



การหาปริมาณฟลาโวนอยด์และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส
เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง

DETERMINATION OF FLAVONOIDS AND ANTI-COLLAGENASE, ANTI-
ELASTASE AND ANTI-TYROSINASE ACTIVITIES TESTING OF YELLOW WATER LILY
PETAL AND STAMEN EXTRACTS

รัชชานา ชิตามระ

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส
เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

DETERMINATION OF FLAVONOIDS AND ANTI-COLLAGENASE, ANTI-
ELASTASE AND ANTI-TYROSINASE ACTIVITIES TESTING OF YELLOW WATER LILY
PETAL AND STAMEN 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

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การหาปริมาณฟลาโวนอยด์และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส
เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง
ของ

รัชชนา ชิตามระ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง) (รองศาสตราจารย์ ดร.ชุตตา จิตตสุโก)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัฒนพร พัฒนภักดี) (รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี)

ชื่อเรื่อง	การหาปริมาณฟลาโวนอยด์และการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง
ผู้วิจัย	รัชชานา ชิตามระ
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัฒนพร พัฒนภักดี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สำหรับการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ (catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin) ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography และทดสอบฤทธิ์ชะลอวัยของผิวหนังโดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดจากกลีบดอกมี epicatechin 4.20 %w/w และ hesperidin 8.18 %w/w ส่วนสารสกัดจากเกสรมี epicatechin 2.49 %w/w, rutin 2.80 %w/w และ hesperidin 5.06 %w/w จากผลการทดสอบฤทธิ์ชะลอวัย พบว่ากลีบดอกแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสมากกว่าเกสรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) เท่ากับ 0.42 และ 0.52 mg/mL ตามลำดับ และกลีบดอกแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสน้อยกว่าเกสรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.84 และ 1.62 mg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ากลีบดอกและเกสรแสดงฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.85 และ 0.84 mg/mL ตามลำดับ จากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ และสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สารสกัดดังกล่าวเป็นส่วนประกอบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ลดริ้วรอยและลดจุดด่างดำของผิวหนังได้

คำสำคัญ : ฟลาโวนอยด์, ฤทธิ์ยับยั้งคอลลาจีเนส, ฤทธิ์ยับยั้งอีลาสเตส, ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส, สารสกัดจากกลีบดอกและเกสร, บัวสาย

Title	DETERMINATION OF FLAVONOIDS AND ANTI-COLLAGENASE, ANTI-ELASTASE AND ANTI-TYROSINASE ACTIVITIES TESTING OF YELLOW WATER LILY PETAL AND STAMEN EXTRACTS
Author	RUNCHANA CHITAMARA
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Associate Professor Sarin Tadtong , Ph.D.
Co Advisor	Assistant Professor Wattanaporn Pattanapukdee , Ph.D.

The objectives of this study are (1) to develop and to validate a method for the determination of seven flavonoids (catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin and hesperetin) in petal and stamen extracts from yellow water lilies; and (2) to evaluate the skin anti-aging properties by testing collagenase, elastase and tyrosinase inhibitory activities. The results showed that epicatechin and hesperidin were found in the petals (4.20 and 8.18 %w/w, respectively) while epicatechin, rutin and hesperidin were found in the stamen (2.49, 2.80 and 5.06 %w/w, respectively). The petals exhibited significantly higher collagenase inhibition activity than the stamen with half of the maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.42 and 0.52 mg/mL, respectively. The petals had significantly lower elastase inhibitory activity compared to the stamen with an IC_{50} of 1.84 and 1.62 mg/mL, respectively. Both the petals and the stamen showed similar tyrosinase inhibitory activity with an IC_{50} of 0.85 and 0.84 mg/mL, respectively. These results showed that the method was accurate and precise enough to determine seven flavonoids in petal and stamen extracts from yellow water lilies. In addition, the yellow water lily petal and stamen extracts exhibited inhibitory activities against collagenase, elastase and tyrosinase. Therefore, they can be used as ingredients for the development of anti-wrinkle and anti-blemish products.

Keyword : Flavonoids, Anti-Collagenase, Anti-Elastase, Anti-Tyrosinase, Petal and stamen extracts, Water lilies

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ เนื่องจากความช่วยเหลือ การชี้แนะ รวมถึงการถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์จากอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ รศ.ดร.สริน ทัดทอง และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร.วัฒนพร พัฒนภักดี ที่สละเวลาทุ่มเทให้คำปรึกษาตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้เพื่อนำไปใช้ในการประกอบวิชาชีพและนำไปใช้ในการประมวลความรู้ความเข้าใจเพื่อต่อยอดเป็นปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ และขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ชุติน จิตตสุโก และ รศ.ดร.วีระศักดิ์ สามิ ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ อ.ดร. วิภาพร เสรีเด่นชัย ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบโครงร่างปริญญานิพนธ์ รวมทั้ง ผศ.ชญานิส ศรชัยธวัชวงศ์ ที่ให้คำแนะนำเพื่อให้ปริญญานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ณ.นพชัย ชาญศิลป์ ผู้อำนวยการสถาบันบัวราชมงคลตะวันออก ที่ให้ความกรุณาระบุสายพันธุ์บัวสายที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท เมดิกา อินโนวา จำกัด ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือ แนะนำ และอำนวยความสะดวกในการเบิกจ่ายอุปกรณ์และสารเคมีมาโดยตลอด

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับทุนสนับสนุนการไปเข้าร่วมเสนอผลงานวิชาการและให้การสนับสนุนสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวสำหรับกำลังใจ แรงบันดาลใจ และคอยช่วยเหลือสนับสนุนตลอดมา

รัชชานา ชิตามระ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ภูมิหลังของงานวิจัย	1
2. ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	3
3. ความสำคัญของการวิจัย	4
4. ขอบเขตของการวิจัย	4
5. กรอบแนวคิดในงานวิจัย.....	5
6. สมมุติฐานในการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
1. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids).....	6
2. บัวสาย.....	11
3. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography	12
4. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Method Validation).....	13
5. สรีรวิทยาของและการเสื่อมสภาพของผิวหนัง.....	16
6. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนส	19

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี	23
2. วิธีการศึกษา.....	25
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	51
1. การศึกษาสภาวะของ HPLC ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์.....	51
2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC.....	52
3. การวิเคราะห์สารสกัดบัวสายสีเหลือง	59
4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส	61
5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส.....	64
6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	67
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	71
สรุปผลการวิจัย.....	71
อภิปรายผลการวิจัย	74
ข้อเสนอแนะ	75
บรรณานุกรม	77
ประวัติผู้เขียน.....	83

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	31
ตาราง 2 การเตรียม spiked solution ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสาย สีเหลือง	35
ตาราง 3 การลำดับและปริมาตรการเติมสารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส	42
ตาราง 4 การลำดับและปริมาตรการเติมสารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการ ทำงานของ PPE	46
ตาราง 5 การลำดับและปริมาตรการเติมสารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส	49
ตาราง 6 สภาวะของ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์	51
ตาราง 7 gradient elution ที่ใช้ในการวิเคราะห์	51
ตาราง 8 ผลการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์	52
ตาราง 9 retention time และ resolution ของ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin	54
ตาราง 10 สมการแสดงความสัมพันธ์ ค่า r และช่วงของความเข้มข้นที่ของฟลาโวนอยด์แต่ละ ชนิด	55
ตาราง 11 ค่าเฉลี่ยของปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบ SD และ %RSD ของการทดสอบ repeatability (n = 6)	56
ตาราง 12 ค่าเฉลี่ยของปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบ SD และ %RSD ของการทดสอบ intermediate precision (n = 12)	56
ตาราง 13 ปริมาณฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดที่เติมลงในสารตัวอย่างและค่าเฉลี่ย % recovery ของ การทดสอบความถูกต้อง (n = 3)	57

ตาราง 14	ขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณของ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin.....	58
ตาราง 15	ผลการวิเคราะห์ของสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลือง	60
ตาราง 16	ผลการวิเคราะห์ของสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลือง	61
ตาราง 17	ค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition ของสารละลาย EGCG ที่แต่ละความเข้มข้น	62
ตาราง 18	ค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่แต่ละความเข้มข้น	63
ตาราง 19	ค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition ของสารละลาย EGCG ที่แต่ละความเข้มข้น	65
ตาราง 20	ค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่แต่ละความเข้มข้น.....	66
ตาราง 21	ค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition ของสารละลาย kojic acid ที่แต่ละความเข้มข้น	68
ตาราง 22	ค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่แต่ละความเข้มข้น.....	69

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 โครงสร้างหลักของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์.....	7
ภาพประกอบ 2 ตัวอย่างโครงสร้างของฟลาโวนอยด์.....	7
ภาพประกอบ 3 ตัวอย่างโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavones.....	8
ภาพประกอบ 4 ตัวอย่างโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavonols.....	9
ภาพประกอบ 5 ตัวอย่างโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavanones.....	9
ภาพประกอบ 6 ตัวอย่างโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavanols.....	10
ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของผิวหนัง.....	16
ภาพประกอบ 8 chromatogram จากการวิเคราะห์โดย (ก) เป็น chromatogram ของ diluent และ (ข) เป็น chromatogram ของสารละลายมาตรฐานผสม ซึ่งประกอบด้วย catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin.....	53
ภาพประกอบ 9 chromatogram จากการวิเคราะห์สารสกัดจากกลีบดอก.....	59
ภาพประกอบ 10 chromatogram จากการวิเคราะห์สารสกัดจากเกสร.....	60
ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย EGCG และ ค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition.....	62
ภาพประกอบ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition.....	63
ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากเกสรบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition.....	64
ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย EGCG และ ค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition.....	65
ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition.....	66

ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากเกสร บัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition	67
ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย kojic acid และ ค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition	68
ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากกลีบ ดอกบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition.....	69
ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากเกสร บัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition	70



บทที่ 1

บทนำ

1. ภูมิหลังของงานวิจัย

จากการประมาณอายุคาดเฉลี่ยของประชากรไทยโดยสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ พบว่าในปีพ.ศ. 2553 ประชากรชายมีอายุคาดเฉลี่ยเท่ากับ 70.4 ปี ประชากรหญิงมีค่าเท่ากับ 77.5 ปี และในปีพ.ศ. 2583 อายุคาดเฉลี่ยของประชากรชายมีค่าเท่ากับ 77.5 ปี ประชากรหญิงมีค่าเท่ากับ 81.9 ปี (สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, 2556) พบว่าอายุคาดเฉลี่ยของประชากรไทยมีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้ผู้สูงอายุมีจำนวนมากขึ้น เมื่อมนุษย์มีอายุเพิ่มขึ้น สิ่งที่เกิดขึ้นตามมาคือความเปลี่ยนแปลงต่างๆ ทั้งที่สามารถเห็นได้จากภายนอก เช่น สิว ผื่น เป็นต้น และการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สามารถเห็นได้จากภายนอก เช่น การมองเห็น ประสิทธิภาพการทำงานของอวัยวะต่างๆ ความจำ เป็นต้น ความเปลี่ยนแปลงต่างๆ เหล่านี้ล้วนส่งผลกระทบต่อการดำเนินชีวิต ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการและแนวทางในการชะลอวัย เพื่อลดความเปลี่ยนแปลงอันเกิดจากการเพิ่มขึ้นของอายุ และเพื่อให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

การเสื่อมสภาพของผิวหนัง (skin aging) เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้อย่างชัดเจนเนื่องจากผิวหนังเป็นอวัยวะที่ปกคลุมทั่วร่างกาย สามารถมองเห็นได้จากภายนอก โครงสร้างของผิวหนังมี 3 ชั้น ได้แก่ หนังกาพรำ (epidermis) หนังแท้ (dermis) และชั้นไขมัน (subcutaneous tissue) โดยหนังแท้ทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงและความยืดหยุ่นให้กับผิวหนังเนื่องจากบริเวณ extracellular matrix (ECM) ของหนังแท้ มีคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบซึ่งทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงและอีลาสตินที่ให้ความยืดหยุ่น ลักษณะของผิวหนังที่เสื่อมสภาพ เช่น การเกิดริ้วรอย การเกิดความผิดปกติของสีผิว ผิวหนังแห้งเหี่ยว เป็นต้น โดยมีปัจจัยที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสภาพของผิวหนัง เช่น การสัมผัสกับแสงแดด มลพิษทางอากาศ การสูบบุหรี่ การเกิดภาวะขาดสารอาหาร พันธุกรรม อายุ เป็นต้น โดยมีสมมุติฐานว่าปัจจัยเหล่านี้เหนี่ยวนำให้มีจำนวนอนุมูลอิสระ อนุพันธ์ออกซิเจนว่องไว (reactive oxygen species, ROS) เพิ่มขึ้น และเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidation stress) ส่งผลให้กลุ่มของเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMP) มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) ที่นอกจากจะทำลายคอลลาเจนแล้ว ยังยับยั้งการสร้างคอลลาเจนอีกด้วย ซึ่งส่งผลกระทบต่อสมดุลในการสร้างและทำลายคอลลาเจน กลุ่มของเอนไซม์ MMP ยังประกอบด้วย

เอนไซม์อีลาสเตส (elastase) ที่ทำลายอีลาสตินในผิวหนัง ปริมาณอีลาสตินที่ลดลงส่งผลให้เกิดริ้วรอย รวมทั้งเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและข้ออักเสบอีกด้วย (Gragnani et al., 2014; Pittayapruerk, Meephansan, Prapapan, Komine, & Ohtsuki, 2016; Tobin, 2017)

การเสื่อมสภาพของผิวหนัง นอกจากการเกิดริ้วรอยแล้ว สิ่งที่เห็นได้ชัดเจนอีกอย่างหนึ่งคือการเกิดจุดด่างดำ ซึ่งเป็นผลจากอายุที่เพิ่มขึ้นรวมทั้งการกระตุ้นจากรังสียูวี จุดด่างดำเกิดจากความผิดปกติของ melanocyte ในชั้นหนังกำพร้า โดยปกติ melanocyte จะใช้เอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ในการสร้างเม็ดสีเมลานินเพื่อปกป้องผิวหนังจากรังสียูวี เมื่อ melanocyte มีจำนวนมากขึ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้น จึงส่งผลให้เกิดจุดด่างดำที่บริเวณผิวหนังได้ (Ebanks, Wickett, & Boissy, 2009; Tobin, 2017)

หนึ่งในแนวทางในการป้องกันการเกิดริ้วรอยคือการลดการเสื่อมสลายของคอลลาเจนและอีลาสติน พบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระทาบนผิวหนัง นอกจากจะสามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระและลดการเหนี่ยวนำของเอนไซม์ MMP แล้ว ยังช่วยลดการอักเสบบริเวณผิวหนังอันเป็นต้นเหตุของการเกิดริ้วรอยได้ ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์สำหรับทาผิวหนัง เช่น วิตามินซี วิตามินอี ผลิตภัณฑ์จากพืช เป็นต้น (Baumann, 2007; Campa & Baron, 2018)

ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จัดอยู่ในกลุ่ม secondary metabolite สร้างจากพืช มีโครงสร้างเป็น polyphenol ฟลาโวนอยด์สามารถจัดประเภทตามสูตรโครงสร้าง โดยแบ่งออกเป็นหลายกลุ่ม เช่น flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, catechins, anthocyanins และ chalcones เป็นต้น ฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งจะรบกวนทั้งการเกิดและการเพิ่มจำนวนของอนุมูลอิสระ รวมทั้งมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อราและต้านเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าฟลาโวนอยด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส จึงช่วยลดการสร้างเม็ดสีเมลานินจากการถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวีได้ อีกด้วย (Khan et al., 2012; Panche, Diwan, & Chandra, 2016)

จากการศึกษา พบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆของบัวสาย ได้แก่ ผล ดอก ใบ ลำต้น และราก พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์ (total flavonoid content) อยู่ในช่วง 0.09 – 0.97 mg ต่อสารสกัด 100 mg โดยสารสกัดจากดอกบัวสายพบปริมาณฟลาโวนอยด์สูงถึง 0.85 mg ต่อสารสกัด 100 mg เมื่อใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้วิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และใช้ quercetin เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดจากดอกบัวสายแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยมีค่า

The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) เท่ากับ 17 $\mu\text{g/mL}$ และสารสกัดจากบัวสายทุกส่วนมีค่า antioxidant activity index (AAI) มากกว่า 2 ซึ่งบ่งบอกว่าสารสกัดเหล่านี้มีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสารสกัดจากดอกและผลของบัวสายมีค่า AAI สูงที่สุด (Cudalbeanu et al., 2018) นอกจากนี้ยังพบว่าในการสกัดสารสกัดจากกลีบและเกสรบัวสายสีเหลือง ให้ปริมาณของสารสกัด (Extraction yield) สูงเมื่อเทียบกับการสกัดสารสกัดจากกลีบและเกสรบัวสายสีอื่นๆ (กัลยากร กู้กิมัน และ นันทน์ภัส ภัทรเศรษฐไชย, 2558; นนทวรรณ จำลองรักษ์ และ กิตติศักดิ์ ไกรสัย, 2556)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากพืช สามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE) เป็นต้น โดยเทคนิคที่นิยมใช้มากที่สุดคือ HPLC เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความสามารถในการแยกสูงและยังสามารถวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ได้ทุกกลุ่ม (Andersen & Markham, 2005) อย่างไรก็ตามชนิดของฟลาโวนอยด์และสารสกัดที่ต้องการวิเคราะห์ ล้วนมีผลต่อการกำหนดสภาวะในวิเคราะห์ ดังนั้นการพัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อ 1) พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในการหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง 2) ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง

2. ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

2.1 เพื่อพัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารมาตรฐาน catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin ด้วยเทคนิค HPLC

2.2 เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ในการหาปริมาณ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง

2.3 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว

2.4 เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง

3. ความสำคัญของการวิจัย

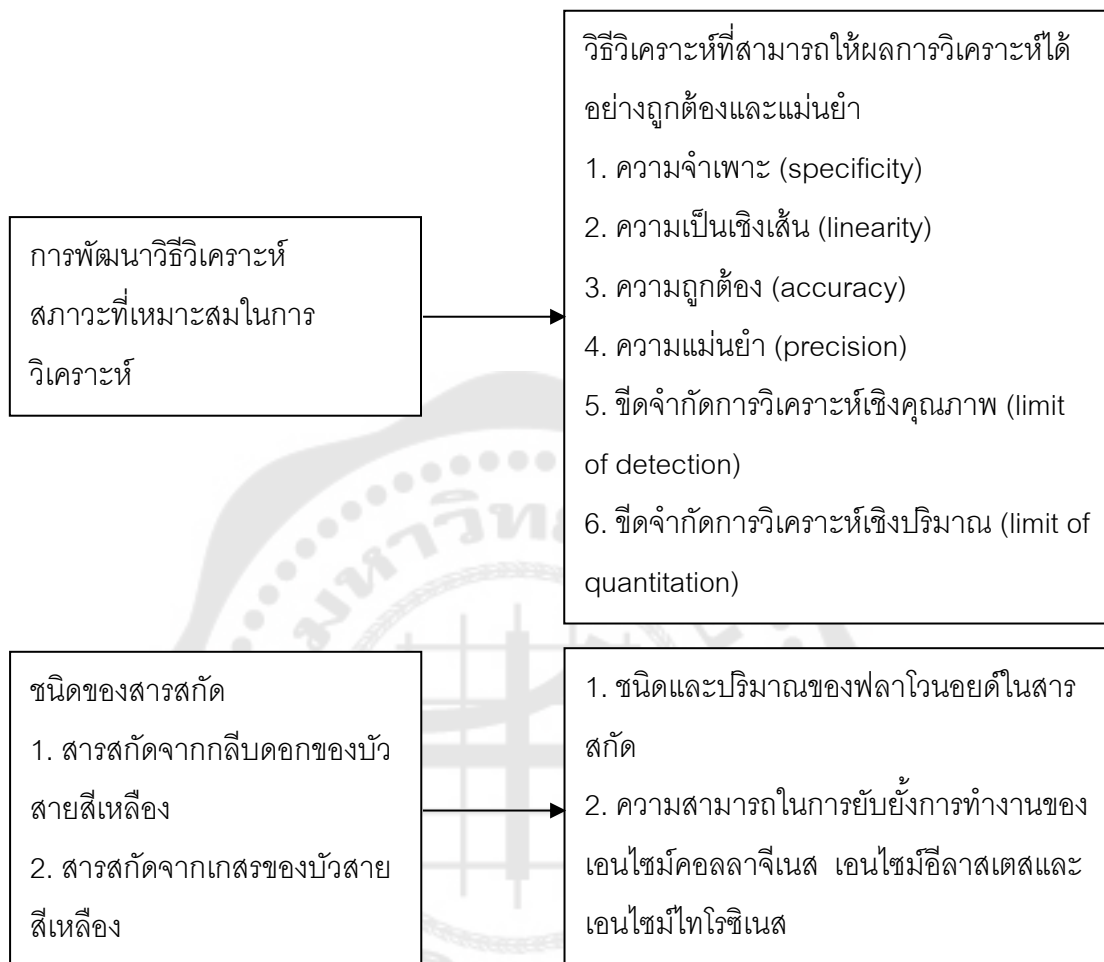
งานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง เพื่อให้ทราบถึงปริมาณและชนิดของฟลาโวนอยด์ที่มีในสารสกัด รวมทั้งทราบถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้สารสกัดเพื่อพัฒนานวัตกรรมที่มีฤทธิ์ชะลอการเสื่อมสภาพของผิวหนัง

4. ขอบเขตของการวิจัย

พัฒนาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในการหาปริมาณ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ แล้วจึงนำวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมาวิเคราะห์หาปริมาณ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง หลังจากนั้นนำสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนส

สำหรับสารสกัดจากดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองเป็นสารสกัดที่ได้รับจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยสกัดจากบัวสายที่มีกลีบดอกสีเหลืองสาย (Nymphaea mexicana "Charlene Strawn") ที่เก็บเกี่ยวบริเวณรอบมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ อำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก ประเทศไทย สกัดโดยวิธีการหมักและใช้สารละลาย 80% เอทานอล (ethanol) เป็นตัวทำละลาย

5. กรอบแนวคิดในงานวิจัย



6. สมมุติฐานในการวิจัย

6.1 วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ สามารถหาปริมาณ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

6.2 สารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนสได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

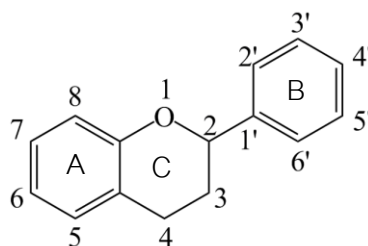
ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids)
2. บัวสาย
3. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography
4. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (analytical method validation)
5. สรีรวิทยาและการเสื่อมสภาพของผิวหน้ง
6. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนส

1. สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

สารพฤกษเคมีที่พบมากที่สุดในพื้นที่คือ สารประกอบในกลุ่มฟีนอล ซึ่งสารในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิกและโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอลกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบในพืช จัดเป็น secondary metabolites มีลักษณะเป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ พบในเกือบทุกส่วนของพืช ซึ่งฟลาโวนอยด์มีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดสี กลิ่นและรสชาติของผล ดอกและเมล็ดของพืช โดยฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ anthocyanins เป็นฟลาโวนอยด์ที่มีสีแดง น้ำเงินและม่วง อีกกลุ่มคือ anthoxanthins รวมทั้ง flavones, flavonols, flavanols ซึ่งเป็นฟลาโวนอยด์ที่ไม่มีสี มีสีขาวหรือเหลือง (King AMY, 1999; Mierziak, Kostyn, & Kulma, 2014)

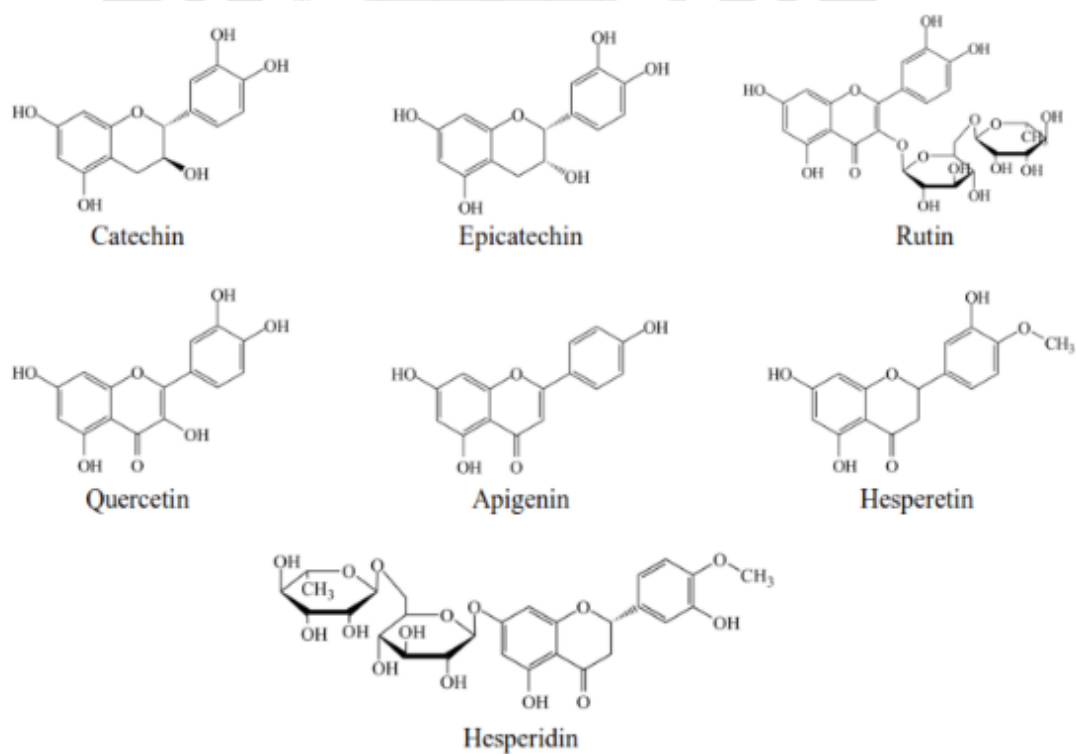
สารตั้งต้นที่ใช้ในการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์คือ p-coumaroyl-CoA และ malonyl-CoA ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการสังเคราะห์ทำให้เกิดเป็นสารที่มีโครงสร้างแตกต่างกัน เกิดเป็นกลุ่มย่อยของสารประกอบฟลาโวนอยด์ เช่น flavones, flavonols, flavanones, flavanols, anthocyanins เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้ยังคงมีโครงสร้างหลักเหมือนกัน โดยโครงสร้างหลักของฟลาโวนอยด์ประกอบด้วย phenyl 2 วง (วง A และวง B) และ heterocyclic ring 1 วง (วง C) ดังแสดงในภาพประกอบ 1 (Mierziak et al., 2014; Panche et al., 2016)



ภาพประกอบ 1 โครงสร้างหลักของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์

ที่มา: Banjarnahor, Sofna DS, & Artanti, Nina. (2015). Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*, 23(4), 239-244.

ฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามสูตรโครงสร้างได้หลายกลุ่ม โดยโครงสร้างของตัวอย่างฟลาโวนอยด์ที่พบในแต่ละกลุ่มแสดงในภาพประกอบ 2 (Banjarnahor & Artanti, 2015; Panche et al., 2016)

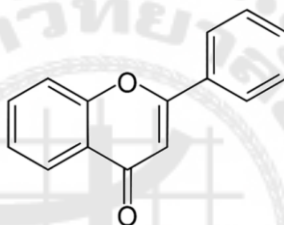


ภาพประกอบ 2 ตัวอย่างโครงสร้างของฟลาโวนอยด์

1.1 ตัวอย่างกลุ่มย่อยของสารประกอบฟลาโวนอยด์

1.1.1 Flavones

สารในกลุ่ม flavones จะมีพันธะคู่อยู่ระหว่างตำแหน่งที่ 2 และตำแหน่งที่ 3 และมีหมู่คีโตนที่ตำแหน่งที่ 4 ของวง C นอกจากนี้สารในกลุ่ม flavones ส่วนมากจะมีหมู่ hydroxy ที่ตำแหน่งที่ 5 หรือตำแหน่งที่ 7 ของวง A หรือตำแหน่งที่ 3' หรือตำแหน่งที่ 4' ของวง B โดยโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavones แสดงในภาพประกอบ 3 (Mierziak et al., 2014) flavones เป็นฟลาโวนอยด์ที่พบได้ทั่วไปในใบ ดอกและผลของพืช ตัวอย่างของฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในกลุ่ม flavones เช่น apigenin, luteolin เป็นต้น โดยมักพบในผักชีฝรั่ง คาโมไมล์ เปะก๊วย ไวน์แดง มะเขือเทศ เป็นต้น

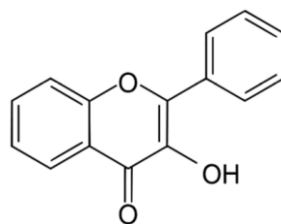


ภาพประกอบ 3 ตัวอย่างโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavones

ที่มา: Mierziak, Justyna, Kostyn, Kamil, & Kulma, Anna. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240-16265.

1.1.2 Flavonols

สารในกลุ่ม flavonols จะมีสูตรโครงสร้างคล้ายสารในกลุ่ม flavones แต่สารในกลุ่มนี้จะมีหมู่ hydroxy ที่ตำแหน่งที่ 3 ของวง C โดยโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavonols แสดงในภาพประกอบ 4 (Mierziak et al., 2014) ตัวอย่างของฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในกลุ่ม flavones เช่น kaempferol, myricetin, quercetin, rutin เป็นต้น โดยมักพบในหัวหอม ผักกาดหอม มะเขือเทศ แอปเปิ้ล องุ่น เป็นต้น

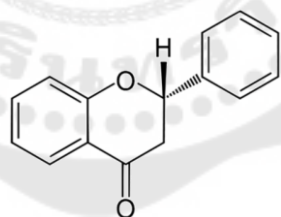


ภาพประกอบ 4 ตัวอย่างโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavonols

ที่มา: Mierziak, Justyna, Kostyn, Kamil, & Kulma, Anna. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240-16265.

1.1.3 Flavanones

โครงสร้างของสารในกลุ่ม flavanones มีลักษณะคล้ายโครงสร้างของสารในกลุ่ม flavones แต่วง C ของ flavanones จะประกอบด้วยพันธะเดี่ยวทั้งหมด โดยโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavanones แสดงในภาพประกอบ 5 (Mierziak et al., 2014) ฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในกลุ่ม flavanones เช่น naringenin, taxifolin, hesperetin, hesperidin เป็นต้น สารในกลุ่มนี้มักพบในพืชสกุลส้ม เช่น ส้ม เลมอน นอกจากนี้ยังพบในองุ่นอีกด้วย

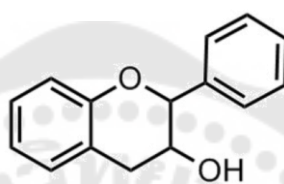


ภาพประกอบ 5 ตัวอย่างโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavanones

ที่มา: Mierziak, Justyna, Kostyn, Kamil, & Kulma, Anna. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240-16265.

1.1.4 Flavanols

สารในกลุ่มนี้จะมีสูตรโครงสร้างคล้ายสารในกลุ่ม flavanones คือ วง C จะประกอบด้วยพันธะเดี่ยวทั้งหมด แต่จะมีหมู่ hydroxy ที่ตำแหน่งที่ 3 ของวง C โดยโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavanols แสดงในภาพประกอบ 6 (Banjarnahor & Artanti, 2015) ฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ เช่น catechin, epicatechin เป็นต้น โดย flavanols พบมากในกล้วย แอปเปิ้ล พีช ลูกแพร ชา เป็นต้น



ภาพประกอบ 6 ตัวอย่างโครงสร้างหลักของสารในกลุ่ม flavanols

ที่มา: Banjarnahor, Sofna DS, & Artanti, Nina. (2015). Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*, 23(4), 239-244.

1.2 ฤทธิ์ทางชีวภาพของฟลาโวนอยด์

จากการศึกษาพบว่าฟลาโวนอยด์บางชนิด เช่น rutin, catechin มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMP) (Mandal, Mandal, Das, Chakraborti, & Chakraborti, 2003; Stipcevic, Piljac, & Berghe, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าฟลาโวนอยด์หลายชนิด เช่น catechin, quercetin, apigenin, hesperetin มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วย (Zolghadri et al., 2019)

1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์สามารถทำได้หลายเทคนิค เช่น thin-layer chromatography (TLC), high-performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrophoresis (CE) เป็นต้น สำหรับเทคนิค gas chromatography (GC) ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากความสามารถในการระเหยของฟลาโวนอยด์ค่อนข้างต่ำ จึงจำเป็นต้องวิเคราะห์โดยการเตรียมให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ สำหรับเทคนิคที่นิยมใช้มากที่สุดคือ HPLC เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความสามารถในการแยกสูง พบว่ามากกว่าร้อยละ 80 ของฟลาโวนอยด์สามารถวิเคราะห์ได้โดย

ใช้เทคนิค HPLC ซึ่งร้อยละ 95 ของวิธีวิเคราะห์ที่รายงานจะทำการวิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ octadecylsilyl (Andersen & Markham, 2005)

2. บัวสาย

บัวสาย (water lily) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Nymphaea* spp. จัดอยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae โดยในวงศ์ Nymphaeaceae ประกอบด้วย 6 สกุล ได้แก่ *Barclaya*, *Euryale*, *Nuphar*, *Nymphaea*, *Ondinea* และ *Victoria* บัวสายจัดอยู่ในสกุล *Nymphaea* ซึ่งปัจจุบันพบประมาณ 50 ชนิด กระจายอยู่เกือบทั่วโลก โดยพบมากบริเวณที่มีภูมิอากาศเขตร้อน เช่น บังกลาเทศ อินเดีย มาเลเซีย พม่า ลาว เวียดนาม รวมทั้งประเทศไทย (Lariushin, 2013; Selvakumari, Shantha, Kumar, & Prabhu, 2016)

บัวสายจัดเป็นพืชน้ำ ดอกและใบงอกจากลำต้นใต้น้ำ เรียกว่าเหง้าบัว ใบบัวมีสีเขียว และมีขนละเอียดปกคลุมทั้งใบ แผ่นใบลอยอยู่บนผิวน้ำ ลักษณะของแผ่นใบและสีของกลีบดอก จะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของบัวสาย ลักษณะของแผ่นใบที่พบมีทั้งใบกลม ใบรูปหัวใจ และใบรูปเกือกม้า ขอบใบหยักเล็กน้อย และมีก้านใบอยู่บริเวณกลางหลังใบ ลักษณะของกลีบดอกเป็นรูปไข่ซ้อนกันอยู่เป็นชั้นๆ มีหลายสี เช่น ขาว ชมพู แดง ม่วง เหลือง เป็นต้น (Lariushin, 2013; กัญญารัตน์ จิราสวัสดิ์, 2014)

นอกเหนือจากการใช้บัวสายเป็นไม้ดอกไม้ประดับแล้ว ยังมีการใช้ส่วนต่างๆ ของบัวเพื่อเป็นอาหารและใช้ในการรักษาในทางการแพทย์แผนโบราณ นอกจากนี้ยังมีการใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางอีกด้วย ในแต่ละส่วนของบัวสายหลายชนิด ประกอบด้วยสารพฤกษเคมี (phytomolecules) หลายชนิด เช่น flavonoids, alkaloids, tannins, lignans และ saponins เป็นต้น (Gupta et al., 2016) สำหรับฟลาโวนอยด์ที่พบในบัวสาย ได้แก่ catechin, epicatechin, rutin, quercetin, apigenin, naringenin, naringin และ kaempferol โดยชนิดและปริมาณของฟลาโวนอยด์ที่พบขึ้นอยู่กัชนิดและแหล่งเพาะปลูกของบัวสาย (Cudalbeanu et al., 2018) สารสกัดจากบัวสายมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ของฮอร์โมนเพศชาย ด้านเชื้อโปรโตซัว ด้านเชื้อแบคทีเรีย คลายกล้ามเนื้อ ด้านโรคซึมเศร้า ด้านเบาหวาน ช่วยปกป้องตับจากสารพิษ บรรเทาอาการปวดและอักเสบ เป็นต้น นอกจากนี้สารสกัดจากบัวสายยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Fajemiroye, Zjawiony Jordan, Alves, & Aderoju, 2018; Mireille Kameni Poumeni, 2017; Selvakumari et al., 2016) โดยพบว่าฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาบางอย่างของสารสกัดบัวสาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ปกป้องตับจากสารพิษ ฤทธิ์ต้านเชื้อ

แบบที่เรีย ฤทธิบรรเทาอาการอักเสบ มีความสอดคล้องกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Kumar, 2013)

3. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เป็นกระบวนการในการแยกสารผสมและตรวจวัดสารในการพิสูจน์เอกลักษณ์และตรวจหาปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ ในกระบวนการแยกสารผสมจะเป็นการใช้ของเหลวแรงดันสูงในการพาสารผสมผ่านวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) ซึ่งสารแต่ละชนิดจะเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลกับวัฏภาคนิ่งแตกต่างกัน ดังนั้นสารแต่ละชนิดที่อยู่ในสารผสมจึงเคลื่อนที่ออกจากวัฏภาคนิ่งด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน (Thammana, 2016; จุฑารัตน์ พิมพ์พันธ์, 2553)

3.1 ส่วนประกอบของ HPLC (จุฑารัตน์ พิมพ์พันธ์, 2553)

3.1.1 ภาชนะบรรจุสารละลาย (solvent reservoir) เป็นขวดแก้วทำหน้าที่บรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase)

3.1.2 เครื่องสูบ (pump) ทำหน้าที่สูบวัฏภาคเคลื่อนที่ให้เคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ โดยให้ความดันได้ถึง 6000 psi

3.1.3 เครื่องฉีดสารตัวอย่าง (sample injector) ทำหน้าที่ฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ฉีดอยู่ในช่วง 0.1 – 100 mL

3.1.4 คอลัมน์ (column) เป็นแท่งสแตนเลสความยาวประมาณ 50 – 300 mm เส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 1 – 5 mm ภายในบรรจุวัฏภาคนิ่งขนาด 3 – 10 μm ทำหน้าที่ในการแยกสารผสมออกจากกัน

3.1.5 เครื่องตรวจวัดสัญญาณ (Detector) อยู่ต่อจากปลายคอลัมน์ เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมา เครื่องตรวจวัดจะตรวจวัดออกมาเป็นสัญญาณไฟฟ้าและส่งต่อไปยังระบบประมวลผล เครื่องตรวจวัดมีหลายประเภท ขึ้นกับหลักการในการตรวจวัด เช่น การวัดการดูดกลืนรังสียูวี การวัดการเรืองแสง การวัดอัตราส่วนมวลต่อประจุของสาร เป็นต้น

3.1.6 ระบบประมวลผล (processing system) ทำหน้าที่แปลงสัญญาณที่ได้จากเครื่องตรวจวัดให้ออกมาอยู่ในรูปกราฟระหว่างสัญญาณที่ตรวจวัดและเวลาหรือที่เรียกว่าโครมาโทแกรม (chromatogram)

3.2 ประเภทการแยกโดยเทคนิค HPLC (จุฑารัตน์ พิมพ์พนธ์, 2553)

3.2.1 Normal phase HPLC เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของสภาพขั้วของสารในการแยกสารผสม โดยวัฏภาคนึงจะมีหมู่ฟังก์ชันที่มีสภาพขั้วมากกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสภาพขั้วต่ำ เช่น hexane, methylene chloride, chloroform เป็นต้น ดังนั้นสารที่มีสภาพขั้วมากจะถูกหน่วงในคอลัมน์นานและจะออกจากคอลัมน์หลังสุด

3.2.2 Reversed phase HPLC เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของสภาพขั้วของสารในการแยกสารผสม โดยวัฏภาคนึงจะมีหมู่ฟังก์ชันที่มีสภาพขั้วน้อยกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยหมู่ฟังก์ชันที่นิยมใช้มักเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน เช่น octadecyl (C_{18}) octyl (C_8) เป็นต้น วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ, buffer, methanol, acetonitrile เป็นต้น ดังนั้นสารที่ไม่มีขั้วจะถูกหน่วงในคอลัมน์นานและจะออกจากคอลัมน์หลังสุด

3.2.3 Size exclusion HPLC เป็นการแยกสารผสมโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของสาร วัฏภาคนึงเป็น silica หรือ polymer ที่มีรูพรุนขนาดสม่ำเสมอเชื่อมต่อกันเป็นร่างแห ในกระบวนการแยก สารที่มีขนาดเล็กผ่านเข้าไปในรูพรุนได้ สารที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนจึงถูกชะออกมาก่อน

3.2.4 Ion exchange HPLC เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของความแรงของประจุของสารในการแยกสารผสม โดยพื้นผิวของวัฏภาคนึงจะมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถแตกตัวแล้วให้ประจุตรงข้ามกับประจุของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่มักใช้สารละลาย buffer ที่มีประจุเดียวกับประจุของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ดังนั้นสารมีประจุที่แรงกว่าจะจับเข้ากับหมู่ฟังก์ชันบนผิวของวัฏภาคนึง จึงถูกหน่วงในคอลัมน์นานและออกจากคอลัมน์หลังสุด

4. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Analytical Method Validation)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์แต่ละกลุ่มในสารสกัดพืชแต่ละชนิดด้วยเทคนิค HPLC การหาสภาวะที่เหมาะสมและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อให้มั่นใจว่าวิธีวิเคราะห์มีความเหมาะสมและสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ การเลือกพารามิเตอร์ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แต่ละวิธีมีความแตกต่างกัน ขึ้นกับจุดประสงค์ในการนำวิธีวิเคราะห์นั้นไปใช้ สำหรับวิธีวิเคราะห์ในการหาปริมาณ (assay) พารามิเตอร์อย่างน้อยที่ต้องทดสอบ ได้แก่ ความถูกต้อง ความแม่นยำ ความจำเพาะ ช่วงและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (ICH, 2005; จุฑารัตน์ พิมพ์พนธ์, 2553)

4.1 พารามิเตอร์ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

4.1.1 ความจำเพาะ (Specificity)

ความจำเพาะคือ ความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ การรายงานผลจะแสดงในรูปโครมาโทแกรมที่แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์สามารถแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากสิ่งเจือปนอื่นๆได้ นอกจากนี้การรายงานค่า resolution ยังเป็นการแสดงความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ได้อีกด้วย

4.1.2 ช่วงและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity and range)

ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงหมายถึง ความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่จะให้ค่าตอบสนองจากเครื่องมือ (response) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณหรือความเข้มข้นของสาร ในช่วงของความเข้มข้นที่กำหนด การตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงควรทำอย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น การรายงานผลจะแสดงด้วยสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนองจากเครื่องมือและความเข้มข้นของสาร calibration curve และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) รวมทั้งช่วงของความเข้มข้นที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงด้วย

4.1.3 ความถูกต้อง (Accuracy)

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์คือ ความใกล้เคียงของค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าจริงหรือค่าอ้างอิง วิธีในการทดสอบหาความถูกต้องสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเปรียบเทียบผลที่วิเคราะห์ได้กับค่าของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณอยู่แล้ว การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากวิธีที่ตรวจสอบกับวิธีมาตรฐานอื่น การเติมสารที่ทราบปริมาณลงในตัวอย่างแล้วเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ก่อนและหลังเติมสาร เป็นต้น ในการตรวจสอบความถูกต้องควรตรวจสอบอย่างน้อย 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง และการรายงานผลจะรายงานในรูปของร้อยละการคืนกลับ (% recovery)

4.1.4 ความแม่นยำ (Precision)

ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์คือ ความใกล้เคียงกันของค่าที่วิเคราะห์ได้ จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันหลายๆครั้ง ในการตรวจสอบความแม่นยำจะต้องตรวจสอบอย่างน้อย 3 ระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง หรือตรวจสอบอย่างน้อย 6 ตัวอย่างที่ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เพียงความเข้มข้นเดียว โดยการรายงานผลจะรายงานในรูปของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, % RSD) การตรวจสอบความแม่นยำสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ

4.1.4.1 Repeatability เป็นการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากการวิเคราะห์ซ้ำในช่วงเวลาเดียวกัน (วันเดียวกัน) โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกันและใช้เครื่องมือเครื่องเดียวกัน ภายใต้สภาวะแวดล้อมเดียวกัน

4.1.4.2 Intermediate precision เป็นการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากการวิเคราะห์ในวันที่ย่างกัน นักวิเคราะห์ต่างกันหรือใช้เครื่องมือต่างกัน ภายใต้สภาวะแวดล้อมเดียวกัน

4.1.4.3 Reproducibility เป็นการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกัน

4.1.5 ขีดจำกัดการตรวจพบ (Limit of detection, LOD)

ขีดจำกัดการตรวจพบหมายถึง ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารที่ต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ การตรวจสอบขีดจำกัดการตรวจพบสามารถทำได้ 3 วิธี ได้แก่ การประเมินด้วยสายตา การประเมินโดยใช้อัตราส่วน signal-to-noise และการประเมินโดยใช้ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าตอบสนองจากเครื่องมือและความชันของความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นและค่าตอบสนองจากเครื่องมือ

4.1.6 ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณหมายถึง ปริมาณหรือความเข้มข้นของสารที่ต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดเชิงปริมาณได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ การตรวจสอบขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณสามารถทำได้ 3 วิธี เช่นเดียวกับการตรวจสอบขีดจำกัดการตรวจพบ

4.2 พารามิเตอร์ในการทดสอบความเหมาะสมของระบบ

การทดสอบความเหมาะสมของระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ (system suitability test) ถือเป็นส่วนหนึ่งของวิธีวิเคราะห์และจะต้องทดสอบเพื่อประเมินว่าระบบมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์สารหรือไม่ โดยพารามิเตอร์ที่ใช้ในการประเมิน ได้แก่

4.2.1 Resolution

Resolution เป็นการแสดงความสามารถในการแยกสารโดยดูจากพิกัดที่อยู่ติดกัน ค่า resolution สูงบ่งบอกถึงความสามารถในการแยกสารที่ดี

4.2.2 Asymmetry factor

Asymmetry factor หรือ tailing factor เป็นการแสดงความสมมาตรของพีค พีคที่ไม่สมมาตรจะส่งผลกระทบต่อความถูกต้องในการวิเคราะห์หาปริมาณ โดยถ้า asymmetry factor มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าพีคมีความสมมาตร

4.2.3 Repeatability

Repeatability เป็นการตรวจสอบความแม่นยำของระบบหรือความนิ่งของระบบ โดยการฉีดสารละลายเดียวกันซ้ำหลายๆครั้ง แล้วประเมินโดยใช้ค่า RSD ของค่าตอบสนองจากเครื่องมือ

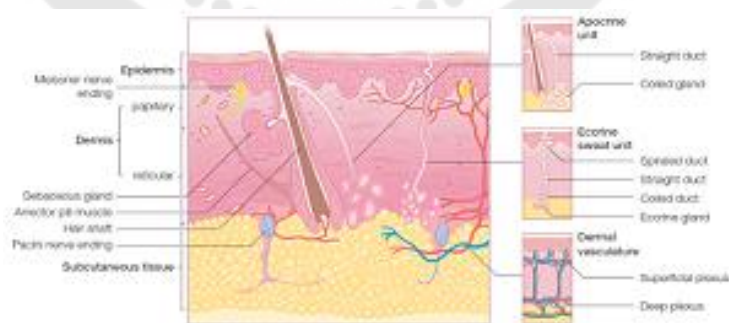
4.2.4 Theoretical Plate

Theoretical plate เป็นพารามิเตอร์ที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ในการแยกสาร โดยถ้า Theoretical plate มีค่ามากแสดงว่าคอลัมน์มีประสิทธิภาพดี

5. สรีรวิทยาของการเชื่อมต่อสภาพของผิวหนัง

5.1 โครงสร้างของผิวหนัง

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ปกคลุมอยู่ทั่วร่างกาย ผิวหนังสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชั้น ได้แก่ หนังกำพร้า (epidermis) หนังแท้ (dermis) และชั้นไขมัน (subcutaneous tissue) โครงสร้างของผิวหนังแสดงในภาพประกอบ 7 (James, Elston, Berger, & Neuhaus, 2015; Tobin, 2017)



ภาพประกอบ 7 โครงสร้างของผิวหนัง

ที่มา : James, W. D., Elston, D., Berger, T., & Neuhaus, I. (2015). *Andrews' Diseases of the Skin E-Book: Clinical Dermatology*. Elsevier Health Sciences.

5.1.1 หนังกำพร้า

หนังกำพร้าเป็นผิวหนังชั้นนอกสุด ทำหน้าที่ป้องกันการสูญเสียน้ำและปกป้องร่างกายจากสารเคมี เชื้อโรค การขีดข่วนและรังสียูวี นอกจากนี้ยังทำหน้าที่สร้างวิตามินดีอีกด้วย หนังกำพร้าสามารถแบ่งออกเป็นหลายชั้น โดยเรียงจากชั้นในสุดไปชั้นนอกสุด ได้แก่ stratum germinativum, stratum spinosum, stratum granulosum และ stratum corneum โดยประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด โดยมี keratinocytes เป็นเซลล์หลักที่พบในหนังกำพร้า ทำหน้าที่สร้างเคราติน ซึ่งนอกจากจะเคลือบบนผิวแล้ว เคราตินยังเป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของผมและเล็บอีกด้วย melanocytes พบอยู่ในชั้น stratum germinativum โดยปกติจะพบในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 เมื่อเทียบกับ keratinocytes ทำหน้าที่สร้างเมลานิน (melanosomes) แล้วส่งไปยัง keratinocytes ที่อยู่รอบๆ ผ่านทาง dendrite เมลาโนโซมทำหน้าที่สร้างเม็ดสีเมลานินโดยอาศัยเอนไซม์ไทโรซิเนส เพื่อปกป้องผิวหนังจากรังสียูวี (Costin & Hearing, 2007; James et al., 2015)

5.1.2 หนังแท้

ชั้นหนังแท้อยู่ลึกลงไปจากชั้นหนังกำพร้า ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ต่อมาเหงื่อ หน่วยของเส้นขน หลอดเลือดและเส้นประสาท เซลล์ที่สำคัญของหนังแท้คือ fibroblasts ทำหน้าที่สร้างสารต่างๆ ที่อยู่ใน extracellular matrix (ECM) ซึ่งเป็นสารจำพวก mucopolysaccharide รวมทั้งเส้นใยร่างแห (reticulum fiber) เส้นใยอีลาสติก (elastic fiber) และคอลลาเจนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของผิวหนัง คอลลาเจนจัดเป็น structural protein หลักของร่างกาย โดยพบในเอ็นกระดูก เอ็นกล้ามเนื้อและเยื่อกระดูก รวมทั้งผิวหนังชั้นหนังแท้ คอลลาเจนประกอบด้วยกรดอะมิโน hydroxyproline, hydroxylysine และ glycine สำหรับคอลลาเจนที่พบที่ผิวหนังจะอยู่ในรูปเส้นใยคอลลาเจน ทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงให้ผิวหนัง โดยมีคอลลาเจนประเภท I เป็นส่วนประกอบหลักซึ่งปกติมีประมาณ 80% ของคอลลาเจนทั้งหมด ส่วนคอลลาเจนประเภท III มีประมาณ 15% คอลลาเจนจะมีการเสื่อมสลายโดยอาศัย proteolytic enzyme คือเอนไซม์คอลลาจีเนส และมีการสร้างใหม่เพื่อทดแทนอย่างต่อเนื่อง เส้นใยที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ เส้นใยอีลาสติก ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยโปรตีนและอีลาสติน ทำหน้าที่สร้างความยืดหยุ่นให้ผิวหนัง กรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของเส้นใยอีลาสติกคือ desmosine และ isodesmosine (James et al., 2015; Tobin, 2017)

5.1.3 ชั้นไขมัน

ผิวหนังชั้นไขมันอยู่ใต้หนังแท้ ประกอบด้วย lipocytes คอลลาเจนและหลอดเลือด ทำหน้าที่พยุงชั้นหนังแท้ กักเก็บพลังงานและยังเป็นบริเวณที่สำคัญในการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนอีกด้วย (James et al., 2015)

5.2 การเสื่อมสภาพของผิวหนัง

การเสื่อมสภาพของผิวหนัง (skin aging) เป็นกลไกทางธรรมชาติที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเจน เนื่องจากผิวหนังเป็นอวัยวะที่ปกคลุมทั่วร่างกาย สามารถมองเห็นได้จากภายนอก โดยปัจจัยที่มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสภาพของผิวหนังแบ่งออกเป็น 2 ปัจจัยคือ ปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก ปัจจัยภายในมีสาเหตุมาจากลักษณะทางพันธุกรรม ฮอร์โมนหรืออายุ การเสื่อมสภาพของผิวหนังจะดำเนินไปอย่างช้าๆ โดยจะมีลักษณะที่แตกต่างกันขึ้นกับเชื้อชาติหรือบริเวณที่เกิด ส่วนปัจจัยภายนอก เป็นปัจจัยที่เกิดจากสภาวะแวดล้อม เช่น รังสียูวี มลภาวะทางอากาศ การสูบบุหรี่ ภาวะโภชนาการ สารเคมี เป็นต้น (Gagnani et al., 2014; Tobin, 2017)

ริ้วรอย ร่องลึกของผิวหนังเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในชั้นหนังแท้ เกิดจากการเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มจำนวนของอนุมูลอิสระ อนุพันธ์ออกซิเจนว่องไว (reactive oxygen species, ROS) รวมทั้งเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidation stress) ส่งผลให้กลุ่มเอนไซม์ matrix metalloproteinase (MMP) มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) ที่นอกจากจะทำลายคอลลาเจนแล้ว ยังยับยั้งการสร้างคอลลาเจนอีกด้วย ซึ่งจะมีผลลดปริมาณคอลลาเจนประเภท I ส่งผลให้อัตราส่วนระหว่างคอลลาเจนประเภท I และคอลลาเจนประเภท III มีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณของคอลลาเจนประเภท IV และคอลลาเจนประเภท VII ลดลง ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นสาเหตุของการเกิดริ้วรอยและร่องลึกของผิวหนัง นอกจากนี้ยังมีผลต่อปริมาณของเอนไซม์อีลาสเตส (elastase) ซึ่งทำหน้าที่ทำลายอีลาสตินในผิวหนัง ปริมาณอีลาสตินที่ลดลงส่งผลให้เกิดริ้วรอย รวมทั้งเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและข้ออักเสบอีกด้วย (Gagnani et al., 2014; Pittayaprupek et al., 2016; Tobin, 2017) แนวทางในการรักษาและป้องกันการเกิดริ้วรอยคือการลดการทำลายโครงสร้างสำคัญของผิวหนังคือคอลลาเจนและอีลาสติน (Baumann, 2007)

จุดต่างดำนบนผิวหนังเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในชั้นหนังกำพร้า เกิดจากอายุ ฮอร์โมน การใช้ยาหรือสารเคมีบางชนิด รวมทั้งการกระตุ้นจากรังสียูวีซึ่งทำให้มีการเพิ่มจำนวนของ ROS พบว่าผิวหนังบริเวณที่สัมผัสกับรังสียูวี จะมีปริมาณ melanocytes รวมทั้งปริมาณของ

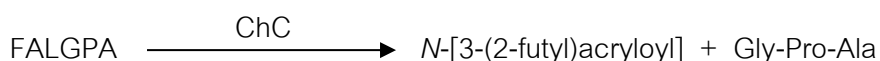
เอนไซม์ไทโรซิเนสมากกว่าบริเวณที่ไม่สัมผัสกับรังสียูวี ส่งผลให้มีการสร้างและส่งเมลานินโซมไปยัง keratinocytes เพิ่มมากกว่าปกติ จนเป็นสาเหตุของจุดต่างดำนบนผิวหนัง (Costin & Hearing, 2007; Tobin, 2017)

การรักษาและป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนัง สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การลดการสัมผัสกับแสงแดด การใช้ผลิตภัณฑ์กันแดด หลีกเลี่ยงการสูบบุหรี่ การสัมผัสกับมลภาวะทางอากาศ รับประทานผักและผลไม้ รวมไปถึงการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งแบบรับประทานและใช้ภายนอก (Baumann, 2007) โดยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสามารถปกป้องผิวหนังจากรังสียูวีได้แก่ เบต้าแคโรทีน ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น (Khan et al., 2012)

6. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนส

6.1 การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสสามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค spectrophotometry (Chattuwatthana & Okello, 2015; Ochocka, Hering, Stefanowicz-Hajduk, Cal, & Barańska, 2017; Thring, Hili, & Naughton, 2009; Van Wart & Steinbrink, 1981) โดยมีหลักการในการทดสอบคืออาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์ โดยสารตั้งต้นคือ *N*-[3-(2-futyl)acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) เมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* (*Clostridium histolyticum* collagenase, ChC) จะเกิดผลิตภัณฑ์คือ *N*-[3-(2-futyl)acryloyl] และ Gly-Pro-Ala ดังแสดงในปฏิกิริยานี้



ในการทดสอบจะแบ่งออกเป็นกลุ่มปฏิกิริยาทดสอบ เป็นการทำปฏิกิริยาโดยใส่สารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงในปฏิกิริยาดัง และกลุ่มควบคุมแบบลบ เป็นการทำปฏิกิริยาโดยไม่ใส่สารตัวอย่าง ในการตรวจวัด จะวัดค่าการดูดกลืนแสงของ FALGPA ที่ความยาวคลื่นในช่วง 340 nm เพื่อหาปริมาณของ FALGPA ที่ลดลง ซึ่งหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ การเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบจะมีค่าน้อยกว่ากลุ่ม

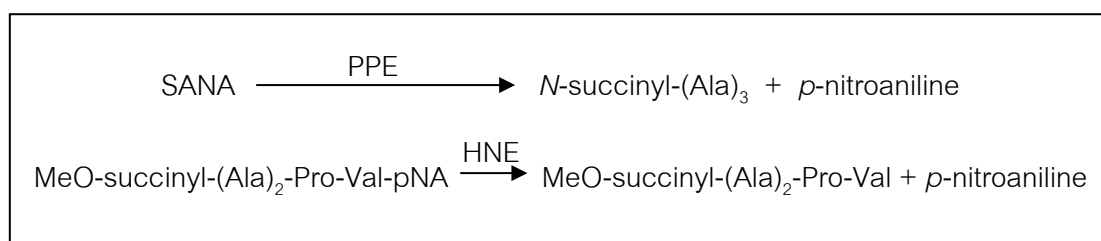
ควบคุมแบบลบ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์จะแสดงในรูป % inhibition โดยคำนวณจากสมการดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\Delta \text{Absorbance}_{\text{Control}} - \Delta \text{Absorbance}_{\text{Sample}}}{\Delta \text{Absorbance}_{\text{Control}}} \times 100$$

เมื่อ $\Delta \text{Absorbance}_{\text{Control}}$ คือค่าการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของ FALGPA ที่เวลาเริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มควบคุมแบบลบ และ $\text{Absorbance}_{\text{Sample}}$ คือค่าการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของ FALGPA ที่เวลาเริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มปฏิกิริยาทดสอบ

6.2 การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสสามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค spectrophotometry (Löser, Kruse, Melzig, & Nahrstedt, 2000; Mori, Ikeda, Kato, Minamino, & Watabe, 2002; Tu & Tawata, 2015) โดยมีหลักการในการทดสอบคืออาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการทดสอบสามารถใช้ได้ 2 ชนิด คือ porcine pancreatic elastase (PPE) และ human neutrophil elastase (HNE) กรณีใช้ PPE จะใช้ *N*-succinyl-(Ala)₃-nitroaniline (SANA) เป็นสารตั้งต้น เมื่อทำปฏิกิริยากับ PPE จะเกิดผลิตภัณฑ์คือ *N*-succinyl-(Ala)₃ และ *p*-nitroaniline กรณีที่ทดสอบโดยใช้ HNE จะใช้ MeO-succinyl-(Ala)₂-Pro-Val-pNA เป็นสารตั้งต้น เมื่อทำปฏิกิริยากับ HNE จะเกิดผลิตภัณฑ์คือ MeO-succinyl-(Ala)₂-Pro-Val และ *p*-nitroaniline ดังแสดงในปฏิกิริยานี้



ในการทดสอบจะแบ่งออกเป็นกลุ่มปฏิกิริยาทดสอบ เป็นการทำปฏิกิริยาโดยใช้สารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงในปฏิกิริยาด้วย และกลุ่มควบคุมแบบลบ เป็นการทำปฏิกิริยาโดยไม่ใส่สารตัวอย่าง ในการตรวจวัด จะวัดค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitroaniline ที่ความยาวคลื่น

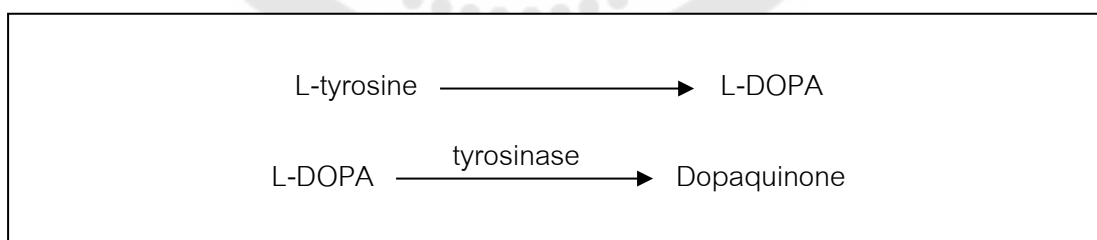
ในช่วง 410 nm เพื่อหาปริมาณของ *p*-nitroaniline ที่เกิดขึ้น ซึ่งหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสได้ *p*-nitroaniline จะเกิดขึ้นน้อยกว่า ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาทดสอบจะมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมแบบลบ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์จะแสดงในรูป % inhibition โดยคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{Control}} - \text{Absorbance}_{\text{Sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{Control}}} \times 100$$

เมื่อ $\text{Absorbance}_{\text{Control}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitroaniline ที่เวลาสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มควบคุมแบบลบ และ $\text{Absorbance}_{\text{Sample}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitroaniline ที่เวลาสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มปฏิกิริยาทดสอบ

6.3 การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสามารถทำได้โดยอาศัยเทคนิค spectrophotometry (Jeong et al., 2013; Tayarani-Najaran, Akaberi, Vatani, & Emami, 2016) โดยมีหลักการในการทดสอบคืออาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์ โดยสามารถใช้สารตั้งต้นได้ 2 ชนิด คือ L-tyrosine หรือ 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) เมื่อสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด (mushroom tyrosinase) จะเกิดผลิตภัณฑ์คือ dopaquinone ดังแสดงในปฏิกิริยานี้



ในการทดสอบจะแบ่งออกเป็นกลุ่มปฏิกิริยาทดสอบ เป็นการทำปฏิกิริยาโดยใช้สารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบลงในปฏิกิริยาด้วย และกลุ่มควบคุมแบบลบ เป็นการทำปฏิกิริยาโดยไม่ใส่สารตัวอย่าง ในการตรวจวัด จะวัดค่าการดูดกลืนแสงของ dopaquinone ที่ความยาวคลื่นในช่วง 475 nm เพื่อหาปริมาณของ dopaquinone ที่เกิดขึ้น ซึ่งหากสารตัวอย่างสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ dopaquinone จะเกิดขึ้นน้อยกว่า ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา

ทดสอบจะมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมแบบลบ ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์จะแสดงในรูป % inhibition โดยคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{Control}} - \text{Absorbance}_{\text{Sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{Control}}} \times 100$$

เมื่อ $\text{Absorbance}_{\text{Control}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของ dopaquinone ที่เวลาสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มควบคุมแบบลบ และ $\text{Absorbance}_{\text{Sample}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-dopaquinone ที่เวลาสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มปฏิกิริยาทดสอบ



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

1.1 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1.1 เครื่องแก้ว

1.1.2 Aluminium foil (Diamond, USA)

1.1.3 Analytical balance (Mettler Toledo, Switzerland)

1.1.4 Centrifuge tube ขนาด 10 mL (Eppendorf, Germany)

1.1.5 High performance liquid chromatography (Thermo Fisher Scientific, USA)

1.1.6 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5, 2 และ 5 mL (Eppendorf, Germany)

1.1.7 Micropipette ขนาด 20, 100, 200, 1000 และ 5000 μ L (Mettler Toledo, USA)

1.1.8 Microplate reader (Molecular devices SpectraMax[®] M3, USA)

1.1.9 Nylon membrane filter ขนาด 0.45 μ m (Sartorius)

1.1.10 Parafilm (PECHINEY PLASTIC PACKAGING, USA)

1.1.11 pH meter (Mettler Toledo, Switzerland)

1.1.12 Sonicator (GT SONIC, China)

1.1.13 Syringe ขนาด 5 mL (Nipro, Thailand)

1.1.14 Syringe membrane filter ขนาด 0.2 μ m

1.1.15 Vacuum filter set

1.1.16 Vortex mixer (VELP[®] Scientifica, Italy)

1.1.17 Water purification system (Millipore Corporation, France)

1.1.18 96-Well plate

1.2 สารเคมี

1.2.1 Acetonitrile HPLC grade (Honeywell Burdick & Jackson, Korea)

1.2.2 Apigenin (Sigma-Aldrich, Germany)

1.2.3 Calcium chloride (CaCl_2) (Merck KGaA, Germany)

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

- 1.2.5 (+) Catechin hydrate (Sigma-Aldrich, Germany)
- 1.2.6 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Ajax Finechem Pty Ltd, Australia)
- 1.2.7 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) (Sigma, USA)
- 1.2.8 (-)-Epicatechin (Sigma-Aldrich, China)
- 1.2.9 (-)-Epigallocatechin gallate (Sigma Aldrich, China)
- 1.2.10 Glacial acetic acid (GAA) (Scharlab S.L., Spain)
- 1.2.11 Hesperetin (Fluka, UK)
- 1.2.12 Hesperidin (Sigma-Aldrich, Spain)
- 1.2.13 Kojic acid (Sigma, USA)
- 1.2.14 Methanol HPLC grade (Honeywell Burdick & Jackson, Korea)
- 1.2.15 *N*-[3-(2-Futyl)acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) (Sigma, USA)
- 1.2.16 *N*-Succinyl-(Ala)₃-nitroanilide (SANA) (Sigma, USA)
- 1.2.17 Porcine pancreatic elastase type IV (PPE) (Sigma, USA)
- 1.2.18 Quercetin (Sigma-Aldrich, India)
- 1.2.19 Rutin hydrate (Sigma-Aldrich, China)
- 1.2.20 Sodium chloride (NaCl) (QRëc, New Zealand)
- 1.2.21 Sodium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (CARLO ERBA Reagents S.A.S, France)
- 1.2.22 Sodium hydroxide (NaOH) (Ajax Finechem Pty Ltd, Australia)
- 1.2.23 Sterile water for irrigation (General drug house, Thailand)
- 1.2.24 Tricine (Sigma, USA)
- 1.2.25 Tris-hydrochloride (Tris-HCl) (Sigma, USA)
- 1.2.26 Tyrosinase (Sigma, USA)
- 1.2.27 สารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายที่มีกลีบดอกสีเหลือง (*Nymphaea mexicana* “Charlene Strawn”) (มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, ประเทศไทย)
- 1.2.28 สารสกัดจากเกสรของบัวสายที่มีกลีบดอกสีเหลือง (*Nymphaea mexicana* “Charlene Strawn”) (มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, ประเทศไทย)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อแยกฟลาโวนอยด์ 7 ชนิด (Andersen & Markham, 2005)

2.1.1 การเตรียม Mobile phase

2.1.1.1 การเตรียม 0.1 % glacial acetic acid (0.1 % GAA)

เติมน้ำประมาณ 500 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 1000 mL ปิเปต glacial acetic acid 1 mL ลงใน volumetric flask ปรับปริมาตรจนครบ 1000 mL ด้วยน้ำ กรองผ่าน nylon membrane filter ขนาด 0.45 μm แล้วนำไป sonicate ประมาณ 30 นาที

2.1.1.2 การเตรียม acetonitrile : methanol อัตราส่วน 70 : 30

ตวง acetonitrile 700 mL ด้วย cylinder ขนาด 1000 mL ลงในขวดแก้วมีฝาปิดขนาด 1000 mL ตวง methanol 300 mL ด้วย cylinder ขนาด 500 mL ลงในขวดแก้ว ผสมให้เข้ากัน นำไปกรองผ่าน nylon membrane filter ขนาด 0.45 μm แล้วนำไป sonicate ประมาณ 30 นาที

2.1.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

2.1.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน catechin

2.1.2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน catechin ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน catechin 10 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL เติม methanol ประมาณ 5 mL ลงใน volumetric flask เขย่าและ sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL ด้วย methanol

2.1.2.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน catechin ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (1 mg/mL) 2 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.1.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน catechin ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (1 mg/mL) 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน epicatechin

2.1.2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน epicatechin ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน epicatechin 10 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL เติม methanol ประมาณ 5 mL ลงใน volumetric flask เขย่าและ sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL ด้วย methanol

2.1.2.2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน epicatechin ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน epicatechin (1 mg/mL) 2 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.2.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน epicatechin ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน epicatechin (1 mg/mL) 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน rutin

2.1.2.3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน rutin ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน rutin 10 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL เติมน methanol ประมาณ 5 mL ลงใน volumetric flask เขย่าและ sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL ด้วย methanol

2.1.2.3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน rutin ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน rutin (1 mg/mL) 2 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน hesperidin

2.1.2.4.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน hesperidin ความเข้มข้น 0.5 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน hesperidin 10 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 20 mL เติมน methanol ประมาณ 10 mL ลงใน volumetric flask เขย่าและ sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรจนครบ 20 mL ด้วย methanol

2.1.2.4.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน hesperidin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน hesperidin (0.5 mg/mL) 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.4.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน hesperidin ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน hesperidin (0.5 mg/mL) 200 μL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin

2.1.2.5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน quercetin 10 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL เติมน methanol

ประมาณ 5 mL ลงใน volumetric flask เขย่าและ sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL ด้วย methanol

2.1.2.5.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้น 600 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน quercetin (1 mg/mL) 3 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.5.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้น 300 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน quercetin (1 mg/mL) 1.5 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน apigenin

2.1.2.6.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน apigenin ความเข้มข้น 0.5 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน apigenin 10 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 20 mL เติมน methanol ประมาณ 10 mL ลงใน volumetric flask เขย่าและ sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรจนครบ 20 mL ด้วย methanol

2.1.2.6.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน apigenin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน apigenin (0.5 mg/mL) 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.6.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน apigenin ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน apigenin (0.5 mg/mL) 200 μL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน hesperetin

2.1.2.7.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน hesperetin ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน hesperetin 10 mg ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL เติมน methanol ประมาณ 5 mL ลงใน volumetric flask เขย่าและ sonicate ประมาณ 5 นาที ปรับปริมาตรจนครบ 10 mL ด้วย methanol

2.1.2.7.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน hesperetin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน hesperetin (1 mg/mL) 500 μL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.2.7.3 เตรียมสารละลายมาตรฐาน hesperetin ความเข้มข้น 20 µg/mL โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน hesperetin (1 mg/mL) 100 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 5 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 5 mL ด้วย methanol

2.1.3 การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบ

2.1.3.1 การเตรียม Diluent

ปิเปต 0.1 % GAA 800 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 2 mL เจือจางและปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน catechin ความเข้มข้น 15 µg/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (400 µg/mL) 75 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน epicatechin ความเข้มข้น 15 µg/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน epicatechin (400 µg/mL) 75 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน rutin ความเข้มข้น 50 µg/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน rutin (1 mg/mL) 100 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน hesperidin ความเข้มข้น 3 µg/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน hesperidin (100 µg/mL) 60 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้น 30 µg/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน quercetin (600 µg/mL) 100 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.7 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน apigenin ความเข้มข้น 3 µg/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน apigenin (100 µg/mL) 60 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.8 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน hesperetin ความเข้มข้น 3 µg/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน hesperetin (100 µg/mL) 60 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.9 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม

2.1.3.9.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ 10 % โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (200 µg/mL) 15 µL, epicatechin (200 µg/mL) 15 µL, rutin (400 µg/mL) 25 µL, hesperidin (20 µg/mL) 30 µL, quercetin (300 µg/mL) 20 µL, apigenin (20 µg/mL) 30 µL และ hesperetin (20 µg/mL) 30 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.9.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ 40 % โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (200 µg/mL) 60 µL, epicatechin (200 µg/mL) 60 µL, rutin (400 µg/mL) 100 µL, hesperidin (20 µg/mL) 120 µL, quercetin (300 µg/mL) 80 µL, apigenin (20 µg/mL) 120 µL และ hesperetin (20 µg/mL) 120 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.9.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ 70 % โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (200 µg/mL) 105 µL, epicatechin (200 µg/mL) 105 µL, rutin (400 µg/mL) 175 µL, hesperidin (20 µg/mL) 210 µL, quercetin (300 µg/mL) 140 µL, apigenin (20 µg/mL) 210 µL และ hesperetin (20 µg/mL) 210 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.9.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ 100 % โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (400 µg/mL) 75 µL, epicatechin (400 µg/mL) 75 µL, rutin (1 mg/mL) 100 µL, hesperidin (100 µg/mL) 60 µL, quercetin (600 µg/mL) 100 µL, apigenin (100 µg/mL) 60 µL และ hesperetin (100 µg/mL) 60 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.9.5 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ 130 % โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (400 µg/mL) 97.5 µL, epicatechin (400 µg/mL) 97.5 µL, rutin (1 mg/mL) 130 µL, hesperidin (100 µg/mL) 78 µL, quercetin (600 µg/mL) 130 µL, apigenin (100 µg/mL) 78 µL และ hesperetin (100 µg/mL) 78 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.9.6 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ 160 % โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (400 µg/mL) 120 µL, epicatechin (400 µg/mL) 120 µL, rutin (1 mg/mL) 160 µL, hesperidin (100 µg/mL) 96 µL, quercetin (600 µg/mL) 160 µL, apigenin (100 µg/mL) 96 µL และ hesperetin (100 µg/mL) 96 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.3.9.7 เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ 200 % โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (400 µg/mL) 150 µL, epicatechin (400 µg/mL) 150 µL, rutin (1 mg/mL) 200 µL, hesperidin (100 µg/mL) 120 µL, quercetin (600 µg/mL) 200 µL, apigenin (100 µg/mL) 120 µL และ hesperetin (100 µg/mL) 120 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 800 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.4 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

2.1.4.1 การเตรียมสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลือง

2.1.4.1.1 เตรียมสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลืองความเข้มข้น 0.5 mg/mL โดยชั่งสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลือง 4 mg ลงใน centrifuge tube ขนาด 10 mL ละลายด้วยสารละลายผสมระหว่าง methanol และ 0.1 % GAA (80 : 20) 8 mL vortex และ sonicate ประมาณ 5 นาที

2.1.4.1.2 เตรียมสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลืองความเข้มข้น 0.1 mg/mL โดยปิเปตสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลือง (0.5 mg/mL) 400 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 720 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

ตาราง 1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสารละลายผสม (%)	ชนิดของฟลาโวนอยด์	ความเข้มข้นสารละลายที่ใช้ในการเตรียม (µg/mL)	ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการเตรียม (µL)	ปริมาตรของ 0.1 % GAA (µL)	ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายผสม (mL)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/mL)
10	CA	200	15	800	2	1.5
	EP	200	15			1.5
	RU	400	25			5
	HD	20	30			0.3
	QT	300	20			3
	AP	20	30			0.3
	HT	20	30			0.3
40	CA	200	60	800	2	6
	EP	200	60			6
	RU	400	100			20
	HD	20	120			1.2
	QT	300	80			12
	AP	20	120			1.2
	HT	20	120			1.2
70	CA	200	105	800	2	10.5
	EP	200	105			10.5
	RU	400	175			35
	HD	20	210			2.1
	QT	300	140			21
	AP	20	210			2.1
	HT	20	210			2.1

ตาราง 1 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลายผสม (%)	ชนิดของฟลาโวนอยด์	ความเข้มข้นสารละลายที่ใช้ในการเตรียม (µg/mL)	ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการเตรียม (µL)	ปริมาตรของ 0.1 % GAA (µL)	ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายผสม (mL)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/mL)
100	CA	400	75	800	2	15
	EP	400	75			15
	RU	1000	100			50
	HD	100	60			3
	QT	600	100			30
	AP	100	60			3
	HT	100	60			3
130	CA	400	97.5	800	2	19.5
	EP	400	97.5			19.5
	RU	1000	130			65
	HD	100	78			4
	QT	600	130			40
	AP	100	78			4
	HT	100	78			4
160	CA	400	120	800	2	24
	EP	400	120			24
	RU	1000	160			80
	HD	100	96			5
	QT	600	160			50
	AP	100	96			5
	HT	100	96			5

ตาราง 1 (ต่อ)

ความเข้มข้นของสารละลายผสม (%)	ชนิดของฟลาโวนอยด์	ความเข้มข้นสารละลายที่ใช้ในการเตรียม (µg/mL)	ปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการเตรียม (µL)	ปริมาตรของ 0.1 % GAA (µL)	ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายผสม (mL)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/mL)
200	CA	400	150	800	2	30
	EP	400	150			30
	RU	1000	200			100
	HD	100	120			6
	QT	600	200			60
	AP	100	120			6
	HT	100	120			6

2.1.4.2 การเตรียมสารละลายสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลือง

2.1.4.2.1 เตรียมสารละลายสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลืองความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลือง 8 mg ลงใน centrifuge tube ขนาด 10 mL ละลายด้วยสารละลายผสมระหว่าง methanol และ 0.1 % GAA (80 : 20) 8 mL vortex และ sonicate ประมาณ 5 นาที

2.1.4.2.2 เตรียมสารละลายสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลืองความเข้มข้น 0.2 mg/mL โดยปิเปตสารละลายสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลือง (1 mg/mL) 400 µL ลงใน volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 720 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.5 การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spiked solution)

2.1.5.1 การเตรียม spiked solution ของสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลือง

2.1.5.1.1 เตรียม spiked solution ของสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นต่ำ โดยปิเปตสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลือง (0.5 mg/mL) 400 µL สารละลายมาตรฐาน catechin (400 µg/mL) 60 µL, epicatechin (400

µg/mL) 56 µL, rutin (1 mg/mL) 80 µL, hesperidin (100 µg/mL) 36 µL, quercetin (300 µg/mL) 144 µL, apigenin (100 µg/mL) 48 µL และ hesperetin (100 µg/mL) 48 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 720 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.5.1.2 เตรียม spiked solution ของสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นกลาง โดยปิเปตสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลือง (0.5 mg/mL) 400 µL สารละลายมาตรฐาน catechin (400 µg/mL) 75 µL, epicatechin (400 µg/mL) 70 µL, rutin (1 mg/mL) 100 µL, hesperidin (100 µg/mL) 44 µL, quercetin (300 µg/mL) 180 µL, apigenin (100 µg/mL) 60 µL และ hesperetin (100 µg/mL) 60 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 720 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.5.1.3 เตรียม spiked solution ของสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นสูง โดยปิเปตสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลือง (0.5 mg/mL) 400 µL สารละลายมาตรฐาน catechin (400 µg/mL) 90 µL, epicatechin (400 µg/mL) 84 µL, rutin (1 mg/mL) 120 µL, hesperidin (100 µg/mL) 52 µL, quercetin (300 µg/mL) 216 µL, apigenin (100 µg/mL) 72 µL และ hesperetin (100 µg/mL) 72 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 720 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.5.2 การเตรียม spiked solution ของสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลือง

2.1.5.2.1 เตรียม spiked solution ของสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นต่ำ โดยปิเปตสารละลายสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลือง (1 mg/mL) 400 µL สารละลายมาตรฐาน catechin (400 µg/mL) 60 µL, epicatechin (400 µg/mL) 56 µL, rutin (1 mg/mL) 80 µL, hesperidin (100 µg/mL) 36 µL, quercetin (300 µg/mL) 144 µL, apigenin (100 µg/mL) 48 µL และ hesperetin (100 µg/mL) 48 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 720 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.5.2.2 เตรียม spiked solution ของสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นกลาง โดยปิเปตสารละลายสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลือง (1 mg/mL) 400 µL สารละลายมาตรฐาน catechin (400 µg/mL) 75 µL, epicatechin (400 µg/mL) 70 µL, rutin (1 mg/mL) 100 µL, hesperidin (100 µg/mL) 44 µL, quercetin (300 µg/mL) 180 µL,

apigenin (100 µg/mL) 60 µL และ hesperetin (100 µg/mL) 60 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 720 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

2.1.5.2.3 เตรียม spiked solution ของสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลือง ที่ความเข้มข้นสูง โดยปิเปตสารละลายสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลือง (1 mg/mL) 400 µL สารละลายมาตรฐาน catechin (400 µg/mL) 90 µL, epicatechin (400 µg/mL) 84 µL, rutin (1 mg/mL) 120 µL, hesperidin (100 µg/mL) 52 µL, quercetin (300 µg/mL) 216 µL, apigenin (100 µg/mL) 72 µL และ hesperetin (100 µg/mL) 72 µL ลง volumetric flask ขนาด 2 mL เติม 0.1 % GAA 720 µL และปรับปริมาตรจนครบ 2 mL ด้วย methanol

ตาราง 2 การเตรียม spiked solution ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง

ระดับ ความ เข้มข้น	ปริมาตรสารละลาย (µL)									ปริมาตร สุดท้าย (mL)
	สาร สกัด	CA	EP	RU	HD	QT	AP	HT	0.1% GAA	
ต่ำ	400	60	56	80	36	144	48	48	720	2
กลาง	400	75	70	100	44	180	60	60	720	2
สูง	400	90	84	120	52	216	72	72	720	2

2.1.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin โดยกำหนดสภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้

Stationary phase : ACE C18-AR, 5-µm, 250 x 4.6-mm

Flow rate : 1.0 mL/min

Injection volume : 20 µL

Detector : UV

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดโดยการปรับเปลี่ยนสภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้

2.1.6.1 อัตราส่วนระหว่าง 0.1 % GAA และ สารผสม acetonitrile และ methanol ใน gradient elution

2.1.6.2 ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด (254 nm และ 280 nm)

2.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (ICH, 2005; Latimer, 2016)

พารามิเตอร์ที่ทดสอบในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ ความถูกต้อง ความแม่นยำ ความจำเพาะ ซีดจำกัดการตรวจพบ ซีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ ช่วงและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยทดสอบดังนี้

2.2.1 การทดสอบความจำเพาะ เตรียมสารละลายดังต่อไปนี้

- Diluent
- สารละลายมาตรฐาน catechin ความเข้มข้น 15 µg/mL
- สารละลายมาตรฐาน epicatechin ความเข้มข้น 15 µg/mL
- สารละลายมาตรฐาน rutin ความเข้มข้น 50 µg/mL
- สารละลายมาตรฐาน hesperidin ความเข้มข้น 3 µg/mL
- สารละลายมาตรฐาน quercetin ความเข้มข้น 30 µg/mL
- สารละลายมาตรฐาน apigenin ความเข้มข้น 3 µg/mL
- สารละลายมาตรฐาน hesperetin ความเข้มข้น 3 µg/mL
- สารละลายมาตรฐานผสมที่ 100 %

กรองสารละลายแต่ละชนิดผ่าน nylon syringe membrane filter ขนาด 0.2 µm แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อดูค่า retention time ของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิด วิธีวิเคราะห์จะต้องสามารถแยกฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดได้โดยมีค่า resolution ไม่น้อยกว่า 1.5 และใน diluent จะต้องไม่มีพีคบริเวณที่ตำแหน่ง retention time เดียวกับฟลาโวนอยด์ที่ต้องการวิเคราะห์

2.2.2 การทดสอบช่วงและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง เตรียมสารละลายดังต่อไปนี้

- สารละลายมาตรฐานผสมที่ 10 %
- สารละลายมาตรฐานผสมที่ 40 %
- สารละลายมาตรฐานผสมที่ 70 %
- สารละลายมาตรฐานผสมที่ 100 %
- สารละลายมาตรฐานผสมที่ 130 %
- สารละลายมาตรฐานผสมที่ 160 %
- สารละลายมาตรฐานผสมที่ 200 %

กรองสารละลายแต่ละชนิดผ่าน nylon syringe membrane filter ขนาด 0.2 μm นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC หลังจากนั้นนำ peak area ที่ได้จากการวิเคราะห์และความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดมาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและคำนวณสมการแสดงความสัมพันธ์ รวมทั้งค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ซึ่ง r ควรมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

2.2.3 การทดสอบความแม่นยำ

2.2.3.1 Repeatability เตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบช่วงและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและสารละลายมาตรฐานผสมที่ 100 % จำนวน 6 ตัวอย่าง กรองสารละลายแต่ละชนิดผ่าน nylon syringe membrane filter ขนาด 0.2 μm นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC คำนวณหาปริมาณที่พบ (amount found) ของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิด จาก slope และ intercept ของสมการแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยใช้สมการดังนี้

$$\text{Amount found } (\mu\text{g/mL}) = \frac{(\text{Peak area} - \text{Intercept})}{\text{Slope}}$$

หลังจากนั้นนำค่า amount found ของสารละลายมาตรฐานผสมที่ 100 % ทั้ง 6 ตัวอย่างมาคำนวณหาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD) โดย RSD ควรมีค่าไม่เกิน 5.3 %

2.2.3.2 Intermediate precision

ทำการทดสอบ repeatability อย่างน้อย 2 วัน หลังจากนั้นนำค่า amount found ของสารละลายมาตรฐานผสมที่ 100 % ทั้งหมดมาคำนวณหา RSD โดย RSD ควรมีค่าไม่เกิน 5.3 %

2.2.4 การทดสอบความถูกต้อง เตรียมสารละลายดังต่อไปนี้

- สารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบช่วงและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง
- สารละลายสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลืองเข้มข้น 0.1 mg/mL
- Spiked solution ของสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นต่ำ กลางและสูง ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง
- สารละลายสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลืองเข้มข้น 0.2 mg/mL
- Spiked solution ของสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นต่ำ กลางและสูง ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง

กรองสารละลายแต่ละชนิดผ่าน nylon syringe membrane filter ขนาด 0.2 μm นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC คำนวณหาร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิด โดยใช้สมการดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Amount found}}{\text{Amount added}} \times 100$$

$$\text{Amount found } (\mu\text{g/mL}) = \frac{[(\text{Peak area}_{\text{Spiked}} - \text{Peak area}_{\text{Sample}})] - \text{Intercept}}{\text{Slope}}$$

โดย amount found คือปริมาณฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดที่พบ คำนวณได้จาก slope และ intercept ของสมการแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง peak area_{Spiked} คือ peak area ของ spiked solution peak area_{Sample} คือ peak area ของสารละลายสารสกัดของบัวสายสีเหลือง ส่วน amount added คือความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์ โดย % recovery ควรมีค่าอยู่ในช่วง 90 – 107

2.2.5 การทดสอบขีดจำกัดการตรวจพบและ ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ 10 %, 40 %, 70 %, 100 %, 130 %, 160 % และ 200 % กรองสารละลายแต่ละชนิดผ่าน nylon syringe membrane filter ขนาด 0.2 μm นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วคำนวณขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และ ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) โดยใช้สมการดังนี้

$$\text{LOD} = \frac{3.3 (\sigma)}{\text{Slope}} \times 100$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 (\sigma)}{\text{Slope}} \times 100$$

เมื่อ σ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ peak area และ Slope คือ slope ที่ได้จากสมการแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

2.3. การวิเคราะห์สารสกัดบัวสายสีเหลือง

เตรียมสารละลายดังต่อไปนี้

- สารละลายมาตรฐานสำหรับการทดสอบช่วงและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง
- สารละลายสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลืองเข้มข้น 0.1 mg/mL
- สารละลายสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลืองเข้มข้น 0.2 mg/mL

กรองสารละลายแต่ละชนิดผ่าน nylon syringe membrane filter ขนาด 0.2 μm นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลืองและปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลือง โดยใช้สมการดังนี้

$$\% \text{ w/w} = \frac{(\text{Peak area} - \text{Intercept})}{\text{Slope}} \times \frac{4}{\text{Weight}} \times \frac{2}{0.4} \times \frac{100}{1000}$$

โดย %w/w คือ ปริมาณฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดที่พบในสารสกัดจากกลีบดอกหรือเกสรของดอกบัวสายสีเหลืองในหน่วย %w/w และ Weight คือ น้ำหนักสารสกัดจากกลีบดอกหรือเกสรของดอกบัวสายสีเหลืองในหน่วย mg

2.4. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Thring et al., 2009)

2.4.1 การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบ

2.4.1.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM tricine pH 7.5 ที่ประกอบด้วย 400 mM NaCl และ 10 mM CaCl_2

ซึ่ง tricine 0.8959 g, NaCl 2.3376 g และ CaCl_2 0.1110 g ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 mL ด้วย sterile water for irrigation หลังจากนั้นปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย 0.1 N NaOH

2.4.1.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.25 mg/mL)

ซึ่งเอนไซม์คอลลาจีเนส 2.5 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM tricine pH 7.5 ปริมาตร 1000 μL

2.4.1.3 การเตรียมสารละลาย FALGPA (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.8 mM)

ชั่ง FALGPA 3.81 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM tricine pH 7.5 ปริมาตร 1000 μ L

2.4.1.4 การเตรียมสารละลาย EGCG (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.32 mg/mL)

ชั่ง EGCG 0.4 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM tricine pH 7.5 ปริมาตร 1000 μ L

2.4.1.5 การเตรียมสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง (ความเข้มข้น 2.5 mg/mL)

ชั่งสารสกัด 3.75 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM tricine pH 7.5 ปริมาตร 1.5 mL นำไป centrifuge เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทของเหลวเหนือตะกอนลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 mL

2.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ

2.4.2.1 เตรียมสารละลาย EGCG ที่ 5 ระดับความเข้มข้น เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.08, 0.16, 0.32, 0.48 และ 0.64 mg/mL ทดสอบโดยใช้วิธีเดียวกับการทดสอบของสารสกัดของบัวสายสีเหลืองตามที่ระบุในข้อ 2.4.3 แต่ใช้สารละลาย EGCG แทนสารละลายสารสกัดของบัวสายสีเหลือง

2.4.2.2 คำนวณหา % inhibition ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารละลาย EGCG ทั้ง 5 ความเข้มข้น โดยดำเนินการทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2.4.2.3 นำค่าเฉลี่ย % inhibition ที่ได้ไป plot กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย EGCG และค่าเฉลี่ยของ % inhibition เพื่อคำนวณหาค่า the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) จากสมการเส้นตรงที่ได้

2.4.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส ของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง โดยดำเนินการทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2.4.3.1 Negative control

2.4.3.1.1 ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM tricine pH 7.5 160 μ L ใน 96-well plate

2.4.3.1.2 เติมสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส 20 μ L

2.4.3.1.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.4.3.1.4 เติมสารละลาย FALGPA 20 μ L

2.4.3.1.5 เตรียม blank โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM tricine pH 7.5 แทนการเติมสารละลาย FALGPA

2.4.3.1.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm ด้วย microplate reader โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 20 นาที

2.4.3.1.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition

2.4.3.2 Positive control

2.4.3.2.1 ใส่สารละลาย EGCG 160 μ L ใน 96-well plate (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.32 mg/mL)

2.4.3.2.2 เติมสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส 20 μ L

2.4.3.2.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.4.3.2.4 เติมสารละลาย FALGPA 20 μ L

2.4.3.2.5 เตรียม blank โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM tricine pH 7.5 แทนการเติมสารละลาย FALGPA

2.4.3.2.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm ด้วย microplate reader โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 20 นาที

2.4.3.2.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition

2.4.3.3 สารสกัดจากบัวสายสีเหลือง

2.4.3.3.1 ใส่สารละลายสารสกัดจากบัวสายสีเหลือง 160 μ L ใน 96-well plate (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาแตกต่างกันไป)

2.4.3.3.2 เติมสารละลายเอนไซม์คอลลาจีเนส 20 μ L

2.4.3.3.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.4.3.3.4 เติมสารละลาย FALGPA 20 μ L

2.4.3.3.5 เตรียม blank โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM tricine pH

7.5 แทนการเติมสารละลาย FALGPA

2.4.3.3.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm ด้วย microplate reader โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 20 นาที

2.4.3.3.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition

ตาราง 3 การลำดับและปริมาตรการเติมสารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรการเติมสาร (μL)				
	Buffer	EGCG	Extracts	Enzyme	FALGPA
Negative control	160	-	-	20	20
Blank negative control	180	-	-	20	-
Positive control	-	160	-	20	20
Blank positive control	20	160	-	20	-
Tested sample	-	-	160	20	20
Blank tested sample	20	-	160	20	-

2.4.4 การคำนวณหา % inhibition ของสารสกัดจากบัวสายสีเหลือง

2.4.4.1 คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\Delta \text{Absorbance}_{\text{Control}} - \Delta \text{Absorbance}_{\text{Sample}}}{\Delta \text{Absorbance}_{\text{Control}}} \times 100$$

เมื่อ $\Delta \text{Absorbance}_{\text{Control}}$ คือค่าการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของ FALGPA ที่เวลาเริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มควบคุมแบบลบ และ $\text{Absorbance}_{\text{Sample}}$ คือค่าการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของ FALGPA ที่เวลาเริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มปฏิกิริยาทดสอบ

2.4.4.2 การคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารสกัดจากบัวสายสีเหลือง

นำค่าเฉลี่ย % inhibition ที่ได้ไป plot กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % inhibition เพื่อคำนวณหา IC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้

2.5 การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส (Liyanaarachchi, Samarasekera, Mahanama, & Hemalal, 2018; Mori et al., 2002)

2.5.1 การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบ

2.5.1.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 200 mM tris-HCl pH 8.0

ชั่ง tris-HCl 3.152 g ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 mL ด้วย sterile water for irrigation หลังจากนั้นปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย 0.1 N NaOH

2.5.1.2 การเตรียมสารละลาย porcine pancreatic elastase (PPE) type IV (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 5 μ g/mL)

ชั่งเอนไซม์ PPE 0.1 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 200 mM tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 2 mL

2.5.1.3 การเตรียมสารละลาย N-succinyl-(Ala)₃-nitroanilide (SANA) (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.18 mg/mL)

ชั่ง SANA 1.81 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 200 mM tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 1000 μ L

2.5.1.4 การเตรียมสารละลาย EGCG (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 1 mg/mL)

ชั่ง EGCG 1.25 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 200 mM tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 1000 μ L

2.5.1.5 การเตรียมสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลือง (ความเข้มข้น 3 mg/mL)

ชั่งสารสกัด 15 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 200 mM tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 5 mL นำไป centrifuge เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทของเหลวเหนือตะกอนลงใน microcentrifuge tube ขนาด 5 mL

2.5.1.6 การเตรียมสารละลายสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลือง (ความเข้มข้น 2.5 mg/mL)

ซังสารสกัด 12.5 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 200 mM tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 5 mL นำไป centrifuge เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทของเหลวเหนือตะกอนลงใน microcentrifuge tube ขนาด 5 mL

2.5.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ

2.5.2.1 เตรียมสารละลาย EGCG ที่ 5 ระดับความเข้มข้น เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.3, 0.6, 1.2, 1.8 และ 2.1 mg/mL ทดสอบโดยใช้วิธีเดียวกับการทดสอบของสารสกัดของบัวสายสีเหลืองตามทีระบุในข้อ 2.5.3 แต่ใช้สารละลาย EGCG แทนสารละลายสารสกัดของบัวสายสีเหลือง

2.5.2.2 คำนวณหา % inhibition ในการยับยั้งการทำงานของ PPE ของสารละลาย EGCG ทั้ง 5 ความเข้มข้น โดยดำเนินการทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2.5.2.3 นำค่าเฉลี่ย % inhibition ที่ได้ไป plot กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย EGCG และค่าเฉลี่ยของ % inhibition เพื่อคำนวณหาค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้

2.5.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ PPE ของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง โดยดำเนินการทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2.5.3.1 Negative control

2.5.3.1.1 ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 200 mM tris-HCl pH 8.0 160 μ L ใน 96-well plate

2.5.3.1.2 เติมสารละลาย PPE 20 μ L

2.5.3.1.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.5.3.1.4 เติมสารละลาย SANA 20 μ L

2.5.3.1.5 เตรียม blank โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 200 mM tris-HCl pH 8.0 แทนการเติมสารละลาย PPE

2.5.3.1.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm ด้วย microplate reader โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 20 นาที

2.5.3.1.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition

2.5.3.2 Positive control

2.5.3.2.1 ใส่สารละลาย EGCG 160 μ L ใน 96-well plate (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 1.0 mg/mL)

2.5.3.2.2 เติมสารละลาย PPE 20 μ L

2.5.3.2.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.5.3.2.4 เติมสารละลาย SANA 20 μ L

2.5.3.2.5 เตรียม blank โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 200 mM tris-HCl pH 8.0 แทนการเติมสารละลาย PPE

2.5.3.2.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm ด้วย microplate reader โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 20 นาที

2.5.3.2.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition

2.5.3.3 สารสกัดจากบัวสายสีเหลือง

2.5.3.3.1 ใส่สารละลายสารสกัดจากบัวสายสีเหลือง 160 μ L ใน 96-well plate (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาแตกต่างกันไป)

2.5.3.3.2 เติมสารละลาย PPE 20 μ L

2.5.3.3.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.5.3.3.4 เติมสารละลาย SANA 20 μ L

2.5.3.3.5 เตรียม blank โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 200 mM tris-HCl pH 8.0 แทนการเติมสารละลาย PPE

2.5.3.3.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm ด้วย microplate reader โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 20 นาที

2.5.3.3.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition

2.5.4 การคำนวณหา % inhibition ของสารสกัดจากบัวสายสีเหลือง

2.5.4.1 คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{Control}} - \text{Absorbance}_{\text{Sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{Control}}} \times 100$$

เมื่อ $\text{Absorbance}_{\text{Control}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitroaniline ที่เวลาสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มควบคุมแบบลบ และ $\text{Absorbance}_{\text{Sample}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitroaniline ที่เวลาสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มปฏิกิริยาทดสอบ

2.5.4.2 การคำนวณหา IC_{50} ของสารสกัดจากบัวสายสีเหลือง

นำค่าเฉลี่ย % inhibition ที่ได้ไป plot กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % inhibition เพื่อคำนวณหา IC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้

ตาราง 4 การลำดับและปริมาตรการเติมสารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ PPE

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรการเติมสาร (μL)				
	Buffer	EGCG	Extracts	Enzyme	SANA
Negative control	160	-	-	20	20
Blank negative control	180	-	-	-	20
Positive control	-	160	-	20	20
Blank positive control	20	160	-	-	20
Tested sample	-	-	160	20	20
Blank tested sample	20	-	160	-	20

2.6. การทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Liyanarachchi et al., 2018)

2.6.1 การเตรียมสารละลายสำหรับทดสอบ

2.6.1.1 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 100 mM phosphate pH 6.8

2.6.1.1.1 ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.1202 g ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 mL ด้วย sterile water for irrigation

2.6.1.1.2 ชั่ง Na_2HPO_4 3.5610 g ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL ละลายและปรับปริมาตรจนครบ 100 mL ด้วย sterile water for irrigation

2.6.1.1.3 เติมสารละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 24.5 mL และสารละลาย Na_2HPO_4 25.5 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL แล้วปรับปริมาตรจนครบ 100 mL ด้วย sterile water for irrigation

2.6.1.1.4 ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วยสารละลาย $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ หรือสารละลาย Na_2HPO_4

2.6.1.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.03 mg/mL)

ชั่งเอนไซม์ไทโรซิเนส 0.3 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 100 mM phosphate pH 6.8 ปริมาตร 1000 μL

2.6.1.3 การเตรียมสารละลาย L-DOPA (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.2 mg/mL)

ชั่ง L-DOPA 0.5 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 100 mM phosphate pH 6.8 ปริมาตร 1000 μL

2.6.1.4 การเตรียมสารละลาย kojic acid (ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.06 mg/mL)

ชั่ง kojic acid 0.12 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 100 mM phosphate pH 6.8 ปริมาตร 1000 μL

2.6.1.5 การเตรียมสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง (ความเข้มข้น 2 mg/mL)

ชั่งสารสกัด 5.2 mg ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 5 mL ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 100 mM phosphate pH 6.8 ปริมาตร 2.6 mL นำไป centrifuge เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเทของเหลวเหนือตะกอนลงใน microcentrifuge tube ขนาด 5 mL

2.6.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ

2.6.2.1 เตรียมสารละลาย kojic acid ที่ 5 ระดับความเข้มข้น เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.03, 0.04, 0.05, 0.06 และ 0.07 mg/mL ทดสอบโดยใช้วิธีเดียวกับการทดสอบของสารสกัดของบัวสายสีเหลืองตามที่ระบุในข้อ 2.6.3 แต่ใช้สารละลาย kojic acid แทนสารละลายสารสกัดของบัวสายสีเหลือง

2.6.2.2 คำนวณหา % inhibition ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารละลาย kojic acid ทั้ง 5 ความเข้มข้น โดยดำเนินการทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2.6.2.3 นำค่าเฉลี่ย % inhibition ที่ได้ไป plot กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย kojic acid และค่าเฉลี่ยของ % inhibition เพื่หาคำนวณหาค่า IC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้

2.6.3 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง โดยดำเนินการทดสอบที่เป็นอิสระต่อกัน 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

2.6.3.1 Negative control

2.6.3.1.1 ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ 100 mM phosphate pH 6.8 100 μ L ใน 96-well plate

2.6.3.1.2 เติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 20 μ L

2.6.3.1.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.6.3.1.4 เติมสารละลาย L-DOPA 80 μ L

2.6.3.1.5 เตรียม blank โดยการเติม 100 mM phosphate pH 6.8 แทนการเติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส

2.6.3.1.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm ด้วย microplate reader โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที

2.6.3.1.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition

2.6.3.2 Positive control

2.6.3.2.1 ใส่สารละลาย kojic acid 100 μ L ใน 96-well plate

2.6.3.2.2 เติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 20 μ L

2.6.3.2.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.6.3.2.4 เติมสารละลาย L-DOPA 80 μ L

2.6.3.2.5 เตรียม blank โดยการเติม 100 mM phosphate pH 6.8 แทนการเติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส

2.6.3.2.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm ด้วย microplate reader โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที

2.6.3.2.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition

2.6.3.3 สารสกัดจากบัวสายสีเหลือง

2.6.3.3.1 ใส่สารละลายสารสกัดจากบัวสายสีเหลือง 100 μ L ใน 96-well plate

2.6.3.3.2 เติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 20 μ L

2.6.3.3.3 Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

2.6.3.3.4 เติมสารละลาย L-DOPA 80 μ L

2.6.3.3.5 เตรียม blank โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 100 mM phosphate pH 6.8 แทนการเติมสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส

2.6.3.3.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 475 nm ด้วย microplate reader โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที

2.6.3.3.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition

ตาราง 5 การลำดับและปริมาตรการเติมสารลงใน 96-well plate เพื่อทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

กลุ่ม	ลำดับและปริมาตรการเติมสาร (μ L)				
	Buffer	Kojic	Extracts	Enzyme	L-DOPA
Negative control	100	-	-	20	80
Blank negative control	120	-	-	-	80
Positive control	-	100	-	20	80
Blank positive control	20	100	-	-	80
Tested sample	-	-	100	20	80
Blank tested sample	20	-	100	-	80

2.6.4 การคำนวณหา % inhibition ของสารสกัดจากบัวสายสีเหลือง

2.6.4.1 คำนวณหา % inhibition จากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{Control}} - \text{Absorbance}_{\text{Sample}}}{\text{Absorbance}_{\text{Control}}} \times 100$$

เมื่อ $\text{Absorbance}_{\text{Control}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของ dopaquinone ที่เวลาสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มควบคุมแบบลบ และ $\text{Absorbance}_{\text{Sample}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-dopaquinone ที่เวลาสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับกลุ่มปฏิกิริยาทดสอบ

2.6.4.2 การคำนวณหา IC_{50} ของสารสกัดจากบัวสายสีเหลือง

นำค่าเฉลี่ย % inhibition ที่ได้ไป plot กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % inhibition เพื่อคำนวณหา IC_{50} จากสมการเส้นตรงที่ได้

บทที่ 4

ผลการดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาสภาวะของ HPLC ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

จากการศึกษาสภาวะของ HPLC ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง พบว่าสามารถวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองได้ โดยรายละเอียดสภาวะของ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์ แสดงในตาราง 6 – 7

ตาราง 6 สภาวะของ HPLC ที่ใช้ในการวิเคราะห์

หัวข้อ	รายละเอียด
Stationary phase	ACE 5 C18-AR, 5- μ m, 250 x 4.6-mm
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 μ L
Detector	UV 280 nm

ตาราง 7 gradient elution ที่ใช้ในการวิเคราะห์

เวลา (นาที)	Acetonitrile : methanol (70 : 30) (%)	0.1 % Glacial acetic acid (%)
0.0	15.0	85.0
12.0	18.0	82.0
16.0	18.0	82.0
30.0	40.0	60.0
45.0	50.0	50.0
50.0	50.0	50.0
50.1	15.0	85.0
60.0	15.0	85.0

ในการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะของ HPLC ทำโดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมที่ 100 % จำนวน 6 ครั้ง แล้วประเมินโดยใช้ค่า resolution, asymmetry factor, repeatability และ theoretical plate ของฟลาไวโนอยด์แต่ละชนิด จากผลการทดสอบพบว่าวิธีที่ศึกษามีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ โดยผลการทดสอบความเหมาะสมแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 ผลการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

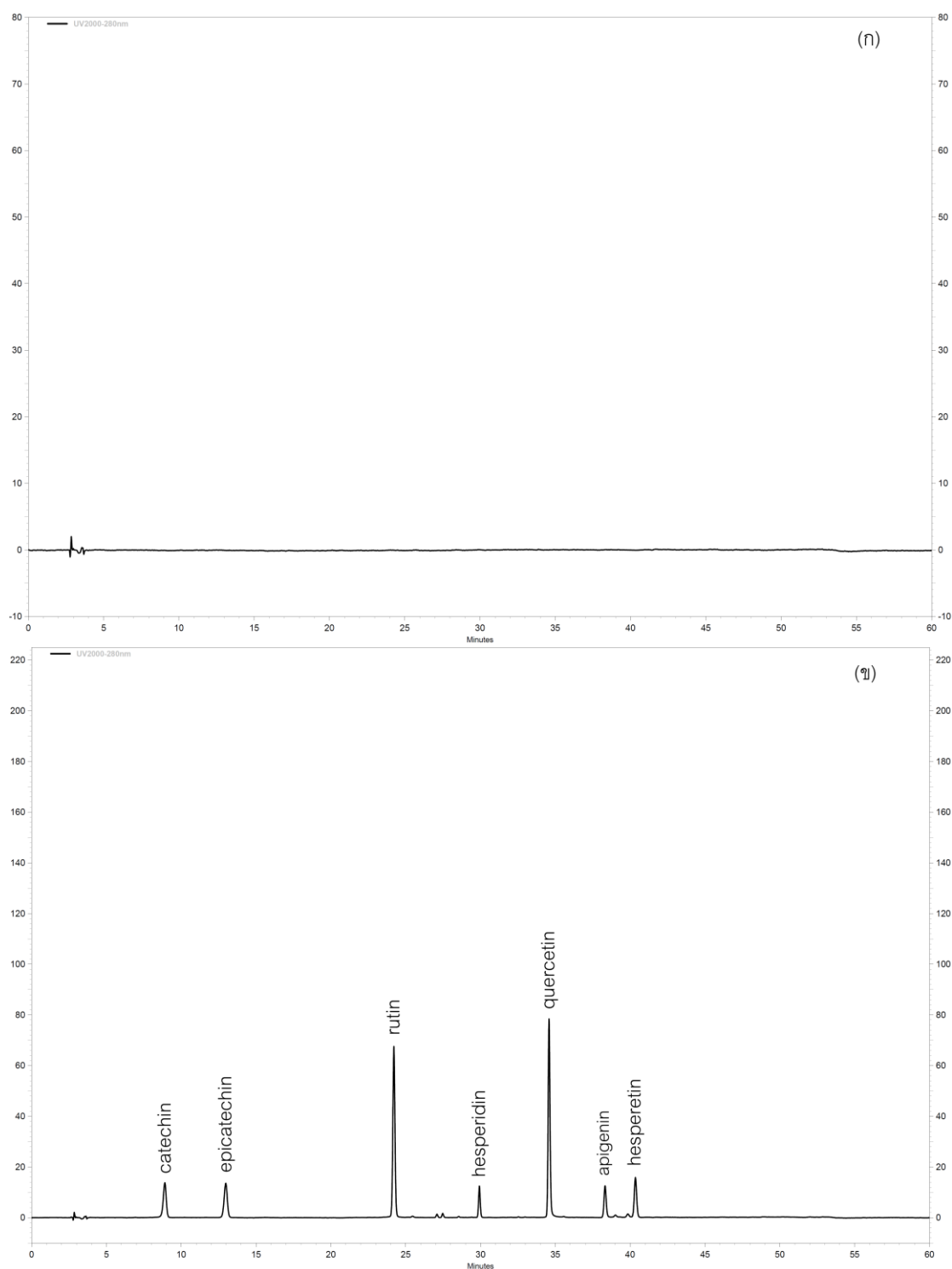
ชนิด ของฟลา ไวโนอยด์	Resolution	Asymmetry Factor	RSD of Peak Area (%)	Theoretical Plate
CA	16.4	0.9	1.1	9003
EP	10.3	1.0	0.4	14335
RU	33.1	1.0	0.7	119485
HD	12.1	1.1	0.4	322493
QT	21.5	1.1	0.4	360866
AP	14.9	1.1	0.8	299697
HT	1.7	1.0	0.3	293074

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

เมื่อทำการศึกษาหาสภาวะของ HPLC ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์แล้ว จะต้องตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ก่อนนำไปใช้วิเคราะห์ฟลาไวโนอยด์ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง เพื่อให้มั่นใจว่าผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำและน่าเชื่อถือ โดยดำเนินการตามแนวทางในการตรวจสอบความถูกต้องตามมาตรฐานของ The International Council for Harmonization (ICH) เรื่อง Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) ซึ่งเป็นมาตรฐานที่ยอมรับกันในระดับสากล สำหรับผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์มีดังนี้

2.1 การทดสอบความจำเพาะ

ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์สามารถแสดงได้จาก chromatogram ดังแสดงในภาพประกอบ 8 ซึ่งประกอบด้วย chromatogram ของ diluent และสารละลายมาตรฐานผสม



ภาพประกอบ 8 chromatogram จากการวิเคราะห์โดย (ก) เป็น chromatogram ของ diluent และ (ข) เป็น chromatogram ของสารละลายมาตรฐานผสม ซึ่งประกอบด้วย catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin

โดยจาก chromatogram ของ diluent พบว่าไม่มีพีค รบกวนที่ตำแหน่ง retention time เดียวกับ ฟลาโวนอยด์ที่ต้องการวิเคราะห์ทั้ง 7 ชนิด และจาก chromatogram ของ สารละลายมาตรฐานผสม พบว่า retention time ของฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดมีค่าแตกต่างกัน และมีค่า resolution ไม่น้อยกว่า 1.5 แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะ สามารถวิเคราะห์ แยกฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดได้ โดย retention time และ resolution แสดงในตาราง 9

ตาราง 9 retention time และ resolution ของ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin

ชนิดของฟลาโวนอยด์	Retention time (นาที)	Resolution
CA	8.597	16.4
EP	12.597	10.3
RU	24.050	33.1
HD	29.908	12.1
QT	34.583	21.5
AP	38.350	14.9
HT	40.397	1.7

2.2 การทดสอบช่วงและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง

ทำโดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 7 ความเข้มข้น ครอบคลุม 10 – 200 % ของความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC แล้ว นำผลการวิเคราะห์มาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงโดยแกน X คือความเข้มข้นของ ฟลาโวนอยด์แต่ละชนิด และแกน Y คือ peak area แล้วคำนวณสมการแสดงความสัมพันธ์และ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) พบว่าสมการของฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิด แสดงความเป็นเส้นตรง โดยมีค่า r มากกว่า 0.995 สำหรับสมการแสดงความสัมพันธ์ ค่า r และ ช่วงของความเข้มข้นที่แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิด แสดงในตาราง

ตาราง 10 สมการแสดงความสัมพันธ์ ค่า r และช่วงของความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิด

ชนิดของฟลาโวนอยด์	สมการแสดงความสัมพันธ์	r	ช่วงความเข้มข้น (µg/mL)
CA	$y = 13617x - 4032$	0.9998	1.5 - 30.0
EP	$y = 14104x - 4417$	0.9998	1.5 - 30.0
RU	$y = 13335x - 2685$	0.9999	5.0 - 100.0
HD	$y = 32298x + 634$	0.9998	0.3 - 6.0
QT	$y = 24357x - 51518$	0.9994	3.0 - 60.0
AP	$y = 45266x - 3183$	0.9998	0.3 - 6.0
HT	$y = 58166x + 3664$	0.9998	0.3 - 6.0

2.3 การทดสอบความแม่นยำ

2.3.1 การทดสอบ repeatability

repeatability ของวิธีวิเคราะห์ แสดงโดยค่า %RSD ของปริมาณฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดที่ตรวจพบจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ จำนวน 6 ตัวอย่าง ค่าเฉลี่ยของปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบ SD และ %RSD ของการทดสอบ Repeatability แสดงในตาราง 11 จากการทดสอบพบว่า %RSD ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.3 - 1.1

2.3.2 การทดสอบ intermediate precision

intermediate precision ของวิธีวิเคราะห์ แสดงจากค่า %RSD ของปริมาณฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดที่ตรวจพบจากการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยทำการทดสอบ 2 วัน ค่าเฉลี่ยของปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบ SD และ %RSD ของการทดสอบ intermediate precision แสดงในตาราง 12 จากการทดสอบพบว่า %RSD ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.6 - 2.2

ตาราง 11 ค่าเฉลี่ยของปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบ SD และ %RSD ของการทดสอบ repeatability (n = 6)

ชนิดของฟลาโวนอยด์	ค่าเฉลี่ยของปริมาณที่ตรวจพบ ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ SD	RSD (%)
CA	15.0 $\pm$ 0.16	1.1
EP	14.9 $\pm$ 0.06	0.4
RU	49.2 $\pm$ 0.35	0.7
HD	3.0 $\pm$ 0.01	0.4
QT	29.3 $\pm$ 0.11	0.4
AP	2.9 $\pm$ 0.02	0.8
HT	3.0 $\pm$ 0.01	0.3

ตาราง 12 ค่าเฉลี่ยของปริมาณฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบ SD และ %RSD ของการทดสอบ intermediate precision (n = 12)

ชนิดของฟลาโวนอยด์	ค่าเฉลี่ยของปริมาณที่ตรวจพบ ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ SD	RSD (%)
CA	14.8 $\pm$ 0.32	2.1
EP	14.9 $\pm$ 0.10	0.7
RU	49.3 $\pm$ 0.31	0.6
HD	3.0 $\pm$ 0.06	2.2
QT	29.5 $\pm$ 0.29	1.0
AP	2.9 $\pm$ 0.03	1.2
HT	2.9 $\pm$ 0.04	1.3

2.4 การทดสอบความถูกต้อง

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ สามารถแสดงได้จาก % recovery จากการเติมสารมาตรฐานของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดลงในสารละลายตัวอย่างของบัวสายสีเหลือง โดยเติมฟลาโวนอยด์ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ระดับความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง ปริมาณสารมาตรฐานฟลาโวนอยด์

นอยด์แต่ละชนิดที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างและ % recovery ของการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงในตาราง 13 จากการทดสอบพบว่าค่าเฉลี่ย % recovery ของฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง มีค่าอยู่ในช่วง 96.8 – 103.8 และ 96.4 - 104.1 ตามลำดับ

ตาราง 13 ปริมาณฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดที่เติมลงในสารตัวอย่างและค่าเฉลี่ย % recovery ของการทดสอบความถูกต้อง (n = 3)

ชนิดของฟลาโวนอยด์	ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่เติม (µg/mL)	สารสกัดจากกลีบดอก		สารสกัดจากเกสร	
		ค่าเฉลี่ยของ recovery (%)	RSD (%)	ค่าเฉลี่ยของ recovery (%)	RSD (%)
CA	12.0	100.4	2.0	99.9	2.1
	15.0	103.8	1.0	102.4	1.5
	18.0	102.7	1.4	102.8	1.2
EP	12.0	102.7	1.8	100.6	0.6
	15.0	102.6	1.5	98.0	1.6
	18.0	102.7	0.5	99.5	1.6
RU	40.0	96.8	1.1	100.2	1.9
	50.0	99.2	1.1	102.1	0.9
	60.0	100.4	1.0	103.1	0.4
HD	2.4	100.6	1.0	102.4	0.2
	3.0	101.3	1.0	98.6	0.4
	3.6	102.7	0.3	101.6	0.7
QT	24.0	97.6	1.4	103.5	1.0
	30.0	98.8	2.0	103.7	1.3
	36.0	100.4	1.6	104.1	0.3
AP	2.4	102.1	1.8	96.4	2.5
	3.0	103.0	1.5	102.7	1.5
	3.6	103.7	0.8	102.3	1.8

ตาราง 13 (ต่อ)

ชนิดของฟลาโวนอยด์	ปริมาณฟลาโวนอยด์ที่เติม (µg/mL)	สารสกัดจากกลีบดอก		สารสกัดจากเกสร	
		ค่าเฉลี่ยของ recovery (%)	RSD (%)	ค่าเฉลี่ยของ recovery (%)	RSD (%)
HT	2.4	103.1	0.6	103.2	0.5
	3.0	103.4	1.1	102.2	2.0
	3.6	102.8	0.3	101.4	0.7

2.5 การทดสอบขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ

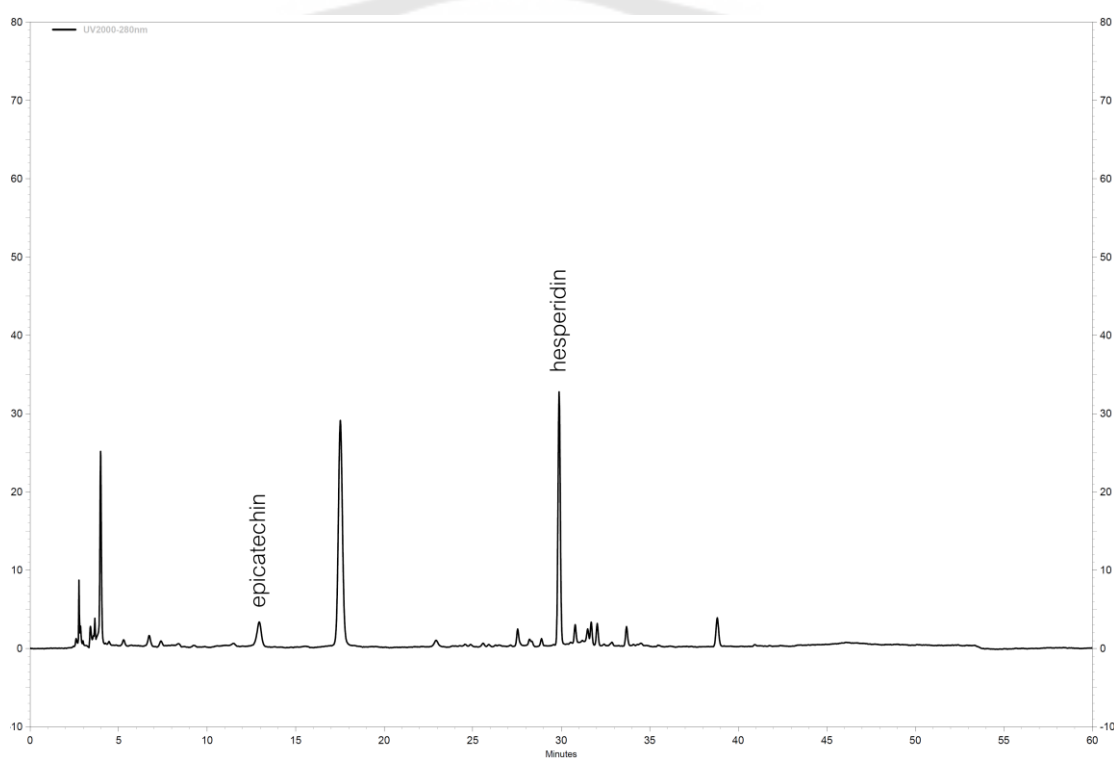
จากการทดสอบหาขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณโดยใช้การคำนวณจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าตอบสนองจากเครื่องมือและความชันของความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นและค่าตอบสนองจากเครื่องมือ ขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณของฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิด แสดงในตาราง 14

ตาราง 14 ขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณของ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin

ชนิดของฟลาโวนอยด์	ขีดจำกัดการตรวจพบ (µg/mL)	ขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (µg/mL)
CA	0.69	2.09
EP	0.62	1.87
RU	1.70	5.14
HD	1.32	3.99
QT	2.62	7.94
AP	0.15	0.44
HT	0.16	0.48

3. การวิเคราะห์สารสกัดบัวสายสีเหลือง

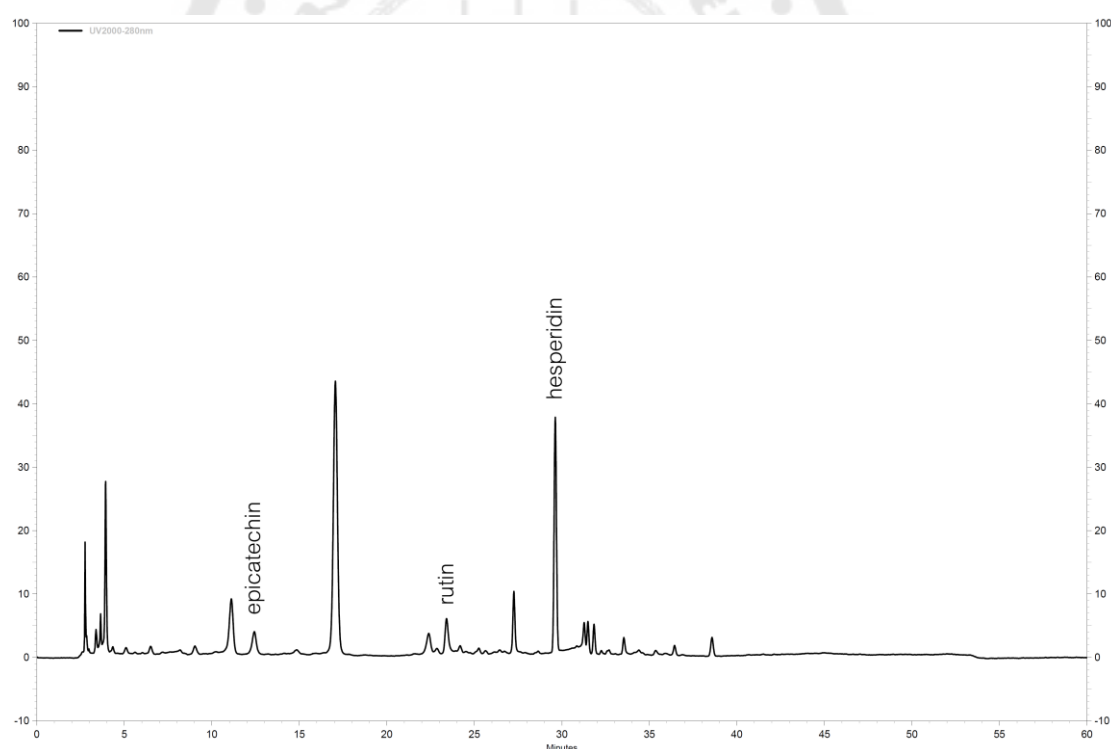
สารสกัดจากกลีบดอกและสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลืองที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล 80 % ถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยใช้วิธีที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว จากผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลืองมี epicatechin และ hesperidin ในปริมาณร้อยละ 4.20 และ 8.18 โดยน้ำหนัก และสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลืองมี epicatechin, rutin และ hesperidin ในปริมาณร้อยละ 2.49, 2.80 และ 5.06 โดยน้ำหนัก chromatogram ของการวิเคราะห์สารตัวอย่างแสดงในภาพประกอบ 9 – 10 และรายละเอียดของผลการวิเคราะห์แสดงในตาราง 15 - 16



ภาพประกอบ 9 chromatogram จากการวิเคราะห์สารสกัดจากกลีบดอก
ของบัวสายสีเหลือง

ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์ของสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลือง

ชนิดของฟลาโวนอยด์	ครั้งที่	ปริมาณร้อยละของฟลาโวนอยด์โดย น้ำหนัก (% w/w) เทียบกับสารสกัด
EP	1	4.23
	2	4.16
	ค่าเฉลี่ย	4.20
HD	1	8.18
	2	8.18
	ค่าเฉลี่ย	8.18



ภาพประกอบ 10 chromatogram จากการวิเคราะห์สารสกัดจากเกสร
ของดอกบัวสายสีเหลือง

ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์ของสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลือง

ชนิดของ ฟลาโวนอยด์	ครั้งที่	ปริมาณร้อยละของฟลาโวนอยด์โดย น้ำหนัก (% w/w)
EP	1	2.52
	2	2.46
	ค่าเฉลี่ย	2.49
RU	1	2.86
	2	2.74
	ค่าเฉลี่ย	2.80
HD	1	5.06
	2	5.06
	ค่าเฉลี่ย	5.06

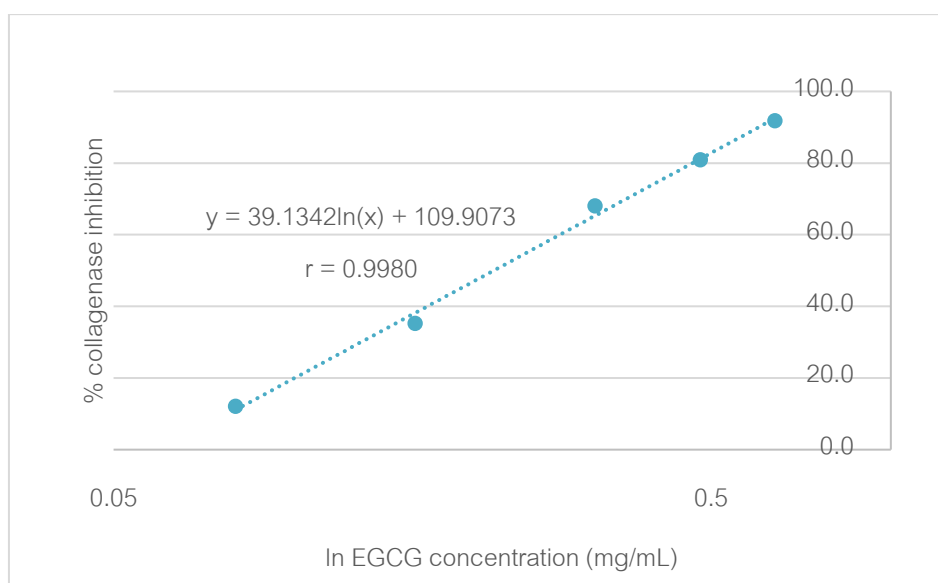
4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส

4.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสโดยใช้ EGCG เป็นสารควบคุมเชิงบวก พบว่าวิธีในการวิเคราะห์สามารถใช้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ ซึ่งจากการทดสอบโดยใช้สารละลาย EGCG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0.08 – 0.64 mg/mL มีค่า % collagenase inhibition ดังแสดงในตาราง 17 และจากการกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย EGCG และค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition พบว่า $\ln$ ความเข้มข้นของสารละลาย EGCG และค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition แสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 39.1342 \ln(x) + 109.9073$ และมีค่า r เท่ากับ 0.9980 ดังแสดงในภาพประกอบ 11 โดยจากสมการเส้นตรงดังกล่าวสามารถคำนวณหาค่า $\ln(x)$ ได้เท่ากับ -1.53 และเมื่อกำหนดค่า IC_{50} ของสารละลาย EGCG จะได้เท่ากับ 0.22 mg/mL

ตาราง 17 ค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition ของสารละลาย EGCG ที่แต่ละความเข้มข้น

สารละลาย	ค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆ				
ตัวอย่าง	0.08 mg/mL	0.16 mg/mL	0.32 mg/mL	0.48 mg/mL	0.64 mg/mL
EGCG	12.1 ± 2.3	35.3 ± 1.4	68.1 ± 1.5	80.9 ± 0.7	91.8 ± 2.4



ภาพประกอบ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย EGCG และค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition

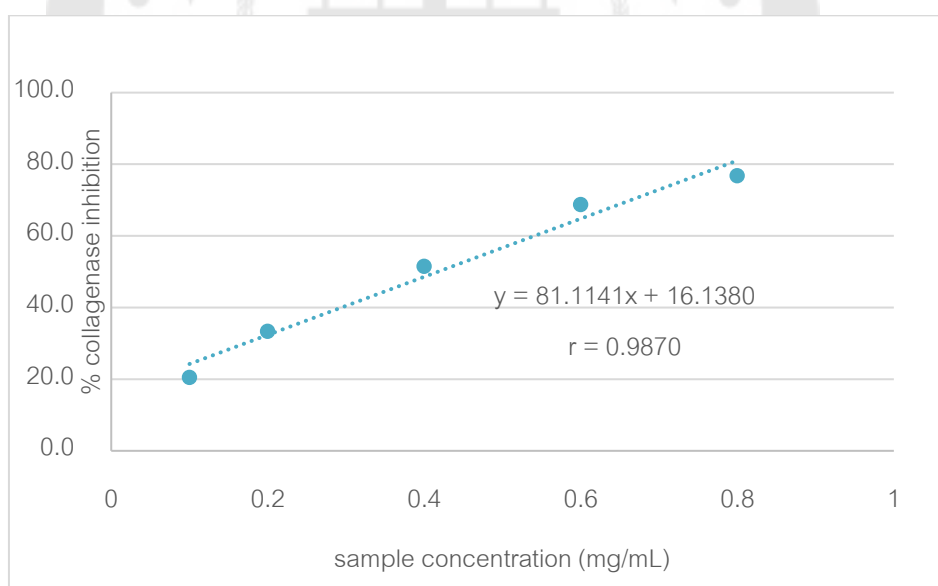
4.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสสำหรับสารสกัดบัวสายสีเหลือง

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองโดยใช้สารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0.1 – 0.8 mg/mL และใช้สารละลาย EGCG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.32 mg/mL เป็นสารควบคุมเชิงบวก พบว่าสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองมีค่า % collagenase inhibition ดังแสดงในตาราง 18

ตาราง 18 ค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่แต่ละความเข้มข้น

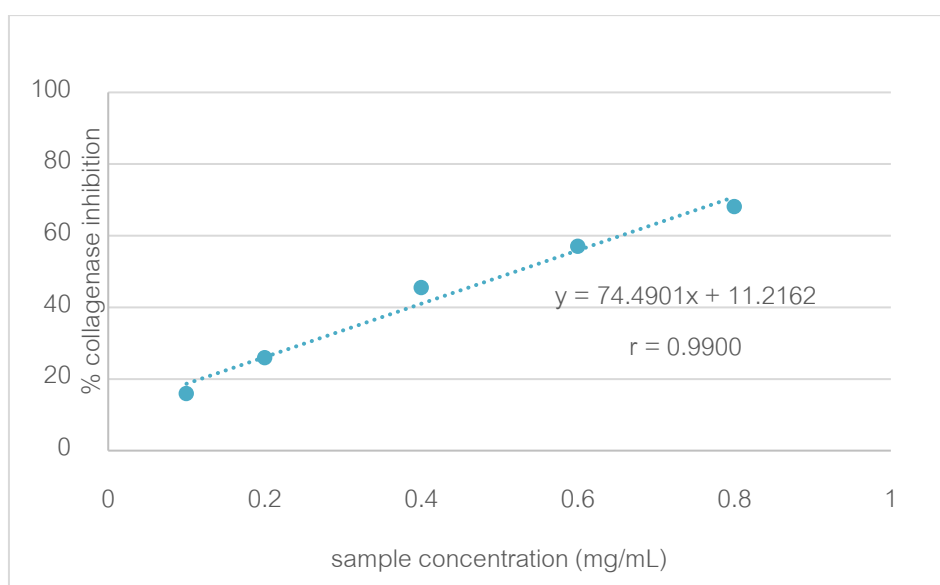
สารละลาย	ค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆ				
ตัวอย่าง	0.1 mg/mL	0.2 mg/mL	0.4 mg/mL	0.6 mg/mL	0.8 mg/mL
กลีบดอก	20.5 ± 1.9	33.4 ± 1.5	51.5 ± 2.4	68.6 ± 1.4	76.8 ± 5.3
เกสร	15.9 ± 3.8	26.0 ± 3.5	45.5 ± 3.5	57.0 ± 5.6	68.1 ± 1.9

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition พบว่าตัวแปรทั้งสองแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 81.1141x + 16.1380$ และมีค่า r เท่ากับ 0.9870 ดังแสดงในภาพประกอบ 12 โดยจากสมการเส้นตรงดังกล่าวสามารถคำนวณหา IC_{50} ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีเหลืองได้เท่ากับ 0.42 mg/mL



ภาพประกอบ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากเกสรบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition พบว่าตัวแปรทั้งสองแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 74.4901x + 11.2162$ และมีค่า r เท่ากับ 0.9900 ดังแสดงในภาพประกอบ 13 โดยจากสมการเส้นตรงดังกล่าวสามารถคำนวณหา IC_{50} ของสารละลายสารสกัดจากเกสรบัวสายสีเหลืองได้เท่ากับ 0.52 mg/mL



ภาพประกอบ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากเกสรบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition

5. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส

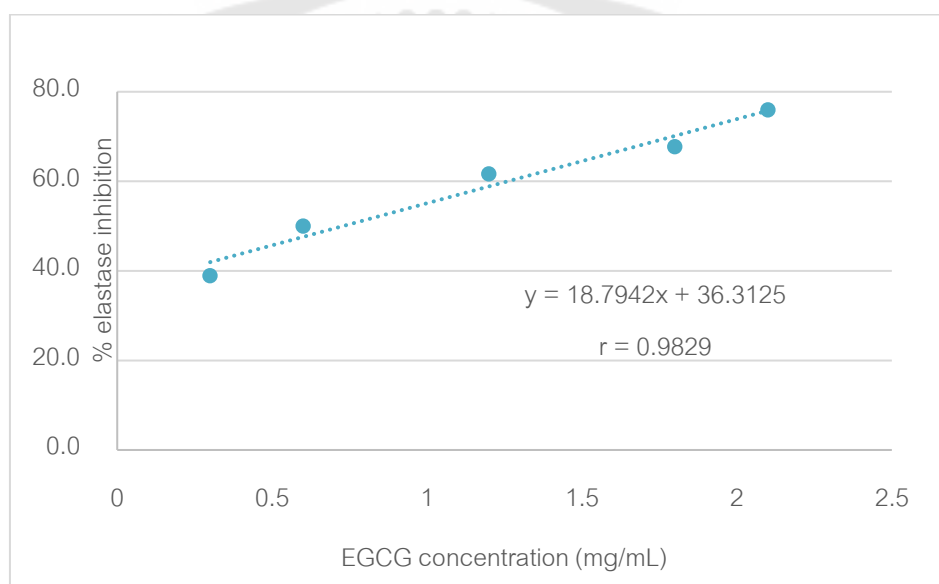
5.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสโดยใช้ EGCG เป็นสารควบคุมเชิงบวก พบว่าวิธีในการวิเคราะห์สามารถใช้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้ ซึ่งจากการทดสอบโดยใช้สารละลาย EGCG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0.3 – 2.1 mg/mL มีค่า % elastase inhibition ดังแสดงในตาราง 19 และจากการกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย EGCG และค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition พบว่าตัวแปรทั้งสองแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 18.7942x + 36.3125$ และมีค่า r เท่ากับ 0.9829 ดังแสดงใน

ภาพประกอบ 14 โดยจากสมการเส้นตรงดังกล่าวสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารละลาย EGCG ได้เท่ากับ 0.73 mg/mL

ตาราง 19 ค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition ของสารละลาย EGCG ที่แต่ละความเข้มข้น

สารละลาย	ค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆ				
ตัวอย่าง	0.3 mg/mL	0.6 mg/mL	1.2 mg/mL	1.8 mg/mL	2.1 mg/mL
EGCG	38.9 ± 2.5	50.0 ± 2.6	61.7 ± 3.8	67.7 ± 3.4	76.0 ± 4.2



ภาพประกอบ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย EGCG และค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition

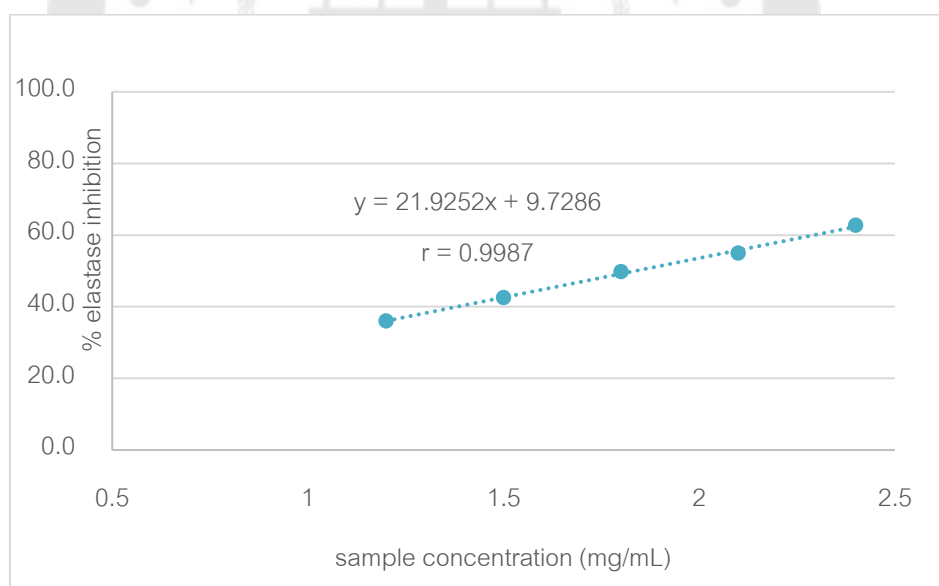
5.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสสำหรับสารสกัดบัวสายสีเหลือง

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองโดยใช้สารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 1.2 – 2.4 mg/mL และ 0.8 – 2.0 mg/mL ตามลำดับ และใช้สารละลาย EGCG ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1.0 mg/mL เป็นสารควบคุมเชิงบวก พบว่าสารละลาย

สารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองมีค่า % elastase inhibition ดังแสดงในตาราง 20

ตาราง 20 ค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่แต่ละความเข้มข้น

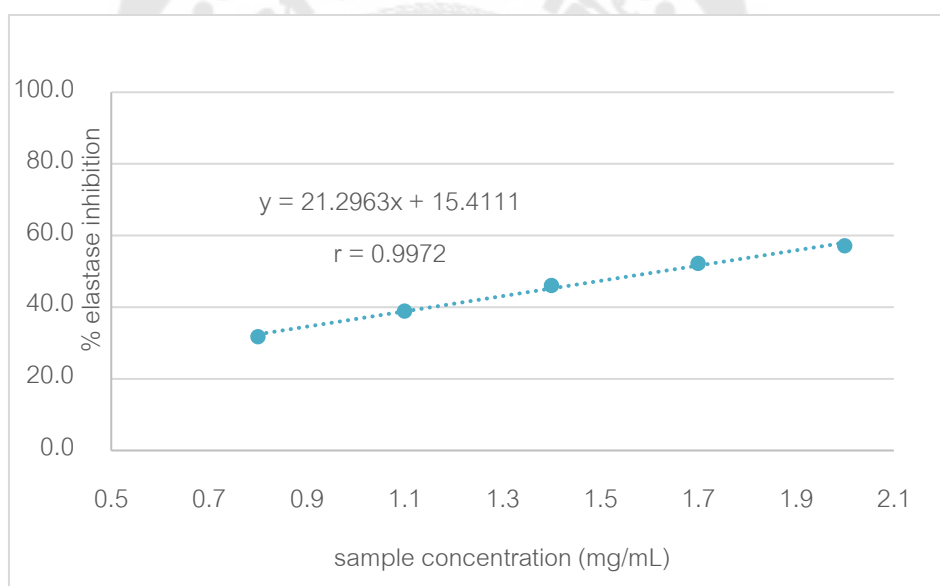
สารละลาย ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆ				
กลีบดอก	1.2 mg/mL	1.5 mg/mL	1.8 mg/mL	2.1 mg/mL	2.4 mg/mL
	36.0 ± 1.6	42.6 ± 2.3	49.7 ± 4.0	55.0 ± 2.0	62.7 ± 7.9
เกสร	0.8 mg/mL	1.1 mg/mL	1.4 mg/mL	1.7 mg/mL	2.0 mg/mL
	31.8 ± 1.4	38.9 ± 2.3	46.1 ± 4.5	52.2 ± 5.3	57.1 ± 4.6



ภาพประกอบ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition พบว่าตัวแปรทั้งสองแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 21.9252x + 9.7286$ และมีค่า r เท่ากับ 0.9987 ดังแสดงในภาพประกอบ 15 โดยจากสมการเส้นตรงดังกล่าวสามารถคำนวณหา ค่า IC_{50} ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีเหลืองได้เท่ากับ 1.84 mg/mL

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากเกสรบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition พบว่าตัวแปรทั้งสองแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 21.2963x + 15.4111$ และมีค่า r เท่ากับ 0.9972 ดังแสดงในภาพประกอบ 16 โดยจากสมการเส้นตรงดังกล่าวสามารถคำนวณหา ค่า IC_{50} ของสารละลายสารสกัดจากเกสรบัวสายสีเหลืองได้เท่ากับ 1.62 mg/mL



ภาพประกอบ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากเกสรบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition

6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

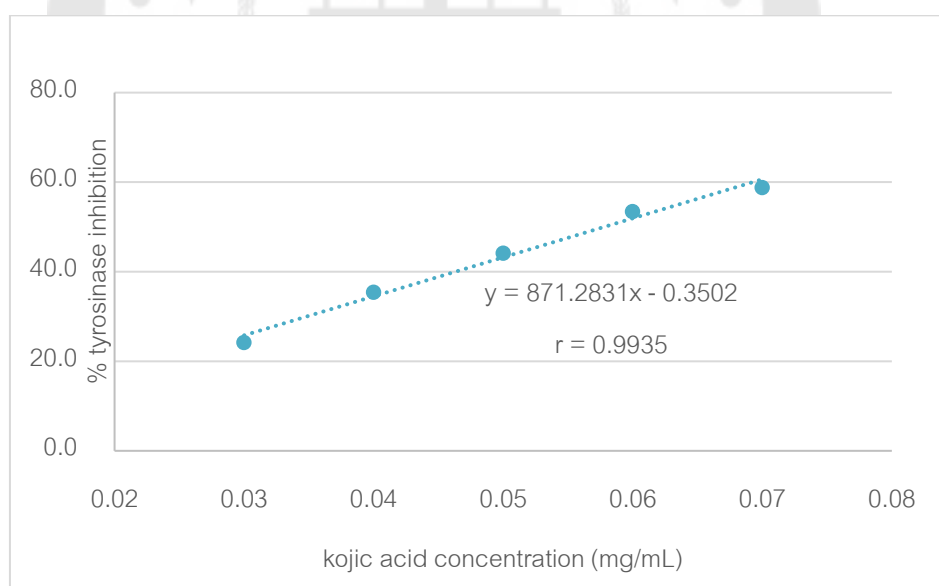
6.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยใช้ kojic acid เป็นสารควบคุมเชิงบวก พบว่าวิธีในการวิเคราะห์สามารถใช้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ซึ่งจากการทดสอบโดยใช้สารละลาย kojic

acid ที่ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0.03 – 0.07 mg/mL มีค่า % tyrosinase inhibition ดังแสดงในตาราง 21 และจากการกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย Kojic acid และค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition พบว่าตัวแปรทั้งสองแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 871.2831x - 0.3502$ และมีค่า r เท่ากับ 0.9935 ดังแสดงในภาพประกอบ 17 โดยจากสมการเส้นตรงดังกล่าวสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารละลาย kojic acid ได้เท่ากับ 0.058 mg/mL

ตาราง 21 ค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition ของสารละลาย kojic acid ที่แต่ละความเข้มข้น

สารละลาย	ค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆ				
ตัวอย่าง	0.03 mg/mL	0.04 mg/mL	0.05 mg/mL	0.06 mg/mL	0.07 mg/mL
kojic acid	24.2 ± 1.7	35.5 ± 3.8	44.2 ± 3.8	53.4 ± 3.9	58.8 ± 3.2



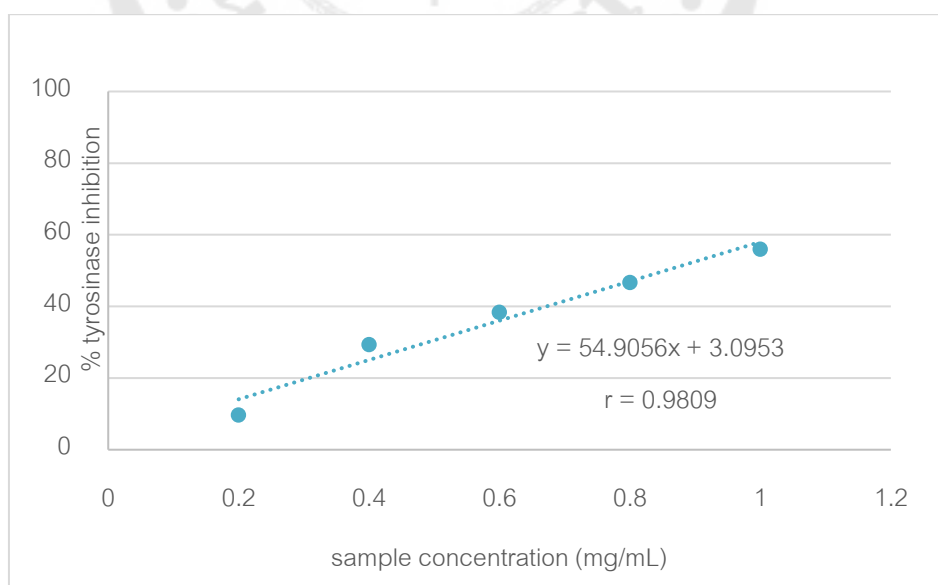
ภาพประกอบ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย kojic acid และค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition

6.2 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสสำหรับสารสกัดบัวสายสีเหลือง

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองโดยใช้สารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นสุดท้ายในช่วง 0.2 – 1.0 mg/mL และใช้สารละลาย kojic acid ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.06 mg/mL เป็นสารควบคุมเชิงบวก พบว่าสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองมีค่า % tyrosinase inhibition ดังแสดงในตาราง 22

ตาราง 22 ค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่แต่ละความเข้มข้น

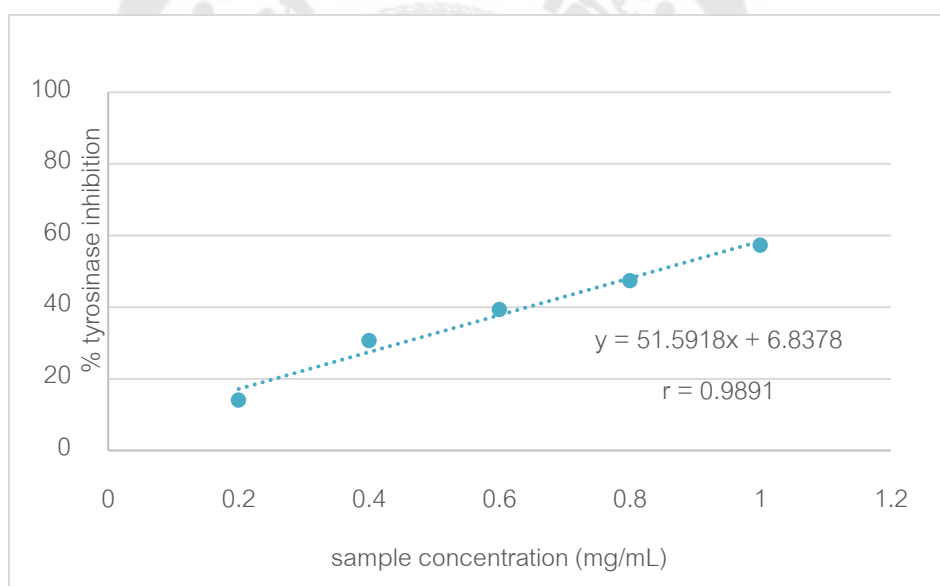
สารละลาย	ค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition ที่ความเข้มข้นต่างๆ				
ตัวอย่าง	0.2 mg/mL	0.4 mg/mL	0.6 mg/mL	0.8 mg/mL	1.0 mg/mL
กลีบดอก	9.7 ± 2.0	29.4 ± 2.3	38.4 ± 2.4	46.7 ± 3.9	56.0 ± 3.5
เกสร	14.1 ± 2.8	30.7 ± 1.9	39.4 ± 0.8	47.4 ± 0.2	57.3 ± 2.9



ภาพประกอบ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition พบว่าตัวแปรทั้งสองแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 54.9056x + 3.0953$ และมีค่า r เท่ากับ 0.9809 ดังแสดงในภาพประกอบ 18 โดยจากสมการเส้นตรงดังกล่าวสามารถคำนวณหา ค่า IC_{50} ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกบัวสายสีเหลืองได้เท่ากับ 0.85 mg/mL

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากเกสรบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition พบว่าตัวแปรทั้งสองแสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงโดยมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $y = 51.5918x + 6.8378$ และมีค่า r เท่ากับ 0.9891 ดังแสดงในภาพประกอบ 19 โดยจากสมการเส้นตรงดังกล่าวสามารถคำนวณหา ค่า IC_{50} ของสารละลายสารสกัดจากเกสรบัวสายสีเหลืองได้เท่ากับ 0.84 mg/mL



ภาพประกอบ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดจากเกสรบัวสายสีเหลืองและค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการวิจัย ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์จำนวน 7 ชนิด ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองด้วยเทคนิค HPLC และนำสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองมาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนส หลังจากได้ผลการดำเนินงานแล้ว สามารถสรุปผลการดำเนินงาน โดยแบ่งหัวข้อในการสรุปผลได้ดังต่อไปนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองด้วยเทคนิค HPLC รวมทั้งทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัด เพื่อประโยชน์ในการเลือกใช้สารสกัดเพื่อนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ชะลอการเสื่อมสภาพของผิวหนังต่อไป ซึ่งจากการดำเนินการวิจัย สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. จากการศึกษาลักษณะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้การตรวจวัดด้วยการวัดการดูดกลืนรังสียูวี ผู้วิจัยได้ศึกษาอัตราส่วนระหว่าง 0.1 % GAA และสารผสม acetonitrile และ methanol ใน gradient elution ซึ่งพบว่า gradient elution ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง ดังแสดงในตาราง 7 โดย gradient elution นี้ สามารถวิเคราะห์แยกฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดออกจากกันได้ นอกจากนี้ในการศึกษาความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด พบว่าที่ความยาวคลื่น 280 nm ฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดให้ค่าการตอบสนองที่เหมาะสมในการตรวจวัดได้

2. ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามแนวทางในการตรวจสอบความถูกต้องตามมาตรฐานของ The International Council for

Harmonization (ICH) เรื่อง Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) โดยแบ่งเป็นหัวข้อดังนี้

2.1 การทดสอบความจำเพาะโดยการวิเคราะห์ diluent สารละลายมาตรฐานของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิด และสารละลายมาตรฐานผสมที่ประกอบด้วยฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิด พบว่า diluent ไม่มีพีคบริเวณที่ตำแหน่ง retention time เดียวกับฟลาโวนอยด์ที่ต้องการวิเคราะห์ และพีคของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดแยกจากกันชัดเจน โดยมีค่า resolution มากกว่า 1.5 จึงสามารถสรุปได้ว่าวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจง

2.2 การทดสอบช่วงและความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 10 – 200 % ของความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ โดย catechin และ epicatechin ทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 1.5 – 30 µg/mL, rutin ทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 5 – 100 µg/mL, hesperidin ทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.3 – 6 µg/mL และ quercetin, apigenin และ hesperetin ทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้น 0.3 – 6 µg/mL โดยค่า r ที่ได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดมีค่าอยู่ในช่วง 0.9994 – 0.9999 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.995 แสดงว่าในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว ค่าการตอบสนองจากเครื่องมือวิเคราะห์แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับความเข้มข้นของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิด

2.3 การทดสอบความแม่นยำ โดยการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดในสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้น 100 % ของความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 6 ตัวอย่าง จากการทดสอบภายในวันเดียวกัน พบว่า % RSD ของปริมาณฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดที่ตรวจพบมีค่าอยู่ในช่วง 0.3 – 1.1 และในการทดสอบระหว่างวัน พบว่า % RSD มีค่าอยู่ในช่วง 0.6 – 2.2 ซึ่ง % RSD ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 5.3 % แสดงว่าวิธีวิเคราะห์มีความแม่นยำ

2.4 การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ แสดงในรูป % recovery จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดใน spiked solution ของสารสกัดจากกลีบและเกสรของบัวสายสีเหลือง ที่ 3 ระดับความเข้มข้น โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของ % recovery ของฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรบัวสายสีเหลืองมีค่าอยู่ในช่วง 96.8 – 103.8 และ 96.4 – 104.1 ตามลำดับ โดย % recovery ที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 90 – 107 ซึ่งแสดงถึงความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

2.5 การทดสอบขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ ทำโดยการคำนวณจากส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าตอบสนองจากเครื่องมือและความชันของความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นและค่าตอบสนองจากเครื่องมือ พบว่าขีดจำกัดการ

ตรวจวัดเชิงปริมาณของ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin มีค่าเท่ากับ 2.09, 1.87, 5.14, 3.99, 7.94, 0.44 และ 0.48 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ

3. จากการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากกลีบและเกสรของบัวสายสีเหลือง ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องแล้ว พบว่าสารสกัดจากกลีบดอกของบัวสายสีเหลืองมี epicatechin และ hesperidin ในปริมาณร้อยละ 4.20 และ 8.18 โดยน้ำหนัก และสารสกัดจากเกสรของบัวสายสีเหลืองมี epicatechin, rutin และ hesperidin ในปริมาณร้อยละ 2.49, 2.80 และ 5.06 โดยน้ำหนัก

4. จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองโดยใช้เทคนิค spectrophotometry สามารถสรุปได้ดังนี้

4.1 สารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 0.8 mg/mL สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ $76.8 \pm 5.3 \%$ และ $68.1 \pm 1.9 \%$ ตามลำดับ และจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดและค่าเฉลี่ยของ % collagenase inhibition พบว่าสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองได้เท่ากับ 0.42 mg/mL และ 0.52 mg/mL ตามลำดับ

4.2 สารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 2.41 mg/mL และ 2.0 mg/mL ตามลำดับ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้ $62.7 \pm 7.9 \%$ และ $57.1 \pm 4.6 \%$ ตามลำดับ และจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดและค่าเฉลี่ยของ % elastase inhibition พบว่าสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองได้เท่ากับ 1.84 mg/mL และ 1.62 mg/mL ตามลำดับ

4.3 สารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือ 1.0 mg/mL สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ $56.0 \pm 3.5 \%$ และ $57.3 \pm 2.9 \%$ ตามลำดับ และจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดและค่าเฉลี่ยของ % tyrosinase inhibition พบว่าสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารละลายสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองได้เท่ากับ 0.85 mg/mL และ 0.84 mg/mL ตามลำดับ

อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษาหาสภาวะของ HPLC ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่าที่ความยาวคลื่น 280 nm ฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดให้ค่าการตอบสนองที่เหมาะสมในการตรวจวัดเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจวัดที่ 254 nm ซึ่งสอดคล้องกับการพบทวนวรรณกรรมที่ระบุว่าความยาวคลื่นที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์คือ 280 nm (Andersen & Markham, 2005) และ gradient elution ซึ่งประกอบด้วย 0.1 % glacial acetic acid และสารละลายผสมระหว่าง acetonitrile และ methanol (70:30) เวลาในการวิเคราะห์ 60 นาที สามารถวิเคราะห์แยกฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิดได้ โดยจากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะ ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ความแม่นยำและความถูกต้อง รวมทั้งมีขีดจำกัดการตรวจพบและขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ อ้างอิงจากมาตรฐานของ The International Council for Harmonization (ICH) เรื่อง Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) (ICH, 2005) วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวจึงสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองได้

เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องไปวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลือง พบว่าในกลีบดอกพบ epicatechin และ hesperidin ในปริมาณร้อยละ 4.20 และ 8.18 โดยน้ำหนัก ส่วนเกสรของพบว่ามี epicatechin, rutin และ hesperidin ในปริมาณร้อยละ 2.49, 2.80 และ 5.06 โดยน้ำหนัก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยที่ระบุว่าสารสกัดจากแต่ละส่วนของบัวสายจะมีปริมาณฟลาโวนอยด์ที่แตกต่างกัน (Cudalbeanu et al., 2018)

เมื่อนำสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยมีแนวโน้มที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสามชนิดได้เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดทั้งสองชนิด พบว่าสารสกัดจากกลีบดอกมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสได้ดีกว่าสารสกัดจากเกสรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.03$) โดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรเท่ากับ 0.42 mg/mL และ 0.52 mg/mL ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัดจากเกสรมีฤทธิ์

ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้ดีกว่าสารสกัดจากกลีบดอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.04$) โดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรเท่ากับ 1.84 mg/mL และ 1.62 mg/mL ตามลำดับ และสารสกัดทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.27$) โดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดจากกลีบดอกและเกสรเท่ากับ 0.85 mg/mL และ 0.84 mg/mL ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ พบว่าสารสกัดจากกลีบดอกมี epicatechin และ hesperidin ส่วนสารสกัดจากเกสรมี epicatechin, rutin และ hesperidin โดยที่สารสกัดทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตส และเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ระบุว่า epicatechin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Geeta, 2019) rutin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนส (Selvaraj, 2016; Si et al., 2012) และ hesperidin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (Widowati, 2018; Zhang et al., 2007)

นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ในแต่ละส่วนของบัวสาย พบว่ามีชนิดและปริมาณของฟลาโวนอยด์แตกต่างกัน นอกจากนี้จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสามชนิด สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ชะลอการเสื่อมสภาพของผิวหนังที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากกลีบดอกหรือเกสรบัวสายสีเหลืองได้

ข้อเสนอแนะ

1. วิธีวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ด้วยเทคนิค HPLC สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการหาปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารตัวอย่างอื่นๆได้ แต่ควรมีการทวนสอบความถูกต้องของวิธีก่อนนำไปใช้ในการวิเคราะห์สารตัวอย่าง เนื่องจากสารตัวอย่างแต่ละชนิดอาจมีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจรบกวนผลการวิเคราะห์ได้ โดยควรมีการทวนสอบหวัข้อขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณด้วย

2. นอกเหนือจากฟลาโวนอยด์ 7 ชนิด ได้แก่ catechin, epicatechin, rutin, hesperidin, quercetin, apigenin และ hesperetin ที่ทำการศึกษา สารสกัดจากกลีบดอกและเกสรของบัวสายสีเหลืองอาจมีฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นๆด้วย จึงควรทำการศึกษาค่าฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นๆเพิ่มเติม

3. เนื่องจากสารตัวอย่างเป็นสารสกัดจากพืช ซึ่งมีส่วนประกอบอื่นๆที่อาจมีผลรบกวนการวิเคราะห์ได้ ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จึงควรใช้ Photodiode array เป็นเครื่องตรวจวัด เพื่อเป็นการยืนยันความบริสุทธิ์ของสารที่ต้องการวิเคราะห์

4. เนื่องจากสารสกัดจากแต่ละส่วนของบัวสายสีเหลือง มีชนิดและปริมาณของฟลาโวนอยด์ รวมทั้งฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส เอนไซม์อีลาสเตสและเอนไซม์ไทโรซิเนสแตกต่างกัน จึงควรทำการศึกษาสารสกัดจากส่วนประกอบอื่นๆของบัวสายสีเหลืองเพิ่มเติม เพื่อให้ได้สารสกัดที่เหมาะสมในการนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ชะลอการเสื่อมสภาพของผิวหนัง



บรรณานุกรม

- Andersen, O. M., & Markham, K. R. (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*: CRC press.
- Banjarnahor, S. D., & Artanti, N. (2015). Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*, 23(4), 239-244.
- Baumann, L. (2007). Skin ageing and its treatment. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 211(2), 241-251.
- Campa, M., & Baron, E. (2018). Anti-aging Effects of Select Botanicals: Scientific Evidence and Current Trends. *Cosmetics*, 5(3), 54.
- Chattuwatthana, T., & Okello, E. (2015). Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of *Pueraria candollei* var. *mirifica* root extract and *Coccinia grandis* fruit juice extract: an in vitro study. *European journal of medicinal plants*, 5(4), 318.
- Costin, G.-E., & Hearing, V. J. (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB journal*, 21(4), 976-994.
- Cudalbeanu, M., Ghinea, I. O., Furdui, B., Dah-Nouvlessounon, D., Raclea, R., Costache, T., . . . Dinica, R. M. (2018). Exploring New Antioxidant and Mineral Compounds from *Nymphaea alba* Wild-Grown in Danube Delta Biosphere. *Molecules*, 23(6), 1247.
- Ebanks, J., Wickett, R., & Boissy, R. (2009). Mechanisms regulating skin pigmentation: the rise and fall of complexion coloration. *International journal of molecular sciences*, 10(9), 4066-4087.
- Fajemiroye, J. O., Zjawiony Jordan, K., Alves, C. E., & Aderoju, A. A. (2018). Evaluation of Anxiolytic and Antidepressant-like Activity of Aqueous Leaf Extract of *Nymphaea Lotus* Linn. in Mice. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 17(2), 613.
- Geeta, G., Widodo, W. S., Widowati, W., Ginting, C. N., Lister, I. N. E., Armansyah, A., & Girsang, E. (2019). Comparison of Antioxidant and Anti-collagenase Activity of Genistein and Epicatechin. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 6(2), 111-117.

- Gragnani, A., Mac Cornick, S., Chominski, V., de Noronha, S. M. R., de Noronha, S. A. A. C., & Ferreira, L. M. (2014). Review of major theories of skin aging. *Advances in Aging Research*, 3(04), 265.
- Gupta, P., Bala, M., Gupta, S., Dua, A., Dabur, R., Injeti, E., & Mittal, A. (2016). Efficacy and risk profile of anti-diabetic therapies: Conventional vs traditional drugs—A mechanistic revisit to understand their mode of action. *Pharmacological research*, 113, 636-674.
- ICH. (2005). *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. Paper presented at the International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland.
- James, W. D., Elston, D., Berger, T., & Neuhaus, I. (2015). *Andrews' Diseases of the Skin E-Book: Clinical Dermatology*: Elsevier Health Sciences.
- Jeong, M.-H., Yang, K.-M., Kim, J.-K., Nam, B.-H., Kim, G. Y., Lee, S.-W., . . . Jo, W.-S. (2013). Inhibitory effects of *Asterina pectinifera* extracts on melanin biosynthesis through tyrosinase activity. *International journal of molecular medicine*, 31(1), 205-212.
- Khan, B. A., Akhtar, N., Rasul, A., Khan, H., Murtaza, G., Ali, A., . . . Mahmood, T. (2012). Human skin, aging and antioxidants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(1), 1-6.
- King AMY, Y. G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2), 213-218.
- Kumar, S. P., Abhay K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Lariushin, B. (2013). *Nymphaeaceae Family*: CreateSpace Independent Publishing Platform.
- Latimer, G. (2016). Official methods of analysis of AOAC International. Rockville, MD: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-87-5. In.
- 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.

Löser, B., Kruse, S. O., Melzig, M. F., & Nahrstedt, A. (2000). Inhibition of neutrophil elastase activity by cinnamic acid derivatives from *Cimicifuga racemosa*. *Planta Medica*, 66(08), 751-753.

Mandal, M., Mandal, A., Das, S., Chakraborti, T., & Chakraborti, S. (2003). Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Molecular and cellular biochemistry*, 252(1-2), 305-329.

Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240-16265.

Mireille Kameni Poumeni, D. D. D. P., & Pierre Kamtchouing. (2017). A Review of the Pharmacological potential of the Water Lily *Nymphaea lotus*. *Modern Applications of Bioequivalence & Bioavailability*, 1(5), 001-003.

Mori, M., Ikeda, N., Kato, Y., Minamino, M., & Watabe, K. (2002). Inhibition of elastase activity by essential oils in vitro. *Journal of cosmetic dermatology*, 1(4), 183-187.

Ochocka, R., Hering, A., Stefanowicz-Hajduk, J., Cal, K., & Barañska, H. (2017). The effect of mangiferin on skin: Penetration, permeation and inhibition of ECM enzymes. *PloS one*, 12(7), e0181542.

Panche, A., Diwan, A., & Chandra, S. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.

Pittayapruerk, P., Meephansan, J., Prapapan, O., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2016). Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 868.

Selvakumari, E., Shantha, A., Kumar, C. S., & Prabhu, T. P. (2016). Phytochemistry and Pharmacology of the Genus *Nymphaea*. *Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)*, 5(7), 98.

Selvaraj, G., Kaliamurthi, S., & Thiruganasambandam, R. (2016). Molecular Docking Studies of Rutin on Matrix Metalloproteinase. *Insights in Biomedicine*, 1(1), 1-5.

Si, Y. X., Yin, S. J., Oh, S., Wang, Z. J., Ye, S., Yan, L., . . . Qian, G. Y. (2012). An integrated study of tyrosinase inhibition by rutin: progress using a computational simulation.

- Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 29(5), 999-1012.
- Stipcevic, T., Piljac, J., & Berghe, D. V. (2006). Effect of different flavonoids on collagen synthesis in human fibroblasts. *Plant foods for human nutrition*, 61(1), 27-32.
- Tayarani-Najaran, Z., Akaberi, M., Vatani, M., & Emami, S. A. (2016). Evaluation of antioxidant and anti-melanogenic activities of different extracts from aerial parts of *Nepeta binaludensis* Jamzad in murine melanoma B16F10 cells. *Iranian journal of basic medical sciences*, 19(6), 662.
- Thammana, M. (2016). A review on high performance liquid chromatography (HPLC). *Department of Pharmacy, Vignan Institute of Pharmaceutical Technology, Duvvada, India*, 25.
- Thring, T. S., Hili, P., & Naughton, D. P. (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC complementary and alternative medicine*, 9(1), 27.
- Tobin, D. J. (2017). Introduction to skin aging. *Journal of tissue viability*, 26(1), 37-46.
- Tu, P. T. B., & Tawata, S. (2015). Anti-oxidant, anti-aging, and anti-melanogenic properties of the essential oils from two varieties of *Alpinia zerumbet*. *Molecules*, 20(9), 16723-16740.
- Van Wart, H. E., & Steinbrink, D. R. (1981). A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Analytical biochemistry*, 113(2), 356-365.
- Widowati, W. A. H. Y. U., Janeva, W. B., Nadya, S., Amalia, A., Arumwardana, S., Kusuma, H. S. W., & Arinta, Y. (2018). Antioxidant and antiaging activities of *Jasminum sambac* extract, and its compounds. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 270-285.
- Zhang, C., Lu, Y., Tao, L., Tao, X., Su, X., & Wei, D. (2007). Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 22(1), 83-90.
- Zolghadri, S., Bahrami, A., Hassan Khan, M. T., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 34(1),

279-309.

กัญญารัตน์ จิราสวัสดิ์. (2014). สารานุกรมวิทยาศาสตร์ เล่มที่ 2: Nanmeebooks.

กัลยากร กู้กิจมัน และ นันทน์ภัส ภัทรเศรษฐไชย. (2558). ฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงของสารสกัดจากเกสรบัวสายสีต่างๆ. (โครงการวิจัยของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต), มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพมหานคร.

จุฑารัตน์ พิมพ์พันธ์. (2553). *High-performance liquid chromatography : Method development and application*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

นนทวรรณ จำลองรักษ์ และ กิตติศักดิ์ ไกรสัย. (2556). ฤทธิ์ทางชีวภาพต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงของสารสกัดจากดอกบัวสายสายพันธุ์ต่างๆ. (โครงการวิจัยของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต), มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพมหานคร.

สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ. (2556). การคาดประมาณประชากรของประเทศไทย พ.ศ. 2553 - 2583 (1 ed.). กรุงเทพมหานคร: สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	รัชณา ชิตามระ
วัน เดือน ปี เกิด	28 ตุลาคม 2529
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2547 มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนสตรีวิทยา พ.ศ. 2552 ปริญญาตรี เกษตรศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	62/440 ถ.เทอดพระเกียรติ ต.วัดชลอ อ.บางกรวย จ.นนทบุรี 11130

