



ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดกระท้อน
เพื่อประยุกต์ในเครื่องสำอาง

ANTIOXIDANT AND ANTITYROSINASE ACTIVITIES FROM
SANDORICUM KOETJAPE (BURM.F.) MERR. EXTRACTS
FOR APPLICATION IN COSMETICS

สิริกัญ ปภากิจพงศ์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2568

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดกระท้อน

เพื่อประยุกต์ในเครื่องสำอาง

ANTIOXIDANT AND ANTITYROSINASE ACTIVITIES FROM
SANDORICUM KOETJAPE (BURM.F.) MERR. EXTRACTS
FOR APPLICATION IN COSMETICS

สิริกัญ ปภากิจพงศ์

การค้นคว้าอิสระนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2568

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง



หน้าอนุมัติการค้นคว้าอิสระ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง

การค้นคว้าอิสระเรื่อง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัดกระทอน
เพื่อประยุกต์ในเครื่องสำอาง

Antioxidant and Antityrosinase Activities from *Sandoricum*

Koetjape (Burm.F.) Merr. Extracts for Application in Cosmetics

ผู้ประพันธ์ สิทธิกุล ปภากิจพงศ์

คณะกรรมการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ

ประธานกรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรिता สังข์ทอง

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนตรา ศรีชะแย้ม

กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรिता สังข์ทอง)

คณบดี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี รังสิวิจิตรประภา)

กิตติกรรมประกาศ

การค้นคว้าอิสระฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรีตา สังข์ทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่ายิ่งในการให้คำปรึกษา แนะนำแนวทาง ชี้แนะข้อบกพร่องต่าง ๆ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์อย่างละเอียดมาโดยตลอด จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของท่านเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบการค้นคว้าอิสระ ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ (ประธานกรรมการ), ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปัญญาวัฒน์ ปินตาทอง (กรรมการ), ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรีตา สังข์ทอง (กรรมการ) และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มนตรา ศรีชะแย้ม (กรรมการ) ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง และสละเวลาในการพิจารณาและอนุมัติการค้นคว้าอิสระฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ นางสาวธนัชชา ประเสริฐ (นักวิทยาศาสตร์) และนางสาววันเพ็ญ กันทาทอง (นักวิทยาศาสตร์) ที่กรุณาเป็นผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบความเที่ยงตรงของเครื่องมือวิจัย และให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ยิ่ง

ขอขอบคุณหลักสูตรวิทยาศาสตรเครื่องสำอาง คณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสาทวิชาความรู้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง สำหรับกำลังใจ มิตรภาพ และความช่วยเหลือที่ดีตลอดมา

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์ จนทำให้การศึกษาระดับปริญญาโทและการทำการศึกษาการค้นคว้าอิสระฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันใดที่พึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ดังกล่าว

สิริกัญญา ปากากิจพงศ์

ชื่อเรื่องการค้นคว้าอิสระ	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากสารสกัด กระท่อนเพื่อประยุกต์ในเครื่องสำอาง
ผู้ประพันธ์	สิทธิญ์ ปากกิจพงศ์
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรिता สังข์ทอง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบศักยภาพของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกระท่อน (*Sandoricum koetjape*) ได้แก่ ใบอ่อน ใบแก่ กิ่ง และเปลือก ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ธรรมชาติสำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยทำการสกัดตัวอย่างพืชด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล 95%, เอทานอล 50% และอะซิโตน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (TPC) ปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์ (TFC) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ผลการวิจัยพบว่า ชนิดของตัวทำละลายและส่วนของพืชมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ต่อปริมาณองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยสารสกัดใบอ่อนที่สกัดด้วยเอทานอล 50% แสดงศักยภาพสูงสุดในภาพรวม โดยมีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (TPC) ในระดับสูง (41.71 mgGAE/g) และแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดทั้งในการทดสอบ DPPH ($IC_{50} = 78.55 \mu\text{g/mL}$) และ ABTS ($IC_{50} = 76.91 \mu\text{g/mL}$) นอกจากนี้ ยังเป็นกลุ่มสารสกัดเพียงกลุ่มเดียวที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($IC_{50} = 355.62 \mu\text{g/mL}$)

สารสกัดดังกล่าวจึงถูกนำมาพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์หลักในความเข้มข้น 1.60% (w/w) ในตำรับเครื่องสำอางต้นแบบ 2 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 (Serum เนื้อเหลว) และ สูตรที่ 2 (Gel-cream เนื้อกึ่งครีมเจล) ผลการทดสอบความคงตัวสถานะเร่งพบว่า ทั้งสองสูตรมีค่า pH เหมาะสมต่อผิวและไม่เกิดการแยกชั้น แต่พบว่าสีของผลิตภัณฑ์เข้มข้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับวันเริ่มต้น สรุปได้ว่า สารสกัดใบอ่อนกระท่อนที่สกัดด้วยเอทานอล 50% มีศักยภาพสูง และตำรับ Gel-cream (สูตร 2) มีความคงตัวที่ดี เหมาะสำหรับเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางกลุ่มชะลอวัยและไวท์เทนนิ่งต่อไป

คำสำคัญ: กระท่อน, *Sandoricum koetjape*, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, ความคงตัวของผลิตภัณฑ์

Independent Study Title Antioxidant and Antityrosinase Activities from Sandoricum Koetjape (Burm.F.) Merr. Extracts for Application in Cosmetics

Author Sithakann Papakijpong

Degree Master of Science (Cosmetic Science)

Advisor Assistant Professor Sarita Sangthong, Ph. D.

ABSTRACT

This research evaluated the biological potential of crude extracts from different parts of Santol (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) including young leaves, old leaves, branch, and bark for cosmetic applications. Plant samples were extracted using 95% ethanol, 50% ethanol, and acetone. Extracts were analyzed for Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC), antioxidant activity (DPPH, ABTS assays), and tyrosinase inhibitory activity. Results revealed that solvent type and plant part significantly ($p < 0.05$) influenced chemical composition and biological activities. The 50% ethanol young leaf extract showed the highest potential, possessing high TPC (41.71 mg GAE/g) and the strongest antioxidant activity against DPPH radicals ($IC_{50}=78.55 \mu\text{g/mL}$) and ABTS radicals ($IC_{50}=76.91 \mu\text{g/mL}$). It was also the only group with significant tyrosinase inhibitory activity ($IC_{50}=355.62 \mu\text{g/mL}$).

This extract was therefore developed as the main active ingredient at a concentration of 1.60% (w/w) in two prototype cosmetic formulations: Formula 1 (Liquid serum) and Formula 2 (Gel-cream). Accelerated stability test results revealed that both formulations had a skin-appropriate pH and no phase separation but were slight darkening. In conclusion, the 50% ethanol extract of young Santol leaves has high potential, and Formula 2 demonstrated good stability, making it a suitable guideline for the future development of anti-aging and whitening cosmetic products.

Keywords: Sandoricum koetjape, Santol, Antioxidant Activity, Tyrosinase Inhibition, Product Stability

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ (INTRODUCTION)	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ความสำคัญของการวิจัย	3
1.4 สมมติฐานของการวิจัย	3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	4
1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ	4
2 การทบทวนวรรณกรรม (LITERATURE REVIEW)	5
2.1 ที่มาและลักษณะทั่วไปของกระท้อน (<i>Sandoricum koetjape</i> (Burm.f.) Merr.)	5
2.2 การใช้ประโยชน์และสรรพคุณทางสมุนไพรของกระท้อน	6
2.3 สารสำคัญทางชีวภาพในกระท้อน (Phytochemical Constituents)	7
2.4 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระและหลักการต้านอนุมูลอิสระ (Mechanism of Free Radicals and Antioxidant Principles)	8
2.5 กลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Mechanism of Tyrosinase Inhibition)	10
2.6 พืชอื่นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและการเปรียบเทียบ (Other Plant Extracts with Tyrosinase Inhibitory Activity and Comparative Analysis)	13
2.7 แนวโน้มการใช้สารสกัดจากธรรมชาติในเครื่องสำอาง (Trends in the Use of Natural Extracts in Cosmetics)	14
2.8 สรุปสาระสำคัญจากการทบทวนวรรณกรรม	15
3 วิธีการดำเนินการวิจัย (MATERIALS AND METHODS)	18
3.1 วัสดุและสารเคมี (Plant Materials and Chemicals)	18
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ (Instruments and Apparatus)	20
3.3 การสกัดด้วยคลื่นเสียง (Ultrasound-assisted Extraction; UAE)	20

สารบัญ

บทที่	หน้า
3.4 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)	22
3.5 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content; TPC)	23
3.6 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content; TFC)	25
3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay	26
3.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging Assay	28
3.9 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase Inhibition Assay)	29
3.10 การวิเคราะห์สถิติ (Statistics Analysis)	30
3.11 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlation Analysis)	31
3.12 การวิเคราะห์การจัดอันดับศักยภาพของสารสกัด (Composite Ranking Analysis)	31
3.13 การพัฒนาตำรับและการทดสอบความคงตัว (Formulation and Stability Testing)	33
4 ผลการวิจัย (RESULT AND DISCUSSION)	37
4.1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัด (%Yield)	37
4.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)	39
4.3 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content; TPC)	40
4.4 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content; TFC)	42
4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH Radical Scavenging Activity)	44
4.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (ABTS Radical Cation Decolorization Assay)	46
4.7 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase Inhibitory Activity)	47
4.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการทดสอบ (Correlation Analysis)	49
4.9 การจัดอันดับศักยภาพของสารสกัด (Composite Ranking Analysis)	51
4.10 สรุปผลการทดลองภาพรวม (Overall Summary and Discussion)	54

สารบัญ

บทที่	หน้า
4.11 ผลการทดสอบตำรับและความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (Formulation and Stability Testing)	55
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ (CONCLUSION AND RECOMMENDATION)	59
5.1 สรุปผลการวิจัย (Conclusion)	59
5.2 ข้อเสนอแนะ (Recommendation)	60
รายการอ้างอิง	62



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
3.1 Prototype 1 — Serum (Water-Gel Serum)	34
3.2 Prototype 2 — Brightening Gel-Cream (O/W Emulsion)	34
4.1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัด (%Yield) ของสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของ กระถ่อนที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน	37
4.2 ผลการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening) ในสาร สกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกระถ่อนด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน	39
4.3 ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract) และ ปริมาณ ฟลาโวนอยด์ (mg QE/g extract) ของสารสกัดจากใบอ่อน ใบแก่ กิ่งก้าน และ เปลือกกระถ่อนในตัวทำละลายต่าง	41
4.4 ค่า IC ₅₀ (µg/mL) ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระถ่อน (<i>Sandoricum koetjape</i> (Burm.f.) Merr.) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS	44
4.5 ค่า IC ₅₀ ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดกระถ่อน (<i>Sandoricum koetjape</i> (Burm.f.) Merr.)	47
4.6 ค่าสหสัมพันธ์ (r) ระหว่างการทดสอบต่าง ๆ ของสารสกัดกระถ่อน (<i>Sandoricum koetjape</i> (Burm.f.) Merr.)	50
4.7 การจัดอันดับศักยภาพของสารสกัดจากกระถ่อน (Composite Ranking; Penalized Model)	52
4.8 ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับ (6 Cycle)	56
4.9 ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับแบบมีสารสกัด (6 Cycle)	57

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
3.1 ส่วนต่าง ๆ ของต้นกระทุงที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ก. ใบอ่อน ข. ใบแก่ ค. กิ่ง ง. เปลือกลำต้น	18



บทที่ 1

บทนำ (INTRODUCTION)

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาวิจัย

กระท้อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) เป็นไม้ผลยืนต้นในวงศ์ Meliaceae ที่พบทั่วไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงประเทศไทย ซึ่งมีการปลูกแพร่หลายในหลายจังหวัด โดยเฉพาะภาคกลางและภาคเหนือ ผลกระท้อนมีรสเปรี้ยวอมหวานและสามารถบริโภคได้ทั้งผลสดและผลแปรรูป เช่น ผลไม้ดอง แยม หรือน้ำผลไม้ (Bailly, 2022) กระท้อนนอกจากเป็นพืชเศรษฐกิจพื้นบ้านแล้วยังมีการใช้ประโยชน์ทางสมุนไพรพื้นบ้านมาอย่างยาวนาน ใบใช้ต้มน้ำอาบเพื่อขับเหงื่อและลดไข้ เปลือกต้นใช้รักษาโรคผิวหนังและแก้ท้องเสีย รากใช้เป็นยาขับลมและยาธาตุ ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่ากระท้อนมีคุณค่าทั้งทางเศรษฐกิจและทางการแพทย์แผนไทย (Wijaya, 2022)

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา มีรายงานการศึกษาพบว่า กระท้อนประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น koetjapic acid, sentulic acid, sandoripins, tannins, flavonoids, phenolic compounds, kationic acid, และ bryonolic acid (Armaghan et al., 2024; Bumi et al., 2019; Jafari et al., 2014; Saadah et al., 2023) สารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญของสารที่ใช้ในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวและชะลอวัย (Bailly, 2022; Hamzah et al., 2020) ปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (free radical) เกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ เช่น รังสี UV มลภาวะ หรือกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในร่างกาย การมีอนุมูลอิสระมากเกินไปจะทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ผิว ทำให้ผิวหมองคล้ำ แห้งกร้าน และเกิดริ้วรอยก่อนวัย (Halliwell & Gutteridge, 2015; Valko et al., 2007) ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระจึงมีบทบาทสำคัญในการปกป้องผิวและคงความอ่อนเยาว์ (Kamiński et al., 2022)

อีกกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับความงามของผิว คือ การสร้างเม็ดสีผิว (melanogenesis) ซึ่งควบคุมโดยเอนไซม์ ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยน *L-tyrosine* ไปเป็น *L-DOPA* และต่อมาเป็น *dopaquinone* ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเมลานิน (Chang, 2012; Zolghadri et al., 2019) การทำงานมากเกินไปของเอนไซม์นี้ส่งผลให้เกิดฝ้า กระ จุดด่างดำ และภาวะผิวหมองคล้ำ การค้นหาสารธรรมชาติที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ จึงเป็นแนวทางสำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางกลุ่มไวท์เทนนิ่ง (Cui et al., 2018; Masuda et al., 2005)

มีรายงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาพืชสมุนไพรและผลไม้เขตร้อน เช่น หม่อน (*Morus alba*), ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra*), ชาเขียว (*Camellia sinensis*), และ มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและมีสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่มีประสิทธิภาพสูง (Rachkeeree et al., 2020; Shin et al., 2022) อย่างไรก็ตาม สำหรับ กระท้อนไทย แม้จะมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น (Hamzah et al., 2024) แต่ยังขาดการศึกษาอย่างเป็นระบบที่เปรียบเทียบ “ส่วนของพืช × ตัวทำละลาย” ต่อฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งด้านการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งไทโรซิเนส รวมทั้งยังไม่เคยมีการเชื่อมโยงข้อมูลระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ (TPC, TFC) กับค่าฤทธิ์ทางชีวภาพ (IC_{50} ของ DPPH, ABTS และ Tyrosinase)

การศึกษานี้จึงมีความสำคัญในการสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับศักยภาพของสารสกัดจากกระท้อนไทย เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็น สารออกฤทธิ์ธรรมชาติ (Natural Active Ingredient) ที่ใช้ในเครื่องสำอาง (Lim & Kwon, 2023) ซึ่งจะช่วยให้มูลค่าให้กับพืชพื้นบ้านไทย และส่งเสริมการใช้ทรัพยากรในประเทศอย่างยั่งยืน (Nhani et al., 2024)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาสารสำคัญทางชีวภาพที่ได้จาก เปลือกลำต้น ใบ และยอดกิ่งก้านของ กระท้อน (*Sandoricum koetjape*) ซึ่งมีฤทธิ์ในการ ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิดเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัด

1.2.2 เพื่อประเมินปริมาณสารสำคัญทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content; TPC) และฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content; TFC) ของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกระท้อน

1.2.3 เพื่อประเมิน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity) ของสารสกัดกระท้อนโดยใช้วิธี DPPH และ ABTS radical scavenging assays และคำนวณค่า IC_{50}

1.2.4 เพื่อประเมิน ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase Inhibition Activity) ของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกระท้อน โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

1.2.5 เพื่อพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์ต้นแบบเครื่องสำอาง (Prototype Cosmetic Formulation) ที่มีส่วนผสมของสารสกัดกระท้อน พร้อมประเมินลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของผลิตภัณฑ์

1.3 ความสำคัญของการวิจัย

เป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับศักยภาพของกระท้อนไทยในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งยังไม่มีการศึกษาอย่างเป็นระบบมาก่อน โดยผลที่ได้จะช่วยอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิก/ฟลาโวนอยด์กับประสิทธิภาพทางชีวภาพ รวมทั้งเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษากลไกทางชีวเคมีของสารออกฤทธิ์ในกระท้อน และผลการวิจัยสามารถนำไปต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากธรรมชาติ เช่น เซรั่มบำรุงผิว ครีมไวท์เทนนิ่ง หรือโลชั่นลดเลือนจุดด่างดำ ซึ่งจะช่วยให้มูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตรของไทยโดยเฉพาะส่วนที่มักถูกทิ้ง เช่น ใบและกิ่งของกระท้อน อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการใช้ทรัพยากรท้องถิ่นอย่างยั่งยืนและลดการนำเข้าสารไวท์เทนนิ่งจากต่างประเทศ

1.4 สมมติฐานของการวิจัย

1.4.1 สารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายต่างกันมีปริมาณสารสำคัญต่างกัน

1.4.2 สารสกัดจากกระท้อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณสารสำคัญ

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 ตัวอย่างพืช: เปลือกลำต้น ใบ และยอดกิ่งก้านของกระท้อนสายพันธุ์ปูผ่าย (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) ที่เก็บจากพื้นที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร

1.5.2 ตัวทำละลาย: 95 % เอทานอล 50 % เอทานอล และ อะซีโตน

1.5.3 การวิเคราะห์: ทดสอบ TPC TFC DPPH ABTS และ Tyrosinase Inhibition Assay

1.5.4 การพัฒนาสูตรตำรับเซรั่มและครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดกระท้อนและทดสอบความคงตัว

1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้รับข้อมูลเชิงเปรียบเทียบของศักยภาพสารสกัดกระท้อนแต่ละส่วนต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

1.6.2 ระบุส่วนของพืชและตัวทำละลายที่ให้ผลดีที่สุด (Optimal extract-solvent combination)

1.6.3 ได้ต้นแบบผลิตภัณฑ์เซรั่มบำรุงผิวจากสารสกัดกระท้อนที่มีคุณสมบัติ Whitening และ Anti-aging

1.7 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.7.1 สารสกัดกระท้อน (Santol extract) หมายถึง สารที่ได้จากการสกัดส่วนต่าง ๆ ของพืชกระท้อนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

1.7.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) หมายถึง ความสามารถของสารในการกำจัดอนุมูลอิสระในระบบทดสอบ DPPH และ ABTS

1.7.3 เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) หมายถึง เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ L-tyrosine และ L-DOPA ให้เป็น dopaquinone

1.7.4 IC₅₀ หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาได้ 50 % ของค่าควบคุม

1.7.5 TPC หมายถึง ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด)

1.7.6 TFC หมายถึง ปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมเคอควิทินต่อกรัมสารสกัด)

1.7.8 DPPH / ABTS assay หมายถึง วิธีการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ

1.7.9 Tyrosinase inhibition assay หมายถึง การทดสอบความสามารถของสารในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม (LITERATURE REVIEW)

2.1 ที่มาและลักษณะทั่วไปของกระท้อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.)

กระท้อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) เป็นไม้ผลขนาดใหญ่ในวงศ์ Meliaceae วงศ์เดียวกับมะฮอกกานี (mahogany) และสะเดา (*Azadirachta indica*) มีถิ่นกำเนิดในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย ลาว กัมพูชา เวียดนาม และฟิลิปปินส์ (Bailly, 2022; Wijaya, 2022) พืชชนิดนี้สามารถปรับตัวได้ดีในภูมิอากาศร้อนชื้นและดินร่วนปนทรายที่มีการระบายน้ำดี ลำต้นกระท้อนสูง 15–30 เมตร เปลือกสีน้ำตาลเทา ผิวค่อนข้างหยาบ ใบประกอบแบบขนนกปลายคู้ มีใบย่อย 3–7 ใบ รูปรี ปลายแหลม ใบแก่เปลี่ยนสีเป็นแดงก่อนร่วง ดอกกระท้อนขนาดเล็ก สีเหลืองอมเขียว ออกเป็นช่อกระจุกตามปลายกิ่ง ผลมีลักษณะกลมแป้น ผิวมีขนละเอียดคล้ายกำมะหยี่ สีเหลืองถึงเหลืองอมส้มเมื่อสุก ภายในมีเนื้อสีขาวนุ่มรสหวานอมเปรี้ยว และมีเมล็ด 3–5 เมล็ด (Wijaya, 2022)

ประเทศไทยจัดว่าเป็นหนึ่งในประเทศที่มีกระท้อนพันธุ์พื้นเมืองหลากหลาย เช่น พันธุ์ทับทิม พันธุ์ปุยฝ้าย พันธุ์นิ่มนวล พันธุ์เทพศิริ พันธุ์ปุยไหม และพันธุ์อีล่า ซึ่งแตกต่างกันในลักษณะผลและรสชาติ โดยพันธุ์ทับทิมถือเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่ให้ผลใหญ่ รสหวานอมเปรี้ยว และมีการปลูกแพร่หลายในภาคกลางของประเทศไทย เช่น จังหวัดนนทบุรี ราชบุรี และสุพรรณบุรี ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมในการศึกษาวิจัยด้านชีวเคมีและสมุนไพรในปัจจุบัน

นอกจากใช้เป็นผลไม้รับประทาน กระท้อนยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เนื่องจากสามารถนำทุกส่วนของพืชมาประยุกต์ใช้ ทั้งผล ใบ เปลือก และกิ่ง ซึ่งมีรายงานว่ามีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น โพลีฟีนอล (polyphenols), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), ลิโมนอยด์ (limonoids), และไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoids) (Bailly, 2022; Bumi et al., 2019; Saadah et al., 2023) สารเหล่านี้เกี่ยวข้องโดยตรงกับคุณสมบัติด้าน การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (anti-tyrosinase) ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการพัฒนาเครื่องสำอางประเภทไวท์เทนนิ่ง (Hamzah et al., 2020; Zolghadri et al., 2019)

งานวิจัยหลายฉบับได้ระบุว่ากระท้อนมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกระจายอยู่ในทุกส่วนของพืช แต่มีความแตกต่างกันทั้งในชนิดและปริมาณของสารสำคัญ (Bailly, 2022) ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงเลือกนำ เปลือกลำต้น, ใบ (ทั้งใบอ่อนและใบแก่), และยอดกิ่งก้าน ของกระท้อนมาทำการสกัด เพื่อ

เปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เนื่องจากแต่ละส่วนมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ใบอ่อน (Young leaves) ซึ่งมีเนื้อเยื่ออ่อน จะมีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิสูงเพื่อป้องกันแมลงศัตรูพืช เช่น polyphenols และ flavonoids (Coley et al., 1985; Starkevič et al., 2020; Zhang et al., 2018); ใบแก่ (Mature leaves) ที่มีโครงสร้างแข็งขึ้น ยังคงมีสารในกลุ่ม flavonoids และ proanthocyanidins ที่มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Bailly, 2022); ยอดกิ่งก้าน (Branchlets) มีองค์ประกอบของสารในกลุ่ม triterpenoids และ limonoids (Bumi et al., 2019); และ เปลือกลำต้น (Stem bark) ซึ่งเป็นส่วนที่พบสารในกลุ่ม oleanane-type triterpenoids สำคัญ เช่น Koetjapic acid ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการต้านมะเร็งและฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ (Armaghan et al., 2024; Jafari et al., 2014)

การเลือกใช้ ทั้งใบอ่อน ใบแก่ ยอดกิ่งก้าน และเปลือกลำต้น จึงเป็นแนวทางที่ครอบคลุมมากที่สุดในการประเมินศักยภาพของสารสกัดจากกระท้อน เนื่องจากแต่ละส่วนอาจมีสัดส่วนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างชนิดกัน ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพของการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่แตกต่างกัน งานของ Wijaya (2022) และ Hamzah et al. (2024) ยังเสนอว่า ปริมาณสารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ในใบกระท้อนมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ โดยใบอ่อนให้ค่าความสัมพันธ์เชิงบวก ($r = 0.87$) ระหว่างปริมาณสารโพลีฟีนอลกับค่า %inhibition ในการทดสอบ DPPH และ ABTS ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในพืชชนิดอื่นที่พบว่า ใบอ่อนมักมีการสะสมของสารโพลีฟีนอลสูงกว่าใบแก่ (Starkevič et al., 2020; Zhang et al., 2018)

ดังนั้น ส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีเหตุผลทางวิทยาศาสตร์รองรับ ทั้งในเชิงองค์ประกอบทางเคมีและผลทางชีวภาพ โดยมุ่งเน้นการเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดแต่ละส่วนภายใต้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (95% ethanol, 50% ethanol และ acetone) ซึ่งสอดคล้องกับหลักการที่ว่าความเข้มข้นของตัวทำละลายมีผลอย่างนัยสำคัญต่อปริมาณสารสกัดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Do et al., 2014; ธนัชสิทธิ์ พูนโพบูลย์พิพัฒน์, 2562) เพื่อระบุส่วนพืชและวิธีการสกัดที่ให้สารออกฤทธิ์สูงสุดสำหรับการนำไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

2.2 การใช้ประโยชน์และสรรพคุณทางสมุนไพรของกระท้อน

พืชกระท้อนมีการใช้ประโยชน์มาอย่างยาวนานทั้งในอาหารและยาพื้นบ้านของไทยและประเทศเพื่อนบ้าน ในตำรายาไทย ระบุว่า ใบกระท้อนใช้ต้มอาบแก้ไข้และขับเหงื่อ เปลือกต้นต้มน้ำดื่มแก้ท้องเสียและบิด รากใช้เป็นยาขับลมและบำรุงธาตุ และผลสุกใช้รับประทานเพื่อช่วยย่อยอาหารและลดไขมัน (Wijaya, 2022; Bailly, 2022)

Bailly (2022) รายงานว่า ผลและใบกระถ่อนมีสาร polyphenols และวิตามินซีสูง ซึ่งช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระและชะลอความเสื่อมของเซลล์ นอกจากนี้ ใบกระถ่อนยังมี quercetin, luteolin, และ proanthocyanidins ซึ่งเป็น flavonoids สำคัญที่มีฤทธิ์ลดการอักเสบ (anti-inflammatory) และช่วยควบคุมกระบวนการสร้างเม็ดสีผิว (melanogenesis) อีกด้วย (Hamzah et al., 2024) ส่วนเปลือกต้นและกิ่งก้าน มีสารในกลุ่ม triterpenes โดยเฉพาะ Koetjapic acid (KA) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็ง (apoptosis) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Armaghan et al., 2024; Jafari et al., 2014) และยังพบสารกลุ่ม Limonoids และ Sentulic acid ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระได้ดี (Bumi et al., 2019)

การศึกษาล่าสุดในปี 2024 พบว่า สารสกัดจากใบกระถ่อนมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibition) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในพืช (Hamzah et al., 2024) สะท้อนให้เห็นถึงคุณสมบัติในการเป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางเพื่อผิวขาวและชะลอวัยอย่างยั่งยืน (Nhani et al., 2024)

2.3 สารสำคัญทางชีวภาพในกระถ่อน (Phytochemical Constituents)

กระถ่อนจัดเป็นพืชที่มีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลาย โดยมีสารออกฤทธิ์กว่า 30 ชนิดจากทุกส่วนของพืช ซึ่งรวมถึงกลุ่ม triterpenoids, limonoids, flavonoids, phenolic acids, monoterpenoids และ alkaloids (Wijaya, 2022; Bailly, 2022) โดยในส่วนของเมล็ดกระถ่อนพบสารกลุ่ม Limonoids ที่สำคัญ (เช่น koetjapin และ sandoricin derivatives) ซึ่งจัดเป็น triterpenoids ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและมีศักยภาพทางยา (Bumi et al., 2019) สำหรับเปลือกลำต้นและกิ่ง พบสารสำคัญกลุ่ม oleanane-type triterpenes โดยเฉพาะ Koetjapic acid, Sentulic acid และ Bryonolic acid ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี (Armaghan et al., 2024; Jafari et al., 2014)

ขณะที่ใบกระถ่อน พบสารในกลุ่ม polyphenol และ flavonoid ปริมาณสูง รวมถึงสารกลุ่ม triterpenoids ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้อย่างมีนัยสำคัญ (Bailly, 2022; Hamzah et al., 2020; Hamzah et al., 2024) จากองค์ประกอบเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า “ใบอ่อนกระถ่อน” เป็นส่วนที่มีศักยภาพสูงที่สุดในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เนื่องจากมีการสะสมของสารโพลีฟีนอลเพื่อป้องกันตัวเองตามธรรมชาติสูงกว่าและมีความปลอดภัย (Starkevič et al., 2020; Zhang et al., 2018)

2.4 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระและหลักการต้านอนุมูลอิสระ (Mechanism of Free Radicals and Antioxidant Principles)

กระบวนการเกิดอนุมูลอิสระ (Free radicals) เป็นปรากฏการณ์ทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติในร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในระหว่างกระบวนการเผาผลาญพลังงานในไมโทคอนเดรีย กระบวนการอักเสบ (Inflammation) การได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต (UV radiation) รวมถึงการสัมผัสมลภาวะ เช่น คาร์บอนและโลหะหนัก (Halliwell & Gutteridge, 2015; Kamiński et al., 2022)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่คู่กัน ทำให้มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในเซลล์ เช่น โปรตีน ลิพิด และกรดนิวคลีอิก ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างเซลล์และการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งภาวะดังกล่าวเรียกว่า ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) (Valko et al., 2007)

2.4.1 การเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย

อนุมูลอิสระที่สำคัญในระบบชีวภาพสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ Reactive Oxygen Species (ROS) หรืออนุมูลอิสระของออกซิเจน เช่น superoxide anion (O_2^-) hydroxyl radical ($-OH$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) และกลุ่ม Reactive Nitrogen Species (RNS) หรืออนุมูลอิสระของไนโตรเจน เช่น nitric oxide (NO) และ peroxynitrite ($ONOO^-$) (Halliwell & Gutteridge, 2015; Valko et al., 2007) โดย ROS และ RNS เหล่านี้เกิดขึ้นได้จากหลายแหล่งในร่างกาย ทั้งจากกระบวนการภายใน เช่น การหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรีย (Electron Transport Chain) การทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase และ xanthine oxidase (Hamzah et al., 2020) การกระตุ้นเม็ดเลือดขาวในภาวะอักเสบ ตลอดจนการได้รับปัจจัยภายนอกอย่างรังสี UV หรือมลพิษ (Kamiński et al., 2022) เมื่อร่างกายมีปริมาณ ROS มากเกินไปจนไม่สามารถควบคุมได้ จะทำให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลชีวภาพที่สำคัญ ก่อให้เกิดการออกซิไดซ์ของลิพิด (Lipid peroxidation) ซึ่งทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความยืดหยุ่น การออกซิไดซ์โปรตีนจนสูญเสียการทำงานของเอนไซม์ และการทำลาย DNA ซึ่งอาจนำไปสู่การกลายพันธุ์ และเป็นปัจจัยเสี่ยงของมะเร็งและความชรา (Armaghan et al., 2024; Halliwell & Gutteridge, 2015)

2.4.2 กลไกการต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย

ร่างกายมีระบบป้องกันอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ (Endogenous antioxidant defense system) ซึ่งประกอบด้วยกลไกหลักสองส่วนคือเอนไซม์และสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Halliwell & Gutteridge, 2015) ในส่วนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Enzymatic antioxidants) ประกอบด้วย

เอนไซม์สำคัญ เช่น Superoxide dismutase (SOD) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยน O_2^- เป็น H_2O_2 , เอนไซม์ Catalase (CAT) ที่เปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน และ Glutathione peroxidase (GPx) ที่ช่วยยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ขณะที่ส่วนของสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-enzymatic antioxidants) นั้น ได้แก่ สารโมเลกุลเล็ก เช่น วิตามินซี (Ascorbic acid), วิตามินอี (Tocopherol), กลูตาไธโอน (GSH) รวมถึงสารกลุ่มโพลีฟีนอลที่ได้จากพืช เช่น flavonoids และ phenolic acids (Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Valko et al., 2007) อย่างไรก็ตาม หากการบริโภคอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอ หรือร่างกายมีการสัมผัสกับอนุมูลอิสระภายนอกอย่างต่อเนื่อง ระบบป้องกันภายในร่างกายอาจเสื่อมถอยหรือทำงานไม่เพียงพอ จึงมีความจำเป็นต้องเสริมสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก โดยเฉพาะสารจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัยสูง เช่น สารสกัดจากพืชสมุนไพร (Anantachoke et al., 2016; Rapa et al., 2023)

2.4.3 หลักการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

สารต้านอนุมูลอิสระจากพืช (Natural antioxidants) ซึ่งมักอยู่ในกลุ่มของฟีนอลิก (Phenolics), ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids), และไตรเทอร์เพนอยด์ (Triterpenoids) สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้หลายรูปแบบ (Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Wijaya, 2022) กลไกสำคัญประการแรกคือการให้อิเล็กตรอน (Electron donation) โดยสารเหล่านี้สามารถบริจาคอิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมให้อนุมูลอิสระ ทำให้พวกมันเสถียรและไม่สามารถทำปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อไปได้ ตัวอย่างเช่น Quercetin และ Catechin ซึ่งพบในใบกระถ่อน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หลายตำแหน่งที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Bailly, 2022) กลไกที่สองคือการคีเลตไอออนโลหะ (Metal chelation) เนื่องจากโลหะหนัก เช่น Fe^{2+} และ Cu^{2+} สามารถเร่งปฏิกิริยา Fenton ที่ทำให้เกิด $\bullet OH$ ซึ่งมีฤทธิ์ออกซิไดซ์สูง สารฟีนอลิกจึงเข้าไปจับกับโลหะเหล่านี้เพื่อหยุดการเกิดอนุมูลอิสระ (Halliwell & Gutteridge, 2015) นอกจากนี้ สารสกัดบางชนิดยังมีกลไกยับยั้งเอนไซม์ที่สร้างอนุมูลอิสระโดยตรง เช่น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase และ xanthine oxidase ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของ ROS (Hamzah et al., 2020) ประการสุดท้าย สารโพลีฟีนอลบางชนิด เช่น Kaempferol และ Quercetin ยังสามารถกระตุ้นระบบป้องกันภายในเซลล์ โดยกระตุ้นการแสดงออกของยีน Nrf2, HO-1 และ SOD ซึ่งเป็นกลไกหลักของระบบต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกาย (Anantachoke et al., 2016)

2.4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในงานวิจัย

ในระดับห้องปฏิบัติการ การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพืชมักใช้วิธีการทดสอบที่อาศัยกลไกการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนเป็นหลัก วิธีที่ได้รับความนิยม ได้แก่ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay ซึ่งเป็นการวัดความสามารถของสารในการลดอนุมูลอิสระ DPPH $\bullet$ ที่มีสีม่วงเข้มให้กลายเป็น DPPH-H ที่ไม่มีสี โดยวัดค่าการลดลงของค่า

การดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร (Gulcin & Alwasel, 2023) และวิธี ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical cation assay ซึ่งใช้วัดความสามารถของสารในการยับยั้งอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ ที่เกิดจากการออกซิไดซ์ของ ABTS ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร (Re et al., 1999) ซึ่งผลการทดสอบมักรายงานเป็นค่า % inhibition หรือค่า IC_{50} ที่ยิ่งต่ำยิ่งแสดงถึงศักยภาพที่สูงกว่า (Gite et al., 2015; Munteanu & Apetrei, 2021) นอกจากนี้ ยังมีวิธี FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) ที่ใช้วัดความสามารถโดยรวมของสารในการรีดิวซ์ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} เพื่อแสดงถึงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ (Munteanu & Apetrei, 2021) ทั้งนี้ ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพืชและกระถ่อน พบว่าชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายมีผลอย่างนัยสำคัญต่อการสกัดสารสำคัญ โดยสารสกัดจากใบที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นปานกลาง (เช่น 50-60%) มักให้ค่าการยับยั้ง DPPH และ ABTS สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่ละลายออกมาได้ดีในสภาวะดังกล่าว (Do et al., 2014; ธนัชสิทธิ์ พูนไพบุลย์พิพัฒน์, 2562; Wijaya, 2022)

2.4.5 บทสรุปเชิงกลไก

จากกลไกทั้งหมดข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า สารต้านอนุมูลอิสระจากกระถ่อน ทำงานผ่านกระบวนการบริจาดอิเล็กตรอนและการคีเลตไอออนโลหะ ซึ่งช่วยยับยั้งการเกิด ROS และลดความเสียหายของเซลล์ผิวหนัง นอกจากนี้ สารโพลีฟีนอลในกระถ่อนยังช่วยยับยั้งการอักเสบและชะลอการเสื่อมของผิวจากรังสี UV จึงมีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางที่มีคุณสมบัติ Anti-aging และ Whitening โดยเฉพาะในกลุ่มผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

2.5 กลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Mechanism of Tyrosinase Inhibition)

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็น copper-containing oxidase ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างเม็ดสีผิว (Melanogenesis) ในสิ่งมีชีวิต ทั้งในมนุษย์ สัตว์ และพืช (Zolghadri et al., 2019) เอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ L-tyrosine ไปเป็น L-DOPA (3,4 dihydroxyphenylalanine) และต่อมาเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น DOPAquinone, ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดเมลานิน (melanin) ชนิดต่าง ๆ เช่น eumelanin และ pheomelanin (Chang, 2012; Zolghadri et al., 2019) เมื่อเอนไซม์ไทโรซิเนสทำงานมากเกินไป หรือถูกกระตุ้นจากรังสี UV, ฮอร์โมน, หรือการอักเสบ จะทำให้เกิดการสร้างเม็ดสีผิวมากเกินไป นำไปสู่ปัญหาความหมองคล้ำ ฝ้า กระ และจุดด่างดำ (Kamiński et al., 2022; Shin et al., 2022) ดังนั้น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจึงเป็นกลไก

หลักของสารไวท์เทนนิ่งในเครื่องสำอางสมัยใหม่ ซึ่งมุ่งลดการสร้างเมลานินโดยไม่ทำลายเซลล์เมลานोไซต์ (melanocyte) โดยตรง (Cui et al., 2018; Masuda et al., 2005)

2.5.1 โครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นโปรตีนที่มีโลหะทองแดง (Cu^{2+}) อยู่ 2 อะตอมในศูนย์กลางเร่งปฏิกิริยา (catalytic active site) โดยไอออนทองแดงแต่ละอะตอมถูกจับยึดด้วยกรดอะมิโนฮิสติดีน (His) หกตำแหน่ง (Zolghadri et al., 2019) โครงสร้างนี้ช่วยให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ในสองขั้นตอนหลัก ได้แก่ Monophenolase activity ซึ่งเป็นการเปลี่ยน L-tyrosine ให้เป็น L-DOPA และ Diphenolase activity ซึ่งเป็นการเปลี่ยน L-DOPA ต่อไปเป็น DOPAquinone หลังจากนั้น DOPAquinone จะเกิดปฏิกิริยา auto-oxidation และ polymerization ต่อเนื่องจนเกิดเป็นเมลานิน (Chang, 2012; Zolghadri et al., 2019)

2.5.2 กลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสามารถเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ โดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 4 กลไกหลัก (Zolghadri et al., 2019) ได้แก่ Competitive inhibition ซึ่งสารยับยั้งมีโครงสร้างคล้าย L-tyrosine หรือ L-DOPA เข้าแข่งขันจับกับ active site โดยตรง เช่น สาร arbutin และ kojic acid; Non-competitive inhibition ซึ่งสารยับยั้งจับกับบริเวณอื่นของเอนไซม์ (allosteric site) ทำให้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์เปลี่ยนไป เช่น สาร glabridin; Mixed inhibition ซึ่งสารยับยั้งสามารถจับได้ทั้งที่ active site และ allosteric site; และ Chelation of Cu^{2+} ซึ่งสารบางชนิดมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถจับ (Chelate) ไอออนทองแดงในศูนย์กลางของเอนไซม์ ทำให้สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา เช่น กรดฟีนอลิกและ flavonoids (Chang, 2012; Hamzah et al., 2024)

โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลไกการคีเลตไอออน Cu^{2+} นี้ถือเป็นกลไกสำคัญของสารยับยั้งจากธรรมชาติ เนื่องจากมีความเสถียร ไม่ทำลายโครงสร้างโปรตีน และให้ผลยับยั้งแบบ reversible (Cui et al., 2018; Zolghadri et al., 2019)

2.5.3 ตัวอย่างสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากธรรมชาติ

มีการค้นพบสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากพืชหลายชนิด ซึ่งมักอยู่ในกลุ่ม phenolic และ flavonoid (Chang, 2012; Zolghadri et al., 2019) ตัวอย่างเช่น Kojic acid จาก *Aspergillus oryzae* ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้มากที่สุดแต่มีข้อจำกัดเรื่องความระคายเคืองผิว; Arbutin จาก *Arctostaphylos uva-ursi* ที่มีความปลอดภัยสูงและให้ผลยับยั้งในระดับปานกลาง; Glabridin จากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra*) ที่ให้ผลยับยั้งได้ใกล้เคียงกับ kojic acid แต่มีความเสถียรมากกว่า; และ Oxyresveratrol จากปอสา (*Broussonetia papyrifera*) และมัลเบอร์รี่ (*Morus alba*) ซึ่งสามารถยับยั้งได้ดี (Zolghadri et al., 2019) สารเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสารโพลีฟีนอลที่มีหมู่ไฮดรอกซิล

(-OH) จำนวนมากสามารถบริจาคอิเล็กตรอนและจับกับศูนย์กลางโลหะของเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นกลไกที่คล้ายคลึงกับสารออกฤทธิ์ที่พบในกระถ่อน (Bailly, 2022)

2.5.4 กลไกการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดกระถ่อน

จากผลการศึกษาทางเคมี กระถ่อนมีสารในกลุ่ม triterpenoids เช่น Koetjapic acid, Sentulic acid, และ Bryonolic acid รวมถึงสารกลุ่ม flavonoids เช่น Quercetin และ Luteolin ซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทั้งแบบ competitive และ chelating (Bailly, 2022; Hamzah et al., 2024)

Koetjapic acid ซึ่งเป็น oleanane-type triterpenoid มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ที่สามารถจับกับ Cu^{2+} ในศูนย์กลางของเอนไซม์ได้ การจำลองโครงสร้างด้วยวิธี in silico แสดงให้เห็นว่าการจับระหว่าง Koetjapic acid กับกรดอะมิโน His263 และ His296 ของเอนไซม์ ส่งผลให้พลังงานยึดเหนี่ยวลดลง (Binding affinity) ซึ่งบ่งชี้ถึงความเสถียรของการยับยั้ง (Armaghan et al., 2024; Hamzah et al., 2024)

นอกจากนี้ สาร Quercetin และ Luteolin ในใบกระถ่อนมีหมู่ -OH หลายตำแหน่งที่สามารถบริจาคอิเล็กตรอน ลดการเกิด o-quinone และชะลอการเปลี่ยน DOPAquinone เป็น melanin ได้ ซึ่งกลไกนี้ไม่เพียงลดการสร้างเม็ดสีผิว แต่ยังช่วยปกป้องเซลล์ผิวจาก oxidative stress ที่เกิดจากรังสี UV อีกด้วย (Bailly, 2022; Kamiński et al., 2022)

การทดสอบระดับ in vitro ของ Hamzah et al. (2024) พบว่า สารสกัดจากกิ่งของกระถ่อนให้ % ยับยั้ง tyrosinase ประมาณ 42 – 45 % ที่ 1 มก./มล. ซึ่งจัดอยู่ในระดับ “ปานกลาง” แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการจำลอง in silico พบว่า ศักยภาพของสาร Koetjapic acid สูงกว่าสารมาตรฐาน kojic acid ในเชิงการจับยึดกับเอนไซม์ แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้สารนี้เป็นสารออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอางในอนาคต (Armaghan et al., 2024; Hamzah et al., 2024)

2.5.5 ความเชื่อมโยงระหว่างการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

กระบวนการสร้างเมลานินและการเกิดอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กันโดยตรง เนื่องจากเอนไซม์ไทโรซิเนสใช้ O_2 เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และกระบวนการนี้สามารถสร้าง ROS ได้ในระหว่างปฏิกิริยาเคมี (Kamiński et al., 2022; Zolghadri et al., 2019) ดังนั้น สารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมักยับยั้งการสร้างเม็ดสีผิวพร้อมกัน เพราะสามารถลดปริมาณ ROS (Scavenging activity) และยับยั้งการทำงานของ tyrosinase ในเวลาเดียวกัน (Chang, 2012; Shin et al., 2022) การที่สารสกัดกระถ่อนมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (โดยเฉพาะใบอ่อนและเปลือกต้น) จึงช่วยเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ส่งผลให้เกิดการลดลงของเม็ดสีผิวและปกป้องผิวจากการเกิดออกซิเดชัน ซึ่ง

เป็นหลักการสำคัญในการพัฒนาเครื่องสำอางกลุ่ม whitening และ anti-aging (Bailly, 2022; Hamzah et al., 2024; Nhani et al., 2024)

2.6 พืชอื่นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและการเปรียบเทียบ (Other Plant Extracts with Tyrosinase Inhibitory Activity and Comparative Analysis)

การค้นหาสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสจากพืชสมุนไพรธรรมชาติได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเภสัชกรรม เนื่องจากสารสังเคราะห์บางชนิด เช่น hydroquinone และ kojic acid มีประสิทธิภาพสูงแต่ก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น การระคายเคืองและภาวะผิวไวต่อแสง (Zolghadri et al., 2019) ในปัจจุบันจึงมีแนวโน้มมุ่งเน้นการใช้สารจากพืชที่มีความปลอดภัยสูง มีฤทธิ์ยับยั้งแบบอ่อนถึงปานกลางแต่ให้ผลยั่งยืนและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง (Chang, 2012; Cui et al., 2018)

งานวิจัยจำนวนมากได้รายงานถึงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของพืชหลายชนิด ทั้งจากผล ใบ เปลือก และราก โดยมีสารออกฤทธิ์หลักในกลุ่ม ฟีนอลิก (phenolics), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และ ไตรเทอร์พีนอยด์ (triterpenoids) ซึ่งมีโครงสร้างเคมีที่สามารถจับกับไอออนทองแดงใน active site ของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (Hamzah et al., 2024; Zolghadri et al., 2019)

ตัวอย่างพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง

ในบรรดาพืชที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูง หม่อน (*Morus alba* L.) ถือเป็นตัวอย่างสำคัญ โดยมีสาร oxyresveratrol, mulberroside A และ kuwanon G ผ่านกลไกการยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) และการคีเลตไอออน Cu^{2+} (Zolghadri et al., 2019) ในทำนองเดียวกัน ชาเขียว (*Camellia sinensis*) อุดมไปด้วย EGCG และ catechin ที่มีค่า IC_{50} ประมาณ 45–60 $\mu\text{g/mL}$ โดยใช้กลไกการบริจาคิเล็กตรอนและคีเลต Cu^{2+} ซึ่งมีการศึกษาพบว่าสารสกัดชาเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการสร้างเม็ดสีได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Shin et al., 2022) ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra*) เป็นอีกหนึ่งพืชที่นิยมใช้ โดยมีสาร glabridin และ isoliquiritigenin ซึ่งมีค่า IC_{50} ประมาณ 78 $\mu\text{g/mL}$ และออกฤทธิ์ผ่านกลไก Non-competitive inhibition ที่มีความเสถียรสูง (Zolghadri et al., 2019) นอกจากนี้ ยังมีพืชชนิดอื่นที่มีศักยภาพ เช่น มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) ซึ่งใช้ ascorbyl glucoside และ ellagic acid ในการลด DOPAquinone ผ่านฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Anantachoke et al., 2016; Chang, 2012); ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera*) ที่มีสาร aloesin ซึ่งยับยั้งเอนไซม์แบบ competitive (Zolghadri et al., 2019); และ ใบบัวบก (*Centella asiatica*) ที่มีสาร asiaticoside และ madecassoside ซึ่งแม้จะให้ผลยับยั้งในระดับปานกลาง แต่มี

คุณสมบัติเด่นด้านการฟื้นฟูเซลล์ผิวและลดรอยดำหลังการอักเสบ (ดวงกมล เลี้ยวกิตติกุล และคณะ, 2553)

2.7 แนวโน้มการใช้สารสกัดจากธรรมชาติในเครื่องสำอาง (Trends in the Use of Natural Extracts in Cosmetics)

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา อุตสาหกรรมเครื่องสำอางทั่วโลกได้เปลี่ยนทิศทางจาก “เครื่องสำอางสังเคราะห์” ไปสู่ “เครื่องสำอางจากธรรมชาติ” (Natural-based cosmetics) อย่างต่อเนื่อง สืบเนื่องจากความตระหนักด้านสุขภาพของผู้บริโภค ผลข้างเคียงจากสารเคมีสังเคราะห์ และกระแสรักษ์สิ่งแวดล้อม (eco-consciousness) ซึ่งสอดคล้องกับแนวคิด “Green Beauty” และ “Clean Cosmetics” (Lim & Kwon, 2023; Nhani et al., 2024)

2.7.1 แนวโน้มระดับโลกของเครื่องสำอางธรรมชาติ

ข้อมูลจากรายงานของ Grand View Research 2024 ระบุว่า ตลาดเครื่องสำอางจากธรรมชาติทั่วโลกมีมูลค่ามากกว่า 44.5 พันล้านเหรียญสหรัฐในปี 2023 และคาดว่าจะเติบโตเฉลี่ยปีละ 6.1% จนถึงปี 2030 โดยผลิตภัณฑ์ที่เติบโตสูงสุดคือกลุ่ม ผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหน้า (Facial skincare), ผลิตภัณฑ์กันแดด (Sun protection), และผลิตภัณฑ์ไวท์เทนนิ่ง (Whitening & Brightening products) การเติบโตนี้ได้รับแรงสนับสนุนจาก 3 ปัจจัยหลัก ได้แก่ (1) ความต้องการสารสกัดจากธรรมชาติ (Bioactive ingredients) เช่น flavonoids และ phenolics ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และชะลอวัย (Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Shin et al., 2022); (2) เทคโนโลยีการสกัดสมัยใหม่ (Green Extraction) เช่น Ultrasound-assisted extraction (UAE) และ Microwave-assisted extraction (MAE) ที่ช่วยให้ได้สารสกัดบริสุทธิ์ ลดการใช้สารเคมีอันตราย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Biswas et al., 2023; Cannavacciuolo et al., 2024); และ (3) ความยั่งยืน (Sustainability) การนำเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (Agro-industrial biowastes) มาแปรรูปเป็นสารออกฤทธิ์มูลค่าสูง ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐานโลกด้านสิ่งแวดล้อม (Mateo et al., 2025; Nhani et al., 2024)

2.7.2 แนวโน้มในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางของประเทศไทย

ในประเทศไทย อุตสาหกรรมเครื่องสำอางถือเป็นหนึ่งในกลุ่มเศรษฐกิจสร้างสรรค์ที่เติบโตเร็ว โดยเฉพาะในหมวด “Cosmeceuticals” หรือ “เครื่องสำอางกึ่งเวชภัณฑ์” กระแสหลักของตลาดไทยคือการมุ่งเน้น การใช้สมุนไพรพื้นบ้านไทย และการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากพืชท้องถิ่น (Local bioresources) ซึ่งมีรายงานการศึกษาพบว่าผลไม้และสมุนไพรไทยหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สูงและมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงาม (Anantachoke et al., 2016) การสร้างเอกลักษณ์โดยใช้วัตถุดิบท้องถิ่นร่วมกับเทคโนโลยีสกัดมาตรฐานสากล เช่น การใช้พืชอย่าง "กระท้อน" ถือเป็นตัวอย่างของการนำภูมิปัญญาท้องถิ่นมาต่อยอดในเชิงพาณิชย์ (Wijaya, 2022)

2.7.3 ความนิยมของผู้บริโภคต่อสารสกัดจากธรรมชาติ

ผู้บริโภครุ่นใหม่ โดยเฉพาะกลุ่มอายุ 20–40 ปี ให้ความสำคัญกับผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสม “ธรรมชาติแท้” มากขึ้น และคำนึงถึงความยั่งยืน (sustainability) ของวัตถุดิบ (Lim & Kwon, 2023) โดยแนวโน้มหลักที่พบ ได้แก่ แนวคิด Clean Beauty การหลีกเลี่ยงสารเคมีสังเคราะห์ที่อาจระคายเคือง), Vegan & Cruelty-Free (ไม่มีส่วนประกอบจากสัตว์และไม่ทดลองในสัตว์), Functional Naturals (มุ่งเน้นสารสกัดที่มีฤทธิ์เฉพาะทาง เช่น สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพื่อผิวขาว (Zolghadri et al., 2019)), และ การสนับสนุนวัตถุดิบที่มีกระบวนการผลิตที่ยั่งยืนและมีการใช้นาโนเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืช (Nhani et al., 2024)

2.7.4 ความเชื่อมโยงของแนวโน้มดังกล่าวกับการใช้ “สารสกัดกระท้อน”

จากแนวโน้มข้างต้น “กระท้อน” (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) จัดอยู่ในกลุ่มพืชพื้นถิ่นที่มีศักยภาพสูงในเชิงการพัฒนาเครื่องสำอางธรรมชาติ เนื่องจากมีสารออกฤทธิ์หลายกลุ่ม เช่น Koetjapic acid, Quercetin, Luteolin และ Bryonolic acid ที่ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ยับยั้งไทโรซิเนส, ต้านอักเสบ และปกป้องเซลล์ผิว (Armaghan et al., 2024; Bailly, 2022; Hamzah et al., 2024) นอกจากนี้ กระท้อนยังเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ทั่วประเทศของประเทศไทย ทำให้มีความพร้อมด้านวัตถุดิบ และสอดคล้องกับแนวคิดการนำวัสดุเหลือทิ้ง (เช่น ใบและเปลือก) มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด (Mateo et al., 2025) การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดกระท้อนในงานวิจัยนี้จึงเป็นการตอบสนองต่อแนวโน้มโลกแห่ง “Green & Sustainable Cosmetics” อย่างแท้จริง เพราะนอกจากจะเพิ่มมูลค่าให้กับผลไม้ไทยแล้ว ยังส่งเสริมเศรษฐกิจหมุนเวียนในอุตสาหกรรมสมุนไพรไทยอีกด้วย

2.8 สรุปสาระสำคัญจากการทบทวนวรรณกรรม

จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า พืชกระท้อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) เป็นพืชเขตร้อนในวงศ์ Meliaceae ที่มีศักยภาพสูงทางด้านชีวภาพและเศรษฐกิจ เนื่องจากทุกส่วนของพืชสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ทั้งในด้านอาหาร สมุนไพร และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง กระท้อนมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด โดยเฉพาะในกลุ่ม ฟีนอลิก (phenolics) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ

(antioxidant) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (anti-tyrosinase) ที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการสร้างเม็ดสีผิว (Bailly, 2022; Wijaya, 2022)

ส่วนต่าง ๆ ของกระถ่อนมีองค์ประกอบของสารสำคัญแตกต่างกัน โดย ใบอ่อนและเปลือกลำต้น เป็นส่วนที่พบสารในกลุ่ม โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และไตรเทอร์พีนอยด์ มากที่สุด เช่น Koetjapic acid, Bryonolic acid, Quercetin, และ Proanthocyanidin ซึ่งเป็นสารที่มีรายงานว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบสูง (Armaghan et al., 2024; Bumi et al., 2019; Jafari et al., 2014) งานของ Hamzah et al. (2024) ยังระบุเพิ่มเติมว่าสารสกัดจากกิ่งและใบกระถ่อนสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ในระดับปานกลาง ซึ่งสอดคล้องกับผลการจำลองแบบ in silico ที่แสดงให้เห็นว่า สาร Koetjapic acid สามารถจับกับบริเวณ active site ของเอนไซม์ได้อย่างมั่นคง

เมื่อเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น หม่อน (*Morus alba*), ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra*), และชาเขียว (*Camellia sinensis*) พบว่ากระถ่อนให้ค่าการยับยั้งที่แม้จะไม่สูงที่สุด แต่มีข้อได้เปรียบในด้านความปลอดภัย ความอ่อนโยนต่อผิว และแหล่งวัตถุดิบที่หาได้ในประเทศ จึงมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางธรรมชาติของไทย (Shin et al., 2022; Zolghadri et al., 2019)

ในเชิงกลไก สารในกลุ่มโพลีฟีนอลจากกระถ่อนทำหน้าที่เป็น สารบริจาคอิเล็กตรอน (electron donor) ช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีผิว เช่น ไทโรซิเนส (Bailly, 2022; Chang, 2012) นอกจากนี้ สารฟลาโวนอยด์บางชนิดยังสามารถคีเลตไอออนทองแดง (Cu^{2+}) ที่ศูนย์กลางของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ส่งผลให้การเร่งปฏิกิริยาลดลง ซึ่งเป็นกลไกเดียวกับสารไวท์เทนนิ่งเชิงพาณิชย์ เช่น Kojic acid และ Arbutin แต่ปลอดภัยกว่าต่อผิวหนัง (Zolghadri et al., 2019)

ผลจากการรวบรวมวรรณกรรมในช่วงปี 2015–2024 สะท้อนให้เห็นแนวโน้มการใช้ “สารสกัดจากธรรมชาติ (Natural Extracts)” เป็นองค์ประกอบหลักในเครื่องสำอางที่เน้นความปลอดภัย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์กลุ่ม whitening, anti-aging, และ antioxidant skincare ภายใต้แนวคิด “Green Cosmetics” และ “Clean Beauty” ที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญกับความยั่งยืนของวัตถุดิบ (Lim & Kwon, 2023; Nhani et al., 2024)

ในบริบทของประเทศไทย กระถ่อนถือเป็นพืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ เนื่องจากมีแหล่งปลูกกระจายอยู่ทั่วประเทศ วัตถุดิบราคาถูก และมีสารสำคัญที่ให้ผลทางชีวภาพจริง โดยเฉพาะสารในใบอ่อนที่ให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระสูง และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสใกล้เคียงสารมาตรฐานในเชิงเครื่องสำอาง (Hamzah et al., 2020; Wijaya, 2022) ดังนั้น งานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสาร

สกัดกระท้อน จึงมีความสำคัญทั้งในด้านการสร้างองค์ความรู้ใหม่ทางวิทยาศาสตร์ และในการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของพืชสมุนไพรไทย

สรุปได้ว่า การศึกษาครั้งนี้จะเป็นการเชื่อมโยงองค์ความรู้จากวรรณกรรมที่มีอยู่เกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวภาพของพืชกระท้อน เข้ากับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ผ่านการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ (in vitro) และการพัฒนาตำรับต้นแบบผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถต่อยอดสู่งานวิจัยระดับอุตสาหกรรมในอนาคตได้อย่างเป็นรูปธรรม ทั้งนี้ยังเป็นแนวทางในการใช้ทรัพยากรธรรมชาติของไทยให้เกิดคุณค่าสูงสุด ภายใต้แนวคิดการพัฒนาอย่างยั่งยืน (Sustainable Innovation in Thai Herbal Cosmetics) (Mateo et al., 2025)



บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย (MATERIALS AND METHODS)

3.1 วัสดุและสารเคมี (Plant Materials and Chemicals)

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ใช้พืชสมุนไพร “กระท้อน” (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) สายพันธุ์ปุ๋ยผ่าย ซึ่งเป็นไม้ผลในวงศ์ Meliaceae ที่ปลูกแพร่หลายในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศไทย ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษานี้เก็บจากต้นกระท้อนอายุประมาณ 10 ปี ปลูกในพื้นที่กรุงเทพมหานคร ซึ่งมีลักษณะภูมิอากาศแบบร้อนชื้นเขตร้อน (Tropical Savanna Climate) อุณหภูมิเฉลี่ยรายวัน 30 ± 2 °C มีความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 65–75 % ตลอดฤดูเก็บเกี่ยว เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีคุณภาพสูงและคงความเป็นธรรมชาติของสารออกฤทธิ์ ตัวอย่างทุกชิ้นเก็บในช่วงเดือน พฤษภาคม ถึง มิถุนายน ซึ่งเป็นฤดูผลิดอกและใบใหม่ โดยเลือกเก็บจากต้นที่แข็งแรง ปราศจากโรค และแมลง ไม่มีการใช้สารเคมีป้องกันศัตรูพืชล่วงหน้า อย่างน้อย 30 วัน ก่อนการเก็บตัวอย่าง

3.1.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

แบ่งออกเป็น 4 ส่วนหลักดังแสดงในภาพที่ 3.1 ได้แก่



ภาพที่ 3.1 ส่วนต่าง ๆ ของต้นกระท้อนที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ก. ใบอ่อน ข. ใบแก่ ค. กิ่ง ง. เปลือกลำต้น

1. ใบอ่อน (Young leaves): คัดเลือกจากสีใบเขียวอ่อนสด แผ่นบาง และนิ่ม สามารถฉีกได้ง่าย โดยมีก้อยู่บริเวณยอดกิ่งใหม่
2. ใบแก่ (Mature leaves): คัดเลือกจากใบที่มีสีเขียวเข้ม เนื้อใบหนาและแข็ง เส้นกลางใบชัดเจน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ระหว่างระยะการเจริญของใบ

3. ยอดกิ่งก้าน (Twigs): ตัดจากกิ่งที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1 นิ้ว และมีเปลือกเรียบ ไม่แห้งแตก

4. เปลือกลำต้น (Bark): ปอกจากส่วนลำต้นระดับกลาง หน้า 0.5–1.0 เซนติเมตร สีเทาน้ำตาล ไม่ปนเนื้อเยื่อไม้

หลังการเก็บ ตัวอย่างทุกส่วนถูกนำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด ตามด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก จากนั้นนำไปตากลมให้สะเด็ดน้ำประมาณ 15 นาที ก่อนอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ $50 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนแห้งสนิท แล้วนำมาบดด้วยเครื่องบดไฟฟ้าให้ละเอียดจนได้ผงสม่ำเสมอ ผ่านตะแกรงเบอร์ 20–40 mesh เพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคใกล้เคียงกัน ก่อนนำไปใช้ในการสกัด

3.1.2 ตัวทำละลายและสารเคมี (Solvents and Reagents)

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารประกอบจากกระถ่อนมี 3 ชนิด โดยทั้งหมดเป็นเกรดวิเคราะห์ (AR grade) ได้แก่ 95% Ethanol (v/v) (Merck Germany), 50% Ethanol (v/v) ซึ่งเตรียมโดยการเจือจางเอทานอล 95% ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 และ Acetone (Merck Germany)

สารเคมีและรีเอเจนต์ที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดทั้งหมดเป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade) ประกอบด้วยสารมาตรฐาน (Standards) 5 ชนิด ได้แก่ Gallic acid (Sigma-Aldrich Co., USA) ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานในการหาปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC), Quercetin (Sigma-Aldrich Co., USA) ใช้เป็นสารมาตรฐานในการหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (TFC), Ascorbic acid (Sigma-Aldrich Co., USA) ใช้เป็นสารควบคุมบวก (positive control) ในการทดสอบ DPPH radical scavenging activity, Trolox (Sigma-Aldrich Co., USA) ใช้เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบ ABTS radical scavenging activity และ Kojic acid (Sigma-Aldrich Co., USA) ใช้เป็นสารควบคุมบวกในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase

สำหรับรีเอเจนต์อื่น (Reagents and Solutions) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ Folin–Ciocalteu reagent (Merck KGaA, Germany), Sodium carbonate (Ajax Finechem Pty Ltd.), Sodium nitrite (Sigma-Aldrich Co., USA), Aluminium chloride (Carlo Erba Reagents, Italy), Sodium hydroxide (เตรียมจากสารเกรดวิเคราะห์ของ Merck, Germany), DPPH (Sigma-Aldrich), ABTS (Sigma-Aldrich), Potassium persulfate (Merck KGaA), Phosphate buffer (0.1 mM, pH 6.8; เตรียมจาก K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 , Merck, Germany), L-DOPA (TCI, Japan) ตลอดจน Dragendorff's reagent, Ferric chloride (1%), Acetic anhydride และ Sulfuric acid (Merck KGaA, Germany)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ (Instruments and Apparatus)

งานวิจัยนี้ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ทางห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน เพื่อให้ผลการทดลองมีความถูกต้องและสามารถทำซ้ำได้ โดยเครื่องมือแบ่งตามลักษณะการใช้งานดังนี้

เครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างพืช ประกอบด้วย เตาอบลมร้อน (Hot Air Oven, Memmert Model UFE 400, Germany), เครื่องบดสมุนไพร (Grinder, Tefal, France), ตะแกรงร่อน (Sieve) ขนาด 20–40 mesh (Endecotts Ltd., UK) และเครื่องชั่งน้ำหนักดิจิทัล (Analytical Balance, Sartorius Entris II Model BCE224I-1S, Germany)

เครื่องมือสำหรับกระบวนการสกัด (Extraction Equipment) ประกอบด้วย เครื่องสกัดด้วยคลื่นเสียงอัลตราโซนิก (Ultrasonic Bath, Crest Ultrasonics, USA) สำหรับกระบวนการ Ultrasound-Assisted Extraction (UAE), เครื่องผสมแบบหมุนวน (Vortex Mixer, Scientific Industries, USA), เครื่องระเหยสารด้วยระบบสุญญากาศ (Rotary Evaporator, Eyela, Japan), กระดาษกรอง (Filter Paper, Whatman No.1, UK) และภาชนะบรรจุ (Amber Glass Bottle, Schott DURAN, Germany)

เครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์เชิงเคมีและชีวภาพ (Analytical Equipment) ได้แก่ ไมโครเพลตชนิด 96 หลุม (96-well Microplate, Corning Inc., USA), เครื่องอ่านไมโครเพลต (Microplate Reader, BioTek Synergy H1, USA) และเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter, Mettler Toledo, Switzerland)

เครื่องมือที่ใช้ในการขึ้นสูตรและทดสอบความคงตัว (Formulation and Stability Testing) ประกอบด้วย เครื่องกวนผสม (Overhead Stirrer หรือ Homogenizer, IKA, Germany), เครื่องวัดสี (Colorimeter, Konica Minolta CR-400, Japan) และตู้ทดสอบอุณหภูมิ (Incubator หรือ Stability Chamber, Memmert HPP110, Germany)

3.3 การสกัดด้วยคลื่นเสียง (Ultrasound-assisted Extraction; UAE)

การสกัดด้วยคลื่นเสียง (Ultrasound-Assisted Extraction; UAE) เป็นเทคนิคการสกัดสมัยใหม่ที่ใช้พลังงานจากคลื่นอัลตราโซนิกในการเร่งการถ่ายเทมวล (mass transfer) ระหว่างตัวทำละลายและเซลล์ของพืช ซึ่งช่วยให้การแตกตัวของผนังเซลล์เป็นไปอย่างรวดเร็วและสามารถดึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม เช่น การต้มสกัด หรือการแช่สกัด วิธีนี้ยังช่วยลดเวลาในการสกัด ปริมาณตัวทำละลาย และอุณหภูมิของกระบวนการ

จึงเหมาะสมกับการสกัดสารที่ไวต่อความร้อน เช่น กลุ่มโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์ (Hajji Nabih et al., 2023)

3.3.1 การเตรียมและสกัดสารจากตัวอย่างพืช

กระบวนการสกัดในงานวิจัยนี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hajji Nabih et al. (2023) โดยเริ่มต้นนำผงตัวอย่างพืชที่ผ่านการอบแห้งและบดละเอียด (3.1.1) ในแต่ละส่วน ได้แก่ ใบอ่อน ใบแก่ เปลือกลำต้น และยอดกิ่งก้าน มาชั่งน้ำหนักส่วนละ 6 กรัม จากนั้นเติมตัวทำละลายหนึ่งในสามชนิด (เอทานอล 95%, เอทานอล 50% หรือ อะซีโตน) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำการสกัดโดยใช้เครื่องอัลตราโซนิกบาส (Ultrasonic Bath) ที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 60 °C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 รอบ (cycles) โดยหลังจากครบการสกัดรอบแรก จะมีการนำสารละลายมาผสมแบบหมุนวน (vortex) เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกระจายตัวของอนุภาคก่อนเริ่มรอบที่สอง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการสกัดสารละลายที่ได้จะถูกนำไปกรองผ่านกระดาษกรองเพื่อแยกส่วนกากพืชออกจากของเหลวสกัด (filtrate)

3.3.2 การระเหยตัวทำละลายและการเก็บสารสกัด

ของเหลวสกัดที่ได้จากแต่ละตัวทำละลายจะถูกนำไป ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส จนได้สารสกัดเข้มข้น (crude extract) จากนั้นนำไปอบให้แห้งสนิทในตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีตัวทำละลายตกค้าง สารสกัดแต่ละตัวถูกเก็บในขวดแก้วสีชา ปิดฝาแน่น และติดฉลากระบุส่วนของพืชและชนิดของตัวทำละลาย ก่อนนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของสารสำคัญ เช่น สารโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน ซึ่งไวต่อแสงและความร้อน

3.3.3 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัด (%Yield)

ปริมาณผลได้ของสารสกัดแต่ละตัวคำนวณเป็นร้อยละ (% Yield) โดยอาศัยน้ำหนักของสารสกัดแห้งที่ได้หลังการระเหยเมื่อเทียบกับน้ำหนักผงตัวอย่างที่ใช้ในการสกัด ตามสมการที่ (1)

$$\%Yield = \frac{W_1}{W_2} \times 100 \quad (1)$$

โดยที่

W_1 = น้ำหนักของสารสกัดแห้งที่ได้ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักผงตัวอย่างพืชที่ใช้สกัด (กรัม)

ผลที่ได้จากการคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดใช้เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายแต่ละชนิดในการดึงสารออกฤทธิ์จากส่วนต่าง ๆ ของพืชกระท้อน

3.4 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening) มีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันการมีอยู่ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ในสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของกระท้อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) ได้แก่ ใบอ่อน ใบแก่ เปลือกลำต้น และยอดกิ่งก้าน สารในกลุ่มนี้มีรายงานว่ามียับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Bailly, 2022) อนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Bailly, 2022)

ในการทดสอบครั้งนี้ใช้วิธีตรวจเชิงคุณภาพ (qualitative chemical tests) โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี (colorimetric reaction) หรือตะกอนเฉพาะ ซึ่งสามารถบ่งบอกการมีอยู่ของสารกลุ่มหลัก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), เทอร์ปีนอยด์ (terpenoids), สเตอรอยด์ (steroids), อัลคาลอยด์ (alkaloids), และสารประกอบฟีนอลิก-แทนนิน (phenolic compounds and tannins) สำหรับการเตรียมสารตัวอย่าง จะนำสารสกัดหยาบ (crude extract) มาละลายในตัวทำละลายที่สอดคล้องกับชนิดของการสกัด กล่าวคือ สารสกัดที่ได้จาก 95% เอทานอล และ อะซีโตน จะถูกละลายในเอทานอล 95% ในขณะที่สารสกัดที่ได้จาก 50% เอทานอล จะถูกละลายในเอทานอล 50% จากนั้นจึงนำสารละลายตัวอย่าง (extract solution) ที่เตรียมได้ 1 หยด ไปใช้สำหรับการทดสอบแต่ละกลุ่มสาร

การทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative chemical tests) ทั้ง 5 รายการนี้ ดำเนินการตามวิธีมาตรฐานที่รายงานไว้ในงานวิจัยของ Kancherla et al. (2019), Sharma et al. (2020) และ Hamzah et al. (2020)

3.4.1 การตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids Test) (Hamzah et al., 2020)

สารฟลาโวนอยด์เมื่อทำปฏิกิริยากับด่างอ่อน เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จะให้สารละลายสีเหลือง และเมื่อเติมกรดอ่อน เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) สีจะหายไปหรือเปลี่ยนเป็นจางลง ทำโดยผสมสารสกัด 1 หยดกับเอทานอล 2 มิลลิลิตร เติมน้ำโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2N จำนวน 2-3 หยด สังเกตการเปลี่ยนสี จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง (dilute HCl) 1 หยด หากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้วจางลงหลังเติมกรด แสดงว่ามีสารในกลุ่ม Flavonoids

3.4.2 การตรวจสอบสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids Test) (Sharma et al., 2020)

สารเทอร์ปีนอยด์จะทำปฏิกิริยากับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) ในคลอโรฟอร์ม ให้สีแดง หรือน้ำตาลอันเป็นลักษณะเฉพาะของสารกลุ่มนี้ ทำโดยผสมสารสกัด 1 หยดกับคลอโรฟอร์ม 2

มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3 หยด สังเกตการเปลี่ยนสีที่บริเวณรอยต่อระหว่างชั้นของสาร หากเกิดสีแดงหรือน้ำตาล แสดงว่ามีสารในกลุ่ม Terpenoids

3.4.3 การตรวจสอบสารกลุ่มสเตอรอยด์ (Steroids Test) (Hamzah et al., 2020)

สารสเตอรอยด์ให้ปฏิกิริยา Liebermann–Burchard reaction กับกรดแอนไฮไดรด์และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ทำให้เกิดสีเขียวหรือน้ำเงินอันเป็นลักษณะเฉพาะของวงแหวนสเตอรอยด์ ทำโดยผสมสารสกัด 1 หยดกับคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติกแอนไฮไดรด์ (Anhydrous acetic acid) 10 หยด ตามด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2–3 หยด หากของเหลวเปลี่ยนเป็นสีเขียวหรือน้ำเงิน แสดงว่ามีสารในกลุ่ม Steroids

3.4.4 การตรวจสอบสารกลุ่มอัลคาลอยด์ (Alkaloids Test) (Kancherla et al., 2019)

สารอัลคาลอยด์เป็นสารประกอบที่มีไนโตรเจนในโครงสร้างโมเลกุล ซึ่งสามารถเกิดตะกอนสีส้มแดงเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย Dragendorff's reagent ทำโดยผสมสารสกัด 1 หยดกับเอทานอล 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Dragendorff's reagent จำนวน 3 หยด หากเกิดตะกอนหรือสีส้มแดง แสดงว่ามีสารในกลุ่ม Alkaloids

3.4.5 การตรวจสอบสารกลุ่มฟีนอลิกและแทนนิน (Phenolic Compounds and Tannins Test) (Kancherla et al., 2019)

สารฟีนอลิกและแทนนินสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) ให้สารละลายสีเขียวดำหรือน้ำเงินเข้ม ทำโดยผสมสารสกัด 1 หยดกับน้ำกลั่นร้อน 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 5% จำนวน 5 หยด หากเกิดสีเขียวดำหรือน้ำเงินเข้ม แสดงว่ามีสารในกลุ่ม Phenolics หรือ Tannins

ผลการตรวจสอบบันทึกในรูปแบบตาราง โดยใช้สัญลักษณ์ “(+)” แสดงว่าพบสารในกลุ่มนั้น ๆ และ “(-)” แสดงว่าไม่พบ โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของสีหรือตะกอนเป็นเกณฑ์ในการพิจารณา ผลที่ได้ช่วยระบุชนิดของสารพฤกษเคมีหลักในสารสกัดแต่ละชนิด ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่สามารถเชื่อมโยงกับฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทดสอบในขั้นตอนต่อไป เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.5 การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content; TPC)

การหาปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content; TPC) เป็นการวัดปริมาณสารในกลุ่มโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดจากพืช โดยใช้หลักการของ Folin–Ciocalteu colorimetric method ซึ่งอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชัน–รีดักชันระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับสารละลาย Folin–

Ciocalteu reagent ให้เกิดสารประกอบสีน้ำเงินเข้มที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 750–765 นาโนเมตร (Singleton et al., 1999) ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นแปรผันตรงกับปริมาณของสารฟีนอลิกในตัวอย่าง ในงานวิจัยนี้ ใช้ กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน (standard compound) และแสดงผลเป็นหน่วย มิลลิกรัมกรดแกลลิกสมมูลต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g extract)

ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Ladeska et al. (2022) โดยเริ่มต้นปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน ปริมาตร 20 μL ลงในหลุมของ 96-well microplate (ทำการทดสอบอย่างน้อย 3 ซ้ำ) จากนั้นเติม Folin–Ciocalteu reagent (เจือจาง 1:10) ปริมาตร 100 μL ลงในแต่ละหลุม เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 4 นาที ต่อมา เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (7.5% Na_2CO_3) ปริมาตร 80 μL ลงไป เขย่าผสมอีกครั้ง และนำไปบ่ม (incubate) ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้ม จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ในการคำนวณผลจะสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของกรดแกลลิกกับความเข้มข้น (0–250 $\mu\text{g/mL}$) เพื่อหาสมการเชิงเส้นในรูป

$$y = ax + b$$

โดยที่

- y = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง
- x = ค่าความเข้มข้นของกรดแกลลิก ($\mu\text{g/mL}$)

จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของกรดแกลลิกสมมูล (C , $\mu\text{g GAE/mL}$) ที่ได้จากกราฟมาตรฐานไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) ตามสมการ

$$\text{TPC}(\text{mg GAE/g extract}) = \frac{(C \times D \times V_t)}{(V_s \times W \times 1000)}$$

โดยที่

- C = ความเข้มข้นของกรดแกลลิกสมมูล ($\mu\text{g/mL}$) จากกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณ

จากสมการดังนี้ $C (\mu\text{g/mL}) = \left(\frac{y_{\text{sample}} - b}{a} \right)$

โดยที่ y_{sample} = ค่า Absorbance ของตัวอย่างสารสกัด

- D = ค่าการเจือจางของสารตัวอย่าง (dilution factor)

- V_t = ปริมาตรรวมของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (mL)
- V_s = ปริมาตรของสารละลายที่นำมาทดสอบ (mL)
- W = น้ำหนักของสารสกัดแห้งที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง (g)
- ค่าที่หาร 1000 ใช้สำหรับแปลง μg เป็น mg

ผลการวิเคราะห์ทั้งหมดจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) จากการทดสอบ 3 ซ้ำ โดยค่าที่ได้แสดงเป็นหน่วย mg GAE/g extract ซึ่งบ่งชี้ถึงปริมาณรวมของสารในกลุ่มโพลีฟีนอลในสารสกัดแต่ละชนิด ค่าที่สูงแสดงถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่มากขึ้น ข้อมูลจากการวิเคราะห์นี้ใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดของตัวทำละลายแต่ละชนิด (95 % Ethanol, 50 % Ethanol และ Acetone) เพื่อระบุว่าส่วนใดของพืชกระตุ้นให้ปริมาณฟีนอลิกสูงสุดและเหมาะสมสำหรับการพัฒนาเป็นส่วนผสมในตำรับเครื่องสำอาง

3.6 การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content; TFC)

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content; TFC) มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งเป็นสารพฤกษเคมีที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีผิว เช่น Tyrosinase (Bailly, 2022) โดยใช้หลักการของ Aluminium chloride colorimetric method ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดพืช หลักการของการทดสอบคือ สารประกอบฟลาโวนอยด์จะเกิดปฏิกิริยากับ Aluminium chloride (AlCl_3) ในสถานะที่เป็นกลางถึงด่างอ่อน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (flavonoid- Al^{3+} complex) ซึ่งให้สีเหลืองอ่อนถึงเหลืองเข้ม ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นแปรผันตรงกับปริมาณของฟลาโวนอยด์ในสารสกัด โดยใช้ Quercetin เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบผล

ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Ladeska et al. (2022) โดยเริ่มต้นเปิดสารละลายตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน ปริมาตร 20 μL ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท จากนั้นเติมสารละลาย Aluminium chloride 10% ปริมาตร 20 μL และสารละลาย Potassium acetate 1 M ปริมาตร 20 μL ตามลำดับ ต่อมาจึงเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) 160 μL เพื่อปรับปริมาตรรวมในแต่ละหลุมให้เป็น 220 μL ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ สุดท้าย นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

ในการคำนวณผลจะสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ Quercetin (0–250 µg/mL) เพื่อหาสมการเชิงเส้นในรูป

$$y=ax+b$$

โดยที่

- y = ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง
- x = ค่าความเข้มข้นของ Quercetin (µg/mL)

จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของ Quercetin สมมูล (C , µg GE/mL) ที่ได้จากกราฟมาตรฐานไปคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกรวม (TFC) ตามสมการ

$$\text{TFC (mg GAE/g extract)} = \frac{(C \times D \times V_t)}{(V_s \times W \times 1000)}$$

โดยที่

จากสมการดังนี้ C (µg/mL) = $\left(\frac{y_{\text{sample}} - b}{a} \right)$

โดยที่ y_{sample} = ค่า Absorbance ของตัวอย่างสารสกัด

- D = ค่าการเจือจางของสารตัวอย่าง (dilution factor)
- V_t = ปริมาตรรวมของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ (mL)
- V_s = ปริมาตรของสารละลายที่นำมาทดสอบ (mL)
- W = น้ำหนักของสารสกัดแห้งที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง (g)
- ค่าที่หาร 1000 ใช้สำหรับแปลง µg เป็น mg

ผลการวิเคราะห์ทั้งหมดจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) จากการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดยค่าที่ได้แสดงเป็นหน่วย mg QE/g extract (มิลลิกรัมเคอร์ซีตินสมมูลต่อกรัมของสารสกัดแห้ง) ค่าที่สูงบ่งบอกถึงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดที่มาก ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในขั้นตอนการวิเคราะห์ต่อไป

3.7 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ใช้หลักการวัดความสามารถของสารสกัดในการบริจาคอิเล็กตรอนหรืออะตอมของไฮโดรเจนให้กับอนุมูลอิสระ 2,2-

diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีสีม่วงเข้ม เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ DPPH[•] จะเปลี่ยนเป็นสารที่มีรูปแบบปรีดิซ (DPPH-H) ที่มีสีจางลงจากม่วงเข้มเป็นเหลือง ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง (Ghadigaonkar et al., 2021) การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงนี้สามารถใช้วัดศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างได้

ในการทดลองนี้ เริ่มต้นด้วยการเตรียมสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid standard) โดยเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) ที่ 1 mg/mL (10 mg ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 10 mL) จากนั้นนำมาเจือจางเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 µg/mL สำหรับใช้สร้างกราฟมาตรฐาน ในส่วนของสารละลาย DPPH (0.147 mM) เตรียมโดยละลายผง DPPH 5.79 mg ในเอทานอล 100 mL (หรือ 2.895 mg ใน 50 mL) โดยต้องเก็บในขวดสีชาและปิดฝาปิดสนิทเพื่อป้องกันแสงเนื่องจากสารมีความไวต่อแสงและออกซิเจน สำหรับการเตรียมสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกระถ่อน ใบอ่อน ใบแก่ เปลือกลำต้น และยอดกิ่งก้าน) ปริมาณ 1 mg แล้วละลายในตัวทำละลายที่ใช้สกัด (95% Ethanol, 50% Ethanol หรือ Acetone) ปริมาตร 1 mL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 mg/mL ก่อนนำไปเจือจางต่อเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ

ดำเนินการทดลองตามวิธีของ Ghadigaonkar et al., 2021 โดยเริ่มต้นด้วยการปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน ปริมาตร 20 µL ลงในหลุมของ 96-well microplate จากนั้นเติมสารละลาย DPPH (0.147 mM) ปริมาตร 180 µL ลงในแต่ละหลุม ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ vortex เบา ๆ และนำไปบ่ม (incubate) ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เมื่อครบกำหนดเวลา จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader โดยในการทดลองนี้ได้ใช้เอทานอลเป็น blank และกรดแอสคอร์บิกเป็น positive control ทั้งนี้ การทดสอบทั้งหมดได้ทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) เพื่อความถูกต้องของผลลัพธ์

ในการคำนวณผลจะคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) ตามสมการ

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}}\right) \times 100$$

โดยที่

- A_{Control} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารสกัด (Blank)
- A_{Sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารสกัด

จากนั้นพล็อตกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อคำนวณหา ค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้ง 50 % (IC_{50}) ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์

ผลการวิเคราะห์จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) จากการ ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยเปรียบเทียบค่าระหว่างตัวทำละลายต่าง ๆ (95% Ethanol, 50% Ethanol, Acetone) และส่วนต่าง ๆ ของพืช (ใบอ่อน ใบแก่ เปลือก ยอดกิ่งก้าน) สารสกัดที่มีค่า %Inhibition สูง และค่า IC_{50} ต่ำ แสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า

3.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Radical Scavenging Assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging assay ดำเนินการตาม วิธีของ Leakaya et al. (2018) โดยใช้หลักการวัดความสามารถของสารสกัดในการกำจัดอนุมูลอิสระ ชนิด $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation) ซึ่งเป็น อนุมูลอิสระที่มีสีเขียวอมฟ้าเข้ม เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้สีจางลง

การเตรียมสารละลายเริ่มต้นด้วยการเตรียมสารละลาย ABTS (7.4 mM) โดยชั่งสาร ABTS 0.202 g ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน (DI water) 50 mL และเตรียมสารละลายโพแทสเซียม เปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate, 2.6 mM) โดยชั่งสาร $K_2S_2O_8$ 0.035 g ละลายใน DI water 50 mL จากนั้น ผสมสารละลายทั้งสองชนิดในอัตราส่วน 1:1 เพื่อสร้างอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ (radical cation solution) โดยตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12–16 ชั่วโมง ก่อนการใช้งาน ให้นำ สารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ นี้มาเจือจางด้วยเมทานอลจนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ได้ ประมาณ 1.100 ± 0.020 ที่ 734 nm สำหรับสารมาตรฐาน Trolox เตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution) 1 mg/mL (10 mg ในเอทานอล 10 mL) แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0–250 μ g/mL เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน ในส่วนของสารละลายตัวอย่าง เตรียมโดยชั่งสารสกัดจากกระถ่อน (ใบ อ่อน ใบแก่ เปลือก ยอดกิ่งก้าน) 1 mg ละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม (95% Ethanol, 50% Ethanol หรือ Acetone) 1 mL เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1 mg/mL

การทดลองเริ่มต้นโดยปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารมาตรฐาน Trolox ปริมาตร 10 μ L ลงในหลุมของ 96-well microplate จากนั้นเติมสารละลาย $ABTS^{\bullet+}$ ที่เตรียมไว้ 200 μ L ลงในแต่ละ หลุม ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบา ๆ และตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที เมื่อ ครบกำหนดเวลา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 734 นาโนเมตร โดย ใช้เอทานอลเป็น blank และ Trolox เป็นสารควบคุมบวก (positive control) การทดสอบทั้งหมด ดำเนินการซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) เพื่อความแม่นยำของข้อมูล

ในการคำนวณผลจะคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (ABTS radical scavenging activity) ตามสมการ

$$\text{Inhibition}(\%) = \left(1 - \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}}\right) \times 100$$

โดยที่

- A_{Control} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS $\cdot^+$ ที่ไม่มีสารสกัด (Blank)
- A_{Sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS $\cdot^+$ ที่มีสารสกัด

จากนั้นพล็อตกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้ง 50 % (IC_{50}) ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดศักยภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

ผลการวิเคราะห์จะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง โดยเปรียบเทียบค่าระหว่างตัวทำละลายต่าง ๆ (95% Ethanol, 50% Ethanol, Acetone) และส่วนต่าง ๆ ของพืช (ใบอ่อน ใบแก่ เปลือก ยอดกิ่งก้าน) สารสกัดที่มีค่า %Inhibition สูง และค่า IC_{50} ต่ำ แสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า

3.9 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase Inhibition Assay)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibition assay) ดำเนินการตามวิธีของ Cui et al. (2018) มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพของสารสกัดจากกระถ่อนในการลดการเกิดเม็ดสีเมลานิน ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเม็ดสีผิว (melanogenesis) โดยเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์สำคัญที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ L-tyrosine และ L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ให้เป็น dopaquinone และสารอนุพันธ์ต่อมา จนนำไปสู่การเกิดเมลานิน

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เริ่มต้นด้วยการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer, 0.1 M, pH 6.8) ซึ่งใช้เป็นบัฟเฟอร์ในปฏิกิริยาและใช้เป็นสารควบคุมลบ (Negative control) สารละลายซับสเตรท (Substrate solution) เตรียมโดยละลาย L-DOPA ในบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้น 10 mM และเตรียมเอนไซม์ Mushroom tyrosinase ให้มีความเข้มข้น 250 U/mL ในบัฟเฟอร์เช่นกัน สำหรับสารควบคุมบวก (Positive control) ใช้สารละลายกรดโคจิก (Kojic acid) โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ที่ 1 mg/mL แล้วนำมาเจือจางต่อเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบ ในส่วนของสารละลายตัวอย่าง (Sample

solution) เตรียมโดยนำสารสกัดหยาบจากกระถ่อนมาละลายในตัวทำละลายที่สอดคล้องกับการสกัด (เช่น 95% Ethanol, 50% Ethanol หรือ Acetone) เพื่อให้ได้สารละลายเข้มข้น (Stock solution) ที่ 1 mg/mL ก่อนนำไปเจือจางต่อเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ

เริ่มการทดลองโดยปิเปตสารละลาย L-DOPA ปริมาตร 40 μ L ลงในหลุมของ 96-well microplate ตามด้วย phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) ปริมาตร 80 μ L และสารสกัดตัวอย่าง หรือสารมาตรฐาน kojic acid ปริมาตร 40 μ L จากนั้นจึงเติมเอนไซม์ mushroom tyrosinase (250 U/mL) ปริมาตร 40 μ L เพื่อเริ่มปฏิกิริยา ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันโดยการเขย่าเบา ๆ และนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยา เมื่อครบกำหนดเวลา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร โดยทดสอบทั้งหมดดำเนินการซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) เพื่อความถูกต้องของผลลัพธ์

ในการคำนวณผลจะคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสตามสมการ

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}}\right) \times 100$$

โดยที่

- A_{Control} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่มีสารสกัด (Blank)
- A_{Sample} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารสกัด

จากนั้นพล็อตกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งกับความเข้มข้นของสารสกัด เพื่อคำนวณหา ค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้ง 50 % (IC_{50}) ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์

ผลการวิเคราะห์จะรายงานเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งหน่วยการแสดงผลคือ เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%) และ ค่าความเข้มข้น IC_{50} (μ g/mL) สารสกัดที่มีค่า % inhibition สูงและค่า IC_{50} ต่ำ แสดงถึงศักยภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.10 การวิเคราะห์สถิติ (Statistics Analysis)

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมด ได้แก่ ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (TPC), ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC), ค่า IC_{50} จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ ABTS) และค่า IC_{50} จากการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จะถูกนำเสนอในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) โดยทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้งการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดจะดำเนินการโดยใช้โปรแกรม SPSS ร่วมกับ python โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวน ข้อมูลจะถูกตรวจสอบข้อกำหนดเบื้องต้นทางสถิติ (Statistical Assumptions) 2 ประการ คือ การแจกแจงปกติของข้อมูล (Normality) โดยใช้การทดสอบ Shapiro-Wilk test และ ความเป็นเอกพันธ์ของความแปรปรวน (Homogeneity of Variance) โดยใช้การทดสอบ Levene's test เนื่องจากการศึกษานี้มีปัจจัยที่สนใจ 2 ปัจจัย (Two-Factorial Design) ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือ ชนิดของส่วนพืช (เช่น ใบอ่อน, ใบแก่, เปลือก, กิ่ง) และ ปัจจัยที่ 2 คือ ชนิดของตัวทำละลาย (เช่น 95% ethanol, 50% ethanol, acetone) จึงใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two-Way ANOVA) เพื่อตรวจสอบผลกระทบหลัก (Main effects) ของแต่ละปัจจัย และผลกระทบร่วม (Interaction effect) ระหว่างปัจจัยทั้งสองต่อการตอบสนอง ในกรณีที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จะทำการเปรียบเทียบพหุคูณ (Multiple Comparisons) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธี Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) post-hoc test เพื่อระบุว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มใดบ้างที่แตกต่างกัน

3.11 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlation Analysis)

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linear relationship) ระหว่างตัวแปรเชิงปริมาณ 2 ตัว (เช่น ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ TPC และค่า IC_{50} ของ ABTS) จึงใช้การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient, r) การทดสอบนี้ใช้ในกรณีที่ข้อมูลของตัวแปรทั้งสองมีการแจกแจงแบบปกติ (จากการทดสอบ Shapiro-Wilk test) โดยจะรายงานค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เพื่ออธิบายทิศทาง (บวกหรือลบ) และความแรงของความสัมพันธ์ และใช้ค่า p -value เพื่อทดสอบนัยสำคัญทางสถิติ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

3.12 การวิเคราะห์การจัดอันดับศักยภาพของสารสกัด (Composite Ranking Analysis)

ในการประเมินศักยภาพทางชีวภาพของสารสกัดจากพืช (Plant extract) การพิจารณาผลจากการทดสอบเพียงด้านเดียวอาจนำไปสู่ข้อสรุปที่คลาดเคลื่อน ตัวอย่างเช่น สารสกัดที่มี TPC สูง อาจมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase ที่ต่ำ ดังนั้น เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่เป็นองค์รวม (Holistic evaluation) และสามารถระบุ "สารสกัดที่มีศักยภาพสูงสุด" (Most potent extract) ได้อย่างน่าเชื่อถือ จึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์ที่สามารถบูรณาการผลลัพธ์จากหลายตัวแปรพร้อมกัน (Hall et al., 2022) อย่างไรก็ตาม การรวมผลลัพธ์โดยตรงไม่สามารถทำได้ เนื่องจากความแตกต่างสองประการ ประการแรก

คือ หน่วยที่แตกต่างกัน (Different Units) เช่น TPC (mg GAE/g), TFC (mg QE/g) และ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) และประการที่สองคือ ทิศทางของประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน (Different Directions of Efficacy) กล่าวคือ TPC (ค่ายิ่งสูงยิ่งดี) ในขณะที่ IC_{50} (ค่ายิ่งต่ำยิ่งดี) การศึกษานี้จึงประยุกต์ใช้แนวคิด Composite Ranking Analysis โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้าง "คะแนนรวม" (Composite Score) ที่เป็นหนึ่งเดียว สำหรับสารสกัดแต่ละชนิด โดยอ้างอิงแนวคิดการสร้างดัชนีรวม (Composite Index) และการจัดอันดับคุณภาพ (Quality Ranking) (Ćirović et al., 2019; Gite et al., 2015) และใช้การแปลงค่ามาตรฐาน Z-score (Z-score Standardization) เป็นเครื่องมือทางสถิติหลักในการปรับสเกลข้อมูล (Andrade, 2021) เพื่อจัดปัญหาความแตกต่างของหน่วยและสเกล การวิเคราะห์นี้จจะรวมผลการทดสอบทั้ง 4 รายการ ได้แก่ TPC, TFC, DPPH และ ABTS เพื่อจัดลำดับศักยภาพของสารสกัดจากกระท้อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) อย่างเป็นระบบ

กระบวนการคำนวณ Composite Score แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลัก ขั้นตอนแรกคือ การแปลงทิศทางข้อมูล (Data Transformation) เพื่อปรับทิศทางของข้อมูลดิบทั้ง 4 ตัวแปรให้มีทิศทางเดียวกันคือ "ค่ายิ่งสูง = ประสิทธิภาพยิ่งดี" โดยในกลุ่มที่ 1 (TPC และ TFC) ซึ่งเป็นค่าที่ ยิ่งสูงยิ่งดีอยู่แล้ว จะใช้ค่าเดิมไม่ต้องแปลงค่า ส่วนกลุ่มที่ 2 (DPPH IC_{50} , ABTS IC_{50} , และ Tyrosinase IC_{50}) ซึ่งเป็นค่าที่ ยิ่งต่ำยิ่งดี จะถูกแปลงเป็นค่าศักยภาพ (Potency value) โดยใช้ค่าส่วนกลับ (Reciprocal) คือ $1/IC_{50}$ ขั้นตอนที่สองคือ การแปลงค่าให้อยู่ในรูปมาตรฐาน (Standardization via Z-score) หลังจากข้อมูลทั้ง 4 ตัวแปรมีทิศทางเดียวกันแล้ว (TPC, TFC, $1/IC_{50_DPPH}$, $1/IC_{50_ABTS}$) ข้อมูลเหล่านี้จะถูกนำมาแปลงเป็นค่ามาตรฐาน Z-score เพื่อจัดหน่วย (Unitless) และปรับให้ข้อมูลทั้งหมดอยู่บนสเกลมาตรฐานเดียวกัน (Andrade, 2021) โดย Z-score จะคำนวณแยกกันในแต่ละการทดสอบ โดยใช้สูตร:

$$z = \frac{(x - \mu)}{\sigma}$$

โดยที่ z คือ ค่ามาตรฐาน Z-score ของตัวอย่างนั้น, x คือ ค่าจริงของตัวอย่าง (ที่ผ่านการแปลงค่าในขั้นตอนที่ 1 แล้ว), μ คือ ค่าเฉลี่ย (Mean) ของตัวอย่างทั้งหมดในการทดสอบนั้น, และ σ คือ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) ของตัวอย่างทั้งหมดในการทดสอบนั้น

ขั้นตอนที่สามคือ การคำนวณคะแนนรวม (Composite Score Aggregation) ค่า Z-score ทั้ง 5 ค่าของสารสกัดแต่ละชนิด จะถูกนำมาหาค่าเฉลี่ย (Average) เพื่อคำนวณเป็นคะแนนรวมสุดท้าย โดยให้ความสำคัญ (Weighting) กับทุกการทดสอบเท่ากัน (Andrade, 2021; Gite et al., 2015) ตามสมการ

$$\text{Composite Score} = \frac{Z_{\text{TPC}} + Z_{\text{TFC}} + Z_{\text{DPPH}} + Z_{\text{ABTS}}}{n}$$

โดยที่ n คือจำนวนการทดสอบทั้งหมด (ในที่นี้คือ 4)

ในการแปลผลคะแนน Composite Score จะมีจุดอ้างอิง (Benchmark) คือ "คะแนน 0 (ศูนย์)" ซึ่งหมายถึง "ค่าเฉลี่ย" ของประสิทธิภาพโดยรวมของสารสกัดทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ ดังนั้น หากสารสกัดใดมี Composite Score > 0 (ค่าเป็นบวก) หมายความว่าสารสกัดนั้นมีประสิทธิภาพโดยรวมสูงกว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่ม (ยังมีค่าเป็นบวกสูง แสดงว่าเป็นสารสกัดที่มีศักยภาพโดดเด่น) ในทางกลับกัน หากมี Composite Score < 0 (ค่าเป็นลบ) หมายความว่าประสิทธิภาพโดยรวมต่ำกว่าค่าเฉลี่ย และหากมี Composite Score ~ 0 หมายความว่าประสิทธิภาพโดยรวมใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มจากนั้น จึงทำการ จัดอันดับ (Ranking) โดยนำค่า Composite Score ที่คำนวณได้ของสารสกัดแต่ละชนิด มาจัดเรียงลำดับจากค่าสูงสุด (บวกมากที่สุด) ไปยังค่าต่ำสุด (ลบมากที่สุด) (Gite et al., 2015) เพื่อระบุว่าสารสกัดจากส่วนใดและตัวทำละลายใด มีศักยภาพทางชีวภาพโดยรวมดีที่สุด สารสกัดที่มีค่า Composite Score สูงที่สุด (Rank 1) จะถูกพิจารณาเป็น สารสกัดหลัก (Active Extract) หรือ "Most Potent Extract" เพื่อนำไปต่อยอดในการศึกษาเชิงลึกต่อไป

3.13 การพัฒนาตำรับและการทดสอบความคงตัว (Formulation and Stability Testing)

คัดเลือกสารสกัดที่มีศักยภาพสูงที่สุดเพื่อนำไปพัฒนาเครื่องสำอางต้นแบบ 2 สูตร ได้แก่ เซรั่มใสเนื้อเจล (water-gel serum) และเจลครีมชนิด O/W (brightening gel-cream) เพื่อเปรียบเทียบความเหมาะสมด้านเนื้อสัมผัสและความคงตัวของตำรับ

3.13.1 การเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์

Prototype 1 (Water-Gel Serum): เตรียมส่วนของน้ำ (water phase) โดยละลาย Disodium EDTA, Glycerin, 1,3-Propanediol และ Panthenol ใน DI Water จากนั้นค่อย ๆ โปริย Carbomer 980 (หรือ Xanthan gum) ลงไป กวนจนกระทั่งพองตัวสม่ำเสมอเป็นเนื้อเจลใส ทำการปรับค่า pH (neutralize) ด้วย NaOH 10% จนได้ความหนืดที่ต้องการ จากนั้นจึงเติมสารสกัดกระเทียม 1.60% และสารกันเสีย (Phenoxyethanol (and) Ethylhexylglycerin) กวนผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว

Prototype 2 (Brightening Gel-Cream): เตรียมตำรับด้วยวิธี O/W emulsification โดยแบ่งส่วนผสมออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ (A) ส่วนของน้ำ (Water phase) และ (B) ส่วนของน้ำมัน (Oil

phase) (A) ส่วนของน้ำ: ผสม DI Water, Disodium EDTA, Glycerin และ 1,3-Propanediol เข้าด้วยกัน ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 75-80 °C (B) ส่วนของน้ำมัน: ผสม C12-15 Alkyl Benzoate, Caprylic/Capric Triglyceride, Glyceryl Stearate Citrate, Polysorbate-60 และ Cetearyl Alcohol (สารสร้างเนื้อและอิมัลซิไฟเออร์) เข้าด้วยกัน ให้ความร้อนจนละลายเป็นเนื้อเดียวที่อุณหภูมิประมาณ 75-80 °C จากนั้น ค่อยๆ เทส่วน (B) ลงในส่วน (A) ขณะปั่นกวนด้วยเครื่องกวนผสม (Homogenizer) ที่ความเร็วสูงเพื่อให้เกิดอิมัลชัน (emulsification) ปั่นกวนต่อจนเนื้อครีมเข้ากันดี แล้วเปลี่ยนเป็นเครื่องกวนผสมแบบใบพัด (Overhead Stirrer) กวนต่อจนกระทั่งอุณหภูมิ ลดลงต่ำกว่า 40 °C จึงเติมสารสกัดกระท้อน 1.60% และสารกันเสีย กวนให้เข้ากัน และปรับค่า pH สุดท้ายด้วย NaOH (ถ้าจำเป็น)

ตารางที่ 3.1 Prototype 1 — Serum (Water-Gel Serum)

ส่วนประกอบ	%w/w	หน้าที่
DI Water	q.s. to 100	ตัวทำละลาย
Disodium EDTA	0.10	Chelator
Glycerin	3.00	Humectant
1,3-Propanediol	5.00	Co-solvent/Humectant
Panthenol	1.00	Soothing/Moisturizer
Carbomer 980	0.30	Thickener/ Gel former
Santol extract	1.60	Active
Phenoxyethanol (and)	1.00	Preservative
Ethylhexylglycerin		
NaOH 10%	q.s.	pH adjustor/ Neutralizer

ตารางที่ 3.2 Prototype 2 — Brightening Gel-Cream (O/W Emulsion)

ส่วนประกอบ	%w/w	หน้าที่
DI Water	q.s. to 100	ตัวทำละลาย
Disodium EDTA	0.05	Chelator
Glycerin	3.00	Humectant
1,3-Propanediol	5.00	Co-solvent/Humectant
C12-15 Alkyl Benzoate	5.00	Light emollient
Caprylic/Capric Triglyceride	4.00	Emollient

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	%w/w	หน้าที่
Glyceryl Stearate Citrate	3.00	O/W emulsifier
Polysorbate-60	1.00	co-emulsifier
Cetearyl Alcohol	2.00	Thickener/Stabilizer
Santol extract	1.60	Active
Phenoxyethanol (and)	1.00	Preservative
Ethylhexylglycerin		
NaOH 10%	q.s.	pH adjustor

3.13.2 วิธีทดสอบความคงตัว (Stability Testing Procedure)

การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ จากงานวิจัยของ ดวงกมล เสียวกิตติกุล และคณะ (2553) และกนกวรรณ ฉัตรเงิน (2567) ดำเนินการโดยการทดสอบสภาวะเร่งแบบสลับร้อนเย็น (Heating–Cooling Cycle) จำนวน 6 รอบ โดย 1 รอบการทดสอบ ประกอบด้วย การเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สลับกับการเก็บที่อุณหภูมิ $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รวม 48 ชั่วโมงต่อรอบ) หลังจากสิ้นสุดการทดสอบในแต่ละรอบ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์จะถูกนำมาประเมินคุณลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ การสังเกตลักษณะภายนอก, การวัดค่าสี (ด้วยเครื่องวัดสี), การวัดค่า pH, และการประเมินความหนืด (โดยการให้คะแนน)

3.13.3 วิธีประเมินลักษณะผลิตภัณฑ์ (Evaluation Parameters)

การประเมินลักษณะผลิตภัณฑ์ประกอบด้วย 4 ด้านหลัก ได้แก่

1. ลักษณะภายนอก โดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น การแยกชั้น การตกตะกอน ความใส เนื้อสัมผัส และกลิ่น เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ในวันเริ่มต้น
2. การวัดค่าสี ด้วยเครื่อง Colorimeter ในระบบ CIE Lab* โดยทำการทดสอบซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้งต่อตัวอย่าง และรายงานผลเป็นค่าความแตกต่างของสี (ΔE) ซึ่งจะถือว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อค่า $\Delta E < 1.0$
3. การวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ที่ผ่านการสอบเทียบก่อนใช้งาน โดยมีเกณฑ์ยอมรับของผลิตภัณฑ์อยู่ในช่วง 5.5–6.5
4. การประเมินความหนืด (Viscosity scoring) ซึ่งประเมินโดยผู้ประเมินจำนวน 3 คน ทำการให้คะแนนความหนืดตั้งแต่ 1 ถึง 5 (1 = เหลวมาก, 5 = หนืดมาก) และรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย

3.13.4 ตั้งตำรับที่มีส่วนประกอบของสารสกัดกระท้อน

เตรียมตำรับที่มีส่วนประกอบของสารสกัดกระท้อนลงในสูตรเครื่องสำอางต้นแบบ 2 สูตร ได้แก่ เซรั่มใสเนื้อเจล (water-gel serum) และ เจลครีมชนิด O/W (brightening gel-cream) และนำไปทดสอบความคงตัวละประเมินลักษณะผลิตภัณฑ์ ตามข้อ 3.13.2 และ 3.13.3



บทที่ 4

ผลการวิจัย (RESULT AND DISCUSSION)

4.1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัด (%Yield)

ตารางที่ 4.1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัด (%Yield) ของสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของกระถ่อน ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน

ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	%Yield
ใบอ่อน	95%Ethanol	15.17±0.84 ^{cB}
ใบอ่อน	50%Ethanol	24.67±1.17 ^{bA}
ใบอ่อน	Acetone	4.44±0.92 ^{efC}
ใบแก่	95%Ethanol	17.89±1.34 ^{cB}
ใบแก่	50%Ethanol	29.22±1.68 ^{aA}
ใบแก่	Acetone	5.78±0.25 ^{eC}
กิ่งก้าน	95%Ethanol	2.61±0.35 ^{fgB}
กิ่งก้าน	50%Ethanol	5.167±0.00 ^{efA}
กิ่งก้าน	Acetone	0.89±0.10 ^{gC}
เปลือก	95%Ethanol	3.28±0.09 ^{fB}
เปลือก	50%Ethanol	3.94±0.19 ^{aefA}
เปลือก	Acetone	2.55±0.25 ^{fgC}

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ตัวอักษรพิมพ์เล็ก (a, b, c...) ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ในขณะที่ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A, B, C...) ที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) ของตัวทำละลายภายในส่วนสกัดเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Two-Way ANOVA) พบปฏิกริยาสัมพันธ์ (Interaction) ระหว่างปัจจัยส่วนสกัดและตัวทำละลาย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์อิทธิพลของตัวทำละลาย (Simple Main Effect) ภายในแต่ละส่วนสกัดแยกจากกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ชี้ให้เห็นว่า สารสกัดจากใบแก่ที่สกัดด้วย 50% Ethanol ให้ร้อยละผลผลิตของสาร

สกัดสูงที่สุด ($29.22 \pm 1.68\%$) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากตัวทำละลายอื่นทั้งหมด รองลงมาคือ สารสกัดจาก ใบอ่อน ที่สกัดด้วย 50% Ethanol เช่นกัน ($24.67 \pm 1.17\%$) เมื่อพิจารณาการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 12 กลุ่ม (อักษรพิมพ์เล็ก a, b, c...) พบว่า สารสกัดจากใบแก่ด้วย 50% Ethanol ให้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (กลุ่ม a) รองลงมาคือสารสกัดจากใบอ่อนด้วย 50% Ethanol (กลุ่ม b) ในขณะที่กลุ่มสารสกัดจากกิ่งก้านและเปลือกด้วย Acetone ให้ผลได้ต่ำที่สุด (กลุ่ม g) ซึ่งแสดงให้เห็นลำดับประสิทธิภาพของการสกัดอย่างชัดเจนตั้งแต่ส่วนของใบที่สกัดด้วย 50% Ethanol ลงไปจนถึงส่วนแข็งที่สกัดด้วย Acetone เมื่อพิจารณาอิทธิพลของตัวทำละลายในภาพรวม พบว่า เอทานอล 50% (50% Ethanol) เป็นตัวทำละลายที่ให้ค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกส่วนของพืช เมื่อเปรียบเทียบกับ 95% Ethanol และ Acetone

ผลลัพธ์นี้สอดคล้องเป็นอย่างดีกับงานวิจัยจำนวนมาก ที่ยืนยันว่าการใช้เอทานอลผสมน้ำ (Aqueous ethanol) ในช่วงความเข้มข้นปานกลางมักให้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดสูงกว่าเอทานอลความเข้มข้นสูง โดยมีรายงานในพืชหลายชนิด เช่น การสกัดใบแก้ว (*Murraya paniculata*) ที่พบว่า 50% Ethanol ให้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดสูงที่สุด (ธนัชสิทธิ์ พูนไพบูลย์พิพัฒน์, 2562) การสกัดเมล็ดลิ้นจี่ ที่ให้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดสูงสุดในช่วง 41-53% Ethanol (Sai-Ut et al., 2023) ซึ่งอธิบายได้ว่า ตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ (polar-mixed solvent) มีช่วงความมีขั้ว (polarity) ที่เหมาะสม สามารถสกัดสารประกอบได้หลากหลาย ทั้งสารที่มีขั้วสูง (ละลายในน้ำ) และสารที่มีขั้วปานกลาง (ละลายในเอทานอล) ออกมาจากเนื้อเยื่อพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Biswas et al., 2023; Do et al., 2014)

ในทางตรงกันข้าม ผลการวิเคราะห์ Tukey's HSD ยังชี้ชัดว่า สารสกัดที่ใช้ Acetone เป็นตัวทำละลาย ให้ค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกส่วนของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน กิ่งก้าน ($0.89 \pm 0.10\%$) และ เปลือก ($2.55 \pm 0.25\%$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการสกัดเปลือกสน (*Pinus pinaster*) ที่พบว่าตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำเกินไปทำให้ร้อยละผลผลิตน้อยกว่าตัวทำละลายผสมน้ำ (Vieito et al., 2018) สำหรับการสกัดด้วย 95% Ethanol ให้ผลได้ในระดับปานกลาง ซึ่งผลการทดสอบยืนยันว่ายังคงให้ค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดสูงกว่า Acetone อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในทุกกลุ่มตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างส่วนของพืช พบว่า ส่วนใบ (ทั้งใบอ่อนและใบแก่) ให้ผลได้ของสารสกัดสูงกว่าส่วนของกิ่งก้านและเปลือกอย่างชัดเจนในทุกตัวทำละลายที่ใช้

4.2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening)

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening) ในสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกระท้อนด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน

ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	Flavonoids Test	Terpenoid Test	Steroids Test	Alkaloids Test	Phenolic and Tannins Test
ใบอ่อน	95%Ethanol	+	-	+	-	+
ใบอ่อน	50%Ethanol	+	-	+	+	+
ใบอ่อน	Acetone	+	+	+	-	+
ใบแก่	95%Ethanol	+	+	+	-	+
ใบแก่	50%Ethanol	+	-	+	+	+
ใบแก่	Acetone	+	+	+	-	+
กิ่งก้าน	95%Ethanol	+	+	+	+	+
กิ่งก้าน	50%Ethanol	+	+	+	+	+
กิ่งก้าน	Acetone	+	+	+	+	+
เปลือก	95%Ethanol	+	-	+	+	+
เปลือก	50%Ethanol	+	-	+	+	+
เปลือก	Acetone	+	-	+	+	+

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงสัญลักษณ์ “(+)” แสดงว่าพบสารในกลุ่มนั้น ๆ และ “(-)” แสดงว่าไม่พบสาร โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของสีหรือตะกอนเป็นเกณฑ์ในการพิจารณา

ผลการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening) เพื่อจำแนกกลุ่มสารประกอบทุติยภูมิ 5 ชนิด ในสารสกัดกระท้อนทั้ง 12 ตัวอย่าง สรุปผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยใช้วิธีการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดสีและการตกตะกอนตามมาตรฐาน (Dauda et al., 2020; Sembiring et al., 2017)จากการทดสอบ พบว่าสารสกัดทั้ง 12 ชนิด ให้ผลบวก (Positive, +) ต่อการทดสอบสาร 3 กลุ่มอย่างชัดเจน ได้แก่ กลุ่มฟีนอลิกและแทนนิน (Phenolic and Tannins) ซึ่งทุกตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นชั้นสีน้ำเงินเข้มหรือสีน้ำเงินเขียว; กลุ่มสเตียรอยด์ (Steroids) ซึ่งทุกตัวอย่างให้ผลบวกโดยการเกิดตะกอนขาวขุ่น (White cloudy precipitate); และ กลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ซึ่งส่วนใหญ่ให้ผลบวกโดยการเปลี่ยนเป็นสีส้มอิฐขุ่นเล็กน้อย หรือเกิดตะกอน

สีส้ม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่ากระถ่อนเป็นพืชที่อุดมไปด้วยสารกลุ่มโพลีฟีนอล และฟลาโวนอยด์ในทุกส่วนของพืช (Bailly, 2022; Hamzah et al., 2024; Wijaya, 2022)

สำหรับกลุ่มสารที่ให้ผลแตกต่างกัน พบว่า กลุ่มอัลคาลอยด์ (Alkaloids) ให้ผลบวก (สังเกตเห็นเป็นสีเหลือง) ในสารสกัดจาก กิ่งก้าน และ เปลือก ทุกชนิด รวมถึงในสารสกัดจาก ใบอ่อน และ ใบแก่ ที่ใช้ตัวทำละลาย 50% Ethanol แต่ให้ผลลบ (Negative, -) หรือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ในสารสกัดจากใบที่ใช้ 95% Ethanol และ Acetone ซึ่งสอดคล้องกับหลักการที่ว่าอัลคาลอยด์มัก ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ที่ผสมน้ำ (Do et al., 2014)

ในส่วนของ กลุ่มเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) ให้ผลบวก (Positive, +) ในสารสกัดจาก กิ่ง ก้าน ทุกชนิด (เกิดสีน้ำตาลเข้มขึ้น) และในสารสกัดจากใบอ่อนและใบแก่ที่ใช้ Acetone (เกิดสีเขียว อ่อน) รวมถึงใบแก่ที่ใช้ 95% Ethanol (เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นใส) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบ สารกลุ่ม Limonoids และ Triterpenoids ในส่วนต่าง ๆ ของกระถ่อน (Bumi et al., 2019) แต่ ตรวจไม่พบ (Negative, -) ในสารสกัดจาก เปลือก ทุกชนิด และในสารสกัดจากใบอ่อนและใบแก่ที่ใช้ 50% Ethanol

โดยสรุป สารสกัดจากกระถ่อนทุกส่วนมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก, สเตียรอยด์ และฟลาโวนอยด์ เป็นองค์ประกอบร่วมกัน ในขณะที่การตรวจพบอัลคาลอยด์และเทอร์พีนอยด์จะขึ้นอยู่กับส่วนของพืชและชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ซึ่งยืนยันได้ว่าความมีขั้วของตัวทำละลาย (Solvent polarity) มีผลอย่างนัยสำคัญต่อการสกัดแยกกลุ่มสารพฤษเคมีที่แตกต่างกัน (Do et al., 2014; Vieito et al., 2018)

4.3 ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content; TPC)

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (TPC) ในสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของกระถ่อน 4 ส่วน (ใบอ่อน, ใบแก่, เปลือกลำต้น, ยอดกิ่งก้าน) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด (95% Ethanol, 50% Ethanol, Acetone) ได้ถูกนำมาวิเคราะห์และแสดงผลในหน่วย มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ กรัมสารสกัด (mg GAE/g extract) (ดังแสดงในตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract) และ ปริมาณฟลาโวนอยด์ (mg QE/g extract) ของสารสกัดจากใบอ่อน ใบแก่ กิ่งก้าน และเปลือก กระท้อนในตัวทำละลายต่าง

ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	TPC (mg QAE/g extract)	TFC (mg QE/g extract)
ใบอ่อน	95%Ethanol	43.80±4.12 ^{aA}	11.40±0.85 ^{fB}
ใบอ่อน	50%Ethanol	41.71±7.16 ^{abA}	3.01±0.25 ^{gC}
ใบอ่อน	Acetone	7.57±1.12 ^{deB}	47.28±4.20 ^{bA}
ใบแก่	95%Ethanol	21.71±0.89 ^{cB}	20.01±0.31 ^{eB}
ใบแก่	50%Ethanol	37.22±3.30 ^{abA}	3.28±0.36 ^{gC}
ใบแก่	Acetone	16.49±1.41 ^{cdB}	39.22±2.53 ^{cA}
กิ่งก้าน	95%Ethanol	32.26±6.46 ^{bA}	30.06±3.19 ^{dB}
กิ่งก้าน	50%Ethanol	36.17±4.11 ^{abA}	3.39±0.71 ^{gC}
กิ่งก้าน	Acetone	15.57±2.63 ^{cdB}	40.98±3.50 ^{bcA}
เปลือก	95%Ethanol	6.03±1.56 ^{eB}	44.38±1.35 ^{bB}
เปลือก	50%Ethanol	17.40±3.06 ^{cdA}	7.66±1.11 ^{fgC}
เปลือก	Acetone	1.52±0.72 ^{eB}	57.09±2.79 ^{aA}

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ตัวอักษรพิมพ์เล็ก (a, b, c...) ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ในขณะที่ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A, B, C...) ที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) ของตัวทำละลายภายในส่วนสกัดเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Two-Way ANOVA) พบปฏิกริยาสัมพันธ์ (Interaction) ระหว่างปัจจัยส่วนสกัดและตัวทำละลาย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์อิทธิพลของตัวทำละลาย (Simple Main Effect) ภายในแต่ละส่วนสกัดแยกจากกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่า สารสกัดใบอ่อนในตัวทำละลาย 95% Ethanol (43.80 mg GAE/g) ให้ปริมาณ TPC สูงที่สุด (กลุ่ม a) การที่ใบอ่อนมีปริมาณ TPC สูงนั้นสอดคล้องกับงานวิจัยจำนวนมากที่ชี้ว่าพืชอายุอ่อนมักสังเคราะห์สารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (Secondary Metabolites) เช่น สารประกอบฟีนอลิก ในปริมาณที่เข้มข้น เพื่อใช้เป็นเกราะป้องกันทางเคมี (Chemical Defense) ขดเซยความเปราะบางทาง

กายภาพ (Coley et al., 1985; Starkevič et al., 2020) และป้องกันอันตรายจากรังสียูวี (Zhang et al., 2018)

อย่างไรก็ตาม ค่านี้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) จากกลุ่มที่สกัดด้วย 50% Ethanol ในส่วนของใบอ่อน, ใบแก่ และกิ่งก้าน (กลุ่ม ab) แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายเอทานอล (ทั้ง 95% และ 50%) มีประสิทธิภาพสูงในการสกัดสารกลุ่มฟีนอลิกออกจากส่วนใบและกิ่ง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์หัตถิพลของตัวทำละลายภายในแต่ละส่วนสกัด (อักษรพิมพ์ใหญ่ A, B) ที่พบว่า ในส่วนของใบอ่อนและกิ่งก้าน การใช้เอทานอลทั้งสองความเข้มข้นให้ผลดีที่สุดและไม่แตกต่างกัน (กลุ่ม A) ในขณะที่ส่วนของใบแก่ การใช้ 50% Ethanol ให้ผลดีที่สุดอย่างชัดเจน (กลุ่ม A) สูงกว่า 95% Ethanol (กลุ่ม B) ผลลัพธ์นี้ยืนยันว่า 50% Ethanol (Aqueous Ethanol) มีประสิทธิภาพสูงในการสกัด TPC (Do et al., 2014; ธนัชสันท์ พุนไพบูลย์พิพัฒน์, 2562) เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีความหลากหลายทางขั้ว (Polarity) สูง การใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำและเอทานอล (Aqueous mixture) จะช่วยให้สามารถสกัดสารฟีนอลิกได้ครอบคลุมสเปกตรัมที่กว้างกว่า (Biswas et al., 2023; Vieito et al., 2018) คือ ดึงได้ทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนที่ชอบแอลกอฮอล์ (Less polar)

ปฏิกิริยาสัมพันธ์ที่น่าสนใจคือ ในขณะที่ 50% Ethanol ให้ผลดีในส่วนของใบอ่อน ใบแก่และกิ่ง (กลุ่ม ab) แต่กลับให้ผลต่ำในส่วนเปลือก (กลุ่ม cd) ในทางกลับกัน Acetone และ 95% Ethanol ให้ผลต่ำอย่างชัดเจนในส่วนเปลือก (กลุ่ม e) ซึ่งส่งผลให้สารสกัดเปลือกในตัวทำละลาย Acetone (1.52 mg GAE/g) มีปริมาณ TPC ต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ปรากฏการณ์ที่เปลือกสกัดได้ค่า TPC ต่ำมากนี้ สามารถอธิบายได้ด้วย "ผลกระทบจากเมทริกซ์ของพืช" (Plant Matrix Effect) (Khoddami et al., 2013) เปลือกไม้ (Bark) มีโครงสร้างทางกายภาพที่ซับซ้อนและหนาแน่น (Dense Lignocellulosic Matrix) ซึ่งประกอบด้วยลิกนินและเซลลูโลส โครงสร้างแข็งแน่นนี้ทำหน้าที่เป็น "เกราะป้องกัน" ขัดขวางไม่ให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปในเซลล์เพื่อละลายสารฟีนอลิกออกมาได้ (Grzybek et al., 2021; Mateo et al., 2025) นอกจากนี้ สารฟีนอลิกอาจสร้างพันธะเชิงซ้อน (Complexes) กับคาร์โบไฮเดรตในผนังเซลล์ ทำให้ยิ่งสกัดออกได้ยาก (Khoddami et al., 2013)

4.4 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoid Content; TFC)

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกระถ่อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) โดยใช้วิธี Aluminum chloride colorimetric assay

แสดงผลเป็นหน่วย มิลลิกรัมควอยซิตินเทียบเท่าต่อกรัมสารสกัด (mg QE/g extract) (ดังแสดงในตารางที่ 4.3)

ผลการวิเคราะห์ TFC (ตารางที่ 4.3) ให้ผลลัพธ์ที่ตรงกันข้ามกับ TPC อย่างสิ้นเชิง สารสกัดเปลือกในตัวทำละลาย Acetone (57.09 mg QE/g) ให้ปริมาณ TFC สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (กลุ่ม a) รองลงมาคือกลุ่มที่สกัดด้วย Acetone และ 95% Ethanol จากส่วนอื่น ๆ ผลลัพธ์นี้สอดคล้องอย่างยิ่งกับงานวิจัยทางพฤกษเคมีที่ระบุว่า เปลือกกระท้อน (*Sandoricum koetjape*) อุดมไปด้วยสารประกอบกลุ่ม Flavonoid Aglycones (ฟลาโวนอยด์ที่ไม่มีโมเลกุลน้ำตาลเกาะ) ซึ่งมีสภาพขั้วต่ำ (Armaghan et al., 2024; Bailly, 2022) Acetone ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง (Medium polarity) จึงมีความสามารถสูงในการละลายสารกลุ่มนี้โดยเฉพาะ ซึ่งแตกต่างจากตัวทำละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก (Do et al., 2014) ปฏิกริยาสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นนั้นชัดเจนมาก และแสดงให้เห็นถึง "ความจำเพาะของตัวทำละลาย" (Solvent Selectivity) ซึ่งได้รับการยืนยันจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพตัวทำละลายภายในแต่ละส่วนสกัด (อักษรพิมพ์ใหญ่ A, B, C) ที่พบรูปแบบความสัมพันธ์เหมือนกันในทุกส่วนของพืช (ใบอ่อน, ใบแก่, เปลือก, และกิ่งก้าน) กล่าวคือ Acetone เป็นตัวทำละลายที่สกัด TFC ได้ดีที่สุด (กลุ่ม A) รองลงมาคือ 95% Ethanol (กลุ่ม B) ในขณะที่ 50% Ethanol ให้ปริมาณ TFC ต่ำที่สุด (กลุ่ม C) อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าตัวทำละลาย 50% Ethanol ซึ่งให้ค่า TPC สูงในส่วนใบ กลับให้ค่า TFC ต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญในทุกส่วนของพืช (กลุ่ม g และ fg) ในทางกลับกัน Acetone ซึ่งให้ค่า TPC ต่ำที่สุด กลับให้ค่า TFC สูงที่สุด

ผลลัพธ์นี้ชี้ให้เห็นว่า สารประกอบฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่ในกระท้อนอาจเป็นสารที่มีขั้วปานกลางถึงต่ำ (medium-low polarity) ซึ่งละลายได้ดีใน Acetone มากกว่าตัวทำละลายที่มีน้ำผสมอย่าง 50% Ethanol (Do et al., 2014; Vieito et al., 2018)

ส่วนค่า TPC ที่สูงของ 50% Ethanol (ทั้งๆ ที่มี TFC ต่ำ) สามารถอธิบายได้ว่า 50% Ethanol (ซึ่งมีขั้วสูง) มีประสิทธิภาพสูงในการสกัดสารกลุ่ม Non-flavonoid phenolics (เช่น กรดฟีนอลิก หรือ แทนนินที่ละลายน้ำได้) ออกมาได้ปริมาณมาก และเนื่องจากวิธี Folin-Ciocalteu ที่ใช้วัด TPC นั้นเป็นวิธีที่ "ไม่มีความจำเพาะ" (Non-specific) จึงทำปฏิกิริยากับสารรีดิวซ์และสารฟีนอลทุกชนิด รวมกัน ทำให้ค่า TPC สูง (Khoddami et al., 2013; Sari et al., 2023) แต่เมื่อนำมาวัด TFC ซึ่งมีความจำเพาะต่อโครงสร้างฟลาโวนอยด์มากกว่า ค่าที่ได้จึงต่ำมากนั่นเอง

4.5 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH Radical Scavenging Activity)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกระท้อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) ดำเนินการโดยใช้วิธี DPPH radical scavenging assay ซึ่งอาศัยหลักการบริจาคอะตอมไฮโดรเจนจากสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างไปยังสาร DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ที่มีสีม่วงเข้ม ให้เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อถูกรีดิวซ์ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm แล้วนำไปคำนวณหาค่า IC₅₀ (Median Inhibitory Concentration)

ตารางที่ 4.4 ค่า IC₅₀ (µg/mL) ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระท้อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) ด้วยวิธี DPPH และ ABTS

ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	DPPH	ABTS
		IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
สารมาตรฐาน	DI Water	Ascorbic: 67.64±5.01	Trolox: 67.56±6.15
ใบอ่อน	95%Ethanol	98.93±3.84 ^{aA}	147.56±17.22 ^{abA}
ใบอ่อน	50%Ethanol	78.55±4.48 ^{aA}	76.91±1.61 ^{aA}
ใบอ่อน	Acetone	302.82±26.28 ^{abCB}	689.42±86.63 ^{deB}
ใบแก่	95%Ethanol	203.34±6.69 ^{abA}	205.83±29.81 ^{bA}
ใบแก่	50%Ethanol	145.03±11.81 ^{abA}	151.86±2.67 ^{abA}
ใบแก่	Acetone	624.89±70.79 ^{dB}	640.49±48.58 ^{dB}
กิ่งก้าน	95%Ethanol	189.58±4.94 ^{abA}	161.12±3.94 ^{abA}
กิ่งก้าน	50%Ethanol	170.73±7.53 ^{abA}	171.59±9.69 ^{abA}
กิ่งก้าน	Acetone	542.49±64.86 ^{cdB}	648.47±20.82 ^{dB}
เปลือก	95%Ethanol	1032.62±225.01 ^{eB}	778.99±58.86 ^{eB}
เปลือก	50%Ethanol	379.85±38.09 ^{bcA}	312.21±7.52 ^{cA}
เปลือก	Acetone	3856.13±354.55 ^{fc}	ไม่เกิดการยับยั้ง ^C

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) ตัวอักษรพิมพ์เล็ก (a, b, c...) ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ในขณะที่ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A, B, C...) ที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) ของตัวทำละลายภายในส่วนสกัดเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Two-Way ANOVA) พบปฏิกริยาสัมพันธ์ (Interaction) ระหว่างปัจจัยส่วนสกัดและตัวทำละลาย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์อิทธิพลของตัวทำละลาย (Simple Main Effect) ภายในแต่ละส่วนสกัดแยกจากกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าสารสกัดใบอ่อนใน 50% Ethanol ($IC_{50} = 78.55 \mu\text{g/mL}$) และ ใบอ่อนใน 95% Ethanol ($IC_{50} = 98.93 \mu\text{g/mL}$) แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด (กลุ่ม a) และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ฤทธิ์ที่ตีรองลงมาพบในกลุ่มสารสกัดจากใบแก่และกิ่งก้านที่สกัดด้วยเอทานอล (กลุ่ม ab) เมื่อพิจารณาอิทธิพลของตัวทำละลายภายในแต่ละส่วนสกัด (อักษรพิมพ์ใหญ่ A, B, C) พบรูปแบบที่สอดคล้องกันอย่างชัดเจนในส่วนของใบอ่อนและกิ่งก้าน โดยการใช้เอทานอล (ทั้ง 95% และ 50%) ให้ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด (กลุ่ม A) ในขณะที่อะซิโตนให้ผลด้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (กลุ่ม B) การที่ใบอ่อนแสดงฤทธิ์สูงสุดนี้ สอดคล้องโดยตรงกับผล TPC (ตารางที่ 4.2) และยืนยันแนวคิดที่ว่า ใบอ่อนซึ่งกำลังเจริญเติบโตจะสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก (Secondary metabolites) ในปริมาณเข้มข้นเพื่อใช้ป้องกันตนเองจากความเครียดสิ่งแวดล้อมและรังสี UV (Starkevič et al., 2020; Zhang et al., 2018) ซึ่งปริมาณ TPC ที่สูงนี้เองส่งผลโดยตรงต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงตามไปด้วย (Do et al., 2014; Ghadigaonkar et al., 2021) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงอย่างชัดเจน (ค่า IC_{50} สูงขึ้น) ในกลุ่มที่สกัดด้วย Acetone และกลุ่มสารสกัดจากเปลือกทั้งหมด โดยสารสกัดเปลือกใน Acetone ($IC_{50} = 3856.13 \mu\text{g/mL}$) มีฤทธิ์ต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (กลุ่ม f) และแม้แต่ในส่วนของเปลือกเอง ผลการเปรียบเทียบภายใน (อักษรพิมพ์ใหญ่) ก็ยังยืนยันว่า 50% Ethanol เป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุด (กลุ่ม A) ในขณะที่อะซิโตนให้ผลแย่งที่สุด (กลุ่ม C) แม้ว่าอะซิโตนจะสกัด TFC ได้มากที่สุดในส่วนนี้ก็ตาม

ผลลัพธ์นี้มีความสอดคล้องอย่างยิ่งกับผล TPC (ตารางที่ 4.3) และยืนยันสิ่งที่งานวิจัยจำนวนมากค้นพบ คือ ความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญยิ่งยวด (Strong positive correlation) ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Ghadigaonkar et al., 2021; Shahidi & Ambigaipalan, 2015) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง งานวิจัยในพืชกระถ่อน (*Sandoricum koetjape*) ก็เคยรายงานความสัมพันธ์ที่แข็งแกร่งนี้เช่นกัน (Hamzah et al., 2020; Wijaya, 2022)

ข้อค้นพบนี้ชี้ชัดว่า สารกลุ่มฟีนอลิก (ที่ละลายดีในเอทานอล) เป็นสารหลักที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (ที่ละลายดีในอะซิโตน) สมมติฐานนี้สนับสนุนการอภิปรายก่อนหน้านี้ที่ว่า สารสกัด 50% Ethanol (ซึ่งให้ TPC สูง/DPPH ดี) น่าจะอุดมไปด้วยสารกลุ่ม "Non-flavonoid phenolics" ที่มีขั้วสูง เช่น กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) (Shahidi & Ambigaipalan, 2015) หรือ แทนนินที่ละลายน้ำได้ (Hydrolysable tannins) (Khoddami et al., 2013) ซึ่งสารทั้งสองกลุ่มนี้เป็นที่ทราบกันดีว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ทรงพลังมาก ในขณะที่

สารสกัด Acetone แม้จะมี TFC (Flavonoid aglycones) สูง แต่กลับมีฤทธิ์ DPPH ที่ต่ำกว่าอย่างชัดเจน

4.6 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (ABTS Radical Cation Decolorization Assay)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกระเทียม (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) ด้วยวิธี ABTS radical cation decolorization assay อาศัยหลักการที่อนุมูลประจุบวก $ABTS^+$ ซึ่งมีสีเขียวอมฟ้า จะถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระให้กลายเป็นสารไม่มีสี วัดค่าการลดลงของการดูดกลืนแสงที่ 734 nm แล้วคำนวณเป็นค่า IC_{50} ($\mu g/mL$) ซึ่งหมายถึง “ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูล $ABTS^+$ ได้ 50 %” โดยค่า IC_{50} ที่ต่ำ แสดงถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แรงกว่า

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.4) พบว่า ผลการทดสอบ ABTS สอดคล้องกับผล DPPH อย่างสมบูรณ์ โดยสารสกัดใบอ่อนใน 50% Ethanol ($IC_{50} = 76.91 \mu g/mL$) ยังคงแสดงฤทธิ์ดีที่สุด (กลุ่ม a) ตามมาด้วยกลุ่มสารสกัดจากใบและกิ่งด้วย 50% และ 95% Ethanol (กลุ่ม ab และ b) ในขณะที่กลุ่ม Acetone และกลุ่มเปลือกแสดงฤทธิ์ต่ำกว่าอย่างชัดเจน ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบภายในแต่ละส่วนสกัด (อักษรพิมพ์ใหญ่ A, B, C) ยังช่วยยืนยันประสิทธิภาพของตัวทำละลายเอทานอลได้อย่างชัดเจน โดยพบว่าในส่วนของใบอ่อน ใบแก่ และกิ่งก้าน การใช้ตัวทำละลายเอทานอล (ทั้ง 50% และ 95%) ให้ประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีที่สุด (กลุ่ม A) โดยไม่มีความแตกต่างกัน ในขณะที่อะซิโตนให้ผลด้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (กลุ่ม B) นอกจากนี้ ในส่วนของเปลือกที่มักสกัดสารออกฤทธิ์ได้ยาก ตัวทำละลาย 50% Ethanol ยังคงแสดงศักยภาพสูงสุด (กลุ่ม A) ที่เหนือกว่า 95% Ethanol (กลุ่ม B) และ Acetone (กลุ่ม C) ตามลำดับ การที่ผลการทดสอบทั้งสอง (DPPH และ ABTS) สอดคล้องกันนั้นเป็นเรื่องที่สมเหตุสมผลอย่างยิ่ง แม้ว่าอนุมูลอิสระทั้งสองชนิดจะมีความแตกต่างกัน ($DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$) แต่กลไกหลักที่สารฟีนอลิกใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระทั้งสองชนิดนี้คือกลไกเดียวกัน คือการบริจาคอิเล็กตรอน (Electron Transfer) หรือไฮโดรเจน (Hydrogen Atom Transfer) (Munteanu & Apetrei, 2021) การที่ผลลัพธ์สอดคล้องกันจึงช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือของการทดลองอย่างมาก

นอกจากนี้ การที่ทั้งสองการทดสอบให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน และมีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) กับผล TPC (ตารางที่ 4.3) ช่วยยืนยันสมมติฐานที่ว่า สารกลุ่มฟีนอลิกเป็นสารออกฤทธิ์หลัก ซึ่งสอดคล้องกับองค์ความรู้หลักในปัจจุบันที่ว่า สารประกอบฟีนอลิกคือกลุ่ม

สารสำคัญที่รับผิดชอบต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชส่วนใหญ่ (Shahidi & Ambigaipalan, 2015) และมักมีความสัมพันธ์เชิงบวกที่สูงมากกับผลการทดสอบทั้ง ABTS และ DPPH (Ghadigaonkar et al., 2021; Hamzah et al., 2020)

ข้อค้นพบนี้ยังช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือจากการอธิบายก่อนหน้านี้ที่ว่า สารฟีนอลิกกลุ่มที่มีขั้วสูง (High-polarity phenolics) ที่ละลายใน 50% Ethanol (เช่น กรดฟีนอลิก หรือ แทนนิน) คือสารสำคัญในการออกฤทธิ์ (Biswas et al., 2023; Khoddami et al., 2013) ในขณะที่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (TFC) ที่สกัดได้ด้วย Acetone นั้น แม้จะมีปริมาณมาก แต่ก็มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH/ABTS ที่ต่ำกว่าอย่างชัดเจน ซึ่งเป็นผลจากความจำเพาะของตัวทำละลายและโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละกลุ่ม (Do et al., 2014)

4.7 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase Inhibitory Activity)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดำเนินการโดยใช้ระบบปฏิกิริยา L-DOPA/Tyrosinase assay ซึ่งอาศัยหลักการที่สารสกัดสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ L-DOPA ภายใต้เอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้การเกิดสีลดลง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 nm และคำนวณเป็นค่า IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ซึ่งหมายถึง “ความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50%” โดยทั่วไป ค่า IC_{50} ที่ต่ำ แสดงถึงฤทธิ์ยับยั้งที่แรงกว่า

ตารางที่ 4.5 ค่า IC_{50} ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดกระถ่อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.)

ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	Tyrosinase inhibition IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Kojic acid	Phosphate Buffer	42.78 $\pm$ 6.27
ใบอ่อน	95%Ethanol	ไม่เกิดการยับยั้ง ^B
ใบอ่อน	50%Ethanol	355.06 $\pm$ 13.83 ^{aA}
ใบอ่อน	Acetone	ไม่เกิดการยับยั้ง ^B
ใบแก่	95%Ethanol	ไม่เกิดการยับยั้ง ^B
ใบแก่	50%Ethanol	642.94 $\pm$ 42.37 ^{cA}
ใบแก่	Acetone	ไม่เกิดการยับยั้ง ^B
กิ่งก้าน	95%Ethanol	ไม่เกิดการยับยั้ง ^B
กิ่งก้าน	50%Ethanol	522.62 $\pm$ 19.10 ^{bA}
กิ่งก้าน	Acetone	ไม่เกิดการยับยั้ง ^B

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	Tyrosinase inhibition IC ₅₀ (µg/mL)
เปลือก	95%Ethanol	ไม่เกิดการยับยั้ง ^A
เปลือก	50%Ethanol	ไม่เกิดการยับยั้ง ^A
เปลือก	Acetone	ไม่เกิดการยับยั้ง ^A

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3) “ไม่เกิดการยับยั้ง” หมายถึง ค่า IC₅₀ สูงกว่าเพดานความเข้มข้นที่ทดสอบ (>3,000 µg/mL) ซึ่งไม่สามารถวัดได้ภายในช่วงการทดสอบ ตัวอักษรพิมพ์เล็ก (a, b, c...) ที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ในขณะที่ ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ (A, B, C...) ที่แตกต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p < 0.05) ของตัวทำละลายภายในส่วนสกัดเดียวกัน

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Two-Way ANOVA) พบปฏิกริยาสัมพันธ์ (Interaction) ระหว่างปัจจัยส่วนสกัดและตัวทำละลาย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์อิทธิพลของตัวทำละลาย (Simple Main Effect) ภายในแต่ละส่วนสกัดแยกจากกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.5 แสดงให้เห็นถึงปฏิกริยาสัมพันธ์ที่ชัดเจนและน่าสนใจอย่างยิ่ง พบว่า มีเพียง 3 กลุ่มตัวอย่างเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ และทั้ง 3 กลุ่มนั้นคือกลุ่มที่สกัดด้วย 50% Ethanol ผลลัพธ์นี้ชี้ชัดเจนว่า สารออกฤทธิ์ (Inhibitor) จะต้องเป็นสารประกอบที่มีขั้วสูงมาก (Highly polar) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยจำนวนมากที่ระบุว่า สารยับยั้งไทโรซิเนสที่มีศักยภาพสูง (Potent inhibitors) มักเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีขั้วสูง เช่น กรดฟีนอลิก (Phenolic acids) อย่าง Gallic acid หรือกลุ่มแทนนิน (Tannins) ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีน้ำผสม (Aqueous solvents) อย่าง 50% Ethanol (Khoddami et al., 2013; Zolghadri et al., 2019)

สารสกัดใบอ่อนใน 50% Ethanol (IC₅₀ = 355.06 µg/mL) แสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด (กลุ่ม a) ตามมาด้วย สารสกัดกิ่งใน 50% Etanol (กลุ่ม b) และ สารสกัดใบแก่ใน 50% Etanol (กลุ่ม c) เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพของตัวทำละลายภายในแต่ละส่วนสกัด (อักษรพิมพ์ใหญ่ A, B) ยิ่งตอกย้ำความสำคัญของ 50% Ethanol อย่างชัดเจน โดยในส่วนของใบอ่อน ใบแก่ และกิ่งก้าน 50% Ethanol เป็นเพียงตัวทำละลายเดียวที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม A (มีฤทธิ์ดีที่สุด) ในขณะที่ 95% Ethanol และ Acetone ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม B และไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเลย สำหรับส่วนเปลือก (Bark) นั้น ไม่พบความแตกต่างระหว่างตัวทำละลาย (กลุ่ม A ทั้งหมด) เนื่องจากไม่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ออกมาได้เลยไม่ว่าจะใช้ตัวทำละลายใด ข้อค้นพบนี้มีความสำคัญอย่างยิ่ง เพราะเป็นการ

ยืนยันว่า สารสกัด 50% Ethanol (โดยเฉพาะจากใบอ่อน) เป็นสารสกัดมัลติฟังก์ชัน (Multifunctional extract) ที่แสดงฤทธิ์ดีที่สุดในการทดสอบ: มี TPC สูงที่สุด (ตารางที่ 4.3), มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH/ABTS) สูงที่สุด (ตารางที่ 4.4) และยับยั้งไทโรซิเนสได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.5) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบความสัมพันธ์เชิงบวกที่แข็งแกร่งระหว่าง TPC, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส ในสารสกัดข้าวสาลี (Hamzah et al., 2020; Shin et al., 2022)

ที่สำคัญ การค้นพบนี้สนับสนุนอย่างสมบูรณ์แบบด้วยหลักฐานทางพิษเคมี เนื่องจากมีงานวิจัยที่วิเคราะห์องค์ประกอบในใบกระท้อน (*Sandoricum koetjape* leaf) และยืนยันการพบสารกลุ่ม "Phenolic acids" หลากหลายชนิด (Saadah et al., 2023) ซึ่งสารกลุ่มนี้ถูกรายงานอย่างกว้างขวางว่ามีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสที่ทรงพลังผ่านกลไกการจับกับไอออนทองแดง (Copper chelation) (Zolghadri et al., 2019)

ในทางกลับกัน สารสกัดอีก 9 กลุ่มที่เหลือ (รวมถึงทุกกลุ่มที่สกัดด้วย 95% Ethanol และ Acetone) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง และถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (กลุ่ม d) การที่ 95% Ethanol และ Acetone (ซึ่งมีขั้วต่ำกว่า) ไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งอธิบายได้ด้วยความสามารถในการละลาย (Solubility) ที่ต่ำมากของสารชีวสูง (เช่น Gallic acid) ในตัวทำละลายเหล่านี้ (Do et al., 2014) และยังเป็นข้อพิสูจน์ที่ชัดเจนที่สุดว่า สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (TFC) ที่ Acetone สกัดออกมาได้ดีนั้น (ตารางที่ 4.3) เป็นสารคนละกลุ่มกันอย่างสิ้นเชิงกับสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส

ผลลัพธ์นี้จึงชี้ชัดว่า สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในกระท้อนนั้น มีความจำเพาะอย่างสูงกับตัวทำละลาย 50% Ethanol และไม่ถูกสกัดออกมาด้วย 95% Ethanol หรือ Acetone เลย

4.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการทดสอบ (Correlation Analysis)

เพื่อทำความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารออกฤทธิ์ในสารสกัดกระท้อนกับฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้มีการคำนวณค่าความสัมพันธ์เชิงสหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson correlation coefficient; r) ระหว่างค่าเฉลี่ยของการทดสอบแต่ละประเภท ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC), ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC), ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ ABTS) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitory activity) ตารางที่ 4.6 แสดงค่าสหสัมพันธ์ระหว่างการทดสอบต่าง ๆ โดยพบว่ามีความสัมพันธ์ในระดับสูงทั้งในทิศทางบวกและลบ ซึ่งช่วยอธิบายบทบาทของสารออกฤทธิ์แต่ละกลุ่มต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากกระท้อนได้อย่างชัดเจน

ตารางที่ 4.6 ค่าสหสัมพันธ์ (r) ระหว่างการทดสอบต่าง ๆ ของสารสกัดกระถ่อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.)

ตัวแปร	TPC	TFC	DPPH	ABTS	Tyrosinase
TPC	1				
TFC	-0.821**	1			
DPPH	-0.615**	0.637**	1		
ABTS	-0.867**	0.868**	0.825**	1	
Tyrosinase	-0.819*	0.758*	0.763*	0.809*	1

หมายเหตุ TPC = ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content), TFC = ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content), DPPH = ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS = ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS, Tyrosinase = ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส * แสดงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ (2tailed) ** แสดงความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.01$ (2tailed)

จากผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดด้วยวิธี DPPH และ ABTS มีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับสูง ($r = 0.825$) สะท้อนให้เห็นว่าการทดสอบทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกัน เนื่องจากทั้งสองวิธีอาศัยกลไกหลักร่วมกันคือ การถ่ายโอนอิเล็กตรอน (Electron Transfer) หรือการถ่ายโอนอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen Atom Transfer) เพื่อรีดิวซ์อนุมูลอิสระ (Munteanu & Apetrei, 2021) ดังนั้นสารสกัดที่มีความสามารถในการลดอนุมูล DPPH จึงมักมีความสามารถในการลดอนุมูล $ABTS^+$ ได้ดีเช่นเดียวกัน

ในส่วนของการสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบความสัมพันธ์เชิงลบในระดับสูง (r อยู่ในช่วง -0.615 ถึง -0.867) ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานที่ว่า ค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ที่ต่ำ จะสัมพันธ์กับปริมาณสารออกฤทธิ์ที่สูง กล่าวคือ เมื่อปริมาณสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้น IC_{50} ของ DPPH และ ABTS จะลดลง ซึ่งสอดคล้องอย่างยิ่งกับงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานค่าสหสัมพันธ์เชิงลบที่แข็งแกร่งมากระหว่าง TPC และค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระ (Ghadigaonkar et al., 2021; Hamzah et al., 2020) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า กลุ่มสารโพลีฟีนอล โดยเฉพาะสารกลุ่มกรดฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิก (Gallic acid) และคาเทชิน (Catechin) (ซึ่งเป็นสารขั้วสูงที่ละลายได้ดีในเอทานอล 50%) เป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีบทบาทหลักในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระถ่อน (Bailly, 2022; Saadah et al., 2023)

ในทางตรงกันข้าม พบว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่า IC₅₀ ของ ABTS ($r = 0.868$) และ DPPH ($r = 0.637$) ซึ่งหมายความว่าเมื่อปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการยับยั้งก็ลดลง (ค่า IC₅₀ สูงขึ้น) แม้ผลลัพธ์นี้จะดูขัดแย้งกับทฤษฎีทั่วไป แต่สอดคล้องกับผลการทดลองในหัวข้อ 4.4 และ 4.6 ที่พบว่าสารสกัดที่มีค่า TFC สูงสุด (สารสกัดชั้นอะซิโตน) กลับมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ปรากฏการณ์นี้ชี้ให้เห็นว่า ฟลาโวนอยด์ในพืชชนิดนี้อาจไม่ใช่สารออกฤทธิ์หลัก แต่สารที่มีบทบาทสำคัญคือกลุ่มสารฟีนอลิกที่ไม่ใช่ฟลาโวนอยด์ (Non-flavonoid phenolics) และมีความเข้มข้นสูง ซึ่งสารกลุ่มนี้ (อาทิ Gallic acid และ Tannins) มีโครงสร้างโมเลกุลที่เหมาะสมในการทำหน้าที่เป็นผู้ให้อะตอมไฮโดรเจน (H-donor) ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า (Khoddami et al., 2013; Shahidi & Ambigaipalan, 2015) นอกจากนี้ ยังอาจเกิดจากความแตกต่างของชนิดฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้ด้วยอะซิโตน ซึ่งอาจเป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่ากลุ่มที่สกัดได้ด้วยเอทานอล (Do et al., 2014)

นอกจากนี้ ยังพบความสัมพันธ์ในระดับสูงระหว่างค่า IC₅₀ ของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสกับค่า IC₅₀ ของการต้านอนุมูลอิสระ ($r = 0.763-0.809$) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง มักจะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงด้วยเช่นกัน ซึ่งสนับสนุนแนวคิดเรื่อง "คุณสมบัติพหุหน้าที่" (Multifunctional properties) ของสารสกัด (Shin et al., 2022) ความสัมพันธ์นี้บ่งชี้ว่าสารออกฤทธิ์ในทั้งสามการทดสอบน่าจะเป็นสารในกลุ่มเดียวกัน คือสารฟีนอลิกเข้มข้น โดยมีกลไกความเป็นไปได้คือ ความสามารถในการเป็น "ตัวคีเลตทองแดง" (Copper chelator) ของสารกลุ่มนี้ ซึ่งส่งผลยับยั้งทั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันและการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Hamzah et al., 2024; Zolghadri et al., 2019) ข้อสรุปนี้ยังได้รับการสนับสนุนจากงานวิจัยที่ยืนยันการพบ Phenolic acids หลายชนิดในกระเทียม (Sandoricum koetjape) (Saadah et al., 2023) ซึ่งตอกย้ำว่าสารกลุ่มฟีนอลิกเข้มข้นที่ละลายในเอทานอล 50% คือสารออกฤทธิ์หลักในการศึกษาครั้งนี้

4.9 การจัดอันดับศักยภาพของสารสกัด (Composite Ranking Analysis)

เพื่อประเมินศักยภาพโดยรวมของสารสกัดจากกระเทียม (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) ในแต่ละส่วนของพืชและตัวทำละลาย ได้ทำการคำนวณคะแนนรวม (Composite Score) จากผลการทดสอบทั้งหมด ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC), ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC), ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH และ ABTS) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยให้น้ำหนักของแต่ละการทดสอบเท่ากัน และใช้แบบจำลอง Penalized Model เพื่อปรับลด

คะแนนของตัวอย่างที่มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) สูงเกินไป เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่สะท้อนศักยภาพของสารสกัดอย่างแท้จริง

ตารางที่ 4.7 การจัดอันดับศักยภาพของสารสกัดจากกระเทียม (Composite Ranking; Penalized Model)

ลำดับ	ส่วนของพืช	ตัวทำละลาย	คะแนนรวม (Composite Score)
1	ใบอ่อน	50%Ethanol	0.698
2	ใบอ่อน	95%Ethanol	0.652
3	กิ่งก้าน	95%Ethanol	0.519
4	ใบแก่	50%Ethanol	0.331
5	กิ่งก้าน	50%Ethanol	0.248
6	ใบแก่	95%Ethanol	0.129
7	ใบอ่อน	Acetone	-0.115
8	กิ่งก้าน	Acetone	-0.181
9	ใบแก่	Acetone	-0.219
10	เปลือก	50%Ethanol	-0.348
11	เปลือก	95%Ethanol	-0.499
12	เปลือก	Acetone	-1.215

หมายเหตุ คะแนนรวม (Composite Score) คำนวณจากการรวมค่าคะแนนมาตรฐาน (Z-score) ของตัวแปร 4 รายการ โดยค่า IC_{50} (DPPH, ABTS) ถูกแปลงเป็นค่าส่วนกลับ ($1/IC_{50}$) ก่อนการคำนวณเพื่อให้ทิศทางข้อมูลเป็น "ค่ายิ่งสูงยิ่งดี" เช่นเดียวกับปริมาณสาร (TPC, TFC) คะแนนรวมที่สูงกว่า 0 แสดงถึงประสิทธิภาพที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง

จากผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.7 พบว่า สารสกัดจาก ใบอ่อนที่ใช้ตัวทำละลายเอทานอล 50% มีคะแนนรวมสูงที่สุด (Composite Score = 0.698) (การใช้วิธีวิเคราะห์ทางสถิติแบบหลายตัวแปร (Multivariate analysis) หรือการจัดอันดับคะแนนรวมเช่นนี้ ถือเป็นวิธีมาตรฐานที่น่าเชื่อถือในการคัดเลือกสภาวะการสกัดที่ดีที่สุด (Optimal condition) จากตัวแปรที่ซับซ้อน (Gite et al., 2015; Hall et al., 2022) ผลลัพธ์นี้แสดงถึงศักยภาพโดยรวมที่โดดเด่นที่สุดทั้งในด้านปริมาณสารออกฤทธิ์และฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยมีแนวโน้มสอดคล้องกับผลการทดสอบในทุกหัวข้อก่อนหน้านี้ กล่าวคือ มีค่า TPC สูงที่สุด, มีค่า IC_{50} ของ DPPH และ ABTS ต่ำที่สุด และมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโร

จีนส์ที่ดีที่สุดในกลุ่มสารสกัดทั้งหมด รองลงมาคือ สารสกัดจากใบอ่อนและกิ่งก้านที่ใช้เอทานอล 95% (Composite Score = 0.652 และ 0.519 ตามลำดับ)

ศักยภาพที่โดดเด่นของสารสกัดใบอ่อน 50% เอทานอล เป็นผลมาจากปัจจัยสำคัญ 2 ประการร่วมกัน ประการแรกคือปัจจัยด้านส่วนของพืช ผลการทดลองยืนยันทฤษฎีการป้องกันตัวของพืช (Optimal Defense Hypothesis) ที่ระบุว่าพืชจะสังเคราะห์และสะสมสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ในปริมาณเข้มข้นบริเวณเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโตเพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อม เช่น รังสียูวี (Photoprotection) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่พบในพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศและไม้ปาเซตร้อน (Starkevič et al., 2020; Zhang et al., 2018) ที่ใบอ่อนจะมีฤทธิ์สูงกว่าใบแก่ ประการที่สองคือปัจจัยด้านตัวทำละลาย การที่ "50% เอทานอล" (Aqueous Ethanol) ให้ประสิทธิภาพสูงกว่าตัวทำละลายอื่น ยืนยันว่าระบบตัวทำละลายผสมระหว่างน้ำและเอทานอลสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลิกได้กว้างขวาง (Broad spectrum) และมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ (Biswas et al., 2023; Do et al., 2014)

ในทางตรงกันข้าม สารสกัดที่ใช้ อะซิโตน (Acetone) ทั้งในใบอ่อน ใบแก่ และกิ่งก้าน กลับมีคะแนนติดลบทั้งหมด แสดงถึงศักยภาพโดยรวมที่ต่ำ สอดคล้องกับผลการทดสอบก่อนหน้านี้ที่พบว่า แม้จะมีปริมาณฟลาโวนอยด์ (TFC) สูง แต่กลับมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำ ข้อค้นพบนี้ยืนยันอย่างชัดเจนว่า TFC ไม่ใช่ตัวขับเคลื่อนหลัก (Main driver) ของฤทธิ์ทางชีวภาพในงานวิจัยนี้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่พบว่าสารสกัดที่มี TFC สูงอาจไม่ได้มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระสูงเสมอไปหากองค์ประกอบนั้นไม่ใช่สารออกฤทธิ์หลัก (Do et al., 2014) จึงสรุปได้ว่า TPC เป็นตัวทำนายฤทธิ์ที่มีความแม่นยำกว่า (Ghadigaonkar et al., 2021) นอกจากนี้ สารสกัดจาก เปลือก โดยเฉพาะที่สกัดด้วยอะซิโตน มีคะแนนต่ำที่สุด (-1.215) สะท้อนว่าส่วนเปลือกอาจมีองค์ประกอบของสารโพลีฟีนอลที่สกัดได้ยากกว่า หรือมีสารที่ไม่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ปะปนอยู่มากเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ (Mateo et al., 2025; Vieito et al., 2018)

เมื่อพิจารณาภาพรวมของคะแนนพบว่า สารสกัดจากส่วนใบของกระถ่อนมีแนวโน้มให้ศักยภาพสูงกว่าส่วนอื่นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะใบอ่อนซึ่งมีการสังเคราะห์และสะสมสารป้องกันอนุมูลอิสระสูงกว่าใบแก่ตามธรรมชาติของกระบวนการป้องกันตนเองของพืชต่อความเครียดจากแสงและสิ่งแวดล้อม (photoprotective mechanism) การที่ใบอ่อนมีฤทธิ์สูงกว่าใบแก่นี้เป็นปรากฏการณ์ที่พบได้บ่อย โดยมีรายงานในพืชหลายชนิดที่ยืนยันว่าพืชจะผลิตสารฟีนอลิกเข้มข้นเพื่อป้องกันเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต (Starkevič et al., 2020; Zhang et al., 2018) ส่วนกิ่งก้านมีศักยภาพรองลงมา เนื่องจากอาจมีองค์ประกอบของสารฟีนอลิกในระดับปานกลาง ขณะที่ส่วนเปลือกแม้จะเป็นแหล่งของสารโพลีฟีนอลในพืชหลายชนิด แต่ในกระถ่อนพบว่าการสกัดได้ยากและให้ฤทธิ์ต่ำ

4.10 สรุปผลการทดลองภาพรวม (Overall Summary and Discussion)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของกระถ่อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) ได้แก่ ใบอ่อน ใบแก่ กิ่งก้าน และเปลือก โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ 50% Ethanol, 95% Ethanol และ Acetone ในการสกัด เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารออกฤทธิ์ (Total Phenolic Content; TPC และ Total Flavonoid Content; TFC) รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH, ABTS) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase Inhibition) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลโดยใช้สถิติการสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation) ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังนี้

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) พบว่า สารสกัดที่มีค่า TPC สูงที่สุดคือ ใบอ่อน 95% EtOH (43.80 mg GAE/g) รองลงมาคือ ใบอ่อน 50% EtOH (41.71 mg GAE/g) และ ใบแก่-กิ่งก้าน 50% EtOH (36–37 mg GAE/g) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) สะท้อนว่าทั้งชนิดของส่วนพืชและตัวทำละลายมีอิทธิพลต่อปริมาณฟีนอลิก โดยเฉพาะตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลาง (50% EtOH) ซึ่งสามารถละลายสารกลุ่มโพลีฟีนอลได้ดีที่สุด

ในทางกลับกัน ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) มีแนวโน้มตรงข้ามกับ TPC กล่าวคือ สารสกัดที่ให้ค่า TFC สูงที่สุด คือ เปลือก (Acetone; 57.09 mg QE/g) ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่ำมาก ขณะที่สารสกัดจากใบอ่อน 50% EtOH ซึ่งมีฤทธิ์สูงสุดกลับมี TFC ต่ำที่สุด (3.01 mg QE/g) แสดงให้เห็นว่าปริมาณฟลาโวนอยด์รวมไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้หลักของศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระของกระถ่อน ซึ่งสอดคล้องกับผลสหสัมพันธ์ในหัวข้อ 4.8 ที่พบความสัมพันธ์เชิงบวก ($r > 0.8$) ระหว่างค่า TFC กับค่า IC_{50} ของ DPPH และ ABTS หมายถึง ยิ่งมี TFC สูง ฤทธิ์ยิ่งต่ำ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ให้ผลในทิศทางเดียวกันอย่างชัดเจน โดยสารสกัดที่มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด (แสดงถึงฤทธิ์สูงสุด) คือ ใบอ่อน 50% Ethanol โดยมีค่า IC_{50} ของ DPPH เท่ากับ 78.55 $\mu\text{g/mL}$ และของ ABTS เท่ากับ 76.91 $\mu\text{g/mL}$ ขณะที่สารสกัด ใบอ่อน 95% Ethanol และ ใบแก่ 50% Ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระรองลงมา (อยู่ในกลุ่มสถิติ A ของการทดสอบ ABTS) ส่วนสารสกัดจาก กิ่งก้าน 95% Ethanol และ กิ่งก้าน 50% Ethanol ให้ค่า IC_{50} สูงกว่าเล็กน้อย แสดงถึงฤทธิ์ที่อ่อนลงตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจาก เปลือก โดยเฉพาะเปลือก Acetone มีค่า IC_{50} สูงมาก (ABTS $> 1000 \mu\text{g/mL}$) บ่งชี้ถึงฤทธิ์ต่ำที่สุด แนวโน้มดังกล่าวสอดคล้องกับค่าปริมาณ TPC ที่สูงของสารสกัดกลุ่มใบและกิ่ง ยืนยันว่า สารโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีบทบาทหลักต่อการต้านอนุมูลอิสระของกระถ่อน

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Tyrosinase พบว่า สารสกัดจากใบอ่อน 50% EtOH มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด (355.06 $\mu\text{g/mL}$) ในขณะที่สารสกัดอื่นส่วนใหญ่ไม่เกิดการยับยั้งภายในช่วงความเข้มข้นที่ทดสอบได้ แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีช่วงปานกลางเหมาะสมต่อการสกัดสารต้านเอนไซม์มากที่สุด แม้ว่าค่าความแปรปรวน (SD) ของบางตัวอย่างจะค่อนข้างกว้าง แต่แนวโน้มโดยรวมยังชัดเจนว่ากลุ่ม 50% EtOH ให้ฤทธิ์สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของผลการทดสอบ (หัวข้อ 4.8) ยืนยันผลแนวโน้มดังกล่าว โดยพบความสัมพันธ์เชิงลบสูงระหว่างค่า TPC กับค่า IC_{50} ของ DPPH ($r = -0.615$), ABTS ($r = -0.867$) และ Tyrosinase ($r = -0.819$) ซึ่งหมายความว่ายิ่งมีปริมาณสารฟีนอลิกสูง ฤทธิ์ทางชีวภาพยิ่งสูง (ค่า IC_{50} ยิ่งต่ำ) ในขณะที่ค่า TFC มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ IC_{50} ของทุกการทดสอบ ($r = 0.637-0.868$) ยืนยันว่าพลาโวนอยด์รวมไม่ใช่ตัวแปรหลักที่กำหนดฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด

ผลการจัดอันดับศักยภาพแบบรวม (Composite Ranking; 4.9) ชี้ชัดว่า ใบอ่อน 50% EtOH มีคะแนนรวมสูงสุด (0.698) รองลงมาคือใบอ่อน 95% EtOH (0.652) และกิ่งก้าน 95% EtOH (0.519) ซึ่งสะท้อนถึงศักยภาพโดยรวมที่โดดเด่นทั้งในด้านองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพ ในขณะที่กลุ่มเปลือกโดยเฉพาะเปลือก Acetone มีคะแนนต่ำที่สุด (-1.215) สอดคล้องกับผลการทดสอบทุกหัวข้อ

4.11 ผลการทดสอบตำรับและความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (Formulation and Stability Testing)

สารสกัดใบอ่อนกระช่อนด้วยเอทานอล 50% (Santol extract (50% EtOH)) ถูกนำมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์หลักในความเข้มข้น 1.60% (w/w) ในทั้งสองตำรับ โดยมีขั้นตอนการเตรียมเป็นไปตามวิธีดำเนินการวิจัยหัวข้อ 3.13.1

การพัฒนาตำรับเสริมในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้สารสกัดกระช่อน ใบอ่อน 50% เอทานอล (Young Leaf 50% EtOH extract) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์หลักที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase ได้ดีที่สุด (จากผลการทดลองใน หัวข้อ 4.1-4.9) เข้าสู่รูปแบบเครื่องสำอางต้นแบบ ประเภท เซรั่ม สำหรับผิวกระจางใสและชะลอวัย โดยออกแบบตำรับ 2 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1: Serum (เนื้อเหลว) และ สูตรที่ 2: Gel-cream (เนื้อกึ่งครีมเจล) ทั้งสองสูตรมีสี กลิ่น และ pH อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อผิว ($\text{pH} \approx 5.5-6.5$) โดย สูตร 1 มีเนื้อสัมผัสบางเบา ซึมเร็ว เหมาะใช้ก่อนครีม ขณะที่ สูตร 2 ให้ความชุ่มชื้นมากกว่า เคลือบผิวได้ดี เหมาะใช้เป็นผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย ซึ่งถือว่ามีลักษณะทางกายภาพที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของเครื่องสำอางบำรุงผิว

4.11.1 การทดสอบความคงตัวของตำรับ (Stability Testing)

ทำการทดสอบความคงตัวด้วยวิธี Accelerated Stability Test แบบ 6 cycle โดยเก็บผลิตภัณฑ์ในอุณหภูมิ 4 °C และ 45 °C สลับกันทุก 24 ชั่วโมง ครบ 6 รอบ (รวม 12 วัน) และประเมินการเปลี่ยนแปลงของ สี, ความเป็นกรด-ด่าง, ความหนืด และ การตกตะกอน/แยกชั้น

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับ (6 Cycle)

พารามิเตอร์	สูตร 1 Serum		สูตร 2 Gel-cream	
	เริ่มต้น	หลัง 6 cycle	เริ่มต้น	หลัง 6 cycle
รูปภาพ				
สี (L*a*b*)	56, 0.26, 2.23	58.28, 1.16, 0.4 dL* = 2.28 da* = 0.90 db* = -1.84 dE*ab* = 3.08	95.38, -0.01, 0.28	91.41, -0.27, - 0.61 dL* = -3.97 da* = -0.25 db* = -0.90 dE*ab* = 4.08
pH	6.33	6.10	7.00	5.43
ความหนืด	2	1	4	4
การแยกชั้น/ ตกตะกอน	ไม่เกิดการแยกชั้น และไม่ตกตะกอน	ไม่เกิดการแยกชั้น และไม่ตกตะกอน	ไม่เกิดการแยกชั้น และไม่ตกตะกอน	ไม่เกิดการแยกชั้น และไม่ตกตะกอน

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงผลการทดสอบความคงตัวด้วยวิธีสภาวะเร่ง (Heating-Cooling Cycle) จำนวน 6 รอบ (1 รอบประกอบด้วย 45°C 24 ชม. สลับกับ 4°C 24 ชม.) dE*ab คือ ค่าความแตกต่างของสีรวม (Total Color Difference) เมื่อเปรียบเทียบกับวันเริ่มต้น ความหนืด แสดงเป็นระดับคะแนน 1-5 โดย: 1 = เหลวมากเหมือนน้ำ, 2 = เหลวหนืดเล็กน้อย, 3 = เนื่อครีมปานกลาง, 4 = เนื่อครีมข้น, 5 = เนื่อครีมแข็งตัว การแยกชั้น: สังเกตด้วยตาเปล่า (Visual observation)

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับแบบมีสารสกัด (6 Cycle)

พารามิเตอร์	สูตร 1 Serum		สูตร 2 Gel-cream	
	เริ่มต้น	หลัง 6 cycle	เริ่มต้น	หลัง 6 cycle
รูปภาพ				
สี (L*a*b*)	53.07, 1.4, 7.77	48.8, 6.63, 13.48 dL* = -4.27 da* = 5.23 db* = 5.72 dE*ab* = 8.85	92.7, 0.51, 5.36	85.95, 2.96, 9.69 dL* = -6.75 da* = 2.46 db* = 4.33 dE*ab* = 8.39
pH	6.33	6.08	6.20	5.80
ความหนืด	2	1	4	4
การแยกชั้น/ ตกตะกอน	ไม่เกิดการแยกชั้น และไม่ตกตะกอน	ไม่เกิดการแยกชั้น และไม่ตกตะกอน	ไม่เกิดการแยกชั้น และไม่ตกตะกอน	ไม่เกิดการแยกชั้น และไม่ตกตะกอน

หมายเหตุ ข้อมูลแสดงผลการทดสอบความคงตัวด้วยวิธีสภาวะเร่ง (Heating-Cooling Cycle) จำนวน 6 รอบ (1 รอบประกอบด้วย 45°C 24 ชม. สลับกับ 4°C 24 ชม.) dE*ab คือ ค่าความแตกต่างของสีรวม (Total Color Difference) เมื่อเปรียบเทียบกับวันเริ่มต้น ความหนืด แสดงเป็นระดับคะแนน 1-5 โดย: 1 = เหลวมากเหมือนน้ำ, 2 = เหลวหนืดเล็กน้อย, 3 = เนื่อครีมปานกลาง, 4 = เนื่อครีมข้น, 5 = เนื่อครีมแข็งตัว การแยกชั้น: สังเกตด้วยตาเปล่า (Visual observation)

ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับทั้งสองสูตรภายใต้สภาวะเร่ง (Accelerated Stability Test, 6 cycle) (กนกวรรณ ฉัตรเงิน, 2567; ดวงกมล เลี้ยวกิตติกุล และคณะ, 2553) พบว่าผลิตภัณฑ์มีลักษณะกายภาพพื้นฐานที่แตกต่างกัน โดย สูตรที่ 1 (Serum) มีเนื้อสัมผัสบางเบา โปร่งใส

และไหลได้ดี ขณะที่ สูตรที่ 2 (Gel-cream) มีลักษณะกึ่งครีมเจล มีความหนืดและให้ความชุ่มชื้นสูงกว่าเมื่อพิจารณาตำรับฐาน (Base formulation) (ตารางที่ 4.8) พบว่า สูตรที่ 1 (Serum) มีความคงตัวทางเคมีดี โดยค่า pH ลดลงเพียงเล็กน้อย (จาก 6.33 เป็น 6.10) ในทางตรงกันข้าม ตำรับฐานของสูตรที่ 2 (Gel-cream) แสดงให้เห็นถึงความไม่คงตัวอย่างชัดเจน โดยค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญจาก 7.00 เหลือ 5.43 ($\Delta\text{pH} = -1.57$) ซึ่งอยู่นอกเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ (± 1.0) ภาวะดังกล่าวอาจบ่งชี้ถึงการเสื่อมสภาพของสารเพิ่มความหนืดหรือการแตกตัวของอิมัลซิไฟเออร์ภายใต้สภาวะเร่งอย่างใดก็ตาม เมื่อเติมสารสกัดกระท้อนใบอ่อน 50% เอทานอล ลงในตำรับ (ตารางที่ 4.9) พบว่า ตำรับทั้งสองสูตรมีเสถียรภาพทางเคมีดีขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน สูตรที่ 2 (Gel-cream) ซึ่งค่า pH เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (จาก 6.20 เหลือ 5.80; $\Delta\text{pH} = -0.40$) และอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระท้อนอาจมีบทบาทในการช่วยรักษาสมดุลความเป็นกรด-ด่างของตำรับ (Buffering capacity) โดยกลุ่มสารฟีนอลิก (Phenolic compounds) ซึ่งมีสมบัติเป็นกรดอ่อน อาจทำหน้าที่เป็นสารบัฟเฟอร์ หรือช่วยป้องกันการสลายตัวของโครงสร้างเจล ทำให้สูตรที่มีสารสกัดมีเสถียรภาพทางเคมีสูงกว่าตำรับฐาน (Shahidi & Ambigaipalan, 2015) ในด้านการเปลี่ยนแปลงของสี พบว่าทั้งสองสูตรที่มีสารสกัด (Serum และ Gel-cream) มีค่าความแตกต่างของสี (ΔE) สูง (ประมาณ 8–9) โดยสีของผลิตภัณฑ์เข้มข้นหลังการทดสอบ ซึ่งคาดว่าเป็นผลโดยตรงจากกระบวนการออกซิเดชันของสารฟีนอลิก (Phenolic oxidation) เมื่อสัมผัสกับออกซิเจนและอุณหภูมิสูง (Khoddami et al., 2013; Shahidi & Ambigaipalan, 2015) แม้การเปลี่ยนแปลงนี้จะไม่ส่งผลต่อความคงตัวของโครงสร้างตำรับ แต่จำเป็นต้องมีการศึกษาความคงตัวด้านประสิทธิภาพ (Efficacy stability) เพิ่มเติม เพื่อยืนยันว่าสารออกฤทธิ์ยังคงมีประสิทธิภาพหลังเกิดการเปลี่ยนแปลงของสี

ด้านความคงตัวทางกายภาพ (ความหนืด) ซึ่งประเมินโดยการให้คะแนน (1=เหลวมาก, 5=หนืดมาก) พบว่า ที่สภาวะเริ่มต้น (ตารางที่ 4.9) สูตรที่ 1 (Serum) และ สูตรที่ 2 (Gel-cream) มีความหนืดแตกต่างกันตามลักษณะของตำรับอย่างชัดเจน (เช่น คะแนนเริ่มต้นประมาณ 2 และ 4 ตามลำดับ) หลังผ่านสภาวะเร่ง พบว่า สูตรที่ 1 (Serum) มีแนวโน้มความหนืดลดลงเล็กน้อย (เช่น จากคะแนน 2 ลดเหลือ 1) ซึ่งอาจเกิดจากการสลายพันธะของพอลิเมอร์เมื่อสัมผัสอุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน ในขณะที่ สูตรที่ 2 (Gel-cream) สามารถรักษาค่าความหนืดได้คงที่ใกล้เคียงเดิม (เช่น คะแนน 4 คงที่ที่ 4) แสดงถึงเสถียรภาพทางโครงสร้างที่ดีกว่า นอกจากนี้ ไม่พบการแยกชั้นหรือการตกตะกอน (Phase separation) ในตำรับที่มีสารสกัดทั้งสองสูตร ในตำรับที่มีสารสกัดทั้งสองสูตร ซึ่งเป็นเกณฑ์สำคัญในการยอมรับความคงตัวของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสมุนไพร (ดวงกมล เลียวกิตติกุล และคณะ, 2553)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ (CONCLUSION AND RECOMMENDATION)

5.1 สรุปผลการวิจัย (Conclusion)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินศักยภาพของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของ กระท้อน (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) ได้แก่ ใบอ่อน ใบแก่ เปลือก และกิ่งก้าน โดยใช้ตัวทำละลาย 3 ชนิด (50% เอทานอล, 95% เอทานอล และอะซิโตน) เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ, การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และหาความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทางเคมีต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ พร้อมทั้งพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบเพื่อความกระจำใส และชะลอวัย

ผลการวิจัยสรุปได้ว่า สารสกัดจากใบอ่อนที่สกัดด้วย 50% เอทานอล (Young Leaf 50% EtOH extract) เป็นตัวอย่างที่มีศักยภาพทางชีวภาพสูงที่สุด โดยแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (ผ่านการทดสอบ DPPH และ ABTS) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด ศักยภาพที่โดดเด่นนี้เป็นผลมาจาก ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) ซึ่งตรวจพบในปริมาณสูงในสารสกัดกลุ่ม 50% เอทานอล ในทางตรงกันข้าม ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) ไม่แสดงความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพที่วัดได้ โดยสารสกัดที่มี TFC สูง (เช่น เปลือกอะซิโตน) กลับมีฤทธิ์ต่ำ จึงชี้ชัดว่าสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีขั้ว (Polar phenolics) เป็นองค์ประกอบหลักที่รับผิดชอบต่อฤทธิ์ดังกล่าว การวิเคราะห์ทางสถิติสนับสนุนข้อสรุปนี้อย่างชัดเจน การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlation Analysis) ยืนยันว่า TPC มีความสัมพันธ์เชิงลบในระดับสูงมากกับค่า IC₅₀ ของทุกการทดสอบ (ยิ่งมีฟีนอลิกมาก ฤทธิ์ยิ่งสูง) ในขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีความสัมพันธ์เชิงบวกต่อกันในระดับสูงมาก ซึ่งสะท้อนว่ามาจากสารออกฤทธิ์กลุ่มเดียวกัน นอกจากนี้ การจัดอันดับศักยภาพ (Composite Ranking Analysis) ยังยืนยันว่า ใบอ่อน 50% EtOH มีคะแนนรวมสูงที่สุดอย่างโดดเด่น ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบ พบว่าสารสกัดใบอ่อน 50% เอทานอล สามารถนำไปพัฒนาเป็นสูตร Gel-cream ที่มีความคงตัวดี โดยไม่พบการแยกชั้นหรือตกตะกอนหลังการทดสอบสภาวะเร่ง ผลลัพธ์ที่สำคัญคือ สารสกัดกระท้อนไม่เพียงแต่ไม่ทำให้ตำรับเสื่อมสภาพ แต่กลับมีบทบาทช่วย เสริมความคงตัวทางเคมี (Chemical stability) ให้กับตำรับฐานได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยช่วยรักษาค่า pH ให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานได้ดีกว่าตำรับฐานที่ไม่มีสารสกัด กล่าวโดยสรุป งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ใบอ่อนของกระท้อนที่สกัดด้วย 50% เอทานอล เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ธรรมชาติที่มีศักยภาพ

สูง ทั้งในด้านการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และการเสริมเสถียรภาพของระบบสูตรเครื่องสำอาง

5.2 ข้อเสนอแนะ (Recommendation)

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะเพื่อการต่อยอดองค์ความรู้และการประยุกต์ใช้ในอนาคต ดังนี้

5.2.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเชิงลึก

ควรมีการวิเคราะห์สารประกอบเชิงลึก (Advanced Phytochemical Profiling) ด้วยเทคนิคที่มีความละเอียดสูง เช่น LC-MS/MS หรือ NMR เพื่อระบุและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์อื่น ๆ ที่มีบทบาทสำคัญต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ แต่ไม่ได้ถูกตรวจวัดในการวิเคราะห์ด้วย HPLC ในการศึกษาครั้งนี้

5.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพในแบบจำลองระดับเซลล์

ควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์ (In vitro cellular models) เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารสกัด ได้แก่ การทดสอบการยับยั้งการสร้างเมลานินในเซลล์เมลานोไซต์ (Melanogenesis assay) และ การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ผิวหนัง (Cellular ROS inhibition assay)

5.2.3 การประเมินความปลอดภัยของสารสกัด

เพื่อรองรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ ควรดำเนินการทดสอบความปลอดภัยของสารสกัดเพิ่มเติมอย่างเป็นระบบ ได้แก่ การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity test), การทดสอบการระคายเคืองผิว (Skin irritation test) และการทดสอบการแพ้ในอาสาสมัคร (Human patch test)

5.2.4 การศึกษาความคงตัวด้านประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์

เนื่องจากผลการทดสอบพบการเปลี่ยนแปลงของสีในตำรับอย่างชัดเจน (ΔE 8–9) ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic oxidation) จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องศึกษา ความคงตัวด้านประสิทธิภาพ (Efficacy stability) เพื่อประเมินว่าการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพดังกล่าว ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ (เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) เมื่อเวลาผ่านไปหรือไม่

5.2.5 การต่อยอดเชิงพาณิชย์และการตลาด

ผลการวิจัยนี้สามารถนำไปต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวได้หลากหลายรูปแบบ (เช่น Brightening serum, Anti-aging cream) โดยเฉพาะสูตร Gel-cream ที่แสดงความคงตัวดีเยี่ยม ซึ่งควรพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป พร้อมทั้งศึกษา การยอมรับของผู้บริโภค (Consumer perception test) เพื่อประเมินศักยภาพทางการตลาด

5.2.6 การส่งเสริมเศรษฐกิจชุมชนและความยั่งยืน

การใช้วัตถุดิบจาก “กระท้อน” ซึ่งเป็นพืชพื้นถิ่นของไทย สามารถต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรท้องถิ่นที่มีมูลค่าเพิ่มสูง สอดคล้องกับโมเดล เพื่อส่งเสริมเศรษฐกิจชุมชนและสร้างความยั่งยืนให้กับอุตสาหกรรมความงามของไทย



รายการอ้างอิง

- กนกวรรณ ฉัตรเงิน. (2567). การศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและความคงตัวของสารสกัดใบกะเพรา (วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.
- ดวงกมล เลี้ยวกิตติกุล, วิชาวี วัชรณะ, มานิตา หาญพานิชเจริญ, และฉันทนา อารมย์ดี. (2553). การตั้งตำรับครีมที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากบัวบก. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)*, 2(4), 39–53.
- ธนชสิทธิ์ พูนไพบูลย์พิพัฒน์. (2562). ผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของเอทานอลต่อการสกัดสารสกัดหยาบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากใบแก้ว. *วารสารเกษตรนเรศวร*, 16(2), 1-6.
<https://li01.tci-thaijo.org/index.php/aginujournal/article/view/247828>
- Anantachoke, N., Lomarat, P., Praserttirachai, W., Khammanit, R., & Mangmool, S. (2016). Thai fruits exhibit antioxidant activity and induction of antioxidant enzymes in HEK-293 cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/6083136>
- Andrade, C. (2021). Z scores, standard scores, and composite test scores explained. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 43(6), 555–557.
<https://doi.org/10.1177/025371762111046525>
- Armaghan, M., Khan, K., Irfan, M., Hafeez, A., Zafar, S., Javed, Z., . . . Bagiu, R. V. (2024). Koetjapic acid: unveiling its potential as a saviour in the realm of biological and medicinal properties, with a focus on anticancer mechanism of action. *European Journal of Medical Research*, 29(1). <https://doi.org/10.1186/s40001-024-01699-6>
- Bailly, C. (2022). The health benefits of santol fruits and bioactive products isolated from *Sandoricum koetjape* Merr.: A scoping review. *Journal of Food Biochemistry*, 46(7), e14152. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14152>
- Biswas, A., Dey, S., Xiao, A., Deng, Y., Birhanie, Z. M., Roy, R., Akhter, D., . . . Li, D. (2023). Ultrasound-assisted extraction (UAE) of antioxidant phenolics from *Corchorus olitorius* leaves: a response surface optimization. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00443-2>

- Bumi, M. B., Heliawaty, L., Hermawati, E., & Syah, Y. M. (2019). Four limonoids from the seeds extract of *Sandoricum koetjape*. *Journal of Natural Medicines*, 73(3), 641–647. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01303-w>
- Cannavacciuolo, C., Pagliari, S., Celano, R., Campone, L., & Rastrelli, L. (2024). Critical analysis of green extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, and optimization strategies-A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 173, 117627. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117627>
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.
- Chang, T. S. (2012). Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6490.
- Ćirović, T., Barjaktarević, A., Cupara, S., Mitić, V., Nikolić, J., & Stankov Jovanović, V. (2019). Antioxidant and antimicrobial activity of *Sanguisorba minor* L. extracts. *Advanced Technologies*, 8(2), 20-28.
- Coley, P. D., Bryant, J. P., & Chapin, F. S., III. (1985). Resource availability and plant antitherbivore defense. *Science*, 230(4728), 895–899. <https://doi.org/10.1126/science.230.4728.895>
- Cui, H.-X., Duan, F.-F., Jia, S.-S., Cheng, F.-R., & Yuan, K. (2018). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of seed oils from *Torreya grandis* Fort. ex Lindl. *BioMed Research International*, 2018, 5314320. <https://doi.org/10.1155/2018/5314320>
- Dauda, H., Uba, G., & Ali, U. (2020). Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Analysis of Flavonoids from the Stem Bark Extract of *Commiphora africana* (Burseraceae). *Bulletin of Environmental Science and Sustainable Management*, 4(1), 25–27. <https://doi.org/10.54987/bessm.v4i1.529>
- Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>

- Ghadigaonkar, S., Reddy, A. G., Kalakumar, B., Lakshman, M., & Rajkumar, U. (2021). Quantification of total phenolic content, total flavonoid content and evaluation of in vitro free radical scavenging activities in *Ficus religiosa* Linn. *The Pharma Innovation Journal*, 10(3), 84–88.
- Gite, S. S., Yadav, S. A., Nilegaonkar, S. S., & Agte, V. V. (2015). Antioxidant quality ranking of some plant materials based on multiple in vitro radical scavenging assays. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(7), 152-159.
- Grzybek, M., Griebhammer, R., Barz, M., & Theato, P. (2021). Organosolv lignin from European tree bark: Influence of bark pretreatment on lignin's physicochemical properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7695. <https://doi.org/10.3390/ijms22147695>
- Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH radical scavenging assay. *Processes*, 11(8), 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
- Hajji Nabih, M., Bouluka, H., El Hajam, M., Alghonaim, M. I., Kandri, N. I., Alsalamah, S. A., & Boufahja, F. (2023). Successive solvent extraction, characterization and antioxidant activities of cardoon waste (leaves and stems) extracts: Comparative study. *Molecules*, 28(3), 1129. <https://doi.org/10.3390/molecules28031129>
- Hall, B., Rapinski, M., Spoor, D., Eid, H., Saleem, A., Arnason, J. T., . . . Harris, C. S. (2022). A Multivariate approach to Ethnopharmacology: Antidiabetic plants of Eeyou Istchee. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.511078>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
- Hamzah, F. N., Ahmad, A., Subandi, S., Septama, A. W., Sujarwo, W., Choudhry, H., . . . Mozef, T. (2024). Investigating *Sandoricum koetjape* leaf extracts for tyrosinase inhibition: Flavonoid profiles and mechanisms. *E3S Web of Conferences*, 577, 02008. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202457702008>
- Hamzah, F. N., Anam, S., Rahayu, D., Yuliana, A., & Hermawati, E. (2020). Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of Kecapi (*Sandoricum koetjape* (Burm.f) Merr.) leaf extract. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 833, 012012. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/833/1/012012>

- Jafari, S. F., Ahamed, M. B. K., Iqbal, M. A., Suede, F. S. R. A., Khalid, S. H., Haque, R. A., Nassar, Z. D., Umar, M. I., & Majid, A. M. S. A. (2014). Increased aqueous solubility and proapoptotic activity of potassium koetjapate against human colorectal cancer cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(10), 1394–1409. <https://doi.org/10.1111/jphp.12272>
- Kamiński, K., Kazimierczak, U., & Kolenda, T. (2022). Oxidative stress in melanogenesis and melanoma development. *Współczesna Onkologia*, 26(1), 1–7. <https://doi.org/10.5114/wo.2021.112447>
- Kancherla, N., Dhakshinamoothi, A., Chitra, K., & Komarama, R. B. (2019). Preliminary analysis of phytoconstituents and evaluation of anthelmintic property of *Cayratia auriculata* (In Vitro). *MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine*, 14(4), 350–356. <https://doi.org/10.26574/maedica.2019.14.4.350>
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Ladeska, V., Elya, B., Hanafi, M., & Kusmardi. (2022). Antioxidants, total phenolic and flavonoid content and toxicity assay of *Ampelas* (*Tetracera macrophylla* Wall.Ex Hook.F.& Thoms) From Kalimantan-Indonesia. *Pharmacognosy Journal*, 14(5), 642–648. <https://doi.org/10.5530/pj.2022.14.147>
- Leakaya, N., Sato, V. H., & Chewchinda, S. (2018). Antioxidant activity, total phenolic, total flavonoid content and HPTLC analysis of morin in *Maclura cochinchinensis* heartwood extract. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(Supplement Issue), 27–31.
- Lim, H. Y., & Kwon, K. H. (2023). Sustainable assessment of the environmental activities of major cosmetics and personal care companies. *Sustainability*, 15(18), 13286. <https://doi.org/10.3390/su151813286>
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., & Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Glechoma hederacea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69(1), 197–201.

- Mateo, S., Fabbri, A., & Moya, R. (2025). Lignin from plant-based agro-industrial biowastes: From extraction to sustainable applications. *Polymers*, 17(1), 126. <https://doi.org/10.3390/polym17010126>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Nhani, G. B. B., Di Filippo, L. D., de Paula, G. A., Mantovanelli, V. R., da Fonseca, P. P., Tashiro, F. M., . . . Chorilli, M. (2024). High-tech sustainable beauty: Exploring nanotechnology for the development of cosmetics using plant and animal by-products. *Cosmetics*, 11(4), 112. <https://doi.org/10.3390/cosmetics11040112>
- Rachkeeree, A., Kantadong, K., Puangpradub, R., & Suksathan, R. (2020). Phytochemicals, antioxidants and anti-tyrosinase analyses of selected ginger plants. *Pharmacognosy Journal*, 12(4), 872–883. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.125>
- Rapa, S. F., Magliocca, G., Pepe, G., Amodio, G., Autore, G., Campiglia, P., & Marzocco, S. (2023). Protective effect of pomegranate peel extract and its fractions against oxidative stress and inflammation in macrophage cells. *Antioxidants*, 12(2), 344. <https://doi.org/10.3390/antiox12020344>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Saadah, S., Tulandi, S., & Rohman, R. (2023). Seven types of phenolic acid and inhibitory activity for protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) from the stem of *Sandoricum koetjape*. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 1255(1), 012070. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1255/1/012070>
- Sai-Ut, S., Benjapak, M., Srinuanchai, W., Kijroongrojana, K., & Suttirak, W. (2023). Optimization of ethanolic extraction of phenolic antioxidants from lychee and longan seeds using response surface methodology. *Molecules*, 28(16), 6133. <https://doi.org/10.3390/molecules28166133>

- Sari, K. R. P., Ikawati, Z., Danarti, R., & Hertiani, T. (2023). Micro-titer plate assay for measurement of total phenolic and total flavonoid contents in medicinal plant extracts. *Arabian Journal of Chemistry*, 16(9), 105003. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105003>
- Sembiring, E. N., Elya, B., & Sauriasari, R. (2017). Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacognosy Journal*, 10(1), 123–127. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.1.22>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18(Part B), 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Sharma, T., Pandey, B., Shrestha, B. K., Koju, G. M., Thusa, R., & Karki, N. (2020). Phytochemical screening of medicinal plants and study of the effect of phytoconstituents in seed germination. *Tribhuvan University Journal*, 35(2), 1–11. <https://doi.org/10.3126/tuj.v35i2.36183>
- Shin, S., Kim, M., Song, N., Sun, S., Choi, J., & Park, K. (2022). Antioxidant and Anti-Melanogenesis Effects of Colloidal Gold *Camellia sinensis* L. Extracts. *Molecules*, 27(17), 5593. <https://doi.org/10.3390/molecules27175593>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Starkevič, P., Kviklys, D., Laužikė, K., Valiuškaitė, A., & Račelis, A. (2020). Production of defense phenolics in tomato leaves of different age. *Plants*, 9(10), 1311. <https://doi.org/10.3390/plants9101311>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44–84.
- Vieito, C., Fernandes, E., Velho, M. V., & Pires, P. (2018). The effect of different solvents on extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of extracts from pine bark (*pinus pinaster* subsp. *atlantica*). *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*, 64, 127–132. <https://doi.org/10.3303/cet1864022>

- Wijaya, M. D. (2022). Ethnomedicinal, phytochemicals, and pharmacological aspects of Sentul (*Sandoricum koetjape*). *Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry*, 11(1), 65-73. <https://doi.org/10.14421/biomedich.2022.111.65-73>
- Zhang, T., Wan, D., Li, Y., Wang, S., Zhou, X., Sefidkon, F., & Yang, X. (2023). UPLC-MS Analysis, Quantification of Compounds, and Comparison of Bioactivity of Methanol Extract and Its Fractions from Qiai (*Artemisia argyi* Lévl. et Van.). *Molecules*, 28(5), 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules28052022>
- Zhang, T., Zheng, J., Yu, Z., Huang, X., Zhang, Q., Tian, X., & Peng, C. (2018). Functional characteristics of phenolic compounds accumulated in young leaves of two subtropical forest tree species of different successional stages. *Tree Physiology*, 38(10), 1486–1501. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpy030>
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 279–309. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>