยวข้องกับการสลายกรดไฮยาลูโรนิกซึ่งเป็นโมเลกุลสำคัญในการให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว การขาดการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสแสดงให้เห็นว่า Dp อาจไม่ได้ผลในสูตรที่มีจุดมุ่งหมายเพื่อป้องกันการย่อยสลายของกรดไฮยาลูโรนิก สอดคล้องกับงานของ Kim S.J. และคณะ¹⁴, Sutthiwanjampa C และคณะ¹⁶ และ Insaf A. คณะ¹⁷ การยับยั้งเอนไซม์ที่แตกต่างกันนี้แสดงถึงความจำเพาะของฤทธิ์ทางชีวภาพของ Dp และชี้ให้เห็นว่า แม้ว่าอาจมีประโยชน์ในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทส แต่อาจถูกจำกัดสำหรับการใช้งานที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จำเป็นต้องมีการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อแยกและกำหนดลักษณะของสารออกฤทธิ์ใน Dp ที่มีต่อผลกระทบเหล่านี้

ประสิทธิภาพของการสมานแผลของ Dp เปรียบเทียบกับวิตามินซีในเซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (HaCaT cell)

Dp ที่ความเข้มข้น 1 มก./มล. สามารถกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังของมนุษย์ (HaCaT cell) เคลื่อนเข้าหากันเร็วกว่ากลุ่มควบคุม แต่ช้ากว่าวิตามินซี 1 มก./มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($p=0.049$) แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์การรักษาบาดแผลอย่างมีนัยสำคัญโดยการเร่งการเคลื่อนย้ายของเซลล์ผิวหนังของมนุษย์เข้าหากัน ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในกระบวนการปิดบาดแผล สอดคล้องกับ Muhammad AA. และคณะ¹⁹ แม้ว่าฤทธิ์นี้จะเด่นชัดกว่าในกลุ่มควบคุม แต่ก็ช้ากว่าเมื่อเทียบกับผลที่สังเกตได้จากวิตามินซีที่ความเข้มข้นเท่ากัน วิตามินซีเป็นที่รู้จักกันดีว่ามีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์คอลลาเจนและการย้ายเซลล์ อย่างไรก็ตาม ความสามารถของ Dp ในการส่งเสริมการย้ายของเซลล์ สอดคล้องกับ Vichai V. และคณะ²⁰ แม้ว่าจะมีอัตราที่ช้าลง แต่ก็บ่งชี้ว่ามีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่อาจนำไปสู่การรักษาบาดแผลผ่านกลไกที่อาจเสริมหรือแตกต่าง

จากวิตามินซี คุณสมบัตินี้สามารถนำไปใช้ในสูตรการดูแลบาดแผล ซึ่ง Dp อาจทำหน้าที่เป็นสารสนับสนุนควบคู่ไปกับสารประกอบอื่นๆ ที่มีศักยภาพมากกว่า เช่น วิตามินซี การวิจัยเพิ่มเติมควรมุ่งเน้นไปที่การแยกสารออกฤทธิ์และกลไกการรักษาบาดแผลของเซลล์

สรุปผล

Dp มีคุณสมบัติที่สามารถพัฒนาต่อยอดในทั้งเครื่องสำอาง เวชสำอาง หรือยาที่พัฒนาจากสมุนไพร โดยศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสารสำคัญ วิธีการการสกัดที่เหมาะสม และการพัฒนาในรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม รวมถึงการทดลองทางคลินิกต่อไป

ข้อเสนอแนะและข้อจำกัด

1. ศึกษาสารสำคัญในส่วนต่างๆ ของลำต้นหึ่งเปรียบเทียบกับส่วนผล เพื่อหาส่วนที่เหมาะสม คัดค้าน
2. ควรทดสอบผลการระคายเคืองในอาสาสมัครเพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์
3. ควรศึกษาประสิทธิผลในระดับคลินิกในอาสาสมัครเพิ่มเติม
4. ผลของลำต้นหึ่งที่ใช้ในการทดลอง ออกเพียงปีละครั้ง ช่วงเดือน มกราคม-มีนาคม และข้อมูลการขยายพันธุ์ยังมีน้อย

เอกสารอ้างอิง

1. Sabandar CW, Jalil J, Ahmat N, et al. Medicinal uses, chemistry and pharmacology of *Dillenia* species (Dilleniaceae). *Phytochemistry* 2017;134:6-25. doi:10.1016/j.phytochem.2016.11.010.
2. Lima CC, Lemos RP, Conserva LM. Dilleniaceae family: An overview of its ethnomedicinal uses, 3 biological and phytochemical profile. *J Pharmacogn Phytochem* 2014;3:181-204.
3. Saiful Yazan L, Armania N. *Dillenia* species: A review of the traditional uses, active constituents and pharmacological properties from pre-clinical studies. *Pharm Biol* 2014;52:890-7. doi:10.3109/13880209.2013.872672.
4. Goh MP, Ahmad N, Yasin HM, et al. Antioxidant, antibacterial and cytotoxic activity of the *Dillenia suffruticosa* Leaves against the Lung (A549) and Cervical (CaSki) Cancer Cell Lines. *Nat Prod J* 2022;12:87-94. doi:10.2174/2210315511666210204120431.
5. Yakop F, Sheikh Abdul Hamid MH, Ahmad N, et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of extracts and fractions of *Dillenia suffruticosa* leaves. *MAB* 2020;49:121-30. doi:10.55230/mabjournal.v49i1.1663.
6. Sabandar CW, Jalil J, Ahmat N, et al. Aktivitas Antioksidan dan Penghambatan Xantin Oksidase Kulit Batang Songi (*Dillenia serrata* Thunb.): Antioxidant and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Stem Bark of Songi (*Dillenia serrata* Thunb.). *JFG*;6:151-9. doi:10.22487/j24428744.2020.v6.i1.15008.
7. Biju J, Sulaiman CT, Satheesh G, et al. Total phenolic and flavonoids in selected medical plants from kerala. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014;6:406-8.
8. Mongkolsilp S., Pongbupakit I., Sae-Lee N, et al. Radical scavenging activity and total phenolic content of medicinal plants used in primary health care. *SWU J Pharm Sci* 2004;9:32-5. (in Thai)

9. Manosroi A, Ruksiriwanich W, Abe M, et al. Biological activities of the rice bran extract and physical characteristics of its entrapment in niosomes by supercritical carbon dioxide fluid. *J Supercrit Fluids* 2010;54:137-44.
10. Manosroi A, Boonpisuttinant K, Winitchai S, et al. Free radical scavenging and tyrosinase inhibition activity of physic nut (*Jatropha curcas* Linn.) seed oil entrapped in niosomes. *Current Nanoscience* 2011; 7:825-9.
11. Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 2009;10:2440-75.
12. Lee S-H, Sanchetis., Sancheti S, et al. Potent antielastase and antityrosinase activities of *Astilbe chinensis*. *Am J Pharmacol Toxicol* 2009;4:127-9.
13. Kim SJ, Sancheti SA, Sancheti S, et al. Effect of 1,2,3,4,6-penta-o-galloyl-b-d-glucose on elastase and hyaluronidase activities and its type II collagen expression. *Acta Pol Pharm* 2010;67:145-50.
14. Manosroi A, Kumguan K, Chankhampan C, et al. Nanoscale gelatinase A (MMP-2) inhibition on human skin fibroblasts of Longkong (*Lansium domesticum* Correa) leaf extracts for anti-aging. *J Nanosci Nanotechnol* 2012;12:7187-97.
15. ISO 10993-5: 2009 Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization; Geneva, Switzerland: 2009.
16. Sutthiwanjampa C, Kim SM. Production and characterization of hyaluronidase and elastase inhibitory protein hydrolysate from *venus clam*. *Nat Prod Res* 2015;29: 1614-23.
17. Insaf A, Parveen R, Gautam G, et al. A comprehensive study to explore tyrosinase inhibitory medicinal plants and respective phytochemicals for hyperpigmentation; molecular approach and future perspectives. *Curr Pharm Biotechnol* 2023; 24:780-813.
18. Torres-Rodríguez ML, García-Chávez E, Berhow M, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidant effect of *calea urticifolia* lyophilized aqueous extract on lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 2016; 188:266-74.
19. Muhammad AA, Pauzi NA, Arulselvan P, et al. In vitro wound healing potential and identification of bioactive compounds from *Moringa oleifera* Lam. *Biomed Res Int* 2013;2013:974580. doi:10.1155/2013/974580.
20. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 2006;1:1112-6. doi:10.1038/nprot.2006.179.