6. 114310

สัญญาเลขที่ 09/พ.ศ. 2555
รหัสโครงการ 55208020009

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ทางชีวภาพ และความคงตัวของสีจากเศษเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำกระเจี๊ยบ

Biological activities and color stability from residue in Roselle juice processing industry

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐยา เหล่าฤทธิ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุรี กัลยาวัฒนกุล

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) ที่สนับสนุนทุนวิจัย โดยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2555 และมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่สนับสนุนสถานที่ รวมถึงครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ คุณวิไล ดวงใจ ที่ให้การสนับสนุนด้านการประสานงาน และเอกสารต่าง ๆ

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาสีจากเศษเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำกระเจี๊ยบ สำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางซึ่งนอกจากจะเป็นการผลิตวัตถุดิบในเครื่องสำอางได้ในประเทศแล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าผลิตผลทางการเกษตร โดยนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น รวมถึงวิธีการสกัดที่ไม่ยุ่งยาก ซึ่งมีความเหมาะสมในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คณะผู้วิจัย
7 พฤศจิกายน
2556

บทสรุปผู้บริหาร

กระเจี๊ยบ เป็นพืชที่ปลูกได้ในประเทศที่มีอากาศร้อนชื้น และนิยมนำมาบริโภคเป็นเครื่องดื่มทั้งในรูปแบบน้ำผลไม้ และน้ำชา ตลอดจนมีการนำมาแปรรูปเป็นแยม ซึ่งนอกจากจะมีรสชาติที่ดีแล้ว ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่ใช้ในการเสริมและบำรุงสุขภาพ และองค์ประกอบหลักในกระเจี๊ยบที่ให้สี เป็นสารกลุ่ม anthocyanins และสารกลุ่มฟีนอลิค ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี ประกอบกับในเขตจังหวัดเชียงราย มีโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำผลไม้กระป๋องและน้ำกระเจี๊ยบเป็นน้ำผลไม้ที่มีการผลิตมากชนิดหนึ่งโดยใช้ส่วนดอกสีแดงในการคั้นน้ำ กลุ่มผู้วิจัยเห็นว่าเศษเหลือทิ้งนี้น่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเหมือนในน้ำกระเจี๊ยบ เนื่องจากผ่านขบวนการผลิตในช่วงเวลาสั้นๆ เพื่อการคั้นน้ำ และเศษเหลือทิ้งเหล่านั้น ถูกนำไปใช้ประโยชน์เพียงเป็นปุ๋ยหรือทิ้งเป็นเศษขยะ จึงสนใจจะเพิ่มมูลค่ากากกระเจี๊ยบโดยศึกษาความคงตัวด้านสีจากเศษเหลือทิ้งเหล่านี้ที่ความเข้มข้น, pH และอุณหภูมิต่างๆ และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพ และการพัฒนาสีจากธรรมชาติสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบทางเครื่องสำอางที่มีคุณสมบัติเป็น Multifunctional cosmetic active ingredient คือ ให้สีสันที่สวยงามดึงดูดใจและแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นทางเครื่องสำอางในตำรับ เพราะเป็นคุณสมบัติที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาวัตถุดิบในประเทศ และเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของประเทศไทยกับต่างประเทศ ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยในภาคเหนือ ที่เน้นการวิจัยเพื่อสนับสนุนการพัฒนาเศรษฐกิจการค้า และลงทุนภาคเหนือสู่ภูมิภาคลุ่มน้ำโขงและอินโดจีน ตามกลยุทธ์การวิจัยที่ 1 ในการสรรสร้างคุณค่าผลิตภัณฑ์ภาคเกษตรและการใช้ประโยชน์จากพืชป่าสู่มูลค่าอุตสาหกรรมและการค้าตามหลักการพึ่งตนเองอย่างยั่งยืน ตามแผนงานวิจัย ที่เน้นการวิจัยและพัฒนาการผลิต แปรรูปพืชเศรษฐกิจ โดยการนำกระเจี๊ยบ ซึ่งเป็นเศษเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำผลไม้ มาสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่าสารสกัด 95% EtOH ให้สีแดงสด ในขณะที่สารสกัดสีจากตัวทำละลาย EtOAc ให้สีเขียวอ่อน และสารสกัดมีสีเขียวเข้ม ในตัวทำละลาย *n*-Hexane คัดเลือกสารสกัดกระเจี๊ยบส่วน 95% EtOH และ EtOAc ซึ่งให้สีที่มีความสวยงาม เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ไปศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วย DPPH assay และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ โดยหาปริมาณฟีนอลิครวม และการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิคด้วย HPLC พบว่าสารสกัด 95% EtOH แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีปริมาณฟีนอลิครวม ตลอดจน gallic acid, chlorogenic acid, quercetin, caffeic acid และ ferulic acid ในปริมาณสูง และมากกว่า ส่วนสกัด EtOAc และสารสกัดสีแดงสดจาก 95% EtOH ที่เตรียมได้ ไม่มีความเป็นพิษต่อ vero cells และมีความคงตัวดี ตลอด

ระยะเวลาการทดสอบ 10 วัน โดยเฉพาะการเก็บสารสกัดสี ภายใต้ อุณหภูมิ 23 °C ใน buffer ที่มี pH 3

โดยได้มีการเผยแพร่ผลงานวิจัยบางส่วนในวารสาร Agro Food Hi-Tech ซึ่งอยู่ในฐานข้อมูล Thomson Reuters Journal Citation Reports และ SCImago Journal & Country Rank ใน volume 24 หน้า 40-42 ปี 2013 ดังแนบในภาคผนวก

ชื่อโครงการวิจัย ฤทธิ์ทางชีวภาพ และความคงตัวของสีจากเศษเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำกระเจี๊ยบ

คณะผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐยา เหล่าฤทธิ์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุรี กัลยาวัฒนกุล

บทคัดย่อ

เตรียมสารสกัดกลีบรองดอกกระเจี๊ยบ ด้วยตัวทำละลาย 95% EtOH, EtOAc และ *n*-Hexane ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิครวม พบว่า สารสกัดส่วน 95% EtOH ที่มีสีแดงสด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิค มากกว่า ส่วนสกัด EtOAc อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมี gallic acid, chlorogenic acid, quercetin, caffeic acid และ ferulic acid มากกว่า เช่นกัน จึงคัดเลือกสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ ส่วน 95% EtOH ไปทดสอบความคงตัวเป็นเวลา 10 วัน พบว่า สารสกัดสี ใน puffer ที่มี pH 3 เก็บที่อุณหภูมิ 23 °C มีความคงตัวดีที่สุด ตลอดระยะเวลาการทดสอบ การวิจัยนี้จึงเป็นการใช้ประโยชน์จากผลิตผลทางการเกษตรอย่างยั่งยืน และเป็นแนวทางสำคัญในการเพิ่มมูลค่าของกระเจี๊ยบ ลดเศษเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ โดยการนำมาแปรรูปเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์สำคัญทางชีวภาพ ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และให้สีที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อการตกแต่งต่อไป

คำสำคัญ: กระเจี๊ยบ/สีธรรมชาติ/ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ/ความคงตัวของสี/วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

Research title	Biological activities and color stability from residue in Roselle juice processing industry
Researchers	Asst. Prof. Dr. Nattaya Lourith Asst. Prof. Dr. Mayuree Kanlayavattanakul

Abstract

Extraction of Roselle calyces discarded from juice production using EtOH imparted a more attractive color than that of EtOAc and *n*-Hexane. The antioxidant activity and total phenolic content of EtOH and EtOAc Roselle extracts were compared. The bright red EtOH extract exhibited significantly ($p < 0.05$) greater DPPH radical scavenging activity than the light green EtOAc extract and had greater phenolic content. Gallic acid, chlorogenic acid, quercetin, caffeic acid and ferulic acid were found at higher concentrations in the EtOH extract. The red color was highly stable over 10 days of storage at pH 3 and 23 °C. This report investigates the application potential of agri-industrial waste. An optimized process is offered to minimize the waste from Roselle juice production. Roselle value and profitability in agribusinesses will be increased by the transformation of the juice waste into active extracts that function as antioxidant or decorative colorant.

Keywords: Roselle/*Hibiscus sabdariffa*/antioxidant color/color stability/agricultural waste

สารบัญ

		หน้า
บทที่ 1	**บทนำ**	
	1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
	1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
	1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
	1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	**แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	
	2.1 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
	2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
	2.3 กระเจี๊ยบ	7
บทที่ 3	**ระเบียบวิธีวิจัย**	8
บทที่ 4	**ผลการวิจัย**	11
บทที่ 5	**สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ**	18
รายการอ้างอิง		19
ประวัติคณะผู้วิจัย		23
การเผยแพร่ผลงานวิจัย		26

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4-1 ร้อยละผลผลิต และลักษณะของสารละลายของสารสกัดสี 11

ตารางที่ 4-2 ชนิดและปริมาณสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิคในสารสกัดสี 15

ตารางที่ 4-3 คุณสมบัติทางกายภาพของสารสกัดสีในสภาวะที่คงตัวที่สุด (pH 3, 23 °C) 17

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 4-1	สารละลายของสารสกัดสีกลีบรองดอกกระเจี๊ยบ	12
ภาพที่ 4-2	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay ของสารสกัดสีจากกลีบรองดอกกระเจี๊ยบ	12
ภาพที่ 4-3	ปริมาณฟีนอลิครวม ของสารสกัดสีจากกลีบรองดอกกระเจี๊ยบ	13
ภาพที่ 4-4	HPLC chromatogram ของสารสกัดสีจากกลีบรองดอกกระเจี๊ยบ (บนซ้ายและขวา) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (ล่าง)	14

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มนุษย์มีการใช้สีอินทรีย์และอนินทรีย์จากธรรมชาติมาตั้งแต่ยุคก่อนประวัติศาสตร์ ทั้งในด้านความงาม ความเชื่อ และพิธีกรรมทางศาสนา จากการค้นพบสีสังเคราะห์ ในปี ค.ศ. 1856 โดย W.H. Perkin ทำให้ปริมาณการใช้สีสังเคราะห์ เพิ่มขึ้นตามลำดับ (Zollinger, 1991)

สี เป็นองค์ประกอบสำคัญอย่างหนึ่งในเครื่องสำอางโดยเฉพาะกลุ่มเพื่อตกแต่ง เช่น ลิปสติก อายแชโดว์ บลัชออน เป็นต้น หรือเพื่อแต่งสีผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางให้ดูสวยงามน่าใช้ยิ่งขึ้นและดึงดูดใจผู้ใช้ เช่น สบู่ก้อน ครีม และโลชั่น ในปัจจุบันพบว่าสีสังเคราะห์มีการนำมาใช้เป็นจำนวนมากและพบรายงานความไม่ปลอดภัยหรือเป็นพิษ เช่น สีสังเคราะห์ที่ใช้ในเครื่องสำอางสำหรับผมหลายชนิด เป็น mutagen และ carcinogen และเพิ่มอัตราเสี่ยงในการเกิดมะเร็งทรวงอกอย่างไรก็ตามถึงแม้สีจากธรรมชาติจะมีความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าสีสังเคราะห์ แต่สีจากธรรมชาติส่วนใหญ่จะไม่ค่อยคงตัว ไม่ติดแน่น และมีคุณภาพแตกต่างกันไป ตามแหล่ง และวิธีการผลิต (Zheng et al., 2002) โดยสีธรรมชาติ อาจแบ่งตามกลุ่มองค์ประกอบทางเคมี หรือแหล่งของสี ได้ เช่น กลุ่มแคโรทีนอยด์ เช่น β-carotene ให้สีเหลืองอมส้ม จากแครอท หรือ lycopene ให้สีส้มแดง จากมะเขือเทศ เป็นต้น กลุ่มฟลาโว-นอยด์ เช่น α-cyanin ให้สีม่วงแดง จาก องุ่น เป็นต้น กลุ่ม quinolone เช่น laccaic acid ให้สีส้มจนถึงม่วงแดง จาก scale bug เป็นต้น กลุ่ม porphyrines เช่น chlorophyll ให้สีเขียว จากส่วนใบของพืชหลายชนิด และกลุ่ม diketone เช่น curcumine ให้สีเหลือง จากขมิ้นชัน เป็นต้น (พเยาว์, 2520; เต็ม, 2523; Kanlayavattanakul and Nattaya, 2007)

กระเจี๊ยบ (*Hibicus sabdariffa*) เป็นพืชที่ปลูกได้ในประเทศที่มีอากาศร้อนชื้น และนิยมนำมาบริโภคเป็นเครื่องดื่มทั้งในรูปแบบน้ำผลไม้ และน้ำชา ตลอดจนมีการนำมาแปรรูปเป็นแยม ซึ่งนอกจากจะมีรสชาติที่ดีแล้ว ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ ที่ใช้ในการเสริมและบำรุงสุขภาพ (Onyenekwe et al., 1999; Ali et al., 2003 and 2005; Chang-Che et al., 2004) และองค์ประกอบหลักในกระเจี๊ยบที่ให้สี เป็นสารกลุ่ม anthocyanins และสารกลุ่มฟีนอลิค และฟลาโวนอยด์ เช่น protocatechuic acid และ quercetin ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Ali et al., 2003) ประกอบกับในเขตจังหวัดเชียงราย มีโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำผลไม้กระป๋อง และน้ำกระเจี๊ยบเป็นน้ำผลไม้ที่มีการผลิตมากชนิดหนึ่งโดยใช้ส่วนดอกสีแดงในการคั้นน้ำ ทำให้มีกากเหลือทิ้งปริมาณมาก กลุ่มผู้วิจัยเห็นว่าเศษเหลือทิ้งนี้น่าจะมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีเหมือนในน้ำ

กระเจี๊ยบ เนื่องจากผ่านขบวนการผลิตในช่วงเวลาสั้นๆ เพื่อการคั้นน้ำ และเศษเหลือทิ้งเหล่านั้นถูกนำไปใช้ประโยชน์เพียงเป็นปุ๋ยหรือทิ้งเป็นเศษขยะ จึงสนใจจะเพิ่มมูลค่ากากกระเจี๊ยบโดยศึกษา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิครวม ความคงตัวด้านสีของเศษเหลือทิ้งเหล่านี้ที่ความเข้มข้น ความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสีจากธรรมชาติสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบทางเครื่องสำอางที่มีหน้าที่ในสูตรตำรับได้มากกว่าหนึ่งอย่าง (Multifunctional cosmetic active ingredient) คือ ให้สีสันที่สวยงามดึงดูดใจและแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ ทางเครื่องสำอางในตำรับ เพราะเป็นคุณสมบัติที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาวัตถุดิบในประเทศ และเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของประเทศไทยกับต่างประเทศ ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยในภาคเหนือ ที่เน้นการวิจัยเพื่อสนับสนุนการพัฒนาเศรษฐกิจ การค้า และลงทุนภาคเหนือสู่ภูมิภาคลุ่มน้ำโขงและอินโดจีนตามกลยุทธ์การวิจัยที่ 1 ในการสรรสร้างคุณค่าผลิตภัณฑ์ภาคเกษตรและการใช้ประโยชน์จากพืชป่าสู่มูลค่าอุตสาหกรรมและการค้าตามหลักการพึ่งตนเองอย่างยั่งยืน ตามแผนงานวิจัย ที่เน้นการวิจัยและพัฒนาการผลิต แปรรูปพืชเศรษฐกิจ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสีจากกระเจี๊ยบ
2. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ
3. วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิครวมในสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ
4. ทดสอบความคงตัวของสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ ที่สภาวะความเข้มข้น ความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิต่างๆ

1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ในขบวนการคั้นน้ำผลไม้ เพื่อผลิตเครื่องดื่มจากกระเจี๊ยบ ใช้ระยะเวลาสั้น และมีเศษเหลือทิ้งจำนวนมาก จึงคาดว่าน่าจะมีสารออกฤทธิ์สำคัญทางชีวภาพที่มีฤทธิ์เช่นเดียวกับกระเจี๊ยบ รวมถึงสีหลงเหลืออยู่ เช่นเดียวกับการนำเศษวัสดุเหลือทิ้งจากการแปรรูป องุ่น, แอปเปิ้ล, ส้ม และมะม่วงมาใช้ประโยชน์ในการเสริมและบำรุงสุขภาพ (Giusti and Wrolstad, 2003) หากงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงจะเป็นการพัฒนาวัตถุดิบทางเครื่องสำอางจากธรรมชาติในประเทศ และเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันกับต่างประเทศ ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยในภาคเหนือและของชาติ

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เตรียมสารสกัดกลีบรองดอกกระเจี๊ยบ ที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำกระเจี๊ยบจากโรงงานผลิตน้ำผลไม้ ใน อ. แม่จัน จ. เชียงราย และนำมาทำการสกัดด้วยวิธีการหมัก แล้วทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay และวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิครวม จากนั้นทดสอบความคงตัวของสีที่ความเข้มข้น, pH และอุณหภูมิต่าง ๆ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สีจากธรรมชาติที่มีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง
2. วิธีการสกัดที่เหมาะสม ไม่ยุ่งยากซับซ้อนสำหรับการเตรียมสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ
3. ความคงตัวของสีจากธรรมชาติ
4. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบที่ทราบปริมาณฟีนอลิครวม
5. แนวทางในการประยุกต์ใช้ผลิตผลทางการเกษตรอย่างยั่งยืน

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สีเป็นวัตถุดิบที่เป็นองค์ประกอบสำคัญอย่างหนึ่งในเครื่องสำอางโดยเฉพาะกลุ่มเพื่อตกแต่ง เช่น ลิปสติก อายแชโดว์ บลัชออน เป็นต้น หรือเพื่อแต่งสีผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางให้ดูสวยงามน่าใช้ยิ่งขึ้น และดึงดูดใจผู้ใช้ เช่น สบู่ก้อน ครีม และโลชั่น เป็นต้น ในปัจจุบันพบว่าสีสังเคราะห์ถูกนำมาใช้เป็นจำนวนมากและพบรายงานความไม่ปลอดภัยหรือเป็นพิษ

สีธรรมชาติมีคุณภาพแปรเปลี่ยนตามส่วนของสมุนไพรที่นำมาใช้ ชื่อของสมุนไพรนั้นเพราะสมุนไพรบางชนิด อาจมีหลายชื่อ และใช้แตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ สภาพภูมิศาสตร์ของแหล่งสมุนไพร ตลอดจนสภาพภูมิอากาศ แต่อย่างไรก็ตาม สีจากธรรมชาติมีความปลอดภัย และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากกว่าสีสังเคราะห์ ด้วยเหตุนี้ การใช้สีธรรมชาติจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น และมีการค้นหา และพัฒนาสีธรรมชาติมากขึ้น ตลอดจนการเลือกสีให้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ และใช้ในปริมาณที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค โดยสีที่ดี ไม่ควรทำให้คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลง มีความคงตัวและไม่เกิดปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์และบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ ง่ายต่อการใช้ในผลิตภัณฑ์ และให้ความเข้มของสีสูง หรือใช้ปริมาณน้อยเพื่อความปลอดภัย และเหตุผลด้านเศรษฐศาสตร์

ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อค้นหาสีธรรมชาติจากสมุนไพร รวมถึงการศึกษาสภาวะการสกัดสีที่เหมาะสมทั้งในแง่ของวิธีการและตัวทำละลายที่ใช้ การศึกษาความคงตัวของสีที่ pH และอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาสีจากธรรมชาติสำหรับการประยุกต์ใช้เป็นวัตถุดิบทางเครื่องสำอาง ถือเป็นการพัฒนาศักยภาพในการแข่งขันบนข้อได้เปรียบด้านความหลากหลายทางชีวภาพ และความอุดมสมบูรณ์ทางทรัพยากรธรรมชาติและเป็นการเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรในประเทศไทยอีกด้วย

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สีธรรมชาติหลายชนิด มีการศึกษาวิธีการทำให้บริสุทธิ์ และองค์ประกอบทางเคมีของสีธรรมชาติ โดยอาจแบ่งตามกลุ่มองค์ประกอบทางเคมี หรือแหล่งของสี ได้ดังนี้

1. กลุ่มแคโรทีนอยด์ เช่น β-carotene ให้สีเหลืองอมส้ม จากแครอท หรือ lycopene ให้สีส้มแดง จากมะเขือเทศ เป็นต้น

2. กลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น enocyanin ให้สีม่วงแดง จาก องุ่น เป็นต้น

3. กลุ่ม quinolone เช่น laccaic acid ให้สีส้มจนถึงม่วงแดง จาก scale bug เป็นต้น

4. กลุ่ม porphyrines เช่น chlorophyll ให้สีเขียว จากส่วนใบของพืชหลายชนิด

5. กลุ่ม diketone เช่น curcumine ให้สีเหลือง จากขมิ้นชัน เป็นต้น

6. กลุ่มอื่น ๆ

ซึ่งแต่ละกลุ่มสีมีความคงตัวและให้สีที่แตกต่างในสภาวะเดียวกันหรือต่างกัน ดังนั้น การศึกษาความคงตัวของสีธรรมชาติจึงมีความสำคัญต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์

ในประเทศไทย มีการประยุกต์ใช้สีจากธรรมชาติในการย้อมผ้า และผสมอาหารจากสมุนไพรมาอย่างยาวนาน ดังตัวอย่างต่อไปนี้ (ณัฐยา, 2008; พเยาว์, 2520; เต็ม, 2523; Kanlayavattanakul and Nattaya, 2007)

สีเหลือง จาก ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) นิยมใส่ในแกงเหลือง แกงกะหรี่ และข้าวหมกไก่ เป็นต้น โดยมีสารที่ให้สีเหลือง คือ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ในด้านเครื่องสำอางมีการประยุกต์ใช้ขมิ้นชัน ในสบู่

พริกหยวก (*Capsicum annum*) ให้สีส้มแดง ที่ไม่เสถียรในสภาวะที่มีแสง ใช้แต่งสีแดงในอาหารคาวโดยมีสารกลุ่ม carotenoid ที่ให้สีแดง คือ capsanthin และ สารให้สีเหลือง คือ capsorubin และ β-carotene มีการประยุกต์ใช้สีจากพริกหยวกในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดผมและลิปสติก

เปลือกไม้จันแดง (*Pterocarpus santalinus*) มีสีน้ำตาลดำ และยางสีแดงเข้ม ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสีแดงสด ในสภาวะด่าง (pH 10-11) แก่นไม้จันแดง จะให้สีน้ำตาลแดง ถึงม่วงอมน้ำตาล สารที่ให้สีแดง คือ santalic acid ซึ่งจะเป็นสีแดงเลือดในแอลกอฮอล์ สีเหลืองในอีเทอร์ และสีม่วงในสารละลายที่มีสภาวะเป็นด่าง มีการประยุกต์ใช้ไม้จันแดงในผลิตภัณฑ์สำหรับลดรอยเหี่ยวย่น และแก้สิว เป็นต้น

มีการประยุกต์ใช้สีม่วงน้ำเงินจากคราม (*Indigofera tinctoria*) และแดงเข้มจากเทียนกิ่งดอกแดง (*Lawsonia inermis*) กันอย่างแพร่หลาย และยาวนานในผลิตภัณฑ์สำหรับทำสีผม และเล็บ รวมถึงการย้อมผ้า และหนังสัตว์ โดยมีเฉดสีที่ต่างกันไปตามสภาวะความเป็นกรดด่าง

ดอกคำฝอย (*Carthamus tinctorius*) นิยมใช้แต่งสีอาหารที่ต้องการสีเหลือง โดยมีสารที่ให้สีเหลืองซึ่งละลายน้ำได้ดี และสารให้สีแดงที่ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายได้ดีในสารละลายที่มีความเป็นด่าง สารหลักที่ให้สีแดงคือ carthamin และ carthamone มีการประยุกต์ใช้สีส้มแดงจากดอกคำฝอย ในผลิตภัณฑ์สำหรับผิว

เมล็ดในของผลคำแสด (*Mallotus philippinensis*) ให้สีแดงส้ม จาก bixin สมัยโบราณใช้แต่งหน้าเรียกชาด ไว้ทาแก้ม นอกจากนี้ยังสามารถใช้แต่งสีแดงในอาหาร และย้อมผ้า

แก้วมังกร หรือ ดราก้อนฟรุต เป็นพืชในตระกูลกระบองเพชร มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกากลาง และมีปลูกแพร่หลายในเวียดนาม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Hylocercus undatus* (Haw) Brit. & Rose. เป็นไม้เลื้อย มีอายุยาวนานหลายปี ส่วนที่นำมาสกัดสีคือ เปลือกและเนื้อผลภายในพันธ์สีแดง โดยพบรายงานสารให้สีในกลุ่ม betacyanins จากเปลือกผลและเนื้อผลแก้วมังกรพันธ์ที่เนื้อในเป็นสีม่วง เพื่อนำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหาร โดย betacyanins นี้เป็น pigments ในกลุ่ม betalain ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของพืชตระกูลแก้วมังกร และเมื่อนำเปลือกแก้วมังกรมาเตรียมสารสกัดสี สามารถให้สีที่มีความคงตัวดี และมีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง (Lourith and Kanlayavattanakul, 2013)

มังคุด หรือ *Garcinia mangostana* เป็นพืชที่เพาะปลูกมาก และนิยมรับประทานในประเทศไทย มีเปลือกซึ่งให้สีแดง โดยในภาคใต้นิยมนำมาย้อมผ้า นอกจากนี้ สารสกัดจากเปลือกมังคุดยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ทั้งในทางเภสัชกรรม และเครื่องสำอาง โดยมีฤทธิ์ต้านอักเสบ และสามารถนำไปใช้รักษาแผล รวมถึงสิว (Chomnawang et al., 2005) และปัจจุบันมังคุดได้รับความนิยมในการนำมาแปรรูปเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ (Gruenwald, 2009) เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพและสารสำคัญต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ และเมื่อนำเปลือกมังคุด มาสกัดสี และทดสอบความคงตัว พบว่า สารสกัดสีจากเปลือกมังคุดมีความคงตัวดีตลอดระยะเวลาทำการทดสอบ นอกจากนี้ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต้องห้ามทางเครื่องสำอางได้เช่นกัน (Lourith and Kanlayavattanakul, 2011)

อั้งคั่ก หรือข้าวแดงเมืองจีน สีแดงที่เกิดขึ้นในข้าวนั้นคือ ราประเภท Monascus ที่เพาะกับเมล็ดข้าวทำให้เมล็ดข้าวเป็นสีแดงเข้ม สีแดงนี้เป็นสารกลุ่ม pyrone (พเยาว์, 2520)

บีทรูท หรือ *Beta vulgaris* L. บีทรูท เป็นพืชที่หัวอยู่ใต้ดิน มีสีแดงเข้ม ใช้เป็นสีธรรมชาติผสมอาหารได้อย่างปลอดภัย สีแดงเป็นสารกลุ่ม anthocyanin ซึ่งสารสำคัญคือ betalaine (พเยาว์, 2520)

ครั่ง หรือ Lac หรือชื่อวิทยาศาสตร์ *Tachardia lacca* Kew. รังครั่งเป็นสารที่ตัวครั่งขับออกมาให้ติดอยู่ตามกิ่งไม้ เพื่อใช้เป็นที่อาศัย ครั่งอาศัยอยู่ตามต้นไม้หลายชนิด และมีมากในภาคเหนือ เมื่อนำครั่งมาแช่น้ำร้อน หรือต้ม ให้น้ำสีแดงคล้ำ จาก laccaic acid (พเยาว์, 2520)

แต่อย่างไรก็ตามสีธรรมชาตินั้น มักจะมีปัญหาด้านความคงตัว (Zheng et al., 2002) ดังนั้น จึงต้องทำการทดสอบ ความคงตัวภายใต้สภาวะต่างๆ (Chigurupati et al., 2002; Lourith and Kanlayavattanakul, 2011 and 2013; Stark et al. 1996) โดยศึกษาทั้งความคงตัวของสี ซึ่งเป็นคุณสมบัติทางกายภาพ และความคงตัวทางเคมี ซึ่งส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้อย่างหลากหลาย และมีประโยชน์มากขึ้น

2.3 กระเจี๊ยบ

กระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ Malvaceae มีความสำคัญในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มและนิยมบริโภคในแบบน้ำผลไม้ หรือแยม เป็นต้น (Gruenwald, 2009)

มีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ (Onyenekwe et al., 1999; Ali et al., 2003 and 2005; Chang-Che et al., 2004) จากสารหลักที่ให้สีแดง คือสารในกลุ่ม anthocyanins ซึ่งให้สีสันที่น่ารับประทาน (Bridle and Timberlake, 1997) ทำให้กระเจี๊ยบได้รับความสนใจ ในการนำมาประยุกต์ใช้แต่งสีอาหารและใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม (Chewonarin et al., 1999; Il et al., 2005) รวมถึงเครื่องสำอางอย่างกว้างขวาง ตั้งแต่ปี คศ. 1970 (Mazza and Miniati, 1993) นอกจากนี้มียังใช้น้ำดอกกระเจี๊ยบในการบำบัดรักษานิ่ว ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ลดไขมันในเลือด (Hirunpanich et al., 2006) และใช้บรรเทาความเครียดในตำรายาไทย (Franworth and Bunyapraphatsara, 1992) รวมถึงอียิปต์ ซูดาน เม็กซิโก และไนจีเรีย (Dangkrajang et al., 2009) โดยรายงานการวิจัยพบว่าสามารถใช้ลดความเป็นพิษในตับ (Lin et al., 2003) มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Tseng et al., 2000) ลดไขมัน (Chang et al., 2006) และคอเลสเตอรอล (Lin et al., 2007) โดยฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้เป็นผลอันเกี่ยวเนื่องมาจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Tseng et al., 1997; Christian et al., 2006) รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอักเสบ และมีการใช้กระเจี๊ยบในการบรรเทาอาการเครียด (Christian et al., 2006) และลดความดันเลือด (Faraji et al., 1999; Wahabi et al., 2010) โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้นอกจากจะเป็นสารในกลุ่ม anthocyanins คือ delphinidin-3-glucoxyloside (Hibiscin), cyanidin-3-rutinoside, delphinidin, delphinidin-3-monoglucoside, cyanidin-3-monoglucoside, cyanidin-3-sambubioside และ cyanidin-3,5-diglucoside ที่ให้สีแดงในกระเจี๊ยบดังที่กล่าวไปแล้วข้างต้น (Kong et al., 2003; Maganha et al., 2010) ยังรวมถึงสารกลุ่มฟีนอลิค และฟลาโวนอยด์ (Tsuda et al., 2000; Maganha al., 2010) เช่น protocatechuic acid และ quercetin (Tseng et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบองค์ประกอบอื่น ๆ เช่น ascorbic acid, β-carotene, citric acid และ tartaric acid และพบว่า กระเจี๊ยบมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Campylobacter* spp. โดยมีค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) อยู่ในช่วง 96-152 ppm และเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดสิว คือ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* โดยมีค่า MIC = 2.5 และ 0.625 ppm ตามลำดับ และสามารถฆ่าเชื้อเหล่านี้ได้ที่ความเข้มข้น 5 ppm (Chomnawang et al., 2005) นอกจากนี้ยังพบว่า กระเจี๊ยบมีความปลอดภัยสูง โดยมีค่าความเป็นพิษ ที่ LD_{50} (Lethal dose) 5,000 mg/kg (Onyenekwe et al., 1999) จึงได้รับการยอมรับและถือเป็นสมุนไพรที่สามารถใช้บำบัดรักษา และเสริมสุขภาพ (Gruenwald, 2009) ตลอดจนมีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม (Ali et al., 2005)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

ทำการศึกษาวิจัยที่ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 การเตรียมตัวอย่างสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ

3.1.1 เก็บกากกระเจี๊ยบที่เหลือทิ้งจากการผลิตน้ำผลไม้ (ส่วนของกลีบรองดอก) จากโรงงานแปรรูปอาหาร ใน อ. แม่จัน จ. เชียงราย

3.1.2 การสกัดสีจากกลีบรองดอกกระเจี๊ยบ

หั่นการกากกระเจี๊ยบเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C และนำมาบดเป็นผงแล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย *n*-Hexane, EtOAc และ 95% EtOH โดยมีอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างพืชและตัวทำละลายเป็น 1:4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ 150 rpm กรอง และทำให้แห้ง โดยการกลั่นภายใต้สภาวะสุญญากาศ และคำนวณร้อยละผลผลิต

3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย **DPPH assay** (Lourith et al., 2009)

3.2.1 เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 6×10^{-5} M

3.2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีความเข้มข้นต่าง ๆ

3.2.3 เตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.2.4 ผสมตัวอย่าง กับ สารละลาย DPPH radical (0.1 ml, each) แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วย microplate reader

3.2.5 นำค่าการดูดกลืนของแต่ละตัวอย่าง มาพล็อตกราฟ และหาค่า IC_{50} เปรียบเทียบกับวิตามินซีโดยสมการ

$$\% \text{ inhibition} = (A-B)/A \times 100$$

โดย A = ค่าการดูดกลืนที่ไม่มีสารตัวอย่าง

B = ค่าการดูดกลืนที่มีสารตัวอย่าง

3.2.6 ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิครวม (Total phenolic content; TPC) (Kanlayavattanakul and Lourith, 2011)

3.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.3.2 เตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.3.3 ผสมสารสกัดตัวอย่าง และ Folin-Ciocalteu reagent และ 2% Na_2CO_3 แล้ว incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm

3.3.4 นำค่าการดูดกลืนแสง ของแต่ละตัวอย่างมาคำนวณปริมาณฟีนอลิครวม เทียบกับสารตัวอย่าง แล้วแสดงค่าเป็น mg gallic acid equivalent ต่อน้ำหนักสารสกัด (mg GAE/100 g crude)

3.3.5 ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

3.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิคด้วย HPLC (Kanlayavattanakul and Lourith, 2011)

หาสภาวะของระบบของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ สารมาตรฐานกลุ่มฟีนอลิคด้วย absorption wavelength และ retention time และทำการวิเคราะห์สารสกัดกระเจี๊ยบภายใต้สภาวะการวิเคราะห์เดียวกัน

3.5 การศึกษาความคงตัวของสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบภายใต้สภาวะต่าง ๆ (Chigurupati et al., 2002; Hurtado et al., 2009; Lourith and Kanlayavattanakul, 2011 and 2013; Rhee et al., 2008; Stark et al. 1996)

3.5.1 ศึกษาความคงตัวของสารสกัดสีที่ pH ต่าง ๆ ด้วยวิธีการทางสเปคโตรโฟโต-เมทรี

- โดยเตรียมสารละลายสีที่สกัดได้ที่ ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.1, 0.4 และ 1.0 mg/ml ใน Sorenson's phosphate buffer solutions ที่ pH 3, 5, 7 และ 9 ในแต่ละระดับความเข้มข้นที่ pH ต่าง ๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 23, 37 และ 50 °C

- นำสารละลายสี ไปวัดค่า pH วัดสีด้วยเครื่อง UltraVis-Scan (บันทึกค่า L^*, a^* และ b^* ในช่วง 400-800 nm) และ การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง โดยทำ wave scan ช่วง 200-400 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer วัดค่าเหล่านี้ ที่เวลาเริ่มต้น และเวลาต่าง ๆ จนสิ้นสุดระยะเวลาในการทดสอบความคงตัว (10 วัน/สภาวะ)

3.6 การทดสอบความเป็นพิษใน vero cells (Eisenbrand et al., 2002, Vadivies-Garcia et al., 1993)

ทำการทดสอบความเป็นพิษใน vero cells โดยใช้การตรวจสอบ green florescent protein detection method เปรียบเทียบกับ elliptine ซึ่งส่งสารสกัดไปทดสอบที่ศูนย์พันธุ-วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3.7 การวิเคราะห์ผล สรุปผลการทดลอง

รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ด้วยสถิติด้วย ANOVA โดย independent t test โดยมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า $p < 0.05$ ด้วย SPSS version 16.0 และสรุปผลการทดลอง

บทที่ 4

ผลการวิจัย

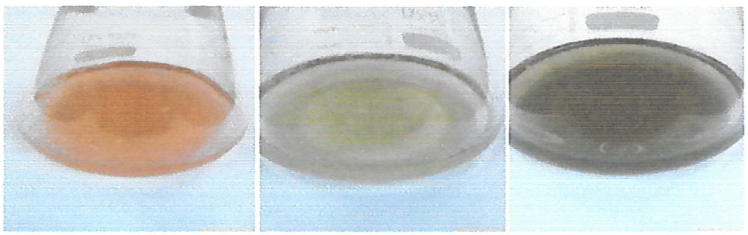
4.1 ผลการเตรียมตัวอย่างสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ

การสกัดสีจากกระเจี๊ยบซึ่งเป็นเศษเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำกระเจี๊ยบ ด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วแตกต่างกัน โดยมีสัดส่วนระหว่างตัวทำละลาย ระยะเวลาในการสกัดและแรงของการเขย่าที่เท่ากัน พบว่า 95% EtOH ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขั้วสูงที่สุดในการวิจัยนี้ ให้ร้อยละผลผลิตดีที่สุด ตามด้วยตัวทำละลาย *n*-Hexane และ EtOAc ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ร้อยละผลผลิต และลักษณะของสารละลายของสารสกัดสี

Sample	Yield (% w/w)	Appearance
n-Hexane	2.16	สารละลายสีเขียวเข้ม
EtOAc	1.43	สารละลายสีเขียวอ่อน
EtOH	4.91	สารละลายสีแดงสด

เมื่อนำสารสกัดความเข้มข้น 1 mg/ml เตรียมในตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่าสารสกัด 95% EtOH ให้สีแดงสด ในขณะที่สารสกัดสีจากตัวทำละลาย EtOAc ให้สีเขียวอ่อน และสารสกัดมีสีเขียวเข้ม ในตัวทำละลาย *n*-Hexane (ภาพที่ 4-1) จึงนำสารสกัดกระเจี๊ยบส่วน 95% EtOH และ EtOAc ซึ่งให้สีที่มีความสวยงาม เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมากกว่า ไปศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay และปริมาณฟีนอลิครวม

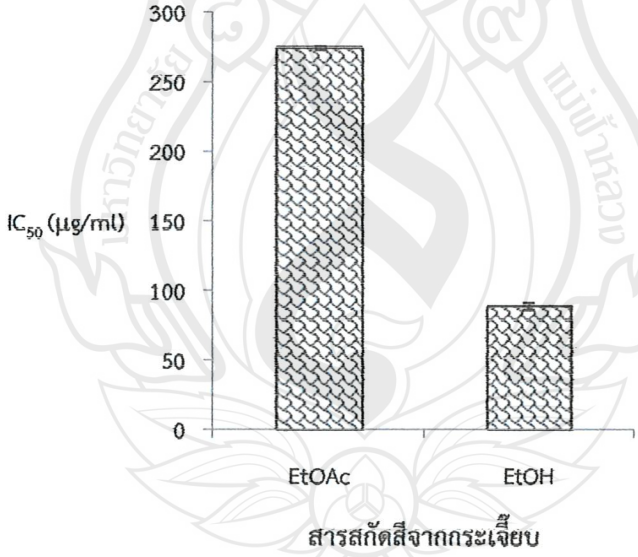


95% EtOH EtOAc *n*-Hexane

ภาพที่ 4-1 สารละลายของสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay

จากภาพที่ 4.2 พบว่า สารสกัดสีจากกระเจี๊ยบส่วน 95% EtOH ซึ่งให้สีแดงสด แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} = 274.06 ± 1.37 µg/ml) ดีกว่า สารสกัด EtOAc (IC_{50} = 88.51 ± 2.47 µg/ml) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยมีค่า IC_{50} น้อยกว่าถึง 3 เท่า แต่อย่างไรก็ตาม ยังมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ น้อยกว่าสารมาตรฐานวิตามินซี

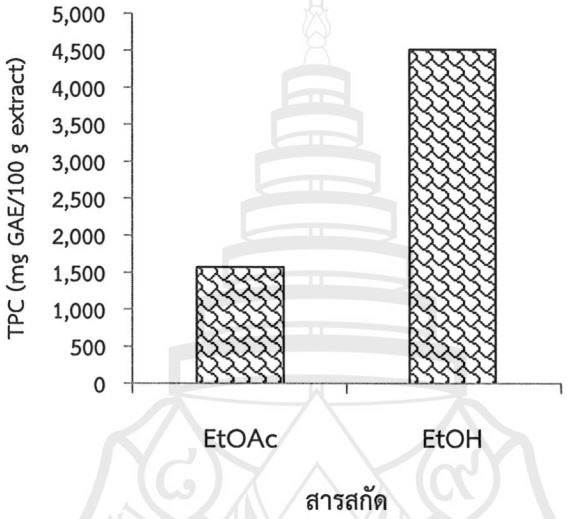


ภาพที่ 4-2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay ของสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ

4.3 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิครวมของสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบ

เมื่อนำสารสกัดไปวิเคราะห์ปริมาณ ฟีนอลิครวม (ภาพที่ 4-3) พบว่า สารสกัด 95% EtOH ที่ให้สีสวยกว่า และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่า มีปริมาณฟีนอลิครวม (4516.67 ±

0.01 mg GAE/100 g extract) มากกว่าสารสกัด EtOAc (1571.4 ± 0.01 mg GAE/100 g extract) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เช่นเดียวกัน ดังนั้นสารสำคัญในกระเจี๊ยบกลุ่มฟีนอลิคน่าจะเป็นสารหลักในการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ ปริมาณฟีนอลิครวมที่สกัดได้จากกระเจี๊ยบนี้ยังมีมากกว่า ปริมาณสูงสุด (43.06 ± 0.53 mg GAE/g extract) ที่พบได้จากการสกัดกลีบรองดอกกระเจี๊ยบสด และแห้งที่ทำการสกัดด้วยน้ำ (Chumsri et al., 2008)



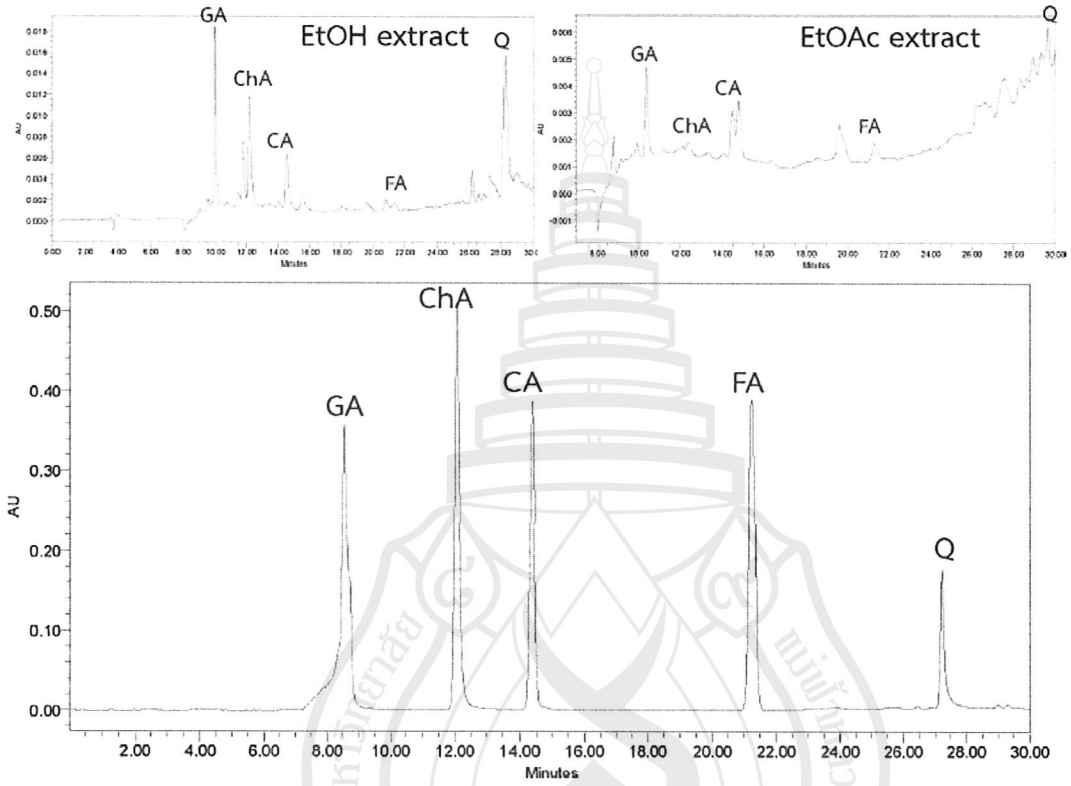
ภาพที่ 4-3 ปริมาณฟีนอลิครวม ของสารสกัดสีจากกลีบรองดอกกระเจี๊ยบ

ดังนั้น จึงทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิค ซึ่ง เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ (Shahidi and Chandrasekara, 2010) ต่อไป

4.4 ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิคของสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบด้วย HPLC

จากข้อมูลปริมาณฟีนอลิครวมในสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบที่เกี่ยวข้อง ได้ทำการรวิเคราะห์ gallic acid, chlorogenic acid และ quercetin เนื่องจากเป็นสารกลุ่มฟีนอลิคที่มีในกระเจี๊ยบ (Fernández-Arroyo et al., 2011; Ramírez-Rodrigues et al., 2011a and 2011b) รวมถึง caffeic acid และ ferulic acid เนื่องจากสารเหล่านี้ เป็นฟีนอลิคกลุ่มที่เป็นอนุพันธุ์ของ hydroxycinnamic acid ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดี (Balasundram et al., 2006) และประกอบด้วยแกนหลักของโครงสร้าง C_6-C_1 และ C_6-C_3 ซึ่งเกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ใน shikimic pathway เช่นเดียวกัน (Kroon and Williamson, 1999)

ทำการวิเคราะห์ชนิด และปริมาณสารสำคัญเหล่านั้น ด้วย HPLC โดยสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ด้วยระบบของตัวทำละลายที่ประกอบด้วย acetonitrile (AcCN) และ acetic acid (AcOH) ดังแสดงในภาพที่ 4-4



ภาพที่ 4-4 HPLC chromatogram ของสารสกัดสีจากกลีบรองดอกกระเจี๊ยบ (บนซ้ายและขวา) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (ล่าง)

สารกลุ่มฟีนอลิคที่พบในสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบส่วน EtOAc และ 95% EtOH คือ มีปริมาณ gallic acid ในสูงที่สุด ตามด้วย chlorogenic acid, quercetin, caffeic acid และ ferulic acid (ตารางที่ 4-2) ดังนั้น กระเจี๊ยบที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ จึงเป็นแหล่งสำคัญของสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะ gallic acid และ chlorogenic acid ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟีนอลิคสำคัญที่ใช้ในการเสริมสุขภาพ และผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง นอกจากนี้ ปริมาณของสารเหล่านี้ยังมีมากกว่ากระเจี๊ยบจาก Senegal (Fernández-Arroyo et al., 2011) ซึ่งเป็นการยืนยันถึงคุณภาพที่ดีของกระเจี๊ยบไทย (FAO, 2004)

ตารางที่ 4-2 ชนิดและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิคในสารสกัดสี

Extract	Active content (g/kg in dried plant)				
	Gallic acid	Caffeic acid	Ferulic acid	Chlorogenic acid	Quercetin
EtOAc	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	-	-	0.02 ± 0.00
95%EtOH	0.75 ± 0.05	0.39 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.74 ± 0.03	0.45 ± 0.05

นอกจากนี้ พบว่าปริมาณสารสำคัญยังมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางชีวภาพ และปริมาณฟีนอลิครวม โดยสารสกัด 95% EtOH ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และมีปริมาณฟีนอลิครวมมากกว่าสารสกัด EtOAc มี gallic acid, chlorogenic acid, quercetin, caffeic acid และ ferulic acid มากกว่าเช่นเดียวกัน

ดังนั้น สารสกัดกระเจี๊ยบ ส่วน 95% EtOH ซึ่งให้สีแดงสด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารสำคัญมากกว่า จึงมีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมากกว่า จึงคัดเลือกสารสกัดสีแดงจากกระเจี๊ยบนี้ ไปทดสอบความคงตัวภายใต้สภาวะต่าง ๆ ต่อไป

4.5 ผลการศึกษาความคงตัวของสารสกัดสีจากกระเจี๊ยบส่วน 95% EtOH ภายใต้สภาวะต่าง ๆ

ทำการทดสอบความคงตัวด้วย CIE color system (Weatherall and Lee, 1991) โดยอาศัยหลักการสะท้อนกลับของแสงใน 3 แกนระนาบ ที่เรียกกว่า CIE L^*, a^* และ b^* โดย L^* เป็นแกนของความสว่าง จากขาว (100) ถึง ดำ (0) และ ค่า a^* แสดงถึงสีเขียว (-) และแดง (+) ในขณะที่ b^* ให้สีน้ำเงิน (-) และ เหลือง (+) และทั้ง 3 ค่า นำไปคำนวณค่าความแตกต่างของสี หรือ ΔE โดย $\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ ซึ่ง ตาของมนุษย์จะบอกความแตกต่างของสี ได้เมื่อ $\Delta E > 1.5$ (Stark et al., 1996) และติดตาม ความคงตัวของสารสกัดสี เพิ่มเติมใน ค่า pH และ ความสามารถในการดูดกลืนแสง ที่ λ_{max} ตลอดระยะเวลา 10 วันของการทดสอบความคงตัว ซึ่งใช้ในการทดสอบสารสกัดสีจากพืชเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ (Chigurupati et al., 2002; Hurtado et al., 2009; Rhee et al., 2008) รวมถึงในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Lourith and Kanlayavattanakul, 2011; 2013)

สารสกัดสีจากกลีบรองดอกกระเจี๊ยบส่วน 95% EtOH เปลี่ยนแปลงน้อยกว่า 1.5 ($\Delta E < 1.5$) เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ที่ pH 3, 5 และ 9 โดยสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด ($\Delta E = -0.13$) และมีความคงตัวตลอดระยะเวลาการทดสอบดีที่สุด ($\Delta E = 34.594 \pm 0.651$) คือ สารสกัดเข้มข้น 0.4 mg/ml ใน buffer ที่มี pH เท่ากับ 3 ที่อุณหภูมิ 23 °C

สารสกัดสีจากกระเจี๊ยบซึ่งมีสีแดง มีความคงตัวดีภายใต้สภาวะที่เป็นกรด เนื่องจากโมเลกุลของสารที่ให้สีแดงนั้น มีเสถียรภาพดีในสภาวะกรด (Fossen et al., 1998) และเมื่อทำ

การวิเคราะห์ค่า pH พบว่าสารสกัดกระเจี๊ยบมีความเป็นกรด (Chumsri et al., 2008; Ramírez-Rodrigues et al., 2011b) และทำให้ ค่า pH ของ buffer ลดลงมากขึ้น เมื่อสารสกัดมีความเข้มข้นมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม สารสกัดเมื่อเก็บไว้ภายใต้สภาวะต่างๆ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลง pH เล็กน้อย แบบไม่มีนัยสำคัญนั้น ($p > 0.05$) แสดงถึงความคงตัวของสารสกัด โดยเฉพาะสารสกัดเข้มข้น 0.4 mg/ml ใน buffer ที่มี pH 3 และเก็บที่ 23 °C ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด (3.193 ± 0.037) ดังแสดงในตารางที่ 4-3

จากนั้น ติดตามผลความคงตัวของสารสกัดสีในแง่ของการดูดกลืนแสง และ λ_{max} ซึ่งมักจะเปลี่ยนแปลงตาม pH (Fossen et al., 1998) พบว่า สารสกัดใน buffer ที่มี pH 3, 5, 7 และ 9 มี λ_{max} เป็น 230, 200, 200 และ 206 nm ตามลำดับ โดยความเปลี่ยนแปลง λ_{max} (0.037) และการดูดกลืนแสง (0.419 ± 0.018) ที่น้อยที่สุด ได้แก่ สารสกัดสี ที่ pH 3 เข้มข้น 0.1 mg/ml เก็บไว้ 23 °C (ตารางที่ 4-3)

4.6 การทดสอบความเป็นพิษใน vero cells

แม้มีการใช้ประโยชน์จากกระเจี๊ยบ ในการเป็นเครื่องดื่ม และส่วนประกอบต่างๆ ของอาหารแล้ว และไม่พบความเป็นพิษเมื่อให้หนู (150-180 mg/kg) กินสารสกัดด้วย methanolic water (Akindahunsi and Olaleye, 2003) แต่ความปลอดภัยของสารสกัดธรรมชาติที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องทำการทดสอบ (Balasundram et al., 2006) ดังนั้น จึงทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดกระเจี๊ยบส่วน 95% EtOH ใน mammalian cells (Eisenbrand et al., 2002) ซึ่งพบว่าสารสกัดไม่แสดงความเป็นพิษต่อ vero cells (Vadivies-Garcia et al., 1993) ที่ความเข้มข้นสูงสุดของการทดสอบ (50 μg/ml) แสดงถึงความปลอดภัยของสารสกัด และสามารถนำไปเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงามได้ต่อไป

ตารางที่ 4-3 คุณสมบัติทางกายภาพของสารสกัดสีในสภาวะที่คงตัวที่สุด (pH 3, 23 °C)

Concentration (mg/ml)	Day	Physicochemical characters						
		pH	λ_{max} (nm)	Absorbance	Color parameters			
					*L**	*a**	*b**	*E*
0.1	0	3.33	230.00	0.39	41.41	0.34	-0.80	26.28
	1	3.31	230.00	0.43	41.17	0.14	-1.12	24.41
	3	3.22	230.00	0.42	39.64	0.18	-1.46	25.09
	5	3.14	230.00	0.43	40.84	0.26	-1.34	24.05
	7	3.14	230.00	0.43	39.20	0.19	-0.99	24.29
	9	3.15	230.00	0.40	39.20	0.19	-0.99	24.29
	10	3.31	230.00	0.43	39.14	0.21	-0.74	23.04
mean		3.23 ± 0.09	230.00 ± 0.00	0.42 ± 0.02	40.09 ± 1.01	0.22 ± 0.07	-1.06 ± 0.27	21.44 ± 0.99
0.4	0	3.21	230.00	1.62	61.57	1.62	-0.26	34.02
	1	3.25	230.00	1.58	59.48	1.39	-0.63	33.89
	3	3.20	230.00	1.59	58.88	1.29	-0.12	35.51
	5	3.16	230.00	1.56	58.15	1.21	-0.25	34.89
	7	3.15	230.00	1.55	58.34	1.18	0.66	34.98
	9	3.16	228.00	1.46	58.34	1.18	0.66	34.98
	10	3.22	230.00	1.56	58.06	1.11	0.95	33.89
mean		3.19 ± 0.04	229.71 ± 0.76	1.56 ± 0.05	58.97 ± 1.25	1.28 ± 0.17	0.14 ± 0.60	34.59 ± 0.65
1.0	0	3.28	238.00	3.48	74.08	6.51	5.05	39.59
	1	3.24	236.00	3.33	73.37	6.11	5.36	37.55
	3	3.19	236.00	3.32	73.05	5.60	5.69	38.92
	5	3.13	236.00	3.27	73.40	5.60	6.42	37.41
	7	3.11	236.00	3.28	73.26	5.19	6.80	38.90
	9	3.12	236.00	3.19	73.26	5.19	6.80	38.90
	10	3.22	236.00	3.17	72.53	4.87	7.13	37.39
mean		3.18 ± 0.07	236.29 ± 0.76	3.29 ± 0.10	73.28 ± 0.46	5.58 ± 0.57	6.179 ± 0.81	38.38 ± 0.90

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

กลีบรองดอกกระเจี๊ยบ ซึ่งเป็นเศษเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ ให้สารสกัดสีแดงสด เมื่อทำการสกัดด้วย 95% EtOH โดย สารสกัดสีนี้ แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay (IC_{50} = 88.51 ± 2.47 μg/ml) และมีปริมาณฟีนอลิครวม (4516.67 ± 0.01 mg GAE/100 g extract) โดยพบสารสำคัญในกลุ่มฟีนอลิค คือ gallic acid, chlorogenic acid, quercetin, caffeic acid และ ferulic acid ในปริมาณสูง อีกทั้งสารสกัดสี ที่เตรียมได้ ไม่มีความเป็นพิษต่อ vero cells นอกจากนี้ ยังมีความคงตัวดี ตลอดระยะเวลาการทดสอบ 10 วัน โดยเฉพาะการเก็บสารสกัดสี ภายใต้ อุณหภูมิ 23 °C ใน buffer ที่มี pH 3

การวิจัยนี้ จึงเป็นแนวทางหนึ่ง ในการใช้ประโยชน์จากผลิตผลทางการเกษตรอย่างยั่งยืน (Schieber et al., 2001) และเป็นแนวทางสำคัญในการเพิ่มมูลค่าของกระเจี๊ยบ ลดเศษเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ โดยการนำมาแปรรูปเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์สำคัญทางชีวภาพ ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และให้สีที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ณัฐยา เหล่าฤทธิ์. สีธรรมชาติ. SCCT Newsletter. 3, 14-15, 2008.

พเยาว์ เหมือนวงษ์ญาติ. สีธรรมชาติและสีสังเคราะห์. กรุงเทพ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2520.

เต็ม สมิตินันทน์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (ชื่อพฤกษศาสตร์- ชื่อพื้นเมือง). กรุงเทพ: กรมป่า-ไม้; 2523.

Akindahunsi AA, Olaleye MT. Toxicological investigation of aqueous methanolic extract of the cylyces of *Hibicus sabdariffa* L. J. Ethnopharmacol. 89: 161-164, 2003.

Ali BH, Mousa HM, El-Mougy S. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. Phytother. Res. 17: 56-59, 2003.

Ali BH, Wabel NA, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. Phytother. Res. 19: 369-375, 2005.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 99: 191-203, 2006.

Bridle P, Timberlake CF. Anthocyamins as natural food colors – selected aspects. Food Chem. 58: 103-109, 1997.

Chang YC, Huang KX, Huang AC, Ho YC, Wang CJ. *Hibiscus* anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis. Food Chem Toxicol. 44: 1015-1023, 2006.

Chang-Che C, Fen-Pi C, Yung-Chyan H, Wea-Lung L, Chin-Pin W, Erl-Shyh K, An-Chung H, Chau-Jong W. Inhibitory effects of *Hibiscus sabdariffa* L. extract on low-density lipoprotein oxidation and anti-hyperlipidemia in fructose-fed and cholesterol-fed rats. J. Sci. Food Agric. 84: 1989-1996, 2004.

Chewonarin T, Kinouchi T, Kataoka K, Arimochi H, Kuwahara T, Vinitketkumnuen U, Ohnishi Y. Effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), a Thai medicinal plant, on the mutagenicity of various known mutagens in *Salmonella typhimurium* and on formation of aberrant crypt foci induced by the colon carcinogens azoxymethan and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in F344 rats. Food Chem. Toxicol. 37: 591-601, 1999.

Chigurupati N, Saiki L, Gayser Jr C, Dash AK. Evaluation of red cabbage dye as a potential

natural color for pharmaceutical use. Int. J. Pharm. 241: 293-299, 2002.

Chomnawang MT, Surassmo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. J. Ethnopharmacol. 101: 330-333, 2005.

Chumsri P, Sirichote A Itarat A. Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of rosells (*Hibicus sabdariffa* Linn.) extract. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30: 133-139, 2008.

Christian KR, Nair MG, Jackson JC. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*). J. Food Com. Anal. 19: 778-783, 2006.

Dangkrajang S, Sirichote A, Suwansichon T. Development of roselle leather from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) by-product. As. J. Food Ag-Ind. 2: 788-795, 2009.

Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, Carere A, Kevekordes S, Lhuguenot JC, Pieters R, Kleiner J. Methods of *in vitro* toxicology. Food Chem. Toxicol. 40: 193-236, 2002.

FAO. Hibiscus: post-production management for improve market access. 2004.

Faraji MH, Tarkhani AHH. The effect of sour tea (*Hibiscus sabdariffa*) on essential hypertension. J. Ethnopharmacol. 65: 231-236, 1999.

Fernández-Arroyo S, Rodríquez-Medina IC, Beltrán-Debón R, Pasini F, Joven J, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Quantification of the polyphenols fraction and *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. Food Res. Int. 44: 1490-1495, 2011.

Fossen T, Cabrita L, Andersen ØM. Colour and stability of pure anthocyanins influences by pH including the alkaline region. Food Chem. 63: 435-440, 1998.

Franworth NR, Bunyapraphatsara N. Thai medicinal plants. Bangkok: Prachachon Press; 1992, p. 163-166.

Giusti MM, Wrolstad RE. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. Biochem. Eng. J. 14: 217-225, 2003.

Gruenwald J. Novel botanical ingredients for beverages. Clin. Dermatol. 27: 210-216, 2009.

Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyapraphatsara N, Sato H, Herunsale A, Suthisisang C. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. J. Ethnopharmacol. 103: 252-260, 2006.

Hurtado NH, Morales AL, González-Miret ML, Escudero-Gilete ML, Heredia FJ. Color, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.) Food Chem. 117: 88-93, 2009.

Il BH, Al Wabel N, Blunden G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of

Hibiscus sabdariffa L.: a review. Phytother. Res. 19: 369-375, 2005.

Kanlayavattanakul M, Lourith N. Sapodilla seed coat as a multifunctional ingredient for cosmetic application. Process Biochem. 46: 2215-2218, 2011.

Kanlayavattanakul M, Nattaya L. Herbal Cosmetics Laboratory (1701312). Chiang Rai: Mae Fah Luang University; 2007.

Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochem. 64: 923-933, 2003.

Kroon PA, Williamson G. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. J. Sci. Food Agric. 79: 355-361, 1999.

Lin TL, Lin HH, Chen CC, Lin MC, Chou MC, Wang CJ. *Hibiscus sabdariffia* extract reduces serum cholesterol in men and women. Nutri. Res. 27: 140-145, 2007.

Lin WL, Hsieh YJ, Chou FP et al. *Hibiscus* protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. Arch. Toxicol. 77: 42-47, 2003.

Lourith N, Kanlayavattanakul M, Chanpirom M. Free radical scavenging efficacy of tamarind seed coat and its cosmetics application. J. Health Res. 23: 159-162, 2009.

Lourith N, Kanlayavattanakul M. Biological activity and stability of mangosteen as a potential natural color. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75: 2257-2259, 2011.

Lourith N, Kanlayavattanakul M. Antioxidant and stability of dragon fruit peel colour. Agro Food Hi-Tech 2013 (in press).

Magnha EG, Halmenschlager RC, Rosa RM, Henriques JAP, Ramos ALLP, Saffi J. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. Food Chem. 118: 1-10, 2010.

Mazza G, Miniati E. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. New York: CRC Press; 1993.

Onyenekwe PC, Ajani EO, Ameh DA, Gamaniel KS. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. Cell Biochem. Func. 17: 199-206, 1999.

Ramírez-Rodrigues MM, Balaban MO, Marshall MR, Rouseff RL. Hot and cold water infusion aroma profiles of *Hibiscus sabdariffa*: fresh compared with dried. J. Food Sci. 76: 212-217, 2011a.

Ramírez-Rodrigues MM, Plaza ML, Azeredo A, Balaban MO, Marshall MR. Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. J. Food Sci. 76: 428-435, 2011b.

Rhee YS, Park CW, Shin YS, Kam SH, Lee KH, Park ES. Application of instrumental

evaluation of color for the pre-formulation and formulation of rabeprazole. Int. J. Pharm. 350: 122-129, 2008.

Schieber A, Stintzing FC, Carle R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. Trends Food Sci. Technol. 12: 401-413, 2001.

Shahidi F, Chandrasekara A. Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. Phytochem. Rev. 9: 147-170, 2010.

Stark G, Fawcett JP, Tucker IG, Weatherall IL. Instrumental evaluation of color of solid dosage forms during stability testing. Int. J. Pharm. 143: 93-100, 1996.

Tseng TH, Kao ES, Chu CY, Chou FP, Lin Wu HW, Wang CJ. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabsariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocyts. Food Chem. Toxicol. 35: 1159-1164, 1997.

Tseng TH, Kao TW, Chu CY et al. Induction of apoptosis by *Hibiscus* protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. Biochem. Pharmacol. 60: 307-315, 2000.

Tsuda T, Horio F, Osawa T. The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. Biofactor 13: 122-133, 2000.

Valdivies-Garcia A, Clarke RC, Rahn K, Durette A, Macleod DL, Gyles CL. Neutal red assay for measurement of quantitative *vero* cell cytotoxicity. Appl. Envi. Microbiol. 59: 1981-1983, 1993.

Wahabi HA, Alansary LA, Al-Sabban AH, Glasziuo P. The effectiveness of *Hibiscus sabdariffa* in the treatment of hypertension: a systematic review. Phytomed. 17: 83-86, 2010.

Weatherall IL, Lee WG. Instrumental evaluation of some New Zealand fruit colors using CIELAB values. New Zealand J. Bot. 29: 197-205, 1991.

Zheng T, Holford TR, Mayne ST, Owens PH, Boyle P, Zhang B, Zhang YW, Zahm SH. Use of hair colouring products and breast cancer risk: a case-control study in Connecticut. Eur. J. Cancer. 38, 1647-1652, 2002.

Zollinger H. Color chemistry: Syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. 2nd ed. Weinhem: VCH; 1991.

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐยา เหล่าฤทธิ์
สังกัด สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ต. ท่าสุด อ. เมือง จ. เชียงราย 57100
โทรศัพท์ 0-5391-6834 โทรสาร 0-5391-6931
E-mail: nattayal@mfu.ac.th

ประวัติการเผยแพร่ผลงานวิจัย (ตั้งแต่ปี คศ. 2005 – ปัจจุบัน)

1. **Lourith N.**, Katayama T., Suzuki T. Stereochemistry and biosynthesis of 8-*O*-4′ neolignans in *Eucommia ulmoides*: diastereoselective formation of guaiacylglycerol-8-*O*-4′-(sinapyl alcohol) ether. J. Wood Sci. 51: 370-378, 2005.

2. **Lourith N.**, Katayama T., Ishikawa K., Suzuki T. Biosynthesis of a syringyl 8-*O*-4′ neolignan in *Eucommia ulmoides*: formation of syringlyglycerol-8-*O*-4′-(sinapyl alcohol) ether. J. Wood Sci. 51: 379-386, 2005.

3. Kanlayavattanakul M., **Lourith N.** Carboxymethylglucan in cosmetics. Thai Pharm. Health Sci. J. 3 : 378-382, 2008.

4. **Lourith N.** Natural colors. SCCT newsletter. 3 : 14-15, 2008 (in Thai).

5. Ruamrak C., **Lourith N.**, Natakankitkul S. Comparison of clinical efficacies of sodium ascorbyl phosphate, retinol and their combination in acne treatment. Int. J. Cosmet. Sci. 3 : 41-46, 2009.

6. **Lourith N.**, Kanlayavattanakul M. Natural surfactants used in cosmetics : glycolipids. Int. J. Cosmet. Sci . 31: 255-261, 2009.

7. Lawan K., Kanlayavattanakul M., **Lourith N.** Antimicrobial efficacy of caprylyl glycol and ethylhexylglycerine in emulsion. J. Health Res. 23: 1-3, 2009.

8. Kanlayavattanakul M., Phrutivorapongkul A., **Lourith N.**, Ruangrungsi N. Pharmacognostic specification of *Naringi crenulata* stem wood. J. Health Res. 23: 65-69, 2009.

9. Patin R., Kanlayavattanakul M., **Lourith N.** Aromatherapy and essential oils in Thai spa business. IJPS. 5: 160-166, 2009.

10. **Lourith N.**, Kanlayavattanakul M., Chanpirom, S. Free radical scavenging efficacy of Tamarind seed coat and its cosmetics application. J. Health Res. 23: 159-162, 2009.

11. Kanlayavattanakul M., **Lourith N.** Lipopeptides in cosmetics. Int. J. Cosmet. Sci. 32: 1-8, 2010.

12. Churienthong P., **Lourith N.**, Leelapornpisid P. Clinical efficacy comparison of anti-wrinkle cosmetics containing herbal flavonoids. Int. J. Cosmet. Sci. 32: 99-106, 2010.

13. **Lourith N.,** Kanlayavattanakul M. Oral malodor and active ingredients for treatment. Int. J. Cosmet. Sci. 32: 321-329, 2010.

14. Kanlayavattanakul M., **Lourith N.** Ferulic acid in paper mulberry and its waste water from pulps production. J. Chem. Chem. Eng. 4: 58-62, 2010.

15. **Lourith N.** Herbs for hair loss. SCCT newsletter. 1: 9-11, 2010 (in Thai).

16. Kanlayavattanakul M., **Lourith N.** Therapeutic agents and herbs in topical application for acne treatment. Int. J. Cosmet. Sci. 33: 289-297, 2011.

17. Kanlayavattanakul M., **Lourith N.** Body malodours and their topical treatment agents. Int. J. Cosmet. Sci. 33: 298-311, 2011.

18. **Lourith N.**, Kanlayavattanakul M., Pongpunyayuen S. Botanical arbutin from *Naringi crenulata.* Cosmetics: Types, Allergies and Applications. (Ed.; Hayes, LM) Nova Science Publishers, Inc.: New York. 157-164, 2011.

19. Kanlayavattanakul M., **Lourith N.** Sapodilla seed coat as a multifunctional ingredient for cosmetic applications. Process Biochem. 46: 2215-2218, 2011.

20. **Lourith N.**, Kanlayavattanakul M. Biological activity and stability of mangosteen as a potential natural color. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75: 2257-2259, 2011.

21. Charoennit P., **Lourith N.** Validated UV-spectrophotometric method for the evaluation of the efficacy of makeup remover. Int. J. Cosmet. Sci. 34: 190-192, 2012.

22. **Lourith N.**, Kanlayavattanakul M., Pongpunyayuen S., Chaiwarith J. Characterization of arbutin and kojic acid in *Naringi crenulata.* Household and Personal care Today 7: 20-21, 2012.

23. Kanlayavattanakul M., **Lourith N**. Sunscreen liquid foundation containing *Naringi crenulata* powder. Adv. Mat. Res. 506: 583-586, 2012.

24. Kanlayavattanakul M., Rodchuea C., **Lourith N**. Moisturizing effect of alcohol-based hand rub containing okra polysaccharide. Int. J. Cosmet. Sci. 34: 280-283, 2012.

25. Kanlayavattanakul M., **Lourith N**. Thanaka loose powder and liquid foundation preparations. Household and Personal care Today 7: 30-32, 2012.

26. **Lourith N.**, Kanlayavattanakul M. Antioxidant color of purple glutinous rice (*Oryza sativa*) color and its stability for cosmetic application. Adv. Sci. Lett. 17: 302-305, 2012.

27. Kanlayavattanakul M., **Lourith N**. Biologically active phenolics in seed coat of three sweet *Tamarindus indica* varieties grown in Thailand. Adv. Sci. Eng. Med. 4: 511-516, 2012.

28. Kanlayavattanakul M., Ospondpant D., Ruktanonchai U., **Lourith N**. Biological activity assessment and phenolic compounds characterization from the fruit pericarp of *Litchi chinensis* for cosmetic application. Pharm. Biol. 50: 1384-1390, 2012.

29. Kanlayavattanakul M., **Lourith N**. Spent coffee as a rich source of antioxidant appraisal for cosmetic applications. Adv. Sci. Eng. Med. 5: 173-176, 2013.

30. **Lourith N.**, Kanlayavattanakul M. Antioxidant activities and phenolics of *Passiflora edulis* seed recovered from juice production residue. J. Oleo Sci. 62: 235-240, 2013.

31. **Lourith N.**, Kanlayavattanakul M. Antioxidant and stability of dragon fruit peel colour. Agro Food Hi-Tech 24: 56-58, 2013.

32. Kanlayavattanakul M., **Lourith N.**, Ospondpant D., Ruktanonchai U., Pongpunyayuen S., Chansriniyom C. Salak plum peel extract as a safe and efficient antioxidant appraisal for cosmetics. Biosci. Biotecnol. Biochem. 77: 1068-1074, 2013.

33. **Lourith N.**, Kanlayavattanakul M. Hair loss and herbs for treatment. J. Cosmet. Sci. 12: 210-222, 2013.

34. **Lourith N.**, Kanlayavattanakul M. Appraisal of Thai glutinous rice husk for health promotion products. J. Cereal Sci. 57: 343-347, 2013.

35. **Lourith N.**, Kanlayavattanakul M. Antioxidant activity and stability of natural colour recovered from Roselle juice production. Agro Food Hi-Tech 24: 46-42, 2013.

36. Kanlayavattanakul M., **Lourith N.**, Janwattanapol J. Extraits and absolutes of Thai *Plumeria obtusa* L. flowers and their preference for cosmetics. Household and Personal care Today 8: 25-28, 2013.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุรี กัลยาวัฒนกุล

สังกัด สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ต. ท่าสุด อ. เมือง จ. เชียงราย 57100

โทรศัพท์ 0-5391-6832 โทรสาร 0-5391-6931

E-mail: mayuree@mfu.ac.th

ประวัติการเผยแพร่ผลงานวิจัย (ตั้งแต่ปี คศ. 2005 – ปัจจุบัน)

1. **Kanlayavattanakul M**, Ruangrungsi N. Watanabe T, Kawahata M, Therrien B, Yamaguchi K, Ishikawa T. *ent*-Halimane Diterpenes and a Guaiane Sesquiterpene from *Cladogynos orientalis*. J. Nat. Prod. 68: 7-10, 2005.

2. Lawan K, **Kanlayavattanakul M**, Lourith N. Antimicrobial efficacy of caprylyl glycol and ethylhexylgly- cerine in emulsion. J. Health Res. 23: 1-3, 2009.

3. **Kanlayavattanakul M**, Phrutivorapongkul A, Lourith N, Ruangrungsi N. Pharmacognostic specification of *Naringi crenulata* stem wood. J. Health Res. 23: 65-69, 2009.

4. Patin R, **Kanlayavattanakul M**, Lourith N. Aromatherapy and essential oils in Thai spa business. IJPS. 5: 160-166, 2009.

5. Lourith N, **Kanlayavattanakul M**, Chanpirom S. Free radical scavenging efficacy of Tamarind seed coat and its cosmetics application. J. Health Res. 23: 159-162, 2009.

6. Futrakul B, **Kanlayavatanakul M**, Krisdaphong P. Biophysics evaluation of polysaccharide gel from durian's fruit hulls for skin moisturizer. Int. J. Cosmet. Sci. 32: 211-215, 2010.

7. **Kanlayavattanakul M,** Lourith N. Tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of wastewater from paper mulberry pulps production. *In*: Pure and Applied Chemistry International Conference 2010 Proceeding. January 21-23, 2010. 123-126.

8. **Kanlayavattanakul M,** Lourith N. Ferulic acid in paper mulberry and its wastewater from pulps production. J Chem. Chem. Eng. 4: 58-62, 2010.

9. Lourith N, **Kanlayavattanakul M**, Pongpunyayuen S. Botanical arbutin from *Naringi crenulata.* Cosmetics: Types, Allergies and Applications. (Ed.; Hayes, LM) Nova Science Publishers, Inc.: New York. 157-164, 2011.

10. **Kanlayavattanakul M**, Lourith N. Sapodilla seed coat as a multifunctional ingredient for cosmetic applications. Process Biochem. 46: 2215-2218, 2011.

11. Lourith N, **Kanlayavattanakul M**. Biological activity and stability of mangosteen as a potential natural color. Biosci. Biotechnol. Biochem. 75: 2257-2259, 2011.

12. Lourith N, Kanlayavattanakul M, Pongpunyayuen S, Chaiwarith J. Characterization of arbutin and kojic acid in *Naringi crenulata.* Household and Personal care Today 7: 20-21, 2012.

13. **Kanlayavattanakul M**, Lourith N. Sunscreen liquid foundation containing *Naringi crenulata* powder. Adv. Mat. Res. 506: 583-586, 2012.

14. **Kanlayavattanakul M**, Rodchuea C, Lourith N. Moisturizing effect of alcohol-based hand rub containing okra polysaccharide. Int. J. Cosmet. Sci. 34: 280-283, 2012.

15. **Kanlayavattanakul M**, Lourith N. Thanaka loose powder and liquid foundation preparations. Household and Personal care Today 7: 30-32, 2012.

16. Lourith N, **Kanlayavattanakul M.** Antioxidant color of purple glutinous rice (*Oryza sativa*) color and its stability for cosmetic application. Adv. Sci. Lett. 17: 302-305, 2012.

17. **Kanlayavattanakul M**, Lourith N. Biologically active phenolics in seed coat of three sweet *Tamarindus indica* varieties grown in Thailand. Adv. Sci. Eng. Med. 4: 511-516, 2012.

18. **Kanlayavattanakul M**, Ospondpant D, Ruktanonchai U, Lourith N. Biological activity assessment and phenolic compounds characterization from the fruit pericarp of *Litchi chinensis* for cosmetic application. Pharm. Biol. 50: 1384-1390, 2012.

19. **Kanlayavattanakul M**, Lourith N. Spent coffee as a rich source of antioxidant appraisal for cosmetic applications. Adv. Sci. Eng. Med. 5: 173-176, 2013.

20. Lourith N, **Kanlayavattanakul M**. Antioxidant activities and phenolics of *Passiflora edulis* seed recovered from juice production residue. J. Oleo Sci. 62: 235-240, 2013.

21. Lourith N, **Kanlayavattanakul M.** Antioxidant and stability of dragon fruit peel colour. Agro Food Hi-Tech 24: 56-58, 2013.

22. **Kanlayavattanakul M,** Lourith N, Ospondpant D, Ruktanonchai U, Pongpunyayuen S, Chansriniyom C. Salak plum peel extract as a safe and efficient antioxidant appraisal for cosmetics. Biosci. Biotecnol. Biochem. 77: 1068-1074, 2013.

23. Lourith N, **Kanlayavattanakul M.** Appraisal of Thai glutinous rice husk for health promotion products. J. Cereal Sci. 57: 343-347, 2013.

24. Lourith N, **Kanlayavattanakul M**. Antioxidant activity and stability of natural colour recovered from Roselle juice production. Agro Food Hi-Tech 24: 40-42, 2013.

25. **Kanlayavattanakul M**, Lourith N, Janwattanapol J. Extraits and absolutes of Thai *Plumeria obtusa* L. flowers and their preference for cosmetics. Household and Personal care Today 8: 25-28, 2013.

บทความวิชาการ (ตั้งแต่ปี คศ. 2005 – ปัจจุบัน)

1. **Kanlayavattanakul M**, Lourith N. Carboxymethylglucan in cosmetics. Thai Pharm. Health Sci. J. 3: 378-382, 2008.

2. Lourith N, **Kanlayavattanakul M**. Natural surfactants used in cosmetics : glycolipids. Int. J. Cosmet. Sci. 31: 255-261, 2009.

3. **Kanlayavattanakul M**, Lourith N. Lipopeptides in cosmetics. Int. J. Cosmet. Sci. 32: 1-8, 2010.

4. Lourith N, **Kanlayavattanakul M**. Oral malodor and active ingredients for treatment. Int. J. Cosmet. Sci. 32: 321-329, 2010.

5. Kanlayavattanakul M., **Lourith N**. Therapeutic agents and herbs in topical application for acne treatment. Int. J. Cosmet. Sci. 33: 289-297, 2011.

6. Kanlayavattanakul M., **Lourith N**. Body malodours and their topical treatment agents. Int. J. Cosmet. Sci. 33: 298-311, 2011.

7. Lourith N, **Kanlayavattanakul M**. Hair loss and herbs for treatment. J. Cosmet. Sci. 12: 210-222, 2013.