

## ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านริ้วรอยของสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพสำหรับประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางบำรุงผิวหน้า

ฤทธิพันธ์ รุ่งเรือง<sup>1\*</sup> จรัสฟ้า โหมตสุวรรณ<sup>1</sup> อมรรัตน์ สีสุทอง<sup>2</sup>

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต แขวงดุสิต เขตดุสิต กรุงเทพฯ 10300

และ ณิชฐพล ไช้แสงศรี<sup>3</sup>

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

\* Corresponding Author: rittipun\_run@dusit.ac.th

<sup>1</sup> อาจารย์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

<sup>2</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์ กลุ่มวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

<sup>3</sup> นักวิจัย ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยเกษตรแปรรูปและอาหารเชิงหน้าที่ สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ

### ข้อมูลบทความ

### บทคัดย่อ

#### ประวัติบทความ :

รับเพื่อพิจารณา : 25 กันยายน 2561

แก้ไข : 26 กุมภาพันธ์ 2562

ตอบรับ : 14 มีนาคม 2562

#### คำสำคัญ :

ข้าวทับทิมชุมแพ / สารฟีนอลิก /

ฤทธิ์ทางชีวภาพ / เครื่องสำอาง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากข้าวทับทิมชุมแพเพื่อประยุกต์ใช้ในตำรับเครื่องสำอางบำรุงผิว โดยสกัดข้าวทับทิมชุมแพด้วยตัวทำละลายเอทานอล เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดข้าวทับทิมชุมแพมีปริมาณฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ  $80.20 \pm 0.03$  gGAE/g extract และ  $8.18 \pm 0.05$  gQE/g extract ตามลำดับ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH' และ ABTS<sup>++</sup> (IC<sub>50</sub>) เท่ากับ  $0.77 \pm 0.006$  และ  $0.29 \pm 0.002$  mg/mL ตามลำดับ ในส่วนของผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทสและคอลลาจีเนส (MMP-1 และ MMP-2) พบว่า สารสกัดข้าวทับทิมชุมแพมีร้อยละการยับยั้งเอนไซม์เท่ากับ  $84.23 \pm 0.14$ ,  $83.67 \pm 0.49$  และ  $83.26 \pm 0.16$  ตามลำดับ นอกจากนี้ เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของคน (CCD-986 SK) พบว่าสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ร้อยละ  $100.00 \pm 6.23$  จึงนำสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพมาใส่ครีมบำรุงผิว โดยเมื่อทดสอบความคงตัวที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ และสภาวะเร่ง เป็นระยะเวลา 3 เดือนพบว่าทุกตำรับมีลักษณะของเนื้อครีมเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้น ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ความหนืด และค่าสีมีการเปลี่ยนแปลง แต่ไม่มีผลต่อตำรับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพมีศักยภาพในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิว

---

## Antioxidant and Anti-wrinkle Activities of Tubtim Chumphae Rice Extract for Application in Facial Cosmetics

Rittipun Rungruang<sup>1\*</sup>, Jarasfah Modsuwan<sup>1</sup>, Amornrat Srisukong<sup>2</sup>

Suan Dusit University, Dusit, Bangkok 10150

and Nattapon Kaisangsri<sup>3</sup>

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thakam, Bangkhuntein, Bangkok 10150

\* Corresponding Author: rittipun\_run@dusit.ac.th

<sup>1</sup> Lecturer, Department of Cosmetic Science, Faculty of Science and Technology.

<sup>2</sup> Assistant Professor, Biology program, Faculty of Science and Technology.

<sup>3</sup> Researcher, Agricultural and Functional Foods Processing Laboratory, Pilot Plant Development and Training Institute.

---

### Article Info

### Abstract

#### Article History:

Received: September 25, 2018

Revised: February 26, 2019

Accepted: March 14, 2019

---

#### Keywords:

Tubtim Chumphae Rice /

Phenolic Compounds /

Biological Activity / Cosmetics

The aim of this research was to analyze the contents of total phenolics, total flavonoids as well as biological activity of Tubtim Chumphae rice (TCR) extract for application in a cosmetic product. TCR was extracted with ethanolic solution. Total phenolics content, total flavonoids content and antioxidant activities of the extract were first investigated. It was found that the total phenolics and flavonoids contents were  $80.20 \pm 0.03$  gGAE/g extract and  $8.18 \pm 0.05$  gQE/g extract, respectively.  $IC_{50}$  of DPPH<sup>\*</sup> and ABTS<sup>++</sup> were  $0.77 \pm 0.006$  and  $0.29 \pm 0.002$  mg/mL, respectively. The elastase and collagenase (MMP-1 and MMP-2) inhibition activities were  $84.23 \pm 0.14\%$ ,  $83.67 \pm 0.49\%$  and  $83.26 \pm 0.16\%$ , respectively. Moreover, the toxicity to human skin fibroblast cells (CCD-986SK) was determined by the MTT colorimetric assay. The results indicated that TCR extract did not affect the CCD-986SK cells of which the survival of cells was  $100.00 \pm 6.23\%$ . The extract was then incorporated into a facial cream formulation, which was then tested for its stability under long-term and accelerated conditions for 3 months. Results showed that all the formulations were homogeneous upon the storage. Although the pH, viscosity and color of the products changed, such changes did not affect the product quality. Results suggested that ethanolic extract of TCR has a good potential for skin care product application.

---

## 1. บทนำ

ปัจจุบันสภาวะภูมิอากาศที่รุนแรงส่งผลต่อผิวพรรณของคนไทยเป็นอย่างมาก เช่น ริวรอย รอยหมองคล้ำ หรือจุดด่างดำบนใบหน้า รวมไปถึงประเทศไทยกำลังจะเข้าสู่ภาวะผู้สูงอายุ ดังนั้นการเกิดริ้วรอยจึงเป็นปัญหาที่พบได้มาก และนอกจากริ้วรอยที่เกิดขึ้นตามวัยแล้ว ริ้วรอยก่อนวัยสามารถเกิดขึ้นได้ด้วยบ่งบอกถึงการเกิดริ้วรอยก่อนวัยได้ชัดเจนที่สุด คือลักษณะภายนอกที่พบเห็นได้ เช่น ผิวหนังแห้ง เที้ยวย่น ขาดความชุ่มชื้น และมีการฟื้นฟูกลับมาปกติได้ยาก ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่างๆ ขึ้นมามาก เช่น เซรัม โลชั่น ครีม หรือแผ่นมาร์คหน้าบำรุงผิว แต่ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในปัจจุบันมีการอ้างสรรพคุณที่เกินความเป็นจริง และไม่มีงานวิจัยรองรับ นอกจากนี้ สารเคมีที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์ ซึ่งอาจทำให้เกิดอาการแพ้ หรือระคายเคืองแก่ผิว และก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้น การใช้สารจากธรรมชาติ เช่น ข้าว ซึ่งข้าวอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสำคัญที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและความงาม เช่น สารโทโคไตรอีนอล สารแกมมาออริซานอล กรดเฟอร์ูลิก [1, 2] และพบว่าทั้งในข้าวขาวและข้าวที่มีสีมีสารในกลุ่มฟีนอลิก เช่น สาร Protocatechuic acid, Hydroxybenzoic acid, Vanillic acid, Syringic acid, Chlorogenic acid, Caffeic acid, p-Coumaric acid, Ferulic acid, Sinapinic acid และ Feruloyl sucrose [3] ส่วนในข้าวที่มีสีส่วนมากจะพบแอนโธไซยานินซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [4] และ reduces oxidative stress ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ [5] ปัจจุบันข้าวสีที่มีความโดดเด่น และมีปริมาณการปลูกที่เพิ่มสูงขึ้น คือ ข้าวทับทิมชุมแพ เป็นข้าวที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าขาวดอกมะลิ 105 กล้วยพันธุ์จากฝรั่งเศสพันธุ์ Semidwarf KDML105 กับข้าวเจ้าพันธุ์สังข์หยดพัทลุงซึ่งเป็นข้าวเจ้าที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงได้เป็นข้าวสายพันธุ์บริสุทธิ์ SRN06008-18-1-5-7-CPA-20 ลักษณะเด่นของข้าวสายพันธุ์นี้คือมีสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์  $\alpha$ -Tocopherol และ  $\gamma$ -Oryzanol รวมทั้งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าข้าวสังข์หยดพัทลุง [6, 7] จากสมบัติดังกล่าวข้าวทับทิมชุมแพจึงเหมาะที่จะนำมาศึกษาและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิว

## 2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### 2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำข้าวทับทิมชุมแพ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ จังหวัดขอนแก่น มาอบด้วยตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ความชื้นไม่เกิน ร้อยละ 10 จากนั้นนำมาบดให้เป็นผง และร่อนผงข้าวผ่านตะแกรงละเอียดขนาด 100 เมช จะได้ผงข้าวทับทิมชุมแพ

### 2.2 การสกัดตัวอย่าง

นำข้าวทับทิมชุมแพที่เตรียมได้จากข้อ 1 มาสกัดด้วย 70% เอทานอล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 (w/v) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไปประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) จนได้สารสกัดหยาบที่มีลักษณะข้นเหนียว (crude extract) นำสารสกัดหยาบที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปวิเคราะห์ต่อไป

### 2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total phenolics content)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม โดยใช้วิธี Folin-Ciocalteu assay ดัดแปลงจาก Slinkard และ Singleton [8] โดยนำตัวอย่างสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงใน 96-well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 10% Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นเติม 7.5% Sodium carbonate ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 60 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (Biochrom รุ่น EZ Read 2000) นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณ ฟีนอลิก โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

### 2.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoids content)

วิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric method ประยุกต์จากงาน

วิจัยของ Ghasemzadeh และคณะ [9] นำสารสกัดตัวอย่าง ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงใน 96-well plate ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นเติม  $\text{NaNO}_2$  (1:5, w/v) ที่ ละลายในเมทานอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกันแล้วทิ้งไว้ เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติม  $\text{AlCl}_3$  (1:10, w/v) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมและตั้งทิ้งไว้ 6 นาที จากนั้นเติม 1M NaOH ปริมาตร 55 ไมโครลิตร และบ่มทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ทำการทดลองอีกครั้งโดยเปลี่ยนจากสารสกัด ตัวอย่างเป็นสารละลายมาตรฐานเคอควิทิน (Quercetin) นำ ค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์รวม โดยเปรียบเทียบกับ calibration standard curve ของ สารมาตรฐานเคอควิทิน ในหน่วย mg Quercetin equivalent (mg QE/g extract)

## 2.5 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินด้วย เครื่อง HPLC

วิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตามวิธี ของ Rungruang และคณะ [7] คอลัมน์ที่ใช้ Agilent Eclipse XDB-C18 reverse phase (4.6 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร) สภาวะที่ใช้วิเคราะห์เป็น Isocratic elution system มี Mobile phase 2 ชนิด โดย Mobile phase A คือ 0.1% Trifluoroacetic acid in Milli-Q water และ Mobile phase B คือ acetonitrile (ACN) กำหนด flow rate เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ตัวอย่างสารสกัดข้าวความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใช้ UV-visible diode-array ความยาวคลื่น 250 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณเทียบกับสารมาตรฐานไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyaniding-3-O-glucoside chloride)

## 2.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกด้วย เครื่อง HPLC

วิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตามวิธี ของ Ghasemzadeh และคณะ [9] คอลัมน์ที่ใช้ Agilent Eclipse XDB-C18 reverse phase (4.6 มิลลิเมตร x 150

มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร) สภาวะที่ใช้วิเคราะห์เป็น Isocratic elution system มี Mobile phase 2 ชนิด โดย Mobile phase A คือ 0.03M Orthophosphoric acid และ Mobile phase B คือ Methanol กำหนด flow rate เท่ากับ 1 มิลลิลิตร ต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส มีสภาวะการ วิเคราะห์ ดังนี้ 0 นาที 40% B, 10 นาที 100% B, 15 นาที 100% B และ 20 นาที 40% B โดยใช้ตัวอย่างสารสกัดข้าว ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ใช้ UV-visible diode-array ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน ดังนี้ กรดแกลลิก (Gallic acid) ไมริเซติน (Myricetin) ลูทีโอลิน (Luteolin) แคมพ์เฟอร์อล (Kaempferol) และ อะพิจิเจินิน (Apigenin)

## 2.7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH\* (Antioxidant activity; DPPH\*)

วิเคราะห์ฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH scavenging assay ดัดแปลงจาก Brand และคณะ [10] โดยการนำสารละลาย DPPH\* ความเข้มข้น 0.16 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารสกัดข้าวทับทิม ชุมแพความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใน 96-well plate แล้วนำไปเก็บในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (Biochrom รุ่น EZ Read 2000) ที่ ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลาย มาตรฐาน Trolox และ L-ascorbic acid นำมาคำนวณใน สมการ

$$\% \text{ Scavenging} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

คำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ได้ร้อยละ 50 หรือค่า  $\text{IC}_{50}$  โดยเปรียบเทียบกับระหว่างค่า  $\text{IC}_{50}$  ของสารสกัดและค่า  $\text{IC}_{50}$  ของ Trolox และ L-ascorbic acid

## 2.8 การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS<sup>•+</sup> (Antioxidant activity; ABTS<sup>•+</sup> assay)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ABTS scavenging assay ดัดแปลงจาก Cai และคณะ [11] โดยเตรียมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ผสมกับโพแทสเซียมเพอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ อัตราส่วน 2:1 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ ABTS<sup>•+</sup> radical cation นำมาเจือจางด้วยเอทานอล และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader (Biochrom รุ่น EZ Read 2000) ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่  $0.700 \pm 0.030$  นาโนเมตร จากนั้นนำสารละลาย ABTS<sup>•+</sup> ปริมาตร 160 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ใน 96-well plate แล้วนำไปเก็บในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox และ L-ascorbic acid นำมาคำนวณในสมการ

$$\% \text{ Scavenging} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

คำนวณหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 หรือค่า IC<sub>50</sub> โดยเปรียบเทียบกับระหว่างค่า IC<sub>50</sub> ของสารสกัดและค่า IC<sub>50</sub> ของ Trolox และ L-ascorbic acid

## 2.9 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเทส (Anti-elastase inhibitory activity)

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเทส ประยุกต์จากงานวิจัยของ Kim และคณะ [12] โดยนำตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมลงใน 96-well plate และเติมเอนไซม์ Porcine pancreatic elastase (PE – E.C.3.4.21.36) ที่เตรียมด้วย 0.2 mM Tris-HCL buffer (pH 8.0) ความเข้มข้น 3.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นเติม 1.6 mM N-Succinyl-Ala-

AlaAla-p-nitroanilide (AAPVN) โดยให้ปริมาตรสุทธิอยู่ที่ 250 ไมโครลิตรต่อหลุมทดสอบ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader (Biochrom รุ่น EZ Read 2000) ที่ความยาวคลื่น 381 และ 402 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารมาตรฐานคือ Epigallocatechin gallate (EGCG)

## 2.10 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส (Anti-collagenase inhibitory activity)

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสประยุกต์จากงานวิจัยของ Pientaweeratch และคณะ [13] โดยใช้ชุด Kit ของ EnzChek® collagenase/gelatinase นำตัวอย่างสารสกัดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ลงใน 96-well plate ชนิด Fluorescence-based Assays และเติม MMP-1 ใช้ DQTM collagen 1 หรือ MMP-2 ใช้ DQTM gelatin ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Collagenase (ChC) ที่ได้จาก *Clostridium histolyticum* บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นระยะเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าด้วย fluorescence intensity กำหนด excitation wavelength คือ 485 นาโนเมตร และ emission wavelength คือ 538 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารมาตรฐานคือ Epigallocatechin gallate (EGCG)

## 2.11 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity assay)

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT colorimetric assay กับเซลล์ Human skin fibroblast ATCC no. CRL 1947 (CCD-986 SK) ตามวิธีของ Rungruang [14] โดยเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร RPMI1640 ที่มี 5% FCS ในตู้บ่ม 5% CO<sub>2</sub> จนได้เซลล์ที่เจริญอยู่ในระยะ exponential phase จากนั้นทำการ Trypsinization ด้วย 0.05% Trypsin-EDTA และเจือจางเซลล์ให้มีความเข้มข้น  $2.5 \times 10^4$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมลงใน 96 well plates ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุมเลี้ยงไว้ 1 วัน เติมสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพที่ความเข้มข้น 2, 8, 20, 40 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เลี้ยงไว้เป็นระยะ

เวลา 3 วัน แล้วเติมสารละลาย MTT เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศา เซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติม DMSO ปริมาตร 150 ไมโครลิตรต่อหลุม และ Glycine buffer pH 10.4 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าให้ผลึก Formazan ละลาย จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการรอดของเซลล์

$$(\% \text{ Survival}) = (\text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

โดยที่  $\text{OD}_{\text{sample}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงหลุมที่ ใส่สารสกัด

$\text{OD}_{\text{control}}$  = ค่าการดูดกลืนแสงหลุมที่ ไม่ใส่สารสกัด

## 2.12 การตั้งตำรับเครื่องสำอางจากสารสกัด ข้าวทับทิมชุมแพ

การเตรียมตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้าด้วยวิธี Small scale processing – Beaker method ประยุกต์จากงานวิจัย ของ Limpongsa และคณะ [15] โดยมีสูตรดังแสดงในตาราง ที่ 1 โดยละลาย Xanthan gum ลงใน Glycerin และ Propylene glycol จากนั้นเติม DI Water แล้วนำไปปั่นผสมด้วย เครื่องกวนสารแบบใบกวน (Overhead stirrer) เติม Carbopol aqua SF1 และ Triethanolamine ปั่นผสมให้เข้ากัน จน ผลิตภัณฑ์ข้นขึ้นแล้วเติมสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพที่ละลาย อยู่ในรูป PG solution ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Spectrastat PHL และ Fragrance เป็นลำดับสุดท้าย เทลงในภาชนะบรรจุ เพื่อนำไปทดสอบความคงตัว

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของตำรับครีมบำรุงผิวหน้า

Part	Trade Name	INCI Name	Function	%w/w
A	DI Water	DI Water	Diluent	qs.
	Glycerin	Glycerin	Humectant	2.50
	Propylene glycol	Propylene glycol	Humectant	1.00
	Xanthan gum	Xanthan gum	Thickener	0.10
	Carbopol aqua SF1	Acrylates Copolymer	Thickener	4.00
	Triethanolamine	Triethanolamine	pH adjusters	0.40
B	Rice extract (PG solution)	Tubtim Chumphae rice extract (PG solution)	Active agent	2
C	Spectrastat PHL	Caprylhydroxamic Acid (and) 1,2-Hexanediol (and) Propanediol	Preservative	0.70
	Fragrance	Fragrance	Fragrance	0.02

หมายเหตุ : qs หมายถึง ปรับปริมาณให้ครบ 100

## 2.13 การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์

การเร่งด้วยอุณหภูมิ (Heating-cooling cycle) โดย นำตำรับใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24

ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ สลับกันเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนครบ 6 รอบ แล้ว ประเมินความคงตัวที่สภาวะต่างๆ ระยะเวลา 3 เดือน ดังนี้

อุณหภูมิเย็น (4°C) อุณหภูมิห้อง (25°C) อุณหภูมิร้อน (50°C) สภาวะแสงแดดส่อง (Light exposure) โดยนำมาประเมิน pH โดยใช้ pH meter การประเมินความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield viscometer DVLV-I Prime หัววัดขนาด 62 ความเร็วรอบ 0.3 rpm อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส สังเกตการแยกชั้น และวัดค่าสี L\*, a\*, b\* ด้วยเครื่อง Chroma meter CR-400 Konica Minolta [16]

## 2.14 การประเมินผลทางสถิติ

โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05) โดยใช้โปรแกรม SAS เวอร์ชัน 9 (SAS Institute, USA)

## 3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

### 3.1 ปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในข้าวทับทิมชุมแพ

การสกัดข้าวทับทิมชุมแพด้วยตัวทำละลายเอทานอล พบว่า มีร้อยละของน้ำหนักรสสกัดหยาบเท่ากับ  $2.39 \pm 0.16$  มีลักษณะทางกายภาพข้นเหนียวและมีสีน้ำตาลแดงเข้ม มีปริมาณฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์รวม เท่ากับ  $80.20 \pm 0.03$  gGAE/g extract และ  $8.18 \pm 0.05$  gQE/g extract ตามลำดับ และพบสารสำคัญ 6 ชนิด คือ Gallic acid, Myricetin, Luteolin, Kaempferol, Apigenin และ Cyanidin-3-glucoside ดังแสดงในตารางที่ 2 ทั้งนี้เนื่องจากเอทานอลเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถสกัดสารในกลุ่มฟีนอลิกได้ และการใช้เอทานอลมีความปลอดภัยกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น [17] โดยผลการทดลองสอดคล้องกับการรายงานของ Goufo และ Trindade [18] ที่พบว่าส่วนใหญ่บริเวณรำข้าวจะพบสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ Myricetin, Luteolin, Kaempferol และ Apigenin นอกจากนี้ยังพบ Cyanidin-3-glucoside ในข้าวทับทิมชุมแพ [7] ซึ่งในข้าวสีจะพบสารแอนโทไซยานินปริมาณมาก โดยเฉพาะ Cyanidin-3-O-glucoside ที่เป็นแอนโทไซยานินหลัก [19, 20] จากสมบัติดังกล่าวทำให้ข้าวสีมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ROS (Reactive Oxygen Species) สูง [21]

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม และสารสำคัญที่พบในสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ

Compound	Content
Total phenolics content (gGAE/g extract)	80.20±0.03
Total flavonoids content (gQE/g extract)	8.18±0.05
Compound	Content (µg/g extract)
Gallic acid	2138.14
Myricetin	740.95
Luteolin	818.31
Kaempferol	1150.34
Apigenin	594.28
Cyanidin-3-glucoside	617.87

### 3.2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ ด้วยวิธี DPPH<sup>•</sup> scavenging assay และ ABTS<sup>•+</sup> scavenging assay เทียบกับสารมาตรฐานวิตามินซี และโทรลอกซ์ แสดงในรูปของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (50% Inhibitory concentration) ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า สารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> และ ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub>)

เท่ากับ 0.77±0.006 และ 0.29±0.002 mg/mL ตามลำดับ ทั้งนี้ เนื่องจากในข้าวที่มีสีส่วนมากจะพบสารในกลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง [22] ซึ่งสอดคล้องกับผลของสารฟีนอลิกที่พบในตารางที่ 2 นอกจากนี้ยังพบว่า ข้าวหอมมะลิ 105 และข้าวพันธุ์สังหยดพัทลุงซึ่งเป็นต้นแม่ในการผสมให้ได้เป็นข้าวทับทิมชุมแพ ก็มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน [23, 24]

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> และ ABTS<sup>•+</sup> ของสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ

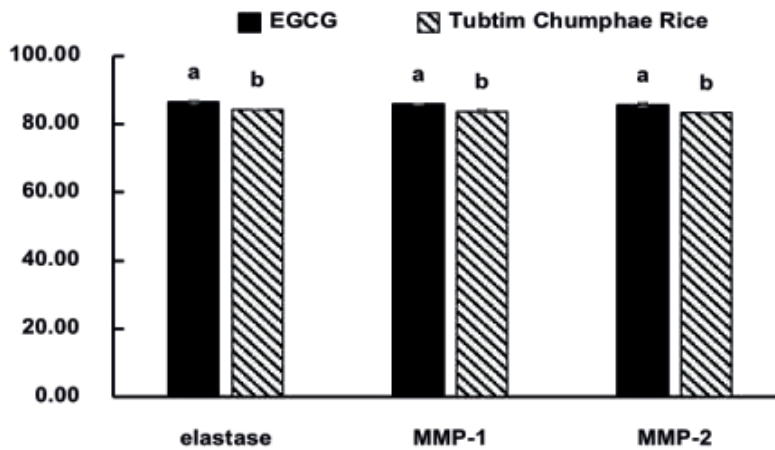
Sample	DPPH <sup>•</sup>	ABTS <sup>•+</sup>
	IC <sub>50</sub> (mg/mL)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Tubtim Chumphae rice	0.77±0.006	0.29±0.002
Trolox	0.03±0.004	0.04±0.007
L-ascorbic acid	0.24±0.001	0.26±0.004

### 3.3 ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส และอีลาสเทส

เอนไซม์คอลลาจิเนส และอีลาสเทสเป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำให้เกิดริ้วรอย และทำลายความยืดหยุ่นของผิวหนัง เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะไปทำลายคอลลาเจนและอีลาสติน ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของผิว โดยปกติสามารถพบคอลลาเจนประมาณ 70 - 80% ของผิว ช่วยทำให้ทำให้โครงสร้างผิวมีความกระชับและยืดหยุ่น [25] ซึ่งเอนไซม์อีลาสเทสและคอลลาจิเนสเป็นเอนไซม์สำคัญที่รู้จักกันดีว่าเป็นสาเหตุของการเสื่อมสภาพของผิวหนัง โดยเอนไซม์อีลาสเทสสามารถย่อยสลาย อีลาสตินซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความยืดหยุ่นสูงบริเวณผิวหนัง และนอกจากนี้ยังพบว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ตจากดวงอาทิตย์สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อีลาสเทส และคอลลาจิเนส ส่งผลให้เกิดความหย่อนคล้อย และริ้วรอยที่บริเวณผิวหนัง ซึ่งผลการศึกษาดูฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเทส และคอลลาจิเนส ของสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์อีลาสเทส ร้อยละ 84.23±0.14 และคอลลาจิเนส ชนิด MMP-1 ร้อยละ 83.67±0.49 และ

MMP-2 ร้อยละ 83.26±0.16 ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน EGCG (p<0.05) ทั้งนี้เนื่องจากสารในกลุ่มฟีนอลิกมีสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส [26] โดยเข้าไปมีผลต่อการเปลี่ยนรูปร่างของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ [27] และยังพบว่าสารในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ส่วนใหญ่มีสมบัติในการเป็น Chelators ที่สามารถจับกับ Zn<sup>2+</sup> ไอออน บริเวณ Active site ของเอนไซม์ ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ [28] สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารในกลุ่มฟีนอลิกสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเทสได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น Kaempferol, Quercetin และ Myricetin [29] นอกจากนี้งานวิจัยของ Lim และคณะ [30] ระบุว่า Kaempferol เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจิเนส ในขณะที่ Apigenin เป็นสารในกลุ่มฟลาโวน (Flavones) ก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์คอลลาจิเนส เช่นเดียวกันแต่น้อยกว่าฟลาโวนอยด์ ดังนั้น การที่พบสารฟีนอลิกในข้าวทับทิมชุมแพ จึงมีส่วนช่วยในการคงสภาพของคอลลาเจนในชั้นผิวหนัง [31]



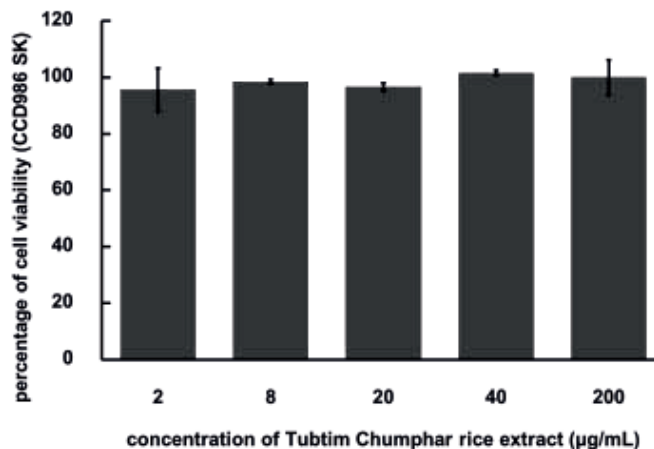


รูปที่ 1 ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อีลาสเทส และคอลลาจีเนส (MMP-1 และ MMP-2) ของสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ เทียบกับสารมาตรฐาน Epigallocatechin gallate (EGCG)

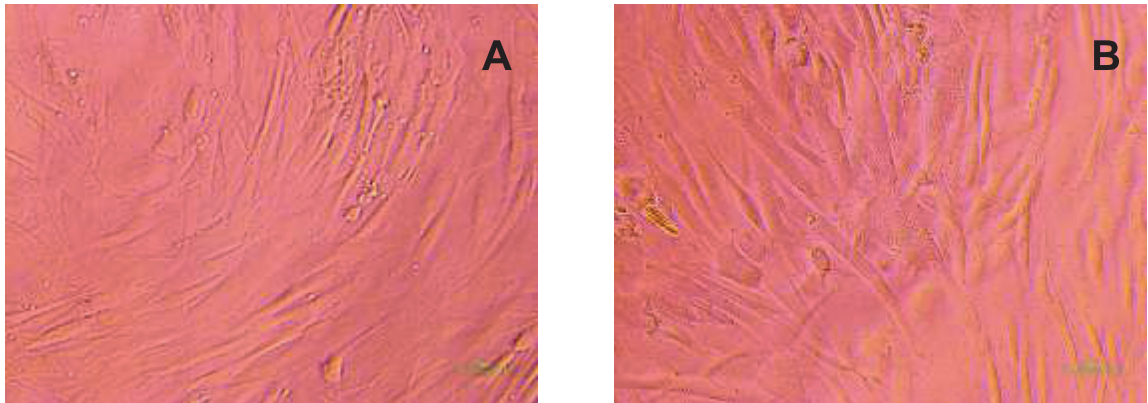
### 3.4 ความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง CCD-986 SK ของสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ Human skin fibroblast CCD-986 SK ของสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพที่ความเข้มข้น 200, 40, 20, 8 และ 2  $\mu\text{g/mL}$  พบว่า เซลล์มีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ ร้อยละ  $100 \pm 6.23$ ,  $101.59 \pm 0.91$ ,  $96.58 \pm 1.34$ ,  $98.41 \pm 0.87$  และ  $95.62 \pm 7.72$  ตามลำดับ

(รูปที่ 2) เมื่อนำเซลล์ Human skin fibroblast CCD-986 SK มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า พบว่า ลักษณะของเซลล์ที่เติมสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพมีการเจริญเติบโต และแผ่กระจายหนาแน่นเต็มพื้นที่หลุมเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับเซลล์ที่ไม่เติมสารสกัด (ชุดควบคุม) ที่เซลล์มีการเจริญเติบโต ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ CCD-986 SK ของสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ ด้วยวิธี MTT colorimetric assay



รูปที่ 3 ลักษณะของเซลล์ CCD-986 SK ที่ไม่เติมสารสกัด (A) และเติมสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (B) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20 เท่า

### 3.5 การประยุกต์สารสกัดข้าวทับทิมชุมแพในตำรับเครื่องสำอางบำรุงผิว และผลความคงตัวของตำรับ

การทดสอบความคงตัว 5 สภาวะ คือ สภาวะอุณหภูมิเย็น (4°C) สภาวะอุณหภูมิห้อง (25°C) สภาวะอุณหภูมิร้อน (50 °C) สภาวะร้อนสลับเย็น (Heating-cooling) และสภาวะแสงแดดส่อง (Light exposure) ของตำรับที่ใส่สารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า ลักษณะทางกายภาพของตำรับมีความเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่พบการแยกชั้น และกลิ่นไม่เปลี่ยนแปลง สำหรับผลของค่า pH พบว่า การทดสอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และสภาวะร้อนสลับเย็น มีค่า pH ลดลง ( $p < 0.05$ ) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lourith และ Kanlayavattanukul [32] ที่พบว่าตำรับที่ใส่สารสกัดจากกลีบข้าว ทดสอบที่สภาวะร้อนสลับเย็นมีค่า pH ลดลงเนื่องจากความร้อน นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารออกฤทธิ์ทางเครื่องสำอางที่เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิก ก็ส่งผลให้ค่า pH ของตำรับลดลงเช่นกัน [33] อย่างไรก็ตามค่า pH ของตำรับเครื่องสำอางที่ทดสอบกับสภาวะอื่นๆ ไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วง

5.78 – 6.02 ซึ่งเป็นช่วงค่า pH เหมาะสม โดย Budiman และคณะ [34] รายงานว่า pH ของตำรับควรอยู่ในช่วง 4.5 – 6.5 ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมต่อผิว ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองสำหรับค่าสีของตำรับแสดงในรูปของค่า  $L^*$ ,  $a^*$  และ  $b^*$  พบว่ามีค่า  $L^*$  ลดลง ที่การทดสอบของสภาวะร้อนสลับเย็น และอุณหภูมิสูง สอดคล้องกับผลของความหนืดของตำรับ พบว่าการทดสอบที่สภาวะ 4°C, 25°C และแสงแดดส่องไม่แตกต่างกับชุดควบคุม แต่การทดสอบที่อุณหภูมิ 50 °C และสภาวะร้อนสลับเย็นมีค่าความหนืดลดลงโดยมีค่าเท่ากับ  $87.38 \pm 1.01$  และ  $87.18 \pm 1.02$  ( $\times 10^3$  cP) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ( $88.02 \pm 1.01 \times 10^3$  cP) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Deuschle และคณะ [35] ที่อุณหภูมิสูงมีผลทำให้ความหนืดลดลงเนื่องจากอุณหภูมิสูงมีผลต่อปฏิกิริยาทางเคมีของสารในตำรับ ส่งผลต่อความหนืด สี และกลิ่น อย่างไรก็ตามความหนืดที่เปลี่ยนแปลงไม่ได้มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ และความหนืดที่ลดลงสามารถเพิ่มการเคลือบของครีม หรือการกระจายของครีมบนผิวได้ดีขึ้น [36, 37]

ตารางที่ 4 สี ความเป็นกรด-ด่าง ความหนืด และความเข้ากันของตำรับผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้าที่มีส่วนผสมของสารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ ที่สภาวะอุณหภูมิ 4, 25 และ 50 องศาเซลเซียส แสงแดดส่อง และสภาวะร้อนสลับเย็น

Condition	Color			pH	Viscosity ( $\times 10^3$ cP)	Homogeneous	Odor	Appearance
	L*	a*	b*					
control	21.46 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.75 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.16 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	6.02 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	88.02 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>	H	NC	NC
4°C	21.25 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	6.00 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	88.03 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>	H	NC	NC
25°C	21.54 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	6.00 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	88.08 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	H	NC	NC
50°C	20.33 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.78 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	5.87 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	87.38 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>	H	NC	NC
Light exposure	21.09 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	0.74 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	5.99 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	88.03 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>	H	NC	NC
Heating-cooling	20.95 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.77 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	5.78 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	87.18 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>	H	NC	NC

หมายเหตุ : H หมายถึง ไม่แยกชั้น (Homogeneous)

NC หมายถึง ไม่เปลี่ยนแปลง (No Change)

a,b,c... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p \leq 0.05$

#### 4. สรุป

สารสกัดข้าวทับทิมชุมแพ มีสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน และยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์คอลลาจีเนส และอีลาสเทส เมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์ Human skin fibroblast CCD-986 SK พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และเมื่อนำสารสกัดมาตั้งตำรับและศึกษาความคงตัวพบว่าตำรับมีความคงตัวทางกายภาพดี

#### 5. เอกสารอ้างอิง

1. Qureshi, A.A., Sami, S.A. and Khan, F.A., 2002, "Effects of Stabilized Rice Bran, its Soluble and Fibre Fractions on Blood Glucose Levels and Serum Lipid Parameters in Humans with Diabetes Mellitus Types I and II," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, pp. 175–187.

2. Zawistowski, J., Kopec, A. and Kitts, D.D., 2009, "Effects of a Black Rice Extract (*Oryza sativa* L. indica) on Cholesterol Levels and Plasma Lipid Parameters in Wistar Kyoto Rats," *Journal of Functional Foods*, 1, pp. 50–56.

3. Tian, S., Nakamura, K. and Kayahara, H., 2004, "Analysis of Phenolic Compounds in White Rice, Brown

Rice, and Germinated Brown Rice," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (15), pp. 4808-4813.

4. Yodmanee, S., Karrila, T.T. and Pakdeechuan, P., 2011, "Physical, Chemical and Antioxidant Properties of Pigmented Rice Grown in Southern Thailand," *International Food Research Journal*, 18, pp. 901–906.

5. Chiang, A.N., Wu, H.L., Yeh, H.I., Chu, C.S., Lin, H.C. and Lee, W.C., 2006, "Antioxidant Effects of Black Rice Extract through the Induction of Superoxide Dismutase and Catalase Activities," *Lipids*, 41, pp. 797–803.

6. Chum Phae Rice Research Center, 2017, The Miracle of Rice [Online], Available: <https://www.thairice.org/html/doc-dl/thairice-magazine.pdf>. [20 September 2017]

7. Rungruang, R., Modsuwan, J., Sae-Lee, N., Kaisangsri, N., Kerdchoechuen, O. and Laohakunjit, N., 2018, "Effect of pH on the Extraction of Anthocyanin and Antioxidants of Tubtim Chumphae Rice," *Agricultural Science Journal*, 49 (2), (Suppl.), pp. 225-228. (In Thai)

8. Slinkard, K. and Singleton, V.L., 1977, "Total

Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods,” *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, pp. 49–55.

9. Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z., Rahmat, A. and Ashkani, S., 2015, “Secondary Metabolites Constituents and Antioxidant, Anticancer and Antibacterial Activities of *Etlingera elatior* (Jack) RM Sm grown in Different Locations of Malaysia,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15 (1), p. 335.

10. Brand-William, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C., 1995, “Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity,” *Lebensmittel Wissenschaft and Technology*, 28, pp. 25–30.

11. Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H., 2004, “Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer,” *Life Sciences*, 75, pp. 2157–2184.

12. Kim, Y.J., 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 (1), pp. 256-261.

13. Pientaweeratch, S., Panapisal, V., and Tansirikongkol, A., 2016, “Antioxidant, Anti-Collagenase and Anti-Elastase Activities of *Phyllanthus Emblica*, *Manilkara Zapota* and Silymarin: an In Vitro Comparative Study for Anti-Aging Applications,” *Pharmaceutical Biology*, 54 (9), pp. 1865 - 1872.

14. Rungruang, R., 2015, Effect of Methyl Jasmonate and Jasmonic acid on Phenolic Contents of Rice, Soybean and Mulberry Cell Suspension in *In vitro* Culture, Master of Bioresources and Technology Thesis, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut’s University of Technology Thonburi. (In Thai)

15. Limpongsa, E., Jaipakdee, N. and Deeseenthum, S., 2014, “Formulation and Evaluation of Facial Masks

Prepared from Thai Jasmine Rice,” *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 19 (6), pp. 891-901.

16. Estanqueiro, M., Conceição, J., Amaral, M.H., Santos, D., Silva, J.B. and Lobo, J.M.S., 2014, “Characterization and Stability Studies of Emulsion Systems Containing Pumice,” *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50 (2), pp. 361-369.

17. Halee, A. and Rattanapun, B., 2016, “Effects of Solvent Type and Concentration of Citric Acid on the Extraction of Antioxidants from Hom Nin Rice,” *KMUTT Research and Development Journal*, 39 (3), pp. 353-364. (In Thai)

18. Goufo, P. and Trindade, H., 2014, “Rice Antioxidants: Phenolic Acids, Flavonoids, Anthocyanins, Proanthocyanidins, Tocopherols, Tocotrienols,  $\gamma$ -oryzanol, and Phytic acid,” *Food Science and Nutrition*, 2 (2), pp. 75-104.

19. Yoshimura, Y., Zaima, N., Moriyama, T. and Kawamura, Y., 2011, “Different Localization Patterns of Anthocyanin Species in the Pericarp of Black Rice Revealed by Imaging Mass Spectrometry,” *PLOS One*, 7, pp. 31285.

20. Chen, X.Q., Nagao, N., Itani, T. and Irifune, K., 2012, “Anti-Oxidative Analysis, and Identification and Quantification of Anthocyanin Pigments in Different Coloured Rice,” *Food Chemistry*, 135 (4), pp. 2783-2788.

21. Pitija, K., Nakornriab, M., Sriseadka, T., Vanavichit, A. and Wongpornchai, S., 2013, “Anthocyanin Content and Antioxidant Capacity in Bran Extracts of Some Thai Black Rice Varieties,” *International Journal of Food Science and Technology*, 48 (2), pp. 300-308.

22. Batubara, I., Maharni, M. and Sadiyah, S., 2017, “The Potency of White Rice (*Oryza sativa*), Black Rice (*Oryza sativa* L. Indica), and Red Rice (*Oryza nivara*) as Antioxidant and Tyrosinase Inhibitor,” *Journal of Physics: Conference Series, IOP Publishing*, 824 (1),

pp. 012017.

23. Soradech, S., 2016, "Radical Scavenging, Antioxidant and Melanogenesis Stimulating Activities of Different Species of Rice (*Oryza sativa* L.) Extracts," *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* (TJPS), 40.

24. Muntana, N. and Prasong, S., 2010, "Study on Total Phenolic Contents and Their Antioxidant Activities of Thai White, Red and Black Rice Bran Extracts," *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13 (4), pp. 170.

25. 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 (132), pp. 2.

26. Miao, Y.P., Wen, R., Aoshima, H. and Zhou, P.G., 2004, "Synthesis and Antioxidative Activity of 2-substituted phenyl-5-(3'-indolyl)-oxazole Derivatives," *Acta Pharmaceutica Sinica*, 39 (1), pp. 37-40.

27. Madhan, B., Krishnamoorthy, G., Rao, J.R. and Nair, B.U., 2007, "Role of Green Tea Polyphenols in the Inhibition of Collagenolytic Activity by Collagenase," *International Journal of Biological Macromolecules*, 41 (1), pp. 16-22.

28. Malešev, D. and Kuntić, V., 2007, "Investigation of Metal-Flavonoid Chelates and the Determination of Flavonoids via Metal-Flavonoid Complexing Reactions," *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72 (10), pp. 921-939.

29. Kanashiro, A., Souza, J.G., Kabeya, L.M., Azzolini, A.E.C. and Lucisano-Valim, Y.M., 2007, "Elastase Release by Stimulated Neutrophils Inhibited by Flavonoids: Importance of the Catechol Group," *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62 (5-6), pp. 357-361.

30. Lim, H. and Kim, H.P., 2007, "Inhibition of Mammalian Collagenase, Matrix Metalloproteinase-1, by Naturally-Occurring Flavonoids," *Planta Medica*,

73 (12), pp. 1267-1274.

31. Landau, M., 2007, "Exogenous Factors in Skin Aging," in E. Tur (Ed.) *Environmental Factors in Skin Diseases*, Karger Publishers, Vol. 35, pp. 1-13.

32. Lourith, N. and Kanlayavattanakul, M., 2013, "Appraisal of Thai Glutinous Rice Husk for Health Promotion Products," *Journal of Cereal Science*, 57 (3), pp. 343-347.

33. Waqas, M.K., Akhtar, N., Ahmad, M., Murtaza, G., Khan, H.M., Iqbal, M. and Bhatti, N.S., 2010, "Formulation and Characterization of a Cream Containing Extract of Fenugreek Seeds," *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67 (2), pp. 173-178.

34. Budiman, A., Aulifa, D.L., Kusuma, A.S.W., Kurniawan, I.S. and Sulastri, A., 2017, "Peel-Off Gel Formulation from Black Mulberries (*Morus nigra*) Extract as Anti-Acne Mask," *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 7 (9), pp. 1-8.

35. Deuschle, V.C.K.N., Deuschle, R. A.N., Bortoluzzi, M.R. and Athayde, M.L., 2015, "Physical Chemistry Evaluation of Stability, Spreadability, *in vitro* Antioxidant, and Photo-protective Capacities of Topical Formulations Containing *Calendula officinalis* L. Leaf Extract," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(1), pp. 63-75.

36. Lardy, F., Vennat, B., Pouget, M.P. and Pourrat, A., 2000, "Functionalization of Hydrocolloids: Principal Component Analysis Applied to the Study of Correlations Between Parameters Describing the Consistency of Hydrogels," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26 (7), pp. 715-721.

37. Garg, A., Aggarwal, D., Garg, S. and Singla, A.K., 2002, "Spreading of Semisolid Formulations: an Update," *Pharmaceutical Technology North America*, 26 (9), pp. 84-84.

