



ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยของสารสกัดดอกเข็ม  
INHIBITORY ACTIVITY OF ENZYME INVOLVING IN WRINKLE FORMATION  
FROM *IXORA COCCINEA* L. FLOWER EXTRACTS

ศุภเศรษฐ์ เลิศกาญจนศักดิ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2565

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยของสารสกัดดอกเข็ม



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์  
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

INHIBITORY ACTIVITY OF ENZYME INVOLVING IN WRINKLE FORMATION  
FROM *IXORA COCCINEA* L. FLOWER EXTRACTS



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

2022

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์  
เรื่อง  
ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยของสารสกัดดอกเข็ม  
ของ  
ศุภเศรษฐ์ เลิศกาญจนศักดิ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์  
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

-----  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

-----  
คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง)

..... ประธาน  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชูดา จิตตสุโก)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สามี)

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยของสารสกัดดอกเข็ม
ผู้วิจัย	ศุภเศรษฐ์ เลิศกาญจนศักดิ์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส และวิเคราะห์ปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ วิธีการศึกษา: สกัดสารจากดอกเข็มสีแดง เหลือง ส้ม และชมพู และนำมาทดสอบฤทธิ์ลดเลือนริ้วรอยโดยศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและอีลาสเตสด้วยวิธี spectrophotometric โดยใช้ควอเซตินเป็นสารควบคุมเชิงบวก รายงานผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) วิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method, aluminium chloride complexation colorimetric method, pH differential method และ spectrophotometric method ตามลำดับ ผลการศึกษา: สารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง ส้ม และสีชมพูมีค่า IC<sub>50</sub> ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสอยู่ในช่วง 239.54 ± 76.57 - 1,662.73 ± 0.13 µg/ml ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสอยู่ในช่วง 28.95 ± 2.00 - 556.94 ± 165.81 µg/ml และเอนไซม์อีลาสเตสอยู่ในช่วง 287.80 ± 12.22 - 1,615.15 ± 106.67 µg/ml และในสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง ส้ม และสีชมพูปริมาณ 1 g มีปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกอยู่ในช่วง 9.23 ± 0.60 - 23.86 ± 4.83 mg เทียบเท่ากับกรดแกลลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์อยู่ในช่วง 277.38 ± 2.94 - 696.78 ± 5.80 mg เทียบเท่ากับควอเซติน สารกลุ่มแอนโทไซยานินอยู่ในช่วง 3.08 ± 0.02 - 8.56 ± 0.06 mg เทียบเท่ากับไซยานิดิน และแคโรทีนอยด์อยู่ในช่วง 48.91 ± 0.11 - 120.75 ± 3.00 mg เทียบเท่ากับเบต้าแคโรทีน สรุปผลการทดลอง: จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ พบว่าสารสกัดดอกเข็มสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ดีที่สุด สารสกัดดอกเข็มสีส้มมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ดีที่สุด และสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสได้ดีที่สุด และสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยโดยมีค่าขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด พืชชนิดในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ พบว่ามีปริมาณของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบมากที่สุด และมีปริมาณแคโรทีนอยด์ ฟีนอลิก และแอนโทไซยานินรองลงมา ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ แต่ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและอีลาสเตส

คำสำคัญ : สารสกัดดอกเข็ม, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส, ฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์, แอนโทไซยานิน, แคโรทีนอยด์

Title	INHIBITORY ACTIVITY OF ENZYME INVOLVING IN WRINKLE FORMATION FROM <i>IXORA COCCINEA</i> L. FLOWER EXTRACTS
Author	SUPPASET LERTKANCHANASAK
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2022
Thesis Advisor	Associate Professor Sarin Tadtong , Ph.D.

The objective of this study is to investigate the inhibitory activities of hyaluronidase, collagenase, and elastase, and analyzing the total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, and carotenoids in various extracts of differently colored *Ixora coccinea* L. flowers. The methodology was as follows: the red, yellow, orange, and pink *I. coccinea* flowers were extracted and tested for their anti-wrinkling effects by studying the inhibitory effects of hyaluronidase using the colorimetric method, and the inhibitory effects of collagenase and elastase using the spectrophotometric method, with quercetin as a positive control. The results were reported as the concentration of the extract that could inhibit enzyme activity by 50% ( $IC_{50}$ ). The total content of phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, and carotenoids was analyzed using the Folin-Ciocalteu, aluminum chloride complexation colorimetric, pH differential, and spectrophotometric methods, respectively. The results were as follows: The  $IC_{50}$  values for inhibiting the activity of hyaluronidase by the extracts of red, yellow, orange, and pink *I. coccinea* flowers were between  $239.54 \pm 76.57$  -  $1,662.73 \pm 0.13$   $\mu\text{g/ml}$ . The inhibitory effects on collagenase were between  $28.95 \pm 2.00$  -  $556.94 \pm 165.81$   $\mu\text{g/ml}$ . The inhibitory effects on elastase were between  $287.80 \pm 12.22$  -  $1,615.15 \pm 106.67$   $\mu\text{g/ml}$ . Furthermore, the total content of phenolic compounds in 1 g of the extracts of red, yellow, orange, and pink *I. coccinea* flowers were between  $9.23 \pm 0.60$  -  $23.86 \pm 4.83$  mg of gallic acid equivalents. The total content of flavonoids was between  $277.38 \pm 2.94$  -  $696.78 \pm 5.80$  mg of quercetin equivalents. The total content of anthocyanins was between  $3.08 \pm 0.02$  -  $8.56 \pm 0.06$  mg of cyanidin equivalents. Lastly, the total content of carotenoids was between  $48.91 \pm 0.11$  -  $120.75 \pm 3.00$  mg of beta-carotene equivalents. In conclusion, the extracts of various colors *I. coccinea* flowers had different inhibitory effects on wrinkle formation involving enzymes. Red *I. coccinea* flowers showed the highest inhibitory effect on hyaluronidase, orange *I. coccinea* flowers exhibited the highest inhibitory effect on collagenase, and yellow *I. coccinea* flowers expressed the highest inhibitory effect on elastase. The inhibitory effects of the extracts depend on the concentration of the extract. The extracts of *I. coccinea* flowers possessed the highest content of flavonoids and lower contents of carotenoids, phenolics, and anthocyanins, respectively. Moreover, flavonoid showed relationship with hyaluronidase inhibitory activity, while there was no relationship with collagenase and elastase inhibitory activities.

Keyword : *Ixora coccinea* L. flower extracts, hyaluronidase inhibitory activity, elastase inhibitory activity, collagenase inhibitory activity, phenolics, flavonoids, anthocyanins, carotenoids

## กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง ซึ่งมีความกรุณาถ่ายทอดความรู้ให้คำชี้แนะในการศึกษาวิจัยทั้งทางทฤษฎีและปฏิบัติ รวมไปถึงให้การสนับสนุนสารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำงานวิจัย ให้สำเร็จลุล่วงตามความมุ่งหมาย รวมทั้งขอขอบคุณ ประธานสอบปริญญาานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ชูดา จิตตสุโก และ กรรมการสอบปริญญาานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ สามิ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบปริญญาานิพนธ์ และให้คำแนะนำแก้ไขต่าง ๆ เพื่อให้ปริญญาานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากขึ้น ผู้วิจัยขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คุณวัลลภา จิตตะชัย และคุณวีรัตน์ นำศรีเจริญกุล นักวิทยาศาสตร์ ประจำห้องปฏิบัติการสำหรับความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวก ด้านอุปกรณ์และสารเคมี นอกจากนี้ขอขอบคุณ คุณธนภัทร สุขสมบูรณ์ และคุณชนกานต์ ชีวบันเทิง ที่ได้ให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือ ตลอดโครงการวิจัยนี้ และหากปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อบกพร่องประการใด ผู้วิจัยขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ศุภเศรษฐ์ เลิศกาญจนศักดิ์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ .....	ฐ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของงานวิจัย .....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
สมมติฐานการวิจัย .....	4
บทที่ 2.....	5
ทบทวนวรรณกรรม .....	5
2.1. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของดอกเข็ม .....	5
2.2. การสกัดสารจากดอกเข็ม .....	6
2.3. พฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเข็ม.....	7
2.4. การเกิดริ้วรอย.....	8



2.5. สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) และการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content determination) .....	9
2.6. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และการหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content determination) .....	12
2.7. สารกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanins) และการหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content determination) .....	13
2.8. สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) และการหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Total carotenoid content determination) .....	14
2.9. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของผิวหนัง .....	15
2.9.1. กรดไฮยาลูโรนิกและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิกเดส .....	15
2.9.2. คอลลาเจนและเอนไซม์คอลลาจีเนส .....	17
2.9.3. อีลาสตินและเอนไซม์อีลาสเตส .....	18
2.10. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดการเสื่อมสภาพของผิวหนัง .....	19
2.10.1. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิกเดส .....	19
2.10.1.1. Colorimetric method .....	19
2.10.1.2. Turbidimetric method .....	20
2.10.2. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส .....	20
2.10.2.1. Spectrophotometric method .....	20
2.10.2.2. Spectrofluorometric method .....	21
2.10.3. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส .....	22
2.10.3.1 Spectrophotometric .....	22
2.10.3.2. Spectrofluorometric .....	22
บทที่ 3 .....	24

วัสดุและวิธีการวิจัย.....	24
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	24
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	25
พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง.....	25
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	25
1. การเตรียมสารสกัดดอกเข็ม และหาปริมาณสารสกัดที่ได้.....	25
2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric.....	26
3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometric.....	30
4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสด้วยวิธี spectrophotometric.....	33
5. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method.....	36
6. การหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation.....	38
7. การหาปริมาณรวมของแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential method.....	40
8. การหาปริมาณรวมของแคโรทีนอยด์ด้วยวิธี spectrophotometry.....	41
สถิติที่ใช้ในการวิจัย.....	43
บทที่ 4.....	45
ผลการศึกษา.....	45
บทที่ 5.....	73
สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ.....	73
บรรณานุกรม.....	77
ภาคผนวก.....	82
ประวัติผู้เขียน.....	97

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้ในการหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส .....	29
ตาราง 2 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้ในการหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส .....	33
ตาราง 3 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้ในการหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส.....	36
ตาราง 4 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก .....	38
ตาราง 5 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้หาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ .....	39
ตาราง 6 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้หาปริมาณรวมของแคโรทีนอยด์.....	43
ตาราง 7 แสดงสมการเส้นตรงของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส.....	47
ตาราง 8 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีแดงที่ความเข้มข้น 39.10 - 625 µg/ml.....	48
ตาราง 9 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองที่ความเข้มข้น 500 - 1,500 µg/ml.....	49
ตาราง 10 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีส้มที่ความเข้มข้น 1,000 - 5,000 µg/ml.....	49
ตาราง 11 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีชมพูที่ความเข้มข้น 1,000 - 10,000 µg/ml.....	49
ตาราง 12 แสดง IC <sub>50</sub> ± SE ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ quercetin .....	50
ตาราง 13 แสดงสมการเส้นตรงของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์คอลลาจีเนส.....	52
ตาราง 14 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีแดงที่ความเข้มข้น 125 - 2,000 µg/ml.....	52

ตาราง 15	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองที่ความเข้มข้น 500 – 1,500 µg/ml.....	53
ตาราง 16	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีส้มที่ความเข้มข้น 25 – 500 µg/ml.....	53
ตาราง 17	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีชมพูที่ความเข้มข้น 100 – 500 µg/ml.....	54
ตาราง 18	แสดง IC <sub>50</sub> ± SE ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ quercetin .....	54
ตาราง 19	แสดงสมการเส้นตรงของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส.....	56
ตาราง 20	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีแดงที่ความเข้มข้น 180 – 780 µg/ml.....	57
ตาราง 21	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองที่ความเข้มข้น 100 – 500 µg/ml.....	57
ตาราง 22	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีส้มที่ความเข้มข้น 500 – 1,500 µg/ml.....	58
ตาราง 23	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีชมพูที่ความเข้มข้น 375 – 3,000 µg/ml.....	58
ตาราง 24	แสดง IC <sub>50</sub> ± SE ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ quercetin .....	59
ตาราง 25	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮyaluronidase ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml กับปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ .....	71
ตาราง 26	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ความเข้มข้น 250 µg/ml กับปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ .....	71
ตาราง 27	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสที่ความเข้มข้น 500 µg/ml กับปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์.....	72
ตาราง 28	แสดงค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮyaluronidase เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส ที่ 50 (IC <sub>50</sub> ) ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ.....	74

ตาราง 29 แสดงปริมาณพฤษเคมีที่พบในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ น้ำหนัก 1 g..... 76

ตาราง 30 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 94

ตาราง 31 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ .. 95

ตาราง 32 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ..... 96



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 ดอกเข็มสีแดง .....	5
ภาพประกอบ 2 ดอกเข็มสีเหลือง .....	5
ภาพประกอบ 3 ดอกเข็มสีชมพู .....	6
ภาพประกอบ 4 ดอกเข็มสีส้ม .....	6
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของฟินอล (ซ้าย) และกรดฟินอลิก (ขวา) .....	10
ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ (ซ้าย) และโครงสร้างของสติลบีนส์ (ขวา) .....	11
ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของคูมารินส์ (ซ้าย) และโครงสร้างของแทนนินส์ (ขวา).....	11
ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ pH ต่าง ๆ.....	14
ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก.....	16
ภาพประกอบ 10 โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ .....	16
ภาพประกอบ 11 การแบ่งกลุ่มยีนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิกเดส .....	17
ภาพประกอบ 12 โครงสร้างคอลลาเจนแบบ neutral strand.....	18
ภาพประกอบ 13 โครงสร้างที่เสถียรของคอลลาเจน .....	18
ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 300-700 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิกเดส .....	46
ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 400-700 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิกเดส .....	46
ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 780-12,500 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส .....	50
ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 25-400 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอีลาสเตส .....	55

ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.3-5.0 mg/ml กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm.....	59
ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในรูปมิลลิกรัมของ gallic acid equivalents (GAE) ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 1 กรัม.....	60
ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 25-100 µg/ml กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm.....	61
ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในรูปมิลลิกรัมของ quercetin equivalents (QE) ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 1 กรัม.....	62
ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanidin ที่ความเข้มข้น 0.25-1.5 µg/ml กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 nm...	62
ภาพประกอบ 23 กราฟแสดงปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินในรูปมิลลิกรัมของ cyanidin equivalents (CE) ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 1 กรัม.....	63
ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน β-carotene ที่ความเข้มข้น 2.5-12.5 µg/ml กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm.....	64
ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในรูปมิลลิกรัมของ β-carotene equivalents (BCE) ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 1 กรัม.....	64
ภาพประกอบ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml.....	65
ภาพประกอบ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml.....	65
ภาพประกอบ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml.....	66
ภาพประกอบ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml.....	66
ภาพประกอบ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml.....	67

ภาพประกอบ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml .....	67
ภาพประกอบ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml.....	68
ภาพประกอบ 33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml.....	68
ภาพประกอบ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml.....	69
ภาพประกอบ 35 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml .....	69
ภาพประกอบ 36 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml.....	70
ภาพประกอบ 37 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml .....	70
ภาพประกอบ 38 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีแดงที่ ความเข้มข้น 39.10-625 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส .....	83
ภาพประกอบ 39 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองที่ ความเข้มข้น 500-1,500 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส .....	83
ภาพประกอบ 40 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองที่ความเข้มข้น 500-1,250 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส .....	84
ภาพประกอบ 41 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีส้มที่ความเข้มข้น 1,000-5,000 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส .....	84
ภาพประกอบ 42 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีส้มที่ความเข้มข้น 1,000-4,000 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส .....	85
ภาพประกอบ 43 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีชมพูที่ความเข้มข้น 1,000-10,000 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส .....	85





ภาพประกอบ 57 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีส้ม ที่ความเข้มข้น 750-1,500 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส..... 93

ภาพประกอบ 58 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีชมพู ที่ความเข้มข้น 375-3,000 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส..... 93

ภาพประกอบ 59 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส \* $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ quercetin ..... 94



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ภูมิหลัง

ริ้วรอย เป็นสิ่งที่มนุษย์ไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้โดยอายุที่มากขึ้นเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดริ้วรอย เนื่องจากสารสำคัญในผิวหนังของเราสามารถผลิตออกมาได้น้อยลง ส่งผลให้เกิดการเสียสมดุลในร่างกาย โดยปกติแล้วผิวหนังของมนุษย์จะมีสารเคลือบเซลล์ (Extracellular matrix; ECM) ปกป้องผิวอยู่ ซึ่งช่วยให้เซลล์สามารถคงสภาพอยู่ได้ และเป็นส่วนสำคัญที่ค้ำจุนเซลล์ให้เซลล์มีความแข็งแรง ยืดหยุ่น โดยสารเคลือบเซลล์จะมีลักษณะเป็นของเหลว มีส่วนสำคัญในการค้ำจุนโครงสร้างของเซลล์ และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกระบวนการต่างๆทางชีวภาพอีกมากมาย เช่น กระบวนการแบ่งตัวของเอมบริโอ กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ กระบวนการต้านการอักเสบ รวมไปถึงการสมานแผล ถ้าสารเคลือบเซลล์เกิดความผิดปกติขึ้นก็อาจทำให้เซลล์นั้นเกิดความผิดปกติตามไปด้วย ในสารเคลือบเซลล์จะประกอบไปด้วย โปรตีโอไกลแคน (proteoglycan) และ เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีน (matrix metallo proteins, MMP) ผสานกันอยู่ สารเคลือบเซลล์ที่รู้จัก เช่น คอลลาเจน (collagen) อีลาสติน (elastin) ไฟโบรเนคติน (fibronectin) และกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid; HA) โดยที่คอลลาเจนเป็นโปรตีนโครงสร้างหลักที่สำคัญให้กับเซลล์ อีลาสตินรักษาความยืดหยุ่นให้กับผิว และกรดไฮยาลูโรนิก มีคุณสมบัติในการดึงน้ำไว้ในเซลล์ ส่งผลให้ผิวมีความเรียบเนียนชุ่มชื้น เมื่ออายุมากขึ้นความไม่สมดุลระหว่างการสร้างสารอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระก็เพิ่มขึ้น ทำให้ผิวเกิดริ้วรอยหรือเกิดโรคต่างๆ เช่น ผิวหนังอักเสบ กลาก หลอดเลือดอักเสบ หรือมะเร็ง ดังนั้นอายุของผิวจึงมีความสัมพันธ์กับกลไก oxidative metabolism และ ปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิต (species generation) โดยการสูญเสียโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ในชั้นผิวหนังแท้ (dermis) เป็นสาเหตุหลักในการเกิดริ้วรอย อายุที่เพิ่มขึ้น ทำให้ความยืดหยุ่นของผิวหนังลดลง เนื่องจากเกิดการเสียสมดุลระหว่างการผลิต MMP และ matrix metallo proteinases (MMPs) ที่เป็นเอนไซม์สำหรับย่อยสลาย MMP เมื่ออายุเพิ่มขึ้นร่างกายจะมีการสร้าง MMP ที่ลดลง ส่งผลให้การสร้างสารเคลือบเซลล์ลดลงด้วย และจะทำให้ MMPs ที่ประกอบไปด้วย เอนไซม์ คอลลาจีเนส (collagenase) เอนไซม์อีลาสเตส (elastase) เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) เกิดการย่อยสลายคอลลาเจน เส้นใยอีลาสติน และกรดไฮยาลูโรนิกตามลำดับ ส่งผลให้ผิวหนังแห้ง เกิดริ้วรอยและเหี่ยวย่น วิธีที่ดีที่สุดที่จะทำให้ผิวหนังยังคงความชุ่มชื้น และลดรอยเหี่ยวย่นได้ ก็คือ การยับยั้งการทำงานของ MMPs จะช่วยป้องกันและลดการสลายตัวของสารเคลือบเซลล์ได้ (Zhang & Duan, 2018)

การศึกษาในเรื่องของการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้แทนการใช้สารเคมี ในปัจจุบันนั้นเริ่มมีงานวิจัยเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากสารสกัดจากธรรมชาติจะมีความปลอดภัยในเรื่องของการทำให้เกิดอาการแพ้หรือระคายเคืองได้น้อยกว่าสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้น โดยสารสกัดจากธรรมชาติที่นิยมนำมาใช้ในการต่อต้านการเกิดริ้วรอย จะเป็นสารสกัดที่มีฟลูโอกซีเคมีในกลุ่มฟีนอลิก (phenolic) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) แอนโทไซยานิน (anthocyanin) และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) เป็นองค์ประกอบหลัก เนื่องจากในการศึกษาพบว่าสารในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์สามารถยับยั้งการทำงานของ MMPs ได้ ซึ่งจะทำให้สามารถลดการเกิดริ้วรอยได้ (Abhijit & Manjushree, 2010; Bessada et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากดอกเข็มนั้นมีสารที่เป็นองค์ประกอบทางฟลูโอกซีเคมีของสารในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์อยู่ (Sharma et al., 2021) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากดอกเข็มในการยับยั้งการทำงานของ MMPs

เข็ม (*Ixora coccinea* L.) เป็นพืชในวงศ์ Rubiaceae เป็นไม้ในเขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยจากการศึกษาทางงานวิจัยพบว่าในสารสกัดดอกเข็มมีสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ (Sharma et al., 2021; Srichaikul, 2016) และยังพบว่าสารสกัดจากเข็มนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Torey et al., 2010) นอกจากนี้ได้มีการทดสอบฤทธิ์ฟลาโวนอยด์ ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสพบว่า ฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ (Kuppusamy & Das, 1991)

จากที่กล่าวมาข้างต้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่เป็นสาเหตุให้เกิดริ้วรอย ได้แก่ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส และยังสนใจที่จะหาปริมาณของฟลูโอกซีเคมีในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์เพื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญที่พบในสารสกัดจากดอกเข็มกับฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ชนิดต่างๆ

### ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการทำวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังต่อไปนี้

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดจากดอกเข็ม
2. เพื่อหาปริมาณรวมของสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ที่มีในสารสกัดจากดอกเข็ม
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสาระสำคัญในดอกเข็มกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส

### ความสำคัญของการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อยืนยันและตรวจสอบปริมาณรวมของสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัดจากดอกเข็ม เพื่อใช้ในการคาดเดาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่ตรวจพบได้ และศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส เพื่อเป็นแนวทางในการนำสารสกัดจากดอกเข็มที่น่าสนใจ ไปพัฒนาหรือต่อยอดเพื่อทำออกมาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพหรือเครื่องสำอาง ที่สามารถใช้สำหรับชะลอวัยและยับยั้งรอยเหี่ยวย่นได้

### ขอบเขตของการวิจัย

#### ตัวแปรที่ศึกษา

1. ศึกษาฤทธิ์ลดเลื้อนริ้วรอยของสารสกัดจากดอกเข็ม ได้แก่
  - 1.1. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ด้วยวิธี colorimetric
  - 1.2. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ด้วยวิธี spectrophotometric
  - 1.3. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส ด้วยวิธี spectrophotometric
2. ศึกษาปริมาณพฤษเคมีของสารสกัดจากดอกเข็ม ได้แก่
  - 2.1. สารประกอบฟีนอลิก ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu
  - 2.2. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ด้วยวิธี aluminium chloride complexation colorimetric
  - 2.3. สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ด้วยวิธี pH differential method
  - 2.4. สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ด้วยวิธี spectrophotometry

### 3. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารสำคัญในดอกเข็มกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส

#### นิยามศัพท์เฉพาะ

ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส หมายถึง ประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ โดยสามารถวัดได้จากค่า %inhibition และ the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ )

ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส หมายถึง ประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ โดยสามารถวัดได้จากค่า %inhibition และ the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ )

ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส หมายถึง ประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้ โดยสามารถวัดได้จากค่า %inhibition และ the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ )

%inhibition หมายถึง ร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำการทดสอบ ซึ่งวัดผลจากค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ แล้วนำมาคำนวณโดยใช้สมการ

The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) หมายถึง ประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำการทดสอบได้ร้อยละ 50 โดยคำนวณได้จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดและร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ที่อยู่ในช่วง 0-100

#### สมมติฐานการวิจัย

1. สารสกัดจากดอกเข็มสีต่าง ๆ มีฤทธิ์ในการลดเลื้อนริ้วรอยโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส
2. สารสกัดจากดอกเข็มสีต่าง ๆ มีสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์
3. สารสกัดจากดอกเข็มสีต่าง ๆ มีความสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณสารสำคัญในดอกเข็มกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส

## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของดอกเข็ม

เข็ม (*Ixora coccinea* L.) เป็นพืชในวงศ์ Rubiaceae เป็นไม้ในเขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์คือ เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ลำต้นสูง 3-5 ฟุต แตกกิ่งก้านสาขาแผ่เป็นพุ่ม ใบแข็งและเปราะลักษณะมนรี ปลายแหลมโคนใบมน เรียงสลับ ดอก ออก เป็นช่อใหญ่บริเวณตรงกลางส่วนยอดของต้น ในแต่ละช่อประกอบด้วยดอกขนาดเล็กๆ มากมาย ดอกมีลักษณะเป็นหลอด ตรงปลายหลอดแยกเป็นกลีบ 4-5 กลีบ ปลายกลีบแหลม โดย ดอกมีสี ต่างๆ (Abdullah et al., 2016; KV & Deodhar) เช่น สีแดง (ภาพประกอบ 1) สีเหลือง (ภาพประกอบ 2) สีชมพู (ภาพประกอบ 3) สีส้ม (ภาพประกอบ 4)



ภาพประกอบ 1 ดอกเข็มสีแดง



ภาพประกอบ 2 ดอกเข็มสีเหลือง



ภาพประกอบ 3 ดอกเข็มสีชมพู



ภาพประกอบ 4 ดอกเข็มสีส้ม

## 2.2. การสกัดสารจากดอกเข็ม

จากการศึกษางานวิจัยต่าง ๆ พบว่า การสกัดสารจากดอกเข็ม จะนิยมใช้วิธี solvent extraction และตัวทำละลายที่เหมาะสมในการนำมาสกัดคือ เมทานอล เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว และเมื่อเทียบกับการใช้ตัวทำละลายอื่นเช่น เฮกเซน (hexane) หรือ ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) จะพบว่า เมทานอลจะให้ปริมาณสารสกัดออกมาได้ถึงร้อยละ 9.43 แต่เฮกเซน และไดคลอโรมีเทนได้ปริมาณสารสกัดออกมาร้อยละ 5.42 และ 3.56 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากดอกเข็มที่ใช้ เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระถึงร้อยละ 90 (Ounamornmas & Sommano, 2016; Torey et al., 2010) แต่ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้ เอทานอลแทนเมทานอล เนื่องจากมีความปลอดภัยในการสกัด และการนำไปทดสอบมากกว่า โดยจะนำค่า dielectric constant มาคำนวณให้ความมีขั้วของเอทานอลใกล้เคียงกับเมทานอลมากที่สุด จากสมการ

$$\varepsilon_{mixture} = (\varepsilon_1 \times \%_1) + (\varepsilon_2 \times \%_2) + \dots$$



โดยที่ค่า dielectric constant ของเมทานอล เอทานอล และน้ำจะมีค่า 32.6, 24.3 และ 78.5 ตามลำดับ ซึ่งจะใช้ เอทานอลผสมกับน้ำ เพื่อให้มีความมีขั้วใกล้เคียงกับเมทานอลมากที่สุด และเมื่อทำการคำนวณแล้วจะได้ปริมาณเอทานอลอยู่ที่ 84.69% เพื่อให้ง่ายต่อการเตรียมในงานวิจัยจึงจะใช้เป็น เอทานอล 80%

### 2.3. พฤษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของเข็ม

จากการศึกษาพบว่าพฤษเคมีที่มีการค้นพบโดยใช้เครื่องมือ Liquid Chromatography Multi-stage Mass Spectrometry (LC-MS) ในใบเข็มจะพบ แคทีชิน (catechin), เควอเซติน (quercetin) และแคมป์เฟอรอล (kaempferol) แต่ในลำต้นจะพบแค่แคมป์เฟอรอลเป็นหลัก แต่สารทั้งหมดที่พบจะเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Jaiswal et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพฤษเคมีในดอกเข็มโดยใช้เครื่องมือ high performance liquid chromatography (HPLC) พบว่ามี กรดแกลลิก (gallic acid), แคทีชิน และกรดคลอโรเจนิค (chlorogenic acid) ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิก (Srichaikul, 2016) และพบสารประเภทแคโรทีนอยด์ในดอกเข็ม โดยพบว่าดอกเข็มสีเหลืองมีปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุด (Sharma et al., 2021)

เข็มเป็นพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย โดยได้มีการศึกษาสารสำคัญในใบเข็ม และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) พบว่าเข็มมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 50 อยู่ที่ 9.63  $\mu\text{g/mL}$  (DPPH assay) (Upadhyay et al., 2014) และพบว่าส่วนที่สกัดจากตัวทำละลาย เมทานอล เป็นส่วนของสารที่มีฤทธิ์มากที่สุดคือ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ในการทดสอบสารต้านจุลชีพ พบว่าใบเข็มที่สกัดด้วยเมทานอล มีฤทธิ์มาก (MIC 0.125–2 mg/mL) เมื่อเทียบกับสารสกัดตัวทำละลายอื่น ๆ โดยพบว่าไวต่อเชื้อ gram positive *Bacillus subtilis* และ gram negative *Klebsiella pneumoniae* มากที่สุด (MIC 0.125 และ 0.25 mg/mL ตามลำดับ) ฤทธิ์ในการสมานแผล พบว่าใบเข็มที่สกัดด้วยเมทานอล ช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast proliferation activity) ที่ความเข้มข้น 12.5  $\mu\text{g/mL}$  (Upadhyay et al., 2014) และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ออกซิเดส (xanthine oxidase) ซึ่งมีประโยชน์ในการรักษาโรคตับและโรคเกาต์ที่เกิดจากการสร้างกรดยูริกและซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเรดิคัล โดยฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ออกซิเดสของ ใบ ดอก และลำต้นของเข็ม มีร้อยละของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 39.7 ถึง 77.3 ในขนาด (12.5–100  $\mu\text{g/mL}$ ) (Torey et al., 2010)

จากข้อมูลดังกล่าวมาข้างต้น ยังไม่มีการทดสอบฤทธิ์ในด้านของการลดเลือนริ้วรอย ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ลดเลือนริ้วรอยซึ่งได้แก่ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ฤทธิ์ใน

การยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส เนื่องจากเห็นว่าเขามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ น่าจะมีสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ข้างต้นได้

#### 2.4. การเกิดริ้วรอย

การเกิดริ้วรอยในร่างกาย เกิดจากการที่องค์ประกอบของร่างกายนั้นเกิดความไม่สมดุลกัน ระหว่างกระบวนการสร้างและกระบวนการสลาย หรือเรียกได้ว่าการสร้างที่ลดลง ส่งผลให้ร่างกายที่เคยไร้ริ้วรอยนั้นเกิดมีริ้วรอยขึ้นมาได้ การเกิดริ้วรอยตามผิวหนังเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งเกิดจากความเสื่อมของร่างกายและเวลาที่ผ่านไป โดยลักษณะที่เราจะมองเห็นได้คือ ผิวหนังมีร่องลึก เกิดริ้วรอย และขาดความยืดหยุ่น และการเสื่อมสภาพของผิวหนังสามารถแบ่งออกได้ 2 ปัจจัย ได้แก่

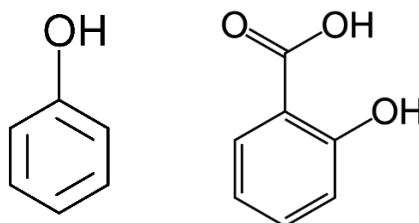
ปัจจัยภายใน (intrinsic aging) ซึ่งเกิดจากกระบวนการภายในร่างกายที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ การเกิดความแก่ของผิวหนังที่เกิดจากปัจจัยภายในมีความสัมพันธ์กับพันธุกรรม ความเครียด ฮอรโมน เป็นต้น โดยเซลล์ผิวหนังของร่างกายมนุษย์จะประกอบไปด้วยส่วนต่างๆที่สำคัญ และสิ่งที่สำคัญที่ช่วยให้เซลล์ยังสามารถคงสภาพอยู่ได้นั้นก็คือ extracellular matrix หรือที่เราเรียกว่า สารเคลือบเซลล์ ซึ่ง ECM เป็นส่วนที่สำคัญของชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และหนังแท้ (dermis) ในผิวหนังมนุษย์ โดยชั้นหนังกำพร้าจะถูกพยุงไว้ด้วยชั้นหนังแท้ที่มีเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ จะมีลักษณะเป็นของเหลว มีส่วนสำคัญในการค้ำจุนโครงสร้างของเซลล์ ซึ่งประกอบไปด้วย โปรติโอไกลแคน (proteoglycan) เกี่ยวพันอยู่กับเมทริกซ์เมทัลโลโปรตีน (matrix metallo proteins) เช่น คอลลาเจน (collagen) อีลาสติน (elastin) และ กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid; HA) พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นคือ ชั้นหนังกำพร้า (ไม่รวม stratum corneum เนื่องจาก ผิวหนังชั้นนี้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง) ชั้นหนังแท้บางลง เสื่อมสภาพ และบริเวณรอยต่อผิวหนังชั้นหนังแท้กับหนังกำพร้าเกิด flattening มากขึ้นเนื่องจากการสร้างเซลล์ผิวหนังลดลง สำหรับกระบวนการเสื่อมสลายของเซลล์ การวิจัยพบว่าเมื่ออายุมากขึ้น การเพิ่มจำนวนของเซลล์ในชั้นฐานจะลดลง จากนั้นผิวหนังชั้นนอกจะบางลง และพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างผิวหนังชั้นหนังแท้และชั้นหนังกำพร้าลดลง ส่งผลให้มีการแลกเปลี่ยนพื้นผิวที่เล็กลงสำหรับส่งสารอาหารไปให้กับผิวชั้นนอก และความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์พื้นฐานลดลง โดยในสภาวะปกติสามารถพบเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ (matrix metallo proteinases; MMPs) เช่น เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) สำหรับย่อยคอลลาเจน เอนไซม์อีลาสเตส (elastase) จะย่อยสลายเส้นใยอีลาสติน และ เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) จะย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิก โดยเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ของผิวหนัง ซึ่งในสภาวะปกติจะพบเอนไซม์เหล่านี้

ในปริมาณที่ต่ำ และจะพบปริมาณของ tissue inhibitor of metallo proteinases (TIMPs) ได้แก่ TIMP-1 และ TIMP-3 ที่มีปริมาณค่อนข้างสูงซึ่งมีหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ MMPs แต่ในกรณีที่เกิดการเสื่อมสภาพของผิวหนัง จะมีปริมาณ MMPs ค่อนข้างสูงและมี TIMPs ค่อนข้างต่ำ ซึ่งเกิดการขาดคอลลาเจน อีลาสติน และกรดไฮยาลูโรนิก จะส่งผลให้โครงสร้างของเซลล์ไม่แข็งแรง ไม่ยืดหยุ่น และขาดน้ำ ทำให้ผิวหนังไม่เรียบเนียนชุ่มชื้น

ปัจจัยภายนอก (extrinsic aging) เช่น มลพิษทางอากาศ การสูบบุหรี่ โภชนาการที่ไม่ดี และแสงแดด ส่งผลให้เกิดริ้วรอยที่หยาบกร้าน สูญเสียความยืดหยุ่น ความหย่อนคล้อย โดยการได้รับแสงแดดนำไปสู่การเสื่อมสภาพของผิว เนื่องจากแสงแดดนั้นจะมีรังสียูวี (ultraviolet; UV) การสัมผัสกับรังสียูวีเป็นปัจจัยหลักของการเสื่อมสภาพของผิวภายนอก คิดเป็นประมาณ 80% ของริ้วรอยบนใบหน้า โดยพบว่าหนึ่งกำพร้าที่ฉายรังสี UV จะหนาขึ้น และดูมีอายุเกินกว่าอายุของผิวหนังจริง โดยรังสียูวีจะไปกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ MMPs เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการลดลงของคอลลาเจน อีลาสติน และกรดไฮยาลูโรนิก นอกจากนี้รังสียูวียังสามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Free radical และ reactive oxygen species, ROS) โดยกลไกของ ROS ที่ทำให้การเสื่อมสภาพของผิวหนังคือ คือ ROS ไปกระตุ้น growth factor cytokine receptors บนผิวของเซลล์ fibroblasts ส่งผลทำให้เกิดการส่งสัญญาณไปยัง protein kinase แล้วกระตุ้น activating protein-1 (AP-1) ในนิวเคลียส และไปเพิ่มระดับของ AP-1 ส่งผลทำให้ปริมาณของเอนไซม์ MMPs เพิ่มขึ้น และเกิดการทำลายเมทริกซ์ที่อยู่นอกเซลล์ (Abhijit & Manjushree, 2010; Ganceviciene et al., 2012; Papakonstantinou et al., 2012; Zhang & Duan, 2018)

## 2.5. สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compound) และการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content determination)

สารประกอบฟีนอลิก จัดเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่พืชสร้างขึ้น และพบได้มากในธรรมชาติ โดยในปัจจุบันพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิดในธรรมชาติ ซึ่งสารประกอบฟีนอลมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน ที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซีน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่ออยู่ และสารประกอบฟีนอลิกพื้นฐานคือ สารฟีนอล (phenol) ที่ต่ออยู่กับกรดคาร์บอกซิลิก (-COOH group) รวมไปถึงอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล ซึ่งมีการแทนที่ด้วยหมู่ฟังก์ชันต่างๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ลิกนิน (lignins) กรดซินนามิก (cinnamic acid) ซึ่งการจำแนกสารประกอบฟีนอลิก สามารถจำแนกออกได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ (Liu, 2004)



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของฟีนอล (ซ้าย) และกรดฟีนอลิก (ขวา)

ที่มา: en.wikipedia.org

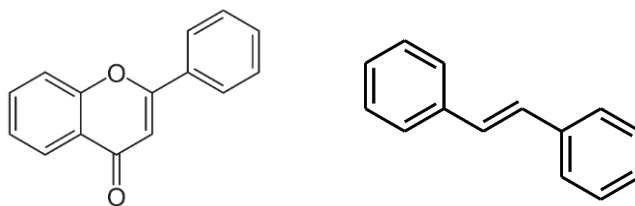
2.5.1. กลุ่มกรดฟีนอลิก สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เป็นโครงสร้างของกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acids) ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid) และกลุ่มที่เป็นโครงสร้างของกรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acid) ได้แก่ กรดคาเฟอิก (caffeic acid) กรดเฟอร์ูลิก (ferulic acid) และกรดคูมาริก (coumaric acid) (Butkhup, 2012)

2.5.2. กลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นกลุ่มใหญ่ สามารถแบ่งออกได้เป็น 7 กลุ่มตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชัน ประกอบด้วยกลุ่ม ฟลาโวนอล (flavonols) ฟลาโวน (flavones) ฟลาวาโนน (flavanones) ฟลาวานอล (flavanols) ฟลาวาโนนอล (flavanonols) ไอโซฟลาโวน (isoflavones) และแอนโทไซยานิดิน (anthocyanidins) (Yoosatit & Klinchan, 2016)

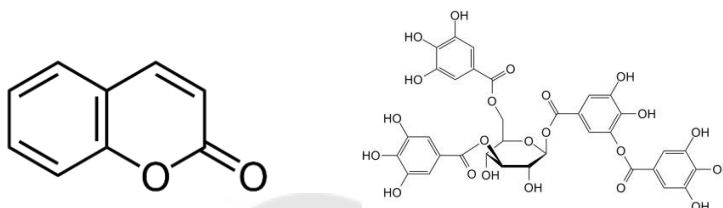
2.5.3. กลุ่มสติลเบนส์ (stilbenes) ในธรรมชาติจะถูกสร้างขึ้นโดยพืชเพื่อป้องกันเชื้อโรครวมไปถึงแมลง และสามารถป้องกันแสงแดด จากการศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันและต้านการอักเสบได้ (Butkhup, 2012)

2.5.4. กลุ่มคูมารินส์ (coumarins) สามารถแบ่งโครงสร้างออกได้เป็น 4 กลุ่มตามลักษณะโครงสร้างดังนี้ คูมารินอย่างง่าย (simple coumarins) ฟูแรนคูมาริน (furanocoumarins) ไพแรนคูมาริน (pyranocoumarins) และคูมารินที่มีหมู่แทนที่เป็นไพโรน (pyrone-substituted coumarins) (Küpeli Akkol et al., 2020)

2.5.5. กลุ่มแทนนินส์ (tannins) สามารถแบ่งตามโครงสร้างออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ condensed tannins เป็นสารที่ไม่ถูกย่อยแต่เมื่อถูกกรดหรือเอนไซม์จะสลายให้สารสีแดงซึ่งไม่ละลายน้ำ และอีกกลุ่มคือ hydrolysable tannins เช่น gallic acid หรือ ellagic acid จับกันเป็นโมเลกุลใหญ่เป็นสารที่ถูกย่อย (hydrolyse) ได้โดยกรดหรือเอนไซม์ (Butkhup, 2012)



ภาพประกอบ 6 โครงสร้างของฟลาโวนอยด์ (ซ้าย) และโครงสร้างของสตีลปีนส์ (ขวา)



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของคูมารินส์ (ซ้าย) และโครงสร้างของแทนนินส์ (ขวา)

ที่มา: en.wikipedia.org

ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกที่พบในธรรมชาติจะมีปริมาณที่แตกต่างกัน แต่เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส คุณสมบัติดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูล ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเข็มมีสารสำคัญที่อยู่ในกลุ่มฟีนอลิก จึงได้มีการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากดอกเข็ม

การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่สกัดได้ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method โดยใช้หลักการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องมือ UV-Vis spectrophotometer ซึ่งเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ที่ให้สีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสารละลายกับสารทดสอบ Folin-Ciocalteu reagent ที่ประกอบไปด้วยโซเดียมโมลิบเดต (sodium molybdate) กรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) และโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) โดยพบว่าสารจากธรรมชาติที่มีกลุ่มฟีนอลิกไฮดรอกซิล (phenolic hydroxyl group) หรือสารกลุ่มพอลิฟีนอล (polyphenols) เป็นองค์ประกอบ จะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) กับสารทดสอบ Folin-Ciocalteu reagent ( $\text{Mo}^{6+}$ ) ซึ่งมีสีเหลืองให้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น phosphotungstic acid และ phosphomolyb ( $\text{Mo}^{5+}$ ) ซึ่งมีสีน้ำเงิน และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในสารตัวอย่างนั้น คำนวณโดยใช้การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกในสารตัวอย่าง จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อรายงานค่าในหน่วย Gallic acid equivalents (GAE) (CHEEWABANTHOENG & Tadtong, 2021; Suksomboon et al., 2021)

## 2.6. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และการหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Total flavonoid content determination)

สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทหนึ่งที่ได้พบได้ทั่วไปในพืช โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟลาโวนอยด์มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นฟลาแวน (flavan) หรือ 2-ฟีนอลเบนโซไพแรน (2-phenylbenzopyran) ประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม เรียงกันแบบ C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> เรียงเป็น 3 ring เรียกเป็น ring A, B, และ C โดย ring A และ B เป็นวงเบนซีน (benzene ring) ส่วน ring C เป็น heterocyclic pyran ring ซึ่งอยู่ตรงกลางของโครงสร้าง ทำให้โครงสร้างที่ได้เป็นแบบวงแหวนโครแมน (chroman ring) ในธรรมชาติสารประกอบฟลาโวนอยด์มีมากกว่า 4,000 ชนิด ส่วนใหญ่ อยู่ในรูปฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลหนึ่งหมู่ หรือมากกว่าในโมเลกุลของสารประกอบฟลาโวนอยด์ จะเกิดพันธะกับโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (glucose) แรมโนส (rhamnose) อะราบินอส์ (arabinose) และไซโลส (xylose) สารประกอบ ฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันซึ่งแทนที่ในโครงสร้างพื้นฐาน ได้เป็น 7 กลุ่ม

2.6.1. ฟลาโวนอล (flavonols) เช่น เควอเซติน (quercetin) แคมป์เฟอรอล (kaempferol) ไมริซิติน (myricetin)

2.6.2. ฟลาโวน (flavones) เช่น ลูทีโอลิน (luteolin) อากิเจนิน (apigenin)

2.6.3. ฟลาวานอน (flavanones) เช่น เฮสเพอริติน (hesperetin)

2.6.4. ฟลาวานอล (flavanols) เช่น แคทีชิน (catechin) แกลโลแคทีชิน (gallocatechin)

2.6.5. ฟลาวานอนอล (flavanonols) เช่น แทกซิโฟลีน (taxifolin)

2.6.6. ไอโซฟลาโวน (isoflavones) เช่น เดดซีน (daidzein) จีนิสตีน (genistein)

2.6.7. แอนโทไซยานิน (anthocyanins) เช่น ไซยานิดิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) มัลวิดิดิน (malvidin) เพลาโกนิดีน (pelargonidin) (Yoosatit et al., 2016)

การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation colorimetric method โดยใช้เควอเซติน (quercetin) เป็นสารมาตรฐาน โดยหลักการคือ AlCl<sub>3</sub> จะเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่คีโต (keto group) ในคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และหมู่ไฮดรอกซิลในคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และตำแหน่งที่ 5 ของฟลาโวนและฟลาโวนอลหรือทำปฏิกิริยากับ ไดไฮดรอกซิล (dihydroxyl) ที่วงแหวน A และ B เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเหลือง โดยจะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร หลังจากการเข้าทำปฏิกิริยาผ่านไปแล้ว 40 นาที จากนั้นทำการสร้างกราฟมาตรฐานของ

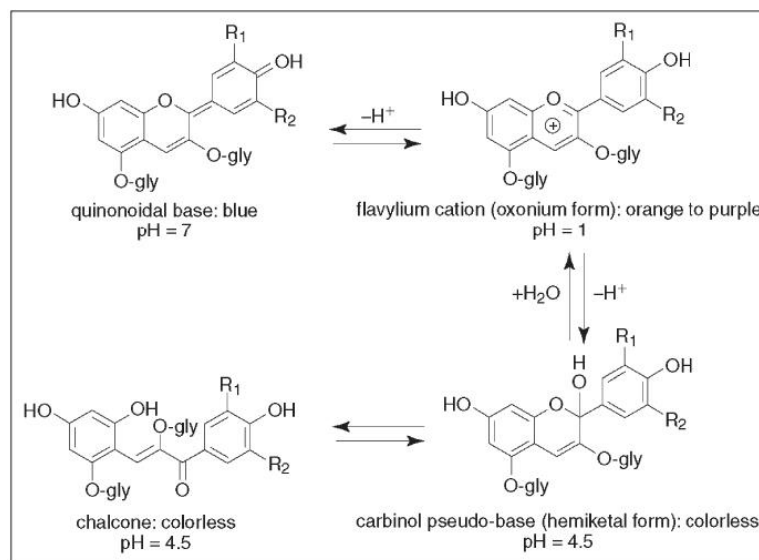
สารละลายควอเซติน เพื่อนำสมการเส้นตรงไปคำนวณหาปริมาณรวมของสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารละลายตัวอย่าง (CHEEWABANTHOENG et al., 2021)

## 2.7. สารกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanins) และการหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานิน (Total anthocyanin content determination)

แอนโทไซยานิน เป็นสารให้สีตามธรรมชาติที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ และเป็นสารรงควัตถุ (pigment) ที่ให้สีในพืช เช่น สีแดง สีน้ำเงิน โดยสามารถพบได้ในทั้งดอกและผล สามารถละลายน้ำได้ดี และสีของแอนโทไซยานินจะเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะกรด-เบส จึงทำหน้าที่เป็นอินดิเคเตอร์วัดความเป็นกรด-ด่างได้ (pH indicator) โดยที่ pH น้อยกว่า 4.5 จะให้สีแดง ที่ pH มากกว่า 4.5 ไม่มีสี และที่สภาวะเป็นกลาง (pH = 7) ให้สีน้ำเงิน แอนโทไซยานินมีคุณสมบัติช่วยต้านอนุมูลอิสระ สามารถลดอาการอักเสบ ช่วยปกป้องหลอดเลือด ซึ่งโครงสร้างของแอนโทไซยานินจะประกอบไปด้วยส่วนของอะไกลโคน (aglycone) น้ำตาล และหมู่เอซิล (acyl group) โดยจะเป็นคาร์บอนเรียงต่อกัน 15 อะตอม แบบ C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> เรียงเป็น 3 ring หรือเรียกโครงสร้างนี้ว่า flavylum โดยเกิดการเกิดสีต่าง ๆ จะเกิดจากการแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (OH) และหมู่เมทอกซี (OCH<sub>3</sub>) ของ flavylum ring ถ้าหากมีการแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิลมาก จะทำให้เกิดเฉดสีน้ำเงิน แต่ถ้ามีการแทนที่ด้วยหมู่เมทอกซี แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปออกโซเนียม (oxonium form) จะทำให้เกิดเฉดสีแดง (Fakngoen & Meerod, 2017)

การหาปริมาณแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH Differential method จะใช้สารละลายสองชนิดในการวัดคือ KCl buffer และ CH<sub>3</sub>COONa ที่ pH 1.0 และ 4.5 ตามลำดับ และจะทำการวัดผลด้วย UV-Vis spectrophotometer จากค่าการดูดกลืนแสงของสีที่เปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากเมื่อโครงสร้างของแอนโทไซยานินเปลี่ยนแปลงไป จะทำให้ได้สีของสารละลายที่แตกต่างกัน หากอยู่ที่ pH 1.0 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปออกโซเนียมของฟลาโวลีียม ซึ่งให้สีแดง และที่ pH 4.5 แอนโทไซยานินจะอยู่ในรูปเฮมิคีทอล (hemiketal form) ของคาร์บินอล ซึ่งไม่มีสี เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรของ pH 1.0 และ 4.5 แล้วนำมาหักลบกัน จะได้เป็นปริมาณรวมของสารแอนโทไซยานินในสารที่เราทดสอบ และในกรณีที่สารละลายมีความขุ่น จะต้องทำการวัดที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เพื่อนำมาหักลบค่าความขุ่น ที่อาจจะทำให้การหาปริมาณแอนโทไซยานินคลาดเคลื่อนได้ ดังสมการ

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



ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของแอนโทไซยานินที่ pH ต่าง ๆ

ที่มา : อรุษา ชาวนลิขิต. (2554). วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี).

ข้อควรระวังในการใช้วิธี pH Differential method คือสารละลายที่นำมาทดสอบ ควรมี pH ที่ถูกต้องและแม่นยำ เนื่องจากหาก pH ที่นำมาทดสอบเปลี่ยนแปลงไปจากค่ามาตรฐาน จะส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินมีความคลาดเคลื่อนได้ และจะส่งผลต่อการคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน โดยควรทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง หลังจากปล่อยให้สารละลายทำปฏิกิริยากันเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที แต่ไม่ควรนานเกิน 60 นาที (Chaovanalikit, 2011)

## 2.8. สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) และการหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Total carotenoid content determination)

แคโรทีนอยด์เป็นองค์ประกอบสำคัญของสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วยแสง เนื่องจากมีคุณสมบัติป้องกันแสง และดูดกลืนแสงความยาวคลื่นระหว่าง 400 ถึง 550 นาโนเมตร ซึ่งทำให้สารประกอบของสิ่งมีชีวิตที่มีแคโรทีนอยด์จะพบสีแดง ส้ม หรือเหลือง แคโรทีนอยด์ถูกจัดให้เป็นสารทุติยภูมิในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ (terpenoids) โดยมีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย isoprene unit ( $C_5$ ) ทั้งหมด 8 หน่วยมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ได้เป็น tetraterpene ที่มีคาร์บอน 40 ตัว และเกิดการคอนจูเกตกันของพันธะคู่ในสายยาวของแคโรทีนอยด์ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานที่เหมาะสมของแคโรทีนอยด์ เช่น ช่วยให้การดูดกลืนแสงสำหรับสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์ด้วย



แสงดีขึ้น ซึ่งแคโรทีนอยด์สามารถจำแนกออกได้เป็นสองประเภทคือ hydrogenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแคโรทีน (carotene) และ oxygenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) ในกลุ่มแคโรทีน จะเป็นกลุ่มที่มีไฮโดรคาร์บอนอยู่ในโมเลกุล ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีขั้ว จึงละลายได้ดีในไขมัน โดยสารในกลุ่มนี้ที่เราจะพบได้คือ อัลฟาแคโรทีน (alpha-carotene) เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) และไลโคปีน (lycopene) ส่วนในกลุ่มแซนโทฟิลล์ จะเป็นกลุ่มที่มีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล ทำให้มีขั้วมากกว่าและละลายในน้ำได้ดีกว่าในไขมัน โดยสารที่เราจะพบคือ ลูทีน (lutein) ซีแซนทีน (zeaxanthin) แอสตราแซนทีน (astaxanthin) เป็นต้น (Tan & Norhaizan, 2019; Tanaka et al., 2008)

จากการศึกษาปริมาณแคโรทีนอยด์ที่พบในดอกเข็ม พบว่าดอกเข็มสีเหลืองมีปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุด และรองลงมาเป็นดอกเข็มสีส้ม และสีอื่น ๆ ซึ่งสัมพันธ์กับคุณสมบัติของแคโรทีนอยด์ที่จะพบในสารที่มีเหลือง และส้มเป็นส่วนใหญ่ (Sharma et al., 2021)

การหาปริมาณรวมแคโรทีนอยด์ด้วยวิธี spectrophotometry เป็นการตรวจสอบหาปริมาณแคโรทีนอยด์ โดยใช้เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate;EA) ไดคลอโรมีเทน (dichlorometane;DCM) และเฮกเซน (hexanCe;Hex) กับสารละลายที่ทดสอบ โดยสารละลาย EA:DCM:Hex จะไปละลายกับสารกลุ่มแคโรทีน ที่เป็นสารไม่มีขั้ว และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของแคโรทีนที่ความยาวคลื่น 454 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer และทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้เบต้าแคโรทีนเป็นสารมาตรฐาน และวัดค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของสารละลายตัวอย่างมาแทนค่าในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณเป็นปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์จากสารละลายตัวอย่าง (Davey et al., 2006; Serino et al., 2009)

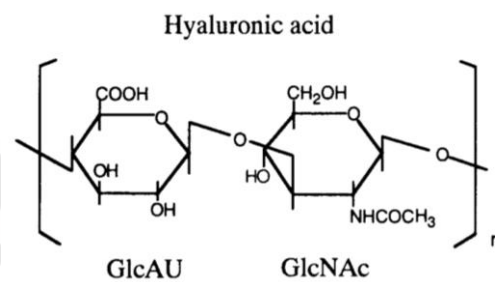
## 2.9. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของผิวหนัง

### 2.9.1. กรดไฮยาลูโรนิกและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จะย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิก หรือที่เรียกว่าไฮยาลูโรแนน (hyaluronan) เป็นส่วนประกอบหลักของ ECM เป็นโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่เรียกว่าไกลโคสะมิโนไกลแคน (glycosaminoglycans, GAGs) โดยภายในโครงสร้างไกลโคสะมิโนไกลแคน ประกอบด้วย ไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) ของกรด D-glucuronic (GlcUA) เชื่อมอยู่กับ N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) กรดไฮยาลูโรนิกมีส่วนสำคัญในการลดริ้วรอย รักษาบาดแผล และทำให้ผิวเรียบเนียนและชุ่มชื้น โดยกรดไฮยาลูโรนิก 1 มิลลิกรัม สามารถกักเก็บน้ำไว้ได้ถึง 6000 มิลลิลิตร นอกจากนี้กรดไฮยาลูโรนิกสามารถถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

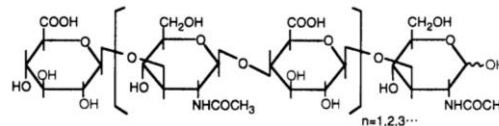
(hyaluronidases) ด้วยการตัด N-acetylglucosamidic ที่พันธะไกลโคซิดิกบริเวณตำแหน่ง  $\beta$ -1,4 ทำให้ได้เป็นโมเลกุลโอลิโกแซ็กคาไรด์ขนาดเล็ก โดยกรดไฮยาลูโรนิกสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามการทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิกได้แก่

1. โครงสร้างที่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ hyaluronate 4-glycanohydrolase
2. โครงสร้างที่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ hyaluronate 3-glycanohydrolase
3. โครงสร้างที่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ hyaluronate lyase

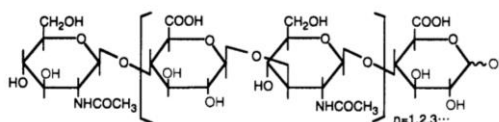


ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก

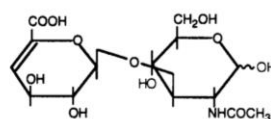
A. Hyaluronate 4-glycanohydrolase (EC 3.2.1.35)



B. Hyaluronate 3-glycanohydrolase (EC 3.2.1.36)



C. Hyaluronate lyase (EC 4.2.99.1)



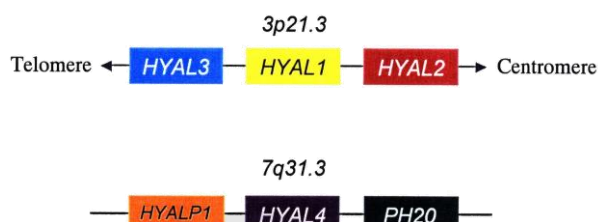
ภาพประกอบ 10 โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิกที่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

ที่มา: Ikegami M. (2004)

โดยทั่วไปในจีโนมของมนุษย์มียีน 6 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิก ได้แก่ Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3, Hyal-4, Hyalp-1 และ PH-20 โดยยีนแต่ละชนิดกระจายอยู่

บริเวณเนื้อเยื่อที่ไม่ซ้ำกันยกเว้น PH-20 จะสามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อ โดยยีนทั้ง 6 ยีนสามารถแบ่งกลุ่มออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

1. กลุ่มที่มีการรวมตัวกันบนโครโมโซม 3p21.3 ได้แก่ Hyal-1, Hyal-2 และ Hyal-3
2. กลุ่มที่มีการรวมตัวกันบนโครโมโซม 7q31.3 ได้แก่ Hyal-4, Hyalp-1 และ PH-20



ภาพประกอบ 11 การแบ่งกลุ่มยีนของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

ที่มา: Ikegami M. (2004)

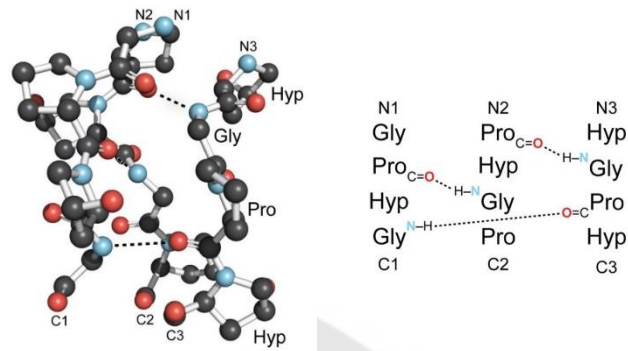
เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่สามารถพบได้ในร่างกายมนุษย์จะประกอบไปด้วยเอนไซม์จากยีน Hyal-1 และ Hyal-2 โดยที่ Hyal-1 จะย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงให้เป็นโอลิโกเมอร์ขนาดเล็ก (โดยส่วนใหญ่เป็นเตตระแซ็กคาไรด์) สามารถพบได้ที่ ตับ ไต หัวใจ และม้าม ในขณะที่ Hyal-2 จะย่อยสลายกรดไฮยาลูโรนิกที่มีมวลโมเลกุลสูงให้เป็นผลิตภัณฑ์ประมาณ 20 kDa (Ikegami, 2004; Liyanaarachchi et al., 2018; Stern & Jedrzejewski, 2006)

### 2.9.2. คอลลาเจนและเอนไซม์คอลลาจีเนส

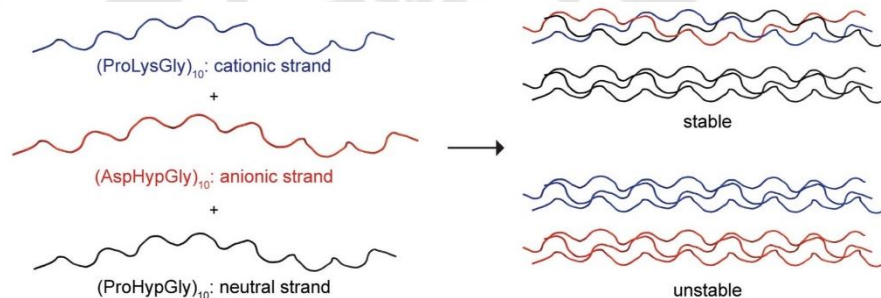
คอลลาเจนจัดเป็นโครงสร้างแบบเกลียวสามชั้นคือประกอบไปด้วยสายโซ่เกลียวที่เชื่อมกันสามสาย (triple helix) โดยมีกรดอะมิโน X-Y-Gly เรียงวนซ้ำเป็นเกลียวไป โดยโครงสร้างที่แข็งแรงของคอลลาเจนสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ

1. เป็นโครงสร้างที่ X และ Y เป็นกรดอะมิโนโพรลีน (proline) และไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ตามลำดับ โดยไฮดรอกซีโพรลีนนั้นเกิดจากการที่กรดอะมิโนโพรลีนถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) โดยผ่านกระบวนการ hydroxylation โดยโครงสร้างที่ได้ออกมาเป็น  $(\text{Pro-Hyp-Gly})_n$  จะเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) โดยจะเรียกโครงสร้างนี้ว่า neutral strand
2. เป็นโครงสร้างที่มีสามสายของกรดอะมิโนมารวมกันโดยที่ X และ Y เป็นกรดอะมิโนโพรลีน และไลซีน (lysine) ตามลำดับ เรียงกันออกมาได้เป็น  $(\text{Pro-Lys-Gly})_n$  เรียกโครงสร้างนี้ว่า cationic strand มารวมตัวกับ anionic strand ที่ X และ Y เป็นกรดอะมิโน

แอสพาราจีน (asparagine) และไฮดรอกซีโพรลีนตามลำดับ ซึ่งได้โครงสร้างออกมาเป็น  $(\text{Asp-Hyp-Gly})_n$  มารวมกับ neutral strand จะได้โครงสร้างตามภาพประกอบ 13



ภาพประกอบ 12 โครงสร้างคอลลาเจนแบบ neutral strand



ภาพประกอบ 13 โครงสร้างที่เสถียรของคอลลาเจน

ที่มา: Chung et al. (2004). Journal of The EMBO journal.

โครงสร้างแบบเกลียวสามชั้นนี้ทำให้คอลลาเจนในชั้นผิวหนัง สามารถต้านทานต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนส่วนใหญ่ได้ แต่เอนไซม์ที่สามารถแยกโครงสร้างของคอลลาเจนได้คือ เอนไซม์คอลลาจีเนส ซึ่งเป็นหนึ่งในเอนไซม์ของ MMPs โดยเอนไซม์คอลลาจีเนสที่สามารถพบได้ในร่างกายของมนุษย์จะประกอบไปด้วย เอนไซม์คอลลาจีเนสชนิดที่ 1 (MMP-1) เอนไซม์คอลลาจีเนสชนิดที่ 2 (MMP-8) เอนไซม์คอลลาจีเนสชนิดที่ 3 (MMP-13) และ เอนไซม์คอลลาจีเนสชนิดที่ 4 (MMP-18) โดยความจำเพาะของ MMP-1 และ MMP-8 จะจำเพาะต่อการจับกับคอลลาเจนชนิดที่ 1 และ 3 แต่ถ้าเป็น MMP-13 และ MMP-18 จะจำเพาะต่อการจับกับคอลลาเจนชนิดที่ 1 เพียงอย่างเดียว (Chung et al., 2004; Shoulders & Raines, 2009)

### 2.9.3. อีลาสตินและเอนไซม์อีลาสเตส

เอนไซม์อีลาสเตส จะย่อยสลายเส้นใยอีลาสติน อีลาสตินเป็นโปรตีนหลักของเส้นใยที่ให้ความยืดหยุ่นแก่เนื้อเยื่อ เช่น หลอดเลือด ปอด ผิวหนัง และกระดูกอ่อน มีคุณสมบัติพิเศษคือ ให้ความ

ยืดหยุ่น มีความทนทานสูง โดยเส้นใยอีลาสตินประกอบด้วยแกนอีลาสติน (elastin core) และไมโครไฟบริลลาร์แมนเทิล (microfibrillar mantle) อีลาสตินสามารถต้านทานต่อแรงดึงได้ดี เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นเอกลักษณ์ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ 4 ชนิด ได้แก่ ไกลซีน (Glycine) อะลานีน (Alanine) วาลีน (Valine) และ โพรลีน (Proline) และส่วนของ tropoelastin ที่เป็นสารตั้งต้นที่ละลายน้ำได้ของอีลาสตินที่เป็นโมโนเมอร์มารวมตัวกันบริเวณไมโครไฟบริลและเกิด crosslinked โดยผ่านปฏิกิริยา lysine oxidase ทำให้ประกอบกันเป็นเส้นใยอีลาสติน และเมื่อร่างกายเกิดการอักเสบจะมีการหลั่งเอนไซม์อีลาสเตสออกมาจะส่งผลให้อีลาสตินเกิดการเสื่อมสภาพ และการที่มีเอนไซม์อีลาสเตสร่วมกับการปลดปล่อยอีลาสไทโคไคน์ จะส่งผลให้เกิดการย่อยสลายเส้นใยอีลาสตินที่เพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์อีลาสเตส ที่มีผลต่อการย่อยสลายเส้นใยอีลาสตินในร่างกายมากที่สุดคือ macrophage metalloelastase (MMP-12) ซึ่งถูกหลั่งออกมาจากเซลล์หลายเซลล์เช่น เคราติโนไซต์ (keratinocytes) ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) และเซลล์ที่เกิดการอักเสบ (inflammatory cell) (Heinz, 2020; Wang et al., 2021; Weihermann et al., 2017)

## 2.10. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดการเสื่อมสภาพของผิวหนัง

2.10.1. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส จะสามารถทดสอบได้ 2 วิธีคือ วิธี colorimetric และวิธี turbidimetric

### 2.10.1.1. Colorimetric method (Lee & Kim, 2010)

เป็นการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วย แบบจำลอง colorimetric hyaluronidase inhibition assay เป็นแบบจำลองในการทดสอบ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส โดยการวัดปริมาณของ N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) ที่ถูกแยกออกมาจากกรดไฮยาลูโรนิก โดยที่ GlcNAc จะเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส และถูกเปลี่ยนไปเป็น chromogen I และ II จากนั้นก็จะเปลี่ยนเป็น chromogen III เพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับ *p*-dimethylaminobenzaldehyde (PDMAB) และจะได้สีม่วงปรากฏออกมา

วิธีการทดสอบนี้ จะเป็นการวิเคราะห์ด้วยการเปรียบเทียบความเข้มของสี โดยนำสารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมาทำปฏิกิริยากับสารทดสอบที่เป็นเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส คือ bovine hyaluronidase แล้วทำการใส่ sodium hyaluronate ซึ่งทำหน้าที่เป็น substrate จากนั้น ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร จากการทำ

ปฏิกิริยากับ PDMAB เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นเทียบกับกลุ่มควบคุมผลลบ ถ้าหากว่าสารตัวอย่างสามารถป้องกันการทำเข้าปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ ปฏิกิริยาจะมีสีม่วงที่น้อยกว่าปฏิกิริยาควบคุมผลลบ โดยสามารถคำนวณฤทธิ์ในการยับยั้งที่วัดเป็น % inhibition ได้จากสมการ

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

เมื่อ Optical density คือ ค่าการดูดกลืนแสงในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และในปฏิกิริยาที่ทดสอบกับสารละลายทดสอบ ที่เวลาสิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

#### 2.10.1.2. Turbidimetric method (Schmith & Faber, 1950)

เป็นการวิเคราะห์ค่าความขุ่น ของปฏิกิริยาที่เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสทำกับกรดไฮยาลูโรนิก โดยจะวัดค่าความขุ่นที่ลดลงของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่อยู่ในสารละลายกรด จากการที่เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเข้าไปตัดพันธะของกรดไฮยาลูโรนิก ทำให้พันธะของกรดไฮยาลูโรนิกสั้นลง และสามารถละลายน้ำได้ดีมากขึ้น ส่งผลให้สารละลายมีความขุ่นที่ลดลง

วิธีการทดสอบนี้ จะเป็นการเปรียบเทียบค่าความขุ่นของสารละลายกรดไฮยาลูโรนิกที่อยู่ในสารละลายกรด โดยนำสารที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมาทำปฏิกิริยากับกรดไฮยาลูโรนิก แล้วทำการใส่เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสลงไป จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร เพื่อวัดค่าความขุ่นที่เปลี่ยนแปลงไปเทียบกับกลุ่มควบคุมผลลบ ถ้าหากว่าสารทดสอบสามารถป้องกันการทำเข้าปฏิกิริยาของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ ค่าความขุ่นที่วัดได้ในปฏิกิริยาจะไม่แตกต่างจากปฏิกิริยาควบคุมผลลบ

โดยในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีการทดสอบด้วยวิธี colorimetric

2.10.2. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส จะสามารถทดสอบได้ 2 วิธี คือ วิธี spectrophotometric และวิธี spectrofluorometric

#### 2.10.2.1. Spectrophotometric method (Mandrone et al., 2015)

เป็นการวิเคราะห์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* โดยใช้สารตั้งต้นเป็น N-(3-[2-Furyl]-Acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) เมื่อสารตั้งต้นเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์คอลลาจีเนส จะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาสองตัวคือ N-(3-[2-Furyl]-Acryloyl)-Leu และ Gly-Pro-Ala

วิธีการทดสอบเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากการสลายตัวของ FALGPA ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร หากสารที่ทำการทดสอบสามารถยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* จะมีค่าการดูดกลืนแสงของ FALGPA ที่น้อยกว่าปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และสามารถคำนวณร้อยละของการยับยั้งเป็น %inhibition ได้จากสมการ

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

เมื่อ  $\Delta \text{Optical density}$  คือ ค่าที่เปลี่ยนแปลงไปของค่าการดูดกลืนแสงที่วัดค่าได้ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยาของ FALGPA ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และในปฏิกิริยาที่ทดสอบกับสารละลายทดสอบ

#### 2.10.2.2. Spectrofluorometric method (Ahmed et al., 2007)

เป็นการวัดค่าการเรืองแสงจากการสลายตัวของ DQ<sup>TM</sup>-collagen 1 และ DQ<sup>TM</sup>-gelatin โดยใช้เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* (MMP-1 และ MMP-2) โดย DQ<sup>TM</sup>-collagen 1 และ DQ<sup>TM</sup>-gelatin จะถูกย้อมสี fluoresce และเมื่อเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์คอลลาจีเนส MMP-1 จะเข้าไปสลายพันธะของ DQ<sup>TM</sup>-collagen 1 และ MMP-2 จะเข้าไปสลายพันธะของ DQ<sup>TM</sup>-gelatin และเมื่อเกิดการสลายตัวจะได้สารที่สามารถเรืองแสง และสามารถวัดที่ความยาวคลื่น 485 (excitation) และ 538 (emission) นาโนเมตรได้

วิธีการทดสอบนี้จะเป็นการวัดการเรืองแสงของโปรตีน ที่สลายตัวจากเอนไซม์คอลลาจีเนส *Clostridium histolyticum* โดยวัดที่สองความยาวคลื่นคือ 485 และ 538 นาโนเมตร หากสารที่ทำการทดสอบสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ การสลายของโปรตีน ก็จะมีค่าการเรืองแสงที่น้อยกว่าปฏิกิริยาควบคุมผลลบ ซึ่งสามารถนำค่าการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนที่เรืองแสงในปฏิกิริยามาคำนวณหาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสเป็น %inhibition ได้จากสมการ

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

เมื่อ Fluorescence intensity คือ ค่าการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนเรืองแสงในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และในปฏิกิริยาที่ทดสอบกับสารละลายทดสอบ

โดยในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีการทดสอบด้วยวิธี spectrophotometric

2.10.3. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส จะสามารถทดสอบได้ 2 วิธี คือ วิธี spectrophotometric และวิธี spectrofluorometric

#### 2.10.3.1 Spectrophotometric (Ambarwati et al., 2020)

เป็นการวิเคราะห์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสที่ได้จากตับอ่อนหมู (porcine pancreatic elastase) โดยใช้สารตั้งต้นเป็น N-Succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-*p*-nitroanilide (SANA) โดยปกติแล้วเอนไซม์อีลาสเตสจะทำการตัดพันธะของสารตั้งต้นเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็น N-Succinyl-(Ala)<sub>3</sub> และ *p*-nitroaniline โดยปริมาณที่จะทำการวัดผลจะใช้เป็น *p*-nitroaniline

วิธีการทดสอบนี้จะเป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitroaniline ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หากสารที่ทำการทดสอบสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้ การสลายตัวของ SANA จะน้อยลง ทำให้การเกิด *p*-nitroaniline ลดลง และมีค่าการดูดกลืนแสงน้อยกว่าปฏิกิริยากลุ่มควบคุมผลลบ โดยสามารถคำนวณหาฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสเป็น %inhibition จากสมการ

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

เมื่อ Optical density คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitroaniline ในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และในปฏิกิริยาที่ทดสอบกับสารละลายทดสอบ ที่เวลาสิ้นสุดการทำปฏิกิริยา

#### 2.10.3.2. Spectrofluorometric (Vallisuta et al., 2014)

เป็นการวัดค่าการเรืองแสงของโปรตีน bovine neck ligaments ที่สลายตัวด้วยเอนไซม์อีลาสเตสจากตับอ่อนหมู โดยที่ bovine neck ligaments จะถูกย้อมสี BODIPY<sup>®</sup> FL conjugate เอาไว้ เมื่อโปรตีนเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์อีลาสเตส เอนไซม์จะเข้าไปสลายพันธะ และทำให้เกิดการสลายตัวพร้อมกันได้สารที่สามารถเรืองแสงได้ และนำไปวัดที่ความยาวคลื่น 485 (excitation) และ 535 (emission) นาโนเมตร

วิธีการทดสอบนี้จะเป็นการวัดค่าการเรืองแสงของ bovine neck ligaments ที่ได้ทำการย้อมสี BODIPY<sup>®</sup> FL conjugate เอาไว้และเกิดการสลายตัวด้วยเอนไซม์อีลาสเตส โดยมีการวัดที่สองความยาวคลื่นคือ 485 และ 535 นาโนเมตร หากสารที่ทดสอบสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้ ค่าการเรืองแสงที่วัดได้จะมีค่าน้อยกว่า ค่าการเรืองแสงของปฏิกิริยากลุ่ม



ควบคุมผลลบ ซึ่งจะนำค่าการเรืองแสงที่วัดได้ในห้องปฏิบัติการมาคำนวณหาเป็น %inhibition จากสมการ

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

เมื่อ Fluorescence intensity คือ ค่าการเรืองแสง fluorescence ของโปรตีนเรืองแสงในปฏิกิริยาควบคุมผลลบ และในปฏิกิริยาที่ทดสอบกับสารละลายทดสอบ

โดยในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้วิธีการทดสอบด้วยวิธี spectrophotometric



### บทที่ 3

## วัสดุและวิธีการวิจัย

#### สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- Aluminium chloride ( $\text{AlCl}_3$ ) (Kemaus, Australia)
- Bovine hyaluronidase (BHA) (Sigma-aldrich Co.,Ltd., USA)
- Beta-carotene,  $\beta$ -carotene (Fluke, China)
- Calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) (Merck KGaA, Germany)
- Collagenase type I จาก *Clostridium histolyticum* (Sigma, USA)
- Cyanidin chloride (Fluke, China)
- Ethanol AR (Merk Co.,Ltd., Germany)
- Folin-Ciocalteu reagent (Carlo Erba, France)
- Gallic acid (Sigma, USA)
- Glacial acetic acid (Quality Reagent Chemical, New Zealand)
- Hyaluronic acid (Chanjao Longevity Co., Ltd., Thailand)
- Hydrochloric acid (QReC, S.V. medico Co.,Ltd., New zealand)
- N-(3-[2-Furyl]-acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) (Sigma, USA)
- N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide (SANA) (Sigma, USA)
- Porcine pancreatic elastase type IV (PPE) (Sigma, USA)
- Potassium chloride (KCl) (Ajax Finechem, Australia)
- p-Dimethylamino benzaldehyde; PDMAB (Sigma-aldrich Co.,Ltd., India)
- Quercetin (Sigma-aldrich Co.,Ltd., India)
- Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) anhydrous (Ajax Finechem, New Zealand)
- Sodium chloride (NaCl) (Quality Reagent Chemical, New Zealand)
- Sodium hydroxide (NaOH) (Ajax Finechem Pty Ltd, Australia)
- Sterile water for injection (A.N.B. laboratory, ประเทศไทย)
- Tricine (Sigma, USA)
- Tris-HCl (Sigma, USA)

### เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องแก้ว
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (Sartorius corporate administration GmbH, Germany)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Sartorius corporate administration GmbH, Germany)
- Blender (Panasonic, ประเทศไทย)
- Fume hood (Major scientific product Co.,Ltd., Thailand)
- Hot air oven (Contherm, New Zealand)
- Incubator (Mettler GmbH + Co. KG , Germany)
- Microcentrifuge tube 1.5 ml (Bio7 bioline, Meridian bioscience, China)
- Microcentrifuge tube 2.0 ml (Axygen, USA)
- Micropipette 200, 1000 µl (Rainin instrument, LLC., USA)
- Microtitre plate 96 well (Thermo scientific, Sterilin Co.,Ltd., UK)
- Microplate reader spectramax M3 (Molecular devices, RI technologies Co.,Ltd., USA)
- Pipette tip 200, 1000 µl (Sarstedt AG & CO. KG., Germany)
- Rotary evaporator (Buchi, Switzerland)
- Sonicator (Power Sonic450, Hwashin Technology, Korea)
- Vortex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, USA)
- Water bath (Buchi, Switzerland)

### พืชสมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

- ดอกเข็มสีแดง (นครนายก ประเทศไทย)
- ดอกเข็มสีเหลือง (นนทบุรี ประเทศไทย)
- ดอกเข็มสีชมพู (นครนายก ประเทศไทย)
- ดอกเข็มสีส้ม (นนทบุรี ประเทศไทย)

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 1. การเตรียมสารสกัดดอกเข็ม และหาปริมาณสารสกัดที่ได้

1.1 นำดอกเข็มที่เก็บมา ล้างทำความสะอาด แล้วนำไปผึ่งลมในที่ร่มให้แห้ง

1.2 นำดอกเข็มที่ผึ่งลมจนแห้งแล้ว เข้าสู่อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

- 1.3 นำมาบดให้เป็นผงด้วย blender
- 1.4 นำผงแห้งที่ได้ไปชั่ง จะได้น้ำหนักผงแห้งของดอกเข็ม
- 1.5 นำผงแห้งมาแช่สกัด (maceration) ด้วย ethanol 80% ที่อุณหภูมิประมาณ 2-3 วัน ในอัตราส่วนสมุนไพร (g) : ethanol (ml) เป็น 1:10 ทำซ้ำจนกว่าสีของสารสกัดที่กรองได้จะจางลง
- 1.6 นำสารสกัดที่ได้มากรอง
- 1.7 นำสารสกัดที่กรองได้ ไประเหย ด้วยเครื่อง rotary evaporator จนได้สารสกัดจากดอกเข็มที่เหนียวข้นขึ้น
- 1.8 ชั่งน้ำหนักของสารสกัดที่ทำการระเหยได้ และนำไปคำนวณปริมาณสารสกัด คิดเป็นร้อยละที่ได้ ด้วยสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ yield} = \frac{w_1}{w_2} \times 100$$

เมื่อ  $w_1$  คือ น้ำหนักของสารสกัดหยาบ

$w_2$  คือ น้ำหนักแห้งของดอกเข็ม

## 2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric

### 2.1. การเตรียมสารละลายทดสอบ

#### 2.1.1. เตรียมสารละลาย 0.1 M acetate buffer pH 3.6

2.1.1.1. ชั่ง sodium acetate 0.198 g และ acetic acid 2.858 g

2.1.1.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย sterile water จนครบ 500 ml

2.1.1.3. ปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH จนได้ pH 3.6

2.1.2. เตรียมสารละลาย bovine hyaluronidase (BHA) ความเข้มข้น 7,900 units/ml โดยละลาย ด้วย acetate buffer pH 3.6

2.1.2.1. ชั่ง bovine hyaluronidase (BHA) 0.0296 g

2.1.2.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetate buffer จนครบ 3 ml

2.1.3. เตรียมสารละลาย hyaluronic acid (HA) ความเข้มข้น 15 mg/ml

2.1.3.1. ชั่ง hyaluronic acid 0.0900 g

2.1.3.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetate buffer จนครบ 6 ml

2.1.4. เตรียมสารละลาย *p*-dimethyl-aminobenzaldehyde (PDMAB) 0.5 g/50ml

2.1.4.1. ชั่ง PDMAB 0.5000 g ละลายด้วย 10 N HCl ปริมาตร 6.25 mL

2.1.4.2. เติม glacial acetic acid 43.75 mL

2.1.5. เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500, 550, 600, 650 และ 700  $\mu\text{g/ml}$

2.1.5.1. ชั่ง quercetin มา 0.05 g

2.1.5.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol AR : propylene glycol (EtOH : PG) อัตราส่วน 2 : 3 จนครบ 1000  $\mu\text{l}$  แล้วนำไป sonicate จนได้สารละลายสีเหลืองใส จะได้ stock solution ที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml

2.1.5.3. นำ stock solution มาเจือจางด้วย EtOH : PG (อัตราส่วน 2 : 3) ให้มีความเข้มข้น 13.5, 14.85, 16.20, 17.55 และ 18.90 mg/ml ตามลำดับ

2.1.6 เตรียมสารละลายของสารสกัดจากดอกเข็ม เพื่อนำไปสร้างกราฟเส้นตรง โดยทดสอบให้ความเข้มข้นสุดท้าย 39.10, 78.13, 156.25, 312.50, 625.00  $\mu\text{g/ml}$

2.1.6.1. ชั่งสารสกัดดอกเข็มมา 40 mg เติม water for injection 2 ml นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกส่วน supernatant ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 rpm 10 นาที จะได้ stock concentration ที่มีความเข้มข้น 20 mg/ml

2.1.6.2. นำ stock concentration มาเจือจางด้วย water for injection โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 39.10, 78.13, 156.25, 312.50, 625.00  $\mu\text{g/ml}$

## 2.2. การทดสอบความเหมาะสมของสภาวะทดสอบ

2.2.1. เติมสารละลาย BHA ความเข้มข้น 7,900 units/ml ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2.0  $\mu\text{l}$

2.2.2. เติมสารละลายมาตรฐาน quercetin ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

2.2.3. เติมสารละลาย acetate buffer 50  $\mu\text{l}$  สำหรับปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และ EtOH : PG (อัตราส่วน 2 : 3) 50  $\mu\text{l}$  สำหรับปฏิกิริยาควบคุมตัวทำละลาย (solvent control)

2.2.4. เติมสารละลาย HA ความเข้มข้น 15 mg/ml ปริมาตร 250  $\mu\text{l}$  หรือเติม acetate buffer แทนการเติม HA สำหรับ blank

2.2.5. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที

2.2.6. นำมาเติม PDMAB ปริมาตร 1000  $\mu\text{l}$

2.2.7. ปิเปตสารละลายมาใส่ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200  $\mu$ l แต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ซ้ำ

2.2.8. นำไปวัดค่าการดูดกลืน (absorbance) แสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทันทีหลังทำปฏิกิริยา แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งจากสมการ

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

2.2.9. นำค่าร้อยละการยับยั้งที่คำนวณได้ ไปสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส และทำการหาค่า  $R^2$  เพื่อเลือกสภาวะการทดสอบที่เหมาะสม

2.2.10. ทำการคำนวณ  $IC_{50}$  ของสารละลายมาตรฐาน quercetin จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ เพื่อนำไปใช้เป็น positive control

2.2.11. ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate)

2.3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดจากดอกเข็มสีต่าง ๆ

2.3.1. เตรียมสารละลาย quercetin ให้มีความเข้มข้น 50 mg/ml เป็น stock concentration และเจือจางให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 700  $\mu$ g/ml สำหรับใช้เป็นปฏิกิริยาควบคุมผลบวก (positive control)

2.3.2. เติมสารละลาย BHA ความเข้มข้น 7,900 units/ml ปริมาตร 50  $\mu$ l ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2.0  $\mu$ l

2.3.3. เติมสารละลาย quercetin ปริมาตร 50  $\mu$ l สำหรับ positive control

2.3.4. เติมสารละลายดอกเข็มความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 50  $\mu$ l สำหรับ test sample

2.3.5. เติมสารละลาย acetate buffer 50  $\mu$ l สำหรับปฏิกิริยาควบคุมผลลบ (negative control) และ EtOH : PG (อัตราส่วน 2 : 3) 50  $\mu$ l สำหรับปฏิกิริยาควบคุมตัวทำละลาย (solvent control)

2.3.6. เติมสารละลาย HA ความเข้มข้น 15 mg/ml ปริมาตร 250  $\mu$ l หรือเติม acetate buffer แทนการเติม HA สำหรับ blank

2.2.5. นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที

2.2.6. นำมาเติม PDMAB ปริมาตร 1000  $\mu$ l

2.2.7. ปิเปตสารละลายมาใส่ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200  $\mu$ l ทันที โดยให้แต่ละความเข้มข้นจำนวน 3 ซ้ำ

2.2.8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ทันทีที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทันทีหลังทำปฏิกิริยา แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งจากสมการ

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

2.2.9. นำค่าร้อยละการยับยั้งที่คำนวณได้ ไปสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกเข็มสีต่าง ๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส และทำการหาค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดจากดอกเข็มจากสมการเส้นตรง

2.2.10. ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate)

ตาราง 1 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้ในการหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

กลุ่ม	ปริมาณสารใน microcentrifuge tube ( $\mu$ l)				
	HA	BHA	Sample	Acetate buffer	PDMAB
Negative control	250	50	-	50	1000
Blank negative control	-	50	-	300	1000
Test sample	250	50	50	-	1000
Blank test Sample	-	50	50	250	1000
Positive control	250	50	50	-	1000
Blank positive control	-	50	50	250	1000
Solvent control	50	250	50	-	1000
Blank solvent control	50	-	50	250	1000

เมื่อ sample คือ สารสกัดจากดอกเข็ม สำหรับ test sample, quercetin สำหรับ positive control และ ethanol AR สำหรับ solvent control

### 3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometric

#### 3.1. การเตรียมสารละลายทดสอบ

##### 3.1.1. เตรียมสารละลาย 0.05 M Tricine buffer pH 7.5

3.1.1.1. ชั่ง Tricine 0.8959 g, NaCl 2.3376 g และ  $\text{CaCl}_2$  2.3376 g

3.1.1.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย sterile water for irrigation ให้มีปริมาตรเป็น 100 ml

3.1.1.3. ปรับ pH ด้วย 1N NaOH จนได้ pH 7.5

3.1.2. เตรียมสารละลาย collagenase type I from *Clostridium histolyticum* ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 6.25 collagen digestion unit (CDU)

3.1.2.1. ชั่ง collagenase type I 0.005 g

3.1.2.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tricine buffer จนครบ 2 ml

3.1.3. เตรียมสารละลาย N-[3-(2-furyl)acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.8 mM

3.1.3.1. ชั่ง FALGPA มา 0.0381 g

3.1.3.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tricine buffer จนครบ 1 ml

3.1.4. เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.78125, 1.5625, 3.125, 6.25 และ 12.5 mg/mL

3.1.4.1. ชั่ง quercetin มา 0.500 g

3.1.4.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tricine buffer จนครบ 10 ml แล้วนำไป sonicate จนได้สารละลายสีเหลืองใส จะได้ stock solution ที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml

3.1.4.3. นำ stock solution มาเจือจางด้วย Tricine buffer ให้มีความเข้มข้น 250, 200, 150, 100 และ 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ตามลำดับ

3.1.5. เตรียมสารละลายของสารสกัดจากดอกเข็ม เพื่อนำไปสร้างกราฟเส้นตรง โดยทดสอบให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.1, 0.25, 0.35, 0.45 และ 0.5 mg/ml

3.1.5.1. ชั่งสารสกัดดอกเข็มมา 0.15 g เติมน้ำ water for injection ปริมาตร 3 ml นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกส่วน supernatant ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 rpm 10 นาที จะได้ stock concentration ที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml



3.1.5.2. นำ stock concentration มาเจือจางด้วย water for injection โดยให้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.125, 0.3125, 0.4375, 0.5625 และ 0.625 mg/ml

### 3.2. การทดสอบความเหมาะสมของสภาวะทดสอบ

3.2.1. เติมน้ำละลายมาตรฐาน quercetin ปริมาตร 120  $\mu$ l ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ลงใน 96-well plate เป็น test sample

3.2.2. เติมน้ำละลาย Tricine buffer 120  $\mu$ l สำหรับ negative control

3.2.3. เติมน้ำละลาย collagenase 15  $\mu$ l หรือเติม Tricine buffer 15  $\mu$ l แทนการเติมเอนไซม์สำหรับ blank

3.2.4. นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

3.2.5. เติมน้ำละลาย FALGPA 15  $\mu$ l

3.2.6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ทันทีหลังทำปฏิกิริยา และ 20 นาทีหลังทำปฏิกิริยา แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งจากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\Delta \text{Absorbance}_{\text{control}} - \Delta \text{Absorbance}_{\text{sample}}}{\Delta \text{Absorbance}_{\text{control}}} \times 100$$

3.2.7. นำค่าร้อยละการยับยั้งที่คำนวณได้ ไปสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส และทำการหาค่า  $R^2$  เพื่อเลือกสภาวะการทดสอบที่เหมาะสม

3.2.8. ทำการคำนวณ  $IC_{50}$  ของสารละลายมาตรฐาน quercetin จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ เพื่อนำไปใช้เป็น positive control

3.2.9. ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate)

### 3.3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดจากดอกเข็มสีต่าง ๆ

3.3.1. เตรียมสารละลาย quercetin ให้ความเข้มข้น 50 mg/ml เป็น stock concentration และเจือจางให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 1,560  $\mu$ g/ml สำหรับใช้เป็นปฏิกิริยาควบคุมผลบวก (positive control)

3.3.2. เติมสารละลายดอกเข็มความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 120  $\mu\text{l}$  ลงใน 96-well plate สำหรับ test sample

3.3.3. เติมสารละลาย quercetin ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  สำหรับ positive control

3.3.4. เติมสารละลายดอกเข็มความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  สำหรับ test sample

3.3.5. เติมสารละลาย collagenase ปริมาตร 15  $\mu\text{l}$  หรือเติม Tricine buffer แทนการเติม เอนไซม์ สำหรับ blank

3.2.6. นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

3.2.7. เติมสารละลาย FALGPA 15  $\mu\text{l}$

3.2.8. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ทันทีหลังทำปฏิกิริยา

3.2.9. นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งจากสมการ

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

3.2.10. นำค่าร้อยละการยับยั้งที่คำนวณได้ ไปสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกเข็มสีต่าง ๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้ง เอนไซม์คอลลาจีเนส และทำการหาค่า  $\text{IC}_{50}$  ของสารสกัดจากดอกเข็มจากสมการเส้นตรง

3.2.11. ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate)

ตาราง 2 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้ในการหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส

กลุ่ม	ปริมาณสารใน 96-well plate (µl)				
	Collagenase	Quercetin	Sample	Tricine buffer	FALGPA
Negative control	15	-	-	120	15
Blank negative control	-	-	-	135	15
Test sample	15	-	120	-	15
Blank test Sample	-	-	120	15	15
Positive control	15	120	-	-	15
Blank positive control	-	120	-	15	15

#### 4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometric

##### 4.1. การเตรียมสารละลายทดสอบ

##### 4.1.1. เตรียมสารละลาย 0.2 M Tris-HCl buffer pH 8.0

4.1.1.1. ชั่ง Tris-HCl 3.153 g

4.1.1.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย sterile water for irrigation จนครบ 100 ml

4.1.1.3. ปรับ pH ด้วย 1N NaOH จนได้ pH 8.0

4.1.2. เตรียมสารละลาย PPE type IV (4.5 unit/mg solid) ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.01 mg/ml

4.1.2.1. ชั่ง PPE type IV 0.02 mg

4.1.2.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer จนครบ 2 ml

4.1.3. เตรียมสารละลาย N-Succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide (SANA) ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.8 mM

4.1.3.1. ชั่ง SANA มา 0.01444 g

4.1.3.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer จนครบ 4 ml

4.1.4. เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 25, 50, 100, 200 และ 400 µg /mL

4.1.4.1. ชั่ง quercetin มา 0.01 g

4.1.4.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย Tris-HCl buffer จนครบ 10 ml แล้วนำไป sonicate จนได้สารละลายสีเหลืองใส จะได้ stock solution ที่มีความเข้มข้น 1000 µg/ml

4.1.4.3. นำ stock solution มาเจือจางด้วย Tricine buffer ให้มีความเข้มข้น 31.25, 62.50, 125, 250 และ 500 µg/ml ตามลำดับ

4.1.5. เตรียมสารละลายของสารสกัดจากดอกเข็ม เพื่อนำไปสร้างกราฟเส้นตรง โดยทดสอบให้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5, 0.75, 1.00, 1.25 และ 1.50 mg/ml

4.1.5.1. ชั่งสารสกัดดอกเข็มมา 0.03 g เติม water for injection ปริมาตร 10 ml นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วแยกส่วน supernatant ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 rpm 10 นาที จะได้ stock concentration ที่มีความเข้มข้น 3 mg/ml

4.1.5.2. นำ stock concentration มาเจือจางด้วย water for injection โดยให้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.625, 0.9375, 1.25, 1.5625 และ 1.875 mg/ml

#### 4.2. การทดสอบความเหมาะสมของสภาวะทดสอบ

4.2.1. เติมสารละลายมาตรฐาน quercetin ปริมาตร 160 µl ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ลงใน 96-well plate เป็น test sample

4.2.2. เติมสารละลาย Tris-HCl buffer 160 µl สำหรับ negative control

4.2.3. เติมสารละลาย PPE 20 µl หรือเติม Tris-HCl buffer 20 µl แทนการเติม เอนไซม์สำหรับ blank

4.2.4. นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

4.2.5. เติมสารละลาย SANA 20 µl

4.2.6. นำไป incubate ต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

4.2.7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ทันทีหลังทำปฏิกิริยา แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งจากสมการ

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

4.2.9. นำค่าร้อยละการยับยั้งที่คำนวณได้ ไปสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส และทำการหาค่า  $R^2$  เพื่อเลือกสภาวะการทดสอบที่เหมาะสม

4.2.10. ทำการคำนวณ  $IC_{50}$  ของสารละลายมาตรฐาน quercetin จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ เพื่อนำไปใช้เป็น positive control

4.2.11. ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ ( $n=3$ , triplicate)

4.3. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดจากดอกเข็มสีต่าง ๆ

4.3.1. เตรียมสารละลาย quercetin ให้มีความเข้มข้น 1,000  $\mu\text{g/ml}$  เป็น stock concentration และเจือจางให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 400  $\mu\text{g/ml}$  สำหรับใช้เป็นปฏิกิริยาควบคุมผลบวก (positive control)

4.3.2. เติมสารละลายดอกเข็มความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 160  $\mu\text{l}$  ลงใน 96-well plate สำหรับ test sample

4.3.3. เติมสารละลาย quercetin ปริมาตร 160  $\mu\text{l}$  สำหรับ positive control

4.3.4. เติมสารละลาย Tris-HCl buffer 160  $\mu\text{l}$  สำหรับ negative control

4.3.5. เติมสารละลาย PPE ปริมาตร 20  $\mu\text{l}$  หรือเติม Tris-HCl buffer แทนการเติมเอนไซม์สำหรับ blank

4.3.6. นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

4.3.7. เติมสารละลาย SANA 20  $\mu\text{l}$

4.3.8. นำไป incubate ต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

4.3.9. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ทันทีหลังทำปฏิกิริยา

4.3.10. นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาร้อยละการยับยั้งจากสมการ

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

4.3.11. นำค่าร้อยละการยับยั้งที่คำนวณได้ ไปสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกเข็มสีต่าง ๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส และทำการหาค่า  $IC_{50}$  ของสารสกัดจากดอกเข็มจากสมการเส้นตรง

#### 4.3.12. ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate)

ตาราง 3 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้ในการหาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส

กลุ่ม	ปริมาณสารใน 96-well plate (μl)				
	PPE	Quercetin	Sample	Tris-HCl buffer	SANA
Negative control	20	-	-	160	20
Blank negative control	-	-	-	180	20
Test sample	20	-	160	-	20
Blank test Sample	-	-	160	20	20
Positive control	20	160	-	-	20
Blank positive control	-	160	-	20	20

### 5. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu method

#### 5.1. การเตรียมสารละลายทดสอบ

5.1.1. เตรียมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้น 10% v/v

5.1.1.1. บีบอัดสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 1000 μl เจือจางด้วย water for irrigation จนครบ 10 ml

5.1.2. เตรียมสารละลาย sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 75 mg/ml

5.1.2.1. ชั่ง  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.375 g

5.1.2.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย water for irrigation จนครบ 5 ml

5.1.3. เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25 และ 0.5 mg/ml

5.1.3.1. ชั่ง gallic acid 0.01 g

5.1.3.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol AR จนครบ 1 ml จะได้เป็น stock solution ความเข้มข้น 10 mg/ml

5.1.3.3. นำ stock solution มาเจือจางด้วย sterile water for irrigation ให้มีความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 และ 5 mg/ml

5.1.4. เตรียมสารละลายของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ความเข้มข้น 10 mg/ml  
(ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 1 mg/ml)

5.1.4.1. ชั่งสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 0.01 g

5.1.4.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย 95% ethanol จนครบ 1 ml

5.2. การทดสอบหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก จะทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง แต่  
ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate)

5.2.1. ปิเปต Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 100  $\mu$ l ลงใน microcentrifuge tube  
ขนาด 2 ml สำหรับ control

5.2.2. ปิเปต สารละลายดอกเข็มสีต่าง ๆ หรือสารละลายมาตรฐาน gallic acid  
ปริมาตร 100  $\mu$ l สำหรับ sample

5.2.3. ปิเปต  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ปริมาตร 100  $\mu$ l สำหรับ control และ sample

5.2.4. ปิเปต water for irrigation ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000  $\mu$ l

5.2.5. ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 นาที

5.2.6. ปิเปตสารละลายในแต่ละหลอด ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200  $\mu$ l จำนวน  
3 หลุม

5.2.7. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 765 นา  
โนเมตร

5.2.8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการ  
ดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid เป็นกราฟมาตรฐาน

5.2.9. คำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกที่วัดค่าได้จากค่าการดูดกลืนแสง  
ของสารสกัดดอกเข็ม โดยคำนวณมาเป็นมิลลิกรัมของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อปริมาณ  
ในหน่วยกรัมของสารสกัดดอกเข็ม (mg/g)

ตาราง 4 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้หาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก

กลุ่ม	ปริมาณสารใน microcentrifuge (µl)			
	Folin-ciocalteu reagent	Sample	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Water for irrigation
Sample	100	100	100	700
Blank sample	-	100	-	900
Control	100	-	100	800

เมื่อ sample คือ สารละลายมาตรฐาน gallic acid สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน หรือ สารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ สำหรับการทดสอบหาปริมาณสารตัวอย่าง

## 6. การหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation

### 6.1. การเตรียมสารละลายทดสอบ

6.1.1. เตรียมสารละลาย aluminium chloride (AlCl<sub>3</sub>) ความเข้มข้น 8 mg/ml

6.1.1.1. ชั่ง AlCl<sub>3</sub> 0.24 g

6.1.1.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol AR 30 ml

6.1.2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5, 5.0, 7.5, 10 และ 12.5 µg/ml

6.1.2.1. ชั่ง quercetin 0.001 g

6.1.2.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% ethanol จนครบ 2 ml จะได้ stock solution ความเข้มข้น 500 µg/ml

6.1.2.3. นำ stock solution มาเจือจางด้วย 50% ethanol ให้มีความเข้มข้น 25, 50, 75, 100 และ 125 µg/ml

6.1.3. เตรียมสารละลายของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ความเข้มข้น 10 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 1 mg/ml)

6.1.3.1. ชั่งสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 0.01 g

6.1.3.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย water for irrigation จนครบ 1 ml



6.2. การทดสอบหาปริมาณรวมฟลาโวนอยด์ จะทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้ง ทดสอบ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate)

6.2.1. ปิเปต  $\text{AlCl}_3$  ปริมาตร 1000  $\mu\text{l}$  ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 ml สำหรับ control

6.2.2. ปิเปต สารละลายดอกเข็มสีต่าง ๆ หรือสารละลายมาตรฐาน quercetin ปริมาตร 1000  $\mu\text{l}$  สำหรับ sample

6.2.3. ปิเปต ethanol AR ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ml

6.2.4. ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 40 นาที

6.2.5. ปิเปตสารละลายในแต่ละหลอด ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200  $\mu\text{l}$  จำนวน 3 หลุม

6.2.6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร

6.2.7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin เป็นกราฟมาตรฐาน

6.2.8. คำนวณหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ที่วัดค่าได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดดอกเข็ม โดยคำนวณมาเป็นมิลลิกรัมของ quercetin equivalent (QE) ต่อปริมาณในหน่วยกรัมของสารสกัดดอกเข็ม (mg/g)

ตาราง 5 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้หาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์

กลุ่ม	ปริมาณสารใน microcentrifuge ( $\mu\text{l}$ )		
	Sample	$\text{AlCl}_3$	Ethanol AR
Sample	1000	1000	8000
Blank sample	1000	-	9000
Control	-	1000	9000

เมื่อ sample คือ สารละลายมาตรฐาน quercetin สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน หรือ สารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ สำหรับการทดสอบหาปริมาณสารตัวอย่าง

## 7. การหาปริมาณรวมของแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential method

### 7.1. การเตรียมสารละลายทดสอบ

7.1.1. เตรียมสารละลาย 0.2M potassium chloride (KCl) buffer pH 1.0

7.1.1.1. ชั่ง KCl 0.7455 g

7.1.1.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย sterile water for irrigation จนครบ 50 ml

7.1.1.3. ปรับ pH ให้ได้ 1.0 ด้วย 0.2M HCl

7.1.2. เตรียมสารละลาย 0.4 M sodium acetate ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) pH 4.5

7.1.2.1. ชั่ง  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0.1495 g

7.1.2.2. บีบเปิด glacial acetic acid ปริมาตร 80  $\mu\text{l}$  ลงผสม

7.1.2.3. ละลายและปรับปริมาตรด้วย sterile water for irrigation จนครบ 50 ml

7.1.3. เตรียมสารละลาย cyanidin ความเข้มข้น 2  $\mu\text{g/ml}$  (stock solution)

7.1.3.1. ชั่ง cyanidin 0.00004 g

7.1.3.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol AR จนครบ 2 ml

### 7.2. การสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของ cyanidin

7.2.1. เจือจาง cyanidin stock solution ด้วยสารละลาย KCl (pH 1.0) และ  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (pH 4.5) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0  $\mu\text{g/ml}$

7.2.2. ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

7.2.3. บีบเปิดสารละลายในแต่ละหลอด ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200  $\mu\text{l}$  จำนวน

3 หลุม

7.2.4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร

7.2.5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน cyanidin เป็นกราฟมาตรฐาน จากสมการ

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

7.3. การหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ความเข้มข้นสุดท้าย 10 mg/ml

7.3.1. ชั่งสารสกัดดอกเข็ม 0.01 g ลง microcentrifuge tube จำนวน 2 หลอด

7.3.2. ละลายสารสกัดดอกเข็มด้วย 35% ethanol ใน KCl (pH 1.0) จำนวน 1000  $\mu$ l 1 หลอด และอีก 1 หลอดละลายด้วย 35% ethanol ใน  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (pH 4.5) จำนวน 1000  $\mu$ l

7.3.3. ปิเปตสารละลายในแต่ละหลอด ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200  $\mu$ l จำนวน 3 หลุม

7.3.4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงของ แอนโทไซยานิน จากสมการ

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

7.3.5. ทำการทดลองของแต่ละตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

7.3.6. คำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดดอกเข็ม โดยนำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินของสารสกัดดอกเข็มแทนค่าในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณเป็นมิลลิกรัมของ cyanidin equivalence (CE) ต่อกรัมของสารสกัด (mg/g)

## 8. การหาปริมาณรวมของแคโรทีนอยด์ด้วยวิธี spectrophotometry

8.1. การเตรียมสารละลายทดสอบ

8.1.1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -carotene ความเข้มข้น 0.02 mg/ml

8.1.1.1. ชั่ง beta-carotene 0.01 g

8.1.1.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย ethanol AR 100 ml

8.1.1.3. นำ stock solution มา 10 ml และปรับปริมาตรด้วย ethanol AR จนมีปริมาตรเป็น 50 ml จะได้ความเข้มข้น 0.02 mg/ml

8.1.2. เตรียมสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -carotene ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2.5, 5.0, 7.5, 10 และ 12.5  $\mu$ g/ml

8.1.2.1. นำสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -carotene 0.02 mg/ml มา 1, 3, 5, 7 และ 9 ml เจือจางด้วย ethanol AR ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 ml

8.1.2.2. จะได้สารละลาย  $\beta$ -carotene ที่มีความเข้มข้นเป็น 0.8, 2.4, 4.0, 5.6 และ 7.2  $\mu$ g/ml

8.1.3. เตรียมสารละลายของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ ความเข้มข้น 10 mg/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น 1 mg/ml)

8.1.3.1. ชั่งสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ 0.01 g

8.1.3.2. ละลายและปรับปริมาตรด้วย water for irrigation จนครบ 1 ml

8.1.4. เตรียมสารละลาย ethyl acetate (EA) : dichloromethane (DCM) : hexane (Hex) (20:4:1, v/v/v)

8.1.4.1. ปิเปต ethyl acetate มา 20 ml ใส่ลงใน flask

8.1.4.2. ปิเปต dichloromethane มา 4 ml ใส่ลงใน flask

8.1.4.3. ปิเปต hexane มา 1 ml ใส่ลงใน flask และผสมให้เข้ากัน จะได้

สารละลายผสม EA:DCM:Hex

8.2. การทดสอบหาปริมาณรวมเบต้าแคโรทีน ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ (n=3, triplicate)

8.2.1. ปิเปตสารละลาย EA:DCM:Hex ปริมาตร 1000  $\mu$ l ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 ml สำหรับ control

8.2.2. ปิเปตสารละลายดอกเข็มสีต่างๆ หรือสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -carotene ปริมาตร 1000  $\mu$ l สำหรับ sample

8.2.3. ปิเปต ethanol AR ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ml

8.2.4. ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

8.2.5. ปิเปตสารละลายในแต่ละหลอด ลงใน 96-well plate ปริมาตร 200  $\mu$ l จำนวน 3 หลุม

8.2.6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 454 นาโนเมตร

8.2.7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -carotene เป็นกราฟมาตรฐาน

8.2.8. คำนวณหาปริมาณรวมของแคโรทีนอยด์ ที่วัดค่าได้จากค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดดอกเข็ม โดยคำนวณมาเป็นมิลลิกรัมของ  $\beta$ -carotene equivalent (BCE) ต่อปริมาณในหน่วยกรัมของสารสกัดดอกเข็ม (mg/g)

ตาราง 6 ปริมาณสารทดสอบที่ใช้หาปริมาณรวมของแคโรทีนอยด์

กลุ่ม	ปริมาณสารใน microcentrifuge ( $\mu$ l)		
	Sample	EA:CDM:Hex	Ethanol AR
Sample	100	100	800
Blank sample	100	-	900
Control	-	100	900

เมื่อ sample คือ สารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -carotene สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน หรือ สารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ สำหรับการทดสอบหาปริมาณสารตัวอย่าง

EA:DCM:Hex คือสารละลาย ethyl acetate : dichloromethane : hexane อัตราส่วน 20:4:1, v/v/v

### สถิติที่ใช้ในการวิจัย

1. รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดดอกเข็มที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทดสอบได้ 50% ( $IC_{50}$ ) และความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error; SE) และพิจารณาว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยใช้ one-way ANOVA และ post analysis ด้วย Fisher's LSD เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารดอกเข็ม

2. ใช้ Pearson's correlation เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดดอกเข็มกับปริมาณสารสำคัญที่ตรวจพบในดอกเข็ม

### การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา โดยรายงานฤทธิ์ลดเลือนริ้วรอยของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ เป็นค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส ได้ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) และความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean; SE) ( $IC_{50} \pm SE$ ) และเปรียบเทียบฤทธิ์ลดเลือนริ้วรอยของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ กับสารมาตรฐานที่ใช้เป็นปฏิกิริยา

ควบคุมผลบวก โดยนำค่า  $IC_{50} \pm SE$  มาวิเคราะห์ด้วยวิธี Fisher's LSD ด้วยโปรแกรม PSP version 1.6.2 กำหนดค่า  $p < 0.05$  จึงจะยอมรับว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ และรายงานปริมาณพฤษเคมีซึ่งมีปริมาณรวมของ สารประกอบฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ เป็นร้อยละโดยมวล (%w/w) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid, quercetin, cyanidin และ beta-carotene ตามลำดับ ซึ่งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของฤทธิ์กับปริมาณสารสำคัญที่ตรวจพบด้วย Pearson's correlation



## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอน ดังนี้

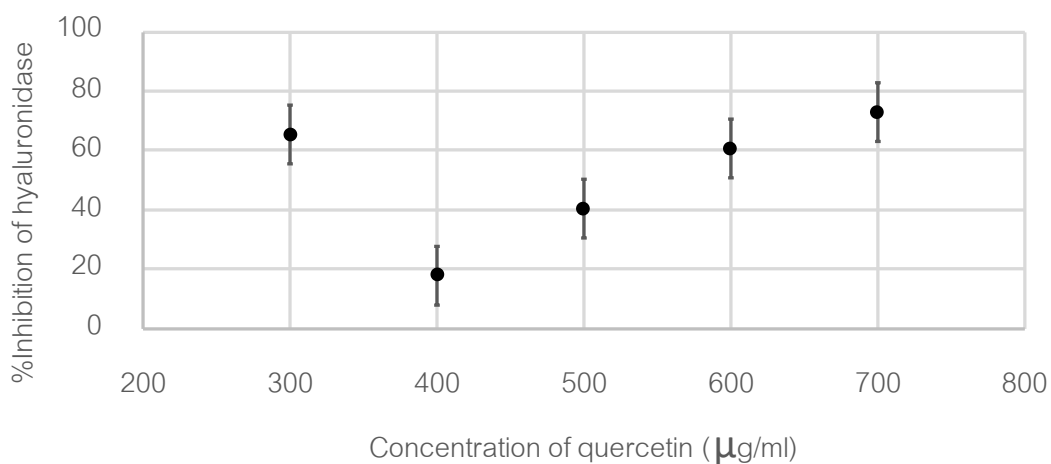
1. การสกัดสารจากดอกเข็มสีต่าง ๆ และการหาปริมาณสารสกัดที่ได้

เมื่อนำผงของดอกเข็มสีต่าง ๆ มาทำการสกัดด้วย 80% เอทานอล และนำไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ให้ได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะเหนียวข้น และทำการเทียบกับปริมาณของดอกเข็มก่อนการสกัด คัดออกมาเป็นร้อยละสารสกัดที่ได้ (% yield) พบว่าสารสกัดดอกเข็มสีส้มให้ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนัก (%w/w) ของสารสกัดดอกเข็มมากที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 48.41 และรองลงมาเป็นดอกเข็มสีเหลือง สีแดง และสีชมพูโดยมีร้อยละ 47.39, 40.29 และ 35.8 ตามลำดับ

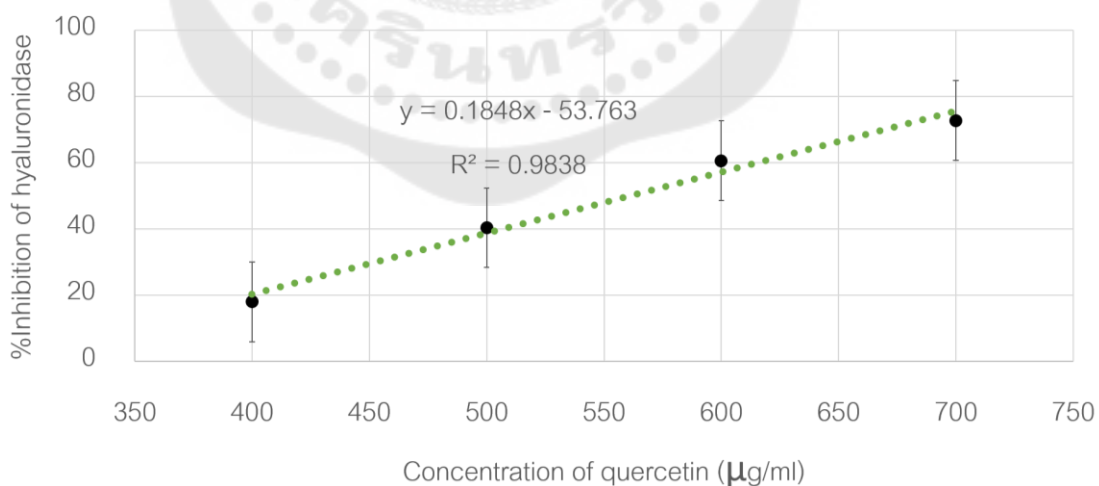
2. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric

ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น โดยทดสอบความเหมาะสมของสภาวะทดสอบด้วยสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 300, 400, 500, 600 และ 700 µg/ml ทำปฏิกิริยากับ bovine hyaluronidase 7,900 unit/ml และ hyaluronic acid ความเข้มข้น 15 mg/ml เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเติม *p*-dimethyl-aminobenzaldehyde (PDMAB) ความเข้มข้น 10 mg/ml แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm และทำการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin กับค่าเฉลี่ยร้อยละในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส พบว่าที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐาน quercetin มีร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นที่ 300 µg/ml พบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่แตกต่างไปจากความเข้มข้นอื่น ดังแสดงในภาพประกอบ 14 และได้ทำการสร้างกราฟเส้นตรงที่เหลือเพียง 4 ความเข้มข้น เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ดังแสดงในภาพประกอบ 15 จากการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสพบว่าวิธีการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งพิจารณาได้จากสมการเส้นตรง  $y = 0.1848x - 53.763$  และค่า  $R^2 = 0.9838$  ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 1 และได้ทำการหา ร้อยละในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ 50 ( $IC_{50}$ ) จากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็น

อิสระต่อกันทำให้ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารละลายมาตรฐานมีค่า  $IC_{50} \pm SE$  เท่ากับ  $561.49 \pm 51.87 \mu\text{g/ml}$  จึงใช้ quercetin ที่ความเข้มข้น  $700 \mu\text{g/ml}$  เป็นปฏิกิริยาควบคุมผลบวกในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ



ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 300-700  $\mu\text{g/ml}$  กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส



ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 400-700  $\mu\text{g/ml}$  กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส



การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ได้แก่ สีแดงที่ความเข้มข้น 39.10, 78.125, 156.25, 312.5 และ 625  $\mu\text{g/ml}$  สีเหลืองที่ความเข้มข้น 500, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500  $\mu\text{g/ml}$  สีส้มที่ความเข้มข้น 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 และ 5,000  $\mu\text{g/ml}$  และสีชมพูที่ความเข้มข้น 1,000, 2,500, 5,000, 7,500 และ 10,000  $\mu\text{g/ml}$  และใช้สารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา 700  $\mu\text{g/ml}$  เป็นสารควบคุมเชิงบวก จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสทำให้ได้กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส โดยร้อยละการยับยั้งของสารสกัดดอกเข็มสีแดงเท่ากับ 11.90, 19.19, 36.61, 69.08 และ 115.58 ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ร้อยละการยับยั้งของสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองเท่ากับ 27.95, 79.24, 109.29, 140.71 และ 147.70 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ซึ่งจะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 1,250 และ 1,500  $\mu\text{g/ml}$  มีค่าร้อยละการยับยั้งของสารที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเริ่มคงที่ จึงจะใช้เพียงแค่ความเข้มข้น 500 – 1,250  $\mu\text{g/ml}$  ในการสร้างกราฟมาตรฐาน สารสกัดดอกเข็มสีส้มแสดงร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 22.78, 69.06, 94.54, 129.68 และ 129.97 ตามลำดับซึ่งจะเห็นได้จากตารางที่ 10 ว่าที่ความเข้มข้น 4,000 และ 5,000  $\mu\text{g/ml}$  มีค่าร้อยละการยับยั้งของสารที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเริ่มคงที่ จึงจะใช้เพียงแค่ความเข้มข้น 1,000 – 4,000  $\mu\text{g/ml}$  ในการสร้างกราฟมาตรฐาน สารสกัดดอกเข็มสีชมพูแสดงร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 37.68, 69.49, 79.00, 108.82 และ 128.18 ดังตารางที่ 11 ซึ่งพบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ มีค่าขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด (dose-dependent) โดยมีสมการเส้นตรงของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 7

ตาราง 7 แสดงสมการเส้นตรงของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

สารสกัดดอกเข็ม	สมการเส้นตรง	ค่า R <sup>2</sup>
สีแดง	$y = 0.1779x + 7.3858$	0.9919
สีเหลือง	$y = 0.1473x - 39.615$	0.9820
สีส้ม	$y = 0.0346x - 7.5303$	0.9873
สีชมพู	$y = 9.4528x + 35.48$	0.9629

จากตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่าทุกสมการมีค่า  $R^2$  เข้าใกล้ 1 จึงสามารถนำมาคำนวณหาร้อยละในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ 50 ( $IC_{50} \pm SE$ ) ของสารสกัดดอกเข็มสีแดง เท่ากับ  $239.54 \pm 76.57$   $\mu\text{g/ml}$  สารสกัดดอกเข็มสีเหลืองเท่ากับ  $608.38 \pm 90.42$   $\mu\text{g/ml}$  สารสกัดดอกเข็มสีส้มเท่ากับ  $1,662.73 \pm 0.13$   $\mu\text{g/ml}$  สารสกัดดอกเข็มสีชมพูเท่ากับ  $1,528.42 \pm 0.61$   $\mu\text{g/ml}$  และเมื่อเปรียบเทียบกับ  $IC_{50}$  ของสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่มีค่าเท่ากับ  $561.49 \pm 51.87$   $\mu\text{g/ml}$  ตารางที่ 12 พบว่า  $IC_{50}$  ของสารละลายมาตรฐาน quercetin มีค่าน้อยกว่าสารสกัดดอกเข็มสีเหลือง สีส้ม และสีชมพู อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า  $p < 0.05$  แสดงให้เห็นว่าสารมาตรฐาน quercetin มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสดีกว่าสกัดดอกเข็มสีเหลือง สีส้ม และสีชมพู แต่มีค่าน้อยกว่าสารสกัดดอกเข็มสีแดง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า  $p < 0.05$  แสดงให้เห็นว่าสารสกัดดอกเข็มสีแดง มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสดีกว่าสารมาตรฐาน quercetin

ตาราง 8 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีแดงที่ความเข้มข้น 39.10 - 625  $\mu\text{g/ml}$

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	%Inhibition
39.10	11.90 $\pm$
78.125	19.19 $\pm$
156.25	36.61 $\pm$
312.5	69.08 $\pm$
625	115.58 $\pm$

ตาราง 9 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองที่ความเข้มข้น 500 – 1,500  $\mu\text{g/ml}$

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	%Inhibition
500	27.95 $\pm$
750	79.24 $\pm$
1000	109.29 $\pm$
1,250	140.71 $\pm$
1,500	147.70 $\pm$

ตาราง 10 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีส้มที่ความเข้มข้น 1,000 – 5,000  $\mu\text{g/ml}$

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	%Inhibition
1,000	22.78 $\pm$
2,000	69.06 $\pm$
3,000	94.54 $\pm$
4,000	129.68 $\pm$
5,000	129.97 $\pm$

ตาราง 11 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีชมพูที่ความเข้มข้น 1,000 – 10,000  $\mu\text{g/ml}$

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	%Inhibition
1,000	37.68 $\pm$
2,500	69.49 $\pm$
5,000	79.00 $\pm$
7,500	108.82 $\pm$
10,000	128.18 $\pm$

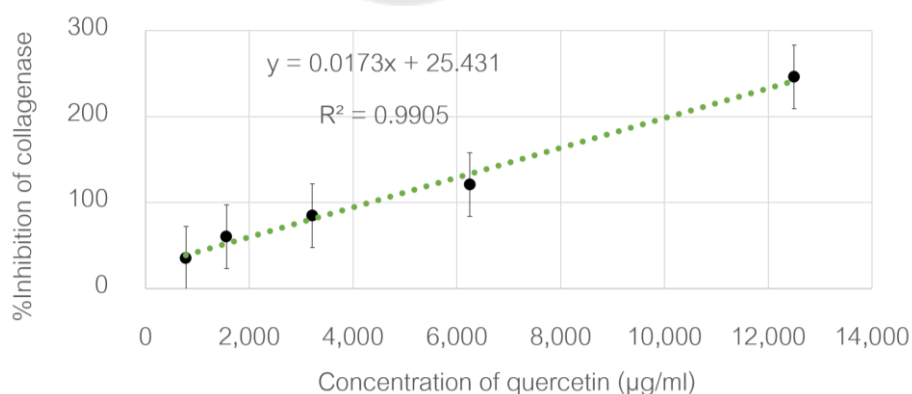
ตาราง 12 แสดง  $IC_{50} \pm SE$  ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ quercetin

สารทดสอบ	$IC_{50} \pm SE$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
สารสกัดดอกเข็มสีแดง	$239.54 \pm 76.57$ *
สารสกัดดอกเข็มสีเหลือง	$608.38 \pm 90.42$ *
สารสกัดดอกเข็มสีส้ม	$1,662.73 \pm 0.13$ *
สารสกัดดอกเข็มสีชมพู	$1,528.42 \pm 0.61$ *
Quercetin	$561.49 \pm 51.87$

หมายเหตุ: \* =  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ quercetin

### 3. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometric

ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometric ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น โดยทดสอบความเหมาะสมของสภาวะทดสอบด้วยสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 780, 1,560, 3,130, 6,250 และ 12,500  $\mu\text{g/ml}$  ทำปฏิกิริยากับ collagenase type I from *Clostridium histolyticum* 6.25 CDU ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้ว N-[3-(2-furyl)acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) ความเข้มข้น 0.8 mM และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 340 nm พบว่า ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐาน quercetin มีร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และสามารถสร้างเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส ดังแสดงในภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น

780-12,500  $\mu\text{g/ml}$  กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส

จากการทดลอง 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกันทำให้ได้ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารละลายมาตรฐาน quercetin และพบว่าร้อยละในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ 50 ของสารละลายมาตรฐาน quercetin มีค่า  $IC_{50} \pm SE$  เท่ากับ  $1,420.17 \pm 168.55 \mu\text{g/ml}$  ดังนั้นในปฏิกิริยาควบคุมผลบวก จึงใช้สารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเป็น  $1,560 \mu\text{g/ml}$  จากการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสพบว่าวิธีการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำ พิจารณาได้จากสมการเส้นตรง  $y = 17.276x + 25.903$  และค่า  $R^2 = 0.9900$  ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 1

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ได้แก่ สีแดงที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 1,000 และ 2,000  $\mu\text{g/ml}$  สีเหลืองที่ความเข้มข้น 500, 750, 1,000, 1,250 และ 2,000  $\mu\text{g/ml}$  สีส้มที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 150 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  และสีชมพูที่ความเข้มข้น 100, 250, 350, 450 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  และใช้สารละลาย quercetin ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา  $1,560 \mu\text{g/ml}$  เป็นปฏิกิริยาควบคุมผลบวก จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสทำให้ได้กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส โดยร้อยละการยับยั้งของสารสกัดดอกเข็มสีแดงเท่ากับ 43.24, 55.02, 76.38, 105.85 และ 111.77 ตามลำดับซึ่งจะเห็นได้จากตารางที่ 14 ว่าที่ความเข้มข้น 1,000 และ 2,000  $\mu\text{g/ml}$  มีค่าร้อยละการยับยั้งของสารที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสเริ่มคงที่ จึงจะใช้เพียงแค่ 4 ความเข้มข้นหลัง ร้อยละการยับยั้งของสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองเท่ากับ 41.99, 73.84, 84.77, 105.90 และ 132.91 ตามลำดับซึ่งจะเห็นได้จากตารางที่ 15 สารสกัดดอกเข็มสีส้มแสดงร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 42.48, 68.33, 97.82, 124.44 และ 169.94 ตามลำดับซึ่งจะเห็นได้จากตารางที่ 16 ว่าที่ความเข้มข้น 150 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  มีค่าร้อยละการยับยั้งของสารที่มีแนวโน้มไปทางเส้นโค้ง แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสเริ่มคงที่ จึงจะใช้เพียงแค่ความเข้มข้น 25 – 150  $\mu\text{g/ml}$  ในการสร้างกราฟมาตรฐาน สารสกัดดอกเข็มสีชมพูแสดงร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 1.28, 38.26, 61.58 และ 76.46 ตามลำดับ (ตารางที่ 17) เนื่องจากความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/ml}$  ไม่มีค่าร้อยละการยับยั้งของสาร หรือไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส จึงใช้เพียงแค่ความเข้มข้น 250-500  $\mu\text{g/ml}$  ในการสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งพบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ มีค่าขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด (dose-dependent)

ตาราง 13 แสดงสมการเส้นตรงของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส

สารสกัดดอกเข็ม	สมการเส้นตรง	ค่า R <sup>2</sup>
สีแดง	$y = 0.0706x + 37.023$	0.9883
สีเหลือง	$y = 0.0856x + 2.3256$	0.9808
สีส้ม	$y = 0.6362x + 31.58$	0.9834
สีชมพู	$y = 0.2939x - 69.504$	0.9896

จากตารางที่ 13 จะเห็นได้ว่าทุกสมการมีค่า R<sup>2</sup> เข้าใกล้ 1 จึงสามารถนำมาคำนวณหา IC<sub>50</sub> ± SE ของสารสกัดดอกเข็มสีแดงเท่ากับ 183.81 ± 53.71 µg/ml สารสกัดดอกเข็มสีเหลืองเท่ากับ 556.94 ± 165.81 µg/ml สารสกัดดอกเข็มสีส้มเท่ากับ 28.95 ± 2.00 µg/ml สารสกัดดอกเข็มสีชมพูเท่ากับ 406.61 ± 3.12 µg/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับ IC<sub>50</sub> ของสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่มีค่าเท่ากับ 1,420.17 ± 168.55 µg/ml ดังตารางที่ 18 จะพบว่า IC<sub>50</sub> ของสารละลายมาตรฐาน quercetin มีค่ามากกว่าสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพู อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า  $p < 0.05$  แสดงให้เห็นว่าสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพู มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสดีกว่าสารมาตรฐาน quercetin

ตาราง 14 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีแดงที่ความเข้มข้น 125 – 2,000 µg/ml

Concentration (µg/ml)	%Inhibition
125	43.24 ± 3.78
250	55.02 ± 6.18
500	76.38 ± 0.93
1,000	105.85 ± 1.88
2,000	111.77 ± 2.90

ตาราง 15 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองที่ความเข้มข้น 500 – 1,500  $\mu\text{g/ml}$

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	%Inhibition
500	41.99 $\pm$ 24.88
750	73.84 $\pm$ 2.99
1,000	84.77 $\pm$ 9.20
1,250	105.90 $\pm$ 3.45
1,500	132.91 $\pm$ 19.77

ตาราง 16 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีส้มที่ความเข้มข้น 25 – 500  $\mu\text{g/ml}$

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	%Inhibition
25	42.48 $\pm$ 2.06
50	68.33 $\pm$ 1.19
100	97.82 $\pm$ 1.00
150	124.44 $\pm$ 1.75
500	169.94 $\pm$ 1.81

ตาราง 17 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีชมพูที่ความเข้มข้น 100 – 500  $\mu\text{g/ml}$

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	%Inhibition
100	0.00
250	1.28 $\pm$ 0.99
350	38.26 $\pm$ 2.78
450	61.58 $\pm$ 0.33
500	76.46 $\pm$ 0.76

ตาราง 18 แสดง  $\text{IC}_{50} \pm \text{SE}$  ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ quercetin

สารทดสอบ	$\text{IC}_{50} \pm \text{SE}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
สารสกัดดอกเข็มสีแดง	183.81 $\pm$ 53.71 *
สารสกัดดอกเข็มสีเหลือง	556.94 $\pm$ 165.81 *
สารสกัดดอกเข็มสีส้ม	28.95 $\pm$ 2.00 *
สารสกัดดอกเข็มสีชมพู	406.61 $\pm$ 3.12 *
Quercetin	1,420.17 $\pm$ 168.55

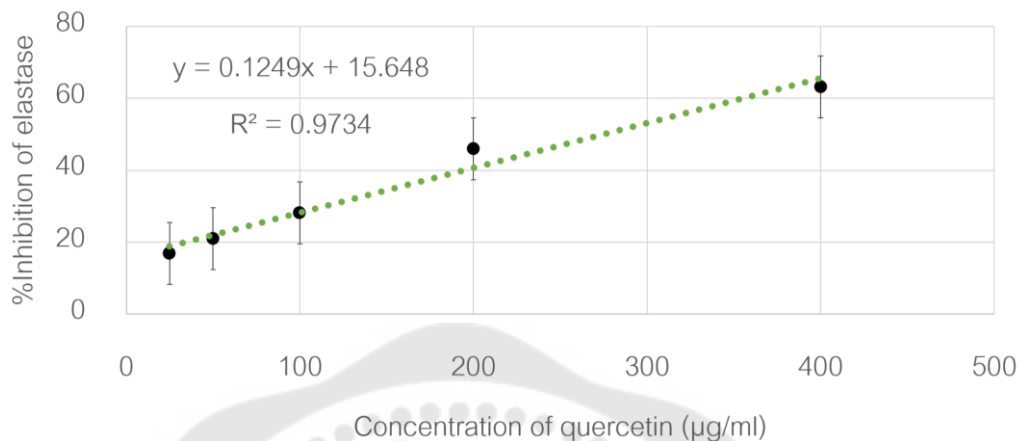
หมายเหตุ: \* =  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ quercetin

#### 4. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometric

ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วยวิธี spectrophotometric ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น โดยทดสอบความเหมาะสมของสภาวะทดสอบด้วยสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 200 และ 400  $\mu\text{g/ml}$  ทำปฏิกิริยากับ porcine pancreatic elastase (PPE) type IV ความเข้มข้น 0.01 mg/ml เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม N-succiny-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide (SANA) ความเข้มข้น 0.8 mM ให้ทำปฏิกิริยา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm พบว่า ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารละลายมาตรฐาน quercetin มีร้อยละของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และสามารถสร้างเป็นกราฟแสดง



ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส ดังแสดงในภาพประกอบ 17



ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 25-400 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอีลาสเตส

จากการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสพบว่าวิธีการทดสอบมีความถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งพิจารณาได้จากสมการเส้นตรง  $y = 0.1249x + 15.648$  และค่า  $R^2 = 0.9734$  ซึ่งมีค่าใกล้เคียง 1 จึงพิจารณาใช้สภาวะทดสอบข้างต้น และได้ทำการหาค่าร้อยละในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสที่ 50 พบว่าสารละลายมาตรฐาน quercetin มีค่า  $IC_{50} \pm SE$  เท่ากับ  $275.04 \pm 79.27$  µg/ml ดังนั้นในปฏิบัติการควบคุมผลบวก จึงใช้สารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิบัติการเป็น 400 µg/ml

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ได้แก่ สีแดงที่ความเข้มข้น 180, 330, 480, 630 และ 780 µg/ml สีเหลืองที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 µg/ml สีส้มที่ความเข้มข้น 500, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500 µg/ml และสีชมพูที่ความเข้มข้น 375, 750, 1,500, 2,500 และ 3,000 µg/ml และใช้สารละลาย quercetin ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิบัติการ 400 µg/ml เป็นปฏิบัติการควบคุมผลบวก จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสทำให้ได้กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส โดยร้อยละการยับยั้งของสารสกัดดอกเข็มสีแดงเท่ากับ 11.21, 11.61, 26.49, 38.61 และ 56.39 ตามลำดับซึ่งจะเห็นได้จากตารางที่ 20 ว่าที่ความเข้มข้น 180 และ 330 µg/ml มีค่าร้อยละการยับยั้งของสารที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสที่ 2 ความเข้มข้นนี้ไม่ต่างกัน จึงเลือกใช้

เพียงความเข้มข้น 330 – 780  $\mu\text{g/ml}$  ในการสร้างกราฟมาตรฐาน ร้อยละการยับยั้งของสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองเท่ากับ 24.06, 37.84, 54.17, 63.56 และ 68.02 ตามลำดับซึ่งจะเห็นได้จากตารางที่ 21 ว่าที่ความเข้มข้น 400 และ 500  $\mu\text{g/ml}$  มีค่าร้อยละการยับยั้งของสารที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสเริ่มคงที่ จึงจะใช้เพียงแค่ความเข้มข้น 100 - 400  $\mu\text{g/ml}$  ในการสร้างกราฟแสดงมาตรฐาน สารสกัดดอกเข็มสีส้มแสดงร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 6.97, 45.41, 56.57, 62.74 และ 70.22 ตามลำดับซึ่งจะเห็นได้จากตารางที่ 22 ว่าที่ความเข้มข้น 500  $\mu\text{g/ml}$  มีค่าร้อยละการยับยั้งของสารน้อยที่สุด จึงใช้เพียงแค่ความเข้มข้น 700 - 1500  $\mu\text{g/ml}$  ในการสร้างกราฟมาตรฐาน สารสกัดดอกเข็มสีชมพูแสดงร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 24.99, 35.57, 52.93, 65.03 และ 72.34 ตามลำดับซึ่งจะเห็นตามตารางที่ 23 ซึ่งพบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ มีค่าขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด (dose-dependent)

ตาราง 19 แสดงสมการเส้นตรงของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลัจีเนส

สารสกัดดอกเข็ม	สมการเส้นตรง	ค่า R <sup>2</sup>
สีแดง	$y = 0.0976x - 20.913$	0.9947
สีเหลือง	$y = 1348x + 11.205$	0.9899
สีส้ม	$y = 32.242x + 22.464$	0.9837
สีชมพู	$y = 17.477x + 21.772$	0.9747

จากตารางที่ 19 จะเห็นได้ว่าทุกสมการมีค่า R<sup>2</sup> เข้าใกล้ 1 จึงสามารถนำมาคำนวณหา IC<sub>50</sub> ± SE ของสารสกัดดอกเข็มสีแดงเท่ากับ 726.57 ± 76.74  $\mu\text{g/ml}$  สารสกัดดอกเข็มสีเหลืองเท่ากับ 287.80 ± 12.22  $\mu\text{g/ml}$  สารสกัดดอกเข็มสีส้มเท่ากับ 855.16 ± 130.84  $\mu\text{g/ml}$  สารสกัดดอกเข็มสีชมพูเท่ากับ 1,615.15 ± 106.67  $\mu\text{g/ml}$  และเมื่อเปรียบเทียบกับ IC<sub>50</sub> ของสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่มีค่าเท่ากับ 275.04 ± 79.27  $\mu\text{g/ml}$  ดังตารางที่ 24 จะพบว่า IC<sub>50</sub> ของสารละลายมาตรฐาน quercetin มีค่าน้อยกว่าสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีส้ม และสีชมพู อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า  $p < 0.05$  แสดงให้เห็นว่าสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีส้ม และสีชมพู มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสน้อยกว่าสารมาตรฐาน quercetin แต่สารสกัดดอกเข็มสีเหลืองมีค่า IC<sub>50</sub> ที่

ใกล้เคียงกับค่า  $IC_{50}$  ของสารละลายมาตรฐาน quercetin มากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $287.80 \pm 12.22 \mu\text{g/ml}$

ตาราง 20 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีแดงที่ความเข้มข้น 180 – 780  $\mu\text{g/ml}$

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	%Inhibition
180	$11.21 \pm 9.82$
330	$11.61 \pm 10.42$
480	$26.49 \pm 10.85$
630	$38.61 \pm 7.73$
780	$56.39 \pm 4.91$

ตาราง 21 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองที่ความเข้มข้น 100 – 500  $\mu\text{g/ml}$

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	%Inhibition
100	$24.06 \pm 23.52$
200	$37.84 \pm 19.17$
300	$54.17 \pm 12.76$
400	$63.56 \pm 9.81$
500	$68.02 \pm 10.72$

ตาราง 22 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีส้มที่ความเข้มข้น 500 – 1,500  $\mu\text{g/ml}$

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	%Inhibition
500	6.97 $\pm$ 0.30
750	45.41 $\pm$ 2.92
1,000	56.57 $\pm$ 6.96
1,250	62.74 $\pm$ 1.95
1,500	70.22 $\pm$ 3.78

ตาราง 23 ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มชมพูที่ความเข้มข้น 375 – 3,000  $\mu\text{g/ml}$

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	%Inhibition
375	24.99 $\pm$ 12.35
750	35.57 $\pm$ 12.16
1,500	52.93 $\pm$ 7.82
2,500	65.03 $\pm$ 5.63
3,000	72.34 $\pm$ 2.92

ตาราง 24 แสดง  $IC_{50} \pm SE$  ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ เปรียบเทียบกับ quercetin

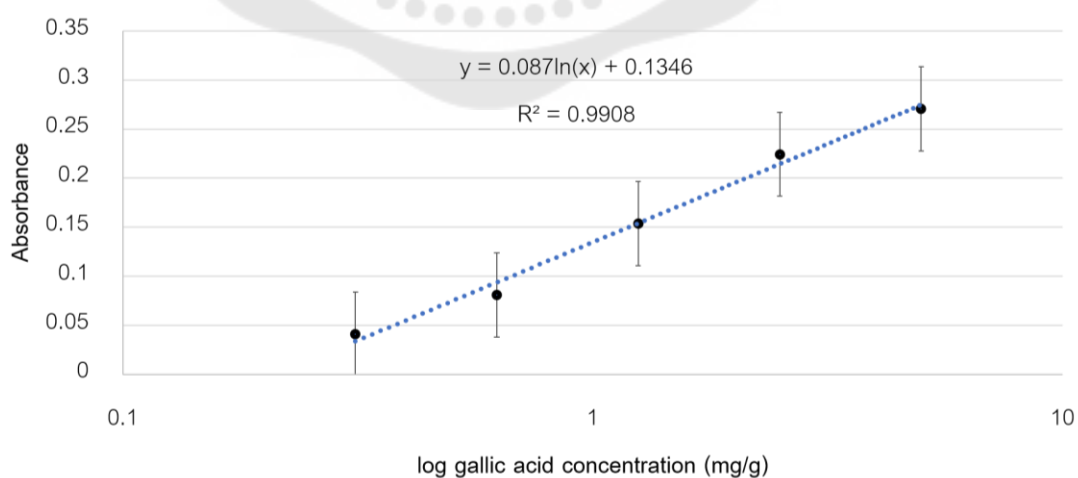
สารทดสอบ	$IC_{50} \pm SE$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
สารสกัดดอกเข็มสีแดง	$726.57 \pm 76.74$ *
สารสกัดดอกเข็มสีเหลือง	$287.80 \pm 12.22$
สารสกัดดอกเข็มสีส้ม	$855.16 \pm 130.84$ *
สารสกัดดอกเข็มสีชมพู	$1,615.15 \pm 106.67$ *
Quercetin	$275.04 \pm 79.27$

หมายเหตุ: \* =  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ quercetin

#### 5. การหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-ciocalteu

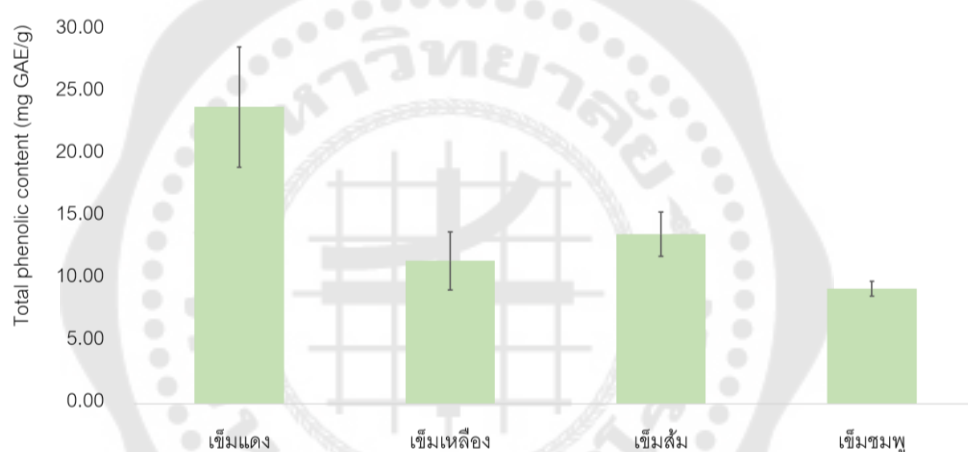
การทดสอบหาปริมาณรวมของสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ด้วยวิธี Folin-ciocalteu ทำการทดสอบสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงมาเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความยาวคลื่น 765 nm

การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ กับสารมาตรฐาน gallic acid ทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 และ 5 mg/ml และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน gallic acid กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ดังแสดงในภาพประกอบ 18



ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0.3-5.0 mg/ml กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ หลังจากทำปฏิกิริยากับ foliocalteu reagent แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงมาแทนค่าในสมการเชิงเส้น  $y = 0.087\ln(x) + 0.1346$  เพื่อคำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิกเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน gallic acid จะได้ค่าปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในรูปมิลลิกรัมของ gallic acid equivalents (GAE) โดยพบว่าสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 1 กรัม สารสกัดดอกเข็มสีแดง มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกมากที่สุดคือ  $23.86 \pm 4.83$  mg gallic acid equivalent และสารสกัดดอกเข็มสีส้ม สีเหลือง และสีชมพู มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกรองลงมาเท่ากับ  $13.63 \pm 1.80$ ,  $11.49 \pm 2.34$  และ  $9.23 \pm 0.60$  mg gallic acid equivalent ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 19

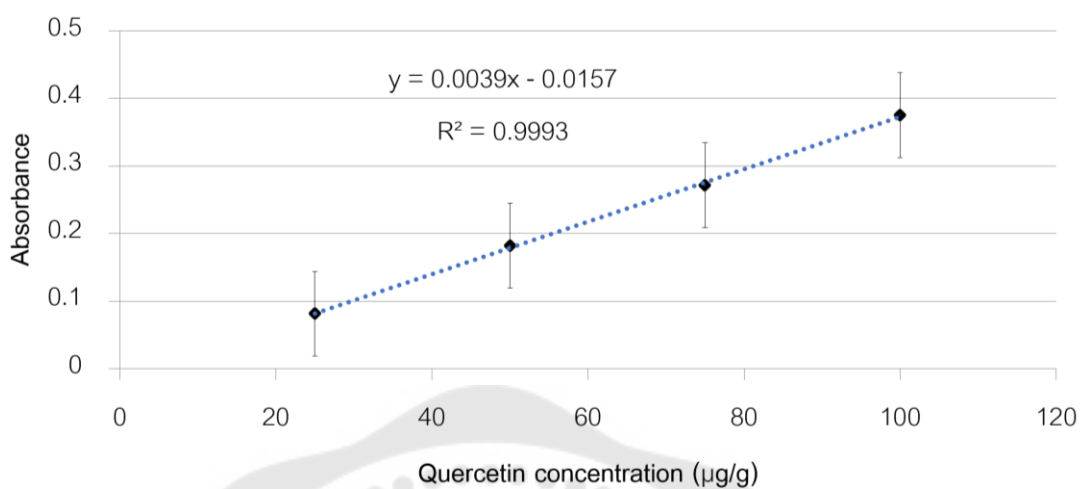


ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในรูปมิลลิกรัมของ gallic acid equivalents (GAE) ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 1 กรัม

#### 5. การหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี aluminium chloride complexation

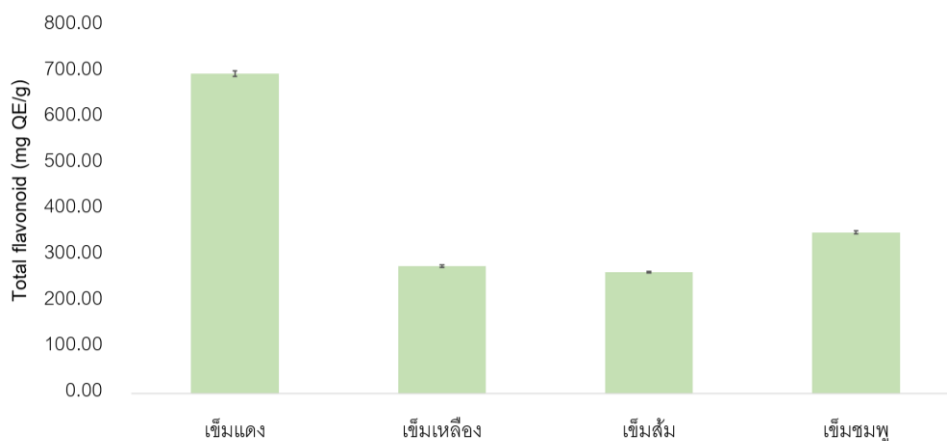
การทดสอบหาปริมาณรวมของฟลาโวนอยด์ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ด้วยวิธี aluminium chloride complexation ทำการทดสอบสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงมาเทียบกับสารมาตรฐาน quercetin ที่ความยาวคลื่น 415 nm

การเปรียบเทียบปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ กับสารมาตรฐาน quercetin ทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 25, 50, 75, 100 และ 125  $\mu\text{g/ml}$  และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน quercetin กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ดังแสดงในภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin ที่ความเข้มข้น 25-100 µg/ml กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ หลังจากทำปฏิกิริยากับ aluminium chloride ( $AlCl_3$ ) แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงมาแทนค่าในสมการเชิงเส้น  $y = 0.0039x - 0.0157$  เพื่อคำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน quercetin จะได้ค่าปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในรูปมิลลิกรัมของ quercetin equivalents (QE) โดยพบว่าสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 1 กรัม สารสกัดดอกเข็มสีแดง มีปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มากที่สุดคือ  $696.78 \pm 5.80$  mg quercetin equivalent และสารสกัดดอกเข็มสีชมพู สีเหลือง และสีส้ม มีปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์รองลงมาเท่ากับ  $350.85 \pm 3.65$ ,  $277.38 \pm 2.94$  และ  $264.13 \pm 1.86$  mg quercetin equivalent ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 21

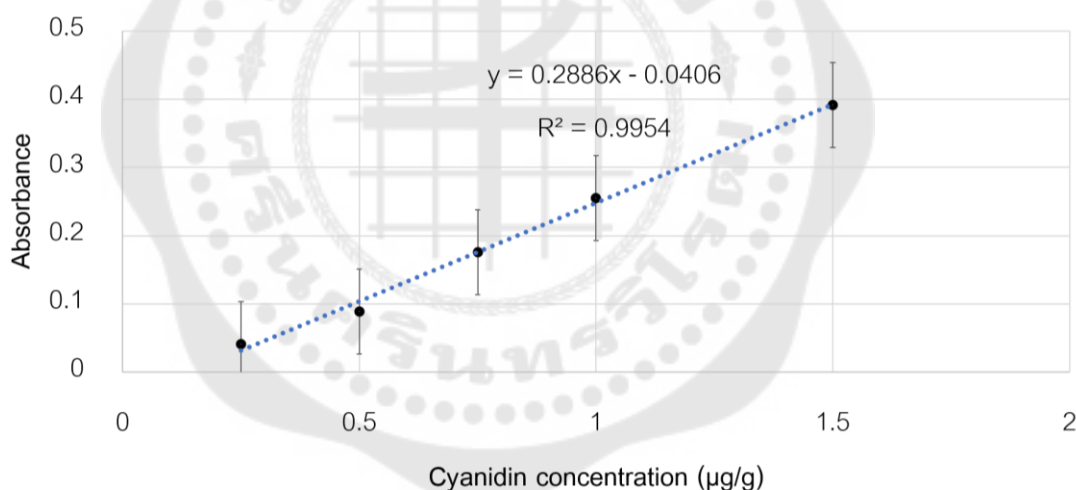


ภาพประกอบ 21 กราฟแสดงปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในรูปมิลลิกรัมของ quercetin equivalents (QE) ในสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ 1 กรัม

#### 6. การหาปริมาณรวมของแอนโทไซยานินด้วยวิธี pH differential

เป็นการทดสอบหาปริมาณรวมของแอนโทไซยานินในสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ ด้วยวิธี pH differential โดยทำการทดสอบสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงมาเทียบกับสารมาตรฐาน cyanidin ที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 nm

การเปรียบเทียบปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินในสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ กับสารมาตรฐาน cyanidin ทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน cyanidin ในสภาวะ pH 1.0 และ 4.5 ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.50  $\mu\text{g/ml}$  และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน cyanidin กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 nm ดังแสดงในภาพประกอบ 22

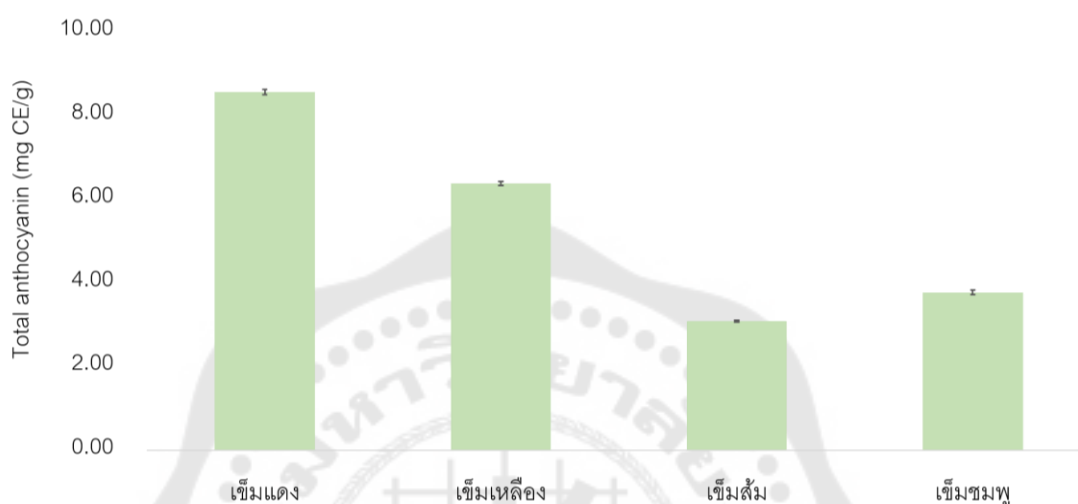


ภาพประกอบ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanidin ที่ความเข้มข้น 0.25-1.5  $\mu\text{g/ml}$  กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 nm

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ หลังจากทำปฏิกิริยากับ pH differential แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงมาแทนค่าในสมการเชิงเส้น  $y = 0.2886x - 0.0406$  เพื่อคำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแอนโทไซยานินเทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน cyanidin จะได้ค่าปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินในรูปมิลลิกรัมของ cyanidin equivalents (CE) โดยพบว่าสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ 1 กรัม สารสกัดดอกเข็มสีแดง มีปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซ



ยานินมากที่สุดคือ  $8.56 \pm 0.06$  mg cyanidin equivalent และสารสกัดดอกเข็มสีเหลือง สีชมพู และสีส้ม มีปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินรองลงมาเท่ากับ  $6.37 \pm 0.04$ ,  $3.77 \pm 0.05$  และ  $3.08 \pm 0.02$  mg cyanidin equivalent ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 23

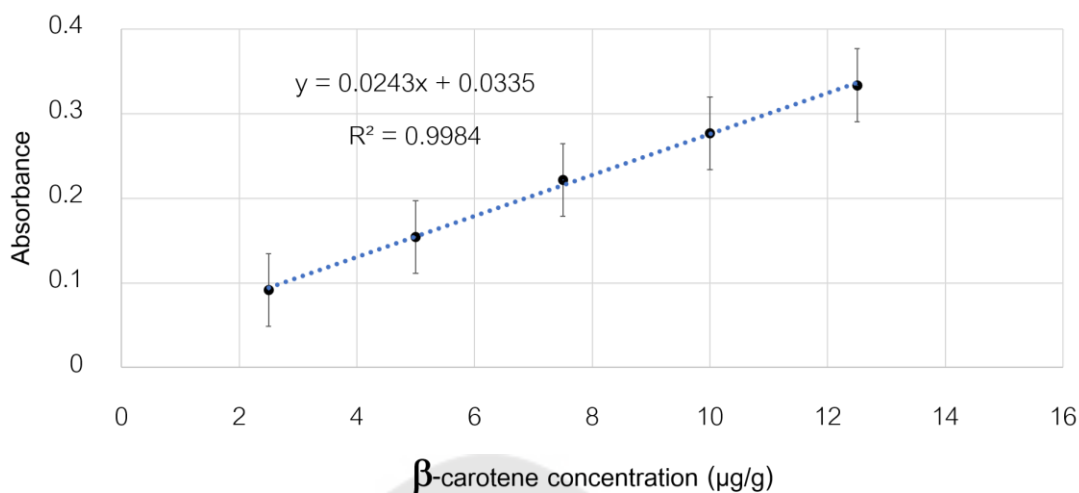


ภาพประกอบ 23 กราฟแสดงปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินในรูปมิลลิกรัมของ cyanidin equivalents (CE) ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 1 กรัม

#### 7. การหาปริมาณรวมของแคโรทีนอยด์ด้วยวิธี spectrophotometric

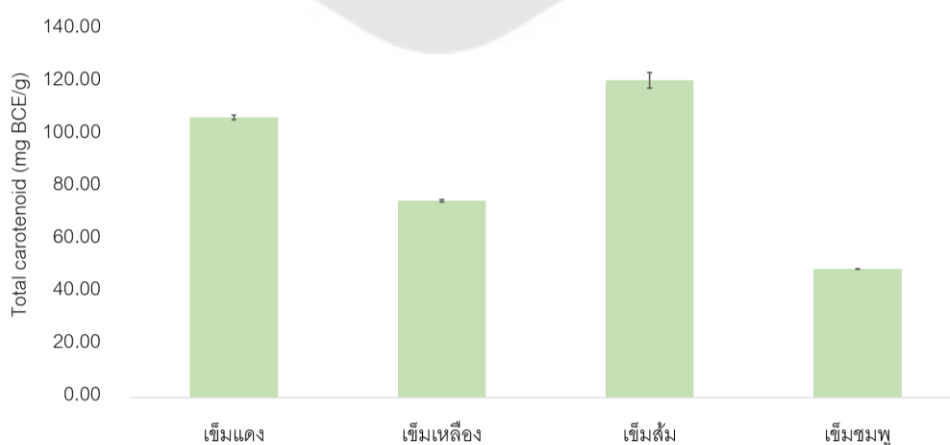
เป็นการทดสอบหาปริมาณรวมของแคโรทีนอยด์ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ด้วยวิธี spectrophotometric โดยทำการทดสอบสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงมาเทียบกับสารมาตรฐาน  $\beta$ -carotene ที่ความยาวคลื่น 450 nm

การเปรียบเทียบปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ กับสารมาตรฐาน  $\beta$ -carotene ทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -carotene ที่ความเข้มข้น 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 และ 12.5  $\mu\text{g/ml}$  และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน  $\beta$ -carotene กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ดังแสดงในภาพประกอบ 24



ภาพประกอบ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน  $\beta$ -carotene ที่ความเข้มข้น 2.5-12.5  $\mu\text{g/ml}$  กับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

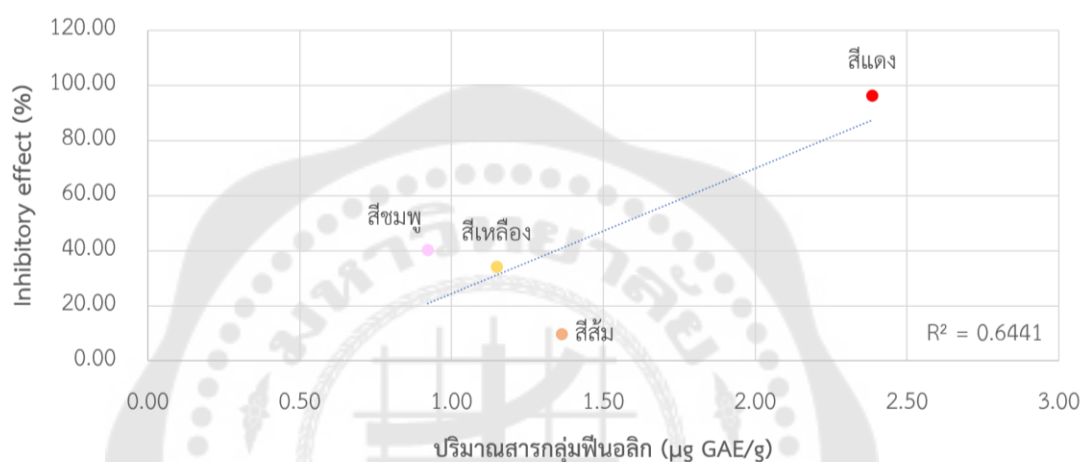
เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ หลังจากทำปฏิกิริยากับ EA:DCM:Hex แล้วนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงมาแทนค่าในสมการเชิงเส้น  $y = 0.0243x + 0.0335$  เพื่อคำนวณหาปริมาณรวมของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่เทียบกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน  $\beta$ -carotene จะได้ค่าปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ในรูปแบบลิกรัมของ  $\beta$ -carotene equivalents (BCE) โดยพบว่าสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 1 กรัม สารสกัดดอกเข็มสีส้ม มีปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์มากที่สุดคือ  $120.75 \pm 3.00$  mg  $\beta$ -carotene equivalent และสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง และสีชมพู มีปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์รองลงมาเท่ากับ  $106.62 \pm 0.79$ ,  $74.89 \pm 0.42$  และ  $48.91 \pm 0.11$  mg  $\beta$ -carotene equivalent ตามลำดับ ดังภาพประกอบ 25



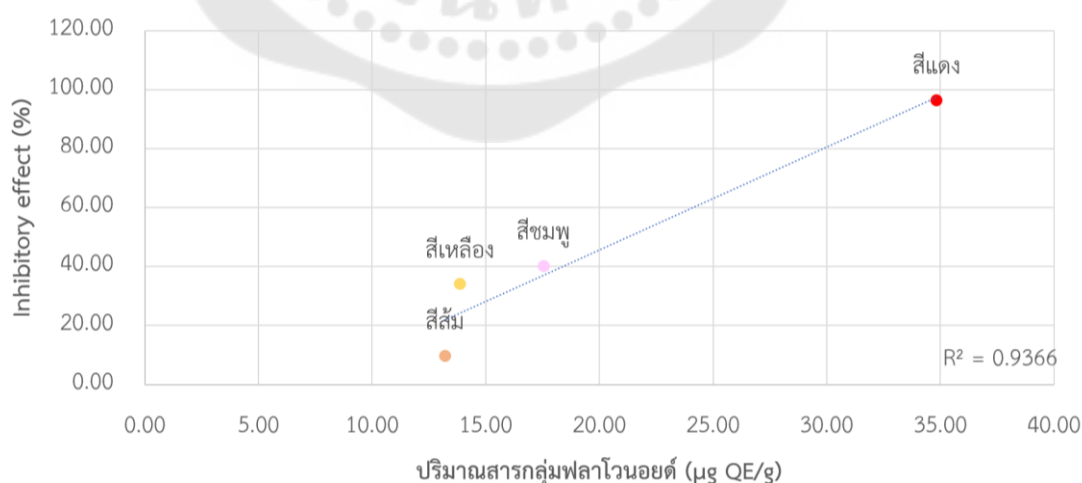
ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกในรูปแบบลิกรัมของ  $\beta$ -carotene equivalents (BCE) ในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ 1 กรัม

8. การศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ กับปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบ โดยใช้กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้น และสถิติ Pearson's correlation

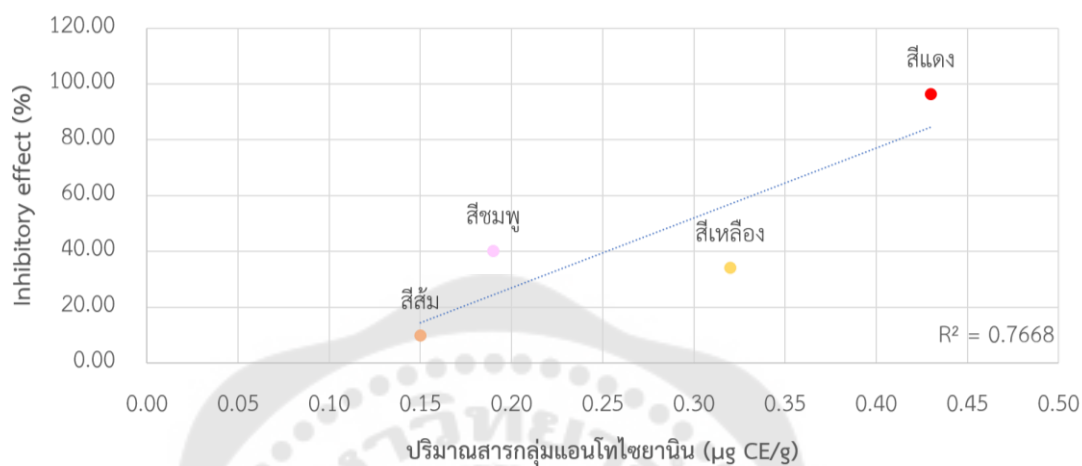
ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดที่พบในสารสกัดดอกเข็มกับร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดความเข้มข้น 500 µg/ml โดยการพิจารณาจากความสัมพันธ์เชิงเส้นดังแสดงในรูปที่ 26 – 29 และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วย Pearson's correlation (ตารางที่ 25)



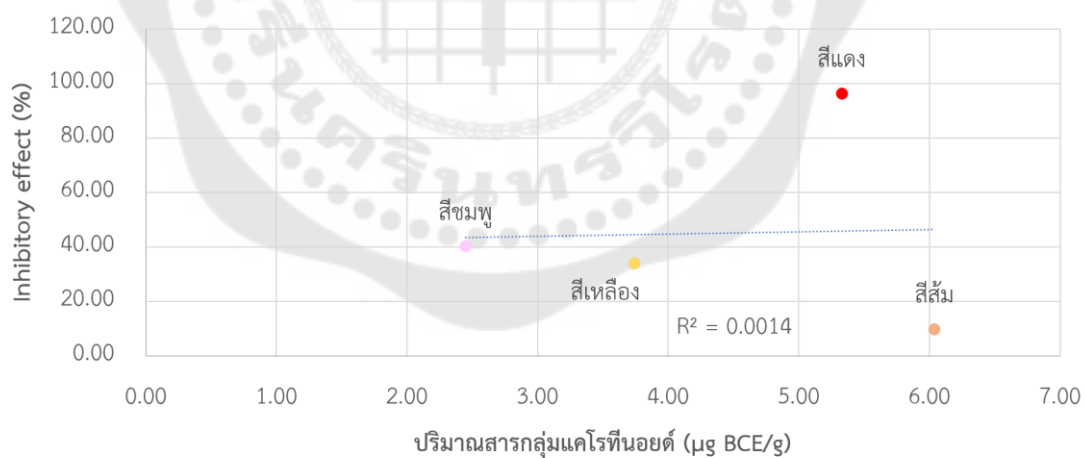
ภาพประกอบ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml



ภาพประกอบ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml



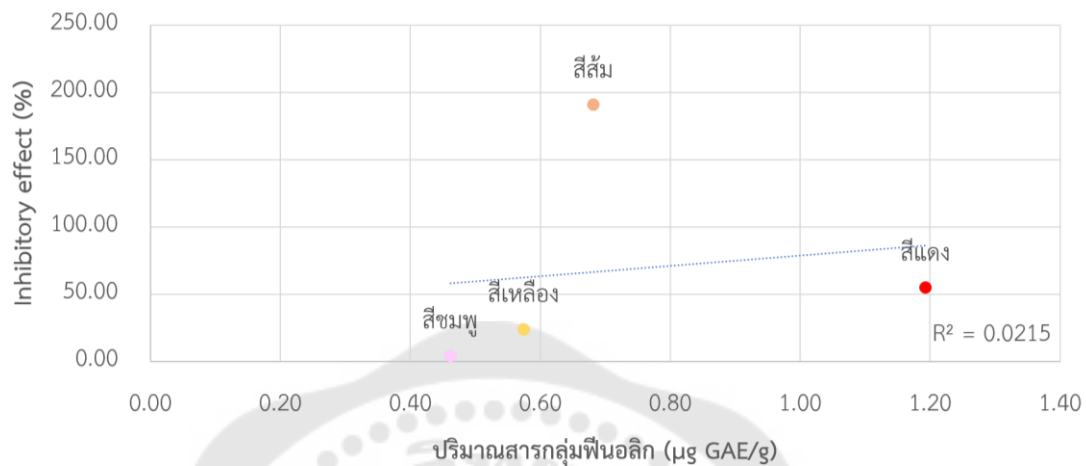
ภาพประกอบ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml



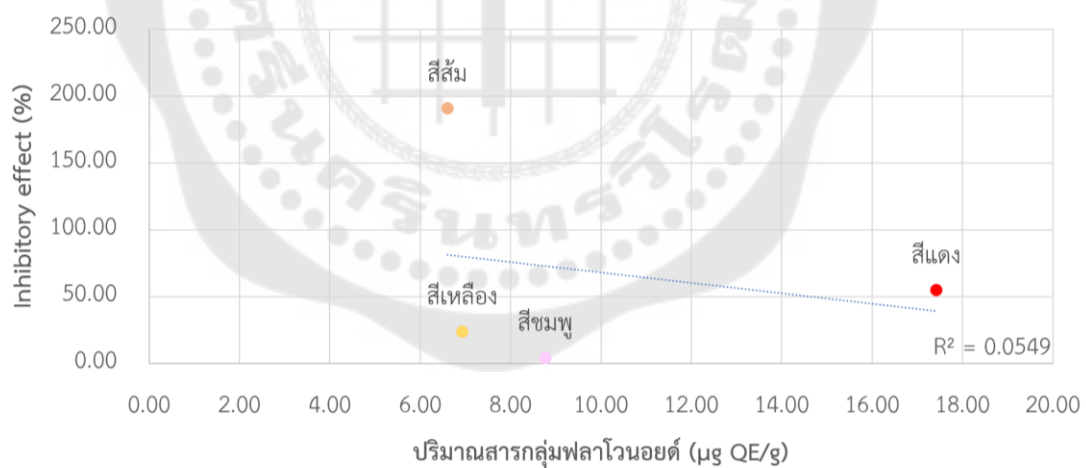
ภาพประกอบ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดที่พบในสารสกัดดอกเข็มกับร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดความเข้มข้น 250 µg/ml โดยการพิจารณาจาก

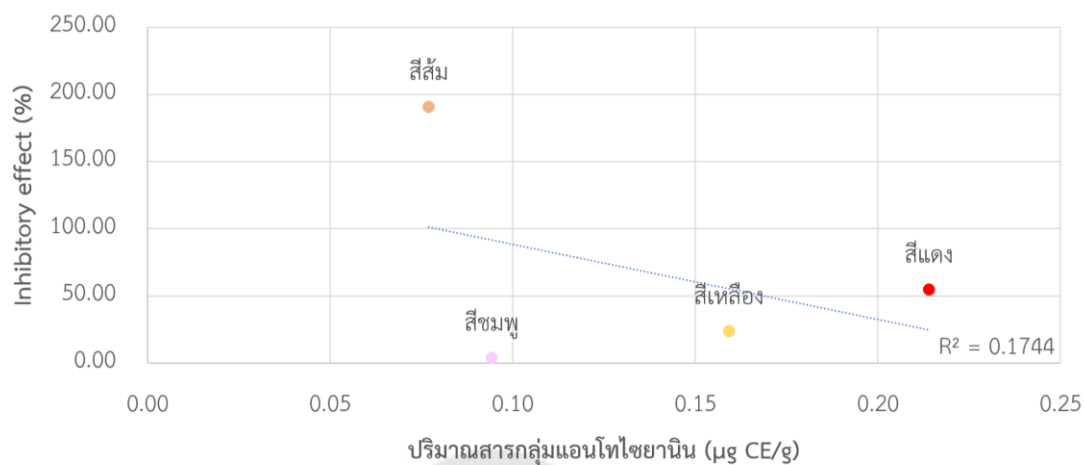
ความสัมพันธ์เชิงเส้นดังแสดงในรูปที่ 30 – 33 และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสด้วย Pearson's correlation (ตารางที่ 26)



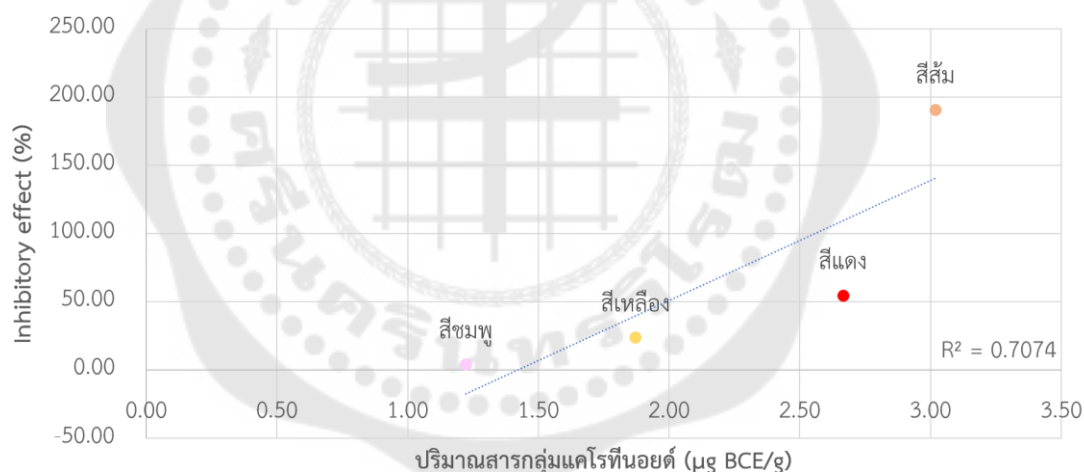
ภาพประกอบ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml



ภาพประกอบ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml

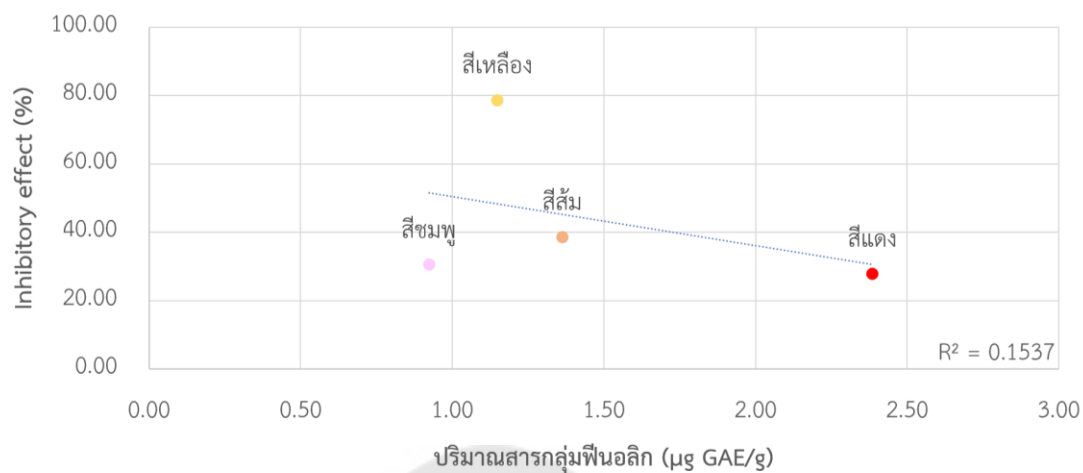


ภาพประกอบ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml

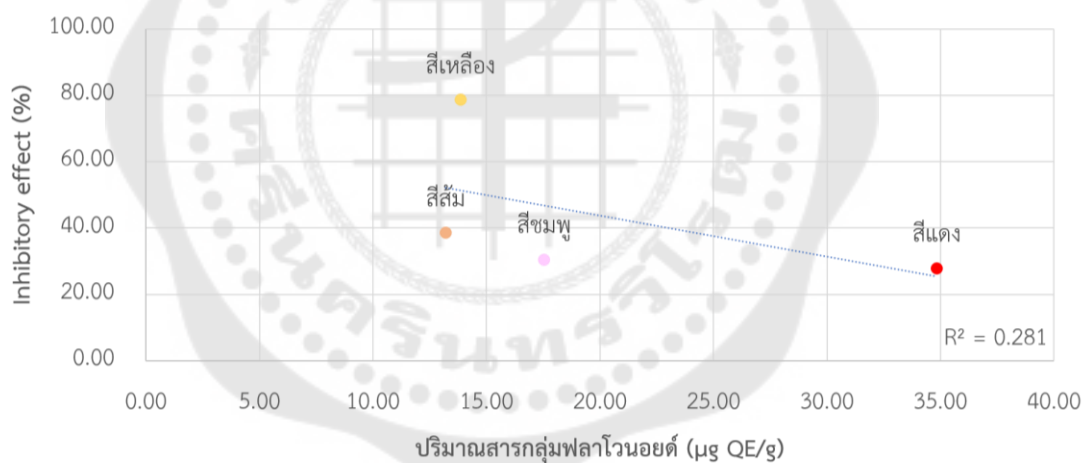


ภาพประกอบ 33 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ ที่ความเข้มข้น 250 µg/ml

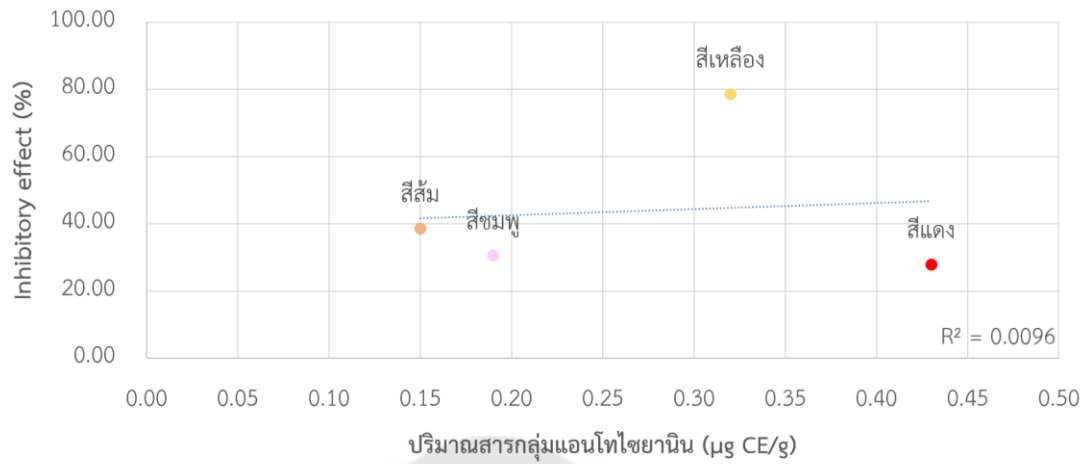
ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญแต่ละชนิดที่พบในสารสกัดดอกเข็มกับร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดความเข้มข้น 500 µg/ml โดยการพิจารณาจากความสัมพันธ์เชิงเส้นดังแสดงในรูปที่ 34 – 37 และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสด้วย Pearson's correlation (ตารางที่ 27)



ภาพประกอบ 34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml



ภาพประกอบ 35 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml



ภาพประกอบ 36 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml



ภาพประกอบ 37 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสและปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 500 µg/ml



ตาราง 25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ความเข้มข้น 500 µg/ml กับปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์

		Correlation				
		Hyaluronidase	Phenolic	Flavonoid	Anthocyanin	Carotenoid
Hyaluronidase	Pearson Correlation	1.000	.804	.968	.876	.037
	Sig. (2-tailed)		.196	.032	.124	.963
	N	4	4	4	4	4
Phenolic	Pearson Correlation	.804	1.000	.895	.759	.624
	Sig. (2-tailed)	.196		.105	.241	.376
	N	4	4	4	4	4
Flavonoid	Pearson Correlation	.968	.895	1.000	.792	.234
	Sig. (2-tailed)	.032	.105		.208	.766
	N	4	4	4	4	4
Anthocyanin	Pearson Correlation	.876	.759	.792	1.000	.122
	Sig. (2-tailed)	.124	.241	.208		.878
	N	4	4	4	4	4
Carotenoid	Pearson Correlation	.037	.624	.234	.122	1.000
	Sig. (2-tailed)	.963	.376	.766	.878	
	N	4	4	4	4	4

ตาราง 26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ความเข้มข้น 250 µg/ml กับปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์

		Correlation				
		Collagenase	Phenolic	Flavonoid	Anthocyanin	Carotenoid
Collagenase	Pearson Correlation	1.000	.149	-.234	-.385	.840
	Sig. (2-tailed)		.851	.766	.615	.160
	N	4	4	4	4	4
Phenolic	Pearson Correlation	.149	1.000	.895	.764	.629
	Sig. (2-tailed)	.851		.105	.236	.371
	N	4	4	4	4	4
Flavonoid	Pearson Correlation	-.234	.895	1.000	.771	.236
	Sig. (2-tailed)	.766	.105		.229	.764
	N	4	4	4	4	4
Anthocyanin	Pearson Correlation	-.385	.764	.771	1.000	.175
	Sig. (2-tailed)	.615	.236	.229		.825
	N	4	4	4	4	4
Carotenoid	Pearson Correlation	.840	.629	.236	.175	1.000
	Sig. (2-tailed)	.160	.371	.764	.825	
	N	4	4	4	4	4

ตาราง 27 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสที่ความเข้มข้น 500 µg/ml กับ ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์

		Correlation				
		Elastase	Phenolic	Flavonoid	Anthocyanin	Carotenoid
Elastase	Pearson Correlation	1.000	-.390	-.530	.098	-.179
	Sig. (2-tailed)		.610	.470	.902	.821
	N	4	4	4	4	4
Phenolic	Pearson Correlation	-.390	1.000	.895	.759	.624
	Sig. (2-tailed)	.610		.105	.241	.376
	N	4	4	4	4	4
Flavonoid	Pearson Correlation	-.530	.895	1.000	.792	.234
	Sig. (2-tailed)	.470	.105		.208	.766
	N	4	4	4	4	4
Anthocyanin	Pearson Correlation	.098	.759	.792	1.000	.122
	Sig. (2-tailed)	.902	.241	.208		.878
	N	4	4	4	4	4
Carotenoid	Pearson Correlation	-.179	.624	.234	.122	1.000
	Sig. (2-tailed)	.821	.376	.766	.878	
	N	4	4	4	4	4

สำหรับความสัมพันธ์เชิงเส้นโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกเข็มที่ความเข้มข้นเดียวกันเปรียบเทียบกับร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ จากรูปที่ 27 จะเห็นได้ว่าปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์คอลลาจีเนส และปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก แอนโทไซยานิน และแคโรทีนอยด์ ไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส ดังแสดงในรูปที่ 26, 28 - 37 ซึ่งการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Pearson correlation ยืนยันว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมีความสัมพันธ์กับปริมาณรวมของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ( $R^2 = 0.9366$ ,  $p = 0.032$ ) แต่ไม่สัมพันธ์กับปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก ( $R^2 = 0.6441$ ,  $p = 0.196$ ) สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ( $R^2 = 0.7668$ ,  $p = 0.124$ ) และสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ( $R^2 = 0.6441$ ,  $p = 0.963$ ) (ตารางที่ 25) ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสไม่สัมพันธ์กับปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก ( $R^2 = 0.0215$ ,  $p = 0.851$ ) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ( $R^2 = 0.0549$ ,  $p = 0.766$ ) สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ( $R^2 = 0.1744$ ,  $p = 0.615$ ) และสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ( $R^2 = 0.7074$ ,  $p = 0.160$ ) (ตารางที่ 26) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสไม่สัมพันธ์กับปริมาณรวมของสารกลุ่มฟีนอลิก ( $R^2 = 0.1537$ ,  $p = 0.610$ ) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ( $R^2 = 0.281$ ,  $p = 0.570$ ) สารกลุ่มแอนโทไซยานิน ( $R^2 = 0.0096$ ,  $p = 0.902$ ) และสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ ( $R^2 = 0.0322$ ,  $p = 0.821$ ) (ตารางที่ 27)

## บทที่ 5

### สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสด้วยวิธี colorimetric method และ ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสและเอนไซม์อีลาสเตสด้วยวิธี spectrophotometric method พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มต่าง ๆ มีค่าขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด (dose dependent) โดยฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพู มีค่ายับยั้งที่ร้อยละ 50 ( $IC_{50}$ ) สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 28 เท่ากับ  $239.54 \pm 76.57$ ,  $608.38 \pm 90.42$ ,  $1,662.73 \pm 0.13$  และ  $1,528.42 \pm 0.61$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพู มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $183.81 \pm 53.71$ ,  $556.94 \pm 165.81$ ,  $28.95 \pm 2.00$  และ  $406.61 \pm 3.12$   $\mu\text{g/ml}$  (ตารางที่ 28) ตามลำดับ และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพู มี  $IC_{50}$  เท่ากับ  $726.57 \pm 76.74$ ,  $287.80 \pm 12.22$ ,  $855.16 \pm 130.84$  และ  $1,615.15 \pm 106.67$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ (ตารางที่ 28) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดดอกเข็มสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ดีที่สุด สารสกัดดอกเข็มสีส้มมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ดีที่สุด และสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสได้ดีที่สุด และสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยโดยมีค่าขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่าสารสกัดของใบเข็มมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดจากใบเข็ม (Bose et al., 2008) และสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการทดสอบสารสกัดที่ได้จากเข็มที่ต่างสายพันธุ์ ต่างสี จะให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านการอักเสบที่แตกต่างกัน (Baliga & Kurian, 2012; Dontha et al., 2015)

ตาราง 28 แสดงค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส ที่ 50 (IC<sub>50</sub>) ของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ

สารสกัด	IC <sub>50</sub> ± SE (µg/ml)		
	Hyaluronidase	Collagenase	Elastase
ดอกเข็มสีแดง	239.54 ± 76.57 *	183.81 ± 53.71 *	726.57 ± 76.74 *
ดอกเข็มสีเหลือง	608.38 ± 90.42 *	556.94 ± 165.81 *	287.80 ± 12.22
ดอกเข็มสีส้ม	1,662.73 ± 0.13 *	28.95 ± 2.00 *	855.16 ± 130.84 *
ดอกเข็มสีชมพู	1,528.42 ± 0.61 *	406.61 ± 3.12 *	1,615.15 ± 106.67 *
Quercetin	561.49 ± 51.87	1,420.17 ± 168.55	275.04 ± 79.27

หมายเหตุ: \* =  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ quercetin

จากการศึกษาชนิดและปริมาณพฤกษเคมีที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ยับยั้งการเกิดริ้วรอย โดยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาหาปริมาณของสารกลุ่มฟีนอลิก สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารกลุ่มแอนโทไซยานิน และสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (ตารางที่ 29) โดยทำการเทียบกับสารมาตรฐาน gallic acid, quercetin, cyanidin และ  $\beta$ -carotene ตามลำดับ สำหรับปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกที่พบในสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพูมีค่าเท่ากับ  $23.86 \pm 4.83$ ,  $11.49 \pm 2.34$ ,  $13.63 \pm 1.80$  และ  $9.23 \pm 0.60$  mg gallic acid equivalent ตามลำดับ ปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพูมีค่าเท่ากับ  $696.78 \pm 5.80$ ,  $277.38 \pm 2.94$ ,  $264.13 \pm 1.86$  และ  $350.85 \pm 3.65$  mg quercetin equivalent ตามลำดับ ปริมาณสารกลุ่มแอนโทไซยานินที่พบในสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพูมีค่าเท่ากับ  $8.56 \pm 0.06$ ,  $6.37 \pm 0.04$ ,  $3.08 \pm 0.02$  และ  $3.77 \pm 0.05$  mg cyanidin equivalent ตามลำดับ และปริมาณสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่พบในสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพูมีค่าเท่ากับ  $106.62 \pm 0.79$ ,  $74.89 \pm 0.42$ ,  $120.75 \pm 3.00$  และ  $48.91 \pm 0.11$  mg  $\beta$ -carotene equivalent ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารที่พบได้มากที่สุดในสารสกัดดอกเข็มเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่มีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส แล้วพบว่าสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ดีที่สุด โดยโครงสร้างที่ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ดีที่สุดคือ luteolin (76.1%) รองลงมาเป็น apigenin (66.5%) และ

kaempferol (56.1%) ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาโครงสร้างจะพบว่าบริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 หากมีโครงสร้างเป็นพันธะคู่ (double bond) จะมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้ดี และการแทนที่ด้วยหมู่คีโตน บริเวณคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 การแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซีที่คาร์บอนตำแหน่ง 5, 7 และ 4' จะทำให้ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสดีกว่า โครงสร้างสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ไม่มีการแทนที่ และนอกจากนี้ยังพบว่าหมู่ไฮดรอกซี ที่คาร์บอนตำแหน่ง 5 และ 7 จะไปจับตำแหน่งการทำงานของเอนไซม์ และขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ได้ (Kuppusamy et al., 1990) และงานวิจัยที่มีการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่าฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการทำงานของคอลลาจีเนสได้ ซึ่งโครงสร้างของฟลาโวนอยด์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ มีลักษณะโครงสร้างที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และ 3 เป็น double bond และที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 มีหมู่ไฮดรอกซีเป็นหมู่แทนที่ ซึ่งฟลาโวนอยด์ที่มีโครงสร้างเช่นนี้ ได้แก่ quercetin, myricetin และ kaempferol (Sin & Kim, 2005) ในงานวิจัยที่ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสพบว่า โครงสร้างที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสได้ดีคือ quercetin, myricetin, luteolin และ apigenin ตามลำดับ และจากการศึกษาโครงสร้างของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จะพบว่า การที่โครงสร้างใน ring C มี double bond ในตำแหน่ง C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> และการเกิด c-glucoside ใน ring A ที่ตำแหน่ง C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub> จะทำให้ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสนั้นมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Jakimiuk et al., 2021) โดยสารสำคัญในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่คาดว่า จะพบในดอกเข็ม ได้แก่ myricetin, quercetin, rutin และ kaempferol (Dontha et al., 2015) จึงคาดว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์น่าจะมี ความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ เกี่ยวกับการเกิดริ้วรอย (Thring et al., 2009) แต่จากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นและ Pearson's correlation พบว่ามีเพียงสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส แต่ไม่สัมพันธ์กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส ในขณะที่พฤษเคมีอื่น ได้แก่ phenolic, anthocyanin และ carotenoid ไม่แสดงความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดคือ hyaluronidase, collagenase และ elastase ผู้วิจัยคาดว่าฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส ที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากพฤษเคมีเหล่านี้ ออกฤทธิ์ร่วมกันหรือเกิดจากพฤษเคมีอื่นที่ไม่ได้ทำการตรวจสอบในงานวิจัยนี้ ในขณะที่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเกิดจาก flavonoid

ตาราง 29 แสดงปริมาณพฤกษเคมีที่พบในสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ น้ำหนัก 1 g

สารสกัด	Phenolic (GAE)	Flavonoid (QE)	Anthocyanin (CE)	Carotenoid (BCE)
ดอกเข็มสีแดง	23.86	696.78	8.56	106.62
ดอกเข็มสีเหลือง	11.49	277.38	6.37	74.89
ดอกเข็มสีส้ม	13.63	264.13	3.08	120.75
ดอกเข็มสีชมพู	9.23	350.85	3.77	48.91

#### ข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ พบว่าสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ พบความสัมพันธ์กันระหว่างฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสกับสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับพฤกษเคมีอื่นที่ทำการตรวจสอบซึ่งได้แก่ phenolic, anthocyanin และ carotenoid นอกจากนี้ยังไม่พบความสัมพันธ์ของพฤกษเคมีทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ phenolic, flavonoid, anthocyanin และ carotenoid กับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส และเอนไซม์อีลาสเตส จึงควรมีการศึกษาพฤกษเคมีอื่น เช่น alkaloid, terpenoid ในสารสกัดดอกเข็มเพิ่มเติม เพื่อหาความสัมพันธ์ของปริมาณพฤกษเคมีและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดริ้วรอยของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถลดเลือนริ้วรอย และควรมีการศึกษาเปรียบเทียบปัจจัยต่าง ๆ ในการนำดอกเข็มมาศึกษา เช่น บริเวณที่เก็บ สภาพการเจริญเติบโตของเข็ม ระยะเวลาในการเก็บดอกเข็ม เพื่อให้การทดสอบมีความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด

## บรรณานุกรม

- Abdullah, N. H., Thomas, N. F., Sivasothy, Y., Lee, V. S., Liew, S. Y., Noorbacha, I. A., & Awang, K. (2016). Hyaluronidase inhibitory activity of pentacyclic triterpenoids from *Prismatomeris tetrandra* (Roxb.) K. Schum: Isolation, synthesis and QSAR study. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 143.
- Abhijit, S., & Manjushree, D. (2010). Anti-hyaluronidase, anti-elastase activity of *Garcinia indica*. *International Journal of Botany*, 6(3), 299-303.
- Ahmed, A., Haylor, J., El Nahas, A., & Johnson, T. (2007). Localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental progressive kidney scarring. *Kidney international*, 71(8), 755-763.
- Ambarwati, N. S. S., Elya, B., Desmiaty, Y., & Omar, H. (2020). Anti-elastase of leaves and stem bark extract of *Garcinia daedalanthera* Pierre. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 12, 592-596.
- Baliga, M. S., & Kurian, P. J. (2012). *Ixora coccinea* Linn.: Traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Chinese journal of integrative medicine*, 18, 72-79.
- Bessada, S. M., C Alves, R., & PP Oliveira, M. B. (2018). Coffee silverskin: A review on potential cosmetic applications. *Cosmetics*, 5(1), 5.
- Bose, S., Bose, A., Maji, S., & Chakraborty, P. (2008). In Vitro antioxidant property of leaf extract of *Ixora coccinea* L. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 84-87.
- Butkhup, L. (2012). Dietary polyphenols and their biological effects. *J. Science Technology Mahasarakham University*, 31, 443-454.
- Chaovanalikit, A. (2011). EXTRACTION AND ANALYSIS OF ANTHOCYANIN. *Journal of Srinakharinwirot University (Journal of Science and Technology)*, 3(6), 26-36.
- CHEEWABANTHOENG, C., & Tadtong, S. (2021). ANTI-AGING ACTIVITY OF MAUVE *CLITORIA TERNATEA* L. PETAL EXTRACT [Srinakharinwirot University].

- Chung, L., Dinakarbandian, D., Yoshida, N., Lauer-Fields, J. L., Fields, G. B., Visse, R., & Nagase, H. (2004). Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *The EMBO journal*, 23(15), 3020-3030.
- Davey, M. W., Keulemans, J., & Swennen, R. (2006). Methods for the efficient quantification of fruit provitamin A contents. *Journal of Chromatography A*, 1136(2), 176-184.
- Dontha, S., Kamurthy, H., & Mantripragada, B. (2015). Phytochemical and pharmacological profile of *Ixora*: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 6, 567-584.
- Fakngoen, S., & Meerod, S. (2017). *Extraction and Separation of Anthocyanins from Carissa carandas L.* Proceeding of the 4<sup>th</sup> National Conference KPRU, Kamphaengphet, Thailand.
- Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2012). Skin anti-aging strategies. *Dermato-endocrinology*, 4(3), 308-319.
- Heinz, A. (2020). Elastases and elastokines: elastin degradation and its significance in health and disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 55(3), 252-273.
- 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. *Stella*.
- Jaiswal, R., Karar, M. G. E., Gadir, H. A., & Kuhnert, N. (2014). Identification and characterisation of phenolics from *Ixora coccinea* L. (Rubiaceae) by liquid chromatography multi-stage mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 25(6), 567-576.
- Jakimiuk, K., Gesek, J., Atanasov, A. G., & Tomczyk, M. (2021). Flavonoids as inhibitors of human neutrophil elastase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 36(1), 1016-1028.
- Küpeli Akkol, E., Genç, Y., Karpuz, B., Sobarzo-Sánchez, E., & Capasso, R. (2020). Coumarins and coumarin-related compounds in pharmacotherapy of cancer. *Cancers*, 12(7), 1959.



- Kuppusamy, U., & Das, N. (1991). Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. *Experientia*, 47(11), 1196-1200.
- Kuppusamy, U., Khoo, H., & Das, N. (1990). Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochemical pharmacology*, 40(2), 397-401.
- KV, S., & Deodhar, M. Anti-Ageing Ability of Terminalia Species with Special Reference to Hyaluronidase, Elastase Inhibition and Collagen Synthesis In Vitro.
- Lee, J. H., & Kim, G. H. (2010). Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *Journal of food science*, 75(7), H212-H217.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of nutrition*, 134(12), 3479S-3485S.
- Liyanaarachchi, G. D., Samarasekera, J. K. R. R., Mahanama, K. R. R., & Hemalal, K. D. P. (2018). Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals. *Industrial crops and products*, 111, 597-605.
- Mandrone, M., Lorenzi, B., Venditti, A., Guarcini, L., Bianco, A., Sanna, C., Ballero, M., Poli, F., & Antognoni, F. (2015). Antioxidant and anti-collagenase activity of *Hypericum hircinum* L. *Industrial crops and products*, 76, 402-408.
- Ounamornmas, P., & Sommano, S. (2016). Analyses of bioactive ingredients and antioxidant activities of some edible flowers. *Journal of Agriculture (Thailand)*.
- Papakonstantinou, E., Roth, M., & Karakiulakis, G. (2012). Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. *Dermato-endocrinology*, 4(3), 253-258.
- Schmith, K., & Faber, V. (1950). The turbidimetric method for determination of hyaluronidase. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2(4), 292-297.
- Serino, S., Gomez, L., Costagliola, G., & Gautier, H. (2009). HPLC assay of tomato carotenoids: validation of a rapid microextraction technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8753-8760.

- Sharma, S., Baran, C., Tripathi, A., Awasthi, A., Jaiswal, A., Uttam, R., Bharti, A. S., Singh, R., & Uttam, K. (2021). Phytochemical screening of the different cultivars of ixora flowers by non-destructive, label-free, and rapid spectroscopic techniques. *Analytical Letters*, 54(14), 2276-2292.
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, 78, 929.
- Sin, B. Y., & Kim, H. P. (2005). Inhibition of collagenase by naturally-occurring flavonoids. *Archives of pharmacal research*, 28, 1152-1155.
- Srichaikul, B. (2016). Ixora chinensis Lamk. Flower Extract Health Drink. *Journal of Advance Research in Social Science and Humanities (ISSN: 2208-2387)*, 2(5), 01-14.
- Stern, R., & Jedrzejewski, M. J. (2006). Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chemical reviews*, 106(3), 818-839.
- Suksomboon, T., Sornchaithawatwong, C., & Tadtong, S. (2021). Phytochemical Study and Anti-wrinkle Activity of Blue Clitoria ternatea L. Petal Extract. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 16(3), 234-238.
- Tan, B. L., & Norhaizan, M. E. (2019). Carotenoids: How effective are they to prevent age-related diseases? *Molecules*, 24(9), 1801.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54(4), 733-749.
- 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), 1-11.
- Torey, A., Sasidharan, S., Latha, L. Y., Sudhakaran, S., & Ramanathan, S. (2010). Antioxidant activity and total phenolic content of methanol extracts of Ixora coccinea. *Pharmaceutical biology*, 48(10), 1119-1123.
- Upadhyay, A., Chattopadhyay, P., Goyary, D., Mitra Mazumder, P., & Veer, V. (2014). Ixora coccinea enhances cutaneous wound healing by upregulating the expression of

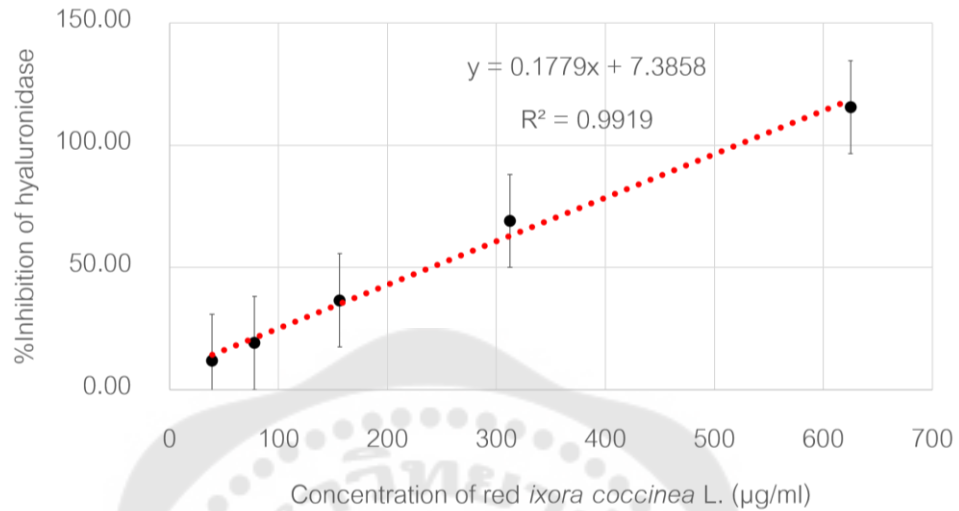
collagen and basic fibroblast growth factor. *International Scholarly Research Notices*, 2014.

- Vallisuta, O., Nukoolkarn, V., Mitrevej, A., Sarisuta, N., Leelapornpisid, P., Phrutivorapongkul, A., & Sinchaipanid, N. (2014). In vitro studies on the cytotoxicity, and elastase and tyrosinase inhibitory activities of marigold (*Tagetes erecta* L.) flower extracts. *Experimental and therapeutic medicine*, 7(1), 246-250.
- Wang, K., Meng, X., & Guo, Z. (2021). Elastin structure, synthesis, regulatory mechanism and relationship with cardiovascular diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
- Weihermann, A., Lorencini, M., Brohem, C., & De Carvalho, C. (2017). Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *International journal of cosmetic science*, 39(3), 241-247.
- Yoosatit, N., & Klinchan, C. (2016). Determination of flavonoid compounds in Kitchen mint leaves, Pomegranate leaves and *Crinum latifolium* leaves for processing of herbal tea products. *The 3rd Kamphaeng Phet Rajabhat university National Conference*, 3, 332-338.
- Zhang, S., & Duan, E. (2018). Fighting against skin aging: the way from bench to bedside. *Cell transplantation*, 27(5), 729-738.

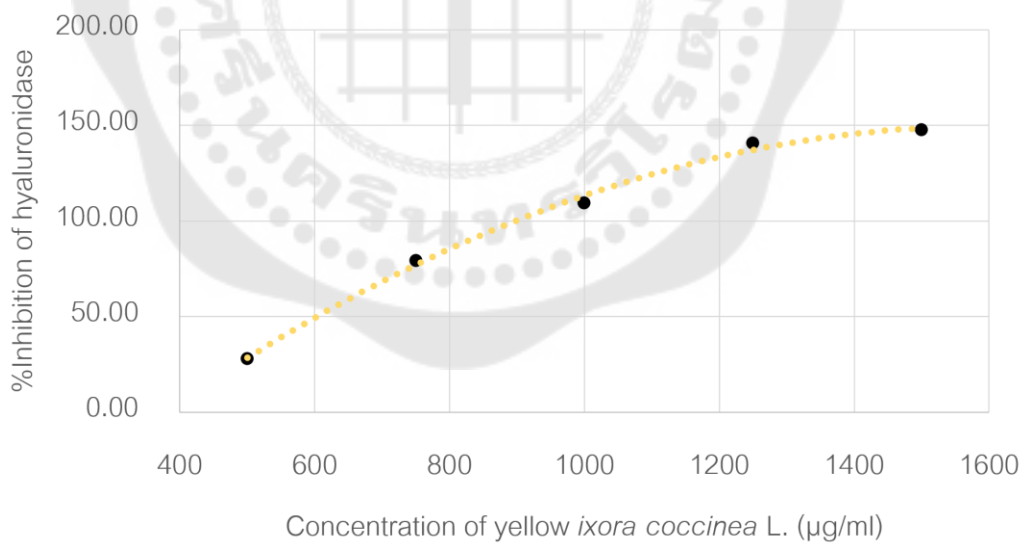
ภาคผนวก



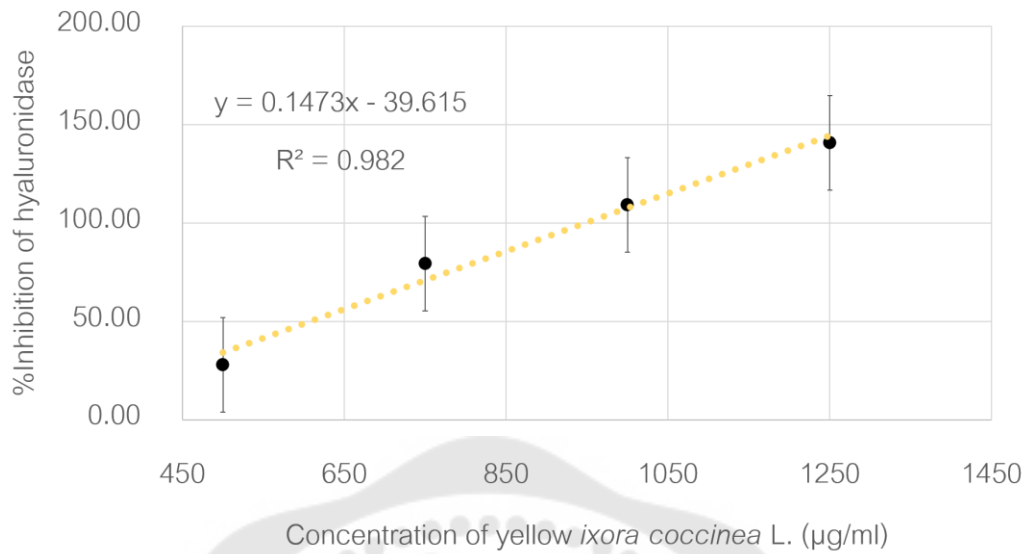
1. ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพู ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับ



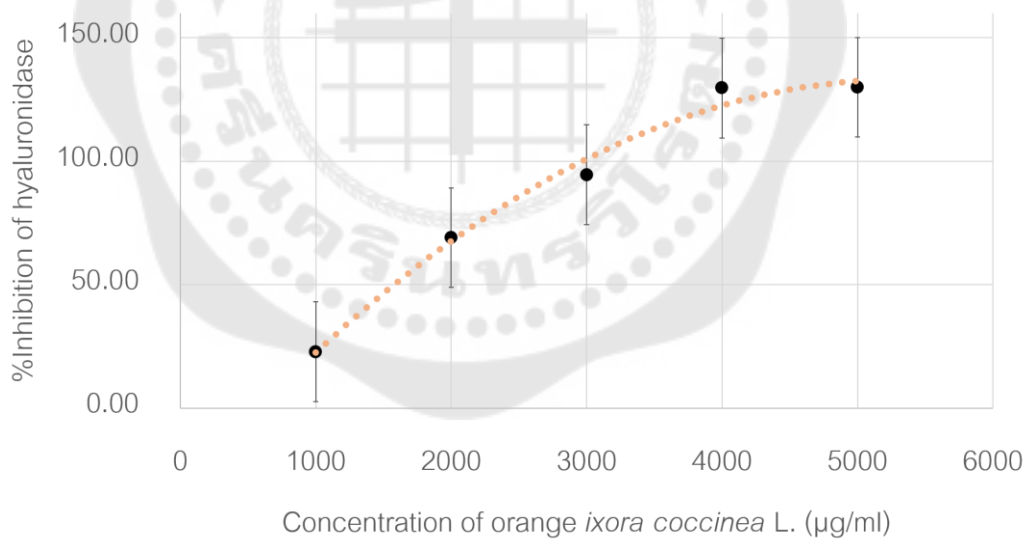
ภาพประกอบ 38 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีแดงที่ความเข้มข้น 39.10-625 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส



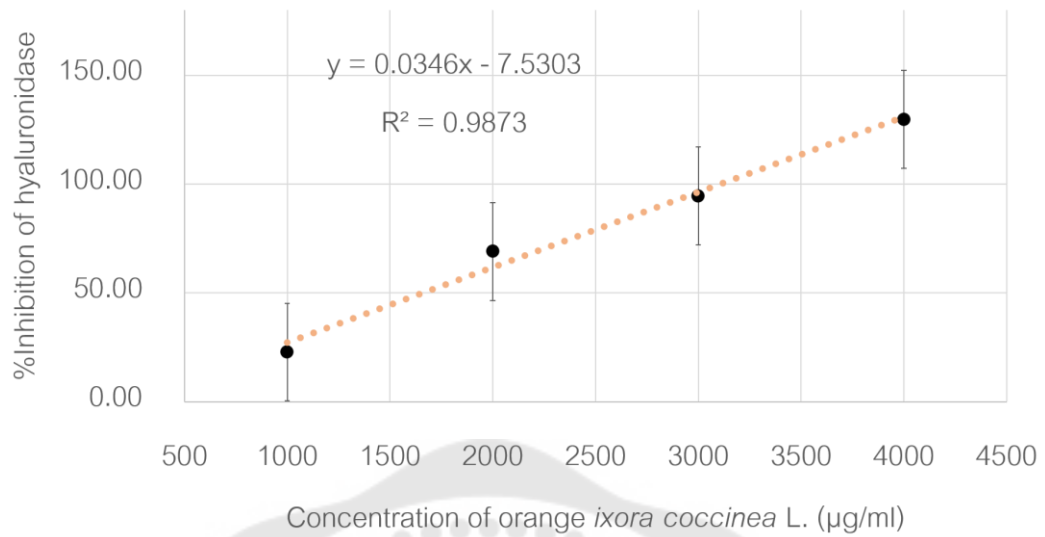
ภาพประกอบ 39 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองที่ความเข้มข้น 500-1,500 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส



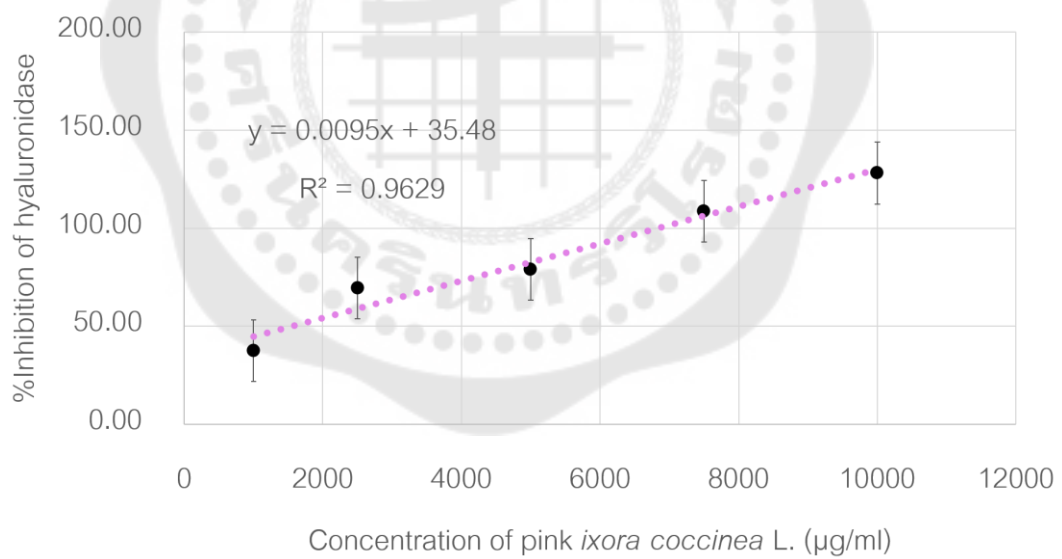
ภาพประกอบ 40 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีเหลืองที่ความเข้มข้น 500-1,250 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส



ภาพประกอบ 41 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีส้มที่ความเข้มข้น 1,000-5,000 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

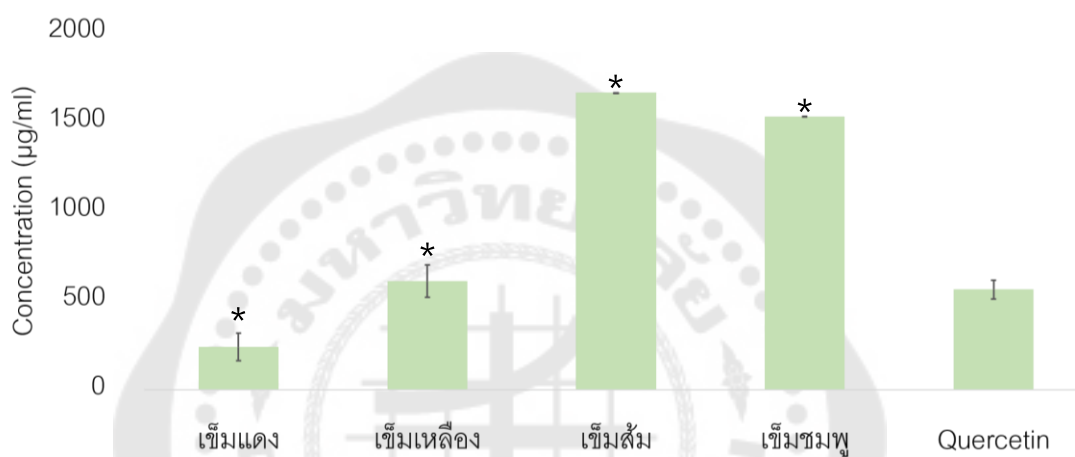


ภาพประกอบ 42 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีส้มที่ความเข้มข้น 1,000-4,000 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส



ภาพประกอบ 43 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีชมพูที่ความเข้มข้น 1,000-10,000 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

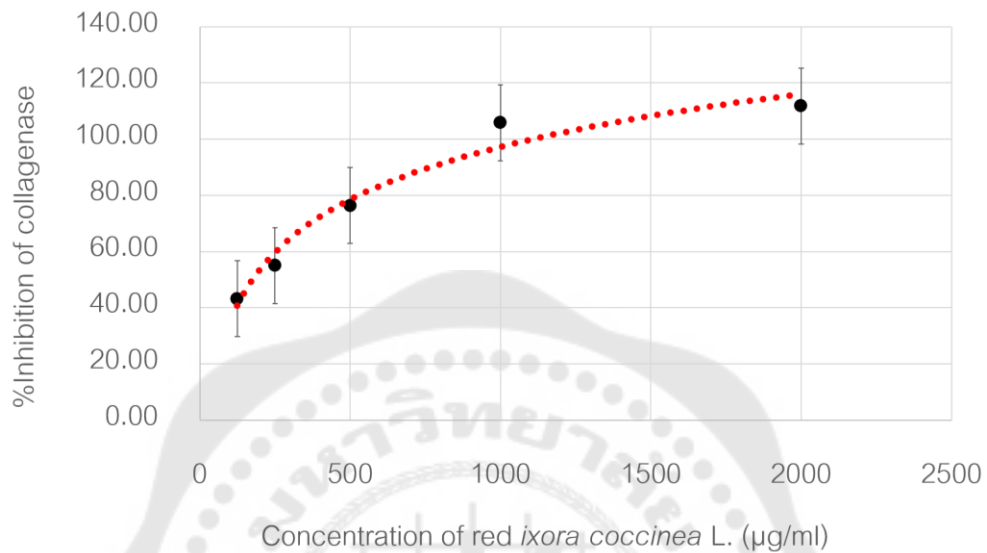
2. ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ 50 ของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ เปรียบเทียบกับ quercetin



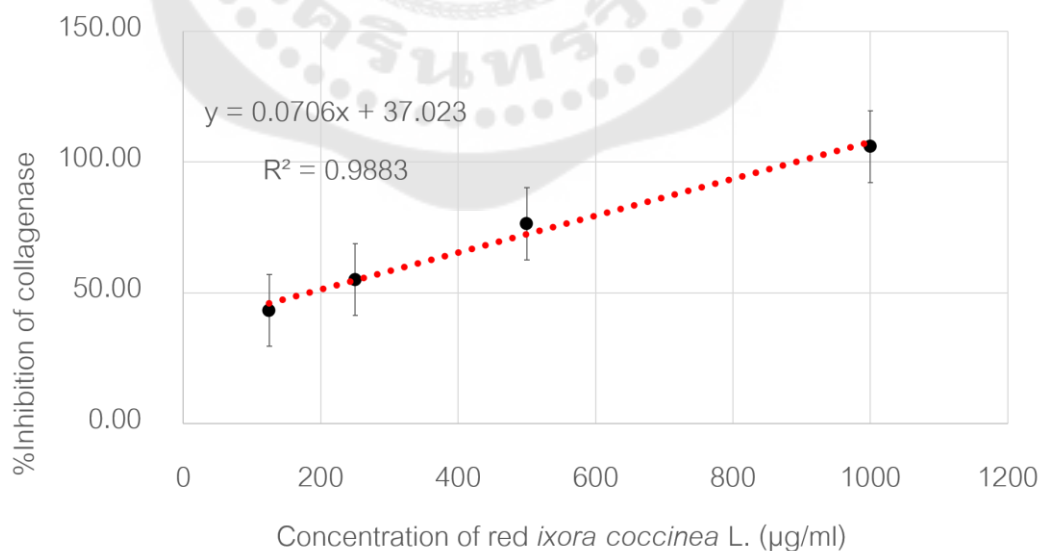
ภาพประกอบ 44 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส \* $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ quercetin



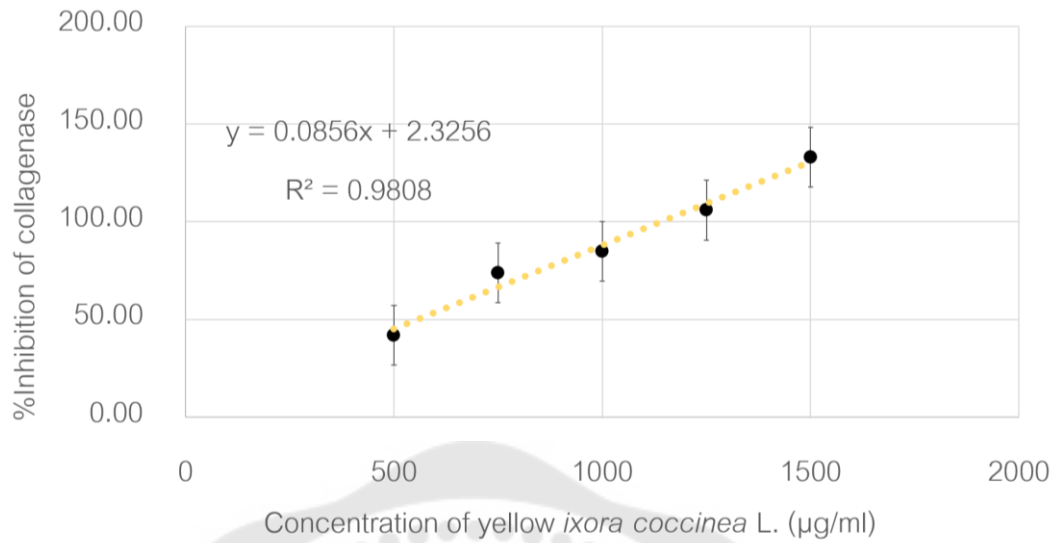
3. ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพู ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามลำดับ



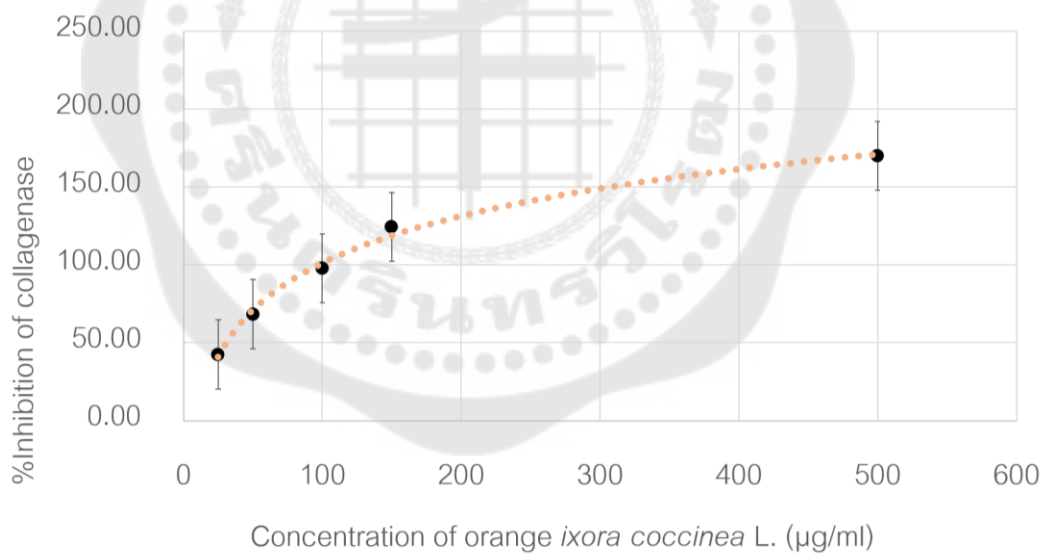
ภาพประกอบ 45 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีแดง ที่ความเข้มข้น 125-2000 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส



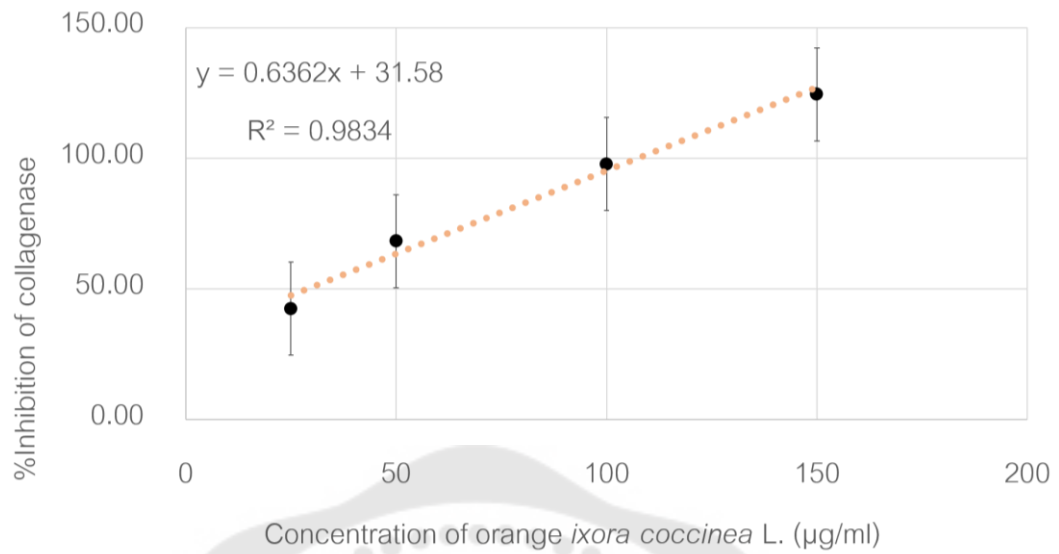
ภาพประกอบ 46 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีแดง ที่ความเข้มข้น 125-1000 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส



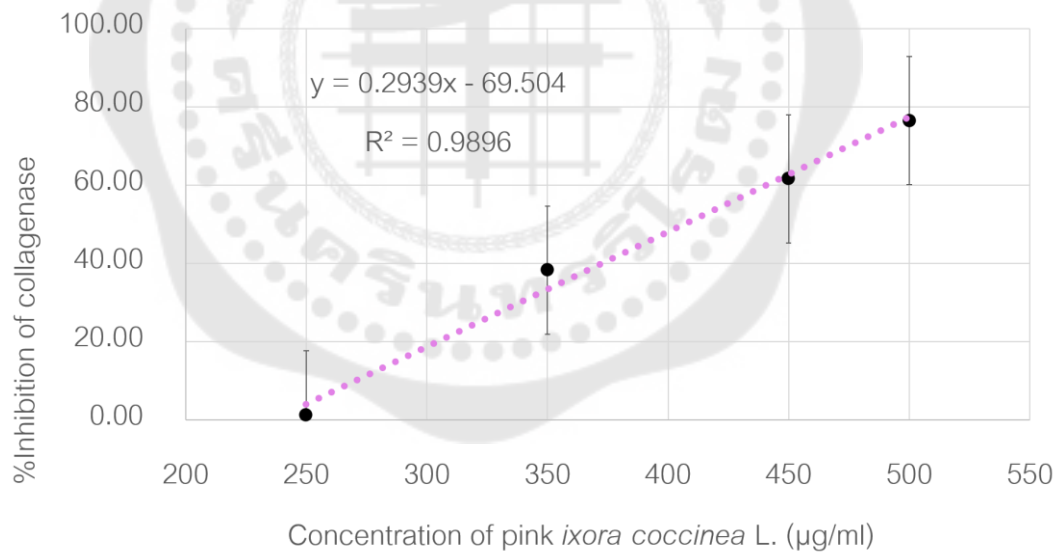
ภาพประกอบ 47 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีเหลือง ที่ความเข้มข้น 500-1500 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส



ภาพประกอบ 48 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีส้ม ที่ความเข้มข้น 25-500 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส

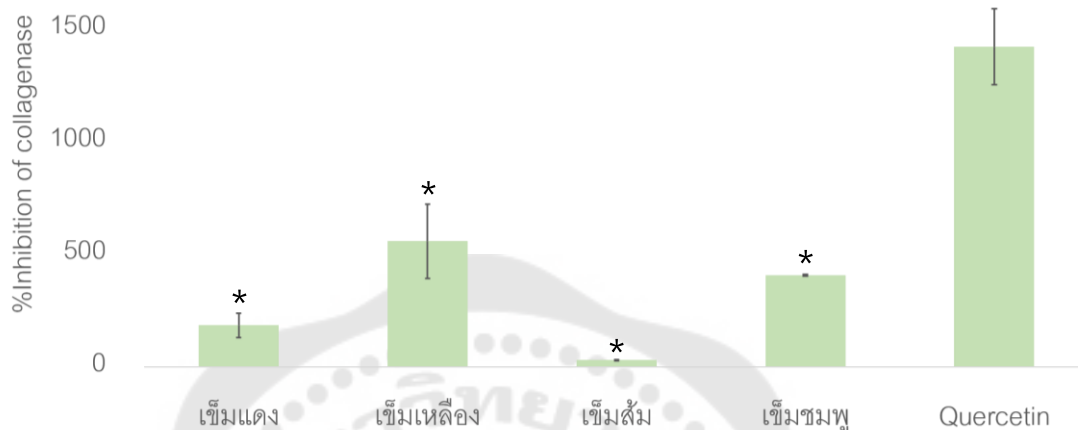


ภาพประกอบ 49 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีส้ม ที่ความเข้มข้น 25-150 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส



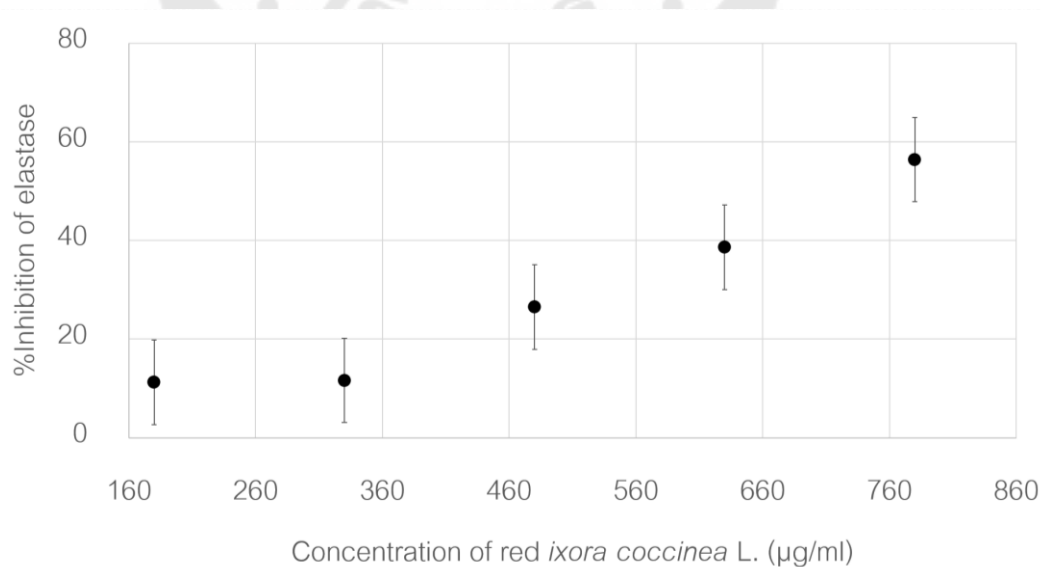
ภาพประกอบ 50 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีชมพู ที่ความเข้มข้น 250-500 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส

4. ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ 50 ของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ เปรียบเทียบกับ quercetin

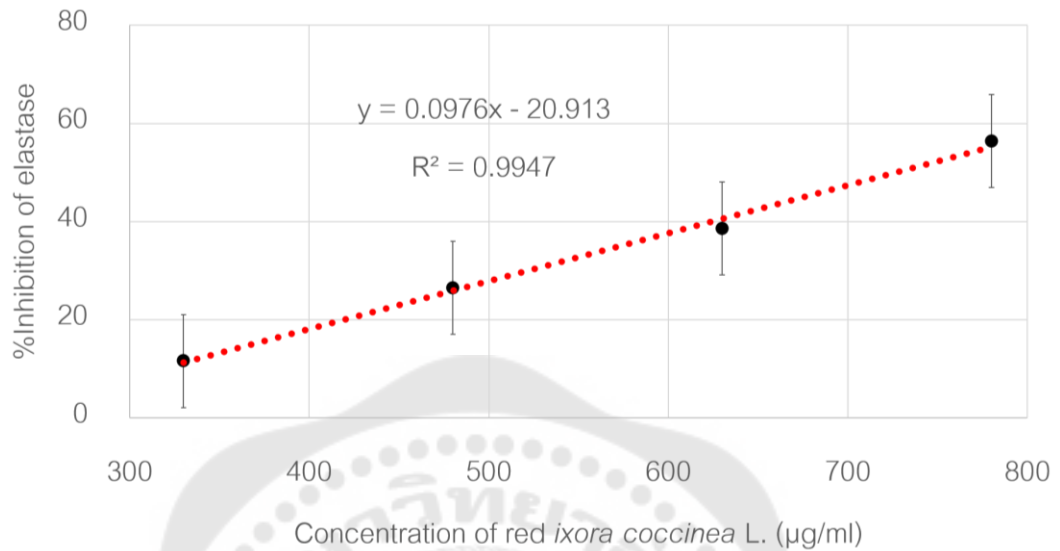


- ภาพประกอบ 51 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส \* $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ quercetin

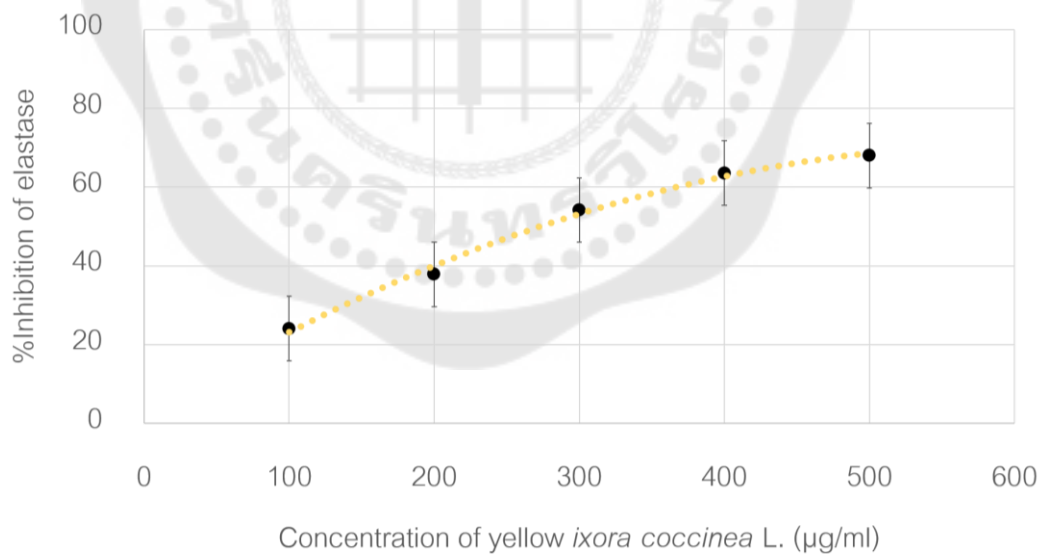
5. ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีส้ม และสีชมพู ที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ



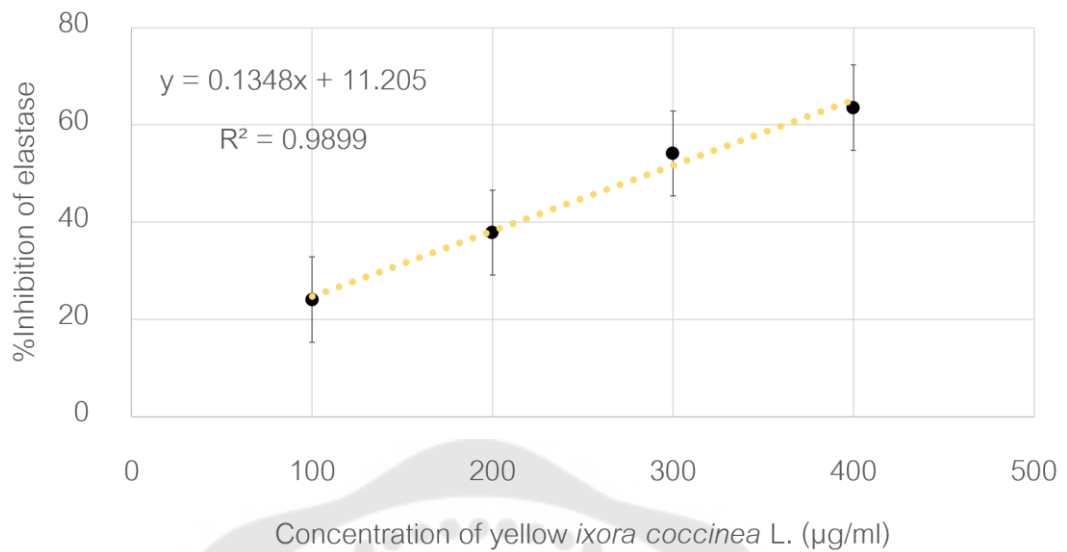
- ภาพประกอบ 52 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีแดง ที่ความเข้มข้น 180-780 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส



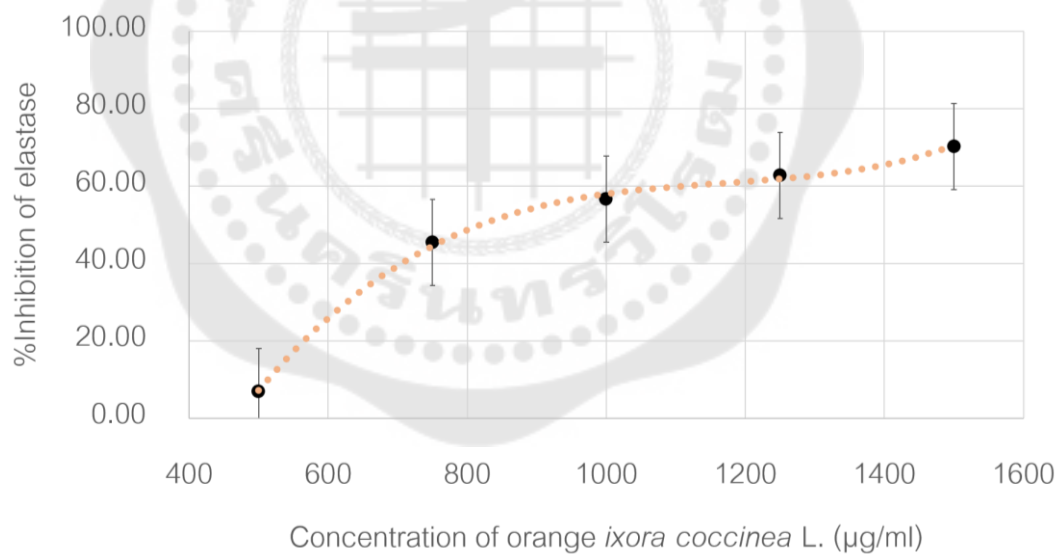
ภาพประกอบ 53 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีแดง ที่ความเข้มข้น 330-780 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส



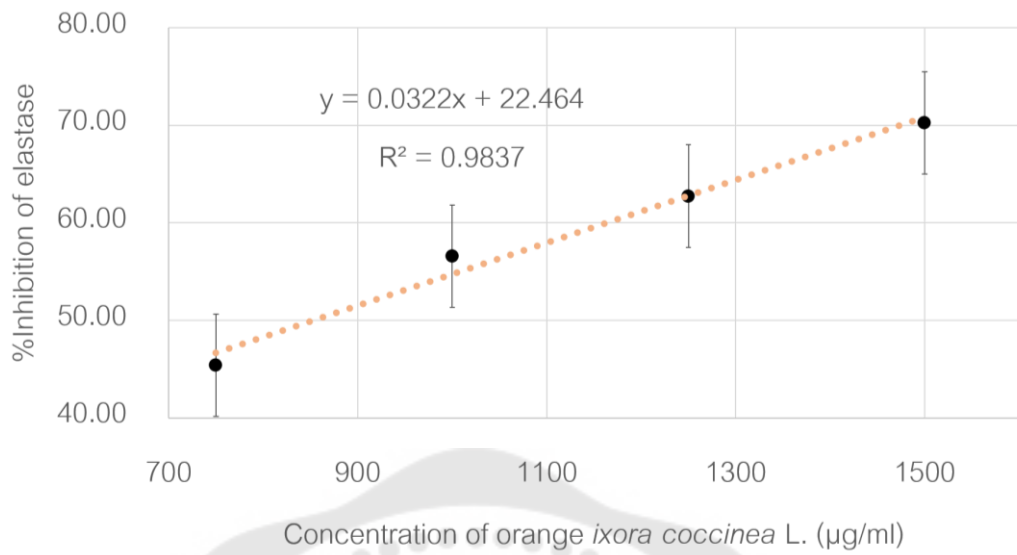
ภาพประกอบ 54 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีเหลือง ที่ความเข้มข้น 100-500 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส



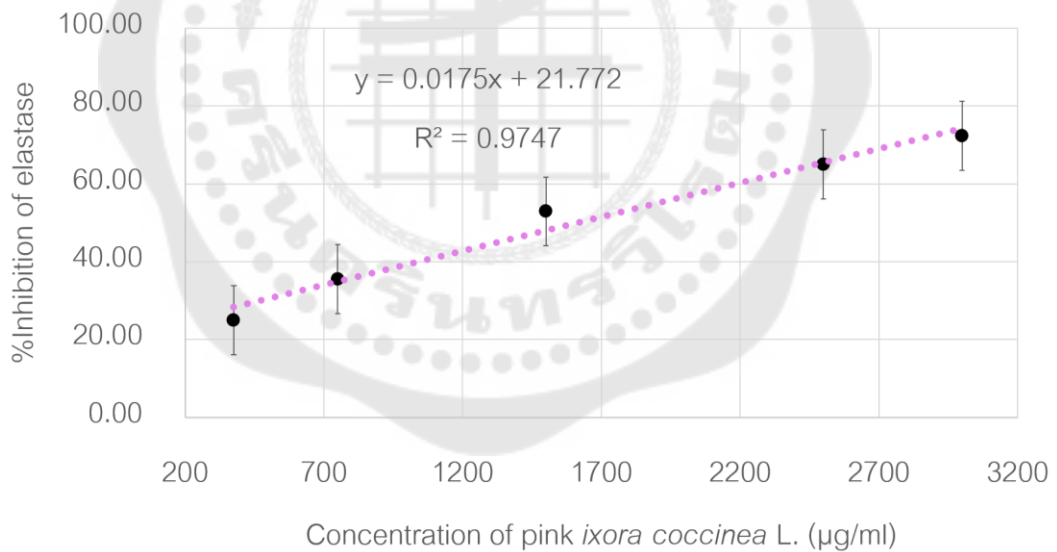
ภาพประกอบ 55 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีเหลือง ที่ความเข้มข้น 100-400 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส



ภาพประกอบ 56 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีส้ม ที่ความเข้มข้น 500-1,500 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส

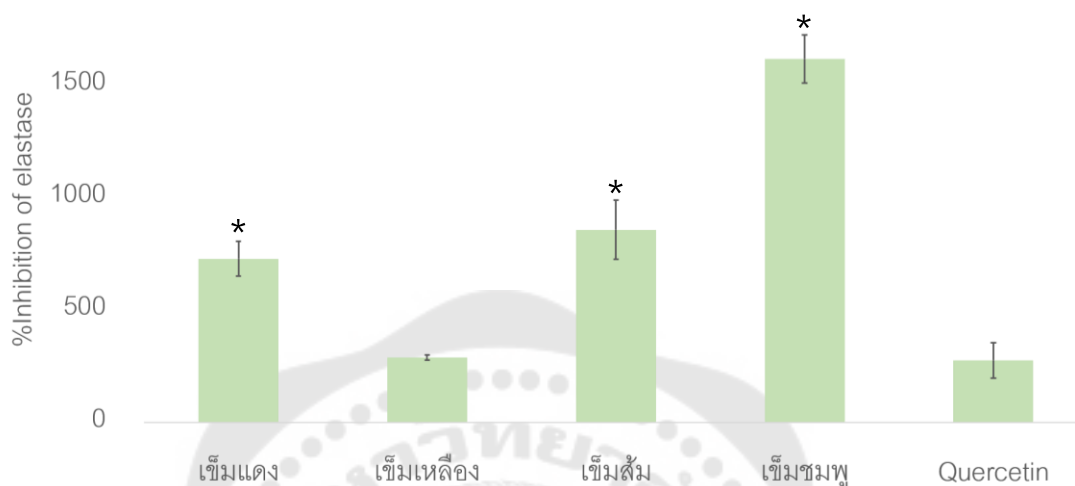


ภาพประกอบ 57 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีส้ม ที่ความเข้มข้น 750-1,500 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส



ภาพประกอบ 58 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีชมพู ที่ความเข้มข้น 375-3,000 µg/ml กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส

6. ค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสที่ 50 ของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ เปรียบเทียบกับ quercetin



ภาพประกอบ 59 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส \* $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับ quercetin

7. การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีชมพู และสีส้ม

ตาราง 30 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีต่างๆ

Multiple Comparisons (%inhibition)

(J) Family	(J) Family	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Turkey HSD	Red	Yellow	-362.59	448.85	.849	-1799.95	1074.77
		Orange	-1383.48	448.85	.059	-2820.84	53.88
		Pink	-1499.25	448.85	.041	-2936.61	-61.89
Yellow	Red	362.59	448.85	.849	-1074.77	1799.95	
		Orange	-1020.88	448.85	.183	-2458.24	416.48
		Pink	-1136.66	448.85	.128	-2574.02	300.70
Orange	Red	1383.48	448.85	.059	-53.88	2820.84	
		Yellow	1020.88	448.85	.183	-416.48	2458.24
		Pink	-115.78	448.85	.994	-1553.14	1321.58
Pink	Red	1499.25	448.85	.041	61.89	2936.61	
		Orange	1136.66	448.85	.128	-300.70	2574.02
		Yellow	115.78	448.85	.994	-1321.58	1553.14



จากตารางที่ 30 เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ แล้วนำมาเปรียบเทียบกันพบว่าสารสกัดดอกเข็มสีแดงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่แตกต่างกับสารสกัดดอกเข็มสีชมพู อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ  $p < 0.05$  แต่สารสกัดดอกเข็มสีอื่น ๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ไม่แตกต่างกัน

#### 8. การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีชมพู และสีส้ม

ตาราง 31 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ

Multiple Comparisons (%inhibition)							
(J) Family	(J) Family	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Turkey HSD	Red	Yellow	-361.68	123.27	.073	-756.43	33.08
		Orange	145.59	123.27	.654	-249.17	540.34
		Pink	-231.88	123.27	.307	-626.63	162.88
Yellow	Red	Orange	361.68	123.27	.073	-33.08	756.43
		Pink	507.26	123.27	.014	112.51	902.02
		Red	129.80	123.27	.725	-264.96	524.56
Orange	Red	Yellow	-145.59	123.27	.654	-540.34	249.17
		Pink	-507.26	123.27	.014	-902.02	-112.51
		Red	-377.46	123.27	.061	-772.22	17.29
Pink	Red	Orange	231.88	123.27	.307	-162.88	626.63
		Yellow	-129.80	123.27	.725	-524.56	264.96
		Red	377.46	123.27	.061	-17.29	772.22

จากตารางที่ 31 เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่าสารสกัดดอกเข็มสีส้มมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่แตกต่างกับสารสกัดดอกเข็มสีชมพู อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ  $p < 0.05$  แต่สารสกัดดอกเข็มสีอื่น ๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสที่ไม่แตกต่างกัน

9. การเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีแดง สีเหลือง สีชมพู และสีส้ม

ตาราง 32 แสดงการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ

		Multiple Comparisons (%inhibition)					
(J) Family	(J) Family	(J) Family	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Turkey HSD	Red	Yellow	300.24	149.59	.283	-217.59	818.07
		Orange	-140.72	133.80	.728	-603.88	322.44
		Pink	-1283.56	149.59	.001	-1801.40	-765.73
	Yellow	Red	-300.24	149.59	.283	-818.07	217.59
		Orange	-440.96	149.59	.092	-958.79	76.87
		Pink	-1583.80	163.87	.000	-2151.06	-1016.55
	Orange	Red	140.72	133.80	.728	-322.44	603.88
		Yellow	440.96	149.59	.092	-76.87	958.79
		Pink	-1142.84	149.59	.001	-1660.68	-625.01
	Pink	Red	1283.56	149.59	.001	765.73	1801.40
		Orange	1583.80	163.87	.000	1016.55	2151.06
		Yellow	1142.84	149.59	.001	625.01	1660.68

จากตารางที่ 32 เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดดอกเข็มสีต่าง ๆ แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่าสารสกัดดอกเข็มสีชมพูมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสที่แตกต่างกับสารสกัดดอกเข็มสีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ  $p < 0.05$  แต่สารสกัดดอกเข็มสีอื่น ๆ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสที่ไม่แตกต่างกัน

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ศุภเศรษฐ์ เลิศกาญจนศักดิ์
วัน เดือน ปี เกิด	8 พฤษภาคม 2540
สถานที่เกิด	จังหวัดราชบุรี
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี เกษศาสตร์บัณฑิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	100/88 หมู่ 8 ตำบลบางพูด อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี 11120

