

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากดอกเก๊กฮวยอินทรีย์เพื่อใช้ในเครื่องสำอาง
Biological Activity of Organic Flower Extract from *Chrysanthemum indicum* L.
for Cosmetic Application

สินีนานู ภูระยัย¹ ลภัสตรา มุ่งหมาย² เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน^{3,4} ณัฐวุฒิ หวังสมนึก¹ และดวงพร อมรเลิศพิศาล^{3,4*}
Sineenad Poorayab¹, Lapatrada Mungmai², Kriangsak Mengamphan^{3,4}, Nattawut Whangsomnuek¹
and Doungporn Amornlerdpison^{3,4*}

¹หลักสูตรสหวิทยาการเกษตร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000

³ศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านนวัตกรรมทางการเกษตรสำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

⁴คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

¹Interdisciplinary Agriculture Program, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

²Cosmetic Science, School of Pharmaceutical Sciences, University of Phayao, Phayao, Thailand 56000

³Center of Excellence in Agricultural Innovation for Graduate Entrepreneur, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

⁴Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

*Corresponding author: doungpornfishtech@gmail.com

Abstract

Received: September 03, 2019

Revised: November 21, 2019

Accepted: December 09, 2019

Chrysanthemum indicum L. contains bioactive compounds and widely produced as herbal drink in Asia. The value added of *C. indicum* flowers as cosmetic product is still rarely studies. This research aimed to evaluate the bioactive compound of organic *C. indicum* flower and their biological activities for anti-aging. The dried *C. indicum* flower were extracted with water and examined for content of biological compounds. The extract was evaluated anti-aging properties such as anti-oxidant, collagenase and tyrosinase inhibition activities. The aqueous extract of *C. indicum* consisted of total phenolic, flavonoid and quercetin contents which found to be 72.28 mgGAE, 16.54 mgQE and 402.47 mg/kg, respectively. The antioxidant activities showed that *C. indicum* can be used as a potent antioxidant via ABTS, DPPH and superoxide scavenging activities. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) were 0.22, 0.32 and 9.39 mg/ml, respectively. Furthermore, the extract inhibited collagenase and tyrosinase activities which presented 2.33 and 102.11 mg/ml, respectively. From this study showed that aqueous extract of organic chrysanthemum flowers are bioactive substances as antioxidants and protection of skin damage. In addition, value added of *C. indicum* flowers as a functional ingredient or cosmetic ingredient are alternative products and income for farmers and cosmetics entrepreneurs.

Keywords: *Chrysanthemum indicum*, bioactive compound, antioxidant, cosmetic ingredient

บทคัดย่อ

ดอกเก็กฮวยมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงได้รับความนิยมนำมาผลิตเป็นเครื่องสำอางสมุนไพรในแถบเอเชีย ส่วนการนำดอกเก็กฮวยมาเพิ่มมูลค่าเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางยังพบน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินสารชีวภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกเก็กฮวยอินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อการชะลอวัย โดยทำการสกัดดอกเก็กฮวยอินทรีย์แห้งด้วยน้ำและตรวจหาสารสำคัญ จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ชะลอวัย ได้แก่ ฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส และไทโรซิเนส ผลการทดลองพบว่า สารสกัดดอกเก็กฮวยอินทรีย์มีองค์ประกอบสำคัญของสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และเคอร์ซีติน เท่ากับ 72.28 mgGAE, 16.54 mgQE และ 402.47 mg/kg ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการขจัดอนุมูลอิสระเอปทีเอส ดีพีพีเอช และซูเปอร์ออกไซด์ โดยมีค่าการยับยั้งอนุมูลดังกล่าวได้ 50% (IC₅₀) เท่ากับ 0.22, 0.32 และ 9.39 mg/ml ตามลำดับ รวมทั้งยังสามารถยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนสและไทโรซิเนสได้ มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2.33 และ 102.11 mg/ml ตามลำดับ

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยน้ำจากดอกเก็กฮวยอินทรีย์เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพช่วยต้านอนุมูลอิสระและช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังได้ โดยการเพิ่มมูลค่าให้กับดอกเก็กฮวยอินทรีย์เป็นสารประกอบเชิงหน้าที่หรือใช้เป็นสารผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจะช่วยเพิ่มทางเลือกและรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เพาะปลูก รวมทั้งผู้ประกอบการด้านเครื่องสำอางอีกทางหนึ่ง

คำสำคัญ: เก็กฮวย สารชีวภาพ สารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบในเครื่องสำอาง

คำนำ

เก็กฮวย (*Chrysanthemum indicum* L.) เป็นดอกไม้ตระกูลเดียวกับเบญจมาศที่มีรายงานว่ามีสรรพคุณในการต้านการอักเสบ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นต้น โดยสารสำคัญที่พบในดอกเก็กฮวยมักเป็นสารประกอบฟีนอลิกในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ และเทอร์ปีนอยด์ เป็นต้น (Choi *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2005) นอกจากนี้ทางมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ จัดทำโครงการส่งเสริมการผลิตเก็กฮวยอินทรีย์ โดยการเก็บเกี่ยวผลผลิตดอกเก็กฮวย แต่นำเฉพาะส่วนดอกมาอบแห้งและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Rawdkhao, 2017) ซึ่งพบได้ทั่วไปตามท้องตลาด ส่วนการนำดอกเก็กฮวยมาเพิ่มมูลค่าเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางยังพบน้อยมาก อีกทั้งกระแสนิยมของชาวเอเชียเรื่องการมีผิวกระจ่างใส ดูอ่อนกว่าวัยมีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ตอบโจทย์ดังกล่าวจึงเป็นที่ต้องการของตลาด สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ลดการอักเสบ ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนส อิลาสเทส และไทโรซิเนส (Ribeiro *et al.*, 2015) จึงถูกนำมาพัฒนาในตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเป็นจำนวนมาก

การแก่ของผิวหนัง (Skin aging) เป็นการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่มีผลมาจากทั้งปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน เช่น อายุ การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน หรือการสัมผัสรังสียูวี เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลทำให้เกิดภาวะความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเมทริกซ์ เมทัลโลโปรตีนเอส (Matrix metalloproteinases, MMPs) เช่น คอลลาจิเนส (Collagenase, MMP-1) หรือ เจลาติเนส (Gelatinase, MMP-9) ทำให้เกิดการทำลาย

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันหรือส่วนที่ให้ความยืดหยุ่นกับผิวที่เรียกว่าอีซีเอ็ม (Extracellular matrix, ECM) ซึ่งได้แก่ คอลลาเจน และอีลาสติน เป็นต้น (Limtrakul *et al.*, 2016; Zakiah *et al.*, 2018) ส่งผลเกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ต่างๆ เกิดริ้วรอย ผิวแห้ง และขาดความชุ่มชื้น (Kanlayavattanukul, 2016) นอกจากนี้การสัมผัสกับรังสียูวียังเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินเพื่อป้องกันอันตรายจากรังสียูวี อีกนัยหนึ่งสภาวะที่มีการผลิตเม็ดสีเมลานินเป็นจำนวนมากมักส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีผิว หรืออาจเกิดกระ-ฝ้า (D'Orazio *et al.*, 2013) โดยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน คือ เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ทำหน้าที่เปลี่ยน L-tyrosine ให้กลายเป็น L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) จากนั้นออกซิเดชัน L-DOPA เป็น DOPA-quinone จนกระทั่งกลายเป็นเมลานิน (Zolghadri *et al.*, 2019) ดังนั้นสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของกระบวนการดังกล่าวจึงมีความสำคัญในการเป็นสารผสมในเครื่องสำอางบำรุงผิวเพื่อช่วยลดเลือนริ้วรอย ปรับสภาพผิวให้กระจ่างใส รวมถึงลดภาวะการหมักของผิวหรือผิวหนังเสื่อมสภาพก่อนวัยอันควรได้

ด้วยสาเหตุดังกล่าวงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มมูลค่าดอกเก็กฮวยอินทรีย์มาใช้เป็นสารชีวภาพในเครื่องสำอางบำรุงผิว โดยทำการประเมินปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพผิวของสารสกัดดอกเก็กฮวยอินทรีย์ ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะช่วยเพิ่มมูลค่าดอกเก็กฮวยอินทรีย์ที่มีผลผลิตเกินความต้องการของตลาดหรือคุณภาพตกเกรดให้มีมูลค่าเพิ่มจากการแปรรูปเป็นสารสกัดที่นำมาใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางบำรุงผิว

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดตัวอย่างดอกเก็กฮวยอินทรีย์

ตัวอย่างดอกเก็กฮวยอินทรีย์ทำการรับซื้อจากโครงการส่งเสริมการผลิตเก็กฮวยอินทรีย์มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ โดยนำดอกเก็กฮวยอินทรีย์แห้งปริมาณ 100 g มาทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในน้ำกลั่น ปริมาตร 4,000 ml ที่อุณหภูมิ 90°C นาน 60 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ทำการแยกตัวทำละลายออกด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน และทำให้แห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง

การทดสอบพิษเฉียบพลัน

1. สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Hammerschmidt and Pratt, 1978) วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยนำตัวอย่างสารสกัด 200 μ L ผสมร่วมกับ 10% Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 1,000 μ L และ 7.5% Na_2CO_3 ปริมาตร 800 μ L จากนั้นเขย่าและตั้งทิ้งไว้ 60 นาที เมื่อครบระยะเวลาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, OD) ที่ 765 nm ผลการทดลองทำการเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดแกลลิก และรายงานในรูปของ mg gallic acid equivalent/g extract (mg GAE/g extract)

2. สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Stanković, 2011) นำตัวอย่างสารสกัดที่ละลายด้วยเมทานอลปริมาตร 1,000 μ L ผสมร่วมกับ 2% AlCl_3 ปริมาตร 1,000 μ L จากนั้นเขย่าและตั้งทิ้งไว้ 60 นาที

และวัดค่า OD ที่ 415 nm ผลการทดลองทำการเปรียบเทียบกับค่า OD ของสารมาตรฐานเคอร์ซีตินและรายงานในรูปของ mg quercetin equivalent/g extract (mg QE/g extract)

3. สารเคอร์ซีติน ทำการตรวจวัดเคอร์ซีติน โดยการส่งตรวจวิเคราะห์ ณ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ ด้วย Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) ตามวิธีการอ้างอิงของ Peñarieta *et al.* (2007) โดยผลปริมาณเคอร์ซีตินรายงานในค่าของ mg/kg ของน้ำหนักสารสกัดแห้ง

การทดสอบฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์การขจัดอนุมูลเอปิตีเอส (Re *et al.*, 1999)

วิเคราะห์ฤทธิ์การขจัดอนุมูลเอปิตีเอส โดยเตรียมสารละลายอนุมูลด้วยการผสม ABTS (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) ความเข้มข้น 7 mM กับ 2.45 mM K₂S₂O₈ ในอัตราส่วน 1:0.5 โดยปริมาตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 12 ชั่วโมง และเจือจางให้มีค่า OD ที่ 734 nm เท่ากับ 0.7±0.5 ก่อนนำไปใช้งาน ในการทดลองนำตัวอย่างสารสกัด 200 µL (ชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น) ผสมกับสารละลายอนุมูลเอปิตีเอส 1,800 µL และตั้งทิ้งไว้นาน 6 นาที ทำการวัดค่า OD ที่ 743 nm เปรียบเทียบผลการทดลองกับสารมาตรฐาน Trolox โดยรายงานในรูปของ mg trolox equivalent antioxidant capacity/g extract (mg TEAC/g extract)

ฤทธิ์การขจัดอนุมูลดีฟิฟิเอซ (Mensor *et al.*, 2001)

ทำการวิเคราะห์ฤทธิ์การขจัดอนุมูลดีฟิฟิเอซ (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH*) โดยนำตัวอย่างสารสกัด 400 µL (ชุดควบคุมใช้เมทานอล) ผสมร่วมกับสารละลายดีฟิฟิเอซ (ความเข้มข้น 0.3 mM ในเมทานอล) ปริมาตร 2,000 µL จากนั้นเขย่าและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 20 นาที ทำการวัดค่า OD ที่ 517 nm และเปรียบเทียบผลการทดลองกับสารมาตรฐานกรด

แกลลิกโดยรายงานในรูปของ mg gallic acid equivalent antioxidant capacity (mg GEAC/g extract)

ฤทธิ์การขจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Nishikimi *et al.*, 1972)

วิเคราะห์ฤทธิ์การขจัดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ โดยทำการเตรียมสารละลายทั้งหมดใน 100 mM Phosphate buffer (pH 8) โดยนำตัวอย่างสารสกัด 100 µL (ชุดควบคุมใช้ Phosphate buffer) ผสมร่วมกับ 156 µM Nitrotetrazolium blue chloride (NBT) ปริมาตร 1,000 µL สารละลาย 468 µM NADH ปริมาตร 1,000 µL และ 60 µM Phenazine methosulphate (PMS) ปริมาตร 100 µL จากนั้นเขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้นาน 5 นาที ทำการวัดค่า OD ที่ 560 nm ผลการทดลองเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกเช่นเดียวกับอนุมูลดีฟิฟิเอซ

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส (Zakiah *et al.*, 2018)

ทำการวิเคราะห์ใน 96-well plate โดยเติมตัวอย่างสารสกัดที่ 50 µL (ชุดควบคุมใช้ Tricine buffer) ร่วมกับ 50 mM Tricine buffer (pH 7.5) และเอนไซม์คอลลาจิเนสจาก *Clostridium histolyticum* (type I) ความเข้มข้น 125 U/mL จากนั้นตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที และเติมซับสเตรท 0.5 mM FALGPA (N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-L-Leu-Gly-L-Pro-L-Ala) ปริมาตร 50 µL จากนั้นทำการวัดค่า OD ทันที ที่ 340 nm นาน 20 นาที และใช้ Epigallocatechin gallate (EGCG) เป็นสารมาตรฐาน

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (Masuda *et al.*, 2005)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome โดยเตรียมเอนไซม์ไทโรซิเนสจากเห็ด 200 U/mL และซับสเตรท L-DOPA (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine) ความเข้มข้น 2.5 mM ใน 20 mM

Phosphate buffer (pH 6.8) ทำการทดสอบใน 96-well plate โดยแต่ละหลุมประกอบด้วยตัวอย่างสารสกัด 20 μ L (ชุดควบคุมใช้ Phosphate buffer) ผสมกับสารละลายเอนไซม์ไทโรซิเนส 40 μ L และ phosphate buffer 140 μ L จากนั้นบ่มไว้นาน 10 นาที และเติมซับสเตรท L-DOPA ปริมาตร 40 μ L เพื่อเริ่มปฏิกิริยา จากนั้นบ่มอีกครั้งนาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองทำการวัดค่า OD ที่ 492 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader และใช้กรดโคจิกเป็นสารมาตรฐานประสิทธิภาพการขจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ (%Inhibition) ทำการคำนวณดังสมการ

Inhibition activity (%)

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

โดยที่ $Abs_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

ที่ปราศจากสารสกัด และ Abs_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงชุดทดลองที่เติมสารสกัด

ผลการวิจัย

การทดสอบทางพิษเคมีของสารสกัดเก็กฮวย

ดอกเก็กฮวยอินทรีย์อบแห้งถูกนำมาสกัดด้วยน้ำและทำให้แห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง พบว่าให้ปริมาณผลผลิตของสารสกัดเก็กฮวยมีค่าอยู่ในช่วง 33.00-45.00% เมื่อนำมาวิเคราะห์สารพิษเคมีในสารสกัดดอกเก็กฮวยพบว่าสารสกัดดอกเก็กฮวย 1 กรัม มีสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 72.28 mg GAE และ 16.54 mg QE ตามลำดับ โดยมีปริมาณเคอร์ซีตินเท่ากับ 402.47 mg/kg (Table 1)

Table 1 Phytochemical contents of organic *C. indicum* extract

Content	Total phenolic content (mg GAE/g extract)	Total flavonoid content (mg QE/g extract)	Quercetin (mg/kg)
<i>C. indicum</i>	72.28 $\pm$ 2.00	16.54 $\pm$ 0.12	402.47

Values were expressed as means $\pm$ standard deviation (n = 3).

ฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระ

ฤทธิ์การขจัดอนุมูลเอปิตีเอส

การทดสอบฤทธิ์การขจัดอนุมูลเอปิตีเอส อาศัยหลักการของสารสกัดมีการรีดักชันอนุมูลผ่านการให้อิเล็กตรอนทำให้อนุมูลที่มีสีเขียวน้ำเงินจางลง ผลการทดลองพบว่า สารสกัดดอกเก็กฮวยความเข้มข้น 0.10-0.50 mg/ml สามารถขจัดอนุมูลโดยมีค่า %Inhibition อยู่ในช่วง 26.92-97.61% (Figure 1A) เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับโทรลอคซ์ (อนุพันธ์ของวิตามิน E) พบว่ามีค่าเท่ากับ 156.41 mg TEAC/g extract และเมื่อพิจารณาค่า IC_{50} (ปริมาณสารสกัดดอกเก็กฮวยในการยับยั้งอนุมูลดังกล่าวได้ 50%) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.22 mg/ml (Table 2)

ฤทธิ์การขจัดอนุมูลดีฟิฟิเอซ

การทดสอบฤทธิ์การขจัดอนุมูลดีฟิฟิเอซอาศัยหลักการของสารสกัดมีการให้อะตอมของไฮโดรเจน ซึ่งจะทำให้อนุมูลดังกล่าวเปลี่ยนสีจากสีม่วงกลายเป็นสีเหลือง พบว่าสารสกัดดอกเก็กฮวยสามารถขจัดอนุมูลดีฟิฟิเอซโดยสารสกัดดอกเก็กฮวยความเข้มข้น 0.10-0.50 mg/ml มีค่า %Inhibition อยู่ในช่วง 17.16-68.04 % (Figure 1B) เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับกรดแกลลิกพบว่า มีค่าเท่ากับ 15.97 mg GEAC/g extract และเมื่อพิจารณาค่า IC_{50} พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.32 mg/ml (Table 2)

ฤทธิ์การจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดดอกเก๊กฮวยมีประสิทธิภาพในการจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระในกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (Reactive Oxygen Species; ROS) มีผลทำให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างของผิวผ่านการทำลายสาร

ชีวโมเลกุลต่างๆ ชนิดนี้ โดยพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 1.00-9.00 mg/ml มีค่า %Inhibition เท่ากับ 5.82-45.99 (Figure 1C) เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกพบว่ามีค่าเท่ากับ 138.28 mg GEAC/g extract และพบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.39 mg/ml (Table 2)

Table 2 Antioxidant capacities of organic *C. indicum* extract

Substance	ABTS assay		DPPH assay		Superoxide assay	
	IC_{50} (mg/ml)	mg TEAC/g extract	IC_{50} (mg/ml)	mg GEAC/g extract	IC_{50} (mg/ml)	mg GEAC/g extract
<i>C. indicum</i>	0.22 ± 0.00	156.41 ± 1.95	0.32 ± 0.00	15.97 ± 0.22	9.39 ± 0.98	138.28 ± 15.08
Trolox	0.04 ± 0.00	-	-	-	-	-
Gallic acid	-	-	0.05 ± 0.00	-	1.37 ± 0.05	-

Values were expressed as means $\pm$ standard deviation (n = 3).

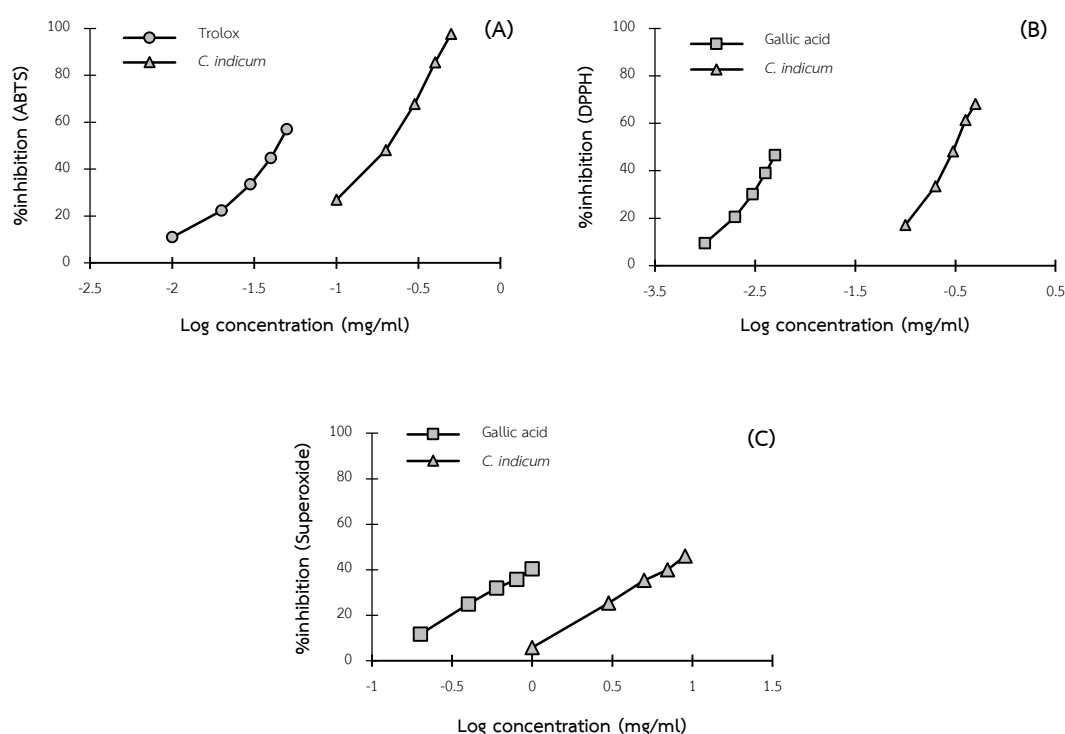


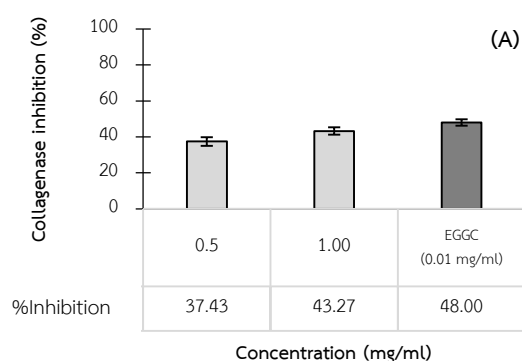
Figure 1 Antioxidant activity: ABTS (A), DPPH (B), and superoxide (C) radical scavenging activities organic *C. indicum* extract

Values were expressed as means $\pm$ standard deviation (n = 3).

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์

ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส

สารสกัดดอกเก๊กฮวยมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส โดยสารสกัดดอกเก๊กฮวยความเข้มข้น 1.00 mg/ml มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้เท่ากับ $43.27 \pm 2.05\%$ ส่วนสารมาตรฐาน EGCG ความเข้มข้น 0.01 mg/ml สามารถยับยั้งได้เท่ากับ $48.00 \pm 1.73\%$ (Figure 2A) ส่วนค่า IC_{50} ของสารสกัดดอกเก๊กฮวยพบว่ามีค่าเท่ากับ 2.33 ± 0.45 mg/ml



ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

สารสกัดดอกเก๊กฮวยสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้โดยที่ความเข้มข้น 100.00 mg/ml มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงที่สุดเท่ากับ $48.23 \pm 0.37\%$ ส่วนสารมาตรฐานกรดโคจิกที่ความเข้มข้น 1.00 สามารถยับยั้งได้ $79.33 \pm 0.69\%$ (Figure 2B) และเมื่อพิจารณาค่า IC_{50} ของสารสกัดดอกเก๊กฮวยพบว่ามีค่าเท่ากับ 102.11 ± 0.05 mg/ml

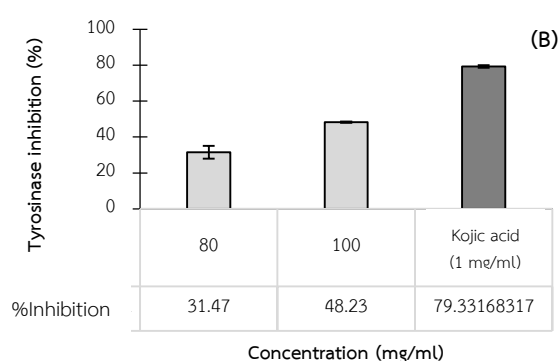


Figure 2 Effect of organic *C. indicum* on collagenase (A), and tyrosinase inhibition activities (B)

Values were expressed as means $\pm$ standard deviation (n = 3).

วิจารณ์ผลการวิจัย

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้รับจากพืชธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ โดยเฉพาะสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการใช้เป็นสารช่วยบำรุงผิวในเครื่องสำอาง เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ช่วยป้องกันผิวหนังจากอันตรายของรังสียูวี เป็นต้น (Ribeiro *et al.*, 2015; Anitha, 2012) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดดอกเก๊กฮวยอินทรีย์ตรวจสอบสารสำคัญกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีรายงานว่าฤทธิ์ทางต้านอนุมูลอิสระในการต้านการอักเสบ ป้องกันผิวจากรังสียูวี (Tungmunthum *et al.*, 2018) ป้องกันการเกิด Lipid oxidation ป้องกันการย่อย

สลายของคอลลาเจน เป็นต้น (Malinowska, 2013) นอกจากนี้ยังตรวจพบเคอร์ซีตินในสารสกัดดอกเก๊กฮวย ซึ่งมีคุณสมบัติในการช่วยปรับสภาพผิวให้กระจ่างใสโดยยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Choi and Shin, 2015) โดยพบว่าความเข้มข้น 5-50 μ M สามารถยับยั้งการสังเคราะห์เมลานินได้ดีในเซลล์ B16F10 Melanoma cells (Kim, 2012)

จากการศึกษาด้านฤทธิ์ชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อผิวในครั้งนี้พบว่า สารสกัดดอกเก๊กฮวยอินทรีย์มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบฤทธิ์การขจัดอนุมูลเอปิตีเอส ดีพีพีเอช และซูเปอร์ออกไซด์ โดยที่อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์จัดเป็นอนุมูลชนิดแรกในร่างกายที่มีบทบาทสำคัญในการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ อย่างรุนแรง โดยการสร้างอนุมูล

ในกลุ่ม ROS ชนิดอื่นๆ เช่น Singlet oxygen และอนุมูลไฮดรอกซิล (Sasikumar and Kalaisezhiyen, 2014) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแก่ของผิวหนังที่มีสาเหตุหลักมาจากภาวะความเครียดออกซิเดชัน ซึ่งเกี่ยวข้องับอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการช่วยป้องกันเซลล์จากภาวะดังกล่าว เช่น ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ชัดขวางปฏิกิริยาลูกโซ่ของออกซิเดชัน ซึ่งทำให้ช่วยชะลอหรือป้องกันการแก่ของผิวหนัง หรือการเสื่อมสภาพของผิวหนังได้ (Costa and Santos, 2017) ส่วนการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์พบว่าสารสกัดดอกเก๊กฮวยมีฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสที่จัดอยู่ในกลุ่ม MMPs ที่สามารถย่อยสลายคอลลาเจนทำให้ผิวหนังขาดความยืดหยุ่นและเกิดริ้วรอยได้ และพบว่าสารสกัดดอกเก๊กฮวยมีประสิทธิภาพสูงในยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับ Kim (2016) ที่พบว่าดอกเก๊กฮวยที่ทำการสกัดด้วยเอทานอลสามารถลดการแสดงออกของยีน *MMP1* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสลายของคอลลาเจนที่ถูกกระตุ้นด้วยภาวะความเครียดออกซิเดชัน และยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นเอนไซม์สำคัญในการสังเคราะห์เมลานิน ซึ่งสอดคล้องกับ Choi *et al.* (2016) ที่พบว่าเครื่องสำอางที่ผสมสารสกัดจากเก๊กฮวยที่ความเข้มข้น 0.5% สามารถลดเมลานินในอาสาสมัครได้

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสมุนไพรกำลังได้รับความนิยมในการใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางบำรุงผิวเพื่อช่วยลดเลือนริ้วรอย และปรับสภาพผิวให้กระจ่างใส เช่น ดอกและใบดาหลา (Whangsomnuek *et al.*, 2019) หนุ้าทะเล *Thalassia hempricii* (Zakiah *et al.*, 2018) ดอกดาวเรือง (Leelapornpisid *et al.*, 2014) ดอกราชพฤกษ์ (Limtrakul *et al.*, 2016) เป็นต้น และยังพบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชสมุนไพรยังมีความอ่อนโยน ปลอดภัย และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Soto *et al.*, 2015) จากผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้นพบว่า สารสกัดจากดอกเก๊กฮวยด้วยตัวทำละลายน้ำและ

เอทานอลมีฤทธิ์ชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อผิว ช่วยลดเลือนริ้วรอย และเพิ่มความกระจ่างใสให้ผิว อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้านประสิทธิภาพการชะลอวัยของสารสกัดดอกเก๊กฮวยในเซลล์เพาะเลี้ยงของผิวหนัง หรือในอาสาสมัครเพิ่มเติมเพื่อยืนยันประสิทธิภาพดังกล่าว

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดด้วยน้ำจากดอกเก๊กฮวยอินทรีย์ เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในการเป็นสารช่วยต้านอนุมูลอิสระ ช่วยยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนสที่เป็นสาเหตุที่ทำให้ผิวเสื่อมสภาพหรือเกิดริ้วรอย นอกจากนี้ยังสามารถปรับสภาพผิวให้กระจ่างใสโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานิน ผลจากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้กับดอกเก๊กฮวยอินทรีย์ เป็นสารประกอบเชิงหน้าที่นำไปเป็นสารผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Cosmetic ingredient) ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มทางเลือกและรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เพาะปลูกเก๊กฮวย รวมทั้งผู้ประกอบการด้านเครื่องสำอางอีกทางหนึ่ง นอกเหนือจากการนำไปทำผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางแบบเดิมๆ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาหน่วยวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการสร้างนวัตกรรมด้านการเกษตร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับทุนสนับสนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ และศูนย์ความเป็นเลิศทางด้านนวัตกรรมทางการเกษตรสำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Anitha, T. 2012. Medicinal plants used in skin protection. **Asian J Pharm Clin Res.** 5(2): 35-38.
- Cheng, W., J. Li, T. You and C. Hu. 2005. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linné. **J Ethnopharmacol** 101(1-3): 334-337.
- Choi, M.H. and H.J. Shin. 2015. Anti-melanogenesis effect of quercetin. **Cosmetics** 3(2): 18.
- Choi, K.T., J.H. Kim, H.T. Cho, S.S. Lim, S.S. Kwak and Y.J. Kim. 2016. Dermatologic evaluation of cosmetic formulations containing *Chrysanthemum indicum* extract. **J Cosmet Dermatol.** 15(2): 162-168.
- Costa, R. and L. Santos. 2017. Delivery systems for cosmetics—from manufacturing to the skin of natural antioxidants. **Powder Technol** 322: 402-416.
- D’Orazio, J., S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz and T. Scott. 2013. UV radiation and the skin. **Int J Mol Sci** 14: 12222-12248.
- Hammerschmidt, P.A. and D.E. Pratt. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **J Food Sci** 43(2): 556-559.
- Kanlayavattanakul, M. 2016. **Herbs for Cosmetics: Anti-Wrinkle.** Bangkok: Protex Press. 118 p. [in Thai]
- Kim, Y.J. 2012. Hyperin and quercetin modulate oxidative stress-induced melanogenesis. **Biol Pharm Bull.** 35(11): 2023-2027.
- _____. 2016. Extracts of *Chrysanthemum indicum* Linne mediated regulation of *MMP1* via JNK-AP1 pathway. **Asian J Beauty Cosmetol** 14(4): 399-405.
- Leelapornpisid, P., S. Chansakaow, S. Na-Boonlong and P. Jantrawut. 2014. Development of cream containing nanostructured lipid carriers loaded marigold (*Tagetes erecta* Linn) flowers extract for anti-wrinkles application. **Int J Pharm Pharm Sci** 6(5): 309-313.
- Limtrakul, P., S. Yodkeeree, P. Thippraphan, W. Punfa and J. Srisomboon. 2016. Anti-aging and tyrosinase inhibition effects of *Cassia fistula* flower butanolic extract. **BMC Complement Altern Med.** 16: 497.
- Malinowska, P. 2013. Effect of flavonoids content on antioxidant activity of commercial cosmetic plant extracts. **Herba Pol.** 59(3): 63-75.
- Masuda, T., D. Yamashita, Y. Takeda and S. Yonemori. 2005. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. **Biosci Biotechnol Biochem.** 69(1): 197-201.

- Mensor, L.L., F.S. Menezes, G.G. Leitão, A.S. Reis, T.C.D. Santos, C.S. Coube and S.G. Leitão. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res** 15(2): 127-130.
- Nishikimi, M., N.A. Rao, K. Yagi. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. **Biochem Biophys. Res Commun** 46(2): 849-854.
- Peñarrieta, J.M., J.A. Alvarado, B. Akesson and B. Bergenståhl. 2007. Separation of phenolic compounds from foods by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Revista Boliviana de Química** 24(1): 1-4.
- Rawdkhao, T. 2017. **Production promotion of organic *Chrysanthemum indicum* L.** 7 p. In Research Report. Chiang Mai: Maejo University. [in Thai]
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med** 26(9-10): 1231-1237.
- Ribeiro, A.S., M. Estanqueiro, M.B. Oliveira and J.M.S. Lobo. 2015. Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. **Cosmetics** 2(2): 48-65.
- Sasikumar, V. and P. Kalaisezhiyen. 2014. Evaluation of free radical scavenging activity of various leaf extracts from *Kedrostis foetidissima* (Jacq.) Cogn. **Biochem Anal Biochem** 3(2): 7.
- Soto, M., E. Falqué and H. Domínguez. 2015. Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. **Cosmetics** 2(3): 259-276.
- Stanković, M.S. 2011. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. **Kragujevac J. Sci** 33: 63-72.
- Tungmunthum, D., A. Thongboonyou, A. Pholboon and A. Yangsabai. 2018. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. **Medicines** 5(3): 93.
- Whangsomnuek, N., L. Mungmai, K. Mengamphan and D. Amornlerdpison. 2019. Efficiency of skin whitening cream containing *Etlingera elatior* flower and leaf extracts in volunteers. **Cosmetics** 6(3): 39.

Zakiah, K., E. Anwar and T. Nurhayat. 2018.

In-vitro evaluation of antioxidant activity
and anti-collagenase activity of
Thalassia hempricii as a potent
ingredients for anti-wrinkle cosmetics.
Pharmacogn J 10(4): 778-782.

Zolghadri, S., A. Bahrami, M.T.H. Khan, J. Munoz-

Munoz, F. Garcia-Molina, F. Garcia-
Canovas and A.A. Saboury. 2019.

A comprehensive review on tyrosinase
inhibitors. **Enzyme Inhib Med.**
Chem 34(1): 279-309.