

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและยับยั้งไทโรซิเนสของน้ำหมักใบมะรุมโดย  
เชื้อแอสเพอร์จิลลัส ไนเจอร์ TISTR 3240 สำหรับ  
พัฒนาอิมัลเจลบำรุงผิว

Antioxidant and Antityrosinase Activities of a Fermented Solution  
from *Moringa oleifera* Leaves by *Aspergillus niger* TISTR 3240  
for Skin Care Emulgel Development

ณัททัย เวียงยา<sup>1</sup> ทานตะวัน จันทะพิมพ์<sup>1</sup> พัฒนา ศรีพลากิจ<sup>2</sup> และอรสร สารพันโชติวิทยา<sup>1\*</sup>  
Nahathai Wiengya<sup>1</sup>, Tantawan Jantapim<sup>1</sup>, Pattana Sripalakit<sup>2</sup>  
and Aurasorn Saraphanchotiwitthaya<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Naresuan University

<sup>2</sup>ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy,  
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

\*Corresponding author: aurasorns@nu.ac.th

Received: May 14, 2025

Revised: July 19, 2025

Accepted: July 24, 2025

### บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการหมักใบมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของน้ำหมักที่ได้ และนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ทำการทดลองโดยหมักผงใบมะรุมด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3240 เป็นเวลา 1-3 วัน แล้วนำน้ำหมักมาวิเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ต่าง ๆ ผลการวิจัยพบว่า ผงใบมะรุมหมัก 1 วัน ให้น้ำหมักที่มีปริมาณฟีนอลิกรวมและและฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดเท่ากับ  $14.60 \pm 0.29$  mg gallic acid equivalent/g dry herb และ  $3.08 \pm 0.08$  mg quercetin equivalent/g dry herb ตามลำดับ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl: DPPH ด้วยร้อยละการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ  $95.81 \pm 3.89$  เมื่อหมัก 3 วัน และจากการทดสอบโดยวิธี ferric reducing ability power: FRAP มีค่า FRAP สูงสุดเท่ากับ  $22.01 \pm 0.79$  mM Fe<sup>2+</sup>/g dry herb เมื่อหมัก 1 วัน นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสสูงสุดร้อยละ  $75.84 \pm 0.07$  เมื่อหมัก 1 วัน เช่นกัน เมื่อนำน้ำหมักใบมะรุมที่หมัก 1 วันไปพัฒนาตำรับอิมัลเจลบำรุงผิวจำนวน 13 สูตร พบว่าสูตรที่ 13 (ME-13) ซึ่งประกอบด้วยน้ำหมักใบมะรุม 1 วัน ความเข้มข้น 1% w/w เป็นสูตรที่ดีที่สุด มีความคงตัวทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยามากที่สุดเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 28 วัน ผลการวิจัยสรุปได้ว่า น้ำหมักใบมะรุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ได้จากการหมักเป็นเวลา 1 วัน มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ดังนั้นอิมัลเจล ME-13 ที่มีส่วนผสมของน้ำหมักใบมะรุมจึงมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเครื่องสำอางเพื่อบำรุงผิวและประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์

คำสำคัญ: การหมัก ใบมะรุม แอสเพอร์จิลลัสไนเจอร์ ฤทธิ์ชีวภาพ อิมัลเจล

## Abstract

This research aimed to study the fermentation of moringa leaves (*Moringa oleifera* Lam.), evaluate the antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of the fermented solution, and develop a skincare product. Moringa leaf powder was fermented with *Aspergillus niger* TISTR 3240 for 1–3 days, and the fermented solution was analyzed. The results showed that fermentation for 1 day yielded the highest total phenolic content ( $14.60 \pm 0.29$  mg gallic acid equivalent/g dry herb) and total flavonoid content ( $3.08 \pm 0.08$  mg quercetin equivalent/g dry herb). The highest antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl: DPPH assay of  $95.81 \pm 3.89\%$  was observed on day 3, while the highest Ferric Reducing Antioxidant Power: FRAP of  $22.01 \pm 0.79$  mM  $\text{Fe}^{2+}$ /g dry herb was on day 1. The maximum tyrosinase inhibition of  $75.84 \pm 0.07\%$  was also found on day 1. The fermented solution from day 1 was then used to formulate an emulgel skincare product. Among the 13 tested formulations, formula ME-13, which contains a 1% w/w solution fermented for one day, was the best formulation. It exhibited superior physical, chemical, and microbiological stability after 28 days of storage at room temperature. In conclusion, the fermented solution of moringa leaves—especially those obtained after one day of fermentation—exhibited notable antioxidant properties and effectively inhibited tyrosinase activity. The emulgel formulation ME-13, which includes the fermented moringa extract, has promising potential for development as a skincare cosmetic product and for future commercial applications.

**Keyword:** fermentation, *Moringa oleifera* leaves, *Aspergillus niger*, biological activity, emulgels



## บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญกับสุขภาพและสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้นอย่างมาก มีความนิยมเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติเพื่อความปลอดภัยต่อสุขภาพมากขึ้น คาดว่า ตลาดผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทั่วโลกจะเติบโตอย่างต่อเนื่องจนถึงปี 2033 โดยมีมูลค่ารวมถึง 93.9 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ ด้วยอัตราการเติบโตเฉลี่ย 7.4% ต่อปี (EIN Presswire, 2024) ในขณะที่ตลาดเครื่องสำอางจากธรรมชาติก็มีแนวโน้มขยายตัวเช่นกัน คาดว่าจะมีมูลค่าถึง 45.6 พันล้านดอลลาร์สหรัฐ ภายในปี 2030 ด้วยอัตราการเติบโตเฉลี่ย 5.3% ต่อปี ปัจจัยหลักที่ขับเคลื่อนการเติบโตนี้ ได้แก่ ความกังวลต่อผลข้างเคียงของสารเคมี เช่น การระคายเคือง ความหมองคล้ำของผิว และผลกระทบระยะยาวต่อสุขภาพผิว รวมถึงการตื่นตัวต่อปัญหาสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้ผู้บริโภคหันมาเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ดูแลผิวที่มีส่วนผสมจากธรรมชาติมาก

ขึ้นเป็นลำดับ (Grand View Research, 2024)

อิมัลเจล (Emulgel) เป็นรูปแบบการนำส่งสารออกฤทธิ์ทั้งในตำรับยาและเครื่องสำอางที่ได้รับการพัฒนาขึ้น โดยผสมข้อดีของอิมัลชันและเจลเข้าไว้ในระบบเดียวกัน อิมัลชันมีข้อดีในการกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ที่มีสมบัติชอบไขมัน (hydrophobic substances) และมีการทำงานสอดคล้องกับโครงสร้างชั้นไขมันของผิวหนัง แต่ตำรับอิมัลชันพื้นฐานมักมีข้อจำกัดด้านเนื้อสัมผัสที่เหนียวเหนอะหนะ และอาจมีความไม่คงตัวขณะเก็บรักษา ส่วนเจลมีโครงสร้างที่สามารถกักเก็บน้ำได้มาก จึงเหมาะสมสำหรับการละลายและนำส่งสารออกฤทธิ์ที่มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic substances) อีกทั้งยังให้ความรู้สึกเย็นสบายและซึมซาบรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดในการนำส่งสารออกฤทธิ์ที่ชอบไขมัน อิมัลเจลจึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว และรองรับการนำส่งสารออกฤทธิ์ทั้งที่ ชอบน้ำและชอบไขมัน นอกจากนี้อิมัลเจลยังมีคุณสมบัติ

การไหล (thixotropy) และการกระจายตัว (spreadability) ที่ดี ช่วยให้ทาได้ง่ายและให้สัมผัสบางเบา ไม่เหนียวเหนอะหนะ มีความมันน้อย และคงตัวดี (Tadić et al., 2021) อีกทั้งกระบวนการผลิตอิมัลเจียยังทำได้ง่ายไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ เมื่อเทียบกับระบบการนำส่งอื่น ๆ เช่น ไลโปโซม ซึ่งเป็นระบบนำส่งขั้นสูงที่สามารถเพิ่มการดูดซึมทางชีวภาพและนำส่งสารออกฤทธิ์ได้ตรงเป้าหมาย โดยห่อหุ้มสารไว้ภายในโครงสร้างลิพิดสองชั้น แต่มีข้อจำกัดเรื่องความคงตัว กระบวนการผลิตที่ซับซ้อน และต้นทุนที่สูงกว่า (Saroha et al., 2022) เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของสารสกัดจากน้ำหมักใบมะรุมน้ำซึ่งหมักในน้ำและสกัดด้วยเอทานอล จึงมีแนวโน้มได้สารออกฤทธิ์ทั้งที่ชอบน้ำและชอบไขมัน ประกอบกับจุดมุ่งหมายในการพัฒนาเครื่องสำอางที่ต้องการความเสถียรและสามารถผลิตในระดับต้นทุนที่เหมาะสม งานวิจัยนี้จึงเลือกพัฒนาตำรับในรูปแบบอิมัลเจีย ซึ่งเป็นระบบนำส่งที่เหมาะสมในบริบทของงานวิจัยนี้

มะรุมน้ำ (*Moringa oleifera* Lam.) เป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่มีการบริโภคกันโดยทั่วไปในหลายภูมิภาคของโลก มีการนำใบ เมล็ด เปลือก ลำต้น ราก ยาง และดอกของต้นมะรุมน้ำมาใช้ในตำรับยาพื้นบ้านอย่างแพร่หลาย ใบและฝักอ่อนนิยมบริโภคเป็นอาหาร เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ส่วนใบประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ กลุ่ม polyphenols เช่น myricetin quercetin-3-o-β-d-glucoside kaempferol gallic acid chlorogenic acid caffeic acid นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่ม glucosinolates alkaloids isothiocyanates vitamin tannin และ saponins (Meduri et al., 2022) มีรายงานว่าสารสกัดจากใบมะรุมน้ำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง มีความปลอดภัยในระดับสูงเมื่อศึกษาในสัตว์ทดลอง และไม่พบผลข้างเคียงใด ๆ ในการศึกษาในมนุษย์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ที่ใช้ผงใบมะรุมน้ำระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด โดยมีผลสนับสนุนจากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งผงใบและสารสกัด พบว่ามีฤทธิ์ชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ปกป้องอวัยวะต่าง ๆ (ตับ ไต หัวใจ อวัยวะและปอด) ลดอาการปวด ต้านแผลในกระเพาะ ลดความดันโลหิต ป้องกันรังสี และปรับสมดุลภูมิคุ้มกัน ซึ่งเชื่อว่าเป็นผลจากสาร polyphenols phenolic acids flavonoids glucosinolates และ alkaloids (Stojs & Hartman,

2015) ในทางเครื่องสำอาง สารสกัดจากใบมะรุมน้ำมีศักยภาพในการเป็นสารกันแดด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับปานกลางเมื่อใช้ร่วมกับสารอื่น เมื่อนำไปพัฒนาครีมที่มีสารสกัดใบมะรุมน้ำ 2% ร่วมกับ oxybenzone 2% ให้ค่า Sun Protection Factor: SPF ที่ดี (Tran Thi et al., 2024) นอกจากนี้สารสกัดใบมะรุมน้ำยังประกอบด้วยสาร Vicenin-2, 4-Caffeoylquinic acid และ Quercetin 3-O-glucoside ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์อิลาสเตส คอลลาจีเนส และไฮยาลูโรนิเดสได้ดีตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วย Multi-Target Bio-Affinity Ultrafiltration-High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: AUF-HPLC-MS ซึ่งช่วยเสริมความน่าเชื่อถือในศักยภาพของใบมะรุมน้ำในการเป็นส่วนประกอบหลักของผลิตภัณฑ์ดูแลผิวด้านความชรา ซึ่งสามารถต่อยอดสู่การพัฒนาในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเวชสำอางเพื่อต่อสู้กับปัญหาความชราและริ้วรอยได้ (Xu et al., 2022)

การหมัก (fermentation) ด้วยจุลินทรีย์ ได้รับการนำมาประยุกต์ใช้ในการวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ และได้รับการยอมรับว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารสำคัญบางชนิด และทำให้ฤทธิ์ชีวภาพเพิ่มขึ้นได้ เช่น การหมักเพื่อผลิต ubiquinone (Q10) hyaluronic acid และ resveratrol (Pérez-Rivero and López-Gómez, 2023) นอกจากนี้การหมักยังมีผลดีด้านสิ่งแวดล้อม ในตัวอย่างกรณีของ squalene ซึ่งเดิมได้มาจากตับฉลาม แต่ต่อมาสามารถผลิตได้จากการหมักโดยยีสต์และราชนิดต่าง ๆ เช่น *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Aspergillus nidulans* และ *Saccharomyces uvarum* (Patal et al., 2022)

เชื้อ *Aspergillus niger* เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้อย่างแพร่หลายในธรรมชาติ และมีความสามารถสูงในการผลิตและหลั่งสารชีวโมเลกุล เอนไซม์ และสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) ออกนอกเซลล์ จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการหมักอาหารแบบดั้งเดิม รวมถึงการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม *Aspergillus* สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น protease cellulase hemicellulase และ pectinase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโครงสร้างของผนังเซลล์พืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำลายสิ่งกีดขวางทางกายภาพระหว่าง hemicellulose และ lignin จึงช่วย

เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเส้นใย และการดูดซึมสารอาหารได้ดียิ่งขึ้น (Fan et al., 2023)

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการหมักใบมะรุมด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านไทโรซิเนสของน้ำหมักที่ได้ และพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อการบำรุงผิวรูปแบบอิมัลเจล เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับผักพื้นบ้านที่มีอยู่มากในท้องถิ่น ส่งเสริมการใช้ทรัพยากรชีวภาพอย่างยั่งยืน และตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่ต้องการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพ ปลอดภัย และเป็นมิตรต่อผิวในระยะยาว

### วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาการหมักใบมะรุมด้วยเชื้อ *A. niger* TISTR 3240
2. ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของน้ำหมักใบมะรุม
3. พัฒนาตำรับอิมัลเจลที่มีส่วนผสมของน้ำหมักใบมะรุมเพื่อบำรุงผิว

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. แหล่งที่มาของวัตถุดิบ สารเคมี และเชื้อจุลินทรีย์

ใบมะรุม (*Moringa oleifera* Lam.) อายุระหว่าง 1-2 เดือน ได้จากหมู่บ้านชุมชนในจังหวัดพิษณุโลก (Voucher specimen number: 05937 สถานที่เก็บ: PNU Herbarium คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร) พิสูจน์เอกลักษณ์พืชโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราณี นางงาม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร *Aspergillus niger* TISTR 3240 ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย gallic acid kojic acid tyrosinase mushroom quercetin 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl: DPPH 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine : TPTZ Folin Ciocalteu reagent 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine: L-DOPA ได้จากบริษัท Sigma-Aldrich (Switzerland) ferrous sulfate และ sodium acetate trihydrate ได้จากบริษัท Kemaus (Australia) sodium carbonate ferric chloride aluminum chloride ได้จาก

บริษัท Merck KgaA (Germany) สารเคมีในการพัฒนาตำรับอิมัลเจลได้จากบริษัท Phitsanuchemicals Co., Ltd. (Thailand)

#### 2. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger*

เตรียม Culture medium สำหรับเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยกลูโคส (50 g/l) และ yeast extract (20 g/l) ในน้ำกลั่น ให้ความร้อนและกวนผสมให้ละลายหมด แบ่งเติมลงใน Erlenmeyer flask-125 ml ฟลasks 50 ml นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นลง เชื้อเชื้อ *A. niger* ลงใน Erlenmeyer flask เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง ( $27\pm 2$  °C) เป็นเวลา 3 วัน

นำ spore suspensions มานับจำนวน ด้วย Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเจือจางด้วย culture medium ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ  $1\times 10^5$  spore/ml สำหรับใช้ในการหมักใบมะรุมต่อไป

#### 3. การเตรียมผงใบมะรุม

นำใบมะรุมมาล้างทำความสะอาด นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปบดเป็นผงละเอียดโดยการปั่น และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave ที่ อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที และเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท

#### 4. การหมักใบมะรุมด้วยเชื้อ *A. niger*

เตรียม Culture medium ประกอบด้วยกลูโคส (50 g/l) และ yeast extract (20 g/l) ในน้ำกลั่น ให้ความร้อนและกวนผสมให้ละลายหมด แบ่งเติมลงใน Erlenmeyer flask-125 ml ให้มีปริมาตรสุดท้าย 50 ml นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ autoclave ที่ อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นลง เติมผงใบมะรุม 5 g และ spore suspensions ของเชื้อ *A. niger* ปริมาตร 1 ml ( $1\times 10^5$  spore/ml) ลงใน Erlenmeyer flask เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าด้วยเครื่อง Orbital shaker ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง ( $27\pm 2$  °C) เก็บตัวอย่างทั้ง

flask ณ เวลา 1 2 และ 3 วัน มาเติม 80%v/v ethanol 50 ml/flask นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Orbital shaker ที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยสำลี แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (Feitosa et al., 2020) นำส่วนใส (supernatant) ไปทดสอบในส่วนต่อไป

ทำการทดสอบเช่นเดียวกันด้วยน้ำแช่โคมะรุ้ม โดยเติมเฉพาะ medium และผงโคมะรุ้ม แต่ไม่เติม spore suspensions เขย่าด้วยเครื่อง Orbital shaker ในสภาวะเดียวกันเป็นเวลา 1 วัน ก่อนเตรียมตัวอย่างไปทดสอบ

ทั้งนี้ การกำหนดความเข้มข้นของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบต่าง ๆ พิจารณาจากช่วงการตอบสนองเชิงเส้นของเครื่องมือวัด เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำและเชื่อถือได้

#### 5. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content: TPC) โดยวิธี Folin- Ciocalteu

เติมน้ำหมักโคมะรุ้ม (ความเข้มข้น 10 mg dry powder/ml) ปริมาณ 20 µl ลงใน 96-well plate จากนั้นเติม 10%w/v Folin Ciocalteu reagent ปริมาณ 50 µl และ 7.5%w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ปริมาณ 80 µl ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่ม (incubate) ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (SynergyH1, BioTek, Norway) ทดสอบเทียบกับสารละลาย gallic acid (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 - 80 µg/ml) และสร้างกราฟมาตรฐานของ gallic acid โดย plot ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น เพื่อหาสมการเส้นตรงและค่า r<sup>2</sup> (Singleton et al., 1999) คำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมในน้ำหมักโคมะรุ้มจากสมการเส้นตรงในหน่วย mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry herb

#### 6. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content: TFC) โดยวิธี Aluminum chloride colorimetry

เติมน้ำหมักโคมะรุ้ม (ความเข้มข้น 10 mg dry powder/ml) ปริมาณ 100 µl และ 2%w/v Aluminum

chloride ปริมาณ 100 µl ลงใน 96-well plate ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ทดสอบเทียบกับสารละลาย quercetin (ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5-80 µg/ml) และสร้างกราฟมาตรฐานของ quercetin โดย plot ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้น เพื่อหาสมการเส้นตรงและค่า r<sup>2</sup> คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในน้ำหมักโคมะรุ้มจากสมการเส้นตรงในหน่วย mg quercetin equivalent (QE)/g dry herb (Leakaya et al., 2018)

#### 7. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

เติมน้ำหมักโคมะรุ้ม (ความเข้มข้น 5 mg dry powder/ml) ปริมาณ 50 µl ลงใน 96-well plate จากนั้นเติม 0.2 mM DPPH ปริมาณ 100 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ทดสอบเทียบกับ ascorbic acid (positive control) ความเข้มข้นสุดท้าย 20-100 µg/ml คำนวณร้อยละในการต้านออกซิเดชัน (%Inhibition) (Blois, 1958) ดังสมการ (1)

$$\%Inhibiton = \frac{(Abs_{DPPH} - Abs_{sample})}{Abs_{DPPH}} \times 100 \quad (1)$$

โดยที่  $Abs_{DPPH}$  และ  $Abs_{sample}$  คือค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ไม่เติมและเติมสารทดสอบ ตามลำดับ

#### 8. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant power: FRAP

เติมสารละลาย FRAP reagent (300 mM acetate buffer pH 3.6 10 mM TPTZ ใน 40 mM hydrochloric acid และ 20 mM ferric chloride อัตราส่วน 10:1:1) ปริมาตร 270 µl ลงใน 96-well plate จากนั้นเติมน้ำหมักโคมะรุ้ม (ความเข้มข้น 5 mg dry powder/ml) ปริมาตร 30 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm ด้วยเครื่อง

microplate reader ทำการทดสอบเช่นเดียวกันโดยใช้สารละลาย ferrous sulphate (ความเข้มข้นสุดท้าย 10-80  $\mu\text{M}$ ) และสร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulphate โดย plot ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นเพื่อหาสมการเส้นตรงและค่า  $r^2$  (Benzie & Strain, 1996) คำนวณ FRAP value จากกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate โดยแทนที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบในสมการ รายงานผลในหน่วย  $\text{mM Fe}^{2+}/\text{g dry powder}$  (Kiattisin et al., 2019)

## 9. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสโดยวิธี Dopachrome

เติมน้ำหมักไบโอะรัม (ความเข้มข้น 5 mg dry powder/ml) หรือ kojic acid ความเข้มข้น 5-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ปริมาตร 40  $\mu\text{l}$  8.0 mM L-Dopa ใน 100 mM phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 40  $\mu\text{l}$  Tyrosinase mushroom 625 U/ml (ความเข้มข้นสุดท้าย 25 unit/well) ใน phosphate buffer ปริมาตร 40  $\mu\text{l}$  ใน 96-well plate และเติม phosphate buffer จนครบปริมาตร 200  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากัน และบ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส (%tyrosinase inhibition activity) ดังสมการ (2) (Kobkeatthawin et al., 2021)

$$\%Inhibiton = \frac{(Abs_{control} - Abs_{sample})}{Abs_{control}} \times 100 \quad (2)$$

โดยที่  $Abs_{control}$  และ  $Abs_{sample}$  คือค่าการดูดกลืนแสงที่ไม่เติมและเติมสารทดสอบตามลำดับ

## 10. การพัฒนาตำรับอิมัลเจลที่มีส่วนผสมของน้ำหมักไบโอะรัม

แยกเตรียมส่วนผสมต่าง ๆ ในตำรับ ได้แก่ Carbopol 940 (part A) และ sodium hyaluronate (part B) ในน้ำผสม viscolam AT isopropyl myristate cyclomethicone และน้ำหอมเข้าด้วยกัน (part C) ละลาย sodium citrate/citric

acid และ di-sodium EDTA ในน้ำ (part D) ผสมน้ำหมักไบโอะรัม และ glycerin ในน้ำ (part E) ผสมสารแต่ละส่วนเข้าด้วยกัน แล้วคนผสมจนเข้ากันดีจนได้เนื้อเนียน บรรจุลงในขวดแก้วเพื่อทดสอบความคงตัวต่อไป

## 11. การประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์

บรรจุผลิตภัณฑ์สำหรับทดสอบในขวดแก้วเพื่อศึกษาความคงตัว โดยประเมินความคงตัวทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ หลังจากเตรียมเสร็จทันที และเก็บไว้ ณ อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ ) และอุณหภูมิ 40  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 28 วัน และในสภาวะเร่ง (Heating cooling cycle) อุณหภูมิ 40  $^{\circ}\text{C}$  24 ชั่วโมง สลับกับอุณหภูมิ 4  $^{\circ}\text{C}$  24 ชั่วโมง จำนวน 6 รอบ (Meetham et al., 2018) การประเมินความคงตัวทางกายภาพ ได้แก่ การวัดความหนืดด้วย Viscometer (Brookfield AMETEX Model DV3T Spindle: CP-52, USA) เมื่ออุณหภูมิของตัวอย่างกลับสู่อุณหภูมิห้อง ( $27 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$ ) อย่างน้อย 30 นาที ประเมินสีด้วยการสังเกตและเครื่อง Chroma meter (HunterLab Model MiniScan EZ, USA) ประเมินความคงตัวทางเคมีโดยการวัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter (Mettler Toledo Model S213, Switzerland)

ประเมินความคงตัวทางจุลชีววิทยาเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์โดยวิธี Aerobic Plate Count (APC) ใช้ Nutrient Agar: NA เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยหยดตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ลงบนจาน NA และกระจายเชื้อด้วยแท่งแก้ว sterile L-shaped จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในตู้บ่มเชื้อแบบแอโรบิก สังเกตการเจริญของเชื้อในแต่ละวัน เทียบกับ Bacillus subtilis TISTR 1248 (Positive control) ( $1 \times 10^4$  CFU/ml) เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมของสภาวะการทดสอบ

## 12. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติด้วย ANOVA และ Paired t-test แสดงผลด้วยค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean  $\pm$  SD) ของการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ละครั้งทดสอบ 3 ซ้ำ

## ผลการวิจัย

### 1. คุณสมบัติน้ำหมักโคมะรุ่ม

น้ำหมักโคมะรุ่มที่หมักด้วยเชื้อ *A. niger* เป็นระยะเวลา 1 วัน มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอมน้ำตาลอ่อน และมีกลิ่นสมุนไพรเฉพาะตัวของโคมะรุ่ม เมื่อเพิ่มระยะเวลาการหมักเป็น 2 และ 3 วัน พบว่าสีของน้ำหมักมีความเข้มข้นเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลเข้ม ลักษณะของเหลวเริ่มขุ่น และกลิ่นสมุนไพรมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหมัก ส่วนน้ำแชโคมะรุ่ม 1 วัน มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเขียวมเหลือง และมีกลิ่นสมุนไพรเฉพาะตัวของโคมะรุ่ม

### 2. ปริมาณฟีนอลิกรวม และฟลาโวนอยด์รวมในน้ำหมักโคมะรุ่ม

จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content: TPC) และฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content: TFC) ในน้ำหมักโคมะรุ่มที่หมักด้วยเชื้อ *A. niger* เป็นเวลา 1 2 และ 3 วัน เทียบกับน้ำแชโคมะรุ่มที่ไม่เติมเชื้อและแช่ไว้ 1 วัน พบว่า น้ำแชโคมะรุ่ม 1 วันมีค่า TPC เท่ากับ  $11.54 \pm 0.45$  mg GAE/g dry herb ในขณะที่การหมักด้วยเชื้อ *A. niger* เป็นเวลา 1 วัน มีค่า TPC สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < .05$ ) เท่ากับ  $14.06 \pm 0.29$  mg GAE/g dry herb แต่มีแนวโน้มลดลงในวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก ( $p < .05$ )

ในทำนองเดียวกัน น้ำแชโคมะรุ่ม 1 วันมีค่า TFC เท่ากับ  $2.29 \pm 0.24$  mg QE/g dry herb ในขณะที่การหมักด้วยเชื้อ *A. niger* เป็นเวลา 1 วัน ทำให้ค่า TFC สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < .05$ ) เท่ากับ  $3.08 \pm 0.08$  mg QE/g dry herb แต่มีแนวโน้มลดลงในวันที่ 2 และ 3 ( $p < .05$ ) เช่นเดียวกัน (ตาราง 1)

### 3. ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำหมักโคมะรุ่ม

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำหมักโคมะรุ่มที่หมักด้วยเชื้อ *A. niger* เป็นเวลา 1 2 และ 3 วัน

เทียบกับน้ำแชโคมะรุ่มที่ไม่เติมเชื้อและแช่เป็นเวลา 1 วัน พบว่า น้ำแชโคมะรุ่มมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ด้วย %Inhibition เท่ากับ  $92.05 \pm 1.11\%$  ในขณะที่น้ำหมักโคมะรุ่ม 1 วัน มีฤทธิ์ยับยั้งใกล้เคียงกัน และเพิ่มขึ้นตามเวลาโดยสูงสุดในวันที่ 3 ( $95.81 \pm 3.89\%$ ) ( $p < .05$ ) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการยับยั้งสูงสุดของ ascorbic acid ( $94.84 \pm 0.66\%$ , ณ ความเข้มข้น  $80 \mu\text{g/ml}$ ) แต่มี potency ต่ำกว่า

ในทำนองเดียวกัน น้ำแชโคมะรุ่ม 1 วันมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันค่อนข้างสูงในการทดสอบ FRAP โดยมี FRAP value เท่ากับ  $21.60 \pm 1.74$  mM  $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  dry herb เมื่อเทียบกับน้ำหมักโคมะรุ่ม 1 วัน พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งใกล้เคียงกัน ( $22.01 \pm 0.79$  mM  $\text{Fe}^{2+}/\text{g}$  dry herb) แต่มีแนวโน้มลดลงในวันที่ 2 และ 3 ของการหมัก ( $p < .05$ ) (ตาราง 2)

### 4. ฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของน้ำหมักโคมะรุ่ม

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของน้ำหมักโคมะรุ่มด้วยวิธี Dopachrome เมื่อเติมเชื้อ *A. niger* และหมักเป็นเวลา 1 2 และ 3 วัน เทียบกับน้ำแชโคมะรุ่มที่ไม่เติมเชื้อและแช่เป็นเวลา 1 วัน พบว่า น้ำแชโคมะรุ่มมีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส โดยมีค่า %Inhibition เท่ากับ  $61.56 \pm 1.45\%$  ส่วนน้ำหมักโคมะรุ่มมีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < .05$ ) โดยมีค่า %Inhibition เมื่อหมัก 1 และ 2 วัน ใกล้เคียงกันเท่ากับ  $75.84 \pm 0.07$  และ  $75.66 \pm 1.59\%$  ตามลำดับ และมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยในวันที่ 3 ทั้งนี้ ค่า %Inhibition ของน้ำหมักโคมะรุ่มมีค่าสูงกว่า kojic acid ( $70.47 \pm 1.30\%$ , ณ ความเข้มข้น  $80 \mu\text{g/ml}$ ) แต่มี potency ต่ำกว่า (ตาราง 2) ตัวอย่างกราฟมาตรฐานจากการทดสอบต่าง ๆ แสดงดังภาพ 1

ตาราง 1

ปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) และฟลาโวนอยด์รวม (TFC) ของน้ำหมักใบมะรุมน้ำหมักด้วยเชื้อ *A. niger*

สารทดสอบ	เวลาหมัก (วัน)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)
น้ำหมักผงใบมะรุมน้ำหมัก	1	14.06±0.29*	3.08±0.08*
	2	11.07±1.19**	2.75±0.05**
	3	12.06±0.24**	1.36±0.19**
น้ำแช่ผงใบมะรุมน้ำหมัก	1	11.54±0.45	2.29±0.24

\*p<.05 เทียบกับน้ำแช่ผงใบมะรุมน้ำหมัก 1 วัน (n=3), \*\*p<.05 เทียบกับน้ำหมักผงใบมะรุมน้ำหมัก 1 วัน

ตาราง 2

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH และ FRAP และฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสของน้ำหมักผงใบมะรุมน้ำหมักด้วยเชื้อ *A. niger*

สารทดสอบ	เวลาหมัก (วัน)	DPPH Inhibition (%)	FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> / g dry herb)	Dopachrome Inhibition (%)
น้ำหมักผงใบมะรุมน้ำหมัก	1	90.90±3.10	22.01±0.79	75.84±0.07*
	2	94.84±2.21**	20.53±1.82**	75.66±1.59
	3	95.81±3.89**	19.64±0.73**	74.31±1.09
น้ำแช่ผงใบมะรุมน้ำหมัก	1	92.05±1.11	21.60±1.74	61.56±1.45
Ascorbic acid	-	94.84±0.66 <sup>a</sup>	-	-
Kojic acid	-	-	-	70.47±1.30 <sup>b</sup>

a IC<sub>50</sub> of ascorbic acid: 42.74±0.47 µg/ml (DPPH), b IC<sub>50</sub> of kojic acid: 67.17±1.42 µg/ml (Dopachrome)

\*p<.05 เทียบกับน้ำแช่ผงใบมะรุมน้ำหมัก 1 วัน (n=3), \*\*p<.05 เทียบกับน้ำหมักผงใบมะรุมน้ำหมัก 1 วัน

5. การพัฒนาตำรับ Moringa emulgels

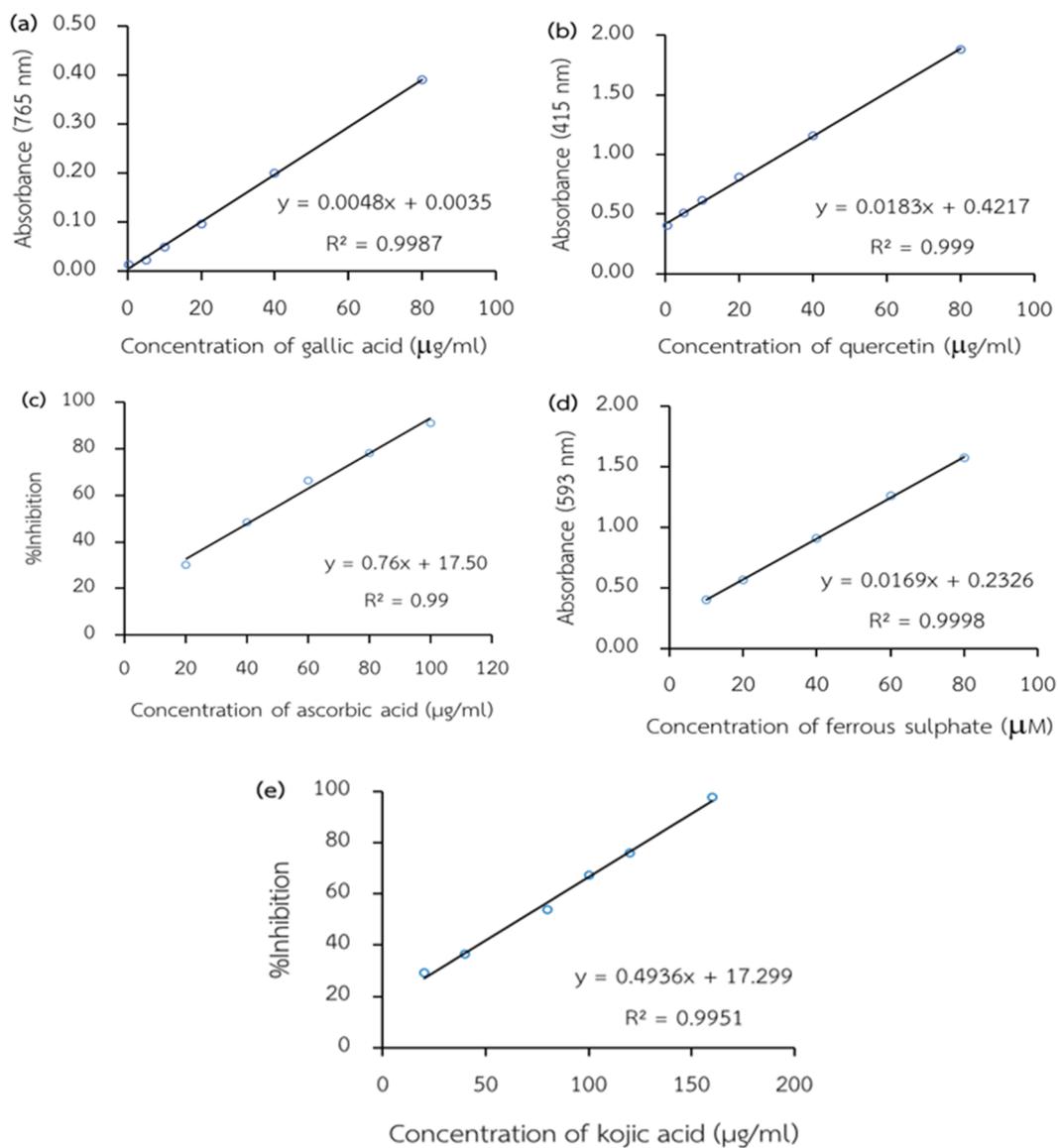
ในการพัฒนาตำรับ Moringa emulgel ได้มีการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของสูตรตำรับ (ตาราง 3) ทั้งหมด 13 สูตร เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสบางเบา ไม่มันจนเกินไป มีความหนืดปานกลาง มีความคงตัว และปลอดภัยต่อการใช้งาน โดยเริ่มจากการปรับความเข้มข้นของสารก่อเจล Carbopol 940 ในสูตรที่ 1-3 ในช่วงความเข้มข้น 0.5-1.5% พบว่า สูตรที่ 2 ซึ่งใช้ความเข้มข้น 1% ให้เนื้อสัมผัสที่เหมาะสม ไม่เหลวหรือข้นจนเกินไป จึงนำไปใช้พัฒนาต่อในสูตรที่ 4-6 โดยปรับระดับของ Viscolam AT 100P ที่ระดับ 2-4% พบว่า สูตรที่ 5 ซึ่ง

ใช้ความเข้มข้น 3% ให้เนื้อ emulgel ที่มีความเสถียร ไม่แยกชั้น และมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดีที่สุด ในสูตรที่ 7-9 ได้ปรับสัดส่วนของสาร emollients พบว่า สูตรที่ 9 ซึ่งมี isopropyl myristate และ cyclomethicone อย่างละ 2% มีคุณสมบัติซึมซาบได้ดี ไม่เหนียวเหนอะหนะ และได้มีการเติมสารเพิ่มความชุ่มชื้น ได้แก่ glycerine และ sodium hyaluronate ในสูตรที่ 10-11 จากนั้นเติมน้ำหมักใบมะรุมน้ำหมักความเข้มข้น 1.0% และ 1.5% ในสูตรที่ 12 และ 13 ตามลำดับ พร้อมทั้งเติม citrate buffer สารกันเสีย สารแต่งกลิ่น และปรับ pH ด้วย triethanolamine

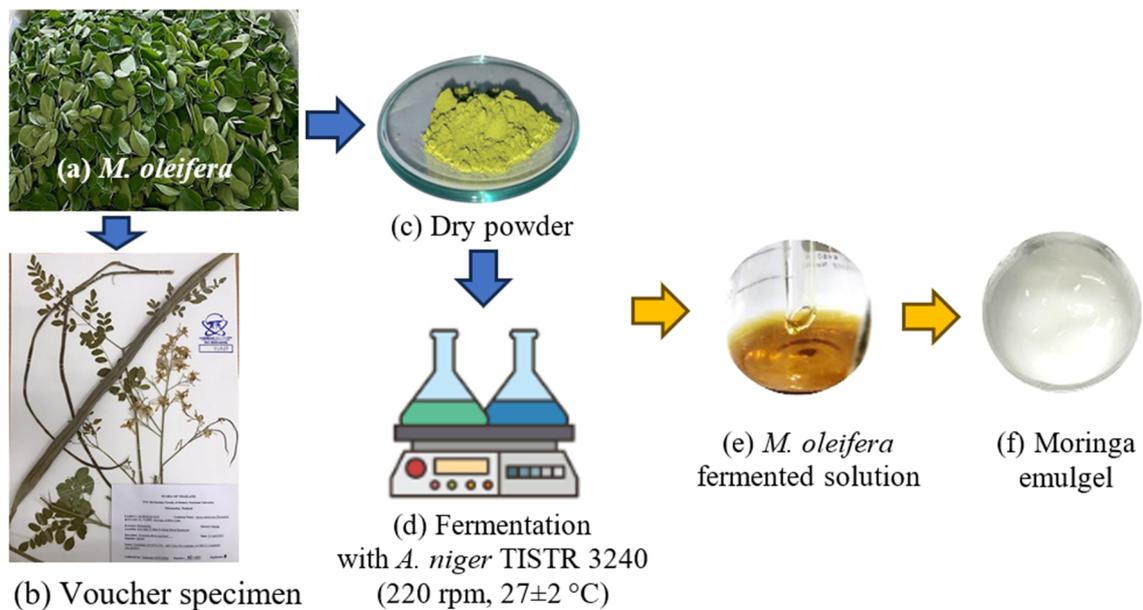
จากการพัฒนาตำรับ พบว่า ตำรับที่ 13 (ME-13) ซึ่งประกอบด้วยน้ำหมัก 1%w/w เป็นสูตรที่ดีที่สุด เนื่องจากมีคุณสมบัติตรงตามที่กำหนดไว้ มีสีและกลิ่นของน้ำหมักที่ไม่เข้มข้นจนเกินไป มีสีขาวนวลเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เมื่อวัดด้วย Chroma meter มีค่าพิกัดสี  $L^*a^*b^*$  เท่ากับ 63.48 -0.79 และ -2.98 แสดงถึงสีขาวเจือสีเขียวอมฟ้าอ่อน มีสีสว่างมากกว่า emulgel base เล็กน้อย ซึ่ง emulgel base (ส่วนผสมเหมือนตำรับ ME-13 แต่ไม่เติมน้ำหมักใบมะรุ้ม) เมื่อเตรียมเสร็จใหม่จะมีสีขาวนวลเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า มีค่าพิกัดสี  $L^*a^*b^*$  เท่ากับ 59.48 -0.47 และ -4.35 ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ถึงสีขาวที่มีอินเตอร์โทเนียน เจือเขียวอม

ฟ้าเล็กน้อย ความแตกต่างของสี ( $\Delta E$ ) ระหว่าง emulgel base กับ ME-13 เท่ากับ 4.24 ซึ่งอยู่ในช่วงที่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยสายตา

ตำรับ ME-13 มีเนื้อสัมผัสบางเบา ไม่มันจนเกินไป มีความหนืดปานกลาง สามารถเกลี่ยบนผิวได้ง่าย มีกลิ่นหอมอ่อนแนวดอกไม้ผสมสมุนไพร สามารถช่วยกลบกลิ่นของส่วนผสมต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตำรับมีค่า pH 5.0-5.5 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับผิวหนัง ขั้นตอนการวิจัยเพื่อเตรียม *M. oleifera* emulgel Voucher specimen ของใบมะรุ้ม ลักษณะผงใบแห้ง *M. oleifera* fermented solution และ *M. oleifera* emulgel แสดงดังภาพ 2



ภาพ 1 ตัวอย่างกราฟมาตรฐาน (a) gallic acid จากการทดสอบ TPC (b) quercetin จากการทดสอบ TFC (c) ascorbic acid จากการทดสอบ DPPH (d) ferrous sulphate จากการทดสอบ FRAP และ (e) kojic acid จากการทดสอบ dopachrome



ภาพ 2 (a) ใบมะรุม (*M. oleifera* Lam.) (b) Voucher specimen (c) ผงใบแห้ง (d) สภาวะการหมักผงใบมะรุมด้วยเชื้อ *A. niger* TISTR 3240 (e) fermented solution และ (f) Moringa emulgel

## 6. ความคงตัวของตำรับ Moringa emulgel

จากการศึกษาความคงตัวของ Moringa emulgel ตำรับที่ 13 (ME-13) เทียบกับ emulgel base เมื่อเก็บในสภาวะต่าง ๆ พบว่า ตำรับ emulgel base มีสีค่อนข้างคงตัว มีค่าสีเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเก็บในสภาวะแรง โดยมีความสว่างของสีเพิ่มขึ้น สำหรับสีของ Moringa emulgel พบค่าสีเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แต่ในสภาวะแรง มีค่าความสว่าง ( $L^*$ ) ลดลง แสดงถึงสีที่เข้มขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของสีจนเป็นที่สังเกต

ตำรับ ME-13 เมื่อเตรียมเสร็จใหม่มีความหนืดเท่ากับ  $28,435 \pm 643.47$  cP เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง 28 วัน ความหนืดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ( $29,550 \pm 1541.49$  cP) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเก็บที่  $40^\circ\text{C}$  28 วัน ความหนืดจะเพิ่มขึ้นอย่างมาก ( $p < .05$ ) ในขณะที่การเก็บในสภาวะแรงทำให้ความหนืดลดลง ( $p < .05$ ) ตำรับ emulgel base เมื่อเตรียมเสร็จใหม่จะมีความหนืด ( $35,280 \pm 622.25$  cP) สูงกว่าตำรับ ME-13 อย่างมีนัยสำคัญ ความหนืดจะเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง 28 วัน แต่ลดลงในสภาวะแรงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < .05$ ) ยกเว้นที่อุณหภูมิ  $40^\circ\text{C}$  ความหนืดไม่เปลี่ยนแปลง

ME-13 และ emulgel base มีความเป็นกรด-

ต่าง (pH) ในช่วงแคบ ( $5.38-5.44$ ) และคงที่ตลอดระยะเวลาการศึกษา โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และไม่แสดงแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงแม้ภายใต้สภาวะแรง ทั้งตำรับ ME-13 และ emulgel base ไม่พบการเจริญของจุลชีพในทุกสภาวะการเก็บ (ตาราง 4) ในขณะที่ *B. subtilis* (positive control) มีการเจริญบน NA อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการป่มที่ใช้ในการทดสอบมีความเหมาะสม

## การอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาการหมักผงใบมะรุมด้วยเชื้อ *A. niger* เป็นเวลา 3 วัน พบว่า น้ำหมักใบมะรุมที่หมักเป็นระยะเวลา 1 วัน มีลักษณะทางกายภาพและกลิ่นที่เหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง การหมักในระยะเวลาที่นานขึ้นส่งผลให้น้ำหมักมีสีเข้มขึ้น เริ่มมีความขุ่นและมีกลิ่นที่เข้มข้นมากเกินไป ซึ่งอาจลดความน่าใช้ของผลิตภัณฑ์ได้ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพดังกล่าวอาจเกิดจากกระบวนการย่อยสลายโครงสร้างของเซลล์พืชโดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. niger* เช่น เซลลูเลส (cellulase) และเฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) ซึ่งส่งผลให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพถูกปลดปล่อยออกมาสู่น้ำหมักมากขึ้น (Pandey

et al., 2016) การเพิ่มขึ้นของสี ความขุ่น และกลิ่นของน้ำหมักสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดที่สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของสารชีวภาพในกระบวนการหมัก สอดคล้องกับรายงานการหมักพืชสมุนไพรชนิดอื่นที่พบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกัน (Li et al., 2020) อย่างไรก็ตาม แม้ว่ากรรมวิธีในระยะเวลาอาจส่งเสริมการปลดปล่อยสารชีวภาพต่าง ๆ แต่ควรพิจารณาองค์ประกอบอื่นร่วมด้วย เช่น ความเหมาะสมของลักษณะปรากฏ ปริมาณและความแรงของสารออกฤทธิ์ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีทั้งคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดีและมีการใช้ในการทดลอง ได้ศึกษาเปรียบเทียบกับผลของน้ำแช่ใบมะรุม 1 วันเพื่อประเมินผลของการหมักจุลินทรีย์ โดยน้ำแช่ใบมะรุมมีแนวโน้มให้สารกลุ่มฟีนอลิกที่ละลายน้ำได้บางชนิด ขณะที่น้ำหมักอาจมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ที่หลากหลายและมีความซับซ้อนมากขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์ของจุลินทรีย์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม (Total Phenolic Content: TPC) และฟลาโวนอยด์รวม (Total Flavonoid Content: TFC) ในน้ำแช่ใบมะรุมที่ไม่เติมเชื้อ *A. niger* พบองค์ประกอบของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในระดับหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่ระบุว่า ใบมะรุมเป็นแหล่งสำคัญของสารออกฤทธิ์ชีวภาพกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ (Stohs & Hartman, 2015; Vergara-Jimenez et al., 2017) เมื่อพิจารณาผลของกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อ *A. niger* พบว่า มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์อย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงเวลาหมัก 1 วัน ซึ่งให้ค่า TPC และ TFC สูงสุดในการทดลอง ทั้งนี้ อาจเป็นผลจากเอนไซม์ที่สร้างจากเชื้อ *A. niger* เช่น cellulase และ  $\beta$ -glucosidase ช่วยย่อยสลายผนังเซลล์พืชและส่งเสริมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ออกมาสู่สารละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### ตาราง 3

ส่วนประกอบของสูตรตำรับ Moringa emulgels ตำรับที่ 13 (ME-13) และ emulgel base

Ingredients	emulgel base (%w/w)	ME-13 (%w/w)	Uses
Carbopol 940	1.0	1.0	Gel-forming agent
Viscolam AT 100P	3.0	3.0	Emulsifier
Isopropyl myristate	2.0	2.0	Emollient
Cyclomethicone	2.0	2.0	Emollient
Sodium hyaluronate	0.25	0.25	Humectant
Glycerine	2.0	2.0	Humectant
<i>M. oleifera</i> fermented solution	-	1.0	Brightening agent
Di-sodium EDTA	0.01	0.01	Chelating agent
Citrate buffer	10	10	Buffering agent
Microcare PHC	0.6	0.6	Preservative
Fragrance	0.1	0.1	Fragrance
Triethanolamine	adjust pH to 5.5	adjust pH to 5.5	Neutralizer
Deionized water to	100	100	Solvent

ตาราง 4

คุณสมบัติของ *Moringa emulgel* ตำรับที่ 13 (ME-13) และความคงตัวของตำรับ ฯ

ตำรับ	สภาวะการเก็บ	สี	ความหนืด (cP)	pH	Microbial growth
ME-13	เตรียมเสร็จใหม่	ขาวนวล	28,435±643.47 <sup>b</sup>	5.40±0.01	ไม่พบเชื้อ
	อุณหภูมิห้อง 28 วัน	ขาวนวล	29,550±1541.49 <sup>b</sup>	5.41±0.01	ไม่พบเชื้อ
	40 °C 28 วัน	ขาวนวล	35,460±1994.04 <sup>a</sup>	5.39±0.01	ไม่พบเชื้อ
	สภาวะเร่ง	ขาวนวล	25,480±1230.37a,b	5.38±0.01	ไม่พบเชื้อ
emulgel base	เตรียมเสร็จใหม่	ขาว	35,280±622.25	5.42±0.02	ไม่พบเชื้อ
	อุณหภูมิห้อง 28 วัน	ขาว	38,400±367.70 <sup>a</sup>	5.44±0.00	ไม่พบเชื้อ
	40 °C 28 วัน	ขาว	34,370±113.14	5.39±0.01	ไม่พบเชื้อ
	สภาวะเร่ง	ขาว	32,405±473.76 <sup>a</sup>	5.40±0.03	ไม่พบเชื้อ

หมายเหตุ: แสดงผลด้วยค่า Mean±SD (n=3) ap<.05 เทียบกับตำรับเดียวกันเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ และ bp<.05 ME-13 เทียบกับ emulgel base ในสภาวะการเก็บเดียวกัน วัดความหนืดด้วย Brookfield AMETEK DV3T Cone Plate Spindle CP-52 ความเร็วรอบ 5 rpm อุณหภูมิ 25±2°C และ %Torque 70–90%

อย่างไรก็ตาม เมื่อระยะเวลาการหมักยาวนานเกินกว่า 1 วัน ปริมาณ TPC และ TFC มีแนวโน้มลดลงสอดคล้องกับรายงานของ Feitosa et al. (2020) และ Starzyńska-Janiszewska et al. (2022) ซึ่งพบว่า เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้น TPC TFC และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีแนวโน้มลดลง มีความเป็นไปได้ว่า อาจเกิดจากการเสื่อมสลายของสารออกฤทธิ์บางชนิดผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในการหมักต่อเนื่อง หรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารสำคัญบางชนิดจนไม่สามารถตรวจวัดได้ในรูปแบบเดิม นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังอาจใช้สารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์บางส่วนเป็นแหล่งพลังงานหรือสารตั้งต้นในกระบวนการเมแทบอลิซึม ส่งผลให้ปริมาณของสารเหล่านี้ลดลงในช่วงหลังของการหมักสัมพันธ์กับแนวโน้มการลดลงของฤทธิ์ชีวภาพ แสดงให้เห็นความสำคัญของการกำหนดระยะเวลาหมักที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ชีวภาพสูงสุด

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำแช่ใบมะรุมที่ไม่เติมเชื้อ *A. niger* พบว่า มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับสูง สอดคล้องกับรายงานของ Vergara-Jimenez

et al. (2017) ที่ระบุว่า ใบมะรุมมีปริมาณสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ปริมาณมาก ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ การหมักด้วยเชื้อ *A. niger* สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้เล็กน้อยจากสภาวะเริ่มต้นที่มีค่าสูงอยู่แล้ว สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า ใบมะรุมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงโดยธรรมชาติ (Sreelatha et al., 2009; Fitriana et al., 2016) จึงอาจส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ชีวภาพหลังการหมักไม่แตกต่างกัน ในทำนองเดียวกัน Feitosa et al. (2020) รายงานว่าการหมักผงใบมะรุมในสภาวะแบบของแข็ง (solid-state fermentation) โดยใช้เชื้อ *A. niger* ทำให้ปริมาณสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้น 136.4% และฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นถึง 783.1% เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากใบมะรุมที่ไม่ผ่านการหมัก ในสภาวะความชื้น 50 และ 70% เมื่อสกัดด้วย 80% ethanol และ 80% acetone ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power assay การหมักดังกล่าวยังส่งผลให้เกิดการสร้างสารประกอบฟีนอลิกชนิดใหม่จำนวน 14 ชนิด ซึ่งไม่พบก่อนการหมัก ได้แก่ (2-hydroxycinnamic

acid kaempferol 3-glicoside p-coumaric acid trans-cinnamic acid luteolin caffeic acid isorhamnetin 6,2 dihydroxyflavone chlorogenic acid epicatechin epigallocatechin gallate quercetin taxifolin และ ferulic acid) โดยสารเหล่านี้มีรายงานว่า มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลชีพอย่างมีประสิทธิภาพ ผลการศึกษานี้จึงสะท้อนให้เห็นว่า แม้ไบโหมมารูจะมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในระดับสูงโดยธรรมชาติ แต่กระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ที่เหมาะสม เช่น *A. niger* มีบทบาทในการเสริมฤทธิ์และปรับเปลี่ยนองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพหรือเครื่องสำอางที่เน้นคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้ TPC TFC และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของน้ำหมักไบโหมมารูที่ได้จากงานวิจัย ที่แตกต่างจากรายงานของ Feitosa et al. (2020) นั้น อาจเกิดได้จากความแตกต่างของแหล่งที่มาของพืช และสภาวะการหมักซึ่ง Feitosa et al. (2020) ทำการหมักไบโหมมารูแบบสถานะของแข็ง (Solid-state fermentation: SSF) และทำการศึกษานิตของน้ำยาสกัดที่เหมาะสม จึงได้ TPC TFC และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่สูงกว่า

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่า น้ำแช่ไบโหมมารู 1 วันมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส โดยไบโหมมารูมีฤทธิ์ สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า กระบวนการหมักมีบทบาทในการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Laksamiani et al. (2022) ที่รายงานว่า สารสกัดไบโหมมารูที่สกัดด้วยวิธี maceration มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 115.36  $\mu\text{g/ml}$  (โดยเปรียบเทียบกับ kojic acid ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 48.90  $\mu\text{g/ml}$ ) โดยคาดว่า สาร quercetin ในไบโหมมารูเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ดังกล่าว นอกจากนี้ Hashim et al. (2021) ยังพบว่า สารสกัดไบโหมมารูสามารถลดการสร้างเมลานินโดยยับยั้งไทโรซิเนสผ่านกลไก uncompetitive inhibition (ค่า  $K_{ii} = 73 \mu\text{g/ml}$ ) โดยมี luteolin เป็นสารสำคัญร่วมที่มีบทบาทในการยับยั้งเอนไซม์ พร้อมกับมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเสริมฤทธิ์การทำงาน ในส่วนของงานวิจัยโดย Nurzak et al. (2022) ได้

พัฒนาผลิตภัณฑ์ครีมจากสารสกัดไบโหมมารูที่เตรียมด้วยการหมักใน 70% ethanol พบว่าสารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนส ด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 92.37 $\pm$ 8.11  $\mu\text{g/ml}$  (เทียบกับ kojic acid ที่มีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 65.03 $\pm$ 2.44  $\mu\text{g/ml}$ ) และเมื่อนำไปพัฒนาเป็นครีมบำรุงผิว พบว่ามีคุณสมบัติทางเครื่องสำอางที่ดี เช่น ค่า pH ที่เหมาะสม ความเป็นเนื้อเดียวกัน และการกระจายตัวของผลิตภัณฑ์ จากข้อมูลข้างต้น แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากไบโหมมารูมีฤทธิ์ในการยับยั้ง tyrosinase activity ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน จึงมีแนวโน้มในการนำไปใช้เพื่อส่งเสริมให้ผิวแลดูกระจ่างใส อีกทั้งการหมักยังเป็นกระบวนการที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของฤทธิ์ชีวภาพดังกล่าว จึงสามารถพัฒนาน้ำหมักไบโหมมารูให้เป็นสารออกฤทธิ์จากธรรมชาติที่มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางเพื่อผิวกระจ่างใสและการชะลอวัยของผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม เพื่อให้มั่นใจในความปลอดภัยและประสิทธิผลของผลิตภัณฑ์ จำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพและกำหนดมาตรฐานของสารสำคัญอย่างเป็นระบบ

ในการเตรียมผงไบโหมมารูสำหรับหมัก ได้ทำการฆ่าเชื้อผงไบโหมมารูด้วย autoclave เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อน และควบคุมการหมักให้เกิดเฉพาะเชื้อที่ต้องการ เพื่อความสม่ำเสมอของกระบวนการหมักและความปลอดภัย อย่างไรก็ตาม ความร้อนสูงจากกระบวนการดังกล่าวอาจส่งผลให้สารสำคัญ เช่น สารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ เสื่อมสภาพหรือลดลง หากมีการพัฒนาในระดับอุตสาหกรรม อาจพิจารณาใช้วิธีฆ่าเชื้อแบบไม่ใช้ความร้อน (non-thermal sterilization) เพื่อคงคุณค่าสารออกฤทธิ์ได้ดียิ่งขึ้น

ในการพัฒนาตำรับ Moringa emulgel เลือกใช้ Carbopol 940 เป็นสารก่อเจลหลัก โดยปรับค่า pH ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมเพื่อส่งเสริมการเกิดโครงสร้างสามมิติของเนื้อเจล ซึ่งช่วยเพิ่มความหนืดและความคงตัวของตำรับ พร้อมทั้งใช้ Viscolam AT 100P เป็นสารเพิ่มความหนืดอีกชนิดหนึ่งซึ่งช่วยเสริมการเกิดอิมัลชันและรักษาความคงตัวของระบบอิมัลชัน ทั้งยังมีบทบาทในการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ให้เนียนนุ่ม นอกจากนี้มีการใช้ isopropyl myristate เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้น ลดความเหนอะหนะ

และเสริมการซึมผ่านของสารออกฤทธิ์เข้าสู่ผิวหนัง ส่วน glycerin ทำหน้าที่เป็นสารให้ความชุ่มชื้นโดยดูดความชื้นจากสิ่งแวดล้อมและช่วยกักเก็บน้ำในผิวหนัง ลดการสูญเสียน้ำและคงความชุ่มชื้นของผิว เติมน้ำ Cyclomethicone เพื่อช่วยเพิ่มความลื่น เคลือบง่าย ลดความเหนอะหนะ และให้ความรู้สึกสบายผิวหลังการใช้ เติมน้ำสารควบคุม pH ได้แก่ sodium citrate และ citric acid ในขณะที่ di-sodium EDTA ทำหน้าที่เป็นสารคีเลต และ Microcare PHC ทำหน้าที่เป็นสารกันเสียเพื่อเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในระยะยาว ในสูตรนี้เติมน้ำหมักไบโอะรูมความเข้มข้น 1% w/w ซึ่งคิดเป็นปริมาณสารออกฤทธิ์อย่างน้อยสองเท่าของความเข้มข้นที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (โดยวิธี DPPH และ FRAP) และฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส จากการประเมินพบว่าตำรับ ME-13 เป็นตำรับที่มีคุณลักษณะที่ดีที่สุด โดยมีลักษณะของอิมัลเจลที่เหมาะสมตามต้องการ อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเพียงแนวทางเบื้องต้น เนื่องจากประสิทธิภาพของน้ำหมักเมื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น เช่น ความสามารถในการซึมผ่านผิวหนัง การปลดปล่อยสารออกฤทธิ์จากตำรับ ความคงตัว รวมถึงปฏิสัมพันธ์กับสารอื่นในตำรับ การประเมินประสิทธิภาพเพิ่มเติมทั้งในระดับ ex vivo และ in vivo จะช่วยยืนยันการนำไปใช้จริงได้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

ตำรับ ME-13 มีสีขาวนวลซึ่งได้จากน้ำหมักไบโอะรูมที่มีสารพฤกษเคมีให้สีตามธรรมชาติ เมื่อเก็บในสถานะต่าง ๆ สีของผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มเข้มข้นภายใต้สภาวะเร่ง (accelerated condition) โดยตรวจวัดจากเครื่อง Chroma meter อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงสีไม่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า ตำรับ ME-13 มีความหนืดต่ำกว่า emulgel base เล็กน้อย ซึ่งคาดว่าเกิดจากผลของน้ำหมักไบโอะรูมต่อโครงสร้างพอลิเมอร์ในระบบเจล และอาจมีผลร่วมจากแอลกอฮอล์ในปริมาณเล็กน้อย (0.4% w/w) จากกระบวนการสกัด อย่างไรก็ตาม ตำรับมีความหนืดค่อนข้างคงที่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง แม้จะมีความผันผวนอยู่บ้างภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่าง แต่ค่าความหนืดยังอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการใช้ในเครื่อง

สำอาง การเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้องจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมในการรักษาความคงตัวของตำรับ นอกจากนี้ pH ของตำรับ ME-13 ยังมีความคงที่ตลอดระยะเวลาการศึกษาในทุกสภาวะการเก็บ ซึ่งสะท้อนถึงความคงตัวของระบบ emulgel และองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากน้ำหมักไบโอะรูม อีกทั้งยังไม่พบการเจริญของจุลชีพใดในทุกสภาวะการเก็บ แสดงถึงประสิทธิภาพของระบบสารกันเสียที่เลือกใช้ และความสะอาดของกระบวนการผลิต ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า น้ำหมักไบโอะรูมที่เตรียมโดยใช้เชื้อ *A. niger* TISTR 3240 เป็นเวลา 1 วัน สามารถเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ รวมถึงเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งไทโรซิเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ การพัฒนา Moringa emulgel ที่มีส่วนผสมของน้ำหมักไบโอะรูมได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพเหมาะสม มีความคงตัวทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยาที่น่าพอใจ และแนะนำให้เก็บในอุณหภูมิห้องโดยหลีกเลี่ยงการเก็บในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง

แม้ผลการศึกษานี้จะแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของน้ำหมักไบโอะรูมที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านไทโรซิเนส ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอางได้ อย่างไรก็ตามควรทำการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์และสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* ในผลิตภัณฑ์อย่างเป็นทางการทั้งในน้ำหมักและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป เพื่อยืนยันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์

ในอนาคต ควรมีการศึกษาผลของปริมาณและคุณสมบัติของน้ำหมักไบโอะรูมที่มีต่อความคงตัวของตำรับเพิ่มเติม รวมถึงการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารพฤกษเคมีในน้ำหมัก และติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของน้ำหมัก เพื่อเป็นข้อมูลประกอบในการกำหนดองค์ประกอบในตำรับอิมัลเจลที่พัฒนาขึ้น ตลอดจนการทดสอบความคงตัวระยะยาว การศึกษาประสิทธิภาพในการบำรุงผิวในอาสาสมัคร เพื่อยืนยันผลเชิงคลินิกและสนับสนุนการพัฒนาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร งบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

และทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์สำหรับปริญญาตรี ประจำปีการศึกษา 2566 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (P1-66-014)



## References

- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.  
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.  
<https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- EIN Presswire. (2024). *Natural health products market to hit US\$ 93.9 billion by 2033*. Retrieved from <https://www.einpresswire.com/article/789980669/natural-health-products-market-to-hit-us-93-9-billion-by-2033>
- Fan, Z., Chen, T., Cai, G., Huang, X., Zhong, S., Li, X., & Zhang, E. (2023). Effect of *Aspergillus niger* fermentation on the metabolites in corn stalks. *Fermentation*, 9(1), 50.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation9010050>
- Feitosa, P. R. B., Santos, T. R. J., Gualberto, N. C., Narain, N. N., & Santana, L. C. L. A. (2020). Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* for the bio-enrichment of bioactive compounds in *Moringa oleifera* leaves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101878.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101709>
- Fitriana, W., Ersam, T., Shimizu, K., & Fatmawati, S. (2016). Antioxidant activity of *Moringa oleifera* extracts. *Indonesian Journal of Chemistry*, 16(3), 297–301. <https://doi.org/10.22146/ijc.21145>
- Grand View Research. (2024). *Natural cosmetics market size, share & trends analysis report*. Retrieved from <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-natural-cosmetics-market>
- Hashim, F., Vichitphan, S., Han, J., & Vichitphan, K. (2021). Alternative approach for specific tyrosinase inhibitor screening: Uncompetitive inhibition of tyrosinase by *Moringa oleifera*. *Molecules*, 26(15), 4576.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26154576>

- Kiattisin, K., Intasai, N., Nitthikan, N., Nantararat, T., Lee, K. H., Lin, W. H. (2019). Antioxidant, anti-tyrosinase, anti-aging potentials and safety of Arabica coffee cherry extract. *Chiang Mai Journal of Science*, 46(5), 930–935. Retrieved from <https://www.thaiscience.info/Journals/Article/CMJS/10990686.pdf> (in Thai)
- Kobkeatthawin, T., Chantrapromma, S., Suwunwong, T., Rhyman, L., Choong, Y. S., & Mungkin, P. (2021). Synthesis, molecular docking and tyrosinase inhibitory activity of the decorated methoxy sulfonamide chalcones. *Sains Malaysiana*, 50(9), 2603–2604. <https://doi.org/10.17576/jsm-2021-5009-09>
- Laksmiani, N. P. L., Widiyantara, I. W. A., & Pawarrangan, A. B. S. (2022). Potency of moringa (*Moringa oleifera* L.) leaves extract containing quercetin as a depigmentation agent inhibiting the tyrosinase enzyme using in-silico and in-vitro assay. *Pharmacia*, 69(1), 85–92. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.69.e73132>
- Leakaya, N., Sato, V. H., & Chewchinda, S. (2018). Antioxidant activity, total phenolic, total flavonoid content and HPTLC analysis of morin in *Maclura cochinchinensis* heartwood extract. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42, 27–31. (in Thai)
- Li, H., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y. (2020). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>
- Meduri, S. S., Govindharaj, P., Amutha, S., Geetha, P. S., Kanchana, S., & Mini, M. L. (2022). *Moringa oleifera*; A miracle tree - Review on bioactive compounds, its therapeutic properties, application of innovative technology and value addition. *Ymer*, 21(5), 256–269. <https://doi.org/10.37896/YMER21.05/30>
- Meetham, P., Kanlayavattanakul, M., & Lourith, N. (2018). Development and clinical efficacy evaluation of anti-greasy green tea toner on facial skin. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 28(2), 214–217. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.01.001>
- Miner, P. E. (1993). Emulsion rheology: creams and lotions. In D. Laba (Ed.), *Rheological properties of cosmetics and toiletries* (pp. 313–370). New York, Marcel Dekker.
- Nurzak, A. N., Wahyuni, D. F., Yunus, A., & Baso, F. F. (2022). Skin brightening cream formulation and tyrosinase inhibition assay of moringa leaf extract. *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Science*, 2(7), 187–190. <https://doi.org/10.47191/ijpbms/v2-i7-01>
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Soccol, V. T., Vandenberghe, L. P. S., & Mohan, R. (2016). Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: Cassava bagasse. *Bioresource Technology*, 74(1), 81–87. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00143-1)

- Patel, A., Bettiga, M., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2022). Microbial genetic engineering approach to replace shark livering for squalene. *Trends in Biotechnology*, 40(10), 1261–1273. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.03.008>
- Pérez-Rivero, C., & López-Gómez, J. P. (2023). Unlocking the potential of fermentation in cosmetics: A review. *Fermentation*, 9(5), 463. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050463>
- Saroha, A., Verma, A., Dahiya, A., Singh, L., & Garg, R. (2022). Updated review on topical liposomal gel. *International Journal of Health Sciences*, 6(S1), 7475–7491. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS1.6595>
- Sreelatha, S., & Padma, P. R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of Moringa oleifera leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 303–311. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0141-0>
- Starzyńska-Janiszewska, A., Stodolak, B., Fernandez-Fernandez, C., Mickowska, B., Verardo, V., & Gómez-Caravaca, A. M. (2022). Phenolic profile, antioxidant activity and amino acid composition of Moringa leaves fermented with edible fungal strains. *Foods*, 11(23), 3762. <https://doi.org/10.3390/foods11233762>
- Stohs, S. J., & Hartman, J. H. (2015). Review of the safety and efficacy of Moringa oleifera. *Phytotherapy Research*, 29(6), 796–804. <https://doi.org/10.1002/ptr.5325>
- Tadić, V. M., Žugić, A., Martinović, M., Stanković, M., Maksimović, S., Frank, A., & Nešić, I. (2021). Enhanced skin performance of emulgel vs. cream as systems for topical delivery of herbal actives (Immortelle extract and hemp oil). *Pharmaceutics*, 13(11), 1919. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111919>
- Tran, T. P. A., Tran, T. T. V., Pham, T. L., & Phan, T. K. V. (2024). Potential use of polyphenol-enriched extract from Moringa oleifera leaves as an active ingredient in sunscreen. *Natural Life Science Communications*, 23(2), e2024016. <https://doi.org/10.12982/NLSC.2024.016>
- Vergara-Jimenez, M., Almatrafi, M. M., & Fernandez, M. L. (2017). Bioactive components in Moringa oleifera leaves protect against chronic disease. *Antioxidants*, 6(4), 91. <https://doi.org/10.3390/antiox6040091>
- Xu, Y. B., Chen, G., & Guo, M. (2022). Potential anti-aging components from Moringa oleifera leaves explored by affinity ultrafiltration with multiple drug targets. *Frontiers in Nutrition*, 9, 854882. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.854882>

