ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและอีลาสเตสของผัก 10 ชนิด ในจังหวัดนครราชสีมา

Antioxidant, tyrosinase and elastase inhibition activities of 10 vegetables cultivated in Nakhon Ratchasima Province

ลัดดาวัลย์ พะวร[1]*, คงศักดิ์ บุญยะประณัย[2], อรอุมา จันทร์เสถียร[1], มินตรา อานนท์[3],
สุพจน์ ทับทิมใหญ่[3], อนุสรา อันพิมพ์[3]
Laddawan Phawon[1]*, Kongsak Boonyapranai[2], Onuma Chansatein[1],
Mintra Arnon[3], Suphod Tabtimyai[3], Anusara Anpim[3]

Received: 29 March 2022 ; **Revised**: 23 May 2022 ; **Accepted**: 14 June 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์อีลาสเตสของผักในจังหวัดนครราชสีมา จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ กะทกรก ผักแว่น ย่านาง ผักหนอก ชะพลู กระถิน ผักแพว ผักแขยง ผักโขมและมะตูมซาอุ โดยนำส่วนใบของผักมาล้าง อบให้แห้ง แล้วบดให้ละเอียด สกัดด้วยวิธีแช่ (Maceration) ด้วยตัวทำละลายเอทานอลเข้มข้น 95% การวิจัยประกอบด้วย 4 การทดลอง คือ การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสด้วยวิธี Spectrophotometric method พบว่าผักทั้ง 10 ชนิด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมอยู่ระหว่าง 47.56 - 307.83 mg GAE/g DW สารสกัดหยาบจากใบของกระถินมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากที่สุด เท่ากับ 307.83±6.11 mg GAE/g DW การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่ากระถินมีฤทธิ์ดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 145.62±5.61 mg QAE/g DW รองลงมาคือ ผักโขม (123.51±5.57 mg QAE/g DW) และย่านาง (106.35±4.32 mg QAE/g DW) ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและอีลาสเตส จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบของใบกะทกรกมีฤทธิ์ยับยั้งดีที่สุด เท่ากับ 47.34±3.21% และ 45.21±3.33% ตามลำดับ ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ากระถิน กะทกรก ย่านางและ ผักโขม เป็นพืชที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงามต่อไปได้

คำสำคัญ: ผัก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส

Abstract

The research objective was to screen total phenolic compounds, antioxidants, tyrosinase and elastase inhibition activities of 10 indigenous vegetables in Nakhon Ratchasima province. The plants were *Passiflora foetida* Linn., *Marsilea crenata* Presl., *Tiliacora triandra* Diels., *Hydrocotyle javanica* Thunb., *Piper sarmentosum* Roxb., *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit., *Polygonum odoratum* Lour., *Limnophila geoffrayi* Bonati., *Amaranthus gracilis* Desf. and *Schinus terebinthifolius* Raddi. Leaves were washed, dried and ground to fine powder. Maceration with 95% ethanol

[1] สาขาวิทยาศาสตร์ คณะศึกษาศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000
[2] ศูนย์วิจัยโรคไม่ติดเชื้อและอนามัยสิ่งแวดล้อม สถาบันวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200
[3] นักศึกษาสาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000
* ติดต่อผู้นิพนธ์ ลัดดาวัลย์ พะวร สาขาวิทยาศาสตร์ คณะศึกษาศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000
อีเมล์: laddawan@nmc.ac.th
[1] Science, Faculty of Education, Nakhon Ratchasima College, Nakhon Ratchasima 30000
[2] Ph.D., Research Center for Non-communicable Disease and Environmental Health, Research Institute for Health Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200
[3] Medical science, Faculty of Allied Health Sciences, Nakhon Ratchasima College, Nakhon Ratchasima 30000
* **Corresponding author:** Laddawan Phaworn, Science, Faculty of Education, Nakhon Ratchasima College, Nakhon Ratchasima 30000, Email: laddawan@nmc.ac.th

was conducted for the extraction. There were 4 experiments including analysis of phenolic compounds, antioxidant activity and tyrosinase and elastase inhibition using Folin-Ciocalteu method, DPPH radical scavenging activity assay, dopachrome method and spectrophotometric method, respectively. Total phenolic contents of crude extracts of all indigenous vegetables ranged between 47.56 and 307.83 mg GAE/g DW. The highest total phenolic compounds were found in leaf extract of *Limnophila leucocephala* (Lam.) de Wit. with 307.83±6.11 mg GAE/g DW. When analyzed for antioxidant activity, the crude extract from *Limnophila leucocephala* (Lam.) de Wit. showed the highest antioxidant activity, with 145.62±5.61 mg QAE/g DW, followed by *Tiliacora triandra* Diels. (123.51±5.57 mg QAE/g DW) and *Amaranthus gracilis* Desf. (106.35±4.32 mg QAE/g DW), respectively. The best tyrosinase and elastase inhibitor activities were found in *Passiflora foetida* Linn. leaf extract at 47.34±3.21% and 45.21±3.33%, respectively. This study showed that the leaves of *Limnophila leucocephala* (Lam.) de Wit., *Passiflora foetida* Linn., *Tiliacora triandra* Diels. and *Amaranthus gracilis* Desf. are rich in bioactive compounds. They could be developed as health and beauty products ingredients in the future.

Keywords: Indigenous vegetables, antioxidant activity, tyrosinase inhibitiose inhibition activity

บทนำ

ผิวหนัง เป็นอวัยวะที่สำคัญของร่างกาย ทำหน้าที่รับความรู้สึก ป้องกันสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย รวมถึงป้องกันความเสียหายจากผลกระทบของสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงอุลตร้าไวโอเล็ต (Ultraviolet light) หรือแสงยูวี (UV light) ที่มากับแสงแดด (จำเนียร ชมภู และคณะ, 2563) ซึ่งการได้รับแสงยูวีมากเกินไปจะส่งผลทำให้เกิดการสะสมของอีลาสติคไฟเบอร์ (Elastic fibers) ลดการสร้างคอลลาเจน (Collagen) และเกิดการสะสมของสารในกลุ่มไกลโคซามิโนไกลแคน (Glycosaminoglycan) ซึ่งผลกระทบเหล่านี้ทำให้ผิวหนังขาดความยืดหยุ่นเกิดรอยเหี่ยวย่นก่อนวัย รวมถึงความสดใสอ่อนเยาว์ของผิวหนัง (Oikarnin & Kallionen, 1989) การสูญเสียความแข็งแรงและความยืดหยุ่นในผิวหนัง มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส (Elastase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำลายเส้นใยอีลาสตินและคอลลาเจนที่บริเวณผิวหนังได้ (Itoh *et al.*, 2019) นอกจากนี้แสงยูวียังกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ควบคุมกลไกการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Melanin pigment) ในเซลล์เมลาโนไซท์ (Melanocyte) ซึ่งหากมีการสะสมของเม็ดสีที่ผิวหนังมากเกินไป อาจส่งผลเกิดความผิดปกติขึ้นที่ผิวหนังได้ เช่น ผิวหมองคล้ำ หรือเกิดจุดด่างดำ ฝ้า กระ เป็นต้น (Zaidi *et al.*, 2016) ดังนั้นหากต้องการไม่ให้ผิวหนังขาดความยืดหยุ่น เกิดรอยเหี่ยวย่นก่อนวัย และไม่ต้องการให้เซลล์ผิวหนังสร้างเมลานินมากเกินไป (hyperpigmentation) วิธีหนึ่งที่สามารถทำได้คือยับยั้งการทำงานของเซม์อีลาสเตสและไทโรซิเนส

ปัจจุบันเครื่องสำอางค์งค์มีการใช้สารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของผิวหนัง (Skin Aging-related Enzyme) และสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ช่วยเพิ่มความกระจ่างใสให้ผิว และลดริ้วรอยมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มาจากแหล่งธรรมชาติ เช่น พืช พืชสมุนไพร และผักพื้นบ้าน เป็นที่นิยมนำมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เนื่องจากมีแนวโน้มว่ามีความปลอดภัยกว่าการใช้สารสังเคราะห์และลดการใช้สารเคมีที่อาจเป็นอันตรายต่อผิวหนัง (Klinsoonthorn *et al.*, 2013)

จากการศึกษางานวิจัย พบว่าพืชหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่น ดาวเรือง (Vallisuta *et al.,* 2014) ย่านาง (Soradech *et al.*, 2018) และใบหม่อน (Insain *et al.*, 2018) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษาวิจัยทางด้านความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากผักพื้นบ้าน พบว่าผักพื้นบ้านหลายชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ผักแพว ผักแขยง (เกตุการ ดาจันทา และคณะ, 2562) ผักโขม (สมนึก พรมแดง และคณะ, 2562) กระถิน (Chen *et al.*, 2018 ; คณาทิพย์ สิงห์สาย และคณะ, 2563) และย่านาง (บุญเลี้ยง สุพิมพ์ และคณะ, 2653) เป็นต้น และจากการตรวจสอบข้อมูลงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาพืชผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และอีลาสเตสร่วมกับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย ยังมีการศึกษาไม่แพร่หลายมากเท่าที่ควร และผักพื้นบ้านบางชนิดยังไม่มีการรายงานมาก่อน ด้วยเหตุนี้คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาผักพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสและอีลาสเตส ในระดับหลอดทดลองในเขตจังหวัดนครราชสีมา รวมทั้งศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging activity) ร่วมด้วย โดยหวังว่าผลจากการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐาน ช่วยให้ทราบชนิดของผักพื้นบ้านที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง สำหรับผิวขาวกระจ่างใส

ลดรอยเหี่ยวย่น และเป็นแนวทางสำคัญในการพัฒนาเพิ่มมูลค่าผักพื้นบ้านให้สูงและยั่งยืนต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

ผักพื้นบ้านที่ใช้ในการวิจัย

ผักพื้นบ้าน 10 ชนิด ได้แก่ กะทกรก ผักแว่น ย่านาง ผักหนอก ชะพลู กระถิน ผักแพว ผักแขยง ผักโขมและมะตูมซาอุ โดยเลือกเก็บส่วนใบของผักพื้นบ้านในเขตอำเภอเมือง อำเภอขามทะเลสอ อำเภอสูงเนิน อำเภอโนนสูง และอำเภอเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดนครราชสีมา ตรวจเอกลักษณ์ด้วยรูปวิธานโดยศูนย์วิจัยโรคไม่ติดเชื้อและอนามัยสิ่งแวดล้อม วิจัยวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Local vegetables used in the study

Local Name	Scientific name	Family	Collected area
Ka thok rok	*Passiflora foetida* Linn.	Passifloraceae	Sung Noen District
Phak Waen	*Marsilea crenata* Presl.	Marsileaceae	Mueang District
Yanang	*Tiliacora triandra* Diels.	Menispermaceae	Mueang District
Phak Nok	*Hydrocotyle javanica* Thunb.	Araliaceae	Non Sung District
Chaplu	*Piper sarmentosum* Roxb.	Piperaceae	Kham Thale So District
Kra Thin	*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.	Mimosaceae	Kham Thale So District
Phak Phaew	*Polygonum odoratum* Lour.	Polygonaceae	Sung Noen District
Phak Kha Yaeng	*Limnophila geoffrayi* Bonati.	Scrophulariaceae	Non Sung District
Phak Khom	*Amaranthus gracili*s Desf.	Amaranthaceae	Mueang District
Matoom Saudi	*Schinus terebinthifolius* Raddi.	Anacardiaceae	Chaloem Phra Kiat District

การเตรียมสารสกัดเอทานอลจากผักพื้นบ้าน

เก็บตัวอย่างผักพื้นบ้าน 10 ชนิด นำส่วนของใบมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบด้วยเครื่องอบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างแห้ง จากนั้นนำไปบดให้ละเอียด นำผงของตัวอย่างผักพื้นบ้านที่ได้ทำการสกัดด้วยวิธี Maceration technique โดยชั่งใบพืชที่ผ่านการบดละเอียดแล้วนำไปใส่ในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% อัตราส่วนของใบพืชแห้งต่อตัวทำละลายเท่ากับ 30 กรัม ต่อตัวทำละลาย 300 มิลลิลิตร แช่สารสกัดไว้เป็นเวลา 7 วัน ทำการเขย่าทุกวัน จากนั้นกรองแยกเก็บส่วนสารละลายด้วยกระดาษกรอง นำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องระเหยสารสุญญากาศ (Rotary evaporator) และนำไปทำให้แห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านที่ได้คำนวณหาร้อยละของสารสกัดหยาบ (% Crude Extract) เทียบกับน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง และเก็บสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

นำสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านทั้ง 10 ชนิด มาวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Method (Mohd-Esa *et al.*, 2010) เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.05-0.70 mg/ml วิธีโดยสังเขปดังนี้ ชั่งตัวอย่างมา 0.1 กรัม ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ละลายด้วยน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ลงใน 96-well plate นำมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 นาโนเมตร โดยวิเคราะห์ซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวม โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในหน่วยของ mg GAE/g DW

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging ดัดแปลงจาก González-Mendoza *et al.* (2010) โดยใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นในช่วง 0.0125 - 0.20 mg/ml วิธีโดยสังเขปดังนี้ เตรียมสารละลายของสารสกัดเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.05 *มิลลิโมลาร์* ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร เขย่า

ให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณหาร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) จากสูตร

% DPPH free radical inhibition = [(A-B)/A] x100

เมื่อ

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่ไม่มีสารทดสอบ

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH ที่มีสารทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

ทดสอบด้วยวิธี Dopachrome method เทียบกับสารมาตรฐานเชิงบวก คือ กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นวิธีที่ดัดแปลงจาก Masuda *et al.* (2005) วิธีสังเขปดังนี้ เตรียมสารสกัดจากผักพื้นบ้านมาละลายด้วยเอทานอล 95% ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส เทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดโคจิกความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยปิเปตสารสกัดหรือสารมาตรฐานปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมกับ 0.1 M phosphate buffer pH 6.7 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เอนไซม์ไทโรซิเนส (mushroom tyrosinase) (100 unit/mL) โดยใช้ phosphate buffer pH 6.7 เป็นตัวทำลาย ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใน 96 well plate ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 2.5 mM L-DOPA ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader จากนั้นนำไปอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่นเดิม (ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ) จากนั้นคำนวนหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (% inhibition) ดังสมการ

% inhibition = [(A-B)/A] x 100

เมื่อ

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ของสารละลายที่ไม่มีสารสกัด

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ของสารละลายที่มีสารสกัด

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส

ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสด้วยวิธี Spectrophotometric method ดัดแปลงตามวิธีของ Wittenauer *et al.* (2015) วิธีโดยสังเขปดังนี้ นำสารสกัดจากพืชพื้นบ้านมาละลายด้วยเอทานอล 95% ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับกับสารมาตรฐานเชิงบวก คือ Phenylmethylsulfonyl Fluoride: PMSF ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสใน 96- well plate ที่มีเอนไซม์ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Elastase ใน 200 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl buffer pH 8.0 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 10 นาที ก่อนเติม 5 มิลลิโมลาร์ N-Suc-$(Ala)_3$ -nitroanilide ซึ่งเป็นสับสเตรตของเอนไซม์ ตั้งทิ้งให้ทำปฏิกิริยาต่อไปอีก 10 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่นเดิม (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) จากนั้นคำนวนหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส (% inhibition) ดังสมการ

% inhibition = [(A-B)/A] x 100

เมื่อ

A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ของสารละลายที่ไม่มีสารสกัด

B คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ของสารละลายที่มีสารสกัด

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการนำข้อมูลค่าสังเกตมาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานและนำเสนอในรูปแบบ Mean ± S.D.

ผลการวิจัย

ผลการเตรียมสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้าน

จากการนำส่วนของใบผักพื้นบ้านทั้ง 10 ชนิด มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำมาสกัดโดยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยสารสูญญากาศและนำไปแช่เยือกแข็ง พบว่าสารสกัดหยาบจากผักพืชบ้านมีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวข้นหนืดสีเขียวเข้มจนถึงสีดำ จากนั้นชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านที่ได้คำนวณหาร้อยละของส่วนสารสกัดหยาบเทียบกับน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (30 กรัม) พบว่าร้อยละของส่วนสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านทั้ง 10 ชนิด มีค่าระหว่าง 5.60%-10.70% ดังแสดงข้อมูลใน Table 2

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

การหาปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดหยาบจากใบของผักพื้นบ้านทั้ง 10 ชนิด ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu method เทียบกับสารมาตรฐานคือกรดแกลลิก สามารถคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรงของกรดแกลลิก สมการ y = 1.2038x + 0.058 R^2 = 0.9974 พบว่าสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมแตกต่างกัน ดังแสดงไว้ใน Table 2 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมตั้งแต่ 47.56-307.83 mg GAE/g DW โดยมีสารสกัดหยาบของผักพื้นบ้าน 4 ชนิด ที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงกว่า 100 mg GAE/g DW ได้แก่ ย่านาง ผักหนอก กระถิน และผักโขม โดยสารสกัดหยาบของกระถินมีปริมาณสารประกอบ ฟีนอลสูงที่สุด เท่ากับ 307.83 mg GAE/g DW และพบว่าสารสกัดหยาบของผักพื้นบ้านที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงมีความสอดคล้องกับร้อยละผลผลิตของสารสกัดหยาบ (% Yield Crude Extract) งานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nanasombat *et al.* (2019) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของใบย่านาง พบว่าใบย่านางมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่า 100 mg GAE/g DW โดยมีค่าเท่ากับ 101.25 ± 1.8 mg GAE/ g DW และสอดคล้องกับงานวิจัยของเกตุการ ดาจันทา และคณะ (2562) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของกระถิน ในจังหวัดพิษณุโลกที่สกัดด้วยเมทานอล 80% พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เท่ากับ 307.83 ± 22.11 mg GAE/g DW งานวิจัยในครั้งนี้แตกต่างจากงานวิจัยของสัมพันธ์ สร้อยกล่อม (2557) ที่ศึกษาปริมาณสารโพลีฟีนอลและประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในใบผักโขมด้วยการสกัดแบบเย็นแบบแช่ในเอทานอล 70% พบว่ามีปริมาณสารโพลีฟีนอลเท่ากับ 101.905 ± 0.623 mg GAE/g DW ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการวิจัยในครั้งนี้ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีค่าเท่ากับ 235.62 ± 6.44 mg GAE/g DW งานวิจัยในครั้งนี้แตกต่างจากงานวิจัยของ Sivakumar *et al.* (2017) ที่ศึกษาสารสกัดจากผักหนอกที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ เบนซิน เอทิลอะซิเตท เมทานอล และเอทานอล พบว่าผักหนอกที่สกัดด้วยเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 1.02g 100g-1 ในขณะที่งานวิจัยในครั้งนี้สกัดผักหนอกด้วยเอทานอล 95% มีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 171.26 ± 9.70 mg GAE/g DW

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบของผักพื้นบ้านที่สกัดด้วยเอทานอล 95% โดยใช้วิธี DPPH radical scavenging และใช้เคอร์ซิติน (Quercetin) เป็นสารมาตรฐาน สามารถคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรงของเคอร์ซิติน สมการ y = 717.27x + 2.4478 R^2 = 0.9923 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานและสารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านทั้ง 10 ชนิด ได้แสดงเป็นค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% DPPH free radical inhibition) ซึ่งพบว่า สารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ตั้งแต่ 12.43-145.62% โดยสารสกัดหยาบที่แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด 3 อันดับแรก คือ กระถิน (145.62± 5.61%) ผักโขม (123.51±5.57%) และย่6.35±4.32%) ดังแสดงในTable Table 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม เนื่องจากผักพื้นบ้านทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูง ซึ่งสารประกอบ ฟีนอลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยหมู่ ฟีนอล สามารถรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระและกลายเป็นอนุมูลของสารประกอบฟีนอลที่เสถียร ซึ่งทำลายวงจรของความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระในเซลล์ได้ พนิดา แสนประกอบ (2561) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านในครั้งสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยรายงานมาก่อน อาทิ เช่น สอดคล้องกับการศึกษาของเกศศิณี ตระกูลทิวากร และจันทร์เพ็ญ ศักดิ์สิทธิพิทักษ์ (2543) ที่ศึกษาศักยภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยที่สกัดด้วยเมทานอลพบว่า ผักโขม มีศักยภาพสูงในการต้านสารอนุมูลอิสระ มีค่าระหว่าง 25-100 มิลลิกรัมสาร BHA เทียบเท่าใน ผักสด 100 กรัม สอดคล้องกับการศึกษาของสมนึก พรมแดง และคณะ (2563) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในใบผักโขม 12 สายพันธุ์ด้วยวิธี DPPH assay พบว่าผักโขมมีศักยภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Soradech *et al.* (2018) ที่พบว่าใบย่านางที่สกัดด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน และจากการทบทวนการศึกษาที่เกี่ยวข้องพบการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระถิน และชะพลูจากเมทานอล 80% ของเกตุการ ดาจันทา และคณะ (2562) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 65.70 ± 1.53, 7.65 ± 0.65 mg AAE/g dw ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่าใบกระถิน และใบชะพลูที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มีค่าเท่ากับ 145.62± 5.61 และ 12.43±2.75 mg QAE/g DW ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการสกัดผักพื้นบ้านด้วยเอทานอล 95% เป็นวิธีการสกัดอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการสกัดสำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส

จากการนำสารสกัดหยาบจากใบผักพื้นบ้านที่สกัดด้วยเอทานอล 95% จำนวน 10 ชนิด มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยวิธี Dopachrome method และเทียบกับสารมาตรฐานกรด โคจิก พบว่าสารสกัด

หยาบของใบกะทกรก สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด เท่ากับ 47.34±3.21% รองลงมาคือ สารสกัดหยาบของใบชะพลู (40.22 ± 2.14%) และสารสกัดหยาบของใบผักแว่น (36.72±2.37%) ตามลำดับ แต่ค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดหยาบของผักพื้นบ้านที่สกัดด้วยเอทานอล 95% ทั้ง 10 ชนิด มีค่าต่ำกว่าสารมาตรฐานกรดโคจิก ซึ่งเท่ากับ 80.73±2.54% ดังแสดงใน Table 2 จากผลดังกล่าวข้างต้น อาจเนื่องมาจากสารสกัดหยาบของใบผักพื้นบ้านเป็นสารที่มาจากธรรมชาติ และสารสกัดหยาบมีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลายจึงทำให้สารสกัดหยาบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนสที่น้อยกว่าสารมาตรฐานซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีประสิทธิภาพสูง และจากการทบทวนการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจากใบกะทกรกของ Chiavaroli *et al.* (2020) ที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตต เมทานอล เมทานอล-น้ำ (80%) และ น้ำ พบว่าใบกะทกรกที่สกัดด้วยเอทิลอะซิเตตมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 48.48 ± 3.68 % ซึ่งมีค่าร้อยละการยับยั้งใกล้เคียงกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% เท่ากับ 47.34 ± 3.21% แสดงให้เห็นว่าสารสกัด เอทานอล 95% จากใบของกะทกรกที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ไม่แตกต่างจากการศึกษาของ Chiavaroli *et al.* (2020) ดังนั้นการเลือกใช้ใบกะทกรกในรูปแบบของสารสกัดจากเอทานอล 95% หรือสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตสามารถนำไปใช้สำหรับการพัฒนาเวชสำอางได้

ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตส

จากการนำสารสกัดหยาบของใบผักพื้นบ้าน 10 ชนิด ที่สกัดด้วยเอทานอล 95% มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส เทียบกับสารมาตรฐานเชิงบวก คือ Phenylmethylsulfonyl Fluoride: PMSF พบว่าสารสกัดหยาบของใบกะทกรก สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้สูงที่สุด เท่ากับ 45.21±3.33 % รองลงมาคือ สารสกัดหยาบของใบของผักหนอก (30.67±2.43 %) และสารสกัดหยาบของใบมะตูมซาอุ (25.92±1.85%) ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบของใบผักแพวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสได้ต่ำที่สุด เท่ากับ 3.21±0.48 % ดังแสดงใน Table 2 และพบว่าค่าร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสของสารสกัดหยาบจากใบของผักพื้นบ้านทั้ง 10 ชนิด มีค่าต่ำกว่าสาร PMSF ซึ่งเท่ากับ 67.83±3.21% โดยอาจเนื่องจากผักพื้นบ้านที่ใช้ในการวิจัยไม่ได้ถูกสกัดแยกให้บริสุทธิ์ทำให้มีสารออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสต่ำกว่าสารมาตรฐาน อย่างไรก็ตามงานวิจัยครั้งนี้เป็นการรายงานฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสเป็นครั้งแรกในไทยของผักพื้นบ้านทั้ง 10 ชนิด งานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นฐานข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อีลาสเตสสำหรับพืชผักพื้นบ้าน

Table 2 Shows the percentage yield of the extract. total amount of phenolic compounds and percentage of antioxidants Inhibitory percentage of tyrosinase and elastase of crude extra from leaves of 10 local vegetables.

Local name	% Yield Crude Extract	Total phenolic compound (mg GAE/g DW)	% DPPH free radical inhibition (mg QAE/g DW)	Tyrosinase inhibition (%)	Elastase inhibition (%)
Ka thok rok	6.20	95.34±4.97	60.31±4.21	47.34±3.21	45.21±3.33
Phak Waen	7.70	70.81±3.01	30.65±2.67	36.72±2.37	20.12±0.32
Yanang	10.70	294.24±5.05	106.35±4.32	20.54±1.67	8.67±0.45
Phak Nok	9.50	171.26±9.70	68.54± 3.75	14.53±0.63	30.67±2.43
Chaplu	5.60	65.48±4.33	12.43±2.75	40.22±2.14	15.95±1.45
Kra Thin	10.20	307.83±6.11	145.62± 5.61	31.58±2.53	15.34±1.21
Phak Phaew	7.60	47.56±3.21	24.07±0.35	8.45±0.32	3.21±0.48
Phak Kha Yaeng	8.40	67.24±2.87	13.42±1.07	21.64±1.84	6.79±0.86
Phak Khom	8.47	235.62±6.44	123.51±5.57	15.32±0.74	23.29±1.75
Matoom Saudi	8.17	83.23±5.45	22.65±1.87	25.23±1.75	25.92±1.85
** Quercetin	-	-	85.29±0.32	-	-
** Kojic acid	-	-	-	80.73±2.54	-
** PMSF	-	-	-	-	67.83±3.21

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD), n = 3

** สารมาตรฐาน

สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยในครั้งนี้ ทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์อีลาสเตสจากผักพื้นบ้าน 10 ชนิด สกัดด้วยเอทานอล 95% พบว่า กระถิน ย่านาง และผักโขม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งผักพื้นบ้านเหล่านี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบริโภคเป็นอาหารเพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากอนุมูลอิสระ ในขณะที่สารสกัดหยาบจากผักพื้นบ้านต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารสกัดหยาบจากใบกะทกรกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด งานวิจัยครั้งนี้เป็นการรายงานฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นครั้งแรกในไทยของผักแว่น ผักหนอก ชะพลู ผักแขยง และผักโขม ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตส พบว่าสารสกัดหยาบจากใบกะทกรกมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของอีลาสเตสดีที่สุด งานวิจัยครั้งนี้เป็นการรายงานฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเตสเป็นครั้งแรกในไทยของผักพื้นบ้านทั้ง 10 ชนิด ซึ่งงานวิจัยในครั้งนี้จะเป็นฐานข้อมูลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสและอีลาสเตสสำหรับพืชผักพื้นบ้านต่อไป ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าใบกระถิน กะทกรก ย่านาง และ ผักโขม มีศักยภาพที่สามารถนำไปศึกษาต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพและความงาม ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผักพื้นบ้าน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสและอีลาสเตสด้วยวิธีวิเคราะห์ที่แตกต่างและหลากหลายในการศึกษาวิจัยในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ สำนักวิจัยและพัฒนา วิทยาลัยนครราชสีมา ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคณะสหเวชศาสตร์ วิทยาลัยนครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับทำวิจัย และขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่เพื่อใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการที่เสียสละเวลาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

เอกสารอ้างอิง

เกศศิณี ตระกูลทิวากร และ จันทร์เพ็ญ ศักดิ์สิทธิพิทักษ์. (2543). ศักยภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทย. *อาหาร, 30*(3), 164-178.

เกตุการ ดาจันทา, หทัยทิพย์ ร้องคำ, ทรงพรรณ สังข์ทรัพย์เปรม, นภา สีโสภา. (2562). ปริมาณสารประกอบฟีนอล ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของผักพื้นบ้านในจังหวัดพิษณุโลก. *แก่นเกษตร, 47 (ฉบับพิเศษ 1)*, 1541-1548.

คณาทิพย์ สิงห์สาย, อภิษฎา ศักดาวิโรจน์, กนกพิชญ์ เวชพาณิชย์กิจกุล, อสมาภรณ์หมุนสมัย, อภิษฎา ศักดาวิโรจน์. (2563). การเปรียบเทียบสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเอทานอลจากยอดอ่อน ใบ ผล และเมล็ดของกระถินไทย. *วารสารนเรศวรพะเยา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 13*(3), 66-73.

จำเนียร ชมภู, ธนพงศ์ ไกรพุฒ, สุนิสา อุยะตุง, ทศพล พรพรหม. (2563). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของผิวหนังของดอกวัชพืชในวงศ์ Asteraceae บางชนิด. *วารสารเกษตร, 36*(3), 301- 312.

บุญเลี้ยง สุพิมพ์, สุระเดช ไชยตอกเกี๊ย, จิตติมา พีรกมล, สุพรรณี พฤกษา. (2563). ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มน้ำผักสมุนไพร และผลไม้ เทศบาลตำบลนาอ้อ อำเภอเมือง จังหวัดเลย. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 25*(3), 968-982.

พนิดา แสนประกอบ. (2561). การศึกษาสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้านในจังหวัดร้อยเอ็ด. *วารสารวิชาการเกษตร, 36*(3), 293-301.

สมนึก พรมแดง, ลักขณา เบ็ญจวรรณ์, อุทัยวรรณ ด้วงเงิน. (2562). ปริมาณออกซาเลตและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผักโขม 12 สายพันธุ์. *แก่นเกษตร, 48(suppl.1)*, 1065-1072.

สัมพันธ์ สร้อยกล่อม. (2557). *ปริมาณสารโพลีฟีนอลและประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัด ผักโขม*. file:///C:/Users/dell/Downloads/ KC5201050.pdf.

Chen, H., Song, W., Sun, K.K.& Du, H.W. (2018). Structure elucidation and evaluation of antioxidant and tyrosinase inhibitory effect and mechanism of proanthocyanidins from leaf and fruit of *leucaena leucocephala*. *Journal of Wood Chemistry and Technology, 38*(6), 430-444.

Chiavaroli, A., Simone, S.C.D., Sinan, K.I, Ciferri, M.C., Flores, G.A., Zengin, G., Etienne, O.K., Ak, G., Mohamad Jugreet, F.M.S., Cziáky, Z., Jek, J., Recinella, L., Brunetti, L., Leone, S., Angelini, P., Menghini, R.V.L., Ferrante C. & Orlando, G. (2020). Pharmacological properties and chemical profiles of *passiflora foetida* l. extracts. *Novel Insights for Pharmaceuticals and Nutraceuticals. Processes, 8*, 1034. doi:10.3390/pr809103.

González-Mendoza, D., Grimaldo-Juárez, O., Soto-Ortiz, R., Escoboza-Garcia, F. & Hernández, J.F.S. (2010). Evaluation of total phenolics, anthocyanins and antioxidant capacity in purple tomatillo (*Physalis ixocarpa*) genotypes. *African Journal of Biotechnology, 9*(32), 5173-5176.

Insain, P. (2018). Inhibition of melanogenesis from Thai berries. *EAU Heritage Journal Science and Technology, 12*(2), 69-82.

Itoh, S., Yamaguchi, M., Shigeyama, K. & Sakaguchi, I. (2019). The anti-aging potential of extracts from *chaenomeles sinensis*. *Cosmetics, 6*, 21, doi:10.3390/cosmetics6010021.

Klinsoonthorn, N., Nutsatapana, C. & Mapradit, P. (2013). Prohibited substances in acne melasma whitening cosmetic products in lower central provinces during 2010-2013. *FDA Journal, 20*(3), 28-36.

Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y. & Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extract of seashore plant and identification of potent inhibitors from Garciniasubelliptica. *Japan Society for Bioscience Biotecnology and Agrochemistry, 69,* 197-201.

Mohd-Esa, N., Hern, F.S., Ismail, A. & Yee, C.L. (2010). Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chemistry, 122*, 1055-1060.

Nanasombat, S., Yansodthee, K. & Jongjaited, I. (2019). Evaluation of antidiabetic, antioxidant and other phytochemical properties of Thai fruits, vegetables and some local food plants. *Walailak J Sci & Tech, 16*(11), 851-866.

Oikarnin, A., Kallionen, M. (1989). A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun exposed and protected skin. *Photo-dermatology, 6*, 24-31.

Sivakumar, V., Evanjaline, M. & Ananthi, R.M. (2017). Determination of in vitro antioxidant activity of *Hydrocotyle javanica* Thumb whole plant extracts. *World Journal of Pharmaceutical Research, 6*(9), 824-836.

Soradech, S., Kusolkumbot, P. & Thubthimthed, S. (2018). Development and characterization of microemulsions containing *Tiliacora triandra* Diels as an active ingredient for antioxidant and melanogenesis stimulating activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science, 8*(3), 046-054.

Vallisuta, O., Nukoolkarn, V., Mitrevej, A., Sarisuta, N., Leelapornpisid, P., Phrutivorapongkul, A. & Sinchaipanid, N. (2014). In vitro studies on the cytotoxicity, and elastase and tyrosinase inhibitory activities of marigold (*Tagetes erecta* L.) flower extracts. *Experimental and therapeutic medicine, 7*, 246-250.

Wittenauer, J., Mackle, S., Submann, D., Schweiggert-Weisz, U., & Carle, R. (2015). Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. *Fitoterapia, 101*, 179-187.

Zaidi, K.U., Ali, S.A. & Ali, A.S. (2016). Effect of purified mushroom tyrosinase on melanincontent and melanogenic protein expression. *Biotechnology Research International, 2016*, 1-8.