เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

การศึกษาการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม

THE STUDY OF DISSOLUTION OF MANGIFERIN IN COSOLVENT SYSTEMS

ชนิกัณดา เทสสิริ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
พ.ศ. 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

การศึกษาการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม

THE STUDY OF DISSOLUTION OF MANGIFERIN IN COSOLVENT SYSTEMS

ชนิกัณดา เทสสิริ

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
เมื่อวันที่ 16 กรกฎาคม พ.ศ. 2564

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิดา อัศวพิชยนต์
ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

.....
รองศาสตราจารย์พวงแก้ว ลัคนทินพร
กรรมการ

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนี ชาญณรงค์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนี ชาญณรงค์
กรรมการ

.....
อาจารย์ ดร.ปารภัทร โศภารักษ์
ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล
กรรมการ

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทร์วิทยานุชิต
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

การศึกษาการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม

ชนิกัณดา เทสสิริ 596064
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ปวีณา ว่องตระกูล, Ph.D.,
สุนี ชาญณรงค์, Ph.D.

บทคัดย่อ

แมงจิเฟอรินเป็นโพลีฟีนอลของ ซี-ไกลโคซิลแซนโธน ที่มีค่าการละลายน้ำต่ำ ในการศึกษานี้มีการสกัดสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปลูกในจังหวัดสมุทรปราการ ได้ผลผลิตได้ร้อยละ 3.17 มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 94.24 (วิเคราะห์ด้วย HPTLC) จากการหาค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายบริสุทธิ์ ได้ผลเรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ อิท็อกซี่ไดไกลคอล ไดเมทิลไอโซซอร์ไบด์ โพลิเอทิลีนไกลคอล 400 โพลิเอทิลีนไกลคอล 600 โพรพิลีนไกลคอล ไดโพรพิลีน-ไกลคอล กลีเซอรีน ไอโซเพนทิลไดออล เมทานอล เอทานอลและน้ำ การผสมตัวทำละลายเหล่านี้ในน้ำ สามารถเพิ่มค่าการละลายของแมงจิเฟอรินได้ แบบจำลองค่าการละลายแบบล็อก-เชิงเส้นของระบบตัวทำละลายร่วม ได้ถูกนำมาใช้คำนวณหา สัดส่วนโดยปริมาตรของตัวทำละลาย เพื่อใช้ละลายแมงจิเฟอรินที่มีความเข้มข้นสูงเป็น 20 เท่าของค่า IC_{50} ที่ต้านอนุมูล DPPH ตำรับโทนเนอร์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประกอบด้วยสารสกัดแมงจิเฟอรินร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก และประกอบด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล 600 หรือไดโพรพิลีนไกลคอล ร้อยละ 40 โดยน้ำหนักเพื่อทำหน้าที่เป็นสารช่วยละลาย ตำรับที่เตรียมขึ้นถูกนำมาประเมินค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าความหนืด ค่าการต้านอนุมูลอิสระ และความคงตัว ผลการศึกษาพบว่าโทนเนอร์ทั้งสองตำรับ มีความคงตัวดี มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง และมีลักษณะทางกายภาพที่ดี เมื่อเก็บไว้นาน 8-16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และ 45±2 องศาเซลเซียส

คำสำคัญ: ใบมะม่วง แมงจิเฟอริน ตัวทำละลายร่วม สารต้านอนุมูลอิสระ

THE STUDY OF DISSOLUTION OF MANGIFERIN IN COSOLVENT SYSTEMS

CHANIKANDA TESSIRI 596064

MASTER OF SCIENCE (COSMETIC SCIENCE)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PAVEENA WONGTRAKUL, Ph.D.,

SUNEE CHANNARONG, Ph.D.

ABSTRACT

Mangiferin, a polyphenol of C-glycosylxanthone, it has poor aqueous solubility. In this study, the extract of mangiferin from the leaves of Nam Dok Mai mango planted in Samut Prakan. The extraction yield of mangiferin obtained from the leaves was 3.17% with 94.24% purity (HPTLC analysis). The solubility of mangiferin in the studied pure solvents arranging in descending order were ethoxydiglycol, dimethyl isosorbide, polyethylene glycol 400, polyethylene glycol 600, propylene glycol, dipropylene glycol, glycerin, isopentyldiol, methanol, ethanol and water. The addition of these solvents in water could increase the solubility of mangiferin. The log-linear solubility model for the cosolvent system was used to calculate the volume fractions of the selected solvents, which were needed to solubilize mangiferin content at the twenty times of the IC_{50} against DPPH radicals. Antioxidant toners contained 0.5% w/w of mangiferin and 40% w/w of polyethylene glycol 600 or dipropylene glycol as a solubilizer were formulated. The products were then evaluated for the pH, viscosity, antioxidant activity and stability. The results showed that both toner formulations exhibited good stability, retained high antioxidant activity and were physically stable for 8-16 weeks at 30±2 ℃ and 45±2 ℃.

Keywords: Mango leaves, Mangiferin, Cosolvent, Antioxidant

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนี ชาญณรงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งได้ให้คำแนะนำ ข้อชี้แนะ แนวทางการทำวิจัย และให้ความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ เป็นอย่างมาก รวมทั้งเป็นกำลังใจ จนวิทยานิพนธ์นี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิดา อัศวพิชยนต์ ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ รองศาสตราจารย์พวงแก้ว ลัคนทินพร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนี ชาญณรงค์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำ แนวคิดและข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัย จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ และอาจารย์ ดร.ปารภัทร โศภารักษ์ ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ตลอดจนผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทร์วิทยานุชิต คณบดีคณะเภสัชศาสตร์ ที่ช่วยให้การดำเนินงานต่าง ๆ ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะเภสัชศาสตร์ ทุกท่านที่กรุณาอำนวยความสะดวก สนันสนุนจัดเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง ทำให้การดำเนินการทดลองเป็นไปด้วยความสะดวกและสำเร็จลงด้วยดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณมารดา ที่ให้กำลังใจ ตลอดจนให้การสนับสนุนการศึกษาคอยช่วยเหลือด้านต่าง ๆ จนเสร็จสิ้น

ชนิกัณดา เทสสิริ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญแผนภูมิ	ฌ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.5 สมมติฐานการวิจัย	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 มะม่วง	4
2.2 การสกัดสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้	6
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 วัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	10
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	11
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	12
3.3.1 การเตรียมตัวอย่างใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้	12
3.3.2 การเตรียมสารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้	12
3.3.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ สารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยวิธี ยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer)	13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญในสารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี [Thin layer chromatography (TLC)] 16

3.3.5 การวิเคราะห์หาแมงจิเฟอรินในสารสกัดใบมะม่วงด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง [High Performance Thin Layer Chromatography: HPTLC)] 17

3.3.6 การยืนยันชนิดและความบริสุทธิ์ของสารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตมิเตอร์ 18

3.3.7 การหาค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย 19

3.3.8 การหาค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม 21

3.3.9 การหาค่าพีเอชของสารละลายแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม 23

3.3.10 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแมงจิเฟอรินโดยใช้ ABTS 23

3.3.11 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแมงจิเฟอรินโดยใช้ DPPH 27

3.3.12 การเตรียมตำรับโทนเนอร์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดแมงจิเฟอริน 31

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วง 35

4.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์สารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยวิธี ยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer) 38

4.3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญในสารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี่ [Thin layer chromatography (TLC)] 42

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดใบมะม่วงด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography: HPTLC) 44

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 การยืนยันชนิดและความบริสุทธิ์ของสารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตมิเตอร์	46
4.6 การหาค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย	48
4.7 การหาค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม	50
4.8 การศึกษาความคงตัวของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย	53
4.9 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแมงจิเฟอริน	54
4.10 การพัฒนาตำรับเครื่องสำอางในรูปแบบโทนเนอร์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดแมงจิเฟอริน	61
4.11 การศึกษาความคงตัวทางกายภาพแบบสภาวะสลับอุณหภูมิ (temperature cycling condition)	65
4.12 การศึกษาความคงตัวของตำรับโทนเนอร์ ในสภาวะต่าง ๆ	66
4.13 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับโทนเนอร์	69
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปลายผล ข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	71
5.2 อภิปรายผล	72
5.3 ข้อเสนอแนะ	74
บรรณานุกรม	75
ภาคผนวก	79
ประวัติผู้เขียน	82

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเตรียมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ	14
2	การเตรียมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ	20
3	อัตราส่วนตัวทำละลายร่วม	22
4	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ	24
5	การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ	25
6	การเตรียมสารละลายสารสกัดแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ	26
7	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ	28
8	การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ	29
9	การเตรียมสารละลายสารสกัดแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ	30
10	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน แมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ	33
11	ความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร	39
12	เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสารแมงจิเฟอรินและความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์	41
13	ปริมาณร้อยละของสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้เทียบกับสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน	46
14	ค่าความมีขั้วของตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษา	48
15	ค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายต่าง ๆ ณ อุณหภูมิ 27.50$\pm$2.12 องศาเซลเซียส	49
16	ค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอริน ในตัวทำละลายร่วมกับน้ำ ณ อุณหภูมิ 27.50$\pm$2.12 องศาเซลเซียส	51
17	สมการของ YALKOWSKY ของระบบตัวทำละลายร่วมต่าง ๆ และ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการ	52
18	ค่า IC_{50} เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแมงจิเฟอรินและสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานแอสคอร์บิคแอซิด และ โทรลอกซ์	61
19	ความคงตัวทางกายภาพของสูตรที่ 5 ที่ประกอบด้วยสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม ที่ 8 สัปดาห์	62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
20	ปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอรินที่เหลืออยู่ ในสูตรตำรับที่ 5 เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 8 สัปดาห์	67
21	ความคงตัวทางกายภาพของสูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม ที่ 16 สัปดาห์	67
22	ร้อยละปริมาณแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม ในตัวทำละลาย polyethylene glycol 600 ที่ 16 สัปดาห์	68
23	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผลิตภัณฑ์โทนเนอร์สูตรที่ 5 ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์	69
24	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผลิตภัณฑ์โทนเนอร์สูตรที่ 6 ที่ระยะเวลา 16 สัปดาห์	69
25	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผลิตภัณฑ์โทนเนอร์สูตรที่ 6 เมื่อเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 16 สัปดาห์	70

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่		หน้า
1	ยูวีสเปคตรัมของสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินกับสารสกัดแมงจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 5.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	38
2	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน แมงจิเฟอรินช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1.08-12.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	40
3	การแยกสารสกัดแมงจิเฟอริน สารมาตรฐานแกลลิคแอซิด และ สารมาตรฐานคาเทชิน บนแผ่นซิลิกาอลูมิเนียม โดยใช้ mobile phase ชนิดที่ 1	43
4	การแยกสารสกัดแมงจิเฟอริน สารมาตรฐานแกลลิคแอซิด สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และ สารมาตรฐานคาเทชินบนแผ่นซิลิกาอลูมิเนียม โดยใช้ mobile phase ชนิดที่ 2	43
5	การแยกสารสกัดแมงจิเฟอรินแถบที่ 1, 2, 3 และ สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน แถบที่ 7, 8, 9 ด้วย HPTLC บนแผ่นซิลิกาอลูมิเนียม โดยใช้ mobile phase ชนิดที่ 2	44
6	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และ สารสกัดแมงจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	45
7	โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และ สารสกัดแมงจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	47
8	ความสัมพันธ์ของค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย ร่วมกับสัดส่วนโดยปริมาตรของตัวทำละลายตามสมการ log-linear model	52
9	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดแมงจิเฟอรินที่เหลืออยู่ ในตัวทำละลายต่าง ๆ กับ ระยะเวลา	53
10	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับ ความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดแมงจิเฟอริน	55
11	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิคแอซิด	56

สารบัญแผนภูมิ (ต่อ)

แผนภูมิที่		หน้า
12	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์	57
13	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง อนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดแมงจิเฟอริน	58
14	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิคแอซิด	59
15	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS กับ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์	60

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของแมงจิเฟอริน	2
2	มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้	5
3	การสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด	7
4	ใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้	36
5	ใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ผ่านการอบแห้ง	36
6	ผงใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้	36
7	สารสกัดแมงจิเฟอรินตกตะกอนอยู่ในชั้นไดคลอโรมีเทน	37
8	สารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้	37
9	ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ทั้ง 6 สูตร	65
10	ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์สูตรที่ 1 และสูตร 6 ที่ผ่านสภาวะสลับอุณหภูมิ	66
11	ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์สูตรที่ 5 ที่ประกอบด้วยสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม ที่เก็บไว้เป็นเวลา 8 สัปดาห์	67
12	ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์สูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม ที่เก็บไว้เป็นเวลา 16 สัปดาห์	68

บทที่ 1

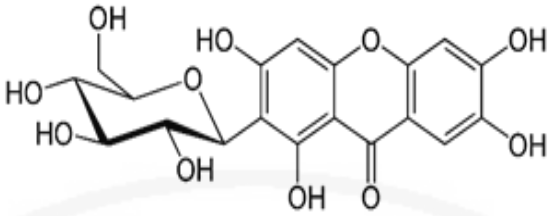
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ด้วยประเทศไทย เป็นประเทศที่มีสภาวะอากาศร้อนมีผลไม้ที่เป็นผลไม้พื้นเมืองหลายชนิด เช่น มะม่วง ซึ่งมีทั้งภาคกลาง ภาคอีสานและภาคเหนือ เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่านอกจากการรับประทานผลมะม่วงแล้ว การนำส่วนอื่น ๆ ของต้นมะม่วงมาทำให้เกิดประโยชน์ เช่น การนำใบมะม่วงมาสกัดหาปริมาณสารสำคัญ “แมงจิเฟอริน (mangiferin)” ซึ่งเป็นสารแซนโทน (xanthone)[1] ที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีรายงานสรรพคุณต้านการอักเสบ[2] ต้านเบาหวาน[3] ต้านไวรัส[4] ต้านอนุมูลอิสระ[5] ทั้งเป็นสารที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย [6] เป็นต้น และจากคุณสมบัติดังกล่าว จึงมีการนำแมงจิเฟอรินมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ยา และเครื่องสำอาง อาทิ ผลิตภัณฑ์ชะลอความแก่ ลดเลือนริ้วรอย ในการเตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางพบว่า สารแมงจิเฟอรินมีปัญหาด้านการละลาย เนื่องจากมีค่าการละลายต่ำ โดยมีค่าการละลายในน้ำ เท่ากับ 165 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวทำละลายอินทรีย์ อาทิ อะซิโตน เท่ากับ 51 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมทานอล เท่ากับ 346 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปิโตรเลียมอีเทอร์ เท่ากับ 11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร [7] ประกอบกับจังหวัดสมุทรปราการมีการปลูกมะม่วงเป็นจำนวนมาก โดยในแต่ละปีมีการทิ้งใบมะม่วงเป็นจำนวนมาก เพื่อนำสิ่งที่ไม่ใช้มาทำให้เกิดประโยชน์ จึงนำใบมะม่วงมาสกัดแมงจิเฟอริน และทำการศึกษาเพื่อเพิ่มค่าการละลายของแมงจิเฟอริน เพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์ของสารสกัดแมงจิเฟอรินเพิ่มขึ้น

แมงจิเฟอรินมีชื่อเคมีคือ 1, 3, 6, 7-tetrahydroxyxanthone C_2-β- D-glucoside มีสูตรทางเคมีคือ $C_{11}H_{18}O_{11}$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 422.3 กรัมต่อโมล[8] เป็นสารที่มีค่าการละลายในน้ำต่ำ จึงก่อให้เกิดปัญหาในการเตรียมผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับทาผิวหนัง หากต้องการให้สารสำคัญออกฤทธิ์ได้ดี สาระสำคัญต้องละลายหรือกระจายตัวได้อย่างสม่ำเสมอในตำรับ

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของแมงจิเฟอริน



ที่มา: Luo และคณะ 2012[9]

ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาการสกัดแยกแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ จากจังหวัดสมุทรปราการ เพื่อหาปริมาณของสารแมงจิเฟอรินในใบมะม่วงน้ำดอกไม้ แล้วจึงนำแมงจิเฟอรินที่สกัดแยกได้มาศึกษาการละลายในตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสกัดและแยกสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้
2. เพื่อศึกษาหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินที่สกัดได้จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดยูวี-วิสิเบิล (UV-VIS spectrophotometer)
3. เพื่อศึกษาการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายต่าง ๆ และระบบตัวทำละลายร่วม
4. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของแมงจิเฟอรินที่เกี่ยวข้องกับวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader)
5. เพื่อตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ประกอบด้วยสารสกัดแมงจิเฟอริน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงปฏิบัติการเพื่อสกัดแยกแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ โดยการสกัดด้วยวิธีการหมักใบมะม่วงในตัวทำละลายที่เหมาะสมและทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี open column chromatography จากนั้นทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารแมงจิเฟอรินด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดยูวี-วิสิเบิล เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารแมงจิเฟอริน การศึกษาหาค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายต่าง ๆ รวมถึงการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของสารแมงจิเฟอรินเพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การศึกษาระบบตัวทำละลายช่วยเพิ่มการละลายของสารแมงจิเฟอริน

2. จากการทำวิจัยหาค่าการละลายแมงจิเฟอริน ในตัวทำละลายที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ทำให้ได้ค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในเครื่องสำอางเพิ่มขึ้น

1.5 สมมติฐานการวิจัย

1. ระบบตัวทำละลายร่วมสามารถทำให้ค่าการละลายของสารแมงจิเฟอรินสูงกว่าค่าการละลายในน้ำ

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะม่วง

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะม่วงในประเทศไทยมีการปลูกเป็นจำนวนมากถึงกว่า 170 สายพันธุ์[10] มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ประกอบด้วย ราก ลำต้น ผล และใบ ซึ่งใบเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ของต้นมะม่วง เพื่อทำให้ใบมะม่วงซึ่งมีจำนวนมากไม่ร่วงทิ้งไปโดยเปล่าประโยชน์ ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดสกัดสารสำคัญซึ่งคือแมงจิเฟอริน ออกจากใบมะม่วง ซึ่งเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว (simple leaf) มีลักษณะดังนี้

ใบมะม่วง[11]

รูปทรงยาว มีปลายทรงแหลม (lanceolate) หรือทรงรี (elliptic) แผ่นใบหนา ขนาดใบยาว 15-45 เซนติเมตร กว้าง 3-30 เซนติเมตร ก้านใบยาวเรียว 25-13 มิลลิเมตร ใน 1 ปีมีการผลัดใบประมาณ 3 ครั้ง

ครั้งที่ 1 ระหว่างเดือน กุมภาพันธ์ – มีนาคม

ครั้งที่ 2 ระหว่างเดือน เมษายน – พฤษภาคม

ครั้งที่ 3 ระหว่างเดือน สิงหาคม – พฤศจิกายน

โดยในหนึ่งปีแต่ละเดือนต้นมะม่วงจะมีการจัดการ ดังนี้

มกราคม แทงช่อดอก ดอกบาน

กุมภาพันธ์ ผสมเกสร

มีนาคม ผลเจริญเติบโต

เมษายน เปลือกเมล็ดเริ่มแข็ง เรียกช่วงนี้ว่า ฤดูกาล เก็บผลมะม่วง

พฤษภาคม ถึง กรกฎาคม เป็นช่วงตัดแต่งกิ่ง

สิงหาคม ถึง พฤศจิกายน กิ่งเจริญเติบโตเต็มที่

ธันวาคม เริ่มออกช่อดอก

ภาพที่ 2 มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

ที่มา: รัตนะ สุวรรณเลิศ (2562) [12]

ด้วยมะม่วงน้ำดอกไม้มีการปลูกกันมากนิยมรับประทานสุก ทรงผลอูมรี หัวใหญ่ปลายแหลม ผลอ่อนสีเขียว ผลสุกผิวเหลืองนวล ขนาดผลเฉลี่ย 340 กรัมต่อผล ขนาดความกว้าง 7.29 เซนติเมตร ยาว 14.73 เซนติเมตร เก็บเกี่ยวเมื่ออายุได้ 100 วัน นับแต่วันที่ดอกบานเต็มที่ มีชื่อสามัญ mango, mango tree ชื่อเรียกอื่น ๆ มะม่วงบ้าน มะม่วงสวน หมักโม่ง หมากม่วง ลูกม่วง ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Managifera indica* Linn. วงศ์ Anacardiaceae[13]

2.1.2 ประโยชน์และสรรพคุณทางยาของมะม่วง [14]

ใบมะม่วง	ประมาณ 15 ใบ ช่วยรักษาโรคเบาหวาน อาการลำไส้อักเสบเรื้อรัง โดยนำมาล้างให้สะอาด แล้วนำมาต้มในน้ำสะอาด 1 ถ้วย โดยใช้ไฟอ่อน ๆ นาน 1 ชั่วโมง ถ้าน้ำแห้งก็เติมเรื่อย ๆ เมื่อเสร็จแล้วนำมาตั้งทิ้งค้างคืนไว้ 1 คืน พอเช้าก็นำมากรองเอาแต่น้ำ ดื่มติดต่อกันประมาณ 3-4 วัน หรือ ใบมะม่วงสด ล้างให้สะอาดแล้วนำมาตำ ใช้เป็น ยาสมานแผลสด ด้วยการใช้ทาบริเวณที่เป็นแผล
เปลือกลำต้น	เมื่อนำมาต้มรับประทานช่วยแก้โรคคอตีบ เยื่อปากอักเสบ จมูกอักเสบ แก้ไข้ตัวร้อน
ผลสดมะม่วงแก่	ช่วยแก้อาการวิงเวียนศีรษะ คลื่นไส้อาเจียน อาการกระหายน้ำ ร้อนใน และช่วยสำหรับการย่อยอาหารและเผาผลาญพลังงาน แก้อาการบิด ถ่ายเป็นเลือด

คุณค่าทางโภชนาการ มะม่วงดิบ 100 กรัม ประกอบด้วย

- พลังงาน 60 กิโลแคลอรี
- คาร์โบไฮเดรต 15 กรัม
- น้ำตาล 13.7 กรัม

2.2 การสกัดสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้

2.2.1 เทคนิคการสกัด (extraction)

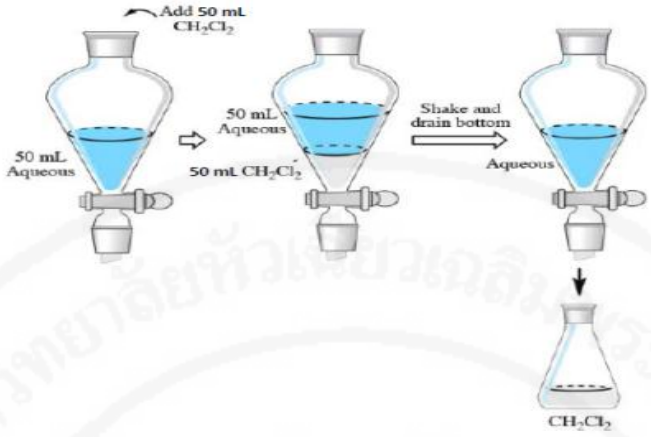
การสกัดเป็นวิธีการที่แยกองค์ประกอบสารสำคัญทางเคมีที่ต้องการออกจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ ซึ่งแบ่งวิธีการสกัดในรูปแบบของการสกัดทางกายภาพได้ดังนี้

1) การสกัดด้วยตัวทำละลายของเหลว (liquid-liquid extract) คือ การสกัดที่มีลักษณะเป็นของเหลว ด้วยการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งต้องมีความสามารถละลายสารออกฤทธิ์ที่ต้องการสกัดมากที่สุดและไม่ทำการละลายสารที่เป็นองค์ประกอบอื่น หรือละลายได้น้อยมาก ๆ โดยพิจารณา[15]

1.1) คุณสมบัติความมีขั้ว ถ้าสารสำคัญที่จะสกัดมีขั้ว ตัวที่นำมาเป็นตัวทำละลาย (solvent) จะต้องเหมือนกันจึงจะละลายกันและกัน เพราะถ้าสารมีขั้วกับไม่มีขั้วมาผสมกัน จะเกิดการแยกชั้น เช่น น้ำมันพืชเป็นสารประเภทไม่มีขั้ว มาผสมกับน้ำซึ่งเป็นสารชนิดมีขั้ว จะแยกชั้นไม่สามารถละลายเข้ากันได้ ตามหลักเกณฑ์ “like dissolve like” โดยสารมีขั้วจะละลายได้ดีในน้ำเพราะมีความมีขั้ว โดยสามารถแบ่งความมีขั้วของสารได้ดังนี้ น้ำ เมทธานอล อะซิโตไนไตรล์ อะซิโตน เอทธิลอะซิเตต ไดคลอโรมีเทน และถ้าความมีขั้วของตัวทำละลายใกล้เคียงกันหรือเท่ากันให้พิจารณาที่จุดเดือด (boiling point) เป็นลำดับต่อไปโดยเลือกจุดเดือดต่ำก่อน เป็นต้น

1.2) การตกผลึกแยกส่วน[16] เป็นการเลือกตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ หรือเปลี่ยนคุณสมบัติตัวทำละลายเป็นกรด หรือ ด่าง ทำให้การละลายของสารสกัดที่ต้องการสกัดเปลี่ยน เกิดการตกผลึกออกมา ตัวอย่างตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) กับน้ำ กระบวนการนี้ชั้นน้ำจะแยกจากตัวทำละลายอินทรีย์ โดยแยกสารสกัดที่ต้องการ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่หนาแน่นกว่าน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์จึงอยู่ในส่วนของเหลวด้านล่าง

ภาพที่ 3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด



ที่มา: Chemistry libretexts (2020)[16]

2) การสกัดแบบกึ่งของแข็ง (semi-solid extracts หรือ soft and dry extract) เป็นการสกัดที่ได้สารสกัดเหลว แล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดที่เข้มข้นขึ้น

3) การสกัดของแข็ง (solid extracts หรือ powdered extract) การสกัดด้วยวิธีการนี้ต้องดำเนินการ ตาม 1) หรือ 2) ก่อน แล้วจึงนำมาทำให้เป็นผงแห้งต่อไป

2.2.2 การทำสารสกัดแมงจิเฟอรินให้บริสุทธิ์ (purification of mangiferin)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง งานวิจัยที่ทำการศึกษาแมงจิเฟอรินที่ได้จากการสกัดใบมะม่วงมีหลากหลายประเด็น ทั้งการศึกษาคุณสมบัติพื้นฐาน เช่น คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ตลอดจนถึงการศึกษาประโยชน์และฤทธิ์ของสารสกัดแมงจิเฟอริน ดังภาพรวมต่อไปนี้

Acosta และคณะ (2016)[17] ได้ทำการวิเคราะห์วัดหาค่าการละลายของแมงจิเฟอรินโดยใช้เทคนิคการสกัดด้วยตัวทำละลาย และปั่นกวนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เหวี่ยงตกตะกอน นำส่วนใสวัดหาค่าการละลาย โดยมุ่งเน้นเลือกเตรียมตัวทำละลายที่ใช้ในอุตสาหกรรม biopharmaceutical ได้แก่ เมทานอล เอทานอล ไดเอธิลอีเธอร์ อะซิโตน เฮกเซน และน้ำ ในอัตราส่วน 1 กรัมแมงจิเฟอรินต่อ 100 กรัมของตัวทำละลาย ในสภาวะอุณหภูมิทำละลาย ที่แตกต่างกัน 5, 15, 30, 40, 50, 60 องศาเซลเซียส และพิสูจน์เอกลักษณ์แมงจิเฟอรินโดยใช้หลักการแยกสารรบกวน ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) และ Ultraviolet spectrometry ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร การศึกษาพบว่า อุณหภูมิมีผลต่อค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายต่าง ๆ โดยเอทานอลเป็นตัวทำละลายแมงจิเฟอรินได้ดี

ที่สุด ส่วนตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น acetone, n-hexane และ diethyl ether สามารถละลายแมงจิเฟอรินได้น้อยทุกสภาวะอุณหภูมิที่ทำการศึกษา

อรัญญา จุติวิบูลย์สุข และ ชาญชัย สาดแสงจันทร์ (2010)[18] ศึกษาสารสกัดใบมะม่วงสามสายพันธุ์ ด้วยการหมักด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ คือ เมทานอล เอทานอล และ 70% อะซิโตน ในน้ำ และทำการแยกสารสำคัญแมงจิเฟอรินออกจากสารสกัดหยาบ ด้วยการตกผลึกในไดคลอโรมีเทน ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน ผลการศึกษาพบว่า มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้เมื่อสกัดด้วยการหมักในเมทานอลจะให้ปริมาณสารสกัดหยาบสูงที่สุด โดยสามารถแยกสารสกัดแมงจิเฟอริน ได้ถึง 2.80 กรัมต่อใบมะม่วง 100 กรัม

วิไลพรรณ ลีปรีชานนท์ (2558)[19] ได้ศึกษาการเตรียมและการตรวจสอบปริมาณสารแมงจิเฟอรินของสารสกัดจากใบมะม่วงและในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยการเตรียมสารสกัดเป็นการเตรียมด้วยเทคนิคการใช้ตัวทำละลายสกัด คือ 85% เอทานอล ใช้วิธีสกัดแยกสารสำคัญออกจากใบมะม่วงด้วยการหมัก (maceration) และทำการแยกสารรบกวนด้วยการใช้ของเหลว 2 ชนิด คือ 50% เอทานอล และ ไดคลอโรมีเทน จากนั้นทำการวิเคราะห์ สารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยเทคนิครงคเลขผิวบางแบบแบบสมถรรนะสูง (High Performance Thin layer Chromatography: HPTLC) เทียบกับสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ ethyl acetate: acetone: formic acid: water การศึกษาพบปริมาณแมงจิเฟอรินร้อยละ 97.75$\pm$0.52 เมื่อนำสารสกัดที่ได้ผสมลงในตำรับที่ pH 5.78-6.13 ไม่เกิดการแยกชั้น พบว่าตำรับมีความคงตัวทางกายภาพ เนื้อโลชั่นสีขาวเนียน มีการกระจายตัวดี ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.27$\pm$1.01 ระยะเวลา 4 เดือน ไม่พบการตกตะกอนของสารสกัดแมงจิเฟอริน

Ramirez และคณะ (2016)[20] ได้ทำการสกัดแมงจิเฟอรินและศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและการประเมินคุณภาพประสาทสัมผัสจากชาแมงจิเฟอร่า ซึ่งในการวิจัยนี้ผู้วิจัยได้แบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วน คือ ศึกษาสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงยังไม่แก่ และ ศึกษาสกัด แมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงแก่ ด้วยทำละลายที่ใช้ในการสกัด คือ น้ำ และใช้วิธีการสกัดที่แตกต่างกันเพื่อหาสภาวะวิธีการสกัดที่เหมาะสม โดยเลือกวิธีการสกัดด้วยกัน 3 วิธี ดังนี้

- การสกัดด้วยความร้อน (Decoction) คือ การต้ม
- การสกัดการแช่ (Infusion) คือ การสกัดที่ใช้เวลาในการสกัดเพื่อให้ตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงใบมะม่วง

- การสกัดแบบอัลตราซาวด์ (Ultrasound) เป็นการสกัดโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ทำให้เกิดการแพร่ของตัวทำละลายซึมเข้าสู่ผนังเซลล์ เกิดการดูดน้ำและพองขึ้น ทำให้การสกัดได้เร็วขึ้น จากวิธีการสกัดมีการใช้ตัวทำละลายที่ปริมาตรต่าง ๆ กัน คือ 0.05, 0.0250, 0.0125 กรัมต่อมิลลิลิตร ผลปรากฏว่า การสกัดด้วยวิธีแบบอัลตราซาวด์ที่ 0.05 กรัมของใบมะม่วงต่อมิลลิลิตรของน้ำในใบมะม่วงที่ยังไม่แก่ให้แมงจิเฟอริน มากสุดคือ 0.717$\pm$0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)[21]

หลักการ คือ โมเลกุลในร่างกายจะประกอบด้วยออกซิเจนซึ่งประกอบไปด้วยอิเล็กตรอน เมื่อมีการสูญเสียอิเล็กตรอน จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เกิดโมเลกุลของออกซิเจนที่จะเข้าทำปฏิกิริยา (reactive oxygen species: ROS) สารที่ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนเรียกว่า รีดิวเซอร์ และส่วนที่ทำหน้าที่รับอิเล็กตรอน เรียกว่า ออกซิไดเซอร์ ดังนั้น ในร่างกายเราจึงประกอบด้วย 2 ส่วน คือ สารส่วนที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น เอ็นไซม์ กูต้าไธโอน สังกะสี โปรตีน เป็นต้น สารส่วนที่ 2 คือ สารทำลายกระบวนการปฏิกิริยาลูกโซ่หรือ การเกิดออกซิเดชั่น เช่น วิตามินอี วิตามินซี อัลบูมิน และกรดอะมิโน เป็นต้น จึงมีการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากใบมะม่วง ในหลอดทดลองหลายวิธี ดังนี้

1) วิธี DPPH

2) วิธี metal chelating

3) วิธี ferric iron-thiocyanate complex activity

Ramirez และคณะ (2016)[20] ได้ทำการสกัดใบมะม่วงและศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดจากใบมะม่วงประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระฟีนอล อาทิ gallic acid, quercetin,3-β-D glucoside,α tocopherol, 3-methyl-gallat, propyl benzoate (+), catechin, (-) epicatechin, benzoic acid and D-glucos[12,13], Mangiferin (1,2,6,7-tetrahydroxy-2-[(2S,3R,4R,5S,6R)]-3,4,5- trihydroxy - 6 - (hydroxymethyl) oxan-2-yl] xanthen-9-one) ซึ่งเป็นสารกลุ่มแซนโทน(xanthone group) และพบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.140$\pm$0.04 และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) มีค่า 80.331$\pm$0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นสารจำพวกฟีนอลิค 1.595$\pm$0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นต้น

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

การดำเนินการวิจัยนี้ เพื่อศึกษาการสกัดและการแยกสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้และ ค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายต่าง ๆ และระบบตัวทำละลายร่วมที่ใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง การพิสูจน์เอกลักษณ์และหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินที่สกัดได้จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้โดยเครื่องโครมาโตกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง การศึกษาฤทธิ์ของแมงจิเฟอรินที่เกี่ยวข้องกับวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น

3.1 วัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. ใบมะม่วงน้ำดอกไม้ จาก อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ จำนวน 10 กิโลกรัม
2. ไดคลอโรมีเทน (เมทิลีนคลอไรด์) ของบริษัท ฟีชเชอร์เคมีคอล (Fisher Chemical) ผลิตในประเทศอังกฤษ AR grade
3. เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท เมอร์ค จำกัด ผลิตในประเทศเยอรมัน AR grade
4. เมทานอล (Methanol) ของ บริษัท เมอร์ค จำกัด ผลิตในประเทศเยอรมัน AR grade
5. ไดเอทิลีนไกลคอลโมโนเอทิลอีเทอร์ (อีทอกซีไดไกลคอล) (Ethoxydiglycol) Cosmetic grade
6. โพรพิลีนไกลคอล (พีจี) (Propylene glycol: PG) Cosmetic grade
7. ไดโพรพิลีนไกลคอล (ดีพีจี) (Dipropylene glycol: DPG) Cosmetic grade
8. กลีเซอริน (Glycerin) Cosmetic grade
9. 3-เมธิล-1,3-บิทานีไดออล (ไอโซเพนทิลไดออล) (Isopentyldiol) Cosmetic grade
10. โพรลีเอทิลีนไกลคอล 400 (พีอีจี 400) (Polyethylene glycol 400: PEG 400) Cosmetic grade
11. โพรลีเอทิลีนไกลคอล 600 (พีอีจี 600) (Polyethylene glycol 600: PEG 600) Cosmetic grade
12. พีอีจี-40 ไฮโดรจีเนทแคสเตอร์ออยล์ (Cremophor RH 40) Cosmetic grade
13. ไดเมทิลไอโซซอร์ไบด์ (ดีเอ็มไอ) (Dimethyl isosorbide: DMI) Cosmetic grade
14. น้ำปราศจากไอออน (DI-water)

15. สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน ความบริสุทธิ์ 96.0% ของบริษัท ซิกม่า-อัลดริช (ประเทศไทย) จำกัด

16. แกลลิคแอซิด 98% (Gallic acid) เกรดเอชพีแอลซี (HPLC) ของบริษัท ซิกม่า-อัลดริช (ประเทศไทย) จำกัด

17. แอสคอร์บิคแอซิด 99.7% ของบริษัท รีเดล-ดีฮัว (Riedel-deHaen) ประเทศจีน

18. โทรลอกซ์ (Trolox) 97% ของบริษัท ซิกม่า-อัลดริช (ประเทศไทย) จำกัด

19. 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพครีไฮดราซิล หรือ ดีพี (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl: DPPH) 95% ของบริษัท ซิกม่า-อัลดริช (ประเทศไทย) จำกัด

20. 2,2-อซิโน-บิส (3-เอธิลเบนซ์ไธอะโซลิน-6-ซัลโฟนิค แอซิด) หรือเอบีทีเอส) (2,2-azino-bis) (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid: ABTS) ของบริษัท ซิกม่า-อัลดริช (ประเทศไทย) จำกัด

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องปั่นกวนสารละลาย (magnetic stirrer) เครื่องหมายการค้า ไฮดอลพ์ (Heidolph) รุ่น 3001 ของบริษัท เมริทเทค จำกัด

2. เครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสูญญากาศ (rotary evaporator) ของบริษัท บูชิ (Buchi) ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดยูวี-วิสิเบิลรุ่นยูวี 1800 (UV-VIS spectrophotometer model UV 1800) ของบริษัท ยู.พี. มาร์เก็ตติ้ง เยนเนอรัล ซัพพลาย จำกัด

4. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดยูวี-วิสิเบิล ไมโครเพลสรีดเดอร์ รุ่น uvm 340 เครื่องหมายการค้า Biochrom Asys บริษัท ไบโอโครม จำกัด

5. เครื่อง HPTLC SCANNER 3 เครื่องหมายการค้า CAMAG ของบริษัท แลมด้าไซแอนติฟิค จำกัด

6. เครื่อง TLC SCANNER 3 เครื่องหมายการค้า CAMAG ของบริษัท แลมด้าไซแอนติฟิค จำกัด

7. เครื่องอัลตราโซนิค (ultrasonic bath) เครื่องหมายการค้า บรานซัน (Branson)

8. ตู้อบลมร้อน เครื่องหมายการค้า เมมเมอร์ท (Memmert) บริษัท ยู.พี. มาร์เก็ตติ้ง เยนเนอรัลซัพพลาย จำกัด

9. ตู้อบลมร้อน ของบริษัท เหยี่ยวเฮง จำกัด

10. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน รุ่น 320R ของบริษัท เอสเอ็นพี ไซแอนติฟิค จำกัด

11. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง เครื่องหมายการค้า Sartorius รุ่น BP 210 S ของ บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด

12. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) เครื่องหมายการค้า สกอตต์ รุ่นแลป 850 (Lab 850) ของ บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด

13. เครื่องเขย่าสารละลาย orbital shaker เครื่องหมายการค้า Stuart รุ่น SSL1 ของบริษัท พี เอ็น พี ซายเอ็นซ์ จำกัด

14. เครื่องวัดความหนืด Brookfield model DV-II ของบริษัท แอดวานซ์ เมทโทรโลยี จำกัด

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

1) ซื้อใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปลูกที่อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ สำหรับนำไปสกัดแมงจิเฟอริน

2) นำใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ตาม 1) ที่มีดอก หรือ ผลของมะม่วงติดอยู่ที่กิ่งนั้น ที่ปลูกที่อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ ดำเนินการพิสูจน์ตรวจเอกลักษณ์ใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ โดยการรับรองจากกรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช

3.3.2 การเตรียมสารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้

1) การเตรียมผงใบมะม่วงน้ำดอกไม้

1.1) นำใบมะม่วงสดพันธุ์น้ำดอกไม้ 10 กิโลกรัม มาล้างด้วยน้ำจนสะอาด

1.2) จาก 1.1) นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในถาดกระจายให้บาง ๆ

1.3) นำใบมะม่วงที่หั่นตาม 1.2) เข้าตู้อบ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

1.4) คอยพลิกกลับใบมะม่วงทุก 24 ชั่วโมง ทำการอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หรือจนใบมะม่วงแห้งกรอบ

1.5) นำใบมะม่วงที่อบแห้งแล้ว มาปั่นด้วยเครื่องปั่นบดจนละเอียดเป็นผง จะได้ผงใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ เก็บไว้ดำเนินการต่อไป

2) การสกัดสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ [19]

2.1) นำผงใบมะม่วงที่ได้ตาม 3.3.2.1 จำนวน 2,600 กรัม ใส่ลงบีกเกอร์ขนาด 5,000 มิลลิลิตร เติมเอทานอลที่เตรียมไว้ความเข้มข้น 85% ปริมาตรต่อปริมาตร ลงในบีกเกอร์ดังกล่าว ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10

2.2) นำสารในข้อ 2.1) มาปั่นกวนด้วยเครื่อง magnetic stirrer ที่ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3) จากนั้นนำสารที่ได้จากข้อ 2.2) มากรองผ่านกระดาษกรองด้วยชุดกรองสุญญากาศ แยกส่วนที่เป็นกากกับสารสกัดออกจากกัน โดยนำส่วนที่เป็นกากไปสกัดซ้ำ 3 ซ้ำ

2.4) นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศ

2.5) นำสารสกัดที่ได้ตามข้อ 2.4) เติมด้วย 50% เอทานอล ให้ละลายในอัตราส่วน 1:1

2.6) นำสารละลายจากข้อ 2.5) ใส่ลงในกรวยแยก เพื่อตกตะกอนแยกสารสกัดแมงจิเฟอริน ด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกัน โดยใช้ตัวทำละลายสองชนิดซึ่งมีความมีขั้วต่างกันและแยกชั้นออกจากกัน โดยใช้ไดคลอโรมีเทน เติมลงใน 50% เอทานอล ที่มีสารสกัดอยู่ในอัตราส่วนไดคลอโรมีเทน ต่อ 50% เอทานอล เท่ากับ 1:1

2.7) นำสารสกัดตาม 2.6) กรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 และเก็บตะกอน คือ สารสกัดแมงจิเฟอริน

2.8) ล้างตะกอนแมงจิเฟอริน ด้วยสารละลาย 50% เอทานอล ที่แช่จนเย็น

2.9) อบตะกอนแมงจิเฟอรินในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.10) บรรจุสารสกัดแมงจิเฟอรินในขวดแก้วปิดสนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation)[22] สารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยวิธี ยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer)

1) เตรียมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 1.08, 2.16, 3.24, 5.40, 6.48, 8.64, 12.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.1) ชั่งสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน 0.0135 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

1.2) เติมตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (จะได้สารละลายใส)

1.3) ขวดที่ 1 ได้สารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 0.00054 กรัมต่อมิลลิลิตร

1.4) ขวดที่ 2 นำสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน จากขวดที่ 1 มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

จะได้สารละลายที่ความเข้มข้น 0.000108 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเป็น stock solution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้น108.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	**ปรับให้ครบปริมาตรด้วยเมทานอล (มิลลิลิตร)**	**ความเข้มข้นของแมงจิเฟอริน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**
0.1	10	1.08
0.2	10	2.16
0.3	10	3.24
0.5	10	5.4
0.6	10	6.48
0.8	10	8.64
1.2	10	12.96

1.5) นำสารละลายแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 258 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และมาเขียนกราฟระหว่างแกน Y คือ ค่าการดูดกลืนแสง และ แกน X คือ ความเข้มข้นของแมงจิเฟอริน ซึ่งต้องได้กราฟเป็นเส้นตรง (linear) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่น้อยกว่า 0.990 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) คำนวณความเข้มข้นที่ได้ ดังนี้

สมการเส้นตรงจากสูตร $Y = bX + a$

โดย Y = ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย

X = ค่าความเข้มข้นของสารละลายแมงจิเฟอริน

a, b = ค่าคงที่สมการ

2) ความแม่นของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ความแม่นของวิธีวิเคราะห์สามารถกระทำโดยการหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ คือ เมื่อใส่สารที่เราทราบความเข้มข้นเข้าไปปริมาณเท่าไร ถ้าวิธีการวิเคราะห์มีความแม่น จะต้องสามารถวิเคราะห์ปริมาณสารเท่ากับปริมาณสารที่เติมเข้าไป เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จะต้องอยู่ในช่วงเปอร์เซ็นต์ความเชื่อมั่น (AOAC, 2016)[23] ดังนี้

ความเข้มข้น	Recovery limits
100 %	98-102%
1 %	97-103%
0.1 %	95-105%
0.01 %	90-107%
10 mg/kg	80-110%
1 mg/kg	80-110%

การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับ ทำโดยการนำสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 4.86, 7.02, 8.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง และนำสารละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 8.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง แล้วคำนวณหาร้อยละการคืนกลับจากสมการ

$$\% \text{ Recovery} = \frac{[Ca - Cb] \times 100}{Cc}$$

โดย Ca = ค่าความเข้มข้นของสารสกัดแมงจิเฟอรินที่เติมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่วิเคราะห์ได้ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

Cb = ค่าความเข้มข้นของสารสกัดแมงจิเฟอรินที่วิเคราะห์ได้ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

Cc = ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่เติมลงในสารสกัดแมงจิเฟอริน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

3) ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Precision)[23, 24] คือ ความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ซ้ำ (repeatability) โดยแสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ จากการคำนวณตามสมการ ดังนี้

ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation : S.D.)

$$S.D. = \sqrt{\frac{(Xi - \overline{X})^2}{n - 1}}$$

แทนค่า เมื่อ S.D. หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

Xi หมายถึง ความเข้มข้นสารสกัดแมงจิเฟอรินที่วิเคราะห์ได้

$\overline{X}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นสารสกัดแมงจิเฟอรินที่วิเคราะห์ได้

N หมายถึง จำนวนซ้ำการวิเคราะห์สารสกัดแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้นเดียวกัน

ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Relative standard deviation: RSD)

$$\%RSD. = \frac{S.D.}{\overline{X}} \times 100$$

แทนค่า เมื่อ %RSD หมายถึง ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

S.D. หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$\overline{X}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นสารสกัดแมงจิเฟอรินที่วิเคราะห์ได้

เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จะต้องอยู่ในช่วงเปอร์เซ็นต์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (AOAC, 2016)[23]

ความเข้มข้น	**RSD %**
100 %	1.3 %
1 %	2.7 %
0.1 %	3.7 %
0.01 %	5.3 %
10 mg/kg	7.3 %
1 mg/kg	11 %

3.3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญในสารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี [Thin layer chromatography (TLC)][18, 25]

1) การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิด ซึ่งมีความมีขั้วต่างกัน ดังนี้

mobile phase ชนิดที่ 1 ประกอบด้วย อะซิติกแอซิด 0.2%: อะซิโตไนไตรล์ ในสัดส่วน 17:3 ปริมาตรต่อปริมาตร

mobile phase ชนิดที่ 2 ประกอบด้วย เอธิลอะซิเตต: อะซิโตน: ฟอร์มิค-แอซิด: น้ำ ในสัดส่วน 8:2:1:1 ปริมาตรต่อปริมาตร

2) วิธีการแยกสารด้วย TLC

2.1) เตรียม TLC tank ที่มี mobile phase ปริมาณความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร

2.2) เตรียมกระดาษกรองสำหรับซับ mobile phase

2.3) เตรียมสารละลายความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดแมงจิเฟอริน สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และสารกลุ่มฟีนอลลิก (phenolic compound) ได้แก่ สารมาตรฐานแกลลิคแอซิด (gallic acid) สารมาตรฐานคาเทชิน (catachin)

2.4) นำแผ่นซิลิก้าเจลไปหยดสารละลายสารสกัดแมงจิเฟอริน สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน สารมาตรฐานแกลลิคแอซิด และสารมาตรฐานคาเทชิน จำนวนตัวอย่างละ 3 ไมโครลิตร

2.5) นำแผ่นซิลิก้าเจลตาม 2.4) วางใน tank จำนวน 2 tank ที่มี mobile phase ต่างชนิดกัน หลังจากนั้นปิดฝาและตั้งทิ้งไว้กระทั่งสารละลายเฟสเคลื่อนที่แยกสารออกจากกัน แล้วนำแผ่นเจลออกมาวิเคราะห์

2.6) นำแผ่นเจลตามข้อ 2.5) ไปดูแถบสีด้วยเครื่อง CAMAG UV Cabinet

2.7) นำค่าที่ได้ไปคำนวณ หาค่า R_f (relative front) ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

3.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณแมงจิเฟอรินในสารสกัดใบมะม่วงด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง [High Performance Thin Layer Chromatography: HPTLC)][26]

1) เตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิดกันซึ่งมีความมีขั้วต่างกัน ดังนี้

mobile phase ชนิดที่ 1 ประกอบด้วย อะซิติกแอซิด 0.2%: อะซิโตไนไตรล์ ในสัดส่วน 17:3 ปริมาตรต่อปริมาตร

mobile phase ชนิดที่ 2 ประกอบด้วย เอธิลอะซิเตต: อะซิโตน: ฟอร์มิคแอซิด: น้ำ ในสัดส่วน 8:2:1:1 ปริมาตรต่อปริมาตร

2) วิธีการวิเคราะห์สารด้วย HPTLC

2.1) เตรียม TLC tank ที่มี mobile phase ปริมาณความสูงประมาณ 2 เซนติเมตร

2.2) เตรียมกระดาษกรองสำหรับซับ mobile phase

2.3) เตรียมสารละลายความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดแมงจิเฟอริน สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และสารกลุ่มฟีนอลลิก (phenolic compound) ได้แก่ สารมาตรฐานแกลลิคแอซิด (gallic acid) สารมาตรฐานคาเทชิน (catechin)

2.4) นำแผ่นซิลิก้าเจลไปหยดสารละลายสารสกัดแมงจิเฟอริน สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน สารมาตรฐานแกลลิคแอซิต และสารมาตรฐานคาเทชิน จำนวนตัวอย่างละ 3 ไมโครลิตร

2.5) นำแผ่นซิลิก้าเจลตาม 2.4) วางใน tank จำนวน 2 tank ที่มี mobile phase ต่างชนิดกัน หลังจากนั้นปิดฝา และตั้งทิ้งไว้กระทั่งสารละลายเฟสเคลื่อนที่แยกสารออกจากกัน แล้วนำแผ่นเจลออกมาวิเคราะห์

2.6) นำแผ่นเจลตามข้อ 2.5) ไปวัดพื้นที่ใต้พีกของสารสกัดและสารมาตรฐาน ด้วยเครื่อง CAMAG TLC Scanner 3 และหาปริมาณแมงจิเฟอรินในสารสกัดโดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีกของสารสกัดกับพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น

3.3.6 การยืนยันชนิดและความบริสุทธิของสารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรมิเตอร์ (Liquid Chromatography - Mass Spectrometer: LC-MS/MS)[26., 34]

1) เตรียมสารละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินและสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2) เตรียมเครื่อง LC-MS/MS ตามสภาวะ ดังนี้

Column KinetexXB-C18 2.6 µm [Particle size] 100 Å [Pore size]
100 mm [Length] 2.1 mm [Internal diameter]

Flow rate 0.3 ml/min โดย Injection volume 2.00 µl

Mobile Phase: A คือ 5 mM Ammonium formate [(NH_4) HCO_2: 0.01% Formic acid (CH_2O_2)

B คือ Acetonitrile (ACN)

อัตราส่วน Mobile Phase [A : B] ที่เวลาต่าง ๆ ดังนี้

เวลา	สารละลาย A (%)	สารละลาย B (%)
0.0	85	15
5.0	20	80
10.0	15	85
15.0	10	90
20.0	85	15
25.0 Stop Time	Post Time 2 minutes	

<u>สภาวะเครื่องส่วน MS</u> [QQQ Mass Spectrometer] ช่วงการแตกตัวเป็นไอออน

Precursor ion	Product ion	Dwell time	Fragmentor [v]	Collision [v]
484	453	90	135	20
484	286	90	135	20
484	177	90	135	50

Source Parameters

Gas temperature	350	°C
Gas flow	10	L/min
Nabulizer	45	psi
Capillary	3500	V
Ionization mode	ESI	
Polarity mode	Positive	
Column temperature set	40	°C

3.3.7 การหาค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย

1) การเตรียมกราฟมาตรฐาน ทำโดยการเตรียมสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน ในตัวทำละลายเมทานอล ที่ความเข้มข้น 0.0011, 0.0022, 0.0032, 0.0054, 0.0065, 0.0086, 0.0130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.1) ชั่งสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินมา 0.0135 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

1.2) เติมตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (จะได้สารละลายใส)

1.3) ขวดที่ 1 ได้สารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 0.00054 กรัมต่อมิลลิลิตร

1.4) ขวดที่ 2 นำสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน จากขวดที่ 1 มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่ความเข้มข้น 0.000108 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเป็น stock solution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน ความเข้มข้น 108.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	**ปรับให้ครบปริมาตรด้วยเมทานอล (มิลลิลิตร)**	**ความเข้มข้นของแมงจิเฟอริน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)**
0.1	10	1.08
0.2	10	2.16
0.3	10	3.24
0.5	10	5.4
0.6	10	6.48
0.8	10	8.64
1.2	10	12.96

1.5) นำสารละลายแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 258 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และมาเขียนกราฟระหว่างแกน Y คือ ค่าการดูดกลืนแสง และ แกน X คือ ความเข้มข้นของแมงจิเฟอริน ซึ่งต้องได้กราฟเป็นเส้นตรง (linearity) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ไม่น้อยกว่า 0.990 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

2) การหาค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย

2.1) ชั่งสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.2) เติมตัวทำละลายขวดละ 20 กรัม โดยตัวทำละลายที่ใช้ทั้งหมด ดังนี้

2.2.1) Ethanol

2.2.2) Methanol

2.2.3) Ethoxydiglycol

2.2.4) Glycerin

2.2.5) Isopentyldiol

2.2.6) Dimethyl isosorbide [DMI]

2.2.7) Propylene glycol [PG]

2.2.8) Dipropylene glycol [DPG]

2.2.9) Cremophor RH 40

2.2.10) Polyethylene glycol 400 [PEG 400]

2.2.11) Polyethylene glycol 600 [PEG 600]

2.2.12) DI-water

2.3) นำสารผสมตามข้อ 2.2) ไปปั่นเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย orbital shaker ที่ 170 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 27$\pm$2 องศาเซลเซียส

2.4) นำสารผสมตามข้อ 2.3) ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.5) แยกเอาส่วนที่เป็นสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 258 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดยูวี-วิสิเบิล

2.6) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแมงจิเฟอริน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่เตรียมตาม ข้อ 1)

3.3.8 การหาค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม

1) ชั่งสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.2 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร

2) เติมตัวทำละลายลงแต่ละขวดตามที่ระบุในตารางที่ 3 โดยตัวทำละลายที่ใช้ทั้งหมด ดังนี้

2.1) Ethanol

2.2) Methanol

2.3) Ethoxydiglycol

2.4) Glycerin

2.5) Isopentyldiol

2.6) Dimethyl isosorbide [DMI]

2.7) Propylene glycol [PG]

2.8) Dipropylene glycol [DPG]

2.9) Cremophor RH 40

2.10) Polyethylene glycol 400 [PEG 400]

2.11) Polyethylene glycol 600 [PEG 600]

ตารางที่ 3 อัตราส่วนตัวทำละลายร่วม

ปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.2 กรัม	**ขวดที่**				
	I	**II**	**II**	**IV**	**V**
ตัวทำละลาย (กรัม)	2	4	6	8	10
DI water (กรัม)	18	16	14	12	10

3) นำสารผสมตามตารางที่ 3 ไปปั่นกวนด้วยเครื่องเขย่าสารละลาย orbital shaker ที่ 170 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4) นำสารผสมตามข้อ 3) ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

5) แยกเอาส่วนที่เป็นสารละลายใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 258 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดยูวี-วิสิเบิล

6) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแมงจิเฟอรินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่เตรียมตาม ข้อ 3.3.7 1)

7) นำค่าการละลายของแมงจิเฟอรินมาสร้างกราฟ ดังสมการ [28]

$$\text{Log Mm} = \log \text{Mw} + \sigma.\text{fi}$$

โดย Mm = ค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

Mw = ค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในน้ำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

σ = ค่าความชันของการทดลอง (solubilization power)

fi = ค่าสัดส่วนตัวทำละลายร่วมโดยปริมาตร (volume fraction)

หมายเหตุ แกน Y คือ ค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ แกน X คือ ค่าสัดส่วนตัวทำละลายร่วมโดยปริมาตร (volume fraction)

3.3.9 การหาค่าพีเอชของสารละลายแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม

1) นำสารละลายแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วมตามข้อ 3.3.8 มาวัดหาค่าพีเอชด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

2) ก่อนดำเนินการวัดพีเอช ต้องทำการปรับเครื่องพีเอชให้อยู่ในสภาวะพร้อมใช้งาน โดยการ calibrate เครื่องด้วยบัฟเฟอร์ พีเอช 7, 4, 10 ตามลำดับทุกครั้งที่เริ่มใช้งานเครื่องพีเอชมิเตอร์

3.3.10 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแมงจิเฟอรินโดยใช้ ABTS[29]

1) การเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์

1.1) ชั่ง ABTS 0.0950 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน (DI-water) ให้ได้ 25 มิลลิลิตร

1.2) เตรียมสารละลายโปแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ (mM) โดยการชั่งโปแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 0.0165 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ 25 มิลลิลิตร

1.3) ผสมสารละลาย ข้อ 1.1) และ 1.2) เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1

1.4) ตั้งสารละลายที่ได้ในข้อ 1.3) ทิ้งไว้ 16 ชั่วโมง ในที่มืด

1.5) นำสารละลายตามข้อ 1.4) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

หมายเหตุ ทำการเจือจางสารละลายด้วยเมทานอล ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.700 ± 0.02

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.06, 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1) ชั่งสารมาตรฐาน Trolox 25 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

2.2) เติมตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (จะได้สารละลายใส)

2.3) ได้สารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเป็น stock solution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	**ปรับให้ครบปริมาตรด้วยเมทานอล (มิลลิลิตร)**	**ความเข้มข้นของ Trolox (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**
1	10	0.1
0.6	10	0.06
0.4	10	0.04
0.3	10	0.03
0.2	10	0.02
0.1	10	0.01

3) เตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิค ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.25, 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1) ชั่งสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค 25 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

3.2) เติมตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (จะได้สารละลายใส)

3.3) ได้สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเป็น stock solution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	**ปรับให้ครบปริมาตรด้วยเมทานอล (มิลลิลิตร)**	**ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิค (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**
3	10	0.3
2.5	10	0.25
1.5	10	0.15
1	10	0.1
0.5	10	0.05

4) วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)

4.1) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS กับสารละลายมาตรฐาน Trolox และ กรดแอสคอร์บิค

4.1.1) นำสารละลาย ABTS ที่เตรียมได้ 180 ไมโครลิตร ผสมกับสารมาตรฐาน คือ Trolox หรือ กรดแอสคอร์บิค ปริมาณ 20 ไมโครลิตร

4.1.2) ตั้งสารละลายที่ได้ทิ้งไว้ 15 นาที

4.1.3) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์ (Microplate reader)

4.1.4) นำผลการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% Antioxidant activity) ตามสูตร

$$\% \text{ Antioxidant activity} = \frac{(\text{Abs.control} - \text{Abs.sample}) \times 100}{\text{Abs.control}}$$

เมื่อ Control คือ เมทานอล

Sample คือ สารละลายมาตรฐาน Trolox หรือ กรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.2) การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดแมงจิเฟอริน

4.2.1) ชั่งสารสกัดแมงจิเฟอริน 25 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

4.2.2) เติมตัวทำละลายเมทานอลให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

4.2.3) ได้สารละลายสารสกัดแมงจิเฟอรินความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเป็น stock solution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเตรียมสารละลายสารสกัดแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเขมขนแมงจิเฟอริน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	**ปรับให้ครบปริมาตรด้วยเมทานอล (มิลลิลิตร)**	**ความเขมข้นแมงจิเฟอริน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**
1.5	10	0.15
1	10	0.1
0.5	10	0.05
0.3	10	0.03
0.2	10	0.02

4.2.4) นำสารละลาย ABTS ที่เตรียมได้มา 900 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 6 จำนวน 100 ไมโครลิตร

4.2.5) ทำการผสมด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 45 วินาที

4.2.6) ตั้งสารละลายที่ได้ทิ้งไว้ 15 นาที

4.2.7) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์

4.2.8) นำผลการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% Antioxidant activity) ตามสูตร

$$\% \text{ Antioxidant activity} = \frac{(\text{Abs.control} - \text{Abs.sample}) \times 100}{\text{Abs.control}}$$

เมื่อ Control คือ เมทานอล

Sample คือ สารละลายแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ

4.2.9) นำค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นของ Trolox, กรดแอสคอร์บิก และสารสกัดแมงจิเฟอริน มาเขียนกราฟโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้น แกน Y เป็นเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ และใช้สมการเส้นตรงหาค่า เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระที่ 50% เป็นค่า IC_{50} ซึ่งคือ ค่า Inhibitory concentration 50 หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

3.3.11 การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแมงจิเฟอรินโดยใช้ DPPH [30]

1) การเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์

1.1) ชั่งดีพีพีเอช 0.02 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปอัลตราโซนิคเป็นเวลา 15 นาที และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

1.2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.09, 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1) ชั่งสารมาตรฐาน Trolox จำนวน 25 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

2.2) เติมตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

2.3) ได้สารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเป็น stock solution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 7

ตารางที่ 7 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	**ปรับให้ครบปริมาตรด้วยเมทานอล (มิลลิลิตร)**	**ความเข้มข้นของ Trolox (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**
1.5	10	0.15
0.9	10	0.09
0.4	10	0.04
0.3	10	0.03
0.2	10	0.02
0.1	10	0.01
0.05	10	0.005

2.4) นำสารละลายดีพีพีเอช ที่เตรียมได้มา 900 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 7 จำนวน 100 ไมโครลิตร

2.5) ทำการผสมด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 45 วินาที

2.6) ตั้งสารละลายที่ได้ทิ้งไว้ 15 นาที ในที่มืด

2.7) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์

2.8) นำผลการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% Antioxidant activity) ตามสูตร

$$\% \text{ Antioxidant activity} = \frac{(\text{Abs.control} - \text{Abs.sample}) \times 100}{\text{Abs.control}}$$

เมื่อ Control คือ เมทานอล

Sample คือ สารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้นต่าง ๆ

2.9) นำค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นของ Trolox มาเขียนกราฟโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้น แกน Y เป็นเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ และใช้สมการเส้นตรงหาค่า เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระที่ 50% เป็นค่า IC_{50} ซึ่งคือค่า Inhibitory

concentration 50 หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์

3) การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค

3.1) ชั่งสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค 25 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

3.2) เติมตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (จะได้สารละลายใส)

3.3) ได้สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น stock solution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 8

ตารางที่ 8 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิค ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	**ปรับให้ครบปริมาตรด้วยเมทานอล (มิลลิลิตร)**	**ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิค (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**
3	10	0.3
2.5	10	0.25
1.5	10	0.15
1	10	0.1
0.5	10	0.05

3.4) นำสารละลายดีพีพีเอช ที่เตรียมได้มา 900 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายกรดแอสคอร์บิคที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามตารางที่ 3.8 จำนวน 100 ไมโครลิตร

3.5) ทำการผสมด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 45 วินาที

3.6) ตั้งสารละลายที่ได้ทิ้งไว้ 15 นาที ในที่มืด

3.7) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์

3.8) นำผลการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% Antioxidant activity) ตามสูตร

$$\% \text{ Antioxidant activity} = \frac{(\text{Abs.control} - \text{Abs.sample}) \times 100}{\text{Abs.control}}$$

เมื่อ Control คือ เมทานอล

Sample คือ สารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ

3.9) นำค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิคมาเขียนกราฟโดยให้แกน X เป็นความเข้มข้น แกน Y เป็นเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ และใช้สมการเส้นตรงหาค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระที่ 50% เป็นค่า IC_{50}

4) วิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของสารสกัดแมงจิเฟอริน

4.1) ชั่งสารสกัดแมงจิเฟอริน 25 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

4.2) เติมตัวทำละลายเมทานอลให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าจนได้สารละลายใส

4.3) ได้สารละลายสารสกัดแมงจิเฟอรินความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเป็น stock solution เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิคความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การเตรียมสารละลายสารสกัดแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	**ปรับให้ครบปริมาตรด้วยเมทานอล (มิลลิลิตร)**	**ความเข้มข้นของแมงจิเฟอริน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**
5.0	10	0.50
4.0	10	0.40
2.5	10	0.25
1.0	10	0.10
0.5	10	0.05
0.2	10	0.02

4.4) นำสารละลายดีพีพีเอช ที่เตรียมได้มา 180 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตามตารางที่ 3.9 จำนวน 20 ไมโครลิตร

4.5) ตั้งสารละลายที่ได้ทิ้งไว้ 15 นาที

4.6) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์

4.7) บันทึกผลการทดลองและนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% Antioxidant activity) ตามสูตร

$$\% \text{ Antioxidant activity} = \frac{(\text{Abs.control} - \text{Abs.sample}) \times 100}{\text{Abs.control}}$$

เมื่อ Control คือ เมทานอล

Sample คือ สารละลายแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ

4.8) นำค่าเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ และความเข้มข้นสารสกัดแมงจิเฟอรินมาเขียนกราฟ โดยให้แกน X เป็นความเข้มข้น แกน Y เป็นเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ และใช้สมการเส้นตรงหาค่า เปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระที่ 50% เป็นค่า IC_{50}

3.3.12 การเตรียมตำรับโทนเนอร์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดแมงจิเฟอริน

1) ตำรับโทนเนอร์ประกอบด้วย สารต่าง ๆ ดังนี้

Allantoin	0.10	% w/w
Witch Hazel extract	3.00	% w/w
Chamomile extract	4.80	% w/w
Disodium EDTA	0.05	% w/w
Germaben II	0.50	% w/w
Mangiferin extract	0.05-0.5	% w/w
Cosolvent	X	% w/w
Water QS.	100	% w/w

หมายเหตุ 1. ปริมาณของสารสกัดแมงจิเฟอรินพิจารณาจากค่าการละลาย และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการทดลอง

2. ปริมาณ Cosolvent ได้จากการคำนวณตามสมการ ของ YALKOWSKY

$$f_i = \frac{\text{Log } M_m - \text{log } M_w}{\sigma}$$

โดย M_m = ค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

M_w = ค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในน้ำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

σ = ค่าความสามารถของการละลาย (solubilization power)

f_i = ค่าสัดส่วนตัวทำละลายร่วมโดยปริมาตร (volume fraction)

2) วิธีการเตรียมโทนเนอร์

2.1) นำ disodium EDTA ละลายในน้ำร้อนคนจนละลายหมด

2.2) นำสารสกัดแมงจิเฟอรินปริมาณไม่เกินค่าการละลายที่ได้จากการทดลองผสมกับตัวทำละลายคนให้เข้ากัน เติมลงใน ข้อ 1 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

2.3) เติม allantoin ลงใน ข้อ 2 ละลายให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

2.4) เติม witch hazel extract และ chamomile extract ลงในข้อ 3

2.5) เติม Germaben II คนผสมจนได้สารละลายเนื้อเดียวกัน

2.6) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าพีเอช ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

2.7) ใส่ขวดภาชนะใสมีฝาปิดสนิท และนำไปทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพต่อไป

3) การศึกษาความคงตัวของตำรับโทนเนอร์ ในสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

3.1) เก็บตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

3.2) เก็บตัวอย่างในตู้อบที่อุณหภูมิ 45$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

3.3) เก็บตัวอย่างไว้ ณ อุณหภูมิห้อง 30$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน

3.4) เก็บตัวอย่างแบบ temperature cycling condition โดยใน 1 รอบการเก็บตัวอย่างจะทำที่อุณหภูมิ 45$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ ที่อุณหภูมิ 5$\pm$2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำซ้ำ 6 รอบ

4) การศึกษาความคงตัวทางกายภาพทำการประเมินลักษณะตำรับ ดังต่อไปนี้ [31]

4.1) บันทึกสภาพที่ปรากฏ มีการเปลี่ยนแปลง หรือไม่เปลี่ยนแปลงของสี

4.2) กลิ่น หลังจากมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิการเก็บแต่ละอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลง หรือ ไม่เปลี่ยนแปลง

4.3) ความเป็นกรด – ด่าง วัดด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

4.4) ความหนืด วัดด้วยเครื่องวัดความหนืด

4.5) การตกตะกอน บันทึกสภาวะที่ปรากฏมีการตกตะกอน ไม่มีตะกอน

หมายเหตุ บันทึกการทดลองที่เวลา 0 และหลังผ่าน temperature cycling condition หรือผ่านสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ

5) การศึกษาความคงตัวทางเคมีของตำรับโทนเนอร์ โดยวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ แมงจิเฟอรินในโทนเนอร์ ด้วยวิธี ยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

5.1) การเตรียมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 1.08, 2.16, 3.24, 5.40, 6.48, 8.64, 12.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.1.1) ชั่งสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินมา 0.0135 กรัม ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร

5.1.2) เติมตัวทำละลายเมทานอลได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าจนได้สารละลายใส

5.1.3) ขวดที่ 1 ได้สารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 0.00054 กรัมต่อมิลลิลิตร

5.1.4) ขวดที่ 2 นำสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน จากขวดที่ 1 มา 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายเมทานอล ให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่ความเข้มข้น 0.000108 กรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเป็น stock solution เพื่อเตรียมความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินต่อไป 7 ความเข้มข้น ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน แมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ

สารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้น108.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	**ปรับให้ครบปริมาตรด้วยเมทานอล (มิลลิลิตร)**	**ความเขมข้นของแมงจิเฟอริน (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)**
0.1	10	1.08
0.2	10	2.16
0.3	10	3.24
0.5	10	5.4
0.6	10	6.48
0.8	10	8.64
1.2	10	12.96

5.1.5) นำสารละลายที่เตรียมได้ตามตารางที่ 3.10 มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 258 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ชนิดยูวี-วิสิเบิล แล้วนำค่าที่ได้ มาเขียนกราฟมาตรฐานแมงจิเฟอริน ระหว่างแกน Y คือ ค่าการดูดกลืนแสง และ แกน X คือ ความเข้มข้น ซึ่งต้องได้เป็นเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.99

5.2) วิธีการหาค่าปริมาณสารสำคัญ แมงจิเฟอรินในตำรับโทนเนอร์ด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

5.2.1) นำสูตรตำรับโทนเนอร์ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

5.2.2) เติมเมทานอลจนได้ปริมาตรละ 10 มิลลิลิตร ทำให้สารละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

5.2.3) นำไปวัดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 258 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโต-มิเตอร์ชนิดยูวี-วิสิเบิล

5.2.4) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ ไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแมงจิเฟอรินโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่เตรียมตาม ข้อ 5.1)

6) การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแมงจิเฟอรินในตำรับโทนเนอร์โดยใช้ DPPH [30]

6.1) การเตรียมสารละลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลลาร์

6.1.1) ชั่งดีพีพีเอช 0.02 กรัม ละลายด้วยเมทานอล ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปอัลตราโซนิคเป็นเวลา 15 นาที และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

6.1.2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

6.2) วิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของโทนเนอร์

6.2.1) นำสารละลายดีพีพีเอช ที่เตรียมได้มา 900 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายในข้อ 5.2) โดยเอามาจำนวน 100 ไมโครลิตร ทำการผสมด้วยเครื่องผสม เป็นเวลา 45 วินาที

6.2.2) ตั้งสารละลายที่ได้ทิ้งไว้ 15 นาที ในที่มืด

6.2.3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

6.2.4) นำผลการทดลองไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การต้านอนุมูลอิสระ (% Antioxidant activity)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การทดลองนี้เพื่อสกัดและแยกสารแมงจิเฟอริน จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ โดยทำการศึกษาปริมาณแมงจิเฟอรินที่สกัดจากใบมะม่วงด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ และนำสารสกัดแมงจิเฟอรินไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง จึงทำการศึกษาการละลายของแมงจิเฟอรินในระบบตัวทำละลายต่างๆ และระบบตัวทำละลายร่วม รวมทั้งการศึกษาฤทธิ์ของแมงจิเฟอรินที่เกี่ยวข้องกับวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง เช่น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาดังกล่าว ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1 ผลการสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วง

การสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ (ภาพที่ 4) ซึ่งปลูกในเขตพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการ เริ่มโดยการนำใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ มาล้างทำความสะอาด หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และทำให้แห้งด้วยการเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 45$\pm$2 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 5) จากนั้นจึงนำใบมะม่วงที่ผ่านการอบแห้งมาทำให้เป็นผงละเอียด (ภาพที่ 6) โดยใช้เครื่องปั่นบด ทำการสกัดแมงจิเฟอรินด้วยการนำใบมะม่วงมาปั่นกวนใน 85% เอทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมากรองแยกกาก และสารละลายออกจากกัน ต่อจากนั้นนำสารละลายที่ได้ทำการระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารภายใต้ระบบสุญญากาศ สารที่ได้เรียกสารสกัดหยาบ จากนั้นจึงทำการแยก แมงจิเฟอรินออกจากสารสกัดหยาบด้วยวิธี liquid-liquid extraction ด้วยการใช้ตัวทำละลาย 50% เอทานอลละลายสารสกัดหยาบและใส่ลงในกรวยแยก ค่อยๆ เติมไดคลอโรมีเทนให้มีปริมาตรเท่ากับสารละลายสารสกัดหยาบ คือ อัตราส่วน 1 ต่อ 1 และทำการเขย่าจะได้สารสกัดแมงจิเฟอรินตกตะกอน ดังภาพที่ 7 กรองเอาตะกอนที่ได้แล้วล้างด้วย 50% เอทานอลที่เย็น เสร็จแล้วนำตะกอนที่ได้ไปอบให้แห้งที่ตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้ผงสารสกัด แมงจิเฟอริน 82.46 กรัม ดังภาพที่ 8 จากน้ำหนักใบมะม่วงผงอบแห้ง 2,600 กรัม สำหรับใช้ในการทำวิจัยต่อไป ซึ่งคิดเป็นสารสกัดแมงจิเฟอรินร้อยละ 3.17

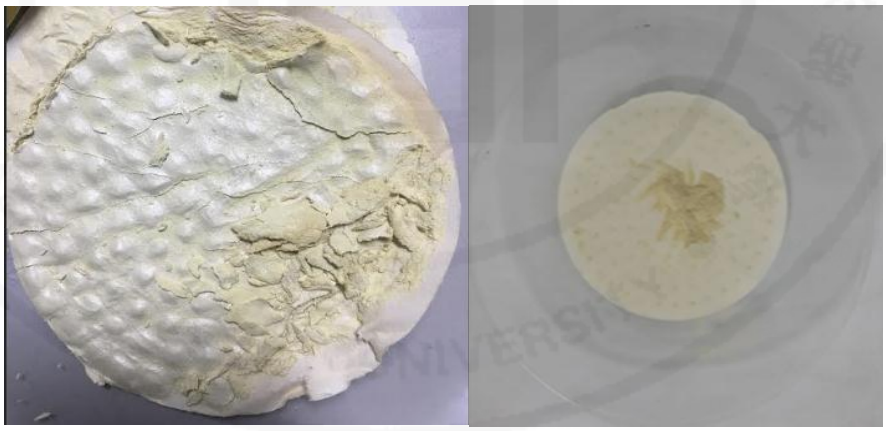
ภาพที่ 4 ใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

ภาพที่ 5 ใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ผ่านการอบแห้ง

ภาพที่ 6 ผงใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

ภาพที่ 7 สารสกัดแมงจิเฟอรินตกตะกอนอยู่ในชั้นไดคลอโรมีเทน

ภาพที่ 8 สารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้



ใบมะม่วงน้ำดอกไม้จำนวน 2,600 กรัม สามารถสกัดแมงจิเฟอรินได้ 82.46 กรัม คำนวณเป็นร้อยละของสารสกัดแมงจิเฟอรินได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณแมงจิเฟอริน (ร้อยละ)} = \frac{82.46 \text{ กรัม} \times 100}{2{,}600 \text{ กรัม}}$$

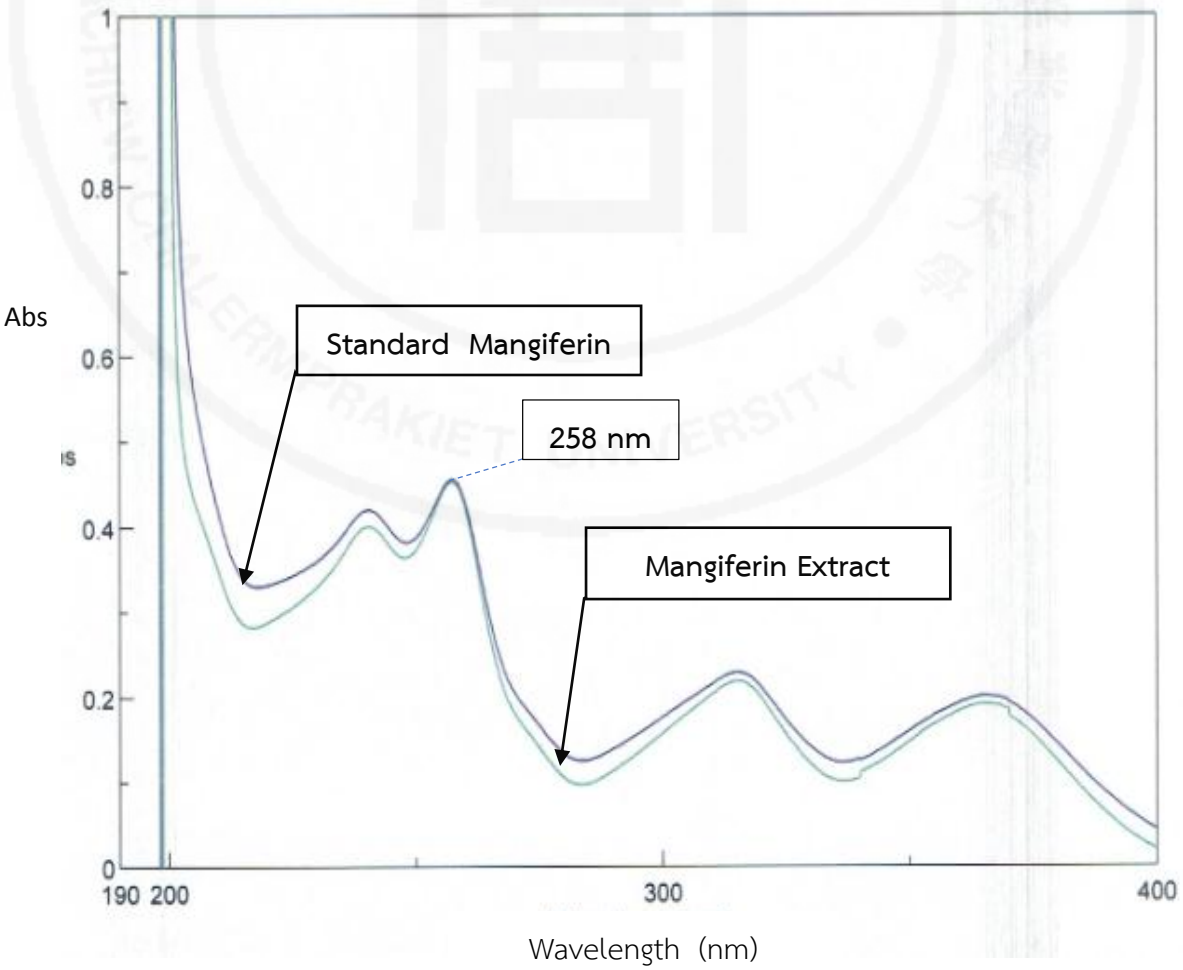
$$= 3.17$$

4.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method Validation) สารสกัดแมงจิเฟอริน ด้วยวิธี ยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible Spectrophotometer)

4.2.1 การหาความจำเพาะ (specificity)

ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินและสารสกัดแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 5.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาสแกนที่ความยาวคลื่น 200 ถึง 400 นาโนเมตร พบว่ายูวีสเปคตรัมของสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินมีลักษณะเดียวกันกับ ยูวีสเปคตรัมของสารละลายสารสกัดแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้นเดียวกัน ทั้งสารสกัดแมงจิเฟอรินและสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินมียูวีสเปคตรัมซ้อนทับกันพอดี และมีพีคที่ 258 นาโนเมตร และไม่มีพีคอื่นที่รบกวนการวิเคราะห์ ตามแผนภูมิที่ 1

แผนภูมิที่ 1 ยูวีสเปคตรัมของสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินกับสารสกัดแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 5.40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



4.2.2 การหาความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงความเข้มข้น (Range) ของวิธีวิเคราะห์สารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

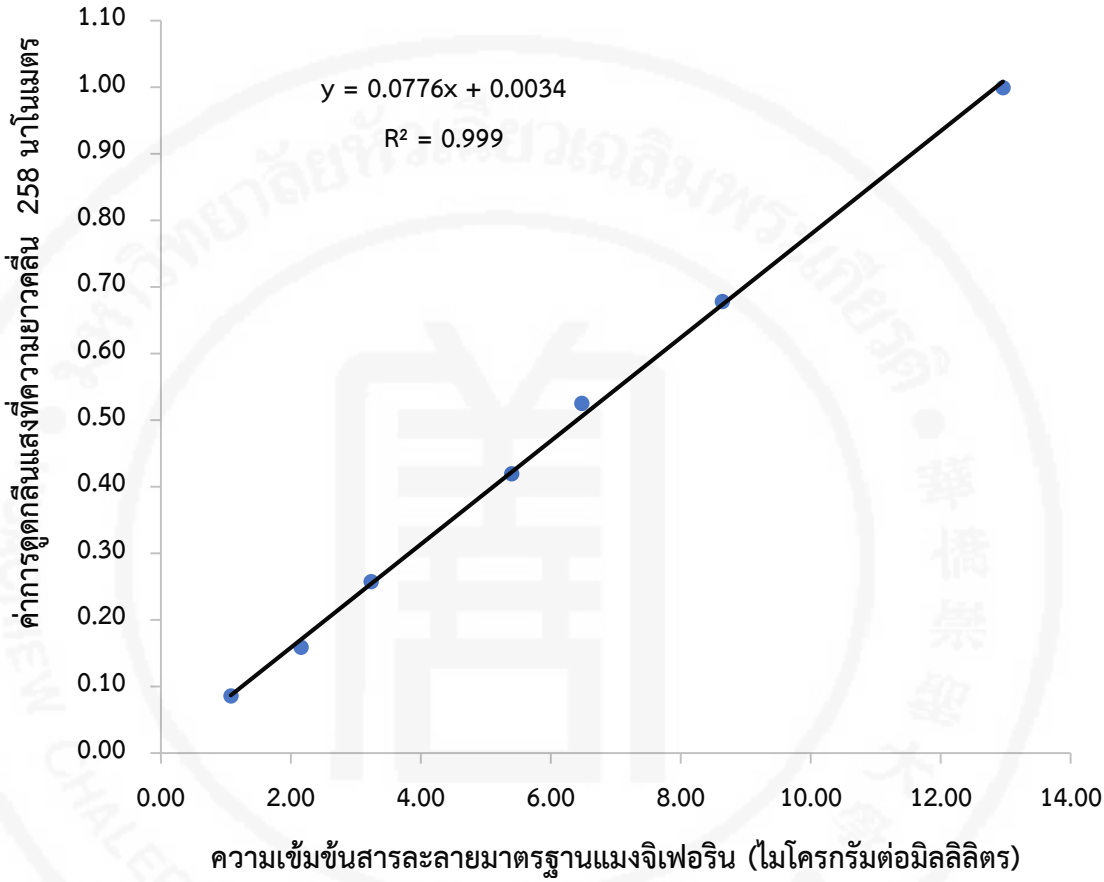
ทำโดยเตรียมสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ละลายด้วยเมทานอล ใช้เมทานอลเป็นแบลงค์วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปทำการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงแกน Y กับค่าความเข้มข้นต่างๆ แกน X โดยทำการทดลองในแต่ละความเข้มข้น 3 ซ้ำ พบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) อยู่ระหว่าง 0.0001 ถึง 0.0015 ร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) อยู่ในช่วง 0.0085 ถึง 0.7571 ตามตารางที่ 11

จากผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง เมื่อเตรียมให้มีความเข้มข้น 1.08 -12.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้กราฟเส้นตรงตามแผนภูมิที่ 2 ได้สมการ คือ y = 0.0776x + 0.0034 มีสัมประสิทธิ์สหสัมพัทธ์ (r) เฉลี่ยเท่ากับ 0.999 ซึ่งบอกถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสมการที่ได้นี้ว่าสามารถทำนายความเข้มข้นของสารแมงจิเฟอรินที่ทำการวิเคราะห์ได้อย่างถูกต้องในช่วงความเข้มข้น 1.08-12.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายแมงจิเฟอรินความเข้มข้นต่าง ๆ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร

ความเข้มข้นสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	**ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 258 นาโนเมตร**			**ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย**	**SD**	**%RSD**
1.08	0.0853	0.0859	0.0866	0.0859	0.0007	0.7571
2.16	0.1591	0.1590	0.1591	0.1591	0.0001	0.0363
3.24	0.2565	0.2574	0.2577	0.2572	0.0006	0.2428
5.40	0.4191	0.4192	0.4192	0.4192	0.0001	0.0138
6.48	0.5254	0.5254	0.5251	0.5253	0.0002	0.0330
8.64	0.6780	0.6780	0.6779	0.6780	0.0001	0.0085
12.96	0.9999	0.9997	0.9972	0.9989	0.0015	0.1506

แผนภูมิที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน ช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1.08 -12.96 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



4.2.3 การหาความแม่น (Accuracy) และ ความเที่ยง (Precision) ของวิธีวิเคราะห์สารแมงจิเฟอรินด้วยวิธียูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

ความแม่นของวิธีวิเคราะห์ทำโดยการเติมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้นที่ต่าง ๆ กัน ลงในสารสกัดแมงจิเฟอริน ที่มีความเข้มข้นคงที่ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแมงจิเฟอรินของสารมาตรฐานที่เติมลงไป นำมาคำนวณหาร้อยละการคืนกลับ (%Recovery)

ส่วนความเที่ยง ของวิธีวิเคราะห์ทำโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำจำนวน 6 ครั้ง แล้วคำนวณหาค่าความเบี่ยงเบนของผลการวิเคราะห์ ที่ได้แสดงผลเป็น % Relative Standard Deviation หรือ %RSD ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การคืนกลับของสารแมงจิเฟอรินและความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์

การทดลองครั้งที่	ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่เติมในสารสกัด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานที่เติมลงในสารสกัดไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ได้จากการวิเคราะห์	% Recovery	% Recovery เฉลี่ย	SD	%RSD
1	4.86	4.89	100.63	103.29	1.73	1.67
2		5.10	105.00			
3		5.10	104.87			
4		4.95	101.85			
5		5.04	103.68			
6		5.04	103.70			
1	7.02	7.29	103.79	103.89	0.50	0.48
2		7.34	104.49			
3		7.34	104.56			
4		7.26	103.44			
5		7.27	103.50			
6		7.27	103.59			
1	8.64	8.83	102.17	101.03	0.71	0.70
2		8.78	101.66			
3		8.68	100.50			
4		8.69	100.54			
5		8.70	100.68			
6		8.69	100.63			

การทดสอบความแม่น (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์แมงจิเฟอรินด้วยวิธียูวี-วิสิเบิลสเปค-โตรโฟโตมิเตอร์ ใช้วิธี standard addition และพิจารณาความถูกต้องโดยการวิเคราะห์ค่าร้อยละการ

คืนกลับ พบว่ามีค่าร้อยละการคืนกลับของสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินอยู่ระหว่างร้อยละ 101.03 ถึงร้อยละ 103.89 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 102.72 ดังนั้น ผลการทดสอบจึงผ่านเกณฑ์ของ AOAC (2016)[23] ซึ่งกำหนดให้ค่าร้อยละการคืนกลับควรมีค่าอยู่ระหว่าง 80.00-110.00%

การทดสอบความเที่ยง (precision) เพื่อหาความสามารถของวิธีที่ใช้ว่าวัดค่าซ้ำได้เที่ยงตรง โดยพิจารณาจากค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 6 ซ้ำ ในการทดสอบวันเดียวกัน (intraday) พบว่าการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 4.86, 7.02 และ 8.64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี %RSD เท่ากับ 1.67%, 0.48% และ 0.70% ตามลำดับ AOAC (2016)[23] กำหนดให้ค่า %RSD ต้องไม่เกินกว่า 7.3% ดังนั้นจึงผ่านเกณฑ์การทดสอบทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ

จากการทดสอบทั้งความจำเพาะ การวิเคราะห์ความเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้น ความแม่นและความเที่ยง พบว่าผ่านเกณฑ์การยอมรับตามข้อกำหนดของ AOAC (2016)[23] แสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์แมงจิเฟอรินด้วยยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตมิเตอร์นี้มีความถูกต้อง

4.3 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสำคัญในสารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี [Thin layer chromatography (TLC)][23]

ทดลองทำโดยหยด (spotting) สารสกัดแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในปริมาณ 3 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นซิลิก้าอลูมิเนียมและทำการแยกสารสกัดแมงจิเฟอริน และ สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน สารมาตรฐานแกลลิคแอซิด และสารมาตรฐานคาเทชิน โดยใช้สารละลายตัวพา (mobile phase) 2 ชนิด ดังนี้

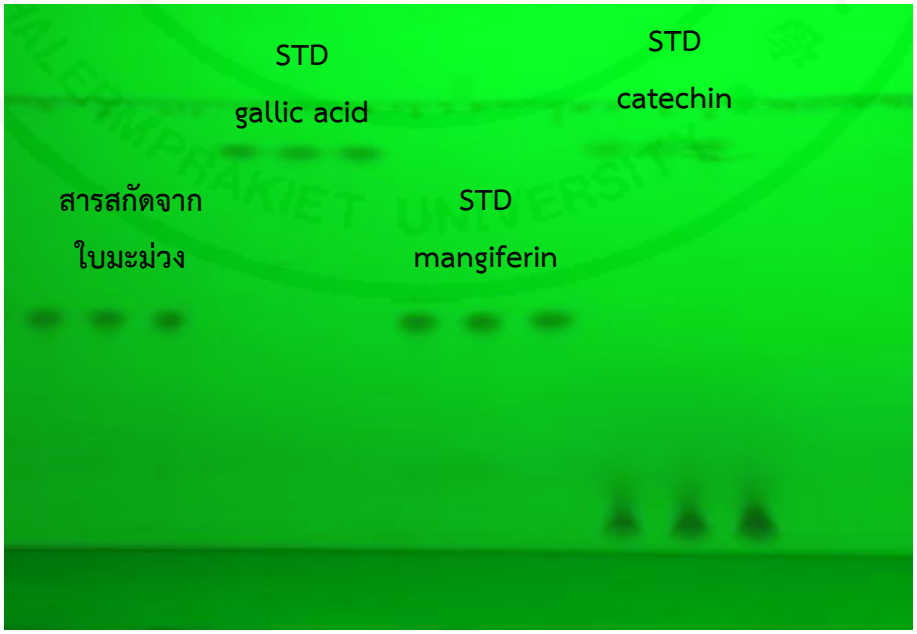
ชนิดที่ 1 ประกอบด้วย อะซิติกแอซิด 0.2% : อะซิโตไนไตรล์ ในสัดส่วน 17:3 ปริมาตรต่อปริมาตร

ชนิดที่ 2 ประกอบด้วย เอธิลอะซิเตต : อะซิโตน : ฟอร์มิคแอซิด : น้ำ ในสัดส่วน 8:2:1:1 ปริมาตรต่อปริมาตร

โดยผลการทดลองปรากฏว่า mobile phase ชนิดที่ 1 ไม่สามารถแยกสารตัวอย่างได้ (แผนภูมิที่ 3) แต่ mobile phase ชนิดที่ 2 สามารถแยกสารตัวอย่างได้ชัดเจน (แผนภูมิที่ 4)

แผนภูมิที่ 3 การแยกสารสกัดแมงจิเฟอริน สารมาตรฐานแกลลิคแอซิด สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และสารมาตรฐานคาเทชิน บนแผ่นซิลิกาอลูมิเนียม โดยใช้ mobile phase ชนิดที่ 1

แผนภูมิที่ 4 การแยกสารสกัดแมงจิเฟอริน สารมาตรฐานแกลลิคแอซิด สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และสารมาตรฐานคาเทชิน บนแผ่นซิลิกาอลูมิเนียม โดยใช้ mobile phase ชนิดที่ 2



จากการแยกสารด้วย mobile phase ทั้ง 2 ชนิด ปรากฏว่า mobile phase ชนิดที่ 2 คือ สารละลายที่ประกอบด้วย เอธิลอะซิเตต: อะซิโตน: ฟอร์มิคแอซิด: น้ำ ในสัดส่วน 8:2:1:1 ปริมาตรต่อปริมาตร สามารถแยกสารสกัดแมงจิเฟอรินได้ และหาความสัมพันธ์ระหว่างระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่กับระยะทางที่ mobile phase เคลื่อนที่ ดังนี้

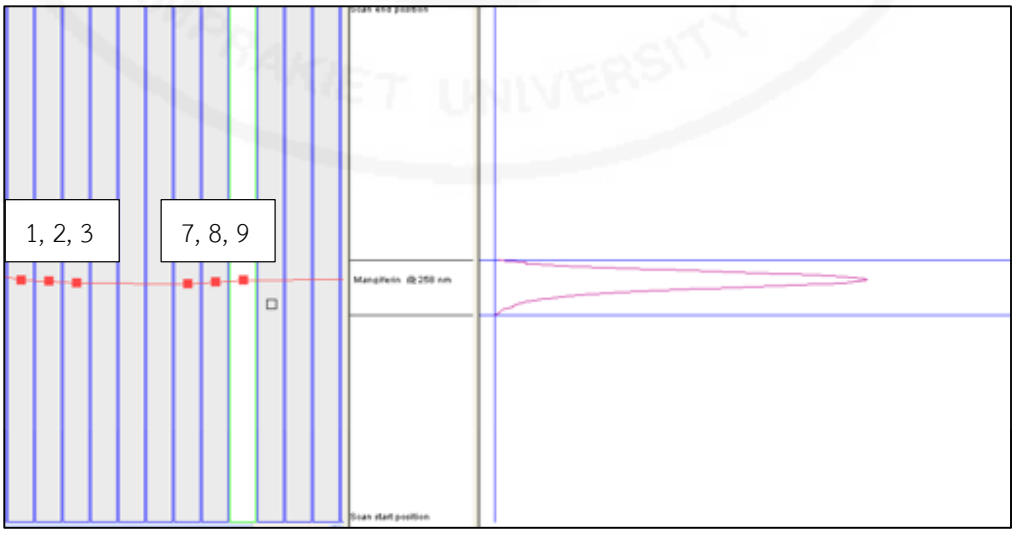
$$Rf_{TLC} \text{ ของ สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน} = \frac{64 \text{ มิลลิเมตร}}{150 \text{ มิลลิเมตร}} = 0.43$$

$$Rf_{TLC} \text{ ของ สารสกัดแมงจิเฟอริน} = \frac{64 \text{ มิลลิเมตร}}{150 \text{ มิลลิเมตร}} = 0.43$$

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดใบมะม่วงด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography: HPTLC)

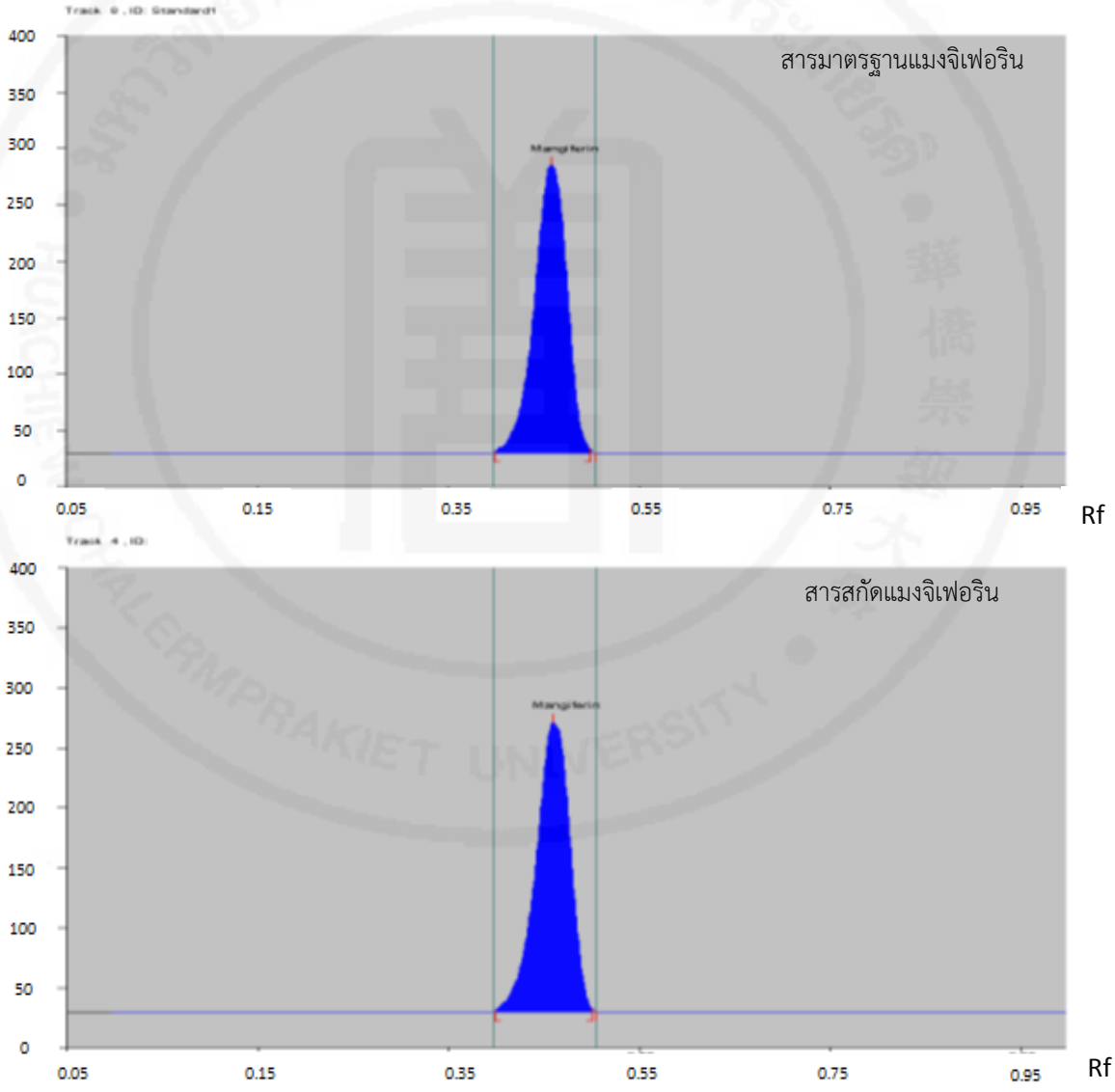
ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (แผนภูมิที่ 5) จะได้ค่า R_f ของสารสกัดแมงจิเฟอรินในแต่ละแถบเท่ากับ 0.46, 0.47, 0.47 และสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินในแต่ละแถบเท่ากับ 0.46, 0.46, 0.47 ดังนี้

แผนภูมิที่ 5 การแยกสารสกัดแมงจิเฟอรินแถบ ที่ 1, 2, 3 และ สารมาตรฐานแมงจิเฟอรินแถบ ที่ 7, 8, 9 ด้วย HPTLC บนแผ่นซิลิกาอลูมิเนียม โดยใช้ mobile phase ชนิดที่ 2



การวิเคราะห์สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และ สารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และสารสกัดแมงจิเฟอรินปรากฏในตำแหน่ง R_f เท่ากับ 0.46 – 0.47 ดังแผนภูมิที่ 6 และคำนวณหาปริมาณร้อยละแมงจิเฟอรินจากพื้นที่ใต้พีกได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 94.24 ดังตารางที่ 13

แผนภูมิที่ 6 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และ สารสกัดแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



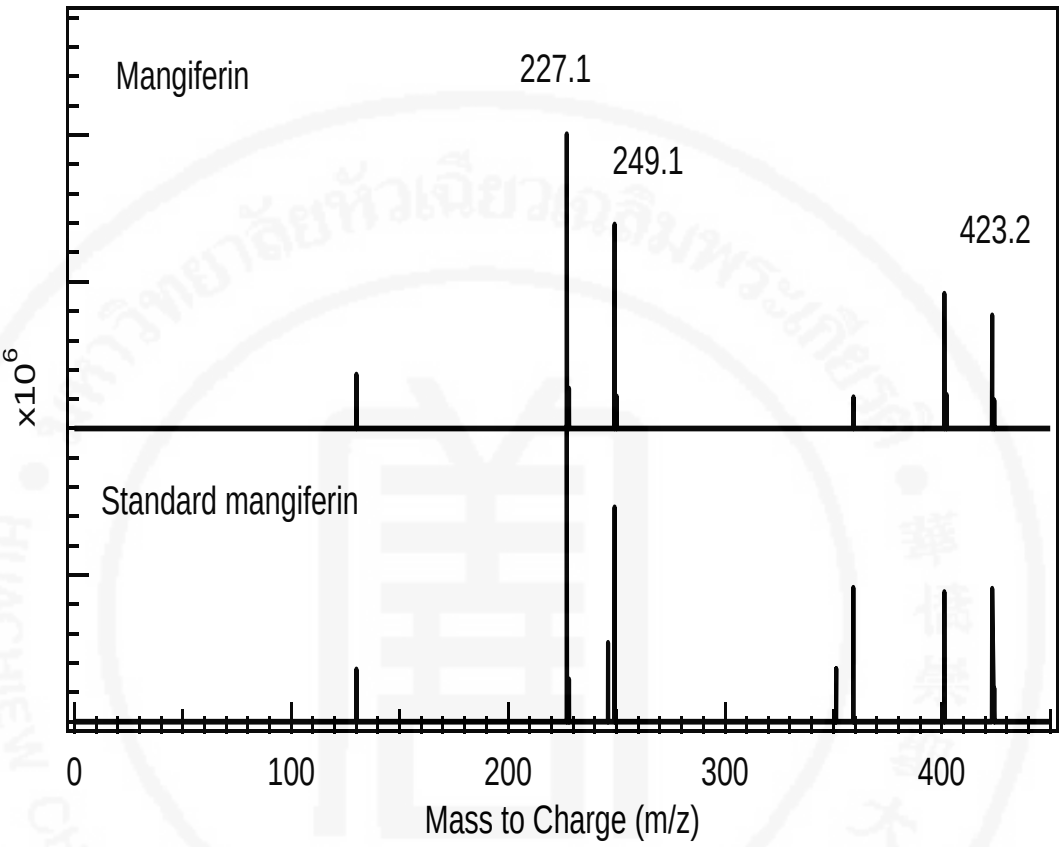
ตารางที่ 13 ปริมาณร้อยละของสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดใบมะม่วงน้ำดอกไม้เทียบกับสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน

พื้นที่ใต้พีกที่ความเข้มข้น 500 µg/ml	ผลการทดลองครั้งที่			เฉลี่ย	%RSD	ร้อยละสารสกัดแมงจิเฟอริน
	1	2	3			
สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน	12517.5	12445.7	10120.0	11694.0	11.7	
สารสกัดแมงจิเฟอริน	12367.5	10703.6	9989.6	11020.0	11.1	94.24

4.5 การยืนยันชนิดและความบริสุทธิ์ของสารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรมิเตอร์ (Liquid Chromatography - Mass Spectrometer : LC-MS/MS)

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค LC-MS/MS วิเคราะห์พบโมเลกุลไอออนที่พีค 423.2 m/z ซึ่งคาดการณ์ได้ว่า เป็นสารแมงจิเฟอรินซึ่งมีสูตรโครงสร้างคือ $C_{19}H_{18}O_{11}$ มีมวลโมเลกุล 422.33 g/mol เมื่อผ่านการทำอิเลคโตรสเปรย์ไอออนไนเซชั่น ทำให้โมเลกุลมีประจุ H^+ เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบพีคที่ 227 m/z และ 249 m/z ซึ่งคือสารประกอบที่มีมวลโมเลกุล 196 ดาลตัล ($C_6H_{12}O_7$) และ 174 ดาลตัล ($C_6H_6O_6$) ซึ่งพีคต่าง ๆ นี้ พบที่เดียวกับสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน ดังแผนภูมิที่ 7

แผนภูมิที่ 7 แมสสเปคตรัมของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และ สารสกัดแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาระสำคัญในสารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) พบค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินกับสารสกัดแมงจิเฟอรินมีค่าเท่ากัน คือ 0.43 แสดงว่าสารสกัดที่ได้เป็นแมงจิเฟอริน และการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (HPTLC) พบว่าสารสกัดแมงจิเฟอรินมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 94.24 และยืนยันชนิดและความบริสุทธิ์ด้วยลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรมิเตอร์ (LC-MS/MS) พบแมสสเปคตรัมของสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน และของสารสกัดแมงจิเฟอริน มีลักษณะเดียวกัน มีมวลโมเลกุล 423.2 m/z เนื่องจากเกิดไฮโดรเจนโปรโตเน็ตเตต ดังนั้น ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ สารสกัดสรุปได้ว่าเป็นแมงจิเฟอริน

4.6 การหาค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้สำหรับการทดลองครั้งนี้ดังแสดงในตารางที่ 14 มีค่าความมีขั้วที่ แตกต่างกัน ดังนี้

ตารางที่ 14 ค่าความมีขั้วของตัวทำละลายที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดตัวทำละลาย	ค่าความมีขั้ว
Ethoxydiglycol	8.59
Polyethylene glycol 600 [PEG 600]	12.7
Polyethylene glycol 400 [PEG 400]	12.4 - 14.1
Cremophor RH 40	16.9
Ethanol	24.3
Dipropylene glycol [DPG]	31.69
Propylene glycol [PG]	32.1
Methanol	32.6
Glycerin	42.5
DI-water	79.7
Dimethyl isosorbide [DMI]	-
Isopentyldiol	-

การศึกษาค่าการละลายทำโดยใช้ สารสกัดแมงจิเฟอริน 0.2 กรัม ละลายในตัวทำละลายที่มีค่า dielectric constant ต่างๆ กัน ปั่นกวนที่ 170 rpm ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 27.5$\pm$2.12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) นำส่วนใสมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ การทดลองพบว่า อีท็อกซีไดไกลคอล (ethoxydiglycol) สามารถทำละลายสารสกัดแมงจิเฟอรินได้ดีที่สุด มีค่าการละลายเท่ากับ 8.3211 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายอื่น ๆ ปรากฏตามตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายต่าง ๆ ณ อุณหภูมิ 27.5±2.12 องศาเซลเซียส

ตัวทำละลาย	ค่าการละลายแมงจิเฟอริน (mg/ml)	ค่าการละลายแมงจิเฟอริน (mg/ml)	SD	%RSD
Methanol	1.0162 1.0162 1.0134	1.0153	0.0017	0.1635
Ethanol	0.3171 0.3174 0.3185	0.3177	0.0008	0.2386
Ethoxydiglycol	8.3157 8.3174 8.3303	8.3211	0.0080	0.0963
Glycerin	1.7565 1.7752 1.7795	1.7704	0.0122	0.6905
Isopentyldiol	1.5855 1.5811 1.5955	1.5874	0.0074	0.4647
Dimethyl isosorbide	7.9546 7.9690 7.9402	7.9546	0.0144	0.1807
Propylene glycol	3.7128 3.6841 3.6884	3.6951	0.0155	0.4196
Dipropylene glycol	2.6017 2.5686 2.6046	2.5916	0.0200	0.7705

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ตัวทำละลาย	ค่าการละลายแมงจิเฟอริน (mg/ml)	ค่าการละลายแมงจิเฟอริน (mg/ml)	SD	%RSD
Cremophor RH 40	1.7838 1.8054 1.8083	1.7991	0.0134	0.7423
Polyethylene glycol 400	5.4866 5.4909 5.4880	5.4885	0.0022	0.0400
Polyethylene glycol 600	3.7214 3.7071 3.6970	3.7085	0.0123	0.3312
DI water	0.1747 0.1740 0.1739	0.1742	0.0005	0.2647

4.7 การหาค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม

การศึกษาค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอริน ในระบบตัวทำละลายร่วมในน้ำที่สัดส่วนต่าง ๆ (volume fraction) ทำโดยการเติมสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.2 กรัม ในตัวทำละลายร่วมร้อยละ 10, 20, 30, 40 และ 50 ปรับปริมาณด้วยน้ำปราศจากไอออน ให้ได้ตัวทำละลายร่วม 20 กรัม และปั่นกวนที่ 170 rpm ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 27.5$\pm$2.12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วแยกส่วนใส วิเคราะห์ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ การทดลองพบว่า ระบบตัวทำละลายร่วมทั้ง 11 ชนิด มีลักษณะเป็นสารละลายใสไม่แยกชั้น ยกเว้น Cremophor RH40 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 ในน้ำมีสภาวะเป็นของเหลวกึ่งแข็ง จึงไม่เหมาะใช้เป็นตัวทำละลายสารแมงจิเฟอรินได้ ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอริน ในตัวทำละลายร่วมกับน้ำ ณ อุณหภูมิ 27.50 ± 2.12 องศาเซลเซียส

ค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)											
ร้อยละตัวทำละลายร่วม	Methanol	Ethanol	Ethoxydiglycol	Glycerin	Isopentyldiol	Dimethyl isosorbide	Propylene glycol	Dipropylene glycol	Poly ethylene glycol	Poly ethylene glycol 600	Cremophor RH40
10	0.10	0.42	0.42	0.15	0.19	0.43	1.73	0.23	0.40	0.37	0.10
20	0.17	0.75	0.83	0.26	0.42	0.63	2.91	0.17	0.76	0.13	1.88
30	0.48	0.97	0.91	0.62	0.77	1.90	4.56	0.55	0.87	0.17	3.39
40	0.65	1.50	1.58	1.17	1.93	3.42	0.72	1.18	3.39	0.47	-
50	0.73	2.09	2.48	1.76	3.77	8.16	2.15	7.47	7.97	1.28	-

จากตารางที่ 15 และ 16 นำค่าการละลายที่ได้ มาหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าการละลายของแมงจิเฟอรินกับสัดส่วนตัวทำละลายร่วมตามสมการของ YALKOWSKY ดังนี้

$$\text{Log } M_m = \text{log } M_w + \sigma.f_i$$

โดย M_m = ค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

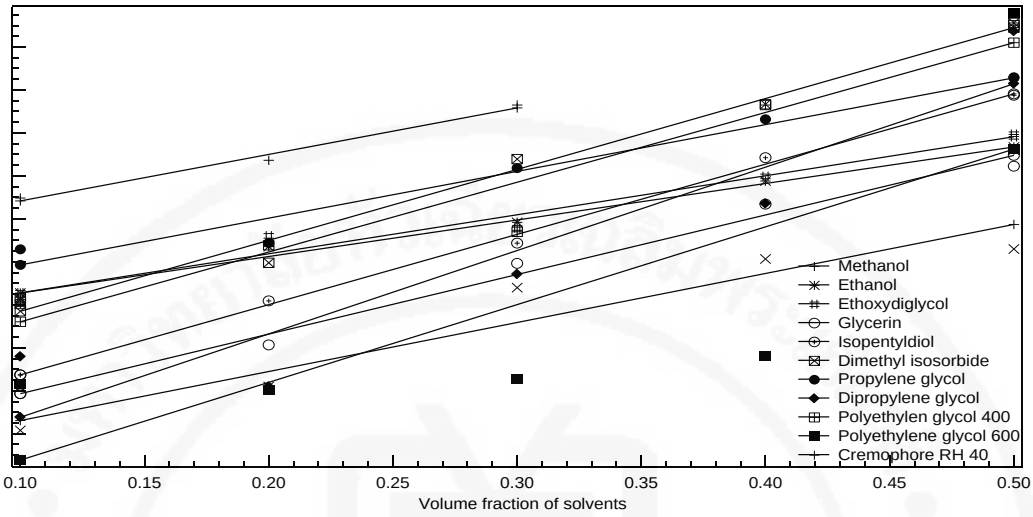
M_w = ค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในน้ำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

σ = ค่าความสามารถของการละลาย (solubilization power)

f_i = ค่าสัดส่วนตัวทำละลายร่วมโดยปริมาตร (volume fraction)

เมื่อนำค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม และ ค่าสัดส่วนตัวทำละลายร่วมมาเขียนกราฟ จะได้กราฟเส้นตรงตามสมการของ log-linear model ของ YALKOWSKY (แผนภูมิที่ 8) โดยสมการเส้นตรงที่ได้จากระบบตัวทำละลายร่วมที่ทำการศึกษา แสดงในตารางที่ 17

แผนภูมิที่ 8 ความสัมพันธ์ของค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วมกับสัดส่วนโดยปริมาตรของตัวทำละลาย ตามสมการ log-linear model



จากสมการ พบตัวทำละลายแต่ละตัวมีค่าความสามารถในการละลายแตกต่างกัน ซึ่งแสดงออกโดยค่า solubilization power (σ) ซึ่งได้จากค่าความชันของเส้นกราฟจากสมการของ YALKOWSKY จากการทดลองพบว่า ไดโพรพิลีนไกลคอล (dipropylene glycol) มีค่าความสามารถในการทำละลาย (σ) แมงจิเฟอรินเท่ากับ 3.8802 ใกล้เคียงกันกับโพลีเอทิลีนไกลคอล 600 (polyethylene glycol 600) ซึ่งได้เท่ากับ 3.5256 ตามปรากฏในตารางที่ 17

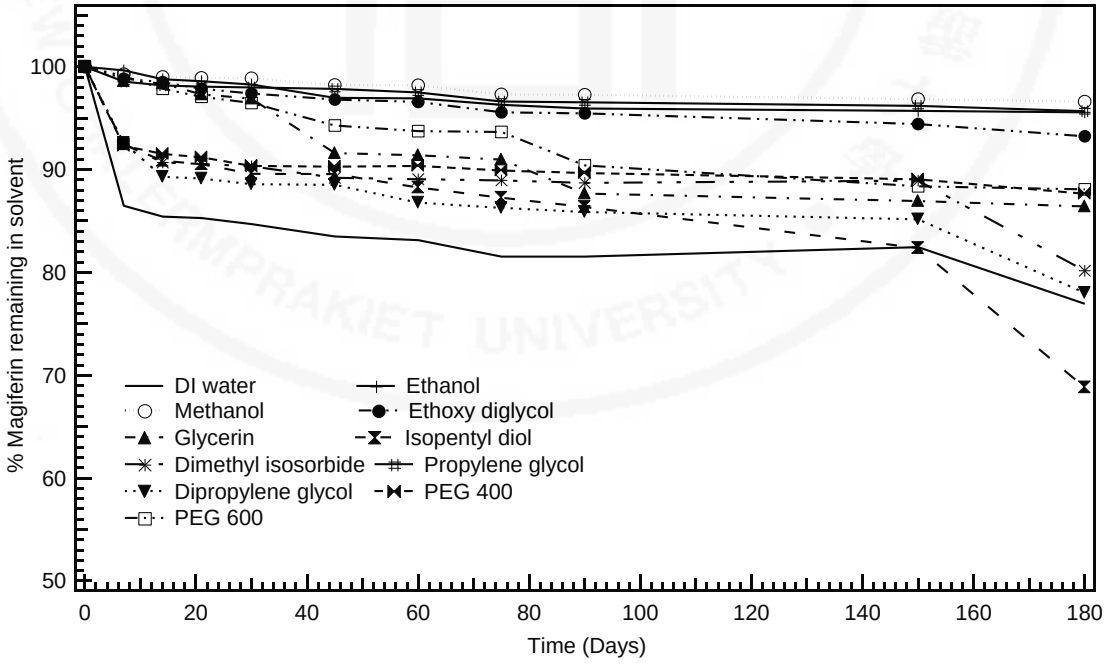
ตารางที่ 17 สมการของ YALKOWSKY ของสารสกัดแมงจิเฟอรินในระบบตัวทำละลายร่วมต่าง ๆ และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของสมการ

ชนิดตัวทำละลาย	สมการเส้นตรง	r^2
Ethanol	y = 1.6996x - 0.5151	0.9875
Ethoxydiglycol	y =1.8158x - 0.5256	0.9652
Propylene glycol	y = 2.1768x - 0.4320	0.9605
Methanol	y = 2.2814x - 1.1666	0.9112
Glycerin	y = 2.7726x - 1.0906	0.9868
PEG 400	y = 3.2473x - 0.8037	0.9388
Isopentyldiol	y = 3.2696x - 1.0531	0.9973
Dimethyl isosorbide	y = 3.3002x - 0.7601	0.9836
PEG 600	y = 3.5256x - 0.8202	0.9714
Dipropylene glycol	y = 3.8802x - 1.3112	0.8623

4.8 การศึกษาความคงตัวของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย

การศึกษาความคงตัวของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายต่าง ๆ โดยการเติมสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.2 กรัม ในตัวทำละลาย 20 กรัม ปั่นกวนที่ 170 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 27.5±2.12 องศาเซลเซียส และนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใส เก็บเป็นตัวอย่างสำหรับนำไปศึกษาความคงตัว ที่อุณหภูมิ 27.5±2.12 องศาเซลเซียส ในที่มืด โดยนำตัวอย่างที่เก็บในที่มืดมาวิเคราะห์หาปริมาณแมงจิเฟอรินที่เหลืออยู่ในตัวทำละลายต่าง ๆ ทุก ๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 180 วัน โดยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ผลการทดลองดังแผนภูมิที่ 9 ซึ่งผลการศึกษาความคงตัวของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายทั้ง 11 ชนิด พบว่า ปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอรินเหลืออยู่ต่ำกว่าร้อยละ 90 ภายในเวลา 14 วันแรก ในตัวทำละลาย DI-water และ dipropylene glycol และที่เวลาผ่านไป 180 วัน พบว่า ปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอรินที่เหลืออยู่มากกว่าร้อยละ 88 ในตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ methanol, ethanol, ethoxydiglycol, propylene glycol, PEG 600

แผนภูมิที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดแมงจิเฟอรินที่เหลืออยู่ในตัวทำละลายต่าง ๆ กับระยะเวลา



ดังนี้ จากผลการศึกษาค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย พบว่าตัวทำละลายที่สามารถทำละลายแมงจิเฟอรินได้ดี คือ อีท็อกซีไดไกลคอล แต่ในการตั้งตำรับตัวทำละลายที่อยู่ในตำรับจะอยู่ในระบบตัวทำละลายร่วม ซึ่งการศึกษาในระบบตัวทำละลายร่วม พบว่า dipropylene glycol มีค่าความสามารถในการละลายได้ดีที่สุดแต่เมื่อศึกษาความคงตัวของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย พบว่า dipropylene glycol ใน 14 วันแรกมีการสลายตัวของแมงจิเฟอรินเหลืออยู่ต่ำกว่าร้อยละ 90 ในขณะเดียวกัน PEG 600 ได้ค่าการสลายตัวของแมงจิเฟอรินเมื่อผ่านไป 180 วัน ปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอรินยังคงมีปริมาณมากกว่าร้อยละ 88 ในตัวทำละลาย PEG 600 ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้เลือกตัวทำละลายในการนำไปตั้งตำรับโทนเนอร์ต่อไปด้วยกัน 2 ชนิด คือ dipropylene glycol และ PEG 600

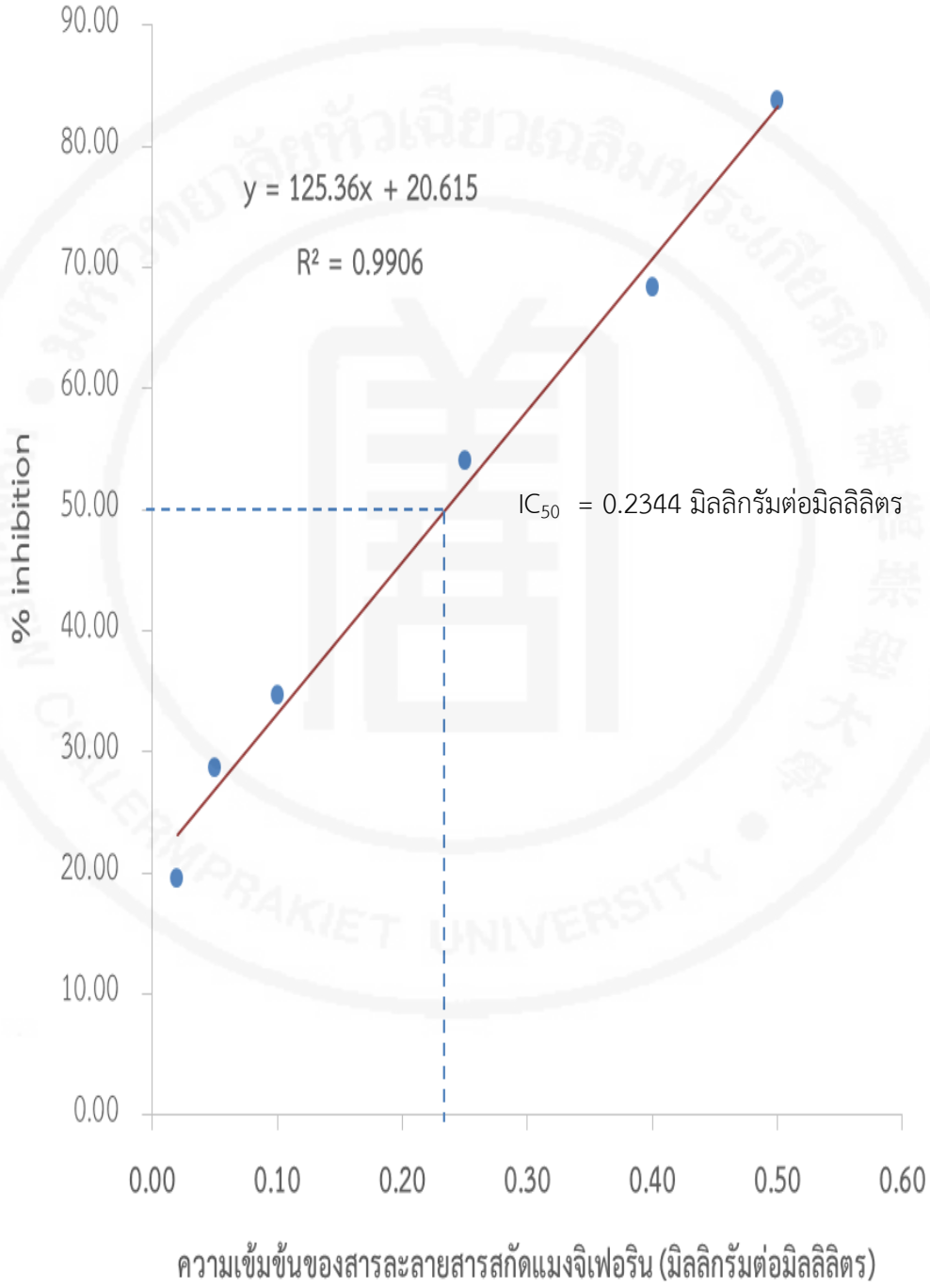
4.9 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแมงจิเฟอริน

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแมงจิเฟอริน ทำโดยการศึกษาความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS เทียบกับสารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิคแอซิด ความบริสุทธิ์ 99.7% และสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ความบริสุทธิ์ 97%

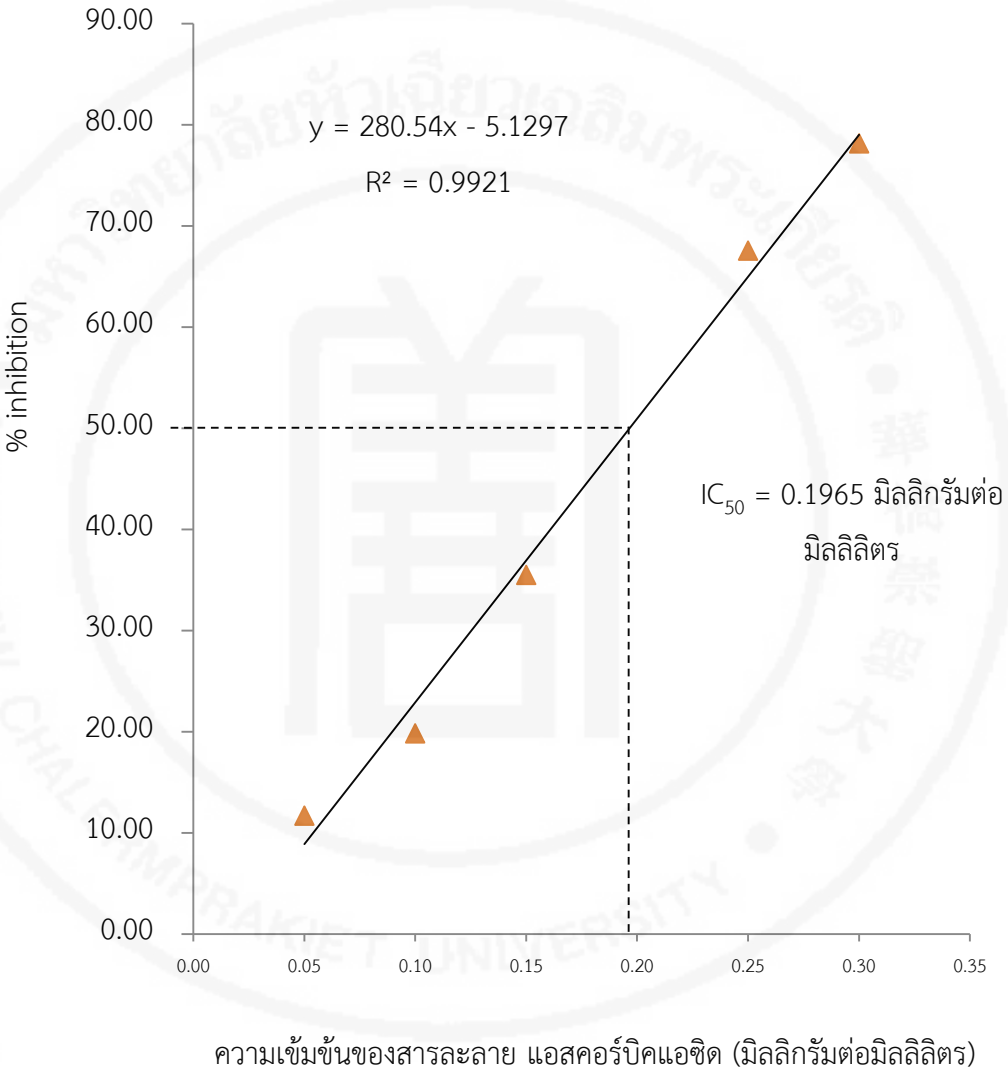
4.9.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดแมงจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.05, 0.10, 0.25, 0.40, 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิคแอซิด ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.25, 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.09, 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในแผนภูมิที่ 10, 11, 12 ตามลำดับ

จากผลการทดลองค่าความเข้มข้นของสารสกัดแมงจิเฟอริน, แอสคอร์บิคแอซิด, โทรลอกซ์ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ IC_{50} มีค่าเท่ากับ 0.2344, 0.1965, 0.1008 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 18

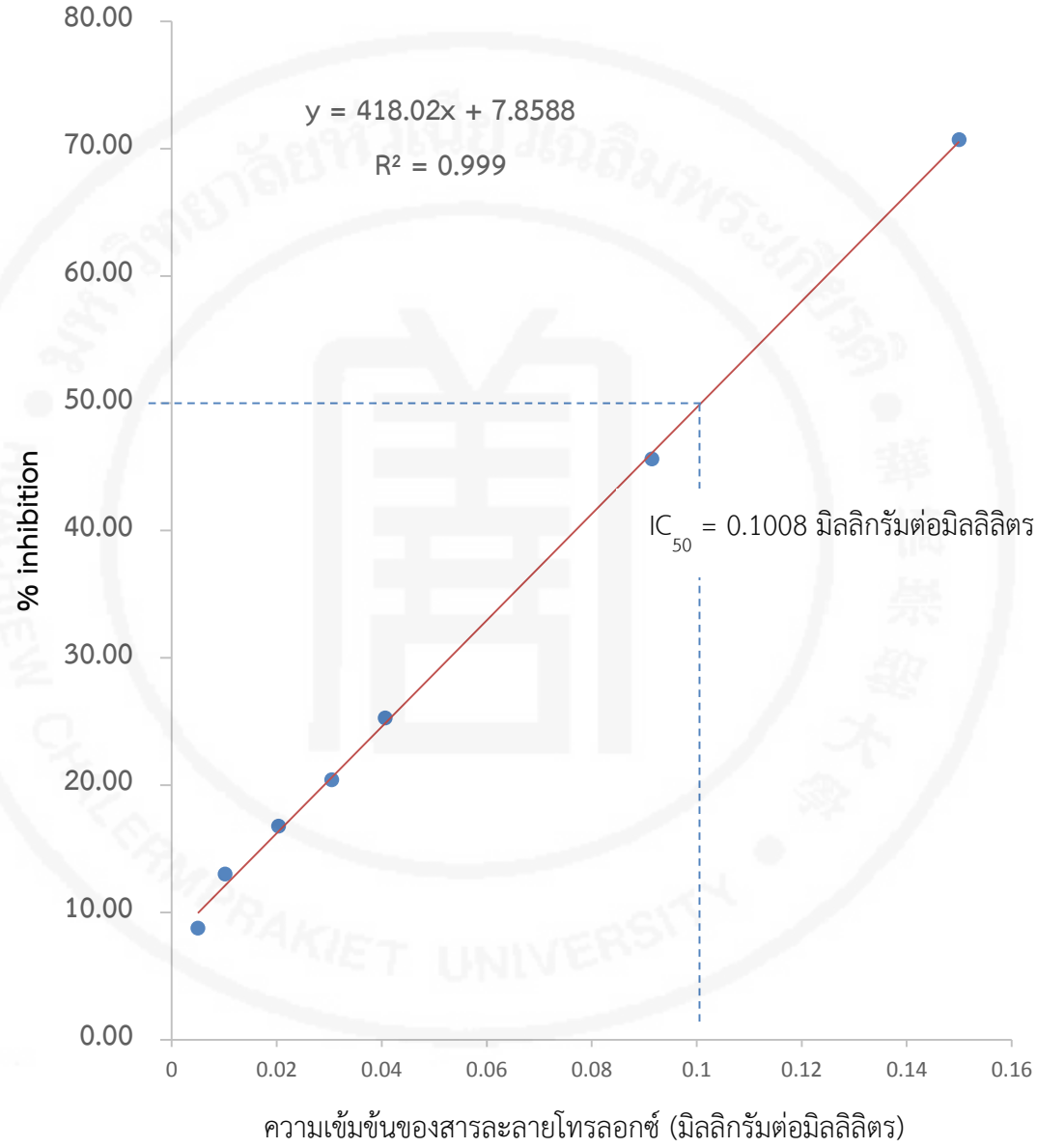
แผนภูมิที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดแมงจิเฟอริน



แผนภูมิที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิคแอซิด



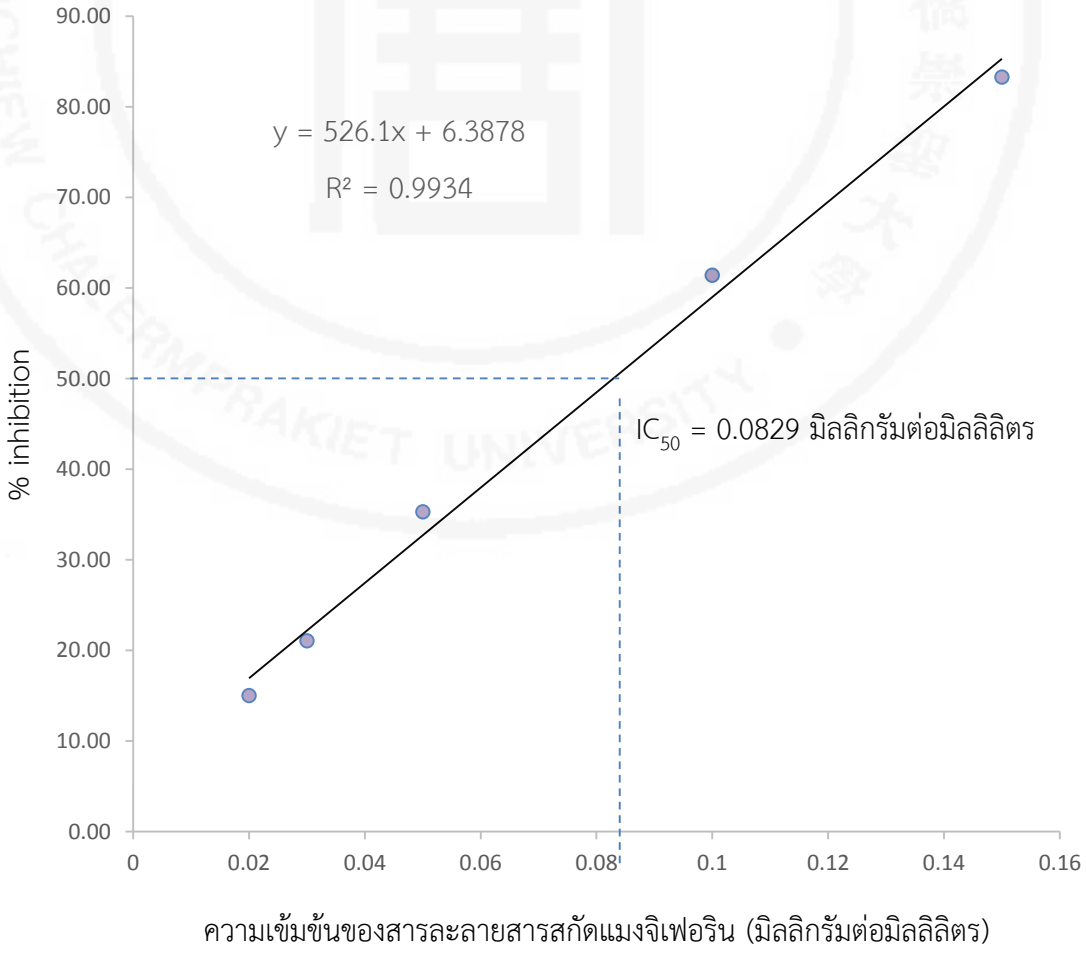
แผนภูมิที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์



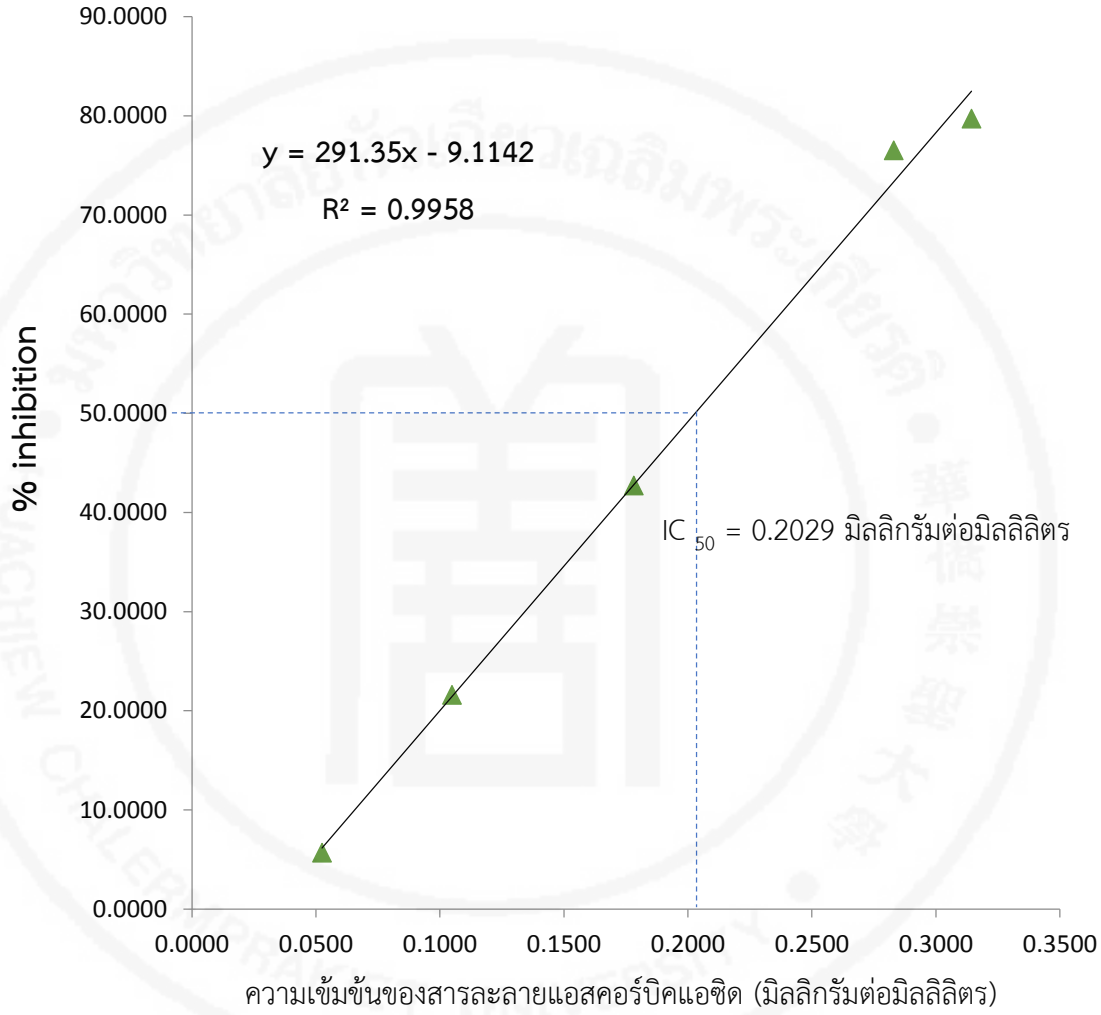
4.9.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดแมงจิเฟอริน ที่ความเข้มข้น 0.02, 0.03, 0.05, 0.10, 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิคแอซิด ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.25, 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ ความเข้มข้น 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.09, 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในแผนภูมิที่ 13, 14, 15 ตามลำดับ

จากผลการทดลอง ค่าความเข้มข้นของสารสกัดแมงจิเฟอริน, แอสคอร์บิคแอซิด,โทรลอกซ์ ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ IC_{50} มีค่าเท่ากับ 0.0829, 0.2029, 0.0635 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 18

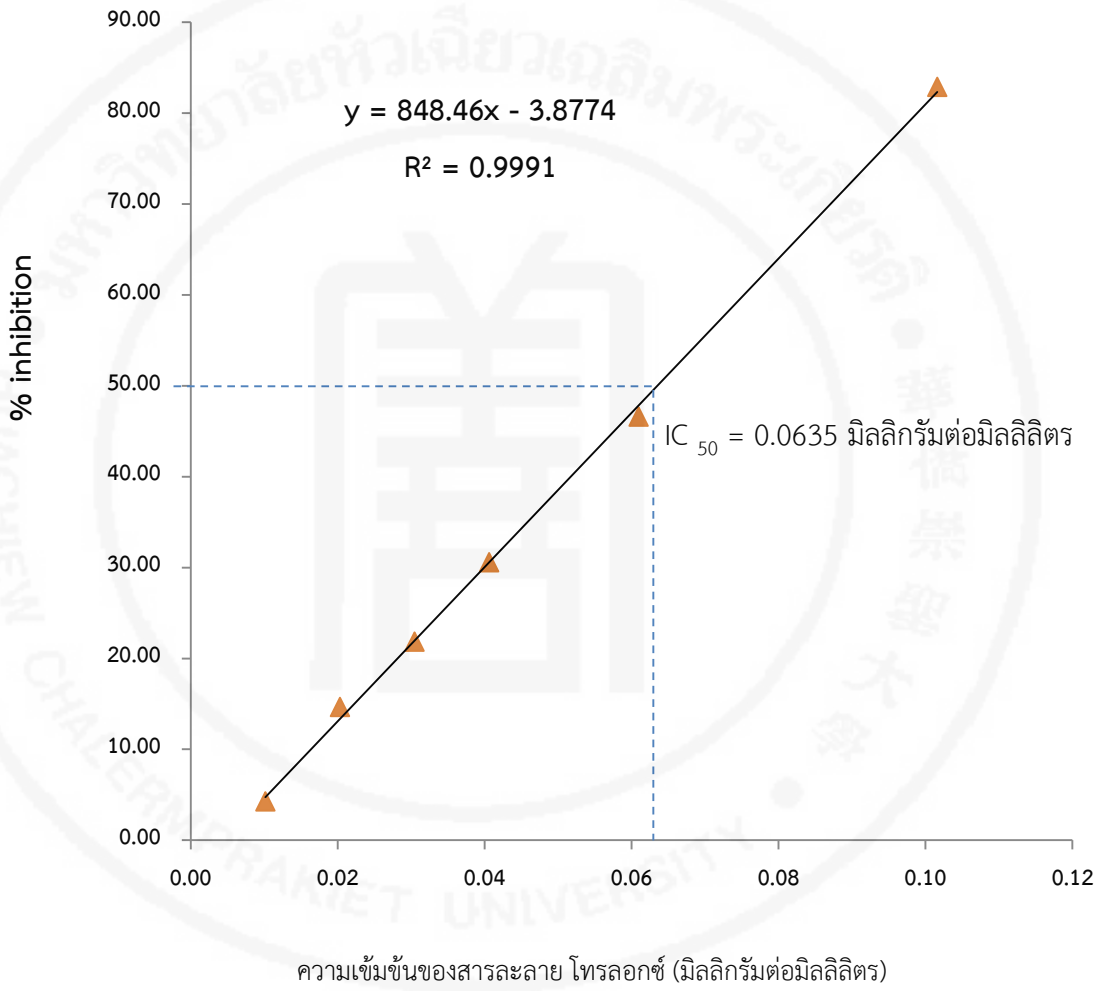
แผนภูมิที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารละลายสารสกัดแมงจิเฟอริน



แผนภูมิที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแอสคอร์บิคแอซิด



แผนภูมิที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์



ตารางที่ 18 ค่า IC_{50} เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแมงจิเฟอรินและสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานแอสคอร์บิคแอซิด และ โทรลอกซ์

อนุมูลอิสระ	ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	โทรลอกซ์	แอสคอร์บิคแอซิด	สารสกัดแมงจิเฟอริน
ABTS	0.0635	0.2029	0.0829
DPPH	0.1008	0.1965	0.2344

ผลจากจากการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแมงจิเฟอริน พบความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) คือ ที่ปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอรินเท่ากับ 0.2344 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเป็นค่าที่นำไปสำหรับการตั้งตำรับต่อไปในข้อ 4.10

4.10 การพัฒนาตำรับเครื่องสำอางในรูปแบบโทนเนอร์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดแมงจิเฟอริน

จากการศึกษาค่าการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอริน พบว่า ระบบตัวทำละลายร่วมที่สามารถทำละลายสารสกัดแมงจิเฟอรินได้ดี คือ ตัวทำละลายร่วม dipropylene glycol กับ น้ำ ซึ่งมีค่าความสามารถของการละลายเท่ากับ 3.8802 เมื่อพิจารณาความคงตัวของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย พบว่า polyethylene glycol 600 สามารถรักษาความคงตัวของสารสกัดแมงจิเฟอรินได้ดี จึงเลือกใช้ตัวทำละลายทั้งสองในการตั้งตำรับ โดยใช้ปริมาณของตัวทำละลายในตำรับจากการคำนวณตามสมการของ YALKOWSKY ด้วยการนำค่าการละลายของแมงจิเฟอริน ณ ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) คือ ที่ปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอรินเท่ากับ 0.2344 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาแทนค่าในสมการเพื่อคำนวณสัดส่วนตัวทำละลายที่ต้องใช้ในการละลายสารสกัดแมงจิเฟอริน

$$f_i = \frac{\text{Log } M_m - \text{log } M_w}{\sigma}$$

โดย M_m = ค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายร่วม (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

M_w = ค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในน้ำ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

σ = ค่าความสามารถของการละลาย (solubilization power)

f_i = ค่าสัดส่วนตัวทำละลายร่วมโดยปริมาตร (volume fraction)

ผลจากการคำนวณนำมาพัฒนาสูตรตำรับโทนเนอร์ โดยได้สัดส่วนตัวทำละลายร่วมโดยปริมาตร ซึ่งมีค่าเท่ากับปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.05%, 0.10% และ 0.50% w/w ตามลำดับ ในตัวทำละลาย dipropylene glycol และ PEG 600 ซึ่งเทียบเท่ากับแมงจิเฟอรินในปริมาณ 2.17 เท่า, 4.35 เท่า และ 21.74 เท่า ของค่า IC_{50} ของ DPPH ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ปริมาณทำตัวละลายที่ต้องใช้ในการละลายสารสกัดแมงจิเฟอรินจากการคำนวณโดยสมการ YALKOWSKY

สูตรที่	ปริมาณ (%w/w)		
	สารสกัดแมงจิเฟอริน	Polyethylene glycol 600	Dipropylene glycol
1	0.05	13.13	-
2	0.10	23.70	-
3	0.05	-	11.20
4	0.10	-	20.22
5	0.50	-	40.00
6	0.50	40.00	-

จากค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลายจึงเป็นผลให้ ได้สูตรตำรับที่จะพัฒนาขึ้นด้วยกัน 6 สูตร แสดงดังต่อไปนี้

สูตรที่ 1 ตำรับโทนเนอร์ประกอบด้วย

Allantoin	0.10	% w/w
Disodium EDTA	0.05	% w/w
Witch Hazel extract	3.00	% w/w
Chamomile extract	4.80	% w/w
Germaben II	0.50	% w/w
Mangiferin extract	0.05	% w/w
Polyethylene glycol 600	13.13	% w/w
DI water	78.37	% w/w

สูตรที่ 2 ตำรับโทนเนอร์ประกอบด้วย

Allantoin	0.10	% w/w
Disodium EDTA	0.05	% w/w
Witch Hazel extract	3.00	% w/w
Chamomile extract	4.80	% w/w
Germaben II	0.50	% w/w
Mangiferin extract	0.10	% w/w
Polyethylene glycol 600	23.70	% w/w
DI water	67.75	% w/w

สูตรที่ 3 ตำรับโทนเนอร์ประกอบด้วย

Allantoin	0.10	% w/w
Disodium EDTA	0.05	% w/w
Witch Hazel extract	3.00	% w/w
Chamomile extract,	4.80	% w/w
Germaben II	0.50	% w/w
Mangiferin extract	0.05	% w/w
Dipropylene glycol	11.20	% w/w
DI water	80.30	% w/w

สูตรที่ 4 ตำรับโทนเนอร์ประกอบด้วย

Allantoin	0.10	% w/w
Disodium EDTA	0.50	% w/w
Witch Hazel extract	3.00	% w/w
Chamomile extract	4.80	% w/w
Germaben II	0.50	% w/w
Mangiferin extract	0.10	% w/w
Dipropylene glycol	20.22	% w/w
DI water	71.23	% w/w

สูตรที่ 5 ตำรับโทนเนอร์ประกอบด้วย

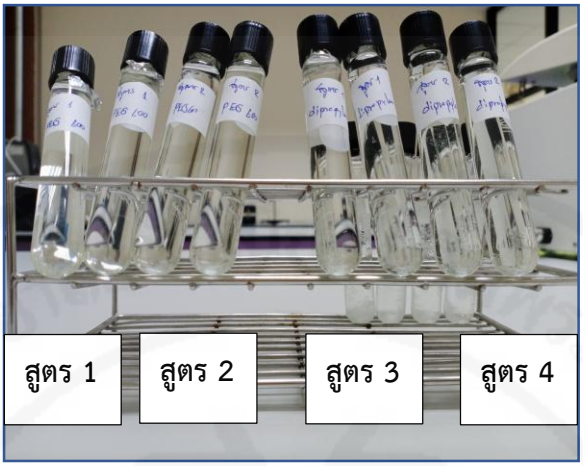
Allantoin	0.10	% w/w
Disodium EDTA	0.50	% w/w
Witch Hazel extract	3.00	% w/w
Chamomile extract	4.80	% w/w
Germaben II	0.50	% w/w
Mangiferin extract	0.50	% w/w
Dipropylene glycol	40.00	% w/w
DI water	50.60	% w/w

สูตรที่ 6 ตำรับโทนเนอร์ประกอบด้วย

Allantoin	0.10	% w/w
Disodium EDTA	0.50	% w/w
Witch Hazel extract	3.00	% w/w
Chamomile extract	4.80	% w/w
Germaben II	0.50	% w/w
Mangiferin extract	0.50	% w/w
Polyethylene glycol 600	40.00	% w/w
DI water	50.60	% w/w

จากการเตรียมตำรับตามสูตรทั้ง 6 สูตรที่มีปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอรินในตำรับ 0.05, 0.1 และ 0.5 %w/w โดยใช้ปริมาณตัวทำละลายจากการคำนวณค่าการละลายตามสมการ YALKOWSKY พบว่าตำรับที่เตรียมได้มีลักษณะใส สีเหลืองอ่อน ไม่พบตะกอน ดังภาพที่ 9 แต่จากการคาดการณ์ตำรับที่มีปริมาณแมงจิเฟอรินมากย่อมตกตะกอนได้ง่ายกว่าตำรับที่มีปริมาณ แมงจิเฟอรินน้อยกว่าเมื่อตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลานาน ดังนั้นการศึกษาความคงตัวจึงนำตำรับสูตร 5 และ 6 ไปทำการศึกษาต่อไป

ภาพที่ 9 ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ทั้ง 6 สูตร



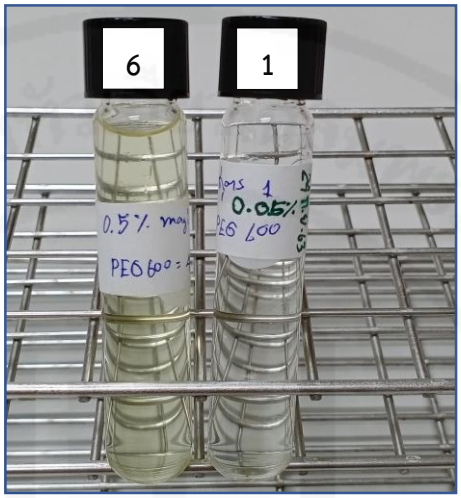
4.11 การศึกษาความคงตัวทางกายภาพแบบสภาวะสลับอุณหภูมิ ของตำรับเครื่องสำอางโทนเนอร์สูตร 6 ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม และตัวทำละลาย polyethylene glycol 600

ผลการศึกษาความคงตัวของตำรับที่เก็บไว้ในสภาวะสลับอุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ ที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำซ้ำ 6 รอบ พบว่าโทนเนอร์สารสกัดแมงจิเฟอริน มีสีเหลืองใส ไม่มีกลิ่น ไม่ตกตะกอน หรือมีการแยกชั้น มีความหนืด 7.85 - 15.2 CPs ที่อุณหภูมิ 27.2–30.2 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 60 rpm โดยใช้ spindle ขนาด S18 ด้วยเครื่อง viscometer มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ช่วง 5.16-5.88 ลักษณะผลิตภัณฑ์แสดงดังภาพที่ 10

ภาพที่ 10 ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์สูตรที่ 1 และ สูตร 6 ที่ผ่านสภาวะสลับอุณหภูมิ

สูตร 6 : ประกอบด้วยแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม ใช้ตัวทำละลาย polyethylene glycol 600

สูตร 1 : ประกอบด้วยแมงจิเฟอริน 0.05 กรัม ใช้ตัวทำละลาย polyethylene glycol 600



4.12 การศึกษาความคงตัวของตำรับโทนเนอร์ ในสภาวะต่าง ๆ ดังนี้

ผลการศึกษาความคงตัวของโทนเนอร์สารสกัดแมงจิเฟอริน ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5$\pm$2 องศาเซลเซียส 30$\pm$2 องศาเซลเซียส และ 45$\pm$2 องศาเซลเซียส พบว่า

สูตรที่ 5 ประกอบด้วย แมงจิเฟอริน 0.5 กรัม ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ ได้ผลตามตารางที่ 20, 21 ผลิตภัณฑ์มีลักษณะดังภาพ 11

สูตรที่ 6 ประกอบด้วยแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม ที่ระยะเวลา 16 สัปดาห์ ได้ผลตามตารางที่ 22, 23 ผลิตภัณฑ์มีลักษณะดังภาพ 12

ตารางที่ 20 ความคงตัวทางกายภาพของสูตรที่ 5 ที่ประกอบด้วยสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 8 สัปดาห์

คุณสมบัติ	**อุณหภูมิ**		
ทางกายภาพ	**5±2 °C**	**30±2 °C**	**45±2 °C**
ลักษณะที่ปรากฏ	สีเหลืองใส ไม่มีกลิ่น แยกชั้น ตกตะกอน	สีเหลืองใส ไม่มีกลิ่น ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน	สีเหลืองใส ไม่มีกลิ่น ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน
ความหนืด (CPs)	7.07±0.0252	7.43±0.0252	7.12±0.0252
ความเป็น กรด-ด่าง	4.3213±0.0251	4.2397±0.0331	4.0547±0.0430

ตารางที่ 21 ปริมาณร้อยละของสารสกัดแมงจิเฟอรินที่เหลืออยู่ ในสูตรตำรับที่ 5 เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 8 สัปดาห์

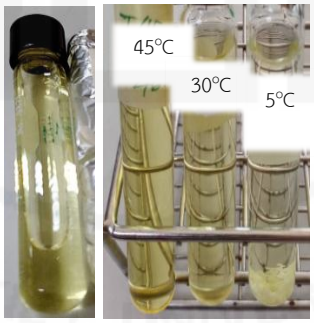
ระยะเวลา (สัปดาห์)	**ร้อยละแมงจิเฟอรินที่เหลืออยู่ที่อุณหภูมิต่างๆ (mean±SD)**		
	5±2 °C	**30±2 °C**	**45±2 °C**
0	96.459±0.030	96.459±0.030	96.459±0.030
4	89.569±0.030	92.434±0.019	93.920±0.025
8	85.017±0.035	87.289±0.010	90.240±0.037

ภาพที่ 11 ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์สูตรที่ 5 ที่ประกอบด้วยสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม ที่เก็บไว้เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่ 22 ความคงตัวทางกายภาพของสูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม เก็บไว้เป็นเวลา 16 สัปดาห์

คุณสมบัติ	**อุณหภูมิ**		
ทางกายภาพ	**5±2 °C**	**30±2 °C**	**45±2 °C**
ลักษณะที่ปรากฏ	สีเหลืองใส ไม่มีกลิ่น แยกชั้น ตกตะกอน	สีเหลืองใส ไม่มีกลิ่น ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน	สีเหลืองใส ไม่มีกลิ่น ไม่แยกชั้น ไม่มีตะกอน
ความหนืด (CPs)	7.17±0.03	7.64±0.03	7.33±0.03
ความเป็น กรด-ด่าง	5.52±0.0352	5.06±0.0163	4.79±0.0280

ภาพที่ 12 ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์สูตรที่ 6 ที่ประกอบด้วยสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม ที่เก็บไว้เป็นเวลา 16 สัปดาห์



ตารางที่ 23 ปริมาณร้อยละแมงจิเฟอรินที่เหลืออยู่ในตำรับที่ 6 ที่เก็บไว้เป็นเวลา 16 สัปดาห์

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ร้อยละแมงจิเฟอรินที่เหลืออยู่ที่อุณหภูมิต่างๆ (mean±SD)		
	5±2 °C	30±2 °C	45±2 °C
0	93.440±0.005	93.440±0.005	93.440±0.005
4	91.460±0.005	91.743±0.008	92.870±0.029
8	87.520±0.005	91.721±0.004	91.879±0.003
12	83.505±0.005	91.577±0.003	89.938±0.007
16	82.943±0.017	91.534±0.003	87.969±0.010

4.13 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับโทนเนอร์

ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดแมงจิเฟอริน 0.5 กรัม ในสูตร 5 และ สูตร 6 ด้วยวิธี ยูวี-วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส 30±2 องศาเซลเซียส และ 45±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และ 16 สัปดาห์ ได้ผลวิเคราะห์ตามตารางที่ 24 และ 25

ตารางที่ 24 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผลิตภัณฑ์โทนเนอร์สูตรที่ 5 เมื่อเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%inhibition) (mean±SD)		
	5±2 °C	30±2 °C	45±2 °C
0	90.401±0.223	90.401±0.223	90.401±0.223
4	83.705±0.352	89.724±0.236	88.796±0.025
8	79.634±0.210	86.118±0.125	84.418±0.196

ตารางที่ 25 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผลิตภัณฑ์โทนเนอร์สูตรที่ 6 เมื่อเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ระยะเวลา (สัปดาห์)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH อุณหภูมิต่าง ๆ (%inhibition)(mean±SD)		
	5±2 °C	30±2 °C	45±2 °C
0	91.798±0.404	91.798±0.404	91.798±0.404
4	84.213±0.210	90.664±0.235	89.754±0.238
8	81.919±0.265	88.720±0.274	86.570±0.060
12	79.134±0.032	86.807±0.172	84.299±0.190
16	60.667±0.270	85.071±0.092	80.519±0.471

จากการศึกษาพบว่า เมื่อเก็บตำรับสูตร 5 ไว้ 8 สัปดาห์ พบว่าที่ 30±2 องศาเซลเซียส และ 45±2 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่มากกว่าร้อยละ 85 และตำรับสูตร 6 ไว้ 16 สัปดาห์ พบว่าที่ 30±2 องศาเซลเซียส และ 45±2 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่มากกว่าร้อยละ 85 และร้อยละ 80 ตามลำดับ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย การอภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

สารออกฤทธิ์ (bioactive substances) ที่สำคัญในใบมะม่วง คือ สารแมงจิเฟอริน ซึ่งมีรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงมีการนำสารดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาวิจัยเพื่อใช้ในการรักษาโรคบางชนิด และใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลการสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้แห้งด้วยการหมักใน 85% เอทานอล แล้วนำสารสกัดหยาบมาทำการสกัดแยกสารแมงจิเฟอรินด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ไม่เข้ากัน ได้ปริมาณสารแมงจิเฟอรินร้อยละ 3.17 โดยน้ำหนัก เมื่อเทียบกับผงแห้งใบมะม่วง โดยมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 94.24 สารแมงจิเฟอรินที่ได้มีลักษณะเป็นผงแห้งสีเหลืองนวล ให้ค่า R_f ในระบบ TLC และลักษณะโครมาโตแกรม จากเครื่อง LC-MS/MS เหมือนกันกับสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน เป็นการยืนยันว่าสารที่แยกได้เป็นสารแมงจิเฟอริน และด้วยแมงจิเฟอรินเป็นสารในกลุ่มแซนโทน ซึ่งมีค่าการละลายในน้ำต่ำ เท่ากับ 0.1742 ± 0.0005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงจัดอยู่ในกลุ่มสารละลายน้ำได้น้อย โดยแมงจิเฟอรินสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำกว่าน้ำโดยเรียงตามลำดับดังนี้ อีทอกซีไดไกลคอล, ไดเมทิลไอโซซอร์ไบด์, โพรลีเอทิลีนไกลคอล 400, โพรลีเอทิลีนไกลคอล 600, โพรพิลีนไกลคอล, ไดโพรพิลีนไกลคอล, กลีเซอริน, ไอโซเพนทิลไดออล, เมทานอล, เอทานอล และน้ำปราศจากไอออน เมื่อนำแมงจิเฟอรินละลายในระบบตัวทำละลายร่วมระหว่างน้ำและตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำกว่าน้ำ เพื่อลดความมีขั้วของน้ำพบว่าระบบดังกล่าวสามารถเพิ่มค่าการละลายของแมงจิเฟอรินได้สูงกว่าค่าการละลายในน้ำ โดยค่าการละลายมีความสัมพันธ์กับสัดส่วน โดยปริมาตรของตัวทำละลายร่วม ตามสมการของ YALKOWSKY เมื่อพิจารณาความสามารถในการช่วยเพิ่มการละลายเปรียบเทียบระหว่างตัวทำละลายต่าง ๆ พบว่าสามารถใช้ค่าความชันของเส้นกราฟ หรือ ค่า solubilization power ของเส้นกราฟตามสมการของ YALKOWSKY ในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมได้ จากผลการทดลองพบว่า ไดโพรพิลีนไกลคอล และโพลีเอทิลีนไกลคอล 600 สามารถช่วยเพิ่มการละลายของแมงจิเฟอรินในระบบตัวทำละลายร่วมได้ดีที่สุด จึงนำมาใช้ในการเตรียมตำรับเครื่องสำอาง

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และ DPPH ของสารสกัดแมงจิเฟอรินพบว่า มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.0829 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.2344 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นของสารสกัดแมงจิเฟอรินที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 สามารถนำมาใช้เพื่อการคำนวณปริมาณสารสกัดออกฤทธิ์ที่จะเติมลงในผลิตภัณฑ์ได้ สำหรับงานวิจัยนี้ ทำการพัฒนาตำรับ

สารละลายใสที่มีส่วนประกอบของสารสกัดแมงจิเฟอริน ปริมาณ 20 เท่าของค่า IC_{50} ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักของแมงจิเฟอรินในตำรับ การเตรียมสารละลายใสจากปริมาณของสารสกัดแมงจิเฟอรินปริมาณดังกล่าว ต้องใช้ตัวทำละลายร่วม ไดโพรพิลีนไกลคอล และโพลีเอทิลีนไกลคอล 600 ในปริมาณร้อยละ 40 โดยน้ำหนัก ซึ่งปริมาณดังกล่าวคำนวณได้จากสมการของ YALKOWSKY โดยการแทนค่าปริมาณของสารแมงจิเฟอรินที่ต้องการละลายในระบบตัวทำละลายร่วมนั้น ๆ

จากการศึกษาความคงตัวของตำรับสารละลายใสที่มีส่วนประกอบของสารสกัดแมงจิเฟอริน ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก พบว่าตำรับโทนเนอร์ที่เตรียมได้เป็นสารละลาย ใส สีเหลือง ไม่พบตะกอน ตลอดระยะเวลาในการทำการศึกษา 8 สัปดาห์ สำหรับระบบตัวทำละลายร่วมไดโพรพิลีนไกลคอล และ 16 สัปดาห์ สำหรับระบบตัวทำละลายร่วม โพลีเอทิลีนไกลคอล 600 นอกจากนี้ยังพบว่า ความคงตัวทางเคมีของสารสกัดแมงจิเฟอรินในตำรับมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

5.2 อภิปรายผล

การสกัดใบมะม่วงด้วยวิธีการปั่นกวนด้วยตัวทำละลาย โดยใช้ผงใบมะม่วงน้ำดอกไม้แห้ง 2.6 กิโลกรัม ภายใต้การกวนด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิห้องในตัวทำละลาย 85% เอทานอล ทำให้ได้สารสกัดกึ่งของแข็ง 0.7987 กิโลกรัม และให้ผลผลิตสารสกัดหยาบร้อยละ 30.72 ได้สารสกัดแมงจิเฟอริน 82.46 กรัม คิดเป็นร้อยละ 3.17 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของอรัญญา จุติวิบูลย์สุข และ ชาญชัย สาดแสงจันทร์ [18] ซึ่งทำการสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงหลายชนิดด้วยการสกัดและแยกสารวิธีเดียวกัน พบว่า ได้สารสกัดแมงจิเฟอริน 39.16 กรัม จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้แห้ง 1,530 กรัม คิดเป็นร้อยละ 2.56 พบว่า วิธีสกัดด้วย 85% เอทานอล และสกัดแยกสารแมงจิเฟอรินด้วยวิธี liquid-liquid extraction ระหว่างไดคลอโรมีเทนและเอทานอล ทำให้ได้สารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ประมาณร้อยละ 2-3

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดจากพืชด้วยวิธี TLC จัดเป็นวิธีการที่สะดวก โดยการเปรียบเทียบค่า R_f ของสารสกัดกับสารมาตรฐาน แต่ไม่สามารถบอกปริมาณของสารสำคัญได้ การใช้เครื่อง HPTLC สามารถคำนวณหาปริมาณของสารสำคัญในสารสกัดได้ โดยการเทียบพื้นที่ใต้พีกระหว่างสารสกัดและสารมาตรฐาน จากการศึกษาพบว่าสารสกัดแมงจิเฟอรินมีความบริสุทธิ์ เมื่อคำนวณเทียบกับสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน เท่ากับร้อยละ 94.24 สอดคล้องกับการทดลองของวิไลพรรณ ลีปรีชานนท์ (2558)[19] ซึ่งใช้ HPTLC ในการวิเคราะห์สารสกัดแมงจิเฟอรินที่สกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ พบว่ามีความบริสุทธิ์ร้อยละ 93.15 เพื่อยืนยันเพิ่มเติมว่าสารสกัดที่ได้เป็นสาร

แมงจิเฟอริน จึงใช้เครื่องมือ ลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสสเปคโตรมิเตอร์ ในการแยกและวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสาร ทำให้ตรวจพบน้ำหนักโมเลกุลของสารที่ 423.2 m/z ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของสารที่มีโครงสร้าง $C_{19}H_{18}O_{11}$ ซึ่งเป็นน้ำหนักโมเลกุลของแมงจิเฟอรินที่ประกอบด้วย H^+ เป็นการยืนยันว่าสารสกัดที่ได้เป็นแมงจิเฟอริน

ค่าการละลายของสาร คือ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลายอิ่มตัวที่อุณหภูมิหนึ่ง ๆ แมงจิเฟอรินมีโครงสร้างเป็น ซี-ไกลโคซิลแซนโธน ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล อะโรมาติกและที่ไม่เป็นอะโรมาติก กลุ่มแลคโตนิกคาร์บอนิลหนึ่งกลุ่ม และกลุ่มไกลโคซิดิกไฮดรอกซิลหนึ่งกลุ่ม ซึ่งมีแนวโน้มที่จะละลายได้น้อยในน้ำ [32] การวิจัยพบว่า ความสามารถในการละลายของแมงจิเฟอรินในน้ำมีค่าต่ำ คือ 0.1744 ± 0.0005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพราะมีความสามารถในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ต่ำ เนื่องจากการมีอยู่ของกลุ่มแซนโทนในโครงสร้างของแมงจิเฟอริน งานวิจัยของ Otsuka (2006)[33]พบว่าโดยหลักการแล้ว สารประกอบหลายชนิดซึ่งละลายได้น้อยในตัวทำละลายบริสุทธิ์ อาจสามารถละลายได้เพิ่มขึ้นในระบบตัวทำละลายร่วม การเติมตัวทำละลายอื่นลงในน้ำอาจสามารถช่วยเพิ่มการละลายได้ เนื่องจากในสารละลายมีปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้น ดังนั้นแมงจิเฟอรินจึงสามารเกิดพันธะไฮโดรเจนกับตัวทำละลายได้ดีขึ้น และสภาพแวดล้อมของน้ำมีความมีขั้วลดลง ดังนั้น ความสามารถในการละลายของแมงจิเฟอรินจึงเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของตัวทำละลายร่วมเพิ่มขึ้น และจากการวิจัยพบว่า ไดโพรพิลีนไกลคอล และโพลีเอทิลีนไกลคอล 600 ให้ค่า solubilization power สูงในระบบตัวทำละลายร่วมกับน้ำ จึงสามารถช่วยเพิ่มการละลายของแมงจิเฟอรินได้ดี

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแมงจิเฟอริน ทำโดยการศึกษาความสามารถของสารสกัดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และอนุมูลอิสระ ABTS จากการทดลองพบค่า IC_{50} ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของสารสกัดแมงจิเฟอรินมีค่าสูงกว่าแอสคอร์บิคแอซิด และโทรลอกซ์ ผลการทดลองดังกล่าว สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแมงจิเฟอริน ในการต้านอนุมูลอิสระ[34] แม้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแมงจิเฟอริน ต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS จะมีค่าต่ำกว่าสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน แต่สารสกัดแมงจิเฟอรินยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี เนื่องจากค่า IC_{50} มีค่าต่ำ จึงน่าสนใจนำมาใช้เป็นสารสำคัญในตำรับเครื่องสำอางจากการศึกษาค่าการละลายทำให้สามารถเตรียมตำรับสารละลายใสของสารสกัดแมงจิเฟอรินด้วยตัวทำละลายร่วม โดยสามารถคำนวณปริมาณตัวทำละลายที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการเตรียมตำรับ ตำรับที่พัฒนาได้ประกอบด้วย สารสกัดแมงจิเฟอริน 20 เท่า ของค่า IC_{50}

ต่ออนุมูลอิสระ DPPH โดยใช้ตัวทำละลาย ไดโพรพิลีนไกลคอล และโพลีเอทิลีนไกลคอล 600 ปริมาณร้อยละ 40 โดยน้ำหนักในสูตรโทนเนอร์จากการศึกษาพบว่า ตำรับโทนเนอร์ที่เตรียมได้มีลักษณะใส ไม่เกิดการตกตะกอนของสารสกัดแมงจิเฟอริน และสารสกัดแมงจิเฟอรินมีความคงตัวในตำรับ โดยตรวจพบปริมาณสารแมงจิเฟอรินมากกว่าร้อยละ 80 ในตำรับ เมื่อเก็บตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ 30$\pm$2°C และ 45$\pm$2°C เป็นเวลา 16 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของวิไลพรรณ ลีปรีชานนท์ (2558)[19] ที่เตรียมตำรับสารสกัดแมงจิเฟอรินในตำรับโลชั่น ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำและน้ำมัน พบว่า การวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอรินในตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45$\pm$2°C เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอรินร้อยละ 20.97$\pm$0.64 ผลการทดลองที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากผลของสารอื่น ๆ ในตำรับและความสามารถในการละลายของสารสกัดแมงจิเฟอรินในระบบที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเก็บตัวอย่างระยะหนึ่ง รวมถึงความคงตัวของสารสกัดแมงจิเฟอรินในระบบที่แตกต่างกัน

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาสารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงในช่วงเดือนต่าง ๆ ของประเทศไทย เพื่อหาช่วงเวลาที่เหมาะแก่การสกัด เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น

2. จากการศึกษาพบว่า ไดโพรพิลีนไกลคอล และโพลีเอทิลีนไกลคอล 600 สามารถทำละลายสารสกัดแมงจิเฟอรินได้ดีในการตั้งตำรับโทนเนอร์ เพื่อความหลากหลายในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง จึงควรพัฒนาสูตรเครื่องสำอางสารสกัดแมงจิเฟอรินในรูปแบบต่าง ๆ โดยใช้ตัวทำละลายดังกล่าว

3. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ทดสอบการแพ้ในอาสาสมัคร เป็นต้น เพื่อนำตำรับโทนเนอร์สารสกัดแมงจิเฟอรินไปพัฒนาด้านอื่น ๆ มากขึ้น

บรรณานุกรม

1. García C, Felipe A, Naessens T, Foubert K, Delgado R, Mora C, et al. Validation of an analytical method by HPLC applicable to the cuban mangiferin. Ars Pharm. 2018;59(4):227-33.
2. Khumpook T, Saenphet S, Tragoolpua Y, Saenphet K. Anti-inflammatory and antioxidant activity of Thai mango (*Mangifera indica* Linn.) leaf extracts. Comp Clin Pathol. [https://doi.org/10.1007/s00580-018-2809-z] 2019 [cited 2020 Jun 20];28:157-64. Available from: https://link.springer.com/article/10.1007/s00580-018-2809-z.
3. Pal PB, Sinha K, Sil PC. Mangiferin attenuates diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress mediated signaling cascade, TNFa related and mitochondrial dependent apoptotic pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. PLoS One [doi: 10.1371/journal.pone.0107220] 2014 [cited 22 Jan2019];9(12): e115364.Availablefrom:https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/ 25233093/.
4. Gold-Smith F, Fernandez A, Bishop K. Mangiferin and cancer: Mechanisms of action. Nutrients. 2016; 8:1-25.
5. Ling LT, Yap SA, Radhakrishnan AK, Subramaniam TH, Cheng M, Palanisamy UD. Standardized *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. Food Chem. 2009;113:1154–9.
6. Rajendran P, Jayakumar T, Nishigaki I, Ekambaram G, Nishigaki Y, Vetriselvi J, Sakthisekaran D. Immunomodulatory effect of mangiferin in experimental animals with Benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis. Int J Biomed Sci. 2013;9(2):68-74.
7. Rakholiya K, Chanda S. Physicochemical and phytochemical investigation of *Mangifera indica* L. var. Kesar leaf. Asian Pacific J Trop Biomed. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60295-0] 2012 [cited 2020 Jun 23];2:S680-S684.Availablefrom:https://www.sciencedirect.com/science/article/ pii/ S222116 9112602950).

บรรณานุกรม (ต่อ)

8. PubChem [database online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), PubChem Compound Summary for CID 5281647, Mangiferin; 2004 [cited 2019 July18].Availablefrom: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mangiferin.
9. Luo F, Lv Q, Zhao Y, Hu G, Huang G, Zhang J, Sun C, Li X, Chen K. Quantification and purification of mangiferin from Chinese mango (*Mangifera indica* L.) cultivars and its protective effect on human umbilical vein endothelial cells under H_2O_2-induced stress. Int J Mol Sci. 2012;13(9):11260-74.
10. M-group article. มะม่วงมีกี่ชนิด [โฮมเพจบนอินเตอร์เน็ต] 2560 [เข้าถึงเมื่อ 14 กันยายน 2560]. เข้าถึงได้จาก: http://www.m-group.in.th/article/บทความ/มะม่วงมีกี่ชนิด.html
11. คู่มือนักวิชาการส่งเสริมการเกษตร. มะม่วง [โฮมเพจบนอินเตอร์เน็ต] 2551 [เข้าถึงเมื่อ 14 มกราคม 2560].เข้าถึงได้จาก:http://www.agriman.doae.go.th/home/t.n/t.n1/3fruit_ Requirement/02_009-cropre-Mango.pdf
12. รัตนะ สุวรรณเลิศ. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง. [โฮมเพจบนอินเตอร์เน็ต] [เข้าถึงเมื่อ 14 สิงหาคม 2562]. เข้าถึงได้จาก: http://clgc.agri.kps.ku.ac.th/resources/ fruit/manaifera .html
13. เมดไทย. มะม่วง [โฮมเพจบนอินเตอร์เน็ต] 2556 [เข้าถึงเมื่อ 5 สิงหาคม 2560].เข้าถึงได้จาก : https://medthai.com
14. Kapook health. ประโยชน์และสรรพคุณทางยาของมะม่วง [เข้าถึงเมื่อ 24 มกราคม 2564]. เข้าถึงได้จาก: https://health.kapook.com/view118325.html
15. มัณฑนา ภาณุมาภรณ์, บรรณาธิการ. เครื่องสำอางเพื่อความงามและสุขภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร; 2552.
16. Chemistry libretexts. [cited 2020 Aug 1]. Available from: https://chem .libretexts. org /Bookshelves/Organic_Chemistry.
17. Acosta J, Sevilla I, Salomón S, Nuevas L, Romero A, Amaro D. Determination of mangiferin solubility in solvents used in the biopharmaceutical industry. Pharm Pharmacog Res J. 2016;4(2), 49-53.

บรรณานุกรม (ต่อ)

18. Jutiviboonsuk A, Sardsaengjun C. Mangiferin in leaves of three Thai mango (*Mangifera indica* L.) Isan J Pharm Sci. 2010;6:122-9.
19. Leeprechanon W, Jutiviboonsuk A. Quantitative determination of mangiferin isolated from leaves of *Mangifera indica* L. variety Nam Doc Mai using HPTLC and its DPPH scavenging activity. Proceedings of the 6th International Conference of Suan Sunandha Rajabhat University, Bangkok, Thailand; 2015 pp. 28-29.
20. Ramírez NM, Farias LM, Santana FA, Leite JPV, Dantas MIDS, Toledo RCL,et al. Extraction of mangiferin and chemical characterization and sensorial analysis of teas from *Mangifera indica* L. leaves of the Uba/ Variety. Beverages [https://doi.org / 10.3390/beverages2040033beverages2040033] 2016 [cited 2019 Aug 21];2(4):33. Available from: https://www.mdpi.com/2306-5710/2/4/33.
21. อธิป สกุลเผือก. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. ศูนย์การศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์ [โฮมเพจบนอินเตอร์เน็ต] 2559 [เข้าถึงเมื่อ 3 มีนาคม 2562] เข้าถึงได้จาก: https://ccpe.pharmacycouncil.org/index.php?option=article_detail&subpage=article_detail&id=204.
22. Magnusson B, Örnemark U (editors). Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics. 2014 [cited 2020 Jun 20] Available from: www.eurachem.org
23. AOAC official methods of analysis. 2016 [cited 2020]. Available from: http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf
24. สุภาณี ดวงธีรปรีชา. การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. [โฮมเพจบนอินเตอร์เน็ต]. 2561 [27 สิงหาคม 2561-26 สิงหาคม 2562]. เข้าถึงได้จาก: https://ccpe.pharmacycouncil.org
25. Biswas T, Sen A, Roy R, Maji S, Maji H.S. Isolation of mangiferin from flowering buds of *Mangifera indica* L and its evaluation of in vitro antibacterial activity. J Pharm Anal. 2015;4(3):49-56.

บรรณานุกรม (ต่อ)

26. Kaliappan I, Kammalla AK, Ramasamy MK, Aruna A, Dubey GP. LC-MS Quantification of mangiferin in hydroalcoholic extract of *Salacia oblonga*, *Salacia roxburghii* and polyherbal formulation. Int J Phytopharm. 2014;4(1):11-5.
27. Ochocka R, Hering A, Stefanowicz-Hajduk J, Cal K, Baraหska H. The effect of mangiferin on skin: Penetration, permeation and inhibition of ECM Enzymes. PLoS One. [doi: 10.1371/journal.pone.0181542] 2017 [cited 2019 Apr 15];12(7):e018 1542. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pmc/ articles/PMC5531637/.
28. Jouyban A. Review of the cosolvency models for predicting solubility of drugs in water-cosolvent mixtures. J Pharm Pharmaceut Sci. 2008;11:32-58.
29. Tomasina F, Carabio C, Celano L, Thomson L. Analysis of two methods to evaluate antioxidants. Biochem Mol Biol Educ. 2012;40:266–70.
30. Shalaby EA, Shanab SMM. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. Ind J Geo-marine Sci. 2013;42(5):556-64.
31. Cosmetics Europe. Guidelines on stability testing of cosmetic products. 2004 [cited 2019 Mar 4]. Availablefrom:https://www.cosmeticseurope.eu/files/ 5914/ 6407/ 8121/Guidelines_on_Stability_Testing_of_Cosmetics_CE-CTFA_-_2004.pdf
32. Xua T, Wu X. Preparative separation of mangiferin glycosides by high-speed counter current chromatographd comparison of their antioxidant and antitumor activities. RSC Advances. 2020;10:25780-5.
33. Otsuka H, Purification by solvent extraction using partition coefficient. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI (editors) Natural products isolation. Methods in biotechnology, 2nd ed. NJ: Humana Press; 2006.
34. Tang BZ, Xia EQ, He TP, Huang MY, Jia Q, Li HW. Ultrasound-assisted extraction of mangiferin from mango (*Mangifera indica* L.) leaves using response surface methodology. Molecules. 2014;19:1411-21.

ภาคผนวก

1. วิธีการคำนวณความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน

สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน	0.0135	กรัม	
ปรับให้ครบปริมาตร	25	มิลลิลิตร	
ความเข้มข้นเท่ากับ	0.00054	กรัมต่อมิลลิลิตร	[1]

สารมาตรฐานแมงจิเฟอริน	5	กรัม	
ปรับให้ครบปริมาตร	25	มิลลิลิตร	
ความเข้มข้นเท่ากับ	0.000108	กรัมต่อมิลลิลิตร	[2]

เปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

$$0.000108 \text{ กรัม} \times \frac{\mathbf{1{,}000} \text{ มิลลิกรัม}}{\mathbf{1} \text{ กรัม}} \times \frac{\mathbf{1{,}000} \text{ ไมโครกรัม}}{\mathbf{1} \text{ มิลลิกรัม}}$$

ความเข้มข้นเท่ากับ	108.0000	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	[3]

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 7 ความเข้มข้น (Stock solution 0.1080 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

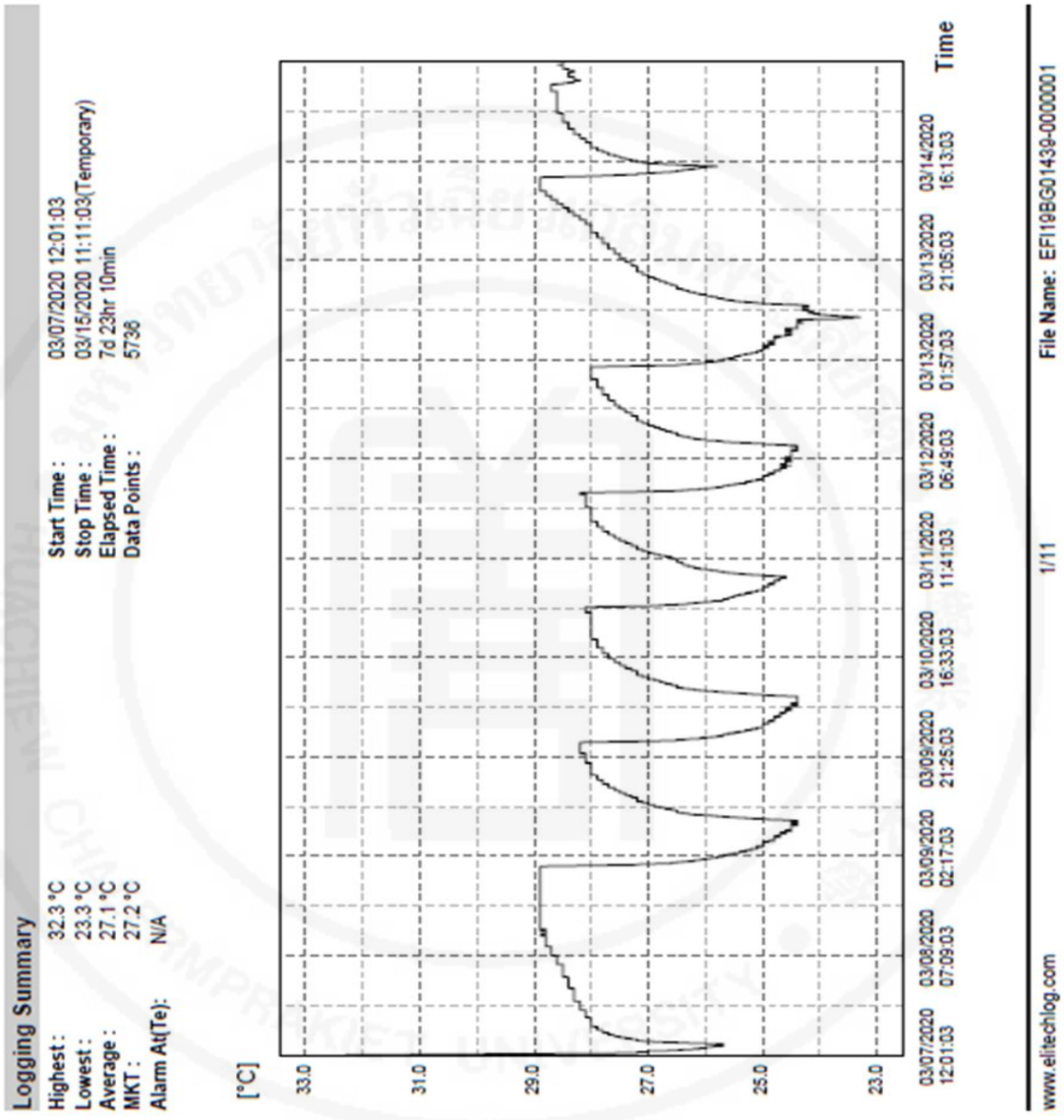
จาก [3] มา	0.1080 x 0.1	ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร	= 1.0800
	0.1080 x 0.2	ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร	= 2.1600
	0.1080 x 0.3	ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร	= 3.2400
	0.1080 x 0.5	ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร	= 5.4000
	0.1080 x 0.6	ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร	= 6.4800
	0.1080 x 0.8	ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร	= 8.6400
	0.1080 x 1.2	ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร	= 12.9600

2. วิธีการคำนวณ Dilution Factor แบบเจือจางหลายขั้นตอน

$$\text{Dilution Factor [DF]} = \frac{\text{ปริมาตรรวม 1}}{\text{ปริมาตรเริ่มต้น 1}} \text{ คูณ } \frac{\text{ปริมาตรรวม 2}}{\text{ปริมาตรเริ่มต้น 2}}$$

ความเข้มข้น Mangiferin = ความเข้มข้นที่เทียบกับ STD Curve คูณ ค่า Dilution Factor [DF]

3. สภาวะอุณหภูมิระหว่างการวิเคราะห์หาค่าการละลายของแมงจิเฟอรินในตัวทำละลาย



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล	นางชนิกัณดา เทสสิริ
วัน เดือน ปีเกิด	16 มีนาคม 2516
ที่อยู่ปัจจุบัน	44 ตำบลบางกระสอ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2535	คณะวิทยาศาสตร์ ราชภัฏพระนครศรีอยุธยา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี)
พ.ศ. 2551	คณะนิติศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ นิติศาสตรบัณฑิต
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ. 2540 - 2547	นักวิทยาศาสตร์ กรมทะเบียนการค้า กระทรวงพาณิชย์
พ.ศ. 2547 - 2562	นักวิชาการพาณิชย์ กรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์
พ.ศ. 2562 - ปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการเกษตรทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร