



ปัญหาพิเศษ

ศึกษาศาสตรสกัดจากมะขามป้อมในการลดรอยดํา

STUDY OF MAKHAM POM EXTRACTS TO REDUCE
HYPERPIGMENTATION

โดย

นางสาวธัญญา บำราศทุกษ์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2563



ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

สาขา

วิทยาศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง ศึกษาสารสกัดจากมะขามป้อมในการลดรอยดำ

STUDY OF MAKHAM POM EXTRACTS TO REDUCE HYPERPIGMENTATION

นามผู้วิจัย..... ธีัญญา นัรารศทุกซ์.....

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ.....

(..อาจารย์พุทธพร สองศรี, D.Eng...)

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(..ผู้ช่วยศาสตราจารย์แดงอ่อน พรหมมิ, ปร.ด...)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์

วันที่.....เดือน..... พ.ศ. 2563

ศึกษาสารสกัดจากมะขามป้อมในการลดรอยดำ

ธัญญา บำราศทุกข์ และ พุทธพร ส่องศรี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผลสดมะขามป้อม สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณ 118.26 ± 30.79 mg GAE/g มากกว่าในสารสกัดด้วย 95% เอทานอล (108.16 ± 14.78 mg GAE/g) ส่วนปริมาณวิตามินซี สารสกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณ 38.53 ± 1.44 mg/100 ml น้อยกว่าในสารสกัดด้วยน้ำกลั่น (66.17 ± 7.24 mg/100 ml) และสารสกัดด้วย 95% เอทานอล (74.77 ± 5.43 mg/100 ml) ส่วนการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สารสกัดเมทานอลที่เจือจาง 1:10 มีฤทธิ์ยับยั้ง 44.50 ± 12.03 เปอร์เซ็นต์ เจือจาง 1:100 มีฤทธิ์ยับยั้ง 40.63 ± 1.42 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าสารสกัด 95% เอทานอลที่เจือจาง 1:10 (28.60 ± 2.44 เปอร์เซ็นต์) และ 1:100 (40.63 ± 1.42 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นผลสดมะขามป้อมที่มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพค่อนข้างสูงจึงเหมาะต่อการนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

คำสำคัญ: มะขามป้อม, สารประกอบฟีนอลิก, วิตามินซี, เอนไซม์ไทโรซิเนส

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

/ /

Study of Makham pom Extracts to Reduce Hyperpigmentation

Tanya Bamrattuk and Puttaporn Songsri

ABSTRACT

This research aimed to study the bioactive compounds of *Phyllanthus emblica* L. in fresh fruits. Total phenolic content in the methanol extract contained 118.26 ± 30.79 mg GAE/g, higher than in 95% ethanol extract (108.16 ± 14.78 mg GAE/g). The amount of vitamin C content in the methanol extract contained less vitamin C (38.53 ± 1.44 mg / 100 ml) than in distilled water extract (66.17 ± 7.24 mg/100 ml) and in 95% ethanol extract (74.77 ± 5.43 mg/100 ml). The activity of tyrosinase inhibition analysis showed that in diluted methanol solvents at 1:10 concentrations (44.50 ± 12.03 percent) and 1: 100 concentrations (41.15 ± 8.93 percent) had higher anti-tyrosinase activity than in diluted 95%ethanol extract at 1:10 concentrations (28.60 ± 2.44 percent) and 1: 100 concentrations (40.63 ± 1.42 percent). Therefore, Makhampom in fresh fruit contain a high amount of bioactive compounds, which is suitable for further utilization.

Keywords: *Phyllanthus emblica* L., Phenolic compound, Vitamin C,
Tyrosinase enzyme

Student's signature

Advisor's signature

____/____/____

บทนำ

เนื่องด้วยปัจจุบันผู้หญิงส่วนใหญ่มีความสนใจในการดูแลผิวพรรณบนใบหน้าให้ดูมีความกระจ่างใสมากยิ่งขึ้น ซึ่งปัญหาหลักที่ผู้หญิงส่วนใหญ่พบเจอนั้นก็คือ ปัญหารอยดำที่ทิ้งไว้จากการเป็นสิวซึ่งนับว่าเป็นปัญหาผิวหนังที่ก่อให้เกิดเป็นปัญหาทวนใจอย่างมาก ดังนั้นจึงมีการมองหาสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติมาใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ซึ่งการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้นั้นได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากกว่าการใช้สารเคมี โดยสารที่มีคุณสมบัติลดความหมองคล้ำ และช่วยให้ผิวกระจ่างใสนั้นมีหลายประเภท ขึ้นอยู่กับกลไกการออกฤทธิ์ แต่กลุ่มที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมากที่สุด ได้แก่ กลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) สำหรับฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นหนึ่งสมบัติที่น่าสนใจ เนื่องจากปัจจุบันปัญหาเรื่องการหมองคล้ำ และรอยดำได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาเป็นอย่างมาก ซึ่งสาเหตุที่พบบ่อยเกิดมาจากการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ซึ่งทำให้ปรากฏเป็นสีผิวเกิดขึ้น

ปรีชา และคณะ, 2550 ได้รายงานจากผลการทดลองว่าผลของมะขามป้อมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้มากที่สุด (อมรรัตน์, 2554) รายงานว่าสารสกัดหยาบจากมะขามป้อมในตัวทำละลายเมทานอล และเอทิลอะซิเตทนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis*

จึงมีการมองหาสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติมาทำการทดลองนั้นก็คือ มะขามป้อม (*Phyllanthus emblica* L.) เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Euphorbiaceae ที่พบได้ตามป่าเบญจพรรณแล้งทั่วไปในเอเชียเขตร้อน และป่าแดงทั่วไปในประเทศไทย (จันทิมา และคณะ, 2553) ผลมะขามป้อมจะให้รสเปรี้ยวๆ ฝาดๆ นำมารับประทานเป็นสมุนไพรเพื่อให้ชุ่มคอ แก้กษหายน้ำ เนื่องจากด้วยเป็นพืชที่มีวิตามินซี และ แทนนินสูง หาได้ง่ายตามท้องถิ่นจึงเหมาะต่อการนำมาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ

ดังนั้นงานวิจัยนี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาสารสกัดจากมะขามป้อมในการลดรอยดำโดยทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ได้จากสารสกัดของมะขามป้อม เพื่อนำมะขามป้อมมาใช้ประโยชน์ได้มากขึ้นในด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง นอกเหนือจากการนำมารับประทานเป็นอาหารเสริม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดสารจากมะขามป้อม

วิธีสกัดสารสกัดดัดแปลงจากวิธีของ (พัชรี, ยงยุทธ, ธารรัตน์ และ วราดุล, 2551) นำมะขามป้อมผลสด 693.30 กรัม หั่นเป็นชิ้นหยาบแล้วบด จากนั้นนำไปสกัดด้วย 95% Ethanol ปริมาตร 800 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมากรองเอากากของมะขามป้อมไปสกัดต่อด้วย Methanol ปริมาตร 700 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน และนำสารละลายทั้งสองตัวทำละลายมากรองด้วย Suction Flask และแบ่งจากสารสกัดที่ได้จากทั้งสองตัวทำละลายมาปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเตาไฟฟ้าควบคุมอุณหภูมิสำหรับตัวทำละลาย 95% Ethanol ที่ 70-80 องศาเซลเซียส สำหรับตัวทำละลาย Methanol ที่ 65 องศาเซลเซียส และนำมะขามป้อมผลสด 266.05 กรัม หั่นเป็นชิ้นหยาบแล้วบด นำไปสกัดด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 300 มิลลิลิตร นำมากรองด้วย Suction Flask

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยดัดแปลงจากวิธีการของ (วันแข็ง และ ดวงฤดี, 2011) โดยการนำสารสกัดมะขามป้อมเจือจาง 2000 เท่า ใส่ในหลอดทดลอง และเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu phenol Reagent ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง และคำนวณค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานแกลลิก (Gallic acid) รายงานผลเป็นมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัม (mg GAE/g) ทำการวัดทั้งหมดสามซ้ำ

3. การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

วิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี โดยวิธีการไทเทรตด้วยสารละลาย 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) โดยดัดแปลงวิธีการของ (พูนศิริ, 2553) แล้วบันทึกปริมาณที่ใช้สารละลาย DCIP โดยเทียบกับ Ascorbic acid ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน ทำการวัดทั้งหมดสามซ้ำ

4. การวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase)

วิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยดัดแปลงวิธีการของ (Neagu *et al.*, 2016) โดยนำสารสกัดเข้มข้นไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ณ เวลา 10, 20 และ 30 นาที

หลังจากทำปฏิกิริยาแล้ว ซึ่งทำการวัดทั้งหมดสามซ้ำ โดยใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน ทำการวัดทั้งหมดสามซ้ำ

ผลการศึกษา

ผลการสกัดสารจากมะขามป้อมผลสดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และตัวทำละลายเมทานอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร พบว่าเมื่อสกัดได้ปริมาตรสุทธิของมะขามป้อมเข้มข้นในทั้งสองตัวทำละลายอยู่ที่ปริมาณ 80 มิลลิลิตร และสารสกัดมะขามป้อมที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ปริมาตรสุทธิอยู่ที่ปริมาณ 250 มิลลิลิตร

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมะขามป้อม พบว่ามะขามป้อมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดมะขามป้อมที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% โดยตัวทำละลายเมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 118.26 ± 30.97 mg GAE/g และตัวทำละลายเอทานอล 95% มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 108.16 ± 14.78 mg GAE/g คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยโปรแกรม Excel 2013

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดในแต่ละตัวทำละลาย

ตัวทำละลาย	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด			ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เฉลี่ย (mg GAE/g) \pm SD
	1	2	3	
95% Ethanol	121.69	110.40	92.39	108.16 ± 14.78
Methanol	124.80	84.54	145.42	118.26 ± 30.97

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีของสารสกัดมะขามป้อม พบว่าสารสกัดมะขามป้อมในตัวทำละลายเอทานอล 95% มีปริมาณวิตามินซีมากที่สุดอยู่ที่ 74.77 รองลงมาคือในน้ำกลั่นอยู่ที่ 66.17 และในตัวทำละลายเมทานอล มีปริมาณวิตามินซีน้อยที่สุดอยู่ที่ 38.53 โดยคิดเป็นปริมาณวิตามินซี mg/100 mL คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยโปรแกรม Excel 2013

ตารางที่ 2 ปริมาณวิตามินซีของสารสกัดมะขามป้อมในตัวทำละลายต่างๆ

สารละลาย ปริมาณ 10 ml	ปริมาณ 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% ที่ใช้ (ml.)				ปริมาณ วิตามินซีเฉลี่ย (mg/100 mL) ± SD
	1	2	3	เฉลี่ย	
สารสกัด มะขามป้อม (น้ำกลั่น)	14.00	13.60	15.10	14.23	66.17 ± 7.24
สารสกัด มะขามป้อม (Methanol)	9.80	8.70	8.40	8.97	38.53 ± 1.44
สารสกัด มะขามป้อม (95% Ethanol)	16.00	15.50	16.20	15.90	74.77 ± 5.43

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิเคราะห์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดมะขามป้อม พบว่าค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ณ เวลา 10 นาที เทียบกับเวลา 0 นาที สารสกัดมะขามป้อมในตัวทำละลายเอทานอล 95% ที่ความเข้มข้น 1:1000 มีค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุด 46.51 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นเดียวกันในตัวทำละลายเมทานอล อยู่ที่ 33.99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าความเข้มข้น 1:10 ในตัวทำละลายเอทานอล 95% มีค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส 28.60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าในตัวทำละลายเมทานอล อยู่ที่ 44.50 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้น 1:100 ในตัวทำละลายเอทานอล 95% มีค่าการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส 40.63 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าในตัวทำละลายเมทานอล 41.15 เปอร์เซ็นต์ สรุปได้ว่าที่ความเข้มข้น 1:10 และ 1:100 ในตัวทำละลายเมทานอล มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าในตัวทำละลายเอทานอล 95% แต่ในความเข้มข้น 1:1000 ในตัวทำละลายเอทานอล 95% มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าในตัวทำละลายเมทานอล คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) ด้วยโปรแกรม Excel 2013

ตารางที่3 ผลการวิเคราะห์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ตัวอย่าง	ค่าดูดกลืนแสงที่ 475 nm	
	ค่าเฉลี่ยรวม 3 ซ้ำ ณ เวลาทุก 10 นาที (10 และ 30 นาที) (nm)	การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส (%) \pm SD
ตัวทำละลาย 95%Ethanol		
blank	0	0
control	0.194	0
ความเข้มข้น 1 : 10	0.137	28.60 \pm 2.44
ความเข้มข้น 1 : 100	0.116	40.63 \pm 1.42
ความเข้มข้น 1 : 1000	0.104	46.51 \pm 3.42
ตัวทำละลาย Methanol		
blank	0	0
control	0.194	0
ความเข้มข้น 1 : 10	0.107	44.50 \pm 12.03
ความเข้มข้น 1 : 100	0.113	41.15 \pm 8.93
ความเข้มข้น 1 : 1000	0.127	33.99 \pm 7.45

หมายเหตุ : คำนวณค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (One-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

วิจารณ์ผลการศึกษา

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดมะขามป้อม พบว่าในการทดลองได้ใช้ sodium carbonate 10% ทำให้เกิดการตกตะกอนขึ้นเมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับสารสกัดเนื่องจาก sodium carbonate สามารถละลายในน้ำได้ดีแต่ละลายในแอลกอฮอล์ได้เล็กน้อย และ ตัวทำละลายในการทดลองที่ใช้เป็นประเภทแอลกอฮอล์ทำให้มีตะกอนเกิดขึ้น ฉะนั้นควรลดเปอร์เซ็นต์ของ sodium carbonate ลงเพื่อลดการเกิดตะกอน และ พบว่าสารสกัดมะขามป้อมในตัวทำละลายเมทานอล มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมากกว่าสารสกัดมะขามป้อมในตัวทำละลายเอทานอล 95% เนื่องจากส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารประกอบที่มีขี้ จึงทำให้ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขี้สูง ซึ่งสัมพันธ์กับผลการทดลองที่ตัวทำละลายเมทานอล สามารถสกัดสาร

สกัดจากมะขามป้อมออกมาได้มากกว่าตัวทำละลายเอทานอล 95% เนื่องจากตัวทำละลายเมทานอล มีสภาพขี้สูงกว่ตัวทำละลายเอทานอล 95% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (ศิวาพร และ ณีฐิณี, 2546) ได้ทำการสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกมันฝรั่งด้วย เมทานอล เอทานอล 95% และ อะซิโตน พบว่าเมทานอล และเอทานอล 95% สกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดได้สูง โดยเมทานอล สูงที่สุดรองลงมาคือเอทานอล 95%

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีของสารสกัดมะขามป้อม พบว่าในตัวทำละลายเอทานอล 95% มีปริมาณวิตามินซีมากที่สุด รองลงมาคือ น้ำกลั่น และตัวทำละลายเมทานอล ตามลำดับ เนื่องจากวิตามินซีสามารถละลายในน้ำได้การที่นำมะขามป้อมมาสกัดด้วยน้ำกลั่นจึงมีปริมาณวิตามิน ซีที่ค่อนข้างสูง และการที่สกัดสารจากมะขามป้อมด้วยตัวทำละลายที่เป็นแอลกอฮอล์ ถึงแม้ในตัวทำ ละลายเอทานอล 95% จะมีปริมาณวิตามินซีของสารสกัดที่สูง อาจเนื่องมาจากตอนทำการทดลองได้ ทำการระเหยแอลกอฮอล์ แล้วนำมาวิเคราะห์ทันทีจึงทำให้มีความเข้มข้นมาก แต่ในเมทานอลที่มี ปริมาณวิตามินซีของสารสกัดน้อยที่สุด อาจเป็นเพราะได้ทำการระเหยแอลกอฮอล์ แล้วเก็บเอาไว้เป็น เวลานานจึงทำให้วิตามินซีอาจจะสลาย หรือโดนทำลายจากแอลกอฮอล์ ทั้งนี้วิตามินซีเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระที่สำคัญ ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ เพื่อป้องกันไม่ให้เยื่อหุ้มเซลล์ที่ชั้นผิวหนัง ถูกทำลาย ยับยั้งตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดการสร้างเมลานิน แล้วนอกจากนี้วิตามินซียังสามารถจับกับ คอปเปอร์ของไทโรซิเนสเพื่อป้องกันกระบวนการเกิดเม็ดสีเมลานินอีกด้วย (Ebanks, Wickett and Boissy, 2009)

การวิเคราะห์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดมะขามป้อม พบว่าที่ ความเข้มข้น 1:10 และที่ความเข้มข้น 1:100 ในตัวทำละลายเมทานอล มีค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่า ในตัวทำละลายเอทานอล 95% แสดงว่าเอนไซม์ไทโรซิเนส ถูกยับยั้งได้ดี เนื่องจากมีค่าการดูดกลืน แสงที่ต่ำ แต่ที่ความเข้มข้น 1:1000 ในตัวทำละลายเอทานอล 95% มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าใน ตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (อมรรัตน์, 2554) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนส และต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดมะขามป้อม พบว่าในตัวทำละลายเมทานอล สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้มากที่สุด และงานวิจัยเกี่ยวกับเครื่องสำอางของ (Chaudhuri, Lascu and Puccetti, 2007) ได้กล่าวว่าสารสกัดมะขามป้อมมีคุณสมบัติยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน หลายกลไก ได้แก่ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และยับยั้งเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ไม่ให้เปลี่ยนโดปาเป็นโดปาโครมที่จะกลายไปเป็นเมลานินอีกด้วย

สรุปผลการศึกษา

มะขามป้อมผลสดมีปริมาณฟีนอลิก และวิตามินซีสูงมาก ในการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ถือว่ามีประสิทธิภาพพอประมาณ ทั้งนี้เนื่องจากมะขามป้อมมีปริมาณวิตามินซีสูง ทำให้สามารถนำมาใช้ในการลดเลือนจุดต่างดำได้ และสารประกอบฟีนอลิกที่พบในมะขามป้อม เช่น กรดแกลลิก นั้นยังไปทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นให้กับเอนไซม์ไทโรซิเนส ในการถูกออกซิไดส์แทนไทโรซีน ส่วนกรดแอลลาจิก มีกลไกยับยั้งเอนไซม์ โดยไปจับกับโลหะคอปเปอร์ ซึ่งช่วยในการยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินได้ (ประไพพิศ, 2561) ทำให้มะขามป้อมเหมาะต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางในเรื่องของการลดเลือนจุดต่างดำได้เป็นอย่างดี

ข้อเสนอแนะการศึกษา

เนื่องจากการทดลองครั้งนี้มีข้อผิดพลาดในขั้นตอนของการสกัดสารสกัดมะขามป้อม ทำให้การทดลองมีข้อผิดพลาดไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบผลการศึกษากันได้ ในหัวข้อการศึกษาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี และ การศึกษากิจกรรมยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงได้มีการเสนอแนวทางแก้ไขการทดลองดังนี้ ในขั้นตอนการสกัดสารสกัดมะขามป้อมถ้าต้องการนำสารสกัดแต่ละตัวมาละลายมาเปรียบเทียบกัน ควรมีการกำหนดตัวแปรควบคุมให้เหมือนกัน ทั้งในเรื่องของน้ำหนักผลสดมะขามป้อมที่จะนำมาสกัด อัตราส่วนของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด ควรมีปริมาณตัวทำละลายอัตราส่วนมากกว่าปริมาณน้ำหนักผลสดมะขามป้อม โดยอาจจะใช้อัตราส่วนน้ำหนักมะขามป้อมกับตัวทำละลายเป็น 1:3 เพื่อให้ตัวทำละลายสกัดสารสกัดออกมาได้มากยิ่งขึ้น และต้องแยกสกัดสารแต่ละตัวทำละลาย รวมถึงเรื่องระยะเวลาของการสกัด ควรดูว่าหัวข้อในการศึกษาแต่ละวิธีควรใช้ระยะเวลาเท่าไรจึงจะเหมาะสม เช่น ในเรื่อง การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีต้องคำนึงถึงในเรื่องสารวิตามินซีนั้นเสื่อมสลายง่าย ควรรับนำมาวิเคราะห์ วิธีการเก็บรักษาสารสกัดที่จะไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณวิเคราะห์ และวางระยะเวลาให้เหมาะสมในการวิเคราะห์ต่างๆ ที่ต้องการศึกษาควรใช้ตัวแปรควบคุมเหมือนกันทั้งหมด เช่น น้ำหนักผลสด ปริมาณตัวทำละลาย ระยะเวลาสกัด และปริมาณสารสกัดที่จะนำมาระเหยตัวทำละลายเพื่อให้สารสกัดเข้มข้นขึ้น ต้องเป็นแพ็คเกจเดียวกันตั้งแต่ต้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ และ ฝ่ายกิจการนิสิต คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความสนับสนุนทุนการทำวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีวเคมีที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- จันทิมา หอมกลบ, สุพนิดา วินิจฉัย, หทัยรัตน์ รอมศิริ, นคร เหลืองประเสริฐ และ วิชัย หลุทัยธนาสันต์. 2553. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเอทิลอะซิเตตจากผลมะขามป้อมจากแหล่งในประเทศไทย, น. 91-99. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ประไพพิศ อินเสน. 2561. การยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากพืชกลุ่มเบอร์รี่ไทย. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 12(2): 69-82.
- ปรีชา มุลสิน, อมรรัตน์ วงษ์กลม, ปริญญา มุลสิน, เกศินี จันทโรโสภณ และ สุกัญญา ไชยชนะ. 2550. การวิจัยเพื่อพัฒนาและถ่ายทอดกระบวนการผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากมะขามป้อมกรณีศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส. งานวิจัย, มหาลัยราชภัฏอุบลราชธานี.
- พัชรี ขุนหลัด, ยงยุทธ ตันฑุลเวสส, ธารารัตน์ ศุภศิริ และ วราดูล ฉัตรทอง. 2551. การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารประกอบเคอร์คิวมินอยด์จากผงขมิ้นชัน. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว 24(1): 125-139.
- พูนศิริ ทิพย์เนตร. 2553. มะนาวผงสำเร็จรูปสูตรเข้มข้น. วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี 7(1): 3-17.
- ภาเกล้า ภูมิใหญ่ และ ชญาณิศา สุพา. 2558. ตัวทำละลายที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากพืชสมุนไพร. น. 627-635. ใน รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร, กำแพงเพชร.
- วันแข็ง สิทธิกิจโยธิน และ ดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข. 2554. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 16(1): 47-55.

- ศิวาพร ศิวเวช และ ญัฐินี ใจสอาด. 2546. การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกมันฝรั่ง. น. 12-19. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อมรรัตน์ วงษ์กลม. 2554.ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดมะขามป้อม. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 25(25): 10-16.
- Chaudhuri, R.K., Z. Lascu and G. Puccetti. 2007. Inhibitory Effects of *Phyyanthus emblica* Tannins on Melanin Synthesis. **Cosmetics & Toiletries** 122(2): 73-80.
- Ebanks, J.P., R.R. Wickett and R.E. Boissy. 2009. Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. **International Journal of Molecular Sciences** 10(9): 4066-4087.
- Kim, J., et al. 2016. Effects of Korean ginseng berry on skin antipigmentation and antiaging via FoxO3a activation. **Journal of Ginseng Research** 41(2017): 277-283.
- Luo, W., et al. 2011. Antioxidant and antiproliferative of phenolics purified from *Phyyanthus emblica* L. fruit. **Food Chemistry** 126(2011): 277-22.
- Neagu, E., G.L. Radu, C. Albu and G. Paun. 2016. Antioxidant activity, acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of *Pulmonaria officinalis* and *Centarium umbellatum* extracts. **Saudi Journal of Biological Sciences** 25(3): 578-585.
- Okun, M.R., L.M. Edelstein, N. Or, G. Hamada and B. Donnellan. 1970. The role of peroxidase vs. the role of tyrosinase in enzymatic conversion of tyrosinase to melanin in melanocytes, masr cells and eosinophils. **The Journal of Investigative Dermatology** 55(1): 1-12.
- Wang, Y.C., et al. 2019. Inhibition of melanogenesis via *Phyyanthus emblica* fruit extract powder in B16F10 cells. **Food Bioscience** 28(2019): 177-182.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สารเคมีและวิธีการเตรียมสาร

สารเคมี

1. Methanol
2. Ethanol 95%
3. Gallic acid
4. Sodium carbonate
5. Folin-Ciocalteu Reagent
6. Kojic acid
7. Mushroom tyrosinase
8. Sodium phosphate buffer pH 6.8
9. L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)
10. Ascorbic acid
11. Metaphosphoric acid 5%
12. Metaphosphoric acid 4%
13. 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP)

การเจือจางสารสกัดมะขามป้อม

1. การเจือจางสารสกัดในการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก

1.1 ดูดสารสกัดแต่ละตัวทำละลาย (95% Ethanol และ Methanol) มาอย่างละปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมแต่ละตัวทำละลายปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดทดลอง (เจือจาง 10 เท่า)

1.2 จากนั้นดูดสารสกัดที่เจือจางแล้ว 10 เท่า มาอย่างละปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมแต่ละตัวทำละลายปริมาตร 9.9 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดทดลอง (เจือจาง 1000 เท่า)

1.3 จากนั้นดูดสารสกัดที่เจือจางแล้ว 1000 เท่า มาอย่างละปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมแต่ละตัวทำละลายปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดทดลอง (เจือจาง 2000 เท่า)

2. การเจือจางสารสกัดในการวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

2.1 ดูดสารสกัดแต่ละตัวทำละลาย (95% Ethanol และ Methanol) มาอย่างละปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมแต่ละตัวทำละลายปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดทดลอง (เจือจาง 1:10)

2.2 จากนั้นดูดสารสกัดที่เจือจาง 1:10 เท่า มาอย่างละปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมแต่ละตัวทำละลายปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดทดลอง (เจือจาง 1:100)

2.3 จากนั้นดูดสารสกัดที่เจือจาง 1:100 เท่า มาอย่างละปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมแต่ละตัวทำละลายปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในแต่ละหลอดทดลอง (เจือจาง 1:1000)

ตารางผนวกที่ ก1 การเตรียมสารละลายแกลลิก (gallic acid) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้น (µg/mL)	Gallic acid (1 mg/mL)	น้ำกลั่น (ml)
0	5	0
5	0.25	4.75
10	0.5	4.5
20	1	4
50	2.5	2.5

ภาคผนวก ข
วิธีการทดลองและผลการทดลอง

วิธีการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

1. นำสารสกัดมะขามป้อมที่เจือจางจากตัวทำละลาย 95% Ethanol และ Methanol มา หลอดละ 1 มิลลิลิตร
2. เติม Sodium carbonate 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
3. เติม Folin-Ciocalteu Reagent ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
4. นำสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Visible spectrophotometer ทำการทดสอบสารสกัดแต่ละตัวทำละลายละสามซ้ำ

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

1. เตรียมสารละลายวิตามินซีมาตรฐาน Ascorbic acid 100 มิลลิกรัม ละลายในสารละลาย Metaphosphoric acid 5% W/V จนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายมาตรฐานวิตามินซีปริมาตร 10 มิลลิลิตร โทเทรตด้วยสารละลาย 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% จนกระทั่งเกิดเป็นสีชมพู แล้วบันทึกปริมาตรของ 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% ที่ใช้
3. ปิเปตสารละลาย Metaphosphoric acid 4% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โทเทรตด้วย สารละลาย 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% จนกระทั่งเกิดเป็นสีชมพู แล้วบันทึกปริมาตร ของ 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% ที่ใช้
4. ปิเปตสารสกัดมะขามป้อมจากทั้งสามตัวทำละลาย (น้ำกลั่น, Methanol และ 95%Ethanol) ปริมาตรอย่างละ 10 มิลลิลิตร เติม Metaphosphoric acid 4% จำนวน 5 หยด โทเทรตด้วยสารละลาย 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% จนกระทั่งเกิดเป็นสีชมพู แล้ว บันทึกปริมาตรของ 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% ที่ใช้
5. นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณวิตามินซี

สูตรคำนวณ

$$\text{ปริมาณวิตามินซี (mg/100 mL)} = \frac{(T-B)}{(S-B)} \times 100$$

T คือ ปริมาณ 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% ที่ใช้ในการไทเทรตกับสารสกัดมะขามป้อม ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

B คือ ปริมาณ 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% ที่ใช้ในการไทเทรตกับ Metaphosphoric acid 4% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

S คือ ปริมาณ 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% ที่ใช้ในการไทเทรตกับ สารละลายวิตามินซีมาตรฐาน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

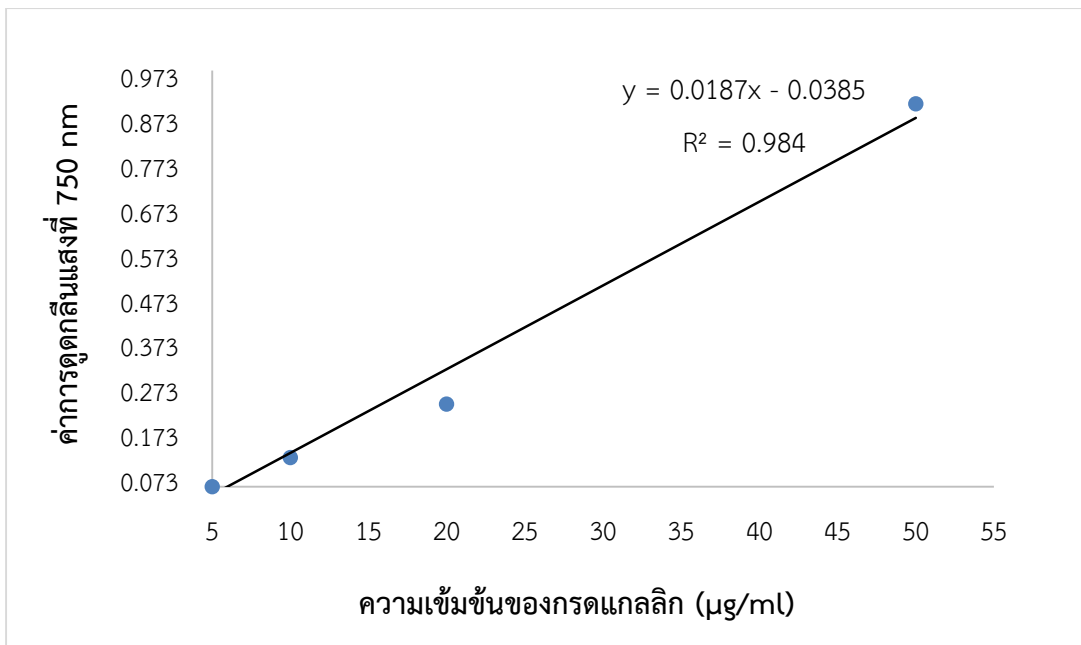
1. นำสารสกัดมะขามป้อมที่เจือจางจากตัวทำละลาย 95% Ethanol และ Methanol ที่ความเข้มข้นต่างๆ (1:10, 1:100 และ 1:1000) มาหลอดละ 100 ไมโครลิตร
2. เติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 12 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
3. จากนั้นเติมสารละลาย Sodium phosphate Buffer pH 6.8 ความเข้มข้น 0.1 โมล ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 15 นาที
4. จากนั้นเติมสารละลาย L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
5. นำสารละลายมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร ทุกๆ 10 นาที (10, 20 และ 30 นาที) โดยใช้ Kojic acid เป็นสารมาตรฐาน

สูตรคำนวณ Tyrosinase inhibition activity

$$\text{การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (\%)} = \left[\left(\frac{\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{control}}} \right) \right] \times 100$$

$\Delta A_{\text{control}}$ คือ ค่าการเปลี่ยนแปลงค่าดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่เวลา 10 และ 30 นาที

ΔA_{sample} คือ ค่าการเปลี่ยนแปลงค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดมะขามป้อมที่เวลา 10 และ 30 นาที

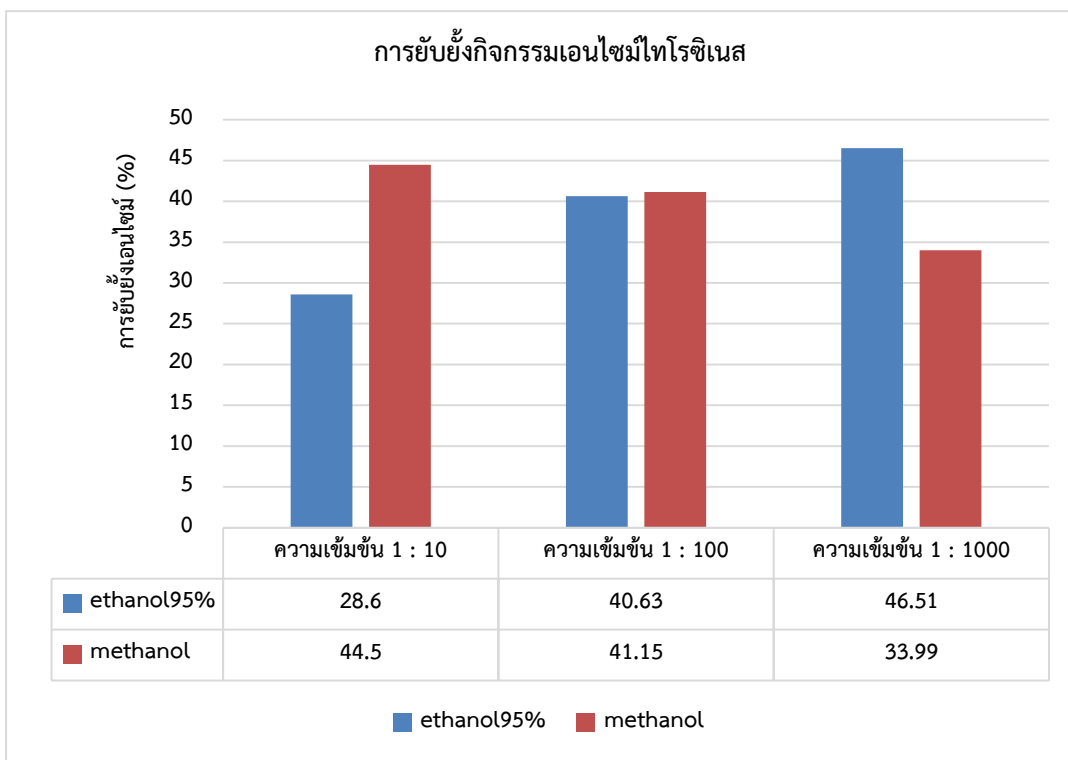


ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก (Gallic acid)

ตารางผนวกที่ ข2 ปริมาณ 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% ที่ใช้

ไทเทรตสารละลาย ปริมาณ 10 ml	ปริมาณ 2,6-dichlorophenolindophenol 0.1% ที่ ใช้ (ml.)			ปริมาณวิตามินซี (mg/100 mL)
	1	2	3	
สารละลายวิตามินซี				
มาตรฐาน	22.60	20.00	19.90	-
สารละลาย				
Metaphosphoric acid 4%	1.20	1.90	1.40	-
สารสกัดมะขามป้อม (น้ำกลั่น)	14.00	13.60	15.10	66.17
สารสกัดมะขามป้อม (Methanol)	9.80	8.70	8.40	38.53
สารสกัดมะขามป้อม (95% Ethanol)	16	15.5	16.2	74.77

หมายเหตุ : ปริมาณวิตามินซีคำนวณเป็น mg/100 mL

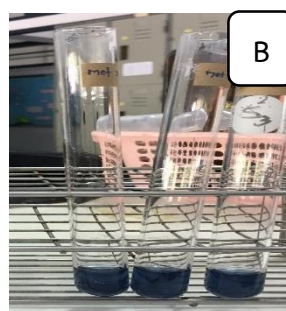
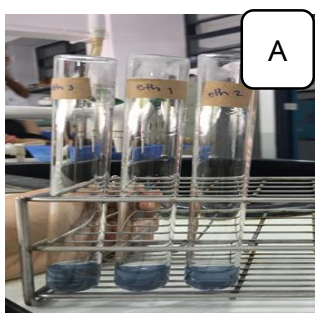


ภาพผนวกที่ ข3 แผนภูมิการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส

ภาคผนวก ค
ภาพการทดลอง

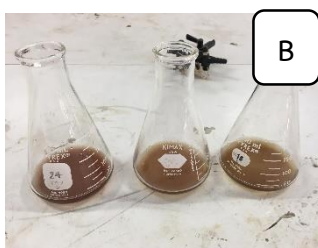


ภาพผนวกที่ ค1 มะขามป้อมผลสด



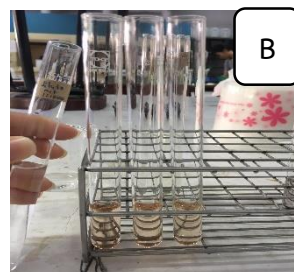
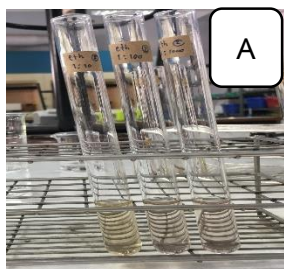
ภาพผนวกที่ ค2 การทดสอบหาสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดมะขามป้อม

(A) ตัวทำละลายเอทานอล 95% , (B) ตัวทำละลายเมทานอล



ภาพผนวกที่ ค3 การทดสอบหาปริมาณวิตามินซีของสารสกัดมะขามป้อม (A) น้ำกลั่น,

(B) เอทานอล 95%, (C) เมทานอล



ภาพผนวกที่ ค4 การทดสอบกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดมะขามป้อม

(A) เอทานอล 95%, (B) เมทานอล