Published Online: 8 OCT 2024

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของพิกัดเกสรทั้งเก้า ที่สกัดด้วยตัวทำละลายดีปยูเทคติกจากธรรมชาติ

Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activities of Nine-flower Remedy Extracted by Using Natural Deep Eutectic Solvent

กิริฎา ตระกูลรุ่ง
อีเมล: 6451701254@lamduan.mfu.ac.th
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาณุพงษ์ ใจวุฒิ
อีเมล: phanuphong@mfu.ac.th
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้สนใจทำการศึกษาเพื่อสกัดสารจากตำรับยาแพทย์แผนไทยพิกัดเกสรทั้งเก้าซึ่งประกอบด้วยดอกมะลิ ดอกพิกุล ดอกบุนนาค ดอกสารภี เกสรบัวหลวง ดอกจำปา ดอกกระดังงา ดอกลำเจียก และดอกลำดวน ด้วยตัวทำละลายดีปยูเทคติกจากธรรมชาติ และทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของสารสกัดพิกัดเกสรทั้งเก้าที่สกัดด้วย Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) เปรียบเทียบกับการสกัดด้วยวิธีดั้งเดิมคือเอทานอล 95% ทางผู้วิจัยได้เลือกใช้สารละลาย NADES ซึ่งเป็นส่วนผสมของสารที่ทำหน้าที่รับไฮโดรเจน คือ L-Proline และสารที่ทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจน คือ Lactic acid โดยใช้สัดส่วนสาร L-Proline, 95% Lactic acid และน้ำ ในสัดส่วน 1:2:2.5 โดยโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณสารละลาย NADES 22.57 กรัม ต่อพิกัดเกสรที่ต้องการสกัด 1 กรัม พบว่า สารที่ได้จากการสกัดด้วย NADES มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลในทุกตัวอย่าง โดยสารสกัด NADES จากบัวหลวงมีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด มีค่าเท่ากับ 93.97±4.27 mg GAE/g การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัด NADES จากลำเจียก จำปา และบัวหลวง ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 112.29±8.30, 107.90±0.70 และ 105.82±2.75 mg TEAC/g ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส พบว่า สารสกัดรวมเก้าชนิดที่สกัดด้วย NADES มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสสูงที่สุด แตกต่างจากตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 155.60±6.52 mg KE/g ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การสกัด

ด้วยวิธี NADES ซึ่งเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์สำหรับการสกัดสารออกฤทธิ์จากตำรับยาแพทย์แผนไทยพิกัดเกสรทั้งเก้าเพื่อใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอางต่อไป

คำสำคัญ: ดีปยูเทกติกจากธรรมชาติ, พิกัดเกสรทั้งเก้า, ฟีนอลิก, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส

Abstract

This research was aimed to extract bioactive substances from nine-flower remedy of Thai traditional medicine using Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) method. Total phenolic compounds, antioxidant capacity and tyrosinase inhibitory activity were used to compare the extraction efficiency between the NADES method and traditional extraction method by using 95% ethanol. The NADES composed of L-Proline as a hydrogen acceptor and lactic acid as a hydrogen donor in the proportion of L-Proline, 95% lactic acid and water was 1:2:2.5 molar ratio mixed at 60 degrees Celsius. Ratio of NADES solution per sample was 22.57:1 gram. It was found that all flower NADES extracts showed higher total phenolic compounds than that being obtained from ethanol extraction. Lotus NADES extract possessed the highest total phenolic content of 93.97±4.27 mg GAE/g. Antioxidant activity tested by using DPPH method indicated that NADES extracts from Lam Chiak, Champa, and Lotus had significantly higher antioxidant capacity than other samples ($p<0.05$) exhibiting 112.29±8.30, 107.90±0.70 and 105.82±2.75 mg TEAC/g, respectively. The tyrosinase inhibitory activity test showed that the NADES extract of mixed sample from nine flower remedy had the highest activity of 155.60±6.52 mg KE/g which significantly different from other samples ($p<0.05$). The results of the study showed that the environmentally friendly NADES method as alternative efficient method for extraction of bioactive compounds from the nine-flower remedy of Thai traditional medicine which could be further applied in cosmetic industry.

Keywords: Natural Deep Eutectic Solvent, Nine-flower Remedy, Phenolic, Antioxidant, Anti-tyrosinase

บทนำ/หลักการและเหตุผล

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญต่อความยั่งยืนของผลิตภัณฑ์ความงามที่มีต่อสิ่งแวดล้อม และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ความงาม อีกทั้งพบว่า ผู้บริโภคมีแนวโน้มความสนใจที่เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากในผลิตภัณฑ์จากสารสกัดจากธรรมชาติและสมุนไพรที่มีการใช้ในการแพทย์แผนโบราณ (Lee & Kwon, 2022) แต่เดิมกระบวนการสกัดสารจากพืชนั้นนิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยได้ง่าย ซึ่งมีประเด็นเรื่องการส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม ความเป็นพิษและการตกค้างของสารในผลิตภัณฑ์ ในขณะที่การใช้ตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมสามารถช่วยลดปัญหาที่เกิดขึ้นจากการใช้ตัวทำละลายแบบเดิมได้ (Hikmawanti et al., 2021) โดยสารที่ได้รับความสนใจมากที่สุดนั้นคือระบบตัวทำละลายดีปยูเทกติกแบบธรรมชาติ (Natural Deep Eutectic Solvents; NADES) (Chemat et al., 2019) เนื่องจากมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีความปลอดภัย ความเป็นพิษต่ำ ใช้พลังงานในการผลิตต่ำ นำกลับมาใช้ได้ใหม่ และย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายของสาร เพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ เพิ่มความเสถียร และช่วยยืดอายุของผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย (Hikmawanti et al., 2021)

จากการวิจัยทางการตลาดของ Future Market Insights เกี่ยวกับความต้องการของผู้บริโภคพบว่า มีความต้องการสารสกัดจากดอกไม้เพิ่มมากขึ้นจากการขยายตัวของผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและสารสกัดออร์แกนิคที่เพิ่มมากขึ้น ได้มีการคาดการณ์ว่าความต้องการสารสกัดจากดอกไม้จะมีการขยายตัวขึ้นขึ้น 5.2% ต่อปี นับจากปี 2022-2023 มีมูลค่าทางการตลาดเพิ่มขึ้นจาก US$ 2,773.7 ในปี 2022 เป็น US$ 4,604.9 ในปี 2032 (Futuremarketinsights, 2021)

ในตำรายาไทยมีการใช้ดอกไม้เพื่อเป็นยาอยู่หลายขนาน และมีการนำดอกไม้หลากหลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยาใกล้เคียงกันมาไว้ด้วยกัน เรียกว่า พิกัดเกสร โดยพิกัดเกสรในยาไทยมี 3 พิกัด คือ พิกัดเกสรทั้งห้า พิกัดเกสรทั้งเจ็ด และพิกัดเกสรทั้งเก้า พิกัดเกสรทั้งเก้า ประกอบด้วยดอกมะลิ ดอกพิกุล ดอกบุนนาค ดอกสารภี เกสรบัวหลวง ดอกจำปา ดอกกระดังงา ดอกลำเจียก และดอกลำดวน สรรพคุณแก้ร้อนในกระหายน้ำ แก้ไข้จับ แก้ไข้เพื่อลม แก้ไข้เพื่อปฐวีธาตุ ให้เจริญอาหาร แก้โรคตา (ชยันต์ พิเชียรสุนทร และวิเชียร จีรวงส์, 2556) โดยสารสกัดจากพิกัดเกสรทั้งเก้าด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิครวมสูงที่สุด (แพรวพรรณ นาเวียง และคณะ, 2558) และยังไม่พบว่ามีการศึกษาใดใช้วิธี NADES ในการสกัดพิกัดเกสรทั้งเก้ามาก่อน ผู้วิจัยได้เลือกใช้สาร L-Proline และ Lactic acid เพื่อเป็นสารละลายในระบบ NADES เนื่องจากเหตุผลเรื่องความสามารถในการสกัดสาร ความคงตัวของสารที่สกัดได้ ความปลอดภัยในเครื่องสำอาง และประโยชน์ของสารทางเครื่องสำอาง งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการสกัดสารออกฤทธิ์จากพิกัดเกสรทั้ง 9 ด้วยวิธี NADES เปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิมโดยใช้เอทานอล 95% เพื่อหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสสำหรับการใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอาง โดยผลจากงานวิจัยนี้จะเป็นการต่อยอดความรู้

และภูมิปัญญาจากศาสตร์การแพทย์แผนไทย ร่วมกับการใช้วิธีการสกัดสารแบบ Green Solvent ที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และเป็นที่ต้องการของตลาด

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากพิกัดเกสรทั้งเก้าด้วยวิธี NADES และConventional solvent

คัดเลือกพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มพิกัดเกสรทั้งเก้าชนิดนี้ในรูปแบบแห้งมาทำการบดแล้วแร่งผ่านตะแกรงให้มีขนาด 60 mesh นำมาสกัดโดยเลือกใช้สารละลาย NADES ที่ประกอบด้วย L-Proline และ Lactic acid และเลือกใช้เอทานอล 95% เป็นตัวละลายเปรียบเทียบในการสกัด การเตรียมสารละลาย NADES ทำโดยผสมสาร L-Proline , 95% Lactic acid และน้ำ ในสัดส่วน 1:2:2.5 molar ratio ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปริมาณของ NADES 25.36 กรัมต่อพิกัดเกสรที่ต้องการสกัด 1 กรัม สกัดโดยใช้เครื่อง Ultrasonic เป็นเวลา 31 นาที นำมาเซนตริฟิวจ์ที่ 6000 rpm เป็นเวลา 20 นาที และเก็บส่วน supernatant ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป (Tzani et al., 2023) การเตรียมสารสกัดด้วยเอทานอล 95% ทำโดยใช้อัตราส่วนพิกัดเกสรที่ต้องการสกัด 1 กรัมต่อสารละลาย 25 กรัม (1:25) ทำการหมักแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์1 เก็บส่วนที่กรองได้ (filtrate) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การทดสอบหาปริมาณสารฟีนอลิกรวม

ทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu reagent โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Gallic acid รายงานผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง (mg Gallic equivalents (GAE)/g dry sample)

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox รายงานผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลโทรล็อกซ์ต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง (mg Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)/g dry sample)

4. การทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส

ทดสอบหาฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome รายงานผลเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลโคจิกต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง (mg Kojic acid equivalent antioxidant capacity (KE)/g dry sample)

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการศึกษาที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistical Package for the Social Science (SPSS Satatistic 21) ใช้วิธี One-way ANOVA แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วน

เบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey test ใช้วิธี Linear Regression เพื่อหาความสัมพันธ์แบบเส้นตรงเชิงบวกระหว่างสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และใช้วิธี Pearson Correlation เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่างสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส

ผลวิจัย (Results)

1. ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของพิกัดเกสรทั้งเก้าด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

พบว่า ตัวอย่างที่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่สูงที่สุดคือสารสกัดบัวหลวงที่สกัดด้วย NADES มีปริมาณเท่ากับ 93.97 ± 4.27 mg GAE/g และตัวอย่างที่มีปริมาณสารฟีนอลิกรวมต่ำที่สุด คือ สารสกัดมะลิที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณเท่ากับ 3.00 ± 0.27 mg GAE/g สารสกัดรวมพิกัดเกสรทั้งเก้าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย NADES มีปริมาณเท่ากับ 43.03 ± 7.67 mg GAE/g เทียบกับสารสกัดรวมพิกัดเกสรทั้งเก้าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณเท่ากับ 8.31 ± 1.01 mg GAE/g และพบว่า สารที่ได้จากการสกัดด้วย NADES มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลในทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ปริมาณสารฟีนอลิกรวมของพิกัดเกสรทั้งเก้า

ตัวอย่างที่	สารสกัด	ตัวทำละลายเอทานอล (mg GAE/g)	ตัวทำละลาย NADES (mg GAE/g)
1	มะลิ	3.00 ± 0.27^{g}	18.67 ± 2.98^{def}
2	พิกุล	9.19 ± 0.87^{efg}	20.30 ± 2.51^{de}
3	บุนนาค	49.48 ± 5.46^{c}	69.18 ± 5.23^{b}
4	สารภี	9.11 ± 0.33^{efg}	49.19 ± 4.57^{c}
5	บัวหลวง	5.35 ± 0.57^{fg}	93.97 ± 4.27^{a}
6	กระดังงา	6.34 ± 0.75^{fg}	10.74 ± 2.36^{efg}
7	จำปา	6.75 ± 0.66^{efg}	14.97 ± 2.32^{defg}
8	ลำเจียก	27.59 ± 2.77^{d}	45.95 ± 5.06^{c}
9	ลำดวน	5.68 ± 0.84^{fg}	16.66 ± 2.70^{defg}
10	รวม 9 ชนิด	8.31 ± 1.01^{efg}	43.03 ± 7.67^{c}

หมายเหตุ ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD), n=3 และตัวยกอักษรภาษาอังกฤษ (a-g) แสดงความแตกต่างกันของตัวอย่างในทุกคอลัมน์ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05; ANOVA -Tukey test)

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพิกัดเกสรทั้งเก้าด้วยวิธี DPPH

พบว่า สารสกัด NADES จากลำเจียกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มากกว่าตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เท่ากับ 112.29 ± 8.30 mg TEAC/g และพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดในสารสกัดบัวหลวงที่สกัดด้วยเอทานอล เท่ากับ 1.73 ± 0.99 mg TEAC/g สารสกัดรวมพิกัดเกสรทั้งเก้าที่สกัดด้วยตัวทำละลาย NADES มีปริมาณเท่ากับ 87.81 ± 3.28 mg TEAC/g เทียบกับสารสกัดรวมพิกัดเกสรทั้งเก้าที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณเท่ากับ 15.99 ± 2.18 mg TEAC/g สารสกัดหลายชนิดเมื่อทำการสกัดด้วยวิธี NADES สามารถเพิ่มฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างมาก ยกตัวอย่างเช่นสารสกัดจากดอกบัวหลวงที่สกัดด้วย 95% Ethanol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุด แต่เมื่อสกัดดอกบัวหลวงด้วยวิธี NADES พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นราว 60 เท่าเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยเอทานอล

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพิกัดเกสรทั้งเก้า

ตัวอย่างที่	สารสกัด	ตัวทำละลายเอทานอล (mg TEAC/g)	ตัวทำละลาย NADES (mg TEAC/g)
1	มะลิ	5.84 ± 3.01^{ij}	38.34 ± 1.50^{fg}
2	พิกุล	23.87 ± 4.32^{hi}	66.47 ± 4.54^{e}
3	บุนนาค	61.84 ± 5.65^{e}	96.77 ± 4.18^{bc}
4	สารภี	10.86 ± 1.29^{ij}	82.24 ± 5.21^{d}
5	บัวหลวง	1.73 ± 0.99^{j}	105.82 ± 2.75^{ab}
6	กระดังงา	2.67 ± 1.53^{j}	43.99 ± 4.15^{f}
7	จำปา	11.52 ± 3.85^{ij}	107.90 ± 0.70^{ab}
8	ลำเจียก	26.79 ± 5.13^{gh}	112.29 ± 8.30^{a}
9	ลำดวน	15.48 ± 1.83^{hi}	61.25 ± 1.84^{e}
10	รวม 9 ชนิด	15.99 ± 2.18^{hi}	87.81 ± 3.28^{cd}

หมายเหตุ ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD), n=3 และตัวยกอักษรภาษาอังกฤษ (a-g) แสดงความแตกต่างกันของตัวอย่าง โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05; ANOVA -Tukey test)

ผลวิเคราะห์ทางสถิติเพิ่มเติมด้วยวิธี Linear Regression พบว่า ในตัวอย่างที่สกัดด้วย 95% Ethanol สารประกอบฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในระดับค่อนข้างมากอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 0.864 ในขณะที่ตัวอย่างที่สกัดด้วย NADES พบว่า สารประกอบฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ

($p<0.05$) ในระดับค่อนข้างน้อย โดยมีค่า R square เท่ากับ 0.364 แสดงถึงว่า สารสกัดจากพิกัดเกสรทั้งเก้าที่มีปริมาณฟีนอลิกสูงจะส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงตามไปด้วย

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกรวม กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการทดสอบ Linear Regression

ตัวอย่าง	Parameter 1	Parameter 2	R square	sig
สารสกัดจากเอทานอล	สารประกอบฟีนอลิก	DPPH	0.864*	0.000
สารสกัดจาก NADES	สารประกอบฟีนอลิก	DPPH	0.364*	0.000

หมายเหตุ * แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *$p<0.05$

3. ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของพิกัดเกสรทั้งเก้าด้วยวิธี Dopachrome

พบว่า สารที่ได้จากการสกัดด้วย NADES มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสสูงกว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลในเกือบทุกตัวอย่าง ยกเว้นสารสกัดจากมะลิ โดยพบว่า สารสกัดแบบดอกรวมเก้าชนิดที่สกัดด้วย NADES มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสสูงที่สุด แตกต่างจากตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 155.60 ± 6.52 mg KE/g อนุมานได้ว่า มีการเสริมฤทธิ์กันของพิกัดเกสรทั้งเก้าที่สกัดด้วย NADES ซึ่งไม่พบงานวิจัยใดทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของสารสกัดพิกัดเกสรทั้งเก้าชนิดในลักษณะเดียวกันนี้ ในขณะที่ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสต่ำสุดคือสารสกัดลำเจียกที่สกัดด้วยเอทานอล มีค่าเท่ากับ 8.58 ± 4.61 mg KE/g

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของพิกัดเกสรทั้งเก้า

ตัวอย่างที่	สารสกัด	ตัวทำละลายเอทานอล (mg KE/g)	ตัวทำละลาย NADES (mg KE/g)
1	มะลิ	31.87 ± 5.51^{de}	24.19 ± 9.39^{def}
2	พิกุล	23.75 ± 6.26^{def}	120.01 ± 7.16^{b}
3	บุนนาค	16.47 ± 6.59^{ef}	117.09 ± 0.86^{b}
4	สารภี	19.63 ± 5.21^{def}	70.64 ± 6.84^{c}
5	บัวหลวง	26.88 ± 5.62^{def}	74.30 ± 4.57^{c}
6	กระดังงา	19.76 ± 4.48^{def}	23.97 ± 5.69^{def}
7	จำปา	26.72 ± 7.09^{def}	116.08 ± 1.93^{b}
8	ลำเจียก	8.58 ± 4.61^{f}	106.56 ± 5.02^{b}
9	ลำดวน	20.93 ± 8.05^{def}	35.30 ± 1.17^{d}
10	รวม9ชนิด	27.45 ± 1.77^{de}	155.60 ± 6.52^{a}

หมายเหตุ ข้อมูลในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD), n=3 และตัวยกอักษรภาษาอังกฤษ (a-g) แสดงความแตกต่างกันของตัวอย่าง โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05; ANOVA -Tukey test)

ผลการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยวิธี Pearson Correlation เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสในพบว่า ในตัวอย่างที่สกัดด้วย 95% Ethanol สารประกอบฟีนอลิกรวมมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสในระดับปานกลางอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.01) โดยมีค่าเท่ากับ 0.521 ในขณะที่ตัวอย่างที่สกัดด้วย NADES ไม่พบความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่างสารประกอบฟีนอลิกรวมกับฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.01)

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกรวม กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธีการทดสอบ Pearson Correlation

ตัวอย่าง	Parameter 1	Parameter 2	Correlation	Sig. (2-tailed)
สารสกัดจากเอทานอล	สารประกอบฟีนอลิก	Tyrosinase inhibiton	0.521*	0.003
สารสกัดจากNADES	สารประกอบฟีนอลิก	Tyrosinase inhibiton	0.275	0.165

หมายเหตุ * แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *p<0.01

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ (Discussion and Suggestion)

จากการศึกษาพบว่า สารที่ได้จากการสกัดด้วย NADES มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงกว่าสารที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอลในทุกตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุด คือ สารสกัด NADES จากบัวหลวง มีค่าเท่ากับ 93.97 ± 4.27 mg GAE/g อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) อาจเป็นเพราะว่าในดอกบัวหลวงนั้นมีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์อยู่เป็นจำนวนมาก และตัวทำละลาย L-Proline/Lactic acid ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความสามารถในการสกัดสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารกลุ่มฟีนอลิกอื่น ๆ สอดคล้องกับงานของ Oktaviyanti et al. (2019) ที่สรุปว่าสารละลาย NADES ในกลุ่มกรดจะสามารถสกัดสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ได้ดีกว่ากลุ่มโพลีแอลกอฮอล์ และงานวิจัยของ Tzani et al. (2023) พบว่า การใช้ตัวทำละลาย L-Proline/Lactic acid สามารถสกัดสารในกลุ่ม Flavonoid ได้สูงกว่าตัวทำละลายแบบดั้งเดิม

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดด้วย NADES มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่าสารสกัดจากเอทานอล โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัด NADES จากลำเจียกมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่าตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) โดยมีค่าเท่ากับ 112.29 ± 8.30 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Oktaviyanti et al. (2019) ที่พบว่า การสกัดด้วย NADES ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าการสกัดด้วยเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) และงานวิจัยของ Tzani et al.

(2023) ที่พบว่า สารที่สกัดด้วย NADES มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารที่สกัดด้วยเอทานอลเช่นเดียวกัน

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสพบว่าสารสกัดแบบดอกรวมเก้าชนิดที่สกัดด้วย NADES มีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสสูงที่สุด แตกต่างจากตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 155.60 ± 6.52 mg KE/g และยังอนุมานได้ว่ามีการเสริมฤทธิ์กันของพิกัดเกสรทั้งเก้าที่สกัดด้วย NADES ซึ่งยังไม่พบฤทธิ์นี้ในการศึกษาอื่น ๆ สอดคล้องกับการศึกษาของ Hikmawanti et al. (2021) ที่สรุปไว้ว่า Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) สามารถเพิ่มความสามารถในการละลายและยังเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยวิธีดั้งเดิม และการศึกษาของ Mansinhos et al. (2021) ที่พบว่า การสกัดสารด้วย Proline:lactic acid มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าการสกัดด้วยเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าการสกัดด้วย NADES สามารถเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสได้เมื่อเทียบกับเอทานอล เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมานั้น Liyanaarachchi et al. (2018) ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของกลีบดอกและเกสรบุนนาคเมื่อสกัดด้วยเอทานอลด้วยวิธี Mushroom Tyrosinase ในขณะที่การศึกษานี้พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของดอกบุนนาคเมื่อสกัดด้วยเอทานอล มีค่าเท่ากับ 16.47 ± 6.59 mg KE/g และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 7 เท่าเมื่อสกัดด้วย NADES คือ เท่ากับ 117.09 ± 0.86 mg KE/g

อย่างไรก็ตามเนื่องจากวิธีการสกัดสารทั้ง 2 วิธีมีความแตกต่างกันอยู่บ้างในประเด็นเรื่องการใช้ Ultrasound-assisted จึงอาจไม่สามารถเทียบค่าที่ได้ของสารสกัดจากทั้ง 2 วิธีดังกล่าวนี้โดยตรง ซึ่งพบข้อจำกัดนี้ในงานวิจัยอื่นเช่นเดียวกัน (Tzani et al., 2023)

สรุปได้ว่าการใช้วิธี NADES สามารถเพิ่มปริมาณของการสกัดสารฟีนอลิกรวม เพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของพิกัดเกสรทั้งเก้าได้เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยเอทานอล

ข้อเสนอแนะ

1. สามารถพิจารณาเลือกใช้สารละลาย NADES ที่แตกต่างกันทั้งชนิดที่เป็นตัวรับไฮโดรเจนและตัวให้ไฮโดรเจนเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของ NADES แต่ละชนิด

2. เนื่องจากมีหลากหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถของ NADES จึงสามารถกำหนดตัวแปรที่แตกต่างกันไม่ว่าจะเป็น สัดส่วนของสารที่ใช้ สัดส่วนของน้ำที่ใช้ อุณหภูมิ ระยะเวลาในการใช้ Ultrasonic เป็นต้น

3. สามารถผลิตสูตรเครื่องสำอางที่มีสารสกัดจากพิกัดเกสรทั้งเก้าโดยต่อยอดจากผลการศึกษานี้ได้

4. สามารถทำการทดสอบฤทธิ์ที่ได้ในอาสาสมัครต่อไป

รายการอ้างอิง

ชยันต์ พิเชียรสุทร และวิเชียร จีรวงส์. (2556). *คู่มือเภสัชกรรมแผนไทย คณาเภสัช* (พิมพ์ครั้งที่ 3). อมรินทร์อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

แพรวพรรณ นาเวียง, มิตรชัย ลักขนัต และศิรสิทธิ์ ศรีเพชร. (2558). *การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพิกัดเกสร* (ภาคนิพนธ์ปริญญาการแพทย์แผนไทยบัณฑิต). คณะแพทย์แผนไทยและแพทย์ทางเลือก มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี.

Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., . . . Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *118*, 248-263.

Futuremarketinsights. (2021). *Market insights on flower extract covering sales outlook, demand forecast & up-to-date key trends flower extract market research report by type, form, application & region - forecast 2022 – 2032.* https://www.futuremarketinsights.com/reports/flower-extract-market

Hikmawanti, N. P. E., Ramadon, D., Jantan, I., & Mun'im, A. (2021). Natural deep eutectic solvents (NADES): phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development. *Plants*, *10*(10), 2091. http://doi.org/10.3390/plants10102091

Lee, J., & Kwon, K. H. (2022). Sustainable changes in beauty market trends focused on the perspective of safety in the post‐coronavirus disease‐19 period. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *21*(7), 2700-2707.

Liyanaarachchi, G. D., Samarasekera, J. K. R. R., Mahanama, K. R. R., & Hemalal, K. D. P. (2018). Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. *Industrial crops and products*, *111*, 597-605.

Oktaviyanti, N. D., & Mun'im, A. (2019). Application and optimization of ultrasound-assisted deep eutectic solvent for the extraction of new skin-lightening cosmetic materials from Ixora javanica flower. *Heliyon*, *5*(11).

Tzani, A., Pitterou, I., Divani, F., Tsiaka, T., Sotiroudis, G., Zoumpoulakis, P., . . . Detsi, A. (2022). Green extraction of Greek propolis using natural deep eutectic solvents (NADES) and incorporation of the NADES-extracts in cosmetic formulation. *Sustainable Chemistry*, *4*(1), 8-25. https://doi.org/10.3390/suschem4010002