วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.1) January – April 2022 บทความวิจัย

การประเมินการใช้สารสกัดสมอไทยในการเป็นสารกันเสียธรรมชาติสำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

Evaluation of Terminalia Chebula Retz. Extract as a Natural Preservative for Cosmetic Products

ปิยนุช พรมภมร[1], ขวัญจิต อิสระสุข[1], กัลยาภรณ์ จันตรี[2], จรัสฟ้า โหมดสุวรรณ[1],
จิตรวดี ตั้งหิรัญรัตน์[1] และ ทัศนีย์ พาณิชย์กุล[1*]

Piyanuch Prompamorn[1], Khwunjit Itsarasook[1], Kanlayaporn Chantree[2],
Jarasfah Modsuwan[1], Jittarawadee Tanghiranrat[1] and Tassanee Panichkul[1*]

[1]*หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต*

[2]*หลักสูตรวิทยาศาสตร์เครื่องสำอางและความงาม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกาญจนบุรี*

[1]*Cosmetic Science, Faculty of Science and Technology, Suan Dusit University*

[2]*Cosmetic and Beauty Sciences Program, Faculty of Science and Technology, Kanchanaburi Rajabhat University*

Received : 29 March 2021
Revised : 23 May 2021
Accepted : 9 August 2021

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลสมอไทยในการเป็นสารกันเสียธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับผิว จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดด้วยวิธี agar well diffusion และ broth microdilution ต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ร้อยละ 50 ของทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบด้วยความเข้มข้นของสารสกัด (MIC_{50}) เท่ากับ 0.22±0.05 และ 0.68± 0.11 mg/ml และความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตาย (MBC/MFC) เท่ากับ 5-20 mg/ml เมื่อนำสารสกัดสมอไทยมาใช้เป็นสารกันเสียในตำรับอิมัลชัน และทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางด้วยวิธี challenge test โดยอ้างอิงตามมาตรฐาน ISO 11930 criteria A พบว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเป็นไปตามเกณฑ์ criteria A แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์และราไม่เป็นไปตามเกณฑ์ จากผลการวิจัยครั้งนี้ สารสกัดสมอไทยสามารถใช้เป็นสารกันเสียธรรมชาติสำหรับยับยั้งแบคทีเรียซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับสารกันเสียสังเคราะห์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

คำสำคัญ : สมอไทย ; สารกันเสียธรรมชาติ

Abstract

The objective of this study was to evaluate the efficiency of *Terminalia chebula* Retz. fruit extract as a natural preservative in topical cream formulation. The antimicrobial activity of *T. chebula* Retz. extract against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans* was determined by agar well diffusion assay and broth microdilution assay. The result showed that *T. chebula* Retz. extract exhibited a strong antimicrobial activity against all tested microorganisms. The minimal concentration of extract inhibited 50% of microbial growth (MIC_{50}) were 0.22±0.05 to 0.68± 0.11 mg/ml. This extract could kill these microorganisms as shown with minimal bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) of 5-20 mg/ml. After that, *T. chebula* Retz. extract used as a preservative in topical cream was evaluated the antimicrobial effectiveness by challenge test method according to a criteria A of ISO 11930. Results showed that criteria A for bacterial inhibitory activity of *T. chebula* Retz. extract was fulfilled for preservative in cosmetic formulation but fungal inhibitory activity of this extract was below the acceptance value of criteria A. This study exhibited that *T. chebula* Retz. extract acts as a natural preservative for bacterial inhibition, or will be applied in combined with synthetic preservatives in cosmetic products.

Keywords : *Terminalia chebula* Retz. ; natural preservative

***Corresponding author. E-mail** : tasanee_p@yahoo.com

บทนำ

ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมีโอกาสถูกปนเปื้อนโดยเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเกิดระหว่างกระบวนการผลิต หรือเกิดขึ้นหลังการเปิดใช้ผลิตภัณฑ์ จากการที่ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมีน้ำเป็นส่วนประกอบทำให้มีโอกาสปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย รวมถึงในผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำมัน เปปไทด์ และคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมให้เกิดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมักพบ เชื้อหลายชนิด ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Candida albicans, Enterobacter gergoviae* และ *Serratia marcescens* เป็นต้น (Halla *et al*., 2018) การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางส่งผลให้ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส และลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป ประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ลดลง และทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ (Herman *et al.,* 2013) ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องมีการเติมสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และยืดอายุการใช้งานของเครื่องสำอางให้นานขึ้น ทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

สารกันเสียเป็นสารที่สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับผลิตภัณฑ์จนถึงขั้นตอนการบริโภค คุณสมบัติที่ดีของสารกันเสีย ได้แก่ มีความสามารถในการออกฤทธิ์ได้กว้างกับจุลินทรีย์ทุกชนิดในความเข้มข้นต่ำ มีความสารมารถในการละลายน้ำได้ดี ออกฤทธิ์ได้ในพีเอชที่กว้าง ไม่เป็นพิษไม่ระคายเคืองต่อผิวและไม่ทำให้เกิดการแพ้ รวมถึงต้องสามารถเข้ากันได้กับสารอื่นในสูตรผลิตภัณฑ์ (Herman *et al.,* 2013) สำหรับสารกันเสียที่นิยมใช้ ได้แก่ สารกันเสียสังเคราะห์ในกลุ่ม พาราเบน (paraben), แอลกอฮอล์ (alcohols), สารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียม (quaternary ammonium compound), กรด (acids), ฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ ไม่ระคายเคืองในความเข้มข้นที่ใช้ มีประสิทธิภาพในพีเอชที่กว้าง และราคาถูก อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้สารกันเสียสังเคราะห์อาจทำให้เกิดผื่นผิวหนังอักเสบจากการสัมผัสและทำให้เกิดการแพ้ได้ (Sasseville, 2004; Yim, Barquerizo Nole & Tosti, 2014; Hughes, Maderal & Tosti, 2016) ทำให้ในปัจจุบันจึงมีการนำสารจากธรรมชาติ เช่นสารสกัดจากพืชและน้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อใช้ทดแทน หรือลดปริมาณการใช้สารกันเสียสังเคราะห์ ซึ่งช่วยลดผลที่ไม่พึงประสงค์ดังกล่าว (Ostrosky *et al.,* 2011; Herman *et al*., 2013; Nabavi *et al.,* 2015)

สมอไทย (*Terminalia chebula* Retz.) เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ผลสมอไทยมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอล ได้แก่ ฟีนอลิก, แทนนิน และ ฟลาโวนอยด์ ในปริมาณสูง สารแทนนินที่พบเป็นสารในกลุ่ม ไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolysable tannin) ได้แก่ เทอร์ฟลาวินเอ (terflavin A), เทอรชิบูลิน (terchebulin), พูนิคาลาจิน (punicalagin), กรดชิบูลาจิก (chebulagic acid), กรดชิบูลินิก (chebulinic acid) และ คลอริลาจิน (corilagin) สำหรับสารฟีนอลิก (phenolic) ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid), กรดแอลลาจิก (ellagic acid) และ กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acid) ส่วนสารฟลาโวยนอยด์ (flavonoid) ที่พบ ได้แก่ รูติน (rutin), เควอซิทิน (quercetin), ลูทีโอลิน (luteolin), ไอโซเควอซิทิน (isoquercitin) และสารอนุพันธ์ของเควอซิทิน (Nigam *et al.,* 2020) มีหลายรายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากผลสมอไทยมีประสิทธิภาพสูงในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ รวมถึงยีสต์และราได้ดี Kannan, Ramadevi & Hopper (2009) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบของ

สารสกัดจากผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลโดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella typhi*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Klebsiela pneumonia* พบว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Bag *et al*. (2009) ที่รายงานว่าสารสกัดจากผลสมอไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ที่ดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเมธิซิลิน และ *E. coli* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาไตรเมโทรพริม-ซัลฟาเมทอกซาโซล รวมถึงการศึกษาของ Bag *et al*. (2012) ที่รายงานว่าสารสกัดจากผลสมอไทยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ดื้อยาปฏิชีวนะที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ได้แก่ *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumonia* และ *S. aureus* นอกจากนี้การศึกษาของ Mehmood *et al*. (1999) และ ยังแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากผลสมอไทยในการต้านเชื้อในกลุ่มฟังไจ ได้แก่ *Candida albacans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* และ *Trichophyton rubrum* ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการนำสารสกัดจากผลสมอไทยมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางเครื่องสำอาง ได้แก่ *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. albicans* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ทดแทนการใช้สารกันเสียสังเคราะห์

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมผลสมอไทย

เก็บผลสมอไทยในเดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2560 จาก ตำบลหนองบัว อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย ประเทศไทย โดยได้มีการพิสูจน์อัตลักษณ์พืชที่ อาคารสืบนาคะเสถียร กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

การเตรียมสารสกัดสมอไทย

เตรียมสารสกัดสมอไทยด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลายเอทานอล 70% โดยดัดแปลงจากวิธีของ Bag *et al*. (2012) นำผลสมอไทยมาล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำเนื้อที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 45 ºC จนแห้งสนิทแล้วนำมาบดให้เป็นผงละเอียด แล้วทำการสกัดด้วย 70% เอทานอลด้วยวิธีการหมัก ในอัตราส่วนสมอไทย 25 g ต่อเอทานอล 150 ml โดยทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกรองแล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน และนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากนั้นทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้เพื่อคำนวณหาร้อยละของน้ำหนัก (% yield) ของสารสกัด เก็บสกัดที่ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 ºC ในที่มืดจนกว่าจะนำไปใช้

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัด

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดสมอไทยด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Phetdee *et al*. (2014) เตรียมสารสกัดสมอไทยความเข้มข้น 1 mg/ml แล้วปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 126 µl ลงใน 96 well plate จากนั้นเติมสารสกัดปริมาตร 4.5 µl กับ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 7% w/v ปริมาตร 90 µl ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา

3 นาที หลังจากนั้นเติม 50 % ของสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 4.5 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำสารสกัดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 760 nm บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมในสารสกัดโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของ gallic acid ในหน่วย mg gallic acid equivalent (mg GAE)/g crude extract

การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัด

วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดสมอไทยด้วยวิธี Aluminium chloride colormetric โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Poumorad, Hosseinimehr & Shahabimajd (2006) โดยเตรียมสารสกัดสมอไทยความเข้มข้น 1 mg/ml ปิเปต $AlCl_3$ ความเข้มข้น 10% w/v ปริมาตร 100 µl ลงใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีจึงนำสารสกัดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 415nm บันทึกค่าการดูดกลืนแสงและนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณฟลาโวยนอด์ทั้งหมดในสารสกัดโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของ quercetin ในหน่วย mg quercetin equivalent (mg QE)/g crude extract

การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัด

ประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ของสารสกัด ด้วยวิธี agar well diffusion โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *P. aeruginosa* สายพันธุ์ ATCC 27853, *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 25923 และ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC 25922 และยีสต์ *C. albicans* สายพันธุ์ ATCC 10231 โดยอ้างอิงจากวิธีของ CLSI document M02-A11 และ M44-A2 โดยนำเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa, S. aureus* และ *E. coli* มาเลี้ยงในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) ส่วน *C. albicans* เลี้ยงในอาหาร Sabouraud Dextrose Broth (SDB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 แล้วทำการเจือจาง 10 เท่าเพื่อให้มีจำนวนจุลินทรีย์เท่ากับ 1.5 x 10^7CFU/ml จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงไปในสารละลายของเชื้อที่เตรียมไว้ กดและบิด cotton swab กับข้างหลอด แล้วกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี three dimension swab ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที ให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง โดยเชื้อแบคทีเรียใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ส่วนยีสต์ทดสอบด้วยอาหาร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) จากนั้นทำการเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย steriled cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ปิเปตสารสกัดสมอไทยความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 40 µl ต่อหลุม ลงไปในหลุมที่เจาะเอาไว้ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB และ/หรือ SDB เป็น negative control ใช้ phenoxyethanol ความเข้มข้น 0.5 mg/ml เป็น positive control จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับเชื้อแบคทีเรีย และอุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับยีสต์ แล้วนำไปวัดบริเวณการยับยั้ง (inhibition zone) แต่ละการทดลองทำ 3 ครั้งและนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อได้

ทำด้วยวิธี broth dilution method ตามวิธีของ CLSI document M27-A3 M07-A10 และ M38-A2 โดยทำการทดลองใน 96 well plate กล่าวคือทำการเจือจางสารสกัดสมอไทยด้วยอัตราส่วน 1:2 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB (สำหรับทดสอบแบคทีเรีย) และ SDB (สำหรับทดสอบยีสต์) เติมสารสกัดที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 µl ลงในหลุมที่มีอาหารเลี้ยง

เชื้อปริมาตร 90 µl จากนั้นเติมจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบที่มีปริมาณเชื้อ $5x10^5$ CFU/ml ปริมาตร 10 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงสำหรับเชื้อแบคทีเรีย ส่วนยีสต์บ่มนาน 24 ชั่วโมงเติมสี alamar blue ปริมาตร 10 µl ลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มต่อนาน 4 ชั่วโมง สังเกตุสีที่เปลี่ยนแปลง ถ้าตัวอย่างมีสีฟ้าแสดงว่าไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ ถ้าตัวอย่างเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีชมพูแสดงว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์ หาค่า MIC_{50} โดยใช้เทคนิค standard plate count และหาค่า MBC และ MFC โดยนำตัวอย่างมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อต้องไม่พบการเจริญของเชื้อแต่ละการทดลองทำ 3 ครั้งและนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของคน

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของคน (human dermal fibroblast) ด้วยวิธี sulforhodamine B assay ตามวิธีของ Vichai & Kirtikara (2006) โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ passage ที่ 40 ทำการทดสอบใน 96 well plate โดยเลี้ยงเซลล์ ($4x10^3$ cell/หลุม) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) ที่มีการเติม 10% fetal bovine serum บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะที่มี CO_2 5% และมีความชื้นสัมพัทธ์ 95% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดสมอไทยที่ผ่านการกรองผ่านเมมเบรนที่มีรูขนาด 0.2 µm และเจือจางให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 mg/ml บ่มเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ใช้ sodium lauryl sulfate ความเข้มข้น 0.1 mg/ml เป็น positive control และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM เป็น negative control เมื่อครบเวลาทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 200 µl ทำการตรึงตัวอย่างด้วย 40% trichloroacetic acid แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 45 นาที หลังจากล้างด้วยสารละลาย PBS ทำการย้อมสี sulforhodamine B เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายทิ้งแล้วเติม 10 mM Tris base solution ปริมาตร 100 µl นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง microplate reader จากนั้นคำนวณ % การมีชีวิตรอดของเซลล์ เปรียบเทียบกับ control ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งและนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การตั้งตำรับอิมัลชันที่มีส่วนผสมของสารสกัดสมอไทย

เตรียมตำรับครีมเบสที่เป็นลักษณะ oil in water ซึ่งประกอบด้วยวัฏภาคน้ำ วัฏภาคน้ำมัน และสารก่ออิมัลชัน โดยอ้างอิงจากการศึกษาของ Herman *et al.* (2013) โดยจะแบ่งสูตรออกเป็น 2 ตำรับ กล่าวคือ ตำรับที่ 1 เป็นตำรับอิมัลชันที่ใช้ phenoxyethanol ปริมาณ 0.5% เป็นสารกันเสียในตำรับ และตำรับที่ 2 เป็นตำรับที่มีการใช้สารสกัดสมอไทยเป็นสารกันเสียในตำรับ (ตารางที่1) การเตรียมอิมัลชันทำโดยผสม Mineral oil, November EC-1 และ Dimethicone ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปผสมกับ part น้ำที่ประกอบด้วย DI water และ Propylene glycol คนผสมให้เข้ากัน จะได้ตำรับครีมเบส

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบและปริมาณของสารในตำรับอิมัลชันรูปแบบน้ำมันในน้ำ

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (%w/w)	
	ตำรับที่ 1	ตำรับที่ 2
DI water	91.5	91.5
November EC-1	3	3
Propylene glycol	3	3
Mineral oil	1	1
Dimethicone	1	1
Phenoxyethanol	0.5	-
สารสกัดสมอไทย	-	0.5

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการเป็นสารกันเสียในตำรับอิมัลชัน

ประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดสมอไทยในการเป็นสารกันเสียในตำรับอิมัลชันด้วยวิธี Challenge test ตามวิธีของ ISO 11930 (2019) โดยทำการทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 6538, *E. coli* สายพันธุ์ ATCC 8739, *P. aeruginosa* สายพันธุ์ ATCC 9027, *C. albicans* สายพันธุ์ ATCC 10231 และ *A. brasiliensis* สายพันธุ์ ATCC 16404 ทำการทดสอบโดย inoculate เชื้อปริมาณ 10^5 CFU/ml ลงในตำรับ แล้วทำการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี standard plate count ที่เวลา 0, 1, 7, 21 และ 28 วัน แสดงผลในรูปของ log CFU/g อ้างอิงผลการทดสอบกับ มาตรฐาน ISO 11930 criteria A กล่าวคือ ในกรณีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสารสกัดต้องมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ไม่ต่ำกว่า 3 log ในวันที่ 7 ของการทดสอบและต้องไม่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในวันที่ 14 และ 28 ของการทดสอบ ในกรณีการยับยั้งยีสต์ สารสกัดต้องมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณยีสต์ไม่ต่ำกว่า 1 log ในวันที่ 7 และต้องไม่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณยีสต์ในวันที่ 14 และ 28 ของการทดสอบ และในกรณีของเชื้อราสารสกัดจะต้องไม่ทำให้เชื้อรามีปริมาณเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นเมื่อตรวจนับในวันที่ 14 รวมถึงต้องสามารถลดปริมาณของเชื้อราได้ไม่ต่ำกว่า 1 log ในวันที่ 28 ของการทดสอบ จึงจะถือว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพในการเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

ผลการวิจัย

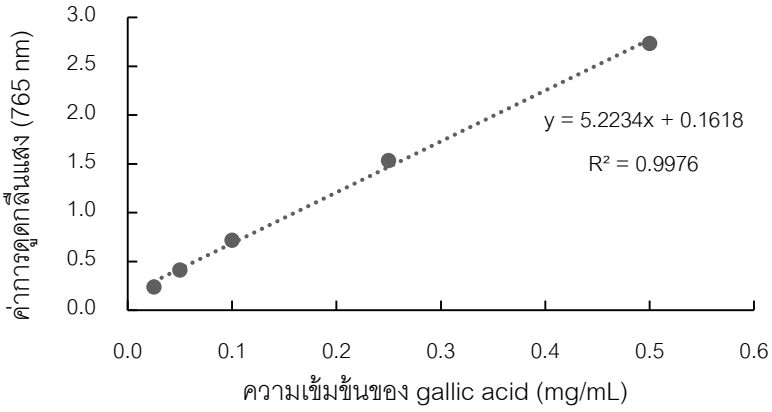
1. *การเตรียมสารสกัดสมอไทย*

เมื่อทำการสกัดผลสมอไทยด้วยวิธีการหมักด้วยตัวทำละลาย 70% เอทานอล จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบลดความดัน แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยวิธีแช่แข็งแห้ง ได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาล (ภาพที่1) มีร้อยละของน้ำหนัก (% yield) ของสารสกัดเท่ากับ 53.75

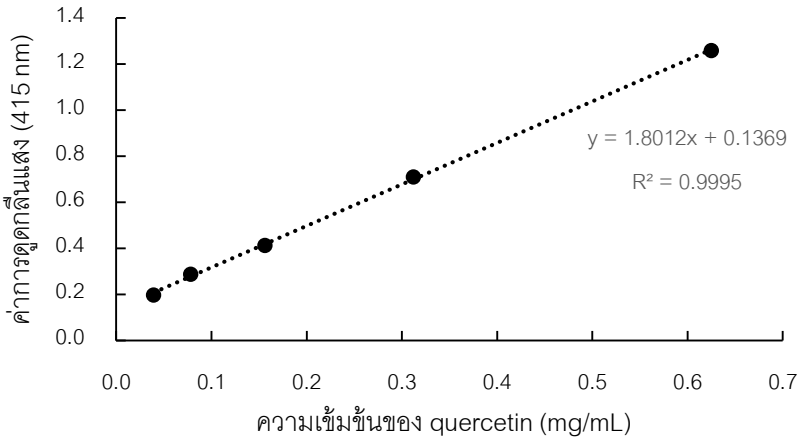
ภาพที่ 1 สารสกัดสมอไทย

2. *<u>การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัด</u>*

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของสารสกัดสมอไทยด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid (ภาพที่ 2) พบว่าสารสกัดมีปริมาณฟีนอลิกรวมเท่ากับ 157.64±4.18 mg gallic acid equivalent (mg GAE)/g crude extract และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของสารสกัดด้วยวิธี Aluminium chloride colormetric โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ quercetin (ภาพที่ 3) พบว่าสารสกัดมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 105.42±5.96 mg quercetin equivalent (mg QE)/g crude extract



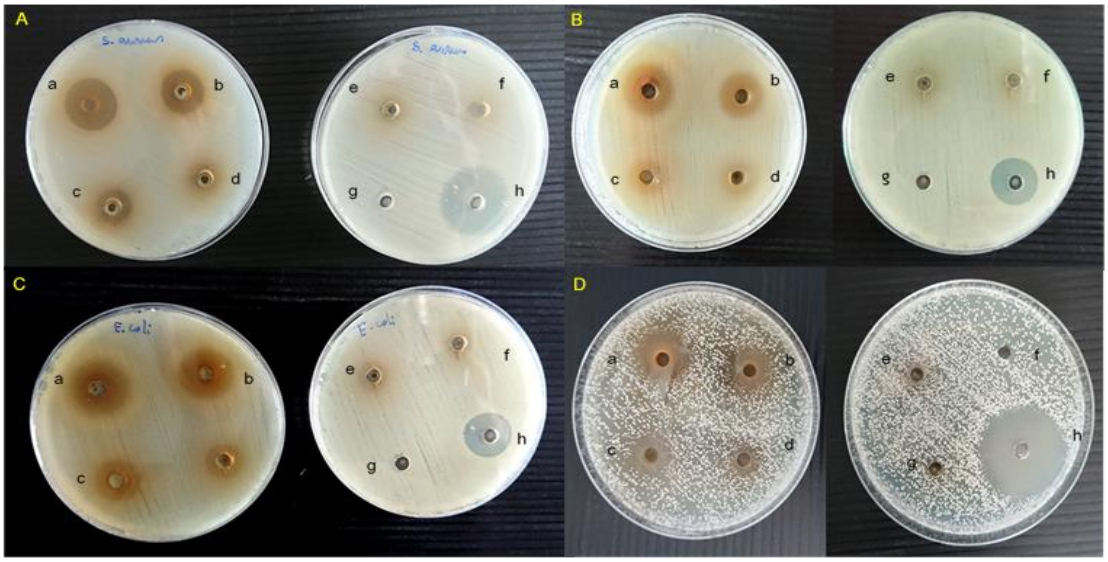
ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานของ gallic acid



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานของ quercetin

3. *<u>การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัด</u>*

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดพบว่า สารสกัดสมอไทยมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* และ *C. albicans* (ภาพที่ 4) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 2



ภาพที่ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งเชื้อ (A) *S. aureus*, (B) *P. aeruginosa*, (C) *E. coli* และ (D) *C. albicans* เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดสมอไทยความเข้มข้น (a) 40 mg/ml, (b) 20 mg/ml, (c) 10 mg/ml, (d) 5 mg/ml, (e) 2.5 mg/ml, (f) 1.25 mg/ml, (g) negative control และ (h) positive control สารกันเสีย phenoxy ethanol ความเข้มข้น 0.5 mg/ml

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัด

ความเข้มข้นของสารสกัด	**ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญ** (cm.)			
(mg/ml)	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*E. coli*	*C. albicans*
40	1.68±0.09	1.63±0.06	1.65±0.19	1.37±0.06
20	1.47±0.05	0.93±0.08	0.86±0.05	1.18±0.03
10	1.20±0.10	0.63±0.07	0.57±0.06	1.10±0.08
5	0.76±0.06	0.57±0.06	0.63±0.07	0.73±0.06
2.5	-	-	-	-
1.25	-	-	-	-
Phenoxyethanol	1.95±0.1	1.85±0.07	1.58±0.14	2.5±0.12

4. *การหาค่า MIC_{50} และ MBC หรือ MFC ของสารสกัด*

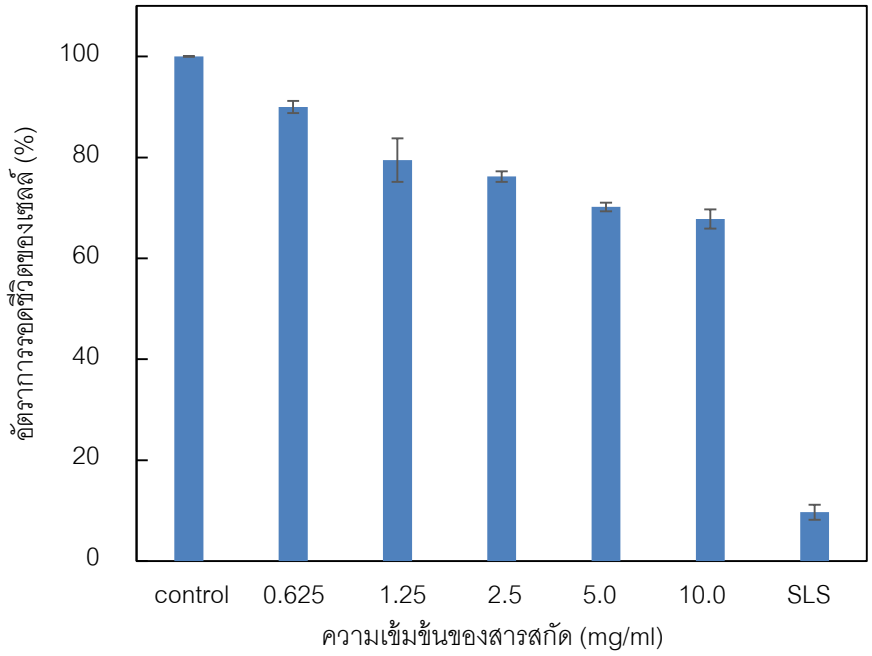
จากการหาค่า MIC_{50} ของสารสกัดพบว่าสารสกัดมีค่า MIC_{50} อยู่ระหว่าง 0.22-0.56 mg/ml โดยจะเห็นได้ว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* สูงที่สุด รองลงมาคือ *E. coli*, *S. aureus* และ *P. aeruginosa* ตามลำดับ เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของสารสกัดพบว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อในกลุ่มยีสต์สูงกว่าเชื้อแบคทีเรีย โดยมีค่า MBC ต่อเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 5 mg/ml ในขณะที่แบคทีเรียที่ทำการทดสอบทุกสายพันธุ์มีค่า MBC เท่ากับ 20 mg/ml

ตารางที่ 3 ค่า MIC_{50} และค่า MBC หรือ MFC ของสารสกัด

เชื้อจุลินทรีย์	**ค่า MIC_{50}** (mg/ml)	**ค่า MBC หรือ MFC** (mg/ml)
S. aureus	0.56±0.08	20
P. aeruginosa	0.68± 0.11	20
E. coli	0.45± 0.09	20
C. albicans	0.22±0.05	5

5. *การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของคน*

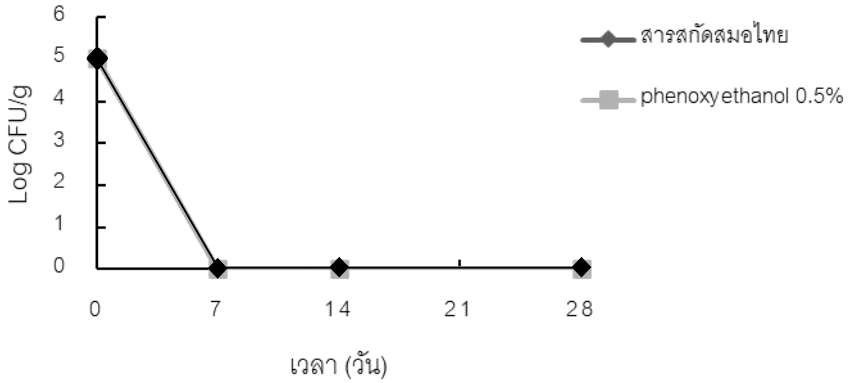
จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมอไทยในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของคนพบว่า เมื่อใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 0.625-5 mg/ml จะทำให้มีอัตรารอดชีวิตของเซลล์อยู่ระหว่าง 70-90 % ในขณะที่สารสกัดความเข้มข้น 10 mg/ml มีอัตรารอดของเซลล์เท่ากับ 67.82±1.89 % ส่วน sodium lauryl sulfate ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ที่เป็น positive control มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 5.23± 0.23 % (ภาพที่ 5)



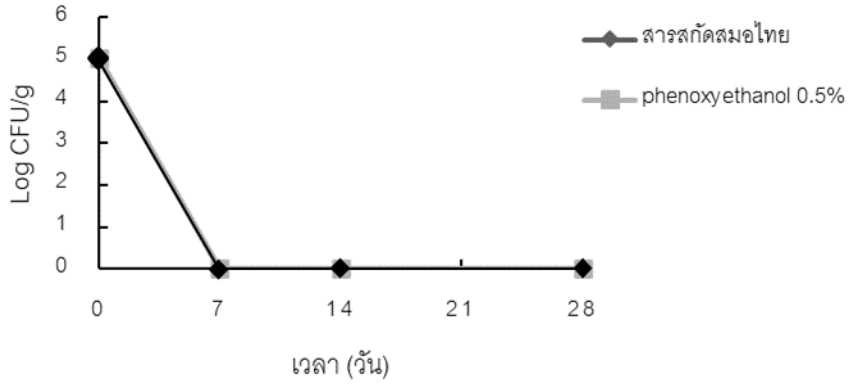
ภาพที่ 5 อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของคน (%) เมื่อทำการทดสอบกับสารสกัดสมอไทยที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ไม่มีการเติมสารสกัด และใช้ sodium lauryl sulfate เป็น positive control แสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

6. *<u>การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดในการเป็นสารกันเสียในตำรับอิมัลชัน</u>*

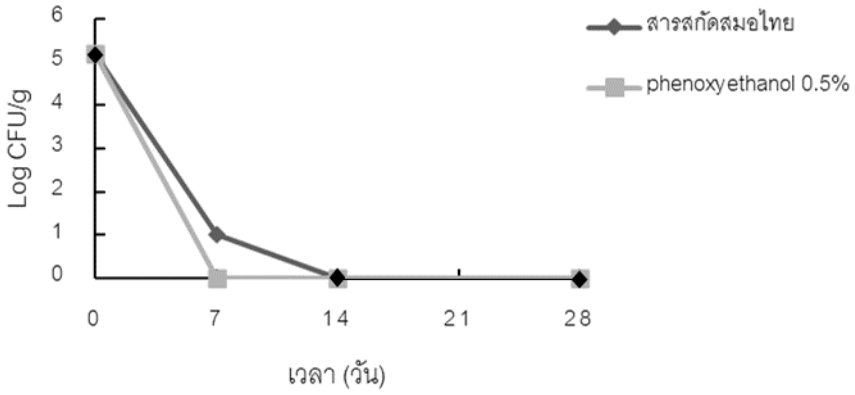
จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมอไทยในการเป็นสารกันเสียในตำรับอิมัลชันที่เตรียมขึ้นพบว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ S. *aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* เป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด กล่าวคือสามารถลดปริมาณเชื้อได้มากกว่าหรือเท่ากับ 3 log ภายในวันที่ 7 ของการทดสอบ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองไม่มีการเพิ่มขึ้นของเชื้อ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อกับสารกันเสียสังเคราะห์ phenoxyethanol พบว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ S. *aureus* และ *E. coli* เทียบเท่ากับ phenoxyethanol ในขณะที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ต่ำกว่า phenoxyethanol เล็กน้อย แต่เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อในกลุ่มยีตส์และรา ได้แก่ *C. albicans* และ *A. brasiliensis* พบว่าสารสกัดสมอไทยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดกล่าวคือ เมื่อทดสอบกับเชื้อ *C. albicans* ไม่สามารถลดเชื้อได้มากกว่าหรือเท่ากับ 1 log ในวันที่ 7 และเมื่อทดสอบกับเชื้อ *A. brasiliensis* ไม่สามารถลดเชื้อได้มากกว่าหรือเท่ากับ 1 log ในวันที่ 28 ของการทดสอบ (ภาพที่ 6-10)



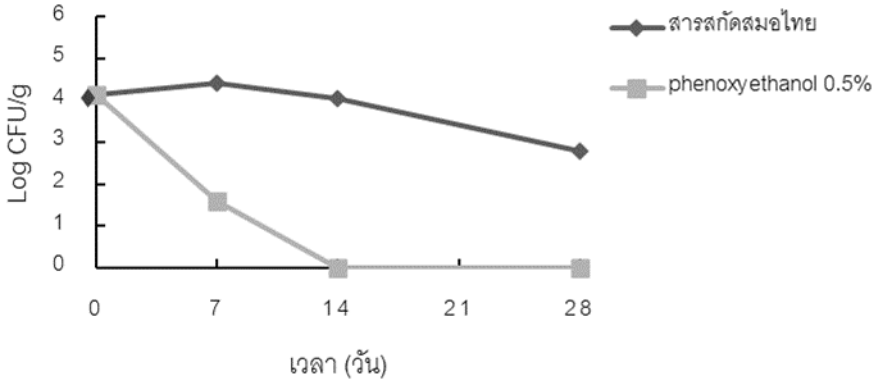
ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ในตำรับอิมัลชันของสารสกัดสมอไทยและสารกันเสีย phenoxyethanol 0.5% เมื่อทดสอบด้วยวิธี challenge test



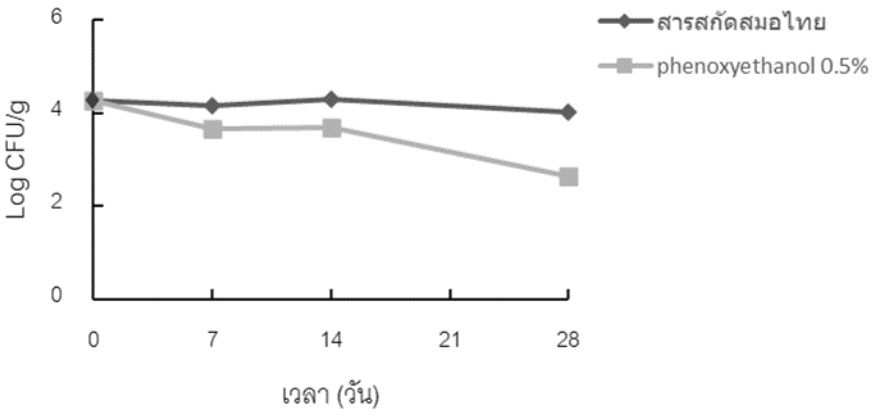
ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ในตำรับอิมัลชันของสารสกัดสมอไทยและสารกันเสีย phenoxyethanol 0.5% เมื่อทดสอบด้วยวิธี challenge test



ภาพที่ 8 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ในตำรับอิมัลชันของสารสกัดสมอไทยและสารกันเสีย phenoxyethanol 0.5% เมื่อทดสอบด้วยวิธี challenge test



ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. albicans* ในตำรับอิมัลชันของสารสกัดสมอไทยและสารกันเสีย phenoxyethanol 0.5% เมื่อทดสอบด้วยวิธี challenge test



ภาพที่ 10 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. brasiliensis* ในตำรับอิมัลชันของสารสกัดสมอไทยและสารกันเสีย phenoxyethanol 0.5% เมื่อทดสอบด้วยวิธี challenge test

วิจารณ์ผลการวิจัย

สารกันเสียเป็นสารที่เติมลงในตำรับเครื่องสำอางเพื่อยับยั้งการเจริญเของเชื้อจุลินทรีย์ในเครื่องสำอางไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อตั้งแต่ขั้นตอนการผลิต การบรรจุหีบห่อ การขนส่ง จนถึงระหว่างการใช้ผลิตภัณฑ์โดยผู้บริโภค ถึงแม้ว่าจะมีการใส่สารกันเสียปริมาณเพียงเล็กน้อยในผลิตภัณฑ์แต่สารกันเสียกลับเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักที่อาจทำให้เกิดการแพ้และการระคายเคืองในผู้บริโภค (González-Muñoz, Conde-Salazar & Vañó-Galván, 2014; Hughes *et al.,* 2016) รวมถึงมีการพบปัญหาการไม่ตอบสนองต่อสารกันเสียของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง (Orús *et al.,* 2015) ทำให้ในปัจจุบันได้มีการศึกษาจำนวนมากเพื่อนำสารธรรมชาติ ได้แก่ สารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชมาใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพื่อลดผลที่ไม่พึงประสงค์ดังกล่าว ตัวอย่างของสารธรรมชาติที่มีการนำมาใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ยกตัวอย่างเช่น สารสกัด *Lonicera caprifolium* และ *Lonicera japonica* (Varvaresou *et al.,* 2009) น้ำมันหอมระเหยจาก *Calamintha officinalis* (Nostro *et al.,* 2004) *Lavandula angustifolia*, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus limon* (Kunicka-Styczyn´ska *et al.,* 2009) และน้ำมันจาก *Zea Mays* และ *Hippophae rhamnoides* (Popescu *et al.,* 2014)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้สารสกัดจากผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 70% มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางเครื่องสำอางรวมถึงทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยเปรียบเทียบกับสารกันเสียสังเคราะห์ phenoxyethanol ซึ่งเป็นสารกันเสียที่มีการใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหลายประเภททั้งในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ใช้แล้วไม่ต้องล้างออก (leave on product) เช่น ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ผลิตภัณฑ์ป้องกันแสงแดด และผลิตภัณฑ์ใช้แล้วล้างออก (rinse off product) เช่น แชมพู และผลิตภัณฑ์ชำระล้าง เนื่องจากมีประสิทธิภาพที่ดีในการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ และรา (Puschmann *et al*., 2018; Dréno *et al*., 2019) จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*,

E. coli, P. aeruginosa และ *C. albicans* ด้วยวิธี agar well diffusion สารสกัดสมอไทยมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่าขนาดของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารสกัดซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Kannan *et al.* (2009) ที่รายงานว่าสารสกัดจากผลสมอไทยที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แบบ broad spectrum สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายสายพันธุ์

เมื่อทำการหาค่า MIC_{50} ของสารสกัดสมอไทยด้วยวิธี broth microdilution พบว่าสารสกัดสมอไทยมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทุกสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบ โดยมีค่า MIC_{50} อยู่ระหว่าง 0.16-0.68 mg/ml และเมื่อทำการหาค่า MBC และ/หรือ MFC ของสารสกัดสมอไทยพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 5-20 mg/ml สำหรับกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวคาดว่าเกิดจากสารประกอบฟีนอลที่สามารถพบได้ในปริมาณสูงเมื่อทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล โดยเฉพาะสารฟีนอลิกที่พบว่ามีค่าเท่ากับ 157.64±4.18 mg GAE/g crude extract ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาก่อนหน้าของ Bag *et al.* (2013) สำหรับกลไกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารฟีนอลิก ได้แก่การทำลายโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ การยับยั้งปัจจัยที่เกี่ยวกับความรุนแรงในการก่อโรค เช่น เอนไซม์และสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น รวมถึงยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย (Miklasiǹska-Majdanik *et al.*, 2018)

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ dermal fibroblast พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 0.625-5 mg/ml จะทำให้มีอัตราการรอดของเซลล์อยู่ระหว่าง 70-90% และเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัด 10 mg/ml จะมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ต่ำกว่า 70% ในขณะที่ sodium lauryl sulfate ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ซึ่งใช้เป็น positive control เนื่องจากเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดประจุลบที่สามารถก่อให้เกิดการระคายเคือง (Perkins et al., 1999) มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เท่ากับ 5.23±0.23% และเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดสมอไทยในการเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยใช้สารสกัดสมอไทยความเข้มข้น 5 mg/ml ในตำรับอิมัลชัน ทดสอบด้วยวิธี Challenge test อ้างอิงจากมาตรฐาน ISO11930 ตาม criteria A พบว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด โดยเมื่อพิจารณาค่า log reduction พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อได้ 2-3 log ภายในวันที่ 7 ของการทดสอบและเมื่อสิ้นสุดการทดลองไม่มีการเพิ่มขึ้นของเชื้อ แม้กระทั่งเชื้อ *P. aeruginosa* ที่มักมีรายงานว่าดื้อต่อยา แต่เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งยีสต์และราในตำรับ ได้แก่ *C. albicans* และ *A. brasiliensis* พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไม่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด กล่าวคือ สารสกัดไม่สามารถลดปริมาณ *C. albicans* และ *A. brasiliensis* ลงได้ตามเกณฑ์ภายในระยะเวลาที่กำหนด ผลที่ได้ดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาของ Ostrosky *et al.* (2011) ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัด *Rubus rosaefolius* ในการเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่พบว่าสารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแต่ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งยีสต์และราตามมาตรฐานที่กำหนด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Papageorgiou *et al.* (2010) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัด *Lonicera caprifoleum* และ *Lonicera japonica* ในการเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางโดยพบว่าเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในผลิตภัณฑ์รูปแบบสารละลาย (aqueous formulations) เช่น **โทนิคโลชั่น** (tonic lotion) สารสกัดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเป็นไปตามเกณฑ์ criteria A ในขณะที่การยับยั้งยีสต์และราไม่เป็นไปตามเกณฑ์ criteria A ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการพัฒนาหรือปรับสูตร

ตำรับที่ไม่มีผลกระทบหรือกระทบน้อยต่อฤทธิ์ของสารสกัดสมอไทยในการยับยั้งยีสต์และรา จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เมื่อทำการศึกษาในตำรับจะให้ผลที่ด้อยกว่าในหลอดทดลอง ทั้งนี้อาจเกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารสกัดกับสารเคมีในสูตรตำรับ (Ostrosky *et al.,* 2011; Herman *et al.,* 2013)

มีรายงานว่าการใช้สารผสมระหว่างสารธรรมชาติร่วมกับสารกันเสียสังเคราะห์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ การศึกษาของ Maccioni *et al.* (2002) แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยที่ได้จาก *Laurus nobilis*, *Eucalyptus globulus* และ *Salvia officalis* ที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.0125% ร่วมกับสารกันเสียสังเคราะห์ methylparaben สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ถึง 200 เท่า เช่นเดียวกับการศึกษาของ Mauricio *et al.* (2017) ถึงประสิทธิภาพของสาร Nissin ในการเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางพบว่า เมื่อใช้สาร Nissin ความเข้มข้น 125 ppm ร่วมกับสารกันเสียสังเคราะห์ Abiol (Imidazolidinyl urea) ความเข้มข้น 0.15% และ Microcare PM2 (Phenoxyethanol, Ethylparaben, Methylparaben) ความเข้มข้น 0.35% ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดีกว่าการใช้สารกันเสียสังเคราะห์เพียงอย่างเดียวเมื่อทดสอบด้วยวิธี challenge test ซึ่งการใช้สารจากธรรมชาติร่วมกับสารกันเสียสังเคราะห์ในลักษณะดังกล่าวสามารถลดปริมาณการใช้สารกันเสียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางได้ (Herman, 2019)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้พบว่าสารสกัดสมอไทยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ ในหลอดทดลองและเมื่อนำสารสกัดมาใช้เป็นสารกันเสียในตำรับ พบว่าการใช้สารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อการเจริญของแบคทีเรียได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่มยีสต์และราได้ตามมาตรฐานที่กำหนด ดังนั้นจึงอาจนำสารสกัดสมอไทยไปประยุกต์ใช้ร่วมกับสารกันเสียสังเคราะห์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในรูปแบบของสารเพิ่มประสิทธิภาพการกันเสียเพื่อลดปริมาณการใช้สารกันเสียสังเคราะห์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2561

เอกสารอ้างอิง

Bag, A., Bhattacharyya, S.K., Bharati, P., Pal, N.K. & Chattopadhyay, R.R. (2009). Evaluation of antibacterial properties of Chebulic myrobalan (fruit of *Terminalia chebula* Retz.) extracts against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and trimethoprim-sulphamethoxazole resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *African Journal of Plant Science, 3*(2), 025-029.

Bag, A., Bhattacharyya, S.K., & Chattopadhyay, R.R. (2013). The development of *Terminalia chebula* Retz. (Combretaceae) in clinical research. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine, 3* (3), 244-252.

Bag, A., Bhattacharyya, S.K., Pal, N.K., & Chattopadhyay, R.R. (2012). In vitro antimicrobial potential of *Terminalia chebula* fruit extracts against multidrug-resistant uropathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2*(3), S1883-S1887.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). *Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. M27-A3*. CLSI. Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). *Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. M38-A2*. CLSI. Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Antifungal disc Diffusion Susceptibility testing of Yeast; *Approved Standard— Second Edition. M44-A2*. Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. M02-A11*. CLSI. Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; *Approved Standard— Tenth Edition. M07-A10*. Wayne, PA, USA.

Dréno, B., Zuberbier, T., Gelmetti, C., Gontijo, G. & Marinovich, M. (2019). Safety review of phenoxyethanol when used as a preservative in cosmetics. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 7*, 15-24.

González-Muñoz, P., Conde-Salazar, L. & Vañó-Galván, S. (2014). Allergic contact dermatitis caused by cosmetic products. *Actas Dermo-Sifiliográficas, 105*(9), 822-832.

Halla, N., Fernandes, I.P., Heleno, S.A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A.E., Ferrira, ICFR, & Barreiro, M.F. (2018). Cosmetics Preservation: A Review on Present Strategies. *Molecules, 23*(7), 1571.

Herman, A. (2019). Antimicrobial ingredients as preservative booster and components of self-preserving cosmetic products. *Current Microbiology, 76,* 744-754.

Herman, A., Herman, A.P., Domagalska, B.W., & Mlynarczyk, A. (2013). Essential oil and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion. *Indian Journal of Microbiology, 53*(2), 232-237.

Hughes, O.B., Maderal, A.D. & Tosti, A. (2016). Preservative sensitization- safety with and safety without. *Current Treatment Options in Allergy, 3,* 345-358.

ISO 11930:2019 Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product.

Kannan, P., Ramadeve, S.R. & Hopper, W. (2009). Antibacterial activity of *Terminalia chebula* fruit extract. *African Journal of Microbiology Research*, *3*(4), 180-184.

Kunicka-Styczynska, A., Sikora, M. & Kalemba, D. (2009). Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of Applied Microbiology, 107*, 1903–1911.

Maccioni, A.M., Anchisi, C., Sanna, A., Sardu, C. & Dessi, S. (2002). Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science, 24*, 53-59.

Maurício, E., Rosado, C., Duarte, M.P., Verissimo, J., Bom, S. & Vasconcelos, L. (2017). Efficiency of Nisin as Preservative in Cosmetics and Topical Products, *Cosmetics, 4,* 41.

Mehmood, Z., Ahmad, I., Mohammad, F. & Ahmad, S. (1999). Indian Medicinal Plants: A Potential Sources for Anticandidal Drugs. *Pharmaceutical Biology, 37*(3), 237-242.

Miklasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R.D., Idzik, D. & Wąsik, T.J. (2018). Phenolic Compounds Diminish Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Clinical Strains. *International Journal of Environmental Research and Public Health. 15*(10), 2321.

Nabavi, S.F., Lorenzo, A.D., Izadi, M., Sobarzo-Sánchez, E., Daglia, M. & Nabavi, S.M. (2015). Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. *Nutrients, 7*(9), 7729-7748.

Nigam, M., Mishra, A.P., Adhikari-Devkota, A., Dirar, A.I., Hassan, M., Adhikari, A., Belwa, T. & Devkota, H.P. (2020). Fruits of *Terminalia chebula* Retz.: A review on traditional uses, bioactive chemical constituents and pharmacological activities. *Phytotherapy Research, 34*, 2518–2533.

Nostro, A., Cannatelli, M.A., Morelli, I., Musolino, A.D., Scuderi, F., Pizzimenti, F. & Alonzo, V. (2004). Efficiency of *Calamintha officinalis* essential oil as preservative in two topical product types. *Journal of Applied Microbiology, 97*(2), 395-401.

Orús, P., Gomez-Perez, L., Leranoz, S. & Berlanga, M. (2015) Increasing antibiotic resistance in preservative-tolerant bacterial strains isolated from cosmetic products. *International Microbiology, 18*, 51–59.

Ostrosky, E.A., Marcondes, E.M., Nishikawa Sde, O., Lopes, P.S., Varca, G.H., Pinto Tde, J.…Kaneko, T.M. (2011). *Rubus rosaefolius* extract as a natural preservative candidate in topical formulations. *American Association of Pharmaceutical Scientists, 12*, 732-727.

Papageorgiou, S., Varvaresou, A., Tsirivas, E. & Demetzos, C. (2010). New alternatives to cosmetics preservation. *Journal of Cosmetic Science, 61*, 107–123.

Perkins, M.A., Osborne, R., Rana, F.R., Ghassesmi, A. & Robinson, M.K. (1999). Comparison of *in Vitro* and *in Vivo* Human Skin Responses to Consumer Products and Ingredients with a Range of Irritancy Potential. *Toxicological Science, 48*, 218-229.

Phetdee, K., Rakchai, R., Rattanamanee, K., Teaktong, T. & Viyoch, J. (2014). Preventive effects of tamarind seed coat extract on UVA-induced alterations in human skin fibroblasts. *International Journal of Cosmetic Science, 65,* 11–24.

Popescu, C., Popescu, C., Popescu, B., Daas, D., Morgovan, C. & Olah, N.K. (2014). Antimicrobial efficacy of the organic greasy oils combination-sea buckthorn oil and maize germs oil. *Farmacia, 62*, 743–752.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J. & Shahabimaid, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology, 5*(11), 1142-1145.

Sasseville, D. (2004). Hypersensitivity to preservatives. *Dermathologic therapy, 17*(3), 251-263.

Puschmann, J., Herbig, M.E., Müller-Goymann, C.C. (2018). Correlation of antimicrobial effects of phenoxyethanol with its free concentration in the water phase of o/w-emulsion gels. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 131*, 152-161.

Vichai, V. & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodomine B colorimetric ossoy for cytotoxicity screening. *Noture Protocols,1*(3), 1112-1116.

Varvaresou, A., Papageorgiou, S., Tsirivas, E., Protopapa, E., Kintziou, H., Kefala, V. & Demetzos, C. (2009). Self-preserving cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science, 31*(3), 163-175.

Yim, E., Baquerizo Nole, K.L. & Tosti, A. (2014). Contact dermatitis caused by preservatives. *Dermatitis, 25*(5), 215-231.