วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 8 ฉบับที่ 1 (มกราคม - มิถุนายน): 50-58, 2021
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 8, No. 1 (January - June): 50-58, 2021

Research article-ISSN: 2351-0846

ประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพของผิวหนัง

Performance of Ethanolic Extracts from *Tagetes patula* Flowers on Antioxidants and Against Skin Aging-Related Enzymes

จำเนียร ชมภู[1*], วาสนา สงกลาง[1], นิธินาถ อริยมงคลชัย[1] และ ราตรี บุญเรืองรอด[2]
Chompoo, J.[1*], Songklang, W.[1], Ariyamongkonchai, N.[1] and Boonruangrod, R.[2]

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[1] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom Province, 73140
[2] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
[2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom Province, 73140

** Corresponding author: agrjnc@ku.ac.th*
Received 01 March 2021; Revised 14 May 2021; Accepted 19 May 2021

บทคัดย่อ

การใช้สารสกัดจากพืชสำหรับบำรุงผิวเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดความเสื่อมสภาพของผิวหนัง การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส 10 พันธุ์ ได้แก่ KPS01-SY, KPS02-SO, KPS03-SO, KPS04-DO, KPS05-DY, KPS06-SR, KPS07-SY, KPS08-DO, KPS09-DY และ KPS10-DR ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพของผิวหนัง ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสทั้ง 10 พันธุ์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยที่พันธุ์ KPS04-DO, KPS06-SR และ KPS08-DO มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS$^{\bullet}$ ได้ดีไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสาร BHT (84.57 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่สารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสทั้ง 10 พันธุ์นี้ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ NO$^{\bullet}$ และ oxLDL ได้น้อยอยู่ในช่วง 2.20-17.91 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองเหล่านี้ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพของผิวหนัง พบว่า สารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS01-SY สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ collagenase และ hyaluronidase ได้ (57.92 และ 48.44% ตามลำดับ) ส่วนสารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS08-DO สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ elastase, hyaluronidase และ tyrosinase (51.07, 49.30 และ 14.25% ตามลำดับ) ได้ดีกว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์อื่น อย่างไรก็ตาม สารสกัดจากดอกดาวเรืองนี้มีประสิทธิภาพด้อยกว่าสาร oleanolic acid ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ collagenase, elastase, hyaluronidase และสาร kojic acid ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ tyrosinase จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS08-DO สามารถนำมาใช้เพื่อต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพของผิวหนังได้
คำสำคัญ: ดาวเรืองฝรั่งเศส, ต้านการเสื่อมสภาพของผิวหนัง, ต้านอนุมูลอิสระ, สารสกัดด้วยเอทานอล

Abstract

Plant extracts have been used for skin care is an alternative choice to reduce skin aging. The aims of this study were to investigate the performance of ethanolic extracts from flowers of 10 cultivars of French marigolds including KPS01-SY, KPS02-SO, KPS03-SO, KPS04-DO, KPS05-DY, KPS06-SR, KPS07-SY, KPS08-DO, KPS09-DY and KPS10-DR at concentration of 100 µg/mL as antioxidants and anti-aging. The results showed that ethanolic extracts from 10 French marigolds gave inhibitory capacity on DPPH$^{\bullet}$ more than 80%. Three cultivars, KPS04-DO, KPS06-SR and KPS08-DO gave good inhibitory effect on ABTS$^{\bullet}$, however, the result was not significantly different from that of BHT (84.57%). While, the extracts from 10 cultivars of French marigolds had a few effects on inhibition of NO$^{\bullet}$ and LDL oxidation, range from 2.20-17.91%. In case of aging-related enzymes inhibition, the ethanolic extract of KPS01-SY showed highest inhibitory effect on collagenase and hyaluronidase enzymes (57.92 and 48.44%, respectively), as compared to other extracts. The ethanolic extract of KPS08-DO showed better inhibitory activities on elastase, hyaluronidase and tyrosinase (51.07, 49.30 and 14.25%, respectively) than those of other cultivars. However, ethanolic extracts of KPS01-SY and KPS08-DO had weaker inhibitory activities against collagenase, elastase,

Published by Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: nr-sjps@group.psu.ac.th.

hyaluronidase than oleanolic acid. The extracts also showed weaker inhibitory activities against tyrosinase than kojic acid. As the results, ethanolic extracts from flowers of KPS08-DO could be used a source of bioactive compounds as antioxidant and against skin aging-related enzymes.

Keywords: French marigold, anti-aging, antioxidant, ethanolic extract

บทนำ

ดาวเรืองฝรั่งเศส (*Tagetes patula* L.) จัดเป็นไม้ดอกกระถางหรือปลูกเป็นไม้ดอกประดับแปลง เนื่องจากมีลักษณะทรงต้นพุ่มเตี้ย มีกลีบดอกหลากหลายสีตั้งแต่โทนสีแดง สีส้ม และสีเหลือง ซึ่งบางสายพันธุ์มีสองสีในดอกเดียว ลักษณะของดอกมีทั้งที่มีกลีบดอกย่อยชั้นเดียว (single flower) และมากกว่าหนึ่งชั้น (double flower) (Spencer, 2021) ดอกดาวเรืองหลากหลายสีมีสารพวก carotenoids และ flavonoids เป็นองค์ประกอบหลัก (Vasudevan *et al*., 1997) สำหรับสาร flavonoids เป็นสารทุติยภูมิในพืชที่มีรายงานสรรพคุณทางยาใช้ในการรักษาโรคของมนุษย์ได้ด้วยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) และจับกับแร่ธาตุประจุบวก (chelating agents) (Čiž *et al*., 2010) ส่วนสาร carotenoids เป็นสาระสำคัญที่มีรายงานฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (Benedich, 1994) ป้องกันโรคหัวใจและระบบหลอดเลือด (Mayne, 1996) และยังมีฤทธิ์ช่วยป้องกันโรคเกี่ยวกับตา ลดความเสื่อมของเซลล์ตา และรักษาเซลล์เยื่อบุตาขาว กระจกตา (Sadighara *et al*., 2016) ช่วยบำรุงผิวให้มีสุขภาพดี ไม่เหี่ยวย่น และไม่มีริ้วรอย (Dumbravă *et al*., 2012) ซึ่งการเสื่อมสภาพของผิวหนังมนุษย์เกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น การสูบบุหรี่ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และแสงแดด โดยเฉพาะแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ปนมากับแสงแดด จะทำให้ร่างกายเกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำลายเซลล์ผิวหนัง ทำให้ผิวหนังเกิดร่องลึกหย่อยย้อย เป็นริ้วรอย เป็นกระแดดและกระขาว รวมทั้งมะเร็งผิวหนัง นอกจากนี้เมื่อมนุษย์มีอายุมากขึ้นเซลล์ผิวหนังจะมีอายุขัยสั้นลง การสร้างสารประกอบในผิวหนัง เช่น collagen, elastin และ hyaluronidase จะค่อยๆ ลดลง (Goodman *et al*., 2019) โดยที่ผิวหนังของมนุษย์ ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์จะมีองค์ประกอบของ hyaluronic acid ซึ่งทำให้ผิวหนังมีความชุ่มชื้น เต่งตึงไม่หย่อนย้อย (Laurent and Fraser, 1992) นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบของเส้นใย collagen และ elastin ทำให้เกิดความต้านทานแรงตึงของผิว ส่งผลให้ผิวหนังเกิดยืดหยุ่น ถ้าผิวหนังมีองค์ประกอบของเส้นใยเหล่านี้น้อย จะเกิดเป็นริ้วรอย (Kim *et al*., 2004) สำหรับเม็ดสี melanin เป็นส่วนสำคัญในการป้องกันผิวหนังจากอันตรายของรังสีอัลตราไวโอเลต ถ้าผิวหนังได้รับแสงอัลตราไวโอเลตมากเกินไปจะส่งผลให้ melanin เปลี่ยนแปลงเป็นสีคล้ำขึ้น เกิดเป็นกระฝ้า หรืออาจทำให้เกิดเป็นมะเร็งผิวหนังได้ (Mapunya *et al*., 2012) ดังนั้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการความเสื่อมสภาพของผิวหนัง ได้แก่ collagenase, elastase, hyaluronidase และ tyrosinase จะสามารถลดปัญหาความชราภาพของผิวหนังได้ การทดลองนี้จึงวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส 10 พันธุ์ ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพของผิวหนัง

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างสารสกัด

ปลูกดาวเรืองฝรั่งเศส จำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ KPS01-SY, KPS 02-SO, KPS03-SO, KPS04-DO, KPS05-DY, KPS06-SR, KPS07-SY, KPS08-DO, KPS09-DY และ KPS10-DR ในกระถางพลาสติกดำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว สูง 9 นิ้ว ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2562 โดยใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 รองก้นหลุมก่อนปลูก ปริมาตร 5 กรัมต่อกระถาง หลังจากนั้นทุก ๆ 2 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ปริมาตร 5 กรัมต่อกระถาง จนกระทั่งดาวเรืองอายุ 2 เดือน รดน้ำทุกวันตามสภาพอากาศในแต่ละวัน ตัดดอกดาวเรืองแต่ละพันธุ์ ที่อายุประมาณ 60-80 วัน หลังปลูก (Figure 1) นำไปผึ่งในที่ร่ม อุณหภูมิห้อง ประมาณ 27-30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งแห้ง บดตัวอย่างแห้งดอกดาวเรืองให้เป็นผงคล้ายแป้งด้วยเครื่องบด นำผงบดดอกดาวเรือง 1 กรัม แช่ในเอทานอล (90 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ได้เป็นสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส เจือจางสารสกัดด้วยเอทานอล (90 เปอร์เซ็นต์) ให้ได้ความเข้มข้น 100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณของสารพฤกษเคมี ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของผิวหนัง

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบพฤกษเคมี

2.1 ปริมาณสาร total flavonoids

นำตัวอย่างสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย aluminium chloride (ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร (Djeridane *et al*., 2006) คำนวณปริมาณสาร total flavonoids จากกราฟมาตรฐานของ rutin equivalent (RUE) เมื่อ y = 0.0047x + 0.0561 (R^2= 0.999) มีหน่วยเป็น mg RUE/ g sample

2.2 ปริมาณสาร total phenolics

นำตัวอย่างสารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำ (dH_2O) ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติม Folins-phenol reagent (อัตราส่วน 1:1; reagent: water) ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร และ sodium carbonate (ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 0.08 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน บ่มสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 นาโนเมตร (Kähkönen *et al*., 1999) คำนวณปริมาณสาร total phenolics จากกราฟมาตรฐานของ gallic acid equivalent (GAE) เมื่อ y = 0.0043x + 0.050 (R^2= 0.999) มีหน่วยเป็น mg GAE/ g extract

2.3 ปริมาณสาร total carotenoids

เติมสาร chloroform ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรือง 1 มิลลิลิตร เขย่าจนเข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนล่างซึ่งมีส่วนประกอบของรงควัตถุ หลังจากนั้นนำสารละลายไประเหยเพื่อกำจัดตัวทำละลายในตู้ดูดควันจนตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างแห้งไปวิเคราะห์ปริมาณสาร carotenoids ตามวิธีของ Lichtenthaler (1987) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 654.2 และ 666.6 นาโนเมตร คำนวณปริมาณสาร carotenoids จากสมการ total carotenoids = [(1000 x A_{470}) - (4.39 x $A_{666.6}$) – (6.44 x $A_{654.2}$)]/ 174 เมื่อ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470, 666.6 และ 654.2

Figure 1 Characteristic of flowers of French marigolds in this study

3. ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

3.1 ปฏิกิริยา DPPH radical scavenging

นำตัวอย่างสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสหรือสาร butylatedhydroxyltoluene (BHT) ซึ่งเป็นสาร positive control ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.04 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลาย sodium acetate buffer (ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่า pH เท่ากับ 5.5) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร นำสารผสมบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Boskou *et al*., 2006)

3.2 ปฏิกิริยา ABTS radical scavenging

เตรียมปฏิกิริยา oxidation ได้เป็นอนุมูลอิสระของ $ABTS^{\bullet}$ ด้วยการผสมสาร potassium persulfate (ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์) กับ 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammoniumsalte (ABTS) (ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์) กับ ในสารละลายบัฟเฟอร์ potassium phosphate (ความเข้มข้น 0.1 M ค่า pH เท่ากับ 7.4) นำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิห้อง นาน 16 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลองนำสารละลายมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.700±0.050 หลังจากนั้นทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการนำสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสหรือสาร BHT ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ใส่ลงสารผสมที่เตรียมไว้ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (Hsu *et al*., 2011)

3.3 ปฏิกิริยา nitric oxide radical scavenging

นำสารละลายผสมของ sodium nitroprusside (ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับ phosphate saline buffer ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร และสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสหรือสาร BHT ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย sulfanilic acid (ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เติมสาร *N*-(1-naphthy) ethyenediaminedihydrochloride (ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Govindarajan *et al*., 2004)

3.4 ปฏิกิริยา oxidation ของ LDL

นำสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสหรือสาร curcumin ซึ่งเป็นสาร positive control ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ผสมกับ low density lipoprotein (LDL) (ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ copper sulfate (ความเข้มข้น 55 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม ethylenediaminetraacetic acid (ความเข้มข้น 1 โมลาร์) ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวางในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Rattan and Arad, 1998) สำหรับการทดสอบปฏิกิริยา oxidation ของ LDL ตามวิธีของ Steinbrecher และคณะ (1984) เติมสารผสมของ thiobarbituric acid (ความเข้มข้น 0.67 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร กับ trichloroacetic acid (ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที นำสารละลายใสส่วนบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร เปรียบเทียบฤทธิ์ใน

การยับยั้งปฏิกิริยาด้วยการคำนวณปริมาณสารผลิตภัณฑ์ malonyldialdehyde (MDA) ที่เกิดจากปฏิกิริยา จากกราฟมาตรฐานของ MDA เมื่อ y= 0.0058x- 0.0006 (R^2=0.998)

4. ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

4.1 กิจกรรมของเอนไซม์ collagenase

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ collagenase จาก *Clostridium histolyticum* โดยนำสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสหรือสาร oleanolic acid ซึ่งเป็นสาร positive control ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีเอนไซม์ collagenase (ความเข้มข้น 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่ละลายใน Tricine buffer (ที่มีส่วนผสมของ NaCl (ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์) และ $CaCl_2$ (ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์) ปรับค่า pH ให้ได้ 7.5) บ่มสารผสมตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นใส่สารสับสเตรท *N*-[3-(2-furyl)acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (Van Wart and Steinbrink, 1981)

4.2 กิจกรรมของเอนไซม์ elastase

ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ elastase ด้วยการเตรียมสารผสมของ Tris-HCl buffer (ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ค่า pH เท่ากับ 8.0) ปริมาตร 0.16 มิลลิลิตร และเอนไซม์ elastase จาก porcine pancreas (ความเข้มข้น 0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่สารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสหรือสาร oleanolic acid ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร และสารสับสเตรท *N*-succ-(Ala)3-nitroanilide (0.8 mM) ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร บ่มสารผสมตัวอย่างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร (Kraunsoe *et al*., 1996)

4.3 กิจกรรมของเอนไซม์ hyaluronidase

นำสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสหรือสาร oleanolic acid ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ร่วมกับเอนไซม์ hyaluronidase จาก bovine testes (ความเข้มข้น 1.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.025 มิลลิลิตร และสารละลาย sodium phosphate buffer (ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม hyaluronic acid sodium salt จาก rooster comb (ความเข้มข้น 0.03 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มสารผสมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที เติมสารละลาย acid albumin ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Kim *et al*., 2009)

4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ tyrosinase

นำสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสหรือสาร kojic acid ซึ่งเป็นสาร positive control ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดลองที่มี phosphate buffer (ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ค่า pH เท่ากับ 6.8) ปริมาตร 0.012 มิลลิลิตร และเอนไซม์ tyrosinase จาก mushroom (ความเข้มข้น 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร บ่มสารผสมตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 15 นาที เติมสารละลาย L-DOPA (ความเข้มข้น 0.85 มิลลิมมลาร์) ปริมาตร 0.02 มิลลิลิตร บ่มสารละลายผสมไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร (Tadtong *et al*., 2009)

คำนวณฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระและประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ จากสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = [(OD_{\text{ชุดควบคุม}} - OD_{\text{ตัวอย่าง}})/OD_{\text{ชุดควบคุม}}] \times 100$$

เมื่อ $OD_{\text{ชุดควบคุม}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล (90 เปอร์เซ็นต์) และ $OD_{\text{ตัวอย่าง}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดตัวอย่าง หรือ positive control

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design ทำการทดลอง 6 ซ้ำ สิ่งทดลอง คือ สารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส 10 พันธุ์ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ปริมาณสารพฤกษเคมี

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร carotenoids ในสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส พบว่า สารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS02-SO, KPS03-SO, KPS04-DO และ KPS08-DO มีปริมาณของสารกลุ่มนี้สูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองพันธุ์อื่นแตกต่างทางสถิติ (P<0.05) (Table 1) จากการสังเกตยังพบว่า ดอกดาวเรืองฝรั่งเศสทั้ง 4 พันธุ์นี้ มีดอกเป็นสีส้ม โดยที่ Guzman และคณะ (2010) รายงานว่า สาร total carotenoids จะมีเป็นส่วนประกอบอยู่ในพืชที่มีสีต่างๆ ตั้งแต่สีเหลืองจนสีแดง ซึ่ง Arscott และ Tanumihardjo (2010) ได้ศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมีและสารอาหารในแครอทสีต่างๆ พบว่า แครอทสีส้มและสีส้มดำมีปริมาณของสาร carotenoids (ได้แก่ α-carotene และ β-carotene) มากกว่าแครอทสีเหลือง แดง ม่วง ขาว ม่วงส้ม ม่วงเหลือง และสีขาว สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร total flavonoids และ total phenolic ในสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสทั้ง 10 พันธุ์ พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS08-DO มีปริมาณของสารทั้ง 2 ชนิดนี้สูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์อื่นแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) (Table 1) เนื่องจากสาร flavonoids และ phenolics ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบทางเคมีที่ชอบน้ำ สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น เอทานอล (Li *et al*., 2007) ซึ่งปริมาณของสารทั้งสองชนิดนี้จะมีปริมาณมากหรือน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธ์ของดอกดาวเรืองที่แตกต่างกัน (Cetkovic *et al*., 2004) โดยที่ phenolics เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบทางเคมีในกลุ่มนี้ ได้แก่ quercetin, rutin, narigin, catechin, caffeic acid, gallic acid และ chlorogenic acid ที่มีความสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Samatha *et al*., 2012) ซึ่งสาร flavonoids เป็นสารในกลุ่ม phenolics ที่พบมากที่สุดในพืช โดยที่สาร quercetin และ rutin จะเป็นสารพี่พบมากในพืชที่นำมาบริโภคเป็นอาหารและยาสมุนไพร (Nakamura *et al*., 2000)

Table 1 The amount of phytochemicals of ethanol flower extracts from 10 species of French marigolds

Marigold Species	Total flavonoids mg RUE/ g extract	Total phenolics mg GAE/ g extract	Total carotenoids mg/ g sample
KPS01-SY	60.47±3.34 h	24.37±1.77 f	264.08±15.88 bcd
KPS02-SO	100.35±4.00 g	35.76±3.45 e	457.73±3.95 a
KPS03-SO	120.93±4.89 f	38.68±3.58 ed	453.58±4.36 a
KPS04-DO	175.41±6.37 b	56.09±3.51 b	455.60±7.52 a
KPS05-DY	134.82±6.46 e	44.40±2.36 cd	300.19±27.12 bc
KPS06-SR	158.58±8.10 c	49.54±5.11 b	306.34±20.19 b
KPS07-SY	150.99±6.70 d	52.34±7.42 b	245.61±21.50 cd
KPS08-DO	188.26±6.49 a	62.30±6.46 a	457.68±3.23 a
KPS09-DY	164.91±5.56 c	51.60±3.34 b	216.52±13.05 d
KPS10-DR	129.96±3.70 e	49.82±5.10 bc	253.45±10.62 bcd

The data represent the mean±standard deviation of six replications. Values followed by the same lower letters within each column are not significantly different according to Duncan's new multiple range test (P<0.05)

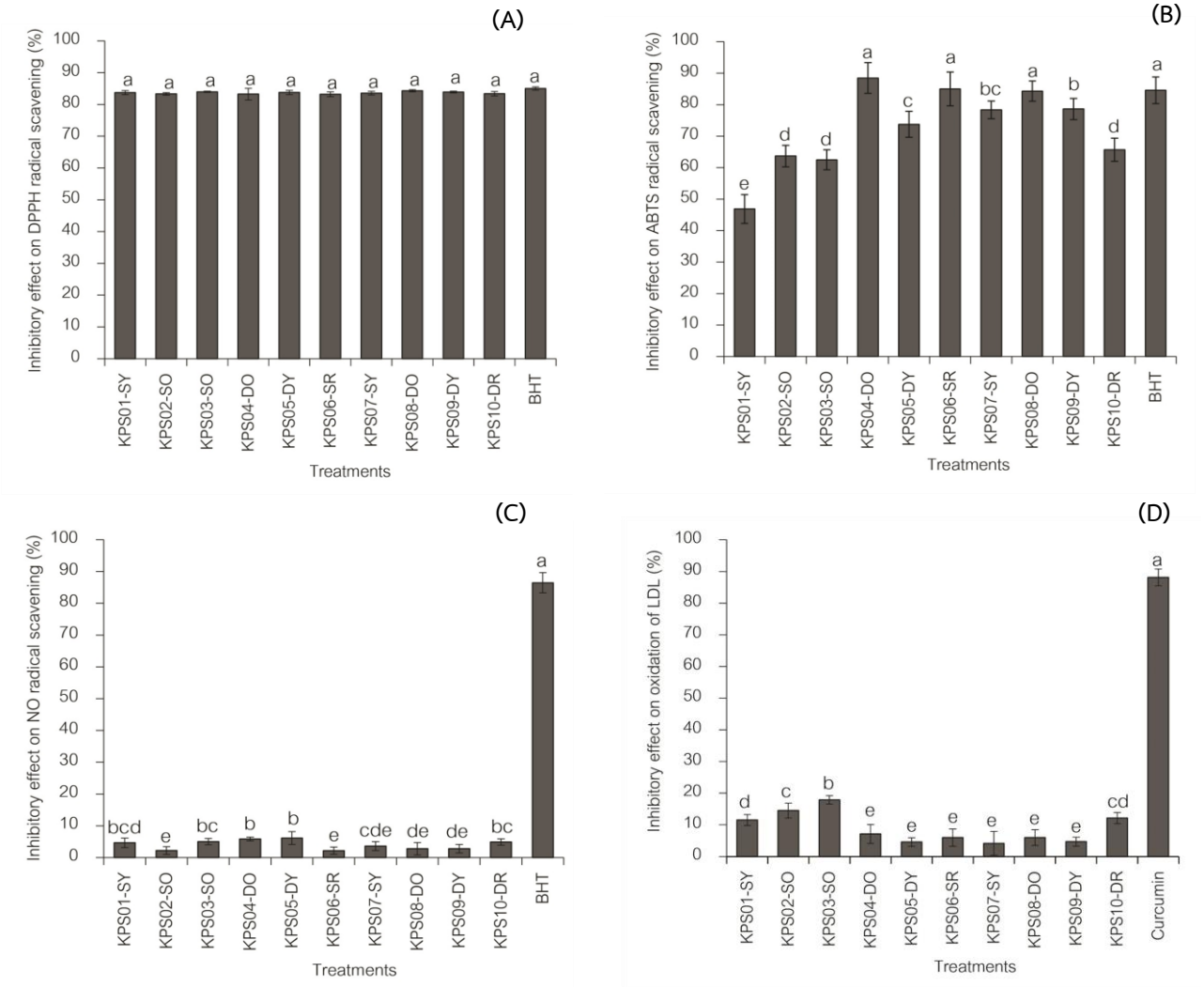

Figure 2 Inhibitory effect of ethanolic flower extracts from 10 French marigold species and positive controls at the concentration of 100 ppm on DPPH (A) ABTS (B) nitric oxide (C) radical scavenging and oxidation of LDL (D). Different lower letters indicate significant difference between the different marigold species at the 0.05 level. Bar represent standard deviation of six replicates

2. ฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส 10 พันธุ์ ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยปฏิกิริยา DPPH radical scavenging (Figure 2A) พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองทั้ง 10 พันธุ์ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลของ DPPH• ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสาร BHT ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของอนุมูล DPPH ได้ 85.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา ABTS radical scavenging (Figure 2B) พบว่า สารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS04-DO, KPS06-SR และ KPS08-DO สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ ABTS ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองพันธุ์อื่นแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยานี้ได้ 88.47, 85.00 และ 84.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยที่สารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองนี้สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลของ ABTS• ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสาร BHT (84.57 เปอร์เซ็นต์) สำหรับผลของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกของดาวเรืองฝรั่งเศสในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา nitric oxide radical scavenging (Figure 2C) พบว่า สารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS04-DO และ KPS05-DY มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลของ NO• ได้ดีกว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์อื่นแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) สามารถยับยั้งได้ 5.84 และ 6.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาoxidation ของ LDL นั้น พบว่า สารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS03-SO สามารถยับยั้งการเกิดปฏิริยา oxidation นี้ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์อื่น ($P<0.05$) ซึ่งสามารถยับยั้งได้ 17.91 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2D) นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา nitric oxide radical scavenging และ LDL oxidation ได้ด้อยกว่าสาร BHT และ curcumin ซึ่งสามารถยับยั้งปฏิกิริยาดังกล่าวนี้ได้ 86.45 และ 88.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากสารสกัดจากพืชมีองค์ประกอบรวมของสารหลายชนิดที่ยังไม่สามารถแยกองค์ประกอบ ชนิดสาร ปริมาณสาร และฤทธิ์ของสาร จึงมักมีฤทธิ์น้อยกว่าสารบริสุทธิ์ที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมซึ่งมีการคัดแยกสารที่มีฤทธิ์เฉพาะสำหรับการต้านโรคของมนุษย์ (Wagner and Ulrich-Merzen, 2009) จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสนี้จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากดาวเรืองที่มีกลีบดอกสีส้ม ได้แก่ KPS03-SO, KPS04-DO และ KPS0-DO มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี สอดคล้องกับรายงานของ Parejo และคณะ (2002) พบว่า ดาวเรืองกลีบดอกสีส้มพันธุ์ Columbus orange มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยา DPPH และ ABTS radical scavenging ได้ดี ซึ่งเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนี้เป็นผลมาจากสาร lutein ที่มีปริมาณสูงในกลีบของดาวเรืองดอกสีส้ม (Bhattacharyya *et al*., 2010) เช่นเดียวกับการทดลองของ Ingkasupart และคณะ (2015) พบว่า ดาวเรืองกลีบดอกสีส้มพันธุ์ Optiva orange มีองค์ประกอบของสาร lutein, gallic acid และ quercetin ในปริมาณที่สูง ส่งผลให้ดาวเรืองพันธุ์นี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา DPPH และ superoxide anion radical scavenging ได้ 89.40 และ 115 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3. ประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศส 10 พันธุ์ ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพของผิวหนัง ได้แก่ collagenase, elastase, hyaluronidase และ tyrosinase พบว่า สารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS01-SY สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ collagenase ได้ 51.92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดจากดอกของดาวเรืองพันธุ์อื่น ($P<0.05$) ((Figure 3A) ส่วนผลของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกของดาวเรืองฝรั่งเศสต่อกิจกรรมของเอนไซม์ elastase (Figure 3B) พบว่า สารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS08-DO มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ elastase ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS01-SY เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์อื่น ($P<0.05$) ซึ่งสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ 49.30 และ 48.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับความสามารถของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ hyaluronidase นั้น พบว่า สารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS08-DO อีกเช่นเดียวกันที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากดอกดาวเรือง
ฝรั่งเศสพันธุ์อื่น ($P<0.05$) สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ 51.07 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ สารสกัดจากดอกดาวเรือง
พันธุ์ KPS06-SR และ KPS07-SY สามารถยับยั้งได้ 44.28 และ 43.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 3C) ประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ tyrosinase นั้น พบว่า สารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS07-SY และ KPS08-DO มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ tyrosinase ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์อื่น ($P<0.05$) สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ 14.29 และ 14.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 3D) โดยที่สารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองเหล่านี้มีประสิทธิภาพด้วยกว่าสาร oleanolic acid ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ collagenase, elastase และ hyaluronidase ซึ่งสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์นี้ได้ 87.40, 81.62 และ 88.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และด้อยกว่าสาร kojic acid ในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งสามารถยับยังได้ 79.68 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีรายงานว่า สาร oleanolic acid เป็นสารอิมัลชัน (emulsion) ที่ประสิทธิภาพสูงในการต้านริ้วรอยที่เกิดขึ้นกับผิวหนังได้ดีมาก และเป็นสารที่เป็นส่วนผสมหลักในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Wang *et al*., 2010) เช่นเดียวกับสาร kojic acid ซึ่งเป็นสาร antityrosinase ที่เป็นที่รู้จัก ใช้สำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ทำให้ผิวกระจ่างใสและใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษารอยดำ ผ้า และริ้วรอย (Springer *et al*., 2003)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีกับประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (Table 2) ปริมาณของสาร flavonoids และ phenolics มีความสัมพันธ์ทางบวกกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ABTS และกิจกรรมของเอนไซม์ collagenase ในระดับมาก นั่นคือ สารสกัดด้วยน้ำจากดอกดาวเรืองที่มีปริมาณของสาร flavonoids และ phenolics สูง จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นสูงเช่นเดียวกัน

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่

เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของผิวหนังจะเห็นได้ว่า สารสกัดจากดาวเรืองพันธุ์ KPS08-DO มีประสิทธิภาพสูงกว่าสารสกัดจากดาวเรืองพันธุ์อื่นในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในการทดลองนี้ อาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์มีองค์ประกอบของสาร flavonoids และ phenolics ปริมาณที่สูงกว่าสารสกัดจากดาวเรืองพันธุ์อื่น จากศึกษาของ Pientaweeratch และคณะ (2016) รายงานว่า สาร flavonoids เป็นสารประกอบที่สามารถจับกับหมู่ carbonyl และ hydroxyl จึงทำให้สารกลุ่มนี้สามารถจับเอนไซม์ที่มีโลหะเป็นองค์ประกอบ (metalloenzyme) เช่น collagenase และ elastase ส่งผลให้เอนไซม์นี้ไม่สามารถทำงานได้ ส่วน Wahab และคณะ (2014) รายงานว่า สารประกอบ phenolics จัดเป็นสารที่สามารถจับกับแร่ธาตุประจุบวก (metal chelating) จึงสามารถ catalytic กับ Zn^{2+} ในโครงสร้างของเอนไซม์ collagenase ทำให้เอนไซม์นี้ไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้โครงสร้างของสาร phenolics ที่ตำแหน่งของหมู่ hydroxyl สามารถจับกับพันธะ hydrogen ในโครงสร้างของเอนไซม์ elastase ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์นี้เปลี่ยนแปลงไปไม่สามารถทำงานได้ (Masuda *et al*., 2009) ซึ่ง Zofia และคณะ (2020) พบว่า สารสกัดจาก *Aegopodium podagraria* ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณของสาร phenolics เท่ากับ 134 mg/ g และ flavonoid เท่ากับ 50 mg/ g สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ collagenase และ elastase ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Kang และคณะ (2018) รายงานว่า สารสกัดด้วยเมทานอลจากดอกดาวเรือง ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีองค์ประกอบของสาร flavonoids เท่ากับ 85.60 mg RU/ g extract สามารถยับยั้งการสังเคราะห์ procollagenase ได้ 83.70 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Darvin และคณะ (2006) ยังพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระพวก carotenoids ยังมีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการปกป้องผิวหนังจากรังสีอัลตร้าไวโอเลต ต้านการเกิดริ้วรอยของผิวหนัง โดยที่ Sies และ Stahl (2004) พบสาร β-carotene และ lycopene ที่มีอยู่มากเมื่อเปรียบเทียบกับสาร zeaxanthin และ lutein ในผิวหนังของมนุษย์จะช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของผิวหนังจากแสงแดดได้ดี ซึ่งปริมาณของสารเหล่านี้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชั้นและตำแหน่งของผิวหนังด้วย ดังนั้นการจำแนกชนิดของสารพฤกษเคมีในสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสแต่ละพันธุ์ที่ทำการศึกษาต่อไป เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคอย่างเฉพาะเจาะจง

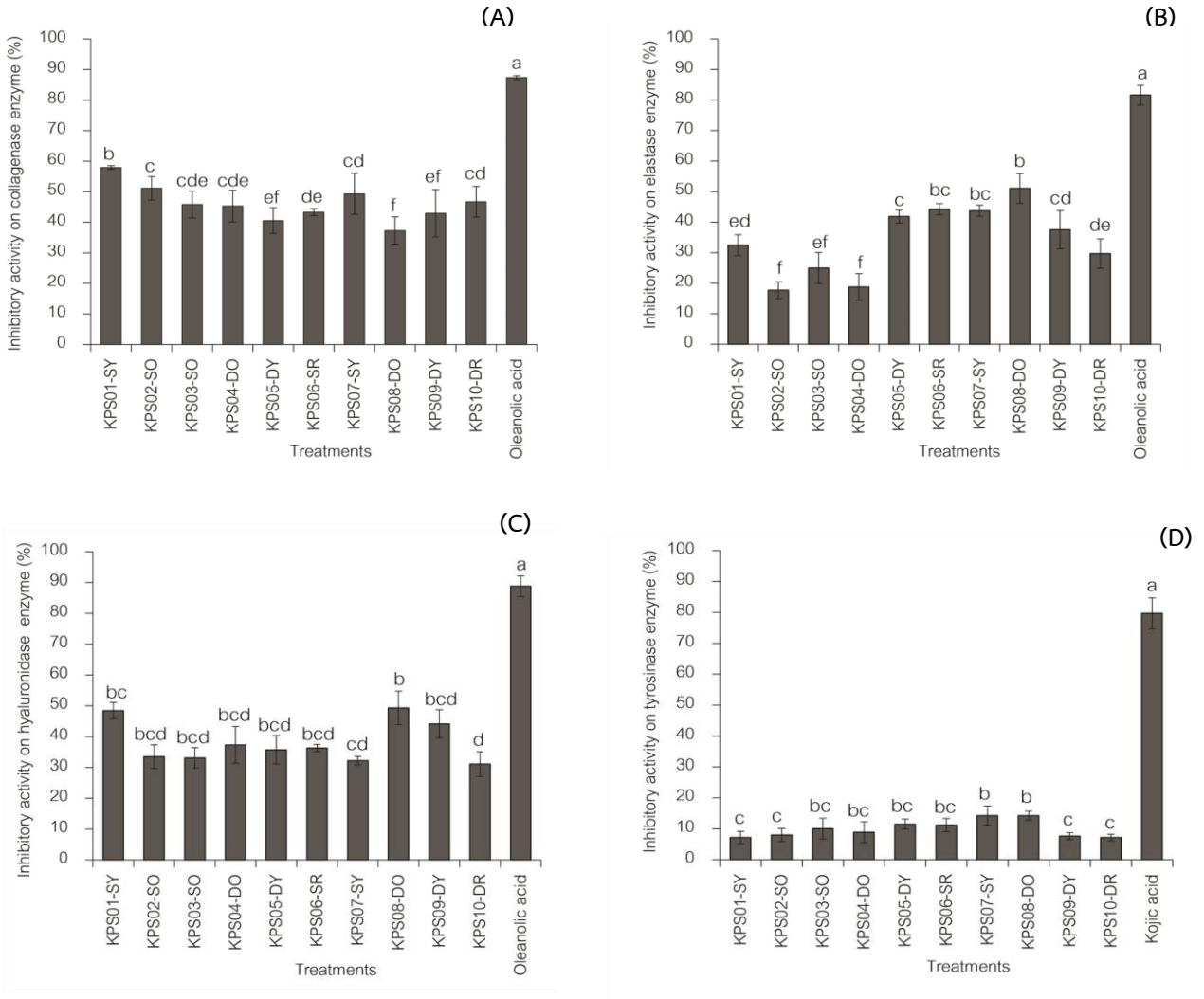

Figure 3 Inhibitory activities of against collagenase (A) elastase (B) hyaluronidase (C) and tyrosinase (D) of ethanolic flower extracts from 10 French marigold species and positive controls at the concentration of 100 ppm. Different lower letters indicate significant difference between the different marigold species at the 0.05 level. Bar represent standard deviation of six replicates

Table 2 Correlations between phytochemical contents and antioxidant capacities and inhibitory effect on enzymatic activities

Phytochemicals	Antioxidant capacities				Enzymatic activities			
	DPPH	ABTS	NO	LDL	COL	ELA	HYA	TYR
Flavonoids	0.148	0.955**	-0.162	-0.624	0.837**	0.045	0.415	0.536
Phenolics	0.123	0.903**	-0.138	-0.608	0.787**	0.003	0.424	0.533
Carotenoids	0.099	0.153	0.003	0.426	-0.208	-0.016	-0.403	0.153

** Significance level at $p<0.01$; DPPH = DPPH radical scavenging; ABTS = ABTS radical scavenging; NO = nitric oxide radical scavenging; LDL = oxidation of low density lipoprotein; COL= collagenase activity; ELA = elastase activity; HYA = hyaluronidase activity; tyrosinase activity

สรุป

สารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์ KPS04-DO, KPS06-SR และ KPS08-DO มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยา DPPH และ ABTS radical scavenging ได้ดี โดยสารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS08-DO ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ elastase, hyaluronidase และ tyrosinase ที่มีผลต่อความเสื่อมสภาพของผิวหนังอีกด้วย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองพันธุ์ KPS08-DO มีองค์ประกอบของสาร total flavonoids, total phenolics และ total carotenoids ปริมาณที่สูงกว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากดอกของดาวเรืองฝรั่งเศสพันธุ์อื่น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) และขอขอบคุณทุนอุดหนุนงานวิจัยพืชไร่นา ซึ่งเป็นโครงการสนับสนุนและส่งเสริมการวิจัยของภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน ที่มอบทุนอุดหนุนสำหรับการทำงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

Arscott, S.A., and Tanumihardjo, S.A. 2010. Carrots of many colors provide basic nutrition and bioavailable phytochemicals acting as a functional food. Comprehensive Review in Food Science and Food Safety 9: 223-239.

Benedich, A. 1994. Recent advances in clinical research involving carotenoids. Pure and Applied Chemistry 66: 1017-1024.

Bhattacharyya, S., Datta, S., Mallick, B., Dhar, P. and Ghosh, S. 2010. Lutein content and in vitro antioxidant activity of different cultivars of Indian marigold flower (*Tagetes patula* L.) extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 8259-8264.

Boskou, G., Salta, F.N., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A. and Andrikopoulos, N.K. 2006. Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. Food Chemistry 94: 558-564.

Cetkovic, G.S., Djilas, S.M., Canadanovic-Brunet, J.M. and Tumbas, V.T. 2004.Antioxidant properties of marigold extracts. Food Research International 37: 643-650.

Číž, M., Čížová, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A. and Lojek. A. 2010. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. Food Control 21: 518-528.

Davin, M., Zastrow, L., Sterry, W. and Lademann, J. 2006. Effect of supplemented and topically applied antioxidant substances on human tissue. Skin Pharmacology and Physiology 19: 238-247.

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. and Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some containing phenolic compounds. Food Chemistry 97: 654-660.

Dumbravă, D.G., Moldovan, C., Raba, D. and Popa, M.V. 2012. Vitamin C, chlorophylls, carotenoids and xanthophylls content in some basil (*Ocimum basilicum* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves extracts. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies 18: 253-258.

Goodman, G.D., Kaufman, J., Day, D., Weiss, R., Kawata, A.K., Gaecia, J.K., Santangelo, S. and Gallagher, C.J. 2019. Impact of smoking and alcohol use on facial aging in women: results of a large multinational, multiracial, cross-sectional survey. The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology 12: 28-39

Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Rao, C.V., Shirwaikar, A., Rawat, A.K.S., Mehrotra, S. and Pushpangadan. P. 2004. Antioxidant potential of *Anogeissus latifolia*. Biological and Pharmaceutical Bulletin 27: 1266-1269.

Guzman, I., Hamby, S., Romero, J., Bosland, P.W. and O'Connell, M.P. 2010. Variability of carotenoids biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. Plant Science 179: 49-59.

Hsu, C.F., Peng, H., Basle, C., Travas-Sejdic, J. and Kilmartin, P.A. 2011. $ABTS^{\bullet+}$ scavenging activity of polypyrrole, polyaniline and poly (3,4-ethylenedioxythiophene). Polymer International 60: 69-77.

Ingkasupart, P., Manochai, B., Song, W.T. and Hong, J.H. 2015. Antioxidant activities and lutein content of 11 marigold cultivars (*Tagetes* spp.) grown in Thailand. Journal of Food Science and Technology 35: 380-385.

Kähkönen, M.P., Hopis, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47: 3954-3962.

Kang, C.H., Rhie, S.J. and Kim, Y.C. 2018. Antioxidant and skin anti-aging effects of marigold methanol extract. Toxicological Research 34: 31-39.

Kim, J.H., Byun, J.C., Bandi, A.K.R., Hyun, C.G. and Lee, N.H. 2009. Compounds with elastase inhibition and free radical scavenging activities from *Callistemon lanceolatus*. Journal of Medicinal Plants Research 3: 914-920.

Kim, Y., Uyama, H. and Kobayashi, S. 2004. Inhibition effects of (+)-catechin aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. Biochemical and Biophysical Research Communications 320: 256-261.

Kraunsoe, J.A.E., Claridge, T.D.W. and Lowe, G. 1996. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. Biochemistry 35: 9090-9096.

Laurent, T.C., and Fraser, J.R. 1992. Hyaluronan. The FASEB Journal 6: 2397-2404.

Li, W., Gao, Y., Zhao, J. and Wang, A.Q. 2007. Phenolic, flavonoid, and lutein ester content and antioxidant activity of 11 cultivars of Chinese marigold. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 8478-8484.

Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Ezymology 148: 350-382.

Mapunya, M.B., Nikolova, R.V. and Lall, N. 2012. Melanogenesis and antityrosinase activity of selected south African plants. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2012: Article ID 374017.

Masuda, M., Murata, K., Fukuhama, A., Naruto, S., Fujita, T., Uwaya, A., Isami, F. and Matsuda, H. 2009. Inhibitory effects of consriruents of *Morinda citrifolia* seeds on elastase and tyrosine. Journal of Natural Medicines 63: 267-273.

Mayne, S.T. 1996. Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in human. The FASEB Journal 10: 690-701.

Nakamura, Y., Ishimitsu, S. and Tonogai, Y. 2000. Effects of quercetin and rutin on serum and hepatic lipid concentrations, fecal steroid excretion and serum antioxidant properties. Journal of Health Science 46: 229-240.

Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J. and Codina, C. 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 6882-6890.

Pientaweeratch, S., Panapisal, V. and Tansirikongkol, A. 2016. Antioxidant, anti-collagenase and antielastase activities of *Phyllanthus emblica*, *Manilkara zapota* and silymarin: an vitro comparative study for anti-aging applications. Pharmaceutical Biology 54: 1865-1875.

Rattan, A.K., and Arad, Y. 1998. Inhibition of LDL oxidation by new estradiol receptor modulator compounds LY-139478, comparative effect with other steroids. Atherosclerosis 136: 305-314.

Sadighara, P., Saghafi, M., Eefanmanesh, A. and Mahdaviyekta, M. 2016. Antioxidant activity and properties of outer shell pistachios in different temperature of cooking. Der Pharmacia Lettre 8: 263-266.

Samatha, T., Shyamsundarachary, R., Srinivas, P. and Swamy, R. 2012. Quantification of total phenolic and total flavonoids contents in extracts of *Oroxylum indicum*L. Kurz. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research 5: 177-179.

Sies, H. and Stahi, W. 2004. Nutritional protection against skin damage from sunlight. Annual Review of Nutrition 24: 172-200.

Spencer, J. 2021. French marigolds aren't French (and other facts about *Tagetes patula*). Available from: https:// dengarden.com/gardening/French-Marigolds-Arent-French [accessed 12 Febuary 2021].

Springer, M., Engelhart, K. and Biesalski, H.K. 2003. Effect of 3-isobutyl-1-methylxanthine and kojic acid on cocultures ans skin equivalents composed of HaCat cells and human melanocytes. Archives of Dermatological Research 295: 88-91.

Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L. and Steinberg, D. 1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoproteein phospholipids. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America 81: 3883-3887.

Tadtong, S., Viriyaroj, A., Vorarat, S., Nimkultat, S. and Suksamrarn, S. 2009. Antityrosinase and antibacterial activities of mangosteen pericarp extract. Journal of Health Research 23: 99-102.

Van Wart, H.E. and Stenbrink, D.R. 1981. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. Analytical Biochemistry 113: 356-365.

Vasudevan, P., Kashyap, S. and Sharma, S. 1997. Tagetes: a multipurpose plant. Bioresource Technology 62: 29-35.

Wahab, N.A., Rahman, R.A., Ismail, A., Mustafa, S. and Hashim, P. 2014. Assessment of antioxidant capacity, anti-collagenase and anti-elastase assays of Malaysian unfermented cocoa bean for cosmetic application. Natural Products Chemistry and Research 2: 1000132.

Wagner, H. and Ulrich-Merzenich, G. 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceutical. Phytomedicine 16: 97-100.

Wang, M.T., Jin, Y., Yang, Y.X., Zhao, C.Y., Yang, H.Y., Xu, X.F., Qin, X., Wang, Z.D., Zhang, Z.R., Jian, Y.L. and Huang, Y. 2010. In vivo biodistribution, anti-inflammatory, and hepatoproteactive effects of liver targeting dexamethasone acetate loaded nanostructured lipid carrier system. International Journal of Nanomedicine 5: 487-489.

Zofia, N.L., Martyna, Z.D., Aleksandra, Z. and Tomasz, B. 2020. Comparison of the antiaging and protective properties of plants from the *Apiaceae* family. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2020: Article ID 5307614.

SJPS-O-M-11-122