ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดสารภีน้ำ เพื่อตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับต่อยอดในเชิงพาณิชย์

Antioxidant Activity and Tyrosinase Inhibition Activity of Extracts from *Elaeocarpus hygrophilus* to Cosmetic Formulations for Continue Commercialization

ณพัฐอร บัวฉุน[1]* และ วิริยาภรณ์ กล่อมสังข์เจริญ[1]

Napattaorn Buachoon[1]* and Wiriyabhorn Klomsungcharoen[1]

[1]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

[1]Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage Pathum Thani Province

*Corresponding author: napattaorn@vru.ac.th

Received: April 25, 2024

Revised: August 21, 2024

Accepted: August 28, 2024

บทคัดย่อ

สารภีน้ำจัดเป็นพืชที่นิยมปลูกกันทั่วไป และนำผลมาแปรรูปเป็นผลไม้แช่อิ่ม การเพิ่มมูลค่าให้กับสารภีน้ำโดยทำการตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารสกัดสารภีน้ำจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *S.aureus E.coli P.aeruginosa* และ *B.cereus* ด้วยวิธี Agar well diffusion เพื่อตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสารสกัดสารภีน้ำ พบว่า สารสกัดผลดิบสารภีน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (261.17±0.84 mg GAE/g extract) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (89.19±1.45 mg QE/g extract) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50} เท่ากับ 11.29±0.55 µg/ml) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50} เท่ากับ 16.10±0.77 µg/ml) ดีที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจาก ดอกตูม ใบ และเปลือก และสารสกัดผลดิบสารภีน้ำ (500 mg/ml) สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิดได้แก่ *S.aureus E.coli P.aeruginosa* และ *B.cereus* หลังจากนั้นนำสารสกัดผลดิบด้วยเอทานอลมาเป็นส่วนผสมในการตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโลชั่น พบว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโลชั่นที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากผลดิบของสารภีน้ำที่พัฒนาขึ้นมานั้นมีลักษณะเนื้อโลชั่นเนียนละเอียด มีสีเหลืองอ่อนขุ่นทึบแสง ไม่มีกลิ่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.15±0.34 ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์และเชื้อรา และโลชั่นมีความคงตัวหลังการทดสอบ heating-cooling stability จำนวน 6 รอบ แสดงให้เห็นว่า งานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางการใช้ประโยชน์จากสารสกัดสารภีทุกส่วนเพื่อต่อยอดในเชิงพาณิชย์

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สารภีน้ำ

Abstract

Elaeocarpus hygrophilus is a common cultivated plant, and its fruit is processed to be fruit preserve. A cosmetic formulation containing E. hygrophilus extract for increasing herbal product value is interesting. This research was conducted to study total phenolic content, total flavonoid content, antioxidant activity, anti-tyrosinase activity, and anti-bacterial activity for all 4 pathogenic bacteria, i.e. *S.aureus, E.coli, P.aeruginosa* and *B.cereus*, based on Agar well diffusion method so as to set the formulation of cosmetic products from *E. hygrophilus* extract. It was found that the total phenolic content of the fruit extract from unripe *E. hygrophilus* (261.17±0.84 mg GAE/g extract), total flavonoid content (89.19±1.45 mg QE/g extract), antioxidant activity (IC_{50} equal to 11.29±0.55 µg/ml), and Tyrosinase Inhibition Activity (IC_{50} equal to 16.10±0.77 µg/ml). Compared to the extract from buds, leaves, and peels, the fruit extract from unripe *E. hygrophilus* is able to inhibit all 4 pathogenic bacteria, i.e. *S.aureus, E.coli, P.aeruginosa* and *B.cereus*, but it can inhibit *S.aureus* the most with statistical significance at 95% confidence. The fruit extract from unripe *E. hygrophilus* was used as an ingredient in the formulation of lotion. It was found that the lotion containing the developed fruit extract from unripe *E. hygrophilus* gave a smooth and fine texture. It has a light yellow, cloudy, opaque, odorless, pH 6.15. The growth of microorganisms and fungi was not found. The consistency of the lotion did not change from the original condition of the product. This research can be used as a guideline for the utilization of the extract from *E. hygrophilus* for commercial development accordingly.

Keywords: antioxidant activity, tyrosinase inhibition activity, *Elaeocarpus hygrophilus*

บทนำ

ปัจจุบันมีโรคที่ติดเชื้อจากแบคทีเรียก่อโรคมากขึ้น การติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคต่าง ๆ เช่น โรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และโรคติดเชื้อทางผิวหนัง เช่น *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) *Escherichia coli* (*E. coli*) *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) และ *Bacillus cereus* (*B.cereus*) นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อ *S.aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างเอนเทอโรทอกซินออกมาทำให้ชั้นผิวหนังกำพร้ามีการหลุดลอกและรุนแรงจนนำไปสู่การติดเชื้อทางผิวหนังอย่างรุนแรง ต้องได้รับยาปฏิชีวนะถ้าไม่ทันอาจติดเชื้อเข้ากระแสเลือดถึงแก่ชีวิต และก่อให้เกิดเป็นโรค 4S (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome) (Mishra et al., 2016) และยังพบว่า *S.aureus* ยังก่อให้เกิดการอักเสบของสิวที่ทำให้เกิดอาการปวดและมีลักษณะแดงนูนออกมากลายเป็นสิวอักเสบ ซึ่งพบได้ที่ผิวหนังและเยื่อเมือกของมนุษย์ (Widerström et al., 2012) ปัจจุบันพบได้ว่า การบริโภคของผู้บริโภคกำลังเปลี่ยนไปหาผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อสุขภาพมากขึ้น และมีแนวโน้มที่จะกลับมาให้ความสำคัญกับสารที่ได้จากธรรมชาติ ทั้งมีการต่อต้านการใช้สารสังเคราะห์ต่าง ๆ และยังมีรายงานความเป็นพิษและการแพ้สารต่าง ๆ ที่มีการเติมแต่ง และยังมีรายงานการศึกษาสารต้านจุลินทรีย์ธรรมชาติจากพืชสมุนไพร ซึ่งพบว่า เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสามารถที่จะออกฤทธิ์ยับยั้งและสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Burt, 2004; konning et al., 2004)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตส่วนมากเป็นพวกที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ สูงมาก จะไปชักนำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ภายในเซลล์ ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นมากมาย ส่งผลให้เกิดความเสียหายอย่างมากกับโครงสร้างและหน้าที่ของสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิต ได้แก่

ทำให้กิจกรรมและกระบวนการต่าง ๆ ทางเมทาบอลิซึมภายในร่างกายบกพร่อง เกิดความผิดปกติในกระบวนการเมทาบอลิซึม นำไปสู่การเกิดโรคภัยต่าง ๆ ทำลายโครงสร้างของเซลล์ ทำให้ เซลล์ตาย และเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเซลล์ นำไปสู่การเกิดโรคมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่สามารถยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระโดยการเข้าไปหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อไป สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติโดยมากจะมาจากพืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพรต่าง ๆ พืชหลายชนิดอุดมไปด้วยสารประกอบที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) และแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ซึ่งพืชที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabraL.*) มักมีคุณสมบัติทำให้ผิวขาวรวมอยู่ด้วย (Solano et al., 2006) ดังนั้นการใช้สารประกอบจากพืชทดแทนสารสังเคราะห์จะเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิตและไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค

เอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในธรรมชาติ ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างเมลานินซึ่งพบได้ทั้งในแบคทีเรีย เห็ดรา พืช สัตว์ รวมทั้งในมนุษย์ โดยเฉพาะในมนุษย์นั้นเมลานินมีหน้าที่สำคัญในการป้องกันผิวหนังจากแสงแดดและช่วยป้องกันอันตรายจากรังสียูวี (Khan, 2007; Song et al., 2006) แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเมลานินที่มากเกินความจำเป็นอาจทำให้เกิดโรคความผิดปกติของการสร้างเม็ดสี (hyperpigmentation) และทำให้เกิด ฝ้า กระ จุดด่างดำได้ (Chen et al., 2013; Kim and Uyama, 2005; Zaidi et al., 2016) ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามหาสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ซึ่งในปัจจุบันสารที่ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส คือ กรดโคจิก (Kojic acid) และอาร์บูติน (Arbutin) ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของสารประกอบไฮดรอกซีไพราโนน และไกลโคซิลไฮโดรควิโนนที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยสารอนุพันธ์ทั้งสองชนิดนี้ได้มาจากการสกัดจากธรรมชาติ โดยกรดโคจิกนั้นเป็นสารอนุพันธ์ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการหมักข้าวมอลต์โดยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* (Yabuta, 1924; Bently, 2006, Yamada et al., 2014) ในขณะที่สารอาร์บูตินนั้นได้จากการสกัดจากพืชตระกูลแบร์เบอร์รี (Pop et al., 2009) ผลการศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่า สารอนุพันธ์ทั้งสองชนิดนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นทั้ง diphenolase activity และ monophenolase activity ได้ เนื่องจากคุณสมบัติของการเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารตั้งต้นทั้งที่เป็นสารประกอบโมโนฟีนอลและไดฟีนอล

สารภีน้ำ หรือ สมอพิพ่าย มีชื่อวิทยาศาสตร์: *Elaeocarpus hygrophilus* เป็นพืชที่พบได้บริเวณริมน้ำและลำห้วย ปัจจุบันนิยมปลูกกันทั่วไปจากการศึกษาพบว่าส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำมีสรรพคุณหลายอย่างได้แก่ ดอกเป็นยาบำรุงธาตุในร่างกาย แก้พิษโลหิต และกำเดา ผลมีรสเปรี้ยวอมหวาน ช่วยแก้อาการกระหายน้ำ ช่วยทำให้ชุ่มคอ แก้เสมหะในลำคอ เปลือกต้นแห้งมีรสเฝื่อน นำมาชงกับน้ำรับประทานเป็นยาฟอกเลือดหลังการคลอดบุตรของสตรี นอกจากนี้ยังพบว่า ผลยังพบวิตามินซี คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม ฟลาโวนอยด์ และสารฟีนอลิก (Alam et al., 2021; Ruangchakpet & Sajjaanantakul, 2007)

การผลิตเครื่องสำอางในปัจจุบันมีการใช้ส่วนผสมของสารให้ความขาวผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์แป้งสบู่ ครีมทาผิว ซึ่งมีส่วนผสมที่เป็นอันตรายต่อผิวหนัง เช่น ปรอท แอมโมเนีย (Kongwong & Wattananamkul, 2011; Klinsoonthorn et al., 2013) โดยสารเหล่านี้ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้หากใช้เป็นระยะเวลานานจะสะสมในร่างกายทำให้เกิดความผิดปกติของระบบทางเดินปัสสาวะ ทำให้ไตอักเสบได้ (Merola et al., 2008) ผู้คนส่วนใหญ่จึงหันมาใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่เป็นสารที่มาจากแหล่งธรรมชาติ เช่น พืช พืชสมุนไพร และผักพื้นบ้าน ซึ่งพืชดังกล่าวสามารถผลิตเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนส รวมทั้งยังสามารถที่จะยับยั้งจุลินทรีย์และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของผิวหนัง (skin aging-related enzyme) ด้วย (Klinsoonthorn et al., 2013) ผู้วิจัยจึงสนใจการใช้สารสกัดจากธรรมชาติจากพืชสมุนไพรโดยเฉพาะสารภีน้ำ เพื่อพัฒนาเป็นตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางต่อยอดในเชิงพาณิชย์และยังเป็นเป็นการเพิ่มมูลค่าสารภีน้ำโดยมีข้อมูลสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ต่อสรรพคุณ

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

2. เพื่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดสารภีน้ำ

3. เพื่อตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสารสกัดสารภีน้ำสำหรับต่อยอดในเชิงพาณิชย์

แนวคิดทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

สารภีน้ำ หรือ สมอพิพ่าย มีชื่อวิทยาศาสตร์: *Elaeocarpus hygrophilus* Kurz. เป็นพืชที่พบได้บริเวณริมน้ำและลำห้วย ปัจจุบันนิยมปลูกกันทั่วไป (Joomwdong, Neungsean & Boonmee, 2018) สารภีน้ำถูกนำมาใช้ในบำบัดรักษาโรค เช่น ดอกเป็นยาบำรุงธาตุในร่างกาย แก้พิษโลหิต และกำเดา ผลมีนำมารักษาอาการกระหายน้ำ ชุ่มคอ แก้เสมหะในลำคอ เปลือกต้นแห้งนำมาเป็นยาฟอกเลือดหลังการคลอดบุตรของสตรี (Ruangchakpet & Sajjaanantakul, 2007) นอกจากนี้ยังได้มีการนำส่วนต่าง ๆ เช่น ผลมาศึกษา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส สารสำคัญที่พบในสารภีน้ำ เช่น ฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ โดยมีการทำการศึกษาพบว่า สารกลุ่มดังกล่าวสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้

สารประกอบฟีนอลิก เป็นกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบป้องกันความเสียหายที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเลต และป้องกันการสร้างสารก่อมะเร็ง สารกลุ่มนี้ถูกจำแนกตามโครงสร้างทางเคมีออกเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม ซึ่งสารในกลุ่มฟีนอลิกเป็นหนึ่งในกลุ่มย่อยเหล่านี้ที่มีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและพบมากในพืช เช่น เมล็ด ผล ใบ ดอก และส่วนอื่น ๆ โดยสามารถพบสารได้ในเกือบทุกส่วนของพืช (Vajragupta, 2007)

สารประกอบฟลาโวนอยด์ เป็นสารเมแทบอไลท์ขั้นทุติยภูมิในพืชสร้างจากกรดอะมิโนที่มีวงแหวน (aromatic amino acids) ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ไทโรซีน (Tyrosine) และมาโลเนท (Malonate) โดยทำหน้าที่เพื่อช่วยป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ (Jez et al., 2000) ช่วยป้องกันแสงอุลตร้าไวโอเลตป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการถูกคุกคามจากไวรัส (Pielta, 2000)

เอนไซม์ไทโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารประกอบฟีนอลเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 60-70 kDa มีค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงาน คือ 6.8 (Halaban, 2002; Mason, 1948) บทบาทมากที่สุดในการสังเคราะห์เม็ดสีเมลานินและเป็นเอนไซม์ที่กำหนดอัตราการทำงานสำหรับการควบคุมการผลิตเมลานินทำหน้าที่เปลี่ยน ไทโรซีนไปเป็นสาร intermediate (DOPA DOPAquinone DOPAchrome DHI) สารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส เป็นได้ทั้งสารสังเคราะห์และสารที่พบในธรรมชาติซึ่งอาจเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ (Niyomdecha & Lohawittayanan, 2016)

โลชัน (lotion) เป็นอิมัลชันมีความหนืดต่ำ เพราะมีวัฏภาคภายนอกในปริมาณที่สูง วัตภาคภายในมักไม่เกิน 35 % เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดในผลิตภัณฑ์ทาผิวโดยเฉพาะผิวหนังที่มีบริเวณกว้าง เพราะทาแล้วชุ่มชื้นไม่เหนอะหนะ ดูดซึมดีให้ความรู้สึกสบาย และล้างน้ำออกได้ง่าย เช่น โลชันทาผิว โลชันป้องกันแสงแดด ซึ่งโลชันนี้อาจใช้สารเพิ่มความหนืด (thickening agent) ในวัฏภาคน้ำให้หนืดขึ้นได้ แต่ยังคงเป็นของเหลวที่ไหลได้ (Leelapornpisit, 1991).

(ก) (ข) (ค) (ง)

ภาพ 1 ส่วนต่าง ๆ สารภีน้ำ โดย (ก) ส่วนดอกตูม (ข) ส่วนใบ (ค) ส่วนผล และ (ง) ส่วนเปลือกต้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำ ได้แก่ ดอกตูม ใบแก่ ผลดิบ และเปลือกต้น จากจังหวัดสระบุรี แต่ละส่วนล้างให้สะอาดด้วยน้ำ ผึ่งให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็ก แล้วนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด นำแต่ละส่วนที่บดละเอียดมาร่อนผ่านตะแกรงไม่เกิน 400 mesh นำผงที่ได้มาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. การเตรียมสารสกัดตัวอย่าง

นำผงของแต่ละส่วนของสารภีน้ำ (ชนิดละ 250 กรัม) มาแยกสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% ปริมาตร 1 ลิตร ด้วยวิธีการแช่หมัก (maceration) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน กรองด้วยกระดาษเบอร์ 1 หลังจากนั้นทำการเก็บสารละลาย และนำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสจะได้เป็นสารสกัดหยาบ นำไปเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

เตรียมสารสกัดตัวอย่างแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตมาอย่างละ 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมสารละลาย 10% Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย 7.5 %w/v โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้นเป็น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปิเปตมาอย่างละ 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมสารละลาย 10 %v/v Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย 7.5 %w/v โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ สำหรับการทดลองชุดควบคุมใช้น้ำกลั่น ทำการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบตัวอย่างโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg GAE/g extract) แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ ดัดแปลงวิธีจาก Vernon L. Singleton (Singleton et al., 1999)

4. การหาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างมาอย่างละ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 10% อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 10 %v/v กรดอะซิติก (CH_3COOH) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Vis spectrophotometer) เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์ซิติน (Quercetin) ให้มีความเข้มข้นเป็น 0.1 0.2 0.3

0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาอย่างละปริมาตรปิเปตสารละลายตัวอย่างมาอย่างละปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 10 %w/v อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 10 %v/v กรดอะซิติก ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดแห้ง (mg QE/g extract) แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ (ดัดแปลงวิธีจาก Gracelin et al., 2013)

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Radical scavenging activity

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในสารละลาย absolute ethanol เตรียมสารสกัดหยาบตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox) ที่ความเข้มข้น 25 50 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานมาอย่างละปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดสารสกัดลงใน 96 well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DPPH อีก 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน แต่ละตัวอย่างทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหา % Radical scavenging จากสมการ

$$\% \text{ Radical scavenging} = [(Ac - As)/Ac] \times 100 \quad (1)$$

โดย Ac คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

As คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

ค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า 50% inhibitory concentration (IC_{50}) จากกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด และ % Radical scavenging โดยใช้ Trolox เป็นสารละลายมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบ ดัดแปลงวิธีจาก Chattip Prommuak (Prommuak et al., 2008)

6. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี Dopachrome

เตรียมสารสกัดตัวอย่างและสารมาตรฐานกรดโคจิก (Kojic acid) ที่ความเข้มข้น 0.01 0.05 0.1 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดตัวอย่างและสารมาตรฐานมาปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate เติม Phosphate buffer pH 6.5 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ไทโรซิเนสความเข้มข้น 30 unit/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณ %Inhibition ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A490 \text{ control} - A490 \text{ sample})/A490 \text{ control}] \times 100 \quad (2)$$

เปรียบเทียบกับกรดโคจิก ซึ่งเป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาค่าการยับยั้งเอนไซม์ ไทโรซิเนสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) พล็อตกราฟระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และความเข้มข้นของสารสกัด (Piao et al., 2002; Masuda et al., 2005)

7. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิดได้แก่ *S.aureus* TISTR 746 *E.coli* TISTR 780 *P. aeruginosa* TISTR 781 และ *B.cereus* TISTR 1449 ที่ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ทำการเพาะแบคทีเรียโดยเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ประมาณ 108 cfu/mL เพื่อให้ได้ความขุ่นของแบคทีเรียเทียบเท่า McFarland standards 0.5 ทำการกระจายเชื้อแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหาร Muller Hinton agar เจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เติมสารสกัด

ส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำที่ความเข้มข้น 500 250 และ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 30 ไมโครลิตร นำไปเลี้ยงเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (zone of inhibition) ในหน่วยมิลลิเมตร เปรียบเทียบกับ DMSO เป็นตัวควบคุมเชิงลบที่ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และยาปฏิชีวนะมาตรฐานที่ใช้ทดสอบ คือ Ceftriazone (ความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 12.5 25 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิดและเป็นที่นิยมใช้นำมาเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Eiamthaworn et al, 2022; Balouiri et al., 2016; Bagul & Sivakumar, 2016, Chuahet al., 2014)

8. การพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

เตรียมตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ดังตาราง 1 โดยแบ่งส่วนผสมเป็นวัฏภาคน้ำ (water phase) ได้แก่ Tween 80 5 มิลลิลิตร และ DI water 56.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ และวัฏภาคน้ำมัน (oil phase) White Bee Wax 3.3 กรัม Stearic Acid 16.7 กรัม Glyceryl Monostearate 5 กรัม Span 80 5 มิลลิลิตร Germaben II 3.5 มิลลิลิตร Isoproply Myristate 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ รวมกันลงในบีกเกอร์ นำแต่ละวัฏภาคมาให้ความร้อนบน Water bath แล้วทำการวัดอุณหภูมิของสารละลายโดยให้อุณหภูมิของสารละลายวัฏภาคน้ำมีอุณหภูมิประมาณ 75 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิของสารละลายวัฏภาคน้ำมันมีอุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส เทสารวัฏภาคน้ำลงในวัฏภาคน้ำมัน พร้อมคนผสมให้เข้ากันอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งอุณหภูมิของสารที่ผสมลดลงมาเหลือประมาณ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนเย็นที่อุณหภูมิห้องจะได้เป็นตำรับผลิตภัณฑ์โลชัน และทำการเติมสารสกัดสารภีน้ำร้อยละ 10 โดยเลือกสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ดีที่สุด ดำเนินการทดสอบ 3 ซ้ำ

9. การศึกษาคุณสมบัติของตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

9.1 การประเมินคุณสมบัติทางเคมี

โดยทดสอบความเป็นกรด–ด่าง โดยใช้ pH meter แล้วบันทึกผล

9.2 การประเมินความคงตัวของตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางด้วยวิธี heating-cooling cycle

โดยนำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมไว้มาใส่ตู้เย็นที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ตู้อบ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำอย่างนี้ไปอีก 6 cycle บันทึกผล (Leelapornpisit, 2008)

9.3 ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ

โดยดูจากลักษณะภายนอกของตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ แล้วเปรียบเทียบกับที่ทดสอบความคงตัวไว้ 6 cycle โดยพิจารณาลักษณะ ดังนี้

เนื้อผลิตภัณฑ์	สังเกตลักษณะเนื้อโลชันที่มองเห็น
สี	สังเกตสีของโลชันที่มองเห็น
กลิ่น	ให้ดมกลิ่นของโลชัน

การไหลของผลิตภัณฑ์ นำขวดของโลชันมาเอียงทำมุม 45 องศากับแนวระดับ จับเวลาตั้งแต่เริ่มเอียงจนโลชันไหลมาถึงปากภาชนะ (Krasantisuk & Runnarong, 2006) โดยแบ่งเป็นระดับ ดังนี้

≤ 3 วินาที	ไหลได้ดีมาก
4-10 วินาที	ไหลได้ดี
≥ 10 วินาที	ไหลได้ช้า
	ไม่ไหลเลย

การเกิด Creaming สังเกตการแยกเป็นชั้นของครีมและชั้นอิมัลชัน เมื่อเขย่าจะผสมกันดังเดิม

การเกิด Cracking สังเกตการแยกเป็นชั้นน้ำและน้ำมัน เมื่อเขย่าจะไม่ผสมกันดังเดิม

ตาราง 1

ส่วนผสมในการพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

สาร	สูตรตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ผสมสารสกัด
water phase	
Tween 80	ร้อยละ 5
DI water	ร้อยละ 56.5
oil phase	
White Bee Wax	ร้อยละ 3.3
Stearic Acid	ร้อยละ 16.7
Glyceryl Monostearate	ร้อยละ 5
Span 80	ร้อยละ 5
Germaben II	ร้อยละ 3.5
Isopropyl Myristate	ร้อยละ 5
สารสกัดสารภีน้ำ	ร้อยละ 10

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test--DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ .05 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด กับฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำโดยใช้การหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) แบบเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient)

ผลการวิจัย

จากการนำส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำ ได้แก่ ดอกตูม ใบแก่ ผลดิบ และเปลือกต้น มาสกัดด้วย ตัวทำละลายเอทานอล 95% นำไประเหยตัวทำละลายจะได้สารสกัดหยาบ พบว่า สารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำมีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวข้นหนืดสีเหลืองอ่อน (ดอกตูม) สีเขียวเข้ม (ใบแก่ ผลดิบ) และสีดำ (เปลือกต้น) จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักสารสกัดหยาบที่ได้ คำนวณหาร้อยละของส่วนสารสกัดหยาบเทียบกับน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง (250 กรัม) พบว่า ร้อยละของส่วนต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบสารภีน้ำมีค่าระหว่าง 6.03%-12.71% ดังแสดงข้อมูลในตาราง 2

1. ผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

จากการนำสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำ ได้แก่ ดอกตูม ใบแก่ ผลดิบ และเปลือก ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยใช้วิธี Folin-ciocalteu และนำมาคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด (mg GAE/g extract) พบว่า สารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในช่วง 156.88-261.17 มิลลิกรัม สมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด โดยสารสกัดหยาบจากผลดิบมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 261.17±0.84 มิลลิกรัม สมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด รองลงมา คือ ดอกตูม ใบแก่ และเปลือกต้น มีค่าเท่ากับ 246.07±0.64 195.91±0.83 และ 156.88±2.28 มิลลิกรัม สมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ ดังแสดงข้อมูลในตาราง 2

2. ผลการศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

เมื่อนำสารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำ มาศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า สารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในช่วง 45.37±89.19 มิลลิกรัม สมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด (mg QE/g extract) โดยสารสกัดหยาบจากผลดิบมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 89.19±1.45 มิลลิกรัม สมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดรองลงมา คือ ดอกตูม ใบแก่ และเปลือกต้น มีค่าเท่ากับ 77.59±0.45 63.80±0.75 และ 45.37±1.00 มิลลิกรัม สมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ ดังแสดงข้อมูลในตาราง 2

3. ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Radical scavenging activity

เมื่อนำสารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำที่มีความเข้มข้น 25 50 250 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาหาค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 516 นาโนเมตร และนำมาคำนวณค่า IC_{50} พบว่า สารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของ

สารภีน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยผลดิบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดโดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 11.29±0.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ดอกตูม ใบแก่ และเปลือกต้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 13.00±0.62 14.89±0.16 และ 16.37±0.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.96±0.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงข้อมูลในตาราง 2

4. ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี Dopachrome

เมื่อนำสารสกัดหยาบส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสด้วยวิธี Dopachrome method และเทียบกับสารมาตรฐาน Kojic acid พบว่า สารสกัดส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ไม่แตกต่างกัน และพบว่า สารสกัดจากผลดิบสารภีน้ำสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงโดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 16.10±0.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ดอกตูม ใบแก่ และเปลือกต้น มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 17.60±0.48 18.44±0.29 และ 20.59±0.24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Kojic acid ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.58±0.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงข้อมูลในตาราง 2

จากตาราง 2 พบว่า สารสกัดจากดอกตูม ใบแก่ ผลดิบ และเปลือกต้น มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 156.88–246.07 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด 45.37–89.19 มิลลิกรัมสมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด พบว่า สารสกัดที่แตกต่างกันมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$) สารสกัดใบแก่และ Trolox มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > .05$) แต่พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) แตกต่างกับสารสกัดดอกตูม ผลดิบ และเปลือกต้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$) ในส่วนของสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50}) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > .05$) ได้แก่ สารสกัดดอกตูมกับสารสกัด ใบแก่ และสารสกัดเปลือกกับ Kojic acid และพบว่า สารสกัดดอกตูมและสารสกัดใบแก่ มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50}) แตกต่างจากสารกัดผลดิบ และสารสกัดเปลือกกับ Kojic acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$)

5. ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *S.aureus E.coli P.aeruginosa* และ *B.cereus* ทำการเพาะแบคทีเรียโดยเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton broth และใช้ยาปฏิชีวนะ Ceftriazone เป็นสารมาตรฐาน เติมสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำที่ความเข้มข้น 500 250 และ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดผลดิบของสารภีน้ำที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ได้ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < .05$) โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเท่ากับ 18.29±0.05 มิลลิเมตร และสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้รองลงมาโดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเท่ากับ 10.31±0.02 มิลลิเมตร ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดที่ส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำที่ความเข้มข้น 500 250 และ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากตาราง 3 เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) ของสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำ พบว่า ผลดิบมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสัมพันธ์กับปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด มีค่า r เท่ากับ 0.996 และพบว่า ผลดิบยังมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) ค่า r เท่ากับ 0.868 ในขณะที่ดอกตูมมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) สูงที่สุด ค่า r เท่ากับ 0.928

จากตาราง 4 พบว่า สารสกัดจากดอกตูม ใบแก่ ผลดิบ เปลือกต้น และ Ceftriazone ที่ระดับความเข้มข้น 500 250 และ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเชื้อแบคทีเรียแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$)

ตาราง 2

ร้อยละสารสกัดหยาบ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำ

	% Yield Crude Extract	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/g extract)	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg QE/g extract)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) (µg/ml)	ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (IC_{50}) (µg/ml)
ดอกตูม	7.65	246.07 ± 0.64^{A}	77.59 ± 0.45^{A}	13.00 ± 0.62^{A}	17.60 ± 0.48^{A}
ใบแก่	6.03	195.91 ± 0.83^{B}	63.80 ± 0.75^{B}	14.89 ± 0.16^{B}	18.44 ± 0.29^{A}
ผลดิบ	10.45	261.17 ± 0.84^{C}	89.19 ± 1.45^{C}	11.29 ± 0.55^{C}	16.10 ± 0.77^{B}
เปลือกต้น	12.71	156.88 ± 2.28^{D}	45.37 ± 1.00^{D}	16.37 ± 0.50^{D}	20.59 ± 0.24^{C}
Trolox	-	-	-	14.96 ± 0.65^{B}	-
Kojic acid	-	-	-	-	20.58 ± 0.34^{C}

* $^{A, B, C, D}$ ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวตั้งแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq .05$)

ตาราง 3

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50}) ของสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำ

สารสกัด	สารสำคัญ	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r)		
		ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50})
ดอกตูม	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	1		
	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	0.461	1	
	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50})	0.759	0.928	1
ใบแก่	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	1		
	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	-0.302	1	
	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50})	0.232	0.857	1
ผลดิบ	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	1		
	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	0.996	1	
	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50})	0.868	0.909	1
เปลือกต้น	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	1		
	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	-0.118	1	
	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (IC_{50})	0.442	0.839	1

ตาราง 4

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดด้วยวิธี Agar well diffusion

สารสกัด	เชื้อแบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส±SD (มิลลิเมตร) ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)		
		125	250	500
ดอกตูม	*S.aureus*	12.29±0.07[a]	13.41±0.15[b]	15.75±0.07[c]
	E.coli	6.35±0.01[a]	7.66±0.01[b]	9.32±0.04[c]
	P.aeruginosa	2.11±0.02[a]	4.78±0.10[b]	6.82±0.01[c]
	B.cereus	1.56±0.01[a]	2.35±0.50[b]	3.27±0.04[c]
ใบแก่	*S.aureus*	10.91±0.03[a]	12.07±0.05[b]	13.59±0.04[c]
	E.coli	5.32±0.05[a]	5.74±0.05[b]	9.11±0.01[c]
	P.aeruginosa	1.91±0.06[a]	3.22±0.02[b]	5.68±0.04[c]
	B.cereus	1.20±0.02[a]	1.68±0.01[b]	2.44±0.03[c]
ผลดิบ	*S.aureus*	13.25±0.04[a]	15.22±0.02[b]	18.29±0.05[c]
	E.coli	7.14±0.011[a]	8.46±0.01[b]	10.31±0.02[c]
	P.aeruginosa	3.23±0.04[a]	5.34±0.02[b]	8.55±0.01[c]
	B.cereus	1.85±0.05[a]	2.11±0.01[b]	4.21±0.02[c]
เปลือกต้น	*S.aureus*	7.25±0.06[a]	8.32±0.02[b]	9.66±0.02[c]
	E.coli	4.88±0.10[a]	6.52±0.01[b]	7.84±0.04[c]
	P.aeruginosa	1.49±0.13[a]	2.13±0.03[b]	3.13±0.02[c]
	B.cereus	0.82±0.05[a]	1.58±0.03[b]	1.85±0.02[c]
Ceftriazone	*S.aureus*	16.29±0.06[a]	20.19±0.05[b]	22.72±0.04[c]
	E.coli	9.18±0.03[a]	13.78±0.10[b]	17.30±0.02[c]
	P.aeruginosa	7.67±0.02[a]	10.24±0.04[b]	12.48±0.03[c]
	B.cereus	3.39±0.16[a]	6.23±0.02[b]	8.34±0.02[c]

* [a, b, c] ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวนอนแสดงว่าค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤.05)

6. ผลการศึกษาการพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

จากการศึกษาเพื่อให้ได้ตำรับของโลชันที่มีคุณภาพและได้มาตรฐานทั้งนี้ได้อ้างอิงจากมาตรฐานอุตสาหกรรม เอส (มอก. เอส 15-2562) ของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม (Thai Industrial Standards Institute (TISI), 2019) โดยทำการตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโลชันที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากผลดิบของสารภีน้ำ ซึ่งมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สูง รวมทั้งยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิดได้แก่ *S.aureus E.coli P.aeruginosa* และ *B.cereus* ได้ด้วย และเมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติของเครื่องสำอางโลชัน พบว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโลชันที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากผลดิบของสารภีน้ำมีลักษณะเนื้อโลชันเนียนละเอียด สีเหลืองอ่อนขุ่นทึบแสง ไม่มีกลิ่น ไม่มีอัตราการไหล เมื่อนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของโลชันเท่ากับ 6.15±0.34 ไม่เกิด Creaming และ Cracking จากนั้นทดสอบความคงสภาพของโลชัน โดยการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 45±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำเช่นนี้จนครบ 6 ครั้ง นำมาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโลชันที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากผลดิบของสารภีน้ำที่ได้ยังคงมีสภาพไม่เปลี่ยนแปลงไปจากสภาพเดิมของผลิตภัณฑ์ ดังตาราง 5

ตาราง 5

ลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และความคงตัวของโลชัน ของตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและตำรับพื้น ที่สังเกตเห็นหลังเตรียมเสร็จที่อุณหภูมิห้อง และทดสอบความคงตัวเป็นเวลา 6 cycle

เวลาที่ประเมิน	**ตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ผสมสารสกัด**	
	t=0	**t=6 cycle**
ลักษณะเนื้อโลชัน	เนียนละเอียด	เนียนละเอียด ค่อนข้างหนืด
การไหลของผลิตภัณฑ์	ไม่ไหลเลย	ไม่ไหลเลย
สี	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น	ไม่มีกลิ่น
pH	6.15±0.34	6.16±1.28
Creaming	ไม่เกิด	ไม่เกิด
Cracking	ไม่เกิด	ไม่เกิด

การอภิปรายผล

จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของสารสกัดสารภีน้ำ เพื่อตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากสารสกัดสารภีน้ำสำหรับต่อยอดในเชิงพาณิชย์ โดยนำส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำ ได้แก่ ดอกตูม ใบแก่ ผลดิบ และเปลือกต้น มาทำการอบและสกัดโดยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล 95% พบว่า สารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำมีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลวข้นหนืดสีเหลืองอ่อน (ดอกตูม) สีเขียวเข้ม (ใบแก่ ผลดิบ) และสีดำ (เปลือกต้น) สารสกัดหยาบจากเปลือกมีร้อยละสารสกัดหยาบมากที่สุดเท่ากับ 12.71% รองลงมาคือ ผลดิบเท่ากับ 10.45% เมื่อนำมาศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่า ผลดิบและดอกตูม มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (261.17±0.84 และ 246.07±0.64 มิลลิกรัม สมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสารสกัดตามลำดับ) ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูง (89.19±1.45 และ 77.59±0.45 มิลลิกรัม สมมูลของเคอร์ซิตินต่อกรัมน้ำหนักสารสกัด ตามลำดับ) Ruangchakpet and Sajjaanantakul (2007) ได้ทำการศึกษาอายุการเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกันของสารภีน้ำ ได้แก่ อายุ 5 6 7 และ 8 เดือน หลังติดดอก พบว่า สารสกัดสารภีน้ำอายุ 6 เดือน หลังติดดอก มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด (345.8 มิลลิกรัม กรดแกลลิกต่อน้ำหนักสด 100 กรัม) และมีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุด (49.0 มิลลิกรัม เคทเทคินต่อน้ำหนักสด 100 กรัม) ซึ่งมีปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับอายุ 5 7 และ 8 เดือน และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้ พบว่า สารสกัดหยาบสารภีน้ำมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดน้อยกว่า แต่ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่า และผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างจากงานวิจัยของ Wetwitayaklung et al. (2009) ที่ทำการหาปริมาณฟีนอลิกในผลสารภีน้ำสดที่มีอายุ 1 2.5 3 และ 4 เดือน ที่พบว่า ผลดิบอายุ 1 เดือน ปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด (2.4286 มิลลิกรัม กรดแกลลิกต่อน้ำหนักสด 100 กรัม) ในขณะที่ผลสารภีน้ำที่มีอายุเพิ่มขึ้นปริมาณฟีนอลิกจะลดลง เมื่อนำผลของสารภีอายุ 2.5 เดือน ที่แช่ใน 15% w/w NaCl นาน 3 วัน จะมีปริมาณฟีนอลิกสูงที่สุด (2.4286 มิลลิกรัม กรดแกลลิกต่อน้ำหนักสด 100 กรัม) และเมื่อแช่ใน 15% w/w NaCl นานยิ่งขึ้น มีผลทำให้ปริมาณฟีนอลิกลดลง จากผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้ที่มีผลการทดลองที่แตกต่างกันอาจจะเนื่องจากผลดิบสารภีน้ำที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นผลที่ออกหลังจากติดดอกแล้วประมาณ 5 ถึง 6 เดือน และอาจเนื่องมาจากสภาพภูมิอากาศ ภูมิประเทศของต้นสารภีน้ำที่นำมาใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการสกัดสารสำคัญอีกด้วย (Homklob et al., 2011) และนอกจากนี้อาจเนื่องมาจากบทบาทหน้าที่ในพืช ดอก ที่จะเป็นจะต้องมีการสะสมสารประกอบโพลิฟีนอล (Polyphenol) เพื่อที่จะใช้ในการป้องกันและกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมาจากความเข้มของแสงที่พืชได้รับ Chua (2016) และ Machiek et al. (1990) กล่าวว่า ธรรมชาติของผลไม้ส่วนใหญ่จะมีปริมาณฟีนอลิก และพบมากช่วงผลดิบ และอาจจะพบกรดแกลลิกได้ตั้งแต่ผลอ่อน และจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อปล่อยให้ผลแก่มากขึ้น เนื่องจากกรดแกลลิกสามารถเปลี่ยนเป็นสารอื่น ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH Radical scavenging activity จะพบว่า สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำ แสดงในรูปฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH และค่า IC_{50} ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระของส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำทั้ง 4 ส่วน แปรผันตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น โดยผลดิบและดอกตูมมีความสามารถในกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าใบ และเปลือกต้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะแสดงด้วยค่า IC_{50} คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างพืชที่ส่งผลให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ (DPPH) ลดลงครึ่งหนึ่ง ค่า IC_{50} ที่ต่ำจึงแสดงถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูง และจากผลการศึกษาจะพบว่า ผลดิบ มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด คือ 11.29±0.55 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับดอกตูมที่มีค่า IC_{50} อยู่ที่ 13.00±0.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 14.96±0.65 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดลองพบว่า มีค่า IC_{50} ของสารมาตรฐาน Trolox มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Koodkaew and Sukonkhajorn (2018) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณฟลาโวนอยด์ โดยสารประกอบ

ฟีนอลิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยหมู่ฟีนอลสามารถรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระและกลายเป็นอนุมูลของสารประกอบฟีนอลที่เสถียร เช่น สาร Lansic acid Kokosanolide Dukunolide D E และ F และ 3-oxo-24-cycloarten-21-oic acid เป็นต้น ที่ทำลายวงจรของความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระในเซลล์ได้ (Saenprakob, 2018; Kiang et al., 1967; Mayanti et al., 2009; Kulkarni & Aradhya, 2005) จากศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำ โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Kojic acid พบว่าสารสกัดผลดิบสารภีน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 16.10±0.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับสารละลายมาตรฐาน Kojic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 20.58±0.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า มีค่า IC_{50} ที่แตกต่างกับงานวิจัยของ Piao et al. (2002) ที่สารละลายมาตรฐาน Kojic acid มีค่า IC_{50} เท่ากับ 12.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และของ Masuda et al. (2005) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.36 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากผลดิบและส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำสามารถยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ดีกว่าสารละลายมาตรฐาน Kojic acid ทั้งนี้ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสอาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลที่พบในสารภีน้ำมีสารประกอบฟีนอลหลายชนิด เช่น kojic acid kaempferol และ quercetin ที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่สำคัญ (Kim & Uyama, 2005; Solano et al., 2006) นอกจากนี้ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำอาจจะมาจากผลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน (Alam et al., 2011)

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบเคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *S.aureus E.coli P.aeruginosa* และ *B.cereus* ของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำพบว่าสารสกัดผลดิบของสารภีน้ำที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S.aureus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<.05$) โดยมีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งเท่ากับ 18.29±0.05 มิลลิเมตร และเมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทั้ง 4 ชนิดพบว่า สารสกัดส่วนต่าง ๆ สารภีน้ำสามารถยับยั้งเชื้อ *S.aureus* ได้ สำหรับเชื้อ *S.aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดเชื้อที่ผิวหนังและเยื่อบุผิวในคนและสัตว์บางชนิด เป็นสาเหตุการเกิดโรคติดเชื้อที่ผิวหนัง ปอด ตุ่มพุพอง โรคริตเตอร์ ผิวหนังหลุดลอก ฝี เป็นต้น (Mishra et al., 2016; Yucharoen et al., 2023) จากการศึกษาสาระสำคัญในส่วนต่าง ๆ ของสารภีน้ำพบว่า มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสูงกว่าสารสกัดดอกตูม ใบแก่ และเปลือกต้น จึงนำสารสกัดผลดิบสารภีมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางบำรุงผิว ที่ช่วยดูแลผิวพรรณแล้วยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S.aureus* สาเหตุการเกิดโรคติดเชื้อทางผิวหนังได้อีกด้วย

การตั้งตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางของโลชันที่มีส่วนผสมสารสกัดจากผลดิบสารภีน้ำจะทำการอ้างอิงจากมาตรฐานอุตสาหกรรมเอส (มอก. เอส 15-2562) ของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม (Thai Industrial Standards Institute (TISI), 2019) พบว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโลชันที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากผลดิบของสารภีน้ำที่พัฒนาขึ้นมานั้นมีลักษณะเนื้อโลชันเนียนละเอียด มีสีเหลืองอ่อนขุ่นทึบแสง ไม่มีกลิ่น ไม่มีอัตราการไหลค่าความเป็นกรด-ด่างของโลชันอยู่ที่ 6.15±0.34 ไม่เกิด Creaming และ Cracking และเมื่อทำการประเมินความคงตัวของตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางด้วยวิธี heating-cooling cycle ผลิตภัณฑ์โลชันที่พัฒนาขึ้นมานั้นมีความคงสภาพของโลชัน ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากสภาพเดิม ซึ่งผลจากการศึกษาเป็นการนำเอาพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่มีอยู่มาหาสารสำคัญและพัฒนาเป็นตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโลชัน ที่สามารถเพิ่มมูลค่าให้กับพืชสมุนไพรได้เพิ่มมากขึ้น โดยมีข้อมูลสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ต่อสรรพคุณจนสามารถที่จะต่อยอดในเชิงพาณิชย์และยังเป็นเป็นการเพิ่มมูลค่าสารภีน้ำ

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาต่อยอดผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษา

โครงสร้างของสารออกฤทธิ์และคุณสมบัติด้านอื่นเพิ่มเติม รวมทั้งนำตำรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโลชันที่พัฒนาขึ้นไปทดสอบหาปริมาณสารปนเปื้อนต่าง ๆ และเข้าสู่กระบวนการทดสอบอาการแพ้ เพื่อพัฒนาต่อยอดออกสู่ท้องตลาดในเชิงพาณิชย์ในอนาคตต่อไป

References

Alam, N., Yoon, K. N., Cha, Y. J., Kim, J. H., Lee, K. R., & Lee, T. S. (2011). Appraisal of the antioxidant, phenolic compounds concentration, xanthine oxidase and tyrosinase inhibitory activities of Pleurotus salmoneostramineus. *African Journal of Agricultural Research, 6*(6), 1555-1563. doi: 10.5897/AJAR10.1145

Bagul, U. S., & Sivakumar, S. M. (2016). Antibiotic susceptibility testing: A review on current practices. *International Journal of Pharmaceutics, 6*(3), 11-17. https://bit.ly/3ZXOydO

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, K. S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis, 2,* 71-79. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology, 94*, 223-253. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences, 10*(6), 2440–2475. https://doi.org/10.3390/ijms10062440

Chua, L. S. (2016). Untargeted MS-based small metabolite identification from the plant leaves and stems of *Impatiens balsamina*. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB, 106*, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.040

Chuah, E. L., Zakaria, Z. A., Suhaili, Z., Bakar, S. A., & Desa, M. N. M. (2014). Antimicrobial activities of plant extracts against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology Research, 4*(1), 6-13. doi:10.5923/j.microbiology.20140401.02

Eiamthaworn, K., Kaewkod, T., Bovonsombut, S., & Tragoolpua, Y. (2022). Efficacy of *Cordyceps militaris* extracts against some skin pathogenic bacteria and antioxidant activity. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 8*(4), 327. https://doi.org/10.3390/jof8040327

Gracelin, D. H. S, Britto, A. J. D., & Kumar, B. J. R. (2013). Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals in five Pteris Species. *International Journal of Pharmaceutical Sciences, 5*(1), 105-107. https://www.innovareacademics.in/journal/ijpps/Vol5Suppl1/6258.pdf

Halaban, R., Patton, R. S., Cheng, E., Svedine, S., Trombetta, E. S., Wahl, M. L., Ariyan, S., & Hebert, D. N. (2002). Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway. *The Journal of Biological Chemistry, 277*(17), 14821–14828. https://doi.org/10.1074/jbc.M111497200

Homklob, J., Winitchai, S., Rimkeeree, H., Luangprasert, N., & Haruthaithanasunti, V. (2011) Development of rice bran wax lip gloss containing liposome of indian gooseberry (*Phyllanthus emblica* L.) extracts. *Proceedings of 49th Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry* (pp. 630-640). Bangkok: Kasetsart University (in Thai)

Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., & Noel, J. P. (2000). Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nature Structural Biology, 7*(9), 786–791. https://doi.org/10.1038/79025

Joomwdong, A., Neungsean, P., & Boonmee, N. (2018). The study on physical and chemical quality of Ma KoK Nam (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.) fruit. *Agricultural Science Journal, 49*(1), 479-482. (in Thai)

Khan, M. T. H. (2007). Molecular design of tyrosinase inhibitors: A critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins. *Pure and Applied Chemistry, 79*, 2277–2295. https://doi.org/10.1351/pac200779122277

Kiang, A. K., Tan, E. L., Lim, Habaguchi, F. Y., Nakanishi, K. K., Fachan, L., & Ourisson, G. (1967). Lansic acid, a bicyclic triterpene. *Tetrahedron Lett, 37*, 3571-3574. doi:10.1016/S0040-4039(01)89797-5

Kim, Y. J., & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS, 62*(15), 1707–1723. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5054-y

Klinsoonthorn, N., Nutsatapana, C., & Mapradit, P. (2013). Prohibited substances in acne melasma whitening cosmetic products in lower central provinces during 2010-2013. *Thai Food and Drug Journal, 20*(3), 28-36. (in Thai)

Kongwong, R., & Wattananamkul, V. (2011). A study of Harmful cosmetics usage behavior among female teenagers in Ubon Ratchathani Province. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences, 7*(1), 76-87. (in Thai)

Koodkaew, I., & Sukonkhajorn, P. (2018). Antioxidant and anti-tyrosinase properties of stem, leaf, flower and seed from garden balsam. *Khon Kaen Agriculture Journal, 46*(1), 1242-1247. (in Thai)

Konning, G. H., Agyare, C., & Ennison, B. (2004). Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. *Fitoterapia, 75*(1), 65–67. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2003.07.001

Krasantisuk, S., & Runnarong, H. (2006). *The development of skin care ceresin lotion* (Unpublished Independent study). Mahidol University. Nakhon Pathom. (in Thai)

Kulkarni, A. P., & Aradhya, S. M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry, 93*(2), 319-324. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.029

Leelapornpisit, P. (2008). *Cosmetics for skin* (2nd ed.). Bangkok: Odeonstore Company Limited. (in Thai)

Leelapornpisit, P. (1991). *Cosmetic emulsions* (2nd ed.). Chiang Mai: Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University. (in Thai)

Lin, J. W., Chiang, H-M., Lin, Y-C., & Wen, K-C. (2008). Natural products with skin-whitening effects. *Journal of. Food and Drug Analysis, 16*(2), 1-10. https://doi.org/10.38212/2224-6614.2366

Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Billot, J. (1990). *Fruit phenolics*. Florida: CRC Press.

Mason, H. S. (1948). The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of trihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry, 172*, 83–99. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35614-X

Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., & Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 69*(1), 197–201. https://doi.org/10.1271/bbb.69.197

Merola, J. M., Shane, M., Ruth, F. W., & Lance, B. (2008). Exogenous Ochronosis. *Dermatology Online Journal, 14*(10), 6. https://escholarship.org/uc/item/3b67z1vb

Mishra, A. K., Yadav, P., & Mishra, A. (2016). A systemic review on Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS): A rare and critical disease of neonates. *The open microbiology journal, 10*, 150–159. https://doi.org/10.2174/1874285801610010150

Niyomdecha, M., & Lohawittayanan, D. (2016). Synthesis of Oseltamivir derivatives with anti-tyrosinase for making whitening skin. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University, 3*(4), 66-81. (in Thai)

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products, 63*(7), 1035–1042. https://doi.org/10.1021/np9904509

Piao, L. Z., Park, H. R., Park, Y. K., Lee, S. K., Park, J. H., & Park, M. K. (2002). Mushroom tyrosinase inhibition activity of some chromones. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 50*(3), 309–311. https://doi.org/10.1248/cpb.50.309

Pop, C., Vlase, L., & Tamas, M. (2009). Natural resources containing arbutin: Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 37*(1), 129–132. doi:10.15835/nbha3713108

Prommuak, C., D-Eknamkul, W., & Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extract. *Separation and Purification Technology, 62*, 444-448. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.02.020

Ruangchakpet, A., & Sajjaanantakul, T. (2007). Effect of Spanish Plum (*Elaeocarpus hygrophilus* Kurz.) Maturity on total phenolics, flavonoids and antioxidant activity. *Agricultural Science Journal, 38*(5),127-130. (in Thai)

Saeed, N., Khan, M. R., & Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 12*, 221-223.

Saenprakob, P. (2018). Phenolic contents and Antioxidant Activities of Local Edible Plantsin Roi Et province. *Thai Agricultural Research Journal, 36*(3), 293-301. (in Thai)

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology, 299*, 152-178. http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1

Solano, F., Briganti, S., Picardo, M., & Ghanem, G. (2006). Hypopigmenting agents: An updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Research, 19*(6), 550–571. https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00334.x

Song, K. K., Huang, H., Han, P., Zhang, C. L., Shi, Y., & Chen, Q. X. (2006). Inhibitory effects of cis- and trans-isomers of 3,5-dihydroxystilbene on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 342*(4), 1147–1151. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.229

Vajragupta, O. (2007). *Antioxidant* (2nd ed.). Bangkok: New Thammada Press (Thailand) Co., Ltd. (in Thai)

Wetwitayaklung, P., Sarunyakasitharin, K., & Phaechamud, T. (2009). Total phenolic content and antioxidant activity of fresh and preserved fruits of *Ellaeocarpus hygrophilus* Kurz. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal, 4*(1), 21-28. (in Thai)

Widerström, M., Wiström, J., Sjöstedt, A., & Monsen, T. (2012). Coagulase-negative staphylococci: Update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology, 31*(1), 7–20. https://doi.org/10.1007/s10096-011-1270-6

Yabuta, T. (1924). The constitution of kojic acid, a gamma-pyrone derivative formed by *Aspergillus oryzae* from carbohydrates. *Journal of the Chemical Society Perkin 1, 125*, 575–587. https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1924/ct/ct9242500575

Yamada, R., Yoshie, T., Wakai, S., Asai-Nakashima, N., Okazaki, F., Ogino, C., Hisada, H., Tsutsumi, H., Hata, Y., & Kondo, A. (2014). Aspergillus oryzae-based cell factory for direct kojic acid production from cellulose. *Microbial Cell Factories, 13*, 71. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-71

Yucharoen, R., Buncharoen, P., & Srisuksomwong, P. (2023). Development of nourishing skin cream containing Siw Gliang Rice Extract. *YRU Journal of Science and Technology, 8*(3), 40-48. (in Thai)

Zaidi, K. U., Ali, S. A., & Ali, A. S. (2016). Effect of purified mushroom tyrosinase on melanin content and melanogenic protein expression. *Biotechnology Research International, 2016*, 9706214. https://doi.org/10.1155/2016/9706214