รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ที่มีส่วนประกอบจาก สารสกัดติ้วสำหรับผิวที่เป็นสิวง่าย

(Development of toner product comprising *Cratoxylum formosum* extract for acne prone skin)

โดย

ผศ.ดร.บัญชา ยิ่งงาม
รศ.ดร.วันดี รังสีวิจิตรประภา
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนวิจัยและสร้างนวัตกรรม
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ประจำปีงบประมาณเงินรายได้ 2563

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

ฝ่ายหอสมุด
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณบุคลากรของห้องปฏิบัติการ คณะเภสัชศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาอำนวยความสะดวกให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี พร้อมนี้ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณทุนวิจัยและสร้างนวัตกรรม มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่สนับสนุนทุนวิจัยจากเงินรายได้ปีงบประมาณ พ.ศ. 2563

บทคัดย่อ

บทนำ: โทนเนอร์ คือ โลชั่นใสใช้ทาบนใบหน้าและเช็ดออกเพื่อขจัดสิ่งสกปรกที่หลงเหลือจากการล้างหน้า สิว เป็นโรคผิวหนังที่พบมากที่สุดในประชากรไทย เชื้อจุลชีพที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว คือ *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) และ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) งานวิจัยก่อนหน้ากล่าวว่า ติ้ว *(Cratoxylum formosum)* มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลชีพอันเป็นสาเหตุของการเกิดสิวได้ **วัตถุประสงค์:** พัฒนาสูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีส่วนผสมจากพืชที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพอันเป็นสาเหตุของการเกิดสิว และศึกษาความคงตัวของตำรับ **วิธีดำเนินการวิจัย:** สกัดติ้ว จากตลาดเจริญศรี จังหวัดอุบลราชธานี เดือนกันยายน ด้วยตัวทำลายลาย 95% Ethanol กำจัดสีและโปรตีนโดยการ Partition ด้วย Hexane และ Ethyl acetate ทำให้แห้งด้วย Freeze dry method แล้ว ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพโดย Disc diffusion method กับเชื้อ *P. acnes* และ *S. aureus* ที่ปรับให้ได้เชื้อ 1.5x10^8 CFU/mL เทียบความขุ่นกับ McFarland no.0.5 พบว่า ติ้วมีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพทั้ง 2 ชนิดส่วน เม็ก และ บัวบก ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. acnes* จากนั้นหา Minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดติ้วโดย Broth dilution method เพื่อคัดเลือกพืชที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพดีที่สุด ทดสอบความคงตัวด้านกายภาพ ความคงตัวด้านเคมี หาปริมาณ 5-O-Caffeoylquinic acid โดย HPLC ทดสอบการระคายเคืองโดย HET-CAM assay ทดสอบฤทธิ์ทางจุลชีววิทยา เปรียบเทียบก่อนและหลังการการทำ freeze thaw cycle จำนวน 6 รอบ **สรุปผล:** ติ้ว มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *P. acnes* และ *S. aureus* ที่ MIC 25 mg/ml เมื่อนำสารสกัดติ้วมาเติมในตำรับ ที่ความเข้มข้น 50 mg/ml และ 100 mg/ml พบว่า โทนเนอร์ทั้งสองตำรับให้ผลไม่แตกต่างกัน ทั้งในด้านความคงตัวทางกายภาพ ความคงตัวทางเคมี การระคายเคือง และยังคงมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

คำสำคัญ: ติ้ว, ฤทธิ์ต้านจุลชีพ, โทนเนอร์ลดสิว, 5-O-Caffeoylquinic acid

ABSTRACT

Introduction: Toner is clear lotion that applied and wiped out to remove residual dirt from the face. Acne is the most common skin disease in the Thai population. The microorganisms that cause acne are *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Previous research said that *Cratoxylum formosum* was active against microorganisms that cause acne. **Objectives:** Development of toner product containing herbal extract for acne prone skin. Investigate the stability of the formulations. **Methods:** Collected plant from Charoensri market on September. Plant Extraction with 95% Ethanol. Remove color and excessive protein by partition method with Hexane and Ethyl acetate as a solvent. Dry out by Freeze dry method. The antimicrobial activity of these extracts was evaluated by using inhibition zone to *P. acnes* and *S. aureus* (Adjusted to 1.5x10 ^ 8 CFU / mL compared with turbidity of McFarland no. 0.5) by Disc diffusion method. The result showed that *C. formosum* extract had the best antimicrobial activity against *P. acnes* and *S. aureus*. *C. formosum* extract were also examimated for Minimum inhibitory concentration (MIC). *C. formosum* toner was tested by stability test, HPLC assay, irritation test by HET-CAM assay, antimicrobial activity compared between before and after freeze thaw cycle. **Result:** *C. formosum* had antimicrobial activity against *P. acnes* and *S. aureus* with MIC value of 25 mg/ml. Stability test, irritation test and antimicrobial activity test showed that 50 mg/ml and 100 mg/ml concentration *C. formosum* toner were not difference.

Keywords: *Cratoxylum formosum,* Antimicrobial activity, Reduce acne toner, 5-O-Caffeoylquinic acid

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
ABSTRACT	4
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญรูปภาพ	7
บทที่ 1 บทนำ	10
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
สิว	10
ติ้ว	10
โทนเนอร์	12
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
รูปแบบในการวิจัย	13
สารสกัดและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	13
เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	14
ขั้นตอนการวิจัย	15
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	
การสกัดพืช	20
ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดพืช	21
การเตรียมสูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากพืชเป็นส่วนประกอบ	24
การทดสอบหาปริมาณสารสำคัญของติ้วโดย HPLC assay	27
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	32

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. สูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้ว	17
2. ผลการต้านเชื้อแบคทีเรีย *P.acnes* และ *S.aureus* ของสารสกัดจากติ้ว เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Tetracycline และ Ampicillin	21
3. ผลการยับยั้งเชื้อ *P.acne* และ *S.aureus* ด้วยวิธี broth dillution method	22
4. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดติ้วด้วยวิธี broth dillution method	23
5. ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพของสารสกัดติ้วด้วยวิธี streak plate method	24
6. ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้ว	25

สารบัญรูปภาพ

รูป	หน้า
1. ขั้นตอนการเตรียมสารพืช	20
2. ผลการต้านเชื้อแบคทีเรีย *P.acnes* และ *S.aureus* ของสารสกัดจาก ติ้ว เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Tetracycline และ Ampicillin	21
3. ผลการยับยั้งเชื้อ *P.acne* และ *S.aureus* ด้วยวิธี broth dillution method	22
4. กราฟและรูปภาพแสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) เชื้อ P. ances ด้วยวิธี Agar disc diffusion techniques ของโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 mg/ml เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ Tetracycline	25
5. ทดสอบการระคายเคืองกับไข่ไก่ ที่มีน้ำหนัก 50 - 60 g ที่เวลา ทุก 30, 120 และ 300 วินาที	26
6. ผลการทดสอบ irritation score ของตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วด้วยวิธี HET-CAM	27
7. ผลการทดสอบ HPLC ของสารสกัดติ้วที่สกัดด้วย ethanol และสารสกัดติ้วที่ได้ทำการ partition	27
8. ปริมาณของสาร 5-o-caffeoylquinic acid ในสารสกัดติ้วที่สกัดด้วย ethano และสารสกัดติ้วที่ได้ทำการ partition	28
9. ผลการทดสอบ HPLC ของโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้วที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 mg/l ทั้งก่อนและหลังการทำ freeze thaw cycle	29
10. ปริมาณของสาร 5-o-caffeoylquinic acid ของโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้วที่มี ความเข้มข้น 50 และ 100 mg/l ทั้งก่อนและหลังการทำ freeze thaw cycle	29

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและความเป็นมา

โทนเนอร์ (Toner) เป็นเครื่องสำอางที่มีลักษณะเป็นโลชั่นใสช่วยในการทำความสะอาดสิ่งสกปรกบนใบหน้าหลังจากทำความสะอาดด้วยผลิตภัณฑ์ล้างหน้า นอกจากนี้โทนเนอร์ยังช่วยปรับสภาพผิวก่อนทาครีมบำรุงผิวหรือแต่งหน้า โดยมีคุณสมบัติในการช่วยกระชับรูขุมขนที่เปิดกว้างขณะล้างหน้า ป้องกันสิ่งสกปรกอุดตันรูขุมขน ช่วยขจัดสิ่งสกปรกที่ละลายน้ำที่อาจตกค้างหลังการล้างหน้า ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ที่โดยทั่วไปมีส่วนประกอบหลัก ได้แก่ Astringent เช่น alum, zinc phenol sulfonate และ witch hazel มีฤทธิ์กระชับรูขุมขน Humectant เช่น glycerin, sorbitol และ propylene glycol ช่วยดึงความชุ่มชื้นเข้าสู่ชั้นผิว ช่วยให้ผิวไม่แห้งตึง ลดสภาวะแห้งจากการล้างหน้า และ มีส่วนผสมของ Alcohol ช่วยกำจัดไขมัน ชำระล้างความมันที่หลงเหลือจากการล้างหน้า ทำให้เกิดความรู้สึกเย็นสบายหลังใช้ และหวังผลในการยับยั้งจุลชีพอันเป็นสาเหตุของการเกิดสิว ซึ่งอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหน้าได้ แนวโน้มของโทนเนอร์ที่มีจำหน่ายในปัจจุบันยังมีการเพิ่มสารสกัดจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการบำรุงผิวพรรณ แต่ส่วนมากจะมุ่งเน้นเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น และลดเลือนจุดด่างดำ คระผู้วิจัยจึงมีความสนใจนำพืชในท้องถิ่นของประเทศไทย มาทดสอบฤทธิ์ในการยังยั้งเชื้อจุลชีพที่ทำให้เกิดสิว และนำมาพัฒนาเป็นสูตรตำรับโทนเนอร์เพื่อเป็นทางเลือกในผู้ที่มีปัญหาสิว และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจให้แก่พืชผักพื้นบ้านของไทย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาสูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดพืชในธรรมชาติ
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิวของสารสกัดพืช และผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดพืช
3. ศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ตามสูตรตำรับที่พัฒนาได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ศึกษาพืชท้องถิ่นในภาคอีสานที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ทำให้เกิดสิว ได้แก่ เชื้อ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*
2. การเตรียมสารสกัดติ้ว และวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ
3. การศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อที่ทำให้เกิดสิว เพื่อใช้ในการกำหนดปริมาณที่ใช้ในผลิตภัณฑ์
4. การพัฒนาสูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดติ้ว

5. การศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของตำรับเวชสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดติ้วในหลอดทดลอง
6. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบและถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับผู้ประกอบการ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้สูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีส่วนผสมของสารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว
2. เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์โทนเนอร์
3. ลดการนำเข้าสมุนไพรหรือเวชสำอางราคาแพงจากต่างประเทศ ช่วยให้เศรษฐกิจของชาติมั่นคง และเป็นการเสริมรายได้ให้แก่ประเทศ
4. เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ผลิตผลทางการเกษตร โดยการใช้เทคโนโลยีนาโนและความรู้ทางเภสัชกรรมมาประยุกต์ใช้ เพื่อช่วยวิจัยและพัฒนาองค์ความรู้จากภูมิปัญญาไทยให้เกิดประโยชน์เป็นรูปธรรมมากยิ่งขึ้น

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เกษตรกรในภาคอีสานนิยมปลูกติ้วไว้ เพื่อนำส่วนยอดและดอกซึ่งมีรสชาติเปรี้ยวมารับประทาน สามารถเก็บใบอ่อนได้ตลอดทั้งปีเพื่อนำมาจำหน่ายในท้องตลาดและสร้างรายได้เสริม และคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเบื้องต้นก่อนหน้านี้ พบว่าสารสกัดติ้วมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่เด่น จึงมีแนวคิดในการเพิ่มมูลค่าให้แก่สารสกัดจากใบติ้ว โดยการนำสารสกัดติ้วมาพัฒนาให้เป็นเวชสำอางนาโนที่ช่วยชะลอการแก่และขจัดสิ่งสกปรกบนผิวหนัง เพื่อให้ได้นวัตกรรมอันจะนำไปสู่การขับเคลื่อนเศรษฐกิจการฐานความหลากหลายชีวภาพในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานีต่อไปได้

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

สิว

สิวเกิดจากการอักเสบของต่อมไขมันที่รูขุมขนบนผิวหนัง (Pilosebaceous follicles) ซึ่งสาเหตุของการเกิดสิวมีหลายปัจจัยร่วมกัน ได้แก่ การแบ่งตัวของผิวหนังชั้น stratum corneum ที่มากเกินไป (Hyperkeratinization) เชื้อแบคทีเรีย *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* การผลิตไขมันที่มากเกินและกระบวนการอักเสบของผิวหนัง การรับประทานอาหาร และ พันธุกรรม เป็นต้น

เชื้อจุลชีพที่ทำให้เกิดสิวที่พบได้บ่อย มี 2 ชนิด คือ

Propionibacterium acnes เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง ดำรงชีวิตแบบ Facultative anaerobe พบที่ผิวหนัง โดยเฉพาะบริเวณผิวหน้า เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม ดำรงชีวิตแบบFacultative anaerobe พบมากที่บริเวณผิวหนัง และพบได้ในทางเดินอาหาร สามารถทำให้เกิดสิว และโรคทางผิวหนัง เช่น impetigo, cellulitis, wound infection

พืชที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

ติ้ว

ชื่อสมุนไพร : ติ้วขาว

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cratoxylum formosum* (Jack) Dyer

ชื่อวงศ์ Clusiaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 3-12 เมตร โคนต้นมีหนามเรือนยอดเป็นพุ่มกลม ลำต้นมีน้ำยางเหลือง กิ่งก้านเล็กเรียว กิ่งอ่อนมีขนนุ่มทั่วไป เปลือกสีน้ำตาลแดง แตกล่อนเป็นสะเก็ด เปลือกในสีน้ำตาลแกมเหลือง และมีน้ำยางสีเหลืองปนแดงซึมออกมา

ใบเดี่ยว เรียงตรงข้าม รูปวงรีแกมไข่กลับ หรือรูปขอบขนาน ปลายใบมนหรือแหลม ขอบใบโค้งเรียบ ผิวใบมีขนละเอียดทั้งสองด้าน ใบอ่อนสีชมพูอ่อนถึงแดง เรียบ เป็นมันวาว ในฤดูหนาวจะเห็นเรือนพุ่มทั้งหมดเป็นสีชมพูอ่อน ใบแก่สีเขียวสด เรียบ เกลี้ยง ผิวใบด้านบนเป็นมัน ด้านล่างมีต่อมกระจายทั่วไปใบแก้สีแดงหรือสีแสด

ดอกช่อออกเป็นกระจุกตามกิ่งเหนือรอยแผลใบ กลีบดอกสีขาวอมชมพูอ่อนถึงแดง กลีบดอกบาง มี 5 กลีบ มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ออกตามซอกใบ เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก สั้น สีเหลือง ก้านเกสรเชื่อมติดกันเป็น 3 กลุ่ม เกสรเพศเมีย มีก้านเกสรตัวเมียสีเขียวอ่อนมี 3 อัน มีรังไข่อยู่เหนือวงกลีบ กลีบเลี้ยง มี 5 กลีบ สีเขียวอ่อนปนแดง

ผลแห้ง แตกได้ รูปไข่แกมกระสวย กว้าง 1 เซนติเมตร ยาว 2 เซนติเมตร ผลมีนวลขาวติดตามผิว เมื่อแก่มีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลดำ ผลแบบแคปซูล ปลายแหลม ผิวเรียบและแข็ง แตกออกเป็น 3 แฉก มีเมล็ดสีน้ำตาล ที่ฐานมีกลีบเลี้ยงยังคงอยู่ พบตามป่าเต็งรัง ป่าดิบแล้ง และป่าเบญจพรรณ ออกดอกช่วงเดือนมกราคมถึงพฤษภาคม ยอดอ่อนใช้รับประทานเป็นผักสด

ตำรายาไทย ใช้ ราก ผสมกับหัวแห้วหมู และรากปลาไหลเผือก ต้มน้ำดื่ม วันละ 3 ครั้ง ขับปัสสาวะ แก้ปัสสาวะขัด น้ำยาง ทารอยแตกของส้นเท้า รากและใบ น้ำต้มกินเป็นยาแก้ปวดท้อง ต้น ยางจากเปลือกต้นทาแก้คัน น้ำต้มเปลือกต้น กินแก้ธาตุพิการ เปลือกและใบ ตำผสมกับน้ำมันมะพร้าว ทาแก้โรคผิวหนังบางชนิด

ผักในสกุลติ้ว (*Cratoxylum Blume*) ถือได้ว่าเป็นผักพื้นบ้านที่ค่อนข้างเป็นที่รู้จักกันดีสำหรับชาวอุบลราชธานีและอีสาน โดยนิยมนำดอกหรือยอดอ่อนมาใช้ปรุงรสอาหารเพื่อให้เกิดรสเปรี้ยว มีรายงานว่าสารสกัดจากเอทานอลของใบติ้ว มีความเป็นพิษต่ำมากในหนู โดยมีค่า LD_{50} มากกว่า 32 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นสารสกัดที่มีความปลอดภัยสูง องค์ประกอบทางเคมีที่พบในใบติ้วคือ chlorogenic acid ซึ่งพบในปริมาณสูงถึงร้อยละ 60 ของสารเคมีทั้งหมด รองลงมาคือ อนุพันธ์ของ dicaffeoylquinic acid และ ferulic acid จากโครงสร้างทางเคมีจะพบว่า chlorogenic acid เป็นสารกลุ่มเอสเทอร์ที่เกิดจาก cinnamic acids และ quinic acid เรียกตามชื่อ IUPAC ว่า 5-O-caffeoylquinic acid หรือ 3-CQA สาร chlorogenic acid เป็นสารประกอบโพลีฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง นอกจากนี้ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า สารสกัดติ้วมีคุณสมบัติในการต้านการเจริญของจุลชีพที่ทำให้เกิดสิวได้

สารละลายโทนเนอร์ (Toner solution) เป็นเครื่องสำอางที่มีลักษณะเป็นโลชันใส ใช้สำหรับทาบนใบหน้าหลังการล้างหน้าแล้วเช็ดออกด้วยสำลี มีคุณสมบัติในการช่วยกระชับรูขุมขนที่เปิดกว้างขณะล้างหน้า ป้องกันสิ่งสกปรกอุดตันรูขุมขน ช่วยขจัดสิ่งสกปรกที่ละลายน้ำที่อาจตกค้างหลังการล้างหน้า ผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ทั่วไปมีส่วนประกอบหลัก ได้แก่ Astringent เช่น alum, zinc phenol sulfonate และ witch hazel มีฤทธิ์กระชับรูขุมขน ป้องกันสิ่งสกปรกอุดตันในรูขุมขน Humectant เช่น glycerin, sorbitol และ propylene glycol ช่วยดึงความชุ่มชื้นเข้าสู่ชั้นผิว ช่วยให้ผิวไม่แห้งตึง ลดสภาวะแห้งจากการล้างหน้า และมีส่วนผสมของ Alcohol ช่วยกำจัดไขมัน ชำระล้างความมันที่หลงเหลือจากการล้างหน้า ทำให้เกิดความรู้สึกเย็นสบายหลังใช้ และช่วยยับยั้งจุลชีพอันเป็นสาเหตุของการเกิดสิว แต่อาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหน้าได้ แนวโน้มของโทนเนอร์ที่มีจำหน่ายในปัจจุบันยังมีการเพิ่มสารสกัดจากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการบำรุงผิวพรรณ แต่ส่วนมากจะมุ่งเน้นเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น และลดเลือนจุดด่างดำ จึงมีความสนใจนำพืชในท้องถิ่นของประเทศไทย มาทดสอบฤทธิ์ในการยังยั้งเชื้อจุลชีพที่ทำให้เกิดสิว เพื่อมาพัฒนาเป็นสูตรตำรับโทนเนอร์เพื่อเป็นทางเลือกในผู้ที่มีปัญหาสิว

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

รูปแบบงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นลักษณะการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental design) เพื่อศึกษาประสิทธิการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Propionibacterium acnes* ของสารสกัดติ้ว เม็ก และบัวบก และนำสารสกัดพืชที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อที่ดีที่สุดมาพัฒนาเป็นตำรับโทนเนอร์ที่มีความคงตัว สามารถต้านเชื้อลจุลชีพที่เป็นสาเหตุการเกิดสิวได้

สารสกัดและสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. Ethyl alcohol anhydrous for HPLC (Carlo Erba Reagents, Halmar (ประเทศไทย จำกัด))
2. Hexane
3. Ethyl acetate
4. Glycerin
5. Propylene glycol
6. Sorbital
7. Tetracycline
8. Ampicillin
9. 0.1 N NaOH
10. 0.9% NaCl solution
11. 0.1% Phosphoric acid
12. Acetronitrile
13. 5-o-caffeoylquinic acid
14. อาหารเลี้ยงเชื้อ
    a. Nutrient broth
    b. Nutrient agar

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

    1) เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator)
    2) เครื่อง Freeze dryer
    3) เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)
    4) เครื่องมือทำการทดลอง Hen's Egg test on the Chorioallantoic membrane (HET-CAM)
    5) เครื่อง Hot air oven
    6) เครื่องบ่มเชื้อ (incubator)
    7) เครื่อง Autoclave
    8) ตู้ Laminar air flow

2. อุปกรณ์

    1) Micropipette ขนาด 10-50 µL และ 100-1000 µL
    2) ขวดเก็บสารแบบมีฝาปิด
    3) Cuvette
    4) Cotton swab
    5) Forceps
    6) Inoculating loop และ Inoculating needle
    7) Stirring rod
    8) Dropper
    9) Round bottom flask
    10) Receiving flask
    11) Eppendorf tube
    12) Cork borer
    13) Seperatory funnel
    14) Tube
    15) Petridish

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

16) Percolation flask

17) Beaker ขนาด 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 ml

18) Volumetri flask ขนาด 500 และ 1000 ml

19) Cylinder ขนาด 25, 50 และ 1000 ml

ขั้นตอนการวิจัย

การเตรียมสารละลายโทนเนอร์จากสารสกัดติ้ว

1. การเตรียมสารสกัดพืช

1.1 นำตัวอย่างใบติ้วมาอบจนแห้งสนิทด้วยเตาอบ

1.2 บดลดขนาด เก็บในที่แห้งและปราศจากความชื้น

1.3 ชั่งผงพืชแห้งที่บดละเอียด 150 g หมักด้วย 95% Ethanol ปริมาตร 200 ml ในภาชนะทึบแสง

1.4 เขย่าสารสกัดเป็นครั้งคราว สกัดพืชเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

1.5 กรองสารสกัดด้วยกระดาษ Whatman เบอร์1

1.6 ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50°C ความดัน 150 mbar

1.7 นำสารสกัดที่ระเหยแห้งมาละลายด้วยน้ำในอัตราส่วนสารสกัด 330 g : น้ำ 800 ml

1.8 เติม hexane ลงไป Partition จนชั้น Hexane ใส

1.9 นำชั้นน้ำมาเติม ethyl acetate ลงไป partition จนใส

1.10 ระเหยแห้งชั้นน้ำด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50°C ความดัน 150 mbar

1.11 นำไปแช่ช่องแช่แข็งเพื่อให้ตกตะกอน จากนั้นทำการระเหยแห้งด้วย freeze dryer

1.12 นำสารสกัดแห้งเก็บในขวดดูดความชื้น

1.13 คำนวณหาร้อยละของผลผลิต

2. ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดพืช

2.1 การเตรียมเชื้อจุลชีพ

2.1.1 เพาะเชื้อ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Nutrient agar) *และ P. acne* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI (Brain heart infusion) agar ที่อุณภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.2 ถ่ายเชื้อ *S. aureus* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) *และ P. acne* ลงในอาหาร

เลี้ยงเชื้อ BHI broth เพาะที่อุณภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.3 ปรับเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No.0.5 ($5x10^5$ cfu/ml) ที่ความยาวคลื่น 625 nm

2.2 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดพืช

2.2.1 swap เชื้อ *S. aureus* ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA *และ P. acne* ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่เตรียมไว้

2.2.2 วาง dish ที่มีสารสกัดพืชทั้ง 3 ชนิดความเข้มข้น 200 mg/ ml และ Tetracycline และ Ampicillin เป็นตัวควบคุม

2.2.3 นำ plate ทั้งหมดไปเพาะเชื้อในเครื่องบ่นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.4 วัดความกว้างของ inhibition zone ของแต่ละสาร

2.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum inhibitory concentration: MIC) โดยวิธี broth dilution method

2.3.1 เตรียมหลอดทดลองทั้งหมด 5 หลอดโดยเขียนเลขระบุ

2.3.2 ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth และ BHI broth ปริมาตร 0.5 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.3.3 ดูดสารสกัดพืชความเข้มข้น 400 mg/ml ปริมาตร 0.5 ml ลงในหลอดทดลองที่ 1 เขย่าให้เข้ากัน

2.3.4 ดูดสารจากหลอดทดลองที่ 1 มา 0.5 ml แล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่ 2 เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นทำต่อไปเรื่อย ๆ ในหลอดที่ 3 และ 4 โดยในหลอดที่ 5 ให้ดูดสารทิ้งจำนวน 0.5 ml

2.3.5 เติมเชื้อจุลชีพที่เตรียมไว้เท่า McFarland No.0.5 ปริมาตร 0.5 ml ลงในทุกหลอดทดลอง โดย *S. aureus* เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth *และ P. acne* เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth

2.3.6 เตรียม positive control คือยา Tetracycline และเตรียม negative control คือ น้ำ

2.3.7 นำหลอดทดลองทั้งหมดไปเพาะเชื้อในเครื่องบ่นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.8 สังเกตหลอดที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดหลอดแรกที่ใส โดยความเข้มข้นนั้นจะเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพได้

2.4 การหาความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum bactericidal concentration, MBC) โดยวิธี Steak plate method

2.4.1 นำ cotton จุ่มลงในหลอดที่ใสทุกหลอดจากการทดลองที่ 2.3 แล้วนำมา swab ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ BHI agar

2.3.3 นำ plate ทั้งหมดไปเพาะเชื้อในเครื่องบ่นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.4 สังกต plate ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุด plate แรกที่ไม่มีเชื้อจุลชีพขึ้น โดยความเข้นข้นนั้นจะเป็นความเข้นข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลชีพได้

3. การเตรียมสูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากพืชเป็นส่วนประกอบ

สูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วเป็นส่วนประกอบ ดังตางรางที่ 1

ตารางที่ 1 สูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้ว

ส่วนประกอบ	ประโยชน์ในตำรับ (หน้าที่ในตำรับ)	ตำรับที่ 1	ตำรับที่ 2
สารสกัดจากติ้ว ความเข้มข้น 500 mg/m;	Active ingredient	1 ml	2 ml
Glycerin	Humectant	0.3 ml	0.3 ml
Propylene glycol	Humectant	0.15 ml	0.15 ml
Deionized water	Solvent	qs to 5 ml	qs to 5 ml

4. การทดสอบความคงตัวของตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้ว โดยวิธี freeze thaw cycle

4.1 นำตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากพืชไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 จากนั้นนำตำรับโทนเนอร์ในหัวข้อ 4.1 ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยนับเป็น 1 รอบ

4.3 ทำทั้งหมด 6 รอบ แล้วประเมินดูความคงตัวทางกายภาพ ได้แก่ความใสและสี และ ความคงตัวทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณสาร 5-o-caffeoylquinic acid ด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟฟีประสิทธิภาพสูง

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากพืชโดย agar well diffusion

5.1 swap เชื้อ *S. aureus* ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA *และ P. acne* ลงบนอาหาร เลี้ยงเชื้อ BHI agar

5.2 เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย cork borer จำนวน 4 หลุม

5.3 เติมโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้วความเข้มข้น 50 และ 100 mg/ml ก่อนและหลังการทำ freeze thaw cycle, โทนเนอร์ที่ไม่มีสารสกัดจากติ้ว ก่อนและหลังทำ freeze thaw cycleและ ยา tetracycline ลงในแต่ละหลุม

5.4 นำ plate ทั้งหมดไปเพาะเชื้อในเครื่องบ่นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

5.5 วัดความกว้างของ inhibition zone ของแต่ละสาร

6. การทดสอบการระคายเคืองของตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วด้วยวิธี HET-CAM

6.1 ฟัก (incubate) ไข่ไก่ในสภาวะที่เหมาะสม (37.8 ± 0.2°C และความชื้นสัมพัทธ์ 58±2%) หมุนพลิกไข่ 15 วินาทีทุก 2 ชั่วโมง ทุกวันเป็นเวลา 9 วัน

6.2 เลือกไข่ที่มีน้ำหนัก 50 - 60 g มาส่องภายใต้แสงเพื่อหา air cell

6.3 เจาะเปลือกไข่ด้านที่มี air cell ออก ใช้ปากคีบเยื่อหุ้มด้านในออก

6.4 บันทึกลักษณะของหลอดเลือดในไข่

6.5 หยดสารทดสอบ ได้แก่โทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วความเข้มข้น 50 และ 100 mg/ml, สารสกัดติ้วความเข้มข้น 100 mg/ml, โทนเนอร์ที่ไม่มีสารสกัดติ้ว โดยมี 0.1 N NaOH และ 0.9% Normal saline solution เป็นตัวควบคุม

6.6 บันทึกลักษณะของหลอดเลือดในไข่ทุก 30 , 120 และ 300 วินาที จับเวลาการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด เช่น การมีเลือดออกจากหลอดเลือด (Vascular hemorrhage) การแตกออกของหลอดเลือด (vascular lysis) หรือเกิดการเสียสภาพ ตกตะกอนของโปรตีน (Coagulation) จดบันทึกลักษณะเป็นคะแนนความระคายเคือง (irritation score) ที่เวลาต่าง ๆ และแปลผล

7. การทดสอบหาปริมาณสารสำคัญของติ้วโดย HPLC assay

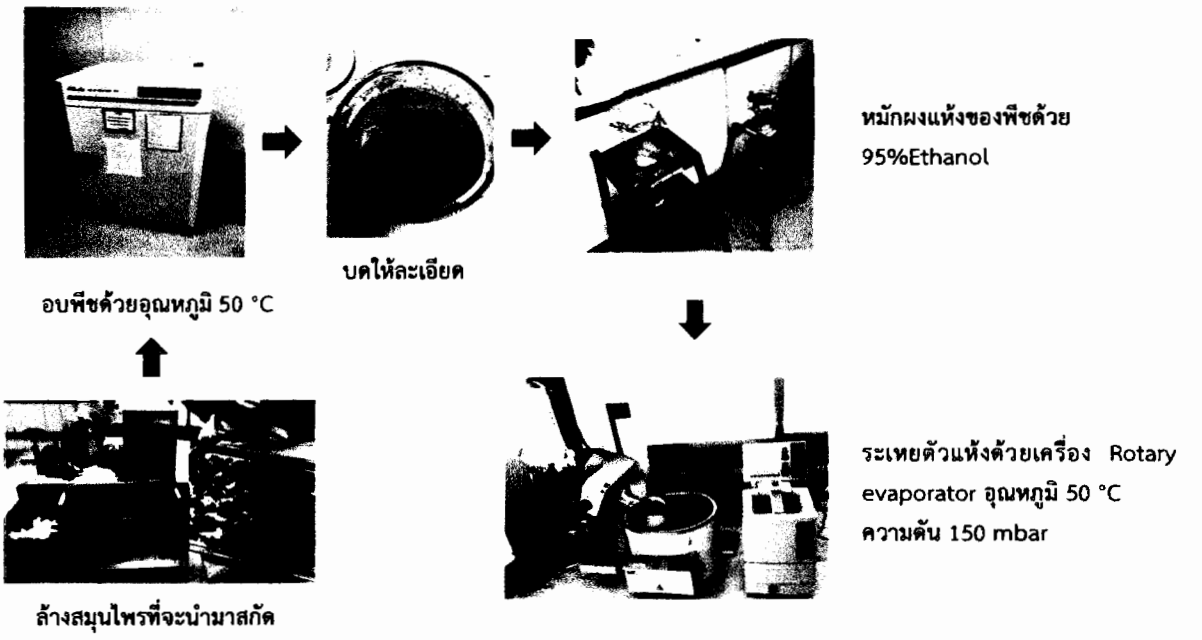
ตรวจสอบปริมาณสาร 5-o-caffeoylquinic acid ในโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วความเข้มข้น 50 และ 100 mg/ml ทั้งก่อนและหลังการทดสอบความคงตัว, สารสกัดติ้วในชั้นน้ำ และสารสกัดติ้วในชั้น Ethanol ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้สภาวะที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วยสัดส่วนวัตภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ 0.1 formic acid in water และ acetronitrile อัตราการไหลของวัตภาคเคลื่อนที่ (flow rate) 1 mL/min ตัวอย่าง 1 ml ถูกฉีดใน guard-column ขนาด 4.0 × 2.0 มม. ซึ่งเชื่อมกับคอลัมน์ที่ใช้ คือ C_{18} Luna reverse-phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 mm particle size) และวิเคราะห์ผลเป็นความเข้มข้นของ 5-o-caffeoylquinic acid

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

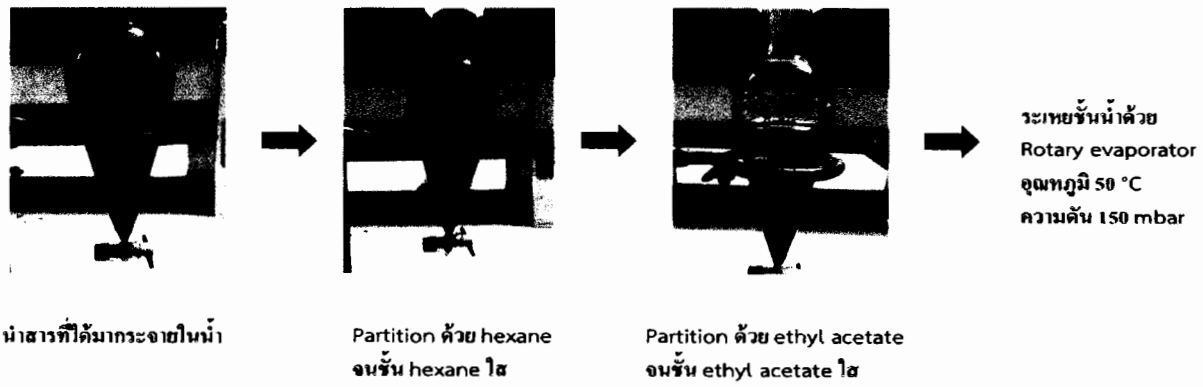
4.1 การสกัดพืช

นำติ้วไปอบแห้ง และบด จากนั้นนำพืชไปหมักด้วย 95% Ethanol แล้วนำไประเหยแห้งด้วย rotary evaporator จากนั้นนำไป partition ด้วย hexane และ ethanol แล้วนำไประเหยแห้งด้วย freeze dryer แล้วเก็บสารสกัดแห้ง แสดงดังรูปที่ 1 และคำนวณหาร้อยละของผลผลิต แสดงดังตารางที่ 2

1. ขั้นตอนการเตรียมพืช



2. ขั้นตอนการกำจัดสีด้วยวิธี partition



3. เก็บสารสกัดพืชแห้ง

นำสารที่ได้มา freeze dry **เก็บสารแห้งในขวดดูดความชื้น**

รูปที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดพืช

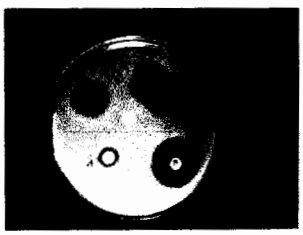
ตารางที่ 2 ผลการสกัดติ้ว

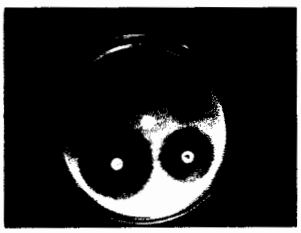
ปริมาณพืช(g)	ปริมาณสารสกัด(g)	%yield
150	6.76	4.51

4.2 ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดพืช

4.2.1 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อของพืช

เมื่อนำสารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 200 mg/ml ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งต่อเชื้อ *P.acnes* และ *S.aureus* ด้วยวิธี agar disc diffusion โดยใช้ Tetracycline และ Ampicillin เป็นตัวควบคุม หลังบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2 และตารางที่ 3





ทดสอบในเชื้อ *P. acnes* **ทดสอบในเชื้อ *S. aureus***

รูปที่ 2 ผลการตานเชื้อแบคทีเรีย *P.acnes* และ *S.aureus* ของสารสกัดจากเม็ก ใบบัวบก และ ติ้ว เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Tetracycline และ Ampicillin

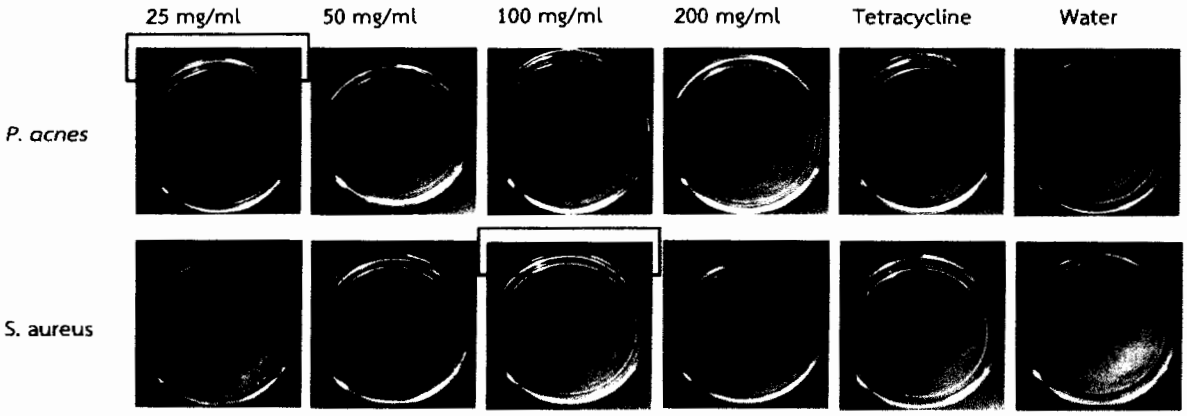
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบหาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของพืชด้วยวิธี agar disc diffusion

ตัวอย่าง	**ขนาดวงใสของการยับยั้งการเจริญ (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, เซนติเมตร)**	
	P.acnes	*S.aureus*
Tetracycline	2.37 ± 0.21	2.47 ± 0.06
Ampicillin	0.47 ± 0.06	3.87± 0.11
ติ้ว	1.07 ± 0.06	1.27± 0.06

จากตารางที่ 3 สารสกัดติ้วสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ได้ดี เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน จึงนำสารสกัดติ้วไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

4.2.2 ผลการหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC)

เมื่อนำสารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 200, 100, 50, 25, 12.5 mg/ml ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *P.acne และ S.aureus* ด้วยวิธี broth dillution method (แสดงดังรูปที่ 3) โดยใช้ Tetracyline 100 mg/ml และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม หลังบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4



MIC ต่อ P. acnes ; 25 mg/ml
MIC ต่อ S. aureus ; 100 mg/ml

รูปที่ 3 ผลการยับยั้งเชื้อ *P.acne* และ *S.aureus* ด้วยวิธี broth dillution method

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดติ้วด้วยวิธี broth dillution method

ตัวอย่าง	ความขุ่น	
	P.acnes	*S.aureus*
สารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 12.5 mg/ml	+	+
สารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 25 mg/ml	-	-
สารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml	-	-
สารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 100 mg/ml	-	-
สารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 200 mg/ml	-	-
Tetracycline 100 mg/ml (positive control)	-	-
น้ำกลั่น	+	+

หมายเหตุ + หมายถึงมีความขุ่นหรือมีเชื้อขึ้น

จากตารางที่ 4 สารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดไม่เกิดความขุ่นต่อเชื้อ *P.acnes* คือ 25 mg/ml และมีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ไม่เกิดความขุ่นต่อเชื้อ *S.aureus* คือ 25 mg/ml ดังนั้นค่า MIC ของสารสกัดต่อเชื้อทั้งสองชนิด มีค่าเท่ากับ 25 mg/ml

4.2.3 ผลการหาค่า Minimum bactericidal concentration (MBC)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดติ้วที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ P.acnes และ S.aureus ได้จากการนำสารตัวอย่างติ้ว ที่มีความเข้มข้น 25, 50, 100, 200 mg/ml ไปทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อจุลชีพด้วยวิธี Streak plate method โดยใช้ Tetracyline 100 mg/ml และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม หลังบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลชีพของสารสกัดติ้วด้วยวิธี streak plate method

ตัวอย่าง	ความขุ่น	
	P.acnes	*S.aureus*
สารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 25 mg/ml	-	+
สารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 50 mg/ml	-	+
สารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 100 mg/ml	-	-
สารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 200 mg/ml	-	-
Tetracycline 100 mg/ml (positive control)	-	-
น้ำกลั่น	+	+

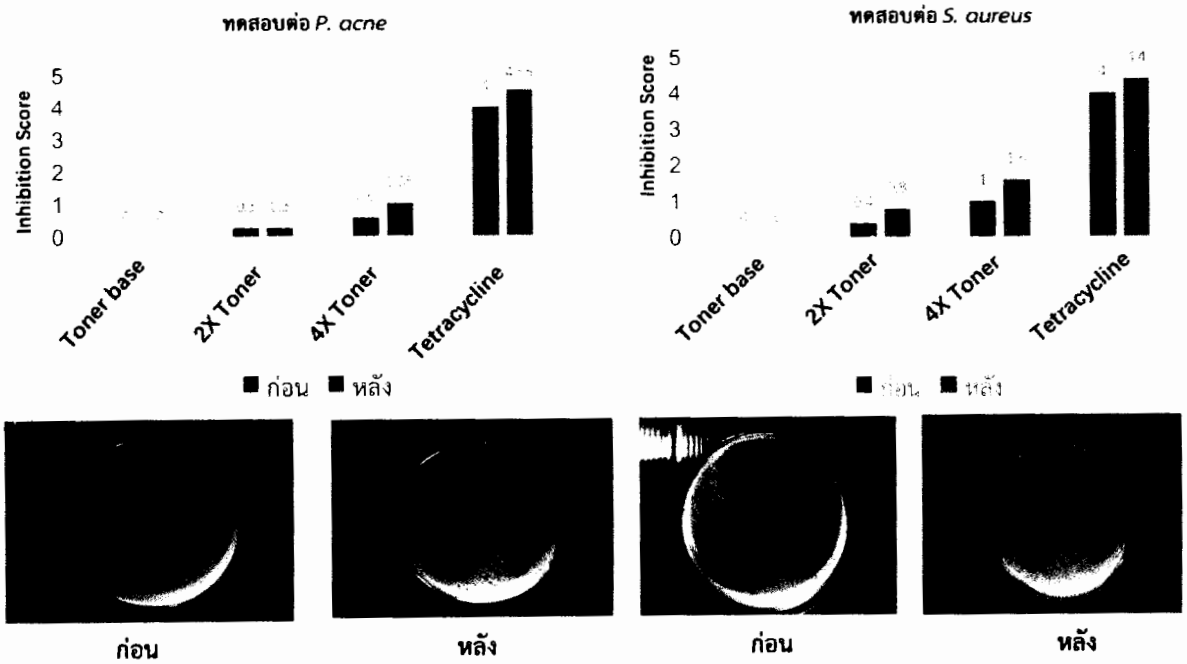
หมายเหตุ + หมายถึงมีความขุ่นหรือมีเชื้อขึ้น

จากตารางที่ 5 สารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ไม่พบเชื้อขึ้นต่อเชื้อ *P.acnes* คือ 25 mg/ml และความความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีเชื้อขึ้นต่อ *S.aureus* คือ 100 mg/ml ดังนั้น สารสกัดติ้วจึงมีค่า MBC ต่อเชื้อ *P.acnes* และ *S.aureus* เท่ากับ 25 และ 100 mg/ml ตามลำดับ

4.3 การเตรียมสูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากพืชเป็นส่วนประกอบ

4.3.1 ผลทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้วโดย agar well diffusion

เมื่อนำโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 mg/ml ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งต่อเชื้อ *P.acnes* และ *S.aureus* ด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งจะมีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพก่อนการทำ freeze thaw cycle และหลังการทำ freeze thaw โดยใช้ Tetracycline และ โทนเนอร์ที่ไม่มีสารสกัดเป็นตัวควบคุม cycle หลังบ่มเพาะที่อุณหภูมิที่ 37 °C ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 พบว่าสารสกัดโทนเนอร์มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P.acnes* และ *S.aureus* ไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 4 กราฟและรูปภาพแสดงบริเวณยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) เชื้อ *P. ances* และ *S.aureus* ด้วยวิธี Agar disc diffusion techniques ของโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 mg/ml เมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะ Tetracycline

4.3.2 การทดสอบความคงตัวของตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้ว

เมื่อนำโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 mg/ml ไปทดสอบความคงตัวในสภาพเร่งด้วยวิธี freeze thaw cycle จำนวน 6 รอบ โดยจะมีการทดสอบความคงตัวทางกายภาพ ได้แก่ ความใสและสี และการทดสอบความคงตัวทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6

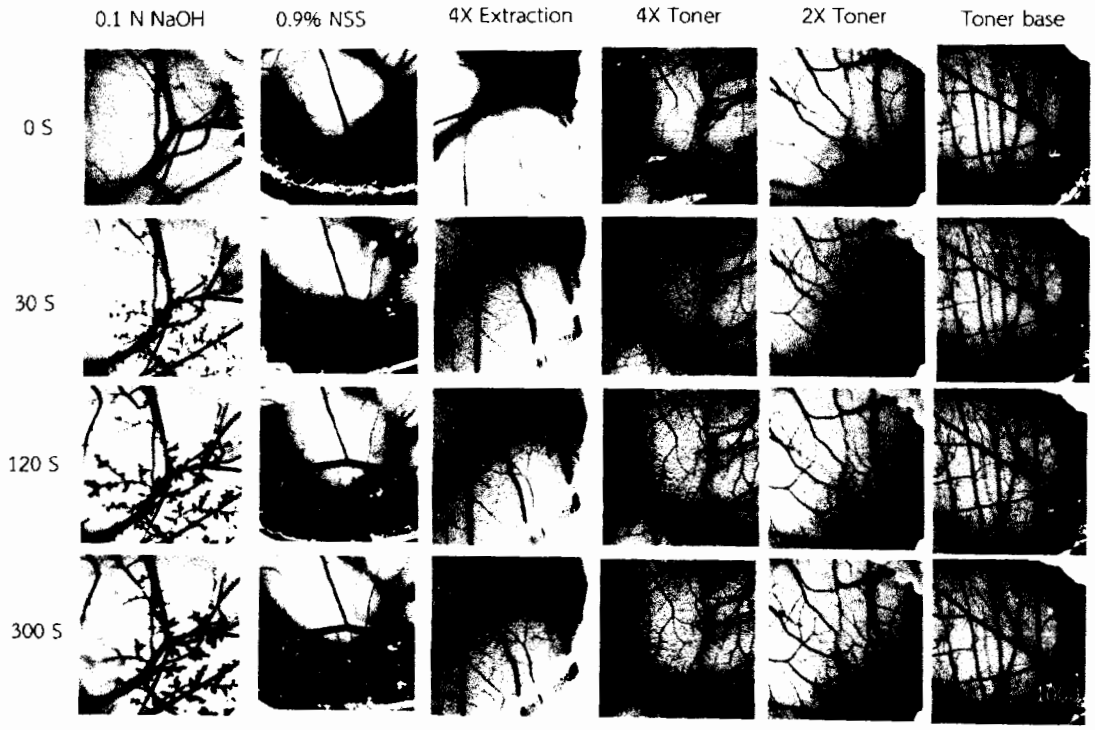
ตารางที่ 6 ผลการทดสอบความคงตัวของตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้ว

Toner	ก่อน			หลัง		
	pH	ความใส	สี	pH	ความใส	สี
100 mg/ml	3	ใส	น้ำตาล	3	ใส	น้ำตาล
50 mg/ml	3	ใส	น้ำตาล	3	ใส	น้ำตาล
เปล่า	5	ใส	ใส	6	ใส	ใส

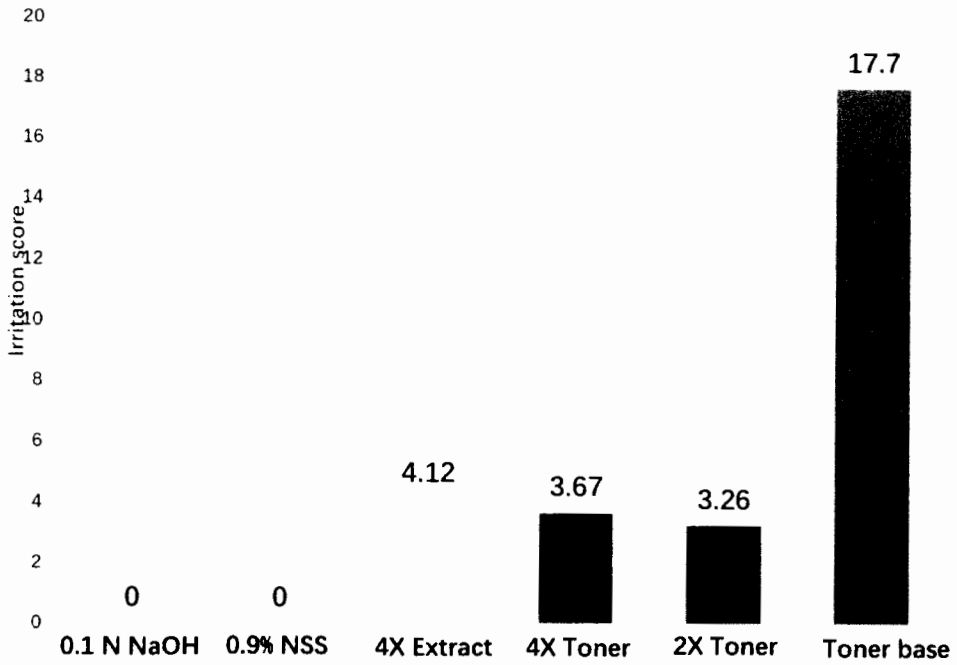
จากตารางที่ 6 เมื่อทดสอบความคงตัวของตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้วและโทนเนอร์เปล่า พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแลงทั้งความคงตัวทางกายภาพ ได้แก่ ความใส สี และความคงตัวทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง แสดงว่าให้เห็นว่าโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้วมีความคงตัวทั้งทางกายภาพและทางเคมีเมื่อทดสอบด้วย freeze thaw cycle

4.3.3 การทดสอบการระคายเคืองของตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วด้วยวิธี HET-CAM

เมื่อนำโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 mg/ml ไปทดสอบการระคายเคืองกับไข่ไก่ ที่มีน้ำหนัก 50 - 60 g แล้วตรวจสอบการมีเลือดออกของหลอดเลือด การขาดของหลอดเลือด และการจับตัวกันของโปรตีนที่หลอดเลือด ซึ่งมีการบันทึกภาพทุก 30, 120 และ 300 วินาที โดยมี 0.1 N NaOH และ 0.9% Normal saline solution เป็นตัวควบคุม แสดงดังรูปที่ 5 และรายงานผลการระคายเคืองเป็นค่า IR (Irritation score) แสดงดังรูปที่ 6 จากการการทดสอบความระคายเคืองพบว่า ตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้ว มีค่า irritation score อยู่ระหว่าง 1-4.25 ซึ่งจัดเป็น weak irritate และพบว่า การทดสอบโทนเนอร์ที่ความเข้มข้นเป็น 4 เท่าของค่า MIC ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่มีความสามารถต้านเชื้อจุลชีพได้ดี และยังคงให้ผลเป็น weakly irritant จากผลการทดลองนี้ที่ความเข้มข้นดังกล่าว มีความเหมาะสมต่อการใช้บนผิวหน้า สามารถพัฒนาเป็นสูตรตำรับโทนเนอร์ที่ความเข้มข้นได้ 4 เท่าของค่า MIC หรือ 100 mg/ml เพื่อได้ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพที่มีประสิทธิภาพ



รูปที่ 5 ทดสอบการระคายเคืองกับไข่ไก่ ที่มีน้ำหนัก 50 - 60 g ที่เวลา ทุก 30, 120 และ 300 วินาที

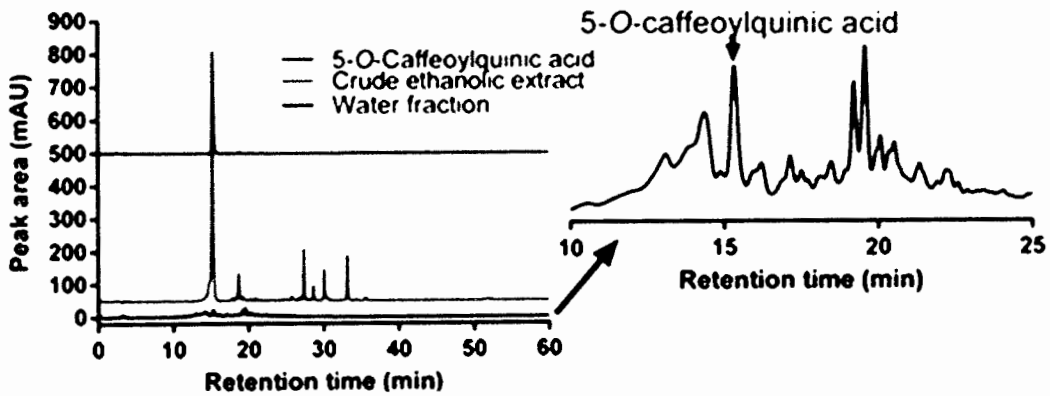


รูปที่ 6 ผลการทดสอบการระคายเคืองของตำรับโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วด้วยวิธี HET-CAM

4.4 การทดสอบหาปริมาณสารสำคัญของสารสกัดติ้วโดย HPLC assay

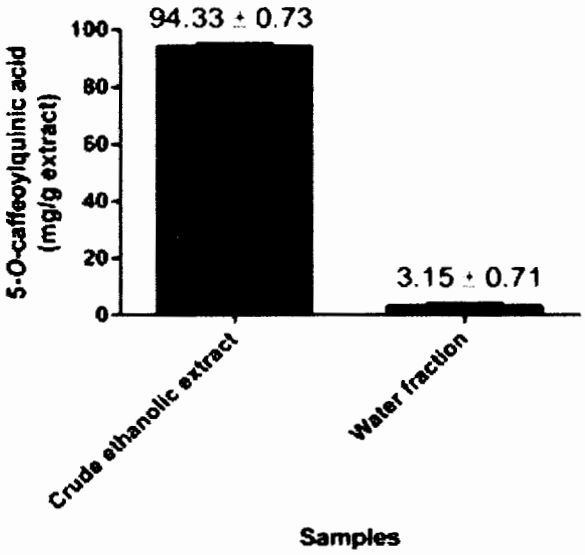
4.4.1 การทดสอบหาปริมาณสารสำคัญของติ้วในสารสกัดติ้ว

เมื่อนำสารสกัดติ้วที่สกัดด้วย ethanol และสารสกัดติ้วที่ได้ทำการ partition ด้วย hexane และ ethyl acetate มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยมี 5-o-caffeoylquinic acid เป็นตัวควบคุม พบว่า ทั้งสารสกัดติ้วที่สกัดด้วย ethanol และสารสกัดติ้วที่ได้ทำการ partition ด้วย hexane และ ethyl acetate มีสาร 5-o-caffeoylquinic acid เป็นองค์ประกอบ ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 ผลการทดสอบ HPLC ของสารสกัดติ้วที่สกัดด้วย ethanol และสารสกัดติ้วที่ได้ทำการ partition

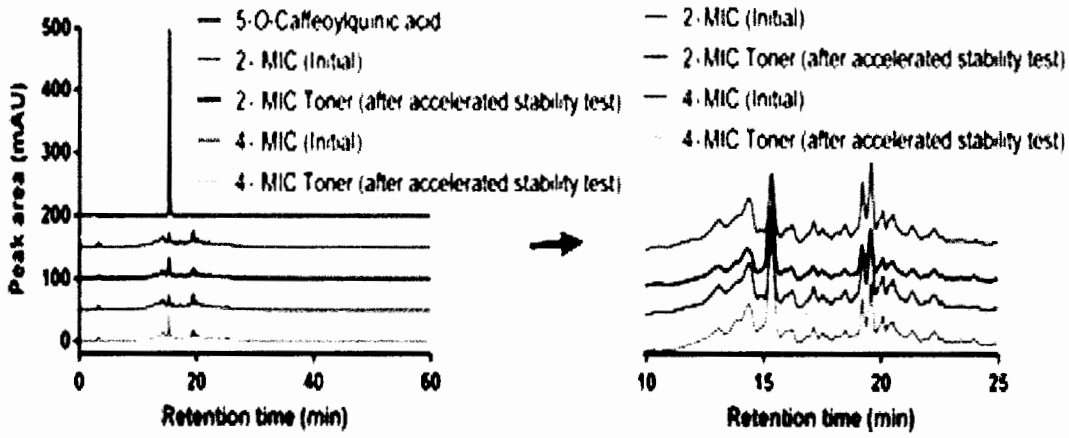
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของสาร 5-o-caffeoylquinic acid ในสารสกัดติ้วที่สกัดด้วย ethanol และสารสกัดติ้วที่ได้ทำการ partition ด้วย hexane และ ethyl acetate พบว่าสารสกัดติ้วที่สกัดด้วย ethanol พบปริมาณของ 5-o-caffeoylquinic acid เท่ากับ 94.33 mg/g ส่วนสารสกัดติ้วที่ได้ทำการ partition พบปริมาณของ 5-o-caffeoylquinic acid เท่ากับ 3.15 mg/g แสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 ปริมาณของสาร 5-o-caffeoylquinic acid ในสารสกัดติ้วที่สกัดด้วย ethanol และสารสกัดติ้วที่ได้ทำการ partition

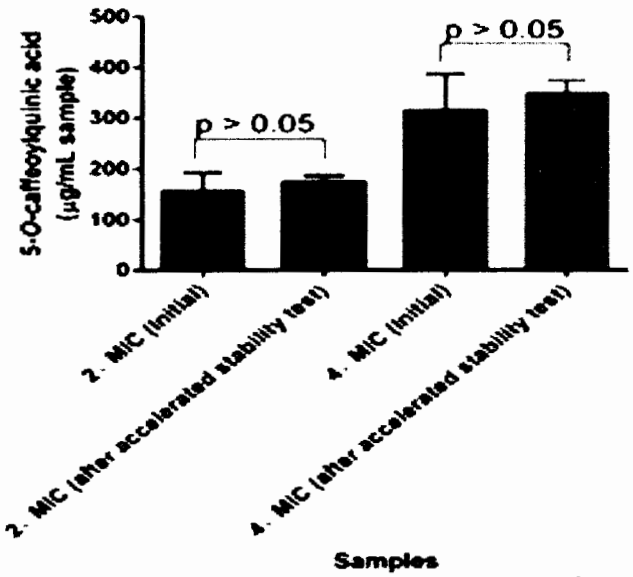
4.4.2 การทดสอบหาปริมาณสารสำคัญของติ้วในโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้ว

เมื่อนำโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้วที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 mg/l ทั้งก่อนและหลังการทำ freeze thaw cycle มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยมี 5-o-caffeoylquinic acid เป็นตัวควบคุม พบว่าทั้งโทนเนอร์ที่มีสารสกัดติ้วที่ความเข้มข้น 50 และ 100 mg/ml ทั้งก่อนและหลังการทำ freeze thaw cycle พบสาร 5-o-caffeoylquinic acid อยู่ แสดงดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 ผลการวิเคราะห์ 5-o-caffeoylquinic acid ของสารสกัดติ้วด้วยเทคนิคโครโมโทรกราฟฟีประสิทธิภาพสูง ของโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้วที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 mg/ml ทั้งก่อนและหลังการทำ freeze thaw cycle

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร 5-o-caffeoylquinic acid ในโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้วที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 mg/L ทั้งก่อนและหลังการทำ freeze thaw cycle พบว่ามีปริมาณของสาร 5-o-caffeoylquinic acid ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าสาร 5-o-caffeoylquinic acid มีความคงตัวหลังการทำ freeze thaw cycle แสดงดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 ปริมาณของสาร 5-o-caffeoylquinic acid ของโทนเนอร์ที่มีสารสกัดจากติ้วที่มีความเข้มข้น 50 และ 100 mg/ml ทั้งก่อนและหลังการทำ freeze thaw cycle

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การวิจัยเรื่องการพัฒนาผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ที่มีส่วนประกอบจากสารสกัดสมุนไพรติ้ว สำหรับผิวที่เป็นสิวง่ายสามารถสรุปผลการวิจัยดังนี้

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพอันเป็นสาเหตุของการเกิดสิว ของพืชท้องถิ่นในประเทศไทย 3 ชนิด ได้แก่ เม็ก *(Syzygium gratum)* ติ้ว (*Cratoxylum formosum)* และบัวบก *(Cratoxylum formosum)* พบว่า ติ้วมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลชีพอันเป็นสาเหตุของการเกิดสิวได้ดีที่สุดเมื่อทดสอบโดย Disc diffusion method มี inhibition zone ต่อ *Staphylococcus aureus* สูงที่สุดเฉลี่ย 1.27 cm และมี inhibition zone ต่อ *Propionibacterium acnes* เฉลี่ย 1.07 cm ในขณะที่เม็ก และบัวบก ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes*

ติ้ว (*Cratoxylum formosum*) มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ที่ MIC 25 mg/ml สูตรตำรับโทนเนอร์ที่มีความคงตัวใช้ Glycerin, Propylene glycol เป็นสารเพิ่มความชุ่มชื้น และ Deionized water เป็นตัวทำละลาย ซึ่งเมื่อนำสารสกัดติ้วมาเติมในตำรับ ที่ความเข้มข้น เป็น 2 เท่า และ 4 เท่าของค่า MIC (50 mg/ml และ 100 mg/ml ตามลำดับ) โทนเนอร์ทั้งสองตำรับให้ผลไม่แตกต่างกัน ทั้งในด้านความคงตัวทางกายภาพ ความคงตัวทางเคมี และ การระคายเคือง ดังนั้น สามารถเติมสารสกัดพืชได้ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 2 เท่า ถึง 4 เท่าของค่า MIC เพื่อให้ได้ฤทธิ์ในการต้านจุลชีพที่มีประสิทธิภาพ

1. แนวทางการพัฒนางานวิจัย

1.1 ด้านการพัฒนาสูตรตำรับ

1.1.1 เติมสารถนอม (Preservative) เช่น Phenoxyethanol 0.1-0.5% ของตำรับ

1.1.2 เติมสารแต่งกลิ่น(Fragrance) เพื่อกลบกลิ่นของสารสกัดพืช

1.1.3 เติมสารที่ช่วยทำให้เกิดความรู้สึกเย็น เช่น Menthol

1.1.4 เติม Surfactant เพื่อช่วยละลายสิ่งสกปรกกลุ่ม lipophilic ที่หลงเหลือบนใบหน้า

1.1.5 เพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์โดยการเติมสารสกัดจากพืชพื้นบ้านที่มีอื่นๆ เช่น เม็ก บัวบก

1.2 ด้านการทดลอง

1.2.1 ควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของพืชทดสอบ เพื่อเพิ่มคุณค่าของผลิตภัณฑ์

1.2.2 ทำการสกัดนำสารบริสุทธิ์ที่เป็นสารออกฤทธิ์ (Partial purified) มาพัฒนาในตำรับเพื่อแก้ปัญหาสี กลิ่น และได้สารในความเข้มข้นที่สูง

1.2.3 ทำการศึกษาความชุ่มชื้นบนผิวหนัง

1.2.4 ทดสอบความพึงพอใจหลังการใช้งาน ในอาสาสมัคร

1.2.5 ทำสอบความคงตัวในระยะยาว (Long Term Stability Test)

1.2.6 ทดลองนำพืชทดสอบ ตั้งตำรับในรูปแบบอื่นๆ เช่น เจลแต้มสิว แผ่นแปะลดสิว

2. ข้อจำกัดในงานวิจัย

2.1 พืชทดสอบเป็นพืชตามฤดูกาล ทำให้สามารถสกัดพืชได้ในช่วงเวลาที่จำกัด

2.2 ปริมาณสารที่สกัดได้ขึ้นอยู่กับแหล่งเพาะปลูก ซึ่งอาจให้ผลการทดสอบที่แตกต่าง . กันในแต่ละพื้นที่

2.3 พืชทดสอบเป็นพืชพื้นบ้าน ไม่มีสารสกัดสำเร็จรูปจำหน่าย ทำให้ต้องสกัดพืชเอง เป็นผลให้ใช้เวลาในการทดสอบมากขึ้น

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เอกสารอ้างอิง

1. Bancha Y, Marlene M, Adelheid B. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Cratoxylum formosum ssp.* formosum leaves using central composite design and evaluation of its protective ability against H_2O_2-induced cell death. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2014; 7(Suppl 1): S497-S505

2. Bettromi, et al. Antiinflamatory, antimicrobial, comedolytic effects of a topical plant complex treatment in acne vulgaris: a clinical trial. cosmetral. 2001; 15:11-20

3. Bussaman P, Rattanasena P, Namsena P. Antimicrobial activities of some local plants of Thailand against acneproducing bacteria. Food and Applied Bioscience Journal. 2015;3(3):184–192

4. Chomnawang MT, Surassamo S, Nukoolkarn VS, Gritsanapan W. Antimicrobial effect of Thai medical plants against acne- inducing bacteria. Journal of ethnopharmacology. 2005;101:330-3

5. เกียรติศักดิ์ ตันเจริญ, เอกชัย สร้อยน้ำ, ศุภชาติ ปานเนียม, สุวิมล พันธุ์ดี, ณรงค์ จึงสมานญาติ. ผลของสารสกัดจากพืชต่อฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียกรัมบวก อันเป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบในโคนม. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 30 ม.ค. - 2 ก.พ. 2550. หน้า 597-602

6. จอมใจ พีรพัฒนา, บังอร ศรีพานิชกุลชัย, อัญชลี ตัดตะวะศาสตร์, ปฐมทรรศน์ ศรีสุข. การพัฒนาตำรับโทนเนอร์สารสกัดลำต้นอด. โครงการประชุมวิชาการ เรื่อง ความงามตามธรรมชาติและสุขภาพดีผ่านวิถีวิทยาศาสตร์ความงาม. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 24 – 25 มกราคม 2556. หน้า 227-230

7. สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากระทรวงสาธารณสุข. คู่มือการผลิตเครื่องสำอางขั้นพื้นฐาน. ครั้งที่พิมพ์1. กรุงเทพฯ: คอนเซ็พเมดิคัส จำกัด;2558

8. พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. เครื่องสำอางสำหรับผิวหนัง. กรุงเทพมหานคร:โอเดียนสโตร์; 2551.

9. ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา, เอกชัย ดำเกลี้ยง, พยุงศักดิ์ สุรินเต๊ะ, วสันต์ ดีล้ำ. ฤทธิ์ปรับภูมิคุ้มกัน ต้านออกซิเดชัน และต้านจุลชีพของสารสกัดผักพื้นบ้านและสมุนไพรอีสาน. IJPS. 2552;5(2):99-107