

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบลองกอง**

Free Radical Scavenging and Tyrosinase Inhibitory Activity of
Longkong Leaves Extract**

ขวัญจิต อิศระสุข*

หลักสูตรวิทยาศาสตรเครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

Khwunjit Itsarasook*

Cosmetic Science Program, Faculty of Science and Technology

Suan Dusit University

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบจากใบลองกองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และโพรพิลีนไกลคอล โดยวิธีการหมัก ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดใบลองกองด้วยโพรพิลีนไกลคอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.76 ± 0.03 mg/mL โดยศึกษาเปรียบเทียบกับวิตามินซี และสารบิวทิลไฮดรอกซิลโทลูอีน (บีเอชที) ซึ่งใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวก และวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดใบลองกอง พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าในตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งมีค่าเท่ากับ 853.13 ± 0.60 mgGAE/g สารสกัด และ 204.54 ± 26.11 mgQE/g สารสกัด ตามลำดับ ทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocaltue assay และ Aluminium chloride method ตามลำดับ การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบลองกอง ด้วยวิธี Dopachrome โดยใช้สารไทโรซีนเป็นสารตั้งต้น ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดใบลองกองที่สกัดด้วยโพรพิลีนไกลคอลมีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.014 ± 0.00017 mg/mL เปรียบเทียบกับกรดโคจิกซึ่งใช้เป็นสารควบคุมเชิงบวก ข้อมูลจากผลการวิจัยทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า ใบลองกองที่สกัดด้วยตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอล สามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวกระจ่างใสได้

คำสำคัญ : ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, สารสกัดใบลองกอง

* ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)

e-mail: K-itsarasook@hotmail.com

Abstract

The aim of this study was to determine the free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activity of Longkong leaves extracts. Extracts of dried Longkong were produced by a maceration technique using two different solvents: methanol and propylene glycol. The crude extracts were tested for antioxidant activity, according to the DPPH scavenging assay. The propylene glycol (PG) extract exhibited dose-dependent antioxidant activity with an IC_{50} value of 6.76 ± 0.03 mg/mL; this extract was compared to a positive control, L-ascorbic acid and butyl hydroxytoluene (BHT). The propylene glycol extract showed higher phenolic and flavonoid contents than the methanolic extract. The phenolic and flavonoid contents were 853.13 ± 0.60 mgGAE/g extract and 204.54 ± 26.11 mgQE/g extract, respectively, determined by the Folin-Ciocalteu assay and the aluminium chloride method, respectively. The tyrosinase inhibitory activity of the extracts was assayed by the dopachrome method using tyrosine as a substrate. The results indicated that the propylene glycol extract possessed higher tyrosinase inhibition activity than the methanolic extract. Specifically, the propylene glycol extract had an IC_{50} value of 0.014 ± 0.00017 mg/mL compared to kojic acid, the positive control. The sum of the findings suggest possible applications for the propylene glycol extract from Longkong leaves in skin lightening cosmetic products.

Keywords: Tyrosinase inhibitory activity, Longkong leaves extract

บทนำ

ในเชิงของการพัฒนาผลิตภัณฑ์สารจากธรรมชาติหลายชนิด โดยเฉพาะจากพืชท้องถิ่นของไทย สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงถูกนำมาศึกษาเป็นลำดับแรกๆ ที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ผลิตภัณฑ์ทำให้ผิวขาว การสร้างความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) และการเกิดเม็ดสีเมลานิน (Melanins) มีส่วนสำคัญในการพัฒนาศาสตร์ด้านเครื่องสำอาง และเวชสำอางเกี่ยวกับเครื่องสำอางสำหรับผิวหน้าในอนาคต

เมลานิน (Melanins) เป็นเม็ดสีที่สร้างจากเซลล์ผิวหนังที่เรียกว่าเซลล์เมลานোসัยต์ (Melanocytes cells) ซึ่งเป็นเซลล์อยู่ที่ผิวหนัง ในผิวหนังชั้นนอก (Epidermis layer) ในรูขุมขน (Hair follicle) และในผิวหนังชั้นใน (Dermis layer) โดยแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ชั้นบาเซล (Basal cells) กระบวนการสร้าง

เมลานินเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดและมีบทบาทมากสุดในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน เปลี่ยนสารตั้งต้นไทโรซีน (Tyrosine) ไปเป็นสาร 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) และเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น Dopaquinone ตามลำดับ ซึ่งสาร DOPA aquinone นี้จะทำปฏิกิริยากับสารเอนไซม์กลูตาไทโอน (Glutathione) หรือซิสเทอีน (Cysteine) แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสาร Cysteinyl DOPA เกิดเป็นเม็ดสีเหลือง/แดงฟีโอเมลานิน (Pheo-melanins) ในสภาวะที่ขาดซิสเทอีน (Cysteine) สาร DOPA aquinone จะเปลี่ยนไปเป็น DOPA achrome ได้ ซึ่งจะถูกละลายต่อไปเป็น 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) เกิดเป็นเม็ดสีดำของยูเมลานิน (Eumelanins) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ Chrome tautomerase (DCT) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนสาร DOPA chrome เป็นสาร 5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid (DHICA) และ ต่อจากนั้นเอนไซม์ Tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) จะเร่งปฏิกิริยาของสาร DHICA ไปเป็นสาร Indole-5,6-quinone carboxylic acid (IDQCA) เกิดเป็นเม็ดสีดำของยูเมลานิน (Eumelanins) (Ando et al., 2007) ปัจจุบันมีการใช้กลุ่มสารทำให้ผิวขาว (Skin whitening agent) อย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิวพรรณหลากหลายชนิดทั้งสำหรับผิวหน้าและผิวกาย การใช้ผลิตภัณฑ์ซึ่งผสมสารที่ทำให้ผิวขาว โดยการยับยั้งกระบวนการสร้างเมลานิน โดยไม่ทำให้เซลล์สร้างสีผิวตาย เป็นหลักการที่ถูกต้อง และมีรายงานวิจัยพบว่า สารยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitors) ที่มาจากสารธรรมชาติจะเป็นที่นิยม เช่น สารสกัดจากหม่อน (Mulberry (*Morus alba* L.) เป็นต้น (Chang et al., 2011)

ลองกอง (Longkong) เป็นไม้ผลเศรษฐกิจเขตร้อนชื้น ในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Lansium domesticum* Corr. จัดอยู่ในวงศ์ Maliaceae (Tilaar et al., 2008) สารสำคัญที่พบในสารสกัดลองกอง พบว่าเป็นสารในกลุ่ม Triterpenoids ซึ่งได้จากสารสกัดในส่วนของเปลือกผล (Fruit peels) เมล็ด (Seeds) ผลอ่อน (Young fruit) ใบ (Leaves) และเปลือกต้น (Bark) (Kiang et al., 1967; Nishizawa et al., 1988; Tanaka et al., 2002; Mayanti et al., 2009) มีรายงานวิจัยศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าสารสกัดจากเมล็ดลองกองมีฤทธิ์ต้านมาลาเรีย (Antimalarial) (Saewan et al., 2006) สารสกัดจากผลอ่อนลองกองมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Anticancer) (Manosroi et al., 2012) และสารสกัดจากเปลือกลองกองมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial) (Mayanti et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดลองกองที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง พบว่า สารสกัดจากผลลองกอง (Lim et al., 2007; Klungsupya et al., 2012) และใบลองกอง (Kumgoun et al., 2011) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging activity) สารสกัดจากใบลองกองมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (Dollagenase) และไม่มีความเป็นพิษ (Dytotoxicity) ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblasts) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitory activity) (Manosroi et al., 2012) สารสกัดจากผลลองกองช่วยลดความหมองคล้ำของผิวหน้า (Skin depigmentation) และเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิว (Moisturizer) และมีการประเมินความปลอดภัยทางผิวหนังในอาสาสมัครผู้หญิง ด้วยวิธี Repeated opened patch test (ROPT) และ Single closed patch test (SCPT) พบว่าสารสกัด

จากผลลองกองที่ความเข้มข้น 1-3% ในตำรับโลชันไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองและการแพ้ (Tialar et al., 2007, 2008)

ด้วยเหตุนี้ทางผู้วิจัยจึงทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging activity) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibitory activity) รวมทั้งยังมีการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content) ในสารสกัดใบลองกอง เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิวกระจ่างใสต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และปริมาณสารประกอบ ฟลาโวนอยด์รวม และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในสารสกัดใบลองกอง เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับกระจ่างใส

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

ใบสดลองกอง (Longkong) เก็บจากตำบลคลองเฉลิม อำเภอกงหรา จังหวัดพัทลุง เก็บในเดือนธันวาคม พ.ศ. 2556 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง; 2, 2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, AR grade), Folin- Calteu reagent, Gallic acid (98%, HPLC grade) และTyrosinase from mushroom ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา, L-ascorbic acid (AR grade) และ Sodium carbonate (Na_2CO_3 , AR grade) ยี่ห้อ AJAX ประเทศออสเตรเลีย, Dimethyl sulfoxide (DMSO, AR grade) และ Methanol (AR grade) ยี่ห้อ LabScan ประเทศไทย, Ethanol absolute (AR Grade) และ Formic acid (AR grade) ยี่ห้อ QRëC ประเทศนิวซีแลนด์, Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) และ Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4) ยี่ห้อ Fisher ประเทศอังกฤษ, L-tyrosine (AR grade) ยี่ห้อ Hi media ประเทศอินเดีย, Kojic acid (99%, HPLC grade) ยี่ห้อ ACROS Organics ประเทศสหรัฐอเมริกา, Propylene glycol (PG, cosmetic grade) ยี่ห้อ P.C ประเทศไทย เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง; เครื่องอัลตราไวโอเลต-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer) ยี่ห้อ Josco รุ่น V-530 ประเทศญี่ปุ่น, เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance) ยี่ห้อ Ohaus รุ่น Adventure ประเทศจีน และเครื่องไมโครเพลท สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Microplate spectrophotometer) รุ่น Spectra Count, ยี่ห้อ Perkin Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมพืช และกระบวนการสกัด

นำใบสดลอกกามาสับเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องตู้อบความร้อน (Hot air oven) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (Blender) (Manosroi et al., 2012) ทำการสกัดใบลอกกอดด้วยวิธีการหมัก (Maceration technique) โดยซังใบลอกกอกที่ผ่านการบดแล้ว นำไปห่อด้วยผ้าขาวบางมัดให้แน่น จากนั้นนำไปใส่ภาชนะที่มีฝาปิดสนิท แล้วทำการสกัดตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ เมทานอล (Methanol) และโพรพิลีนไกลคอล (Propylene glycol, PG) อัตราส่วนของใบลอกกอกแห้งต่อตัวทำละลายเท่ากับ 100 กรัมต่อตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร แช่สกัดไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดออกมารอง แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotary vacuum evaporator) เก็บสารสกัดไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบลอกกอก ด้วยวิธี DPPH assay

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบลอกกอก ทดสอบด้วยวิธี DPPH assay ดัดแปลงตามวิธีของ Viyoch et al. (2010) โดยเตรียมสารสกัดจากใบลอกกอกในตัวทำละลายเมทานอล และสารสกัดในตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลให้ความเข้มข้น 0.4–50.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมสารละลายสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร กับสารละลาย 0.2 มิลลิโมลาร์ของ DPPH ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาการยับยั้งการต้านอนุมูลอิสระ (% free radical scavenging activity) โดยใช้วิตามินซี (L-ascorbic acid) และ บิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (Butyl hydroxytoluene, BHT) เป็นสารมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ครั้ง (Triplicate)

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH กับสารตัวอย่าง และ A_{control} คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH โดยไม่มีการเติมสารตัวอย่าง

จากนั้นคำนวณหาการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (half maximal inhibition concentration, IC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05 (Graph Pad Software ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัดหยาบใบลอกกอก ทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay ดัดแปลงตามวิธีของ Rangsiwong et al. (2009) โดยเตรียมสารสกัดจากใบลอกกอกในตัวทำละลาย

เมทานอล และสารสกัดในตัวทำละลายโพธิ์ลิ้นไกลคอลให้มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตต์ สารละลายสารสกัด มา 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน (DI water) ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร และเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) เข้มข้น 2.0% (w/v) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นเติม สารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เข้มข้น 50% (v/v) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในส่วนผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบ ฟีนอลิกรวม ในสารสกัด โดยเทียบจากกราฟสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) คำนวณในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม (Gallic acid equivalents, GAE/ g extract)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดหยาบใบลองกอง ทดสอบด้วยวิธี Aluminium chloride method ดัดแปลงตามวิธีของ Meda et al. (2005) โดยเติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) เข้มข้น 2% (w/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดจากใบลองกองในตัวทำละลายเมทานอล หรือสารสกัดในตัวทำละลายโพธิ์ลิ้นไกลคอล (ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ครั้ง (Triplicate) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดโดยเทียบจากกราฟสารมาตรฐานของ เควอซิทิน (Quercetin) คำนวณในรูปมิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อสารสกัด 1 กรัม (Quercetin equivalents, QE/ g extract)

5. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase inhibition assay)

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสทดสอบด้วยวิธี Dopachrome method โดยใช้สารไทโรซีน (Tyrosine) เป็นสารตั้งต้น (Substrate) ดัดแปลงตามวิธีของ Manosoi et al. (2012) โดยเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดใบลองกองทั้ง 2 ตัวทำละลาย ให้มีความเข้มข้น 0.001-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) เป็นตัวทำละลาย จากนั้นปิเปตต์สารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Tyrosinase mushroom ความเข้มข้น 100 ยูนิต ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (Phosphate buffer) pH 6.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมไทโรซีน (Tyrosine) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (Phosphate buffer) pH 6.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและเติม 0.1 โมลาร์ บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (Phosphate buffer) pH 6.8 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดลงใน 96-well plate และผสมสารละลายดังกล่าวตามลำดับ จากนั้นนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%tyrosinase inhibition activity) โดยใช้กรดโคจิก (Kojic acid) (ความเข้มข้น 0.001-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นสารควบคุมที่ให้ผลเชิงบวก (Positive control) ทำการทดลอง 3 ครั้ง (triplicate)

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

เมื่อ A คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่เติมสารสกัด และ B คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารสกัด

คำนวณหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (Half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05 (Graph Pad Software ประเทศสหรัฐอเมริกา) พล็อตกราฟระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%tyrosinase inhibition activity) และความเข้มข้นของสารสกัด หรือสารควบคุมที่ให้ผลเชิงบวก (Positive control)

6. การวิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ (Statistic analysis)

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบลองกองในแต่ละตัวทำละลาย จะทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n=3) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปวิเคราะห์ผลทางสถิติ Microsoft Excel 2010 เพื่อแสดงร้อยละ (percentage) ของข้อมูล ค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. การสกัดใบลองกอง (Extraction)

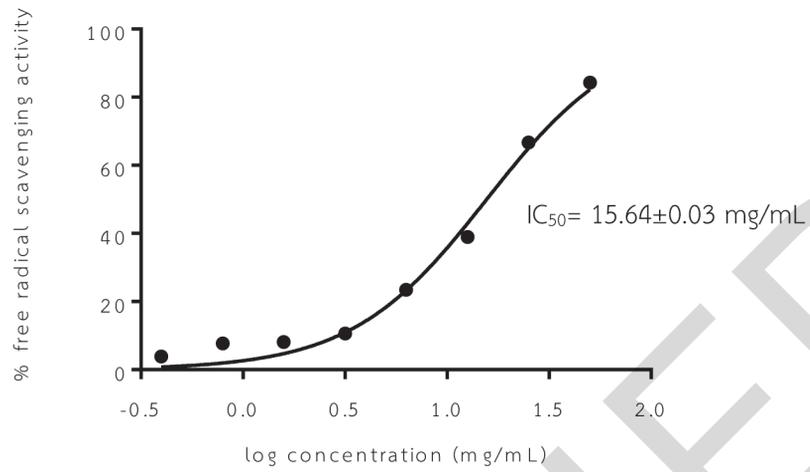
เมื่อนำใบลองกอง มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสแล้ว นำมาสกัดโดยวิธีการหมัก (Maceration technique) ด้วยตัวทำละลายเมทานอลและโพรพิลีนไกลคอล ซึ่งทำการสกัดเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอลมีลักษณะเป็นของเหลวเหนียว สีเขียวเข้มปนดำ ร้อยละของน้ำหนักสารสกัดหยาบ (%yield) ได้เท่ากับ 61.51% ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วยโพรพิลีนไกลคอลมีลักษณะเป็นของเหลวข้น สีเขียวเข้มหนืด มีร้อยละของน้ำหนักสารสกัดหยาบ (%yield) ได้เท่ากับ 95.54%

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบลองกอง ด้วยวิธี DPPH assay

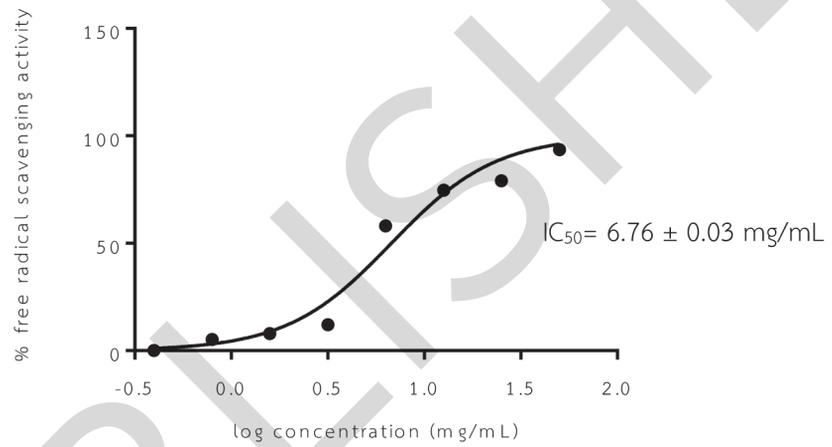
ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging activity) ของสารสกัดใบลองกอง และสารมาตรฐานเชิงบวก ด้วยวิธี DPPH assay แสดงในรูปของค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (Half maximal inhibition concentration, IC_{50}) จากการทดสอบพบว่า ทั้งสารสกัด (Crude extracts) และสารมาตรฐานเชิงบวก ได้แก่ วิตามินซี (L-ascorbic acid) และบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน (Butyl hydroxytoluene, BHT) มีแนวโน้มให้ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical

scavenging activity) เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่างสูงขึ้น (Dose-dependent curve) เมื่อนำข้อมูลมาพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (Log concentration) และร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (%free radical scavenging activity) เพื่อหาค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (Half maximal inhibition concentration, IC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Graph Pad Prism 6.05 ภาพที่ 1A แสดงกราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ คือ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 84.29% มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% เท่ากับ 15.64 ± 0.03 mg/mL และภาพ 1B แสดงกราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดที่สกัดด้วยโพรพิลีนไกลคอล พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ คือ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 93.56% มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% เท่ากับ 6.76 ± 0.03 mg/mL จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่สกัดด้วยโพรพิลีนไกลคอลมีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่สูงกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล และเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเชิงบวกทั้ง 2 ชนิดพบว่าสารสกัดทั้ง 2 ชนิดมีการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่า อาจเนื่องมาจากการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH scavenging assay เป็นวิธีที่นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารที่มาจากธรรมชาติ และสารสกัดมีองค์ประกอบทางเคมีหลากหลาย จึงทำให้เมื่อทดสอบด้วยวิธีนี้ สารสกัดจึงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่น้อยกว่าวิตามินซี และบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอีน ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง

A



B



ภาพที่ 1 การยับยั้งอนุมูลอิสระของ (A) สารสกัดใบลองกองตัวทำละลายเมทานอล และ (B) สารสกัดใบลองกองตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอล

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบลองกอง และสารมาตรฐานเชิงบวก ด้วยวิธี DPPH assay

สารตัวอย่าง	IC ₅₀ ± SD (mg/mL)
สารสกัดใบลองกองตัวทำละลายเมทานอล	15.64±0.03
สารสกัดใบลองกองตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอล	6.76 ± 0.03
วิตามินซี	0.023 ± 0.00015
บิวทิลไฮดรอกซิลโทลูอีน	0.055±3.53

หมายเหตุ ค่า IC₅₀ แสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย (Mean) d ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviations, SD) ทำการทดลอง 3 ชั้น (n=3)

3. การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดใบลองกอง พบว่าสารสกัดใบลองกองในตัวทำละลายเมทานอลและโพรพิลีนไกลคอลมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 646.33 ± 5.36 และ 853.13 ± 0.60 mgGAE/g สารสกัด ตามลำดับ ทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบลองกอง พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และโพรพิลีนไกลคอล มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 176.39 ± 11.33 และ 204.54 ± 26.11 mgQE/g สารสกัด ตามลำดับ โดยทดสอบด้วยวิธี Aluminium chloride method

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดใบลองกองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดที่สกัดด้วยโพรพิลีนไกลคอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเมทานอล เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดทั้ง 2 ชนิดพบว่าสารสกัดมีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% (IC₅₀) แปรผันตรงกับปริมาณสารฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมกล่าวคือ สารสกัดในชั้นตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมในปริมาณสูงด้วยเช่นกัน นั่นคือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดชั้นโพรพิลีนไกลคอล อาจมาจากกลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เช่น สาร Lansic acid Kokosanolid Dukunolid D,E และ F และ 3-oxo-24-cycloarten-21-oic acid เป็นต้น (Amic et al., 2003; Kiang et al., 1967; Nishizawa et al., 1988, 1989; Mayanti et al., 2009)

ตารางที่ 2 แสดงผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในสารสกัดใบลองกอง

สารตัวอย่าง	ปริมาณฟีนอลิกรวม (mgGAE/g สารสกัด)	ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (mgQE/g สารสกัด)
สารสกัดใบลองกองตัวทำละลายเมทานอล	646.33 ± 5.36	176.39±11.33
สารสกัดใบลองกองตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอล	853.13 ± 0.60	204.54±26.11

หมายเหตุ ข้อมูล แสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย (Mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviations, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n=3)

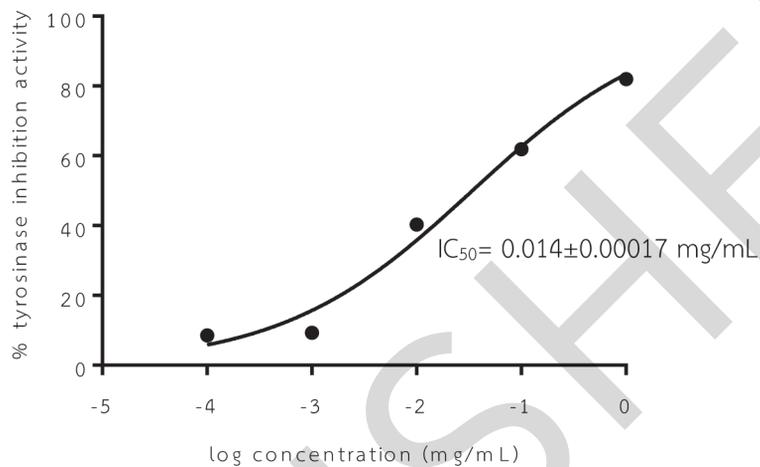
4. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibition assay)

ตารางที่ 3 แสดงค่าการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (Half maximal inhibition concentration, IC_{50}) ทดสอบด้วยวิธี Dopachrome method โดยใช้สารไทโรซินเป็นสารตั้งต้น เปรียบกับกรดโคจิก ซึ่งให้เป็นสารมาตรฐานเชิงบวก ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดใบลองกองที่สกัดด้วยตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลมีการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สูงกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.014 ± 0.00017 และ 0.034 ± 0.00004 mg/mL ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรดโคจิก ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.020 ± 0.003 mg/mL พบว่าสารสกัดชั้นโพรพิลีนไกลคอล มีการยับยั้งที่ดีกว่ากรดโคจิก แต่สารสกัดชั้นเมทานอลมีการยับยั้งที่น้อยกว่ากรดโคจิก เมื่อนำข้อมูลมาพล็อตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น (Log concentration, mg/mL) และร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%tyrosinase inhibition activity) พบว่าทั้งสารสกัด และกรดโคจิกมีแนวโน้มให้ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารตัวอย่างสูงขึ้น (Dose-dependent curve) (ภาพที่ 2)

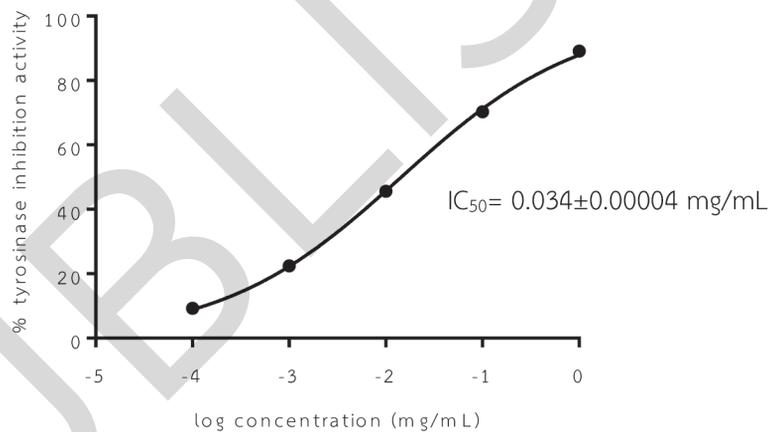
การยับยั้งการเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดใบลองกองอาจจะมาจากสารกลุ่มไฮดรอกซิล (-OH group) ของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดเกิดพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) กับบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง หรือกลุ่มไฮดรอกซิล (-OH group) ของสารประกอบฟีนอลิกจับกับบริเวณเร่ง (Active site) ของเอนไซม์ส่งผลให้เกิดความเกะกะ (Steric hindrance) ของโครงสร้าง ทำให้ความสามารถของเอนไซม์ลดลง ทั้งนี้การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอาจจะมาจากผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน (Alam et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยของ Tilaar และคณะ (2007) พบว่าผลของสารสกัดจากผลลองกองในตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลสามารถลดเม็ดสีเมลานิน (Melanin index) โดยมีการทดสอบในอาสาสมัคร (*in vivo*) ผู้หญิงจำนวน 30 คน อายุระหว่าง 32-52 ปี งานวิจัยของ Arung และคณะ (2009) พบว่าสารสกัดจากเปลือกลองกองที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ และยับยั้งการผลิตเม็ดสีเมลานินจากเซลล์ B16 melanoma

และงานวิจัยของ Manosroi และคณะ (2012) ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากใบลองกองพบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำร้อน (hot water) สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ซึ่งแตกต่างกับผลการทดลองนี้

A



B



ภาพที่ 2 การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของ (A) สารสกัดใบลองกองตัวทำละลายเมทานอล และ (B) สารสกัดใบลองกองตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอล

สรุปผลการวิจัย

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้งการเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดใบลองกองที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ เมทานอล และโพรพิลีนไกลคอล พบว่า สารสกัดใบลองกองที่สกัดด้วยตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลให้ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่ดีกว่าสารสกัดใบลองกองที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล และสารสกัดใบลองกองที่สกัดด้วยตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมมากกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล นั่นคือข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเป็นตำรับเครื่องสำอางสำหรับผิวกระจ่างใส (lightening product) ที่มีส่วนผสมของสารสกัดใบลองกองที่สกัดด้วยตัวทำละลายโพรพิลีนไกลคอลได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดใบลองกองที่สกัดด้วยโพรพิลีนไกลคอล ด้วยวิธีอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น ABTS radical scavenging assay และ lipid peroxidation assay เป็นต้น
2. ควรศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัดจากใบลองกองที่สกัดด้วยโพรพิลีนไกลคอล

References

- Alam, N., Yoon, K.N., Cha, Y.J., Kim, J.H., Lee, K. R. & Lee, T.S. (2011). Appraisal of the antioxidant, phenolic compounds concentration, xanthine oxidase and tyrosinase inhibitory activities of *Pleurotus salmoneostramineus*. *African Journal of Agricultural Research*, 6, 1555-1563.
- Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D. & Trinajstic, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76, 55-61.
- Ando, H., Kondoh, H., Ichihashi, M. & Hearing, V. J. (2007). Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 751-761.
- Arung, E.T., Kusuma, I.W., Christy, E.O., Shimazu, K. & Kondo, R. (2009). Evaluation of medicinal plants from Central Kalimantan for antimelanogenesis. *Journal of Natural Medicines*, 63, 473-480.

- Kiang, A.K., Tan, E.L., Lim, F.Y., Habaguchi, Nakanishi, K. K., Fachan, L. & Ourisson, G. (1967). Lansic acid, a bicyclic triterpene. *Tetrahedron Lett*, 37, 3571-3574.
- Klungsupya, P., Suthepakul, N., Laovithayangoon, S., Thongdon-A, J., Trangwacharakul, S. & Phornchirasilp, S. (2012). Investigation on antioxidant, antimutagenic and cytotoxic properties of active fractions of Thai Long-Kong (*Lansium domesticum* Corr.) fruits. *Journal of Ethnobiology and Ethnopharmacology*, 1, 1-9.
- Kumgoun, K., Manosroi, J., Jantrawut, P., Pankasemsuk, T., Manosroi, W. & Manosroi, A. Antioxidant activities of aqueous extract from leaves of Longkong (*Lansium domesticum* Corr.). *IFSCC conference: Effective, Economic and Ecological cosmetics*, December 12-14, 2011, Bangkok, Thailand.
- Lim, Y.Y., Lim, T.T. & Tee, J.J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chemistry*, 103, 1003-1008.
- Manosroi, A., Jantrawut, P., Sainakham, M., Manosroi, W. & Manosroi, J. (2012). Anticancer activities of the extract from Longkong (*Lansium domesticum*) young fruits. *Pharmaceutical Biology*, 50, 1397-1407.
- Manosroi, A., Kumguan, K., Chankhampan, C., Manosroi, W., Manosroi, J. (2012). Nanoscale Gelatinase A (MMP-2) Inhibition on human skin fibroblasts of Longkong (*Lansium domesticum* Correa) leaf extracts for anti-aging. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 12, 1-11.
- Mayanti, T., Soidah, S., Natawigena, W.D., Supratman, U. & Tjokronegoro, R. Antibacterial Terpenoid from the bark of *Lansium domesticum* Corr cv. Kokossan (Meliaceae). *International Conference on Medicine and Medicinal Plants*, Surabaya, September 8-9, 2007.
- Mayanti, T., Supratman, U., Mukhtar, M. R., Awang, K. & Ng, S. W. (2009). Kokosanolide from the seed of *Lansium domesticum* Corr. *Acta Crystallographica*, 65, 1-8.
- Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J. & Nacoulma O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chemistry*, 91, 571-577.

- Nishizawa, M., Nademoto, Y., Sastrapradja, S., Shiro, M. & Hayahi, Y. (1988). Dukunolide D, E and F: new tetranortriterpenoids from the seeds of *Lansium domesticum*. *Phytochemistry*, 27, 237-239.
- Nishizawa, M., Emura, M., Yamada, H., Shiro, M., Chairul, Hayashi, Y. & Tozuda, H. (1989). Isolation of a new cycloartanoid triterpenes from leaves *Lansium domesticum*: novel skin-tumor promotion inhibitors. *Tetrahedron Letter*. 30, 5615-5618.
- Rangriwong, P., Rangkadilok, N., Satayavivad, J., Goto, M. & Shotipruk, A. (2009). Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. Fruits. *Separation and Purification Technology*, 66, 51-56.
- Saewan, N., Sutherland, J.D. & Chantrapromma, K. (2006). Antimalarial tetranortriterpenoids from the seeds of *Lansium domesticum* *Corr. Phytochemistry*, 67, 2288-2293.
- Tanaka, T., M. Ishibashi, H., Fujimoto, E., Okuyama, T., Koyano, T., Kowithayakorn, M., Hayashi, dan K., Komiyama. (2002). New onoceranoid triterpene constituents from *Lansium domesticum*. *Journal Natural Product*, 65, 1709-1711.
- Tialar, M., Wong, L.W., Ranti, A.S., Wasitaatmadja, S.W., Suryaningsih., Junardy, F.D., Maily. (2007). In search of naturally derived whitening agent-pragmatic approach. *Asian societies of Cosmetic scientists 8th conference ASCS 2007*. Delivering science to the depths of Asian skin. Singapore, 116-117.
- Tialar, M., Wong, L.W., Ranti, A.S., Wasitaatmadja, S.W., Suryaningsih., Junardy, F.D., Maily., (2008). Review of *Lansium domesticum* Corrêa and its use in cosmetics. *Latin American and Caribbean bulletin of medicinal and aromatic plants*, 7, 183 – 189.
- Viyoch, J., Buranajaree, S., Grandmottet, F., Robin, S., Binda, D., Viennet, C., Waranuch, N., Humbert, P. (2010). Evaluation of the effect of Thai breadfruit's heartwood extract on the biological functions of fibroblast wrinkles. *Journal of Cosmetic Science*, 61, 311-324.

ผู้เขียน**อาจารย์ขวัญจิต อิศระสุข**

อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสวนดุสิต เลขที่ 228-228/1-3 ถนนสีรินธร
เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700
e-mail: K-itsarasook@hotmail.com

PUBLISHED