รายงานการวิจัย

เรื่อง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์

The Optimum Condition of Extracting Tamarind and Tyrosinase inhibitor testing of seed coats *Tamarindus indica* L.

นางสาวณัฐพร บู๊ฮวด

ผศ.ดร.ทิวัตถ์ กุลชนะภควัต

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์

The Optimum Condition of Extracting Tamarind and Tyrosinase inhibitor testing of seed coats *Tamarindus indica* L.

นางสาวณัฐพร บู๊ฮวด

(หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ศูนย์วิทยาศาสตร์)

ผศ.ดร. ทิวัตถ์ กุลชนะภควัต

(หลักสูตรเทคโนโลยีเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ศูนย์วิทยาศาสตร์)

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2561)

หัวข้อวิจัย การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์

ผู้ดำเนินการวิจัย นางสาวณัฐพร บู๊ฮวด

ผศ.ดร.ทิวัตถ์ กุลชนะภควัต

หน่วยงาน หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

หลักสูตรเทคโนโลยีเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

ปี พ.ศ. 2561

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อพัฒนาวิธีการกะเทาะเปลือกหุ้มเมล็ดของมะขามเปรี้ยวยักษ์ด้วยวิธีการใช้น้ำแข็งแห้ง เพื่อนำมาสกัดสารสำคัญด้วยตัวทำละลายอินทรีย์และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้สารสกัดหยาบเป็นส่วนผสมในการพัฒนาตำรับครีมปรับสภาพสีผิว จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสระหว่างสารสกัดหยาบที่ได้ละลายด้วยโพรพิลีนไกลคอลที่ละลายด้วยเอทานอล พบว่าสารสกัดหยาบที่ละลายด้วยโพรพิลีนไกลคอลมีค่า IC_{50} (inhibition concentration) เท่ากับ 1.546 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าการออกฤทธิ์ต่ำกว่าสารสกัดที่ละลายด้วยเอทานอลที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.215 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีผลใกล้เคียงกับสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมาตรฐาน ได้แก่สารมาตรฐานกรดโคจิก (kojic acid) ที่มีค่าการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส IC_{50} 1.490 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐานแอลฟา-อาร์บูติน (α–arbutin) ที่มีค่าการออกฤทธิ์ยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 0.0978 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายในเอทานอลและโพรพิลีนไกลคอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสตามธรรมชาติทั้งคู่ เมื่อนำสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายในโพรพิลีนไกลคอลมาใส่ในตำรับครีมปรับสภาพสีผิว มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.01 ความหนืด 5477 cP เมื่อนำไปทดสอบความคงตัวของอิมัลชันด้วยการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที และด้วยวิธี Heating-cooling cycles ผลการศึกษาพบว่าไม่เกิดการแยกชั้นระหว่างไขมันและน้ำ ค่าความเป็นกรดด่าง กลิ่น สี และความหนืดไม่เปลี่ยนแปลง

คำสำคัญ: มะขาม ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ครีมปรับสภาพสีผิว

Research Title	The Optimum Condition of Extracting Tamarind and Tyrosinase inhibitor testing of seed coats *Tamarindus indica* L.
Researchers	Nattaporn Boohuad Asst. Prof. Dr. Tiwatt Kuljanabhagavad
Organizations	Cosmetic Science Program, Faculty of Science and Technology Chemical Technology Program, Faculty of Science and Technology Suan Dusit University
Year	2018

The current research study aims to investigate the development of seed coat cracking in tamarind *Tamarindus indica* L. by using dry ice method and selecting the organic solvent of good solubility of the crude extracts of tamarind seed coats and the inhibition of tyrosinase activity is tested for skin condition cream. The result of this experiment showed the crude extracted of propylene glycol effective inhibitory concentration (IC_{50} = 1.546 µg/mL) and also the crude extracted of 99% ethanol solvent effective inhibitory concentration (IC_{50} = 1.215 µg/mL). The results can be compared with the experimental results of two standard reagents of kojic acid and α–arbutin which showed inhibition of tyrosinase tested with the concentration IC_{50} at 1.4900 and 0.0978 µg/mL in order to study whether the results obtained are comparable. Conclusively, the inhibit tyrosinase enzyme of crude extracted tamarind seed coats of propylene glycol and that of 99% ethanol also show that efficacy is determined of tyrosinase activity. Additionally, tamarind seed coat extracts of both of propylene glycol and 99% ethanol solvent extraction have used to develop the skin condition creams, it has potential of hydrogen pH 6.01 and viscosity value of 5477 cP. The skin condition cream of the extracts was determined the emulsion stability test by using centrifuge the milling machine spins at a speed of 9000 rpm at the room temperature for 30 minute and also heating-cooling cycles method. And the properties included color, odor, pH, viscosity, phase separation were tested. The result showed no change after in term of color, odor, pH and viscosity.

Key words: *Tamarindus indica* L., inhibition of tyrosinase activity, skin condition cream

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2561 มหาวิทยาลัยสวนดุสิต คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต ที่สนับสนุนให้ใช้ห้องปฏิบัติการศูนย์สิ่งแวดล้อม ห้องปฏิบัติการกลาง ห้องปฏิบัติการเคมี และห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เครื่องสำอางสำหรับการทำงานวิจัย ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย อาจารย์ เจ้าหน้าที่ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่มีส่วนช่วยเหลือ และแนะนำในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ในการสกัดสาร การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทรโรซิเนส ขอขอบคุณคุณชุมพล วิวัชจรัลวงศ์ ไร่วิวัชจรัลวงศ์ จังหวัดนครปฐม กรุณาอนุเคราะห์เมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ขอขอบคุณ อาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีเคมีและนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง ในการช่วยเหลือ และให้คำแนะนำต่างๆ ในการทดสอบ ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ภญ. นริศา คำแก่น ผู้อำนวยการฝ่ายเภสัชกรรมสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ผู้ทรงคุณวุฒิกรุณาอ่านและให้คำเสนอแนะเล่มรายงานวิจัย จึงทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ สุดท้ายขอขอบคุณครอบครัวที่ให้กำลังใจและดูแลในระหว่างการทำงานวิจัยมาโดยตลอด

คณะผู้วิจัย

2561

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตการวิจัย	4
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
ระบบปกคลุมร่างกาย (integumentary system)	6
ผิวหนัง (skin)	6
เมลาโนไซต์ (melanocyte)	9
เมลานิน (melanin)	11
กลไกการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin biosynthetic pathway)	12
อิมัลชัน (emulsion)	13
การประเมินคุณภาพอิมัลชัน	16
การทดสอบความคงสภาพของอิมัลชัน	18
ความเป็นพิษของสารสกัด	18
พืชที่ใช้ในการวิจัย	20
สารสำคัญในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม	22
ประสิทธิภาพ IC_{50} (50% Inhibitory Concentration)	23
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	23

หน้า

กรอบแนวคิดในการวิจัย 26

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 27

วัตถุดิบ 27

เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ 27

สารเคมี 29

การเก็บรวบรวมข้อมูล 29

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส 31

การตั้งตำรับผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิว 33

การประเมินลักษณะของตำรับ 34

การทดสอบความคงตัวของอิมัลชันในสภาวะเร่ง (stability test) 35

การวิเคราะห์ข้อมูล 35

บทที่ 4 ผลการวิจัย 36

การสกัดพืชจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ จ.นครปฐม 36

การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (solvent extraction) 38

การสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 99% 40

การทดสอบหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการละลายสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ 40

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ 42

การพัฒนาสูตรพื้นฐานผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิว 42

การทดสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่พัฒนาแล้ว 46

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 48

สรุปผลการวิจัย 48

อภิปรายผล 49

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ 50

		หน้า
บรรณานุกรม		51
	บรรณานุกรมภาษาไทย	51
	บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	52
ภาคผนวก		56
	ภาคผนวก ก บทความวิจัย	57
	ภาคผนวก ข นำเสนอโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ	62
	ภาคผนวก ค ประวัติผู้ทรงคุณวุฒิ	65
ประวัติผู้วิจัย		69

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ตำรับผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิว	33
4.1	ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (%yield) ของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์	38
4.2	ผลการทดสอบแป้งในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด	39
4.3	ผลการทดสอบน้ำตาลในสารละลายแต่ละชนิด	39
4.4	ความสามารถในการละลายของสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ	41
4.5	ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (ค่า IC_{50}) ของสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยโพรพิลีนไกลอลและละลายด้วยเอทานอล สารมาตรฐานกรดโกจิก (kojic acid) และสารมาตรฐานแอลฟาอาร์บูติน (α–arbutin)	42
4.6	ค่าคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีของตำรับครีมปรับสภาพสีผิวสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมสารสกัดสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์)	44
4.7	ตำรับผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มมะขามเปรี้ยวยักษ์	44
4.8	ค่าคุณภาพของผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์	46

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างหนังกำพร้า	7
2.2	เมลาโนไซต์	11
2.3	เมลานิน	12
2.4	กลไกการเกิดเม็ดสีผิว	13
2.5	ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ B16–F1 mouse melanoma ที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นในช่วง 50–200 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งแต่ละแถบแสดงค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการศึกษา 3 ชุด เทียบกับสาร kojic acid	19
2.6	การทำงานและลักษณะเซลล์เคราติโนไซต์-เมลาโนไซต์ของมนุษย์ที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 200 µg/mL (แถบขาว) และไม่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (TSE) (แถบเทา) ในวันที่ 0 และวันที่ 3 แต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการศึกษาจาก 3 ชุดของเซลล์เม็ดสีบนชั้นผิว	19
2.7	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะขามเปรี้ยวยักษ์	20
2.8	โครงสร้าง catechin	22
2.9	โครงสร้าง epicatechin	22
2.10	โครงสร้าง gallate	23
4.1	แสดงภาพเปรียบเทียบลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะขาม (a) มะขามเปรี้ยวยักษ์ Code No. TR-SDU-0001 เก็บตัวอย่างพืชของผู้วิจัย (b) มะขาม จ. เชียงใหม่ เป็น herbarium BKF 94394 (c) มะขาม จ. นครปฐม BKF 188958	36
4.2	ลงพื้นที่ไร่วิวัชจรัลวงศ์ ภาพต้นมะขามปลูกใหม่ ในการลงพื้นที่จริงโดยการแนะนำของเจ้าของไร่ในจังหวัดนครปฐม	37
4.3	กะเทาะเปลือกเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์โดยแช่ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่ระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที (รูป (ก)–(ง))	37
4.4	สารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ครั้งที่หนึ่งและครั้งที่สอง	40
4.5	การละลายสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ในตัวทำละลายต่างๆ กัน (รูป (ก)–(ค))	41

หน้า

4.6	ทดสอบตำรับครีมปรับสภาพสีผิวสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์) ในสภาวะเร่งด้วยแสงและอุณหภูมิ (ก) เริ่มการทดสอบ (ข) หลังการทดสอบ	43
4.7	ผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มมะขามเปรี้ยวยักษ์	47
ข-1	โปสเตอร์นำเสนอเรื่อง Tyrosinase inhibitory and whitening cream application of tamarind (Tamaridus indica L.) seed coat extracts using in vitro model	63
ข-2	อาจารย์และนักศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี นำเสนอโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The 5th International Conference on Advanced Pharma- ceutical Research “Pharmaceutical Research for Quality of Life” ระหว่างวันที่ 20–21 กุมภาพันธ์ 2561	63
ข-3	รับรางวัล popula vote โปสเตอร์นำเสนอเรื่อง Tyrosinase inhibitory and whitening cream application of tamarind (Tamaridus indica L.) seed coat extracts using in vitro model	64
ข-4	นำเสนอโปสเตอร์นำเสนอเรื่อง Tyrosinase inhibitory and whitening cream application of tamarind (Tamaridus indica L.) seed coat extracts using in vitro model เป็นภาษาอังกฤษให้กับคณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี	64

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อยู่ใกล้เส้นศูนย์สูตร ทำให้มีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ในขณะที่ภาคใต้และภาคตะวันออกมีภูมิอากาศแบบมรสุมเขตร้อน โดยทั่วไปมีอุณหภูมิเฉลี่ยระหว่าง 19–38 องศาเซลเซียส ประเทศไทยตั้งอยู่ที่ช่วงพิกัด 5°37′N - 20°27′N และ 97°22′E - 105°37′E มีแสงแดดจัด อาจทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวสายตาด้วยเช่นกัน ความรุนแรงที่เกิดจากแสงแดดเป็นตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดปัญหาผิวพรรณของคนไทยส่วนใหญ่ที่มักเกิดขึ้นบนใบหน้า คือ ปัญหาฝ้า กระ รอยด่างดำ รอยหมองคล้ำต่างๆ เริ่มแห้งกร้านเป็นจุดๆ บริเวณที่พบบ่อยที่สุด คือ แก้มทั้งสองข้าง รูขุมขนกว้างขึ้น ผิวหมองคล้ำ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการผลิตเม็ดสีเมลานิน การสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินจากเมลาโนไซต์ (melanocyte) เกิดจากเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ไปเปลี่ยนสารไทโรซีน (tyrosine) เป็นสาร 3,4-dihydroxy- phenylanine (dopa) และเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น DOPA quinone เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสาร eumelanin และ pheomelanin การยับยั้งเอนไซม์นี้จึงเป็นบทบาทสำคัญในการทำให้การผลิตเม็ดสีเกิดขึ้นน้อยลง พบว่าสารที่มีการใช้เพื่อยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินมีทั้งเป็นสารที่พบได้จากธรรมชาติ ที่ได้จากพืชสมุนไพรชนิดต่างๆ และสารที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น ไฮโดรควิโนน แอลฟาอาร์บูติน กรดโคจิก และกรดผลไม้ ซึ่ง α–arbutin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของ tyrosinase และการสร้างเม็ดสี แต่มีรายงานวิจัยพบว่า α–arbutin เป็นสารก่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ (Li *et al.*, 2011) และสารไฮโดรควิโนน เป็นสารห้ามใช้ในเครื่องสำอาง แต่ก็พบว่ามีการลักลอบใส่ในเครื่องสำอางอยู่เสมอ จึงได้มีการศึกษาหาสารสำคัญออกฤทธิ์ซึ่งสกัดจากพืชชนิดอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน

มะขามเป็นพืชพื้นเมืองของทวีปเอเชียและอัฟริกา ซึ่งพบได้เกือบทุกประเทศของทั้งสองทวีปดังกล่าว ฝักมะขามมีความเปรี้ยวของเนื้อมะขาม มีองค์ประกอบของกรดทาทาริก และน้ำตาลในปริมาณสูง เนื้อมะขามใช้ในการปรุงรสอาหาร ใส่แกง และใส่เป็นซอส ทำเป็นน้ำผลไม้ มีวิตามินบีในปริมาณสูง แคโรทีนและปริมาณวิตามินซีต่ำ ในใบมะขามมีปริมาณวิตามินซีสูง มีสารแอลฟาแคโรทีน มีแร่ธาตุโปรแตสเซียม (K) ฟอสฟอรัส (P) แคลเซียม (Ca) และแมกนีเซียม (Mg) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบ มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ประโยชน์ของส่วนต่างๆ ของมะขาม ใบใช้ทานเป็นผัก มีประโยชน์หลายด้าน มีการใช้ทางยาพื้นบ้านของกลุ่มประเทศในทวีปอัฟริ- กากันอย่างกว้างขวาง ประโยชน์อื่นๆ เช่น เนื้อภายในเมล็ดมะขามบดให้ละเอียดใช้ในการทำกาว เมล็ดเป็นแหล่งโปรตีนสำคัญ ซึ่งสรุปได้ว่าทุกส่วนของมะขามเปรี้ยวยักษ์สามารถนำมาใช้ประโยชน์และแปรรูปได้ ในประเทศไทยมีการปลูกมะขามเปรี้ยวยักษ์เพื่อจำหน่ายในการแปรรูปได้

ผลิตภัณฑ์หลายประเภท เช่น มะขามเปียก มะขามแช่อิ่ม ซอสมะขามใส่ขวด และอีกมากมายหลายประเภท ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านั้นได้มาจากประเทศไทยและประเทศอินเดีย มีผลิตภัณฑ์ของหลายประเทศในทวีปอัฟริกา เช่น ประเทศซีนิเกิล (Senegal) แกมเบีย (Gambia) เคนยา (Kenya) แทนซาเนีย (Tanzania) และแซมเบีย (Zambia) (El-Siddig *et al*., 2006)

มะขามมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีองค์ประกอบเป็น 0.4% ไขมัน 70.8% คาร์โบไฮเดรต 3.0% ไฟเบอร์ และ 2.1% เถ้า นอกจากนั้นเป็น 20.6% ส่วนเมล็ดของมะขามมีปริมาณโปรตีนสูงมาก คาร์โบไฮเดรต และแร่ธาตุ ซึ่งคุณค่าทางโภชนาการของผลมะขามขึ้นกับแหล่งที่ปลูกเป็นสำคัญ (El-Siddig *et al*., 2006) ส่วนสารแอนตี้โภชนาการ (Anti-nutritional factors) มีองค์ประกอบเป็นสารแทนนิน (tannins) กรดไฟติค (phytic acid) ไฮโดรไซยาเนท (hydrogen cyanate) สารยับยั้งทริป- ซิน (trysin inhibitory activity) (El-Siddig *et al*., 2006) มะขามนั้นเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก เช่นในประเทศที่พัฒนาแล้ว มีการพัฒนาให้เป็นเป็นที่ยอมรับและจำกัดปริมาณของสารในปริมาณของสารแอนตี้โภชนาการ (Anti-nutritional factors) (Siddhuraju *et al*., 2000).

จากหลายงานวิจัย พบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม ชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Tamarindus indica* L. มีสรรพคุณพื้นบ้านในการแก้ท้องเสีย ท้องร่วง ใช้ชะล้างบาดแผล พอกรักษาแผล และสมานแผล (Sudjaroen *et al*., 2005) ประกอบไปด้วยสารกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งประกอบด้วยฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และมีสารจำพวกโพลีเมอริกโพรแอนโธไซยานิดินส์สายยาว จำพวกโฟลบาแทนนิน (phlobatannin) ประกอบไปด้วยสารกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งประกอบด้วยฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และ โพลีเมอริกโพรแอนโธไซยานิดินส์สายยาว จำพวกโฟลบาแทนนิน (phlobatannin) ซึ่งเป็นสารชนิดเดียวกันกับคอนเดนท์แทนนิน (condensed tannins) เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่สกัดด้วยเอทานอล (ethanol) มีสารพวกไดไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน (2 – hydroxyl - 3', 4'-dihydroxyacetophenone), ไดไฮดรอกซีเบนโซเอท (methyl 3, 4-dihydroxybenzoate), ไดไฮดรอกซีฟีนิลอะซิเตท (3, 4- dihydroxyphenyl acetate) และ สารอิพิคะเตชิน (-)-epicatechin (ภัคสิริ สินไชยกิจ และไมตรี สุทธจิตต์, 2554)

องค์ประกอบทางเคมีเป็นกรดอะมิโน และแร่ธาตุ ซึ่งพบในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของพันธุ์มะขาม อายุการเก็บเกี่ยว ส่วนต่างๆ ของมะขาม และสภาพแวดล้อมที่ปลูกมะขาม (Glew *et al*., 2005) เมล็ดของมะขามเป็นแหล่งโปรตีนที่ดีที่สุด รวมทั้งมีปริมาณไฟเบอร์และคาร์โบไฮเดรตสูง

การวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าสารแอนติออกซิแดนท์ในสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีความคล้ายคลึงกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่น มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงมากใกล้เคียงกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่น และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีกว่า วิตามินอี (α-Tocopherol) 3.14 เท่า จึงมีการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (กรรณิการ์ พุ่มทอง, 2542) มีการศึกษาการสกัดแยก

สารสำคัญจากเมล็ดมะขาม เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเมล็ดมะขาม ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารฟีนอลลิคในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวาน 3 ชนิด จากประเทศไทย (Luengthanaphol, 2004) ฤทธิ์ต้านเชื้อราและแบคทีเรียจากมะขาม (Doughari, 2006) มีการสกัดและแยกสารสำคัญประเภทพอลิฟีนอลจากเมล็ดมะขามและเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (Sudjaroen et al., 2005) จากงานวิจัยพบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะขามด้วยเมธานอลมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ใกล้เคียงกับกรดแกลลิก (gallic acid) (Thongmuang & Sudjaroen, 2013) และ งานวิจัยของ Phetdee และคณะ (2012) ศึกษากลไกการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินจากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม โดยสกัดสารจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยเอธิลอะซิเตต พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างเมลานินได้ 42–59% ให้ผลใกล้เคียงหรือเทียบเท่ากับกรดโคจิก (kojic acid) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ได้รับความนิยม มีค่าเท่ากับ 50 µg/ml สารสกัดมีค่า inhibited tyrosinase activity (IC_{50}) เท่ากับ 152.1±10.2 µg/ml ดังนั้นสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) จึงมักใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางทำให้ผิวขาวขึ้น (Tamura K, *et al*., 1996)

แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการศึกษาสารสำคัญในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม จะเตรียมเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยวิธีการต้มเมล็ดมะขามในน้ำเดือดเพื่อลอกเปลือกเมล็ดมะขามออกมา มีรายงานการทดลองพบว่าการต้มเมล็ดมะขามในน้ำเดือดที่เวลา 1.5, 2 และ 2.5 ชั่วโมง มีเมล็ดที่ลอกได้สมบูรณ์ 28%, 71% และ 100 % ตามลำดับ ส่วนเมล็ดที่ผ่านการแช่น้ำ 1 สัปดาห์ มีเมล็ดที่ลอกสมบูรณ์เพียง 6% (จิราภา โลหัชวาณิชย์และคณะ, 2555) ซึ่งความร้อนจากการต้มเมล็ดมะขามในน้ำเดือดมีผลต่อสารสำคัญลดลงหรือสลายตัวไป ดังนั้นในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดและการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ เพื่อป้องกันการเสื่อมสลายของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ซึ่งผลจากศึกษาครั้งนี้จะนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาครีมปรับสภาพสีผิวต่อไป

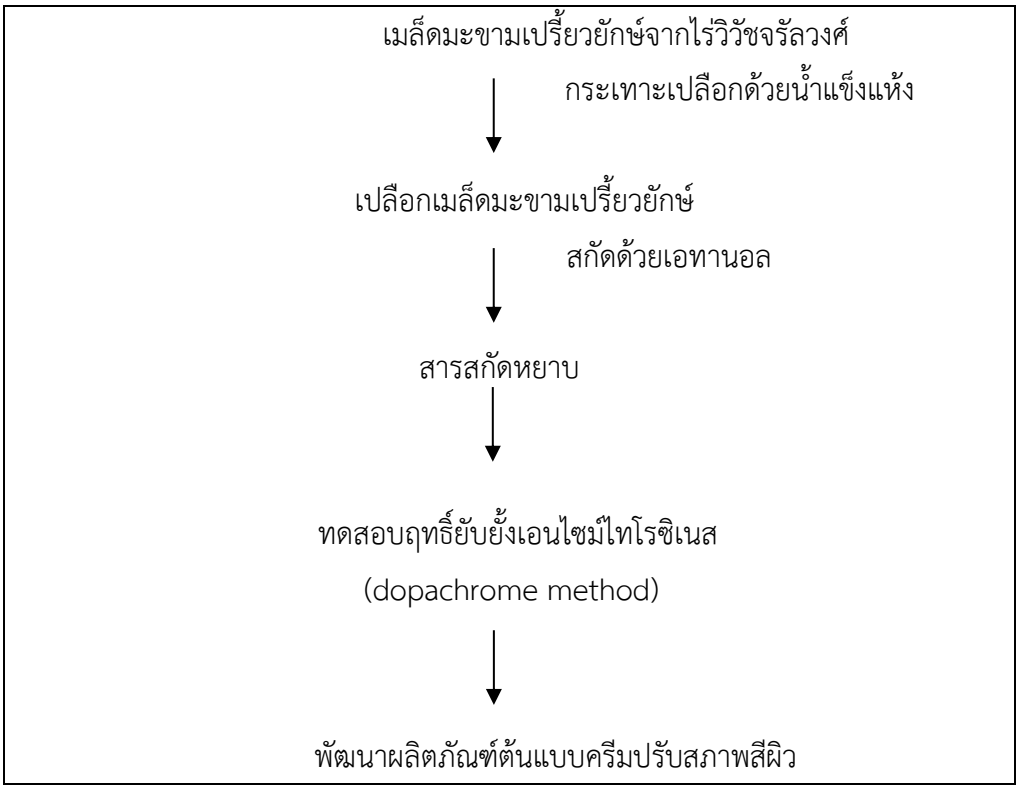
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์
3. เพื่อนำสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมาทำผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิว

1.3 ขอบเขตการวิจัย

แหล่งพืชได้รับการอนุเคราะห์เมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ จากไร่วิวัชจรัลวงศ์ จังหวัดนครปฐม ผู้วิจัยนำไปเทียบ (Identification of Plant) กับหอพรรณไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เพื่อยืนยันรหัสประจำตัวต้นไม้

1. การวิจัยนี้ทำการศึกษาวิธีการสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ (*Tamarindus indica* L. โดยวิธีการหมัก (Maceration) ด้วยเอทานอล
2. นำสารสกัดหยาบจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ (*Tamarindus indica* L.) ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี dopachrome method โดยวัดการดูดกลืนแสงของ dopachrome ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรสิเนส (%tyrosinase inhibition) แล้วนำมาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานทั้งสองชนิดแอฟาอาร์บูติน (α-arbutin) และกรดโคจิก (kojic acid)
3. พัฒนาครีมปรับสภาพสีผิวที่มีความคงตัวดีผสมสารสกัดหยาบจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ (*Tamarindus indica* L.) อธิบายตามลำดับขั้นตอนดังนี้



1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

Fabaceae, *Tamarindus indica* L., seed coat, tyrosinase activity, skin condition cream

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบเพื่อต่อยอดในเชิงพาณิชย์ เผยแพร่ในวารสาร
2. นำมาบูรณาการในการเรียนการสอนในเชิงปฏิบัติการกับนักศึกษาหลักสูตรเครื่องสำอาง ผู้ประกอบการหรือผู้สนใจนำไปใช้ประโยชน์

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบบปกคลุมร่างกาย (integumentary system)

ระบบอวัยวะที่ปกคลุมอยู่นอกสุดของร่างกาย อันได้แก่ ผิวหนัง (skin) และอวัยวะที่มีต้นกำเนิดมาจากผิวหนัง (เล็บ ผม/ขน และรูขุมขน ต่อมไขมัน ต่อมเหงื่อ) ผิวหนังเป็นหนึ่งในอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของร่างกายเป็นตัวแบ่งกั้นอวัยวะภายในออกจากสิ่งแวดล้อมภายนอก

ระบบปกคลุมร่างกายแบ่งออกเป็น 2 ส่วน

1. ผิวหนัง (skin) ผิวหนังเป็นด่านหน้าที่จะเผชิญอันตรายทั้งมวลภายนอกและภายในร่างกาย ผิวหนังแม้จะบอบบางแต่ก็เป็นอวัยวะที่กว้างใหญ่ที่สุดในร่างกาย เฉลี่ยในผู้ใหญ่ 1.6–1.8 ตารางเมตร ในแต่ละแห่งของร่างกายผิวหนังบางหนาไม่เท่ากัน ส่วนที่บางที่สุดคือ เปลือกตา หนา 0.2–0.6 มม. ส่วนที่หนาที่สุดคือฝ่าเท้าและมือ หนา 2–4 มม. ผิวหนังเป็นแหล่งกำเนิดของขนและผม ซึ่งอยู่ติดกับต่อมไขมัน (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2532)

2. อวัยวะที่กำเนิดมาจากผิวหนัง (skin appendages) ได้แก่ ขน รูขุมขน (Hair Follicle) และต่อมไขมัน (the sebaceous, follicle, Sebaceous glands and nonsebaceous ducts) รวมเรียกว่า pilosebaceous units ต่อมเหงื่อ (sweat glands) และเล็บ (nails)

2.2 ผิวหนัง (skin)

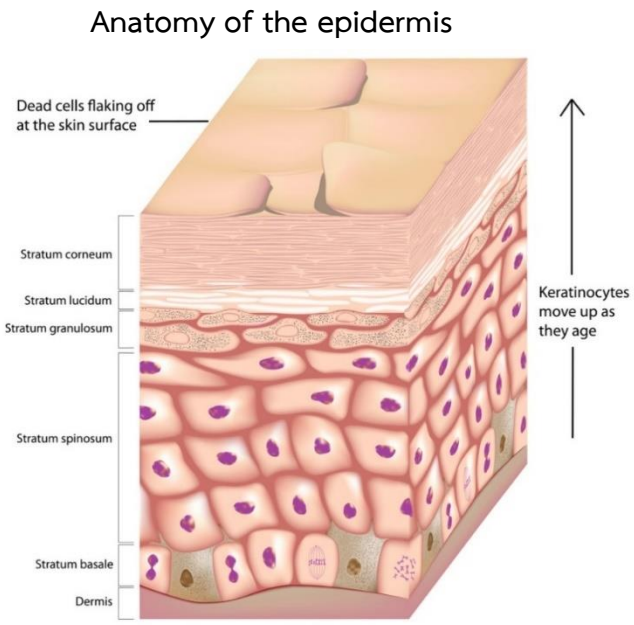
ผิวหนังประกอบด้วยโครงสร้างเนื้อเยื่อ 3 ชั้น คือ

1. หนังกำพร้า (epidermis) อยู่ชั้นนอกสุด ประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีการเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ และเกิดใหม่ โดยที่เซลล์ใหม่จะถูกสร้างจากชั้นล่างสุดติดกับหนังแท้และเจริญเติบโตขึ้นแล้วค่อยๆ เคลื่อนตัวมาทดแทนเซลล์ที่อยู่ชั้นบนจนถึงชั้นบนสุดแล้วกลายเป็นขี้ไคล (keratin) หลุดลอกออกไป

2. หนังแท้ (dermis) เป็นผิวหนังที่อยู่ชั้นล่างถัดจากหนังกำพร้า แต่หนากว่าหนังกำพร้ามาก จะประกอบด้วยโปรตีนหลัก 2 ชนิด คือ คอลลาเจน (collagen) และอีลาสติค (elastic) คอลลาเจน (collagen) ช่วยให้ความแข็งแรงแก่ผิวหนัง และช่วยในการซ่อมแซมผิวหนังที่บาดเจ็บและยังเป็นที่อยู่ของหลอดเลือด เส้นประสาท ต่อมไขมัน ต่อมเหงื่อ และขุมขน

3. ชั้นรองรับผิวหนัง (subcutaneous tissue) ชั้นนี้จะเกี่ยวข้องกับการทำให้ผิวหนังมีการเคลื่อนไหวได้อย่างอิสระไม่ฉีกขาดได้ง่าย ป้องกันอวัยวะภายในจากการถูกกระแทกอีกที

2.2.1 หนังกำพร้า (epidermis)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างหนังกำพร้า

epidermis เป็นชั้นผิวหนังที่อยู่นอกสุดและสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง ผิวชั้นหนังกำพร้าเกิดจากเซลล์ชั้นเดียวซึ่งแบ่งตัวหนาขึ้นเกิดเป็นเซลล์ผิวหนัง (keratonocyte) และ epidermal appen dages (Adnexal Structures) เช่น ขุมขน ต่อมเหงื่อ ต่อมไขมัน แบ่งเป็น 4–5 ชั้นย่อย ซึ่งแต่ละชั้นมีลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ต่างกัน (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2532)

1. stratum basale หรือ stratum germinativum ชั้นที่มีเซลล์เรียงกันแถวเดียว รูปทรงกระบอก ภายในมีนิวเคลียสเชื่อมต่อกันด้วย tonofibrils มีการแบ่งตัวสร้างเซลล์ใหม่ทดแทนเซลล์ชั้นบนที่ตายไปเรื่อยๆ เรียกว่า keratinization โดยโปรตีนภายในเซลล์ค่อยๆ เปลี่ยนสภาพเป็นคีราติน ตัวเซลล์สูญเสียนิวเคลียสจึงแบนลงเรื่อยๆ กระบวนการนี้เริ่มเกิดที่ tonofibrils และผนังของ prickle cell ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์สลายไปโดยเอนไซม์ ribonuclease และdeoxyribo-nullease ทำให้เซลล์สูญเสียความชื้นไปเรื่อยๆ จึงเคลื่อนไปอยู่ที่ผิวบนถูออกเป็นขี้ไคล

2. stratum spinosum เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ มีรูปร่างหลายเหลี่ยมเรียงเป็นชั้นๆ สูงบ้างต่ำบ้างมี cytoplasm ติดสี basophilic แสดงว่ามีการสร้างโปรตีนสำคัญ ซึ่งเป็นรูปเส้นด้าย เรียก

tonofibrils เห็นนิวเคลียสชัดเจน เซลล์ชั้นใต้ๆ มีเม็ดสีผิว (melanin granule) อยู่ภายใน ซึ่งเคลื่อนย้ายมาจากเซลล์สร้างสี (melanocyte) ในชั้น stratum basale

3. stratum granulosum ภายใน cytoplasm ของเซลล์ชั้นนี้มี granule ที่เรียกว่า keratohyalin ทำหน้าที่ช่วยสะท้อนแสงทำให้ผิวดูผาวผุดผ่องและทึบแสง เซลล์ชั้นนี้อาจเรียงตั้งแต่ 1 ถึง 4 แถว แล้วแต่บริเวณของร่างกายเซลล์ชั้นนี้ค่อยๆ กลายสภาพเป็น extracellular compartment ซึ่งอยู่ระหว่างเซลล์ของ stratum corneum ภายในจะประกอบด้วย sterol, lipids และเอนไซม์ ได้แก่ lipases, glycosidases และ acid phosphatase สามารถเปลี่ยนสภาพจากไขมันชนิดมีขั้ว (glycoceramides) ไปเป็นไขมันชนิดไม่มีขั้ว (ceramides) ซึ่งตกผลึกเป็นชั้น (lipid lamella หรือ lipid bilayer) อยู่ระหว่าง corneocytes ทำให้เกิดขั้นซึ่งกั้นน้ำ เรียกว่า skin fat

4. stratum lucidum ประกอบไปด้วย หยดน้ำมันที่เรียกว่า eleidin ชั้นนี้จะพบมากที่อุ้งมือ อุ้งเท้า และหนังที่หนาด้านระหว่างชั้น stratum lucidum และ stratum granulosum ซึ่งอยู่ถัดลงไป มีเยื่อคีราตินบางๆ เรียกว่า Rein' barrier เยื่อนี้จะเป็นตัวแบ่งกั้นพีเอชของผิวหนัง โดยที่เหนือเนื้อเยื่อนี้ขึ้นไปมีพีเอช 5 ใต้ลงมามีพีเอชมากขึ้น เยื่อนี้จะเป็นตัวกั้นการซึมผ่านเข้าออกของน้ำ และอีเลคโตรไลท์

5. stratum corneum ประกอบเซลล์แบนๆ ไม่มีสี เรียงเป็นแถวขนานกับผิวแบบหลังคาบ้าน ไม่มีนิวเคลียส เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว ไม่มีกระบวนการเมตาโบลิซึมเกินขึ้น ดูดอาหารไม่ได้ มีประมาณความชื้นต่ำ เรียก corneal cell หรือ corneocytes ส่วนประกอบใหญ่ คือ คีราติน (keratin) ซึ่งประกอบด้วย insoluble cysteine-rich disulfide crosslinked protein 65% เป็นโปรตีนที่แปรสภาพมาจากเซลล์ชั้นอื่นที่อยู่ใต้ลงไป ไม่ละลายน้ำ ทนต่อสารเคมี จึงทำหน้าที่สำคัญในการป้องกันผิวหนังจากสารพิษ เซลล์เหล่านี้ถูกเชื่อมให้ต่อกันได้ด้วย waxlike substances คล้ายกาว เรียกว่า skin fat ซึ่งได้จากการสลายตัวของเซลล์ในกระบวนการผลัดเปลี่ยนเซลล์ผิว (keratinization) ของเซลล์ชั้นล่างๆ skin fat นี้ ประกอบด้วยกรดไขมัน ceramides กรดอะมิโน purine และน้ำตาล pentose ซึ่ง skin fat นี้สามารถดูดความชื้นจากเหงื่อรวมตัวเป็นอีมัลชันปกคลุมผิวหนัง ทำให้ผิวมีความยืดหยุ่นและนุ่มนวล เป็นการรักษาความชื้นให้ผิว (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2532, น. 3–4)

เซลล์ของหนังกำพร้า ประกอบด้วยเซลล์ 4 ชนิด

1. Keratinocyte
2. Melanocyte
3. Langerhans cell
4. Merkel cell

2.2.2 หนังแท้ (dermis)

ระหว่างหนังกำพร้าและหนังแท้ จะมีเยื่อกั้นแยกออกจากกัน หนังแท้ประกอบด้วยกลุ่มเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งกระจายตัวเป็นร่างแห เรียก fibroblasts นอกจากนี้มี ground substances ทำให้ผิวมีความตึงยืดหยุ่นและอ่อนนุ่ม หนังแท้แบ่งเป็น 2 ชั้น คือ

1. papillary layer ประกอบด้วยกลุ่มหลอดเลือดฝอย ปลายประสาท และมีเซลล์ fibroblasts ซึ่งทำหน้าที่สร้าง fibrous protein ที่สำคัญ ได้แก่ collagen และ elastin แทรกอยู่ระหว่างกันทำหน้าที่เสริมความแข็งแรงทำให้ผิวหนังเกิดความตึงและ ยืดหยุ่นได้ เซลล์เหล่านี้เรียงตั้งฉากกับผิว นอกจากเส้นใย collagen และ elastin จะมี ground substances แทรกอยู่ระหว่างเส้นใยเหล่านี้ ประกอบด้วยเกลือแร่ น้ำ และ glycoaminoglycans ที่สำคัญได้แก่ hyaluronic acid และ chondronintin sulfate ซึ่งทำหน้าที่ดูดและอุ้มน้ำ ทำให้ผิวนุ่มและชุ่มชื้น

2. reticular layer ชั้นนี้มีหลอดโลหิต หลอดน้ำเหลือง เส้นประสาท รากผมหรือขน ต่อมเหงื่อ ต่อมไขมัน ต่อมกลิ่น และกลุ่มเนื้อเยื่อ (fibrous bundle) มากมาย ชั้นนี้เป็นส่วนที่ยืดหยุ่นไม่ดีนัก และเป็นรอยแตกเมื่อถูกยืดมาก ๆ ในชั้นหนังแท้ยังมี Mast cells อยู่ใกล้กับหลอดเลือดฝอย มีบทบาทในการสร้าง heparin ช่วยป้องกันเลือดแข็งตัว สร้าง histamin และ prostaglandins ซึ่งมีผลขยายเส้นเลือดและเกี่ยวข้องกับการแพ้และการอักเสบของผิวหนัง

2.2.3 ผิวหนังชั้นไขมัน (subcutaneous)

ชั้นไขมัน จะอยู่ในสุดของชั้นผิวหนัง มักประกอบด้วย เซลล์ไขมัน (adipocytes & special collagen fibers) และโปรตีนคอลลาเจน และหลอดเลือดต่าง ๆ ที่มาหล่อเลี้ยงจำนวนมาก ทำหน้าที่กักเก็บพลังงาน เป็นเหมือนเบาะกันกระแทกให้กับอวัยวะภายใน

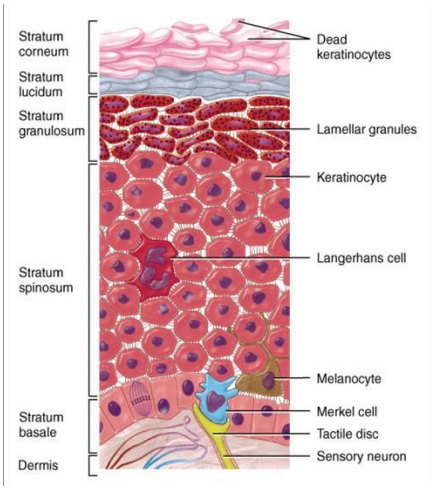
2.3 เมลาโนไซต์ (melanocyte)

เมลาโนไซต์ (melanocyte) เป็น dendritic cell ชนิดหนึ่งที่มีต้นกำเนิดมาจาก neural crest cells จัดเป็น immigrant cells คือ เซลล์ที่เดินทางมาจากที่อื่นแล้วมาอาศัยอยู่ที่ผิวหนังในชั้น epidermis ใน hair follicle และใน dermis เมื่อมองด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะเห็น melanocyte อยู่ในชั้น epidermis อยู่ตรงเบเซลเซลล์เลเยอร์ (basal cell layer) โดยแทรกอยู่ระหว่าง basal cell โดยประมาณ 10 basal cells จะพบ melanocyte อยู่ 1 ตัว ภายใน melanocyte มีเม็ดสี (melanin) อยู่ในถุงหุ้มที่เรียกว่า melanosome แล้ว melanocytes จะส่ง melanin ไปให้ keratinocytes ที่อยู่ชั้นบนกว่าผ่านไปทาง dendritic processes ที่แทรกอยู่ระหว่าง keratinocytes ทำให้เกิดเป็นสีผิวหนังขึ้น (skin color) ซึ่งจะพบว่าจำนวนของ melanin ใน cytoplasm ของ keratinocytes มีปริมาณมากว่าจำนวน melanin ใน melanocytes ข้างเคียง

เมลาโนไซต์มีรูปร่างคล้ายดาว cytoplasm ติดสีซีด (pale-staining cytoplasm) nucleus รูปร่าง กลม และมี melanosome อยู่ภายในเซลล์ melanosome มีรูปร่างกลม มีถุงหุ้ม (membrane-bound) มีหน้าที่สร้าง melanin melanosome สามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะขึ้นกับจำนวน melanin ที่ผลิต (degree of melanization) (stage 1–4) นอกจากนี้ melanosome ที่มี melanin ต่างชนิดกันก็จะมีรูปร่างแตกต่างกัน (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2532)

การย้อมชิ้นเนื้อด้วย H&E stain จะเห็น melanocyte เป็นเพียงเซลล์กลมๆ ใสๆ แต่หากต้องการเห็นรายละเอียดภายในเซลล์มากขึ้นควรย้อมชิ้นเนื้อด้วยสาร 1,3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA) ซึ่งสารนี้จะถูก oxidize โดยเอ็นไซม์ tyrosinase ที่บรรจุอยู่ใน cytoplasm ของ melanocytes เกิดเป็นตะกอนสีน้ำตาลของ melaninเกิดขึ้น

โดยปกติ melanocytes จะไม่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นเอง (insitu) แต่ถ้ามีปัจจัยเหล่านี้มากระตุ้น ได้แก่ แสงแดด ฮอร์โมน melanocyte-stimulating hormone sex-hormone inflammatory mediators ตั้งครรภ์ และวิตามิน D3 ที่สร้างภายใน epidermis ปัจจัยเหล่านี้จะกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นของ melanocyte melanocyte จะมี dendritic processes เพิ่มมากขึ้น มีการสร้าง melanin เพิ่มมากขึ้น (melanogenesis) และมีการส่ง melanin ไปให้ keratinocytes เพิ่มมากขึ้น ผลก็คือสีผิวจะเข้มขึ้นกว่าเดิม สีผิวของมนุษย์จะขึ้นอยู่กับขนาด ชนิด จำนวนของ melanosome จำนวน melanin ใน keratinocytes และความสามารถของ melanocytes ในการผลิต melanin (melanogenesis)

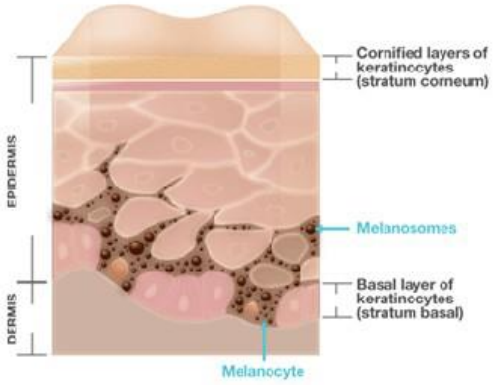


ภาพที่ 2.2 เมลาโนไซต์

2.4 เมลานิน (melanin)

เมลานิน (melanin) เป็นเม็ดสีที่สร้างเซลล์ผิวหนังที่เรียกว่า melanocytes ซึ่งเป็นเซลล์อยู่ที่ผิวหนัง ในผิวหนังชั้นนอก (epidermis layer) ในรูขุมขน (hair follicle) และในผิวหนังชั้นใน (dermis layer) (การนำส่งสารสำคัญทางผิวหนัง, 2559) โดยแทรกอยู่ในเซลล์ชั้นบาเซลล์ (basal cells) โดยปะมาณ 8–10 เซลล์ จะพบเซลล์เมลาโนไซต์ (melanocyte cell) 1 ตัว มีเม็ดสีอยู่ในถุงหุ้มที่เรียกว่า เมลาโนโซม (melanosome) เมื่อสร้างเมลานินเสร็จแล้วเมลาโนไซต์ จะส่งเมลานินไปให้เซลล์คีราติโนไซต์ (keratinocyte cells) ที่อยู่ชั้นบนกว่าผ่านไปทางแขนงเป็นร่างแหเล็กๆ ยื่นไปสัมผัสเซลล์ผิวหนัง (dendritic processes) ทำให้เกิดเป็นสีผิวหนังขึ้น (skin color) ซึ่งจะพบว่าจำนวนของเมลานินในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์คีราติโนไซต์ (keratinocyte cells) มีปริมาณมากกว่าจำนวนเมลานินในเมลาโนไซต์ข้างเคียง

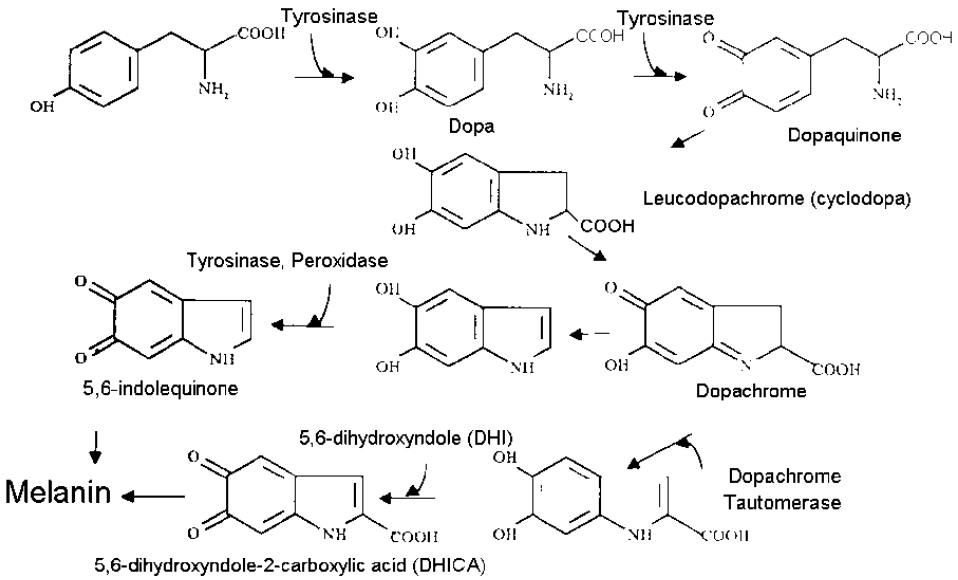
ถ้า melanosome ที่สร้างเมลานินสีน้ำตาล-ดำ (brown-black eumelanin) จะมีรูปร่างเป็นวงรี (elliptical) และเมลานิน เรียงตัวภายในเซลล์ตามยาว (internal organization of longitudinally oriented, concentric lamellae) ส่วน melanosome ที่ผลิตเมลานินสีเหลือง-แดง (yellow-red pheomelanin) จะมีรูปร่างกลม (spheroid shape) และเมลานินจะบรรจุในถุงเล็กๆ อีกที (microvascular internal structure) โดยพันธุกรรมจะเป็นตัวกำหนดขนาดของ melanosome และคนผิวดำจะมี melanosomes ขนาดใหญ่กว่าคนผิวขาว



ภาพที่ 2.3 เมลานิน

2.5 กลไกการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin biosynthetic pathway)

กระบวนการสร้างเมลานินเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดและมีบทบาทมากสุดในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน เปลี่ยนสารตั้งต้นไทโรซีน (tyrosine) ไปเป็นสาร 3,4-dyhydroxyphenylalanine (DOPA) และเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น DOPA aquinone ตามลำดับ ซึ่งสาร DOPA aquinone นี้จะทำปฏิกิริยากับสารเอนไซม์กลูตาไทโอน (glutathione) หรือ ซิสเทอีน (cysteine) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทรองลงมา แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสาร cysteine DOPA เกิดเป็นเม็ดีเหลือง/แดงฟีโอเมลานิน (pheo-melanin) นอกจากนี้ในสภาวะที่ขาดซิสเทอีน (cysteine) สาร DOPA aquinone จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น DOPA achrome ได้ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) เกิดเป็นเม็ดสีดำของยูเมลานิน (eumelanin) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ chrome tautomerase (DCT) และต่อจากนั้นเอนไซม์ tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) จะเร่งปฏิกิริยาของสาร DHICA ไปเป็นสาร Indole-5,6-quinone carboxylic acid (IDQCA) เกิดเป็นเม็ดสีดำของยูเมลานิน (eumelanin) ดังภาพ 2.4



ภาพที่ 2.4 กลไกการเกิดเม็ดสีผิว

ปัจจัยที่ส่งผลให้มีการผลิตเม็ดสีเมลานิน เป็นผลจาก 2 ปัจจัยหลักได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต (UV radiation) เป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นให้มีการสร้างเมลานินและพันธุกรรม รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินได้ 2 วิธี

1. กระตุ้นเซลล์เมลาโนไซต์โดยตรง โดยจะกระตุ้นให้เอนไซม์ไทซิเนส ทำงานมากขึ้นทำให้มีการสร้างเม็ดสีเมลานินมากขึ้น

2. กระตุ้นเซลล์คีราติโนไซต์ให้หลั่งสารหลายตัวออกมา ตัวที่สำคัญคือ α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) ซึ่งสารตัวนี้จะไปกระตุ้นให้ microphthalmia-associated transcription factor (MITF) ทำงานซึ่งมีบทบาททำให้เอนไซม์ทซิเนสทำงานมากขึ้น ส่งผลให้เม็ดสีเมลานินผลิตมากขึ้น

2.6 อิมัลชัน (emulsion)

หมายถึง ผลิตภัณฑ์รูปแบบหนึ่งที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งไม่เข้ากันหรือไม่ละลายในกันและกัน เช่น น้ำและน้ำมัน ถูกนำมาไว้ด้วยกันในลักษณะที่ผสมผสานเข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยอาศัยตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) อิมัลชันที่เกิดขึ้นถ้ามองด้วยตาเปล่าจะเห็นลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2540) แต่ถ้าส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็น 2 วัฏภาค คือ หยดเล็กๆ ของของเหลวชนิดหนึ่งซึ่งเรียกว่า วัฏภาคภายใน (internal or dispersed phase) กระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเรียกว่า วัฏภาคภายนอก (external or continuous

phase) โดยทั่วไปหยดของวัฏภาคภายในอาจทำให้มีขนาดต่าง ๆ กันได้ตั้งแต่เล็กกว่า 0.05 ไมครอน จนถึง 25 ไมครอน ซึ่งขนาดหยดอนุภาคของวัฏภาคภายในนี้มีผลต่อการกระจายแสงได้ต่างกัน จึงทำให้อิมัลชันมีลักษณะภายนอกที่มองเห็นได้แตกต่างกัน

แบ่งตามชนิดของอิมัลชัน ได้เป็น 3 ชนิด

1. อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O emulsion) อิมัลชันชนิดนี้มีวัฏภาคภายในเป็นน้ำ วัฏภาคภายนอกเป็นน้ำมัน พบอิมัลชันชนิดนี้บ้างในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีมล้างหน้า (cleansing cream) ครีมนวดหน้า (massage cream) ครีมทากลางคืน (night cream) และครีมฮอร์โมน (hormone cream) เป็นต้น เนื่องจากอิมัลชันชนิดนี้มีความเหนอะหนะและล้างน้ำออกยาก จึงเป็นที่นิยมใช้น้อย

2. อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) อิมัลชันชนิดนี้กับชนิดแรก คือ มีวัฏภาคภายในเป็นน้ำมัน วัฏภาคภายนอกเป็นน้ำ จึงมีความเหนอะหนะน้อย ทาแล้วกระจายดี ล้างน้ำออกง่ายเป็นที่นิยมมากในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น ครีมและโลชั่นทาผิว (body cream and lotion) ครีมทาหน้า (vanishing cream) ครีมรองพื้น (foundation cream) ครีมทากันแดด (sun screen cream) เป็นต้น

3. อิมัลชันเชิงซ้อน (multiple emulsion) เป็นอิมัลชันที่มีวัฏภาคภายในซ้อนกันอยู่ ซึ่งเป็นของเหลวต่างชนิดกัน เช่น น้ำในน้ำมันในน้ำ หรือ น้ำมันในน้ำในน้ำมัน (W/O/W หรือ O/W/O) อิมัลชันเชิงซ้อนนี้สามารถกลับกลายเป็นอิมัลชันธรรมดาได้ เช่น W/O/W ซึ่งมีน้ำเป็นวัฏภาคภายนอก แต่วัฏภาคภายในซึ่งเป็นน้ำมันจะมีหยดเล็กๆ ของน้ำซ้อนอยู่อีกที เมื่อกลับกลายเป็นอิมัลชันธรรมดาจะกลายเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W) พบอิมัลชันชนิดนี้บ้างในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น cold cream ซึ่งเป็นชนิด O/W/O เป็นต้น

แบ่งความหนืดของอิมัลชันได้เป็น 2 ชนิด

1. โลชั่น (lotion) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดต่ำ เพราะมีวัฏภาคภายนอกในปริมาณที่สูง วัฏภาค ภายในมักไม่เกิน 35% เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดในผลิตภัณฑ์ทาผิวโดยเฉพาะผิวหนังที่มีบริเวณกว้าง เพราะทาแล้วชุ่มชื้นไม่เหนอะหนะ ดูดซึมดีให้ความรู้สึกสบายและล่างน้ำออกได้ง่าย เช่น โลชั่นทาผิว โลชั่นป้องกันแสงแดด ซึ่งโลชั่นนี้อาจใช้สารเพิ่มความหนืด (thickening agent) ในวัฏภาคน้ำให้หนืดขึ้นได้แต่ยังคงเป็นของเหลวที่ไหลได้

2. ครีม (cream) เป็นอิมัลชันที่มีความหนืดสูง เพราะมีส่วนประกอบของสารพวกไขแข็ง (waxes) และไขมัน (fatty acid or fatty alcohol) ซึ่งช่วยเพิ่มความหนืด และเนื้อครีมผสมอยู่กับน้ำมันในวัฏภาคน้ำมัน ครีมมักจะมีความหนืดมากกว่าโลชั่น เพราะมีปริมาณวัฏภาคภายในสูงกว่า คือ

ประมาณ 35–75 % โดยมีการใช้สารเพิ่มเนื้อครีม (bodying or stiffening agent) เช่น ไขมัน และไขแข็ง และถ้าเป็น ชนิด O/W emulsion อาจมีการใส่สารเพิ่มความหนืดร่วมด้วย เช่น acacia, veegum เป็นต้น

สามารถแยกองค์ประกอบพื้นฐาน ในสูตรตำรับอิมัลชันที่ซึ่งมักใช้กับผิวหนังเป็นส่วนใหญ่ ตามหน้าที่ของสารในสูตรได้ดังนี้ (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2540)

1. สารอิมอลเลียนต์ (emollients) ได้แก่ น้ำมัน ไขมัน และไขแข็งต่าง ๆ ซึ่งสารเหล่านี้จัดเป็นวัฏภาคน้ำมัน ควรเลือกสารที่มีองค์ประกอบคล้ายไขผิวหนัง ทำให้ผิวไม่แห้งโดย occlusive action คือปิดกั้นไม่ให้น้ำระเหยไป มักเป็นพวก oleaginous substance emollient ชนิดต่างๆ ได้แก่

1.1 hydrocarbon เป็นสารที่ไม่มีสี ไม่กลิ่น ไม่หืนและคงตัวดี ได้แก่ mineral oil, petrolatum, paraffin wax ทำให้เกิดฟิล์มกันน้ำ ไม่แทรกซึมสู่ผิวหนัง

1.2 lanolin and derivative เป็นสารที่สกัดได้ต่อมไขมันแกะ มีส่วนประกอบเป็นสารเชิงซ้อนพวก ester, diesters และ hydroxyester ของ fatty acid เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำแต่อุ้มน้ำ ทำให้ผิวหนังที่แห้งกลับตื้นสภาพชุ่มชื้นและยืดหยุ่น ความเข้มข้นที่ใช้ได้ไม่เกิน 5% ถ้าเกิน 5% ผิวหนังจะรู้สึกเหนอะหนะ

1.3 phospholipids เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายในไขมัน ประกอบด้วย fatty acid, glycerol, nitrogenous base และ Phosphoric acid สารนี้พบได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ lecithin ใช้ในความเข้มข้นไม่เกิน 1–2%

1.4 fatty acids ที่นิยมมากคือ stearic acid ให้ความชุ่มชื้นโดยเป็นฟิล์มบางๆ ปกคลุมผิวหนังและอุ้มน้ำไว้ในโมเลกุล เพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง ต่างจากสารอื่นที่ฟิล์มจะแห้งและไม่เป็นมัน ความเข้มข้นที่ใช้ คือ 1–20 % แล้วแต่ความหนืดที่ต้องการ oleic acid ใช้เมื่อต้องการประกายมุกแต่ไม่นิยมใช้มากเพราะเหม็นหืนง่าย ต่อมาจึงผลิต oleic acid ให้มี Polyunsaturated ต่ำ เพื่อลดการเหม็นหืน

1.5 fatty acid ester ได้แก่ butyl stearate, isopropyl myristate มีความหนืดต่ำ เคลือบผิวหนังเป็นฟิล์มบางๆ ไม่เป็นมัน ไม่เหนียวเหนอะหนะ ความเข้มข้นที่ใช้ คือ 2–20%

1.6 fatty alcohol เช่น cetyl และ stearyl alcohol ใช้ได้ดีมาก lauryl และ myristyl ใช้น้อย จะทำให้เกิดฟิล์มคลุมผิวหนังให้ความชุ่มชื้นดีใช้ cetyl และ stearyl alcohol ร่วมกัน เพื่อให้มีจุดหลอมเหลวสูง มักใช้อย่างละ 0.2%

2. สารฮิวเมกแตนต์ (humectant) ได้แก่ สารที่เพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง ตัวอย่างเช่น propylene glycol, glycerin และ sorbitol (active ingredient) เป็นสารที่เติมลงในเครื่องสำอางแต่ละประเภทต่างๆ โดยเฉพาะ เช่น สารกันแดด สารชำระล้าง และ สารอาหารและวิตามินที่จำเป็นแก่ผิวหนัง ได้แก่ vitamin A และ wheat germ oil

3. ตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) ที่นิยมใช้มากที่สุดในเครื่องสำอาง คือ สารลดแรงตึงผิว

3.1 anionic

3.2 cationic

3.3 nonionic อาจใช้ร่วมกับ anionic และ cationic

4. สารเพิ่มความหนืด (thickener) เป็นสารซึ่งเพิ่มความหนืดในวัฏภาคน้ำทำให้ครีมนั้นมีเนื้อข้น มักเตรียมอยู่ในรูป solution หรือ dispersions ในน้ำก่อนนำไปผสมกับยาอื่นๆ แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

4.1 สารที่เกิดจากธรรมชาติ ได้แก่ วีกัม (veegum) ทากาแคนท์ (tragacanth) แอลจิเนต (alginate) เมทิลเซลลูโลส (methyl cellulose: MC) คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, CMC)

4.2 สารที่ได้จากการสังเคราะห์ ได้แก่ คาร์โบพอล (carbopol) พีวีพี (polyvinyl pyrollidone, P.V.P)

5. สารกันเสีย (preservative) ใช้เพื่อป้องกันผลิตภัณฑ์จากการปนเปื้อนและถูกทำลายโดยเชื้อจุลินทรีย์

6. สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) เติมในกรณีที่สูตรตำรับมีสารซึ่งไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน

2.7 การประเมินคุณภาพอิมัลชัน

การประเมินคุณภาพของอิมัลชัน จำเป็นต้องมีการทดสอบเป็นขั้นตอน เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตออกมาจำหน่ายเป็นที่ยอมรับและเชื่อถือได้จริงๆ (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2540, น. 181–184) ควรมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

1. การทดสอบในห้องปฏิบัติการ (laboratory test) เป็นการประเมินผลขั้นตอนโดยการตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ว่าเข้าเกณฑ์มาตรฐานตามที่ตั้งไว้หรือไม่มีการทดสอบดังนี้

1.1 ตรวจวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณตัวยาสำคัญ สารกันบูด เป็นต้น

1.2 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพเคมี เช่น ความหนืด pH และการไหล

1.3 การทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น การแยกชั้นหรือตกตะกอน

1.4 การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

1.5 การทดสอบด้านประสาทสัมผัส เช่น สี กลิ่น ความเนียนของเนื้อครีม การดูดซึมเมื่อใช้ทาบนผิว เป็นต้น

2. การทดสอบคุณภาพด้านการใช้ของผลิตภัณฑ์ (performance test) เป็นการตรวจสอบว่าผลิตภัณฑ์นั้นให้ผลการใช้ตามจุดประสงค์หรือไม่ โดยการใช้อาสาสมัครทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ เช่น ทาครีมที่ผิว ทาแล้วมีความรู้สึกพอใจหรือไม่ อาจให้ตอบคำถามในแบบสอบถามตามเกณฑ์ที่ผู้ผลิตตั้งไว้

3. การทดสอบผลต่อร่างกาย (physiological test) เป็นการทดสอบว่าผลิตภัณฑ์ มีผลเสียหรือเป็นอันตรายต่อร่างกายหรือไม่ เช่น ทำให้เกิดการแพ้ หรือระคายเคืองหรือไม่ โดยการทำ patch test และ sensitization test ทำให้เกิดความเป็นพิษหรือไม่

4. การทดสอบด้านความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ (stability test) ความคงสภาพของอิมัลชันเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องทำการทดสอบ เพราะผลิตภัณฑ์ที่ดีเมื่อผลิตเสร็จใหม่ๆ ภายหลังการเก็บหรืออยู่ในท้องตลาด อาจถูกกระทบกระเทือนโดยปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ การขนส่ง แสง อาจทำให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม เช่น การตกตะกอนหรือแยกชั้น การเปลี่ยนแปลงสี กลิ่น การแห้งของเนื้อครีม การเสื่อมหรือแตกของภาชนะบรรจุ ตลอดการเสื่อมเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ปะปนมา

คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของอิมัลชันที่ควรนำมาประเมิน มีดังนี้

1. ความหนืดและคุณสมบัติการไหล
2. ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาค
3. การสูญเสียน้ำและสารระเหยออกจากผลิตภัณฑ์
4. การเปลี่ยนแปลงของ phase to volume ratio
5. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)
6. ความเนียนและการแยกชั้น
7. การปนเปื้อน
8. ความคงตัวของตัวยาสำคัญและสารปรุงแต่งในผลิตภัณฑ์

2.8 การทดสอบความคงสภาพของอิมัลชัน

อิมัลชันเป็นระบบที่ไม่คงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ อาจเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลาภายหลังการผลิต เนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ ดังนั้นก่อนออกจำหน่ายจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความคงสภาพของอิมัลชันระหว่างการเก็บรักษา ในระยะเวลายาวนานเท่ากับอายุการเก็บรักษา (shelf life)

1. การเร่งโดยอุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่สำคัญในการสายตัวของสารเคมีในตำรับผลิตภัณฑ์ แต่การเร่งโดยใช้อุณหภูมิสูงนี้ ยังไม่เป็นที่ยอมรับ เพราะอิมัลชันเป็นระบบ 2 วัฏภาค เมื่ออุณหภูมิสูงส่งผลให้ค่า HLB เปลี่ยนไป แต่อย่างก็ตามในการคัดเลือกสูตรอิมัลชันที่ดี โดยทั่วไปก็ยังใช้การทดสอบแบบเร่งด้วยอุณหภูมิ เพราะอิมัลชันที่คงทนต่อความร้อนได้ดีมักจะคงทนต่ออุณหภูมิได้ดีด้วย การเร่งมักทำที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส นิยมใช้ 37–45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1–3 เดือน จากนั้นประเมินผลทดสอบ นอกจากนี้ยังมีการเร่งอุณหภูมิต่ำ อิมัลชันอาจแยกชั้นเนื่องจากตัวทำอิมัลชันหรือ wax ตกตะกอน ถ้าเย็นมากน้ำจะกลายเป็นน้ำแข็ง เป็นเกล็ดแยกออกจากน้ำมันได้ จึงเป็นการเร่งการสลายตัวของอิมัลชัน (พิมพร ลีลาพรพิสิฐ, 2540)

การใช้อุณหภูมิต่ำสลับสูงมี 2 ลักษณะคือ

1.1. heating cooling cycle โดยการเก็บอิมัลชันในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเข้าตู้อบที่ 45 องศาเซลเซียส อีก 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบรวมทั้งสิ้น 6 ถึง 8 รอบแล้วนำมาประเมินผล

1.2. freeze and thaw cycle โดยการเก็บอิมัลชันในช่องแข็ง 20 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเข้าตู้อบที่ 25 องศาเซลเซียส อีก 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบรวมทั้งสิ้น 6 ถึง 8 รอบแล้วนำมาประเมินผล

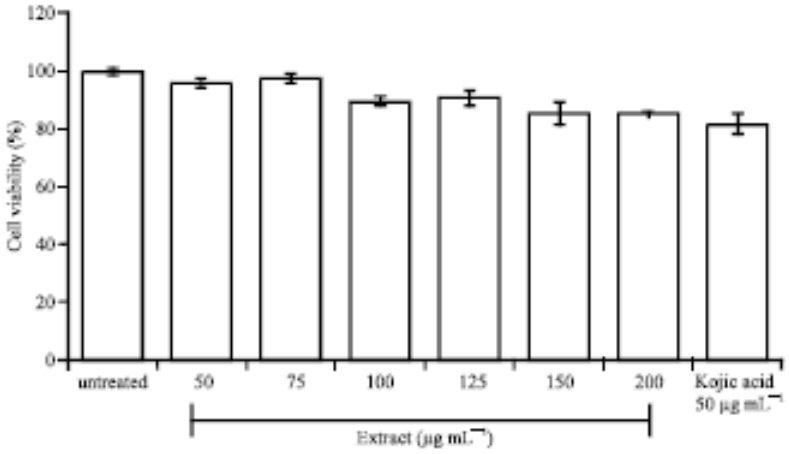
2. การเร่งโดยแสงพลังงานแสงอาจเร่งให้เกิดการซีดจางการเปลี่ยนสี กลิ่น หรือ เกิดปฏิกิริยาเคมีตัวทำอิมัลชัน น้ำมันบางชนิดในสูตรตำรับอาจสลายตัวโดยแสงทำให้ อิมัลชันมีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม จึงควรทำการทดสอบอย่างยิ่ง

3. การเร่งโดยใช้แรงโน้มถ่วงโลก อาจทำได้โดยปั่นเหวี่ยง (centrifuge) หรือ การเขย่า (shake) การปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงจะเร่งการตกตะกอนของอิมัลชัน

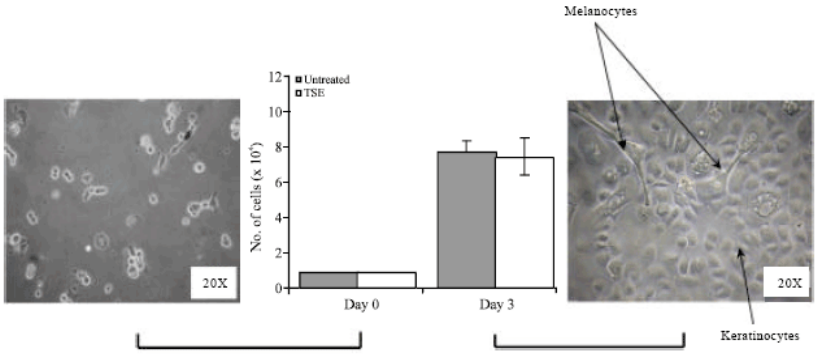
2.9 ความเป็นพิษของสารสกัด

การศึกษาด้านความเป็นพิษของพืชสมุนไพร ทำให้ผู้บริโภคลดความเสี่ยงต่อการใช้สมุนไพร การทราบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดเป็นเรื่องสำคัญ จากกงานวิจัยของเพชรดี และคณะ (2555) พบว่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ B16–F1 mouse melanoma ที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ด

มะขามที่ความเข้มข้นในช่วง 50–200 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าสูงเกือบร้อยละ 100 และมีค่าสูงกว่าร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ B16–F1 mouse melanoma ที่ได้รับ kojic acid ความเข้มข้น 50 µg/mL ซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายในเครื่องสำอาง



ภาพที่ 2.5 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ B16–F1 mouse melanoma ที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้นในช่วง 50–200 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งแต่ละแถบแสดงค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของการศึกษา 3 ชุด เทียบกับสาร kojic acid



ภาพที่ 2.6 การทำงานและลักษณะเซลล์เคราติโนไซต์-เมลาโนไซต์ของมนุษย์ที่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ความเข้มข้น 200 µg/mL (แถบขาว) และไม่ได้รับสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม (TSE) (แถบเทา) ในวันที่ 0 และวันที่ 3 แต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของการศึกษาจาก 3 ชุดของเซลล์เม็ดสีบนชั้นผิว

2.10 พืชที่ใช้ในการวิจัย

ภาพที่ 2.7 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะขามเปรี้ยวยักษ์

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะขามเปรี้ยวยักษ์

มะขามมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tamarindus indica* L. ชื่อสามัญ Tamarind, Indian date อยู่ในวงศ์ Fabaceae – Caesalpinioideae มีชื่อเรียกอื่นๆ ภาคใต้เรียกว่า ขาม ชาวบน-นครราชสีมา เรียก ตะลูบ กะเหรี่ยง-กาญจนบุรี เรียก ม่องโคล้ง เขมร-สุรินทร์ เรียก อำเปียล เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน เรียก หมากแกง และกะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอนเรียก ส่ามอเกล (สรรพคุณสมุนไพร, 2559)

มะขาม เป็นต้นไม้ยืนต้นที่มีประโยชน์หลากหลาย โดยเฉพาะส่วนของผล เป็น พืชพื้นเมืองในเขตร้อนของแอฟริกา และแพร่กระจายไปยังเอเชีย และอเมริกากลาง ประเทศอินเดียและไทย เป็นประเทศที่ปลูกมะขามมากของโลก โดยมีผลผลิต 300,000 และ 140,000 ตันต่อปี ตามลำดับ มะขามมีสองประเภท คือ มะขามเปรี้ยว (พบมากที่สุด) และมะขามหวาน (ส่วนใหญ่มาจากประเทศไทย) สามารถรับประทานสด (ผลสุก) และแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ นอกเหนือไปจากการใช้มะขามในอาหาร ยังมีการใช้มากในอุตสาหกรรมและการแพทย์พื้นบ้าน เภสัชวิทยา (Yahia, E.M., & Salih, N. K.-E., 2011)

มะขามเปรี้ยวยักษ์ เป็นพืชทนแล้ง ปลูกง่าย อายุยืน แสง ชอบแสงแดดเต็มวัน ขนาดทรงพุ่ม 15–20 เมตร ช่วงพักตัว กุมภาพันธ์–เมษายน ช่วงออกดอก พฤษภาคม–กรกฎาคม ช่วงฝักอ่อน มิถุนายน–สิงหาคม ช่วงฝักดิบ กันยายน–พฤศจิกายน ช่วงฝักแก่มกราคม–มีนาคม การเจริญเติบโตเร็ว สำหรับกลางแจ้ง ช้าในที่ร่ม โรคแมลง แมลงและหนอนกินดอกและใบอ่อน ระยะที่ใช้ในการปลูก 10 x 10 เมตร ลำต้นแข็งแรง มีเปลือกสีน้ำตาลอ่อนและแตกสะเก็ดเป็นร่องเล็กๆ ซึ่งใช้ในการจำแนกพันธุ์ได้ ปลายกิ่งมะขามมักจะห้อยลง ลำต้นแข็งแรงมาก เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ใบเป็นไม้ใบรวมจะออกใบเป็นคู่ๆ เรียงกันตามก้านใบก้านหนึ่งมีประมาณ 10–18 คู่ ลักษณะของใบย่อยเป็นรูปขอบขนาน ปลายใบ และโคนใบโค้งมน มีสีเขียวแก่ ใบจะลู่หรือหุบในเวลาที่ไม่มีแสงดอก จะมีสีเหลืองและมีจุดประสีแดงอยู่ตรงกลางดอก ออกดอกเป็นช่อเล็ก ๆ อยู่ตามบริเวณปลายกิ่ง เป็นช่อแบบ ราซีม ช่อหนึ่งมีดอกประมาณ 10–15 ดอก ดอกเล็กมีกลีบดอก 5 กลีบ ซึ่งมองเห็นชัดเพียง 3 กลีบ ส่วนอีก

2 กลีบ มองเห็นชัดเพียงเป็นเกล็ดเล็กๆ อยู่ด้านหลังเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ดอกจะออกในช่วงฤดูฝน ดอกมีรสเปรี้ยว ผลเมื่อดอกร่วงก็จะติดผล มีรูปร่างยาวหรือโค้งงอ เปลือกหนาไม่แตกมีสีน้ำตาลปนเขียว เมื่อแก่จะเป็นสีน้ำตาลอมเทา ข้างในผลมีเนื้อเยื่อ แรกๆ มีรสเปรี้ยว มีผลที่โตมาก มะขามคราบหมู คือ มะขามกำลังจะสุก หรือ ระหว่างสดกับแก่ เมล็ด ขณะยังอ่อนจะมีสีเขียว และค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจนถึงดำ ใน 1 ฝัก อาจจะมีเมล็ด 1–17 เมล็ด ลักษณะค่อนข้างใหญ่แบน

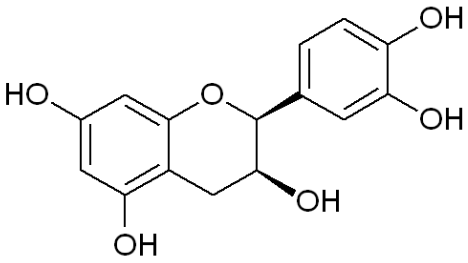
สรรพคุณทางยานำส่วนราก ใช้แก้ท้องร่วง สมานแผล รักษาเริม และงูสวัด เปลือกต้น แก้ไข้ตัวร้อน แก่น กล่อมเสมหะ และโลหิต ขับโลหิต ขับเสมหะ รักษาฝีในมดลูก รักษาโรคบุรุษ เป็นยาชักมดลูกให้เข้าอู่ ใบสด (มีกรดเล็กน้อย) เป็นยาถ่าย ยาระบาย ขับลมในลำไส้ แก้ไอ แก้บิด รักษาหวัด ขับเสมหะ หยอดตารักษาเยื่อตาอักเสบ แก้ตามัว ฟอกโลหิต ขับเหงื่อ ต้มผสมกับสมุนไพรอื่นๆ อาบหลังคลอดช่วยให้สะอาดขึ้น เนื้อหุ้มเมล็ด แก้อาการท้องผูก เป็นยาระบาย ยาถ่าย ขับเสมหะ แก้ไอ กระหายน้ำ เป็นยาสวนล้างท้อง ฝักดิบ ฟอกเลือด และลดความอ้วน เป็นยาระบายและลดอุณหภูมิในร่างกาย บรรเทาอาการไข้ เมล็ดในสีขาว เป็นยาถ่ายพยาธิไส้เดือนตัวกลมในลำไส้ พยาธิเส้นด้าย เปลือกเมล็ด แก้ท้องร่วง แก้บิดลมป่วง สมานแผลที่ปาก ที่คอ ที่ลิ้น และตามร่างกาย รักษาแผลสด ถอนพิษและรักษาแผลที่ถูกไฟลวก รักษาแผลเบาหวาน เนื้อในฝักแก่ (มะขามเปียก) รับประทานจิ้มเกลือ แก้ไอ ขับเสมหะ ดอกสด เป็นยาลดความดันโลหิตสูง มีการใช้รักษาแผล โดยนำเมล็ดมากะเทาะเปลือก ต้ม นำมาล้างแผลและสมานแผลได้ (สรรพคุณสมุนไพร, 2559)

มะขามเปียกมีกรดอินทรีย์หลายชนิด กรดมะขามหรือกรดทาร์ทาริค กรดมะนาว หรือกรดซิตริก มีสารเมือกเพคติน น้ำตาลและเส้นใยที่ทนความร้อน และความเย็น มีความเป็นกรดอ่อนๆ จะช่วยขจัดสิ่งสกปรกจากผิวหนังได้ดี ลบรอยกร้านดำ โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นรอยด้าน เช่น ตาตุ่ม ข้อศอก ขาหนีบ ฝ่ามือและบริเวณรักแร้ ทำให้ผิวขาวนุ่มนวลขึ้น น้ำมะขามเปียกที่มีเนื้อปนมาด้วยจะมีคุณสมบัติชำระล้างความสกปรกรูขุมขน คราบไขมันบนผิวหนังได้ดีมาก สำหรับผู้ที่มีผิวมันสามารถใช้มะขามเปียกล้างหน้าแทนสบู่ได้ หรือใช้มะขามล้างสบู่มีความเป็นด่างเพื่อให้กรดจากผลไม้สะเทินผิวให้ได้ pH 5.5-6.5 แต่ไม่ควรใช้กับผู้ที่มีผิวแห้งเพราะจะทำให้ผิวแห้งจนเกินไป (ศศิธร แท่นทอง, 2554 น. 8) ใช้น้ำมะขาม เมื่อนำมาพอกหน้าทิ้งไว้สักครู่ ล้างออกด้วยน้ำสะอาด ผิวจะนุ่มนวล ช่วยลดจุดกระ ฝ้า รอยด่างดำ มีการใช้ล้างหน้าลดริ้วรอยแห้งกร้าน ทำให้ผิวเปล่งปลั่ง สดใส ใช้ปรับสภาพผิวเปล่งปลั่ง สดใส ใช้ปรับสภาพผิว ตำรับพื้นบ้านใช้มะขามเปียก 1 กำมือ นมสดรสจืด 3 ช้อนโต๊ะ น้ำผึ้ง 1 ช้องโต๊ะ หรือผสมกับดินสอพอง เป็นสูตรที่เหมาะกับผู้ที่มีผิวมัน ถ้าผิวแห้งให้ลดมะขามเปียกลง เพิ่มปริมาณนมสดหรือน้ำผึ้งแทน ในอินเดียจะใช้น้ำมะขามเปียกหรือน้ำต้มใบมะขามใส่ในโลชั่น เป็นมากส์ (face mask) พอกหน้า ทำบาล์มทาปาก และสบู่ด้วย (พร้อมจิต ศรลัมพ์, 2555, น. 126)

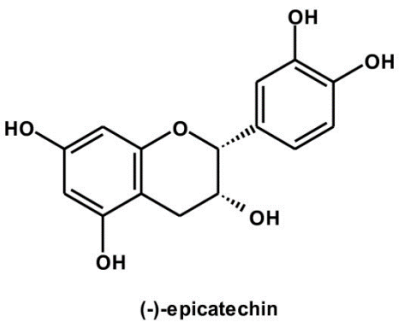
2.11 สารสำคัญในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม

มะขามมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ ใบมีสารแอลกอฮอล์ (Alcohols) ฟีโนลิคเอสเทอร์ (phenolic esters) และอีเทอร์ (ethers) แซมบูไบออส (Sambubiose) กรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acid) กรดออกซาลิก (Oxalic acid) ดอกมีสารอัลฟา ออกโซกลูตาลิก (α-Oxoglutaric acid) กรดไกลโอซาลิก (Glyoxalic acid) กรดออกซาอะซิติก (Oxaloacetic acid) ผลมีแอลกอฮอล์ (Alcohols) อัลดีไฮด์(Aldehydes), กรดซิตริก คีโตน (Citric acid Ketones) วิตามิน บี 1 (Vitamin B1) น้ำมันระเหยง่าย (Essential Oil) เอนไซม์ (Enzyme) เมล็ดมีฟอสฟาติดิวคลอรีน (Phosphatidylcholine) โปรตีน กลูเตลิน (Proteins Glutelin) อัลบูมิน (Albumin) โปรลามีน (Prolamine) เลคติน (Lectin) (สรรพคุณสมุนไพร, 2559)

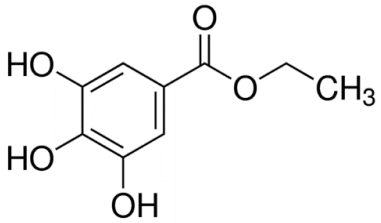
จากรายงานการศึกษาของเพชรดี และคณะ (2012) ในการใช้เมล็ดมะขามในส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามถูกสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีปริมาณฟีนอลิกทีสูงที่สุด มีประสิทธิภาพในการลดเม็ดสี ในสารสกัดจะคำนึกถึงฟีนอลและโพลีฟีนอล ยังเป็นสารประกอบธรรมชาติที่มีความสามารถในการลด oxidative stress เมื่อนำมาใช้กับผิวและแสดงให้เห็นว่าฟีนอลบางส่วนสามารถลดความคล้ำผ่านการยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase สำหรับตัวอย่างสาร คือ catechin epicatechin และ gallate ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ tyrosinase



ภาพที่ 2.8 โครงสร้าง catechin



ภาพที่ 2.9 โครงสร้าง epicatechin



ภาพที่ 2.10 โครงสร้าง gallate

2.12 ประสิทธิภาพ IC_{50} (50% Inhibitory Concentration)

ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไปครึ่งนึง (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) เพชรดี และคณะ (2555) ศึกษากลไกการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินจากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม โดยสกัดสารจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยเอธิลอะซิเตต ทดสอบใน melanoma cells B16-F1 สารสกัดมีค่า inhibited tyrosinase activity (IC_{50}) เท่ากับ 152.1±10.2 µg/ml

2.13 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บุญล้อม สิบหมื่นเปี่ยม (2550) ศึกษาการพัฒนาเจลให้ความชุ่มชื้นผิวจากสารสกัดเมล็ดมะขาม พบว่าสารสำคัญจากเมล็ดมะขาม คือ กลุ่มโพลีแซคคาไรด์ พัฒนาเป็นเจลใส่สารสกัดมะขาม ทดสอบ *In-vivo* Test โดยประเมินประสิทธิภาพความชุ่มชื้นด้วยเครื่อง Coreneo meter/CM825 ในอาสาสมัคร พบว่าสารสกัดเมล็ดมะขาม 1% มีความสามารถเพิ่มความชุ่มชื้นผิวได้ 23.89%, 30.10%, 34.14%, และ 34.69% หลังจากที่ใช้เจลเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ตามลำดับ

อุษณีย์ ตั้งพิจิตรา (2551) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองด้วยวิธี DPPH assay ของสารสกัดกึ่งบริสุทธิ์ และสารสกัดหยาบของเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม พบว่า สารสกัดหยาบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด

สลิลทิพย์ ประสาทพรศิริโชค (2552) ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและความเป็นพิษต่อเซลล์ Normal Human Fibroblast (NHF) พบว่าสารสกัดเมล็ดมะขามด้วยเอทานอล 70% มีฤทธิ์ในการป้องกันและต้านอนุมูลอิสระต่อเซลล์ NHF ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/ml และไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ NHF ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10 µg/ml

วันเซ็ง สิทธิกิจโยธิน และดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข. (2554) กล่าวว่า มะขามจัดเป็นพืชที่มีสรรพคุณทางยาสมุนไพร โดยน้ำต้มจากใบและดอกมะขามสามารถช่วยลดความดันโลหิต มะขามเปียกสามารถเป็นยาระบาย ขับเสมหะ ในขณะที่เมล็ดนำมาใช้เป็นยาแก้ท้องร่วง ยาขับพยาธิ เป็นต้น จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

แต่การศึกษาวิจัยส่วนใหญ่ไม่ได้ระบุชนิดของมะขาม และแหล่งที่มาที่แน่นอนของเมล็ดมะขามที่นำมาศึกษา และเนื่องจากมะขามต่างชนิดกันจะมีองค์ประกอบภายในเมล็ดแตกต่างกันออกไป เป็นผลให้ฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระที่ได้แตกต่างเช่นกัน ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการเปรียบเทียบฤทธิ์ของการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวาน และมะขามเปรี้ยว จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวความเข้มข้น 1 ถึง 100 µg/mL มีปริมาณฟีนอลอยู่ในช่วง 0.233±0.001 ถึง 1.09±0.04 µg เมื่อคำนวณเป็น gallic acid และมี ร้อยละการยับยั้งสาร Diphenyl ถึง 2-picrylhydrazyl (DPPH) อยู่ในช่วง 41.01±4.92 ถึง 91.64±1.38 โดยความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวาน 1 ถึง 100 µg/mL มีปริมาณฟีนอล อยู่ในช่วง -0.04±0.006 ถึง 1.06±0.009 µg เมื่อคำนวณเป็น gallic acid และมีร้อยละการยับยั้งสาร DPPH อยู่ในช่วง 3.2±3.3 ถึง 90.49±0.27 จากการเปรียบเทียบสรุปได้ว่า (1) สารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวมีปริมาณฟีนอลและร้อยละการยับยั้งสาร DPPH มากกว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2) ปริมาณสารประกอบฟีนอลสัมพันธ์กับร้อยละการยับยั้งสาร DPPH และ (3) สารฟีนอลและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความเข้มข้นของสารสกัด

Phetdee *et al.* (2012) ได้ศึกษากลไกการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินจากสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม โดยสกัดสารจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามด้วยเอธิลอะซิเตต ทดสอบใน melanoma cells B16-F1 เมื่อเติมสารสกัดลงไป 24 ชั่วโมง ทำให้เซลล์สามารถจับในตำแหน่งที่ถูกกระตุ้นด้วย α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างเมลานินได้ 20-32% เมื่อเติม α-MSH หลังจากเติมสารสกัดวัดที่ 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถยับยั้งการสร้างเมลานินได้ 42-59% ให้ผลใกล้เคียงหรือเทียบเท่ากับกรดโคจิก (kojic acid) ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ได้รับความนิยม เท่ากับ (50 µg/ml) สารสกัดมีค่า inhibited tyrosinase activity (IC_{50}) เท่ากับ 152.1±10.2 µg/ml

วันเชิง สิทธิกิจโยธิน และดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข (2554) ศึกษาการเตรียมผงปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม นำเมล็ดมะขามล้างน้ำให้สะอาดนำไปผึ่งแดด 1 วันหรือจนกว่าจะแห้งจากนั้นแกะเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามออกและนำมาบดจนละเอียดผ่านตะแกรงร่อนขนาด 355 ไมครอน และเก็บผงเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามไว้ที่ตู้ดูดความชื้นจนกว่าจะนำมาทำการทดลองในขั้นตอนต่อไปการสกัดสารสกัดหยาบจากผงเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามนำผงเปลือกเมล็ดมะขาม 100 g. สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 100% ปริมาณ 500 ml จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมงกรองด้วย vacuum filter ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ทำการระเหยเอทานอลด้วย steroglass rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-134) ที่อุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียสและอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สารสกัดหยาบจากเปลือกเมล็ดมะขามที่ได้มีลักษณะเป็นผง เก็บที่ตู้ดูดความชื้น

น้ำหนักสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ได้ คือ 24.18 กรัม คิดเป็นร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบที่ได้ต่อผงเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามโดยน้ำหนัก (% yield dry weight) คือ 24.18

เสาวลักษณ์ รุ่งแจ้ง และ Hiroshi Shinmoto (2556) ศึกษาการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกเมล็ดมะขามโดยตัวทำละลาย พบวาการสกัดสารต่านอนุมูลอิสระ ด่วยคลื่นอัลตร่าโซนิค ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสโดยใชเมทานอลเปนตัวทำละลายใหความสามารถในการตาน อนุมูลอิสระสูงที่สุดฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และการลดทอนฤทธิ์ของอนุมูลอิสระของสารสกัดดวยเมทานอลใหผลใกล่เคียงหรือเทียบเท่า Trolox สารที่สกัดโดยใชเมทานอลและเอทานอลที่ความเข่มข่น 0.5 มิลลิกรัมตอมิลลิลิตร มีความสามารถจับประจุของอิออนเหล็กรอยละ 85.08 และ 82.03 ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดโดยใชเอทิลอะซีเตตไมแสดงฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH การลดทอนฤทธิ์อนุมูลอิสระและความสามารถจับประจุของอิออนเหล็ก

ภัคสิริ สินไชยกิจ และไมตรี สุทธจิตต์ (2554) พบว่าเปลือกเมล็ดมะขามที่เหลือทิ้งถูกนำไปสกัดสำหรับผลิตเป็นครีมบำรุงผิวโดยกลุ่มแม่บ้านตำบลหนองหล่ม อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา โรงงานของกลุ่มแม่บ้านตำบลหนองหล่มใช้เครื่องมือราคาไม่แพงในท้องถิ่นในการผลิตครีม ดังนั้น การผลิตต้องหากระบวนการสกัดที่เหมาะสมกับโรงงาน โดยพบว่าการสกัดเปลือกเมล็ดมะขามที่เหมาะสมกับโรงงานคือการใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำสารสกัดน้ำที่ได้ไปผสมกับครีมพื้นเพื่อผลิตเป็นครีมบำรุงผิวและนำไปทดสอบลักษณะทางกายภาพ และความคงตัวของครีมพบว่าครีมบำรุงผิวที่ผลิตโดยเภสัชกร (ครีมสูตรทดลอง) มีปัญหาเรื่องการเปลี่ยนแปลงของสีซึ่งไม่พบในครีมบำรุงผิวสูตรของโรงงาน (ครีมสูตรพัฒนาใหม่) ต่อมากลุ่มผู้วิจัยได้ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซินเนสของครีมบำรุงผิวสูตรทดลองและสูตรพัฒนาใหม่ จากผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกเมล็ดมะขามน่าจะมีคุณสมบัติในการผลิตเป็นครีมเพื่อป้องกันผิวหนังจากอนุมูลอิสระและทำให้ผิวขาวขึ้นได้ การทดลองสุดท้ายกลุ่มผู้วิจัยได้นำครีมบำรุงผิวสูตรโรงงานภายใต้ตราสินค้าแม่แสงดีไปประเมินความพึงพอใจโดยกลุ่มผู้ใช้ผลิตภัณฑ์ พบว่ามากกว่าร้อยละ 80 ของผู้ใช้มีความพึงพอใจในครีมบำรุงผิวสูตรนี้ อย่างไรก็ดี เรื่องของสี กลิ่น และความข้นหนืดของครีมบำรุงผิวยังจำเป็นต้องมีการปรับปรุงต่อไป

จากการวิจัยของ Meléndez กับ Capriles, V.A. (2006) และ Caluwé กับ Halamová, K. และ Damme. (2010) รายงานพบว่าสารสกัดจากใบมะขามมีฤทธิ์ดีในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ 13 ชนิด และยังมีการรายงานว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้อีกด้วย จึงยืนยันได้ว่าสารสกัดจากใบสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียซึ่งสามารถใช้ได้มีประสิทธิภาพดี ในสารสกัดของมะขามนั้นเป็นสารที่สามารถใช้ดื่มเป็นเครื่องดื่มได้ด้วยซึ่งสามารถพบได้หลายประเทศ เช่น ประเทศเบอร์กินา (Burkina) ฟาโซ (Faso) และประเทศเวียดนาม (Vietnam) (El-Siddig *et al*., 2006)

ผลของมะขามมีรายงานว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้มีประสิทธิ์ภาพสูง จากการรายงานตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ซึ่งมีการใช้งานจริงในหลายๆ ลักษณะด้วยกัน (Ray and Majumdar, 1976, Guerin

and Reveillere, (1984, Bibitha *et al*., 2002, Metwali, 2003 and John *et al*., 2004) และยังพบอีกว่ามีการรายงานสารสกัดจากผลมะขามมีฤทธิ์ในการต้านรา *Aspergillus niger* และ *Candida albicans* (El-Siddig *et al*., 1999, El-Siddig *et al*., 2006)

สารสกัดจากฝักมะขามมีฤทธิ์ในการฆ่าหอยและหอยทาก ซึ่งเนื่องจากว่าในฝักมีสารซาโปนินในปริมาณที่สามารถตรวจพบได้และยังสามารถแสดงฤทธิ์ต่อหอยและหอยทาก ซึ่งสามารถพบได้ในผลของมะขามได้อีกด้วย (Imbabi & Abu-Al-Futuh, 1992)

มีผลการวิจัยรายงานว่าสารสกัดจากชั้นน้ำของเมล็ดมะขาม มีฤทธิ์ยับยั้งโรคเบาหวานได้ (Sundaram *et al., 2015*) และมีรายงานของ Al-Fatimi *et al*., 2007 พบว่าสารสกัดจากชั้นเมทานอลของมะขามแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ แสดงการยับยั้งต่อเซลล์ของ FL-cells ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 50 µg/mL.

มะขามมีการใช้ทางการแพทย์อย่างกว้างขวางในหลายประเทศทั่วโลก (Siddhuraju, 2007) และทางยามีการใช้อย่างมากมายในหลายพื้นที่ (Morton, 1987) การใช้ทางยามีการใช้อย่างกว้างขวางมากที่สุดในหลายประเทศซึ่งขึ้นกับการใช้งานสัมพันธ์กับวัฒนธรรมของประเทศเหล่านั้น มีผลิตภัณฑ์หลากหลายประเทศที่ทำมาจากส่วนต่างๆ ของมะขาม อาทิเช่น ใบ ผล และเมล็ด มีการใช้เป็นยาพื้นบ้านของประเทศอินเดียและประเทศอัฟริกา (Jayaweera, 1981, Parrotta, 1990)

มีการรายงานว่าเมล็ดมะขามมีฤทธิ์ในลดอาการอักเสบ ซึ่งมาจากอาการบวมและอักเสบจากโรค (Fook *et al*., 2005) มีนักวิจัยจำนวนมากได้ศึกษาโปรตีน การแก้อาการอักเสบโดยใช้ serine proteinase inhibitor ที่ได้จากเมล็ดมะขามได้ และยังสามารถใช้ผลมะขามเป็นคุณสมบัติที่ช่วยเหลือคือ ใช้ผลมะขามในการลดอาการอักเสบได้ (Rimbau *et al*., 1999)

2.14 กรอบแนวคิดในการวิจัย

ปัญหาผิวพรรณที่เกิดจากการสร้างเม็ดสีผิว (melanin) ที่ผิดปกติ ได้แก่ ฝ้า กระ จุดด่างดำ มีสาเหตุมาจากเซลล์เมลาโนไซต์ที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดสีเมลานินถูกกระตุ้นให้มีการผลิตเมลานินมากเกินไป (hyperpigmentation) ดังนั้นหากต้องการลดการสร้างเม็ดสีผิวจะต้องพยายามลดการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้สารเคมีหรือสารสกัดจากพืชสมุนไพร

ศึกษาวิธีการสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ปรับสภาพสีผิวต้นแบบที่เหมาะสมเพื่อรักษาสารสำคัญและทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	⟶	พัฒนาผลิตภัณฑ์ครีม

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

เมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ (Tamarind seed coat) นำมาจากไร่วิวัชจรัลวงศ์ 49 หมู่ที่ 6 ตำบลทัพหลวง อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000 โดยการอำนวยความสะดวกโดยเจ้าของไร่ ผู้เป็นเจ้าของที่ให้ความอนุเคราะห์กับทางผู้วิจัยเป็นอย่างดี โดยผู้วิจัยได้สัญญาว่าถ้ามีการนำเสนองานในรูปแบบโปสเตอร์ จะได้นำไปมอบให้ทางเจ้าของไร่ได้ติดประกาศไว้ในส่วนของการประชาสัมพันธ์ต่อไป

3.2 เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ

3.2.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางกายภาพ

1. ถาดสแตนเลส
2. โหลแก้ว
3. บีกเกอร์ (BEAKER) ขนาด 50, 100, 250 และ 1000 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
5. กระดาษกรองชนิดหยาบ
6. กรวยกรอง (funnel) ขนาดเล็ก
7. stand and ring camp
8. แท่งแก้ว (stirring rod)
9. pipette tip ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
10. ขวดแก้วสีชา

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี

1. เครื่องชั่งวิเคราะห์ 2 ตำแหน่ง รุ่น adventurer ยี่ห้อ Ohaus Corp. Pine Brook, NJ ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องชั่งวิเคราะห์ 4 ตำแหน่ง รุ่น QUINTIX224-15 ยี่ห้อ Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

3. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) รุ่น SB-1000 ยี่ห้อ EYELA บริษัท Tokyo rikakikai Co., Ltd, ประเทศญี่ปุ่น
4. เครื่องปั่นกวนความเร็วสูง (homogenizer) รุ่นL5M ยี่ห้อ SILVERSON ประเทศอังกฤษ
5. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader) รุ่น EZ read 2000 ยี่ห้อ Biochrome ประเทศอังกฤษ
6. ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิต่ำ (cooled incubators) รุ่น APP.NO. 00111 ยี่ห้อ contherm ประเทศเยอรมนี
7. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น CV250 บริษัท Aerex Instruments, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. เครื่องวัดค่าพีเอส (pH meter) รุ่น STARTER 2100 ยี่ห้อ OHAUS ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. เครื่องดูดความชื้น (desiccator)
10. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB22 ยี่ห้อ memmert ประเทศเยอรมนี
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifugal) รุ่น force 1418 ยี่ห้อ Force micro ประเทศเยอรมนี
12. เครื่องวัดความหนืด (viscometer) รุ่น DV–I prime ยี่ห้อ BROOKFIELD ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบช่องเดียว (single channel pipette)
14. เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบ 8 ช่อง (multi-channel pipette) รุ่น jrans ferpettr S ยี่ห้อ Brand
15. เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) รุ่น VX-200 ยี่ห้อ Labnet
16. เตาให้ความร้อน (hotplate) รุ่น 18715 ยี่ห้อ EGO ประเทศเยอรมนี
17. ตู้ดูดความชื้น (incubator)
18. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
19. จานหลุม 96 หลุม (96-well plates)

3.3 สารเคมี

1. น้ำปราศจากประจุ (deionize water)
2. เอทานอล 95% และ เอทานอล 99%
3. silica (Si-5 sildex H-52)
4. glyceryl stearate (and) PEG-100 stearate
5. dicaprylyl ether
6. dimethicone
7. cetostearyl alcohol
8. carbomer
9. isopropyl palmitate
10. glycerine
11. disodium EDTA
12. Tamarindus indica seed coat extract
13. 10% sodium hydroxide
14. propylene glycol (and) diazolidinyl urea (and) methylparaben (and) propylparaben
15. fragrance
16. propylene glycol
17. carbonic anhydride (dry ice)

3.4 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.4.1 การเตรียมวัตถุดิบ

คัดเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ เป็นลักษณะเมล็ดที่มีความสมบูรณ์ทุกเมล็ด (ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณชุมพล วิวัชจรัลวงศ์ ไร่วิวัชจรัลวงศ์ จังหวัดนครปฐม) นำเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์มาล้างให้สะอาดและทำไปทำให้แห้ง จากนั้นนำน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ทุบให้ละเอียดใส่ลงในถังที่มีฝาปิดสนิท นำเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์มาวางและนำน้ำแข็งแห้ง (dry ice) มาวางทับอีกชั้นทิ้งไว้ 30 60 และ 90 นาที จากนั้นนำเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์มากะเทาะเอาเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามออกให้หมด นำเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ได้มาอบที่ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ถุงเมทัลไลท์ (metalite) พ่นก๊าซไนโตรเจน 1 ครั้ง จนอากาศออกหมด จากนั้นรีดเอาก๊าซไนโตรเจนออกจากถุงและพ่นก๊าซไนโตรเจนซ้ำอีก 1 ครั้ง

และปิดปากถุงซิปฟรอยด์พร้อมซิลปิดถุงให้สนิท เมื่อต้องการใช้เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์นำมาบดให้ละเอียดจากนั้นนำมาผ่านตะแกรงร่อนขนาด 60 mesh

3.4.2 การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (solvent extraction)

นำผงเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่เตรียมไว้มาทดลองการทำการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล 95% เอทานอล 99% และเอทานอล 95% : น้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:1 โดยนำผงเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่เตรียมไว้มาสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดในอัตราส่วน 1:5 ในแต่ละหลอดทดลอง จากนั้นมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 3 นาที และนำไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้ไประเหยจนแห้งสนิท จากนั้นนำไปหาร้อยละผลผลิต

%yield = 100 x (น้ำหนักของสารสกัดที่ได้/น้ำหนักของเปลือกแห้งที่นำมาสกัด)

3.4.3 การทดสอบแป้งในสารสกัดแต่ละชนิด

จากผลการทดลอง ข้อ 3.4.2 นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละชนิดตัวทำละลายมาทดสอบหาแป้งในสารสกัด โดยนำสารสกัดหยาบ 0.1 กรัม มาทำละลายในตัวทำละลาย คือ เอทานอล 95% เอทานอล 99% และ เอทานอล 95% : น้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:1 ในอัตราส่วน 1:5 ในแต่ละหลอด จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 3 นาที หรือจนละลาย จากนั้นนำไปหยดสารละลายไอโอดีน หลอดละ 5 หยด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตและบันทึกผลการทดลอง

3.4.4 การทดสอบน้ำตาลในสารสกัดแต่ละชนิด

จากผลการทดลอง ข้อ 3.4.2 นำสารสกัดที่ได้ในแต่ละชนิดตัวทำละลายมาทดสอบหาน้ำตาลในสารสกัดโดยนำสารสกัดหยาบ 0.1 กรัม มาทำละลายในตัวทำละลาย คือ เอทานอล 95% เอทานอล 99% และเอทานอล 95% : น้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:1 ในอัตราส่วน 1:5 ใน 3 หลอดการทดลอง อีกหลอดการทดลองใส่ กลูโคส 0.1 กรัม และ น้ำ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 3 นาที หรือจนละลาย จากนั้นนำไปทดสอบหยดสารละลายเบเนดิกต์ (Benedict’s test) หลอดละ 5 หยด นำไปต้มที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 45 องศาเซลเซียส 5 นาที สังเกตสีตะกอน และบันทึกผล

3.4.5 การสกัดตัวอย่างด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

จากผลการทดลอง ข้อ 3.4.2 นำผงเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม 100 กรัม สกัดด้วยเอทานอล 99% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaking incubator) ที่ 120 rpm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน วันละ 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทำการระเหยเอทานอลด้วยเครื่องกลั่นแยกสาร (rotary evaporator)

ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะได้สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเป็นของเหลวหนืด จากนั้นนำไประเหยให้แห้งดีด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จนสังเกตว่าแห้งสนิทแล้ว ประมาณ 1–2 ชั่วโมง โดยน้ำหนักสารที่สกัดได้นำมาคำนวณหาร้อยละผลผลิตที่ได้

%yield = 100 x (น้ำหนักของสารสกัดที่ได้/น้ำหนักของเปลือกแห้งที่นำมาสกัด)

3.4.6 การทดสอบหาตัวทำละลายที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบ

นำสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์มาทดสอบการละลายโดยใช้อัตราส่วนในการละลายของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 : 5 ซึ่งตัวทำละลายได้แก่ น้ำปราศจากประจุ เอทานอล 99% และเอทานอล 95% บิวทิลีนไกลคอลและโพรพีลีนไกลคอล โดยชั่งสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์น้ำหนัก 0.2 กรัม ใส่ในไวแอล เติมตัวทำละลาย 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดูการละลายเบื้องต้นด้วยการสังเกตด้วยสายตา หากไม่ละลาย ให้นำไปใส่ในเครื่องเขย่าสารโดยใช้เสียงความถี่สูง (ultrasonic bath sonicator) เป็นเวลา 3 นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง หรือเพิ่มตัวทำละลายครั้งละ 1 เท่า จากนั้นประเมินลักษณะทางกายภาพและนำไปทดสอบการละลายด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifugal) ที่ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที (การสกัดแยกกรดนิวคลิอิกจากแหล่งต่างๆ, ม.ป.ป.) และบันทึกผลการทดลอง

3.5 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

3.5.1 การเตรียมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์

ชั่งสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ 0.1 กรัม (100 มิลลิกรัม) ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรขนาด 1 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางกับโพรพิลีนไกลคอลด้วยความเข้มข้นต่างๆ

3.5.2 เตรียม 67 mM Phosphate buffer (pH 6.8)

ชั่งโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โมโนไฮเดรต (NaH_2PO_4*$2H_2O$) ปริมาณ 5.616 กรัม และชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4.anhydrous) ปริมาณ 4.40 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter

3.5.3 เตรียม 25 mM ของ L-dopa ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ชั่งสาร L-dopa 0.0492 มิลลิกรัม มาละลายใน 67mM phosphate buffer (pH 6.8) ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร

3.5.4 เตรียม mushroom tyrosinase 60U

ชั่งเอนไซม์ mushroom tyrosinase 0.0028 กรัม มาละลายใน 67 mM phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตรให้ได้ 2.8 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางสาร 96 เท่า

3.5.5 เตรียมสาร kojic acid

ชั่งสาร kojic acid 0.1 กรัม (100 มิลลิกรัม) ละลายใน phosphate buffer (pH 6.8) ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ

3.5.6 เตรียมสาร α–arbutin

ชั่งสาร α–arbutin 0.1 กรัม (100 มิลลิกรัม) ละลายใน phosphate buffer (pH 6.8) ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ

3.5.7 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

ใช้ L-dopa เป็นสารตั้งต้น โดยนำสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ละลายใน 100% เอทานอล และ ละลายในโพรพีลีนไกลคอล แล้วทำปฏิกิริยาในจานหลุม 96 หลุม (96-well plate) ประกอบด้วย สารสกัดสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ปริมาตรหลุมละ 20 µl ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (67mM, pH 6.8) 140 µl เอนไซม์ไทโรซิเนส (60 units/mL) 20 µl และ L-dopa (2.5 mM) 20 µl ใช้เวลาทำปฏิกิริยาที่ 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 492 นาโนเมตร

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ด้วยวิธี dopachrome method โดยดัดแปลงมาจาก งานวิจัยของเพชรดีและคณะ (2555) ได้ทำการทดสอบใน 96-well plates และอ่านผลโดยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader) ซึ่งในแต่ละหลุมใน 96-well plates จะแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่ม A คือ กลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวก ประกอบด้วย 67 mM phosphate buffer 160 µl เอนไซม์ไทโรซิเนส (60 units/mL) 20 µl และ 25 mM L-dopa 20 µl

กลุ่ม B กลุ่มควบคุมที่ให้ผลลบ ประกอบด้วย 67 mM phosphate buffer 180 µl และ 25 mM L-dopa 20 µl

กลุ่ม C กลุ่มทดสอบของสารสกัดที่มีเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยจะมีทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ที่ความเข้มข้นที่ 1, 3 และ 10 µg/mL 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 67 mM Phosphate buffer 140 µl สารสกัดที่ละลายในโพรพิลีนไกลคอล 20 µl เอนไซม์ไทโรซิเนส (60 units/mL) 20 µl และ 25 mM L-dopa 20 µl

กลุ่ม D กลุ่มทดสอบของสารสกัดที่ไม่มีเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยจะมีทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ที่ความเข้มข้นที่ 1, 3 และ 10 µg/mL 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 67 mM phosphate buffer 160 µl สารสกัดที่ละลายในโพรพิลีนไกลคอล 20 µl และ 25 mM L-dopa 20 µl

กลุ่ม E เป็นสารมาตรฐาน ใช้ kojic acid และ **α**–arbutin เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ความเข้มข้น ที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 10 µg/mL 3 ซ้ำ

ผสมสารในแต่ละหลุมให้เข้ากันแล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไมโครเพลทไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

3.6 การตั้งตำรับผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิว

สูตรตำรับครีมปรับสภาพสีผิวดัดแปลงมาจากสูตร skin lightening with emblica (O/W) MDA-A-155-01 (www.personalcaremagazine.com, 2016) และเติมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ (X) โดยคำนวณจากค่า IC_{50} ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์

ตารางที่ 3.1 ตำรับผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิว

Phase	INCI Name	Function	% w/w
A	silica	slip agent	
	glyceryl stearate and PEG-100 stearate	emulsifier	
	dicaprylyl ether	emollient	
	dimethicone	emollient	
	cetostearyl alcohol	wax, bodying	
	isopropyl palmitate	emollient	
B	carbomer	thickener	
	glycerine	humectant	
	disodium EDTA	chelating agent	
	purified water	diluent	
C	propylene glycol	humectant	
	***Tamarindus indica* seed coat extract**	**skin condition agent**	**X**

D	10% sodium hydroxide	neutralize agent	
E	propylene glycol (and) diazolidinyl urea (and) methylparaben (and) propylparaben	preservative	
	perfume	fragrance	
Total			**100.00**

วิธีผสม มีลำดับตั้งแต่ขั้นที่ 1–8

1. ชั่งสาร phase A ทีละตัวลงในบีกเกอร์ ยกเว้น silica (Si-5 Sildex H-52) นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จนได้อุณหภูมิ 70–75 องศาเซลเซียส
2. ชั่งสาร phase B ทีละตัวลงในบีกเกอร์ โดยแยกโปรย carbomer เป็นอันดับสุดท้าย ปั่นกวนด้วย electronic overhead stirrers จน carbomer กระจายตัวดี นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75–80 องศาเซลเซียส
3. โปรย silica (Si-5 sildex H-52) ลงใน phase A ที่หลอมเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว กวนให้กระจายเข้ากันดี
4. ผสม phase A ลง phase B กวนผสมอย่างต่อเนื่องด้วย electronic overhead stirrers
5. ละลาย *Tamarindus seed* coat extract ใน propylene glycol นำ phase C ใส่ใน A/B ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
6. เติมสาร phase D แล้วนำไปเข้าเครื่อง homogenizer จนเป็นเนื้อเดียวกัน
7. จากนั้นเติม phase E ผสมจนอิมัลชันเย็นตัวที่อุณหภูมิห้อง
8. นำไปประเมินลักษณะของตำรับ

3.7 การประเมินลักษณะของตำรับ

ใช้การประเมินลักษณะทางกายภาพ และทางเคมี ของตำรับครีมที่ผสมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ก่อนและหลังการทดสอบความคงตัวสภาวะเร่ง (stability testing)

3.7.1 การประเมินลักษณะทางกายภาพ

ใช้วิธีการสังเกตสี ด้วยตา วัดค่าความข้นหนืดโดยใช้เครื่อง viscometer บันทึกผล

3.7.2 การประเมินค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

โดยวิธีวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter ที่ความดันและอุณหภูมิคงที่ วัดค่าศักย์ไฟฟ้าของสารละลายในรูปของ H^+

3.8 การทดสอบความคงตัวของอิมัลชันในสภาวะเร่ง (stability test)

3.8.1 การทดสอบความคงตัวของอิมัลชันด้วยวิธี heating-cooling cycle

นำตำรับมาทำการทดสอบความคงตัวด้วยวิธี heating-cooling โดยเก็บครีมที่ผสมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ในตู้บ่ม (incubator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บในตู้ให้ความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ เก็บทั้งหมด 6 รอบ ประเมินคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพทุกรอบ บันทึกผล หากพบการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สามารถยอมรับได้ ให้หยุดการทดสอบและรายงานผลการทดลอง

3.8.2 การทดสอบความคงตัวของอิมัลชันด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง

นำตำรับที่ทางผู้วิจัยได้เลือกแล้วมาทำการทดสอบความคงตัวด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifugal) โดยนำครีมที่ผสมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์จากจังหวัดนครปฐม ที่ได้จัดเตรียมไว้แล้วนั้นมา 50 มิลลิกรัม โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 rpm เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและโดยจากการสังเกตลักษณะของผลิตภัณฑ์ตามจุดประสงค์ที่ผู้วิจัยได้ทำการทดลองและค่าที่ดี บันทึกผล

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณค่าการยับยั้ง เอนไซม์ไทโรซิเนสเทียบกับสารมาตรฐาน ตามสูตรดังนี้

$$\%\text{tyrosinase inhibitory} = ((A-B)-(C-D))/((A-B)) \times 100$$

เมื่อตัวแปร มีดังต่อไปนี้

A คือ ค่าการดูดกลืนแสง เมื่อไม่มีตัวอย่างสารสกัด (positive control)

B คือ ค่าการดูดกลืนแสง เมื่อไม่มีตัวอย่างสารสกัดและเอนไซม์ (negative control)

C คือ ค่าการดูดกลืนแสง เมื่อมีตัวอย่างสารสกัด (sample)

D คือ ค่าการดูดกลืนแสง เมื่อมีตัวอย่างสารสกัดแต่ไม่มีเอนไซม์ (blank sample)

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การสกัดพืชจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ จ.นครปฐม

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะขามเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ แตกกิ่งก้านสาขามากเปลือกขรุขระและหนา สีน้ำตาลอ่อน ใบประกอบ ใบเล็กออกตามก้านใบเป็นคู่ ใบย่อยเป็นรูปขอบขนาน ปลายใบและโคนใบมน ใบย่อยมีจำนวน 10–15 คู่ มีขนาดเล็กกว้างประมาณ 2–5 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 1–3 เซนติเมตร ออกรวมกันเป็นช่อยาวประมาณ 2–20 เซนติเมตร ดอกออกตามปลายกิ่ง ดอกมีขนาดเล็กสีเหลืองและมีจุดสีแดงมีสีม่วงแดงอยู่ตรงกลางดอก เนื้อในมีสีน้ำตาล เมล็ดเมื่อแก่แล้วสีน้ำตาล เนื้อปริมาณมากมีรสเปรี้ยวจัด มะขามเปรี้ยวยักษ์ ได้มาจากไร่วิวัชจรัลวงศ์ เลขที่ 49 หมู่ที่ 6 ตำบลทัพหลวง อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม (ภาพที่ 4.2) นำส่วนกิ่งที่มีดอกและใบมาทำตัวอย่างพรรณพืชแห้ง (herbarium specimens) เพื่อนำไปเทียบหารหัสพรรณไม้ ณ สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช เทียบหารหัสของหอพรรณไม้ ตรงกับรหัส BKF 94394 และ BKF 188958 จากจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดนครปฐม ตามลำดับ จากข้อมูลที่กล่าวมาแล้วนั้นทำให้ทราบว่าเป็นสายพันธุ์ผสม (Breeding F1 x F1)

(a) มะขามเปรี้ยวยักษ์
Code No. TR-SDU-0001

(b) มะขาม จ. เชียงใหม่
BKF 94394

(c) มะขาม จ. นครปฐม
BKF 188958

ภาพที่ 4.1 แสดงภาพเปรียบเทียบลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะขาม (a) มะขามเปรี้ยวยักษ์ Code No. TR-SDU-0001 เก็บตัวอย่างพืชของผู้วิจัย (b) มะขาม จ. เชียงใหม่ เป็น herbarium BKF 94394 (c) มะขาม จ. นครปฐม BKF 188958

ภาพที่ 4.2 ลงพื้นที่ไร่วิวัชจรัลวงศ์ ภาพต้นมะขามปลูกใหม่ ในการลงพื้นที่จริง โดยการแนะนำของเจ้าของไร่ในจังหวัดนครปฐม

4.1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

การกะเทาะเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ โดยนำมาแช่ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) โดยเรียงสลับเป็นชั้นระหว่างเมล็ดมะขามและน้ำแข็งแห้ง ในระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 30 60 และ 90 นาที พบว่าที่ระยะเวลา 90 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสามารถกะเทาะเปลือกของเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ออกได้หมดมากที่สุดและกะเทาะเปลือกออกได้ง่าย (ภาพที่ 4.2) ร้อยละผลผลิตของเปลือกเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ เท่ากับ 32.33

(ก) เมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์

(ข) เมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่แช่ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) 30 นาที และกะเทาะเปลือก

(ค) เมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่แช่ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) 60 นาที และกะเทาะเปลือก

(ง) เมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่แช่ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) 90 นาที และกะเทาะเปลือก

ภาพที่ 4.3 กะเทาะเปลือกเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์โดยแช่ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่ระยะเวลา 30 60 และ 90 นาที (รูป (ก)–(ง))

4.2 การคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด (solvent extraction)

4.2.1 ค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (%yield)

เปรียบเทียบการสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เอทานอล 95% เอทานอล 99% และเอทานอล 95% : น้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:1 พบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% : น้ำกลั่น ที่อัตราส่วน 1:1 มีค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (%yield) สูงที่สุด รองลงมา คือ เอทานอล 95% และเอทานอล 100% ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (%yield) เท่ากับ 39.2650 22.5850 และ 22.4420 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (%yield) ของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์

พืช	**ค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (%yield)**		
	ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดพืช		
	เอทานอล 95%	**เอทานอล 99%**	**เอทานอล 95% : น้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:1**
เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์	22.5850	22.4420	39.2650

4.2.2 การทดสอบแป้งในสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด

เนื่องจากในเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ จึงทำการทดสอบหาแป้งในสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% เอทานอล 99% และเอทานอล 95% : น้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:1 ด้วยไอโอดีน ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนสีของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ยังคงมีสีของสารสกัดเป็นสีน้ำตาลคงเดิมผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบแป้งในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด

พืช	ผลการทดสอบหาแป้ง		
	ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดพืช		
	เอทานอล 95%	เอทานอล 99%	เอทานอล 95% : น้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:1
เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์	ไม่พบการเปลี่ยนสี	ไม่พบการเปลี่ยนสี	ไม่พบการเปลี่ยนสี

4.2.3 การทดสอบน้ำตาลในสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 ไม่พบการเปลี่ยนสีของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ซึ่งหากมีแป้งในสารสกัดที่ได้จะเปลี่ยนสีจากสีน้ำตาลเป็นสีม่วงแกมน้ำเงิน จึงทำการทดสอบหาน้ำตาลในสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ด้วยเบเนดิกต์ พบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% และ เอทานอล 95% : น้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:1 เกิดมีตะกอนสีแดงอิฐ ส่วนสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่สกัดด้วย เอทานอล 99% ไม่พบตะกอน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบน้ำตาลในสารละลายแต่ละชนิด

พืช	ผลการทดลอง		
	ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัดพืช		
	เอทานอล 95%	เอทานอล 99%	เอทานอล 95% : น้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:1
เปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์	พบตะกอนสีแดงอิฐ	ไม่พบตะกอน	พบตะกอนสีแดงอิฐ

ดังนั้นจึงเลือกตัวทำละลายเอทานอล 99% นำมาใช้สกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ในการทดลองต่อไป

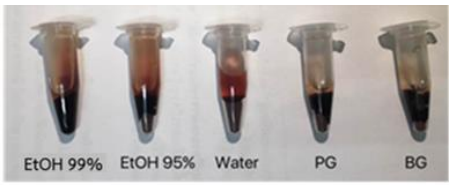
4.3 การสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 99% (ethanol 99%)

หลังจากการกะเทาะเปลือกด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งเสร็จเรียบร้อย จากนั้นเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามที่ได้มาทำการสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ด้วยเอทานอล 99% จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารสุญญากาศ ได้ค่าร้อยละของผลผลิต (% yield) เท่ากับ 23.42

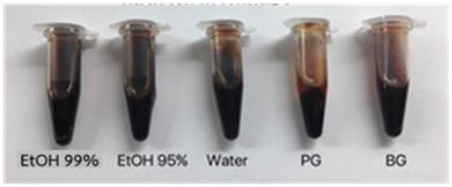
ภาพที่ 4.4 สารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ครั้งที่หนึ่งและครั้งที่สอง

4.4 การทดสอบหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการละลายสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์

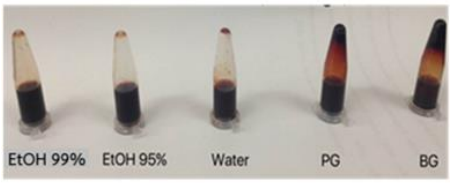
นำสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ มาทดสอบการละลายกับตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ น้ำปราศจากประจุ เอทานอล 95% เอทานอล 99% บิวทิลีนไกลคอล และโพรพีลีนไกลคอล โดยการเขย่าและการปั่นเหวี่ยง พบว่าสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์สามารถละลายได้ในตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด โดยตัวทำละลายเอทานอล 99% เอทานอล 95% และน้ำปราศจากประจุ สามารถละลายได้ดีมาก ตัวทำละลายโพรพีลีนไกลคอลสามารถละลายได้ปานกลางและละลายได้น้อยในบิวทิลีนไกลคอล (ภาพที่ 4.5 และ ตารางที่ 4.4)



(ก) สารสกัดหยาบเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ผสมกับตัวทำละลาย



(ข) สารสกัดหยาบเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ผสมกับตัวทำละลาย เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 3 นาที



(ค) สารสกัดหยาบเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ผสมกับตัวทำละลาย ปั่นเหวี่ยง (centrifugal) ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

ภาพที่ 4.5 การละลายสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ในตัวทำละลายต่าง ๆ กัน (รูป (ก)–(ค))

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการละลายของสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ในตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	**ความสามารถในการละลาย**
	สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์
น้ำปราศจากประจุ	++++
เอทานอล 95%	++++
เอทานอล 99%	++++
บิวทิลีนไกลคอล	+
โพรพีลีนไกลคอล	++

การแสดงผลวัดโดยการสังเกตสีและเปรียบเทียบกับความขุ่นที่เกิดขึ้น :

– ไม่ละลาย, + ละลายได้น้อย, ++ ละลายได้ปานกลาง, +++ ละลายได้ดี, ++++ ละลายได้ดีมาก

4.5 ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ด้วยวิธี Dopachrome method โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Lee *et al.*, (2002) และ นุตติยา และ ระวิวรรณ (2555) ใช้ความเข้มข้น 1, 3 และ 10 µg/mL และใช้กรดโกจิก (kojic acid) และ แอลฟา อาร์บูติน (**α**–Arbutin) เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยโพลพิลีน ไกลคอลมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 1.546 µg/mL และสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยเอทานอล 99% มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.215 สารมาตรฐานกรดโกจิก (kojic acid) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.490 µl/mL และแอลฟาอาร์ บูติน (**α**–arbutin) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0978 µg/mL คำนวนโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 7.02 (Prism, USA) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (ค่า IC_{50}) ของสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยโพรพิลีนไกลอล และละลายด้วยเอทานอล สารมาตรฐานกรดโกจิก (kojic acid) และสารมาตรฐานแอลฟาอาร์บูติน (**α**–arbutin)

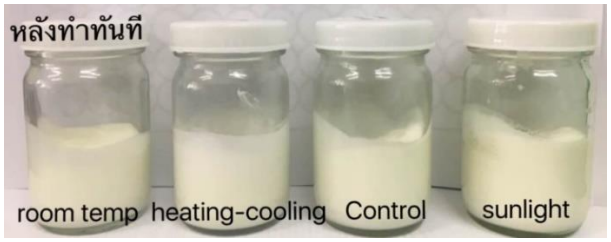
สารทดสอบ	**ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (IC_{50})**
สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ละลายด้วยโพรพิลีนไกลอล	1.546 µg/mL
สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ละลายด้วยเอทานอล	1.215 µg/mL
สารมาตรฐาน kojic acid	1.490 µg/mL
สารมาตรฐาน **α**–arbutin	0.0978 µg/mL

4.6 การพัฒนาสูตรพื้นฐานผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิว

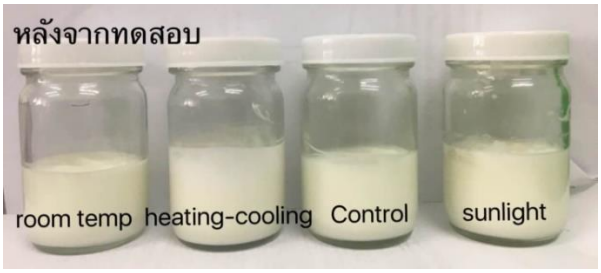
4.6.1 การศึกษาหาสูตรพื้นฐานของผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิวที่เหมาะสม

ตั้งตำรับครีมปรับสภาพสีผิวสูตรพื้นฐาน โดยใช้สูตรจากในตารางที่ 3.1 ตัดสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์จากจังหวัดนครปฐม และแทนค่าในสูตรให้ครบ 100% ด้วยน้ำปราศจากประจุ จากนั้นนำตำรับครีมปรับสภาพสีผิวสูตรพื้นฐาน มาวัดค่าคุณภาพทางกายภาพและ

ทางเคมี มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 6.04–6.17 และมีความข้นหนืดอยู่ในช่วง 4825–5627 cP. เมื่อนำมาทดสอบความคงตัวของอิมัลชันในสภาวะเร่ง (heating-cooling cycle) โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทดสอบจำนวน 6 รอบ พบว่าไม่เกิดการแยกชั้นของไขมันและน้ำ และทดสอบความคงตัวของอิมัลชันในสภาวะที่มีแสงแดด สภาวะอุณหภูมิห้องและเก็บไว้ในที่มืดใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และตารางที่ 4.5 นำเนื้อครีมที่ผ่านการทดสอบไม่แยกชั้นมาทดสอบความคงตัวของอิมัลชันด้วยการปั่นเหวี่ยง (centrifugal) ที่ความเร็วรอบ 9000 rpm เป็นเวลา 30 นาที พบว่าไม่เกิดการแยกชั้นของไขมันและน้ำ จึงมั่นใจได้ว่าสูตรครีมปรับสภาพสีผิวมีความคงตัวดี นำมาพัฒนาเป็นตำรับครีมปรับสภาพสีผิวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ต่อไป



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.6 ทดสอบตำรับครีมปรับสภาพสีผิวสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์) ในสภาวะเร่งด้วยแสงและอุณหภูมิ (ก) เริ่มการทดสอบ (ข) หลังการทดสอบ

ตารางที่ 4.6 ค่าคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีของตำรับครีมปรับสภาพสีผิวสูตรพื้นฐาน (ไม่เติมสารสกัดสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์)

Heating/ Cooling รอบที่	ลักษณะทางเคมี	ลักษณะทางกายภาพ				
	pH @25 °C	สี	กลิ่น	ความข้น@25 °C speed 100 rpm, spindle 64		ความคงตัว
				cP	%T	
0	6.06	ขาว	กลิ่นหอมอ่อน	5018	83.3	√
1	6.10	ขาว	กลิ่นหอมอ่อน	5117	85.3	√
2	6.12	ขาว	กลิ่นหอมอ่อน	5201	86.7	√
3	6.05	ขาว	กลิ่นหอมอ่อน	5471	91.2	√
4	6.04	ขาว	กลิ่นหอมอ่อน	5477	91.3	√
5	6.05	ขาว	กลิ่นหอมอ่อน	5489	91.5	√
6	6.04	ขาว	กลิ่นหอมอ่อน	5627	93.8	√
centrifugal speed 9000 rpm, 30 min						√

หมายเหตุ เครื่องหมาย √ คือ มีความคงตัวไม่พบการแยกชั้น

ตั้งตำรับครีมปรับสภาพสีผิวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยโพรพิลีนไกลอล เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่มีความปลอดภัยและนิยมใช้ในเครื่องสำอาง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.546 µg/mL นำมาใช้ในตำรับคิดเป็นประมาณ 0.0001 g/100 mL ได้สูตรตำรับแสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ตำรับผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มมะขามเปรี้ยวยักษ์

Phase	INCI Name	Function	% w/w
A	silica	slip agent	
	glyceryl stearate and PEG-100 stearate	emulsifier	
	dicaprylyl ether	emollient	
	dimethicone	emollient	
	cetostearyl alcohol	wax, bodying	
	isopropyl palmitate	emollient	

B	carbomer	thickener	
	glycerine	humectant	
	disodium EDTA	chelating agent	
	purified water	diluent	
C	propylene glycol	humectant	
	***Tamarindus indica* seed coat extract**	**Skin conditioning agent**	**0.0001**
D	10% sodium hydroxide	neutralize agent	
E	caprylhydroxamic acid (and) phenoxyethanol (and) methylpropanediol (and) water	preservative	
	perfume	fragrance	

<u>วิธีผสมมีลำดับตั้งแต่ขั้นที่ 1–8</u>

1. ชั่งสาร phase A ทีละตัวลงในบีกเกอร์ ยกเว้น silica นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ จนได้อุณหภูมิ 70–75 องศาเซลเซียส
2. ชั่งสาร phase B ทีละตัวลงในบีกเกอร์ โดยแยกโปรย carbomer เป็นอันดับสุดท้าย ปั่นกวนด้วย electronic overhead stirrers จน carbomer กระจายตัวดี นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75–80 องศาเซลเซียส
3. โปรย silica ลงใน phase A ที่หลอมเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว กวนให้กระจายเข้ากันดี
4. เทสาร phase A ลงในบีกเกอร์ phase B กวนผสมอย่างต่อเนื่องด้วย electronic overhead stirrers
5. เตรียม phase C โดยละลายสารสกัดหยาบ *Tamarindus* seed coat extract ลงใน propylene glycol นำ ใส่ใน A/B ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
6. เติมสาร phase D แล้วนำไปเข้าเครื่อง homogenizer จนเป็นเนื้อเดียวกัน
7. จากนั้นเติม phase E ผสมจนอิมัลชันเย็นตัวที่อุณหภูมิห้อง
8. นำไปประเมินลักษณะของตำรับ เพื่อตั้งเป็นตำรับมาตรฐานต่อไป

4.7 การทดสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่พัฒนาแล้ว

นำผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ มาทำการวัดค่าคุณภาพทางกายภาพและทางเคมี มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าเท่ากับ 6.06 เนื้อครีมมีสีขาวจากการสังเกต และมีค่าความข้นหนืด เท่ากับ 5018 cP. เมื่อนำไปทดสอบความคงตัวด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง (centrifugal) ที่ความเร็วรอบ 9000 rpm เป็นเวลา 30 นาที มีความคงตัวของอิมัลชัน คือไม่พบการแยกชั้นระหว่างน้ำกับไขมัน ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.8 ค่าคุณภาพของผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์

ค่าคุณภาพทางเคมี และทางกายภาพ	**ครีมปรับสภาพสีผิวสูตรพื้นฐาน (ไม่ผสมสารสกัด)**	**ครีมปรับสภาพสีผิว (ผสมสารสกัด)**
สี (จากการสังเกต)	ขาว	ขาว
กลิ่น	กลิ่นหอมอ่อน	กลิ่นหอมอ่อน
pH @ 25 °C	6.06	6.01
ความข้นหนืด (cP.) @ 25 °C speed 100 rpm, Spindle 64	5018	5477
ความคงตัว	ไม่พบการแยกชั้น	ไม่พบการแยกชั้น

ได้พัฒนาออกแบบบรรจุภัณฑ์ เพื่อทำเป็นผลิตภัณฑ์ครีมปรับผิวขาวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มมะขามเปรี้ยวยักษ์ขนาดทดลอง 3 มิลลิลิตร เพื่อให้ผู้เข้าร่วมฟังการนำเสนอโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The 5th International Conference on Advanced Pharmaceutical Research “Pharmaceutical Research for Quality of Life” ระหว่างวันที่ 20–21 กุมภาพันธ์ 2561

ภาพที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิวผสมสารสกัดเปลือกหุ้มมะขามเปรี้ยวยักษ์

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการค้นคว้าพบว่าเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์มีสาระสำคัญประกอบด้วยสารกลุ่มโพลีฟีนอล ซึ่งประกอบด้วยฟลาโวนอยด์และโพลีเมอริกโพรแอนโธไซยานิดินส์สายยาวหรือคอนเดนท์แทนนิน (ภัคสิริ สินไชยกิจและไมตรี สุทธจิตต์, ม.ป.ป.) ซึ่งมีโครงสร้างในส่วนวงเบนซีนและหมู่ฟังชันของไฮดรอกซีเหมือนกับโครงสร้างหลักที่คล้ายคลึงกันกับสารมาตรฐานทั้งสองชนิด คือ kojic acid และ α–arbutin

ในการเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ เอทานอล 95% เอทานอล 99% และเอทานอล 95% ต่อน้ำปราศจากประจุที่อัตราส่วน 1:1 มีค่าร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (%yield) เท่ากับ 22.5850 22.4420 และ 39.2650 ตามลำดับ พบว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์เอทานอล 95% ต่อน้ำปราศจากประจุที่อัตราส่วน 1:1 มีร้อยละของผลผลิต (%yield) มากกว่า เอทานอล 99%

สารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด จะมีน้ำผสมจากกระบวนการสกัด คาดว่าจะมีคาร์โบไฮเดรต จึงทดสอบหาแป้งด้วยไอโอดีน ผลคือไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด เนื่องจากในสารสกัดนั้นไม่พบโมเลกุลของแป้ง และทดสอบหาน้ำตาลด้วยสารละลายเบเนดิกต์ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัดด้วยเอทานอล 99% แต่พบการตกตะกอนสีส้มอิฐในสารสกัดด้วยเอทานอล 95% และ เอทานอล 95% ต่อน้ำที่อัตราส่วน 1:1 เนื่องมาจากในเอทานอล 95% มีน้ำเป็นส่วนประกอบ 5% จึงสามารถสกัดน้ำตาลออกมาได้บางส่วน และเอทานอล 95% ต่อน้ำที่อัตราส่วน 1:1 พบการตกตะกอนของสีแดงอิฐชัดเจน เนื่องจากน้ำตาลสามารถละลายออกมากับน้ำได้มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นๆ (คาร์โบไฮเดรต, ม.ป.ป.) จึงได้เลือกสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่สกัดด้วยเอทานอล 99% มาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมและนำไปใช้ในการตั้งตำรับครีมปรับสภาพสีผิว

ในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการละลายสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ทดสอบการละลายกับตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ น้ำปราศจากประจุ เอทานอล 95% เอทานอล 99% บิวทิลีนไกลคอล และโพรพีลีนไกลคอล พบว่าสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์สามารถละลายได้ในตัวทำละลายทั้ง 5 ชนิด โดยตัวทำละลายเอทานอล 99% เอทานอล 95% และน้ำปราศจากประจุ สามารถละลายได้ดีมาก ตัวทำละลายโพรพีลีนไกลคอลสามารถละลายได้ปานกลาง และละลายได้น้อยในบิวทิลีนไกลคอล ถึงแม้ว่าสารสกัดจะละลายได้ดีมากในตัวทำละลายเอทานอล 99% เอทานอล 95% และน้ำปราศจากประจุ แต่เอทานอลอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังในบุคคลที่แพ้เอทานอล และการใช้ตัวทำละลายสารสกัดด้วยน้ำปราศจากประจุ อาจติดเชื้อได้ง่ายเมื่อต้องมีการละลายและเก็บไว้ใช้ในระยะยาว ในการตั้งตำรับครีมปรับสภาพสีผิวจึงเลือกตัวทำละลายโพรพีลีนไกลคอล ที่สามารถละลายสารสกัดได้ปานกลาง แต่หากให้ความร้อน

ประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส ก็สามารถละลายได้หมด อีกทั้งโพรพีลีนไกลคอล ยังเป็นสารที่มีความปลอดภัยมีการใช้ในเครื่องสำอางเป็นสารให้ความชุ่มชื้นผิว (humectant) อีกด้วย

ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ด้วยวิธี Dopachrome method เลือกทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยโพลพิลีนไกลคอล สารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยเอทานอล 99% ด้วยเนื่องจากเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้สกัดสารและสามารถละลายสารสกัดได้ดีมาก พบว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยโพลพิลีนไกลคอลมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ 50% (IC_{50}) เท่ากับ 1.546 µg/mL และสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยเอทานอล 99% มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.215 สารมาตรฐานกรดโกจิก (kojic acid) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.490 µl/mL และสารมาตรฐานแอลฟาอาร์บูติน (**α**–arbutin) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0978 µg/mL

จากการทดสอบนำสารสกัดมะขามเปรี้ยวยักษ์ใส่ลงไปในครีมเบสพบว่า ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพและทางเคมี โดยมีลักษณะของเนื้อครีมข้น สีขาว มีกลิ่นหอมอ่อน มีค่าความข้นหนืดเท่ากับ 5477 cP ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.01 เมื่อนำมาทาลงบนผิวมีการกระจายตัวดี เกลี่ยง่าย ซึมสู่ผิวได้เร็ว ไม่เหนอะหนะและมีความชุ่มชื้นแก่ผิว เมื่อนำไปทดสอบความคงตัวของอิมัลชันด้วยการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที ไม่เกิดการแยกชั้นระหว่างไขมันและน้ำ แสดงว่าตำรับมีความคงตัวที่ดีเหมาะแก่การนำไปพัฒนาเป็นตำรับเวชสำอางครีมปรับสภาพสีผิวต่อไป

อภิปรายผล

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยวิธี Dopachrome method จากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยโพรพิลีนไกลคอล มีค่า IC_{50} (inhibition concentration) เท่ากับ 1.546 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยเอทานอล มีค่า IC_{50} (inhibition concentration) เท่ากับ 1.215 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารมาตรฐานทั้งสองชนิด คือ kojic acid และ **α**–arbutin มีค่า IC_{50} (inhibition concentration) ของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมีค่าเท่ากับ 1.4900 และ 0.0978 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันพบว่าฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยโพรพิลีนไกลคอล มีฤทธิ์ต่ำกว่าสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ที่ละลายด้วยเอทานอล 1.27 เท่า มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ kojic acid และมีฤทธิ์ต่ำกว่า **α**–arbutin 15.8 เท่า จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ ที่สกัดจากเอทานอล 99% และนำมาละลายด้วยโพรพิลีนไกลคอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และมีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติ และทุกส่วนของมะขามสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ส่วนที่รับประทานได้เป็นส่วนใบ ผล และเมล็ด และเนื้อจากลำต้นใช้เป็นยาใช้แพร่หลายในประเทศในแถบอัฟริกา และเหมาะสมแก่การนำไปพัฒนาตำรับทางเครื่องสำอางต่อไป ในเบื้องต้นนี้ผู้วิจัยได้ใช้สารสกัดนำมา

พัฒนาเป็นตำรับทางเครื่องสำอางและได้พัฒนาต่อไปในอนาคตเป็นการหาสารสำคัญในหาสารออกฤทธิ์ในลักษณะอื่น ๆ ต่อไป

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

การวิจัยครั้งนี้ มีข้อจำกัดในเรื่องระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากมะขามเปรี้ยวยักษ์จะมีฝักแก่ที่สามารถเก็บได้ในช่วงเดือน มกราคม–มีนาคม เท่านั้น เมล็ดที่แกะออกจากเนื้อไม่สามารถเก็บไว้ได้นานเนื่องจากจะมีด้วงหรือมอดเจาะกินเมล็ดมะขาม อีกทั้งผู้ประกอบการรายใหญ่สามารถจำหน่ายเนื้อมะขามและเมล็ดมะขามได้ง่ายอยู่แล้ว เมล็ดมะขามเป็นที่ต้องการของตลาดส่งออกญี่ปุ่นเพื่อนำไปทำกาว จึงยังไม่สนใจนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ดังนั้นการส่งเสริมเกษตรกรในจังหวัดอื่นๆ ควรเป็นเกษตรกรที่มีการทำอาชีพอื่นหรือปลูกพืชอื่นอยู่แล้ว แต่ยังมีพื้นที่ว่างเหลืออยู่อีกเยอะไม่น้อยกว่า 10 ไร่ เพื่อให้ได้ผลผลิตมากพอที่จะจ้างแรงงานมาเก็บเกี่ยว และไม่มีเวลา กำลังคนงานในการดูแล ก็เหมาะที่จะปลูกมะขามเปรี้ยวยักษ์เสริม และควรมีการรวมกลุ่มคนในชุมชนเพื่อแปรรูปทั้งเนื้อและเมล็ดมะขามในเชิงพาณิชย์ โดยเนื้อสามารถนำมาทำมะขามคลุก แช่อิ่ม ส่วนเมล็ดสามารถนำมาสกัดทำเครื่องสำอางเพื่อเพิ่มมูลค่าได้ แต่ต้องมีการปรับเปลี่ยนกระบวนการสกัดให้เหมาะกับการทำในชุมชน ส่วนวิธีการสกัดในงานวิจัยนี้เหมาะกับผู้ประกอบการด้านเครื่องสำอางที่มีขนาดปานกลางขึ้นไป

ในกระบวนการกะเทาะเปลือกหุ้มมะขามเปรี้ยวยักษ์ด้วยการแช่ในน้ำแข็งแห้งเป็นระยะเวลา 90 นาที เหมาะสำหรับการเตรียมการสกัดสารสำคัญในปริมาณน้อย เนื่องจากน้ำแข็งแห้งมีราคาสูงกิโลกรัมละ 30 บาท การเตรียมสารสกัดหยาบเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์ 32.33 กรัม ต้องใช้น้ำแข็งแห้งสำหรับการแช่ประมาณ 10 กิโลกรัม เป็นเงิน 300 บาท ซึ่งในการแช่แต่ละครั้งนั้นต้องทำให้เสร็จทั้งหมด ถ้าทิ้งไว้แล้วเมื่อเวลาผ่านไปทำให้การกะเทาะเปลือกออกยากและห้ามปล่อยให้เมล็ดมะขามมีความชื้นจะทำให้กะเทาะเปลือกได้ยากยิ่งขึ้น

ในการทำวิจัยเพิ่มเติมควรมีการแยกสารสำคัญเฉพาะ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมีการทดสอบความเป็นพิษ (toxicity test) ของสารสกัดในระดับเซลล์ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสาร และการทดสอบประสิทธิภาพในมนุษย์โดยการใช้ผลิตภัณฑ์ครีมปรับสภาพสีผิวที่มีส่วนผสมสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามเปรี้ยวยักษ์

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

กรรณิการ์ พุ่มทอง. (2542). *ฤทธิ์แอนติออกซิแดนของสารโพลีฟีนอลที่สกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขาม* (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตภาควิชาชีวเคมีคณะแพทยศาสตร์). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จิราภา โลหัชวาณิชย์, ปกรณ์ อ่อนสำลี, วรรษมล กาญจนพัฒนกุล และ วสันต์ อินทร์ตา. (2555, ตุลาคม 25). *คุณลักษณะทางกายภาพของเมล็ดมะขาม*. สืบค้น 1 มกราคม 2560 จาก http://www.foodnetworksolution.com/ news_and_articles/article/0 2 6 5 / คุณลักษณะทางกายภาพของเมล็ดมะขาม.

ฆนัท ครุธกูล. (2559). *แนวทางการปฏิรูปและส่งเสริมผลิตภัณฑ์สมุนไพรและเกษตรแปรรูป ในระบบสุขภาพไทย วันที่ 10 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2559*. กรุงเทพมหานคร: คณะกรรมาธิการการสาธารณสุขและคณะกรรมาธิการส่งเสริมนวัตกรรมการแพทย์และสาธารณสุข.

นุตติยา วีระวัธนชัย และระวิวรรณ แก้วอมตวงศ์. (2555). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของฟลาโวนอยด์จากกระดังงาจีน. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 14*(1), 23–29.

บุญล้อม สิบหมื่นเปี่ยม. (2550). *การพัฒนาเจลให้ความชุ่มชื้นผิวจากสารสกัดเมล็ดมะขาม.* การศึกษาโดยอิสระวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

พร้อมจิต ศรลัมพ์. (2555). สมุนไพรที่มีศักยภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ใน วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ, อัญชลี จินตพัฒนากิจ และจิรพงศ์ สุขสิริวรพงศ์ (บรรณาธิการ) *กระบวนการผลิตเครื่องสำอางสมุนไพรด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัย (น. 115-26).* กรุงเทพมหานคร: โครงการพัฒนาศักยภาพผู้ประกอบการอุตสาหกรรมเครื่องสำอางสมุนไพรไทยเพื่อลดผลกระทบจากการเปิดเสรทางการค้า AFTA กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. (2532). *เครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง.* กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. (2540). *อิมัลชันทางเครื่องสำอาง.* กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

ภัคสิริ สินไชยกิจ และไมตรีสุทธจิตต์. (2554). *คุณสมบัติชีวเคมีและการประยุกต์ใช้ของเมล็ดมะขาม. วารสารนเรศวรพะเยา, 4*(2), 5-16.

มะขาม ใน *สรรพคุณสมุนไพร.* (2559). สืบค้น 19 กุมภาพันธ์ 2559 จาก http://www. rspg.or.th

วันเซ็ง สิทธิกิจโยธิน และดวงฤดี เชิดวงศ์เจริญสุข. (2554). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามหวานและมะขามเปรี้ยว. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 16*(1), 47-55.

ศศิธร แท่นทอง, ปรียาภรณ์ มาลารักษ์ และ ณิชาภัทร ลิ้มสุข. (2554). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์ประทินผิวจากมะขาม.* (รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์).

สลิลทิพย์ ประสาทพรศิริโชค. (2552). *การกักเก็บสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขามในไลโปโซม.* การศึกษาโดยอิสระวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.

เสาวลักษณ์ รุ่งแจ้ง และ Hiroshi Shinmoto. 2556. การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามโดยตัวทำละลาย ใน *การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 43*. (น. 565-9). กรุงเทพมหานคร: สาขาสัตว์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสาวลักษณ์ อุกฤษฎาวิทิต, ปาริชาติ ภู่สว่าง, และมณีวรรณ สุขสมทิพย์. (2551). *สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกเมล็ดมะขาม Tamarind indica และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนัง.* (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุษณีย์ ตั้งพิจิตรา. (2551). *ผลของสารสกัดเปลือกหุ้มเมล็ดมะขามต่อระบบต้านอนุมูลอิสระในตับหนูขาว.* (วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาคลีนิก). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G. & Lindequist, U. (2007). Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *Journal of Ethnopharmacology, 111*, 657–666.

Bibitha, B., Jisha, V.K., Salitha, C.V., Mohan, S. & Valsa, A.K. (2002). Antibacterial activity of different plant extracts. *Indian Journal of Microbiology*, *42*(4), 361–363.

Caluwé, ED., Halamová, K. & Damme, PV. (2010). Tamarindus indica L. – A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Afrika focus*, 23(1): 53-83.

Doughari, J. H., (2006). Antimicrobial Activity of Tamarindus indica Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. *5*(2), 597-603.

El-Siddig, K., Ebert, G. & Lüdders, P. (1999). Tamarind (*Tamarindus indica* L.): a Review on a multipurpose tree with promising future in the Sudan. *Journal of Applied Botany – Angewandte Botanik*, *73*, 202–205.

El-Siddig, K., Gunasena, H.P.M., Prasa, B.A., Pushpakumara, D.K.N.G., Ramana, K.V.R., Vijayanand. P. & Williams, J.T. (2006). Tamarind – *Tamarindus indica* L. Fruits for the future 1. *Southampton Centre for Underutilized Crops*, Southampton, UK, 188.

Fook, J.M.S.L.L, Macedo, L.LP., Moura, G.E.D.D., Teixeira, F.M., Oliveira, A.S., Queiroz, A.F.S. & Sales, M.P. (2005). A serine proteinase inhibitor isolated from *Tamarindus indica* seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase. *Life Sciences, 76*, 2881–2891.

Glew, R.S., VanderJagt, D.J., Chuang, L.T., Huang, Y.S., Millson & M., Glew, R.H. (2005). Nutrient content of four edible wild plants from West Africa. *Plant Foods for Human Nutrition, 60*, 187–193.

Guerin, J.C. & Reveillere, H.P. (1984). Activité antifongique d'extraits vegetaux a usage therapeutique.1. Etude de 41 extracts sur 9 souches fonguques (Antifungal activity of plant extracts used in therapy). 1. Study of 41 plant extracts against 9 fungal species). *Annales Pharmaceutiques Françaises, 42*(6), 553–559 (English summary).

Imbabi, E.S. & Abu-Al-Futuh I.M. (1992). Investigation of the molluscicidal activity of Tamarindus indica L. *International Journal of Pharmacology, 30*(2), 157–160.

Jayaweera, D.M.A. (1981) Medicinal Plants (Indigenous and Exotic) Used in Ceylon. Part 111. Flacourtiaceae-Lytharaceae. *A publication of the National Science Council of Sri Lanka*, 244–246.

John, J., Joy, M. & Abhilash, E.K. (2004). Inhibitory effects of tamarind (Tamarindus indica L.) on polypathogenic fungi. *Allelopathy Journal, 14*(1), 43–49.

Kuljanabhagavad, T., Suttisri, R., Pengsuparp, T. & Ruangrungsi, N. (2009). Chemical Structure and Antiviral Activity of Aerial Part from Laggera Pterodonta. *J Health Res, 23*(4), 175-7.

Lee, HS., Kim, BS. & Kim, MK. (2002). Suppression effect of Cinnamomum cassia bark-derived component on nitric oxide synthase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *50*, 7700–7703.

Li, H., Jeong, Y., Kim, S., Kim, M. & Kim, D., (2011). Arbutin inhibits TCCSUP human bladder cancer cell proliferation via up-regulation of p21. *Pharmazie*, 66, 306 - 309.

Lourith, N., Kanayavattanakul, M. & Chanpirom, S. (2009). Free radical scavenging efficacy of Tamarind seed coat and its cosmetics application. *J. Health. Res., 23*(4), 159-62.

Luengthanaphol, S., Mongkholkhajornsilp, D., Douglas, S., Douglas, P. L., Pengsopa, L., & Pongamphai, S. (2004). Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat–preliminary experiments. *Journal of Food Engineering*. *63*, 247–252. 7. Doughari, 2006

Maiti, R., Jana, D., Das, U.K. & Ghosh, D. (2004). Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of Tamarindus indica in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *92*(1), 85–91.

Meléndez, P.A. & Capriles, V.A. (2006). Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine*, *13*, 272-276.

Metwali, M.R. (2003). Study of antimicrobial potencies of some Yemeni medicinal plants. *Egyptian Journal of Microbiology*, *38*(1), 105–114.

Morton, J. (1987). Fruits of Warm Climates. *Miami FL*, 115–121.

Nakchat, O., Nalinratana, N., Meksuriyen, D. & Pongsamart, S. (2014). Tamarind seed coat extract restores reactive oxygen species through attenuation of glutathione level and antioxidant enzyme expression in human skin fibroblasts in response to oxidative stress. *Asian Pac J Trop Biomed, 4*(5), 379-85.

Parrotta, J.A. (1990). Tamarindus indica L Tamarind. SO-ITF-SM-30 June, *USDA Forestry Service*. Rio Piedras, Puerto Rico, 1–5.

Phetdee, K., Rattanamanee, K., Teaktong, T. & Viyoch, J. (2012). Tamarind Seed Coat Extract Reduces Melanin Production via Tyrosinase in Melanocyte. *Journal of Biological Sciences*. *12*(4), 239-245.

Ray, P.G. & Majumdar, S.K. (1976). *Antimicrobial activity of some Indian plants. Economic Botany, 30*(4), 317–320.

Rimbau, V., Cerdan, C., Vila, R. & Iglesias, J. (1999) Anti-inflammatory activity of some extracts from plants used in the traditional medicine of North-African countries. *Phytotherapy Research, 13*(2), 1281–32.

Siddhuraju, P. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *Food Science and Technology, 40*, 982–990.

Siddhuraju, P., Becker, K. & Makkar, HP. (2000). Studies on the nutritional composition and antinutritional factors of three different germplasm seed materials of an under-utilized tropical legume, Mucuna pruriens var. utilis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *48*(12), 6048 - 60.

Sundaram, M., Hemshekhar, M., Santhosh, M., Paul, M., Sunitha, K., Thushara, R., NaveenKumar, S., Naveen, S., Devaraja, S., Rangappa, K., Kemparaju, K. & Girish, K. (2015). *Tamarind Seed (Tamarindus indica) Extract Ameliorates Adjuvant-Induced Arthritis via Regulating the Mediators of Cartilage/Bone Degeneration, Inflammation and Oxidative Stress*. Scientific reports. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4461917/.

Sudjaroen, Y., Hull, W.E., Haubner, R., Wuertele, G., Spiegelhalder, B., Changbumrung, S., Bartsch, H. & Owen, R.W. (2005). The isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamrind (Tamarindus indica L.) seeds and pericarp. *Food and Chemical Toxicology*, *43*, 1673-82.

Sittikijyothin, W. & Cherdwongcharoensuk, D. (2011). Free Radical Scavenging Activity of Seed Coat Extracts of Sweet and Sour Tamarinds. *Burapha Sci. J., 16*(1), 47-55.

Tamura, K., Oda, M. & Imoto, T. (1996). Tyrosinase inhibitors from Tamarindus indica for manufacturing cosmetics and food. *Patent: Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 08*, 231, 343 (96, 231,343), 1996: 7.

Thongmuang, P. & Sudjaroen, Y. (2013). The Tyrosinase and Cyclooxygenase Inhibitory Activities and Cytotoxicity Screening of Tamarindus indica Seeds. World Academy of Science, *Engineering and Technology International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*. *7*(1).

Yahia, E.M. & Salih, N. K.-E. (2011). *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Tamarind (Tamarindus indica L.).* Woodhead Publishing Limited, 442–457, 458e.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
บทความวิจัย

บทความวิจัย นำเสนองานในการประชุม The 5th International Conference on Advanced Pharmaceutical Research ระหว่างวันที่ 20–21 กุมภาพันธ์ 2561

P-CO02

TYROSINASE INHIBITORY AND WHITENING CREAM APPLICATION OF TAMARIND (*TAMARINDUS INDICA* L.) SEED COAT EXTRACS USING *IN VITRO* MODEL

Nattaporn Boohuand[1], Yadanan Kaewpila[1,2], Phichaya Phromtang[1,2], Sujinthon Yonniyom[1,2], Preyalak Phetkhuea[1,2] and Tiwatt Kuljanabhagavad[2*]

[1]Cosmetic Science Program, [2]Chemical Technology Program, Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University, Bangkok 10700, Thailand

*Corresponding author : E-mail : ktiwatt@gmail.com

Abstract : *Tamarindus indica* seed coat was extracted with dry ice modified method and tyrosinase inhibitor testing. Ethanol extract of *T. indica* seed coat showed high inhibitory concentration IC_{50} at 1.215 µg/ml and also propylene glycol extract showed high inhibitory concentration IC_{50} at 1.546 µg/ml The kojic acid and alpha-arbutin substances were a skin-whitening agent use as standard compounds showed strong tyrosinase inhibitory concentrations IC_{50} at 1.49 µg/ml and 0.978 µg/ml, respectively. The ethyl acetate extract and propylene glycol extract showed higher tyrosinase inhibitor testing than standard compounds. Pretreatment of whitening cream followed by propylene glycol extract of *T. indica* seed coat extract 0.001% w/w in formula facial whitening cream. In addition, a formula facial whitening cream was assayed with tyrosinase inhibitor testing was observed propylene glycol extract exposure at concentrations 10 times the IC_{50} resulted in complete clearance of all. In the present communication, the important factor of whitening cream products were off white color and perfectly homogeneous emulsion and the values at a pH of 6.06 and viscosity of 5018 cP at 25 °C and the centrifugal of 9000 rpm for 30 minutes showed high stability. These studies could be further extended to exploit its possible application for the prevention of food products as well as neutraceutical and a health supplement.

Keywords: Fabaceae, *Tamarindus indica* L., seed coat, tyrosinase activity, whitening cream

INTRODUCTION

The tyrosinase properties of herbs and spices are of particular interest in view of the impact of tyrosinase inhibitor testing modification of skin whitening agent in the development of cosmetic science and many other degenerative ailments (Kamkaen *et al*., 2007). As several metabolic and aging, tanning, and pigment disorders are closely associated with melanogenesis processes, the use of herbs and spices as a source of melanogenesis to controlled by tyrosinase activity warrants further attention (Sánchez-Ferrer *et al*., 1995). Anti-tyrosinase activity of the *Tamarindus indica* L. seed coat was potential for cosmetics showed a similar potential the same as kojic acid for used in Japanese cosmeceutical industry.

Tamarind; *T. indica* is belonging to the family Fabaceae *T. indica* is used as valuable ingredient in medical practice and for culinary purposes, however, not much work has been reported on the evaluation of biological potential, particularly tyrosinase activity and formulation facial cream of its seed coat.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of plant extracts

T. indica seeds 10 kg were collected from Wiwatcharanwong farm of Nakhon Pathom province, Thailand. The seeds of *T. indica* were soaked with the dry ice modified method for 1.5 hours and then creaked. The seed coat of *T. indica* was dried in an incubator for 1.5 hours at 45 °C. The dry seed coats of *T. indica* were extracted with ethanol 100 percent in ratio 1:5. The *T. indica* seed coat was macerated at room temperature for 10 days by shaking incubator 3 times a day for 3 min each time. After filtration, the extract was evaporated under vacuum at 45 °C. It was ground into fine powder and stored in the plastic bag with nitrogen gas at room temperature until further use.

Preparation of phosphate buffer solution pH.6.8

Dissolve 5.616 g of $NaH_2PO_4.2H_2O$, 4.40 g of Na_2HPO_4 anhydrous in DI water and mixed then dilute to 1000 ml with DI water. *Tyrosinase Inhibition:* Mushroom tyrosinase and L-3, 4-dihydroxyphenylalanine; *L*-DOPA were purchased from Sigma chemical. Twenty µl of sample solution, 20 µl of mushroom tyrosinase 80 U and 180 µl of 67 mm phosphate buffer pH 6.8 were mixed, called positive control. The negative control was carried out using 68 mM phosphate buffer. The kojic acid and α-arbutin standard solutions were also prepared by repeating all previous steps with and without mushroom tyrosinase added. Add 20 µl of 25 mm *L*-DOPA solution as the substrate into every sample and blank then incubated at 37 °C for 30 min (Phetkhuea *et al*., 2017). The reaction mixture was measured at 492 nm (OD_{492}) in a microplate reader Biochrome, UK. All spectrophotometric analyses were performed with three replicates. The concentration of extract giving fifty percent inhibition IC_{50} was determined from plot of percent inhibition against log concentration of extract, α-arbutin or kojic acid using Graphpad Prism, California, USA.

Preparation of whitening cream

The facial whitening cream was prepared oil in water by the addition of oil suspended in aqueous phase with continuous agitation (Phetkhuea *et al*., 2017). The preparation of oily phase consisted of an emulsifier blend with glyceryl stearate and peg-100 stearate 2.50% w/w, dicaprylyl ether 7.00% w/w, dimethicone 0.50% w/w, cetostearyl alcohol 2.00% w/w and isopropyl palmitate 7.00% w/w were heated at 70-75 °C. And also, an aqueous phase consists of water 72.199% w/w, glycerine 3.00% w/w, disodium EDTA 0.10% w/w and carbomer 0.20% w/w were heated at 70-75 °C. The emulsion of oil in water was cool down to

RESULTS AND DISCUSSION

The result of anti-tyrosinase activity of pure ethanol extract and the extract dissolved in PG of *T. Indica* compared to positive controls were showed in Table 1. The study of pharmacological effect of *T. Indica* of pure ethanol extract and the extract dissolved in PG were compared with the standard compounds as kojic acid and α-arbutin. The IC_{50} of tyrosinase inhibitory activity (μm) of pure ethanol extract and the extract dissolved in PG was similar to kojic acid. The extract dissolved in PG compared with kojic acid showed a strong and significant of *T. indica* seed coat was dissolved in PG at similar concentration. These results clearly indicate that the extract dissolved in PG could be used in cosmetic formulations. The result of characteristic, physical and chemical properties of *T. Indica* facial whitening cream are summarized in Table 2. In the present communication, the whitening cream products were off white color and perfectly homogeneous emulsion. Whitening cream had a pH at 6.06, viscosity at 5018 cP at 25 °C and no precipitation was found at the centrifugal of 9000 rpm for 30 minutes, indicating high stability of the product (Table 2).

Table 1. The anti-tyrosinase activity of extracts

Plant and standard compounds	IC_{50} (μm)
T. indica seed coat extract	1.215 μg/ml
T. indica seed coat dissolved in PG	1.546 μg/ml
Kojic acid (std.)	1.49 μg/ml
α-arbutin (std.)	0.978 μg/ml

Table 2. The evaluation data of facial whitening cream (Roland *et al*., 2003)

Parameters evaluated	Results
Appearance	Creamy white, odorless
pH values at 25 °C	6.06
Homogeneity	Homogeneous and smooth
Viscosity at 25 °C (rpm.)	5018
Stability test (heating/cooling cycles)	Not separate
Stability test (under centrifugation)	Not separate

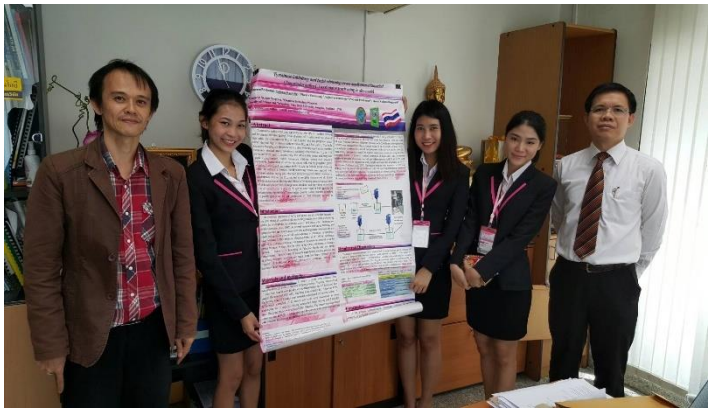
ภาคผนวก ข
นำเสนอโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ

The 5th International Conference on Advanced Pharmaceutical Research “Pharmaceutical Research for Quality of Life” ระหว่างวันที่ 20–21 กุมภาพันธ์ 2561

ภาพที่ ข-1 โปสเตอร์นำเสนอเรื่อง Tyrosinase inhibitory and whitening cream application of tamarind (*Tamaridus indica* L.) seed coat extracts using *in vitro* model

ภาพที่ ข-2 อาจารย์และนักศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี นำเสนอโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The 5th International Conference on Advanced Pharmaceutical Research “Pharmaceutical Research for Quality of Life” ระหว่างวันที่ 20–21 กุมภาพันธ์ 2561

ภาพที่ ข-3 รับรางวัล popula vote โปสเตอร์นำเสนอเรื่อง Tyrosinase inhibitory and whitening cream application of tamarind (*Tamaridus indica* L.) seed coat extracts using *in vitro* model



ภาพที่ ข-4 นำเสนอโปสเตอร์นำเสนอเรื่อง Tyrosinase inhibitory and whitening cream application of tamarind (*Tamaridus indica* L.) seed coat extracts using *in vitro* model เป็นภาษาอังกฤษให้กับคณบดี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ภาคผนวก ค
ประวัติผู้ทรงคุณวุฒิ

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) รองศาสตราจารย์.ดร.ภญ. นริศา คำแก่น

(ภาษาอังกฤษ) Miss. Narisa Kamkaen

2. เลขที่บัตรประจำตัวประชาชน 5-1004-00024-29-3

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้อำนวยการฝ่ายเภสัชกรรมสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

ที่อยู่ (ที่ทำงาน) ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต
เลขที่ 52/347 หมู่บ้านเมืองเอก ถ.พหลโยธิน ต.หลักหก อ.เมือง

จังหวัด ปทุมธานี **รหัสไปรษณีย์** 12000

โทรศัพท์ 0-2997-1422 **โทรสาร** 0-2791-1403

ที่อยู่ (ที่บ้าน) -

จังหวัด ปทุมธานี **รหัสไปรษณีย์** 12000

โทรศัพท์ 0-2997-1422 **โทรสาร** 0-2791-1403 **มือถือ** 086-366-2199

E-mail Address narisa.kamkaen@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรีสาขา ภบ. (เภสัชศาสตร์) คณะเภสัชศาสตร์
สถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ปีที่สำเร็จ พ.ศ. 2532

5.2 ปริญญาโทสาขา ภม. (เภสัชเวท) คณะเภสัชศาสตร์
สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จ พ.ศ. 2537

5.3 ปริญญาเอกสาขา (Health Sciences), Biomedical Sciences
สถาบัน Charles Sturt University ประเทศออสเตรเลีย
ปีที่สำเร็จ พ.ศ. 2546

6. ผลงานวิจัย

1. Meeglinhom, W., Sophasing, D., Sakunpak, A., Vipunngeun, N., & Kamkaen, N. (2018). Determination and comparison of two varieties of capsicum fruits. In A. Chiangsom (Ed.), Proceedings of the 5th International conference on Advanced Pharmaceutical Research (pp.38-45). Pathumthani: Rangsit University.

2. Sophasing, D., Meeglinhom, W., Sueree, L., Charoonratana, T., & Kamkaen N. (2018). The development and evaluation of capsicum extract loaded gel formulation.

In A. Chiangsom (Ed.), Proceedings of the 5th International conference on Advanced Pharmaceutical Research (pp. 46-52). Pathumthani: Rangsit University.

3. Kamkaen, N. & Tadtong, S. (2017). GC-MS Analysis of Various Ratios of Blended Essential Oils. Presented at 48th International Symposium on Essential Oils (ISEO2017), September 10-13, 2017, Pécs, Hungary

4. Kamkaen, N., Vipunngeun, N., & Songsak, T. (2016). GC-MS detection of dimethyl trisulfide as a chemical marker of shallot extract and oil in Thailand. Presented at 47th International Symposium on Essential Oils (ISEO2016) September 11-14, 2016. Nice, France.

5. Kamkaen, N., Ruangrungsi, N., & Songsak, T. (2015). GC-MS data of three different grades of agarwood oil in Thailand. Presented at The Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia (ISPSA). August 30 – September 02, 2015, Tokushima, Japan.

6. Kamkaen N., Ruangrungsi N., Na Patalung N., Watthanachaiyingcharoen R. (2015). Physiological and Psychological Effects of Lemongrass and Sweet Almond Massage Oil. Journal of Health Research. 29(2): 85-91.

7. Tadtong S., Watthanachaiyingcharoen R., Kamkaen N. (2015). The Chemical Components of Four Essential Oils in Aromatherapy Recipe. Natural Product Communications. 10(6): 1091-1092.

8. Tadtong S., Watthanachaiyingcharoen R., Kamkaen N. (2014). Antimicrobial constituents and synergism effect of the essential oils from Cymbopogon citratus and Alpinia galanga. Natural Product Communications. 9(2): 277-280.

9. Supabphol R., Wattanachaiyingcharoen R., Kamkaen N., Supabphol A. (2013). Cytoprotective effect of Vernonia cinerea Less. extract on human umbilical vein endothelial cells against nicotine toxicity. Journal of Medicinal Plants Research. 7(15): 980-987.

10. Promputta C., Anupunpisit V., Panyarachun B., Sawatpanich T., Watthanachaiyingcharoen R., Paeratakul O., Kamkaen N., Petpiboolthai H. (2012). Effect of Vernonia cinerea in improvement of respiratory tissue in chronic nicotine treatment. Journal of the Medical Association of Thailand. 95 (Suppl 12): S47-55.

11. Kamkaen N., Samee W., Nimkulrat S., Managit C., Leerungnavarat O., Kingnok P., Chuichulcherm S. (2010). Development of New Formulation and Study on Release of Capsaicin from Transdermal Patch. Journal of Health Research. 24(4): 151-154.

12. Samee W., Nakakita K.R., Panyawachira A., Kamkaen N. (2010). Effect of Aloe Vera and Wax Gourd Extracts in Reducing Burning Sensation of Capsicum Gel. Journal of Health Research. 24(3): 107-112.

13. Vorarat S., Managit C., IamthanakulL., Soparat W., Kamkaen N. (2010). Examination of Antioxidant Activity and Development of Rice Bran Oil and Gamma-Oryzanol Microemulsion. Journal of Health Research. 24(2): 67-72.

14. Soisuwan S., Mapaisansin W., Samee W., Brantner A.H., Kamkaen N. (2010). Development of Peacock Flower Extract as Anti-wrinkle Formulation. Journal of Health Research. 24(1): 29-34.

15. Mekseepralard C., Kamkaen N. (2010). Wilkinson JM. Antimicrobial and antioxidant activities of traditional Thai herbal remedies for aphthous ulcers. Phytotherapy research. Published Online: 1 June 2010.

ประวัติผู้วิจัย

1. นางสาวณัฐพร บู๊ฮวด (Nattaporn Boohuad)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 7007 00019 91 8

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงาน หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

สถานที่ติดต่อ 228-228/1-3 ถนนสิรินธร เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700

เบอร์ติดต่อ 02-4239421 เบอร์มือถือ 089-141-6790

โทรสาร 02-4239409 E-mail: nattaporn2608@gmail.com

ประวัติการศึกษา

1998-2001 B. Sc. (Environmental science)

Silapakorn University, Nakornpathom, Thailand

2005-2007 M. Sc. (Cosmetic science)

MaeFahLaung, Chaingrai, Thailand

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ Cosmetic science, Health science

หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

1. การเจริญของเซลล์เมลาโนมาในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีสารสกัดจากอินทนิลน้ำ และยางเลือดมังกร (หัวหน้าโครงการ) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555
2. ฤทธิ์ความเป็นพิษของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อเซลล์เมลาโนมาของคน (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555
3. การศึกษาพื้นฐานของการเลี้ยงเซลล์ของคนในหลอดทดลองและการจัดเก็บข้อมูลของสารเครื่องสำอาง (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555
4. การศึกษาฤทธิ์สารสกัดทองพันชั่งและบัวบกในการต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อพัฒนาสบู่ (ผู้ร่วมวิจัย) ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว:

1. Boohuad, N., Kaewpila, Y., Phromtang, P., Yonniyom, S., Phetkhuea, P. & Kuljanabhagavad, T. (2018). Tyrosinase inhibitory and facial whitening cream application of tamarind (Tamarindus indica L.) seed coat extracts using in vitro model. Proceeding of the V International Conference on Advanced Pharmaceutical Research "Pharmaceutical Research for Quality of Life". Bangkok, Thailand. 20-21 February 2018. 7-10.

2. Boohuad N., Prompamorn P., Panichakul T., Viriyasangjan J., Pramote P., Pisurat P. and Emyeam M. Growth of Melanoma Cells in Vitro Culture with Extracts of Queen's Flower (*Lagerstroemia speciosa* (L.) Per.). SDU Res. J. 2014, 7(1)-4: 41-56.

3. Panichakul T., Prompamor P., Boohaud N., Sriyam S., Kanganaprachachai A., Amyam M. Cytotoxic activity of Banaba's extracts against human melanoma cells: In vitro study. SDU Res. J. 2013, 6(2): 97-113.

อนุสิทธิบัตร

1. อนุสิทธิบัตรเลขที่ 11977 สบู่เหลวที่มีส่วนประกอบสารสกัดทองพันชั่ง

2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิวัตถ์ กุลชนะภควัต (Asst. Prof. Tiwatt Kuljanabhagavad)

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3700100976750
ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
หน่วยงาน หลักสูตรเทคโนโลยีเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
สถานที่ติดต่อ มหาวิทยาลัยสวนดุสิต 228-228/1-3 ถนนสิริธร เขตบางพลัด กรุงเทพมหานคร 10700
โทรศัพท์มือถือ 08-56789039 โทรศัพท์ 024-239432-3
โทรสาร 024-239434 E-mail: ktiwatt@gmail.com

ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี วท.บ. (เคมี) มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม
ปริญญาโท ภ.ม. (เภสัชพฤกษศาสตร์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาเอก Ph.D. (Pharmacy) Heidelberg University, Germany

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Medicinal Plants, Organic Chemistry, Food Chemistry, Pharmaceutical Biology

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในประเทศและภายนอกประเทศ

หัวหน้าโครงการวิจัย:

- Kuljanabhagavad T., Thongphasuk P., Thongphasuk J. & Wink M. Effect of irradiation on bioactive constituents and antioxidant activity of turmeric (Curcuma longa L.). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2016 (submitted).
- Kuljanabhagavad T., Sirithana W., Techasakul, S., Suttisri, R., Ruangrungsi, N. & Wink M. Ageratina adenophora an important invasive medicinal plant: phyto chemical and pharmacological profile 2014, Journal of Pharmacy and Pharmacology. (submitted)
- Kuljanabhagavad T., Sriubolmas N. & Ruangrungsi N. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from Heracleum siamicum Craib. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2011, 45(3): 178–182.
- Kuljanabhagavad T., Suttisri R., Pengsuparp, T. & Ruangrungsi N. Chemical structure and antiviral activity of aerial part from Laggera pterodonta Journal of Health Research. 2009, 23: 175–177.

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- ชื่องานวิจัย โครงการวิจัยเรื่องความหลากหลายของพืชสมุนไพรที่เป็นประโยชน์ทางยาในพื้นที่อุทยานแห่งชาติพุเตย จังหวัดสุพรรณบุรี (2555)

แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

- ชื่องานวิจัย โครงการวิจัยเรื่องศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชในวงศ์เอพีเอซี (Apiaceae)

แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)