



ฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วง

ANTI-AGING ACTIVITY OF MAUVE *CLITORIA TERNATEA* L. PETAL EXTRACT



ชนกานต์ ชีวบัณฑิต

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2563

ฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ANTI-AGING ACTIVITY OF MAUVE *CLITORIA TERNATEA* L. PETAL EXTRACT



CHANAKAN CHEEWABANTHOENG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Pharmaceutical Product Development)
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2020

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
ฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วง
ของ
ชนกานต์ ชีวบันเทิง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก	 ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง)	(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูดา จิตตสุโก)
	 กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามิ)

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วง
ผู้วิจัย	ชนกานต์ ชีวบัณฑิต
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2563
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วง โดยทดสอบการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส และวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วง วิธีการศึกษา: เตรียมสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วงโดยการสกัดผงกลีบดอกอัญชันสีม่วงด้วย 80% เอทานอล และระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ทดสอบฤทธิ์ชะลอวัย โดยรายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ทดสอบการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometry โดยใช้กรดแกลลิกเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก ทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetry โดยใช้เคอเวเซทินเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก วิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method, aluminium chloride complexation colorimetric method และ pH differential method ตามลำดับ ผลการศึกษา: สารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงมีค่า IC_{50} ในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเท่ากับ 2.95, 3.37 และ 12.67 mg/ml ตามลำดับ และมีปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก 27.84 mg GAE, สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ 3.47 mg QE, และสารกลุ่มแอนโทไซยานิน 0.02 mg CE ในสารสกัดกลีบดอกอัญชัน 1 กรัม สรุป: สารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วงมีฤทธิ์ชะลอวัย โดยการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส และพบสารกลุ่มฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วง ซึ่งฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วง น่าจะเป็นผลจากสารกลุ่มฟีนอลิกเนื่องจากพบปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดมากที่สุด

คำสำคัญ : ฤทธิ์ชะลอวัย, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส, สารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วง

Title	ANTI-AGING ACTIVITY OF MAUVE <i>CLITORIA TERNATEA</i> L. PETAL EXTRACT
Author	CHANAKAN CHEEWABANTHOENG
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2020
Thesis Advisor	Associate Professor Sarin Tadtong , Ph.D.

Objective: To investigate anti-aging properties of mauve *Clitoria ternatea* L. (commonly known as butterfly pea) petal extract, including anti-elastase, anti-collagenase and anti-hyaluronidase, as well as to determine the contents of total phenolic, total flavonoid, and total anthocyanin. Methods: The extract was prepared by soaking powdered mauve *C. ternatea* L. petal in 80% ethanol, then filtered and concentrated by a rotary evaporator. The anti-elastase and anti-collagenase activities were determined by spectrophotometry and gallic acid was used as a positive control, while anti-hyaluronidase test was determined by colorimetry and quercetin was used as a positive control and reported the anti-aging activity as half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}). The total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu method, based on the gallic acid standard curve. The total flavonoid content was determined by aluminium chloride complexation colorimetric method based on quercetin standard curve. The total anthocyanin content was determined by pH differential method based on cyanidin standard curve. Results: The anti-elastase, anti-collagenase, and anti-hyaluronidase activities of mauve *C. ternatea* L. petal extract exhibited IC_{50} values of 2.95, 3.37, and 12.67 mg/ml, respectively. The total phenolic, total flavonoid, and total anthocyanin were found 27.84 mg GAE/g, 3.47 mg QE/g, and 0.02 mg CE/g of the extract, respectively. Conclusion: Mauve *C. ternatea* L. petal extract possessed anti-aging properties by inhibiting the activity of elastase, collagenase, and hyaluronidase, as well as contained phenolic compounds, flavonoids, and anthocyanins. Thus, it can be deduced that the anti-aging properties of mauve *C. ternatea* L. petal extract might be the effect of phenolic compounds contained in the extract because the total phenolic content was found in highest amount in the extract among these three components.

Keyword : Anti-aging activity, anti-elastase, anti-collagenase, anti-hyaluronidase, mauve *Clitoria ternatea* L. petal extract

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับความช่วยเหลือจากรองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ซึ่งกรุณาให้คำปรึกษาและความรู้ต่าง ๆ ทั้งภาคทฤษฎีและภาคปฏิบัติ ตลอดจนจัดหาทุนสนับสนุนสารเคมีในการทำปริญญานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงตามความมุ่งหมาย รวมถึงรองศาสตราจารย์ ดร.ชุติน จิตตสุโก ประธานสอบปริญญานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามีกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำและแก้ไขข้อบกพร่องในการทำปริญญานิพนธ์จนรูปเล่มปริญญานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

หากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สร้างประโยชน์และคุณค่าแก่อาจารย์ บุคลากรทางการแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ และผู้สนใจศึกษาหาความรู้ทั่วไป ขอมอบคุณงามความดีครั้งนี้แก่ครอบครัว อาจารย์และผู้มีพระคุณที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ส่วนข้อบกพร่องทั้งหมดผู้วิจัยขอน้อมรับเพียงผู้เดียวและขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ชนกานต์ ชีวบัณฑิต

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
สมมุติฐานในการวิจัย.....	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	5
1. โครงสร้างผิวหนัง กระบวนการเสื่อมสภาพของผิวหนัง และการทดสอบฤทธิ์ชะลอวัย (anti-aging activity test)	5
2. ข้อมูลทางพิษศาสตร์ของอัญชัน	13
3. ฤทธิ์ทางชีวภาพของอัญชัน.....	15
4. สารกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compound) และฤทธิ์ชะลอวัย	16
5. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก (total phenolic content determination).....	18
6. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (total flavonoid content determination) ..	19

7. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน (total anthocyanin content determination).....	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	21
วิธีการดำเนินงานวิจัย	23
1. การเตรียมสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วงและหาปริมาณสารสกัดที่ได้	23
2. การหาฤทธิ์ชะลอวัย.....	24
3. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method	31
4. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation colorimetric method	33
5. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential method	35
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	37
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	38
1. ปริมาณสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่สกัดได้	38
2. ฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง.....	38
2.1 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง	38
2.2 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง.....	39
2.3 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง	41
3. ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง	42
4. ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง	43
5. ปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง	44
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	46
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	46
ข้อเสนอแนะ	47

บรรณานุกรม	48
ภาคผนวก.....	53
ประวัติผู้เขียน.....	66



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ปริมาณสารที่ใช้ทดสอบและวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส	26
ตาราง 2 ปริมาณสารที่ใช้ทดสอบและวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส	28
ตาราง 3 ปริมาณสารที่ใช้ทดสอบและวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส	31
ตาราง 4 ปริมาณสารที่ใช้ในการผสมสำหรับทดสอบหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก	33
ตาราง 5 ปริมาณสารที่ใช้ในการผสมสำหรับทดสอบหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์	35
ตาราง 6 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงและ gallic acid	39
ตาราง 7 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงและ gallic acid	40
ตาราง 8 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงและ quercetin	42
ตาราง 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm ของสารมาตรฐาน gallic acid (n=3, triplicate)	54
ตาราง 10 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง (n=3, triplicate)	56
ตาราง 11 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและผลต่างค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นและสุดท้ายที่ความยาวคลื่น 340 nm ของสารมาตรฐาน gallic acid (n=3, triplicate)	57
ตาราง 12 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและผลต่างค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นและสุดท้ายที่ความยาวคลื่น 340 nm ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง (n=3, triplicate)	59
ตาราง 13 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ของสารมาตรฐาน quercetin (n=3, triplicate)	60
ตาราง 14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง (n=3, triplicate)	61

ตาราง 15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid และสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง (n=3, triplicate)	62
ตาราง 16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ของสารละลายมาตรฐาน quercetin และสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง (n=3, triplicate)	63
ตาราง 17 ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 nm ของสารละลายมาตรฐาน cynidin และสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่ pH 1.0 (Abs _{1.0}) และ 4.5 (Abs _{4.5}) (n=3, triplicate)	64



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กระบวนการเสื่อมสภาพของผิวหนัง.....	7
ภาพประกอบ 2 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric method.....	13
ภาพประกอบ 3 ดอกอัญชันสีต่าง ๆ.....	14
ภาพประกอบ 4 สารกลุ่มฟีนอลิก.....	17
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างหลักของสารฟลาโวนอยด์	17
ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ pH ต่าง ๆ	20
ภาพประกอบ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง และ gallic acid	39
ภาพประกอบ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง และ gallic acid	41
ภาพประกอบ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง	42
ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm	43
ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm	44
ภาพประกอบ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanidin กับผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ pH 1.0 และ 4.5.....	45
ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐาน gallic acid.....	55
ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐาน gallic acid	55

ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง	57
ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐาน gallic acid	58
ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง	60
ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง	62
ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของ สารมาตรฐาน gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm	63
ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm	64
ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanidin กับผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ pH 1.0 และ 4.5.....	65

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ผิวหนังเป็นอวัยวะส่วนหนึ่งของร่างกายมนุษย์ที่ทำหน้าที่ปกคลุมและป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมภายนอกทั้งทางกายภาพ เคมี และชีวภาพแก่อวัยวะภายในร่างกายโดยผิวหนังมี 3 ชั้น ได้แก่ ผิวหนังชั้นนอก ชั้นหนังแท้ และชั้นไขมันใต้ผิวหนัง โดยชั้นหนังแท้มี extracellular matrix (ECM) เป็นส่วนประกอบหลัก เพื่อคงโครงสร้างของชั้นผิวหนังให้แข็งแรง มีความยืดหยุ่นและชุ่มชื้น ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยอีลาสติน เส้นใยคอลลาเจน ไฟโบรเนกติน และกรดไฮยาลูโรนิก (กัมพลเอี่ยมพนากิจ, 2560) โดยการเสื่อมสภาพของผิวหนังเกิดได้จากปัจจัยภายนอกในร่างกาย เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต มลพิษต่าง ๆ และปัจจัยภายในร่างกาย เช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ ซึ่งทั้ง 2 ปัจจัยกระตุ้นให้ matrix metalloproteinases (MMPs) ที่เป็นเอนไซม์ทำลาย ECM ทำงานมากขึ้น โดย MMPs ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของผิวหนัง ได้แก่ เอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ซึ่งทำลายเส้นใยอีลาสติน เส้นใยคอลลาเจน และกรดไฮยาลูโรนิกในชั้นผิวหนัง ทำให้ผิวหนังเสียสภาพ ขาดความยืดหยุ่น ขาดความชุ่มชื้น เกิดเป็นริ้วรอยและรอยเหี่ยวย่น (Garg, 2017)

ในปัจจุบันผู้คนให้ความสำคัญกับการชะลอการเสื่อมสภาพของผิวหนังมากขึ้น และมักเลือกใช้ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากพืชธรรมชาติ (Ganceviciene, Liakou, Theodoridis, Makrantonaki, & Zouboulis, 2012) เพื่อป้องกันการเกิดอาการแพ้หรือระคายเคืองผิวหนัง และลดการใช้สารเคมีที่อาจทำลายผิวหนังได้ ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืชธรรมชาติพบว่า สารสกัดจากดอกอัญชันและสารสกัดจากใบอัญชันมีสารกลุ่มฟีนอลิกที่สามารถยับยั้งการเกิดสารอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถลดเลือนริ้วรอยได้ (Rabeta & An Nabil, 2013) นอกจากนี้ยังมีพืชสมุนไพรอื่นที่มีฤทธิ์ชะลอวัย เช่น แคมเฟอรอล เคอเซทิน และไมริเซทินซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์คอลลาจีเนส (Kanashiro, Souza, Kabeya, Azzolini, & Lucisano-Valim, 2007; Sin & Kim, 2005) และแอนโทไซยานินมีฤทธิ์กระตุ้นการแสดงออกของ ECM mRNA ทำให้มีการสร้างเส้นใยอีลาสติน เส้นใยคอลลาเจน และกรดไฮยาลูโรนิกมากขึ้น (Nanashima et al., 2018) ซึ่งพืชสมุนไพรดังกล่าวพบในดอกอัญชัน โดยดอกอัญชันแต่ละสีมีชนิดและปริมาณของพืชเคมีที่แตกต่างกัน (Kazuma, Noda, & Suzuki, 2003) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นหากลไกในการชะลอวัยของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง และหาปริมาณรวมของพืช

เคมีที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการชะลอวัย ซึ่งได้แก่ สารกลุ่มฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มแอนโทไซยานิน

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง
2. เพื่อหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง
3. เพื่อหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง
4. เพื่อหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

ความสำคัญของการวิจัย

อัญชันเป็นไม้ล้มลุกที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย โดยออกดอกตลอดทั้งปี ซึ่งที่พบมีทั้งหมด 4 สี ได้แก่ สีน้ำเงิน สีม่วง สีฟ้า และสีขาว โดยดอกอัญชันสีน้ำเงินพบมากที่สุด รองลงมาคือดอกอัญชันสีม่วง สีฟ้า และสีขาวตามลำดับ จึงมีการนำสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีน้ำเงินมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นจำนวนมาก แต่ดอกอัญชันสีอื่น ๆ ยังพบน้อย ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง เนื่องจากเป็นสีที่พบมากในประเทศไทย รองมาจากดอกอัญชันสีน้ำเงิน รวมถึงเป็นดอกอัญชันสีเดียวที่พบสารกลุ่มแอนโทไซยานินชนิดเดลฟินิดิน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดดอกอัญชันและเจลบำรุงรอบดวงตาที่มีส่วนผสมของสารสกัดดอกอัญชันซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ สามารถช่วยลดเลือนริ้วรอยได้ (Kamkaen & Wilkinson, 2009) แต่การศึกษาลดเลือนริ้วรอยโดยการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันยังพบน้อย ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงศึกษาฤทธิ์ชะลอวัย โดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของผิวหนังโดยตรง เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการศึกษาและวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเพื่อลดเลือนและชะลอการเกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นของผิวหนังต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้มุ่งศึกษาฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่สกัดด้วย 80% ethanol และระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator และหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ชะลอวัย ด้วยวิธีการดังนี้

1. ศึกษาฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วง โดยศึกษาการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส ด้วยวิธี spectrophotometric method, ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ด้วยวิธี spectrophotometric method และศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric method
2. หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method
3. หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงด้วยวิธี aluminium chloride complexation colorimetric method
4. หาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงด้วยวิธี pH differential method

นิยามศัพท์เฉพาะ

ฤทธิ์ชะลอวัย หมายถึง ฤทธิ์ในการชะลอการเสื่อมสภาพของผิวหนัง โดยศึกษาจากฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส หมายถึง การลดหรือชะลอการทำลายเส้นใยอีลาสตินในชั้นผิวหนัง เพื่อคงสภาพความยืดหยุ่นของผิวหนัง ไม่ให้ผิวหนังเหี่ยวยุบหรือเกิดริ้วรอย ซึ่งวัดได้จากค่า %inhibition และ the half maximal inhibitory concentration (IC_{50})

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส หมายถึง การลดหรือชะลอการทำลายคอลลาเจนในชั้นผิวหนัง เพื่อให้โครงสร้างผิวหนังแข็งแรง ชะลอการเกิดริ้วรอยและรอยเหี่ยวยุบ ซึ่งวัดได้จากค่า %inhibition และ the half maximal inhibitory concentration (IC_{50})

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส หมายถึง การลดหรือชะลอการทำลายกรดไฮยาลูโรนิกที่อยู่ระหว่างเส้นใยอีลาสตินและคอลลาเจนในชั้นผิวหนัง เพื่อคงสภาพของโครงสร้างผิวหนังให้แข็งแรง ชะลอการเกิดริ้วรอยและรอยเหี่ยวยุบ รวมถึงให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง ซึ่งวัดได้จากค่า %inhibition และ the half maximal inhibitory concentration (IC_{50})

%inhibition หมายถึง ร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส หรือเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่คำนวณจากค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่วัดด้วยเครื่อง spectrophotometry

The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) หมายถึง ความเข้มข้นของสารสกัดกลีบดอกอัญชันที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส หรือเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ร้อยละ 50 โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารสกัดกลีบดอกอัญชันกับค่าเฉลี่ยของ %inhibition

สมมุติฐานในการวิจัย

สารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงมีฤทธิ์ชะลอวัย โดยยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส หรือเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

ดอกอัญชันสีม่วงมีสารกลุ่มฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มแอนโทไซยานิน เป็นองค์ประกอบ

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรม

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี

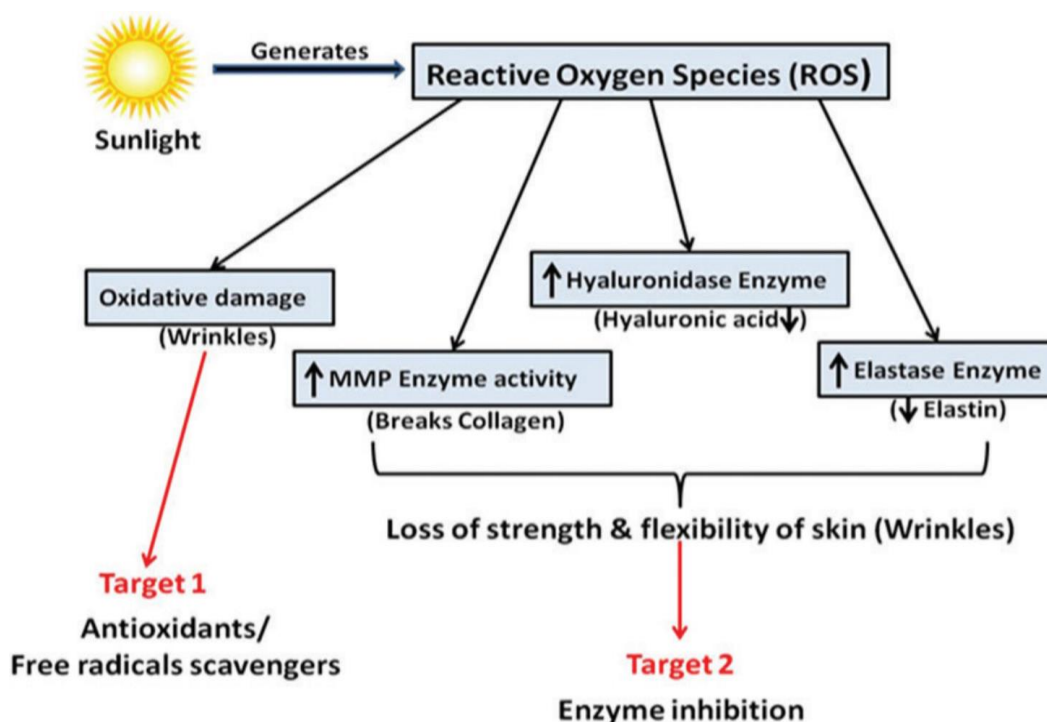
1. โครงสร้างผิวหนัง กระบวนการเสื่อมสภาพของผิวหนัง และการทดสอบฤทธิ์ชะลอวัย (anti-aging activity test)
2. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของอัญชัน
3. ฤทธิ์ทางชีวภาพของอัญชัน
4. สารกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compound) และฤทธิ์ชะลอวัย
5. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก (total phenolic content determination)
6. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (total flavonoid content determination)
7. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน (total anthocyanin content determination)

1. โครงสร้างผิวหนัง กระบวนการเสื่อมสภาพของผิวหนัง และการทดสอบฤทธิ์ชะลอวัย (anti-aging activity test)

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดของร่างกายมนุษย์ทำหน้าที่ปกคลุมและป้องกันอันตรายแก่อวัยวะภายใน ทั้งเชื้อโรค สิ่งแปลกปลอม และรังสีอัลตราไวโอเล็ต รวมถึงรับรู้ความรู้สึก และควบคุมอุณหภูมิร่างกาย โดยผิวหนังมีทั้งหมด 3 ชั้น ได้แก่ ผิวหนังชั้นนอกหรือชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ชั้นหนังแท้ (dermis) และชั้นไขมันใต้ผิวหนัง (hypodermis หรือ subcutis) (กัมพลเอี่ยมพนาภิจ, 2560) ซึ่งในชั้นหนังแท้จะมีองค์ประกอบเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของโปรตีนเส้นใยกลุ่มคอลลาเจน (collagen) และเส้นใยอีลาสติน (elastin) โดยมีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ในลักษณะของเส้นใยที่ทอประสานกัน ทำหน้าที่พยุงโครงสร้างของผิวหนังให้แข็งแรง ร่วมกับอีลาสตินเพื่อให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น รวมถึงในชั้นผิวหนังยังมีกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) ทำหน้าที่ประสานเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสตินเข้าด้วยกัน ทำให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น แข็งแรง ปราศจากริ้วรอย และดึงน้ำเข้าเซลล์เพื่อให้ผิวหนังมีความชุ่มชื้น (Garg, 2017) โดยการเสื่อมสภาพของผิวหนัง (skin aging) เกิดได้จาก 2 ปัจจัย ได้แก่

1. การเสื่อมสภาพของผิวหนังจากปัจจัยภายใน (Intrinsic skin aging) เกิดจากร่างกายสร้างคอลลาเจน อีลาสติน และกรดไฮยาลูโรนิกลดลง และมีการสลายตัวของคอลลาเจน อีลาสติน และกรดไฮยาลูโรนิกที่มากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น รวมถึงกระบวนการฟื้นคืนสภาพของผิวหนังมีประสิทธิภาพลดลง ส่งผลให้ผิวหนังสูญเสียสภาพความยืดหยุ่นและเกิดรอยเหี่ยวย่น อายุที่เพิ่มขึ้นยังกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเอส (matrix metalloproteinase; MMPs) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) เอนไซม์อีลาสเตส (elastase) และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) ที่เป็นเอนไซม์ทำลายคอลลาเจน อีลาสติน และกรดไฮยาลูโรนิกตามลำดับ (Garg, 2017) นอกจากนี้การเสื่อมสภาพของผิวหนังยังเกี่ยวข้องกับพันธุกรรม ความเครียด และฮอร์โมน ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ที่ลดลงส่งผลให้ผิวหนังสูญเสียความชุ่มชื้นและมีการสร้างคอลลาเจนในชั้นผิวหนังลดลง (Ganceviciene et al., 2012)

2. การเสื่อมสภาพของผิวหนังจากปัจจัยภายนอก (Extrinsic skin aging) เกิดจากการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Ultra Violet; UV) จากแสงแดด ซึ่งเป็นปัจจัยกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ MMPs มากขึ้น ทำให้อีลาสติน และกรดไฮยาลูโรนิกถูกทำลายมากขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกาย เกิดเป็นสารอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species, ROS หรือ free radical) โดยสารอนุมูลอิสระจะทำให้โมเลกุลของเซลล์ผิวหนังขาดเสถียรภาพ ส่งผลให้เซลล์ผิวหนังทำงานผิดปกติและเกิดริ้วรอยได้ รวมถึงสารอนุมูลอิสระยังกระตุ้นให้เอนไซม์ MMPs ทำงานมากขึ้น (Garg, 2017) ดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 กระบวนการเสื่อมสภาพของผิวหนัง

ที่ ม ๑ : Chanchal Garg, Priyanka Khurana, Munish Garg. (2017). International Journal of Green Pharmacy

1.1 อีลาสติน เอนไซม์อีลาสเตส และการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส (elastin, elastase and anti-elastase activity test)

อีลาสตินเป็นเส้นใยที่สร้างจากการ cross-linked tropoelastin เพื่อสร้างความยืดหยุ่นให้แก่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ปอด เส้นเอ็น ผนังหลอดเลือด และผิวหนัง เป็นต้น โดยเส้นใยอีลาสตินถูกทำลายด้วยเอนไซม์อีลาสเตส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease โดยเอนไซม์อีลาสเตสจะทำงานได้เมื่อถูก proteolysis ที่ N-terminal ด้วยกรดอะมิโนทริปซิน (trypsin) และใช้กรดอะมิโนเซอรีน (serine) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายเส้นใยอีลาสติน เมื่ออีลาสตินในชั้นผิวหนังถูกทำลายจะทำให้ผิวหนังเกิดริ้วรอย เหี่ยวย่น และขาดความยืดหยุ่น (Werb, Banda, Mckerrow, & Sandhaus, 1982)

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส (anti-elastase activity test) สามารถทดสอบได้ 2 วิธี คือ วิธี spectrophotometric method และวิธี spectrofluorometric method

1.1.1 วิธี spectrophotometric method

การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสจะใช้เอนไซม์ porcine pancreatic elastase (PPE) ในการเปลี่ยน N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide เป็น p-nitroanilide ซึ่งเกิดปฏิกิริยาดังนี้



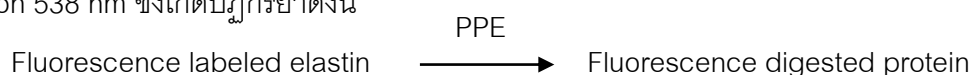
ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และปฏิกิริยาที่ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาทดสอบ (sample test) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ p-nitroanilide ที่ความยาวคลื่น 410 nm (optical density) (Wittenauer, Mäcke, Sußmann, Schweiggert-Weisz, & Carle, 2015; Wongsukkasem et al., 2018) ดังนั้นหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้ จะเกิดสาร p-nitroanilide น้อยกว่าในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ ซึ่งสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงของ p-nitroanilide ที่เกิดขึ้นในทั้งสองปฏิกิริยามาคำนวณหาฤทธิ์การยับยั้งเป็น %inhibition ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{\text{Optical density}_{\text{control}} - \text{Optical density}_{\text{sample}}}{\text{Optical density}_{\text{control}}} \times 100$$

เมื่อ Optical density คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ p-nitroanilide ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample test) ที่เวลาที่สิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

1.1.2 วิธี spectrofluorometric method

ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ porcine pancreatic elastase (PPE) กับสารตั้งต้น โดยสารตั้งต้น คือ elastin ที่ติดฉลากด้วยสี fluorescence เมื่อเกิดปฏิกิริยา elastin ที่ถูกย่อยได้ผลิตภัณฑ์เป็นโปรตีนที่สามารถเรืองแสง fluorescence ที่ excitation 485 nm และ emission 538 nm ซึ่งเกิดปฏิกิริยาดังนี้



ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และปฏิกิริยาที่ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาทดสอบ (sample test) โดยวัดโปรตีนเรืองแสง fluorescence ที่ excitation 485 nm และ emission 538 nm เป็นค่าการเรืองแสง fluorescence (fluorescence intensity) ของโปรตีนเรืองแสงที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา (Pientaweeratch, Panapisal, & Tansirikongkol, 2016) ดังนั้นหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้ การเกิดขึ้นของโปรตีนเรืองแสงจะน้อยกว่าในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ ซึ่งสามารถนำค่าการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนเรือง

แสงที่เกิดขึ้นในทั้งสองปฏิกิริยามาคำนวณหาฤทธิ์การยับยั้งเป็น %inhibition ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{Fluorescence\ intensity_{control} - Fluorescence\ intensity_{sample}}{Fluorescence\ intensity_{control}} \times 100$$

เมื่อ Fluorescence intensity คือ ค่าการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนเรืองแสงในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample test) ที่เวลาที่สิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

งานวิจัยนี้ทดสอบการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสด้วยวิธี spectrophotometric method โดยใช้ porcine pancreatic elastase (PPE) เป็นเอนไซม์ในการทดสอบ และใช้ N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide เป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยา

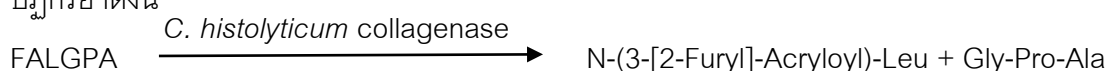
1.2 คอลลาเจน เอนไซม์คอลลาจีเนส และการทดสอบการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagen, collagenase and anti-collagenase activity test)

คอลลาเจนเป็นสายโปรตีนรูปร่าง triplex helix ที่เกิดจากการประสานกันของแอลฟา (α-chains) ของกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) โพรลีน (proline) และไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ซึ่งคอลลาเจนมีประมาณ 28 ชนิด ชนิดที่พบมากในชั้นหนังแท้ คือ คอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 3 (type I & III collagen) และคอลลาเจนชนิดที่ 7 (type VII collagen) จะกระจายอยู่ในบริเวณรอยต่อผิวหนังชั้นหนังแท้กับหนังกำพร้า โดยคอลลาเจนจะประสานกันเป็นร่างแหเพื่อสร้างความแข็งแรงให้กับโครงสร้างของชั้นผิวหนัง ซึ่งคอลลาเจนถูกทำลายด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนส โดยการทำลายพันธะระหว่างสายโปรตีน ทำให้เกิดการคลายตัวของโครงร่าง triplex helix เส้นใยคอลลาเจนจึงเสื่อมสภาพ ส่งผลให้โครงสร้างของผิวหนังขาดความแข็งแรง เกิดริ้วรอย (Alipour, Raz, Zakeri, & Djadid, 2016; León-López et al., 2019)

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส (anti-collagenase activity test) สามารถทดสอบได้ 2 วิธี คือ วิธี spectrophotometric method และวิธี spectrofluorometric method

1.2.1 วิธี spectrophotometric method

การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสใช้เอนไซม์ *Clostridium histolyticum* collagenase ในการเปลี่ยนสารตั้งต้น N-(3-[2-Furyl]-Acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) เป็นผลิตภัณฑ์ N-(3-[2-Furyl]-Acryloyl)-Leu และ Gly-Pro-Ala ตามปฏิกิริยาดังนี้



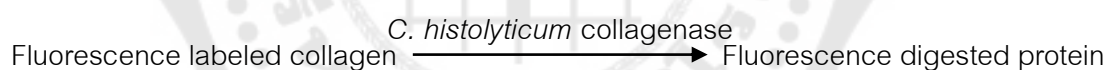
เมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และปฏิกิริยาที่ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาทดสอบ (sample test) วัดการลดลงของ FALGPA โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm (Chanvorachote et al., 2009; Wongsukkasem et al., 2018) โดยหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของ FALGPA จะน้อยกว่าปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และสามารถคำนวณหาฤทธิ์การยับยั้งเป็น %inhibition ได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{\text{Fluorescence intensity}_{control} - \text{Fluorescence intensity}_{sample}}{\text{Fluorescence intensity}_{control}} \times 100$$

เมื่อ Δ Optical density คือ การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยาของ FALGPA ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample test)

1.2.2 วิธี spectrofluorometric method

เอนไซม์ *C. histolyticum* collagenase ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น คือ collagen ที่ติดฉลากด้วยสี fluorescence ที่อุณหภูมิห้อง collagen จะถูกย่อยได้ผลิตภัณฑ์เป็นโปรตีนที่สามารถเรืองแสง fluorescence ที่ excitation 485 nm และ emission 538 nm ได้



ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และปฏิกิริยาที่ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาทดสอบ (sample test) โดยวัดการเกิดขึ้นของโปรตีนเรืองแสง fluorescence ที่ excitation 485 nm และ emission 538 nm เป็นค่าการเรืองแสง fluorescence (fluorescence intensity) ของโปรตีนเรืองแสง (Pientaweeratch et al., 2016) ดังนั้นหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ การเกิดขึ้นของโปรตีนเรืองแสงจะน้อยกว่าในปฏิกิริยาควบคุมผลลบซึ่งสามารถนำค่าการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนเรืองแสง ที่เกิดขึ้นในทั้งสองปฏิกิริยามาคำนวณหาฤทธิ์การยับยั้งเป็น %inhibition ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{\text{Fluorescence intensity}_{control} - \text{Fluorescence intensity}_{sample}}{\text{Fluorescence intensity}_{control}} \times 100$$

เมื่อ Fluorescence intensity คือ ค่าการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนเรืองแสงในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample test) ที่เวลาที่สิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

งานวิจัยนี้ทดสอบการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometric method โดยใช้ *C. histolyticum* collagenase เป็นเอนไซม์ในการทดสอบ และใช้ N-(3-[2-Furyl]-Acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) เป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยา

1.3 กรดไฮยาลูโรนิก เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronic acid, hyaluronidase and anti-hyaluronidase activity test)

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycan) ที่เกิดจากการเชื่อมกันเป็นพอลิเมอร์ (polymer) สายยาวระหว่างโมเลกุลของ D-glucuronic acid (GlcUA) และ N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) โดยพบตามกระดูกอ่อน น้ำไขข้อ น้ำเลี้ยงลูกตา และน้ำหล่อลื่นบริเวณส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เพื่อลดการเสียดสีของอวัยวะและเซลล์ และพบในผิวหนังโดยเป็นตัวประสานเส้นใยคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสตินเข้าด้วยกัน เพื่อคงสภาพของผิวหนังให้แข็งแรง มีความยืดหยุ่น ปราศจากริ้วรอย และทำให้ผิวหนังมีความชุ่มชื้นโดยการดึงน้ำเข้าเซลล์ผิว ซึ่งกรดไฮยาลูโรนิกถูกทำลายด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ทำให้กรดไฮยาลูโรนิกมีความหนืด (viscosity) ลดลง และเพิ่มความสามารถในการแทรกผ่าน (permeability) ส่งผลให้ผิวหนังสูญเสียน้ำขาดความชุ่มชื้น (Ikegami, 2004; Stern & Jedrzejewski, 2006)

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (anti-hyaluronidase activity test) สามารถทดสอบได้ 2 วิธี คือ วิธี turbidimetric method และวิธี colorimetric method

1.3.1 วิธี turbidimetric method

เป็นการวัดความขุ่นที่ลดลงของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกเนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ กรดไฮยาลูโรนิกจึงแขวนลอยในสารละลาย ทำให้เห็นสารละลายขุ่นตามความเข้มข้นของกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ เมื่อเติมเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสลงไป เอนไซม์จะตัดพันธะที่เชื่อมต่อกันระหว่างโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิก ทำให้กรดไฮยาลูโรนิกมีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง สามารถละลายได้มากขึ้น ทำให้ความขุ่นของสารละลายลดลงเมื่อเทียบกับก่อนเติมเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และปฏิกิริยาที่ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาทดสอบ (sample test) โดยวัดค่าความขุ่นของสารละลายที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 600 nm (optical density) (Ikegami, 2004; Schmith & Faber, 1950) ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจึงดูที่ค่าความขุ่นของสารละลายหลังเติมเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ถ้า

สารละลายมีความขุ่นไม่ต่างจากก่อนเติมเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส แสดงว่าสารที่ทดสอบนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

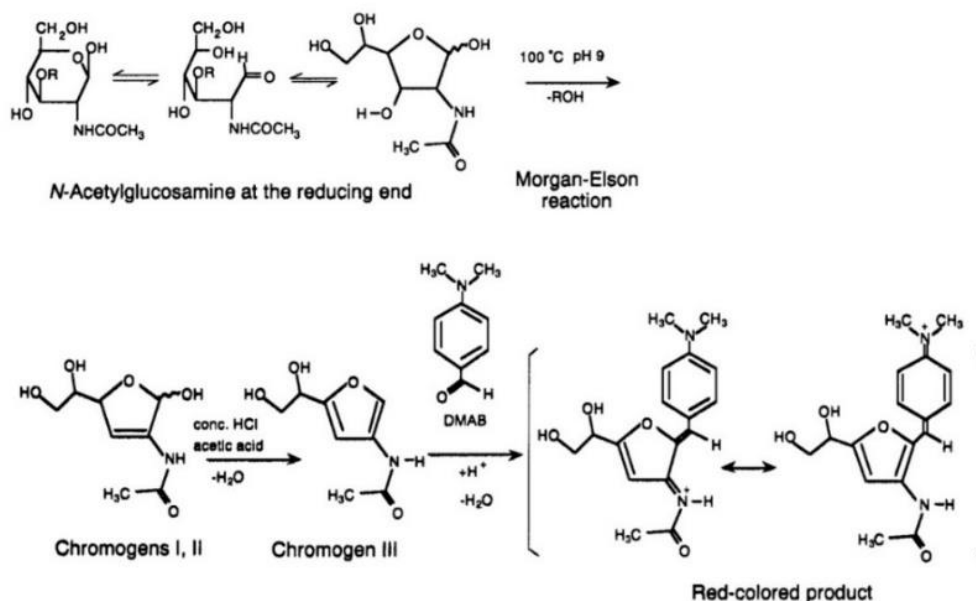
1.3.2 วิธี colorimetric method

การทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสใช้เอนไซม์ bovine testes hyaluronidase ทำปฏิกิริยากับกรดไฮยาลูโรนิก ได้ผลิตภัณฑ์เป็น N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) ซึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็น chromogen I และ II ภายใต้สภาวะที่เป็นเบสที่อุณหภูมิ 100 °C และจะถูกเปลี่ยนเป็น chromogen III โดยสภาวะกรด และ chromogen III จะทำปฏิกิริยากับ *p*-dimethylaminobenzaldehyde (PDMAB) เกิดเป็นสารละลายสีม่วง (reddish-purple) ที่สามารถวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 nm ดังภาพประกอบ 2 นอกจากนี้ได้มีการดัดแปลงวิธีการทดสอบโดยการทำปฏิกิริยาระหว่าง GlcNAc กับ *p*-dimethylaminobenzaldehyde (PDMAB) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 570 nm

ทำการทดสอบเปรียบเทียบระหว่างปฏิกิริยาที่ไม่ได้ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และปฏิกิริยาที่ใส่สารตัวอย่างเรียกว่า ปฏิกิริยาทดสอบ (sample test) โดยวัดการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์หลังเกิดปฏิกิริยาระหว่าง GlcNAc กับ *p*-dimethylaminobenzaldehyde (PDMAB) ที่ความยาวคลื่น 570 nm (Ikegami, 2004; Lee, Moon, Hong, Ahn, & Paik, 2020) ดังนั้นหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ จะเกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้อยกว่าในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ ซึ่งสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในทั้งสองปฏิกิริยามาคำนวณหาฤทธิ์การยับยั้งเป็น %inhibition ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%inhibition = \frac{Optical\ density_{control} - Optical\ density_{sample}}{Optical\ density_{control}} \times 100$$

เมื่อ Optical density คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ GlcNAc-PDMAB ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample test) ที่เวลาที่สิ้นสุดการทำปฏิกิริยา



ภาพประกอบ 2 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric method

ที่มา: Mayumi Ikegami. (2003). Stella Japan

งานวิจัยนี้ทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric method โดยใช้ bovine testes hyaluronidase เป็นเอนไซม์ในการทดสอบ และใช้กรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยา

2. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของอัญชัน

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Clitoria ternatea* L.

ชื่อวงศ์: Leguminosae (Papilionaceae, Fabaceae)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: อัญชันเป็นไม้ล้มลุกเลื้อยพัน โดยเถามีลักษณะกลม เล็กเรียวสีเขียวอ่อนยาว 1 - 5 เมตร ใบประกอบแบบขนนกปลายคี่เรียงสลับ มีใบย่อย 5 - 9 ใบ รูปวงรีแกมไข่มีขนปกคลุม ขอบใบเรียบ โคนใบสอบ ปลายใบมน กว้าง 1 - 3 เซนติเมตร ยาว 2 - 5 เซนติเมตร แกนกลางใบประกอบยาว 3 - 7 เซนติเมตร และหูใบรูปใบหอกขนาดเล็ก ดอกอัญชันมี 4 สี ได้แก่ สีน้ำเงิน สีม่วง สีฟ้า และสีขาว ดังภาพประกอบ 3 เป็นดอกเดี่ยวรูปทรงแบบดอกถั่วออก 1 - 2 ดอกตามซอกใบ มีทั้งดอกชั้นเดียวและดอกซ้อน กลีบ บดอกย่อยบาง ดอกบานเต็มที่ยาวประมาณ 3.5 เซนติเมตร ปลายเว้าเป็นแฉ่ง โดยดอกชั้นเดียวมีกลีบชั้นนอกขนาดใหญ่ที่สุด 1 กลีบ

กลางกลีบมีสีเหลือง กลีบชั้นในขนาดเล็กและแต่ละกลีบมีขนาดไม่เท่ากัน ดอกซ้อนจะมีกลีบดอกมีขนาดเท่ากันซ้อนเวียนเป็นเกลียว ออกดอกตลอดทั้งปี ผลเป็นฝักแบบฝักถั่ว ลักษณะแบนยาวกว้าง 1 - 1.5 เซนติเมตร ยาว 5 - 12 เซนติเมตร มีขนปกคลุม ปลายเป็นจางย่นสั้น ๆ ฝักอ่อนสีเขียว และฝักแก่สีน้ำตาลอ่อน มีเมล็ดรูปไตสีดำ 6 - 10 เมล็ด (ข้อมูลพันธุ์ไม้ ระบบฐานข้อมูลเกษตรดิจิทัล, 2560; สุดารัตน์ หอมหวาน, 2553)



ดอกสีน้ำเงิน

ดอกสีขาว

ดอกสีฟ้า

ดอกสีม่วง

ภาพประกอบ 3 ดอกอัญชันสีต่าง ๆ

พฤษเคมีที่พบในอัญชัน: ชนิดและปริมาณพฤษเคมีที่พบในแต่ละส่วนของอัญชันแตกต่างกัน แต่ส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มแทนนิน (tannins), คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates), ซาโปนิน (saponins), ไตรเทอร์ปีนอยด์ (triterpenoids), ฟีนอล (phenols), ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), ฟลาโวนอลไกลโคไซด์ (flavonol glycosides), โปรตีน (proteins), แอลคาลอยด์ (alkaloids), แอนทราควิโนน (anthraquinone), แอนโทไซยานิน (anthocyanins), คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides), น้ำมันหอมระเหย (volatile oils) และสเตียรอยด์ (steroids) (Al-Snafi, 2016; Lijon, Meghla, Jahedi, Rahman, & Hossain, 2017; Manjula, Mohan, Sreekanth, Keerthi, & Devi, 2013)

1. พฤษเคมีที่พบในใบ ได้แก่ แอลคาลอยด์, แทนนิน, เรซิน, ฟลาโวนอยด์, ไกลโคไซด์ และสเตียรอยด์
2. พฤษเคมีที่พบในราก ได้แก่ ซาโปนิน, ฟลาโวนอยด์ และฟีนอล
3. พฤษเคมีที่พบในยอดอ่อน ได้แก่ แอลคาลอยด์, แทนนิน, ไกลโคไซด์, เรซิน และฟลาโวนอยด์
4. พฤษเคมีที่พบในเมล็ด ได้แก่ แอลคาลอยด์, แทนนิน, ไกลโคไซด์, เรซิน และฟลาโวนอยด์

5. พฤษเคมีที่พบในดอก ได้แก่ แอลคาลอยด์, แทนนิน, ไกลโคไซด์, เรซิน, ซาโปนิน, คาร์โบไฮเดรต, ฟลาโวนอยด์ และสเตียรอยด์

นอกจากนี้ดอกอัญชันแต่ละสียังมีชนิดและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ต่างกัน โดยสารแอนโทไซยานินกลุ่มเดลฟินิดิน (delphinidin) พบในดอกอัญชันสีม่วงเท่านั้น ส่วนสารแอนโทไซยานินกลุ่มเทอร์นาทิน (ternatin) พบมากในดอกอัญชันสีน้ำเงิน รองมาคือดอกอัญชันสีฟ้า สำหรับในดอกอัญชันสีขาวตรวจไม่พบสารกลุ่มแอนโทไซยานิน คือไม่พบทั้งสารกลุ่มเดลฟินิดินและสารกลุ่มเทอร์นาทิน และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในดอกอัญชัน มี 3 ชนิด ได้แก่ แคมเฟอรอล, เคอเซทิน และไมริเซทิน (Kazuma et al., 2003)

3. ฤทธิ์ทางชีวภาพของอัญชัน

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของอัญชันพบว่าอัญชันมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial), ต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant), ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory), ต้านมะเร็ง (anti-cancer) ป้องกันมะเร็ง (chemoprevention) และปกป้องผิวหนัง (skin protective property) จากการศึกษาศักยภาพการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (anti-hyaluronidase) เอนไซม์อีลาสเตส (anti-elastase) และเอนไซม์คอลลาจีเนส (anti-collagenase) ของสารสกัดจากใบอัญชันในหลอดทดลอง (*In vitro*) โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดโอลีโนนิค (oleanolic acid) พบว่าสารสกัดจากใบอัญชันมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์คอลลาจีเนส ซึ่งช่วยในการสมานแผลที่ผิวหนังและชะลอการเสื่อมสลายของผิวหนังที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ (Maity, Nema, Sarkar, & Mukherjee, 2012) และจากการศึกษาการยับยั้งการเกิดสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่าสารสกัดจากดอกอัญชันและสารสกัดจากใบอัญชันมีสารกลุ่มฟีนอลิกที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (anti-oxidation) และต้านสารอนุมูลอิสระ ซึ่งสารอนุมูลอิสระเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์คอลลาจีเนสทำงานมากขึ้น ส่งผลให้กรดไฮยาลูโรนิค (hyaluronic acid) เส้นใยอีลาสติน (elastin) และคอลลาเจน (collagen) ในชั้นผิวหนังถูกทำลายมากขึ้น โครงสร้างผิวหนังเสื่อมสลาย ผิวหนังเกิดริ้วรอย รอยเหี่ยวย่น และสูญเสียความชุ่มชื้น (Jiratchayamaethasakul et al., 2020; Rabeta & An Nabil, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดดอกอัญชันและเจลบำรุงรอบดวงตาที่มีส่วนผสมของสารสกัดดอกอัญชันมีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถช่วยลดเลือนริ้วรอยได้ (Kamkaen & Wilkinson, 2009)

4. สารกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compound) และฤทธิ์ชะลอวัย

สารกลุ่มฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารทุติยภูมิหรือพฤษเคมีที่พืชสร้างขึ้นเพื่อการเจริญเติบโต โดยโครงสร้างของสารกลุ่มฟีนอลิกประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อย 1 หมู่ต่ออยู่บนวงแหวนเบนซีน ดังภาพประกอบ 4 โดยสารกลุ่มฟีนอลิกสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม (Butkhup, 2012) ได้แก่

4.1. กรดฟีนอลิก (phenolic acids) แบ่งออกเป็นกรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acids) เช่น กรดคาเฟอิก (caffeic acid), กรดคูมาริก (coumaric acid) เป็นต้น และกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids) เช่น กรดเอลลาจิก (ellagic acid), กรดแกลลิก (gallic acid) ซึ่งกรดฟีนอลิกมีฤทธิ์ต้านสารก่อมะเร็ง ด้านการอักเสบ และด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

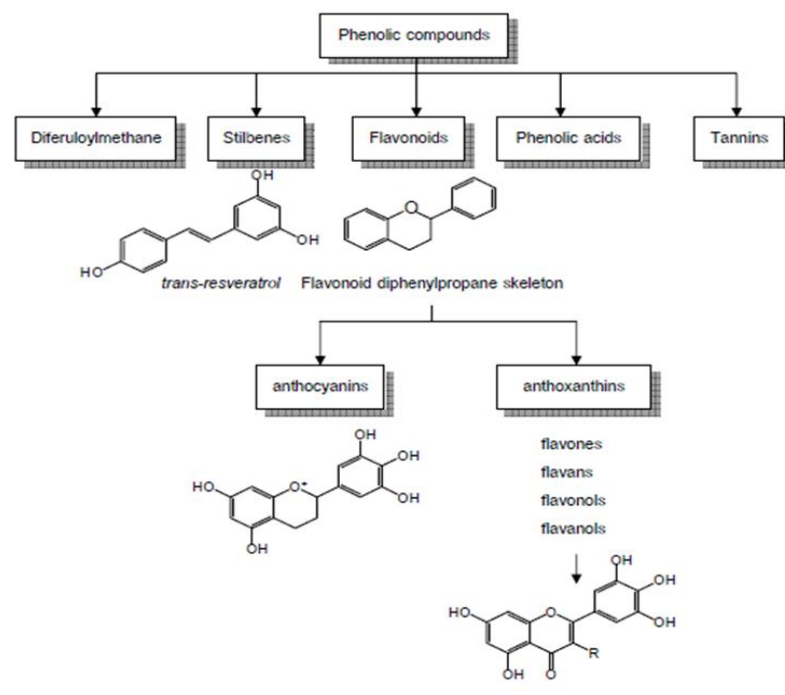
4.2. ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารกลุ่มฟีนอลิกที่พบมากที่สุด โดยมีโครงสร้างหลักเป็นเบนโซไพแรน (benzopyran) หรือฟลาแวนินิวเคลียส (flavan nucleus) ซึ่งประกอบด้วยวงเบนซีน (benzene) 2 วง (A และ B) ที่เชื่อมต่อกันด้วยวงไพแรน (pyran) หรือไพโรน (pyrone) (C) ดังภาพประกอบ 5 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ ring c ทำให้เกิดเป็นอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ ได้แก่ ฟลาโวน (flavones), ฟลาวาโนน (flavanone), ฟลาวานอล (flavanols), ฟลาวาโนนอล (flavanonols), ฟลาแวน (flavan), ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) และแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ซึ่งชนิดของฟลาโวนอยด์ที่พบส่วนใหญ่ คือ ไมริเซติน (myricetin), ฟิเซติน (fisetin), เคอเซทิน (quercetin), แคมเฟอรอล (kaempferol) และคาทีชิน (catechin) โดยฟลาโวนอยด์มีบทบาทสำคัญในการป้องกันสารก่อมะเร็ง ด้านการกลายพันธุ์ และต้านสารอนุมูลอิสระ โดยลดหรือป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

4.3. สติลบีน (stilbenes) เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันเชื้อโรค ป้องกันแมลงกัดกิน และป้องกันแสงแดด ซึ่งสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และด้านการอักเสบในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Chang et al., 2006)

4.4. แทนนิน (tannin) พบได้ทั่วไปในพืชเกือบทุกชนิด มีโมเลกุลใหญ่และมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ส่วนใหญ่พบในรูปของโกลโคไซด์ ซึ่งแบ่งออกเป็น condensed tannins และ hydrolysable tannins

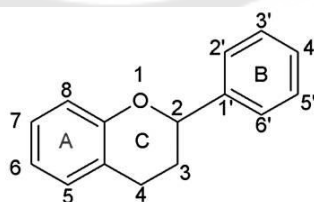
4.5. ไดเฟอรูลอยล์มีเทน (diferuloylmethanes) เป็นสารกลุ่มฟีนอลิกกลุ่มเล็ก ๆ ที่โครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก 2 วง มีหมู่ไฮดรอกซีเกาะอยู่ และจับอยู่กับหมู่

คาร์บอนิลแบบสายตรง สารไดเฟอรูลอยด์มีเทน เช่น เคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids) และ ไฮดรอกซีไทโรซอล (hydroxytyrosol)



ภาพประกอบ 4 สารกลุ่มฟีนอลิก

ที่มา: ลือชัย บุตุคุป. (2554). วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างหลักของสารฟลาโวนอยด์

ที่มา: Shashank Kumar และ Abhay K. Pandey. (2013). The Scientific World Journal

จากการศึกษาพบว่าสารกลุ่มฟีนอลิกสามารถยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ทำลาย extracellular matrix (ECM) ซึ่งประกอบด้วยคอลลาเจน อีลาสติน ไฟโบรเนคติน และกรดไฮยาลูโรนิกในชั้นผิวหนังได้ (Mukherjee, Maity, Nema, & Sarkar, 2011; Wittenauer et al., 2015) รวมถึงสารกลุ่มฟีนอลิกยังต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดการเกิดริ้วรอย และชะลอการเสื่อมของผิวหนังได้ (Wahab, Rahman, Ismail, Mustafa, & Hashim, 2014) และพืชที่มีสารกลุ่มฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส, เอนไซม์คอลลาจีเนสและต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) (Thring, Hili, & Naughton, 2009) และจากการศึกษา HPLC ของสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ชะลอวัยพบว่าเคอเซทิน, แคมเฟอรอล และกรดแกลลิกเป็นสารออกฤทธิ์ชะลอวัย (Ali, 2017) ซึ่งมีการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าแคมเฟอรอล, เคอเซทิน และไมริเซทินมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์คอลลาจีเนส (Kanashiro et al., 2007; Sin & Kim, 2005) และจากการศึกษาสารแอนโทไซยานินพบว่าสารแอนโทไซยานินกระตุ้นการแสดงออกของ ECM mRNA ส่งผลให้มีการสร้างคอลลาเจน อีลาสติน และกรดไฮยาลูโรนิกมากขึ้น (Nanashima et al., 2018)

5. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก (total phenolic content determination)

การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method (Chen, Cheng, & Liang, 2015; Miliauskas, Venskutonis, & Van Beek, 2004) เป็นการหาปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบทั้งหมดที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโมเลกุล โดยวัดการเกิดสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารละลายที่ต้องการทดสอบกับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมโมลิบเดต (sodium molybdate) กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) และโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) และอาศัยการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox) โดยสารจากธรรมชาติที่มีกลุ่มฟีนอลิกไฮดรอกซิล (phenolic hydroxyl group) หรือสารกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenols) ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในโมเลกุลจะสามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) กับ Folin-Ciocalteu reagent ในรูป Mo^{6+} ซึ่งมีสีเหลือง ได้เป็นผลิตภัณฑ์ คือ phosphotungstic acid และ phosphomolybdate ในรูป Mo^{5+} ที่มีสีน้ำเงิน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ในการหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารตัวอย่าง ทำได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารตัวอย่างจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณเป็นรูปมิลลิกรัมของ gallic acid equivalents (GAE)

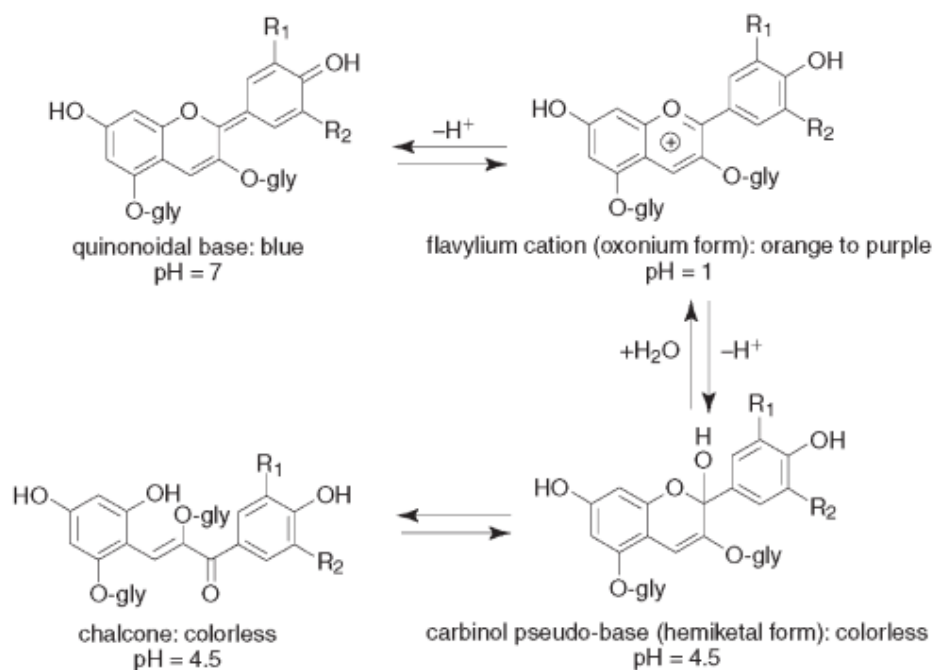
6. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (total flavonoid content determination)

การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation colorimetric method (Pekal & Pyrzyńska, 2014; Tadtong et al., 2011) เป็นการหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์จากสารประกอบเชิงซ้อนของอะลูมิเนียม-ฟลาโวนอยด์ (aluminium-flavonoid) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างอะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl_3) กับฟลาโวนอยด์ โดย AlCl_3 ทำปฏิกิริยากับหมู่คีโต (keto group) ในคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และหมู่ไฮดรอกซิลในคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 5 ของฟลาโวน และฟลาโวนอล หรือทำปฏิกิริยากับไดไฮดรอกซิล (dihydroxyl) ที่วงแหวน A และ B ของฟลาโวนอยด์ โดยใช้เวลาประมาณ 40 นาทีในการเกิดปฏิกิริยา เพื่อให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm

ในการหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ในสารตัวอย่าง ทำได้โดยการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายเคอเซทิน เพื่อหาสมการเส้นตรงในการคำนวณ ปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ในสารตัวอย่าง

7. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน (total anthocyanin content determination)

การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential method (อรุณา เชาวณลิขิต, 2554) อาศัยคุณสมบัติของแอนโทไซยานินที่เป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) โดยโครงสร้างของสารกลุ่มแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะความเป็นกรด-เบสของสารละลาย ทำให้ในแต่ละสารละลายมีสีที่แตกต่างกัน โดยแอนโทไซยานินในสารละลายที่มี pH 1 จะอยู่ในรูปออกซิเนียม (oxonium form) ซึ่งให้สีส้มอมม่วงหรือสีแดง และแอนโทไซยานินในสารละลายที่มี pH 4.5 จะอยู่ในรูปเฮมิคีทอล (hemiketal form) ซึ่งไม่มีสี ดังภาพประกอบ 6 เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดที่ pH 1 และ pH 4.5 แล้วนำมาหักลบกันจะได้ปริมาณรวมของสารแอนโทไซยานิน โดยแต่ละสภาวะกรด-เบสจะต้องกำจัดการดูดกลืนแสงจากสารอื่น ๆ ที่ไม่ใช่แอนโทไซยานินด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 nm เพื่อหักลบความขุ่นที่อาจจะเกิดขึ้น และให้ผลที่ได้มีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น



ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ pH ต่าง ๆ

ที่มา: อรุษา เชาวน์ลิขิต. 2554. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ข้อควรระวังของการหาปริมาณรวมของแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential method คือ สารละลายที่ใช้ต้องมี pH ที่ถูกต้องและแม่นยำ เนื่องจาก pH ที่เปลี่ยนไปจากมาตรฐานจะส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินเปลี่ยนแปลงไป ก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการทดสอบได้ รวมถึงระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาก็มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสง หากทิ้งปฏิกิริยาไว้นานจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้นได้ ดังนั้นควรวัดค่าการดูดกลืนแสงหลังการผสมสารทดสอบต่าง ๆ แล้วประมาณ 15 นาที แต่ไม่เกิน 60 นาที

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วงและหาปริมาณสารสกัดที่ได้
2. การหาฤทธิ์ชะลอวัย
 - 2.1 การหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสด้วยวิธี spectrophotometric method
 - 2.2 การหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometric method
 - 2.3 การหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric method
3. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method
4. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation colorimetric method
5. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential method

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
- เครื่องชั่ง 5 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Switzerland)
- เครื่องปั่น (Philips, Netherlands)
- 96 well/ flat bottom microtitre plate, non-sterile (Sterilin[®], UK)
- Aluminium foil (Diamond, Thailand)
- Beaker ขนาด 50 ml, 100 ml, 250 ml (Pyrex, USA)
- Centrifuge (MX-301, Tomy, Japan)
- Centrifuge tube ขนาด 15 ml, 50 ml (Corning, USA)
- Erlenmayer flask ขนาด 500 ml, 1000 ml, 2000 ml (Pyrex, USA)
- Funnel glass (Pyrex, USA)
- High speed refrigerated centrifuge (model MX-301, Tomy Seiko, Japan)
- Hot air oven (Contherm, Australia)
- Hot plate (Jenway 1000, UK)
- Incubator (Electronic Microprocessor PID Control, Memmert, Germany)

Microcentrifuge tube ขนาด 1.5, 2 ml (Bio7 Bioline, USA)

Micropipette ขนาด 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Gilson, France)

Micropipette tips ขนาด 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Axygen, USA)

Microplate reader (SpectraMax M3, Molecular Devices, USA)

pH meter (Mettler Toledo, Switzerland)

Porcelain evaporating dish

Rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114, Switzerland)

Round bottom flask (Buchi, Switzerland)

Sonicator (power sonic 405, model LUC-405, Lab Tech, Korea)

Vortex (GENIE 2™, G-560E, Scientific Industries Inc., USA)

Water bath

สารเคมี

4-(Dimethylamino)-benzaldehyde (PDMAB) (Sigma Aldrich, USA)

Aluminium chloride (AlCl₃) (Kemaus, Australia)

Calcium chloride (CaCl₂) (Merck KGaA, Germany)

Collagenase type I จาก *Clostridium histolyticum* (Sigma, USA)

Cyanidin chloride (Fluka, China)

Ethanol analytical grade (EMSURE®, Merck, Germany)

Ethanol commercial grade (95% ethanol) (สามชัยเคมีคอล, ประเทศไทย)

Folin-Ciocalteu's reagent (Carlo Erba, France)

Gallic acid (Sigma, USA)

Glacial acetic acid (Quality Reagent Chemical, New Zealand)

Hyaluronic acid (HA) (MySkinRecipes, Thailand)

Hyaluronidase from bovine testes (800 units/mg solid) (Sigma, USA)

Hydrochloric acid 37% (HCl) (ACI Labscan, Thailand)

N-(3-[2-Furyl]-Acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) (Sigma, USA)

N-succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide (SANA) (Sigma, USA)

Porcine pancreatic elastase type IV (PPE) (Sigma, USA)

Potassium chloride (KCl) (Ajax Finechem, Australia)

Quercetin (Sigma-aldrich, USA)

Sodium acetate (CH_3COONa) (Quality Reagent Chemical, New Zealand)

Sodium carbonate (Na_2CO_3) anhydrous (Ajax Finechem, New Zealand)

Sodium chloride (NaCl) (QReC, New Zealand)

Sodium hydroxide (NaOH) (Ajax Finechem Pty Ltd, Australia)

Sterile water for irrigation (A.N.B. Laboratorues, Thailand)

Tricine (Sigma, USA)

Tris-HCl (Sigma, USA)

พืชที่ใช้ในงานวิจัย

ดอกอัญชันสีม่วง เก็บจากจังหวัดนนทบุรี ประเทศไทย

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วงและหาปริมาณสารสกัดที่ได้

1.1 การเตรียมสารสกัดกลีบดอกอัญชัน

1.1.1 นำกลีบดอกอัญชันสีม่วงผึ่งลมในที่ร่มจนแห้ง และอบใน hot air oven ที่อุณหภูมิ $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น

1.1.2 ชั่งผงกลีบดอกอัญชันสีม่วง แล้วสกัดด้วย 80% ethanol ในสัดส่วนผงกลีบดอกอัญชัน 1 g ต่อ 80% ethanol 10 ml เป็นเวลา 3 วัน

1.1.3 กรองสารสกัดด้วยสำลีเพื่อให้ได้สารละลายใส และสกัดผงกลีบดอกอัญชันซ้ำ 5 ครั้ง

1.1.4 นำสารละลายใสไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator โดยตั้งค่าเป็น rotation 100 rpm, chiller $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, water bath $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ และ vacuum 70 – 180 mbar

1.1.5 นำมาระเหยต่อบน water bath ด้วยใช้ evaporating dish จนสารสกัดขึ้นเหนียว

1.1.6 เก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชา และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

1.2 การหาปริมาณสารสกัดที่ได้ (extraction yields)

ปริมาณสารสกัดที่ได้ คิดเป็นร้อยละผลได้ด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$\%yield = \frac{\text{น้ำหนักพืชก่อนสกัด} - \text{น้ำหนักสารสกัด}}{\text{น้ำหนักพืชก่อนการสกัด}} \times 100$$

2. การหาฤทธิ์ชะลอวัย

2.1 การหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสด้วยวิธี spectrophotometric method

2.1.1 การเตรียมสาร

2.1.1.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)

- ชั่งสาร Tris-HCl 3.152 g
- ละลายด้วย water for irrigation และปรับปริมาตรจนครบ 100 ml
- ปรับ pH ด้วยสารละลาย 1 N NaOH จนได้ pH 8.0

2.1.1.2 การเตรียมสารละลาย porcine pancreatic elastase type IV (PPE) (4.5 unit/mg solid) ความเข้มข้น 0.01 mg/ml

- ชั่งเอนไซม์ 0.00002 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer จนครบ 2000 μ l

2.1.1.3 การเตรียมสารละลาย N-Succinyl-(Ala)₃-p-nitroanilide (SANA) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.8 mM

- ชั่ง SANA 0.01444 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer จนครบ 4000 μ l

2.1.1.4 การเตรียมสารละลาย gallic acid ให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 4 mg/ml

- ชั่ง gallic acid 0.0075 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer จนครบ 1500 μ l

2.1.1.5 การเตรียมสารละลายของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง ความเข้มข้น 12.5 mg/ml (stock solution) และให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 2 – 6 mg/ml

- ชั่งสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง 0.05 g
- ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer จนครบ 4000 μ l
- เจือจาง stock solution ด้วย Tris-HCl buffer ให้ได้ความเข้มข้น 2.5, 3.75, 5, 6.25 และ 7.5 mg/ml หรือให้ได้ความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น

2.1.2 การหาความเหมาะสมของสภาวะทดสอบ

2.1.2.1 เตรียมสารละลาย gallic acid 5 ความเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0.25 - 4 mg/ml (วิธีการทดสอบใช้วิธีการเดียวกับข้อ 2.1.3 ในหัวข้อ positive control)

2.1.2.2 หา %inhibition ในการยับยั้งการทำงานของ PPE ทั้ง 5 ความเข้มข้น (ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ)

2.1.2.3 นำค่า %inhibition ที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสาร gallic acid กับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้และหาค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ เพื่อใช้เป็น positive control ในข้อ 2.1.3

2.1.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดกลีบดอก อัญชันสีม่วง

ทำการทดลองของแต่ละตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยทดสอบ negative control, positive control และ tested sample ใน 96-well plate

2.1.3.1 ปิเปตสารทดสอบลงใน 96-well plate ตามตาราง 1

2.1.3.2 incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีหลังจากเติม Tris-HCl buffer, สารทดสอบ และ PPE

2.1.3.3 เติมสาร SANA แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

2.1.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 410 nm

2.1.3.5 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

$$\%inhibition = \frac{Optical\ density_{control} - Optical\ density_{sample}}{Optical\ density_{control}} \times 100$$

เมื่อ Optical density คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitroanilide ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample test)

2.1.3.6 สำหรับสารทดสอบให้นำ ค่า %inhibition ทั้ง 5 ความเข้มข้นที่คำนวณได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารทดสอบกับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้ และหาค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

ตาราง 1 ปริมาตรสารที่ใช้ทดสอบและวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาเจส

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรสารใน 96-well plate (μl)					
	Tris-HCl Buffer	Sample	PPE	incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที	SANA	incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที
Negative control	160	-	20		20	
Blank negative control	180	-	-		20	
Positive control	-	160	20		20	
Blank positive control	20	160	-		20	
Tested sample	-	160	20		20	
Blank tested sample	20	160	-		20	

เมื่อ sample คือ gallic acid สำหรับ positive control และสารสกัดกลีบดอก
อัญชันสีม่วงสำหรับ tested sample

2.2 การหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometric

2.2.1 การเตรียมสาร

2.2.1.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tricine buffer (pH 7.5)

- ชั่งสาร Tricine 0.89590 g, NaCl 2.3376 g และ CaCl_2 2.3376 g
- ละลายด้วย water for irrigation และปรับปริมาตรจนครบ 100 ml
- ปรับ pH ด้วยสารละลาย 1 N NaOH จนได้ pH 7.5

2.2.1.2 การเตรียมสารละลาย collagenase type I from *Clostridium*

histolyticum ให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 6.25 collagen digestion unit; CDU

- ชั่งเอนไซม์ 0.005 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tricine buffer จนครบ 2000 μl

2.2.1.3 การเตรียมสารละลาย N-[3-(2-furyl)-acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala

(FALGPA) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.8 mM

- ชั่ง FALGPA 0.00381 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tricine buffer จนครบ 1000 μl

2.2.1.4 การเตรียมสารละลาย gallic acid ให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 4 mg/ml

- ชั่ง gallic acid 0.0075 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tricine buffer จนครบ 1500 μ l

2.2.1.5 การเตรียมสารละลายของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง ความเข้มข้น 12.5 mg/ml (stock solution) และให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 2 – 6 mg/ml

- ชั่งสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง 0.05 g

- ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tricine buffer จนครบ 4000 μ l

- เจือจาง stock solution ด้วย Tricine buffer ให้ได้ความเข้มข้น 3.125, 3.75, 4.375, 5 และ 5.65 mg/ml หรือให้ความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น

2.2.2 การหาความเหมาะสมของสภาวะทดสอบ

2.2.2.1 เตรียมสารละลาย gallic acid 5 ความเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0.25 - 4 mg/ml (วิธีการทดสอบใช้วิธีการเดียวกับข้อ 2.2.3 ในหัวข้อ positive control)

2.2.2.2 หา %inhibition ในการยับยั้งการทำงานของ collagenase type I ทั้ง 5 ความเข้มข้น (ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ)

2.2.2.3 นำค่า %inhibition ที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสาร gallic acid กับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้และหาค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ เพื่อใช้เป็น positive control ในข้อ 2.2.3

2.2.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

ทำการทดลองของแต่ละตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยทดสอบ negative control, positive control และ tested sample ใน 96-well plate

2.2.3.1 ปิเปตสารทดสอบลงใน 96-well plate ตามตาราง 2

2.2.3.2 incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีหลังจากเติม Tricine buffer, สารทดสอบ และเอนไซม์ collagenase type I

2.2.3.3 เติมน้ำ FALGPA แล้ว วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 340 nm ทุก ๆ 2 นาทีอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 20 นาที

2.2.3.4 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

$$\%inhibition = \frac{\Delta Optical\ density_{control} - \Delta Optical\ density_{sample}}{\Delta Optical\ density_{control}} \times 100$$

เมื่อ Δ Optical density คือ การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยาของ FALGPA ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample test)

2.2.3.5 สำหรับสารทดสอบให้นำ ค่า %inhibition ทั้ง 5 ความเข้มข้นที่คำนวณได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารทดสอบกับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้ และหาค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

ตาราง 2 ปริมาณสารที่ใช้ทดสอบและวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส

กลุ่ม	ลำดับและปริมาณสารใน 96-well plate (μl)				incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
	Tricine Buffer	Sample	Collagenase enzyme	FALGPA	
Negative control	120	-	15	15	
Blank negative control	135	-	15	-	
Positive control	-	120	15	15	
Blank positive control	15	120	15	-	
Tested sample	-	120	15	15	
Blank tested sample	15	120	15	-	

เมื่อ sample คือ gallic acid สำหรับ positive control และสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงสำหรับ tested sample

2.3 การหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric method

2.3.1 การเตรียมสาร

2.3.1.1 การเตรียม สารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M acetate buffer (pH 3.6)

- ชั่งสาร sodium acetate 0.03960 g และ acetic acid 0.57160 g
- ละลายด้วย water for irrigation และปรับปริมาตรจนครบ 100 ml
- ปรับ pH ด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้ pH 3.6

2.3.1.2 การเตรียมสารละลาย hyaluronidase from bovine testes (800 units/mg solid) ความเข้มข้น 7900 units/ml

- ชั่งเอนไซม์ 0.0395 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetate buffer จนครบ 4000 μ l

2.3.1.3 การเตรียมสารละลาย hyaluronic acid (HA) ความเข้มข้น 15 mg/ml

- ชั่ง HA 0.105 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetate buffer จนครบ 7000 μ l

2.3.1.4 การเตรียมสารละลาย *p*-dimethylaminobenzaldehyde (PDMAB)
- ชั่ง PDMAB 2 g ละลายด้วย 10N HCl 25 ml และ glacial acetic acid 175 ml

2.3.1.5 การเตรียมสารละลาย quercetin ให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.6 mg/ml

- ชั่ง quercetin 0.081 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol AR จนครบ 500 μ l

- นำไป sonicate จนได้สารละลายสีเหลืองใส

2.3.1.6 การเตรียมสารละลายของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง ความเข้มข้น 540 mg/ml (stock solution)

- ชั่งสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง 1.08 g

- ละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% ethanol จนครบ 2000 μ l

- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 รอบ โดยรอบที่ 2 ให้ปั่นเหวี่ยงส่วน supernatant ที่ได้จากรอบแรก

- เจือจางส่วน supernatant ด้วย 50% ethanol ให้ได้ความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 10 - 20 mg/ml

2.3.2 การหาความเหมาะสมของสภาวะทดสอบ

2.3.2.1 เตรียมสารละลาย quercetin 5 ความเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0.50 – 0.80 mg/ml (วิธีการทดสอบใช้วิธีการเดียวกับข้อ 2.3.3 ในหัวข้อ positive control)

2.3.2.2 หา %inhibition ในการยับยั้งการทำงานของ hyaluronidase ทั้ง 5 ความเข้มข้น (ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ)

2.3.2.3 นำค่า %inhibition ที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสาร quercetin กับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้และหาค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ เพื่อใช้เป็น positive control ในข้อ 2.3.3

2.3.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

ทำการทดลองของแต่ละตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ โดยทดสอบ negative control, positive control และ tested sample

2.3.3.1 ปิเปตสารทดสอบลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml ตามตาราง 3

2.3.3.2 incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 40 นาที หลังจากเติมเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส, สารทดสอบ และกรดไฮยาลูโรนิก

2.3.3.3 เติมสาร PDMA B แล้วปิเปตสารลงใน 96-well plate ปริมาตร 200 μ l จำนวน 3 wells/microcentrifuge tube

2.3.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 nm

2.3.3.5 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition

$$\%inhibition = \frac{Optical\ density_{control} - Optical\ density_{sample}}{Optical\ density_{control}} \times 100$$

เมื่อ Optical density คือ ค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์ GlcNAc-PDMA B ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และในปฏิกิริยาทดสอบ (sample test) ที่เวลาที่สิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

2.3.3.6 สำหรับสารทดสอบให้นำ ค่า %inhibition ทั้ง 5 ความเข้มข้นที่คำนวณได้ไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของตัวอย่างทดสอบกับค่าเฉลี่ยของ %inhibition ที่คำนวณได้ และหาค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

ตาราง 3 ปริมาตรสารที่ใช้ทดสอบและวิธีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรสาร microcentrifuge tube (μl)					incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 40 นาที
	Hyaluronidase	Sample	Acetate buffer	HA	PDMAB	
Negative control	50	-	50	250	1000	
Blank negative control	50	-	300	-	1000	
Solvent control	50	50	-	250	1000	
Blank solvent control	50	50	250	-	1000	
Positive control	50	50	-	250	1000	
Blank positive control	50	50	250	-	1000	
Tested sample	50	50	-	250	1000	
Blank tested sample	50	50	250	-	1000	

เมื่อ sample คือ ethanol AR สำหรับ solvent control, quercetin สำหรับ positive control และสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงสำหรับ tested sample

3. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method

3.1 การเตรียมสาร

3.1.1 การเตรียมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% v/v

- ปิเปต Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 1000 μl และเจือจางด้วย water for irrigation จนครบ 10 ml

3.1.2 การเตรียมสารละลาย sodium carbonate (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 75 mg/ml

- ชั่ง Na_2CO_3 0.375 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย water for irrigation จนครบ 5 ml

3.1.3 การเตรียมสารละลาย gallic acid ความเข้มข้น 10 mg/ml (stock solution) และให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 0.03125 – 0.5 mg/ml

- ชั่ง gallic acid 0.01 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol AR จนครบ 1000 μ l

- เจือจาง stock solution แบบ serial dilution ด้วย water for irrigation ให้ได้ความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 และ 5 mg/ml หรือให้ได้ความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น

3.1.4 การเตรียมสารละลายของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง ความเข้มข้น 5 mg/ml

- ชั่งสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง 0.05 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย 95% ethanol จนครบ 1000 μ l

3.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ gallic acid

3.2.1 ปิเปตสารทดสอบลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml ตามตาราง 4

3.2.2 incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที

3.2.3 ปิเปตสารลงใน 96-well plate ปริมาตร 200 μ l จำนวน 3 wells/microcentrifuge tube

3.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 nm

3.2.5 คำนวณหาผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสาร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของ sample ลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ blank sample

3.2.6 ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

3.2.7 นำค่าเฉลี่ยผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของ gallic acid มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความเข้มข้นของ gallic acid (mg/ml)

3.3 การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

3.3.1 ปิเปตสารทดสอบลงใน microcentrifuge tube 1.5 ml ตามตาราง 4

3.3.2 incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที

3.3.3 ปิเปตสารลงใน 96-well plate ปริมาตร 200 μ l จำนวน 3 wells/microcentrifuge tube

3.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 nm

3.3.5 คำนวณหาผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสาร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของ sample ลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ blank sample

3.3.6 ทำการทดลองของแต่ละตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

3.3.7 คำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง โดยนำค่าเฉลี่ยผลต่างค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงแทนค่าในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณเป็นมิลลิกรัมของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อกรัมของสารสกัด (mg/g)

ตาราง 4 ปริมาณสารที่ใช้ในการผสมสำหรับทดสอบหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก

กลุ่ม	ปริมาณสาร (μl)			
	Sample	Folin-ciocalteu reagent	Na ₂ CO ₃	Water for irrigation
Sample	100	100	100	700
Blank sample	100	-	-	900
Control	-	100	100	800

เมื่อ sample คือ gallic acid สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน และสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงสำหรับการทดสอบสารตัวอย่าง

4. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation colorimetric method

4.1 การเตรียมสาร

4.1.1 การเตรียมสารละลาย aluminium chloride (AlCl₃) ความเข้มข้น 8 mg/ml

- ชั่ง AlCl₃ 0.2400 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol AR จนครบ 30 ml

4.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้น 0.5 mg/ml (stock solution) และให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 2.5 - 18 μg/ml

- ชั่ง quercetin 0.0015 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% ethanol จนครบ 3000 μ l

- เจือจาง stock solution ด้วย 50% ethanol ให้ได้ความเข้มข้น 25, 50, 75, 100 และ 125 μ g/ml หรือให้ได้ความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 5 ความเข้มข้น

4.1.3 การเตรียมสารละลายของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง ความเข้มข้น 1 mg/ml

- ชั่งสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง 0.001 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย water for irrigation จนครบ 1000 μ l

4.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ quercetin

4.2.1 ปิเปตสารทดสอบลงใน microcentrifuge tube 15 ml ตามตาราง 5

4.2.2 incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที

4.2.3 ปิเปตสารลงใน 96-well plate ปริมาตร 200 μ l จำนวน 3 wells/microcentrifuge tube

4.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 415 nm

4.2.5 คำนวณหาผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสาร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของ sample ลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ blank sample

4.2.6 ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

4.2.7 นำผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสาร quercetin มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความเข้มข้นของ quercetin (μ g/ml)

4.3 การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

4.3.1 ปิเปตสารทดสอบลงใน microcentrifuge tube 15 ml ตามตาราง 5

4.3.2 incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที

4.3.3 ปิเปตสารลงใน 96-well plate ปริมาตร 200 μ l จำนวน 3 wells/microcentrifuge tube

4.3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 415 nm

4.3.5 คำนวณหาผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสาร โดยนำค่าการดูดกลืนแสงของ sample ลบด้วยค่าการดูดกลืนแสงของ blank sample

4.3.6 ทำการทดลองของแต่ละตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

4.3.7 คำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง โดยนำผลต่างค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงแทนค่าในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณเป็นมิลลิกรัมของ quercetin equivalence ต่อกรัมของสารสกัด (mg/g)

ตาราง 5 ปริมาณสารที่ใช้ในการผสมสำหรับทดสอบหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์

กลุ่ม	ปริมาณสาร (ml)		
	AlCl ₃	Ethanol AR	Sample
Sample	0.5	4	0.5
Blank sample	-	4.5	0.5
Control	0.5	4.5	-

เมื่อ sample คือ quercetin สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน และสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงสำหรับการทดสอบสารตัวอย่าง

5. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential method

5.1 การเตรียมสาร

5.1.1 การเตรียมสารละลาย 0.2 M potassium chloride (KCl) pH 1.0

- ชั่ง KCl 0.7455 g ละลายด้วย water for irrigation
- ปรับ pH ด้วย 0.2 M HCl ให้ได้ pH 1.0 และปรับปริมาตร water for irrigation จนครบ 50 ml

5.1.2 การเตรียมสารละลาย 0.4 M sodium acetate (CH₃COONa) pH 4.5

- ชั่ง CH₃COONa 0.1495 g ผสมกับ glacial acetic acid 0.08 ml
- ปรับปริมาตรด้วย sterile water for irrigation จนครบ 50 ml

5.1.3 การเตรียมสารละลาย cyanidin ความเข้มข้น 2 µg/ml (stock solution)

- ชั่ง cyanidin 0.00004 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol AR จนครบ 2000 μ l

5.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ cyanidin

5.2.1 เจือจาง cyanidin stock solution ด้วยสารละลาย KCl (pH 1.0) และ CH_3COONa (pH 4.5) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 0.125 - 4 $\mu\text{g/ml}$

5.2.2 incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 - 40 นาที

5.2.3 ปิ เป ต ส ร ลง ใน 96-well plate ปริมาตร 200 μ l จำนวน 3 wells/microcentrifuge tube

5.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 nm

5.2.5 คำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินจากสมการ

$$\text{Abs}_{\text{anthocyanin}} = (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 1.0} - (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

5.2.6 ทำการทดลองที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

5.2.7 นำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินของสาร cyanidin มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความเข้มข้นของ cyanidin ($\mu\text{g/ml}$)

5.3 การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

5.3.1 ชั่งสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง 0.0010 g ใส่ microcentrifuge tube จำนวน 2 หลอด

5.3.2 ละลายด้วย 35% ethanol ใน KCl (pH 1.0) จำนวน 1000 μ l 1 หลอด และอีก 1 หลอดละลายด้วย 35% ethanol ใน CH_3COONa (pH 4.5) จำนวน 1000 μ l

5.3.3 incubate ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 - 40 นาที

5.3.4 ปิ เป ต ส ร ลง ใน 96-well plate ปริมาตร 200 μ l จำนวน 3 wells/microcentrifuge tube

5.3.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 nm

5.3.6 คำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินจากสมการ

$$\text{Abs}_{\text{anthocyanin}} = (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 1.0} - (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

5.3.7 ทำการทดลองของแต่ละตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

5.3.8 คำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง โดยนำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงแทนค่าในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณเป็นมิลลิกรัมของ cyanidin equivalence ต่อกรัมของสารสกัด (mg/g)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา โดยรายงานฤทธิ์ชะลอวัยเป็นค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส หรือเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ร้อยละ 50 และความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean; SE) ($\text{IC}_{50} \pm \text{SE}$) และเปรียบเทียบฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงกับสารมาตรฐานที่ใช้เป็นปฏิกิริยาควบคุมผลบวก โดยนำค่า $\text{IC}_{50} \pm \text{SE}$ มาวิเคราะห์ด้วยวิธี independent t-test ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics กำหนดค่า $p \leq 0.05$ จึงจะยอมรับว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ และรายงานปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มแอนโทไซยานินเป็นร้อยละโดยมวล (%w/w) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid, quercetin และ cyanidin ตามลำดับ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาและวิจัยพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิวเพื่อลดเลือนและชะลอการเกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นของผิวหนัง โดยดำเนินการตามขั้นตอนต่าง ๆ ตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้ ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

1. ปริมาณสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่สกัดได้
2. ฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง
 - 2.1 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง
 - 2.2 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง
 - 2.3 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง
3. ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง
4. ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง
5. ปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

1. ปริมาณสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่สกัดได้

เมื่อสกัดผงกลีบดอกอัญชันสีม่วงหนัก 28.3 กรัม ด้วย 80% ethanol ได้สารสกัดหนัก 14.85 กรัม คิดเป็นร้อยละสารสกัดที่ได้โดยมวลเป็น 47.53

2. ฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

การศึกษาฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง โดยการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ให้ผลการทดลองดังนี้

2.1 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

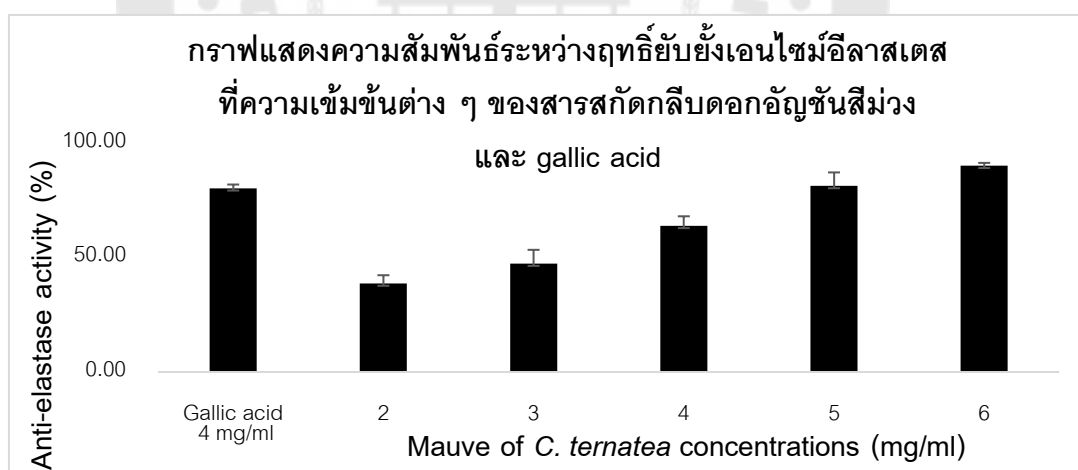
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น ด้วยวิธี spectrophotometric method โดยทดสอบความเหมาะสมของสภาวะทดสอบด้วยสารมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 0.25 – 4 mg/ml ซึ่งมีค่า $IC_{50} \pm SE$ เท่ากับ 1.56 ± 0.11 mg/ml จึงใช้ gallic acid ความเข้มข้น 4 mg/ml เป็นปฏิกิริยาควบคุมผลบวกในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดกลีบดอกอัญชัน โดยสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสดังแสดงในตาราง 6 และภาพประกอบ 7 ซึ่งมีค่า $IC_{50} \pm SE$ เท่ากับ 2.91 ± 0.36 mg/ml ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสน้อยกว่าสาร

มาตรฐาน gallic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (independent t-test = -3.440, df = 4, p -value = 0.026)

ตาราง 6 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงและ gallic acid

ความเข้มข้นสาร ตัวอย่าง (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการ ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส	สมการเส้นตรง	IC ₅₀ ± SE (mg/ml)
สารสกัดกลีบ ดอกอัญชัน สีม่วง	2 3 4 5 6	38.70 ± 3.63 47.41 ± 6.01 63.91 ± 4.19 81.37 ± 5.91 90.19 ± 1.27	y = 13.693x + 9.5464 R ² = 0.9857 2.91 ± 0.36 ^a
gallic acid	4	80.36 ± 1.63	
		-	

^a $p \leq 0.05$ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid



ภาพประกอบ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส
ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง และ gallic acid

2.2 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

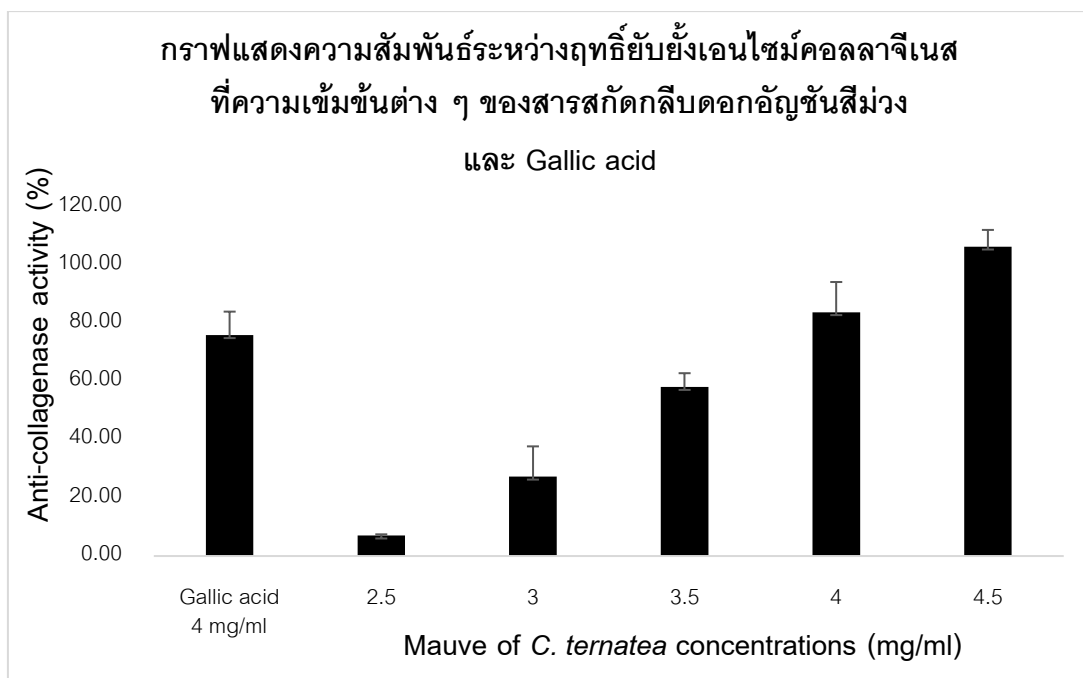
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่
ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น ด้วยวิธี spectrophotometric method โดยทดสอบความ
เหมาะสมของสภาวะทดสอบด้วยสารมาตรฐาน gallic acid ความเข้มข้น 2 – 4 mg/ml ซึ่งมีค่า

$IC_{50} \pm SE$ เท่ากับ 2.43 ± 0.02 mg/ml จึงใช้ gallic acid ความเข้มข้น 4 mg/ml เป็นปฏิกิริยาควบคุมผลบวกในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดกลีบดอกอัญชัน โดยสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสดังแสดงในตาราง 7 และภาพประกอบ 8 โดยมีค่า $IC_{50} \pm SE$ เท่ากับ 3.35 ± 0.01 mg/ml ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสน้อยกว่าสารมาตรฐาน gallic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (independent t-test = -38.160, df = 4, p -value < 0.0001)

ตาราง 7 รั้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงและ gallic acid

ความเข้มข้นสารตัวอย่าง (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยรั้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส	สมการเส้นตรง	$IC_{50} \pm SE$ (mg/ml)
สารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง	2.5 7.04 ± 0.43 3 27.28 ± 10.43 3.5 58.11 ± 4.76 4 83.84 ± 10.39 4.5 106.39 ± 5.75	$y = 51.049x - 122.14$ $R^2 = 0.9964$	3.35 ± 0.01^a
gallic acid	4 75.94 ± 8.10	-	2.43 ± 0.02

^a $p \leq 0.05$ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid



ภาพประกอบ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส
ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง และ gallic acid

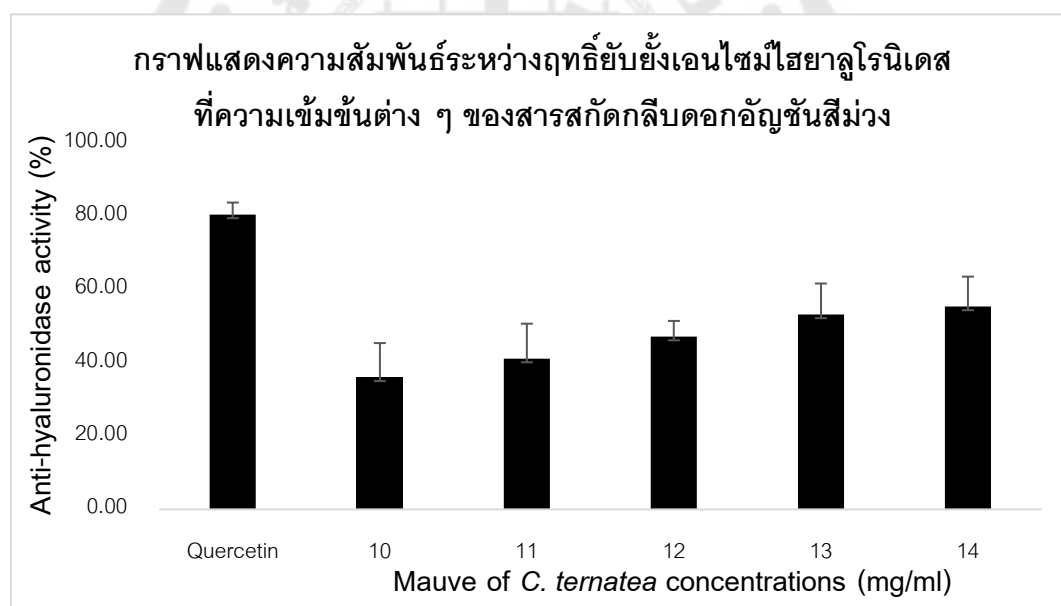
2.3 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น ด้วยวิธี colorimetric method โดยทดสอบความเหมาะสมของสภาวะทดสอบด้วยสารมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้น 2 – 4 mg/ml ซึ่งมีค่า $IC_{50} \pm SE$ เท่ากับ 0.56 ± 0.02 mg/ml จึงใช้ quercetin ความเข้มข้น 0.60 mg/ml เป็นปฏิกิริยาควบคุมผลบวกในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดกลีบดอกอัญชัน โดยพบว่าสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสดังแสดงในตาราง 8 และภาพประกอบ 9 โดยมีค่า $IC_{50} \pm SE$ เท่ากับ 11.93 ± 2.64 mg/ml ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสน้อยกว่าสารมาตรฐาน quercetin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (independent t-test = -5.395, df = 2.000, p-value = 0.033)

ตาราง 8 ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงและ quercetin

ความเข้มข้นสารตัวอย่าง (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส	สมการเส้นตรง	IC ₅₀ ± SE (mg/ml)
สารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง	10	$y = 5.0745x - 14.292$ $R^2 = 0.9814$	11.93 ± 1.73^a
	11		
	12		
	13		
	14		
Quercetin	0.6	-	0.56 ± 0.02

^a $p \leq 0.05$ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน quercetin

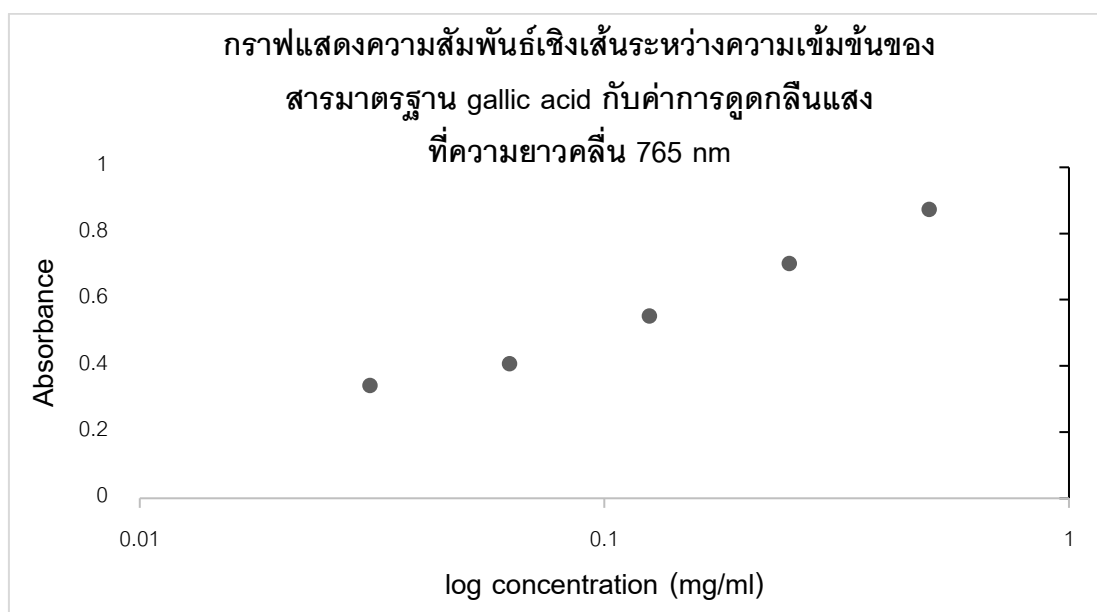


ภาพประกอบ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

3. ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

การทดสอบหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงด้วยวิธี Folin-ciocalteu method เป็นการเปรียบเทียบสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงกับสารมาตรฐาน gallic acid ในรูปของมิลลิกรัมของ gallic acid equivalents ต่อสารสกัด 1 กรัม

(mg GAE/g) โดยหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารมาตรฐาน gallic acid ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25, และ 0.5 mg/ml และหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ดังแสดงในภาพประกอบ 10



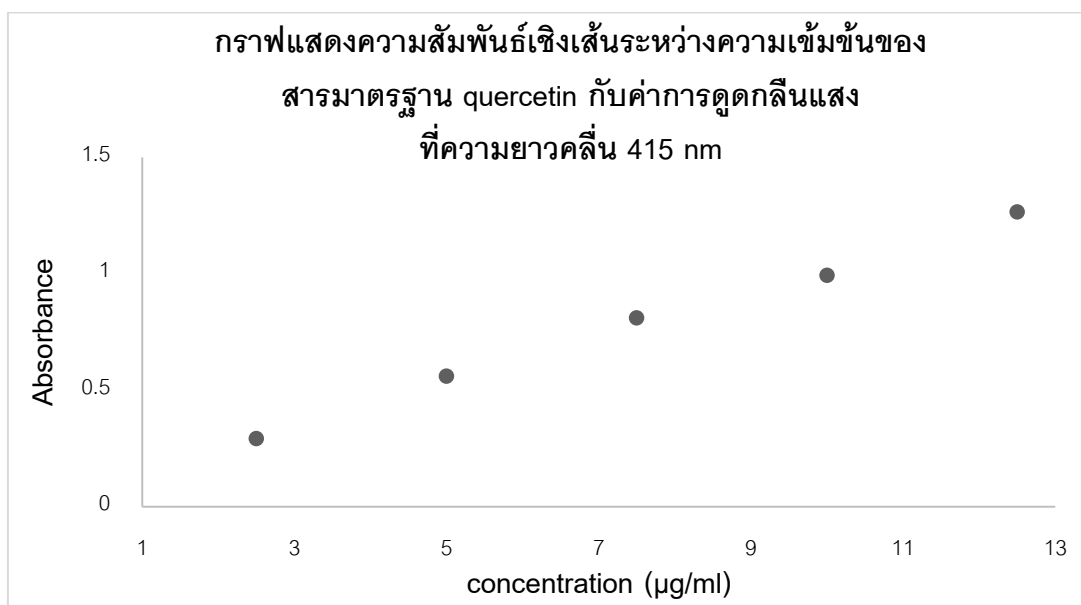
ภาพประกอบ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่ความเข้มข้น 5 mg/ml จำนวน 3 ครั้ง และคำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยสมการเชิงเส้น $y = 0.1974\ln(x) + 0.9867$ ได้เท่ากับ 29.14 ± 6.78 mg GAE/g ซึ่งคิดเป็น 2.91 ± 0.68 %w/w

4. ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

การทดสอบหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงด้วยวิธี aluminium chloride complexation colorimetric method เป็นการเปรียบเทียบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงกับสารมาตรฐาน quercetin ในรูปของมิลลิกรัมของ quercetin equivalents ต่อสารสกัด 1 กรัม (mg QE/g) โดยหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารมาตรฐาน quercetin ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 2.5, 5, 7.5, 10 และ

12.5 µg/ml และหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ดังแสดงในภาพประกอบ 11

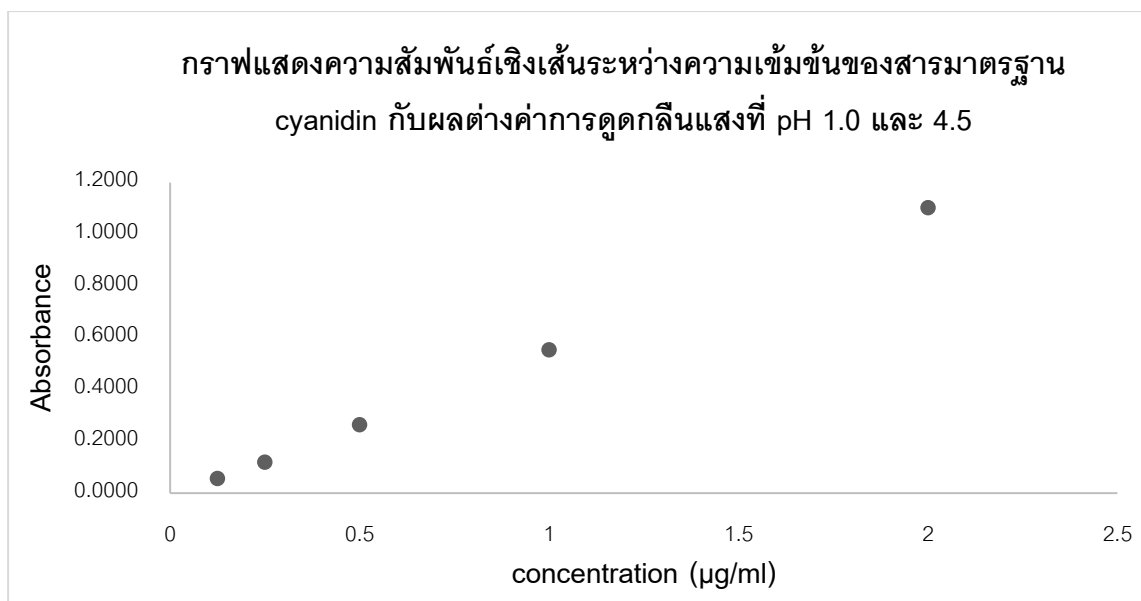


ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่ความเข้มข้น 1 mg/ml จำนวน 3 ครั้ง และคำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยสมการเชิงเส้น $y = 0.0952x + 0.0704$ ได้เท่ากับ 3.47 ± 0.46 mg QE/g ซึ่งคิดเป็น 0.35 ± 0.05 %w/w

5. ปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

การทดสอบหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงด้วยวิธี pH differential method เป็นการเปรียบเทียบสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงกับสารมาตรฐาน cyanidin ในรูปของมิลลิกรัมของ cyanidin equivalents ต่อสารสกัด 1 กรัม (mg CE/g) โดยหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารมาตรฐาน cyanidin ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.125, 0.25, 0.5, 1 และ 2 µg/ml และหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanidin กับผลต่างค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารที่ pH 1.0 และ 4.5 ดังแสดงในภาพประกอบ 12



ภาพประกอบ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน
cyanidin กับผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ pH 1.0 และ 4.5

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่ความเข้มข้น
10 mg/ml จำนวน 3 ครั้ง และคำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยสมการ
เชิงเส้น $y = 0.5611x - 0.0151$ ได้เท่ากับ 0.0217 ± 0.0043 mg QE/g ซึ่งคิดเป็น
 0.0043 ± 0.0009 %w/w

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วง โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometric method และทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric method พบว่าสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงมีฤทธิ์ชะลอวัย โดยยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำลายเส้นใยอีลาสติน เส้นใยคอลลาจีเนส และกรดไฮยาลูโรนิกในชั้นผิวหนัง ส่งผลให้โครงสร้างของชั้นผิวหนังถูกทำลาย และสูญเสียน้ำ จึงก่อให้เกิดริ้วรอยบนผิวหนัง สารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วงจึงป้องกันและชะลอการเสื่อมของผิวหนังได้ โดยสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสมากที่สุด รองลงมาคือฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดจากใบอัญชันที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมากกว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส (Maity et al., 2012) เนื่องจากสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วงและใบอัญชันมีฤทธิ์ชะลอวัยเหมือนกันแต่มีปริมาณฤทธิ์ชะลอวัยแต่ละชนิดที่ต่างกันจึงส่งผลให้สารสกัดจากอัญชันแต่ละส่วนมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน (Al-Snafi, 2016) ซึ่งฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วงขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ทดสอบ โดยสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่มีความเข้มข้นมากจะมีฤทธิ์ชะลอวัยได้ดีกว่าสารสกัดที่มีความเข้มข้นน้อย

จากการศึกษาชนิดและปริมาณฤทธิ์ชะลอวัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ชะลอวัย โดยงานวิจัยนี้ศึกษาหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มแอนโทไซยานินโดยเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid, quercetin และ cyanidin ตามลำดับ พบว่าสารสกัดจากกลีบดอกอัญชันสีม่วงมีสารกลุ่มฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มแอนโทไซยานิน โดยมีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกมากที่สุด รองลงมาคือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และสารกลุ่มแอนโทไซยานินตามลำดับ ซึ่งจากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์คอลลาจีเนสในงานวิจัยนี้ใช้สารมาตรฐาน gallic acid ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟีนอลิกเป็นสารทดสอบในปฏิกิริยาควบคุมผลบวก พบว่าสารมาตรฐาน gallic acid มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์คอลลาจีเนส นอกจากนี้สารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงยังมี gallic acid เป็นองค์ประกอบ (Pengkumsri, Kaewdoo, & Leeprechanon, 2019) จึงสรุปได้ว่าสารกลุ่มฟีนอลิกเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเสื่อมสลายของเซลล์ผิวหนัง ป้องกันการเกิดริ้วรอยและรอยเหี่ยวย่น โดยการยับยั้ง

เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์คอลลาจีเนสเป็นหลัก ซึ่งเป็นไปตามการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่า ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกมีความสัมพันธ์กับการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์คอลลาจีเนส แต่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูนิเดสไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก (Chiocchio et al., 2018; Eun, Kang, & Kim, 2020; Piwowarski, Kiss, & Kozłowska-Wojciechowska, 2011; Szewczyk et al., 2020) สารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงจึงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูนิเดสน้อยกว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์คอลลาจีเนส

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากประเทศไทยมีดอกอัญชันทั้งหมด 4 สี คือ สีน้ำเงิน สีม่วง สีฟ้า และสีขาว แต่ในงานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ชะลอวัยจากสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงเพียงสีเดียว จึงควรทดสอบฤทธิ์ชะลอวัยของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีน้ำเงิน สีฟ้า และสีขาวเพิ่มเติม เพื่อเปรียบเทียบและหา ดอกอัญชันสีที่มีฤทธิ์ชะลอวัยมากที่สุด และนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ลดเลือนริ้วรอยและชะลอวัยต่อไป รวมถึงควบคุมแหล่งวัตถุดิบและระยะเวลาในการเก็บเกี่ยววัตถุดิบเพื่อลดความคลาดเคลื่อนของปริมาณสารสกัด ชนิดและปริมาณพฤษเคมีที่สกัดได้ในแต่ละครั้ง

บรรณานุกรม

- Al-Snafi, A. E. (2016). Pharmacological importance of *Clitoria ternatea*—A review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 6(3), 68-83.
- Ali, A. (2017). Phenolics for skin photo-aging. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(4).
- Alipour, H., Raz, A., Zakeri, S., & Djadid, N. D. (2016). Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 975-981.
- Butkhup, L. (2012). Dietary polyphenols and their biological effects. *J. Science Technology Mahasarakham University*, 31, 443-454.
- Chang, J.-C., Lai, Y.-H., Djoko, B., Wu, P.-L., Liu, C.-D., Liu, Y.-W., & Chiou, R. Y.-Y. (2006). Biosynthesis enhancement and antioxidant and anti-inflammatory activities of peanut (*Arachis hypogaea* L.) arachidin-1, arachidin-3, and isopentadienylresveratrol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 10281-10287.
- Chanvorachote, P., Pongrakhananon, V., Luanpitpong, S., Chanvorachote, B., Wannachaiyasit, S., & Nimmannit, U. (2009). Type I pro-collagen promoting and anti-collagenase activities of *Phyllanthus emblica* extract in mouse fibroblasts. *Journal of Cosmetic Science*, 60(4), 395-403.
- Chen, L. Y., Cheng, C. W., & Liang, J. Y. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food chemistry*, 170, 10-15.
- Chiocchio, I., Mandrone, M., Sanna, C., Maxia, A., Tacchini, M., & Poli, F. (2018). Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors, two enzymatic targets of cosmetic interest. *Industrial Crops and Products*, 122(15), 498-505.
- Eun, C.-H., Kang, M.-S., & Kim, I.-J. (2020). Elastase/Collagenase Inhibition Compositions of Citrus unshiu and Its Association with Phenolic Content and Anti-Oxidant

- Activity. *Applied Sciences*, 10(14), 4838.
- Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2012). Skin anti-aging strategies. *Dermato-endocrinology*, 4(3), 308-319.
- Garg, C. (2017). Molecular mechanisms of skin photoaging and plant inhibitors. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 11(2).
- Ikegami, M. (2004). *Development of highly sensitive assay methods for hyaluronidase and their application to studies of possible involvement of the enzyme in diabetes mellitus progression using model rats*. Hoshiyakka.
- Jiratchayamaethasakul, C., Ding, Y., Hwang, O., Im, S.-T., Jang, Y., Myung, S.-W., . . . Lee, S.-H. (2020). In vitro screening of elastase, collagenase, hyaluronidase, and tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of 22 halophyte plant extracts for novel cosmeceuticals. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 23(1), 1-9.
- Kamkaen, N., & Wilkinson, J. (2009). The antioxidant activity of *Clitoria ternatea* flower petal extracts and eye gel. *Phytotherapy Research*, 23(11), 1624-1625.
- Kanashiro, A., Souza, J. G., Kabeya, L. M., Azzolini, A. E. C., & Lucisano-Valim, Y. M. (2007). Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(5-6), 357-361.
- Kazuma, K., Noda, N., & Suzuki, M. (2003). Flavonoid composition related to petal color in different lines of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*, 64(6), 1133-1139.
- Lee, J. H., Moon, S. H., Hong, Y., Ahn, D. U., & Paik, H.-D. (2020). Anti-elastase and anti-hyaluronidase activity of phosvitin isolated from hen egg yolk. *British Poultry Science*, 61(1), 17-21.
- León-López, A., Morales-Peñaloza, A., Martínez-Juárez, V. M., Vargas-Torres, A., Zeugolis, D. I., & Aguirre-Álvarez, G. (2019). Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications. *Molecules*, 24(22), 4031.
- Lijon, M. B., Meghla, N. S., Jahedi, E., Rahman, M. A., & Hossain, I. (2017). Phytochemistry and pharmacological activities of *Clitoria ternatea*. *International Journal of Natural and Social Sciences*, 4(1), 01-10.

- Maity, N., Nema, N. K., Sarkar, B. K., & Mukherjee, P. K. (2012). Standardized *Clitoria ternatea* leaf extract as hyaluronidase, elastase and matrix-metalloproteinase-1 inhibitor. *Indian journal of pharmacology*, 44(5), 584.
- Manjula, P., Mohan, C., Sreekanth, D., Keerthi, B., & Devi, B. P. (2013). Phytochemical analysis of *Clitoria ternatea* Linn., a valuable medicinal plant. *The Journal of Indian Botanical Society*, 92(3and4), 173-178.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P., & Van Beek, T. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.
- Mukherjee, P. K., Maity, N., Nema, N. K., & Sarkar, B. K. (2011). Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine*, 19(1), 64-73.
- Nanashima, N., Horie, K., Maeda, H., Tomisawa, T., Kitajima, M., & Nakamura, T. (2018). Blackcurrant anthocyanins increase the levels of collagen, elastin, and hyaluronic acid in human skin fibroblasts and ovariectomized rats. *Nutrients*, 10(4), 495.
- Pełka, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776-1782.
- Pengkumsri, N., Kaewdoo, K., & Leeprechanon, W. (2019). Influence of Extraction Methods on Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Some of the Commonly Used Plants in Thailand. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 22(3), 117-126.
- Pientaweeratch, S., Panapisal, V., & Tansirikongkol, A. (2016). Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and silymarin: An in vitro comparative study for anti-aging applications. *Pharmaceutical biology*, 54(9), 1865-1872.
- Piowowski, J. P., Kiss, A. K., & Kozłowska-Wojciechowska, M. (2011). Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 937-941.
- Rabeta, M., & An Nabil, Z. (2013). Total phenolic compounds and scavenging activity in

- Clitoria ternatea* and *Vitex negundo* linn. *International Food Research Journal*, 20(1).
- Schmith, K., & Faber, V. (1950). The turbidimetric method for determination of hyaluronidase. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 2(4), 292-297.
- Sin, B. Y., & Kim, H. P. (2005). Inhibition of collagenase by naturally-occurring flavonoids. *Archives of pharmacal research*, 28(10), 1152-1155.
- Stern, R., & Jedrzejewski, M. J. (2006). Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chemical reviews*, 106(3), 818-839.
- Szewczyk, K., Miazga-Karska, M., Pietrzak, W., Komsta, L., Krzemińska, B., & Grzywa-Celińska, A. (2020). Phenolic Composition and Skin-related Properties of the Aerial Parts Extract of Different *Hemerocallis* Cultivars *Antioxidants*, 9(8).
- Tadtong, S., Athikomkulchai, S., Worachanon, P., Chalongsol, P., Chaichanachai, P., & Sareedenchai, V. (2011). Antibacterial activities of rambutan peel extract. *Journal of Health Research*, 25(1), 35-37.
- Thring, T. S., Hili, P., & Naughton, D. P. (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC complementary and alternative medicine*, 9(1), 27.
- Wahab, N. A., Rahman, R. A., Ismail, A., Mustafa, S., & Hashim, P. (2014). Assessment of antioxidant capacity, anti-collagenase and anti-elastase assays of Malaysian unfermented cocoa bean for cosmetic application. *Nat Prod Chem Res*, 2(132), 2.
- Werb, Z., Banda, M. J., Mckerrrow, J. H., & Sandhaus, R. A. (1982). Elastases and elastin degradation. *Journal of Investigative Dermatology*, 79(1), 154-159.
- Wittenauer, J., Mäcke, S., Sußmann, D., Schweiggert-Weisz, U., & Carle, R. (2015). Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia*, 101, 179-187.
- Wongsukkasem, N., Soynark, O., Suthakitmanus, M., Chongdiloet, E., Chairattanapituk, C., Vattanikitsiri, P., . . . Tadtong, S. (2018). Antiacne-causing Bacteria, Antioxidant, Anti-Tyrosinase, Anti-Elastase and Anti-Collagenase Activities of Blend Essential

Oil comprising Rose, Bergamot and Patchouli Oils. *Natural Product Communications*, 13(5).

กัมพล เอี่ยมพนากิจ. (2560). โครงสร้างและหน้าที่ของผิวหนัง.

https://meded.psu.ac.th/binlaApp/class02/orientation/Manifestation_of_skin/index.html

ข้อมูลพันธุ์ไม้ ระบบฐานข้อมูลเกษตรดิจิทัล. (2560). อัญชัน *Clitoria ternatea* L.

<https://data.addrun.org/plant/archives/200-clitoria-ternatea-l>

สุदारัตน์ หอมหวาน. (2553). ฐานข้อมูลสมุนไพร-อัญชัน.

<http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=139>

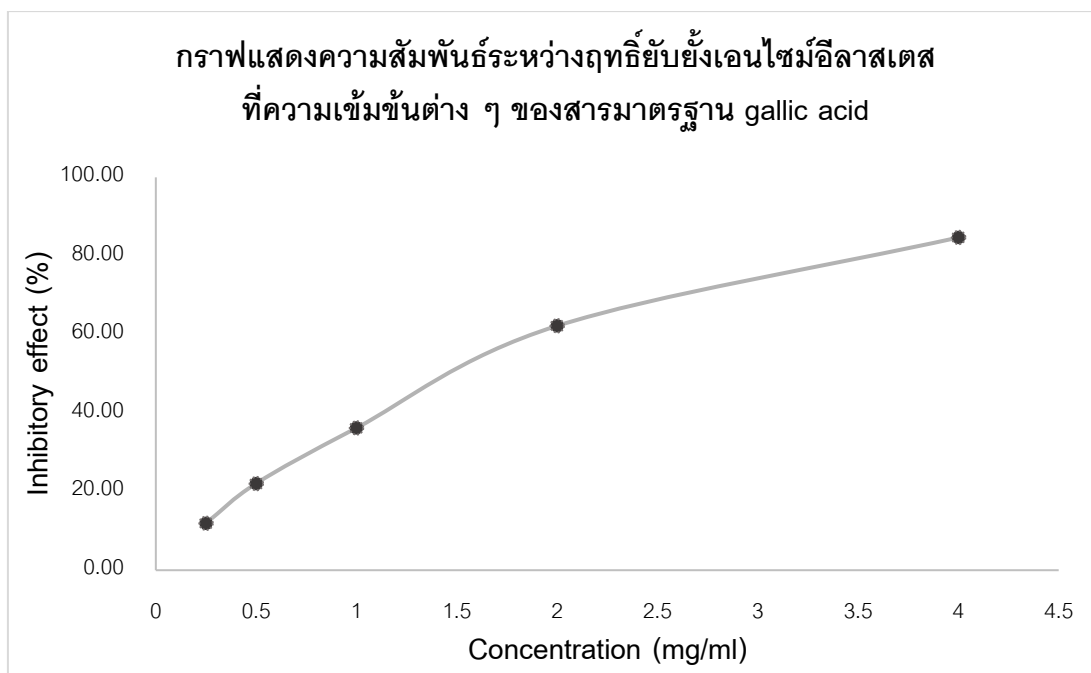
อรุษา เชาวน์ลิขิต. (2554). การสกัดและวิธีการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน (EXTRACTION AND ANALYSIS OF ANTHOCYANIN). *Journal of Srinakharinwirot University (Journal of Science and Technology)*, 3(6), 26-36.



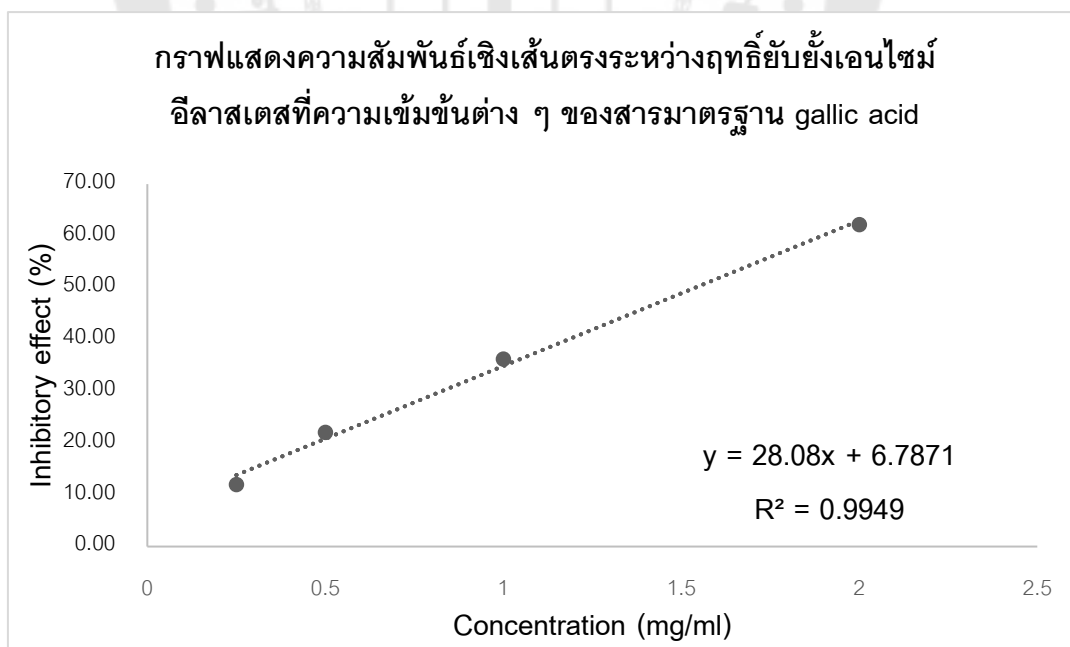
1. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส

ตาราง 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm ของสารมาตรฐาน gallic acid (n=3, triplicate)

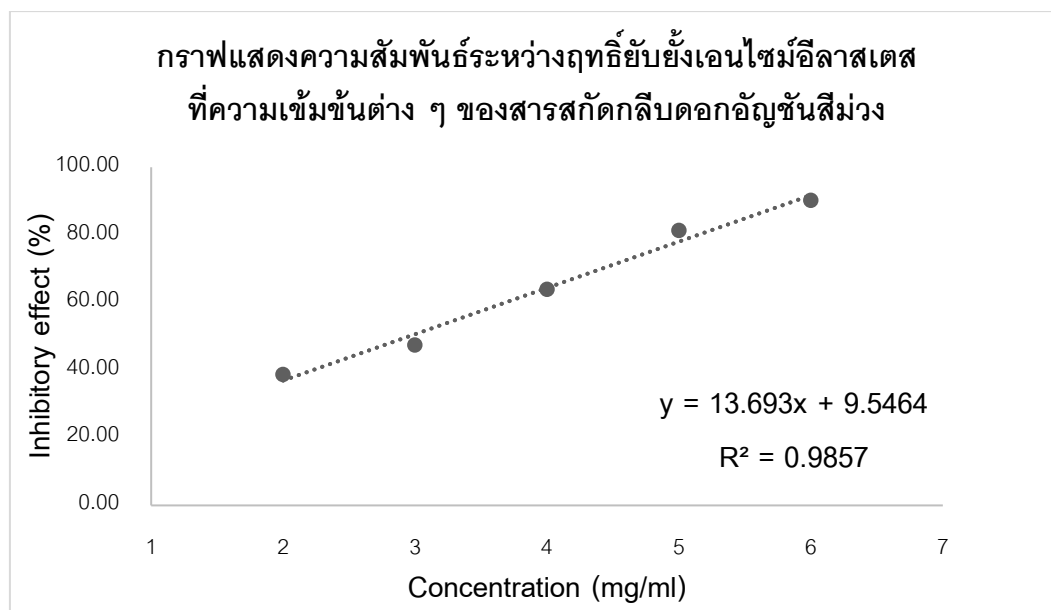
		ความเข้มข้น (mg/mL)					Negative control
		0.25	0.50	1	2	4	
N ₁	Sample (S)	3.7937	3.9913	4.0000	4.0000	3.4390	3.2657
	Blank (B)	0.8753	1.3997	1.7940	2.9930	2.8653	0.0593
	S-B	2.9183	2.5917	2.2060	1.0070	0.5737	3.2063
	%Inhibition	8.98	19.17	31.20	68.59	82.11	
	สมการเส้นตรง	$y = 33.541x + 0.542, R^2 = 0.9937$					$IC_{50} = 1.47$
N ₂	Sample (S)	3.8090	3.9633	4.0000	4.0000	3.3900	3.4333
	Blank (B)	0.8763	1.3647	1.9177	2.3823	2.7740	0.0587
	S-B	2.9327	2.5987	2.0823	1.6177	0.6160	3.3747
	%Inhibition	13.10	22.99	38.30	52.06	81.75	
	สมการเส้นตรง	$y = 21.508x + 11.449, R^2 = 0.9446$					$IC_{50} = 1.79$
N ₃	Sample (S)	3.7497	3.9873	4.0000	4.0000	3.3703	3.3390
	Blank (B)	0.9380	1.5093	2.0140	2.8880	3.0497	0.0760
	S-B	2.8117	2.4780	1.9860	1.1120	0.3207	3.2630
	%Inhibition	13.83	24.06	39.14	65.92	90.17	
	สมการเส้นตรง	$y = 29.191x + 8.3701, R^2 = 0.995$					$IC_{50} = 1.43$
AVE _{%Inhibition}		11.97	22.07	36.21	62.19	84.68	
สมการเส้นตรง		$y = 28.08x + 6.7871, R^2 = 0.9949$					$IC_{50} = 1.54$
IC ₅₀ ± SE		1.56 ± 0.11					



ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส
ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐาน gallic acid



ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส
ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐาน gallic acid



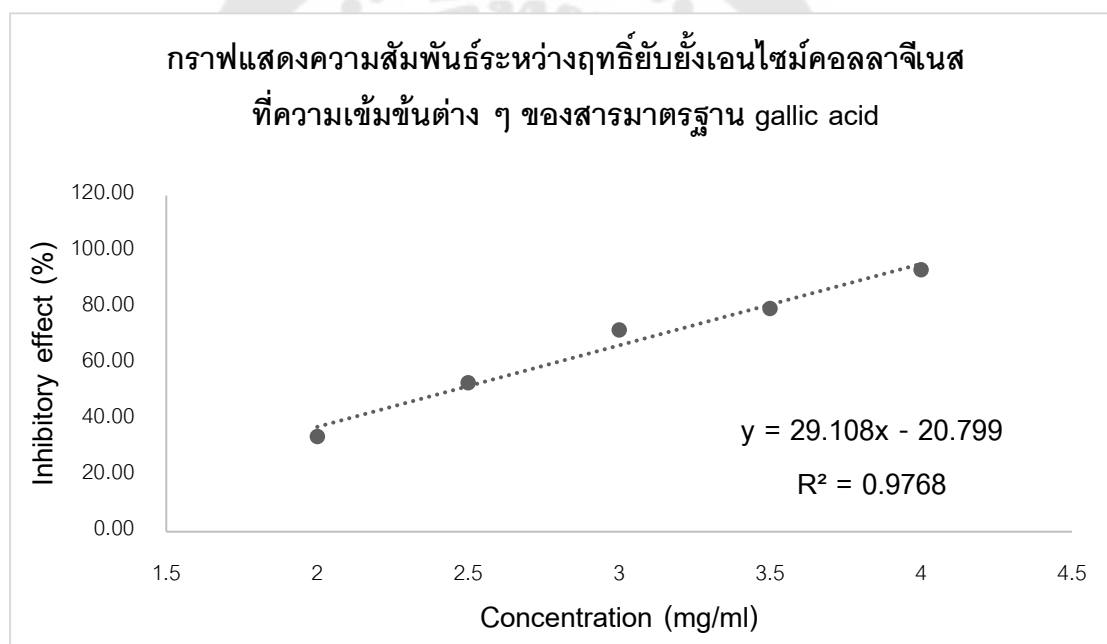
ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส
ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

2. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส

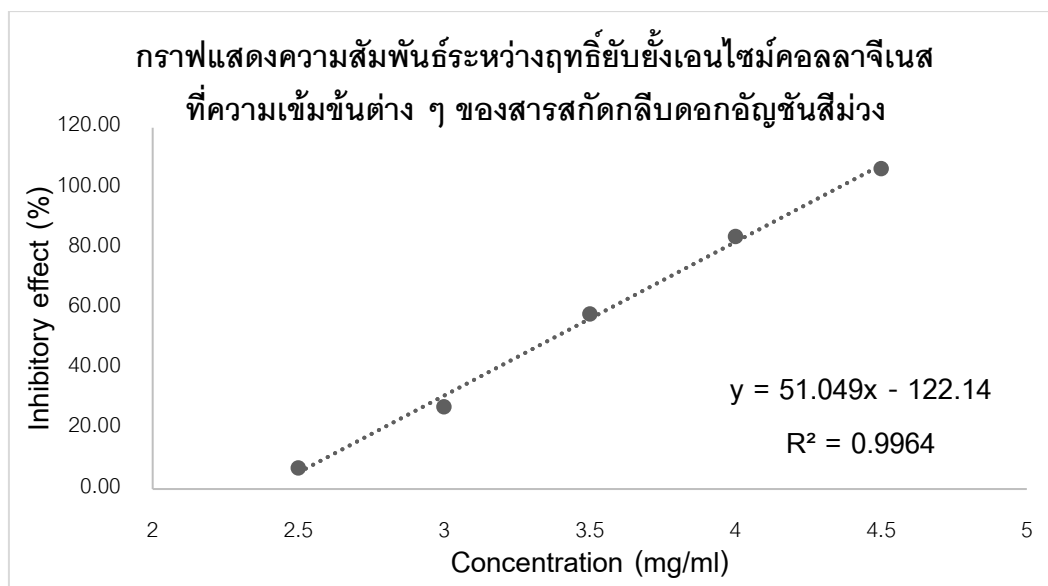
ตาราง 11 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและผลต่างค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นและ
สุดท้ายที่ความยาวคลื่น 340 nm ของสารมาตรฐาน gallic acid (n=3, triplicate)

		ความเข้มข้น (mg/mL)					Negative control
		0.25	0.50	1	2	4	
N ₁	Sample (S)	0.6863	0.0640	-0.0397	-0.0271	-0.0037	-0.1357
	Blank (B)	0.7843	0.1256	-0.0071	-0.0052	0.0023	0.0043
	S-B	-0.0980	-0.0616	-0.0326	-0.0219	-0.0060	-0.1400
	%Inhibition	30.00	56.02	76.74	84.36	95.71	
	สมการเส้นตรง	$y = 31.952x - 27.29$, $R^2 = 0.9461$					$IC_{50} = 2.41$
N ₂	Sample (S)	0.0156	0.0015	-0.0489	-0.0375	-0.0058	-0.1324
	Blank (B)	0.1026	0.0687	-0.0098	-0.0082	0.0012	0.0016
	S-B	-0.0870	-0.0672	-0.0391	-0.0293	-0.0070	-0.1340
	%Inhibition	35.07	49.87	70.82	78.13	94.75	

สมการเส้นตรง		$y = 29.524x - 22.84, R^2 = 0.9845$					$IC_{50} = 2.47$
N ₃	Sample (S)	0.1189	0.0353	-0.0598	-0.0317	-0.0084	-0.1234
	Blank (B)	0.1983	0.0999	-0.0160	0.0010	0.0053	0.0026
	S-B	-0.0794	-0.0646	-0.0438	-0.0327	-0.0137	-0.1260
	%Inhibition	36.98	53.86	68.71	76.64	90.21	
สมการเส้นตรง		$y = 25.849x - 12.265, R^2 = 0.9862$					$IC_{50} = 2.41$
AVE _{%Inhibition}		34.02	53.25	72.09	79.71	93.56	
สมการเส้นตรง		$y = 29.108x - 20.799, R^2 = 0.9768$					$IC_{50} = 2.43$
$IC_{50} \pm SE$		2.43 ± 0.02					



ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐาน gallic acid



ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

3. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

ตาราง 13 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ของสารมาตรฐาน quercetin (n=3, triplicate)

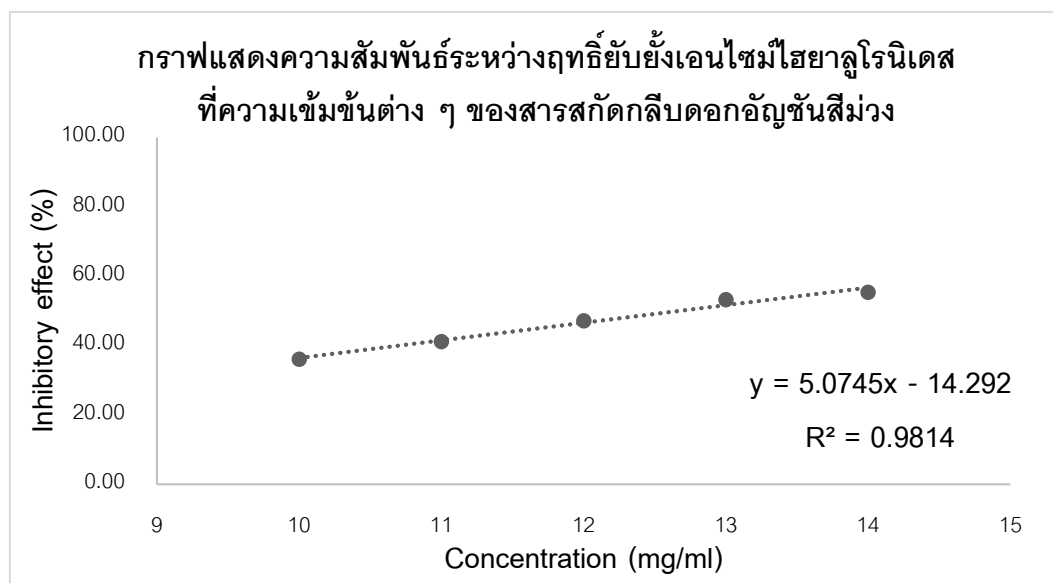
		ความเข้มข้น (mg/mL)					Buffer	Solvent
		0.50	0.55	0.60	0.65	0.70	control	Control
N ₁	Sample (S)	-0.0536	-0.0664	-0.0752	-0.0689	-0.0755	-0.0545	-0.0671
	Blank (B)	-0.0045	-0.0310	-0.0595	-0.0585	-0.0873	-0.0056	-0.0057
	S-B	-0.0491	-0.0355	-0.0157	-0.0104	0.0117	-0.0489	-0.0614
	%Inhibition	0.00	27.42	67.94	78.65	124.01		0.00
	สมการเส้นตรง	$y = 598.5x - 299.5, R^2 = 0.9767$					$IC_{50} = 0.58$	
N ₂	Sample (S)	-0.0700	-0.0655	-0.0896	-0.0767	-0.0950	-0.0804	-0.0783
	Blank (B)	-0.0228	-0.0550	-0.0526	-0.0608	-0.1048	-0.0049	-0.0051
	S-B	-0.0472	-0.0105	-0.0371	-0.0159	0.0098	-0.0755	-0.0732
	%Inhibition	37.48	86.14	50.91	78.90	113.02		3.05
	สมการเส้นตรง	$y = 287.68x - 99.32, R^2 = 0.5814$					$IC_{50} = 0.52$	

N ₃	Sample (S)	-0.0882	-0.1238	-0.0918	-0.0933	-0.0902	-0.0747	-0.0806
	Blank (B)	-0.0449	-0.0388	-0.0859	-0.0843	-0.0928	-0.0026	-0.0059
	S-B	-0.0433	-0.0849	-0.0059	-0.0090	0.0026	-0.0722	-0.0747
	%Inhibition	40.07	0.00	91.83	87.58	103.65		0.00
	สมการเส้นตรง	y = 429.46x – 193.05, R ² = 0.6092					IC ₅₀ = 0.57	
AVE _{%Inhibition}		25.85	37.85	70.22	81.71	113.56		1.02
สมการเส้นตรง		y = 438.55x – 197.29, R ² = 0.9751					IC ₅₀ = 0.56	
IC ₅₀ ± SE		0.56 ± 0.02						

ตาราง 14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮyaluronidase และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง (n=3, triplicate)

		ความเข้มข้น (mg/mL)					Quercetin	Buffer control	Solvent Control
		10	11	12	13	14			
N ₁	Sample (S)	0.5903	0.5869	0.6448	0.6834	0.6603	0.0773	0.2428	0.2457
	Blank (B)	0.5023	0.5113	0.5604	0.6268	0.5809	0.0494	0.0532	0.0533
	S-B	0.0880	0.0756	0.0844	0.0566	0.0794	0.0279	0.1895	0.1924
	%Inhibition	53.59	60.13	55.47	70.14	58.09	85.26		0.00
	สมการเส้นตรง	$y = 1.9012x + 36.669, R^2 = 0.2168$					$IC_{50} = 7.01$		
N ₂	Sample (S)	0.6026	0.5857	0.6164	0.6325	0.6433	0.1061	0.2299	0.2424
	Blank (B)	0.4645	0.4690	0.5196	0.5340	0.5870	0.0745	0.0538	0.0536
	S-B	0.1381	0.1167	0.0968	0.0986	0.0563	0.0315	0.1761	0.1888
	%Inhibition	21.53	33.67	45.02	44.00	68.01	82.08		0.00
	สมการเส้นตรง	$y = 10.328x - 81.485, R^2 = 0.9063$					$IC_{50} = 12.73$		
N ₃	Sample (S)	0.5766	0.5692	0.5971	0.6101	0.6305	0.1220	0.2309	0.2557
	Blank (B)	0.4527	0.4391	0.4880	0.5093	0.5197	0.0744	0.0460	0.0441
	S-B	0.1239	0.1301	0.1091	0.1007	0.1109	0.0476	0.1849	0.2116
	%Inhibition	33.03	29.69	41.03	45.55	40.07	74.25		0.00
	สมการเส้นตรง	$y = 2.9946x - 1.9387, R^2 = 0.5465$					$IC_{50} = 16.05$		

AVE _{%Inhibition}	36.05	41.17	47.17	53.23	55.39	80.53	0.00
สมการเส้นตรง	y = 5.0745x – 14.292, R ² = 0.9814					IC ₅₀ = 12.67	
IC ₅₀ ± SE	11.93 ± 2.64						

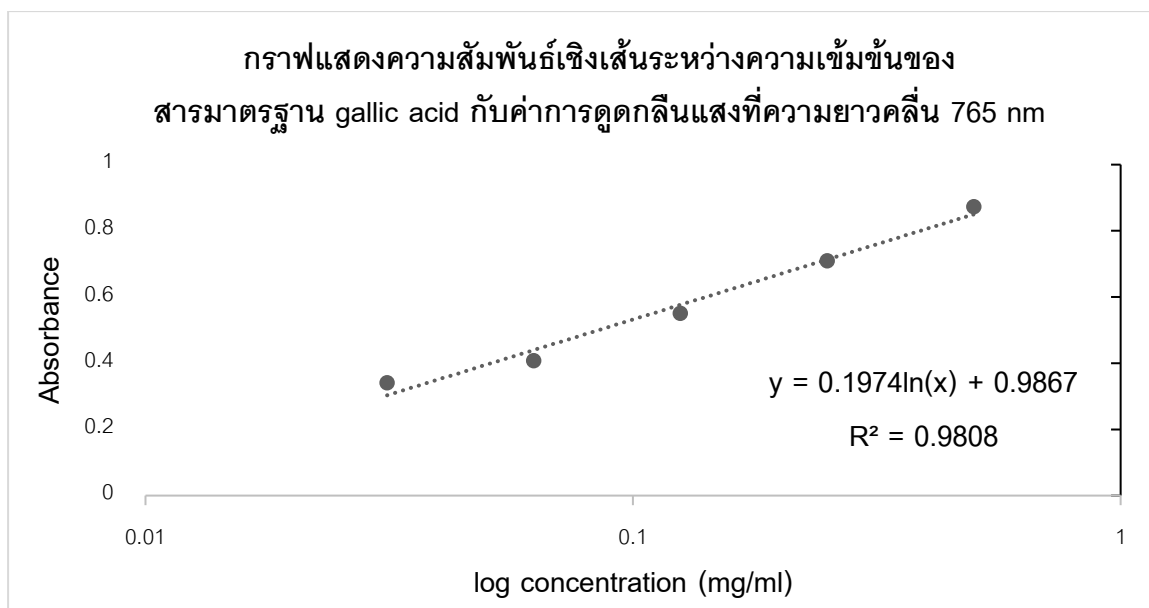


ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาโลโรนิเดส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

4. ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

ตาราง 15 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ของสารละลายมาตรฐาน gallic acid และ สารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง (n=3, triplicate)

ความเข้มข้นสารตัวอย่าง (mg/ml)		N_1	N_2	N_3	ค่าเฉลี่ย
Gallic acid	0.0313	0.3056	0.3078	0.4088	0.3407
	0.0625	0.3569	0.4201	0.4452	0.4074
	0.125	0.4841	0.5804	0.5875	0.5507
	0.25	0.7232	0.7145	0.6914	0.7097
	0.5	0.9445	0.6413	1.0340	0.8733
ดอกอัญชันสีม่วง	5	0.5386	0.5718	0.6818	0.5974

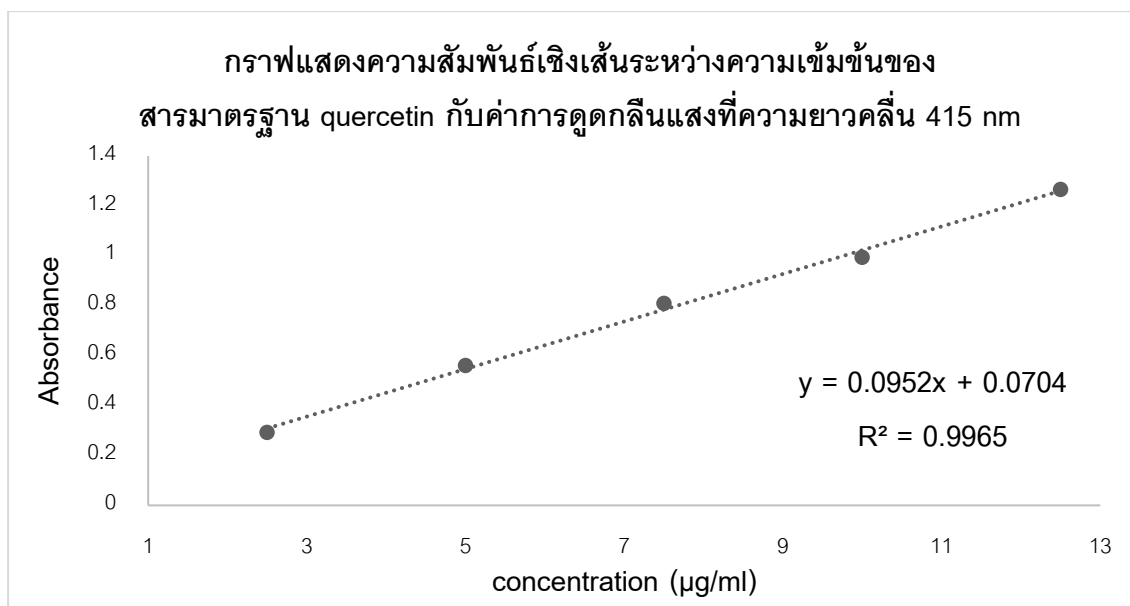


ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของ
สารมาตรฐาน gallic acid กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

5. ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

ตาราง 16 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ของสารละลายมาตรฐาน quercetin และ
สารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง (n=3, triplicate)

ความเข้มข้นสารตัวอย่าง		N ₁	N ₂	N ₃	ค่าเฉลี่ย
Quercetin (µg/ml)	2.5	0.2526	0.3118	0.3129	0.2924
	5	0.5157	0.5808	0.5844	0.5603
	7.5	0.7714	0.8275	0.8311	0.8100
	10	0.9450	1.0362	0.9996	0.9936
	12.5	1.2228	1.3103	1.2647	1.2659
ดอกอัญชันสีม่วง (mg/ml)	1	0.3279	0.3938	0.4796	0.4004

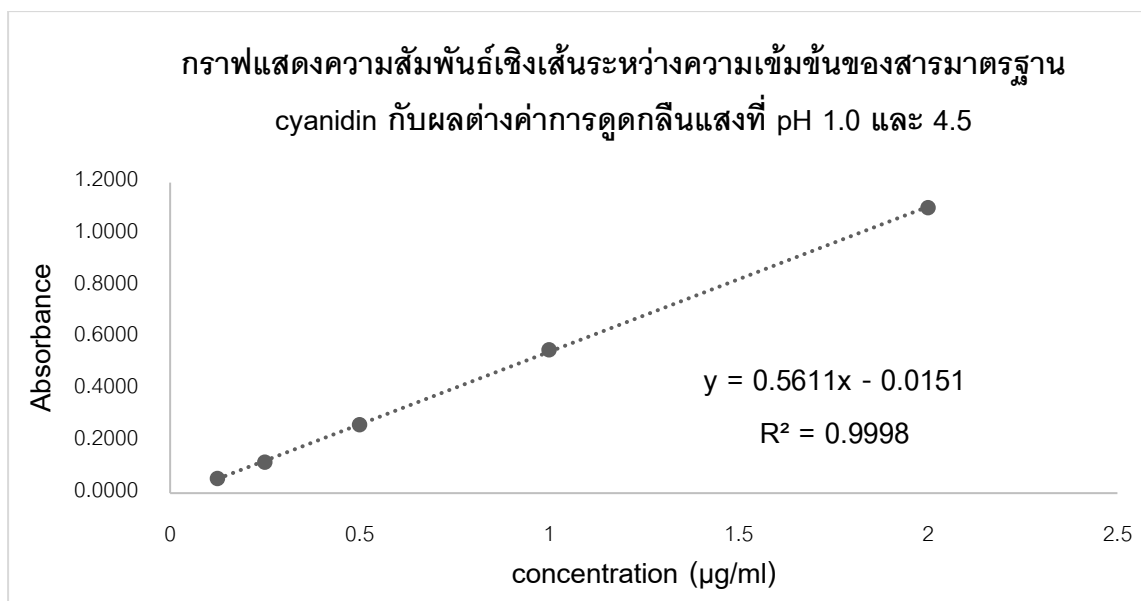


ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm

6. ปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วง

ตาราง 17 ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 nm ของสารละลายมาตรฐาน cynidin และสารสกัดกลีบดอกอัญชันสีม่วงที่ pH 1.0 ($Abs_{1.0}$) และ 4.5 ($Abs_{4.5}$) (n=3, triplicate)

ความเข้มข้นสาร		N ₁		N ₂		N ₃		ค่าเฉลี่ย
ตัวอย่าง		Abs _{1.0}	Abs _{4.5}	Abs _{1.0}	Abs _{4.5}	Abs _{1.0}	Abs _{4.5}	Abs _{1.0} – Abs _{4.5}
Quercetin (µg/ml)	0.125	0.0596	0.0019	0.0589	0.0027	0.0582	0.0026	0.2924
	0.25	0.1243	0.0029	0.1243	0.0035	0.1209	0.0035	0.5603
	0.5	0.2753	0.0040	0.2739	0.0041	0.2547	0.0035	0.8100
	1	0.5763	0.0058	0.5625	0.0053	0.5412	0.0055	0.9936
	2	1.1543	0.0099	1.0682	0.0100	1.1176	0.0093	1.2659
ดอกอัญชัน สีม่วง (mg/ml)	1	0.6054	0.5883	0.6121	0.5903	0.6018	0.5985	0.0141



ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanidin กับผลต่างค่าการดูดกลืนแสงที่ pH 1.0 และ 4.5

7. การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics

สารทดสอบ	Shapiro-Wilk			Levene's test		Independent t-test		
	Statistic	df	Sig.	F	Sig.	t	df	Sig.
ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส								
Gallic acid	0.832	3	0.194	6.995	0.057	-3.440	4	0.026
อัญชัน	0.776	3	0.59					
ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส								
Gallic acid	0.750	3	0.0001	0.810	0.419	-38.160	4	0.0001
อัญชัน	0.987	3	0.780					
ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส								
Quercetin	1.000	3	1.000	15.903	0.016	-5.395	2.000	0.033
อัญชัน	0.758	3	0.017					

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวชนกานต์ ชีวบัณฑิต
วัน เดือน ปี เกิด	11 มิถุนายน 2539
สถานที่เกิด	สุราษฎร์ธานี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2562 เภสัชศาสตรบัณฑิต (ภ.บ.) สาขาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ พ.ศ. 2563 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	125 หมู่ 10 ตำบล ละแม อำเภอละแม จังหวัด ชุมพร 86170
ผลงานตีพิมพ์	Chanakan C, Chayanid S, and Sarin T. Anti-aging activity of mauve Clitoria ternatea L. petal extract. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2021; 16(3). Accepted April 20, 2021. (TCI teir 1)