ฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านไทโรซิเนส ฤทธิ์ต้านคอลลาจิเนส และฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของสารสกัดผลดิบสตาร์แอปเปิ้ล

Total Phenolics, Antioxidant, Anti-Tyrosinase, Anti-Collagenase and Cell Proliferation Activities of *Chrysophyllum cainito* Green Fruit Extract

ปริชาติ เทพทอง[*1] เบญจพาณี บุญถาวร[1] และ นิสากร แซ่วัน[2]

Parichat Thepthong[*1], Benchaphanee Boontaworn[1], & Nisakorn Saewan[2]

[1]สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

[2]สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

[1]Department of Chemistry, Faculty of Science, Thaksin University

[2]School of Cosmetic Science, Mae Fah Luang University

Submitted 28/1/2022 ; Revised 13/2/2022 ; Accepted 1/4/2022

บทคัดย่อ

สตาร์แอปเปิ้ล (*Chrysophyllum cainito* L.) หรือต้นน้ำนม เป็นไม้ยืนต้นที่ผลกินได้ มีสรรพคุณทางยาหลายประการ เช่น ต้านเบาหวานและต้านการอักเสบ สารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสตาร์แอปเปิ้ลเป็นสารประเภทฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านออกซิเดชัน ต้านมะเร็ง และต้านการอักเสบ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบเอทานอลและส่วนย่อย (CCF1-CCF4) จากผลดิบสตาร์แอปเปิ้ลเพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งผลการทดสอบพบว่า สารสกัดหยาบมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 0.34±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร ซึ่งด้อยกว่าส่วนย่อย CCF4 (0.41±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร) เล็กน้อย ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนย่อย CCF4 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด (0.3±0.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร) และยังสามารถรีดิวซ์เฟอริกได้ดีที่สุด (FRAP value 1.01±0.03 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร) ส่วนย่อย CCF4 สามารถยับยั้งไทโรซิเนสได้ 51.82% และที่ความเข้มข้นในถาดหลุม 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนย่อย CCF4 แสดงฤทธิ์ยับยั้งคอลลาจิเนสได้ 37.45% และมีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์ 15.06% ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าส่วนย่อย CCF4 มีสารออกฤทธิ์ที่ดีเป็นองค์ประกอบ เหมาะที่จะนำไปพัฒนาเพื่อนำไปใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง

คำสำคัญ: สตาร์แอปเปิ้ล ต้านออกซิเดชัน ต้านไทโรซิเนส ต้านคอลลาจิเนส

[*]**ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)**

E-mail: parichat@tsu.ac.th

Abstract

Star apple (*Chrysophyllum cainito* L.), or Namnom in Thai, is a tropical edible plant. It has been reported to possess various beneficial medicinal properties such as antidiabetic and anti-inflammatory. The main active ingredients in star apple are flavonoids which have biological activity in antioxidation, anticancer, and anti-inflammatory. The objective of this research was to evaluate the biological activity of crude ethanol extract and their fractions (CCF1-CCF4) from the green fruit of star apple for application in cosmetic products. The results showed that the total phenolic content of the crude extract was 0.34±0.01 mg GAE/mL extract, which was slightly less than that of fraction CCF4 (0.41±0.01 mg GAE/mL extract). At an initial concentration of 5 mg/mL, fraction CCF4 displayed the greatest scavenging activity against DPPH radical (0.31±0.00 mg AAE/mL extract) and also the best reducing ferric iron (FRAP value 1.01±0.03 mg AAE/mL extract). Fraction CCF4 inhibited tyrosinase by 51.82% and at a final concentration of 50 µg/mL, fraction CCF4 inhibited 37.45% collagenase inhibition and stimulated the cell proliferation with 15.06%. The results of the study indicated that fraction CCF4 contains good active ingredients. It is suitable for development for being used as an ingredient in cosmetics.

Keywords: *chrysophyllum cainito*, antioxidant, anti-tyrosinase, anti-collagenase

บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีสารช่วยป้องกันแสงแดด ทำให้ผิวกระจ่างใส ลดเลือนริ้วรอย และชะลอวัย เพื่อช่วยให้ผิวพรรณดูดีตามวัยหรือดูอ่อนกว่าวัย แต่สารออกฤทธิ์ที่มีในเครื่องสำอางบางชนิดส่งผลเสียต่อสุขภาพในระยะยาว ทำให้ผู้ผลิตนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมากขึ้น เนื่องจากเป็นที่สนใจและต้องการของผู้บริโภค

สารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการลดเรือนริ้วรอย ลดการเกิดผิวหมองคล้ำ และชะลอวัย มักจะเป็นสารประเภทฟีนอลิก เช่น สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ซึ่งสารประเภทนี้มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่ดี และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่กระตุ้นการสร้างเม็ดสี ทำให้ผิวหมองคล้ำ สารกลุ่มนี้สามารถจับกับโลหะในโครงสร้างของเมทาโลเอนไซม์ (metalloenzyme) ที่บริเวณเร่ง (active site) ได้ ทำให้ลดการสร้างเม็ดสีจากการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ทั้งนี้โครงสร้างของฟลาโวนอยด์บางชนิดมีหมู่แอลฟา-คีโต (α-keto) หรือ 3-ไฮดรอกซี (3-hydroxy) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับหมู่ไดไฮดรอกซีฟีนิลของ 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) จะทำให้สามารถจับคอปเปอร์ได้ [1] และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนสได้ในระดับหนึ่ง หากร่างกายมีปริมาณคอลลาจิเนสมากจะกระตุ้นการทำลายเส้นใยคอลลาเจนทำให้ปริมาณคอลลาเจนลดลง ส่งผลให้เซลล์ผิวหนังเสื่อมสภาพ เป็นที่มาของการเกิดริ้วรอยหรือการแก่ก่อนวัย [2] ซึ่งสารประเภทนี้มักจะไม่เป็นพิษต่อเซลล์

ต้นสตาร์แอปเปิ้ล หรือ ต้นน้ำนม พืชพื้นเมืองของไทย เวียดนาม และกัมพูชา นิยมรับประทานเป็นขนมหวาน มีสรรพคุณในการป้องกันโรคเบาหวาน และต้านการอักเสบ เปลือกต้นนำมาต้มเป็นยาบำรุง ยาชูกำลัง และยาแก้ไอ จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าสารสกัดเมทานอลผลสดสตาร์แอปเปิ้ลจากประเทศสหรัฐอเมริกาแสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระในระดับดี (IC_{50} 22 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบสารประกอบฟีนอลิกที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับดี จำนวน 9 สาร ซึ่งโครงสร้างล้วนมีหมู่ไฮดรอกซิลบนวงเบนซีนที่ตำแหน่ง 1,2- หรือ *ortho* [3] มีรายงานเพิ่มเติมว่าเปลือกผลสตาร์แอปเปิ้ลในประเทศเม็กซิโกเป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเภสัชกรรมได้ [4] แต่ยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เอนไซม์คอลลาจิเนส และฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของสตาร์แอปเปิ้ลในประเทศไทย ผู้วิจัยจึงสนใจนำผลสตาร์แอปเปิ้ลที่ปลูกในประเทศไทยมาศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์คอลลาจิเนส และฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์ของสารสกัดหยาบและส่วนย่อยจากผลดิบ เพื่อประเมินศักยภาพในการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

วัตถุประสงค์

เพื่อเป็นข้อมูลในการประเมินศักยภาพของสารสกัดผลดิบสตาร์แอปเปิ้ลต่อการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

วิธีดำเนินการวิจัย

พืชตัวอย่าง

ผลดิบสตาร์แอปเปิ้ล (*Chrysophyllum cainito* L.) เก็บจากอำเภอจุฬาภรณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช เมื่อช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2563 ยืนยันชื่อท้องถิ่นโดยปราชญ์ชาวบ้านใน อำเภอจุฬาภรณ์ และยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์โดย ดร. ปวีณา แก้วอุบล นักพฤกษศาสตร์จากสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

การเตรียมสารสกัดหยาบและส่วนย่อย

หั่นผลดิบสตาร์แอปเปิ้ลเป็นชิ้นขนาดเล็ก และนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนมีน้ำหนักคงที่ นำพืชตัวอย่างแห้ง น้ำหนัก 202.01 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน กรองและระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน (rotary evaporator) นำสารสกัดหยาบ (CCF) น้ำหนักประมาณ 25 กรัม มาแยกด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว (quick column chromatography) โดยใช้ซิลิกาเจล 60H เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเอทานอลเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) วิเคราะห์ส่วนแยกย่อย (fraction) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (thin layer chromatography) และรวมส่วนแยกย่อยที่คล้ายกันเข้าด้วยกัน ได้เป็นส่วนย่อยจำนวน 4 ส่วน (CCF1 - CCF4) นำสารสกัดหยาบและส่วนย่อยที่ได้ไปทำแห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง (freeze dry) เก็บสารสกัดหยาบและส่วนย่อยไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม ดัดแปลงมาจากวิธีของ Vichit & Saewan [5] โดยนำสารตัวอย่างความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำ DI (น้ำปราศจากไอออน) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 25 ไมโครลิตร วางไว้ 5 นาที และเติม 7% Na_2CO_3 ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมเข้าด้วยกัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (UVM 340, Biochrom) คำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก โดยรายงานค่าในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH assay)

การทดสอบความสามารถในการดักจับหรือต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Vichit & Saewan [5] โดยนำสารตัวอย่างความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลาย 0.1 มิลลิโมลาร์ DPPH ปริมาตร 195 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และวางในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก โดยรายงานค่าในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร

การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก (FRAP assay)

การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก ดัดแปลงมาจากวิธีของ Vichit & Saewan [5] โดยนำสารตัวอย่างความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาผสมกับ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.2) และ สารละลาย 1% $K_3[Fe(CN)_6]$ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และวางไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย 10% CCl_3CO_2H ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ น้ำ DI ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (A1) ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นเติม 0.1% เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร (A2) คำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงของ Fe^{2+} จากสูตร

ค่าการดูดกลืนแสงของ $Fe^{2+} = (A2–A1)_{sample} – (A2–A1)_{control}$

เมื่อ $(A2–A1)_{sample}$ คือ ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายหลังและก่อนเติมเฟอริกคลอไรด์ (มีสารตัวอย่าง)

$(A2–A1)_{control}$ คือ ผลต่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายหลังและก่อนเติมเฟอริกคลอไรด์ (ไม่มีสารตัวอย่าง)

คำนวณหาค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกโดยใช้กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และรายงานค่าในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร เลือกสารตัวอย่างที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับดี คือ CCF3 และ CCF4 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์คอลลาจิเนส

และฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nurrochmad และคณะ [6] โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเอทานอล นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายผสมของ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิโมลาร์ L-DOPA ปริมาตร 40 ไมโครลิตร อุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ของเอนไซม์ไทโรซิเนส (ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.8) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้กรดโคจิกเป็นสารมาตรฐาน คำนวณหาร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสูตร

ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส = $[(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100$

เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในถาดหลุมควบคุม (ไม่มีสารตัวอย่าง)

และ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในถาดหลุมที่มีสารตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนส ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nurrochmad และคณะ [6] โดยใช้ MMP-1 colorimetric drug discovery kit โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย 153 มิลลิยูนิตต่อไมโครลิตร MMP-1 (matrix metalloproteinase-1) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลาย 1.3 ไมโครโมลาร์ *N*-isobutyl-*N*-(4-methoxyphenylsulfonyl) glycylhydroxamine acid ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในสารตัวอย่าง และนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้ตัวยับยั้งและเอนไซม์ทำปฏิกิริยากัน จากนั้นเติม 100 ไมโครโมลาร์ ของซับสเตรท ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงไปในปฏิกิริยาข้างต้น และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส จากสูตร

ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส = $[(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100$

เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในถาดหลุมควบคุม (ไม่มีสารตัวอย่าง)

และ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในถาดหลุมที่มีสารตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Vichit & Saewan [7] โดยนำเซลล์ผิวหนังมนุษย์ (human dermal fibroblast cell) มาเลี้ยงในอาหาร DMEM (dulbecco's modified eagle medium) ที่มี 10 % FBS (fetal bovine serum) และเสริมด้วย 1% เพนิซิลิน-สเตรปโตมัยซิน จากนั้นนำเซลล์ไปใส่ในถาดหลุมที่ความเข้มข้น 2000 เซลล์ต่อหลุม และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำสารสกัดความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) มาเจือจางด้วย DMEM (โดยไม่มี FBS) ให้มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายไปกรองและฆ่าเชื้อผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร และเตรียมสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารตัวอย่างลงไปในเซลล์ที่เตรียมไว้ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในตู้บ่มที่มี 5% CO_2 กำจัดอาหารเลี้ยงเชื้อ และเติมสารละลาย 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปบ่ม 4 ชั่วโมง และเมื่อครบเวลา เติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่ออีก 30 นาที

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาค่าร้อยละของการแบ่งเซลล์ ตามสมการ

ร้อยละการแบ่งเซลล์ = $[(A_{sample} - A_{control})/A_{control}] \times 100$

เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในถาดหลุมควบคุม (ไม่มีสารตัวอย่าง)

และ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในถาดหลุมที่มีสารตัวอย่าง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทุกรูปแบบจะทำ 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS รุ่น 11.5 สำหรับ Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวด้วยโปรแกรม ANOVA และรายงานผลการทดลองด้วยค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการวิจัย

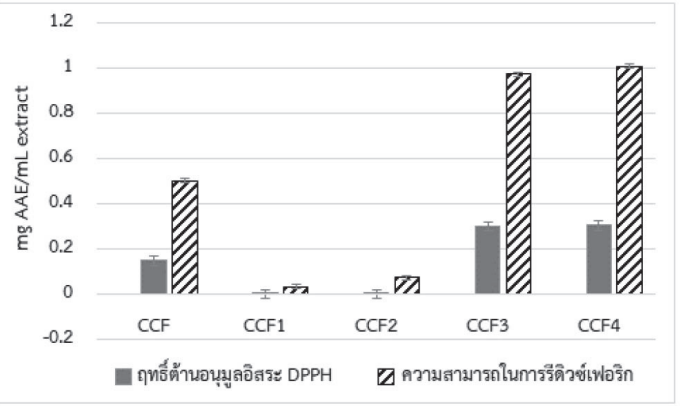
นำผลดิบสตาร์แอปเปิ้ลแห้งน้ำหนัก 202.01 กรัม มาสกัดด้วยเอทานอลได้สารสกัดหยาบ (CCF) น้ำหนัก 30.40 กรัม คิดเป็นร้อยละ 15.05 โดยน้ำหนัก เมื่อนำมาแยกให้เป็นส่วนย่อยด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบรวดเร็ว ได้ส่วนย่อยจำนวน 4 ส่วน (CCF1-CCF4) ซึ่งสารองค์ประกอบส่วนใหญ่ที่มีในส่วนผลดิบสตาร์แอปเปิ้ลเป็นสารประกอบที่มีขั้วปานกลางและขั้วสูง โดยส่วนย่อย CCF1 และ CCF2 มีน้ำหนักค่อนข้างน้อย สารส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนย่อย CCF3 และ CCF4 ซึ่งถูกชะออกมากับ 20% และ 30% เอทานอลในไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม โดยนำสารตัวอย่างมาผสมกับ Folin-ciocalteu reagent ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือสารประกอบฟีนอลิกจะไปรีดิวซ์รีเอเจนต์ เกิดเป็นสารละลายสีน้ำเงินซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก $y = 2.4113x + 0.0214$ ($R^2 = 0.9993$) และรายงานปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร ซึ่งผลการวิเคราะห์พบว่าสารสกัดหยาบมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 0.34±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร และในส่วนย่อย CCF1-CCF4 จะมีปริมาณฟีนอลิกรวมเพิ่มขึ้นตามสภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ (0.04±0.02, 0.08±0.01, 0.33±0.02 และ 0.41±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ) โดยส่วนย่อย CCF4 ซึ่งชะออกมาด้วย 30% เอทานอลในไดคลอโรมีเทน มีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด ซึ่งปริมาณฟีนอลิกรวมของส่วนย่อย CCF4 นี้มีค่ามากกว่าในสารสกัดหยาบเพียงเล็กน้อย

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

การทดสอบประสิทธิภาพในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดหยาบและส่วนย่อยที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพิจารณาจากการลดลงของปริมาณอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเป็นสารละลายสีม่วง และดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ถ้าในตัวอย่างมีสารองค์ประกอบที่ให้อนุมูลอิสระไฮโดรเจนได้ดี จะทำให้สารละลายมีสีม่วงจางลงหรือกลายเป็นสีเหลือง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และคำนวณจากสมการ $y = 254.3x + 5.509$ ($R^2 = 0.9971$) รายงานผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร (mg AAE/mL extract) ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้เพียง 0.15±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร ซึ่งด้อยกว่าส่วนย่อยที่มีขั้วสูงประมาณ 2 เท่า โดยส่วนย่อย CCF4 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีที่สุด ที่ระดับ 0.31±0.00 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร และใกล้เคียงกับ CCF3 ซึ่งยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ที่ระดับ 0.30±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกของสารตัวอย่าง

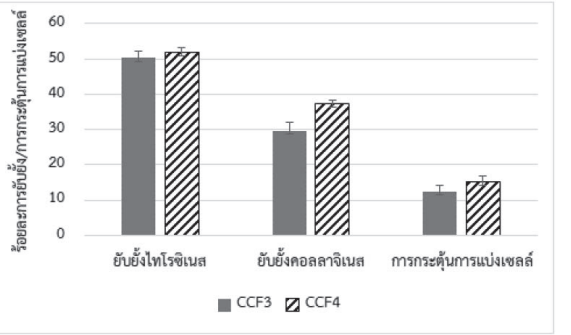
ผลการทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก

การทดสอบประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เฟอริกของสารสกัดหยาบและส่วนย่อย ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อนเหล็ก โดยเมื่อสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+} ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+} ที่มีสีน้ำเงิน โดยวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกด้วยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก และคำนวณจากสมการ y = 2.0978x-0.0195 (R^2 = 0.9987) และรายงานผลเป็นค่า FRAP value ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร ผลการทดลองพบว่าค่า FRAP value ของสารสกัดหยาบมีค่าเท่ากับ 0.50±0.02 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร และส่วนย่อย CCF1-CCF4 แสดงความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก ด้วยค่า FRAP value ในช่วง 0.04-1.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร โดยส่วนย่อย CCF4 แสดงความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกได้ดีที่สุด ลำดับรองคือ CCF3 ด้วยค่า FRAP value เท่ากับ 1.01±0.03 และ 0.98±0.03 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร ในขณะที่ CCF1 และ CCF2 มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกต่ำมาก ดังภาพที่ 1

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ FRAP พบว่าสารสกัดหยาบแสดงฤทธิ์ในระดับค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ส่วนย่อย CCF3 และ CCF4 ฤทธิ์ต้านอออกซิเดชันในระดับที่น่าสนใจ สอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวมที่มีในส่วนย่อย จึงเลือกส่วนย่อยทั้งสองนี้ไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนส เอนไซม์คอลลาจิเนส และฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์ ต่อไป

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome โดยใช้ L-DOPA เป็นสารตั้งต้น ซึ่งเอนไซม์ไทโรซิเนสจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็น L-Dopaquinone ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็น Dopachrome ด้วยกระบวนการออกซิเดชันเกิดเป็นสารละลายสีส้มแดง มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ซึ่งศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของส่วนย่อย CCF3 และ CCF4 มีค่อนข้างต่ำ โดยที่ความเข้มข้นของสารตัวอย่างในถาดหลุม 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงฤทธิ์ได้ใกล้เคียงกัน คิดเป็นร้อยละ 50.30±1.85 และ 51.82±1.38 ตามลำดับ ดังภาพที่ 2 ซึ่งมีศักยภาพด้อยกว่ากรดโคจิก (ความเข้มข้นในถาดหลุม 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีร้อยละการยับยั้ง 64.37±2.63) ซึ่งจากร้อยละของการยับยั้งเอนไซม์ของส่วนย่อย บ่งชี้ว่าส่วนย่อย CCF3 และ CCF4 มีสารออกฤทธิ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นองค์ประกอบค่อนข้างน้อย



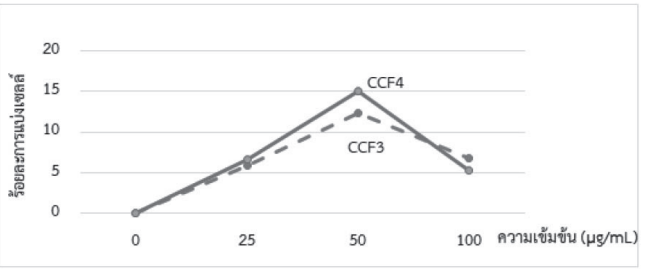
ภาพที่ 2 ร้อยละการยับยั้งไทโรซิเนส (ความเข้มข้นในถาดหลุม 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ยับยั้งคอลลาจิเนส และการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (ความเข้มข้นในถาดหลุม 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ของส่วนย่อย CCF3 และ CCF4

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส

ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสของส่วนย่อย CCF3 และ CCF4 โดยวิเคราะห์การลดลงหรือการถูกยับยั้งของ MMP-1 ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญในการตอบสนองต่อการถูกทำลายของคอลลาเจนที่ผิวหนัง ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นในถาดหลุมของสารตัวอย่าง 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนย่อย CCF3 และ CCF4 แสดงศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสได้ไม่ดีนัก คิดเป็นร้อยละ 29.71±2.40 และ 37.45±0.83 ตามลำดับ ดังภาพที่ 2

ผลการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์

การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งเซลล์ใช้ MTT assay ในการวิเคราะห์การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของเกลือ tetrazolium (สีเหลือง) ซึ่งมีอยู่ในเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งจะเปลี่ยนเป็นผลึก formazan (สีม่วง) โดยผลึกดังกล่าวละลายได้ในรีเอเจนต์ที่ใช้ ปริมาณสีม่วงที่เพิ่มขึ้นจะหมายถึงปริมาณของเซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้นด้วย การทดสอบศักยภาพของส่วนย่อย CCF3 และ CCF4 ต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ผิวหนัง พบว่าที่ความเข้มข้นในถาดหลุม 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดมีศักยภาพในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ คิดเป็นร้อยละ 12.41±1.90 และ 15.06±1.71 ตามลำดับ ดังภาพที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าส่วนย่อยที่มีขั้วสูงกว่าจะมีศักยภาพในการกระตุ้นกระบวนการแบ่งเซลล์ที่ดีกว่า ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากข้อมูลภาพที่ 3 จะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้นต่ำกว่าหรือสูงกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีการแบ่งตัวน้อยลง



ภาพที่ 3 ร้อยละการแบ่งเซลล์ของส่วนย่อย CCF3 และ CCF4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

อภิปรายผลการวิจัย

ผลจากการวิจัย สารสกัดหยาบผลดิบสตาร์แอปเปิ้ลมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 0.34±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร (เท่ากับ 68±2.0 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิก ต่อสารสกัด 1 กรัม) และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับค่อนข้างต่ำ (ต้านอนุมูลอิสระ DPPH 0.15±0.01 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 43.37±1.54 และมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริก 0.50±0.02 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสารสกัด 1 มิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างจากการรายงานโดย Kubola และคณะ ที่นำผลดิบสตาร์แอปเปิ้ลแห้งน้ำหนัก 1 กรัม มาสกัดด้วย 80% เมทานอล 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อนำสารสกัดที่ได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาวิเคราะห์ พบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 17.88±3.70 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 1 กรัม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ยับยั้งร้อยละ 94.40±0.78) และ FRAP (36.98±0.09 มิลลิโมลของ $FeSO_4$ ต่อ 1 กรัม) [8] ซึ่งตัวเลขที่มีความแตกต่างกัน เนื่องจากใช้วิธีการทดสอบที่แตกต่างกัน และตัวอย่างต่างกัน (พื้นที่เพาะปลูกและอายุพืชต่างกัน) ทำให้ปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่างกัน โดยศักยภาพของสารสกัดหยาบและส่วนย่อยผลดิบสตาร์แอปเปิ้ลในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH และการรีดิวซ์เฟอริกมีความสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวม นั่นคือน่าจะมีสารต้านออกซิเดชันเป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วนย่อย CCF3 และ CCF4 โดย CCF4 มีความโดดเด่นที่สุด น่าจะมีสารกลุ่มฟีนอลิกที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่ในตำแหน่งออร์โธหรือตำแหน่งพาราเป็นองค์ประกอบ

สารองค์ประกอบในส่วนย่อย CCF4 เป็นสารฟีนอลิกที่มีสภาพขั้วค่อนข้างสูง การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารองค์ประกอบในส่วนย่อยนี้น่าจะเป็นผลจากหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของสารประกอบฟีนอลิกเกิดพันธะไฮโดรเจนกับบริเวณเร่ง หรือบริเวณใกล้เคียงกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์มีประสิทธิภาพลดลง ซึ่งสอดคล้องกับสมบัติการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส สารประกอบฟีนอลิกจะมีผลให้เอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ [9] และยังพบว่าสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่มีสมบัติในการเป็นตัวจับ (chelators) ที่สามารถจับกับ Zn^{2+} บริเวณเร่งของเอนไซม์ ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ [10] นอกจากนี้ ที่ความเข้มข้นในถาดหลุม 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร CCF4 ยังสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ผิวหนังได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งสารองค์ประกอบในส่วนย่อยนี้มีสมบัติที่เหมาะแก่การนำไปพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยต้องผ่านกระบวนการแยกเอาสารออกฤทธิ์มาใช้

สรุปผลการวิจัย

การสกัดผลดิบสตาร์แอปเปิ้ลแห้งน้ำหนัก 202.01 กรัม ด้วยเอทานอล ได้สารสกัดหยาบน้ำหนัก 30.40 กรัม (ร้อยละ 15.05) นำไปแยกด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีแบบรวดเร็ว ได้ส่วนย่อย 4 ส่วน (CCF1-CCF4) สารสกัดหยาบมีปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับค่อนข้างต่ำ ในขณะที่ส่วนย่อย CCF3-CCF4 มีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่า และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH และ FRAP ในระดับดีกว่า เมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและคอลลาจิเนส พบว่าส่วนย่อย CCF3 และ CCF4 แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ในระดับที่ยังไม่ดีมากนัก โดยส่วนย่อย CCF4 แสดงฤทธิ์ได้ดีที่สุดในทุกการทดสอบ และยังกระตุ้นการแบ่งเซลล์ผิวหนังได้ดีที่สุดอีกด้วย ส่วนย่อย CCF4 ควรผ่านกระบวนการแยกเอาสารออกฤทธิ์ก่อนที่จะนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานสภานโยบายการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมแห่งชาติ โดยมหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

เอกสารอ้างอิง

[1] Ebanks, J. P., Wickett, R. R., & Boissy, R. E. (2009). Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 4066-4087.

[2] Fisher, G. J., Varani J., & Voorhees, J. J. (2008). Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Archives of Dermatology*, 144(5), 666-672.

[3] Luo, X. D., Basile, M. J., & Kennelly, E. J. (2002). Polyphenolic antioxidants from the fruits of Chrysophyllum cainito L. (Star apple). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1379-1382.

[4] Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-Leon, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Oritz-Vazques, E., Betancur-Ancona, D., & Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chemistry*, 166, 17-22.

[5] Vichit, W., & Saewan, N. (2015). Antioxidant activities and cytotoxicity of Thai pigmented rice. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(7), 329-334.

[6] Nurrochmad, A., Dirman, W. A., Lukitaningsih, E., Rahmawati, A., & Fakhrudin, N. (2018). Effects of antioxidant, anti-collagenase, anti-elastase, anti-tyrosinase of the extract and fraction from Turbinaria decurrens Bory. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 29(4), 188-197.

[7] Vichit, W., & Saewan, N. (2016). Effect of germination on antioxidant, anti-inflammatory and keratinocyte proliferation of rice. *International Food Research Journal*, 23(5), 2006-2015.

[8] [8] Kubola, J., Siriamornpun, S., & Meeso, N. (2011). Phytochemicals, vitamin C and sugar content of Thai wild fruits. *Food Chemistry*, 126(3), 972-981.

[9] Madhan, B., Krishnamoorthy, G., Rao, J. R., & Nair, B. U. (2007). Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(1), 16-22.

[10] Malešev, D., & Kuntić, V. (2007). Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72(10), 921-939.