เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

การเตรียมและการตรวจสอบปริมาณสารแมงจิเฟอรินของสารสกัดจากใบมะม่วงและในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

PREPARATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF MANGIFERIN IN MANGO LEAVES EXTRACT AND IN COSMETIC

วิไลพรรณ ลีปรีชานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
พ.ศ. 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

การเตรียมและการตรวจสอบปริมาณสารแมงจิเฟอรินของสารสกัดจากใบมะม่วง และในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

PREPARATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF MANGIFERIN IN MANGO LEAVES EXTRACT AND IN COSMETIC

วิไลพรรณ ลีปรีชานนท์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ตรวจสอบและอนุมัติให้
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
เมื่อวันที่ 23 มิถุนายน พ.ศ. 2558

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย
ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญญา จุติวิบูลย์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญญา จุติวิบูลย์สุข
กรรมการ

.....
รองศาสตราจารย์พวงแก้ว ลัคนทินพร
กรรมการ

.....
อาจารย์ ดร.กนกภรณ์ สวัสดี
กรรมการ

.....
อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล
ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

.....
รองศาตราจารย์อิสยา จันทร์วิทยานุชิต
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

.....
รองศาสตราจารย์ ดร.จันทรา ชัยพานิช
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

การเตรียมและการตรวจสอบปริมาณสารแมงจิเฟอรินของสารสกัดจากใบมะม่วง และในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

วิไลพรรณ ลีปรีชานนท์ 534036
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อรัญญา จุติวิบูลย์สุข, Ph.D

บทคัดย่อ

สารแมงจิเฟอรินที่สกัดได้จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ (*Mangifera indica L.)* มีสัดส่วนร้อยละ 2.61 ของน้ำหนักผงใบแห้ง นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าฤทธิ์ของสารสกัดมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH ได้โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.38 มคก./มล. ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดด้วยวิธี รงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง (HPTLC) ซึ่งการวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบความถูกต้องของวิธี ทำโดยใช้แผ่น HPTLC silica gel 60 F_{254} เป็นวัฏภาคคงที่และตัวทำละลายผสมของ ethyl acetate : acetone : formic acid : water ในอัตราส่วน 8:2:1:1 โดยปริมาตร เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ตรวจวัดด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (TLC scanner 3) ที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์พบว่า วิธีวิเคราะห์มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.0-3.0 มคก./แถบ มีความแม่น (ค่าร้อยละการกลับคืนเท่ากับ 107.89 ± 0.29 %) ความเที่ยงในวันเดียวและต่างวันกันมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 0.51-1.71% และ 1.52% ตามลำดับ และความจำเพาะเจาะจงของวิธี พบว่ามีการแยกออกจากสารอื่นได้สมบูรณ์โดยมีค่า R_f ของสารแมงจิเฟอรินที่ 0.48 ความบริสุทธิ์ของสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 94.75±0.52%

การศึกษาความคงตัวของโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินที่มีสารสกัด ร้อยละ 1 ที่สภาวะเร่งอุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% เป็นระยะเวลา 120 วัน พบว่าโลชันสารสกัดมีสีเข้มขึ้น กลิ่นจางลง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความหนืดลดลงเล็กน้อย มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดี แต่ปริมาณสารแมงจิเฟอรินลดลงอย่างรวดเร็ว และการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10% เป็นระยะเวลา 120 วัน พบว่ามีความคงตัวทางเคมีกายภาพและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดี และปริมาณสารแมงจิเฟอรินค่อย ๆ ลดลงเล็กน้อย

คำสำคัญ: สารสกัดแมงจิเฟอริน สารต้านอนุมูลอิสระ รงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง

PREPARATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF MANGIFERIN IN MANGO LEAVES EXTRACT AND IN COSMETIC

WILAIPAN LEEPREECHANON 534036
MASTER OF SCIENCE (COSMETIC SCIENCE)
THESIS ADVISORY COMMITTEE: ARANYA JUTIVIBOONSUK, Ph.D.

ABSTRACT

Mangiferin) was isolated from Leaves of *Mangifera indica* L. variety Nam Doc Mai with the percentage yield of 2.61% w/w of dried leaves. It showed a potent scavenging activity on DPPH redical with an IC_{50} value of 6.38 µg/ml. A high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) method was developed and validated for quantitative determination of mangiferin. The method was performed on HPTLC silica gel 60 F_{254} pre-coated plate with the mixture of ethyl acetate-acetone-formic acid-water 8:2:1:1 (v/v/v/v) as mobile phase. Detection and quantitation was achieved by densitometric scanning at the wavelength of 320 nm. The results from validation method indicated that the proposed HPTLC method provided a good linearity in the range of 1.0 to 3.0 µg/band, accuracy (% recovery 107.89±0.29), precision (intra-day and inter-day RSDs 0.51-1.71% and 1.52% respectively) The specificity was obtained with a sharp peak with the R_f value of 0.48. The purity of mangiferin extract was 94.75±0.52%

The stability test of 1 % isolated mangiferin lotion with an accelerated condition, 45±2°C/75%RH, for 120 days found that the color of lotion increased from light yellow to dark yellow and small decreased of pH and viscosity, with fading of the odor, The DPPH radical scavenging activity of lotion was potent and stable although the content of mangiferin significantly decreased. The stability test at room temperature, 30°C/70±10%RH, for 120 days showed the stable of physical and the DPPH radical scavenging activity oh the lotion, with a low decreased mangiferin content.

Keywords: Isolated mangiferin, the DPPH radical scavenging activity, HPTLC

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญญา จุติวิบูลย์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำแนะนำ ข้อชี้แนะ และให้ความช่วยเหลือจนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ รองศาสตราจารย์ พวงแก้ว ลัคนทินพร อาจารย์ ดร.กนกภรณ์ สวัสดี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล และอาจารย์ ดร.สุนี ชาญณรงค์ ที่กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำปรึกษา แนวความคิดและข้อแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไข จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณในความช่วยเหลือจากเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาเภสัชเคมี - เภสัชเวท และภาควิชาเภสัชเทคโนโลยีอุตสาหกรรมทุกท่านที่อำนวยความสะดวกทั้งในงานด้านเอกสาร สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง รวมถึงให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่สาว ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาตลอดจนกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ตลอดมา

วิไลพรรณ ลีปรีชานนท์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญแผนภูมิ	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 มะม่วง	3
2.2 เทคนิคการเตรียมสารสกัดแมงจิเฟอริน	7
2.3 วิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณด้วยวิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง	8
2.4 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	12
2.5 การพัฒนาตำรับเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพร	15
2.6 กรอบแนวคิดการวิจัย	18
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 วัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	19
3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย	20
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	21
3.4 ระยะเวลาและแผนการดำเนินงาน	30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ 31

4.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้โดยวิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง

4.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และการหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัด 33

4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH 41

4.5 ศึกษาการเตรียมตำรับโลชันพื้น 45

4.6 การเตรียมโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ 48

4.7 การศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) 49

4.8 การศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10 เปอร์เซ็นต์) 54

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล 57

5.2 อภิปรายผล 59

5.3 ข้อเสนอแนะ 61

เอกสารอ้างอิง 63

ภาคผนวก

คำย่อ 67

ประวัติผู้เขียน 68

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	วิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารแมงจิเฟอริน	7
2	เกณฑ์การยอมรับของร้อยละการกลับคืน (% recovery) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (accuracy acceptance) ตาม AOAC	12
3	เกณฑ์การยอมรับความเที่ยงในระดับความทนซ้ำได้ (repeatability) โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของสารสำคัญตาม AOAC	14
4	ส่วนประกอบในตำรับโลชันพื้น Rx 1- Rx 8	26
5	แผนการดำเนินงาน	30
6	ข้อมูลความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน	36
7	ผลการทดสอบความแม่น (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์	38
8	ผลการทดสอบความทนซ้ำได้ (repeatability) ของวิธีวิเคราะห์	39
9	ผลการทดสอบ Intermediate precision	40
10	ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดจากใบมะม่วง	41
11	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของวิตามินซี สารสกัดแมงจิเฟอรินและ Trolox®	44
12	ผลการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตำรับโลชันพื้น	46
13	ผลการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตำรับโลชันพื้น Rx6, Rx7 และ Rx8 จากการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิเป็นเวลา 6 รอบ	47
14	สูตรตำรับโลชันพื้นและโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน	48
15	ผลการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโลชันพื้นและโลชันสารสกัดหลังจากเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 16 สัปดาห์	50
16	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณของสารแมงจิเฟอรินในตำรับโลชันสารสกัดเมื่อศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 16 สัปดาห์	52
17	ผลการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโลชันพื้นและโลชันสารสกัดหลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 16 สัปดาห์	55
18	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารแมงจิเฟอรินในตำรับโลชันเมื่อศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์	56

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่		หน้า
1	กรอบแนวคิดการวิจัย	18
2	HPTLC เดนซิโตแกรมของสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินและสารสกัดแมงจิเฟอริน	35
3	ยูวีเสปคตรัมของสารมาตรฐานและสารสกัดแมงจิเฟอริน	36
4	กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน	37
5	HPTLC โครมาโตแกรม (3มิติ) ของกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	37
6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของวิตามินซี	42
7	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดแมงจิเฟอริน	42
8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของ Trolox®	43
9	HPTLC เดนซิโตแกรมของตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน ในการศึกษาความคงตัวที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาต่าง ๆ (สัปดาห์ที่ 0-16)	53
10	ยูวีสเปคตรัมของสารแมงจิเฟอริน (R_f 0.48) และสารที่เกิดจากการสลายตัว (R_f 0.22)	54
11	HPTLC เดนซิโตแกรมของตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน ในการศึกษาความคงตัวที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาต่าง ๆ (สัปดาห์ที่ 0-16)	56

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ต้นมะม่วงจากซ้ายไปขวา รูปต้น ดอก และผลมะม่วง	3
2	โครงสร้างของสารแมงจิเฟอริน	5
3	โครมาโตแกรมของสารสกัดพืชวงสกุล *Rhododendron* ในเมทานอล	10
4	HPTLC เดนซิโตแกรมของสารสกัดเมทานอลของน้ำมันงาและสารมาตรฐาน sesamin, sesamoin	11
5	ลักษณะของผงแมงจิเฟอรินที่สกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้	31
6	HPTLC โครมาโตแกรมสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และสารสกัดแมงจิเฟอริน จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2	33
7	HPTLC โครมาโตแกรม แสดงความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์	34
8	ตำรับโลชันสารกลัดแมงจิเฟอริน (ซ้าย) และตำรับโลชันพื้น (ขวา)	49
9	ลักษณะของโลชันแมงจิเฟอริน (M) และโลชันพื้น (B) ในการศึกษาความคงตัวที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 16 สัปดาห์	50
10	ลักษณะของโลชันแมงจิเฟอริน (M) และโลชันพื้น (B) ในการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 16 สัปดาห์	55

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะม่วง เป็นไม้ยืนต้นในสกุล *Mangifera* มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Mangifera indica L.* ซึ่งเป็นไม้ผลเมืองร้อนที่รู้จักไปทั่วโลกมีประมาณ 69 สปีชีส์ [(1)] อยู่ในวงศ์ไม้ดอก Anacardiaceae ใบมะม่วงมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณสูง สารเหล่านี้ ได้แก่ วิตามินซี สารประกอบ phenolics เช่น gallic acid และ ellagic acid สาร flavonoids เช่น catechin, epicatechin, quercetin และ kaempferol และสาร xanthone glycoside เช่น แมงจิเฟอริน (mangiferin) [(2)] ซึ่งแมงจิเฟอรินเป็นสารที่พบเป็นองค์ประกอบหลักในใบมะม่วง แมงจิเฟอรินมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้าน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ฤทธิ์ต้านการเกิดมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [(3)] เป็นต้น จากฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงมาใช้ประโยชน์ทางด้านผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้ทำวิจัยเลือกใช้ใบมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้ เนื่องจากพบว่าในประเทศไทยมีการเพาะปลูกมะม่วงน้ำดอกไม้ในปริมาณมาก และใบมะม่วงน้ำดอกไม้เป็นวัสดุเหลือทิ้งที่เกิดจากการตัดแต่งในขั้นตอนการดูแลของเกษตรกร ทำให้มีใบมะม่วงน้ำดอกไม้ในปริมาณมาก จึงเหมาะแก่การนำมาสกัดสารแมงจิเฟอริน เพื่อใช้ประโยชน์ในทางเครื่องสำอาง เป็นทางเลือกในการใช้เครื่องสำอางที่มีสารสำคัญจากธรรมชาติอีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าใบมะม่วงน้ำดอกไม้ ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอีกด้วย ในขั้นตอนการสกัดสารได้พัฒนาวิธีการสกัดจากวิธีการสกัดของอรัญญา จุติวิบูลย์สุข และคณะ [(4)] และตรวจสอบปริมาณสารแมงจิเฟอรินของสารสกัดจากใบมะม่วง และในตำรับเครื่องสำอาง โดยใช้วิธีทางโครมาโตกราฟี ชนิดรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง (High Performance Thin Layer Chromatography) ซึ่งเป็นวิธีการที่มีหลักการเดียวกับทีแอลซี (TLC) แต่ได้พัฒนามาใช้เครื่องมือแบบอัตโนมัติ และใช้แผ่นรงคเลขผิวบางชนิดที่มีประสิทธิภาพสูง (HPTLC plate) ซึ่งแผ่นชนิดนี้มีขนาดอนุภาคของวัฏภาคคงที่ขนาดเล็กและสม่ำเสมอจึงสามารถใช้ตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ในปริมาณน้อย และมีประสิทธิภาพในการแยกที่ดีกว่า ทำให้ลดข้อผิดพลาดที่อาจเกิดจากการวิเคราะห์ และได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องมากกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC แบบเดิม นอกจากนี้วิธี HPTLC ยังมีข้อดี คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น สามารถทดสอบสารตัวอย่างได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน ใช้ตัวทำละลายในการวิเคราะห์ปริมาณน้อยและสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ [(18)] พร้อมทั้งทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแมงจิเฟอริน และตำรับเครื่องสำอางที่มีสารสกัดแมงจิเฟอริน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้
2. เพื่อตรวจหาปริมาณแมงจิเฟอรินในสารสกัดโดยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแมงจิเฟอริน
4. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดแมงจิเฟอรินมาเตรียมเป็นเครื่องสำอางบำรุงผิว

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้จะศึกษาวิธีการสกัดสารแมงจิเฟอรินจากใบของมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยวิธี การหมัก (maceration) ด้วยตัวทำละลาย และสกัดแยกสารแมงจิเฟอรินออกจากสารสกัดหยาบด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน (sovent-solvent partitioning) จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาตรวจหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินโดยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธี DPPH และศึกษาการตั้งตำรับโลชั่นของสารสกัดแมงจิเฟอริน พร้อมทั้งศึกษาความคงตัวและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโลชัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำวิธีการสกัดจากงานวิจัยนี้ซึ่งมีขั้นตอนง่าย ไม่ซับซ้อน ไปประยุกต์ใช้ในการสกัดสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงสายพันธุ์อื่น ๆ ให้มีความบริสุทธิ์ และได้ปริมาณสูง
2. สามารถพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อตรวจหาปริมาณสารแมงจิเฟอริน ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารสกัดจากใบมะม่วงด้วยวิธี HPTLC ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ประหยัดทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์
3. สามารถนำวิธี HPTLC มาประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารแมงจิเฟอรินในตำรับเครื่องสำอาง
4. เป็นการเพิ่มมูลค่าของใบมะม่วงเหลือทิ้ง (by-product) เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบทางเครื่องสำอาง

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะม่วง [1]

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะม่วง มีชื่อสามัญคือ Mango tree ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Mangifera indica Linn.* อยู่ในวงศ์ Anacadiaceae มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูงประมาณ 10–30 เมตร ใบ มีลักษณะใบเดี่ยวสีเขียว ขอบใบเรียบ ฐานใบมน ปลายใบแหลม ยาว 16-45 ซม. กว้าง 3-10 ซม. ก้านใบยาว 1.5-6 ซม. ลักษณะดอกเป็นช่อ ยาว 10-30 ซม. มีกลีบดอก 5 กลีบ เกสรมีสีแดงเรื่อ ๆ ดอกออกช่วงเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ ช่วงฤดูร้อนจึงติดผล ลักษณะผลยาวประมาณ 5-20 ซม. กว้าง 4-8 ซม. ลูกดิบสีเขียว เมื่อสุกเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือเหลืองเข้ม มีเมล็ดภายใน 1 เมล็ด การปลูก ควรปลูกในหน้าฝนเพราะเจริญเติบโตได้ดีในดินอุดมสมบูรณ์ ขยายพันธุ์ได้โดยการเพาะเมล็ดและการตอนกิ่ง (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 ต้นมะม่วงจากซ้ายไปขวา รูปต้น ดอก และผลมะม่วง

ที่มา: Krutu. 31 มีนาคม 2555 : ออนไลน์
http://plant.opat.ac.th/plant-data/plant-4/p-120/

2.1.2 ประโยชน์ทางยา

ส่วนที่ใช้เป็นยา	ผล ยางจากผลและลำต้น ดอก เมล็ด ใบ
	เปลือกต้นและเปลือกผล
ช่วงเวลาเก็บ	ผลแก่เก็บในฤดูร้อน
	เมล็ดเก็บจากการรับประทานผลสุก ล้างสะอาด ตากแห้ง เก็บไว้ใช้
	เปลือกต้นใช้สด

2.1.3 รสและสรรพคุณในตำรายาไทย

ผล	รสเปรี้ยว ชุ่มเย็น ใช้บำรุงกระเพาะอาหาร แก้คลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน กระหายน้ำ และขับปัสสาวะ
ยางจากผลและลำต้น	ผสมกับน้ำมันหรือน้ำส้มแก้คัน
ดอกมะม่วง	รับประทานแก้ท้องร่วงและเบาหวาน แก้บิดเรื้อรัง กระเพาะปัสสาวะ อักเสบ และหนองใน
เมล็ด	รสเปรี้ยว ชุ่ม แก้ไส้เลื่อน ท้องอืดแน่น
ใบ	รสเปรี้ยว ชุ่มเย็น แก้ลำไส้อักเสบเรื้อรัง ท้องอืดแน่น เด็กเป็นตานขโมย ชะล้างแผล และพอกบาดแผลสด
เปลือกต้น	แก้ไข้ตัวร้อน
เปลือกผล	แก้บิดถ่ายเป็นเลือด แก้ปวดเมื่อยเมื่อมีประจำเดือน
ใบอ่อนและเปลือก	ชงน้ำร้อนดื่มแก้ปวด อมบ้วนปากแก้เจ็บคอ และปวดฟัน เจ็บเหงือก แต่ใบแก่จัดมีสารพิษ

2.1.4 ขนาดและวิธีใช้

1. แก้คลื่นไส้อาเจียน วิงเวียน กระหายน้ำ รับประทานผลแก่สดพอสมควร

2. ต้มแก้ท้องอืดแน่น ขับพยาธิ ใช้เมล็ด (ที่ได้หลังจากรับประทานผลสุกแล้วล้างสะอาด ตากแห้ง ใช้ 2-3 เมล็ด ต้มเอาน้ำดื่ม หรือบดเป็นผง รับประทาน

3. แก้ลำไส้อักเสบเรื้อรัง ท้องอืดแน่น ใช้ใบสด 15-30 กรัม ต้มเอาน้ำดื่ม

4. ใช้ภายนอก ชะล้างบาดแผล ใช้ใบสด ต้มเอาน้ำชะล้าง

5. แก้ไข้ตัวร้อน ใช้เปลือกต้นพอสมควร ต้มเอาน้ำดื่ม

6. แก้อาการปวดเมื่อยเมื่อมีประจำเดือน ใช้เปลือกผลดิบคั่วรับประทานร่วมกับน้ำตาลแก้ปวดประจำเดือน ใช้เปลือกต้นแห้งบดเป็นยา 0.5-4.0 กรัม ต้มน้ำร้อน 120 มิลลิลิตร รับประทาน

7. แก้บิดถ่ายเป็นเลือดและเป็นยาบำรุงอวัยวะเกี่ยวกับการย่อย ใช้เปลือกผลแห้งบดเป็นผงผสมน้ำนมและน้ำผึ้งรับประทาน

8. สำหรับสตรีมีครรภ์ที่ท้องเสีย เป็นบิด ใช้เมล็ดแกะเปลือกออกแล้วคั่วบดเป็นผงผสมนมเปรี้ยว ให้เป็นของเหลวข้น ๆ รับประทาน

2.1.5 ข้อควรระวัง

คนที่รับประทานอาหารมากเกินไป หรือหลังจากฟื้นไข้ ห้ามรับประทานผลมะม่วงสุก และห้ามรับประทานร่วมกับกระเทียมหรือของเผ็ดทั้งหลาย การรับประทานมากเกินไปอาจทำให้ไตอักเสบได้

2.1.6 สารสำคัญที่พบในส่วนต่างๆของมะม่วง [1, 2]

ผล พบสารแมงจิเฟอริน, gallic acid, gallotannin, quercetin, isoquercetin และ glucogallin ผลดิบมีสาร glucan, arabinan และ galactoronan ผลสุกมี thiamine 52-63 มิลลิกรัม folic acid 7.26 ไมโครกรัม และ riboflavin 37-73 กรัม ต่อน้ำหนักผล 100 กรัม

เมล็ด มีไขมันร้อยละ 5.2 ประกอบด้วย glyceride ร้อยละ 14, monoolein ร้อยละ 24, diolein ร้อยละ 61, triglycerol ester ร้อยละ 1, stearic acid ร้อยละ 34, oleic acid ร้อยละ 50, palmitic acid, myristic acid และ sterols นอกจากนี้ยังมีแป้งเป็นส่วนใหญ่ และโปรตีน

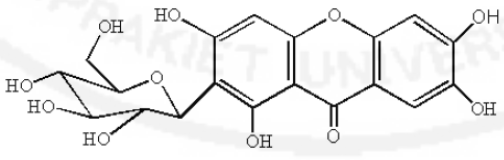
ใบ มีสาร ascorbic acid 23.7 เปอร์เซ็นต์ quercetin 11.7 เปอร์เซ็นต์ mangiferin 6.0 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังมี polysaccharide, xanthone, isomangiferin และ cyanogenetic glycosides

เปลือกต้น มีสารแมงจิเฟอริน, homomangiferin, quercetin (33 เปอร์เซ็นต์), oleonolic aldehyde, mangiferonic acid, isomangiferolic acid, hydroxymangiferolic acid, hydroxymangiferronic acid, ambonic acid, cycloartanol acetate, amyrin acetate, lupeol acetate และ tannins (ร้อยละ16-20)

2.1.7 สารแมงจิเฟอรินและฤทธิ์ทางชีวภาพ

แมงจิเฟอริน เป็นสารประกอบฟีนอลิก มีโครงสร้างทางเคมีเป็นแซนโธนกลัยโคไซด์ สูตรโมเลกุลคือ C2-β-D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone (ภาพที่ 2) มีน้ำหนักโมเลกุล 422.35 จุดหลอมเหลว (โมเลกุลปราศจากน้ำ) 271 องศาเซลเซียส และมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน

ภาพที่ 2 โครงสร้างของสารแมงจิเฟอริน



ที่มา: Soon Yew Tang et al. 2004

สารแมงจิเฟอรินสามารถพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น มะม่วง (*Mangifera Indica linn.*) [4] ฮันนี่บุช (*Cyclopia intermedia*) [5] กำแพงเจ็ดชั้น (*Salacia chinensis*) [6] และ Zhi mu (*Anemarrhena asphodeloides*) [7]

สารแมงจิเฟอรินมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จากรายงานการทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแมงจิเฟอรินจากเปลือกมะม่วงซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า Vimang® เทียบกับสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินในหนูทดลอง โดยการป้อนสารสกัด Vimang® หรือสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินให้กับหนูทดลองต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน ก่อนจะป้อนสาร TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13 acetate) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดออกซิเดชันในเลือด ตับ และสมอง พบว่า สารสกัดและสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ SOD (superoxside dismutase) และ GPx (glutathione peroxidase) ในการลดการเกิดออกซิเดชันของโปรตีน ลดการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ลดการแตกหักของ DNA ลดการเกิดปฏิกิริยารีดักชันใน cytochrome c และลดระดับของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยพบว่าสารสกัด Vimang® และสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินมีประสิทธิภาพสูงเช่นเดียวกับ วิตามินซี และวิตามินอี [1] จากการทดลองของ Stoilova และคณะในปี ค.ศ. 2005 ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารแมงจิเฟอรินที่สกัดได้จากใบมะม่วง โดยความเข้มข้นของสารละลายแมงจิเฟอรินที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) คือ 7.5±0.0075 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [8]

พบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารiแมงจิเฟอรินต่อแบคทีเรีย 7 สปีชีส์ ได้แก่ *Bacillus pumilus, B. cereus, Staphylococcus citreus, S. aureus, Escherichia coli*, *Salmonella agona* และ *Krebsiella pneumoniae* และเชื้อรา 5 สปีชีส์ คือ *Saccharomyces cerevisiae, Thermoascus aurantiacus, Trichoderma reesei, Aspergillus flavus และ A. fumigatus* [8]

จากการศึกษาของ Hui-Seong Kim และคณะในปี ค.ศ. 2012 พบว่า สารแมงจิเฟอรินสามารถยับยั้งการเกิดริ้วรอย ความหนาของผิว และการสูญสียคอลลาเจน เนื่องจากรังสียูวีบีในหนูทดลองได้ [9]

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารแมงจิเฟอรินมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง ฤทธิ์ต้านเนื้องอก ฤทธิ์ต้านเบาหวาน ฤทธิ์ในการยับยั้งหลอดเลือดแดงแข็งตัว ฤทธิ์ต้านภูมิแพ้ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านการปวด ฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกัน และฤทธิ์ต้านไวรัสอีกด้วย [10, 11]

2.2 เทคนิคการเตรียมสารสกัดแมงจิเฟอริน

การสกัด เป็นการแยกองค์ประกอบทางเคมีจากวัตถุดิบ ส่วนใหญ่จะเป็นการแยกสารสำคัญในการออกฤทธิ์ออกจากองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ เช่น สารเฉื่อยหรือสารรบกวน สารสกัดเบื้องต้นที่ได้จะเป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งปริมาณสารสำคัญในการออกฤทธิ์ในสารสกัดนั้นเป็นตัวบ่งบอกถึงคุณภาพของสารสกัด ดังนั้นการเลือกวัตถุดิบและวิธีการสกัดจึงมีความสำคัญที่ต้องคำนึงถึงในเตรียมการสกัดพืชสมุนไพร [12]

จากรายงานการสกัดสารแมงจิเฟอรินในส่วนต่าง ๆ ของพืชส่วนใหญ่ ใช้ตัวทำละลายเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อของพืชโดยใช้เทคนิคต่าง ๆ ได้แก่ การหมัก (maceration) การชะสกัด (percolation) การสกัดแบบต่อเนื่อง (continueous extraction) ด้วย soxhlet extractor การสกัดโดยใช้คลื่นเสียงช่วยสกัด (ultrasonic assisted extraction) การสกัดด้วยของไหลวิกฤติยิ่งยวด (supercritical fluid extraction) และการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟ เป็นต้น ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 วิธีการสกัดและตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารแมงจิเฟอริน

วัตถุดิบ	ตัวทำละลาย	วิธีสกัด
ใบมะม่วง	น้ำ น้ำ แอมโมเนียมซัลเฟต และ t-butanol 99% ethanol 99% cabondioxide 70% acetone , methanol และ ethanol	Soxhlet extractor [13] Ultrasonic assisted extraction [13] Percolation [14] Supercritical fluid extraction [14] Maceration [4]
เปลือก และผลมะม่วง	ethanol: acetone (7:3)	Ultrasonic assisted extraction [15]
เปลือกราก *Salacia chinensis*	90% methanol	Soxhlet extractor [6]
ใบและลำต้นฮันนี่บุช	น้ำและ acetronitrile : น้ำ (1:2)	Steam bath [5]

2.3 วิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณด้วยวิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง (High Performance - Thin-Layer Chromatography) [16, 17]

รงคเลขผิวบาง (Thin-Layer Chromatography) หรือที่นิยมเรียกสั้น ๆ ว่า TLC เป็นวิธีการแยกสารประเภทหนึ่งที่อาศัยหลักการทางโครมาโตกราฟี วิธีนี้ใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาวิจัยด้านต่าง ๆ โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับการพิสูจน์เอกลักษณ์ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ การแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และการติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารระหว่างขั้นตอนการวิเคราะห์ เหตุผลประการสำคัญที่รงคเลขผิวบางได้รับความนิยมในการวิเคราะห์ คือ ความง่ายและสะดวกในการใช้งาน ค่าใช้จ่ายของวิธีโดยรวมค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับวิธีวิเคราะห์อื่น ๆ การเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยากซับซ้อนและใช้สารตัวอย่างในปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้ยังได้ผลการวิเคราะห์รวดเร็วถูกต้องและแม่นยำ

รงคเลขผิวบางจัดเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีในสารตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีนี้เป็นที่นิยมกันมากในการตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากแหล่งต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดหยาบจากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังประยุกต์ใช้ในงานควบคุมคุณภาพ ทั้งในเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ และตรวจพิสูจน์เบื้องต้นในงานต่าง ๆ อาทิ เช่น การตรวจหาสารเจือปน การตรวจหาสารเสพติดและสารพิษในสิ่งแวดล้อมและชีววัตถุ เป็นต้น

2.3.1 หลักการแยกสารโดยรงคเลขผิวบาง

รงคเลขผิวบางเป็นวิธีการทางโครมาโตกราฟี เพื่อแยกองค์ประกอบแต่ละชนิดในสารตัวอย่างออกจากกันบนแผ่นรงคเลขผิวบาง ซึ่งเป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ที่เคลือบอยู่บนวัสดุรองรับที่เป็นแผ่นระนาบ โดยการใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสมในการนำพาสารให้เคลื่อนที่ไปบนแผ่นรงคเลขผิวบาง ซึ่งสารแต่ละชนิดจะเคลื่อนที่ไปได้มากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติกายภาพเคมีของสาร เช่น คุณสมบัติการละลาย ความมีขั้ว ความเป็นกรด-ด่าง กลุ่มทางเคมี ฯลฯ ชนิดของวัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยตำแหน่งที่ปรากฏของสารแต่ละจุดแสดงได้ด้วยค่า R_f (retardation factor) ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0-1

แผ่นรงคเลขผิวบางที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ยาและสมุนไพรมักเป็นชนิดซิลิกาเนื่องจากสามารถนำมาใช้แยกสารตัวอย่างที่มีองค์ประกอบทางเคมีคลอบคลุมกลุ่มต่าง ๆ ได้หลากหลาย วิธีการของรงคเลขผิวบางได้ถูกพัฒนามาเรื่อย ๆ ซึ่งทำให้เกิดเทคนิคใหม่ของการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงเรียกว่า รงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง หรือ High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) วิธีนี้มีขั้นตอนในการวิเคราะห์แบบเดียวกับ TLC แตกต่างที่ใช้เครื่องมืออัตโนมัติช่วยทำการวิเคราะห์ และแผ่นรงคเลขผิวบางชนิดมีประสิทธิภาพสูง (HPTLC plate) ซึ่งมีขนาดของวัฏภาคคงที่ขนาดเล็กและสม่ำเสมอกว่าแผ่นรงคเลขผิวบางทั่วไป ตามปกติแผ่นรงคเลขผิวบางจะมีขนาดอนุภาคของวัฏภาคคงที่ประมาณ 12 ไมโครเมตร ส่วนแผ่นรงคเลขผิวบางชนิดมี

ประสิทธิภาพสูงจะมีขนาดอนุภาคของวัฏภาคคงที่ประมาณ 7 ไมโครเมตร จึงมีประสิทธิภาพในการแยกสูงขึ้น สามารถแยกสารผสมหลายชนิดออกจากกันได้โดยใช้ระยะทางพัฒนาสารเพียง 5 เซนติเมตร เท่านั้น และให้ผลในการวิเคราะห์ซ้ำที่ดี เหมาะในการวิเคราะห์เชิงปริมาณในพืชสมุนไพร

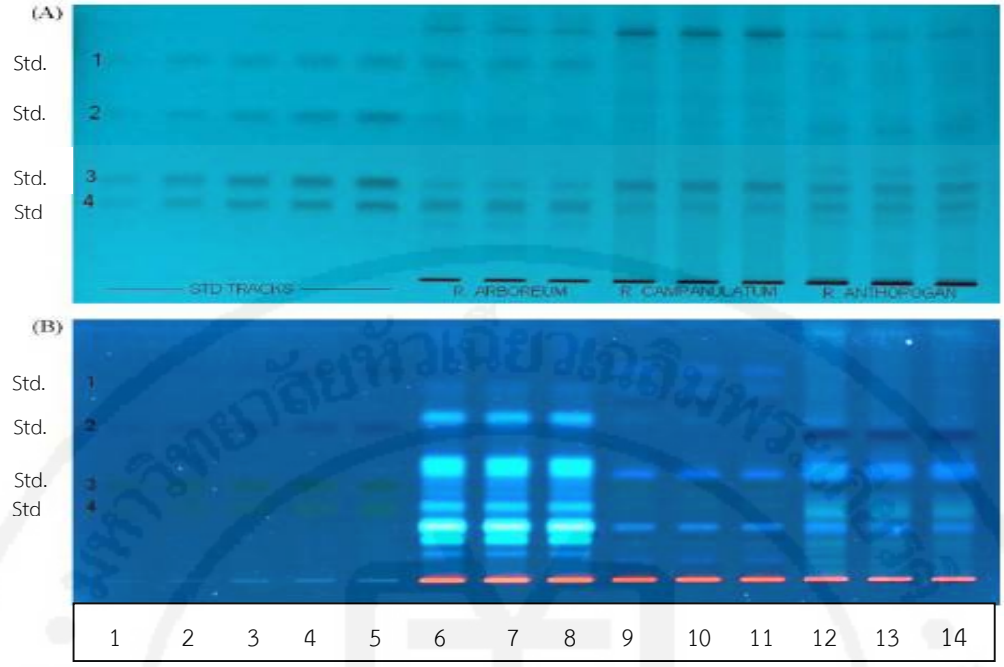
2.3.2 การใช้ประโยชน์ของวิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง

1. ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และหาปริมาณของสาร

การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง ต้องมีจุดของสารมาตรฐานที่ใช้เป็นสารอ้างอิง เพื่อเทียบกับจุดของสารตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์และดูผลโครมาโตแกรม เปรียบเทียบค่า R_f ขนาด รูปร่างและสีของจุดต่าง ๆ ที่ปรากฏบนแผ่นรงคเลขผิวบางภายหลัง จากการตรวจพบด้วยวิธีทางกายภาพ และวิธีทางเคมี หากสารตัวอย่างและสารอ้างอิงมาตรฐานเป็นชนิดเดียวกัน ค่า R_f และลักษณะต่าง ๆ ที่ตรวจพบบนแผ่นรงคเลขผิวบางของจุดทั้งสองต้องเหมือนกัน ทั้งนี้ควรทำการวิเคราะห์โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่อย่างน้อย 2 ถึง 3 ระบบ เช่น การตรวจสอบการแยกของสาร epicatechin, syringic acid, quercetin-3-*O*-galactoside และ quercetin ในส่วนใบของพืชในสกุล *Rhododendron* (Nandini Sharma และคณะในปี ค.ศ. 2010) [18] แสดงดังภาพที่ 3 หรือตัวอย่างงานวิจัยการเทียบลักษณะโครมาโตแกรม และการหาปริมาณของสารลิกแนน ในน้ำมันงาและในสูตรตำรับ [19] ดังภาพที่ 4

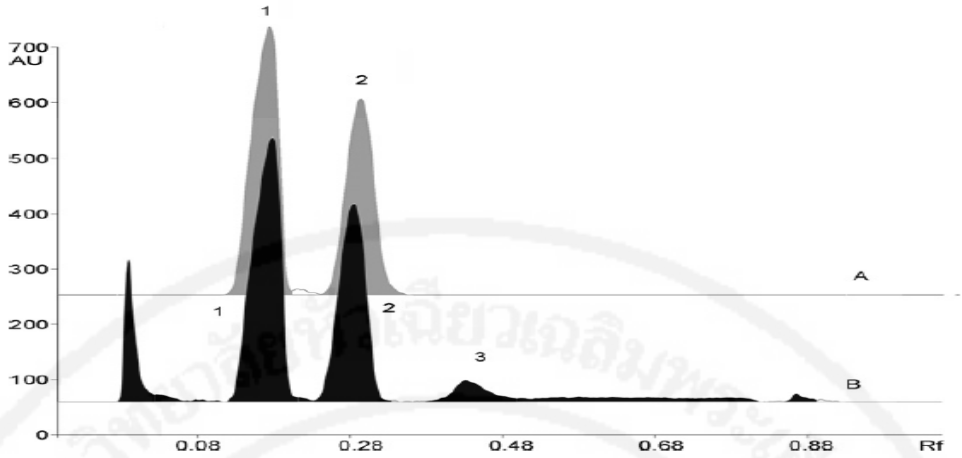
ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้วิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูงในการวิเคราะห์หาปริมาณ ได้แก่ การวิเคราะห์หาปริมาณของสารแมงจิเฟอริน และ lupeol ในผลและเปลือกมะม่วง [15] และการวิเคราะห์หาปริมาณของ andrographolide ในฟ้าทะลายโจรที่สกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล เป็นต้น [20]

ภาพที่ 3 โครมาโตแกรมของสารสกัดเมทานอลของพืชสกุล *Rhododendron* ในเมทานอล



ภาพแสดงการตรวจวัดด้วยกล้อง charg-couple device (CCD) ของแผ่นรงคเลขผิวบาง แถวที่ 1-5 เป็นแถบของสารผสมของสารมาตรฐานสี่ชนิดที่ในความเข้มข้นต่าง ๆ ประกอบด้วย epicatechin std. (1), syringic acid std. (2), quercetin-3-*O*-galactoside std. (3), quercetin std. (4) แถวที่ 6-14 เป็นแถบของสารสกัดเมทานอลในพืชสกุล *Rhododendron* (6-8 *R. arboretum* : 9-11 *R. campanulatum* :12-14 *R. anthopagon*) (A) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และ (B) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

ภาพที่ 4 HPTLC เดนซิโตแกรมของสารสกัดเมทานอลของน้ำมันงาและสารมาตรฐาน sesamin, sesamolin



ภาพแสดง HPTLC เดนซิโตแกรมที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร (A) สารมาตรฐาน (1:sesamin, 2:sesamolin) และ (B) สารสกัดเมทานอลของน้ำมันงา (1:sesamin, 2:sesamolin, 3: ϒ-tocopherol)

2. ใช้ในการควบคุณคุณภาพวัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์

วิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูงใช้ในการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ ทั้งในด้านยา และเครื่องสำอาง ตัวอย่างงานวิจัย ได้แก่ การควบคุมคุณภาพและการทำมาตรฐานของ aloverose ใน Aloe vera gel ในสูตรตำรับ cold cream และ vanishing cream ด้วยวิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง โดยใช้วัฏภาคคงที่เป็น Si-gel Si60F_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของ n-butanol: n-propanol: glacial acetic acid: water (30:10:10:10 โดยปริมาตร) พบว่าให้ผลการแยกที่ดี และมีความแม่นของวิธีวิเคราะห์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นวิธีวิเคราะห์ในงานประจำได้ [21] และการหาปริมาณสาร terpinen-4-ol ซึ่งเป็นสารสำคัญใน tea tree oil จากสูตรตำรับเวชสำอางด้วยรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง โดยใช้วัฏภาคคงที่คือ silica gel 60F_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นสารละลายผสมของ toluene และ ethyl acetate ในอัตราส่วน 85:15 โดยปริมาตร ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดของการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) [22] เป็นต้น

2.4 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ [23, 24]

ในการหาปริมาณของสารสกัดจากพืชสมุนไพรนั้นสามารถใช้เทคนิคและเครื่องมือในการวิเคราะห์หาปริมาณตามความเหมาะสม ซึ่งอาจเป็นวิธีที่มีการใช้กันมาแล้วหรืออาจพัฒนาวิธีขึ้นใหม่เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์มากยิ่งขึ้น ในการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์นั้น ต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีที่พัฒนา เพื่อยืนยันคุณลักษณะเฉพาะของการวิเคราะห์ และจัดทำข้อกำหนดของการวิเคราะห์ รวมถึงตรวจสอบความสามารถของวิธีวิเคราะห์ แสดงหลักฐานการทดสอบว่าวิธีนั้นให้ผลถูกต้องแม่นยำ พารามิเตอร์หรือคุณลักษณะเฉพาะที่กำหนดในแนวทางของการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสมุนไพร ได้แก่

1. ความแม่น (Accuracy) แสดงถึงความใกล้เคียงกันระหว่างผลการวิเคราะห์ที่ได้กับค่าแท้จริง หรือค่าอ้างอิงที่ยอมรับ และควรครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ โดยรายงานค่าเป็นร้อยละการกลับคืน (% recovery) การทดสอบความแม่นของวิธี จะต้องตรวจสอบอย่างน้อย 9 ครั้งในระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ทำซ้ำระดับละ 3 ครั้ง โดยให้ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ เช่น ร้อยละ 80, 100 และ120 ของปริมาณตัวยาที่ระบุ หรือทำซ้ำ 6 ครั้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 100 ของความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ โดย AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ได้กำหนดแนวทางสำหรับพิจารณาการยอมรับร้อยละการกลับคืนตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เกณฑ์การยอมรับของร้อยละการกลับคืน (% recovery) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (accuracy acceptance) ตาม AOAC

ความเข้มข้นของสารสำคัญ	% Recovery
100 %	98-102
> 10%	98-102
>1%	97-103
> 0.1%	95-105
100 ppm	90-107
10 ppm	80-110
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

2. ความเที่ยง (Precision) แสดงถึงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ หรือความใกล้เคียงของผลการทดสอบที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ กันหลายครั้ง โดยใช้ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันภายใต้สภาวะที่กำหนด แบ่งออกเป็น 3 ระดับคือ

Repeatability หรือ intra assay precision (ความทวนซ้ำได้) แสดงความเที่ยงของการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำกันหลายครั้ง โดยนักวิเคราะห์คนเดียวกัน เครื่องมือเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน ภายใต้สภาวะแวดล้อมเหมือนกัน โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างในวันเดียวกันหรือในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน

Intermediate precision แสดงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์เมื่อวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน โดยวิเคราะห์ในเวลา หรือวันต่างกัน

Reproducibility (ความทำซ้ำได้) แสดงความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์เมื่อทำการวิเคราะห์ซ้ำด้วยวิธีการเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการต่างกัน เครื่องมือต่างกัน นิยมใช้ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีมาตรฐาน เช่น วิธีใน pharmacopoeia

การทดสอบความเที่ยงของวิธีจะต้องทำการตรวจสอบอย่างน้อย 9 ครั้ง ในระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ทำซ้ำระดับละ 3 ครั้ง โดยครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ เช่น ร้อยละ 80, 100 และ 120 ของปริมาณของตัวยาที่ระบุ หรือทำซ้ำ 6 ครั้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 100 ของความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ

การตรวจสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์มี 2 แบบ คือความเที่ยงของระบบ (system precision) เป็นการหาค่าร้อยละของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ของการฉีดสารละลายมาตรฐานซ้ำกันหลาย ๆ ครั้ง และความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ เป็นการหาค่า % RSD จากการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำกันหลาย ๆ ครั้ง เกณฑ์การยอมรับจะแตกต่างกันขึ้นกับหลายปัจจัย AOAC ได้กำหนดค่า % RSD ที่ยอมรับได้สำหรับวิธีวิเคราะห์ โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของสารสำคัญในตัวอย่าง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เกณฑ์การยอมรับความเที่ยงในระดับความทนซ้ำได้ (repeatability) โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของสารสำคัญตาม AOAC

ความเข้มข้นของสารสำคัญ	**RSD*r***
100 %	1 %
10 %	1.5 %
1 %	2 %
0.1 %	3 %
0.01 %	4 %
10 µg/g (ppm)	5 %
1 µg/g	8 %
10 µg/kg (ppb)	15 %

หมายเหตุ: RSD*r* หมายถึง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในระดับความทวนซ้ำได้

3. ความจำเพาะเจาะจง (Specificity or selectivity) เป็นพารามิเตอร์แสดงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ ที่สามารถตรวจวิเคราะห์สารที่ต้องการได้อย่างถูกต้องและเฉพาะเจาะจง โดยปราศจากการรบกวนจากสารแปลกปลอมอื่น ที่คาดว่าจะมีในเนื้อตัวอย่าง ซึ่งได้แก่ สารออกฤทธิ์ (active ingredients) สารช่วย (excipients) สารปนเปื้อน (impurity) สารสลายตัว (degradation products) การทดสอบความจำเพาะเจาะจงต้องทำหลายวิธีร่วมกันเพื่อตรวจสอบ ได้แก่

วิธีตรวจสอบเอกลักษณ์ (Identification test) วิธีนี้ต้องแยกสารที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกจากกันได้ ทำโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

วิธีวิเคราะห์ปริมาณ (Assay) โดยเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ของตัวอย่างที่มีสารปนเปื้อน (impurity) กับตัวยาที่ไม่มีสารปนเปื้อน (reference standard) ในกรณีที่รู้ว่าสารปนเปื้อนหรือสารสลายตัวเป็นสารอะไรและมีสารมาตรฐานเหล่านั้น สามารถทดสอบโดยการเติม (spike) สารเหล่านั้นในปริมาณที่เหมาะสมลงในวัตถุดิบเพื่อพิสูจน์ว่า ผลวิเคราะห์ที่ได้ไม่ได้รับผลกระทบจากสารเหล่านั้น

4. การทดสอบขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection, LOD) เป็นการหาปริมาณต่ำสุดของสารที่สนใจที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจพบได้ โดยปริมาณของสารในระดับนี้ไม่อาจบอกเป็นค่าเชิงปริมาณได้

5. ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) เป็นการหาปริมาณต่ำสุดของสารที่สนใจที่วิธีวิเคราะห์สามารถตรวจวัดได้เป็นค่าเชิงปริมาณ โดยคำนึงถึงความแม่นและความเที่ยง

2.5 การพัฒนาตำรับเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมุนไพร

ในปัจจุบันได้มีการนำสารสกัดจากสมุนไพรมาใช้ในการพัฒนาตำรับเครื่องสำอางเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก เนื่องจากการใช้สารสังเคราะห์ที่เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดโรคทางผิวหนังและผลข้างเคียงมากมาย อีกทั้งสารสกัดจากสมุนไพรยังบางชนิดมีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยา ที่ช่วยให้เครื่องสำอางมีประสิทธิภาพในการลดริ้วรอย รักษาสิว และปกป้องผิวหนังจากรังสีอัลตราไวโอเลตในแสงแดดได้ [25] เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา เป็นต้น

ในการเตรียมตำรับเครื่องสำอางที่ใช้ทางผิวหนังโดยใช้สารแมงจิเฟอรินทั้งในรูปแบบสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์เป็นสารออกฤทธิ์ในตำรับที่มีคุณสมบัติชะลอวัยนั้น ได้มีการรายงานปริมาณสารแมงจิเฟอรินที่ใช้อยู่ในช่วง ร้อยละ 0.0001-20 โดยน้ำหนัก [26]

2.5.1 การเตรียมตำรับอิมัลชัน [27]

อิมัลชัน (emulsion) หมายถึงระบบคอลลอยด์ที่ประกอบด้วยของเหลวตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ซึ่งปกติไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน เช่น น้ำและน้ำมัน ผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกันโดยอาศัยตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) เมื่อมองด้วยตาเปล่าจะเห็นเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ถ้าส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็น 2 วัฏภาค โดยของเหลวที่แตกตัวเป็นหยดเล็ก ๆ เรียกว่า วัฏภาคภายใน (internal or disperse phase) กระจายตัวแทรกอยู่ในของเหลวอีกประเภทหนึ่ง เรียกว่า วัฏภาคภายนอก (external or continuous phase) จากการกระจายตัวของวัฏภาคจึงสามารถแบ่งอิมัลชันเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ อิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (w/o emulsion) และอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w emulsion) ถ้าแบ่งตามความหนืดของอิมัลชันจะแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ โลชัน และครีม โดยโลชันจะมีความหนืดต่ำกว่าเพราะมีปริมาณวัฏภาคภายในไม่เกินร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก ส่วนครีมมีความหนืดสูงกว่าเพราะมีส่วนประกอบของไขมันแข็งร่วมด้วย และมีปริมาณวัฏภาคภายในประมาณร้อยละ 35-75 โดยน้ำหนัก

อิมัลชันประกอบด้วย 3 ส่วนที่สำคัญ คือ วัฏภาคน้ำ (water phase) วัฏภาคน้ำมัน (oil phase) และสารลดแรงตึงผิว กลไกของการเกิดอิมัลชัน คือ การทำให้ของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในแตกกระจายเป็นหยดเล็ก ๆ โดยมีสารลดแรงตึงผิวไปลดแรงตึงระหว่างผิวของของเหลวทั้งสองวัฏภาคและเป็นการทำให้พลังงานอิสระของหยดวัฏภาคภายในลดลง จึงเกิดการรวมกันของหยดวัฏภาคภายในได้น้อยลง ซึ่งเป็นการเพิ่มความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกให้แก่อิมัลชัน

อิมัลชันที่นิยมใช้ทางผิวหนังทั่วไปมักเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำซึ่งมีลักษณะทั่วไป คือ มีลักษณะเหลว (โลชัน) หรือมีความหนืด (ครีม) โดยอาจมีปริมาณน้ำในสูตรตำรับได้สูงถึงร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก สามารถใช้ได้กับผิวหนังบริเวณกว้าง เมื่อทาแล้วเกิดเป็นฟิล์มบาง ๆ บนผิว สามารถแผ่กระจายได้ง่ายและให้ความรู้สึกเย็นเมื่อทาเนื่องจากมีการระเหยของน้ำในตำรับ ซึ่งอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำจะมีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงได้ดีกว่าอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน อย่างไรก็ดี

อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำมีโอกาสเกิดปนเปื้อนของเชื้อจุรินทรีย์ได้ง่าย จึงอาจเติมสารกันบูดที่เหมาะสมในตำรับได้

การผลิตอิมัลชันทางเครื่องสำอางนิยมใช้วิธีให้ความร้อน โดยมีหลักการคือ สารใดที่ละลายในน้ำและทนความร้อนได้จะอุ่นผสมในวัฏภาคน้ำ สารใดที่ละลายในน้ำมันและทนความร้อนได้จะอุ่นผสมในวัฏภาคน้ำมัน เทคนิคที่ถูกต้องในการหลอมวัฏภาคน้ำมันคือ หลอมสารที่มีจุดหลอมเหลวสูงก่อนโดยให้สูงกว่าจุดหลอมเหลวของสารประมาณ 5 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงเติมสารที่มีจุดหลอมเหลวต่ำตามลงไป เพื่อป้องกันการให้ความร้อนที่มากเกินไป (over heating) กับสารขี้ผึ้งบางชนิด จากนั้นผสมของเหลวทั้ง 2 วัฏภาคที่มีอุณหภูมิใกล้เคียงกัน แล้วจึงคนผสมให้เข้ากันจนเกิดอิมัลชันที่สมบูรณ์ เมื่ออิมัลชันเย็นตัวลงที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จึงเติมสารที่ไม่ทนความร้อนลงไป เช่น สารแต่งกลิ่น สารสำคัญ หรือสารสกัดสมุนไพรต่าง ๆ เป็นต้น ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของตำรับ ได้แก่คุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ เครื่องมือ เวลาผสม ระยะเวลาการทำให้อิมัลชันเย็นตัวลง และลำดับในการผสม เป็นต้น

2.5.2 การทดสอบคุณสมบัติของอิมัลชัน [28]

ในการควบคุมคุณภาพของอิมัลชันที่เตรียมได้ จะต้องมีการทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของอิมัลชัน ได้แก่

1. การทดสอบชนิดของอิมัลชัน โดยอาศัยคุณสมบัติการละลายของสี (dye solubility) อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำจะกระจายได้ดีในสีที่ละลายได้ในน้ำ ถ้าเป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันจะกระจายได้ดีในสีที่ละลายในน้ำมัน

2. ความหนืด มีบทบาทสำคัญในการกำหนดประสิทธิภาพและคุณภาพของอิมัลชัน โดยขนาดอนุภาคของวัฏภาคภายในจะสัมพันธ์กับความหนืด เมื่ออนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น ความหนืดของอิมัลชันจะลดลง เครื่องมือที่ใช้ในการวัดความหนืด ได้แก่ Viscometer เป็นต้น

3. ขนาดอนุภาคของวัฏภาคภายใน สามารถวัดได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ขนาดอนุภาคของวัฏภาคภายในมีผลต่อลักษณะของอิมัลชัน คุณสมบัติการไหล ประสิทธิภาพและคุณภาพของเนื้ออิมัลชัน รวมถึงความคงตัวของอิมัลชันด้วย โดยเมื่อมีการเก็บอิมัลชันไว้สักระยะเวลาหนึ่ง อิมัลชันอาจมีการเปลี่ยนแปลงขนาดและการกระจายของขนาดอนุภาค ถ้าอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น หรือการกระจายตัวของอนุภาคเพิ่มขึ้นจะแสดงถึงความไม่คงสภาพของอิมัลชัน

4. ความเป็นกรด-ด่าง อิมัลชันที่ใช้ทางผิวหนังควรมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4-7 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับความเป็นกรด-ด่างของผิวหนัง

5. การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส โดยการดมกลิ่น สังเกตสี ความเนียนของเนื้ออิมัลชัน การกระจายตัวและการดูดซึมเมื่อทาบนผิว

6. การตรวจวิเคราะห์ทางเคมี เป็นการหาปริมาณและประเมินประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ในตำรับหลังจากผ่านกระบวนการเตรียมตำรับ และเมื่อศึกษาความคงตัวของตำรับ

7. การศึกษาความคงตัวของอิมัลชันมีประโยชน์อย่างมากต่อการตั้งตำรับเครื่องสำอาง โดยการศึกษาความคงตัวในภาวะเร่งโดยการสลับอุณหภูมิร้อนและเย็น (heating-cooling) เพื่อใช้ในการศึกษาการเลือกตำรับที่เหมาะสมก่อนการผลิตจริง หรือการศึกษาความคงตัวในระยะยาว เพื่อบ่งบอกถึงอายุของผลิตภัณฑ์

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

2.6 กรอบแนวคิดการวิจัย

แผนภูมิที่ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

การวิจัยนี้ ศึกษาวิธีการสกัดสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ด้วยวิธีการหมัก และการสกัดด้วยตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน วิเคราะห์หาปริมาณของสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดด้วยเทคนิครงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง และตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ นำสารสกัดที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และเตรียมผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในรูปแบบโลชันบำรุงผิว ประเมินตำรับและทดสอบความคงตัวของตำรับเป็นระยะเวลา 4 เดือน โดยศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีในสภาวะเร่งด้วยความร้อนและในสภาวะอุณหภูมิห้อง วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในตำรับด้วยเทคนิครงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

3.1 วัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Acetic acid (glacial) จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมัน
2. Acetone BDH , AnalaR® จากบริษัท VWR International ประเทศอังกฤษ
3. Dichloromethane จากบริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ
4. Ethyl acetate จากบริษัท Mallinkrodt ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. Ethyl alcohol จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมัน
6. Formic acid 85% จากบริษัท QReC ประเทศนิวซีแลนด์
7. (+)-Catechin hydrate 98% จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมัน
8. Ellagic acid > 96% (HPCE) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน
9. (-)-Epicatechin 90% ,จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน
10. Gallic acid > 98% (HPLC) , จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน
11. Mangiferin from bark , จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน
12. Quercetin dihydrate 98% (HPLC) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน
13. DPPH 95% จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน
14. Methanol AR grade จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมัน
15. L(+)-Ascorbic acid 99.7% จากบริษัท Riedel-deHaen ประเทศจีน
16. Trolox 97% จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมัน

17. Coconut oil จากบริษัท SAFC ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

18. Brij ®L4 จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. TLC Scanner 3 จากบริษัท CAMAG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
2. Applicator Linomat 5 จากบริษัท CAMAG ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
3. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง จากบริษัท Mettler Teledo ประเทสหรัฐอเมริกา
4. Ultrasonic bath จากบริษัท Branson ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
5. TLC chamber จากบริษัท Altech ประเทศไทย
6. HPTLC plate silica gel $60F_{254}$ จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมัน
7. TLC plate silica gel $60F_{254}$ จากบริษัท MERCK ประเทศเยอรมัน
8. UV-VISIBLE Spectrophotometer Model V-630 จากบริษัท JUSCO ประเทศญี่ปุ่น
9. Rotary evaporator จากบริษัท Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
10. Vacuum Oven VD 630 จากบริษัท Memmert ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Overhead stirrer OST 20 digital จากบริษัท yellow line IKA ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. Brookfield viscometer จากบริษัท Brookfield Engineering Labolatory ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. Mettler teledo™ conductivity meter จากบริษัท Mettler teledo Co,Ltd ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้

สกัดใบมะม่วงที่ผ่านการอบแห้งและบดเป็นผงปริมาณ 1,530 กรัม โดยการหมักด้วย 85% เอทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารสกัดผ่านสำลี และกรองผ่านกระดาษกรองซ้ำอีกครั้งด้วยชุดกรองสุญญากาศ ส่วนกากที่เหลือนำมาสกัดซ้ำด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น จนสารสกัดที่ได้ไม่มีสี จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบ นำสารสกัดหยาบมาละลายด้วย 50% เอทานอล และทำการ partition ด้วยไดคลอโรมีเทนในกรวยแยก แล้วไขสารสกัดชั้นน้ำนำมากรองผ่านกระดาษกรอง โดยเก็บส่วนตะกอนที่กรองได้และล้างตะกอนด้วยสารละลายที่เย็นของ 50% เอทานอล จากนั้นทำการอบตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในตู้อบสุญญากาศ ชั่งน้ำหนักตะกอนที่ได้ และคำนวณหาปริมาณสารที่สกัดแยกได้โดยคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักผงแห้งใบมะม่วงน้ำดอกไม้

3.3.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และหาปริมาณสารแมงจิเฟอริน ในสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้โดยวิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง

1) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐาน mangiferin, catechin, epicatechin, quercetin, ellagic acid, keamferol และ gallic acid ตัวอย่างละ 12.5 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตรแต่ละใบ ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

2) การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

ชั่งสารที่สกัดแยกได้จากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ 10 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

3) การหาสภาวะโครมาโตกราฟี (chromatographic condition) ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์สารแมงจิเฟอริน เป็นการหาระบบของวัฏภาคคงที่ (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่สามารถแยกสารแมงจิเฟอรินได้ดีที่สุด

นำละลายสารมาตรฐานชนิดต่าง ๆ จากข้อ 1) และสารละลายตัวอย่างมา apply ลงบนแผ่น HPTLC และทดสอบตามสภาวะต่อไปนี้

Chromatographic condition:-

Stationary phase: HPTLC plates silica gel 60 F_{254} ขนาด 10.0 x20.0 เซนติเมตร

Mobile phase: ระบบที่ 1 สารผสมของ dichloromethane, acetic acid และ methanol ในอัตราส่วน 9:1:1 โดยปริมาตร
ระบบที่ 2 สารผสมของ ethyl acetate, acetone, formic acid และ water ในอัตราส่วน 8:2:1:1 โดยปริมาตร
ระบบที่ 3 สารผสมของ ethyl acetate, dichloromethane และ acetic acid ในอัตราส่วน 4:5:1 โดยปริมาตร

Developing chamber: เตรียมสภาวะในแชมเบอร์ให้อิ่มตัวด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ (เตรียมล่วงหน้าประมาณ 1 ชั่วโมง)

Development: 8.0 เซนติเมตร

Application volume: ปริมาตร 1-6 ไมโครลิตร

Detection: CAMAG TLC Scanner 3

Lamp: D_2

Wavelength: 320 นาโนเมตร

Slit dimensions: 4.00 x 0.3 มิลลิเมตร, Micro

Measurement mode: Absorption

4) การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อดังนี้ ความจำเพาะเจาะจง (specificity), ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range), ความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision)

ความจำเพาะเจาะจง (specificity) เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ตรวจวัดเฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์โดยไม่มีการรบกวนจากสารอื่น ทำโดยการ apply สารละลายมาตรฐานที่มีการรายงานว่าพบในสารสกัดใบมะม่วง ได้แก่ catechin, epicatechin, quercetin, ellagic acid, keamferol, gallic acid และ mangiferin จำนวนอย่างละ 8 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่างจำนวน 8-20 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ตรวจสอบเป็นไปตาม chromatographic condition ในข้อ 3.3.2 ข้อย่อย 3) โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 (ethyl acetate : acetone : formic acid : water; 8:2:1:1 โดยปริมาตร) และกำหนด spectrum scan mode ดังนี้

Spectrum scan:-

Slit dimensions:	4.00 x 0.30 มิลลิเมตร, Micro
Scan speed:	50 นาโนเมตร/วินาที
Lamp:	D_2
Start wavelength:	220 นาโนเมตร
End wavelength:	400 นาโนเมตร
Data resolution:	1 นาโนเมตร/ ขั้นตอน (step)
Purity scan, relative level:	85 %

ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range) ความเป็นเส้นตรง (linearity) เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลการวิเคราะห์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารที่มีอยู่จริง ช่วงขอวการวิเคราะห์ (range) เป็นช่วงความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุด ถึงความเข้มข้นสูงสุด ที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความแม่น ความเที่ยง และความเป็นเส้นตรง ทดสอบโดยทำการวิเคราะห์ด้วยการ apply สารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินปริมาตร 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น HPTLC (ความเข้มข้นของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน เท่ากับ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อแถบ) และทำการวิเคราะห์โดยใช้ chromatographic condition ตาม 3.3.2 ข้อย่อย 3) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 (ethyl acetate : acetone : formic acid : water; 8:2:1:1 โดยปริมาตร) สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน x) และพื้นที่ใต้พีก (แกน y) ของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r^2) ซึ่งต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 0.995

ความแม่น (accuracy) เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลวิเคราะห์ใกล้เคียงกับค่าที่มีอยู่จริง ทำการทดสอบความแม่นด้วยวิธี standard addition โดยการเติมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ระดับความเข้มข้น 100% ของความเข้มข้นที่ใช้วิเคราะห์ลงบนแถบของสาร ละลายตัวอย่าง ทำการตรวจสอบจำนวน 6 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในแถบสารละลายตัวอย่าง และในแถบสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานโดยใช้ chromatographic condition ตาม 3.2.2 ข้อย่อย 3 วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 (ethyl acetate : acetone : formic acid : water; 8:2:1:1 โดยปริมาตร) คำนวณค่าร้อยละของการกลับคืน (% recovery) และค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละของการกลับคืนต้องอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ การคำนวณค่าร้อยละของการกลับคืน สามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C_a - C_b) \times 100}{C_c}$$

โดยที่ C_a = ปริมาณของสารแมงจิเฟอรินที่วิเคราะห์ได้จากการสารละลายตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน

C_b = ปริมาณของสารแมงจิเฟอรินที่วิเคราะห์ได้จากการสารละลายตัวอย่าง

C_c = ปริมาณของสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่เติมลงบนแถบของสารละลายตัวอย่าง

ความเที่ยง (precision) เป็นค่าที่แสดงความใกล้เคียงของการวิเคราะห์ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำ ๆ กันหลายครั้ง โดยทำการตรวจสอบ 2 วิธีดังนี้

การทดสอบความทวนซ้ำได้ (repeatability)

ทำการตรวจสอบโดย apply สารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 1.0, 2.0 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อแถบ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ (แถบ) ลงบนแผ่น HPTLC เดียวกัน ทำการแยกสารโดยใช้ chromatographic condition ตาม 3.3.2 ข้อย่อย 3) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 (ethyl acetate : acetone : formic acid : water; 8:2:1:1 โดยปริมาตร) นำค่าพื้นที่ใต้พีก (peak area) มาคำนวณหาค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ค่าที่ได้ต้องไม่เกิน 2

Intermediate precision

ทำการตรวจสอบโดย apply สารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัมต่อแถบ จำนวน 6 ซ้ำ (แถบ) ลงบนแผ่น HPTLC เดียวกัน ทำการแยกสารโดยใช้ chromatographic condition ตาม 3.3.2 ข้อย่อย 3) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 (ethyl acetate : acetone : formic acid : water; 8:2:1:1 โดยปริมาตร) หาค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีก (peak area) โดยทำซ้ำเป็นเวลา 3 วัน และนำค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีก (peak area) ในแต่ละวัน มาคำนวณหาค่าร้อยละของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ค่าที่ได้ต้องไม่เกิน 2

5) การวิเคราะห์หาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้

ชั่งสารสกัดแมงจิเฟอริน 12.5 มิลลิกรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วยเมทานอล นำสารละลายของสารสกัดที่ได้ apply ปริมาณ 2.5 ไมโครลิตรต่อแถบ จำนวน 3 ซ้ำ (แถบ) ลงบนแผ่น HPTLC ทำการแยกสารโดยใช้ chromatographic condition ตาม 3.3.2 ข้อย่อย 3) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 (ethyl acetate : acetone : formic acid : water; 8:2:1:1 โดยปริมาตร) คำนวณหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัด โดยอาศัยกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีก (แกน y) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน (แกน x) (mangiferin standard curve)

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

1) การเตรียมสารละลายอนุมูล DPPH ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

ชั่งสารอนุมูล DPPH 0.02 กรัม นำมาละลายด้วยเมทานอลใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร นำไป sonicate นาน 15 นาที และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานวิตามินซี ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐานวิตามินซี 5 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วยเมทานอลใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

3) การเตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสารมาตรฐาน Trolox® 10 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วยเมทานอลใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

4) การเตรียมสารละลายตัวอย่างของสารสกัดแมงจิเฟอรินในมะม่วงน้ำดอกไม้ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสารสกัดแมงจิเฟอริน 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยเมทานอลใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไป sonicate นาน 10 นาที และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

5) วิธีการทดสอบ (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)

หลอดควบคุม ประกอบด้วยสารละลาย DPPH 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 3 มิลลิลิตร

หลอดทดสอบประกอบด้วยสารละลาย DPPH 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร สารละลายมาตรฐานวิตามินซี หรือ Trolox® หรือสารละลายตัวอย่างปริมาณ 40-120 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยเมทานอลเป็น 3 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายในหลองทดลองแต่ละหลอดให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่าร้อยละของการต้านอนุมูล DPPH (% inhibition) และสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) กับ % inhibition นำสมการเส้นตรงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่สามารถต้านอนุมูล DPPH ที่ร้อยละ 50 (IC_{50})

การคำนวณค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH (% inhibition)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{Ac - As}{Ac} \times 100$$

โดยที่ Ac = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

As = ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่างในหลอดทดสอบ

3.3.4 ศึกษาการเตรียมตำรับโลชัน

เตรียมตำรับโลชันพื้น จำนวน 8 สูตร (ตารางที่ 4) ด้วยวิธี beaker method โดยแยกผสมวัฏภาคน้ำและน้ำมัน และให้ความร้อนแก่วัฏภาคน้ำให้มีอุณหภูมิ 78 องศาเซลเซียส และวัฏภาคน้ำมันให้มีอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อยๆเทวัฏภาคน้ำมันลงในวัฏภาคน้ำ คนเบา ๆ ให้เข้ากันจนอุณหภูมิลดลงเป็น 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารกันเสียลงไป แล้วคนต่อจนเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำตำรับโลชันพื้น Rx1-Rx8 ที่ได้ไปตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ลักษณะเนื้อโลชัน สี กลิ่น ขนาดอนุภาค ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความหนืด และการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง ประเมินผลการตรวจสอบ และเลือกตำรับที่มีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีมาทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ (heating – cooling) โดยเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และ 45 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำจนครบ 6 รอบ แล้วนำมาตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ เพื่อคัดเลือกตำรับที่มีลักษณะทางเคมีกายภาพที่ดี และมีความคงตัวดีมา 1 ตำรับ เพื่อใช้ในการพัฒนาสูตรตำรับโลชันที่ประกอบด้วยสารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบในตำรับโลชันพื้น Rx 1- Rx 8

วัฏภาค	สาร	ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนัก (%w/w)							
		Rx 1	Rx 2	Rx 3	Rx 4	Rx 5	Rx 6	Rx 7	Rx 8
น้ำมัน	Coconut oil	20	20	20	20	20	20	20	20
	Cetostearyl alcohol	5	10						
	Stearyl alcohol			5					5
	Cetyl alcohol				5			5	
	Glyceryl-monostearate					5	5		
น้ำ	1%Carbopol 940						10	10	10
	Propylene glycol	10	10	10	10	10	10	10	10
	Brij® L4	5	6	6	5	5	5	5	5
	DI water	59	52	58	59	59	49	49	49
สารกันเสีย	Germaben	1	1	1	1	1	1	1	1

หมายเหตุ: เตรียม 1% cabopol 940 โดยกระจาย 1 กรัมของ carbopol 940 ในน้ำ 98.4 กรัม เติม triethanolamine 0.6 กรัม คนเบา ๆ ให้พองตัวดีจึงนำมาใช้

3.3.5 การเตรียมตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้

เลือกตำรับโลชันพื้นจาก 3.3.4 ที่ผ่านการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ (heating-cooling) และยังคงมีคุณสมบัติทางกายภาพที่ดีมาเตรียมตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน โดยแยกเตรียมเป็น 3 ส่วน ส่วนที่ 1 ผสมสารสกัดแมงจิเฟอริน 1 กรัม กับ propylene glycol ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยเพิ่มการละลาย ส่วนที่ 2 หลอมวัฏภาคน้ำที่เหลือให้ได้อุณหภูมิ 75-78 องศาเซลเซียส และส่วนที่ 3 หลอมวัฏภาคน้ำมันให้ได้อุณหภูมิประมาณ 75 องศาเซลเซียส จากนั้นเทส่วนที่ 3 ลงในส่วนที่ 2 โดยคนระหว่างเท และเมื่ออุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงเติมส่วนที่ 1 ลงไป คนให้เข้ากันด้วยเครื่อง ost stirrer ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที จนโลชันเย็นตัวลงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจึงเติมสารกันเสีย คนต่อจนโลชันเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปิดปากภาชนะให้สนิท ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.6 การประเมินคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของตำรับโลชัน

1) วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

ชั่งโลชัน 1 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรให้ครบ 10 กรัม นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter การวัดทำซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-ด่าง

2) วัดค่าความหนืด

วัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield viscometer โดยใช้หัววัดความหนืด s25 ความเร็วรอบ 12 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การวัดทำซ้ำ 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย

3) ทดสอบชนิดของโลชัน

ทดสอบโดยการย้อมสีโลชันด้วยสีที่ละลายในน้ำหรือน้ำมัน และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

4) วัดค่าการนำไฟฟ้า

วัดค่าการนำไฟฟ้าด้วยเครื่อง Mettler Teledo ^{TM} conductivity meter

5) ลักษณะของเนื้อโลชัน ความรู้สึกเมื่อทาบนผิวหนัง สี และกลิ่น

สังเกตด้วยสายตา และการดมกลิ่น สังเกตการกระจายตัวของโลชันหลังจากทาลงบนผิว

6) การปั่นเหวี่ยง

นำตำรับโลชันประมาณ 5 กรัม ใส่ในหลอดทดลองปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการแยกชั้นของโลชัน

3.3.7 การประเมินความคงตัวทางเคมีและกายภาพ

แบ่งตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินใส่ขวดมีฝาปิด ในปริมาณ 40 กรัม แยกเก็บใน 2 สภาวะ คือ สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียส ความชื้น 75%RH และสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส ความชื้น 70±10 %RH เป็นเวลา 4 เดือน นำมาประเมินความคงตัวทางเคมีและกายภาพตามหัวข้อ 3.3.6

3.3.8 การวิเคราะห์ปริมาณสารแมงจิเฟอรินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน

1) การเตรียมสารละลายของโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินและโลชันพื้น

นำโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน หรือโลชันพื้นมาคนให้เข้ากันดี ชั่งน้ำหนัก 1.25 กรัม ลงในบีกเกอร์ สกัดด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร และ sonicate ด้วยเครื่อง ultrasonic bath นาน 10 นาที จากนั้นนำไปแช่เย็นให้ชั้นน้ำมันแยกออก รินส่วนของเหลวใสลงใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร สกัดซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีเดิม และปรับปริมาตรด้วยเมทานอล กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 ก่อนนำไป apply ลงบนแผ่น HPTLC

2) การหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในตำรับโลชันด้วยวิธี HPTLC

หาปริมาณสารแมงจิเฟอรินโดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย apply สารละลายของโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน สารละลายของโลชันพื้น และสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น HPTLC โดยการ apply สารละลายแต่ละชนิด 3 ซ้ำ (แถบ) และนำไป develop ด้วยสภาวะในการแยกดังนี้

Chromatographic condition:-

Stationary phase:	HTLC plates silica gel 60 F_{254}, 10.0 x20.0 เซนติเมตร
Mobile phase:	สารผสมของ ethyl acetate : acetone : formic acid : water ในอัตราส่วน 8:2:1:1 โดยปริมาตร
Developing chamber:	เตรียมสภาวะในแชมเบอร์ให้อิ่มตัวด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ (เตรียมล่วงหน้าประมาณ 1 ชั่วโมง)
Development:	7.5 เซนติเมตร
Application volume:	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
Detection:	CAMAG TLC Scanner 3
Lamp:	D_2
Wavelength:	320 นาโนเมตร
Slit dimensions:	4.00 x 0.3 มิลลิเมตร, Micro
Measurement mode:	Absorption

การคำนวณหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในตำรับโลชัน โดยคำนวณค่า % label amount

$$\% \text{ label amount} = \frac{\text{ปริมาณของสารแมงจิเฟอรินที่วิเคราะห์ได้จากตำรับโลชัน}}{\text{ปริมาณของสารแมงจิเฟอรินที่ใส่ลงไปในตำรับโลชัน}} \times 100$$

3) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ)

หลอดควบคุมประกอบด้วยสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรเป็น 3 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

หลอดทดสอบประกอบด้วยสารละลายของโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินหรือสารละลายของโลชันพื้น ปริมาณ 280 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรเป็น 3 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

ผสมสารละลายในหลอดทดลองแต่ละหลอดให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็น blank และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่าร้อยละของการต้านอนุมูล DPPH (% inhibition) ตามสมการในข้อ 3.3.3

3.4 ระยะเวลาและแผนการดำเนินงาน

ระยะเวลาและแผนการดำเนินงาน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แผนการดำเนินงาน

การดำเนินงาน	พ.ศ. 2554	พ.ศ. 2555	พ.ศ. 2556	พ.ศ.2557						พ.ศ.2558			
				ม.ค.-ก.พ.	มี.ค.-เม.ย.	พ.ค.มิ.ย.	ก.ค.ส.ค.	ก.ย.ต.ค.	พ.ย.ธ.ค.	ม.ค.-ก.พ.	มี.ค.-เม.ย.	พ.ค.มิ.ย.	ก.ค.-ส..ค
1. ทบทวนวรรณกรรม	↔												
2. ศึกษาการสกัด การวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดด้วยเทคนิค HPTLC และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์		↔		↔	↔								
3. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด						↔							
4. ศึกษาการตั้งตำรับโลชัน							↔	↔	↔	↔			
5. ศึกษาความคงตัวของตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน											↔	↔	
6. นำเสนองานในการประชุมวิชาการ											↔	↔	
7. สรุปและอภิปรายผล											↔	↔	
8. เขียนรายงาน												↔	

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การเตรียมสารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้

จากการสกัดสารแมงจิเฟอรินโดยการหมัก (maceration) ผงใบมะม่วงน้ำดอกไม้ปริมาณ 1530 กรัม ด้วย 85% เอทานอล โดยเปลี่ยนตัวทำละลายทุกวันและสกัดสารได้อย่างหมดจดในระยะเวลา 7 วัน สารสกัดทั้งหมดเมื่อกรองผ่านกระดาษกรองและระเหยตัวทำละลายออก จะได้สารสกัดกึ่งแข็ง (semisolid) ชั่งน้ำหนักได้เท่ากับ 513.30 กรัม นำมาละลายด้วย 50% เอทานอล ปริมาตร 1 ลิตร และเพิ่มการละลายโดยเครื่อง ultrasonic bath หลังจากละลายเข้ากันดี นำมา partition ด้วยไดคลอโรมีเทนเพื่อแยกส่วนที่ไม่ต้องการออก เก็บชั้นเอทานอลซึ่งมีตะกอนของสารแมงจิเฟอรินมากรองผ่านกระดาษกรอง และนำตะกอนไปอบแห้งด้วยตู้อบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สารสกัดแมงจิเฟอรินที่ได้มีลักษณะเป็นผงละเอียด สีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 5) ชั่งน้ำหนักได้ 39.16 กรัม คิดเป็นร้อยละ 2.61 ของน้ำหนักผงใบแห้งมะม่วงน้ำดอกไม้

ภาพที่ 5 ลักษณะของผงแมงจิเฟอรินที่สกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้

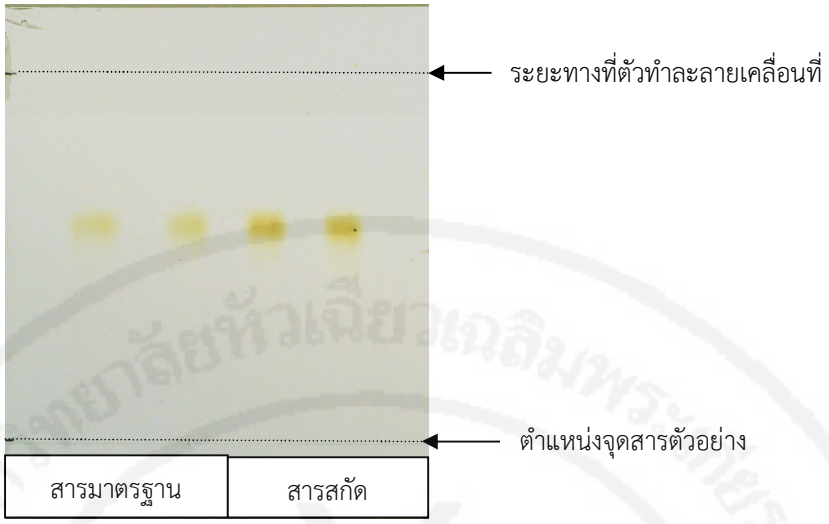
4.2 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้โดยวิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง

การวิเคราะห์หาปริมาณสารแมงจิเฟอรินโดยวิธี HPTLC นั้น ได้ทดลองใช้วัฏภาคคงที่ คือ แผ่น HPTLC silica gel 60 F_{254} และวัฏภาคเคลื่อนที่ 3 ระบบ (ดังแสดงในหัวข้อ 3.3.2 ข้อย่อย 3) ผลการทดลองพบว่า วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 ซึ่งเป็นสารละลายผสมของ ethyl acetate : acetone : formic acid : water ในอัตราส่วน 8:2:1:1 โดยปริมาตร เป็นระบบที่เหมาะสมในการวิเคราะห์และหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัด โดยพบว่าสารแมงจิเฟอรินมีค่า R_f 0.48 ซึ่งตรงกับค่า R_f ของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน ดังภาพที่ 6 ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์และหาปริมาณสารแมงจิเฟอริน คือ

Chromatographic condition:-

Stationary phase:	HPTLC plates silica gel 60 F_{254}10.0 x20.0 เซนติเมตร
Mobile phase:	ethyl acetate : acetone : formic acid : water ในอัตราส่วน 8:2:1:1 โดยปริมาตร
Developing chamber:	เตรียมสภาวะในแชมเบอร์ให้อิ่มตัวด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ (เตรียมล่วงหน้าประมาณ 1 ชั่วโมง)
Development:	8.0 เซนติเมตร
Application volume:	ปริมาตร 2-6 ไมโครลิตรของสารมาตรฐานและสารสกัด
Detection:	CAMAG TLC Scanner 3
Lamp:	D_2
Wavelength:	320 นาโนเมตร
Slit dimensions:	4.00 x 0.3 มิลลิเมตร, Micro
Measurement mode:	Absorption

ภาพที่ 6 HPTLC โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และสารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2



4.3 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์และการหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัด

4.3.1 การทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (specificity)

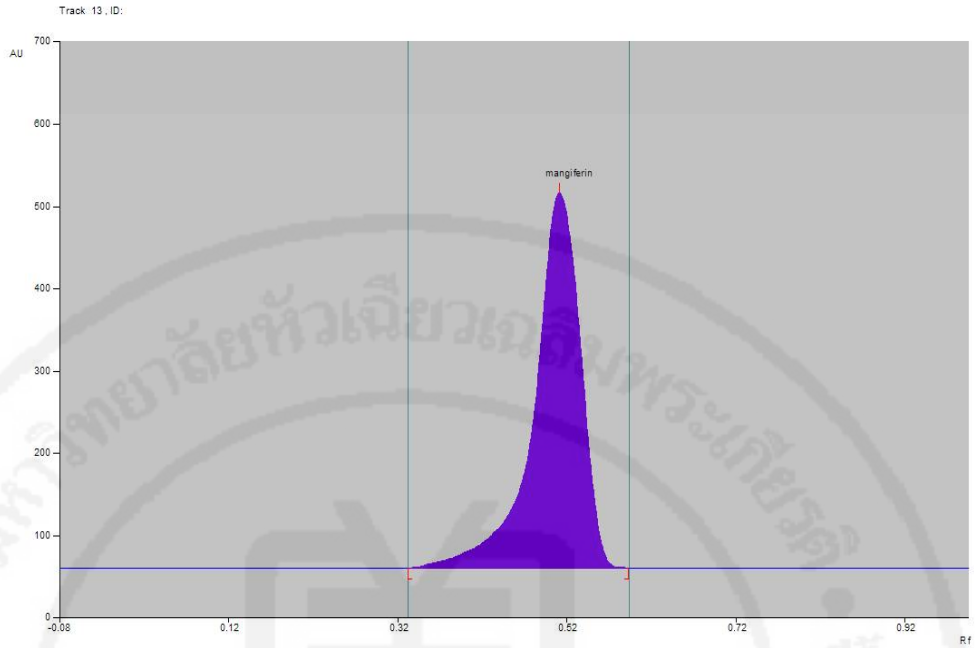
จากการทดสอบโดยการ apply สารละลายของสารมาตรฐาน mangiferin, quercetin, epicatechin, gallic acid, keamferol, catechin และสารละลายของสารสกัด ลงบนแผ่น HPTLC silica gel 60 F_{254} พัฒนาแผ่นด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 คือ สารละลายผสมของ ethyl acetate : acetone : formic acid : น้ำ ในอัตราส่วน 8:2:1:1 โดยปริมาตร สามารถแยกสารแมงจิเฟอรินที่ค่า R_f 0.48 โดยไม่พบการรบกวนของสารมาตรฐานอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งเป็นสารที่มีการรายงานว่าพบในใบมะม่วง และยังสามารถตรวจพบสารแมงจิเฟอรินได้ในแถบของสารสกัด (แถบที่ 7-14) ดังแสดงในภาพที่ 7 และแผนภูมิที่ 2

เมื่อทำการสแกนสารในตำแหน่ง R_f 0.48 ของแถบสารสกัดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินด้วยเครื่อง TLC scanner 3 ในช่วงความยาวคลื่น 230-450 นาโนเมตร พบว่าสารทั้งสองมีลักษณะของยูวีสเปคตรัมเหมือนกัน (แผนภูมิที่ 3) แสดงว่าสารที่ตรวจพบในสารสกัดเป็นสารแมงจิเฟอริน และสรุปได้ว่า วิธีวิเคราะห์นี้มีความจำเพาะ

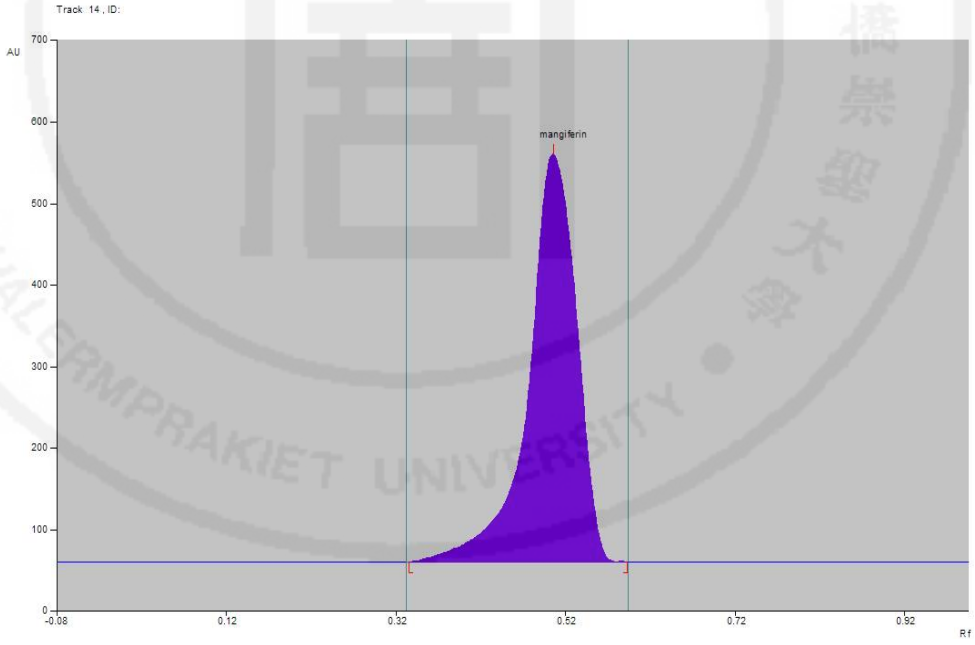
ภาพที่ 7 HPTLC โครมาโตแกรม แสดงความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (แถบที่ 1 คือสารมาตรฐาน mangiferin (R_f 0.48) แถบที่ 2 คือสารมาตรฐาน gallic acid (R_f 0.90) แถบที่ 3 คือสารมาตรฐาน ellagic acid (R_f 0.86) แถบที่ 4 คือสารมาตรฐาน catechin (R_f 0.90) แถบที่ 5 คือสารมาตรฐาน epicatechin (R_f 0.90) แถบที่ 6 คือสารมาตรฐาน quercetin (R_f 0.92) และแถบที่ 7-14 คือสารสกัดแมงจิเฟอรินที่ปริมาตรต่าง ๆ กัน)

แผนภูมิที่ 2 HPTLC เดนซิโตแกรมของสารมาตฐานแมงจิเฟอริน a) และสารสกัดแมงจิเฟอริน b) แสดงค่า R_f 0.48 ที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร

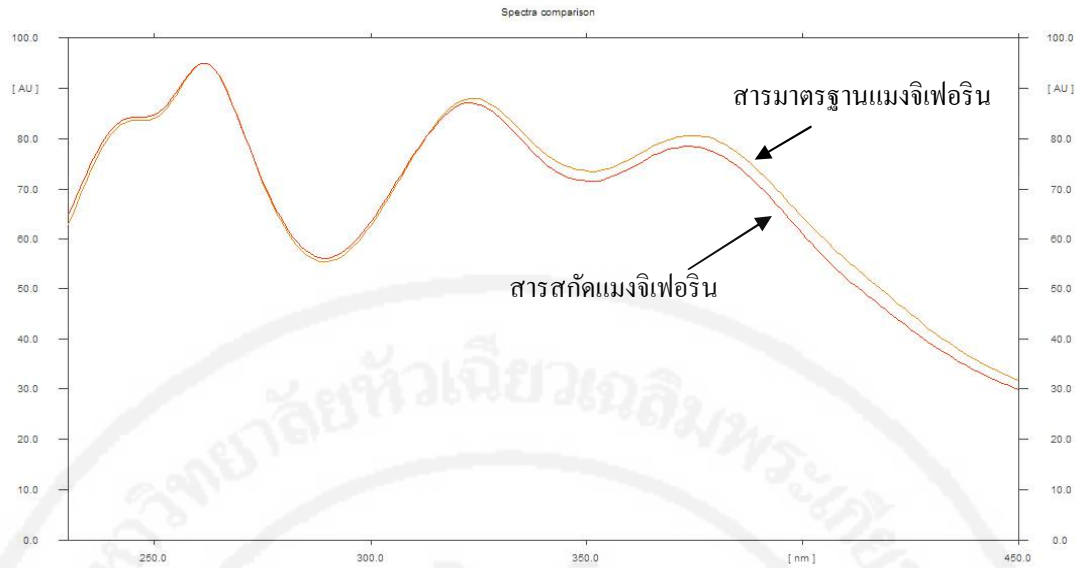
a)



b)



แผนภูมิที่ 3 ยูวีสเปคตรัมของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน และสารสกัดแมงจิเฟอริน (R_f 0.48)



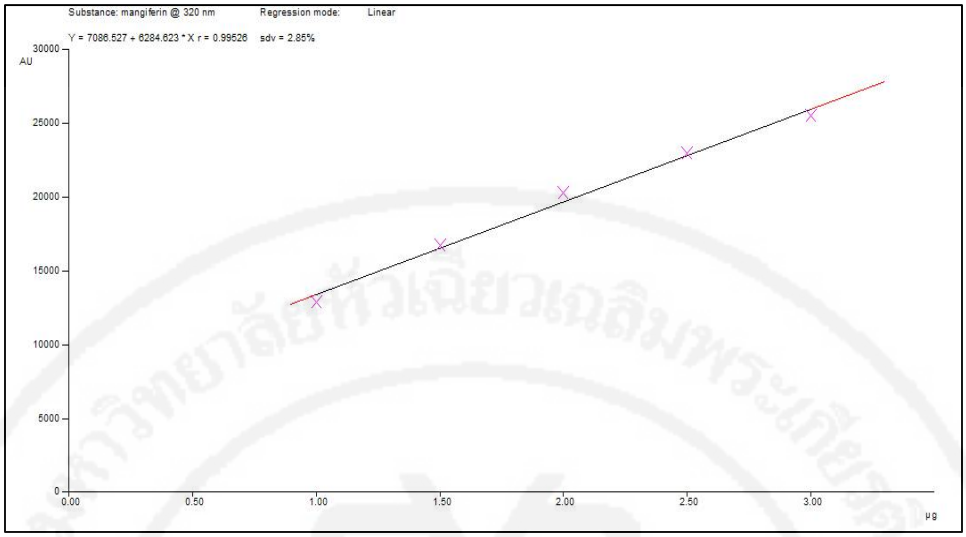
4.3.2 ความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์ (linearity and range)

จากการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินพบว่า มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 1.0 – 3.0 ไมโครกรัมต่อแถบ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9953 ดังตารางที่ 6 แผนภูมิที่ 4 และแผนภูมิที่ 5

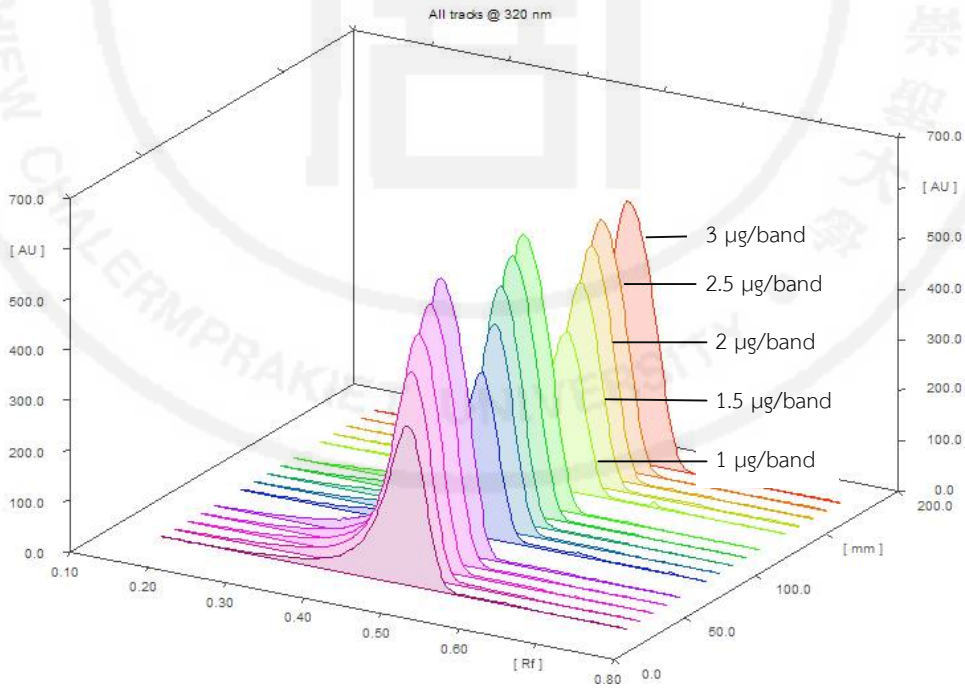
ตารางที่ 6 ข้อมูลความเข้มข้นและพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน (n=3)

ความเข้มข้น (µg/band)	พื้นที่ใต้พีก
1.0	12806.81
1.5	16083.32
2.0	18864.85
2.5	21188.13
3.0	23217.36
Slope	5072
y-intercept	8304
r^2	0.9953

แผนภูมิที่ 4 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอริน โดยแกน x เป็นความเข้มข้นของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน (ไมโครกรัมต่อแถบ) แกน y เป็นพื้นที่ใต้พีก



แผนภูมิที่ 5 HPTLC โครมาโตแกรม (3 มิติ) ของกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (3 ซ้ำ)



4.3.3 ความแม่น (accuracy)

ผลการทดสอบความแม่นของวิธี โดยการเติมสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ระดับความเข้มข้น 100 % ในสารละลายของสารสกัดแมงจิเฟอริน พบว่าค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) เท่ากับ 107.89±0.29 ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความแม่น (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

ลำดับ	**ปริมาณที่เติมเข้าไป (ไมโครกรัม)**	**ปริมาณที่ตรวจพบ (ไมโครกรัม)**	**ร้อยละการกลับคืน**
1	1.0000	1.0828	108.28
2	1.0000	1.0748	107.48
3	1.0000	1.0768	107.68
4	1.0000	1.0808	108.08
5	1.0000	1.0798	107.98
6	1.0000	1.0788	107.88
ค่าเฉลี่ย			107.89
SD			0.29
%RSD			0.26

4.3.4 ความเที่ยง (precision)

1) การทดสอบความทวนซ้ำได้ (repeatability)

จากการทดสอบหาค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของผลการวิเคราะห์พื้นที่ใต้พีก (peak area) ของสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 1.0, 2.0 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อแถบโดยทำความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ พบค่า %RSD เท่ากับ 1.71, 0.51 และ 1.36 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความทวนซ้ำได้ (Repeatability) ของวิธีวิเคราะห์

ครั้งที่	**ความเข้มข้น (µg/band)**	**Peak area**	**ความเข้มข้น (µg/band)**	**Peak area**	**ความเข้มข้น (µg/band)**	**Peak area**
1	1.0	13250.92	2.0	18866.72	3.0	23170.09
2	1.0	12952.72	2.0	18861.32	3.0	23328.60
3	1.0	12738,57	2.0	18747.18	3.0	23522.92
4	1.0	12732.74	2.0	18741.40	3.0	23815.81
5	1.0	12775.05	2.0	18639.44	3.0	23932.15
ค่าเฉลี่ย	12890.00		18771.12		23553.91	
%RSD	1.71		0.51		1.36	

2) Intermediate precision

จากการทดสอบหาค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของผลการวิเคราะห์พื้นที่ใต้พีกของสารละลายมาตรฐานแมงจิเฟอรินที่ความเข้มข้น 2.0 ไมโครกรัม ต่อแถบ จำนวน 6 ซ้ำ โดยทำต่างวันกันเป็นเวลา 3 วัน พบว่า มีค่า %RSD เท่ากับ 1.52 ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบ Intermediate precision

ครั้งที่	**พื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินปริมาณ 2.0 ไมโครกรัม ต่อแถบ**		
	วันที่ 1	**วันที่ 2**	**วันที่ 3**
1	17272.16	17050.44	17437.91
2	17178.12	17637.76	17625.02
3	17325.21	17581.91	17636.46
4	17139.94	17459.96	17809.33
5	17637.44	17435.74	18024.65
6	16953.69	17403.85	18067.72
เฉลี่ย	17243.61	17428.38	17766.85
%RSD	1.32	1.18	1.39
เฉลี่ย 3 วัน	17479.58		
%RSD 3 วัน	1.52		

4.3.5 การหาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดใบมะม่วง

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดจากใบมะม่วงพบปริมาณของสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดร้อยละ 94.75±0.52 โดยน้ำหนัก แสดงตามตารางที่ 10

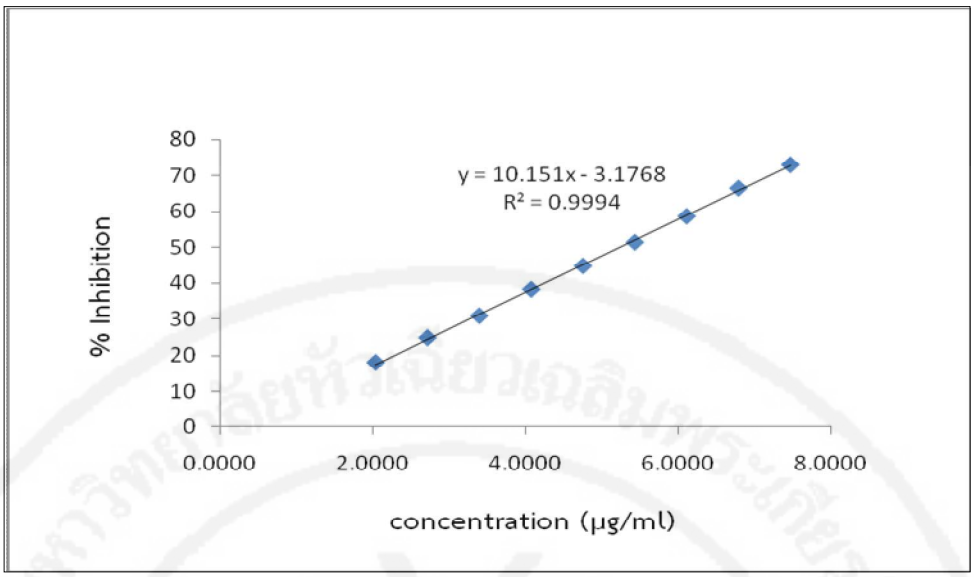
ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดใบมะม่วง

ครั้งที่	ปริมาณสารสกัดที่ทำการวิเคราะห์ (ไมโครกรัมต่อแถบ)	ปริมาณสารแมงจิเฟอรินที่พบในสารสกัด (ไมโครกรัมต่อแถบ)	ร้อยละของสารแมงจิเฟอรินในสารสกัด
1	1.112	1.054	94.79
2	1.112	1.048	94.24
3	1.112	1.059	95.23
เฉลี่ย	1.112	1.054	94.75
SD	0	0.01	0.50
%RSD	0	0.52	0.52

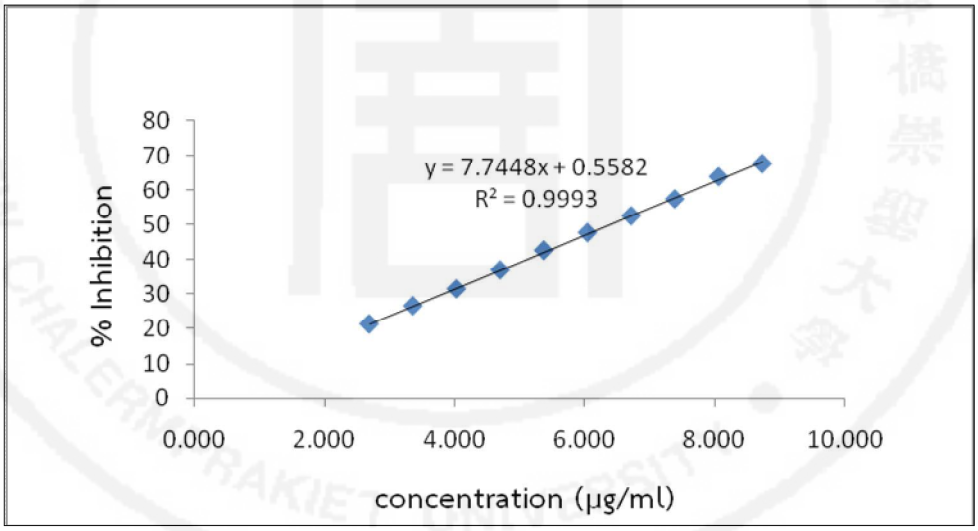
4.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดแมงจิเฟอริน วิตามินซี และ Trolox® แสดงด้วยค่า IC_{50} (ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยังยั้งหรือจับกับอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50) ซึ่งคำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้งอนุมูล DPPH (% inhibition) กับความเข้มข้นของสารทดสอบ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าวิตามินซี สารสกัดแมงจิเฟอริน และ Trolox® มีค่า IC_{50} เท่ากับ 5.24, 6.38 และ 7.89 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแผนภูมิที่ 6-8 และตารางที่ 11

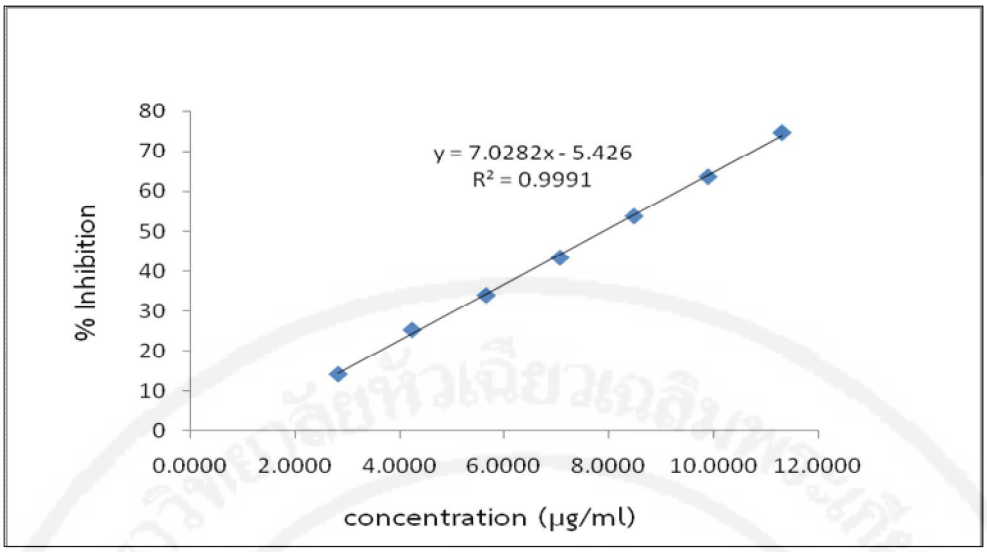
แผนภูมิที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของวิตามินซี



แผนภูมิที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของสารสกัดแมงจิเฟอริน



แผนภูมิที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของ Trolox®



ตารางที่ 11 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของวิตามินซี สารสกัดแมงจิเฟอริน และ Trolox®

สาร	Concentration µg/ml	% inlibition ± SD	IC_{50} (µg/ml)
วิตามินซี	2.67	24.79 ±0.52	5.24
	4.00	38.21 ± 0.48	
	5.33	51.41 ± 1.33	
	6.67	66.53 ± 1.00	
	7.33	73.05 ± 2.65	
สารสกัดแมงจิเฟอริน	2.67	21.31 ± 1.01	6.38
	4.00	31.46 ± 0.16	
	5.33	42.64 ± 1.31	
	6.67	52.48 ± 0.84	
	7.33	57.36 ± 0.12	
	8.00	63.86 ± 0.50	
	8.67	67.62 ± 0.44	
Trolox®	2.67	14.29 ± 1.05	7.89
	4.00	25.41 ± 0.15	
	5.33	34.06 ± 0.50	
	6.67	43.48 ± 0.49	
	8.00	53.88 ±1.29	
	9.33	63.75 ± 1.54	
	10.67	74.83 ± 1.00	

หมายเหตุ: ความเข้มข้นของสารทดสอบในตารางเป็นค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่มีการปรับปริมาตรให้ครบ 3 มิลลิลิตร โดยครอบคลุมช่วง IC_{50}

4.5 ศึกษาการเตรียมตำรับโลชันพื้น

จากการทดลองเตรียมตำรับโลชันพื้น Rx1 – Rx8 และประเมินลักษณะทางเคมีกายภาพของตำรับ ซึ่งได้แก่ สี กลิ่น ลักษณะเนื้อโลชัน และความหนืด พบว่าทุกตำรับมีลักษณะของเนื้อโลชันขาวเนียน น่าใช้ มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าว มีการกระจายตัวดี ทาแล้วมีปื้นขาวตอนเริ่มทาและจางหายไปเมื่อทาเสร็จจะรู้สึกเหนอะหนะเล็กน้อย แต่ละตำรับมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วงที่เหมาะสมในการนำมาใช้ทางผิวหนัง (4.94 – 6.13) เมื่อนำทุกตำรับมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที พบว่า ตำรับ Rx6, Rx7 และ Rx8 ยังคงมีลักษณะทางกายภาพที่ดีไม่แยกชั้น ดังแสดงในตารางที่ 12

ดังนั้น จึงนำตำรับโลชันพื้น Rx6, Rx7 และ Rx8 ที่ผ่านการทดสอบความคงตัวโดยการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) มาศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ (45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง และ 5 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง) จำนวน 6 รอบ เพื่อหาตำรับที่มีความคงตัวมาเตรียมโลชันสารสกัด ซึ่งผลการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพภายหลังการทดสอบจนครบ 6 รอบ ดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่า ตำรับ Rx6 มีความคงตัวดีที่สุด ความเป็นกรด-ด่าง และความหนืดของโลชันมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ลักษณะเนื้อโลชันเกิดชั้นครีมเล็กน้อย แต่เมื่อคนผสมให้เข้ากันพบว่าเนื้อโลชันมีลักษณะขาวเนียนเหมือนเดิม ส่วนตำรับ Rx7 และ Rx8 เกิดแยกชั้นเมื่อสิ้นสุดสภาวะเร่ง และเมื่อคนพบว่า ยังคงแยกชั้น ดังนั้นจึงเลือกตำรับ Rx6 สำหรับนำไปเตรียมตำรับโลชันสารสกัด

ตารางที่ 12 ผลการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตำรับโลชันพื้น

ตำรับ	ลักษณะเนื้อโลชัน สี และกลิ่น	การกระจายตัว เมื่อทา	pH	การปั่นเหวี่ยง 5,000 rpm (30 นาที)
Rx1	สีขาวเนียน มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าว	กระจายตัวดี	4.95	แยกชั้น
Rx2	สีขาวเนียน มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าว	กระจายตัวดี	4.97	แยกชั้น
Rx3	สีขาวเนียน มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าว	กระจายตัวดี	4.96	แยกชั้น
Rx4	สีขาวเนียน มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าว	กระจายตัวดี	5.00	แยกชั้น
Rx5	สีขาวเนียน มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าว	กระจายตัวดี	4.94	แยกชั้น
Rx6	สีขาวเนียน มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าว	กระจายตัวดี	5.78	ไม่แยกชั้น
Rx7	สีขาวเนียน มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าว	กระจายตัวดี	5.94	ไม่แยกชั้น
Rx8	สีขาวเนียน มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าว	กระจายตัวดี	6.13	ไม่แยกชั้น

หมายเหตุ: rpm หมายถึง ความเร็วรอบต่อนาที

pH หมายถึง ความเป็นกรด-ด่าง

ตารางที่ 13 ผลการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตำรับโลชันพื้น Rx6, Rx7 และ Rx8 จากการทดสอบความคงตัวในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิเป็นเวลา 6 รอบ

ตำรับ	ลักษณะของโลชันที่ตรวจสอบ (สี กลิ่น การแยกชั้น)		ความหนืด (cps)		ความเป็นกรด-ด่าง	
	เวลาเริ่มต้น	หลังผ่านสภาวะเร่ง 6 รอบ	เวลาเริ่มต้น	หลังผ่านสภาวะเร่ง 6 รอบ	เวลาเริ่มต้น	หลังผ่านสภาวะเร่ง 6 รอบ
Rx 6	สีขาวเนียน หอมกลิ่นน้ำมันมะพร้าว	สีและกลิ่นคงเดิมแต่เกิดชั้นครีมแยกกันเมื่อคนแล้วกลับไปเหมือนเดิม	3840	4980	6.18	6.10
Rx 7	สีขาวเนียน หอมกลิ่นน้ำมันมะพร้าว	สีและกลิ่นคงเดิมแต่เกิดชั้นครีมแยกกันเมื่อคนแล้วยังคงแยกชั้น	2088	1944	6.37	6.29
Rx 8	สีขาวเนียน หอมกลิ่นน้ำมันมะพร้าว	สีและกลิ่นคงเดิม แต่เนื้อครีมแยกชั้น เมื่อคนแล้วยังคงแยกชั้น	2040	4200	6.44	6.36

หมายเหตุ: cps หมายถึง centipoises เป็นหน่วยของค่าความหนืด

4.6 การเตรียมโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้

ผู้วิจัยได้นำสูตรตำรับ Rx6 มาปรับเพื่อเพิ่มความหนืดในตำรับ ด้วยการเพิ่มปริมาณของ 1 % carbopol 940 ในวัฏภาคน้ำ จากปริมาณร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก และทำการเตรียมโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินและโลชันพื้นตามสูตรตำรับ ดังแสดงในตารางที่ 14

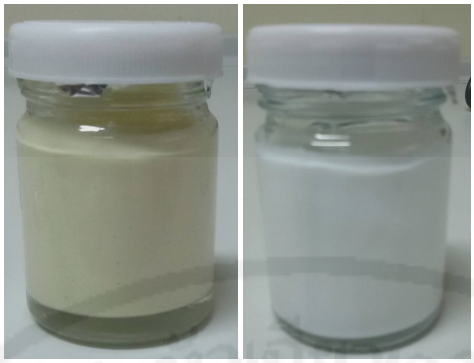
ตารางที่ 14 สูตรตำรับโลชันพื้นและโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน

วัฏภาค	สาร	ปริมาณร้อยละโดยน้ำหนัก (% w/w)	
		โลชันแมงจิเฟอริน	โลชันพื้น
น้ำมัน	Coconut oil	20	20
	Glyceryl monostearate	5	5
น้ำ	1% Carbopol 940	12	12
	Propylene glycol	10	10
	Mangiferin extract	1	-
	Brij® L4	6	6
	DI Water	45	46
สารกันเสีย	Germaben	1	1

จากการเตรียมตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน ได้โลชันมีลักษณะสีเหลืองครีมอ่อน ดังภาพที่ 8 มีกลิ่นหอมของน้ำมันมะพร้าว มีการกระจายตัวดีและรู้สึกเหนอะหนะเล็กน้อยเมื่อทา ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.94±0.02 (n=3, ค่าเฉลี่ย±SD) และความหนืดเท่ากับ 19809±1511 cps (n=3, ค่าเฉลี่ย±SD)

ส่วนตำรับโลชันพื้นที่เตรียมเพื่อทำการทดสอบความคงตัวพร้อมกับโลชันสารสกัดนั้นเนื้อโลชันมีลักษณะสีขาวเนียนดังภาพที่ 15 มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าว มีการกระจายตัวดีและรู้สึกเหนอะหนะเล็กน้อยเมื่อทา ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.27±0.01 (n=3, ค่าเฉลี่ย±SD) และความหนืดเท่ากับ 18809±508 cps (n=3, ค่าเฉลี่ย±SD)

ภาพที่ 8 ตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน (ซ้าย) และตำรับโลชันพื้น (ขวา)



4.7 การศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์)

4.7.1 การประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

การศึกษาความคงตัวของโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินภายใต้สภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูงในระยะเวลา 16 สัปดาห์ (4 เดือน) พบว่า โลชันมีสีเหลืองเข้มขึ้นอย่างชัดเจน กลิ่นของน้ำมันมะพร้าวอ่อนลงอย่างมาก และลักษณะเนื้อโลชันหยาบขึ้น แต่ไม่มีการแยกชั้น ความหนืดลดลงมีค่าเท่ากับ 19143±532 cps ความเป็นกรด-ด่างลดลง มีค่าเท่ากับ 4.85±0.01 แต่ยังอยู่ในช่วงที่ยอมรับในการนำมาใช้ทางผิวหนัง (ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับผิวหนังอยู่ในช่วง 4-7) ลักษณะโลชันแสดงดังภาพที่ 9

ส่วนโลชันพื้นมีลักษณะเนื้อโลชันหยาบขึ้น และเกิดการแยกชั้น เมื่อคนเบา ๆ ซักพักหนึ่งจึงรวมเป็นเนื้อเดียวกัน มีกลิ่นของน้ำมันมะพร้าวจางลง ความเป็นกรด-ด่างลดลงจากเดิมเล็กน้อย มีค่าเท่ากับ 5.86±0.03 ความหนืดลดลงอย่างมากมีค่าเท่ากับ 6598±900 cps แสดงผลการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพดังตารางที่ 15

ภาพที่ 9 ลักษณะของโลชันแมงจิเฟอริน (M) และโลชันพื้น (B) ในการศึกษาความคงตัวที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 16 สัปดาห์

(M) (B)

(M) (B)

ตารางที่ 15 ผลการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโลชันพื้นและโลชันสารสกัด หลังจากเก็บในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 16 สัปดาห์

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ	**โลชันพื้น**		**โลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน**	
	เริ่มต้น	**16 สัปดาห์**	**เริ่มต้น**	**16 สัปดาห์**
ลักษณะทางกายภาพ	โลชันเนื้อเนียนสีขาว มีกลิ่นหอมของน้ำมันมะพร้าว	เนื้อโลชันเกิดการแยกชั้น มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าวอ่อนมาก	โลชันเนื้อเนียนสีเหลืองครีมอ่อน มีกลิ่นหอมของน้ำมันมะพร้าว	โลชันเนื้อหยาบขึ้นมีสีเหลืองเข้มขึ้น มีกลิ่นน้ำมันมะพร้าวอ่อนลงมาก
ความเป็นกรด-ด่าง	6.27±0.01	5.86±0.03	5.94±0.02	4.85±0.01
ความหนืด (cps)	18809±508	6598±900	19809±1511	19143±532

หมายเหตุ: ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความหนืดแสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย±SD, n=3

4.7.2 การศึกษาความคงตัวของสารแมงจิเฟอรินในตำรับและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการศึกษาพบว่าการเก็บโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) มีผลทำให้ปริมาณของสารแมงจิเฟอรินในตำรับลดลงอย่างต่อเนื่องจากสัปดาห์ที่ 0 มีปริมาณสารแมงจิเฟอรินในตำรับร้อยละ 90.85±0.69 เมื่อสัปดาห์ที่ 16 พบว่าเหลือเพียงร้อยละ 20.97±0.64 แต่ไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของตำรับโลชันสารสกัด เนื่องจากสัปดาห์ที่ 0 ตำรับโลชันสารสกัดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 94.30±0.04 และเมื่อสัปดาห์ที่ 16 ยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 93.62±0.16 (ตารางที่ 16) ทั้งนี้ตำรับโลชันพื้นไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อทดสอบด้วยวิธีเดียวกัน

จาก HPTLC เดนซิโตแกรมของตำรับโลชันสารสกัดที่สัปดาห์ที่ 0-16 พบสารที่เพิ่มขึ้นที่มีค่า R_f เท่ากับ 0.22 เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่สารแมงจิเฟอริน (R_f 0.48) มีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นกัน (ภาพที่ 17) และเมื่อเปรียบเทียบยูวีสเปคตรัมของสารที่ R_f 0.22 (λ_{max} :266, 322 และ 380 นาโนเมตร) กับยูวีสเปคตรัมของสารแมงจิเฟอริน (λ_{max} :262, 322 และ 372 นาโนเมตร) พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกัน (ภาพที่ 18)

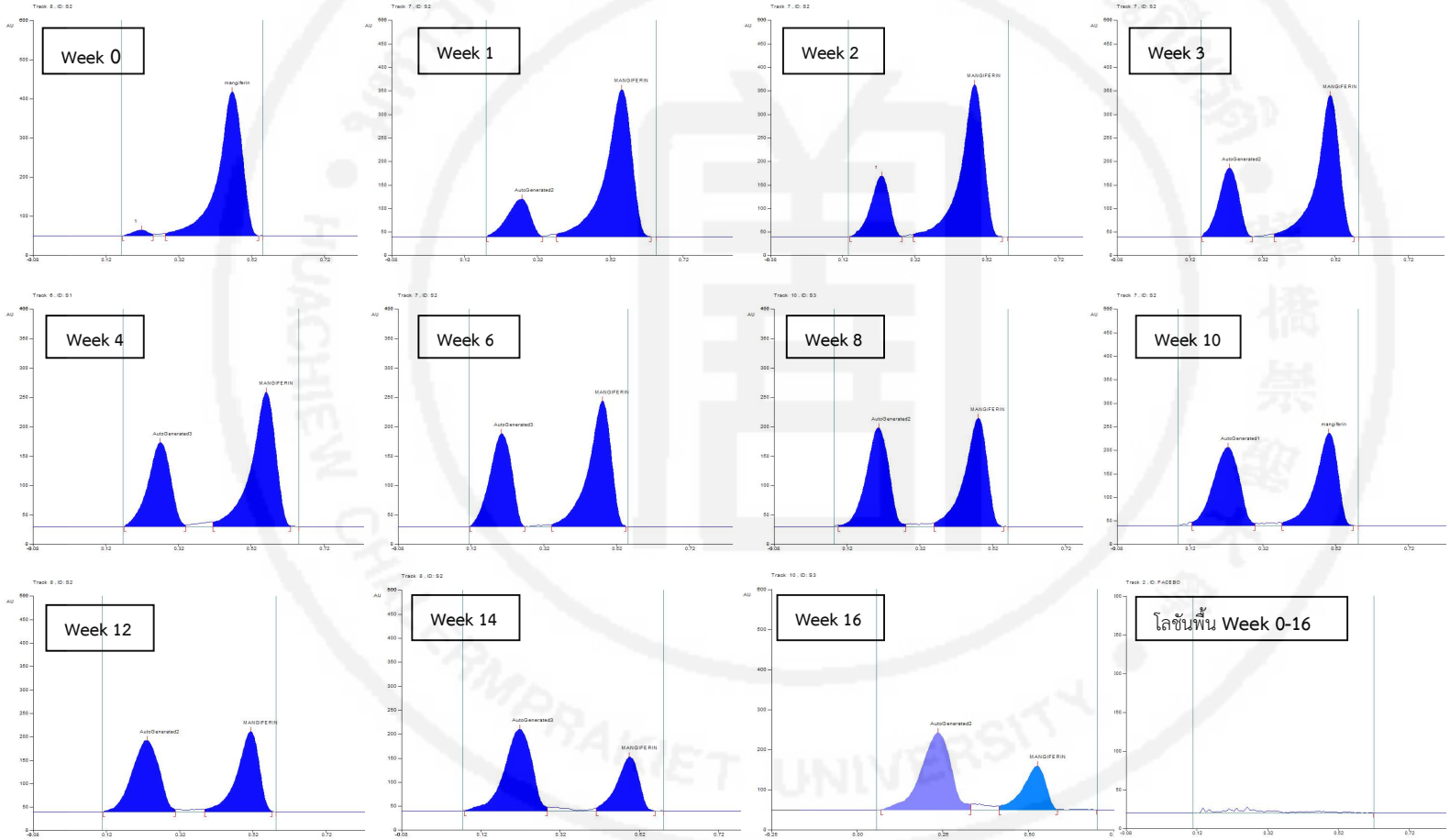
ตารางที่ 16 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารแมงจิเฟอรินในตำรับโลชันสารสกัดเมื่อศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 16 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	การประเมินความคงตัวของสารแมงจิเฟอริน (ค่าเฉลี่ย±SD, n=3)	
	% inhibition	% label amount
0	94.30±0.04	90.85±0.69
1	94.41±0.01	84.67±0.22
2	94.28±0.08	78.69±0.82
3	93.79±0.14	74.43±0.58
4	93.89±0.10	58.36±0.28
6	93.88±0.08	50.73±0.34
8	93.65±0.17	50.34±1.30
10	93.59±0.03	47.53±1.35
12	93.93±0.15	38.51±0.35
14	93.75±0.06	21.40±0.67
16	93.62±0.16	20.97±0.64

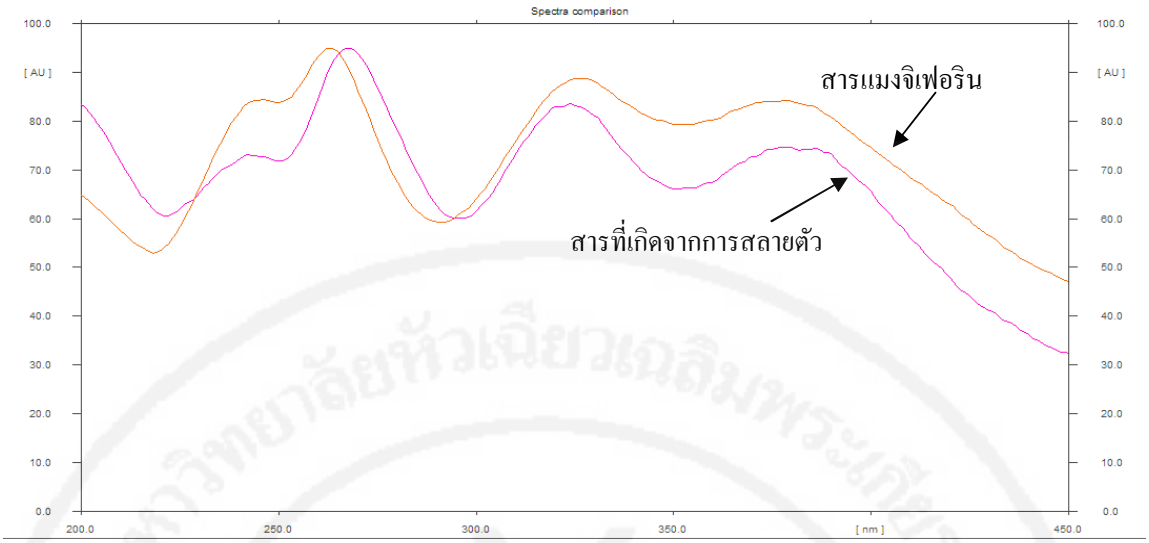
หมายเหตุ: % inhibition หมายถึง ร้อยละของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

% label amount หมายถึง ร้อยละของปริมาณสารแมงจิเฟอรินที่ระบุในตำรับ

แผนภูมิที่ 9 HPTLC เดนซิโตแกรมของตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน ในการศึกษาความคงตัวที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาต่าง ๆ (สัปดาห์ที่ 0-16)



แผนภูมิที่ 10 ยูวีสเปคตรัมของสารแมงจิเฟอริน (R_f 0.48) และสารที่เกิดจากการสลายตัว (R_f 0.22)



4.8 การศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10เปอร์เซ็นต์)

4.8.1 การประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

จากการทดสอบพบว่าโลชันสารสกัด และโลชันพื้น มีความคงตัวทางกายภาพดี คือเนื้อของโลชันยังคงมีลักษณะเนียนสวย และมีกลิ่นหอมของน้ำมันมะพร้าว แสดงดังภาพที่ 10 ค่าความเป็นกรด-ด่างของโลชันพื้นและโลชันสารสกัดลดลงเพียงเล็กน้อยมีค่าเท่ากับ 6.03±0.03 และ 5.36±0.01 ตามลำดับ ส่วนความหนืดของโลชันพื้นและโลชันสารสกัดลดลงเป็น 14077±1151 cps และ 12157±400 cps ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 17

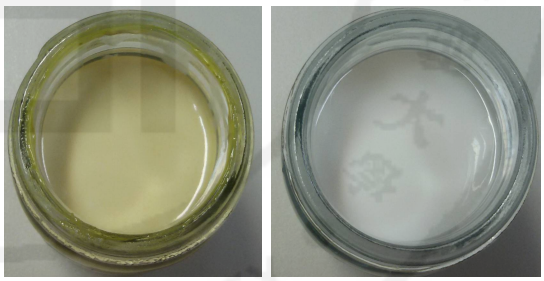
ตารางที่ 17 ผลการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโลชันพื้นและโลชันสารสกัด หลังจากเก็บที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 16 สัปดาห์

คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ	**โลชันพื้น**		**โลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน**	
	เริ่มต้น	**16 สัปดาห์**	**เริ่มต้น**	**16 สัปดาห์**
ลักษณะทางกายภาพ	โลชันเนื้อเนียนสีขาว มีกลิ่นหอมของน้ำมันมะพร้าว	โลชันเนื้อเนียนสีขาว มีกลิ่นหอมของน้ำมันมะพร้าว	โลชันเนื้อเนียนสีเหลืองครีมอ่อน มีกลิ่นหอมของน้ำมันมะพร้าว	โลชันเนื้อเนียนสีเหลืองครีมอ่อน มีกลิ่นหอมของน้ำมันมะพร้าว
ความเป็นกรด-ด่าง	6.27±0.01	6.03±0.03	5.94±0.02	5.36±0.01
ความหนืด (cps)	18809±508	14077±1151	19809±1511	12157±400

หมายเหตุ: ค่าความเป็นกรด-ด่างและค่าความหนืดแสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย±SD, n=3

ภาพที่ 10 ลักษณะของโลชันแมงจิเฟอริน (M) และโลชันพื้น (B) ในการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 16 สัปดาห์

(M) (B)



(M) (B)

4.8.2 การศึกษาความคงตัวของสารแมงจิเฟอรินในตำรับและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

จากการศึกษาความคงตัวในสภาวะอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารแมงจิเฟอรินในตำรับลดลงอย่างช้าๆ และมีปริมาณสารแมงจิเฟอรินอยู่ในตำรับร้อยละ 73.62±1.20 ในสัปดาห์ที่ 16 ในขณะที่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของโลชันสารสกัดลดลงเพียงเล็กน้อยโดยต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 93.98±0.10 ในสัปดาห์ที่ 16 (ตารางที่ 18 และแผนภูมิที่ 11)

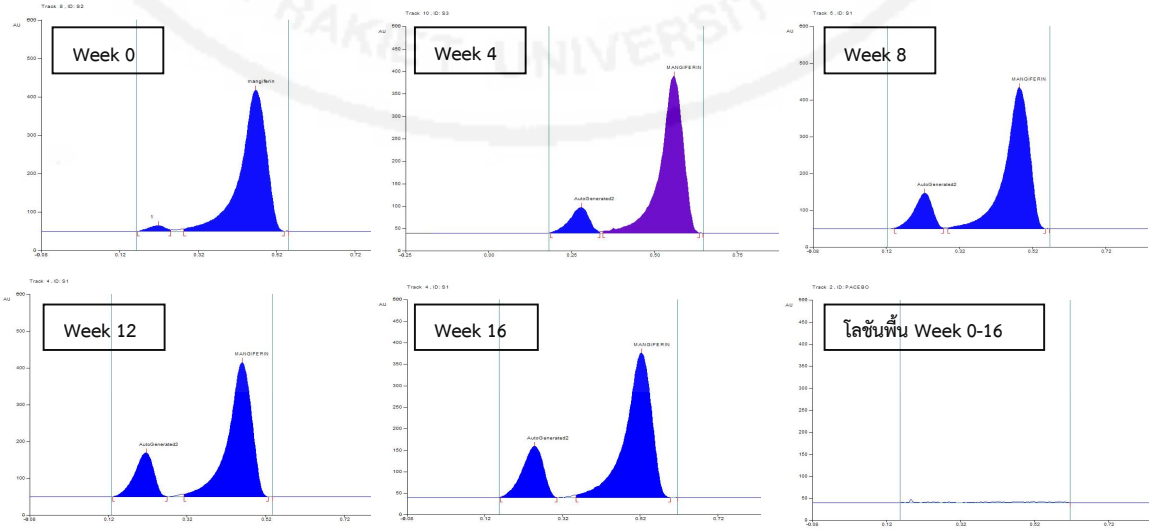
ตารางที่ 18 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารแมงจิเฟอรินในตำรับโลชันเมื่อศึกษาความคงตัวอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์

เวลา (สัปดาห์)	ผลการประเมิน (ค่าเฉลี่ย±SD, n=3)	
	%AA	% label amount
0	94.30±0.04	90.85±0.69
4	93.77±0.11	86.42±1.13
8	93.76±0.25	81.64±0.79
12	93.86±0.05	80.30±1.87
16	93.98±0.10	73.62±1.20

หมายเหตุ: % inhibition หมายถึง ร้อยละของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH

% label amount หมายถึง ร้อยละปริมาณของสารแมงจิเฟอรินที่ระบุในตำรับ

แผนภูมิที่ 11 HPTLC เดนซิโตแกรมของตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน ในการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาต่าง ๆ (สัปดาห์ที่ 0-16)



บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

ในการสกัดสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้ (*Mangifera indica L.)* สามารถใช้วิธีการหมัก (maceration) ด้วยตัวทำละลาย 85% เอทานอล และทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน (sovent-solvent partitioning) ได้ตะกอนของสารแมงจิเฟอรินร้อยละ 2.61 ของน้ำหนักผงใบแห้ง มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน และตรวจสอบสารสกัดด้วยวิธีทางรคเลขผิวบางสมรรถนะสูงเทียบกับสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่คือ สารละลายผสมของ ethyl acetate : acetone : formic acid : water ในอัตราส่วน 8:2:1:1 โดยปริมาตร และวัฏภาคคงที่คือ แผ่น HPTLC silica gel 60 F_{254} ขนาด 10.0 x 20.0 เซนติเมตร ใช้ระยะทางในการพัฒนาแผ่น 8 เซนติเมตร ตรวจวัดด้วยเดนซิโตมิเตอร์ (TLC Scanner 3) ที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร โครมาโตแกรมของสารสกัดมีค่า R_f เท่ากับ 0.48 ตรงกับสารมาตรฐานและยูวีเสปคตรัมของสารสกัดมีลักษณะเหมือนกันกับสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสกัดแมงจิเฟอรินในสารสกัดด้วยวิธี HPTLC ได้ตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์โดยคุณลักษณะที่ใช้ในการตรวจสอบคือ ความจำเพาะเจาะจง ความสัมพันธ์เชิงเส้น ความแม่น และความเที่ยง ซึ่งผลการทดสอบพบว่าวิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจง ไม่พบการรบกวนของสารอื่น ๆ ในช่วง R_f ของสารแมงจิเฟอริน ความสัมพันธ์เชิงเส้นให้ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีกของสารมาตรฐานแมงจิเฟอริน มีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วง 1.0 – 3.0 ไมโครกรัมต่อแถบ โดยมีค่า r^2 = 0.9953 ความแม่นให้ค่าร้อยละการกลับคืนของสารละลายมาตรฐานเท่ากับ 107.89±0.29 และความเที่ยงได้ตรวจสอบใน 2 ลักษณะ คือ ในวันเดียว และต่างวัน ให้ค่า %RSD ในการวิเคราะห์น้อยกว่า 2 และปริมาณสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดที่วิเคราะห์ได้เท่ากับร้อยละ 94.75±0.52 โดยน้ำหนัก

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดแมงจิเฟอริน โดยการทดลองเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี และ Trolox® พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐานวิตามินซี และ Trolox® โดยมีค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานวิตามินซี Trolox® และสารสกัด คือ 5.24, 7.89 และ 6.38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินที่นำมาศึกษาความคงตัวประกอบด้วย สารสกัดแมงจิเฟอริน ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก น้ำมันมะพร้าว ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก กลีเซอริลโมโนสเตียเรท ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก สารลดแรงตึงผิว Brij®L4 ร้อยละ 6 โดยน้ำหนัก โพรพิลีนไกลคอล ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก สารละลาย 1% คาร์โบพอล 940 ร้อยละ 12 โดยน้ำหนัก เจอมาเบน ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก และปรับ

น้ำหนักด้วยน้ำ โลชันสารสกัดที่ได้มีลักษณะเนื้อเนียนสีเหลืองครีมอ่อน มีกลิ่นหอมของน้ำมันมะพร้าว กระจายตัวดี เหนอะหนะเล็กน้อยเมื่อทา ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.94±0.02 และความหนืดเท่ากับ 19809 ± 1511 cps

การศึกษาความคงตัวทางกายภาพของโลชันสารสกัด และโลชันพื้นที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูง (45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์) เป็นระยะเวลา 120 วัน พบว่า โลชันสารสกัดมีสีเหลืองเข้มขึ้นอย่างชัดเจน ลักษณะของเนื้อโลชันหยาบขึ้น แต่ไม่เกิดการแยกชั้น กลิ่นน้ำมันมะพร้าวจางลงมาก ความเป็นกรด-ด่าง และความหนืดลดลง ส่วนโลชันพื้นเริ่มแยกชั้นในเดือนที่ 2 ความเป็นกรด-ด่างลดลง ความหนืดลดลงอย่างมาก แสดงถึงความไม่คงตัวทางกายภาพ

การศึกษาความคงตัวทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของโลชันสารสกัดที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิสูงพบว่า โลชันสารสกัดมีความคงตัวดีต่อการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แต่ปริมาณของสารแมงจิเฟอรินที่วิเคราะห์ได้ลดลงอย่างมาก จึงสรุปได้ว่า ความร้อนมีผลอย่างมากต่อความคงตัวของสารแมงจิเฟอรินในตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน แต่มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของโลชัน

ในการศึกษาความคงตัวทางกายภาพที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 120 วัน พบว่า ทั้งโลชันสารสกัด และโลชันพื้นมีความคงตัวดี ลักษณะเนื้อโลชันคงเดิม กลิ่นจางลงเล็กน้อย ความเป็นกรด-ด่างและความหนืดลดลงเล็กน้อย

การศึกษาความคงทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของโลชันสารสกัดที่อุณหภูมิห้องพบว่า โลชันสารสกัดมีความคงตัวดีต่อการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ปริมาณสารแมงจิเฟอรินที่วิเคราะห์ได้ลดลงทีละน้อย สรุปได้ว่า ตำรับโลชันสารสกัดมีความคงตัวเมื่อเก็บในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 120 วัน และยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี

กล่าวโดยสรุป คือ งานวิจัยนี้สามารถเพิ่มมูลค่าใบมะม่วงน้ำดอกไม้ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยนำมาใช้เป็นวัตถุดิบทางเครื่องสำอาง ในการสกัดสารสำคัญสามารถใช้วิธีการสกัดที่ง่าย และสามารถตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญด้วยวิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูง ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก และรวดเร็ว ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดพบว่ามีประสิทธิภาพสูง และสามารถนำสารสกัดมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับใช้บำรุงผิวหนังได้ และยังสามารถศึกษาต่อยอดเพื่อเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ให้มีอายุการใช้งานได้นานขึ้น

5.2 อภิปรายผล

5.2.1 การเตรียมสารสกัดแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้

การสกัดสารแมงจิเฟอรินในงานวิจัยนี้เป็นการสกัดที่พัฒนามาจากวิธีของ อรัญญา จุติวิบูลย์สุข และคณะ [4] ซึ่งใช้วิธีด้วยการหมักร่วมกับการแยกสลายด้วยน้ำและกรด การใช้ตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อแยกส่วน และการตกผลึกซ้ำ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ลดขั้นตอนที่ยุ่งยากออกไป เพื่อให้ได้วิธีการที่ง่ายและสามารถนำไปใช้ทางอุตสาหกรรมได้ และยังคงคุณภาพของสารสกัดทั้งในแง่ของปริมาณและความบริสุทธิ์ของสาร โดยทำการสกัดด้วยวิธีการหมักด้วย 85% เอทานอลและทำการ partition ด้วยไดคลอโรมีเทน แล้วสามารถแยกกรองตะกอนของสารแมงจิเฟอรินในชั้นของเอทานอลได้เลย และพบว่าการสกัดในงานวิจัยนี้ ได้ปริมาณสารสกัดใกล้เคียงกันกับวิธีการสกัดของอรัญญา จุติวิบูลย์สุข และคณะ อีกทั้งยังได้สารสกัดที่มีความบริสุทธิ์สูงถึงประมาณ 94 เปอร์เซนต์

5.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารแมงจิเฟอรินด้วยวิธีรงคเลขผิวบางสมรรถนะสูงและการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีการต่าง ๆ ต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีก่อนนำไปใช้ ตัวแปรที่ใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้คือ ความจำเพาะเจาะจง ความสัมพันธ์เชิงเส้นและช่วงของการวิเคราะห์ ความแม่น และความเที่ยง พบว่าวิธีวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้มีความจำเพาะต่อการแยกสารแมงจิเฟอริน โดยไม่พบการรบกวนการวิเคราะห์จากสารอื่น ๆ ที่มีการรายงานว่าพบในใบมะม่วงที่ค่า R_f ของสารแมงจิเฟอริน ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างพื้นที่ใต้พีกกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานแมงจิเฟอรินมีความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 1-3 ไมโครกรัมต่อแถบ ให้ค่า r^2 เท่ากับ 0.9953 ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์ยอมรับ (0.995) และในการทดสอบความแม่นยำของวิธี แสดงผลด้วยค่าเฉลี่ย % recovery เท่ากับ 107.89±0.29

ในการทดสอบความเที่ยงของวิธีได้ทำ 2 แบบ คือ การทวนซ้ำและการทำแบบต่างวันกัน ได้ค่า % RSD น้อยกว่า 2 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับ

ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์นี้จึงมีความถูกต้องสามารถนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของสารแมงจิเฟอรินในสารสกัดและในตำรับโลชันสารสกัดได้ ซึ่งปริมาณของสารแมงจิเฟอรินที่ตรวจพบในสารสกัดมีความบริสุทธิ์สูง คือเท่ากับ 94.75±0.52%

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์และหาปริมาณสารด้วยวิธี HPTLC เป็นวิธีการแบบระบบเปิด จึงอาจมีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อการวิเคราะห์ ได้แก่ ความชื้นในอากาศ ระดับของวัฏภาคเคลื่อนที่ในแชมเบอร์ และการทำให้แผ่น HPTLC แห้งไม่สม่ำเสมอ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการกระจายตัวของสารในชั้นวัฏภาคคงที่ และทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์หาปริมาณในแต่ละครั้ง [18]

5.2.3 การทดสอบฤทธิ์แอนติออกซิแดนซ์ด้วยวิธี DPPH

สารแมงจิเฟอรินมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้าน โดยเฉพาะฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของแมงจิเฟอรินมีหมู่แทนที่ไฮดรอกซิลถึง 4 หมู่และที่วงคาร์บอนมีพันธะคู่ ทำให้อิเล็กตรอนสามารถเคลื่อนที่ไปมาได้ (delocalization) ทั่วโมเลกุล จึงมีฤทธิ์ในการจับกับอนุมูลอิสระได้มาก [29] ซึ่งมีความน่าสนใจในการนำสารแมงจิเฟอรินมาใช้เป็นสารสำคัญในตำรับโลชัน เพื่อช่วยในการลดริ้วรอยอันเกิดจากวัย และรังสี UVB [30] ในงานวิจัยนี้เลือกวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารธรรมชาติ [29] และสะดวกในการติดตามผลเพื่อศึกษาความคงตัวของสารสกัดในตำรับ

5.2.4 การศึกษาตำรับโลชันพื้นและโลชันสารสกัดแมงจิเฟอริน

การศึกษาตำรับโลชันพื้นในงานวิจัยนี้ต้องการใช้สารที่ได้จากธรรมชาติเป็นหลัก จึงมีส่วนประกอบในวัฏภาคน้ำมัน คือ น้ำมันมะพร้าว ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และสารกลุ่ม fatty alcohol ได้แก่ cetyl alcohol, stearyl alcohol, ceto-stearyl alcohol และ polyol ester ได้แก่ glyceryl monostearate (GMS) ประมาณร้อยละ 5-10 โดยน้ำหนัก สารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ Brij® L4 ร้อยละ 5-6 โดยน้ำหนัก 1% carbopol 940 ร้อยละ10 โดยน้ำหนัก และสารกันบูด germaben ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก สูตร Rx6-8 ซึ่งมี 1% carbopol 940 ในสูตร ช่วยเพิ่มความหนืดให้กับวัฏภาคนอก [31] มีความคงตัวต่อการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที โดย Rx 6 มีความคงตัวมากสุด เมื่อทดสอบในสภาวะเร่งแบบสลับอุณหภูมิ

ในการเตรียมโลชันสารสกัดในปริมาณมาก พบว่าอาจเกิดฟองอากาศในเนื้อโลชัน จึงควรเตรียมด้วยความระมัดระวังในขั้นตอนการผสมวัฏภาคน้ำมันและวัฏภาคน้ำเข้าด้วยกัน หรืออาจเติมสารช่วยลดการเกิดฟอง (antifoaming agent) ในสูตรตำรับ

5.2.5 การทดสอบความคงตัวทางกายภาพ

ที่สภาวะเร่ง อุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้โลชันแมงจิเฟอรินมีสีเข้มขึ้นอย่างชัดเจน กลิ่นน้ำมันมะพร้าวจางลงมากเช่นกัน ลักษณะเนื้อโลชันหยาบขึ้น ขนาดอนุภาคของหยดน้ำมันซึ่งเป็นวัฏภาคภายในมีขนาดใหญ่ขึ้น หรือมีการรวมกลุ่มกันของอนุภาคภายใน แต่เมื่อทำการคนโลชันยังคงรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ความเป็นกรด-ด่างลดลงเล็กน้อย ความหนืดมีค่าสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 และค่อย ๆ ลดลงช้า ๆ เหมือนกับโลชันพื้น แต่เมื่อเวลา 60 วัน โลชันพื้นเกิดแยกชั้นโดยมีน้ำใส ๆ เยิ้มออกมาที่ผิวหน้าโลชัน เรียกว่า bleeding และความหนืดลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกันแล้วตำรับโลชันสารสกัดมีความคงตัวทางกายภาพต่อความร้อนได้ดีกว่าตำรับโลชันพื้น

ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70±10 เปอร์เซ็นต์ ตำรับโลชันพื้นและโลชันสารสกัดมีความหนืดลดลงเรื่อย ๆ แต่ลดน้อยกว่าในสภาวะเร่ง ความหนืดที่ลดลงเรื่อย ๆ จะแสดงถึงความไม่คงตัวของตำรับ แต่การศึกษาเป็นเวลา 120 วันพบว่าตำรับยังมีความคงตัว

5.2.6 การทดสอบความคงตัวทางเคมี

ในการศึกษาความคงตัวที่สภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 120 วัน ปริมาณสารแมงจิเฟอรินลดลงอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง โดยพบว่าสารแมงจิเฟอรินเกิดการสลายตัวและปรากฏสารขึ้นที่ R_f 0.22 ในขณะที่การศึกษาที่สภาวะอุณหภูมิห้องพบการสลายตัวของแมงจิเฟอรินเช่นกัน แต่เกิดในอัตราที่ช้ากว่ามาก แสดงว่าอุณหภูมิสูงมีผลต่อการสลายตัวของสารแมงจิเฟอริน

จากโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณสารตั้งแต่เริ่มต้น พบพีกของสารอื่นเพิ่มขึ้นที่ค่า R_f 0.22 ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสารไอโซแมงจิเฟอริน (isomangiferin) เนื่องจากเส้นยูวีสเปกตรัมที่ได้จากการสแกนสารนี้ (λ_{max}266, 322, 380) มีลักษณะใกล้เคียงกับสารแมงจิเฟอริน (λ_{max}262, 322, 372) และสอดคล้องกับรายงานของ Elizabeth Joubert และคณะในปี ค.ศ. 2003 [32]

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตำรับโลชันสารสกัดแมงจิเฟอรินเป็นเวลา 120 วัน พบว่ายังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีทั้งที่สภาวะเร่ง (% inhibition 93.93-94.41%) และอุณหภูมิห้อง (% inhibition 93.86-94.30 %) แม้จะพบว่าสารแมงจิเฟอรินมีการสลายตัวก็ตาม จึงเป็นไปได้ว่าสารที่เกิดจากการสลายตัวของแมงจิเฟอรินน่าจะเป็นไอโซแมงจิเฟอริน ซึ่งยังคงเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีการรายงานว่าสารไอโซแมงจิเฟอรินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่าสารแมงจิเฟอรินเพียงเล็กน้อย ($TEAC_{DPPH}$, 0.57 และ 0.62 ตามลำดับ) แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS ($TEAC_{ABTS}$, 1.82 และ 1.67 ตามลำดับ) และอนุมูลเปอร์ออกซิล ($TEAC_{ORAC}$, 4.14 และ 3.69 ตามลำดับ) ได้ดีกว่าสารแมงจิเฟอริน [33]

5.3 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยการสกัดสารแมงจิเฟอรินจากใบมะม่วงน้ำดอกไม้เพื่อนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิว ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะเพื่อนำไปพัฒนา ดังนี้

1. ในการวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี HPTLC ควรควบคุมขั้นตอนในการวิเคราะห์ให้มีความสม่ำเสมอในทุกครั้งเพื่อช่วยให้มีความถูกต้องและคลาดเคลื่อนน้อยลง

2. การพัฒนาสูตรตำรับในโลชันอาจเพิ่มสารลดแรงตึงผิวชนิดมีประจุเพื่อช่วยให้เกิดความคงตัวในตำรับยิ่งขึ้น และอาจเพิ่มสารคีเลต (chelating agent) เพื่อช่วยรักษาสภาพของสี กลิ่น และลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในตำรับ

3. ในการเตรียมตำรับโลชันในปริมาณมากต้องกวนเบา ๆ ด้วยเครื่องปั่นผสมเพื่อช่วยป้องกันการเกิดฟองอากาศในเนื้อโลชัน หรืออาจใส่สารลดฟอง (antifoaming agent) ในการป้องกันการเกิดฟองอากาศในตำรับก็ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Wauthoz N, Balde A, Balde ES, Damme MV, Duez P. Ethnopharmacology of *Mangifera indica L*. bark and pharmacological studies of its main C-Glucosylxanthone, mangiferin. IJBPS. 2007; 1(2): 113-9.
2. Masibo M and He Q. Major mango polyphenols and their potential sighnificance to human health, CRFSFS.2008; 7(4): 309-19.
3. Ribeiro S.M.R, Barbosa L.C.A, Queiroz J.H, Knodler M, Schieber A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica L*.) varieties. Food Chemistry. 2008; 110: 620-6.
4. Jutiviboonsuk A, Sardsaengjun C. Mangiferin in leaves of three Thai mango *(Mangifera indica* L.*)* varieties. IJPS. 2010; 6(3): 122-9.
5. Joubert E, Botha M, Maicu C, De Beer D, Manley M. Rapid screening methods for estimation of mangiferin and xanthone contents of Cyclopia subternata plant material. SAJB. 2012; 82: 113-22.
6. Nadagouda G S, Karigar A, Joshi V G, Mukesh S. Validated HPTLC method for mangiferin in *Salacia chinensis*, JPR. 2010; 3(5): 1107-9.
7. Chen Q, Shi Z , Ma N , Wang W, Wei S, Sun W. Determination of two major xanthone glycosides in rhizome of Anemarrhena asphodeloides using high performance capillary electrophoresis. JMPR. 2012; 6(9): 1585-9.
8. Stoilova I, Gargova S, Stoyanova A., Ho L. Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin. Herba polonica. 2005; 51: 38-44.
9. Kim HS, Song JH, Youn UJ, Hyun JW, Jeong WS, Lee MY, Choi HJ, Lee HK, Chae S. Inhibition of UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by mangiferin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*.EJP. 2012; 689: 38-44.
10. Singh S K, Sharma V K, Kumar Y, Kumar S S, Sinha S K. Phytochemical and pharmacological investigations on mangiferin. Herba polonica. 2009; 55: 126-39.
11. Miza RH, Chi N, Chi Y. Therapeutic Potential of the Natural Product Mangiferin in Metabolic syndrome. Jounal of National Therapeutics. 2013; 2: 74-79.
12. รัตนา อินทรานุปกรณ์. สารสกัดจากสมุนไพร การเตรียมและการแยกสารสำคัญด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี. สมุทรปราการ: คอมเมอร์เชียล เวิลด์ มีเดีย ; 2553.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

13. Kulkarni VM, Rathod VK. Extraction of mangiferin from *Mangifera indica* leaves using three phase partitioning coupled with ultrasound. Industrial Crops and Products. 2014; 52: 292–7.
14. Garcia-Mendoza MP, Paula JT, Paviani LC, Cabral FA, Martinez-Correa HA. Extracts from mango peel by-product obtained by supercritical CO_2 and pressurized solvent processes. Food Science and Technology. 2015; 62(1): 131-7.
15. Jyotshna, Srivastav P, Killadi B, Shanker K. Uni-dimensional double development HPTLC-densitometry method for simultaneous analysis of mangiferin and lupeol content in mango (*Mangifera indica*) pulp and peel during storage. Food Chemistry. 2015; 176: 91–8.
16. ปนัดดา พัฒนาศิน. รงคเลขผิวบาง (Thin Layer Chromatography) การประยุกต์ใช้ในงานวิจัยยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2550.
17 Reich E, Schibil A. High Performnace Thin Layer Chromatography for analysis of medicinal plants In: Brandenberg B, editor. New York: Thieme Medical publisher.Inc; 2007.
18 Sharma N, Sharma UK, Gupta AP, Sinha AK. Simultaneous determination of epicatechin, syringic acid, quercetin-3-*O*-galactoside. Journal of Food Composition and Analysis. 2010; 23(3): 214–9.
19 Sukumar D, Arimboor R, Arumughan C. HPTLC fingerprinting and quantification of lignans as markers in seasame oil and its polyherbal formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008; 47(4-5): 795-01.
20. Akowuah GA, Zhari I, Norhayati I, Mariam A. HPLC and HPTLC densitometric determination of andrographolides and antioxidant potential of *Andrograpgholides paniculata*. JFCA. 2006; 19(2-3): 118-26.
21. Lobo R, Prabhu KS, Shirwaikar A, Ballal M, Balachandran C, Shirwaikar A. A HPTLC densitometric method for the determination of aloeverose in Aloevera gel. Fitoterapia. 2010; 81(4): 231–3.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

22. Biju SS, Ahuja A, Rafiullah MR, Khar RK. A validated HPTLC method for determination of tea tree oil from cosmeceutical formulations. J Pharm Biomed Anal. 2005; 38(1): 41-4.
23. กรมวิทยาศาตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. 2549.
24. ICH Topic Q 2 B Validation of analytical procedures. Available from: http://www.uam.es/personal_pas/txrf/MUS.pdf.
25. Namita and Nimisha. Development and evaluation of herbal cosmeceutical for skin care. Int J Pharm Bio Sci. 2013; 4(2): 86-92.
26. Roa GV, Mukhopadhyay T, Rajesh GD, Cavinkare Pvt. Ltd. Skin care agent and compositions thereof. United State Patent US 20110135772 A1. 2011 JUNE 9.
27. เกษร จันทร์ศิริ. อิมัลชันทางเภสัชกรรม. นครปฐม: มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2549.
28. Nationnal Heailh Surveillance Agency. Cosmetic product stability guide. Nationnal Heailh Surveillance. Brasilla: ANVISA; 2005.
29. โอภา วัชระคุปต์. สารต้านอนุมูลอิสระ Radical scavenging agent. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: นิวไทยมิตรการพิมพ์; 2550.
30. Lorencini M, Brohem CA, Dieamant GC, Zanchin NI, Maibach HI.Active ingredients against human epidermal aging. Aging Res Rev. 2014; 15: 100-15.
31. มัณฑนา ภานุมาภรณ์. อิมัลชั่นและยาเหน็บ. พิมพ์ครั้งที่ 2. สมุทรปราการ: มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ; 2553.
32. Joubert E, Otto F, Grüner S, Weinreich B. Reversed-phase HPLC determination of mangiferin, isomangiferin and hesperidin in Cyclopia and the effect of harvesting date on the phenolic composition of C. genistoides. Eur Food Res Technol. 2003; 216(3): 270–3.
33. Malherbe CJ, Willenburg E, de Beer D, Bonnet SL, van der Westhuizen JH, Joubert E. Iriflophenone-3-C-glucoside from Cyclopia genistoides: isolation and quantitative comparison of antioxidant capacity with mangiferin and isomangiferin using on-line HPLC antioxidant assays. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2014; 1(951-952): 164-71.

ภาคผนวก

คำย่อ

HPTLC	รงคเลขผิวบางสมรรถนสูง
TLC	รงคเลขผิวบาง
DPPH	อนุมูลดีพีพีเอช (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)
RSD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
SD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
µg/band	ไมโครกรัมต่อแถบ
IC_{50}	ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถต้านอนุมูลได้ร้อยละ 50
D_2	หลอดดิวเทอเลียม
pH	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
rpm	จำนวนรอบต่อนาที
cps	เซนติพอยส์
ABTS	อนุมูลเอบีทีเอช (2,2(-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid))
ORAC	Oxigen radical absorbance capacity assay
$TEAC_{DPPH}$	Trolox equivalent antioxidant capacity assay โดยวิธี DPPH
$TEAC_{ORAC}$	Trolox equivalent antioxidant capacity assay โดยวิธี ORAC

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาววิไลพรรณ ลีปรีชานนท์
วัน เดือน ปีเกิด	3 มิถุนายน 2521
ที่อยู่ปัจจุบัน	224 หมู่ 4 ตำบลลาดยาว อำเภอลาดยาว จังหวัดนครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2544	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เคมี)
ประวัติการทำงาน	
พ.ศ. 2545-ปัจจุบัน	เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
การเผยแพร่งานวิจัย	The 6th International Academic Conference: Suan Sunantha Rajabhat University, Bangkok, Thailand. April 28-29, 2015