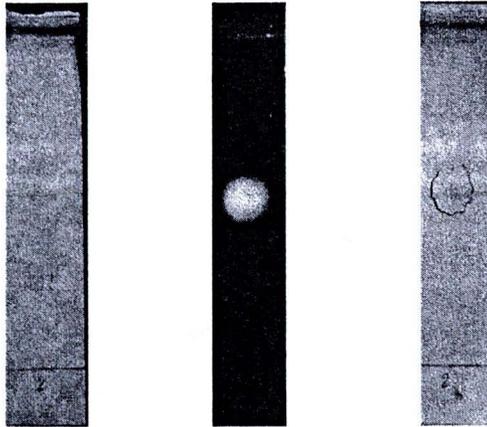


## บทที่ 4

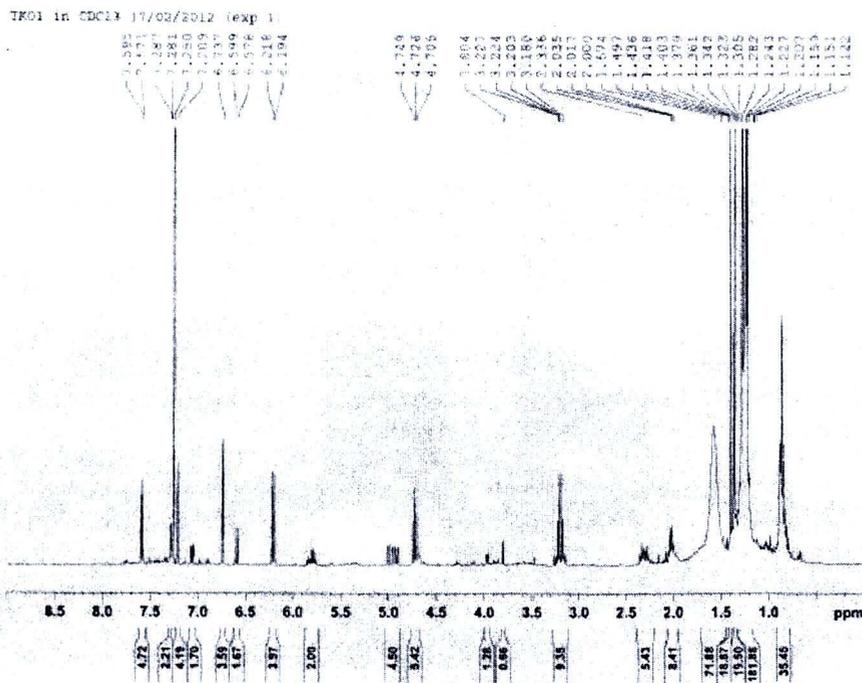
### รายงานผลการวิจัย

#### 4.1 การควบคุมคุณภาพของสารสกัด

##### 4.1.1 ผลของการแยกสารสำคัญในสารสกัด

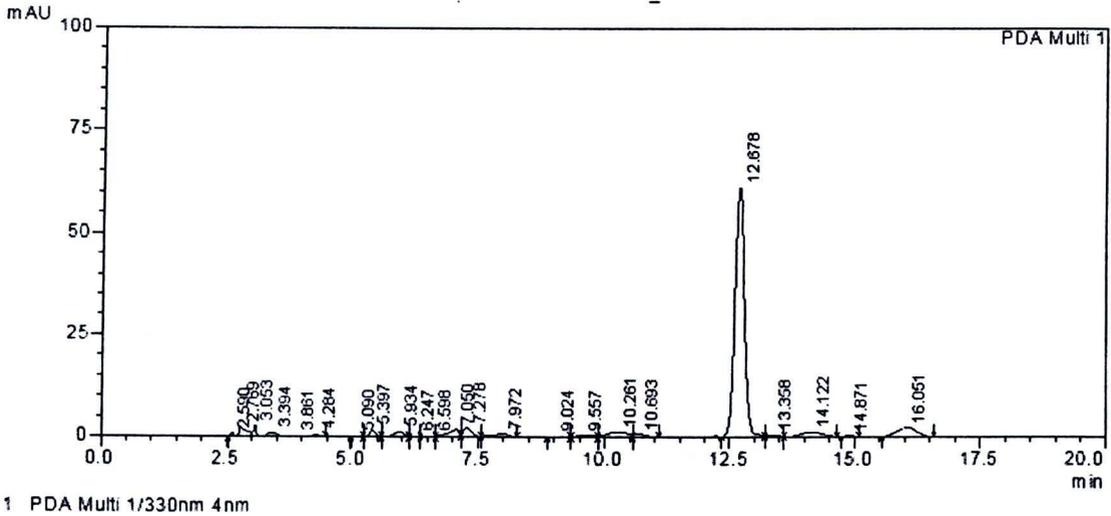


รูปที่ 1 แสดงโครมาโตแกรม TLC ของสารที่แยกได้จากสารสกัด โดยใช้ mobile phase คือ hexane และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 50:50 ก) ส่องภายใต้ UV ที่ 254 nm ข) ส่องภายใต้ UV ที่ 366 nm ค) สเปรย์ด้วย anisaldehyde reagent



รูปที่ 2 แสดงผลจาก NMR ของสารที่แยกได้จากสารสกัด

#### 4.1.2 การควบคุมคุณภาพของสารสกัดโดย HPLC



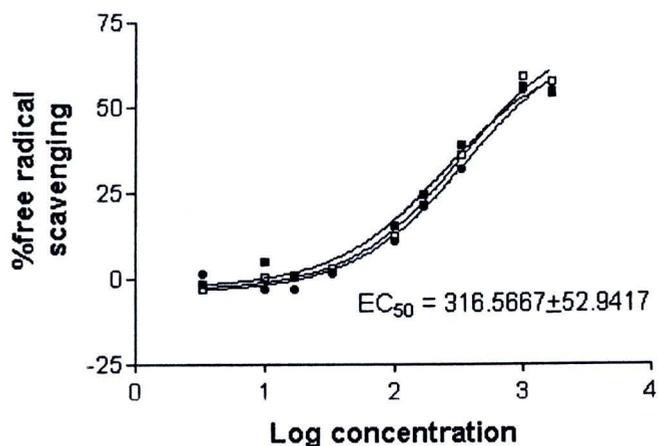
รูปที่ 3 แสดงโครมาโตแกรม HPLC ของสารสกัด โดยใช้ mobile phase คือ น้ำและ acetonitrile ในอัตราส่วน 50:50

#### 4.2 การวัดฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันโดย DPPH assay

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัด

| Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Final concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) | % free radical scavenging |         |         | Average  | SD      |
|------------------------------------|--|---------------------------|---------|---------|----------|---------|
|                                    |  | N1                        | N2      | N3      |          |         |
| 10                                 | 3.3333                                   | -1.5306                   | 1.4031  | -2.9217 | -1.0164  | 2.2078  |
| 30                                 | 10.0000                                  | 5.1020                    | -2.9337 | 0.4675  | 0.8786   | 4.0336  |
| 50                                 | 16.6667                                  | 0.4252                    | -2.6786 | 1.2855  | -0.3226  | 2.0852  |
| 100                                | 33.3333                                  | 1.8707                    | 1.6156  | 2.9996  | 2.1620   | 0.7365  |
| 300                                | 100.0000                                 | 15.4762                   | 10.8844 | 12.5049 | 12.9551  | 2.3288  |
| 500                                | 166.6667                                 | 24.4048                   | 21.2585 | 21.3479 | 22.3370  | 1.7913  |
| 1000                               | 333.3333                                 | 38.9456                   | 32.1429 | 35.9174 | 35.6686  | 3.4082  |
| 3000                               | 1000.0000                                | 55.8673                   | 54.8469 | 59.0183 | 56.5775  | 2.1745  |
| 5000                               | 1666.6667                                | 54.1667                   | 55.1446 | 57.5380 | 55.6164  | 1.7345  |
| EC <sub>50</sub>                   |  | 256.2                     | 355.1   | 338.4   | 316.5667 | 52.9417 |

### Tanaka

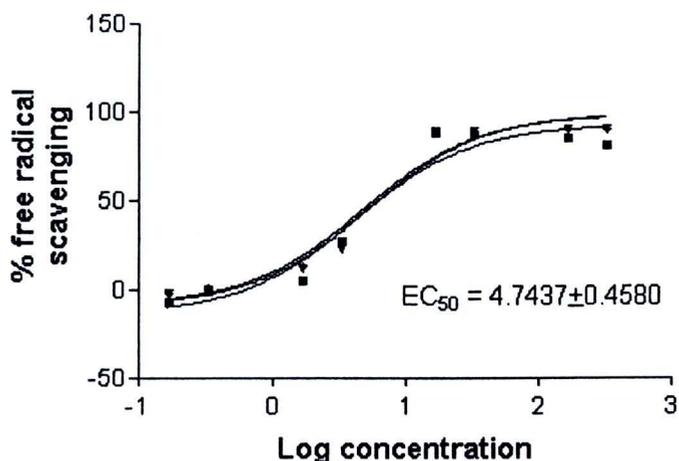


รูปที่ 4 แสดงค่า EC<sub>50</sub> ของสารสกัด

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระของวิตามินซี

| Concentration (µg/ml) | Final concentration (µg/ml) | % free radical scavenging |         |         | Average | SD     |
|-----------------------|-----------------------------|---------------------------|---------|---------|---------|--------|
|                       |                             | N1                        | N2      | N3      |         |        |
| 0.5                   | 0.1667                      | -6.5476                   | -1.7141 | -1.7530 | -3.3382 | 2.7795 |
| 1                     | 0.3333                      | -1.2982                   | 0.0390  | 0.9739  | -0.0951 | 1.1419 |
| 5                     | 1.6667                      | 5.6004                    | 11.9595 | 13.3229 | 10.2943 | 4.1218 |
| 10                    | 3.3333                      | 26.9428                   | 22.7892 | 27.1134 | 25.6151 | 2.4488 |
| 50                    | 16.6667                     | 87.6950                   | 88.8975 | 89.2871 | 88.6265 | 0.8299 |
| 100                   | 33.3333                     | 87.5755                   | 89.2871 | 89.4819 | 88.7815 | 1.0490 |
| 500                   | 166.6667                    | 85.2643                   | 90.4168 | 90.2610 | 88.6474 | 2.9308 |
| 1000                  | 333.3333                    | 81.0585                   | 90.6506 | 90.4947 | 87.4013 | 5.4936 |
| EC <sub>50</sub>      |                             | 4.274                     | 5.189   | 4.768   | 4.7437  | 0.4580 |

### L-ascorbic acid



รูปที่ 5 แสดงค่า EC<sub>50</sub> ของวิตามินซี

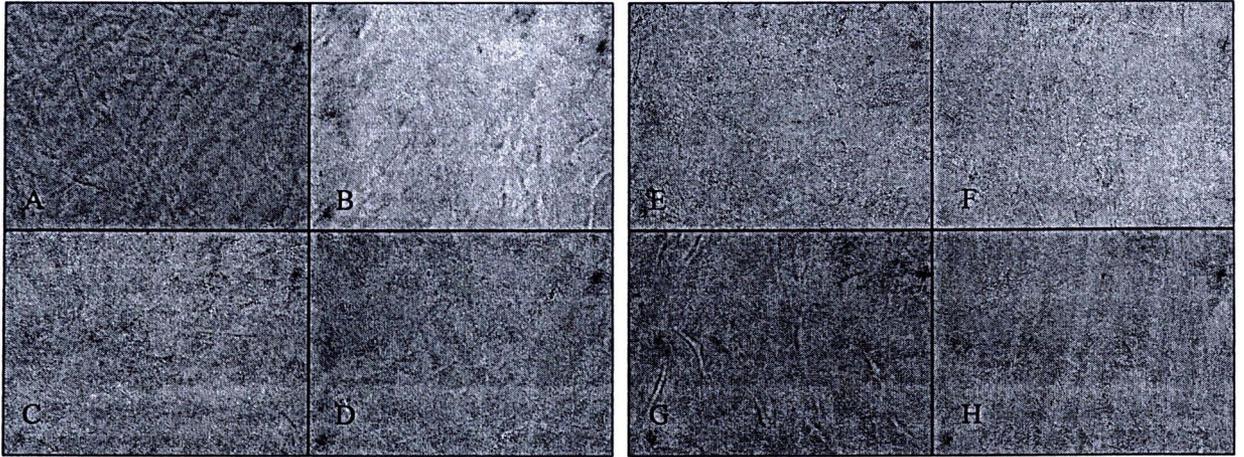
#### 4.3 การศึกษาผลของสารสกัดต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์บริเวณที่เป็นริ้วรอย

บลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังมนุษย์บริเวณที่เป็นริ้วรอย

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์ที่เซลล์มีชีวิตอยู่ (% cell viability) เมื่อได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

| Concentration (µg/ml) | %cell viability |          |          | Average  | SD      |
|-----------------------|-----------------|----------|----------|----------|---------|
| Control               | 99.6324         | 102.9412 | 97.4265  | 100.0000 | 2.7757  |
| 0.1% DMSO             | 108.4559        | 109.4940 | 96.8750  | 104.9416 | 7.0052  |
| 5                     | 103.1250        | 84.0309  | 102.3897 | 96.5152  | 10.8180 |
| 10                    | 103.1250        | 99.3401  | 101.8382 | 101.4345 | 1.9245  |
| 20                    | 108.0882        | 100.1145 | 105.8824 | 104.6950 | 4.1173  |
| 40                    | 100.3676        | 103.1193 | 96.8750  | 100.1206 | 3.1295  |
| 50                    | 100.0000        | 108.5748 | 98.3456  | 102.3068 | 5.4909  |
| 80                    | 99.6324         | 101.9678 | 103.8603 | 101.8201 | 2.1178  |
| 100                   | 93.7500         | 107.0775 | 100.0000 | 100.2758 | 6.6680  |





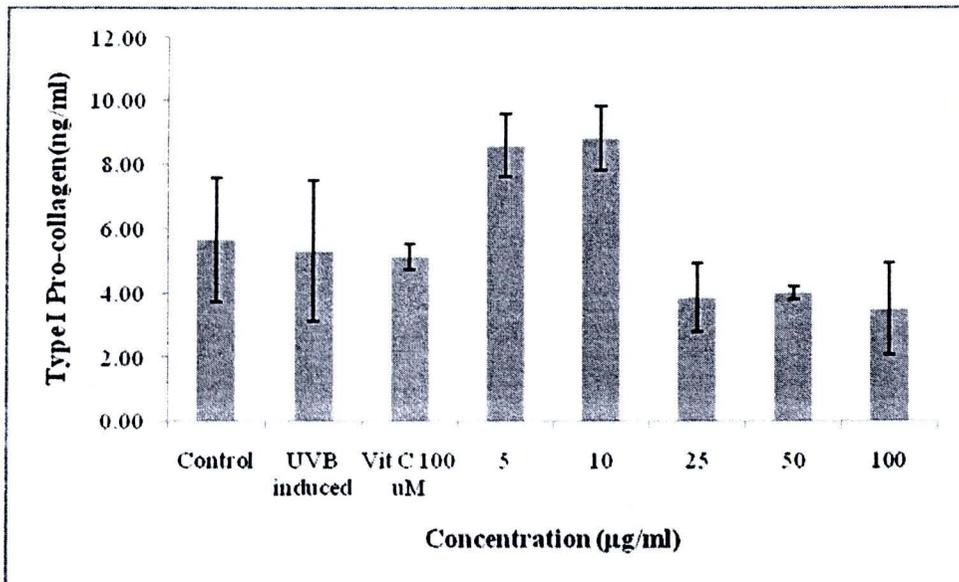
รูปที่ 6 แสดงลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

(A: DMEM, B: 5 µg/ml, C: 10 µg/ml, D: 20 µg/ml, E: 40 µg/ml, F: 50 µg/ml, G: 80 µg/ml and H: 100 µg/ml)

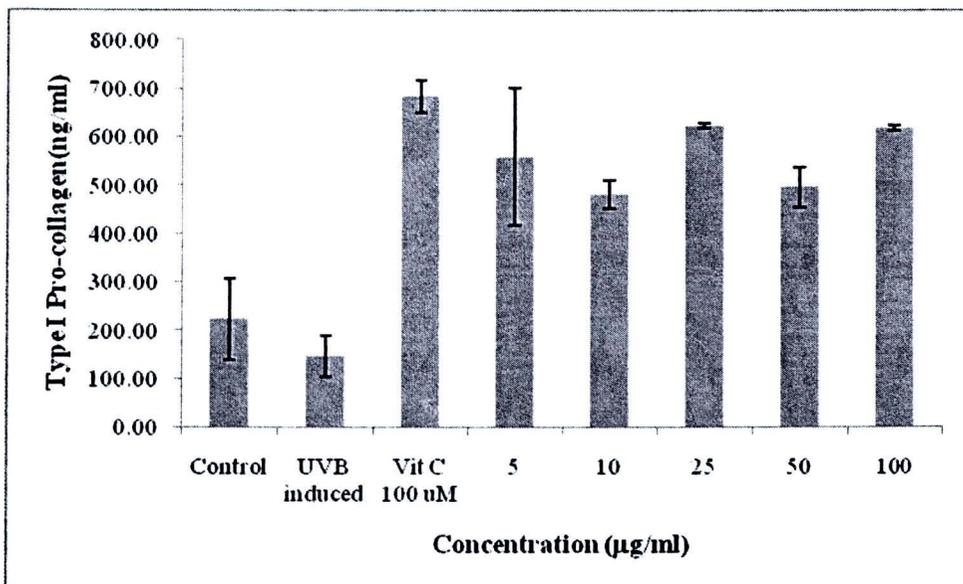
#### 4.4 การทดสอบผลของสารสกัดต่อการกระตุ้นการสร้าง type I procollagen และการผลิตเอนไซม์ MMP-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอยและถูกกระตุ้นด้วยแสง UV (UVB-irradiated fibroblasts from wrinkles)

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณ type I procollagen ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆและถูกกระตุ้นด้วย UVB ที่ 4 และ 24 ชั่วโมง

| ความเข้มข้นของสารสกัด<br>(µg/ml) | ปริมาณ type I procollagen (ng/ml) |      |            |        |
|----------------------------------|-----------------------------------|------|------------|--------|
|                                  | 4 ชั่วโมง                         |      | 24 ชั่วโมง |        |
|                                  | ค่าเฉลี่ย                         | SD   | ค่าเฉลี่ย  | SD     |
| Non-UV                           | 5.65                              | 1.91 | 223.45     | 84.64  |
| UVB induced                      | 5.30                              | 2.19 | 145.15     | 42.71  |
| วิตามินซี 100 µM                 | 5.12                              | 0.39 | 683.30     | 32.95  |
| 5                                | 8.60                              | 0.99 | 558.20     | 142.55 |
| 10                               | 8.82                              | 1.00 | 480.87     | 30.51  |
| 25                               | 3.85                              | 1.06 | 622.32     | 5.83   |
| 50                               | 4.00                              | 0.21 | 495.90     | 41.44  |
| 100                              | 3.50                              | 1.41 | 617.90     | 5.66   |



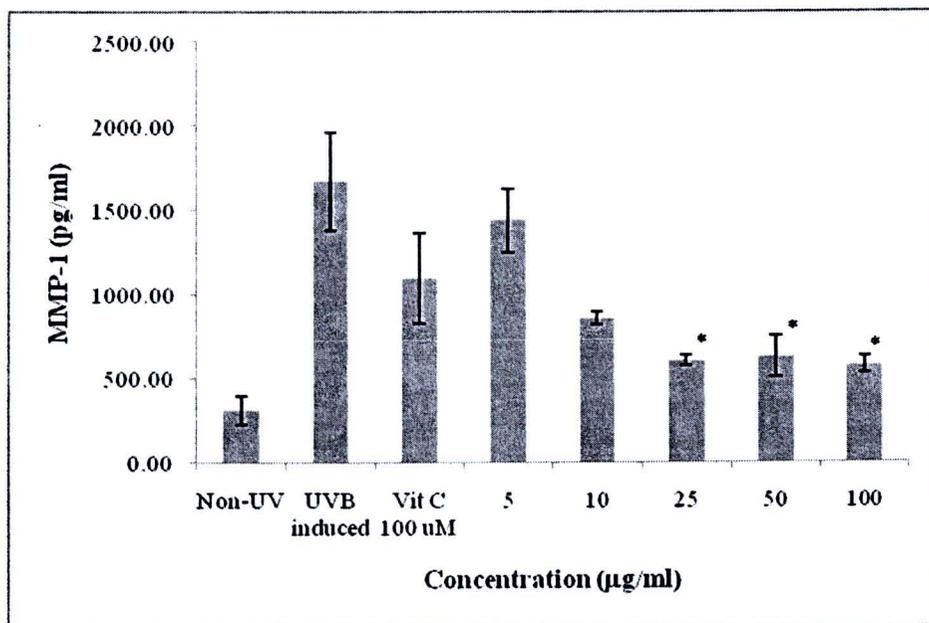
รูปที่ 7 กราฟแท่งแสดงปริมาณ type I procollagen ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆและถูกกระตุ้นด้วย UVB ที่ 4 ชั่วโมง



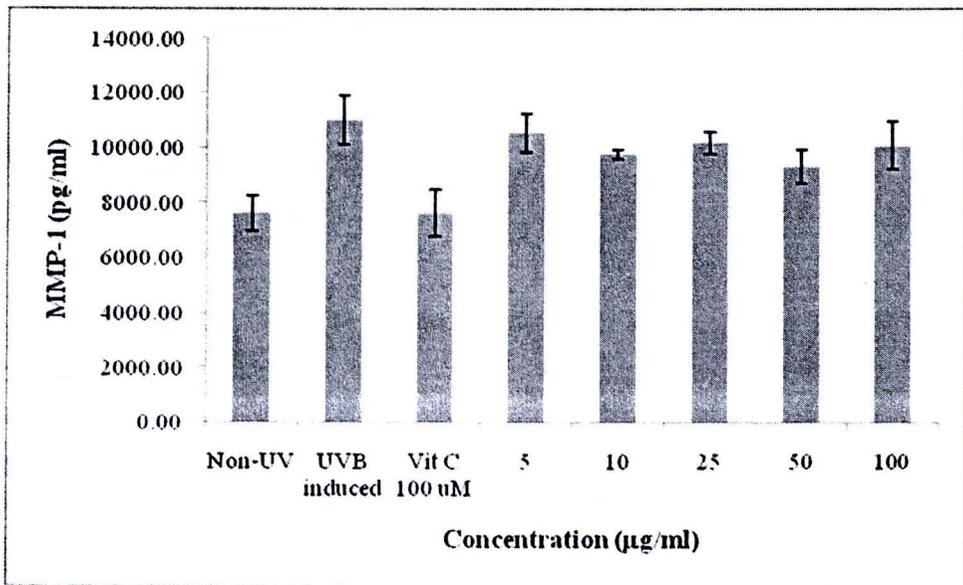
รูปที่ 8 กราฟแท่งแสดงปริมาณ type I procollagen ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆและถูกกระตุ้นด้วย UVB ที่ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณเอนไซม์ MMP-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆและถูกกระตุ้นด้วย UVB ที่ 4 และ 24 ชั่วโมง

| ความเข้มข้นของสารสกัด<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | ปริมาณ MMP-1 (pg/ml) |        |            |        |
|---|----------------------|--------|------------|--------|
|   | 4 ชั่วโมง            |        | 24 ชั่วโมง |        |
|   | ค่าเฉลี่ย            | SD     | ค่าเฉลี่ย  | SD     |
| Non-UV  | 310.67               | 83.44  | 7602.67    | 634.51 |
| UVB induced                                   | 1670.33              | 293.68 | 10997.17   | 904.39 |
| วิตามินซี 100 $\mu\text{M}$                   | 1090.50              | 269.88 | 7605.50    | 842.64 |
| 5   | 1435.00              | 186.20 | 10531.17   | 684.71 |
| 10  | 855.83               | 38.42  | 9758.83    | 157.68 |
| 25  | 600.67               | 27.81  | 10197.00   | 398.81 |
| 50  | 622.00               | 122.56 | 9304.00    | 613.30 |
| 100   | 572.67               | 48.55  | 10073.33   | 874.93 |



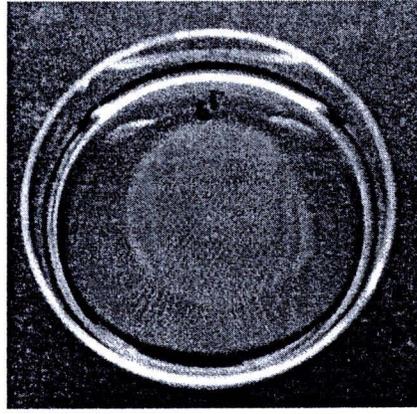
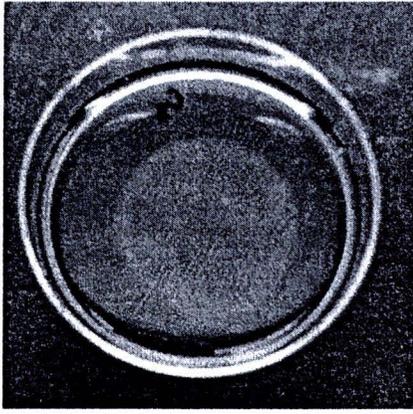
รูปที่ 9 กราฟแท่งแสดงปริมาณเอนไซม์ MMP-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆและถูกกระตุ้นด้วย UVB ที่ 4 ชั่วโมง



รูปที่ 10 กราฟแท่งแสดงปริมาณเอนไซม์ MMP-1 ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์หลังได้รับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆและถูกกระตุ้นด้วย UVB ที่ 24 ชั่วโมง

4.5 การทดสอบผลของสารสกัดต่อการฟื้นฟูสภาพในการจัดระเบียบ (reorganization) เส้นใย collagen และการหดตัว (contraction) ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่แยกได้จากผิวหนังบริเวณที่มีริ้วรอย ตารางที่ 6 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ fibroblasts-embedded collagen matrix (FECM)

| วันที่ | DMEM ที่ไม่มีสารสกัด (ชม.) |     |     |        | สารสกัด 100 µg/ml (ชม.) |     |     |        |
|--------|----------------------------|-----|-----|--------|-------------------------|-----|-----|--------|
|        | 1                          | 2   | 3   | เฉลี่ย | 1                       | 2   | 3   | เฉลี่ย |
| 1      | 3.2                        | 3.0 | 3.5 | 3.23   | 3.5                     | 3.0 | 3.2 | 3.23   |
| 2      | 3.2                        | 2.7 | 3.0 | 2.97   | 3.3                     | 3.0 | 3.0 | 3.10   |
| 3      | 3.2                        | 2.7 | 3.0 | 2.97   | 3.3                     | 3.0 | 3.0 | 3.10   |



รูปที่ 11 แสดง fibroblasts-embedded collagen matrix (FECM) ซ้าย - ไม่มีสารสกัด ขวา - มีสารสกัด 100  $\mu\text{g/ml}$