ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนใบและเหง้าว่านสาวหลง

TOTAL PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENT, ANTIOXIDANT, TYROSINASE INHIBITION ACTIVITIES OF *AMOMUM BIFLORUM* JACK EXTRACT.

อรณิชา ครองยุติ* และ สุภัสสร วันสุทะ
Ornnicha Krongyut* and Supasson Wansutha

สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี
Thai Traditional Medicine Program, Faculty of Science, Udon Thani Rajabphat University

Received: 20 August 2024 Revised: 30 August 2024 Accepted: 30 August 2024

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสรวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมและปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดเอทานอลจากว่านสาวหลง โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนใบและส่วนรากหรือเหง้าของว่านสาวหลง การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทำโดยวิธี 2,2–diphenyl–1–picrylhydrazyl (DPPH assay) การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method การวิเคราะห์ปริมาณ ฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay และการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทำโดยวิธี Aluminum chloride colorimetric assay จากการศึกษา พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบว่านสาวหลง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (IC_{50}= 2,085.64 ± 2.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสมากที่สุด (IC_{50}= 262.02 ± 5.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณสารฟีนอลิกรวม เท่ากับ 21.92 ± 0.79 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด และปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 14.12 ± 0.12 มิลลิกรัมสมมูลของเควอซิทินต่อกรัมสารสกัด การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบว่านสาวหลงเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ ซึ่งอาจเป็นสมุนไพร

* Corresponding author: อรณิชา ครองยุติ
E-mail: Ornnicha.k@udru.ac.th

ทางเลือกในการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเวชสำอาง ผลิตภัณฑ์สมุนไพร และวิจัยต่อยอดด้านเภสัชวิทยาเพื่อการพัฒนาเป็นสารออกฤทธิ์ทางยาต่อไป

คำสำคัญ: ว่านสาวหลง, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, ฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์

Abstract

This research aimed to determine the antioxidant activity, tyrosinase inhibition activity, total phenolic content and total flavonoid content of *Amomum biflorum* Jack. It is divided into 2 parts: the leaves and rhizomes of *Amomum biflorum* Jack. The extracts were prepared by using solvents 95% ethanol. The antioxidant activity was determined by 2, 2–diphenyl–1–picrylhydrazyl (DPPH assay). The tyrosinase inhibition activity was determined by using the Dopachrome method. Total phenolic content was analyzed by the Folin-Ciocalteuassay and total flavonoid content was analyzed by the Aluminum chloride colorimetric assay. From the results, it was found that the crude 95% ethanol extract of *Amomum biflorum* Jack leaf exhibited the most potent antioxidant activity determined by DPPH assay (IC_{50}= 2,085.64 ± 2.86 µg/mL). Moreover, it exhibited the strongest tyrosinase inhibition activity (IC_{50}= 262.02 ± 5.89 µg/mL) and the highest total phenolic and flavonoid content (total phenolic = 21.92 ± 0.79 mg GAE/g extract, total flavonoid = 14.12 ± 0.12 mg QE/g extract) This research demonstrates that *Amomum biflorum* Jack leaf is considered to be an interesting source of bioactive compounds. It may be an alternative herb for cosmetic applications, Herbal products and further research in pharmacology for the development of active drug compounds.

Keywords: *Amomum biflorum* Jack, Antioxidant activity, Tyrosinase inhibition activity, Phenolics, Flavonoids

บทนำ

ในปัจจุบันมนุษย์ต้องเผชิญกับมลภาวะต่างๆ รวมทั้งรังสีและความร้อนจากแสงแดดมากขึ้น ซึ่งเป็นตัวเร่งให้เกิดสภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นการเสียสมดุลระหว่างการสร้างและการทำลายอนุมูลอิสระ(free radical) อนุมูลอิสระนี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรคต่างๆรวมทั้งกระบวนการแก่การเกิดริ้วรอยก่อนวัย (Halliwell & Gutteridge,2007) ความร้อนจากแสงแดดและมลภาวะยังเป็นตัวกระตุ้น ให้เกิดริ้วรอย ผิวหมองคล้ำ ฝ้า และกระบนผิวหนัง บางคนอาจจะต้องพึ่งคลินิกเสริมความงาม ซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง และอาจเจอกับสารเคมีจำพวกสารทำให้ผิวขาว (whitening agent) หรือสารปรอท เพื่อยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน โดยทำการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์เมลานิน (Kim & Uyama, 2005) โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะเร่งปฏิกิริยาในขั้นเริ่มต้นของกระบวนการคือเร่งปฏิกิริยาของ L-Tyrosine และ 3, 4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) ให้เป็น DOPAquinone (Ebanks et al., 2009) ทำให้มีแนวคิดในการใช้สารสกัดของสมุนไพรในธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นสารทำให้ผิวขาว และมีสารต้านอนุมูลอิสระผสมอยู่ด้วยกัน เพื่อเป็นสารทำให้ผิวขาวและป้องกันริ้วรอยเหี่ยวย่น อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ และจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย

สมุนไพรว่านสาวหลงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amomum biflorum* Jack. เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae อยู่ในตระกูล Amomum เป็นหัวที่อยู่ใต้ดิน มีลักษณะคล้ายหัวตะไคร้ มีอวบอ้วนเป็นพูพอน เมื่อต้นอายุมากจะแตกหัวหรือเหง้าแยกออกใหม่ โดยเปลือกหัวชั้นนอกมีสีน้ำตาล แก่นหัวมีสีขาวอมเหลือง มีกลิ่นหอม ส่วนรากมีระบบรากเป็นรากฝอยจำนวนมาก ทุกส่วนของว่านสาวหลงมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ ตามภูมิปัญญาพื้นบ้านนาส่วนเหง้าของว่านสาวหลงมาต้มน้ำสำหรับดื่มเพื่อขับลมในทางเดินอาหาร นำมาต้มน้ำสำหรับอาบเพื่อบำรุงผิวพรรณ รักษาโรคผิวหนัง และนำส่วนดอกสดมาสูดดมแก้อาการวิงเวียนศีรษะ (Polsena, 2007) สรรพคุณทางยาตามศาสตร์การแพทย์ช่วยขับปัสสาวะ ลดไข้ แก้อาการผื่นคัน รักษาโรคผิวหนัง แก้อาการท้องเสีย บรรเทาอาการ และแก้อาการวิงเวียนศีรษะ แต่ที่พบในปัจจุบันนั้นการนำว่านสาวหลงมาใช้ประโยชน์ในด้านสุขภาพและเวชสำอาง ได้แก่ สบู่ โลชั่น ผลิตภัณฑ์ในธุรกิจสปา เป็นต้น จากการศึกษาพบว่า สารสกัดส่วนเอทิลอะซิเตตจากเหง้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดเฮกเซนจากเหง้า และสารสกัดเมทานอลจากใบมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโร

ซิเนส และสารสกัดเมทานอลจากใบมีฤทธิ์ยับยั้ง nitric oxide ส่วนน้ำมันหอมระเหยมีรายงานฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Singtothong et al., 2013) อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของว่านสาวหลงยังมีค่อนข้างน้อย และยังขาดข้อมูลที่สนับสนุนทางเภสัชวิทยาของสมุนไพร เพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพร ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชวิทยาของสารสกัดเอทานอลจากว่านสาวหลง ได้แก่ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase inhibition activity) รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid content) ของสารสกัดว่านสาวหลง เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ว่านสาวหลงสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอาง มีศักยภาพในการนำไปเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรทางเลือกให้กับผู้บริโภคและสร้างมูลค่าทางเชิงพาณิชย์ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ของสารสกัดส่วนใบและส่วนเหง้าว่านสาวหลง
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนใบและส่วนเหง้าว่านสาวหลง
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนใบและส่วนเหง้าว่านสาวหลง

ขอบเขตการวิจัย

ตัวอย่างพืชสมุนไพรว่านสาวหลง (*Amomum biflorum* Jack.) จากบ้านน้ำโมง อำเภอท่าบ่อ จังหวัดหนองคาย นำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลอง (*In vitro* model) ได้แก่ 1.วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 2. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 3. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างสมุนไพร

การเก็บตัวอย่างและคัดเลือกสมุนไพร ผู้วิจัยได้คัดเลือกสมุนไพรว่านสาวหลง จากพื้นที่ป่าชุมชนบ้านน้ำโมง อำเภอท่าบ่อ จังหวัดหนองคาย โดยคัดเลือกเอาส่วนเหง้าและส่วนใบที่มีอายุ 6 – 12 เดือน ซึ่งมีรายงานผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสร นอกจากนี้ยังเป็นสมุนไพรที่นิยมปลูกและพบได้ง่ายในท้องถิ่น จากนั้นผู้วิจัยนำสมุนไพรล้างและผึ่งให้แห้งสนิท เก็บสมุนไพรในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้สมุนไพรคงความสดใหม่ก่อนนำไปทำงานสกัดสมุนไพรต่อไป

2. การเตรียมสมุนไพรและการสกัดสมุนไพร

นำสมุนไพรว่านสาวหลงล้างทำความสะอาด จากนั้นอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 - 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำว่านสาวหลงไปหมัก (Maceration) ด้วยตัวทำละลาย เอทานอลร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1:2 ส่วน (สมุนไพร 1 กิโลกรัมต่อเอทานอล 2 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางและกรองด้วยกระดาษกรอง แยกส่วนกากแล้วนำมาสกัดซ้ำอีก 2 รอบ จากนั้นนำส่วนสกัดที่กรองแล้วไประเหยแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) นำไปทำให้เป็นผงด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) คำนวณหาร้อยละผลผลิตของสารสกัด (%yield) แล้วเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปทำการศึกษาฤทธิ์ต่อไป

3. การทดสอบหาปริมาณฟีนอลิกรวมทั้งหมด (Total phenolic content)

วิธีหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-ciocalteu reagent ดัดแปลงจาก Singleton et al. (1965) โดยใช้กรดแกลลิก (Gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน เตรียมสารสกัดส่วนใบและเหง้าว่านสาวหลง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสม 50% Folin reagent ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 20% Na_2CO_3 ปริมาตร 125 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกับความเข้มข้น แล้วจึงหาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น (R^2) เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก จึงนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดแทนค่าในสมการเส้นตรงและคำนวณหา

ปริมาณของฟีนอลิกรวมทั้งหมด โดยรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลกับกรดแกลลิกต่อกรัมสารสกัด (mg GAE/g extract)

4. การทดสอบหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมด (Total flavonoid content)

วิธีหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminium trichloride colorimetric ดัดแปลงจาก Chang et al. (2002) โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน เตรียมสารสกัดส่วนใบและเหง้าว่านสาวหลง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 5% $AlCl_3$ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากทำปฏิกิริยาแล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 437 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกับความเข้มข้น แล้วจึงหาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น และค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้น (R^2) เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานของเคอร์ซิติน จึงนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดแทนค่าในสมการเส้นตรงและคำนวณหาปริมาณของ ฟลาโวนอยด์รวมทั้งหมด โดยรายงานผลเป็นมิลลิกรัมสมมูลกับเคอร์ซิตินต่อกรัมสารสกัด (mg QE/g extract)

5. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

การทดสอบฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ดัดแปลงจาก Chu et al. (2000) โดยใช้วิตามินซี เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นเตรียมสารสกัดส่วนใบและเหง้าว่านสาวหลงละลายในเมทานอล โดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 500 - 5000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากทำปฏิกิริยาแล้วจากนั้นจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยมีสารละลายกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) เทียบกับกลุ่มควบคุม แล้วพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและ %inhibition เพื่อให้ได้สมการเส้นตรงและสัมประสิทธิ์เชิงเส้น (r^2) และเทียบหาค่า IC_{50} ค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นร้อยละ 50 ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ การคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระได้จาก

$$\% \text{ Radical scavenging} = (A_{\text{ควบคุม}} - A_{\text{ทดสอบ}}) / A_{\text{ควบคุม}} \times 100$$

6. การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซมไทโรซิเนส ดัดแปลงจาก Chan et al. (2008) โดยวิธี Dopachrome method ใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นละลายสารสกัดส่วนใบและเหง้าว่านสาวหลงใน 30% DMSO (Dimethyl sulfoxide) ปริมาตร 40 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 โมล, pH 6.8) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เอนไซม์ไทโรซิเนส (ความเข้มข้น 1.84 ยูนิต) ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีก่อนเติมสารละลาย L-DOPA (2.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไป วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากสมการ

$$\text{Tyrosinase inhibition activity (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

แทนค่า A =ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ไม่เติมสารสกัด
B =ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่มีสารสกัด

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

ผลการทดลองทำซ้ำในแต่ละตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ (n = 3) แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบกับความแตกต่างทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแต่ละกลุ่มโดยใช้สถิติ One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS พิจารณานัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ p-value < 0.05

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ลักษณะทางกายภาพและผลผลิตของสารสกัดว่านสาวหลง

จากการสกัดว่านสาวหลง แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนใบว่านสาวหลง และส่วนรากหรือเหง้าว่านสาวหลงด้วยวิธีการหมักในตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 95 พบว่า สารสกัดใบว่านสาวหลง มีลักษณะเหนียวหนืด มีสีเขียวเข้ม และมีกลิ่นหอม (ร้อยละผลผลิต 11.32 ± 0.12) และสารสกัดเหง้าว่านสาวหลง มีลักษณะเหนียวหนืด สีน้ำตาลเข้ม และมีกลิ่นหอมฉุน มีกลิ่นเฉพาะตัว (ร้อยละผลผลิต 11.02 ± 0.16) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ลักษณะทางกายภาพ และร้อยละผลผลิตของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง

ตัวอย่างสมุนไพร	ร้อยละผลผลิตของสารสกัด	ลักษณะทางกายภาพของสารสกัด
ใบว่านสาวหลง	11.32 ± 0.12	เหนียวหนืด มีสีเขียวเข้ม และมีกลิ่นหอม
เหง้าว่านสาวหลง	11.02 ± 0.16	เหนียวหนืด สีน้ำตาลเข้ม และมีกลิ่นหอมฉุน มีกลิ่นเฉพาะตัว

2. ปริมาณกลุ่มฟีนอลิกและกลุ่มฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดว่านสาวหลง

การหาปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดเอทานอลจากใบและเหง้าว่านสาวหลง พบว่า สารสกัดใบว่านสาวหลง มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ 21.92 ± 0.79 mg GAE/g extract และ 14.12 ± 0.12 mg QE/g extract ตามลำดับ และสารสกัดเหง้าว่านสาวหลง มีปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ เท่ากับ 10.89 ± 0.15 mg GAE/g extract และ7.64 ± 0.07 mg QE/g extract ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบว่านสาวหลง มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดเหง้าว่านสาวหลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการหาองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง

ลำดับที่	สารสกัด	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ IC_{50} (µg/mL)	องค์ประกอบทางเคมี	
			กลุ่มฟีนอลิก (mg GAE/g extract)	กลุ่มฟลาโวนอยด์ (mg QE/g extract)
1	ใบว่านสาวหลง	2,085.64 ± 2.86**	21.92 ± 0.79*	14.12 ± 0.12*
2	เหง้าว่านสาวหลง	3,846.31 ± 2.59**	10.89 ± 0.15	7.64 ± 0.07
3	วิตามินซี	6.00 ± 0.05**	-	-

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05)

**แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.01)

GAE = Gallic acid, QE = Quercetin

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลงโดยใช้วิตามินซี พบว่า สารสกัดใบว่านสาวหลง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด (IC_{50} = 2,085.64 ± 2.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดเหง้าว่านสาวหลง (IC_{50} = 3,846.31 ± 2.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบว่านสาวหลง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารสกัดเหง้าว่านสาวหลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.01) (ตารางที่ 2)

4. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง

จากผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลงโดยใช้กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารมาตรฐาน พบว่า สารสกัดใบว่านสาวหลง มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} = 262.02 ± 5.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเหง้าว่านสาวหลง มีค่า IC_{50} = 339.17 ± 3.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบว่านสาวหลง มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารสกัดเหง้าว่านสาวหลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง

ลำดับที่	สารสกัด	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส
		IC_{50} (µg/mL)
1	ใบว่านสาวหลง	262.02 ± 5.89*
2	เหง้าว่านสาวหลง	339.17 ± 3.59*
3	กรดโคจิก (Kojic acid)	11.78 ± 0.14*

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05)

อภิปรายผล

งานวิจัยนี้มีได้ทำการศึกษาหาปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นสารสกัดที่สามารถนำไปผลิตภัณฑ์เวชสำอาง และผลิตภัณฑ์สมุนไพรทางเลือกให้กับผู้บริโภคและสร้างมูลค่าทางเชิงพาณิชย์

1. การสกัดสารจากใบและเหง้าว่านสาวหลง

จากการสกัดสารใบและเหง้าว่านสาวหลง โดยใช้วิธีการหมักด้วยตัวทำละลายเอทานอล ร้อยละ 95 สารสกัดทั้งสองส่วนมีลักษณะทางกายภาพและร้อยละผลผลิตที่ใกล้เคียงกัน โดยพบว่า สารสกัดใบว่านสาวหลงให้ร้อยละผลิตมากที่สุด ซึ่งการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งเอทานอลเป็น all-purpose solvent สามารถละลายสารที่มีขั้วและกึ่งมีขั้ว เป็นการแยกสารโดยอาศัยหลักการละลายระหว่างตัวทำละลายกับสารสำคัญในสมุนไพร โดยสารสำคัญจะสามารถละลายในตัวทำละลายได้ก็ต่อเมื่อความเป็นขั้วของตัวสารสำคัญกับตัวทำละลายมีค่าใกล้เคียงกัน (Like dissolves like) ซึ่งสารกลุ่มฟีนอลลิก และฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติในการละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ เป็นกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเลต และป้องกันการสร้างสารก่อมะเร็ง (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547)

2. การหาปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง

จากการหาปริมาณสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric method ของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง พบว่า สารสกัดใบว่านสาวหลง มีปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์สูงกว่าสารสกัดเหง้าว่านสาวหลง เป็นผลจากปัจจัยของลักษณะของสมุนไพรที่แตกต่างกัน ซึ่งส่วนของใบจะเป็นส่วนที่อยู่เหนือดินมักจะมีสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สอดคล้องกับงานวิจัยของ Singtothong et al. (2013) พบว่า สาร Camphene เป็นสารประกอบกลุ่มทีพีนอยด์และฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นส่วนเหนือดินของว่านสาวหลง และสอดคล้องงานวิจัย สนั่น ศุภธีรสกุล และ กชกร มุสิกพงษ์ (2557) พบว่า สารสกัดว่านสาวหลงที่สกัดด้วยเมทานอลมีองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง พบว่า สารสกัดใบว่านสาวหลง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดเหง้าว่านสาวหลง คาดว่าเป็นผลจากสารสกัดใบว่านสาวหลงที่มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดเหง้าว่านสาวหลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ศิริพรรณ สุขขัง และคณะ (2560) ได้ศึกษาผักพื้นบ้านรสเปรี้ยวฝาดและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่า ผักพื้นบ้านที่มีรสเปรี้ยวและน้ำมันหอมระเหย มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งปริมาณสารมี

ความสัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ และสอดคล้องกับการวิจัยของ Srisook et al. (2010) พบว่า ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากว่านสาวหลงมีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH และมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบงานวิจัยของ Hongsiri and Duanyai (2022) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากส่วนใบว่านสาวหลง มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ มีค่า IC_{50} = 17.57 ± 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบว่านสาวหลงที่มีองค์ประกอบทางเคมีในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง ส่งผลให้สารสกัดใบว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี

4. ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง

จากผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดใบและเหง้าว่านสาวหลง พบว่า สารสกัดทั้งสองส่วนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสเรียงลำดับจากมากไปน้อย ได้แก่ สารสกัดใบว่านสาวหลง และเหง้าว่านสาวหลง ตามลำดับ สารสกัดใบว่านสาวหลงมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดี จากรายงานของ Chan et al. (2008) พบว่าส่วนสกัดจากพืชหลายชนิดในวงศ์ Zingiberaceae มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินของผิวหนัง พบว่า ส่วนสกัดของว่านสาวหลงที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสสูงที่สุด คือ ส่วนสกัดเฮกเซน รองลงมา คือ ส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดย่อยน้ำ ตามลำดับ และงานวิจัยของ Uthairung et al. (2020) น้ำมันหอมระเหยส่วนใต้ดินและส่วนทั้งต้นมีฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทรซิเนส โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 117.94 ± 19.08 และ 147.03 ± 10.28 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการศึกษาที่ผ่านมาเป็นการวิจัยของส่วนน้ำมันหอมระเหยของว่านสาวหลง นอกจากนี้ยังมีสมุนไพรชนิด ๆ อื่น ๆ ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ได้แก่ กระถิน กะทกรก ย่านางและ ผักโขม (ลัดดาวัลย์ พะวรและคณะ, 2022)

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่า สารสกัดใบว่านสาวหลงน่าจะมีคุณสมบัติเป็นสารทำให้ผิวขาว และมีสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นสารทำให้ผิวขาว ป้องกันริ้วรอย และมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นจึงต้องมีการศึกษาหาข้อมูลเพิ่มเติมในเรื่องการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา องค์ประกอบทางเคมีกลุ่มอื่นๆ และฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่น ๆ รวมถึงการศึกษาในสัตว์ทดลองและทางคลินิกก่อนนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณ ฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดว่านสาวหลงสารสกัดเอทานอลจากใบและเหง้าของว่านสาวหลง พบว่า สารสกัดใบว่านสาวหลงมีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยังสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ งานวิจัยนี้จึงเป็นการรายงานการยืนยันผลของสารสกัดใบว่านสาวหลงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และมีคุณสมบัติที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางบำรุงผิวและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้สมุนไพรในท้องถิ่นนำไปเป็นผลิตภัณฑ์สมุนไพรทางเลือกให้กับผู้บริโภคและสร้างมูลค่าทางเชิงพาณิชย์ได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้นจึงต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมในเรื่องการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรจากว่านสาวหลง และฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่น ๆ รวมถึงการศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และทางคลินิกก่อนนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เวชสำอาง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากผู้วิจัยได้รับความร่วมมือและช่วยเหลือในการปฏิบัติงานจากผู้ร่วมโครงการวิจัย ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุน ววน.) ประจำปีงบประมาณ 2566 และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2547). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร.* กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ลัดดาวัลย์ พะวร, คงศักดิ์ บุญยะประณัย, อรอุมา จันทร์เส, มินตรา อานนท์, สุพจน์ ทับทิมใหและ อนุสรา อันพิมพ์. (2022). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและอีลาสเตสของผัก 10 ชนิด ในจังหวัด นครราชสีมา. *Journal of Science & Technology MSU*, *41*(6), 277-284.

ศิริพรรณ สุขขัง, สมนึก พรมแดง และ สายน้ำอ้อย สว่างเมฆ. (2560). ผักพื้นบ้านรสเปรี้ยวในการเปนแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ. ใน *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 55 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์* (หน้า 288-295). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สนั่น ศุภธีรสกุล และ กชกร มุสิกพงษ์. (2557). ผลต่อการผ่อนคลายในอาสาสมัครของน้ำมันหอมระเหยจากว่านสาวหลง. *วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ*, *7*, 17-25.

Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Wong, L. F., Lianto, F. S., Wong, S. K., Lim, K. K., & Lim, T. Y. (2008). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food chemistry*, *109*(3), 477-483.

Chang, Q., Zuo, Z., Harrison, F., & Chow, M. S. S. (2002). Hawthorn. *The Journal of Clinical Pharmacology*, *42*(6), 605-612.

Chu, Y. H., Chang, C. L., & Hsu, H. F. (2000). Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(5), 561-566.

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.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. New York: Oxford University Press.

Hongsiri, A., & Duanyai, S. (2022). Antioxidant Activity, Total phenolic and Essential Oil from *Amomum biflorum* Jack: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารประกอบฟีนอลิกและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยว่านสาวหลง. *Advanced Science Journal*, *22*(2), R36-R47.

Kim, Y. J., & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and molecular life sciences*. *62*, 1707-1723.

Polsena, P. (2007). *Khoa Hin Son Botanic Gardens (Complete version).* Bangkok, Thailand: Jetanaromphan Printing. (in Thai)

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.

Singtothong, C., Gagnon, M. J., & Legault, J. (2013). Chemical composition and biological activity of the essential oil of Amomum biflorum. *Natural Product Communications*, *8*(2), 265-267.

Srisook, K., Salee, P., Charoensuk, Y., & Srisook, E. (2010). In vitro anti-oxidant and anti-tyrosinase activities of the rhizomal extracts from *Amomum biflorum* Jack. *Thai Journal of Botany*, *2*, 143–150.

Uthairung, A., Rattarom, R., & Mekjaruskul, C. (2020). Cosmeceutical applications of essential oils of Amomum biflorum Jack from whole plant and rhizome. *Thai Journal of Science and Technology*, *9*(5), 680-692.