

การพัฒนาตำรับโทนเนอร์สารสกัดลำต้นอด

The Development of *Lannea coromandelica* Stem Crude Extract Toner

Jomjai peerapattana^{1,2*}, Bungorn Sripanidkulchai^{1,2}, Unchalee Tattawasart^{1,3}, Pathomthat Srisuk²

บทคัดย่อ

การพัฒนาตำรับโทนเนอร์สารสกัดลำต้นอด

จากผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จ.ชัยภูมิ พบว่าสารสกัดจากลำต้นอด (*Lannea coromandelica*) เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรีย รา และไวรัส ทั้งยังมีความเป็นพิษต่ำ จึงนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โทนเนอร์เพื่อฆ่าเชื้อ *S. aureus* เตรียมผลิตภัณฑ์โทนเนอร์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกลีเซอริน ซorbitol และพอลิโพรพิลีนไกลคอลเป็นสารให้ความชุ่มชื้น เอทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลาย พาราเบนเข้มข้นเป็นสารถนอม ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้มีลักษณะภายนอกสวยงาม สามารถเกาะติดผิวหนังได้ดี แต่กระจายบนผิวหนังหลังทาดี ความคงตัวทางกายภาพเบื้องต้นดี แต่ยังไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นที่ใช้ยังไม่สูงพอ เวลาที่ผลิตภัณฑ์สัมผัสกับเชื้อไม่นานพอ หรือมีส่วนประกอบในน้ำกระสายยาบางตัวในตำรับโทนเนอร์เกิดปฏิกิริยากับตัวยา ทำให้ตัวยาไม่สามารถออกมาออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ หรือออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ช้าลง

คำสำคัญ : อด (*Lannea coromandelica*), โทเนอร์

Abstract

The Development of *Lannea coromandelica* Stem Crude Extract Toner.

Jomjai peerapattana^{1,2*}, Bungorn Sripanidkulchai^{1,2}, Unchalee Tattawasart^{1,3}, Pathomthat Srisuk²

From the biological activities of many herbs from Chulaporn Dam, Chaiyapoom, it was found that the crude extract of *Lannea coromandelica* stem have biological activity against bacteria, fungus and virus. It also has low toxicity. It is chosen to formulate toners for inhibit *S. aureus*. The 0.5 percent toner of *Lannea coromandelica* stem crude extract was prepared. Glycerin, sorbitol and propylene glycol were used as humectants, ethanol and water were used as solvent and paraben concentrate was used as preservative. The toners have great physical appearance, good adherence, good spreadability and good primary physical stability but can not inhibit *S. aureus*. These might be due to the concentration of *Lannea coromandelica* stem crude extract was not high enough, the contact time of products and *S. aureus* was not long enough or there might be some interaction between the active substances and the toner's vehicles resulting in decreasing the antimicrobial activities or retard its activities.

Keyword : *Lannea coromandelica*, Toner

¹Center for Research and Development of Herbal Health Products, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand

²Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand

³Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 40002

*correspondence author E-mail: jomsuj@kku.ac.th

1. บทนำ

จากการเก็บตัวอย่างพืชในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ ได้คัดเลือกพืชจำนวน 11 ชนิด สืบหาข้อมูลทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน เตรียมสารสกัดหยาบด้วย 50% ethanol แล้วนำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 5 ชนิด โดยวิธี microbroth dilution method (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006; Smitinand, 2001) เชื้อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp.*, และ *Vibrio cholerae* ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดจากกิ่งต้นอด (Lannea coromandelica (Houtt.) Merr.) เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้หลายชนิด คือ สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus*, *Shigella spp.*, *V. cholerae*, *Ps. aeruginosa* และ *Salmonella spp.* ได้ที่ความเข้มข้น 1.56, 3.125, 0.78, 3.125 6.25 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อราของสารสกัดหยาบลำต้นอด

Minimum Bactericidal concentration (mg/ml)					IC50 (µg/ml)	MFC (mg/ml)			
<i>S. aureus</i>	<i>Shigella</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>	AntiHSV	Epidermophyton	Microsporum	Trichophyton	
1.56	3.125	0.78	3.125	6.25	26.27	1	2	2	

จึงสนใจนำสารสกัดลำต้นอดมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โทนเนอร์ หรือ astringent ซึ่งเป็นของเหลวใส่สำหรับใช้ทางภายนอก ประกอบด้วย alcohol และกรดอื่นๆ เช่น boric acid และอาจเติมสาร sorbitol หรือ glycerin เพื่อใช้เป็น humectants โทเนอร์ใช้ประโยชน์ในการกระชับรูขุมขนและทำให้รูขุมขนหดเล็กลง และยังมีประโยชน์อื่นๆที่ได้จากสารที่เติมเข้าไปเพิ่ม (อรัญญา, 2537) เช่นการระงับการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นต้น ทำการประเมินคุณลักษณะเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้ และศึกษาความสามารถในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ในหลอดทดลอง

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ ethanol (Merck chemical, ประเทศไทย), glycerin (Italmar, ประเทศไทย), sorbitol และ propylene glycol จากเอกชนเคมีภัณฑ์ ประเทศไทย, methyl paraben และ propyl paraben จากวิทยาคม ประเทศไทย เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ได้แก่ Rotary evaporator (Eyela, N-100, Rikakikai, Japan), Freeze dryer (Christ Gamma 1-1 LSC, Germany),

ทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อไวรัส Herpes simplex virus type 1 โดยวิธี plaque reduction assay (Lorian, 1996; Shigeta *et al.*, 1992) พบว่ามีค่า IC₅₀ 26.27 µg/ml (ตารางที่ 1) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา 3 ชนิดโดยวิธี agar dilution assay (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006) เชื้อราที่ทำการทดสอบได้แก่ Epidermophyton, Microsporum และ Trichophyton พบว่ามีความสามารถในการฆ่าเชื้อราทั้งสามได้ที่ความเข้มข้น 1, 2 และ 2 mg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรกับเซลล์เพาะเลี้ยง Vero cells โดยวิธี MTT assay (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006; Marchetti *et al.*, 1996) พบว่ามีความปลอดภัยค่อนข้างสูง มีค่า CC₅₀ มากกว่า 400 µg/ml

เครื่องชั่ง (Mettler Toledo AG135, USA), อ่างน้ำร้อน และเทอร์โมมิเตอร์

2.2 วิธีการวิจัย

2.2.1 การเตรียมสารสกัดหยาบ

นำลำต้นของอดมาล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ อบที่อุณหภูมิ 45°C บดให้เป็นผงละเอียด นำผงสมุนไพร 1 ส่วนมาหมักใน 50% เอทานอล 6 ส่วน เป็นเวลา 7 วัน คนเป็นระยะ กรองผ่านผ้าขาวบางที่พับซ้อนกันหลายชั้น กรองซ้ำด้วยกระดาษกรอง No.1 นำสารละลายมาระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศ แยกตัวทำละลายที่เป็นน้ำด้วยเครื่อง freeze dryer และชั่งน้ำหนักแห้งของส่วนสกัดสมุนไพรเพื่อคำนวณหาร้อยละผลผลิต (%yield) เก็บส่วนสกัดแห้งไว้ในภาชนะปิดสนิท ป้องกันแสง ที่อุณหภูมิ -20°C

2.2.2 การพัฒนาตำรับโทนเนอร์

เตรียมผลิตภัณฑ์โทนเนอร์เพื่อฆ่าเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมด 6 ตำรับ โดยมีกลีเซอริน ซอพิทอล และพอฟีลีน กลัยคอล เป็นสารให้ความชุ่มชื้น เอทานอลและน้ำเป็นตัวทำละลาย พาราเบนเข้มข้นเป็นสารถนอม ส่วนประกอบในแต่ละตำรับแสดงในตารางที่ 2 เลือกตำรับที่มีคุณลักษณะทางกายภาพค่อนข้างดีมา 2 ตำรับ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ

วิธีเตรียม ผสม Deionized water, Glycerin และ Propylene glycol ให้เข้ากันในบีกเกอร์ เติม 70 % Sorbitol, paraben

concentrate, 10 % ethyl alcohol และสารสกัดต้นอดลงไป คนจนได้สารละลายใส บรรจุในภาชนะแก้ว ปิดสนิท

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบในตำรับโทนเนอร์

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (%w/v)						ประโยชน์ในตำรับ
	1	2	3	4	5	6	
สารสกัดต้นอด	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	Active ingredient
10%Ethanol	2.5	3.0	3.5	-	5.0	-	Solvent
Glycerin	3.0	4.0	4.5	1.5	5.0	3.0	Humectants
70 % Sorbitol	2.5	2.5	2.5	-	3.0	-	Humectants
Propylene glycol	-	-	-	3.0	-	1.5	Humectants
Paraben conc.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	Preservative
Deionized water	91.0	89.5	88.5	94.5	86.0	94.5	Solvent

2.2.3 ศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของตำรับโทนเนอร์

ก. ลักษณะภายนอก สังเกตดูความใสของตำรับ สี กลิ่น การแยกตัวของตัวสำคัญ การเกาะติดผิวหนังและการแผ่กระจายไปบนผิวหนังหลังจากทา

ข. ความคงตัวทางกายภาพ ตั้งผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะภายนอกอีกครั้ง สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเทียบกับเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ๆ

2.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25922 นำโทนเนอร์มาทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.45 μm และทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อ โดยวิธี Time kill assay (Richard *et al.*, 1993) โดยนำผลิตภัณฑ์ 1 มล. ผสมกับเชื้อ *S. aureus* 1 มล. (10^6 CFU/ml) ครบเวลา 5, 10, 20, 30 นาที นำมานับจำนวนเชื้อโดยเฉพาะเชื้อลงบนอาหารแข็ง Blood agar นำไปบ่มที่ 37°C 24 hr อ่านผลโดยนับจำนวนเชื้อที่เหลือจากการทำลายโดยผลิตภัณฑ์

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์และคุณลักษณะทางกายภาพเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์

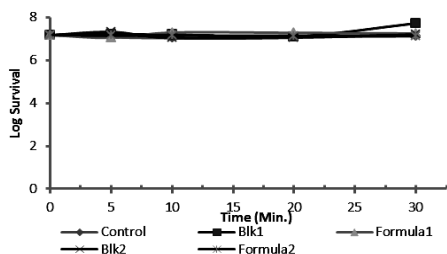
พัฒนาตำรับโทนเนอร์ ที่มีสารสกัดต้นอดเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคิดเป็น 3.2 เท่าของค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* ในการพัฒนาตำรับที่ 1 ถึง 6 มีการปรับปริมาณสารอยู่ 4 ชนิดคือ เอทานอล กลีเซอริน พอลิธินกลัยคอล และซอบีทอล จากตำรับโทนเนอร์ ตำรับที่ 1 ไม่ได้เติมพอลิธินกลัยคอล พบว่ามีสารสกัดต้นอดยังคงหลงเหลือและไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จึงเพิ่มปริมาณ 10% v/v เอทานอลจาก 2.5 จนถึง 5.0 % เพื่อเพิ่มการละลายของ

สารสกัดต้นอด เพิ่มปริมาณกลีเซอริน และ 70% w/v ซอบีทอล เป็น 5.0% และ 3.0% w/w ตามลำดับ เพื่อแก้ไขความรู้สึกหลังทาที่ผิวแห้งและไม่ค่อยติดผิวของตำรับที่ 1 จนได้เป็นตำรับที่ 5 ส่วนในตำรับที่ 5 พบว่าการเพิ่มปริมาณ 10%v/v เอทานอลจะทำให้เกิดความรู้สึกเย็นหลังจากทา จึงไม่ใส่ 10%v/v เอทานอลในตำรับที่ 4 แต่ใช้เฉพาะกลีเซอริน และพอลิธินกลัยคอลแทนในปริมาณ 1.5 และ 3.0 %w/w ตามลำดับ ซึ่งพบว่าได้โทนเนอร์ใสไม่มีตะกอน แต่ความรู้สึกหลังทาที่ผิวแห้ง พบว่าติดผิวได้ดีมากขึ้นไป จึงแก้ไขโดยการเพิ่มปริมาณของกลีเซอรินเป็น 3.0%w/w และลดปริมาณของพอลิธินกลัยคอล 1.5% w/w พบว่าติดผิวดีขึ้นกว่าตำรับที่ 4 ส่วนลักษณะภายนอกที่เห็นด้วยตา เช่น ความใส สี และกลิ่น ไม่แตกต่างกัน ในแต่ละสูตร ยกเว้นความหนืดในแต่ละตำรับอาจแตกต่างกันเล็กน้อยเช่น ในตำรับที่ 5 และตำรับที่ 6 ส่วนในการประเมินความคงตัวทางกายภาพโดยตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่า โทนเนอร์ยังคงสภาพทางกายภาพเหมือนที่เตรียมไว้ตั้งแต่วันแรก จึงเลือกโทนเนอร์ตำรับที่ 6 และ 7 ไปทดสอบและประเมินผลทางจุลชีววิทยา

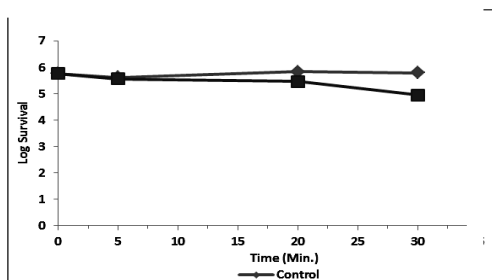
3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ของโทนเนอร์จากสารสกัดต้นอดโดยวิธี Time kill assay คือให้ผลิตภัณฑ์สัมผัสกับเชื้อ แล้วดูความสามารถในการฆ่าเชื้อของผลิตภัณฑ์ที่เวลาต่างๆเป็นเวลา 30 นาที ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งจากรูปพบว่าทั้งน้ำ, Blank ของตำรับที่ 5, ตำรับที่ 5, Blank ของตำรับที่ 6 และ ตำรับที่ 6 ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ในช่วง 0-30 นาที แต่เมื่อใช้สารสกัดต้นอดที่เจือจางด้วยน้ำความเข้มข้น 3.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (0.312%) ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* โดยวิธีเดียวกัน พบว่ามีผลในการลดจำนวนเชื้อได้เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 2

จะเห็นว่าโทเนอร์สารสกัดต้นอดเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคิดเป็น 3.2 เท่าของค่า MBC ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ แต่สารละลายอดเข้มข้น 0.312 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคิดเป็น 2 เท่าของค่า MBC สามารถลดจำนวนเชื้อได้เล็กน้อย จึงเป็นไปได้ว่าอาจมีส่วนประกอบในน้ำกระสายยาบางตัวในตำรับโทเนอร์ เกิดปฏิกิริยากับตัวยา ทำให้ตัวยาไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ หรือออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ช้าลง นอกจากนั้นเวลาที่เชื้อสัมผัสกับ โทเนอร์ก็ไม่นานมาก (30 นาที) จึงอาจทำให้ยังไม่เห็นผลยับยั้งเชื้อ



รูปที่ 1 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureas* ของผลิตภัณฑ์ โทเนอร์ จากสารสกัดต้นอดที่เวลาต่างๆ (Control คือ น้ำ, Blk 1 คือ Blank ของตำรับที่ 5, Formula 1 คือตำรับที่ 5, Blk 2 คือ Blank ของตำรับที่ 6, Formula 2 คือ ตำรับที่ 6)



รูปที่ 2 ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureas* ของสารสกัดต้นอดเทียบกับ น้ำ (control คือน้ำ)

ข้อเสนอแนะในการทดลองครั้งต่อไปควรเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดมากกว่านี้ และศึกษาความเข้ากันได้ของสารสกัดต่อกับส่วนประกอบต่างๆในตำรับ และในการทดลองกับเชื้อก็ควรให้เชื้อสัมผัสกับผลิตภัณฑ์นานขึ้นด้วย

4. สรุปผล

จากผลการทดลองจะเห็นว่าผลิตภัณฑ์โทเนอร์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมได้มีลักษณะภายนอกสวยงาม สามารถเกาะติดผิวหนังได้ดี แม้กระจายบนผิวหนังหลังทาดี ความคงตัวทางกายภาพเบื้องต้นดี แต่ยังไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ ซึ่งอาจเป็นเพราะความเข้มข้นที่ใช้อย่างไม่สูงพอ เวลาที่ผลิตภัณฑ์สัมผัสกับเชื้อไม่นานพอ หรือมีส่วนประกอบในน้ำกระสายยาบางตัวในตำรับโทเนอร์เกิดปฏิกิริยากับตัวยา ทำให้ตัวยาไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ หรือออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ช้าลง

5. References

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. M7-A7. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 7th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
2. Lorian V., 1996. Antibiotics in Laboratory Medicine 4th ed. Pennsylvania Rose Tree Corporate Center.
3. Marchetti M, Pisani S, Pietropaolo V, et al., 1996. Antiviral effect of a polysaccharide from *Scleritium glaucum* towards herpes simplex virus type 1 infection. *Planta Med*; 62 : 303-307.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. NCCLS document M26-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
5. Richard MRE, Dorothy KL, Xing JZ., 1993. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activities of selected lozenges. *J Pharm Sci.*; 82(12): 1218-1220.
6. Shigeta S, Mori S, Baba M, et al., 1992. Antiviral activities of ribavirin, 5-ethynyl-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide, and 6-(R)-6'-C-methylnephanocin A against several ortho- and paramyxoviruses. *Antimicrob Agents Chemother*; 36(2):435-439.
7. อัญญา มโนสร้อย, 2537. เครื่องสำอาง. คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.