ประสิทธิภาพของสารกันเสีย กลุ่มพาราเบน และ ไม่ใช่พาราเบน ในตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน

ANTIMICROBIAL EFFICACY OF PARABENS AND NONPARABENS IN BUTTERFLY PEA EXTRACT SERUM

ชฎาธาร ดิถีเพ็ง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2564

ประสิทธิภาพของสารกันเสีย กลุ่มพาราเบน และ ไม่ใช่พาราเบน ในตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน

ชฎาธาร ดิถีเพ็ง

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ANTIMICROBIAL EFFICACY OF PARABENS AND NONPARABENS IN BUTTERFLY PEA EXTRACT SERUM

CHADARTHARN DITIPAENG

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of MASTER OF SCIENCE

(Pharmaceutical Product Development)

Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของสารกันเสีย กลุ่มพาราเบน และ ไม่ใช่พาราเบน

ในตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน

ของ

ชฎาธาร ดิถีเพ็ง

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง)

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชุดา จิตตสุโภ)

..... ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัฒนพร พัฒนภักดี)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี)

ชื่อเรื่อง	ประสิทธิภาพของสารกันเสีย กลุ่มพาราเบน และ ไม่ใช่พาราเบน ในตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน
ผู้วิจัย	ชฎาธาร ดิถีเพ็ง
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัฒนพร พัฒนภักดี

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารกันเสียกลุ่มพาราเบน (methylparaben, propylparaben) กับสารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน (phenoxyethanol, chlorphenesin) ในตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน และศึกษาความคงสภาพของตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันทั้ง 2 ตำรับ ทำการทดลองโดยเตรียมตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน 4 ตำรับ คือ ไม่ใส่สารกันเสีย ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน กลุ่มไม่ใช่พาราเบน และ สารกันเสียทั้งสองกลุ่ม แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีการทดสอบของตำรายาของประเทศสหรัฐอเมริกา (USP XLII) หัวข้อ 51 และศึกษาความคงสภาพของเซรั่มโดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารเมทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบน พีน็อกซี่เอทานอล และคลอร์เฟเนซิน ในตำรับ โดยพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วย HPLC พร้อมทั้งตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในเซรั่ม ตามวิธีการทดสอบของ USP หัวข้อ 61 และ 62 และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของเซรั่มด้วยการวัดค่า pH การเปลี่ยนแปลงของสีและการแยกชั้นของเซรั่ม โดยเก็บตัวอย่างไว้ ที่อุณหภูมิ 25°C 40°C และ สภาวะเร่ง ทดสอบในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 ผลการศึกษาพบว่าสารกันเสียกลุ่มพาราเบนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันไม่แตกต่างกับสารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน สารกันเสียทั้งสองกลุ่มสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli, E. aerogenes, S. aureus, C. albicans* และ *A. niger* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียทั้ง 4 ชนิดด้วย RP-HPLC คือ ACE5 C18-AR column (250x4.6 mm, 5 µm), เฟสเคลื่อนที่ ปรับเปลี่ยนอัตราส่วน ของ acetonitrile: 0.1% phosphoric acid ที่อัตราการไหล 1.5 มล./นาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร และปริมาตรที่ฉีด 10 ไมโครลิตร ความคงสภาพของเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันสูตรที่ใช้สารกลุ่มพาราเบน และสูตรที่ใช้สารกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบนไม่มีความแตกต่างกัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของสารกันเสียตลอดการศึกษา ($p>0.05$) ค่า pH ของเซรั่มอยู่ในช่วง 5-7 และเซรั่มไม่มีการแยกชั้น แต่เซรั่มที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C มีการเปลี่ยนสีของจากสีน้ำเงินเป็นสีเทาในวันที่ 84 และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จึงสามารถนำ พีน็อกซี่เอทานอล และคลอร์เฟเนซิน มาใช้เป็นสารกันเสียทางเลือกแทนพาราเบนได้

คำสำคัญ : เมทิลพาราเบน, โพรพิลพาราเบน, พีน็อกซี่เอทานอล, คลอร์เฟเนซิน, เซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน, ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

Title	ANTIMICROBIAL EFFICACY OF PARABENS AND NONPARABENS IN BUTTERFLY PEA EXTRACT SERUM
Author	CHADARTHARN DITIPAENG
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Associate Professor Sarin Tadtong , Ph.D.
Co Advisor	Assistant Professor Wattanaporn Pattanapukdee , Ed.D.

The purpose of this research is to compare the antimicrobial efficacy of parabens (methylparaben (MP) and propylparaben (PP)) and non-parabens (phenoxyethanol (PE) and chlorphenesin (CH)) in Butterfly pea extract serum and to investigate the stability of both formulae. The sample serums were prepared with four preservatives: parabens, non-parabens, mixed parabens and non-parabens, and no preservatives. The antimicrobial efficacy test followed the United States Pharmacopeia (USP XLII); Antimicrobial Effectiveness Test <51> and the stability was studied by determination of MP, PP, PE, and CH, microbial contamination in serum, and serum physical properties (pH, color, and appearance) by storage samples at 25°C, 40°C, and accelerated condition. Then, it test was tested on Day 0, 28, 56, 84, 112, 140 and 168 and the developed and validated HPLC method determined the amount of MP, PP, PE, and CH. Microbial contamination was carried out according to the methods of USP XLII <61> and <62>. The results showed that the antimicrobial efficacy of parabens serum was not different from non-parabens serum, and both could inhibit the growth of *E. coli, E. aerogenes, S. aureus, C. albicans,* and *A. niger*, but could not inhibit the growth of *P. aeruginosa*. The RP-HPLC conditions for the quantitative analysis of MP, PP, PE, and CH was conducted with ACE5 C18-AR column (250x4.6 mm, 5 µm), gradient elution with acetonitrile: 0.1% phosphoric acid as a mobile phase, flow rate of 1.5 ml/min, injection volume of 10 µl and UV detection at 270 nm. The stability study showed no difference between parabens serum and non-parabens serum, the remaining of the preservatives did not change ($p>0.05$), serum pH 5-7, the serum appearance was not separate, and no microbial contamination in serums, but the serum stored at 40°C had changed color from blue to gray on day 84. Therefore, PE and CH can be used instead of parabens as preservatives in cosmetics.

Keyword : Butterfly pea extract serum, microbial efficacy, HPLC, Methylparaben, Propylparaben, Phenoxyethanol, Chlorphenesin

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์เรื่อง ประสิทธิภาพของสารกันเสีย กลุ่มพาราเบน และ ไม่ใช่พาราเบน ในตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน ฉบับนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัฒนพร พัฒนภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และคำปรึกษา ในเรื่องของทฤษฎี การปฏิบัติการ การจัดหาทุนสนับสนุน ผศ.ชญานิศ ศรชัยธวัชวงศ์ ในเรื่องการสนับสนุนสารเคมีในการตั้งตำรับ และตำรับเซรั่มที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและจัดทำปริญญานิพนธ์ครั้งนี้ จนสำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์ของการวิจัย รวมถึงการให้คำปรึกษาการดำเนินชีวิตในช่วงที่ยากลำบากของผู้วิจัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ และอาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย คณาจารย์คณะกรรมการพิจารณาเค้าโครงปริญญานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชุดา จิตตสุโภ ประธานคณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามีกรรมการบริหารหลักสูตรวิทยาการเภสัชภัณฑ์ที่เชิญชวนให้เข้าร่วมหลักสูตรและให้คำแนะนำ ข้อแก้ไขต่าง ๆ เกี่ยวข้องกับการศึกษาในหลักสูตรดังกล่าวพร้อมกับการจัดทำรูปเล่มปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ขอบกราบขอบพระคุณ ดร.ธนภร อุบลทิพย์ ที่ให้คำแนะนำในการแก้ปัญหาที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาตลอดหลักสูตร นางสาววรีรัตน์ นำศรีเจริญกุล ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านต่าง ๆ ของการปฏิบัติการ นายธนภัทร สุขสมบูรณ์ และ นางสาวชนกานต์ ชีวบันเทิง ที่คอยตักเตือน ให้คำแนะนำ คำปรึกษาตลอดการศึกษา

ขอขอบพระคุณครอบครัวของผู้วิจัยและผู้ที่มีส่วนสนับสนุน ให้คำปรึกษา ที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัยในระหว่างการดำเนินการจัดทำปริญญานิพนธ์ให้สำเร็จ

ผู้วิจัยหวังว่า ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะสร้างประโยชน์และคุณค่าให้แก่นักวิจัย และผู้สนใจศึกษา ผู้วิจัยขอมอบคุณค่าของปริญญานพนธ์ครั้งนี้แก่ครอบครัว คณาจารย์ และผู้มีพระคุณที่มีส่วนเกี่ยวข้อง สำหรับข้อบกพร่องใด ๆ ที่เกิดขึ้นในงานนี้ ผู้วิจัยขอนิ้มรับคำแนะนำและข้อเสนอจากทุกท่านที่ได้ศึกษาปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เพื่อเป็นประโยชน์แก่การพัฒนางานวิจัยต่อไป

ชฎาธาร ดิถีเพ็ง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูปภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

ภูมิหลัง 1

ความมุ่งหมายของงานวิจัย 3

ความสำคัญของการวิจัย 3

ขอบเขตของการวิจัย 3

นิยามปฏิบัติการ 4

สมมติฐานในการวิจัย 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

เซรั่ม 5

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ และพฤกษเคมีของอัญชัน 6

สารกันเสียที่ใช้ในตำรับเครื่องสำอาง 7

ความเป็นพิษของสารกันเสียกลุ่มพาราเบน 10

วิธีวิเคราะห์สารกันเสีย 13

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสีย 17

การทดสอบความคงสภาพ 18

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 21
เครื่องมือ 21
สารเคมี 21
อาหารเลี้ยงเชื้อ 22
เชื้อจุลินทรีย์ 22
วิธีการทดลอง 23
1. การเตรียมเซรั่มบำรุงเส้นผมที่ใช้ในการทดลอง 23
2. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียทั้งสองกลุ่มโดย HPLC 24
3. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน, สารละลายในการวิเคราะห์ และการเตรียมสารสกัดจากเซรั่ม 24
4. ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) 25
5. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสีย และการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ 27
6. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ 28
7.การศึกษาความคงสภาพ 28
8. การวิเคราะห์ข้อมูล 29
บทที่ 4 ผลการวิจัย 30
พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียโดย HPLC และทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ 30
การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) 32
วิเคราะห์ปริมาณสารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน ในตำรับเซรั่ม 35
ความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ 40
ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสีย 41
การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในตำรับเซรั่ม 43

การวิเคราะห์ผลการทดสอบทางสถิติ 46
บทที่ 5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ 49
สรุปผลการวิจัย 49
อภิปรายผลการวิจัย 52
ข้อเสนอแนะ 55
บรรณานุกรม 56
ภาคผนวก 61
ประวัติผู้เขียน 79

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 สมบัติพื้นฐานของสารกันเสียที่ใช้ในการศึกษา 9

ตาราง 2 ผลการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะการวิเคราะห์ (system suitability) (n = 6) 31

ตาราง 3 ผลการทดสอบหัวข้อ Linearity และ range..... 33

ตาราง 4 ผลการทดสอบหัวข้อ Accuracy และ Precision 34

ตาราง 5 ปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสารกันเสียในตำรับเซรั่มสูตรต่าง ๆ (n=3)..... 36

ตาราง 6 ปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสารกันเสียในตำรับเซรั่ม ภายใต้สภาวะ Freeze/Thaw cycle 40

ตาราง 7 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์..... 42

ตาราง 8 ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน (methylparaben, propylparaben)..... 43

ตาราง 9 ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน (phenoxyethanol, chlorphenesin). 44

ตาราง 10 ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และ ไม่ใช่พาราเบน 44

ตาราง 11 ตำรับเซรั่มที่ไม่ใส่สารกันเสีย 45

ตาราง 12 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะ Freeze/Thaw cycle 46

ตาราง 13 เปรียบเทียบปริมาณ %remaining ของสารกันเสีย ด้วยสถิติ one sample t-test..... 47

ตาราง 14 เปรียบเทียบปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสารกันเสีย ด้วยสถิติ independent t-test 48

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 โครมาโตแกรมแสดงผลการแยกสารกันเสียในเครื่องสำอางประเทศญี่ปุ่น 16

ภาพประกอบ 2 a.) Chromatogram ของ methanol (ตัวทำละลายในการสกัดสาร), b.) Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน phenoxyethanol 600 µg/mL, methylparaben 180 µg/mL, chlorphenesin 280 µg/mL และ propylparaben 35 µg/mL มี retention time 6.8, 8.1, 10.3 และ 14.5 min และ c.) Chromatogram ของสารกันเสีย 4 ชนิด ในเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน 32

ภาพประกอบ 3 กราฟแสดงปริมาณ %remaining เฉลี่ย ของ a.) methylparaben b.) propylparaben ในตำรับเซรั่มสูตรที่ใส่สารกลุ่มพาราเบน ในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168..... 37

ภาพประกอบ 4 กราฟแสดงปริมาณ %remaining เฉลี่ยของ a.) phenoxyethanol b.) chlorphenesin ในตำรับเซรั่มสูตรที่ใส่สารกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168..... 38

ภาพประกอบ 5 กราฟแสดงปริมาณ %remaining เฉลี่ยของ a.) phenoxyethanol b.) methylparaben c.) chlorphenesin d.) propylparaben ในตำรับเซรั่มสูตรที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 39

ภาพประกอบ 6 กลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสร้าง anthocyanin ที่อาจะเกิดขึ้นได้เมื่อได้รับความร้อน..... 53

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารเคมีที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในชีวิตประจำวันออกมาเผยแพร่สู่สาธารณชนจำนวนมาก ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ สารกันเสียที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เช่น สารกันเสียกลุ่มพาราเบน จากการศึกษาพบว่ามีการเกิด Contact allergy ในผิวหนังของมนุษย์ได้ 0-4.2% ซึ่งเป็นการพบในการใช้เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารกันเสียกลุ่มพาราเบน ประมาณ 1% และหากมีการบาดเจ็บบริเวณผิวหนังอาจจะทำให้เกิดอาการแพ้ที่มากขึ้น และ มีการพบปริมาณของสารกลุ่มพาราเบนในเนื้อเยื่อเต้านมของผู้ป่วยมะเร็ง (Cashman และ Warshaw, 2005) ดังนั้นจึงเกิดความกังวลในการใช้สารกลุ่มพาราเบนในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเครื่องสำอางที่มีการใช้ในชีวิตประจำวัน ซึ่งอาจส่งผลกับร่างกายของผู้บริโภคเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางนั้นเป็นระยะเวลานาน จึงเกิดการพัฒนาสูตรตำรับเครื่องสำอางที่ใช้สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่สารกลุ่มพาราเบน โดยสารที่นำมาทนแทน เช่น Phenoxyethanol, Chlorphenesin, Methylisothiazolinone, Methylchloroisothiazolinone เป็นต้น

โดยที่ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทเซรั่มนั้นเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิวประเภทหนึ่งในรูปแบบสารละลายที่มี น้ำ เป็นส่วนประกอบหลัก จึงไม่มีความเหนียวเหนอะ สามารถซึมเข้าผิวได้ง่าย และเร็ว แต่จะมีข้อจำกัดคือ น้ำ สามารถทำให้เกิดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย(อิศเรศ ปัญญา, 2561) ซึ่งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะส่งผลต่อความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังส่งผลต่อผู้บริโภคเมื่อจุลินทรีย์เกิดกระบวนการสร้างสาร endotoxins ที่เป็นพิษต่อร่างกาย ทำให้เกิดการระคายเคืองหรือเกิดการแพ้ได้ จึงมีการออกประกาศกระทรวงสาธารณสุขเกี่ยวกับการกำหนดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในเครื่องสำอาง ดังนี้ ห้ามพบ *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ส่วนเครื่องสำอางผสมสมุนไพรห้ามพบเชื้อ *Clostridium* spp. และเครื่องสำอางที่ใช้บริเวณรอบดวงตา สัมผัสเยื่อบุอ่อน และเครื่องสำอางสำหรับเด็กอายุต่ำกว่า 3 ปี ห้ามพบจำนวนรวมของแบคทีเรีย ยีสต์และรา ที่เจริญเติบโตโดยใช้อากาศ (Total aerobic plate count) มากกว่า 500 colonies/g or cm^3 ขึ้นไป สำหรับเครื่องสำอางทั่วไปที่ไม่ได้สัมผัสเยื่อบุอ่อน และบริเวณรอบดวงตา ห้ามพบจำนวนรวมของแบคทีเรีย ยีสต์และรา ที่เจริญเติบโตโดยใช้อากาศ (Total aerobic plate count) มากกว่า 1,000 colonies/g or cm^3 ขึ้นไป(ราชกิจจานุเบกษา, 2559) นอกจากนี้เครื่องสำอางที่ผสมสารจากสมุนไพรมีโอกาสปนเปื้อนเชื้อได้เนื่องจากสมุนไพรเป็นวัตถุดิบทางธรรมชาติ ทำให้มีสิ่งปนเปื้อน

จากฝุ่น เมล็ดพืช ทราย หิน เศษชิ้นส่วนเล็ก ๆ จากสิ่งแวดล้อม หรือเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ตามดิน อากาศ และน้ำ ที่ใช้ในการเพาะปลูก และอาจเกิดการปนเปื้อนในช่วงกระบวนการการเตรียมวัตถุดิบ เช่น การเก็บเกี่ยว การขนส่ง การเตรียมสมุนไพรแห้ง ที่ผิดวิธี ซึ่งส่วนใหญ่กระบวนการต่างๆนั้นไม่ได้เป็นกระบวนการปราศจากเชื้อ จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่ายขึ้น โดยในประเทศไทยเคยพบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพที่พบในภาคเหนือของประเทศ 3.44% และพบการปนเปื้อนของเชื้อราและยีสต์ คิดเป็น 9.19% ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ประเภทครีมและโลชั่น(Techaoei, 2017) ดังนั้นในการผลิตต้องสามารถยืนยันได้ว่าไม่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อหรือการใส่สารกันเสียในตำรับ ซึ่งส่วนใหญ่สารกันเสียที่เลือกใช้คือ สารกลุ่มพาราเบน แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบปัญหาเกิดการแพ้และอาจเกิดสะสมในร่างกาย จึงต้องมีการใช้สารกันเสียชนิดอื่นมาทดแทน

เซรั่ม นั้นมีส่วนประกอบที่เป็นวัฏภาคน้ำ และวัฏภาคน้ำมัน ซึ่งมีสารเคมีหลายชนิดผสมกัน ในการวิเคราะห์สารเคมีในตำรับนั้น จะเกิดการรบกวนผลการวิเคราะห์จากสารอื่น จึงต้องเลือกวิธีสกัดสารที่เหมาะสมเพื่อแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ออกมา โดยวิธีการสกัดที่ง่าย ไม่ซับซ้อน สามารถแยกสารได้ และเป็นที่นิยม คือ วิธี liquid extraction โดยเลือกตัวทำละลายที่มาสกัดโดยไม่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของสาร การวิเคราะห์สารหลายชนิดที่ละลายอยู่ด้วยกัน จะเกิดการรบกวนผลการทดสอบ ดังนั้นจึงต้องแยกสาร โดยใช้เครื่องมือที่สามารถแยกสารออกจากกันได้ ซึ่งเครื่องมือที่นิยมใช้ในการแยกสารนั้น คือ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เนื่องจากมีความสามารถในการแยกสาร มีความไวสูง ที่สามารถปรับเปลี่ยนสภาวะการวิเคราะห์เพื่อให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ได้แก่ การปรับ mobile phase เพื่อให้สามารถแยกสารออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติความมีขั้ว ไม่มีขั้วของสาร ตามหลักการ like dissolve like คือ สารที่มีคุณสมบัติความมีขั้วเหมือนกับเฟสคงที่ (stationary phase) จะจับกับเฟสคงที่ได้ดี ส่งผลให้สารนั้นออกจากคอลัมน์เข้าสู่ detector ได้ช้ากว่า สารที่มีคุณสมบัติการมีขั้วต่างจากเฟสคงที่

ตำรับเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสมุนไพรโดยเฉพาะตำรับเซรั่มซึ่งมีน้ำผสมอยู่เป็นส่วนมาก สารกันเสียที่ใช้ในตำรับระหว่างสารกลุ่มพาราเบน และ สารที่ไม่ใช่พาราเบนนั้น มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์แตกต่างกันหรือไม่ อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารทั้งสองกลุ่มอย่างชัดเจน นอกจากนี้ความคงสภาพของสารกันเสียทั้งสองกลุ่มในตำรับผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บผ่านไประยะเวลาหนึ่ง โดยจะศึกษาจากปริมาณสารกันเสียในตำรับและประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยทางผู้วิจัยได้นำวิธี liquid extraction มาใช้สกัดสารกันเสียออกจากสูตรตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันแล้วใช้ High

Performance Liquid Chromatography ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร ทางด้านการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อของสารกันเสียทั้งสองกลุ่ม ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่อ้างอิงจาก US pharmacopoeia และ ASEAN guideline (ราชกิจจานุเบกษา, 2559) เนื่องจากเป็นวิธีวิเคราะห์ที่องค์การอาหารและยาของประเทศไทย ยอมรับให้สามารถนำผลการวิเคราะห์ดังกล่าวมาขอขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารกลุ่มกันเสียกลุ่มพาราเบน เปรียบเทียบกับ สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ในตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน

เพื่อศึกษาความคงสภาพของตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันที่ใส่สารสารกลุ่มกันเสียกลุ่มพาราเบน เปรียบเทียบกับ สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน

ความสำคัญของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ เพื่อยืนยันประสิทธิภาพการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบนเทียบเท่าสารกันเสียกลุ่มพาราเบนและ ศึกษาความคงสภาพของเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสูตรตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันให้มีความคงสภาพตลอดการใช้งานของผู้บริโภค

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เซรั่มสารสกัดดอกอัญชันที่เตรียมจากสูตรที่กำหนดโดยมีสารกันเสียเป็นสารกลุ่มพาราเบน และ สารกันเสียที่ไม่ใช่สารกลุ่มพาราเบน เป็นส่วนประกอบ บรรจุในขวด โดยจัดเก็บในอุณหภูมิ 25°C, 40°C และทดสอบ accelerated stability studies เก็บตัวอย่างมาทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial effectiveness testing) กับตัวอย่างเชื้อจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterobacter aerogenes, Candida albicans* และ *Aspergillus niger* ในวันที่ 0, 7, 14, 28 และ 56 ของการทดสอบ และหาปริมาณเฉพาะสารกันเสีย ด้วยเครื่อง HPLC ในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168

ตัวแปรที่ศึกษา

ตัวแปรต้น: ตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันผสมสารกันเสียกลุ่มพาราเบน (methylparaben, propylparaben), และตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันผสมสารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน (phenoxyethanol, chlorphenesin) ‘

ตัวแปรตาม: ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์, ความคงสภาพของเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันทางเคมีและกายภาพ

นิยามปฏิบัติการ

สารกันเสียกลุ่มพาราเบน หมายถึง methylparaben, propylparaben

สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน หมายถึง phenoxyethanol, chlorphenesin

ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ หมายถึง ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterobacter aerogenes, Candida albicans, Aspergillus niger*

ความคงสภาพของเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน หมายถึง ความสามารถของเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันที่จะรักษาสภาพของลักษณะภายนอกของตำรับ ได้แก่ สี กลิ่น การแยกชั้นของตำรับ ค่า pH ของตำรับ และ ปริมาณสารกันเสียในตำรับ

สมมติฐานในการวิจัย

1. ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ในตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ไม่แตกต่างจากตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน

2. ความคงสภาพของตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ไม่แตกต่างจากตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. ผลิตภัณฑ์รูปแบบเซรั่ม
2. ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ และพฤกษเคมีของอัญชัน
3. สารกันเสียที่ใช้ในตำรับเครื่องสำอาง
4. ความเป็นพิษของสารกันเสียกลุ่มพาราเบน
5. วิธีวิเคราะห์สารกันเสีย
6. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสีย
7. การทดสอบความคงสภาพ

เซรั่ม

เซรั่ม คือ ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญในตำรับสูงกว่าผลิตภัณฑ์ประเภทครีมหรือโลชั่นโดยมีสารพื้นของตำรับเป็นน้ำ หรือ น้ำมัน คล้ายกับครีม ซึ่งมีความหนืด มีลักษณะเนื้อสัมผัสบางเบากว่าผลิตภัณฑ์ประเภทครีม เนื่องจากส่วนผสมหลักส่วนใหญ่เป็น น้ำ โดยความเหลว ลักษณะ และสีของเนื้อเซรั่มจะเป็นไปตามอัตราส่วนประกอบของวัฏภาคน้ำกับวัฏภาคน้ำมัน ส่วนผสม สารสกัด ของแต่ละสูตรตำรับเซรั่ม ข้อดีของเซรั่มคือ มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์สำคัญสูงกว่าผลิตภัณฑ์ประเภทครีม ทำให้ปริมาณการใช้ต่อครั้งน้อยกว่า นอกจากนี้เซรั่มจะมีโมเลกุลขนาดเล็กจากส่วนผสมที่มี น้ำเป็นส่วนผสมหลัก ทำให้สามารถซึมเข้าผิวได้ง่าย รวดเร็ว ทำให้เห็นประสิทธิภาพได้เร็ว นอกจากนั้นเนื้อเซรั่มมีความบางเบา ไม่เหนียวเหนอะ ทำให้ไม่อุดตันรูขุมขนจึงสามารถลดการเกิดสิวได้ เซรั่มอาจจัดเป็นเครื่องสำอาง ยาหรือเวชภัณฑ์ขึ้นอยู่กับสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ ที่ผสมเข้าไปในตำรับ จากข้อดีที่กล่าวมานั้นจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เซรั่มเป็นที่นิยมใช้ในเครื่องสำอาง การทดสอบความคงสภาพเซรั่ม แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือทางกายภาพและทางเคมี การทดสอบทางกายภาพ เช่น ค่าความหนืด, ความเป็นเนื้อเดียวกันของตำรับ, คุณภาพทางจุลินทรีย์ สีของตำรับ การทดสอบทางเคมี เช่น ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณสารสำคัญหรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Skinphilic, 2562; อิศเรศ ปัญญา, 2561)

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ และพฤกษเคมีของอัญชัน

ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

ชื่อ : อัญชัน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Clitorea ternatea* L.

ชื่อวงศ์ : Leguminosae (Papilionoideae)

ลักษณะทั่วไป : เป็นไม้ล้มลุกเลื้อยพัน เถามีลักษณะกลมเล็กเรียว สีเขียวอ่อน เถาอ่อนมีขนนุ่ม เถายาว 1-5 เมตร แตกกิ่งก้านตามข้อใบ

- ใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ เรียงสลับ ใบย่อย 2-3 คู่ ใบบาง สีเขียว ใบย่อยรูปวงรีแกมไข่กลับ กว้าง 1-3 เซนติเมตร ยาว 2-5 เซนติเมตร ผิวใบมีขนปกคลุมทั้งสองด้าน หรือบางครั้งผิวด้านบนเกลี้ยง ขอบใบเรียบ ปลายใบมน ปลายเป็นติ่งแหลมสั้นๆ แผ่นใบเรียบ

- ดอกเดี่ยว ออกที่ซอกใบ มี 1-2 ดอก กลีบดอก รูปดอกถั่ว มี 5 กลีบ แบ่งเป็น 2 ปาก ปากล่างขนาดใหญ่ ตรงกลางดอกมีแถบสีเหลืองขาว กลีบเลี้ยงสีเขียว 5 กลีบ แผ่นกลีบบาง ปลายแยกเป็น 5 แฉก ดอกมีสีน้ำเงิน ม่วง หรือขาว แบ่งดอกเป็นสองพันธุ์ คือ 1.พันธุ์ดอกลา ซึ่งมีกลีบใหญ่ที่สุด 1 กลีบ มีจุดแต้มสีเหลืองกลางกลีบ 2.พันธุ์ดอกซ้อน มีกลีบใหญ่มากกว่า 1 กลีบ ดูเหมือนกลีบดอกหลายชั้น มีก้านดอกสั้นๆ ยาว 2-3 มิลลิเมตร

- ผลเป็นฝัก รูปดาบ แบนยาว ขนาดกว้าง 1-1.5 เซนติเมตร ยาว 5-12 เซนติเมตร มีขนสั้นนุ่ม ปลายเป็นจะงอยสั้นๆ ฝักอ่อนมีสีเขียว พอแก่มีสีน้ำตาลอ่อน แตกเป็น 2 ฝา เมล็ดรูปไต สีดำ ยาวได้ประมาณ 5 มิลลิเมตร จำนวน 6-10 เมล็ด (มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2010)

พฤกษเคมีของอัญชัน

จากการวิเคราะห์พฤกษเคมีเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) ในสารสกัดส่วนต่างๆ ของอัญชันโดยเมทานอล โดยในดอกอัญชันพบสารเคมีในกลุ่ม Alkaloids, Tannins, Glycosides, Resins และ Flavonoids ซึ่งสารในกลุ่ม Flavonoids ที่พบได้แก่สาร Kaempferol, Quercetin, Myrictin นอกนั้นยังพบสารกลุ่ม Anthocyanins ได้แก่ สาร Delphinidins, Ternatins (Kazuma, Noda, และ Suzuki, 2003; Manjula, Mohan, Sreekanth, Keerthi, และ Devi, 2013)

การกระตุ้นการเจริญของเส้นผมสารสกัดดอกอัญชัน

การศึกษาของ Kurmar และคณะ ปี 2012 โดยศึกษาสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่สกัดด้วยวิธีการแช่สกัดด้วย ethyl alcohol ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase จากตับของหนู ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ยับยั้งการเจริญของเส้นขน และฤทธิ์การกระตุ้นการเจริญของเส้นขนของหนู mice พบว่าสารสกัดเอทานอลของ *Clitorea ternatea* L. มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5α-reductase และกระตุ้นการงอกของเส้นขนมากที่สุด โดยสารสกัด 1 g มีฤทธิ์เท่ากับ

finasteride 24. 30±1. 64 mg (Kumar, Rungseevijitprapa, Narkkhong, Suttajit, และ Chaiyasut, 2012)

การศึกษา Rabeta และ An Nabil ปี 2011 ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิค และ DPPH scavenging activity ของสารสกัดจากดอกและใบของ *Clitoria ternatea* และ *Vitex negundo* L. ที่สกัดด้วย methanol และ น้ำ ซึ่งพบว่าการสกัดด้วย methanol จะได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคมากกว่าการสกัดด้วยน้ำ พบในใบมากกว่าในดอกของพืช และพบปริมาณสารประกอบฟีนอลิคจากการสกัด *Vitex negundo* L. มากกว่า *Clitoria ternatea* ในส่วนการทดสอบ DPPH scavenging activity พบว่าการสกัดสารจาก *Clitoria ternatea* ด้วย methanol และ น้ำ ให้ผลการทดสอบที่สามารถยับยั้งการเกิด oxidation ได้ (Salleh และ Nabil, 2013)

การศึกษา Trüeb ปี 2012 ศึกษาเกี่ยวกับการเกิด Oxidative stress กระตุ้นให้เกิดกระบวการ Ageing ของเส้นผม โดยทฤษฎีของการเกิด ageing ของเส้นผม เกิดจาก free radical ที่มีพลังงานสูง และอยู่อย่างเป็นอิสระ สามารถทำลายโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์, ไขมัน, โปรตีน และ DNA ของเซลล์ได้ ซึ่งปกติแล้วการเกิด Free radical จะเกิดขึ้นตามปกติเมื่อเกิดกระบวนการ metabolism และสามารถถูกกระตุ้นให้เกิดได้ด้วย Oxidative stresses จากสิ่งแวดล้อม ร่างกายจะสร้าง endogenous defence เพื่อมาป้องกันการเกิด Free radical ได้แก่ 1. Antioxidative enzyme เช่น Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase 2. Non-enzymatic Antioxidative เช่น vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone เพื่อทำให้ Free radical ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาทำลายโครงสร้างของเซลล์ เมื่อมีอายุมากขึ้นจะมีการสร้าง Free radical เพิ่มมากขึ้น และกระบวนการสร้าง endogenous defence ลดลง ทำให้เกิดความสมดุลของกลไกนี้ จึงเกิดการทำลายโครงสร้างของเซลล์เพิ่มมากขึ้น โดยกระบวนการ Aging ของเส้นผมจะทำให้ลดการทำงานของ Melanocyte ส่งผลให้เกิดผมหงอก และลดการสร้างเซลล์ผม เกิดผมร่วง (Trüeb, 2009) จากการศึกษาที่กล่าวมานั้น การป้องกันการหลุดร่วงของเส้นผมที่เกิดจากกระบวนการ Oxidative stress ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ แต่สามารถถูกเร่งด้วยสภาพแวดล้อม อาจสามารถใช้สารสกัดจากดอกอัญชันซึ่งมีฤทธิ์ antioxidant มาเป็นสารสำคัญของผลิตภัณฑ์ เพื่อช่วยลดการหลุดร่วงของเส้นผม

สารกันเสียที่ใช้ในตำรับเครื่องสำอาง

สารกันเสีย สารเคมีที่ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความคงสภาพและสามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ สามารถแบ่งประเภทได้ดังนี้ (Alvarez-Rivera, Llompart, Lores, และ Garcia–Jares, 2018)

1. สารกลุ่ม Organic Acid Preservatives เช่น benzoic acid, formic acid, propionic acid, sorbic acid สารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ไม่นำมาใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ใช้บริเวณตาหรือปาก

2. สารกลุ่ม Alcohols and Derivatives เช่น benzyl alcohol, isopropyl methylphenol, phenoxyethanol, phenoxyisopropanol 4-hydroxybenzoic acid (parabens) ส่วนใหญ่ใช้กับผลิตภัณฑ์ประเภท ยาสีฟัน, สบู่, แป้งทาหน้าและครีมต่าง ๆ

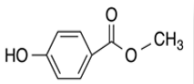
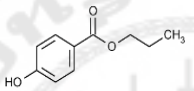
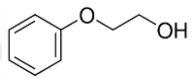
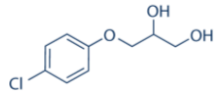
3. สารกลุ่ม Formaldehyde, Methylene Glycol and Formaldehyde Releasers เช่น imidazolidinyl urea, diazolidinyl urea, benzylhemiformal, DMDM hydantoin ส่วนใหญ่ใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภทแชมพู, เจลอาบน้ำ, สบู่เหลว

4. สารกลุ่ม Isothiazolinones เช่น methylisothiazolinone ส่วนใหญ่ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางทั่วไป หรือผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในบ้าน เช่น กาว สี

5. สารกลุ่ม Halogenated Preservatives เช่น 5-bromo-5-nitro-1,3 dioxane (bronidox), 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (bronopol), chlorphenesin ส่วนมากใช้ในแชมพูสระผมและครีมบำรุงผม สบู่เหลว

6. สารกลุ่ม Quaternary Ammonium Salts เช่น benzalkonium chloride, benzethonium chloride ส่วนมากใช้ในแชมพูสระผมและครีมบำรุงผม

ตาราง 1 สมบัติพื้นฐานของสารกันเสียที่ใช้ในการศึกษา

	Methylparaben (Pubchem, 2020)	Propylparaben(Pubchem, 2020)	Phenoxyethanol(Pubchem, 2020)	Chlorphenesin(Pubchem, 2020)
โครงสร้าง				
สูตรโมเลกุล	$C_8H_8O_3$	$C_{10}H_{12}O_3$	$C_8H_{10}O_2$	$C_9H_{11}ClO_3$
น้ำหนักโมเลกุล	152.146	180.20	138.16	202.63
จุดหลอมเหลว	131 °C	96-97 °C	11-13 °C	78 °C
จุดเดือด	270.5 °C	132.78 °C	245 °C	
ความสามารถในการละลาย	1 กรัม ละลายในน้ำ 25 °C 400 มิลลิลิตร, น้ำอุ่น 40 มิลลิลิตร, กลีเซอรีนอุ่น 70 มิลลิลิตร, ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ อะซีโตน และเอสเตอร์	ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ และอีเทอร์, 1 กรัม ละลายในน้ำ 2,159.83 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 °C	ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์, อีเธอร์ และโซเดียมไฮดรอกไซด์ ละลายได้ในเอทานอล, อัลคาลไลน์ และ คลอโรฟอร์ม, สาร 27 g ละลายได้ในน้ำ 1,000 mL	สาร 10 g ละลายได้ในน้ำ 1,000 mL
การต้านเชื้อจุลินทรีย์	สามารถต้านการเจริญเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* แกรมลบ เช่น *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Vibrio* ต้านการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Saccharomyces* (Kosová และคณะ, 2015)		สามารถต้านการเจริญเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และยีสต์ (*Candida albicans*) (Lieber, 1990)	สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ, ฆ่าเชื้อรา *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, ต้านการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* และ *Saccharomyces cerevisiae* (Johnson และคณะ, 2014)

และจากการศึกษาของ Bunyavaree, Kasemsarn และ Boonchai ปี 2016 ได้สำรวจประเภทของสารกันเสียในเครื่องสำอางที่ขายในประเทศไทยพบว่า มีเครื่องสำอางที่ใช้สารกันเสียกลุ่มพาราเบนถึง 43.2% ซึ่งเมื่อแยกประเภทของเครื่องสำอางแล้ว พบว่า สารกันเสียกลุ่มพาราเบนส่วนใหญ่ใช้ในเครื่องสำอางประเภท ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดหน้า, ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวหน้า, ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวทั่วร่างกาย, Make-up, ผลิตภัณฑ์กันแดด และ ผลิตภัณฑ์ดูแลช่องปาก (Bunyavaree, Kasemsarn, และ Boonchai, 2016) เนื่องจากสารกันเสียกลุ่มพาราเบนนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบบ broad spectrum รวมทั้งยีสต์ และ รา สำหรับผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผมและผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดร่างกาย มีการใช้สารกันเสียทดแทนการใช้สารกันเสียกลุ่มพาราเบน ดังนั้นการศึกษาผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผมในครั้งนี้จึงเลือกใช้สารกันเสีย phenoxyethanol และ chlorphenesin ทดแทนการใช้สารกันเสียกลุ่มพาราเบน เนื่องจาก สารกลุ่ม Formaldehyde Releasers นั้นมีโครงสร้างของสาร Formaldehyde และปลดปล่อยออกมาได้ ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค หากได้รับสารเป็นระยะเวลานานมีโอกาสทำให้เป็นมะเร็งได้ สารกลุ่ม Organic acid มีข้อจำกัดในการใช้งานคือ สารกลุ่มนี้ไม่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เมื่ออยู่ในรูปของเกลือ ทำให้ค่า pH ของตำรับมีผลต่อความคงสภาพและประสิทธิภาพของสารกันเสีย โดยประสิทธิภาพจะต่ำลงเมื่อค่า pH ของตำรับสูง สารกลุ่ม Quaternary Ammonium Salts ประสิทธิภาพของสารกันเสียมีความสัมพันธ์กับค่า pH ของตำรับ โดยถ้า ค่า pH ของตำรับต่ำจะมีประสิทธิภาพลดลง และสาร Methylchloroisothiazolinone, Methylisothiazolinone มีรายงานการเกิดอาการแพ้และระคายเคืองที่ผิวหนังของผู้บริโภคจำนวนมาก ส่วนสาร Methylisothiazolinone อาจทำให้เกิด neurotoxic ได้เมื่อมีการใช้สารในระยะเวลานาน (Alvarez-Rivera และคณะ, 2018) และมีการห้ามใช้สารในผลิตภัณฑ์ที่ใช้แล้วไม่ต้องล้างในทวีปยุโรป (Erickson, 2016) ส่วนสาร phenoxyethanol ไม่สามารถต้านการเจริญของเชื้อรา (Lieber, 1990) จึงต้องใช้ในตำรับรูปแบบ combination กับ chlorphenesin ที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อราได้ ทำให้มีประสิทธิภาพการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ครอบคลุม

ความเป็นพิษของสารกันเสียกลุ่มพาราเบน

Contact allergy

การศึกษา contact allergy ของสารพาราเบน ในมนุษย์พบว่า พาราเบนเป็นสารที่ทำให้เกิดการระคายเคืองและเกิดการแพ้ในผิวหนังของมนุษย์ปกติได้น้อย โดยสามารถพบการเกิด allergic contact allergy ได้ 0-4.2 % ซึ่งพบในการใช้เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมเป็นพาราเบน

ประมาณ 1% แต่หากมีอาการบาดเจ็บที่ผิวหนังอาจจะทำให้มีโอกาสเกิดอาการแพ้ได้มากขึ้น โดยมีรายงานการเกิดอาการแพ้จากผู้ที่มีแผลเรื้อรังที่ขา 3.1%

การศึกษาการใช้ patch-tested ที่มีการใส่พาราเบน ในผู้ป่วยที่เป็น chronic dermatitis พบว่า พาราเบนสามารถกระตุ้นให้เกิดอาการแพ้ในอัตราที่ต่ำกว่า 4% ขึ้นอยู่กับแต่ละบุคคล และมี 1% ของพาราเบนที่ไม่ถูก metabolite และถูกดูดซึมเข้าร่างกาย (Cashman และ Warshaw, 2005)

Cancer

จากการศึกษาของ Harvey และ Darbre ในปี 2004 ได้มีการทดสอบโดยนำเครื่องสำอางชนิดครีมหรือโลชั่นที่มีสารกันเสียกลุ่มพาราเบน มาทดสอบใช้บริเวณใต้วงแขน หน้าอก และเต้านม พบว่าสารกันเสียกลุ่มพาราเบน อาจเพิ่มการเกิดมะเร็งเต้านมในผู้หญิงได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างสารกันเสียกลุ่มพาราเบนกับการเกิดมะเร็งเต้านมได้ เนื่องจากการศึกษานี้ไม่ได้จำกัดการได้รับสารกันเสียกลุ่มพาราเบน ซึ่งอาจพบได้จากอาหารหรือยาที่ผู้เข้าร่วมวิจัยได้รับ อีกทั้งการศึกษานี้ไม่มีข้อมูลเบื้องต้นของผู้ร่วมการศึกษา ได้แก่ ชนิดและตำแหน่งของมะเร็ง การใช้เครื่องสำอาง รวมถึงมีขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่เล็ก ซึ่งต่อมา ในปี 2008 ผู้ทำการศึกษาได้ทำการศึกษาในรูปแบบเดิมแต่ไม่ได้ข้อมูลหรือหลักฐานอื่นเพิ่มเติม (Darbre และ Harvey, 2008)

ปี 2012 Barr และคณะ ได้ทดสอบหาปริมาณของสารกันเสียกลุ่มพาราเบน ในเนื้อเยื่อเต้านมที่ไม่ได้เป็นมะเร็ง ยกเว้น propylparaben เนื่องจากมีปริมาณที่สูงกว่าสารกลุ่มพาราเบนชนิดอื่น พบว่าปริมาณของสารกันเสียกลุ่มพาราเบน ในบริเวณเต้านมแต่ละตำแหน่งมีค่าใกล้เคียงกัน ถึงแม้ว่า 7 ใน 40 ของผู้ที่เข้าร่วมจะไม่เคยใช้เครื่องสำอางชนิดทาใต้วงแขน แสดงว่าสารกลุ่มพาราเบน สามารถกระจายไปยังส่วนอื่นของร่างกายได้ (Barr, Metaxas, Harbach, Savoy, และ Darbre, 2012)

จากการศึกษาปี 2014 ของ Khanna โดยเก็บกลุ่มตัวอย่างที่ใช้เครื่องสำอางที่มีพาราเบน เป็นสารกันเสีย ซึ่งใช้กับส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ได้แก่ บริเวณใต้วงแขน, หน้าอก และเต้านม พบว่า พาราเบนสามารถเพิ่มโอกาสการเกิดมะเร็งเต้านมในเพศหญิง โดยในเพศหญิงช่วงวัยรุ่นและเด็กจะได้รับสารกลุ่มพาราเบนแต่ละวันมากกว่าเพศชาย เนื่องจากมีการใช้เครื่องสำอางมากกว่าจึงมีโอกาสได้รับสารกลุ่มพาราเบนมากกว่า ซึ่งการได้รับสารกลุ่มพาราเบนเป็นเวลานานจะทำให้มีผลของ estrogenic ที่บริเวณผิวหนังและพบว่า 60% ของมะเร็งเต้านม เกิดจากสารเคมีที่ได้รับบริเวณใต้แขน อีกทั้ง ethylparaben, butylparaben ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 17 beta

oestradiol 1,000 -10,000 เท่า จะสามารถกระตุ้น MCF7 human breast cancers cell line ได้ แต่มีการเกิด gene expression ที่แตกต่างกับ 17 beta oestradiol (Khanna, Dash, และ Darbre, 2014)

จากการศึกษาวัดระดับของ parabens ester ในเนื้อเยื่อเต้านมของมนุษย์จำนวน 160 ตัวอย่างจากผู้ป่วยมะเร็ง 40 คน พบว่ามีสารกลุ่มพาราเบน ในเนื้อเยื่อเต้านมจำนวน 158 ตัวอย่าง โดยใน 96 ตัวอย่างจะพบ methylparaben, ethylparaben, n-propylparaben, n-butylparaben, isobutyl-paraben ซึ่งมีระดับของ methylparaben, propylparaben ในปริมาณที่สูงกว่า สารกลุ่มพาราเบนชนิดอื่น และจากการศึกษา cell culture พบว่า การได้รับสารกลุ่มพาราเบน ทั้งห้าชนิดหรืออย่างน้อยหนึ่งชนิดสามารถทำให้เกิด proliferation ของ human breast cancers (Barr และคณะ, 2012)

Pregnancy and Lactation

พบว่าสารกลุ่มพาราเบน สามารถผ่านรกไปยังทารกได้ นอกจากนั้นยังพบในน้ำนมแม่ แต่ยังไม่มีการศึกษาผลกระทบต่อทารกหากแม่ได้รับสารกลุ่มพาราเบนเป็นระยะเวลานาน (Darbre และ Harvey, 2008)

Reproductive system

จากการศึกษาของ Glander ปี 1984 พบว่า สารกลุ่มพาราเบนมีผลต่ออวัยวะของระบบสืบพันธุ์เพศชาย ลดระดับของฮอร์โมน testosterone และการลดสร้างตัวอสุจิ โดย methylparaben สามารถลดการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ จากการรบกวนการทำงานของ mitochondria ในการสร้างพลังงานสำหรับการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และการได้รับ butylparaben ระหว่างการตั้งครรภ์และให้นมบุตร จะมีผลต่อการพัฒนาอวัยวะของระบบสืบพันธุ์เพศชายในลูก เช่น น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ จำนวนและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Glander, Rytter, และ Schönborn, 1984)

จากการศึกษาของ Oishi ปี 2002 พบว่า พาราเบนสามารถจับกับ estrogen receptor ได้จึงมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของฮอร์โมน estrogen ได้เล็กน้อยในการศึกษา in vitro ของ estrogen receptor และ in vivo ของ Uterotrophic assay โดย สาร butylparaben ส่งผลข้างเคียงต่อการหลั่ง testosterone และการทำงานของระบบสืบพันธุ์เพศชายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงได้มีการศึกษาผลข้างเคียงที่มีต่อระบบสืบพันธุ์เพศชายของ propylparaben ในสัตว์ทดลอง พบว่า ปริมาณและความเข้มข้นของตัวอสุจิ บริเวณ epidermal ใน testis มีปริมาณลดลงมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ propylparaben ที่ได้รับ โดยที่ความเข้มข้นที่เท่ากับและมากกว่า 0.10 % จะส่งผลอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณ testosterone ในเซรั่มของสัตว์ทดลองลด

น้อยลงตามปริมาณการได้รับ propylparaben ในส่วนของการสร้างและประสิทธิภาพของตัวอสุจิลดน้อยลงในทุกกลุ่มที่ได้รับ propylparaben ซึ่งระดับของการได้รับ propylparaben แล้วเกิดผลดังกล่าวนั้นจะสอดคล้องกับปริมาณมากสุดที่สามารถได้รับสารกลุ่มพาราเบน ที่ประเทศทวีปยุโรปและญี่ปุ่นกำหนดไว้ เท่ากับ 10 mg/kg(body weight)/day (Oishi, 2002)

วิธีวิเคราะห์สารกันเสีย

จากการศึกษาคุณสมบัติของสารกันเสียกลุ่มพาราเบน phenoxyethanol และ chlorphenesin พบว่าพาราเบนแต่ละตัวนั้นมีโครงสร้างที่เป็น hydrophobic และมีความแตกต่างกันบริเวณหมู่แทนที่ของ ester group ส่วน phenoxyethanol และ chlorphenesin นั้นมีโครงสร้างที่เป็น hydrophobic ที่เป็น Aromatic ring เช่นกัน แต่มีความแตกต่างที่หมู่แทนที่ของ Aromatic ring ทำให้มีสภาพขั้วของสารที่แตกต่างกัน จึงได้นำ Reverse Phase HPLC มาใช้ในการแยกสารพาราเบนที่สนใจในตัวอย่างออกจากกัน โดย Reverse Phase HPLC มีหลักการ คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) หรือ คอลัมน์ (column) จะเป็นสารที่ไม่มีขั้ว ซึ่งเข้ากันได้ดีกับ สารประเภท hydrophobic จึงหน่วงสารให้อยู่ในคอลัมน์ได้นานกว่าสารที่เป็น hydrophilic ที่จะเข้ากันได้ดีกับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) มากกว่า การหน่วงของสารในคอลัมน์ที่แตกต่างกันระหว่างเฟส 2 เฟสนี้จะทำให้เกิดการแยกของสาร โดยสารที่มี hydrophobicity ที่มากก็จะเข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) จึงแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้ จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณ (detector) ซึ่งสารกลุ่มพาราเบน, phenoxyethanol และ chlorphenesin สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง UV จึงใช้ความยาวคลื่นช่วง UV เป็น detector โดยมีหลักการคือ ให้แสงในช่วงความยาวคลื่น UV ผ่านสารตัวอย่างที่มีความสามารถดูดกลืนแสงได้ แล้ววัดปริมาณแสงที่ผ่านตัวอย่างเปรียบเทียบกับปริมาณแสงที่ให้ไป แล้วส่งสัญญาณที่บันทึกได้เป็นผลที่มีลักษณะเป็นพีค เรียกว่าโครมาโตแกรม (chromatogram) ซึ่งใน USP42 กำหนดให้วิเคราะห์หาปริมาณสาร paraben ด้วยวิธี Reverse Phase HPLC with UV detector รวมถึง phenoxyethanol และ chlorphenesin ที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีนี้ได้เช่นกัน

ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้ HPLC ในการวิเคราะห์สารกันเสียกลุ่มพาราเบน มีดังนี้

จากงานวิจัยของ Aoyama และคณะ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกันเสียกลุ่มในเครื่องสำอางโดยใช้เทคนิค HPLC เตรียมสารตัวอย่างโดยการ ชั่งครีมมา 0.2 g แล้วเติม methanol ลงไปเล็กน้อย ก่อนนำไป sonicate 30 นาที แล้วจึงปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 5000 rpm 10 นาที แล้วกรองส่วนใส ผ่าน 0.45-mm

membrane และทำการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเบนโดยใช้วิธี HPLC ซึ่งมีสภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

Column:	C18-column (250 x4.6 mm, 3 µm)
Mobile phase:	5 mmol/L ammonium formate solution pH 4.2 : acetonitrile ในอัตราส่วนความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงตามเวลา ดังนี้
	0 – 6 นาที ความเข้มข้น acetonitrile 25%
	6-30 นาที ความเข้มข้น acetonitrile 25% - 50%
	30-35 นาที ความเข้มข้น acetonitrile 50%
Flow rate:	1.0 ml/min
Injection volume:	10 µl
Column Temperature:	40°C
Detector	230 nm

ผลการทดลองที่ได้พบว่า สภาวะที่ใช้สามารถแยก peak ของสารกลุ่มพาราเบน ทั้ง 11 ชนิดที่ใช้ในเครื่องสำอาง เช่น methylparaben, ethylparaben , propylparaben , isopropylparaben และphenoxyethanol โดยศึกษาในช่วงความเข้มข้น 0.25-500 µg/mL และมีค่า resolution > 1.5 ผลการศึกษา Method validation พบว่า ได้ค่า r < 0.997, %recovery อยู่ในช่วง 92.8-111.9% และ %RSD < 4.3% (Aoyama, Doi, Tagami, และ Kajimura, 2014)

จากการศึกษาการหาปริมาณและประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ เมทิลพาราเบนและโพรพิลพาราเบนในครีมทาผิวหลังการเปิดใช้ มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการเก็บครีมทาผิวกับปริมาณและประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ methylparaben และ propylparaben ในครีมทาผิวหลังเปิดใช้งาน โดยวิเคราะห์หาปริมาณ methylparaben และ propylparaben โดยใช้ HPLC พร้อมทั้งตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) ชั่งครีมมา 0.5 g แล้วเติม methanol ลงไปเล็กน้อย ก่อนนำไป sonicate 45 นาที นำไป ปั่นเหวี่ยง 6000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิ 15 °C แล้วจึงปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10 ml จากนั้น แล้วกรองส่วนใส ผ่าน 0.45-mm membrane และทำการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเบนโดยใช้วิธี HPLC ซึ่งมีสภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้

Column:	ACE5 C18-AR (250 x 4.6 mm, 5 µm)
Mobile phase:	acetonitrile: 0.1% phosphoric acid (50 : 50 v/v)
Flow rate:	1.0 ml/min

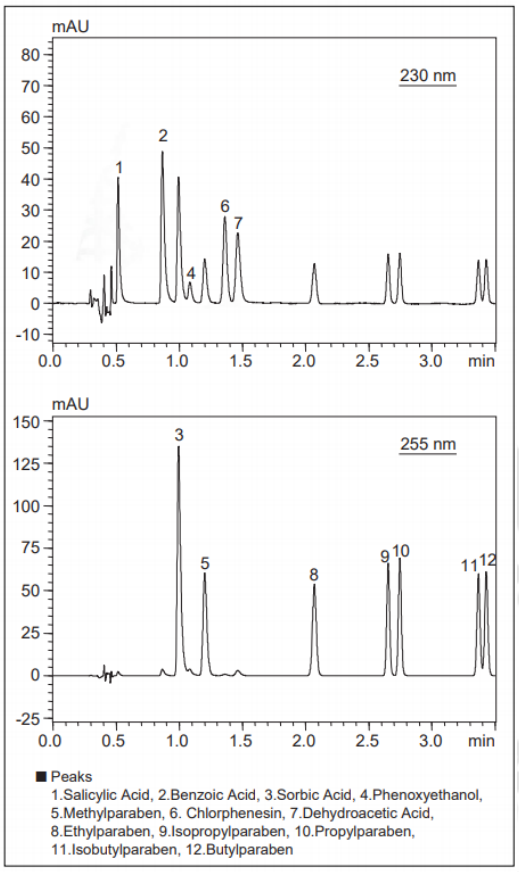
Injection volume:	20 µl
UV detect:	254 nm
Run time:	9 min

ผลการทดสอบ พบว่า สภาวะที่ใช้สามารถแยก peak ของ methylparaben ช่วงความเข้มข้น 5-25 µg/mL และ propylparaben 1-5 µg/mL โดยมีค่า resolution > 2 และมีผล method validation ได้ค่า r < 0.997, %recovery อยู่ในช่วง 97.0 – 101.0% และ %RSD < 2.0% (จิรายุส เลาหลิดานนท์ และ ชฎาธาร ดิถีเพ็ง, 2562)

จากเอกสารตัวอย่างการใช้งาน Column Shim-pack XR-ODS ของบริษัท SHIMADZU โดยทดสอบการแยกสารกันเสียในเครื่องสำอาง ได้แก่ สาร methylparaben, ethylparaben, isopropylparaben, propylparaben, isobutylparaben, butylparaben, phenoxyethanol, chlorphenesin, salicylic acid, benzoic acid, sorbic acid, และ dehydroacetic acid ความเข้มข้น 10 mg/L และแยกสารโดยใช้วิธี HPLC ซึ่งมีสภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้ (SHIMADZU)

Column:	Shim-pack XR-ODS (75 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 µm)
Mobile phase:	A: 5 mmol/L (Sodium) citrate buffer (pH 4.2)
	B: 0 - 1.2 นาที ความเข้มข้น Acetonitrile 30 %
	1.2-1.5 นาที ความเข้มข้น Acetonitrile 40 %
	1.5-3.5 นาที ความเข้มข้น Acetonitrile 55 %
Flow rate:	1.0 ml/min
Injection volume:	4 µl
UV detect:	SPD-M20A at 230, 255 nm
Column Temp.:	40 °C
Flow cell	Semi-micro cell

สามารถแยกสารได้ตามโครมาโตแกรม ตามรูป



ภาพประกอบ 1 โครมาโตแกรมแสดงผลการแยกสารกันเสียในเครื่องสำอางประเทศญี่ปุ่น

ที่มา : SHIMADZU. High Speed, High Resolution Analysis (Part 20) Analysis of Preservatives in Cosmetics

การศึกษาของ Tokunaga ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกันเสียพาราเบน และ phenoxyethanol ในผลิตภัณฑ์โลชั่นภายในประเทศญี่ปุ่น โดยใช้เครื่อง HPLC ซึ่งมีสภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้

Column: ODS column (CAPCELL PAK C18 column, 4.6 x 250 mm)

Mobile phase: พาราเบน: 50 mmol/l phosphate buffer (pH3.5) and acetonitrile (60:40)

Phenoxyethanol: 50 mmol/l phosphate (pH3.5) and acetonitrile (70:30)

UV detect: พาราเบน: 255 nm

Phenoxyethanol: 270 nm

ผลการทดสอบ พบว่า condition ที่ใช้สามารถแยก peak ของสารพาราเบน และ phenoxyethanol ในช่วงความเข้มข้น 0.5-5 µg/mL ออกจากสารอื่นในตำรับและไม่มีพีคอื่นรบกวน (Tokunaga, Takeuchi, Ko, Uchino, และ Ando, 2003)

การศึกษาของ Zhu เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกันเสีย chlorphenesin ในเครื่องสำอางด้วยวิธีการ HPLC ซึ่งมีสภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้

Column:	C18-column (259 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 µm)
Mobile phase:	Methanol : Water (55:45, v/v)
Flow rate:	1.0 ml/min
Photodiode array detect:	280 nm
Column Temp.:	25°C

ผลการทดสอบ พบว่า สามารถแยกสารและหาปริมาณสาร chlorphenesin ในช่วงความเข้มข้น 1-500 mg/L โดยได้ค่า r = 1.000, %recovery ของการ spike สารมาวิเคราะห์อยู่ในช่วง 99.0%-103.0% และได้ค่า RSD <1.2% ไม่มีพีคอื่นรบกวน (Zhu, Zhang, Yang, และ Zhu, 2014)

จากข้อมูลข้างต้นการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ เลือกใช้ตัวทำละลายเป็น methanol มาใช้วิธี liquid extraction ซึ่งมีปัจจัยอื่นที่เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ระยะเวลาที่ใช้ sonicate ความเร็วรอบในการปั่นเหวี่ยง เวลาที่ใช้ในการสกัด และนำสารตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วย HPLC แบบ reverse phase chromatography ซึ่งมี stationary phase เป็นคอลัมน์ที่ไม่มีขั้ว เช่น C18 column โดย organic solvent ที่นิยมใช้เป็น mobile phase คือ acetonitrile และ บัฟเฟอร์ที่ปรับ pH ให้อยู่ในช่วงกรด และใช้เทคนิค gradient elution ในการแยกสารกันเสียหลายชนิด ส่วนของ detector จะอยู่ในช่วง 230-270 nm

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสีย

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบเพื่อศึกษาสารกันเสียที่สนใจนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์และราได้หรือไม่ โดยทดสอบตามวิธีที่ระบุไว้ในมาตรฐาน United State Pharmacopeia (USP) ในหัวข้อ <51> Antimicrobial effectiveness testing ซึ่งกำหนดวิธีการเตรียมสารตัวอย่าง ซึ่งจะเตรียมสารตัวอย่างแล้วนำเชื้อ 5 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Aspergillus brasiliensis* แต่ละเชื้อจำนวน 10^6 cfu การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม สภาวะในการบ่มเชื้อและระยะเวลาการบ่ม โดย ในการทดสอบเชื้อ ได้แก่ *Escherichia coli, Pseudomonas*

aeruginosa, Staphylococcus aureus จะใช้ Soybean-Casein Digest Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 32.5±2.5 °Cเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ เชื้อ *Candida albicans* ใช้ Sabouraud Dextrose Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 22.5±2.5 °C เป็นเวลา 44-52 ชั่วโมง ส่วน เชื้อ *Aspergillus brasiliensis* ใช้เวลาบ่ม 6-10 วัน พร้อมทั้งกำหนดเกณฑ์การยอมรับของผลการทดสอบ โดยแบ่งเกณฑ์ตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ คือ สำหรับครีมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ภายนอก นั้นจะใช้เกณฑ์คือ เชื้อแบคทีเรีย ในวันที่ 14 ของการทดสอบ ต้องมีจำนวนลดลงไม่น้อยกว่า 2 log จากวันแรกที่เริ่มการทดสอบ และในวันที่ 28 ไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรีย จากจำนวนแบคทีเรียในวันที่ 14 ส่วน ยีสต์และรา ในวันที่ 14, 28 ไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนยีสต์และรา จากจำนวนยีสต์และรา ในวันแรกที่เริ่มการทดสอบ (USP, 2019)

ทดสอบตามวิธีที่ระบุใน ASEAN guideline ในหัวข้อ Preservative efficacy test for cosmetic product โดยกำหนดวิธีการเตรียมสารตัวอย่าง 100 g มาทดสอบด้วยการนำเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterobacter aerogenes* มาผสมเข้ากับสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^6 cfu/g และ เชื้อ *Candida albicans, Aspergillus niger* ผสมเข้ากับสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 10^5 cfu/g ทดสอบเปรียบเทียบสารตัวอย่างที่ไม่มีการใส่สารกันเสีย แล้วนำตัวอย่างที่ผ่านการใส่เชื้อจุลินทรีย์เก็บที่อุณหภูมิ 20-25°C และแบ่งสุ่มตัวอย่างออกมาในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 จำนวน 1 mL แล้วนำตัวอย่างที่สุ่มของผลิตภัณฑ์ที่มีเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterobacter aerogenes* มาทำการทดสอบด้วยเทคนิค Surface spread กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Soybean-Casein Digest Agar แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 35±5°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ส่วนผลิตภัณฑ์ที่มีเชื้อ *Candida albicans, Aspergillus niger* มาทำการทดสอบด้วยเทคนิค pour plate กับอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar incubate ที่อุณหภูมิ 25±2°C เป็นเวลา 3-5 วัน โดยกำหนดเกณฑ์การยอมรับของผลการทดสอบ คือ ในวันที่ 7 ของการทดสอบจำนวนของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterobacter aerogenes* และ *Candida albican* ต้องลดลงอย่างน้อย 99.9 % จากวันที่ 0 และไม่มีการเพิ่มขึ้นของเชื้อระหว่างวันที่ทดสอบ สำหรับ *Aspergillus niger* จะต้องลดลงอย่างน้อย 90% ภายในวันที่ 28 ของการทดสอบ (ASEAN, 2005)

การทดสอบความคงสภาพ

International Federation Societies of Cosmetic Chemists IFSCC Monograph ปี 2018 ได้มีการออกแบบการทดสอบที่สามารถประเมินผลความคงสภาพของเครื่องสำอางในด้าน

ต่างๆ โดยใช้เวลาในการทดสอบสั้นที่สุด คือ การทดสอบในสภาวะเร่ง ซึ่งการทดสอบเหล่านั้นจะต้องสามารถประเมินผลแล้วสามารถอ้างอิงถึงสภาวะปกติของการทดสอบได้ โดยนำตัวอย่างเครื่องสำอางมาทดสอบในสภาวะดังนี้ เพิ่มอุณหภูมิ เพิ่มความชื้นสภาพแวดล้อมของการจัดเก็บเครื่องสำอาง (Elevated Temperatures, Elevated Humidities) สภาพแวดล้อมจัดเก็บเครื่องสำอางที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ หรือ/และ ความชื้นจากสภาวะปกติเป็นสภาวะเร่ง แล้วกลับมาสภาวะปกติ เป็นวัฏจักร (Cycling test) สภาพแวดล้อมที่ได้รับแสงแดดโดยตรง (Exposure to Light) ทดสอบด้วย Mechanical test และการทดสอบ freeze/thaw test

Cycling test คือ การทดสอบโดยการเก็บเครื่องสำอางในสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วของ อุณหภูมิ หรือ/และ ความชื้น ซึ่งสามารถสร้างสภาวะที่ไม่เหมาะสมของการจัดเก็บเครื่องสำอาง ทำให้เครื่องสำอางเปลี่ยนแปลงความคงสภาพได้เร็วกว่าการจัดเก็บในอุณหภูมิ หรือ/และ ความชื้นที่คงที่ เช่นการเครื่องสำอางที่อุณหภูมิ 45°C 24 ชั่วโมง และอุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 45°C แล้วนำมาวิเคราะห์คุณภาพด้านต่าง ๆ ของเครื่องสำอาง

Freeze/thaw test ทดสอบโดยการจัดเก็บเครื่องสำอางที่อุณหภูมิ -30 °C (Freeze) และอุณหภูมิห้อง เป็นวัฏจักร อย่างน้อย 6 วัฏจักร ซึ่งการทดสอบนี้สามารถประเมินความคงสภาพของ emulsion ได้

Exposure to Light แสงสามารถเปลี่ยนแปลงความคงสภาพของเครื่องสำอางได้ ทำให้ต้องมีการทดสอบความคงสภาพของเครื่องสำอางเมื่อได้รับแสงโดยตรง โดยอาจจะทดสอบด้วยวิธีการนำเครื่องสำอางเก็บภายใต้แสงจากหลอดไฟ Polarite-daylight 40 W ที่มีความยาว 132 cm ที่ห่างกันประมาณ 1 ฟุต และใช้ไฟฟ้าจากแบตเตอรี่ 12 V

Mechanical test เป็นการทดสอบโดยการสั่นตัวอย่างที่ความถี่ต่างๆ เป็นระยะเวลาหนึ่งสำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็น emulsion สามารถทดสอบด้วยการปั่นเหวี่ยงได้ (IFSCC, 2018)

ตัวอย่างการทดสอบ Freeze/Thaw Cycle ในการศึกษา

จากการศึกษา Antioxidant properties, selected enzyme inhibition capacities and a cosmetic cream formulation of Thai mango seed kernel extracts เพื่อศึกษาความคงสภาพของครีมจากสารสกัดเม็ดมะม่วง จึงมีการทดสอบ Freeze/Thaw Cycle โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 6 รอบ โดยจะสุ่มเก็บมาทดสอบ pH, ความหนืด, การแยกเฟส, สีและปริมาณสารสำคัญของครีม ทุก 48 ชั่วโมง (Namngam และ Pinsirodom, 2017)

การศึกษา Formulation and characterization of sunscreen creams with synergistic efficacy on SPF by combination of UV filters เพื่อพัฒนาสูตรตำรับครีมกันแดดที่มีส่วนผสมของ Organic และ inorganic UV filters และทดสอบความคงสภาพด้วยการทดสอบ Freeze/Thaw Cycle โดย อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 6 รอบ (Amnuaikit และ Boonme, 2013)

การศึกษา Antioxidants in rice bran oil from Sangyod breeding rice and application in cream-gel เพื่อสกัดน้ำมันรำข้าวพันธุ์สังค์หยด เพื่อมาทดสอบฤทธิ์ antioxidants และพัฒนาสูตรตำรับครีมเจลบำรุงผิว โดยมีการทดสอบความคงสภาพของตำรับด้วยวิธี Freeze/Thaw Cycle ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทั้งหมด 4 รอบ (Rattanapiboon และ Jinda, 2012)

การศึกษา Cream Stick Containing Natural Oil for Cracked Heel เพื่อพัฒนาตำรับครีมทาส้นเท้าแตกจากน้ำมันธรรมชาติ ระหว่างน้ำมันมะพร้าวกับน้ำมันรำข้าว มีการทดสอบความคงสภาพของตำรับด้วยวิธี Freeze/Thaw Cycle ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 4 รอบ(Kongmuang, Benjamala, Sangkarat, และ Buakwan, 2012)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 6 รอบ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ

1. ACE5 C18-AR column 250x4.6 mm 5 µm id (ACE®, UK)
2. Aqua MAXTM.basic Water Purification System 360, 370 series (YOUNGLIN, Korea)
3. Autoclave (Tomy seiko, Japan)
4. Biohazard cabinet for microbial culture (ESCO, Singapore)
5. Homogenizer (Ultra-turrax t8, Germany)
6. Hot air oven (Daihan labtech Ltd., Korea)
7. HPLC-UV detector (Agilent 1260 Infinity II, Germany)
8. Incubator (Memmert, germany)
9. Nylon membrane syringe filter ขนาด 0.45 µm (CNW®Technologies, China)
10. Pump ลม (GAST manufacturing, USA)
11. Sonicator (hwanshin technology, Korea)
12. Universal pH Test Strips (Mcolorphasttm, Germany)
13. Vortex (Vortex-genie 2 TM, USA)
14. เครื่อง centrifuge (Tomy Seiko, Japan)
15. เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Mettler toledo, Switzerland)
16. ตู้เย็น

สารเคมี

1. Acetonitrile HPLC grade (LiChrosolv®, Germany)
2. Barium chloride (Ajax chemicals, Australia)
3. Chlorphenesin (MySkinRecipes®, Thailand)
4. Cremophor RH40 (Chemipan, Thailand)
5. Disodium hydrogen phosphate dihydrate (Ajax Finechem, Australia)
6. Glycerin (MySkinRecipes®, Thailand)
7. Methanol HPLC grade (LiChrosolv®, Germany)

8. Microcare®PHC(Phenoxyethanol:Chlorphenesin(80:20)(Chemipan, Thailand)

9. Mineral oil (Chemipan, Thailand)

10. Orthophosphoric acid 85% (RCI Labscan Ltd., Thailand)

11. Peptone (Becton, Dickinson and Company, USA)

12. Phenoxyethanol (Chemipan, Thailand)

13. Potassium dihydrogen phosphate (Ajax Finechem, Australia)

14. Propylene glycol (MySkinRecipes®, Thailand)

15. Purified Water

16. Sodium chloride (Ajax Finechem, Australia)

17. Standard Methylparaben (Sigma-Aldrichl Ltd., India)

18. Standard Propylparaben (Sigma-Aldrichl Ltd., Japan)

19. Sulfuric acid (Ajax Finechem, Australia)

20. Vitamin E Acetate (Chemipan, Thailand)

21. Xanthan gum (MySkinRecipes®, Thailand)

22. กลิ่น SENSUAL 90060 (HongHuat Ltd., Thailand)

23. สารสกัดดอกอัญชัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Agar (Merck, Germany)

2. Cetrimide agar (HiMedia, India)

3. Mannitol salt agar (Becton, Dickinson and Company, USA)

4. Sabouraud dextrose borth (Becton, Dickinson and Company, USA)

5. Trypticase soy broth (Becton, Dickinson and Company, USA)

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Aspergillus niger* (ATCC No.10578), American Type Culture Collection, USA

2. *Candida albicans* (DMST No.5815), กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย

3. *Enterobacter aerogenes* (TISTR No.1540), สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, ประเทศไทย

4. *Escherichia coli* (ATCC No.25923), American Type Culture Collection, USA

5. *Pseudomonas aeruginosa* (DMST No.15501), กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย

6. *Staphylococcus aureus* (DMST No.8013), กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเซรั่มบำรุงเส้นผมที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เตรียมสารเคมี เป็น เซรั่ม ปริมาณ 400 g ตามสูตรตำรับดังนี้

Oil phase		Water phase	
Mineral oil	2 g	Xanthan gum	3.6 g
Vitamin E	0.8 g	Propylene glycol	20 g
Cremophor RH40	4 g	Glycerin	40 g
		สารสกัดดอกอัญชัน	5 g
		Purified Water	QS
		กลิ่น SENSUAL 90060	QS
		สารกันเสีย	QS

1.2 นำ ส่วนผสมของ Oil phase มาผสมให้เข้ากัน โดยผสม Mineral oil กับ Cremophor RH40 เข้าด้วยกัน และใส่ Vitamin E มาผสมเป็นลำดับสุดท้าย

1.3 นำ ส่วนผสมของ Water phase มาผสมให้เข้ากัน โดยละลาย Xanthan gum ด้วยPropylene glycol ให้เป็นเข้ากัน และผสม Glycerin ทำการละลายสารสกัดดอกอัญชันและสารกันเสียด้วย Purified Water

1.4 นำสารละลายในข้อ 1.3 ใส่ในสารละลายข้อ 1.2 แล้วผสมให้เป็นเนื้อเซรั่ม และแต่งกลิ่น

1.5 แบ่งเป็น 4 ตำรับ ดังนี้ 1. เซรั่มที่ไม่ใส่สารกันเสีย 2. เซรั่มที่มีสารกันเสียกลุ่มพาราเบน 3. เซรั่มที่มีสารกันเสียกลุ่มไม่ใช่พาราเบน 4. เซรั่มที่มีสารกันเสียทั้งสองกลุ่ม โดยใส่ส่วนผสมของสารกันเสียเพิ่มเติมดังนี้

เซรั่มที่มีสารกันเสียกลุ่มพาราเบน	methylparaben	0.2 %
	propylparaben	0.02 %
เซรั่มที่มีสารกันเสียกลุ่มไม่ใช่พาราเบน	Microcare®	1 %
เซรั่มที่มีสารกันเสียทั้งสองกลุ่ม	methylparaben	0.2 %

propylparaben	0.02 %
Microcare®	1 %

1.6 เมื่อผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำมาปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer เป็นเวลา 45 นาที

2. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียทั้งสองกลุ่มโดย HPLC

วิธีวิเคราะห์จากการทบทวนวรรณกรรม โดยจะใช้ column เป็น C18-column และปรับสภาวะในการศึกษา ได้แก่ สัดส่วนของ mobile phase ระหว่าง acetonitrile กับ 0.1% phosphoric acid, flow rate และ detector

ทดสอบความเหมาะสมของสภาวะโดยการหา system suitability ด้วยการนำสารละลายมาตรฐานของสารละลายสารกันเสียทั้ง 4 สาร วิเคราะห์ด้วยวิธีการดังกล่าวทั้งหมด 6 ครั้ง แล้วพิจารณาจากค่า plate number ($N > 2000$), capacity factor ($k' > 2$), tailing factor ($T \leq 2$), resolution ($Rs > 2$) และ precision repeatability (%RSD ของ peak area ≤ 2 เมื่อ $n > 5$)

3. การเตรียมสารละลายมาตรฐาน, สารละลายในการวิเคราะห์ และการเตรียมสารสกัดจากเซรั่ม

3.1 การเตรียม stock standard methylparaben ความเข้มข้น 1.5 mg/ml

ชั่งเมทิลพาราเบน 75 mg แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 ml

3.2 การเตรียม stock standard propylparaben ความเข้มข้น 0.3 mg/ml

ชั่งโพรพิลพาราเบน 30 mg แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 100 ml

3.3 การเตรียม stock standard pheonxyethanol ความเข้มข้น 5 mg/ml

ชั่ง pheonxyethanol 125 mg แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 ml

3.4 การเตรียม stock standard chlorphenesin ความเข้มข้น 2.4 mg/ml

ชั่ง chlorphenesin 60 mg แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 ml

3.5 การเตรียม mobile phase

3.5.1 เตรียม 0.1% phosphoric acid โดยตวง 85% orthophosphoric acid 1.2 ml ปรับปริมาตรด้วย ultrapure water จนครบ 1000.0 ml จากนั้นกรองผ่าน Nylon membrane filter 0.45 µm แล้วนำไป sonicate 25 นาที

3.5.2 เตรียม acetonitrile จากนั้นกรองผ่าน Nylon membrane filter 0.45 µm แล้วนำไป sonicate 25 นาที

3.6 การสกัดสารกันเสียในเซรั่มตัวอย่าง

3.6.1 ชั่งเซรั่มตัวอย่างมา 1 g เติม methanol 10 ml

3.6.2 นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไป vortex เป็นเวลา 5 นาที

3.6.3 นำสารละลายตัวอย่างไป sonicate เป็นเวลา 45 นาที

3.6.4 นำไป centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 6,000 rpm นาน 15 นาที แล้วนำ supernatant กรองผ่าน nylon membrane syringe filter 0.45 µm ไปวิเคราะห์หาปริมาณด้วย HPLC

4. ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

4.1 ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

4.1.1 นำ stock standard methylparaben, propylparaben, pheonxyethanol และ chlorphenesin มาเตรียมสารมาตรฐานความเข้มข้น 180 µg/ml, 36 µg/ml, 600 µg/ml และ 288 µg/ml ตามลำดับ โดยปิเปต stock standard ของสาร มาสารละ 3 ml และปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 25 ml จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC

4.1.2 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของเซรั่มสารสกัดอัญชันที่ไม่มีสารกันเสียกับสารละลายมาตรฐานสารกันเสียทั้งสองกลุ่ม ซึ่งจะต้องไม่มี peak อื่นรบกวน peak ของ methylparaben, propylparaben, pheonxyethanol และ chlorphenesin

4.2 ความเป็นเส้นตรง และ พิสัยของวิธีวิเคราะห์ (Linearity และ Range)

4.2.1 เตรียมสารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น โดยปิเปต stock standard methylparaben, propylparaben, pheonxyethanol และ chlorphenesin มาสารละ 1, 2, 3, 4 และ 5 ml ใส่ลงใน volumetric flask 25 ml ตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย methanol ได้สารมาตรฐานที่มี methylparaben ความเข้มข้น 60, 120, 180, 240 และ 300 µg/ml propylparaben ความเข้มข้น 12, 24, 36, 48 และ 60 µg/ml pheonxyethanol ความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 µg/ml chlorphenesin ความเข้มข้น 96, 192, 288, 384 และ 480 µg/ml ตามลำดับ

4.2.2 ฉีดสารมาตรฐานทั้ง 5 ความเข้มข้นเข้าเครื่อง HPLC ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

4.2.3 สร้างสมการเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น (µg/ml) ของสารละลายมาตรฐานแต่ละสาร เป็นแกน x กับ peak area เป็นแกน y และหาสมการของ calibration curve และค่า correlation coefficient (r) โดยค่า correlation coefficient ต้องมากกว่าหรือเท่ากับ 0.997 (A.Shabir, 2005)

4.3 ความแม่นของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

4.3.1 ทดสอบ Intra-day precision

1. เตรียมสารละลายที่มี methylparaben ความเข้มข้น 60, 180 และ 300 µg/ml propylparaben ความเข้มข้น 12, 36 และ 60 µg/ml pheonxyethanol ความเข้มข้น 200, 600 และ 1,000 µg/ml chlorphenesin ความเข้มข้น 96, 288 และ 480 µg/ml ตามลำดับ โดยเตรียมเช่นเดียวกับวิธีการเตรียมสารในการหา linearity และ range มาฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC โดยฉีดความเข้มข้นละ 3 ครั้ง ภายในวันเดียวกัน

2. คำนวณ %RSD ของmethylparaben, pheonxyethanol, chlorphenesin จะต้องไม่เกิน 2.7 % และ %RSD ของ propylparaben จะต้องไม่เกิน 3.7 % (AOAC, 2016)

"%RSD = (SD/Average) x100"

SD คือ ค่าเบี่ยนเบงมาตรฐานของชุดข้อมูล

Average คือ ค่าเฉลี่ยของชุดข้อมูล

4.3.2 ทดสอบ Inter-day precision

1. เตรียมสารละลายที่มี methylparaben ความเข้มข้น 60, 180 และ 300 µg/ml propylparaben ความเข้มข้น 12, 36 และ 60 µg/ml pheonxyethanol ความเข้มข้น 200, 600 และ 1,000 µg/ml chlorphenesin ความเข้มข้น 96, 288 และ 480 µg/ml ตามลำดับ โดยเตรียมเช่นเดียวกับวิธีการเตรียมสารในการหา linearity และ range มาฉีดสารละลายเข้าเครื่อง HPLC โดยฉีดความเข้มข้นละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน

2. คำนวณ %RSD ของmethylparaben, pheonxyethanol, chlorphenesin จะต้องไม่เกิน 2.7 % และ %RSD ของ propylparaben จะต้องไม่เกิน 3.7 % (AOAC, 2016)

4.4 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

เตรียมสารละลายที่มี methylparaben ความเข้มข้น 60, 180 และ 300 µg/ml propylparaben ความเข้มข้น 12, 36 และ 60 µg/ml pheonxyethanol ความเข้มข้น 200, 600 และ 1,000 µg/ml chlorphenesin ความเข้มข้น 96, 288 และ 480 µg/ml ตามลำดับ โดยเตรียมเช่นเดียวกับวิธีการเตรียมสารในการหา linearity และ range จากนั้นฉีดสารละลาย เข้าเครื่อง HPLC โดยทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง คำนวณหา %recovery ของ methylparaben, pheonxyethanol, chlorphenesin ต้องอยู่ในช่วง 97-103% และ %recovery ของ propylparaben ต้องอยู่ในช่วง 95-105% (AOAC, 2016)

"%recovery = (Found /Added) ×100"

Found คือ ปริมาณของสารกันเสียที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการ HPLC

Added คือ ปริมาณของสารกันเสียที่เตรียมเพื่อใช้วิเคราะห์โดยคำนวนจากน้ำหนักสาร

4.5 ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Limit of quantitation LOQ)

เจือจางความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน methylparaben, phenoxyethanol, chlorphenesin และ propylparaben จากความเข้มข้นต่ำสุดของ calibration curve ฉีดเข้า HPLC หาความเข้มข้นที่ให้ค่า 10σ/S เมื่อ σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือ ความชันมาตรฐาน โดยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณคำนวณจากค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า y-intercept (สุภาณี ดวงธีรปรีชา, 2561)

4.6 หาประสิทธิภาพของการสกัด โดยหาความถูกต้องแม่นยำของวิธีการสกัด

4.6.1 เตรียมสารละลายพาราเบนผสมที่มี methylparaben, phenoxyethanol, chlorphenesin เข้มข้น 5 mg/ml และ propylparaben เข้มข้น 1 mg/ml โดยชั่งสารมาตรฐาน methylparaben, phenoxyethanol, chlorphenesin 125 mg และ propylparaben 25 mg ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 ml และปรับปริมาตรจนครบ 25 ml ด้วย methanol ได้เป็นสารละลายสารกันเสีย

4.6.2 ชั่ง เซรั่มตัวอย่างที่ไม่มีสารกันเสีย 5 g จากนั้น spike สารละลายสารกันเสีย ลงไป 1 ml แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นชั่งครีมตัวอย่างที่เติมสารกันเสียมา 1 g เติม methanol 10 ml นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไป vortex เป็นเวลา 5 นาทีและนำไป sonicate เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำไป centrifuge ด้วยความเร็วรอบ 6,000 rpm นาน 15 นาที แล้วนำเอา supernatant ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียด้วย HPLC ทำซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัดจากสูตร

ประสิทธิภาพการสกัด = (Found /Added)×100

Found คือ ปริมาณของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธีการ HPLC

Added คือ ปริมาณของสารกันเสียที่ใส่ลงในผลิตภัณฑ์

5. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสีย และการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

5.1 การเตรียมสารละลาย Buffer

ชั่งสาร Potassium dihydrogen phosphate 3.6 g, Disodium hydrogen phosphate dihydrate 7.2 g, Sodium chloride 4.3 g, Peptone 1 g และ Tween 80 100 g แล้วนำมาละลายและปรับปริมาตรด้วย purified water จนครบ 1,000 ml

5.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.2.1 ชั่ง Trypticase soy broth 9 g., Agar 4.5 g นำมาละลายด้วย purified water 300 ml แล้วนำไป Autoclave ที่ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

5.2.2 ชั่ง Sabouraud dextrose borth 9 g, Agar 4.5 g นำมาละลายด้วย purified water 300 ml แล้วนำไป Autoclave ที่ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

5.2.3 ชั่ง Cetrimide agar 14.01 g นำมาละลายด้วย purified water 300 ml แล้วนำไป Autoclave ที่ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

5.2.4 ชั่ง Mannitol salt 33.3 agar g นำมาละลายด้วย purified water 300 ml แล้วนำไป Autoclave ที่ อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

5.2.5 นำอาหาร ที่ผ่านการ Autoclave มาเทบน plate

5.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบ

5.3.1 แบ่ง เซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน ที่ต้องการทดสอบ มา 1 g ใส่ลงใน tube แล้วใส่สารละลาย Buffer 10 ml ผสมให้เข้ากัน

5.3.2 ปิเปตสารในข้อ 5.3.1 1 ml แล้วนำมา plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการ แล้วนำไป incubate

5.4 การ incubate plate และเก็บผลการทดสอบ

5.4.1 นำ plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Trypticase soy agar), Manitol salt agar, Cetrimide agar incubate ที่อุณหภูมิ 32.5±2.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ว นำมานับจำนวนโคโลนีและบันทึกผล

5.4.2 นำ plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA (Sabouraud dextrose agar) incubate ที่อุณหภูมิ 22.5±2.5 °C เป็นเวลา 3-4 วัน แล้ว นำมานับจำนวนโคโลนีและบันทึกผล

6. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

6.1 เตรียมสารละลาย McFarland standards เพื่อเปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อ เตรียมโดยใช้ 1% Barium chloride 0.05 ml และ 1% Sulfuric acid 9.95 ml

6.2 เจือจางเชื้อทั้ง 6 เชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ สารละลายในข้อ 6.1

7.การศึกษาความคงสภาพ

7.1 สภาวะการเก็บเซรั่ม

- แบ่งเซรั่มเป็น 3 ชุดการทดสอบ โดย เก็บในอุณหภูมิห้อง 1 ชุดการทดสอบ เก็บที่อุณหภูมิ 40 °C 1 ชุดการทดสอบ ทดสอบ Accelerated Stability ที่ดัดแปลงจากการทดสอบ Freeze/Thaw cycle โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 6 รอบ 1 ชุดการทดสอบ

- แบ่งเซรั่ม โดยนำมาใส่เชื้อจุลินทรีย์ 6 เชื้อ ดังนี้ *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Enterobacter aerogenes, Candida albicans* และ *Aspergillus niger* จำนวนเชื้อละ 10^6 cfu ทั้ง 12 ขวด ขวดละ 1 เชื้อ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7.2 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสีย เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 7, 14, 28 และ 56 จากเซรั่มแต่ละขวด

7.3 การตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ วิเคราะห์หาปริมาณ % remaining ของสารกันเสียโดย HPLC จะเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 จากเซรั่มแต่ละขวด

"%remaining = (ปริมาณสารกันเสียในวันอื่น ๆ/ ปริมาณสารกันเสียวันที่ 0) x100"

7.4 ทดสอบความคงสภาพของเซรั่มทางกายภาพโดย วัด pH ด้วย Universal pH paper และดูการแยกชั้น, สีของตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน ด้วยสายตา ในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 จากเซรั่มแต่ละขวด

8. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารกันเสียกลุ่มพาราเบนกับสารกันเสียที่ไม่ใช่กลุ่มพาราเบนในผลิตภัณฑ์เซรั่มจากสารสกัดดอกอัญชัน จากการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์บน plate ในวันที่ 0, 7, 14 และ 28 แล้วใช้สถิติ independent t-test ในการหาความแตกต่างของจำนวนเชื้อที่ปรากฏบน plate ในแต่ละวันที่ทำการทดสอบ วิเคราะห์ข้อมูลของปริมาณของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์เซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน โดยการเปรียบเทียบ %remaining ของแต่ละตำรับระหว่างวันที่ 0 และ วันที่ 168 โดยใช้ one sample t-test

บทที่ 4
ผลการวิจัย

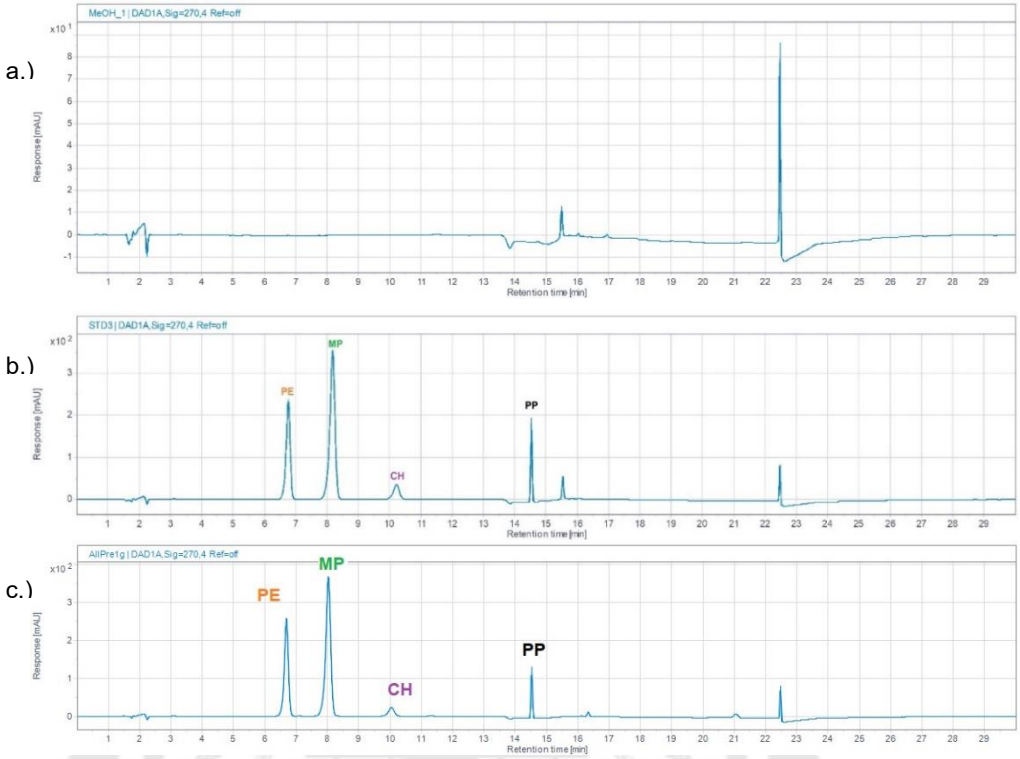
งานวิจัยเรื่องประสิทธิภาพของสารกันเสีย กลุ่มพาราเบน และ ไม่ใช่พาราเบนในตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน โดยมีการศึกษาในด้านการวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียด้วย HPLC ด้านประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ ได้ผลการวิจัยดังนี้

พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียโดย HPLC และทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสีย meyhlparaben, propylparaben, phenoxyethanol และ chlorphenesin ด้วย HPLC ใช้สภาวะดังนี้ คอลัมน์ C18-AR (250 x 4.6 mm, 5 µm) เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ประกอบด้วย acetonitrile: 0.1% phosphoric acid พร้อมกับมีการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนดังนี้ นาทีที่ 0-11 acetonitrile 25% นาทีที่ 11-13 เพิ่มอัตราส่วนของ acetonitrile 25% ไปถึง 100% นาทีที่ 13-20 คงอัตราส่วน acetonitrile 100% นาทีที่ 20-21 ปรับอัตราส่วน acetonitrile 100% ลงมาเหลือ 25% นาทีที่ 21-30 acetonitrile 25% โดยมีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1.5 mL/min ใช้ injection volume 10 µL และ UV detector 270 nm ทดสอบความเหมาะสมของสภาวะการวิเคราะห์โดยการทำ system suitability พิจารณาจากพารามิเตอร์ ได้แก่ Retention time, Precision repeatability (% RSD) ของ peak area, Resolution (Rs), Capacity factor (K'), Tailing factor (T) Theoretical plate number (N) โดยผลแสดงในตารางที่ 2 และ Chromatogram ของการวิเคราะห์สามารถแยกสารกันเสียออกจากสารอื่นในตำรับได้อย่างชัดเจน ไม่มี Peak รบกวน ดังในภาพประกอบ 2

ตาราง 2 ผลการทดสอบความเหมาะสมของสภาวะการวิเคราะห์ (system suitability) (n = 6)

Parameters	Recommended limits(CDER, 1994)	Results			
		Methylparaben	Propylparaben	Phenoxyethanol	Chlorphenesin
Retention times (min)	-	8.00	14.50	6.71	10.17
%RSD of peak area*	%RSD < 1%	0.29	0.74	0.30	0.48
Resolution (Rs)	Rs > 1.5	4.99	14.52	20.26	6.77
Capacity factor (K')	K' > 1.5	12.34	23.17	10.18	15.95
Tailing factor (T)	T < 2	0.82	1.05	0.85	0.87
Theoretical plate number (N)	N > 2000	12441.93	448025.66	13270.58	13181.01



ภาพประกอบ 2 a.) Chromatogram ของ methanol (ตัวทำละลายในการสกัดสาร), b.) Chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน phenoxyethanol 600 µg/mL, methylparaben 180 µg/mL, chlorphenesin 280 µg/mL และ propylparaben 35 µg/mL มี retention time 6.8, 8.1, 10.3 และ 14.5 min และ c.) Chromatogram ของสารกันเสีย 4 ชนิด ในเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียทั้งสองกลุ่ม ด้วย HPLC ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ภายใต้หัวข้อ specificity, linearity, accuracy, precision และ LOQ เพื่อยืนยันความเหมาะสมและความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ ดังนี้

ความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ (Specificity)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียสองกลุ่ม ด้วย HPLC ที่พัฒนาขึ้น สามารถแยกพีคของ phenoxyethanol, methylparaben, chlorphenesin, และ propylparaben ได้อย่างชัดเจน ดังที่แสดงในภาพประกอบ 2 b.), 2 c.) โดยที่ chromatogram ของตำรับเซรั่ม และสารละลายมาตรฐานของสารกันเสีย พบว่าสารกันเสียทุกตัวมี retention time ตรงกัน และไม่มีพีค

ของสารอื่นในตำรับเซรั่มที่รบกวนพีคของสารกันเสีย แสดงว่า วิธีวิเคราะห์ดังกล่าว มีความสามารถในการจำแนกสารกันเสียในตำรับเซรั่มได้

ความเป็นเส้นตรง และพิสัยของวิธีวิเคราะห์ (Linearity และ range)

วิเคราะห์ปริมาณของสารละลายมาตรฐาน phenoxyethanol, methylparaben, chlorphenesin, และ propylparaben ด้วย HPLC ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ได้ผลการวิเคราะห์ดังที่แสดงในตาราง 3 โดยผลของ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของแต่ละสาร มีค่ามากกว่า 0.997 จึงมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ในช่วงของความเข้มข้น ดังนี้ phenoxyethanol 200-1000 µg/mL, methylparaben 60-300 µg/mL, chlorphenesin 96-480 µg/mL, และ propylparaben 12-60 µg/mL

ตาราง 3 ผลการทดสอบหัวข้อ Linearity และ range

Parameter	methylparaben	propylparaben	phenoxyethanol	chlorphenesin
ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (µg/mL)	60-300	12-60	200-1000	96-480
สมการ	y = 23.537x+12.308	y = 18.370x+18.912	y = 3.657x+18.987	y = 1.760x+8.162
ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)	0.9999	0.9999	0.9998	0.9996

ความแม่นของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ผลการประเมินความแม่นของวิธีวิเคราะห์ที่ทำการวิเคราะห์โดยผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการห้องเดิม มีสภาวะการวิเคราะห์และเครื่องมือวิเคราะห์เช่นเดียวกัน วิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (Intra-day precision) และ วิเคราะห์ในวันที่ต่างกัน (Inter- day precision) โดยรายงานผลเป็น %RSD ของ %recovery ได้ผลดังที่แสดงในตาราง 4 โดย %RSD ของสารละลายมาตรฐานในการทดสอบแบบ Intra-day precision อยู่ในช่วง 0.14-1.95 % Inter-day precision อยู่ในช่วง 0.47-1.88 % ซึ่งไม่เกินค่าเกณฑ์มาตรฐาน 2.7% และ 3.7% (AOAC, 2016)

ตาราง 4 ผลการทดสอบหัวข้อ Accuracy และ Precision

Preservatives	ความเข้มข้นของสารละลาย (µg/mL)	Mean recovery (%)	Intra-day precision (%RSD)	Inter-day precision (%RSD)
Methylparaben	60	101.61	1.69	1.81
	180	100.34	1.22	1.70
	300	101.39	1.67	1.33
Propylparaben	12	96.10	0.45	1.88
	35	99.46	0.54	1.17
	60	100.33	0.25	0.47
Phenoxyethanol	200	102.35	0.76	0.59
	600	100.47	0.14	0.63
	1000	101.56	0.92	0.60
Chlorphenesin	96	101.54	0.97	1.70
	280	101.99	1.21	1.19
	480	102.16	1.95	1.70

ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ผลประเมินความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์โดยการเปรียบเทียบปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่เติมลงไป (added) และปริมาณของสารละลายมาตรฐานที่ตรวจพบ (found) จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยรายงานผลเป็น %recovery ของสารกันเสียแต่ละชนิด ได้ผลดังแสดงในตาราง 4 โดย %recovery ของสารละลายมาตรฐาน อยู่ในช่วง 96.10 – 102.35% โดยเกณฑ์มาตรฐานอยู่ในช่วง 97-103% (AOAC, 2016)

ขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ (Limit of quantitation: LOQ)

ผลประเมินขีดจำกัดของการหาเชิงปริมาณ พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารกันเสียจากการคำนวณด้วยสมการ $10\sigma/S$ เมื่อ σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณ และ S คือความชันของกราฟมาตรฐาน ได้ผลดังนี้ LOQ ของ methylparaben เท่ากับ 19.29 µg/mL. propylparaben เท่ากับ 1.50 µg/mL., phenoxyethanol เท่ากับ 66.30 µg/mL. และ chlorphenesin เท่ากับ 22.88 µg/mL

ประสิทธิภาพของการสกัด โดยหาความถูกต้องของวิธีการสกัด

ประสิทธิภาพของการสกัด พิจารณาจากความเข้มข้นของสารกันเสียที่สกัดได้จากเซรั่มเทียบกับความเข้มข้นของสารกันเสียที่ใส่ในเซรั่ม รายงานเป็น ค่าเฉลี่ยของ %recovery ± SD ได้ผลดังนี้ methylparaben 100.65± 0.01 % , propylparaben 103.12± 3.34% , phenoxyethanol 99.52 ±2.50 % และ chlorphenesin 103.02 ±1.40 %

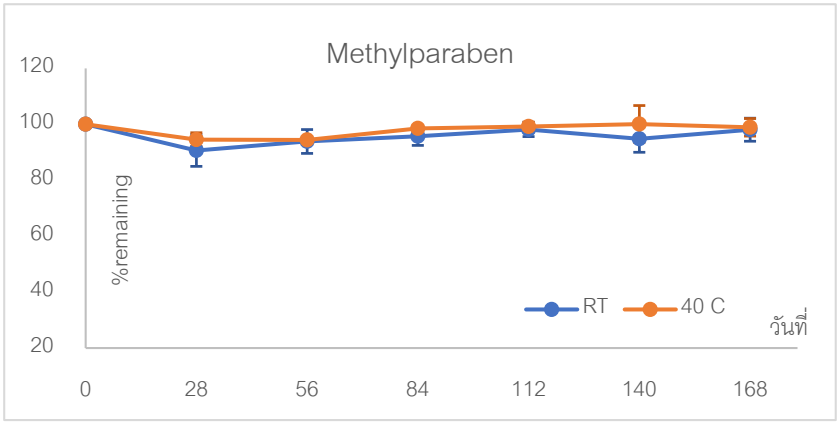
วิเคราะห์ปริมาณสารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน ในตำรับเซรั่ม

เตรียมเซรั่มที่ใช้ในการวิจัยตามตำรับที่กำหนด แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียทั้งสองกลุ่ม ด้วย HPLC และทดสอบความคงสภาพของสารกันเสียในเซรั่มโดยการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในสภาวะดังนี้ อุณหภูมิห้อง, 40 °C และ Freeze/Thaw cycle 6 cycles แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียด้วย HPLC ในวันที่ 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 ได้ผลวิเคราะห์ดังตาราง 5-8 รายงานผลเป็น % remaining (ปริมาณสารกันเสียที่สกัดได้วันที่ Y / ปริมาณสารกันเสียที่สกัดได้วันที่ 0 X 100 (Y = 28, 56, 84, 112, 140 และ 168)

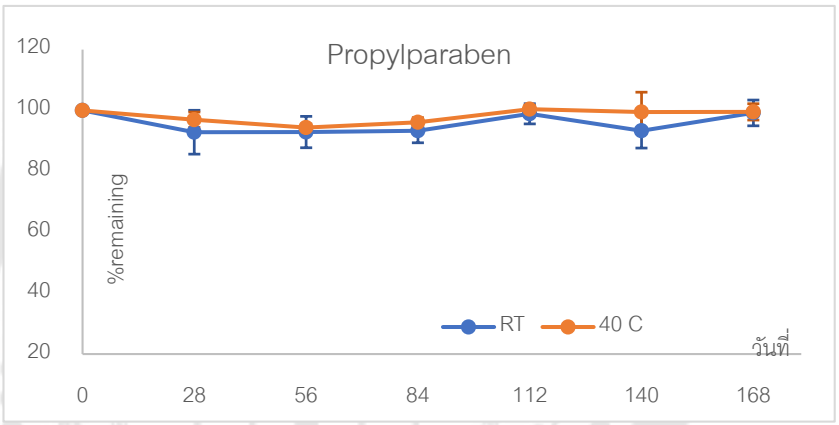
ตาราง 5 ปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสารกันเสียในตำรับเซรั่มสูตรต่าง ๆ (n=3)

สูตรตำรับเซรั่ม	สภาวะ	สารกันเสีย	% remaining±SD						
			Day 0	Day 28	Day 56	Day 84	Day 112	Day 140	Day 168
ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกลุ่มพาราเบน	อุณหภูมิห้อง	Methylparaben	100.00±0.00	90.63±5.70	93.87±4.25	95.75±3.30	98.15±2.56	94.81±4.80	98.04±4.12
		Propylparaben	100.00±0.00	92.85±7.19	92.90±5.17	93.34±3.97	98.91±3.32	93.35±5.68	99.20±4.23
	40 °C	Methylparaben	100.00±0.00	94.55±2.42	94.43±0.21	98.50±1.20	99.21±1.62	100.09±6.60	98.93±3.15
		Propylparaben	100.00±0.00	96.96±2.52	94.37±1.20	96.11±1.53	100.42±1.23	99.47±6.54	99.54±2.67
ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	อุณหภูมิห้อง	Phenoxyethanol	100.00±0.00	102.80±0.33	102.70±0.51	101.01±2.45	100.85±0.52	104.45±1.73	102.72±1.16
		Chlorphenesin	100.00±0.00	103.58±3.00	102.39±0.78	103.21±2.40	105.43±0.70	107.23±3.32	106.10±3.45
	40 °C	Phenoxyethanol	100.00±0.00	101.36±7.32	100.15±2.86	101.76±1.36	100.86±0.85	103.02±1.17	101.76±1.77
		Chlorphenesin	100.00±0.00	103.10±6.68	101.87±2.84	103.41±0.88	105.60±2.98	105.30±2.23	107.34±3.44
ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	อุณหภูมิห้อง	Phenoxyethano	100.00±0.00	92.76±5.07	96.67±5.01	96.37±5.10	95.93±3.60	98.39±4.55	100.81±0.92
		Methylparaben	100.00±0.00	90.49±7.15	93.45±11.23	96.82±3.74	99.17±2.42	97.69±1.27	98.89±1.66
		Chlorphenesin	100.00±0.00	96.25±5.32	98.91±7.76	100.23±2.87	103.34±1.91	102.22±2.03	108.81±3.48
		Propylparaben	100.00±0.00	94.75±9.55	93.64±15.91	96.30±6.84	101.42±5.40	97.48±5.33	101.95±5.33
	40 °C	Phenoxyethano	100.00±0.00	100.67±0.16	98.90±0.86	100.33±1.21	99.73±0.96	100.90±1.57	99.51±1.80
		Methylparaben	100.00±0.00	98.37±0.23	98.17±0.89	100.70±2.02	102.15±0.63	99.72±1.74	99.47±0.74
		Chlorphenesin	100.00±0.00	104.47±0.99	101.43±0.98	101.69±1.99	105.96±3.03	105.64±1.51	107.60±5.09
		Propylparaben	100.00±0.00	100.89±1.77	97.87±1.40	98.31±2.46	102.32±0.23	97.77±2.64	99.63±1.58

a.)

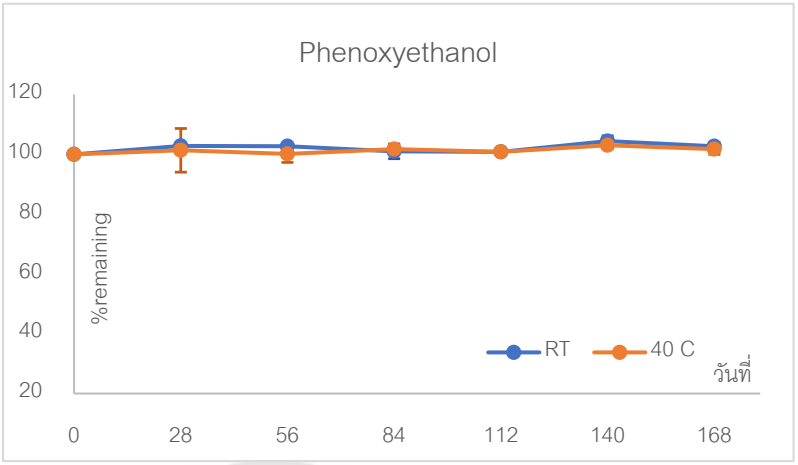


b.)

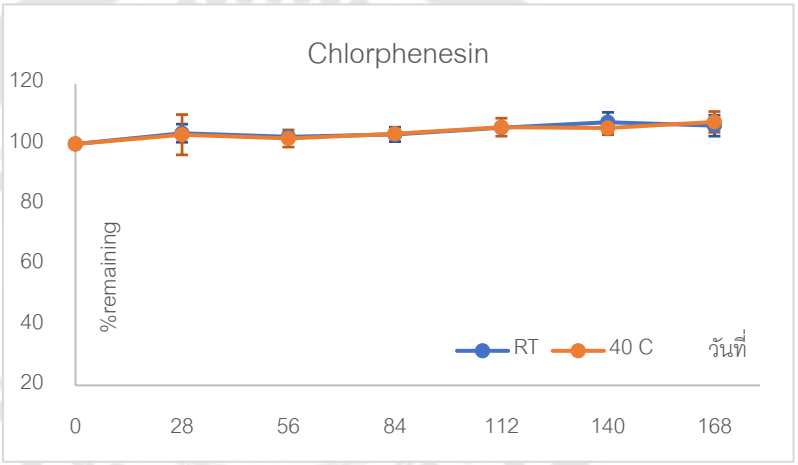


ภาพประกอบ 3 กราฟแสดงปริมาณ %remaining เฉลี่ย ของ a.) methylparaben b.) propylparaben ในตำรับเซรั่มสูตรที่ใส่สารกลุ่มพาราเบน ในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168

a.)

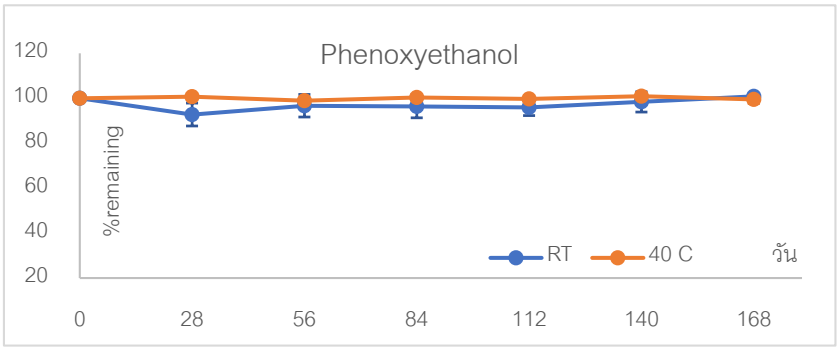


b.)

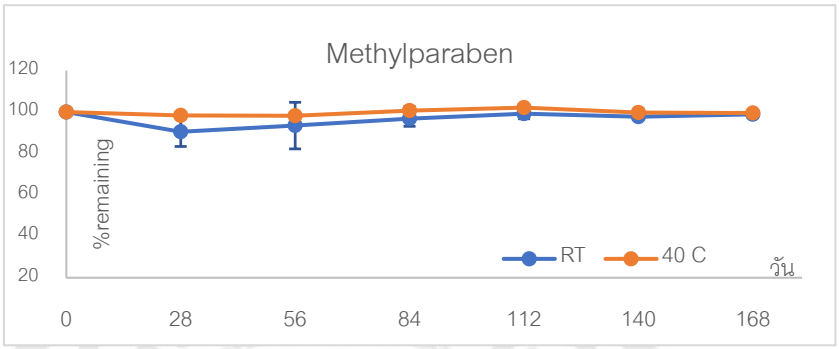


ภาพประกอบ 4 กราฟแสดงปริมาณ %remaining เฉลี่ยของ a.) phenoxyethanol b.) chlorphenesin ในตำรับเซรั่มสูตรที่ใส่สารกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168

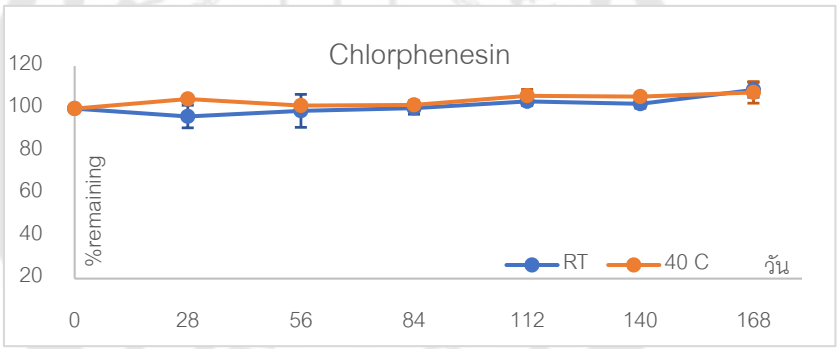
a.)



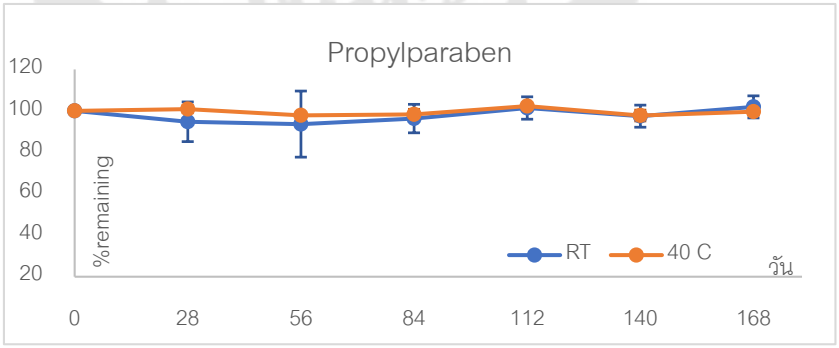
b.)



c.)



d.)



ภาพประกอบ 5 กราฟแสดงปริมาณ %remaining เฉลี่ยของ a.) phenoxyethanol b.) methylparaben c.) chlorphenesin d.) propylparaben ในตำรับเซรั่มสูตรที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168

สภาวะ Accelerated Stability (Freeze / Thaw cycle) โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 6 cycles

ตาราง 6 ปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสารกันเสียในตำรับเซรั่ม ภายใต้สภาวะ Freeze/Thaw cycle

ตัวอย่าง	สารกันเสีย	% remaining ครบ 6 cycles ± SD
ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน	Methylparaben	90.93 ± 4.50
	Propylparaben	92.94 ± 5.79
ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	Phenoxyethanol	102.81 ±2.41
	Chlorphenesin	105.94 ± 6.09
ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน	Phenoxyethanol	98.75 ± 1.83
	Methylparaben	95.23 ± 2.56
	Chlorphenesin	103.97 ± 1.93
	Propylparaben	96.61 ± 3.10

จากตาราง 6 ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน พบว่า methylparaben และ propylparaben มีปริมาณลดลงจากวันแรกที่วิเคราะห์ อยู่ในช่วง 90.9-92.9% ส่วนตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน มีปริมาณของ phenoxyethanol และ chlorphenesin เพิ่มขึ้นจากวันแรกที่วิเคราะห์ ได้ปริมาณ %remainig เฉลี่ย 102.8% และ105.9% ตามลำดับ ส่วนตำรับเซรั่มที่สารกันเสียทั้งสองกลุ่ม พบว่า ปริมาณของ phenoxyethanol, methylparaben และ propylparaben มีปริมาณลดลงจากวันแรกที่วิเคราะห์ อยู่ในช่วง 95.2-98.8% ส่วน ปริมาณของ chlorphenesin มีปริมาณเพิ่มขึ้น พบประมาณ 104.0%

ความคงสภาพของผลิตภัณฑ์

ค่าความเป็นกรดด่างของตำรับ (pH)

วันแรกของการทดสอบผลิตภัณฑ์ทุกสูตรตำรับมีค่า pH อยู่ในช่วง 6-7 และในวันที่ 168 ของการทดสอบ ผลิตภัณฑ์ทุกสูตรตำรับมีค่า pH ในช่วง 5-6

ลักษณะของผลิตภัณฑ์

ลักษณะเนื้อผลิตภัณฑ์ ไม่มีการแยกชั้นของผลิตภัณฑ์ แต่มีการเปลี่ยนแปลงของสีผลิตภัณฑ์ สีของผลิตภัณฑ์ ศึกษาโดยการเปรียบเทียบสีของผลิตภัณฑ์ในวันที่ 0 ของการเริ่มศึกษา กับวันที่ 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 พบว่า ผลิตภัณฑ์ทุกสูตรที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง นั้น

ในวันที่ 168 ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี ส่วนที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C มีการเปลี่ยนแปลงของสี โดยเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเทาทุกสูตรตำรับในวันที่ 84 หรือ เดือนที่ 3 ของการศึกษา และผลิตภัณฑ์ทุกสูตรตำรับที่เก็บในสภาวะ Freeze/Thaw cycle ครบ 6 cycles ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสี

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสีย

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารกันเสียในตำรับเซรั่มต่าง ๆ โดยใส่เชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด ในผลิตภัณฑ์ตัวอย่างทั้ง 4 สูตร แล้วทำการทดสอบด้วย Antimicrobial effectiveness test ในวันที่ 0, 7, 14, 28 และ 56 ได้ผลดังที่แสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสียในผลิตภัณฑ์

เชื้อจุลินทรีย์	ผลิตภัณฑ์	จำนวน colonyเฉลี่ย (จำนวนอาหารเลี้ยงเชื้อที่พบ colony)				
		Day 0	Day 7	Day 14	Day 28	Day 56
E. coli	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน	$>10^3$(2)	0	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	$>10^3$(2)	0	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน	0	0	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ไม่ใส่สารกันเสีย	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)
E. aerogenes	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน	$>10^3$(2)	(1)6	0	0	1(1)
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	$>10^3$(2)	0	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน	0	0	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ไม่ใส่สารกันเสีย	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)
P. aeruginosa	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน	$>10^3$(2)	$>10^3$(1)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	$>10^3$(2)	$>10^3$(1)	$>10^3$(2)	)2002)	$>10^3$(2)
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)
	ตำรับเซรั่มที่ไม่ใส่สารกันเสีย	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)
S. aureus	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	$>10^3$(2)	0	2(1)	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน	$>10^3$(2)	0	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ไม่ใส่สารกันเสีย	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	0	495(2)
C. albicans	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน	850(2)	0	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	300(2)	0	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน	8(2)	0	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ไม่ใส่สารกันเสีย	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)
A. niger	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน	$>10^3$(2)	$>10^3$(1)	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	$>10^3$(2)	0	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน	184(2)	0	0	0	0
	ตำรับเซรั่มที่ไม่ใส่สารกันเสีย	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)

จากตาราง 7 พบว่าผลิตภัณฑ์ตำรับที่ไม่ใส่สารกันเสีย พบการเจริญของเชื้อทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ และทุกช่วงการทดสอบ ผลิตภัณฑ์ตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน พบการเจริญของเชื้อ *E. aerogenes* ในวันที่ 7 และ 56, เชื้อ *A. niger* ในวันที่ 7 จำนวน 1 จานเลี้ยงเชื้อจากการทดสอบ 2 จานเลี้ยงเชื้อ และ เชื้อ *S. aureus* ในวันที่ 7 จำนวน 2 จานเลี้ยงเชื้อ ผลิตภัณฑ์ตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน พบการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ในวันที่ 14 จำนวน 1 จานเลี้ยงเชื้อ จากการทดสอบ 2 จานเลี้ยงเชื้อ ผลิตภัณฑ์ตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและ

ไม่ใช่พาราเบน ไม่พบการเจริญของเชื้อ *E. coli, E. aerogenes* ตั้งแต่วันที่ 0 ของการทดสอบ และ พบการเจริญของเชื้อ *C. albicans* และ *A. niger* น้อยกว่า ตำรับอื่นในวันที่ 0 ของการทดสอบ และพบการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ทั้งสามตำรับ ในทุกช่วงการทดสอบ

การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในตำรับเซรั่ม

ทดสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ด้วยการเก็บตำรับเซรั่มทั้ง 4 สูตร ในสภาวะที่แตกต่างกันดังนี้ เก็บในอุณหภูมิห้อง, อุณหภูมิ 40°C และสภาวะ Accelerated Stability ที่ดัดแปลงจากการทดสอบ Freeze/Thaw cycle โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 6 รอบ แล้วนำตัวอย่างมาทดสอบเพาะเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้ Trypticase soy agar (TSA), Sabouraud dextrose agar (SDA), Cetrimide agar และ Mannitol salt agar วันที่เริ่มการทดสอบ วันที่ 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 ได้ผลการทดสอบดังนี้

ตาราง 8 ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน (methylparaben, propylparaben)

สภาวะ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวน colony เฉลี่ย (จำนวนอาหารเลี้ยงเชื้อที่พบ colony)						
		Day 0	Day 28	Day 56	Day 84	Day 112	Day 140	Day 168
อุณหภูมิห้อง	TSA	0	0	0	0	0	$>10^3$(2)	0
	SDA	0	0	0	0	0	0	0
	Cetrimide agar	0	0	0	0	0	0	0
	Mannitol salt agar	0	0	0	0	0	0	0
40°C	TSA	0	0	0	0	0	0	0
	SDA	0	0	0	0	0	0	0
	Cetrimide agar	0	0	0	0	0	0	0
	Mannitol salt agar	0	0	0	0	0	0	0

จากตาราง 8 พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ในวันที่ 140 ของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนั้นไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

ตาราง 9 ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน (phenoxyethanol, chlorphenesin)

สภาวะ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวน colony เฉลี่ย (จำนวนอาหารเลี้ยงเชื้อที่พบ colony)						
		Day 0	Day 28	Day 56	Day 84	Day 112	Day 140	Day 168
อุณหภูมิห้อง	TSA	0	0	0	0	0	0	0
	SDA	0	0	0	0	0	0	0
	Cetrimide agar	0	0	0	0	0	0	0
	Mannitol salt agar	0	0	0	0	0	0	0
40°C	TSA	0	0	$>10^3$(1)	0	0	0	0
	SDA	0	0	1(1)	0	0	1(1)	0
	Cetrimide agar	0	0	0	0	0	0	0
	Mannitol salt agar	0	0	0	0	0	0	0

จากตาราง 9 พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ในวันที่ 140 ของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C 1 จานเพาะเชื้อ วันที่ 168 ของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 จานเพาะเชื้อ และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol salt agar วันที่ 168 ของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C 1 จานเพาะเชื้อ

ตาราง 10 ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และ ไม่ใช่พาราเบน

สภาวะ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวน colonyเฉลี่ย (จำนวนอาหารเลี้ยงเชื้อที่พบ colony)						
		Day 0	Day 28	Day 56	Day 84	Day 112	Day 140	Day 168
อุณหภูมิห้อง	TSA	0	0	0	0	0	0	0
	SDA	0	0	0	0	0	0	>500(1)
	Cetrimide agar	0	0	0	0	0	0	0
	Mannitol salt agar	0	0	0	0	0	0	0
40°C	TSA	0	0	0	0	0	0	0
	SDA	0	0	0	0	0	82(1)	0
	Cetrimide agar	0	0	0	0	0	0	0
	Mannitol salt agar	0	0	0	0	0	0	1(1)

จากตาราง 10 พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และ SDA ในวันที่ 56 ของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C 1 จานเพาะเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ชนิด และในวันที่ 140 พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่ทดสอบผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C

ตาราง 11 ตำรับเซรั่มที่ไม่ใส่สารกันเสีย

สภาวะ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวน colony เฉลี่ย (จำนวนอาหารเลี้ยงเชื้อที่พบ colony)						
		Day 0	Day 28	Day 56	Day 84	Day 112	Day 140	Day 168
อุณหภูมิห้อง	TSA	0	$>10^3$(2)	13(1)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)
	SDA	0	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)
	Cetrimide agar	0	0	0	0	0	0	0
	Mannitol salt agar	0	$>10^3$(2)	0	226(2)	225(2)	151(2)	>400(2)
40°C	TSA	0	0	$>10^3$(2)	20(2)	$>10^3$(2)	>500(2)	$>10^3$(2)
	SDA	0	0	$>10^3$(2)	34(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)	$>10^3$(2)
	Cetrimide agar	0	0	0	0	0	0	0
	Mannitol salt agar	0	0	120(2)	10(2)	$>10^3$(2)	227(2)	>600(2)

จากตาราง 11 ผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง พบการปนเปื้อนของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA, SDA และ Mannitol salt agar ตั้งแต่การทดสอบวันที่ 28 จำนวนมากกว่า 1,000 โคโลนี แต่ในวันที่ 56 ของการทดสอบ ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol salt agar และมีการพบการปนเปื้อนที่น้อยกว่า 1,000 โคโลนี จนถึงวันที่ 168 ของการทดสอบ ส่วนผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เริ่มพบการปนเปื้อนของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่วันที่ 56 ของการทดสอบ แต่ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Cetrimide agar ตลอดการทดสอบ

ตาราง 12 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะ Freeze/Thaw cycle

สูตรตำรับ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวน colony	
		Day 0	6 Cycles
ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน	TSA	0	0
	SDA	0	0
	Cetrimide agar	0	0
	Mannitol salt agar	0	0
ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	TSA	0	0
	SDA	0	0
	Cetrimide agar	0	0
	Mannitol salt agar	0	0
ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและไม่ใช่พาราเบน	TSA	0	0
	SDA	0	0
	Cetrimide agar	0	0
	Mannitol salt agar	0	0
ตำรับเซรั่มที่ไม่ใส่สารกันเสีย	TSA	0	0
	SDA	0	0
	Cetrimide agar	0	0
	Mannitol salt agar	0	0

จากตาราง 12 พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด ในการทดสอบ

การวิเคราะห์ผลการทดสอบทางสถิติ

การเปรียบเทียบข้อมูลประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

จากผลการทดลองพบว่าไม่สามารถเปรียบเทียบข้อมูลประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารกันเสียกลุ่มพาราเบน และสารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบนในตำรับ และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการเก็บตำรับเซรั่ม กับการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และความคงสภาพของตำรับเซรั่มได้ เนื่องจากผลการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ไม่สามารถนับจำนวนของโคโลนีเชื้อในการทดสอบได้อย่างแน่นอน และพบการปนเปื้อนระหว่างการทดสอบ

เปรียบเทียบปริมาณสารกันเสียที่วิเคราะห์ได้ในตำรับเซรั่ม

เปรียบเทียบปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสารกันเสีย ในแต่ละสูตรตำรับ ระหว่างวันที่ 0 (100%) กับ วันที่ 168 แต่ละสภาวะการเก็บผลิตภัณฑ์ ด้วยสถิติ one sample t-test ได้ผลดังที่แสดงในตาราง 13

ตาราง 13 เปรียบเทียบปริมาณ %remaining ของสารกันเสีย ด้วยสถิติ one sample t-test

สภาวะการเก็บผลิตภัณฑ์	สูตรตำรับ	สารกันเสีย	%remaining วันที่ 168		t	p-value
			ค่าเฉลี่ย	SD		
อุณหภูมิห้อง	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน	Methylparaben	98.04	4.12	-0.822	0.498
		Propylparaben	99.20	4.23	-0.327	0.774
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	Phenoxyethanol	102.72	1.16	4.073	0.055
		Chlorphenesin	106.10	3.45	3.059	0.092
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน	Phenoxyethanol	100.81	0.92	1.515	0.269
		Methylparaben	98.89	1.66	-1.158	0.366
		Chlorphenesin	108.81	3.48	4.381	0.048*
		Propylparaben	101.95	5.33	0.633	0.592
40°C	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน	Methylparaben	98.93	3.15	- 0.590	0.615
		Propylparaben	99.54	2.68	-0.295	0.796
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	Phenoxyethanol	101.76	1.77	1.723	0.227
		Chlorphenesin	107.34	3.44	3.691	0.066
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน	Phenoxyethanol	99.51	1.80	-0.475	0.682
		Methylparaben	99.47	0.74	-1.238	0.341
		Chlorphenesin	107.60	5.09	2.590	0.122
		Propylparaben	99.63	1.58	-0.409	0.722
Freeze/Thaw cycle	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน	Methylparaben	90.93	4.50	-3.494	0.073
		Propylparaben	92.94	5.79	-2.112	0.169
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน	Phenoxyethanol	102.81	2.41	2.021	0.181
		Chlorphenesin	105.94	6.09	1.687	0.234
	ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และไม่ใช่พาราเบน	Phenoxyethanol	98.75	1.83	-1.180	0.359
		Methylparaben	95.23	2.56	-3.224	0.084
		Chlorphenesin	103.97	1.93	3.554	0.071
		Propylparaben	96.61	3.10	-1.895	0.199

จากตาราง 13 พบว่า ปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสารกันเสียทุกชนิด ทุกสูตรตำรับ และทุกสภาวะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ในวันที่ 0 (วันเริ่มการทดสอบ) กับ วันที่ 168 มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่ ปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสาร chlorphenesin ในสูตรตำรับที่ใส่สารกันเสียทั้งสองกลุ่ม ที่เก็บในอุณหภูมิห้อง มีปริมาณ เท่ากับ 108.8±3.48 % (ค่าเฉลี่ย±SD) ซึ่งมีความแตกต่างจากปริมาณ %remaining เฉลี่ยในวันที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ ($p = 0.048$)

เปรียบเทียบปริมาณ %remaining ของสารกันเสียชนิดเดียวกัน ในวันที่ 168 ระหว่างสูตรตำรับเซรั่มที่ใช้สารกันเสียกลุ่มพาราเบนกับสูตรตำรับที่ใช้สารกันเสียทั้ง 2 กลุ่ม และเปรียบเทียบระหว่าง สูตรตำรับเซรั่มที่ใช้สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบนกับสูตรตำรับที่ใช้สารกันเสียทั้ง 2 กลุ่ม ในแต่ละสภาวะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ด้วยสถิติ independent t-test ได้ผลดังที่แสดงในตาราง 14

ตาราง 14 เปรียบเทียบปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสารกันเสีย ด้วยสถิติ independent t-test

สภาวะการเก็บผลิตภัณฑ์	สารกันเสีย	%remaining วันที่ 168						t	P value
		ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน		ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน		ตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและไม่ใช่พาราเบน			
		ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าเฉลี่ย	SD		
อุณหภูมิห้อง	Phenoxyethanol			102.72	1.16	100.81	0.92	2.233	0.089
	Methylparaben	98.04	4.12			98.89	1.66	-0.331	0.757
	Chlorphenesin			106.10	3.45	108.81	3.48	-0.959	0.392
	Propylparaben	99.20	4.23			101.95	5.33	-0.699	0.523
40°C	Phenoxyethanol			101.76	1.77	99.51	1.80	1.549	0.196
	Methylparaben	98.93	3.15			99.47	0.74	-0.292	0.785
	Chlorphenesin			107.34	3.44	107.60	5.09	-0.074	0.944
	Propylparaben	99.54	2.68			99.63	1.58	-0.046	0.965
Freeze/Thaw cycle	Phenoxyethanol			102.81	2.41	98.75	1.83	2.324	0.081
	Methylparaben	90.93	4.50			95.23	2.56	-1.440	0.223
	Chlorphenesin			105.94	6.09	103.97	1.93	0.533	0.622
	Propylparaben	92.94	5.79			96.61	3.10	-0.967	0.388

จากตาราง 14 พบว่า ปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสารกันเสีย ระหว่างสูตรตำรับที่ใช้สารกันเสียทั้ง 2 กลุ่ม กับสูตรตำรับที่ใช้สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และ กลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ในวันที่ 168 ของการทดสอบ ในทุกสภาวะการเก็บรักษา ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$)

บทที่ 5
สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยเรื่อง ประสิทธิภาพของสารกันเสีย กลุ่มพาราเบน และ ไม่ใช่พาราเบนในตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน โดยมีการศึกษาในด้านการวิเคราะห์หาปริมาณด้วย HPLC ด้านประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ ผู้วิจัยสามารถสรุปผลการวิจัย อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การวิเคราะห์หาปริมาณ methylparaben, propylparaben, phenoxyethanol และ chlorphenesin ในเซรั่มสารสกัดดอกอัญชัน ด้วย HPLC มีสภาวะการวิเคราะห์ดังนี้ คอลัมน์ คือ C18-AR column (250 x 4.6 mm, 5 µm) เฟสเคลื่อนที่ แบบ gradient elution ด้วย acetonitrile: 0.1% phosphoric acid โดยนาทีที่ 0-11 acetonitrile 25% นาทีที่ 11-13 เพิ่มอัตราส่วนของ acetonitrile 25% ไปถึง 100% นาทีที่ 13-20 คงอัตราส่วน acetonitrile 100% นาทีที่ 20-21 ปรับอัตราส่วน acetonitrile 100% ลงมาเหลือ 25% นาทีที่ 21-30 acetonitrile 25% โดยมีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ เท่ากับ 1.5 mL/min ใช้ injection volume 10 µL และ UV detector 270 nm สามารถแยก methylparaben, propylparaben, phenoxyethanol และ chlorphenesin ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และค่าพารามิเตอร์ ที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธีการ HPLC ได้แก่ precision repeatability ของ peak area, resolution, capacity factor tailing factor และ plate number เป็นไปตามเกณฑ์ของ Center for Drug Evaluation and Research ของประเทศสหรัฐอเมริกา(CDER, 1994) เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ตาม ICH guideline(ICH, 2005) ในหัวข้อ specificity, linearity, range, precision, accuracy และ LOQ พบว่าเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน AOAC Official Methods of Analysis (AOAC, 2016) ที่กำหนดทุกหัวข้อ และ ช่วงความเข้มข้นของการวิเคราะห์สาร มีค่ามากกว่า LOQ ทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียทั้ง 4 ชนิดได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

วิธีการสกัดสารกันเสียจากตำรับเซรั่ม สามารถสกัดสารกันเสียได้ในช่วง 99.52 – 103.12% ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารกันเสีย โดยคำนวณเป็น %remaining เปรียบเทียบกับปริมาณวันแรกที่เริ่มการทดสอบ พบว่าตลอดช่วงการทดสอบความคงสภาพ 168 วัน ซึ่งวิเคราะห์ในวันที่ 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 ปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ %remaining อยู่ในช่วง 90.49-

108.81% โดยปริมาณสาร %remaining ที่มากกว่า 100% อาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนในบางช่วงเวลาที่ทำการสกัดในขั้นตอนการสกัดสารด้วยเมทานอล ทำให้มีผลต่อความเข้มข้นของสาร แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารกันเสียในวันแรกที่เริ่มการทดสอบกับปริมาณสารกันเสียในวันที่ 168 ด้วยสถิติ one simple t-test พบว่า ปริมาณสารกันเสียในทุกสูตรตำรับและทุกสภาวะการทดสอบความคงสภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้น chlorphenesin ในสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ที่ใส่สารกันเสียทั้งสองกลุ่ม ที่เก็บในอุณหภูมิห้อง มีปริมาณ เท่ากับ 108.8±3.48% (ค่าเฉลี่ย±SD) ซึ่งมีความแตกต่างจากปริมาณ %remaining ในวันแรกที่เริ่มการทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ ($p = 0.048$) ซึ่งอาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนช่วงขั้นตอนการสกัดสารด้วยเมทานอล และในตำรับมีปริมาณของ chlorphenesin น้อย จึงมีโอกาสที่ผลการวิเคราะห์ให้ %remaining ที่คลาดเคลื่อนได้สูง สำหรับการเปรียบเทียบปริมาณสารกันเสียในวันที่ 168 ระหว่างสูตรตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียทั้งสองกลุ่ม กับตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และตำรับเซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ด้วยสถิติ independent t-test พบว่า ปริมาณสารกันเสียไม่แตกต่างกัน สามารถสรุปได้ว่า ปริมาณสารกันเสียของผลิตภัณฑ์ทั้งสามตำรับ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากวันแรกที่เริ่มการทดสอบ จนถึงหลังจากศึกษาความคงสภาพในอุณหภูมิห้อง, 40°C ผ่านไป 6 เดือน หรือ 168 วัน และ ที่สภาวะ Freeze/Thaw cycle ครบ 6 cycles

ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธีและเกณฑ์มาตรฐานที่อ้างอิงจาก USP ซึ่งทดสอบโดยการใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่สนใจไปในผลิตภัณฑ์ เพื่อศึกษาสารกันเสียที่สนใจนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์และราได้ และเกณฑ์ที่กำหนดคือ ต้องมีการลดลงของจำนวนเชื้อแบคทีเรีย ในวันที่ 14 ของการทดสอบไม่น้อยกว่า 2 เท่าของค่า log ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากวันแรกที่เริ่มการทดสอบ และในวันที่ 28 ต้องไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียจากจำนวนในวันที่ 14 ส่วนยีสต์และราในวันที่ 14, 28 ต้องไม่มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนยีสต์และราจากจำนวนในวันแรกที่เริ่มการทดสอบ ซึ่งจากการทดสอบพบว่า การทดสอบด้วยเชื้อ *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *C. albicans* และ *A. niger* ในผลิตภัณฑ์ ทั้งสามสูตรตำรับ แต่การทดสอบด้วยเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่ามีการเจริญของเชื้อตลอดการทดสอบ สรุปได้ว่า สารกันเสียทั้ง 4 สาร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *C. albicans* และ *A. niger* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ ส่วนการศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ในด้านการปนเปื้อนของเชื้อในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 เพื่อศึกษาว่าสารกันเสียที่ใส่ในผลิตภัณฑ์นั้นสามารถป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ได้ สรุป

ได้ว่า ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 สูตร ที่ใส่สารกันเสีย มีความคงสภาพสามารถป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ตลอดการศึกษา

ความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ ค่า pH ของผลิตภัณฑ์ อยู่ในช่วง pH 5-7 ตลอดการศึกษา ส่วนของลักษณะไม่มีการแยกชั้นของผลิตภัณฑ์ แต่สีผลิตภัณฑ์เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเทาทั้ง 3 สูตรตำรับ ที่เก็บไว้อุณหภูมิ 40°C ในวันที่ 84

เซรั่มสารสกัดดอกอัญชันทั้ง 3 สูตร คือที่ใช่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน กลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน และกลุ่มที่ผสมสารกันเสียทั้ง 2 กลุ่ม สามารถป้องกันการเจริญของเชื้อ ตลอดระยะเวลาการศึกษาความคงสภาพ ปริมาณสารกันเสียในผลิตภัณฑ์ไม่แตกต่างจากวันแรกของการศึกษา และปริมาณสารกันเสียของผลิตภัณฑ์สูตรที่ใช้สารกลุ่มพาราเบน และ สูตรที่ใช้สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารกันเสียทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *C. albicans* และ *A. niger* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ สามารถสรุปได้ว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ในตำรับ และความคงสภาพของตำรับเซรั่มสารสกัดดอกอัญชันที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ไม่แตกต่างจากตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน และ ผลิตภัณฑ์เซรั่มสารสกัดดอกอัญชันที่ใส่สารกันเสียทั้ง 3 ตำรับ ในสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิห้อง มีความคงสภาพได้นาน 6 เดือน เนื่องด้วยผลการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของสารกันเสีย และความคงสภาพของตำรับไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์สามารถสรุปได้ว่า หากเก็บผลิตภัณฑ์เซรั่มที่ใส่สารกันเสียไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลีกเลี่ยงความร้อนและแสงแดดโดยตรง ผลิตภัณฑ์จะมีอายุมากกว่า 6 เดือน

เนื่องจากสารกลุ่มพาราเบนนั้นสามารถทำให้เกิด allergic contact allergy ได้ถึง 4.2% (Cashman และ Warshaw, 2005) และสามารถเพิ่มโอกาสการเกิดมะเร็งเต้านมในเพศหญิงจากการสะสมของสารกลุ่มพาราเบนบริเวณใต้วงแขนที่ทำให้เกิดผล estrogenic อาจจะส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์มะเร็งได้ (Barr และคณะ, 2012) ทำให้ผู้บริโภคมีความกังวลที่ใช้สารกันเสียกลุ่มนี้ จึงได้นำสารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบนมาทดแทน ดังนั้นจากการศึกษา สารกันเสีย phenoxyethanol และ chlorphenesin ที่มีประสิทธิภาพเท่ากับสารกันเสียกลุ่มพาราเบน จึงนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ทดแทนกันได้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารกันเสียกลุ่มพาราเบนร่วมด้วย เพราะประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกันระหว่างผลิตภัณฑ์เซรั่มที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน กลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบนและใส่สารกันเสียทั้งสองกลุ่ม นอกจากนี้การใส่สารกันเสียทั้งสอง

กลุ่มไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และเป็นการลดความกังวลของผู้บริโภคในการใช้สารกันเสีย อีกทั้งยังสามารถนำไปใช้ในการส่งเสริมการขาย

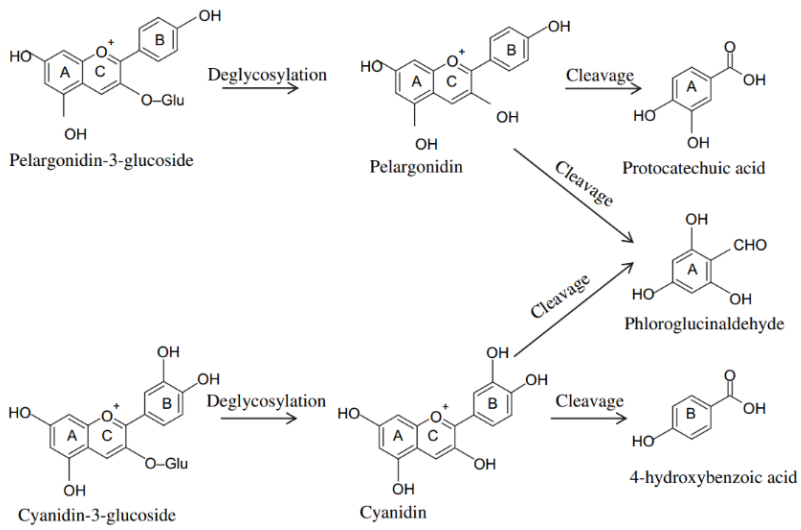
อภิปรายผลการวิจัย

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารกันเสียด้วย HPLC เลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ เป็นส่วนผสมของ acetonitrile กับ สารละลายกรด phosphoric จากหลักการ like dissolve like ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC จากค่าการละลายของ methylparaben, propylparaben, phenoxyethanol และ chlorphenesin ที่ละลายได้ใน acetonitrile ทำให้สามารถละลายและถูกพามาด้วย acetonitrile ซึ่งการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ นั้นเพื่อให้สามารถแยกสารอออกจากกัน จากสภาพความเป็นขั้วที่แตกต่างกันของสารทั้ง 4 ในส่วนของสารละลายน้ำ เลือกใช้กรด phosphoric เนื่องจากสารกันเสียกลุ่มพาราเบนมีโครงสร้างเป็น ester อาจจะเกิด Hydrolysis เมื่ออยู่ในสภาวะด่าง ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายกรด และจากค่า pKa ของ methylparaben และ propylparaben เท่ากับ 8.4 และ 8.5 ตามลำดับ จากสมการ Henderson-Hasselbalch ถ้า Methylparaben และ Propylparaben อยู่ในสารละลายที่มี pH ต่ำ (กรด) จะอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว สามารถจับกับเฟสคงที่ และถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Aoyama และการศึกษาของ Tokunaga ที่วิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียกลุ่มพาราเบน ที่ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น acetoniltlie และสารละลายที่มีค่า pH ต่ำกว่า 7 (Aoyama และคณะ, 2014; Tokunaga และคณะ, 2003)

การวิเคราะห์ปริมาณสารกันเสียที่สกัดจากตำรับเซรั่มสารสกัดอัญชัน พบว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณสารไม่สามารถบอกแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารได้อย่างแน่นอน อาจเกิดจากปริมาณสารกันเสียไม่มีการเปลี่ยนแปลง เพราะว่า methylparaben, propylparaben, phenoxyethanol และ chlorphenesin มีความคงตัว ไม่เกิดการสลายตัวของสาร ขณะทำการสกัดสาร ส่งผลให้ความเข้มข้นของสารกันเสียที่สกัดได้ในแต่ละครั้งเปลี่ยนแปลงจากความเข้มข้นที่ควรจะเป็น จึงไม่เห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นสารกันเสียได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารกันเสียตลอดช่วงการศึกษากับวันแรกที่ศึกษา โดยใช้สถิติแล้วพบว่าปริมาณสารกันเสียไม่แตกต่างกัน

การทดสอบความคงสภาพของผลิตภัณฑ์ การเปลี่ยนสีของผลิตภัณฑ์เซรั่มที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C อาจเกิดจากความไม่คงสภาพของสาร anthocyanin จากความร้อน และมีการลดลงของฤทธิ์ antioxidant โดยจากการศึกษาพบว่า สารกลุ่ม anthocyanin ที่พบส่วนใหญ่ในพืชเป็นสาร cyanidin-3-glucoside เมื่อได้รับความร้อนอาจจะเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของสาร เป็น

สาร cyanidin และเปลี่ยนเป็นสาร 4-hydroxybenzoic acid หรือ phloroglucinaldehyde ดังแสดงในภาพประกอบ 6 (Patras, Brunton, O'Donnell, และ Tiwari, 2010) ทำให้มีผลต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ และประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ แต่ไม่ส่งผลต่อปริมาณและประสิทธิภาพของสารกันเสีย ดังนั้นไม่ควรเก็บผลิตภัณฑ์ในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูง หากมีการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการจัดจำหน่ายจริง ควรใช้บรรจุภัณฑ์ที่สามารถป้องกันแสงได้และมีการติดฉลาก ระบุว่า ควรเก็บผลิตภัณฑ์หลีกเลี่ยงแสงแดดและความร้อน (Loypimai, Moongngarm, และ Chottanom, 2015; Ursu และคณะ, 2020)



ภาพประกอบ 6 กลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสร้าง anthocyanin ที่อาจะเกิดขึ้นได้เมื่อได้รับความร้อน

ที่มา : Ankit Patras. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสียและการปนเปื้อนของเชื้อในผลิตภัณฑ์ ในการศึกษาพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จานเพาะเชื้อ จากการทำซ้ำ 2 จานเพาะเชื้อ ด้วยตัวอย่างเดียวกันและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน ซึ่งอาจเกิดจากการปนเปื้อนระหว่างการ plate ตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นการปนเปื้อนจาก สำลีพันก้าน ตัวจานเพาะเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ หรือ ระหว่างขั้นตอนการ plate ตัวอย่าง ทำให้ผลการทดสอบที่ได้ไม่

สามารถยืนยันได้ว่า ผลิตภัณฑ์มีการเจริญของเชื้อจริง และจำนวนของโคโลนีของเชื้อที่พบระหว่างการทดสอบมีจำนวนมาก ทำให้ไม่สามารถนำผลการศึกษาไปคำนวณทางสถิติได้ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารกันเสียที่การศึกษาต้องใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงในผลิตภัณฑ์ อาจมีสาเหตุจากปริมาณเชื้อที่ใส่ลงในผลิตภัณฑ์มีมากกว่าปริมาณที่ USP กำหนด ซึ่งโดยปกติแล้วสามารถวัดปริมาณของเชื้อได้โดยเปรียบเทียบความขุ่นของสารละลายเชื้อ ให้มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นของสารละลาย 1% $BaCl_2$: 1% H_2SO_4 ในอัตราส่วน 0.05 : 9.95 โดยการมองด้วยสายตาทำให้เกิดการคลาดเคลื่อนได้มาก สามารถวัดความขุ่นด้วยเครื่องมือ UV spectrophotometer โดยใช้ความยาวคลื่น 625 nm จะวัดค่า absorbance ได้ช่วง 0.08-0.1 (biologicals, 2014) สำหรับการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อนั้นเกิดจากที่ไม่สามารถควบคุมปริมาณของเชื้อได้ นอกจากนี้ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของสารกันเสีย พบการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ในผลิตภัณฑ์ทุกสูตรตำรับ เนื่องจาก เชื้อนี้สามารถต้านฤทธิ์ของสารกันเสียและยาฆ่าเชื้อ โดยเฉพาะ methylparaben และ propylparaben ได้มากกว่าเชื้อ *E.coli*, *S.aureus* (Shaqra, Al-Momani, และ Al-Groom, 2014) นอกจากนี้ สาร chlorphenesin และ phenoxyethanol มีประสิทธิภาพในการยับยังเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ต่ำกว่า methylparaben และ propylparaben เนื่องจาก มีค่า MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ของ *P. aeruginosa* สูงกว่า โดย อยู่ที่ 0.4% ส่วน methylparaben มีค่า MIC เท่ากับ 0.16% และ propylparaben มีค่า MIC เท่ากับ 0.04% (LEE, AN, CHOI, MOON, และ CHANG, 2007) นอกจากนี้ในตำรับผลิตภัณฑ์นั้น มีปริมาณของ chlorphenesin ประมาณ 0.2% ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ในส่วน phenoxyethanol ในตำรับมีปริมาณประมาณ 0.6% ซึ่งมากกว่าค่า MIC แต่การใส่เชื้อไปในผลิตภัณฑ์จำนวนมากอาจทำให้ปริมาณดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ และถ้าเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ใส่ลงในผลิตภัณฑ์สามารถต้านฤทธิ์ของสารกลุ่มพาราเบนได้ อาจทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อในตำรับที่ใส่สารกันเสียทั้งสองกลุ่ม สำหรับการทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ ในการศึกษาความคงสภาพของผลิตภัณฑ์สูตรตำรับที่ไม่ใส่สารกันเสีย พบว่า มีการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แต่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Cetrimide agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะเพื่อทดสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *P. aeruginosa* อาจเป็นเพราะว่า เชื้อที่ปนเปื้อนไม่ใช่เชื้อ *P. aeruginosa* อาจจะเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนชนิดอื่น

ข้อเสนอแนะ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียในตำรับ ควรปรับวิธีการสกัดสารกันเสียออกจากตำรับ โดยควบคุมอุณหภูมิในการ sonicate และควรมีการปรับปริมาตรสารสกัดในขั้นตอนสุดท้ายก่อนนำไปวิเคราะห์เพื่อลดความผิดพลาดที่อาจเกิดจากการระเหยของตัวทำละลายที่ใช้สกัด

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ในการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อจุลินทรีย์ ควรระมัดระวังการปนเปื้อนของเชื้อระหว่างการปฏิบัติการทดสอบ ควรเพิ่มตัวอย่างการทดสอบและการทำซ้ำของการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่แน่นอน นอกจากนี้ในการทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารกันเสีย ควรมีการวัดความเข้มข้นของเชื้อด้วยการวัดความขุ่นของสารแขวนตะกอนเชื้อเปรียบเทียบกับความขุ่นของ 0.5 McFarland standards ซึ่งเป็นความขุ่นมาตรฐานของเชื้อปริมาณ $1.5x10^8$ cfu/ml ด้วยเครื่องมือ spectrophotometer แล้วนำมาเจือจางให้ความเข้มข้นของเชื้ออยู่ประมาณ 10^5-10^6 cfu/ml

ควรมีการทำ Positive test บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบทุกชนิด เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีประสิทธิภาพให้เชื้อสามารถเจริญได้ และสามารถนำลักษณะของโคโลนีของเชื้อนั้นมาเปรียบเทียบกับโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้นในการทดสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่เฉพาะเจาะจง เช่น *P. aeruginosa* และ *S. aureus* เพื่อให้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบเชื้อเฉพาะนั้น เป็นเชื้อชนิดเดียวกับเชื้อที่ต้องการศึกษา

ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพของสารกันเสียชนิดอื่น ที่มีความปลอดภัย หรือเป็นสารกันเสียที่ได้จากธรรมชาติ เพื่อใช้ทดแทนสารกันเสียจากการสังเคราะห์ที่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกายได้ หากต้องการผลิตเพื่อจัดจำหน่ายควรมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ antioxidant ของผลิตภัณฑ์ ความปลอดภัย(toxicity) ของผลิตภัณฑ์เพิ่มเติม รวมทั้งความคงสภาพของสาร antioxidant และเพิ่มระยะเวลาในการศึกษาความคงสภาพผลิตภัณฑ์ หรือ ศึกษาความคงสภาพตามขอกำหนดขององค์การอาหารและยา เพื่อใช้ในการประเมินกำหนดวันหมดอายุของผลิตภัณฑ์

บรรณานุกรม

A.Shabir, G. (2005). Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. *Journal of validation technology, 10*, 314-325.

Alvarez-Rivera, G., Llompart, M., Lores, M., และ Garcia–Jares, C. (2018). Preservatives in Cosmetics: Regulatory Aspects and Analytical Methods *Analysis of Cosmetic Products* (2, 9, 175-224). Spain.

Amnuaikit, T., และ Boonme, P. (2013). Formulation and characterization of sunscreen creams with synergistic efficacy on SPF by combination of UV filters *Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3*(8), 1-5.

Analysis, A. O. M. o. (2016). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf

Aoyama, A., Doi, T., Tagami, T., และ Kajimura, K. (2014). Simultaneous determination of 11 preservatives in cosmetics by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci, 52*(9), 1010-1015.

Barr, L., Metaxas, G., Harbach, C. A. J., Savoy, L. A., และ Darbre, P. D. (2012). Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *Journal of Applied Toxicology, 32*(3), 219-232.

biologicals, D. (2014). McFarland standard for in vitro use only. http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf

Bunyavaree, M., Kasemsarn, P., และ Boonchai, W. (2016). Cosmetic preservative labelling on the Thai market. *Contact Dermatitis, 74*(4), 217-221.

Cashman, A. L., และ Warshaw, E. M. (2005). Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis, 16*(2), 57-66; quiz 55-56.

Chemists, I. F. o. S. o. C. (2018). *IFSCC monograph number 2 The Fundamentals of Stability Testing*. Cambridge: Black Bear Press.

Committee, A. M. T. C. o. t. C. M. C. C. (1994). *Reviewer Guidance : Validation of*

Chromatographic Methaods.

Convention, U. S. P. (2019). *The United States Pharmacopeia 42: The National Formulary 37* (42). United States: Pharmacopeial Convention, Inc.

Darbre, P. D., และ Harvey, P. W. (2008). Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J Appl Toxicol, 28*(5), 561-578.

Erickson, B. E. (2016). Preservative in leave-on cosmetics banned in the EU. https://cen.acs.org/articles/94/i16/Preservative-leavecosmetics-banned-EU.html

Glander, H. G., Rytter, M., และ Schönborn, C. (1984). Studies on the mycotic and bacterial risk of contamination and the use of nipagin in the artificial insemination of cryosperm. *Zentralbl Gynakol, 10*(6), 573-584.

Harmonization, A. (2005). Preservative efficacy test for cosmetic product. https://www.asean.org/storage/images/archive/MRA-Cosmetic/Doc-6.pdf

Information, N. C. f. B. (2020a). 2-Phenoxyethanol https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Phenoxyethanol

Information, N. C. f. B. (2020b). Chlorphenesin. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorphenesin

Information, N. C. f. B. (2020c). Methylparaben. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl_4-hydroxybenzoate#section=Top

Information, N. C. f. B. (2020d). Propylparaben. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propyl_4-hydroxybenzoate

Johnson, W. J., Bergfeld, W., Belsito, D., Hill, R., Klaassen, C., Liebler, D., . . . Andersen, A. (2014). Safety Assessment of Chlorphenesin as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol, 33*, 5S-15S.

Kazuma, K., Noda, N., และ Suzuki, M. (2003). Flavonoid composition related to petal color in different lines of Clitoria ternatea. *Phytochemistry, 64*(6), 1133-1139.

Khanna, S., Dash, P. R., และ Darbre, P. D. (2014). Exposure to parabens at the concentration of maximal proliferative response increases migratory and invasive activity of human breast cancer cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology, 34*(9),

1051-1059.

Kongmuang, S., Benjamala, D., Sangkarat, W., และ Buakwan, S. (2012). Cream Stick Containing Natural Oil for Cracked Heel. *Advanced Materials Research, 506*, 461-464.

Kosová, M., Hradkova, I., Brychova, V., Kadlec, D., Šmidrkal, J., และ Filip, V. (2015). Antimicrobial effect of 4-hydroxybenzoic acid ester with glycerol. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics 40*, 436-440.

Kumar, N., Rungseevijitprapa, W., Narkkhong, N.-A., Suttajit, M., และ Chaiyasut, C. (2012). 5α-reductase inhibition and hair growth promotion of some Thai plants traditionally used for hair treatment. *J Ethnopharmacol 139*(3), 765-771.

LEE, E., AN, S., CHOI, D., MOON, S., และ CHANG, I. (2007). Comparison of objective and sensory skin irritations of several cosmetic preservatives. *Contact Dermatitis, 56*, 131-136.

Lieber, M. A. (1990). 9 Final Report on the Safety Assessment of Phenoxyethanol. *Journal of the American College of Toxicology, 9*(2), 259-277.

Loypimai, P., Moongngarm, A., และ Chottanom, P. (2015). Thermal and pH degradation kinetics of anthocyanins in natural food colorant prepared from black rice bran. *Association of Food Scientists & Technologists, 53*, 461-470.

Manjula, P., Mohan, C., Sreekanth, D., Keerthi, B., และ Devi, B. P. (2013). Phytochemical analysis of Clitoria ternatea Linn., a valuable medicinal plant. *Journal of the Indian Botanical Society, 92*(3&4), 173-178.

Namngam, C., และ Pinsirodom, P. (2017). Antioxidant properties, selected enzyme inhibition capacities, and a cosmetic cream formulation of Thai mango seed kernel extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 16*(1), 9-16.

Oishi, S. (2002). Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food and Chemical Toxicology, 40*(12), 1807-1813.

Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., และ Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology, 21*, 3-11.

Rattanapiboon, N., และ Jinda, N. (2012). *Antioxidants in rice bran oil from Sangyod breeding rice and application in cream-gel*. Paper presented at the Antioxidants in rice bran oil from Sangyod breeding rice and application in cream-gel. https://www.researchgate.net/publication/234023930_Antioxidants_in_rice_bran_oil_from_Sangyod_breeding_rice_and_application_in_cream-gel

Salleh, R. M., และ Nabil, A. (2013). Total phenolic compounds and scavenging activity in Clitoria ternatea and Vitex negundo linn. *International Food Research Journal, 20*(1), 495-500.

Shaqra, Q. M. A., Al-Momani, W., และ Al-Groom, R. M. (2014). Susceptibility of Some Bacterial Contaminants Recovered from Commercial Cosmetics in Jordan to Preservatives and Antibiotics. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 13*, 255-259.

SHIMADZU. High Speed, High Resolution Analysis (Part 20) Analysis of Preservatives in Cosmetics. https://shimadzu.com.au/sites/default/files/Appl_HPLC_L375_Preservatives-cosmetics_en.pdf

Skinphilic. (2562, 27 กรกฎาคม 2562). เซรั่ม (Serum) คืออะไร? วิธีใช้? ต่างจากครีมอย่างไร? https://www.skinphilic.com/บทความ/เซรั่ม-serum-คืออะไร/

Techaoei, S. (2017). Bacterial and Fungal Contamination of Personal Care Product in Northern Thailand. *Research Journal Rajamangala University of Technology Thanyaburi, 16*(1-2), 32-38.

Tokunaga, H., Takeuchi, O., Ko, R., Uchino, T., และ Ando, M. (2003). Studies for analyzing phenoxyethanol and parabens in commercial lotions. *Bulletin of National Institute of Health Sciences*(121), 25-29.

Trüeb, R. M. (2009). Oxidative Stress in Ageing of Hair. *International Journal of Trichology, 1*(1), 6-14.

Ursu, M. S., Aprodu, I., Milea, S. A., Enachi, E., Râpeanu, G., and, G. E. B., และ Stănciuc, N. (2020). Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins Extracted from Purple Maize Flour Extract and the Effect of Heating on Selected Biological Functionality.

Foods, 9(1593).

Validation of analytical procedures: text and methodology, (2005).

Zhu, H., Zhang, W., Yang, Y., และ Zhu, Y. (2014). Analysis of the preservative chlorphenesin in cosmetics by high performance liquid chromatography. *Chinese journal of chromatography, 32*(1), 95-99.

จิรายุส เลาหลิดานนท์, และ ชฎาธาร ดิถีเพ็ง. (2562). การหาปริมาณและประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ เมทิลพาราเบนและโพรพิลพาราเบนในครีมทาผิวหลังการเปิดใช้ (โครงงานวิจัยปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต). มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, นครนายก.

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, ค. (2010). อัญชัน. http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=139

ราชกิจจานุเบกษา. (2559). ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง กำหนดลักษณะของเครื่องสำอางที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือขาย พ.ศ.*2559*.

สุภาณี ดวงธีรปรีชา. (2561, สิงหาคม). การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์. บทความวิชาการเพื่อการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์.

อิศเรศ ปัญญา. (2561). การพัฒนาเซรั่มจากสารสกัดบัวบก. (ปริญญานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

รายละเอียดผลการวิจัย

1. พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารกันเสียโดย HPLC และทดสอบความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์

1.1 การทดสอบความเหมาะสมของสภาวะการวิเคราะห์ โดยการทำ system suitability เป็นการวิเคราะห์ปริมาณของ phenoxyethanol, methylparaben, chlorphenesin และ proplyparaben ความเข้มข้น 600 µg/mL,180 µg/mL, 280 µg/mL และ 35 µg/mL ตามลำดับ ทั้งหมด 6 ครั้ง ได้ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 15

ตาราง 15 ผลการทดสอบ system suitability (n=6)

พารามิเตอร์	สาร	การวิเคราะห์ครั้งที่						ค่าเฉลี่ย	SD	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6			
Retention time (min)	PE	6.7	6.70	6.70	6.69	6.69	6.69	6.69	0.01	0.083
	MP	8.00	7.99	7.98	7.98	7.97	7.97	7.98	0.01	0.15
	CP	10.16	10.16	10.15	10.15	10.14	10.14	10.15	0.01	0.10
	PP	14.50	14.50	14.50	14.50	14.50	14.50	14.50	0.00	0.00
Peak area	PE	2216.20	2207.60	2207.85	2197.77	2199.16	2199.08	2204.61	7.22	0.33
	MP	4187.18	4173.53	4171.47	4156.38	4155.83	4158.41	4167.13	12.50	0.30
	CP	520.01	516.49	518.87	516.42	514.54	516.89	517.20	1.95	0.38
	PP	694.33	692.12	701.50	688.64	698.53	689.21	694.06	5.14	0.74
Theoretical plate number (N)	PE	13360.60	13258.13	13251.28	13145.13	13197.38	13196.26	13234.80	74.25	0.56
	MP	12525.16	12418.40	12427.70	12313.00	12346.17	12302.42	12388.81	84.86	0.68
	CP	13281.55	13259.71	13194.00	13094.51	13143.33	13105.68	13179.79	78.79	0.60
	PP	456984.75	454362.62	457050.64	454248.63	451663.51	455598.68	454984.80	2029.99	0.45

ตาราง 15 (ต่อ)

พารามิเตอร์	สาร	การวิเคราะห์ครั้งที่						ค่าเฉลี่ย	SD	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6			
Tailing factor	PE	0.85	0.84	0.84	0.85	0.84	0.83	0.84	0.01	0.84
	MP	0.82	0.81	0.82	0.81	0.81	0.82	0.82	0.01	0.87
	CP	0.88	0.87	0.86	0.87	0.86	0.87	0.87	0.01	0.79
	PP	1.12	1.03	1.07	1.03	1.04	1.03	1.05	0.04	3.43
Capacity factor ()	PE	10.17	10.16	10.16	10.15	10.15	10.15	10.15	0.01	0.08
	MP	12.32	12.32	12.30	12.29	12.28	12.27	12.30	0.02	0.16
	CP	15.93	15.93	15.92	15.90	15.90	15.89	15.91	0.02	0.10
	PP	23.17	23.17	23.17	23.17	23.17	23.17	23.17	0.00	0.01
Resolution (Rs)	PE	20.37	20.26	20.28	20.19	20.22	20.25	20.26	0.06	0.30
	MP	5.00	4.98	4.96	4.94	4.93	4.90	4.95	0.04	0.74
	CP	6.79	6.78	6.79	6.75	6.78	6.78	6.78	0.02	0.23
	PP	19.80	19.81	1.18	19.79	19.81	19.84	16.70	7.61	45.54

1.2 การหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างพื้นที่ใต้พีค และ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โดยทดสอบในช่วงความเข้มข้น ดังนี้ phenoxyethanol 200-1000 µg/mL, methylparaben 60-300 µg/mL, chlorphenesin 96-480 µg/mL, และ propylparaben 12-60 µg/mL ได้กราฟความสัมพันธ์ ดังในตาราง 16-19 และ ภาพประกอบ 7

ตาราง 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ phenoxyethanol กับค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค

ความเข้มข้น (µg/mL)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค
199.52	764.44
399.04	1459.53
598.56	2210.00
798.08	2927.21
997.60	3679.02

ตาราง 17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ methylparaben กับค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค

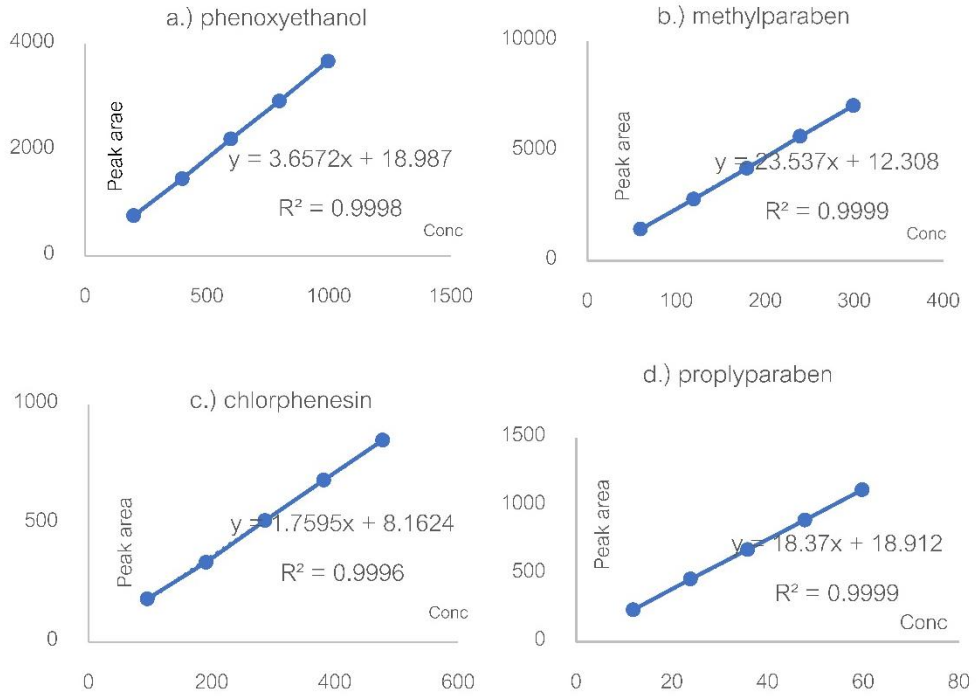
ความเข้มข้น (µg/mL)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค
59.84	1446.50
119.68	2805.31
179.52	4213.71
239.36	5663.02
299.20	7059.96

ตาราง 18 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ chlorphenesin กับค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค

ความเข้มข้น (µg/mL)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค
95.52	182.33
191.04	336.15
286.56	511.71
382.08	681.77
477.60	849.85

ตาราง 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ propylparaben กับค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค

ความเข้มข้น (µg/mL)	ค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค
11.96	236.28
23.92	461.95
35.88	678.36
47.84	895.47
59.8	1118.04



ภาพประกอบ 7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ a.) phenoxyethanol, b.) methylparaben, c.) chlorphenesin และ d.) propylparaben กับค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้พีค

1.3 การหาความแม่นของวิธีวิเคราะห์โดยผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการห้องเดิม มีสภาวะการวิเคราะห์และเครื่องมือวิเคราะห์เช่นเดียวกัน วิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (Intra-day precision) และ วิเคราะห์ในวันที่ต่างกัน (Inter- day precision) โดยรายงานผลเป็น %RSD ของ %recovery ดังที่แสดงในตาราง 20-21

ตาราง 20 ผลการทดสอบหาความแม่นของวิธีวิเคราะห์ intra-day (n=3)

Preservatives	ความเข้มข้นของสารละลาย(µg/mL)	ค่าเฉลี่ย %recovery			ค่าเฉลี่ย %recovery	SD	RSD (%)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
methylparaben	60	103.22	99.80	101.81	101.61	1.72	1.69
	180	101.06	101.04	98.92	100.34	1.23	1.23
	300	100.42	103.43	100.42	101.39	1.69	1.67
propylparaben	12	96.39	96.30	95.61	96.10	0.43	0.45
	35	98.98	99.36	100.05	99.46	0.55	0.55
	60	100.30	100.60	100.10	100.33	0.25	0.25
phenoxyethanol	200	103.22	102.09	101.74	102.35	0.77	0.76
	600	100.64	100.36	100.42	100.47	0.15	0.14
	1000	101.35	102.58	100.74	101.56	0.94	0.92
chlorphenesin	96	105.36	102.95	106.99	105.10	2.03	1.93
	280	101.55	102.75	104.70	103.00	1.59	1.54
	480	103.47	105.59	103.73	104.26	1.16	1.11

ตาราง 21 ผลการทดสอบหาความแม่นของวิธีวิเคราะห์ inter-day (n=3)

Preservatives	ความเข้มข้นของสารละลาย(µg/mL)	ค่าเฉลี่ย %recovery			ค่าเฉลี่ย %recovery	SD	RSD (%)
		Day 1	Day 2	Day 3			
methylparaben	60	104.01	101.61	105.31	103.64	1.88	1.81
	180	101.14	100.34	103.65	101.71	1.72	1.70
	300	100.24	101.39	102.93	101.52	1.35	1.33
propylparaben	12	99.13	96.10	99.46	98.23	1.85	1.88
	35	101.03	99.46	101.77	100.75	1.18	1.17
	60	99.41	100.33	99.78	99.84	0.47	0.47
phenoxyethanol	200	102.52	102.35	101.39	102.09	0.61	0.59
	600	100.32	100.47	101.48	100.76	0.63	0.63
	1000	100.42	101.56	101.38	101.12	0.61	0.60
chlorphenesin	96	103.90	105.10	101.64	103.55	1.76	1.70
	280	100.62	103.00	102.22	101.95	1.21	1.19
	480	100.80	104.26	102.17	102.41	1.75	1.70

2.ความคงสภาพของผลิตภัณฑ์

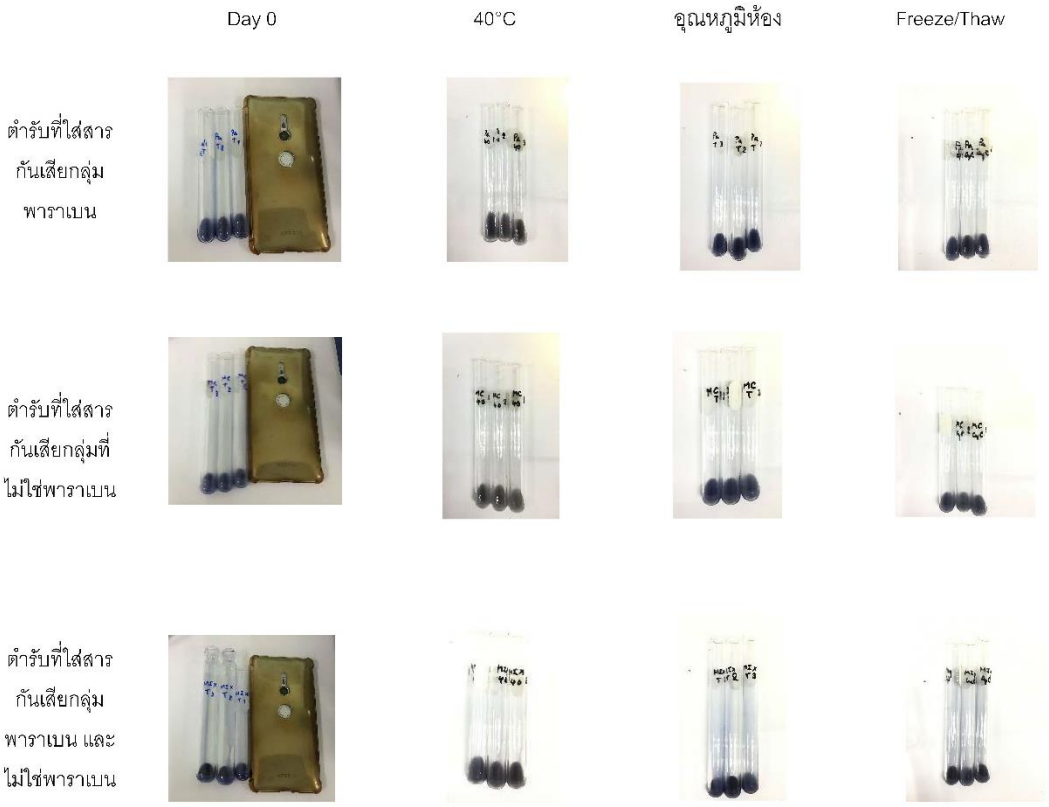
ค่าความเป็นกรดด่างของตำรับ (pH)

วัดความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ในสภาวะอุณหภูมิห้อง, 40°C และ Freeze/Thaw cycle ด้วย Universal pH paper ในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 ตัวอย่างผลการศึกษาแสดงในภาพประกอบ 8

ภาพประกอบ 8 ตัวอย่างการทดสอบความเป็นกรดด่างของตำรับด้วย Universal pH paper ในวันที่ 0 กับวันที่ 84

ลักษณะของผลิตภัณฑ์

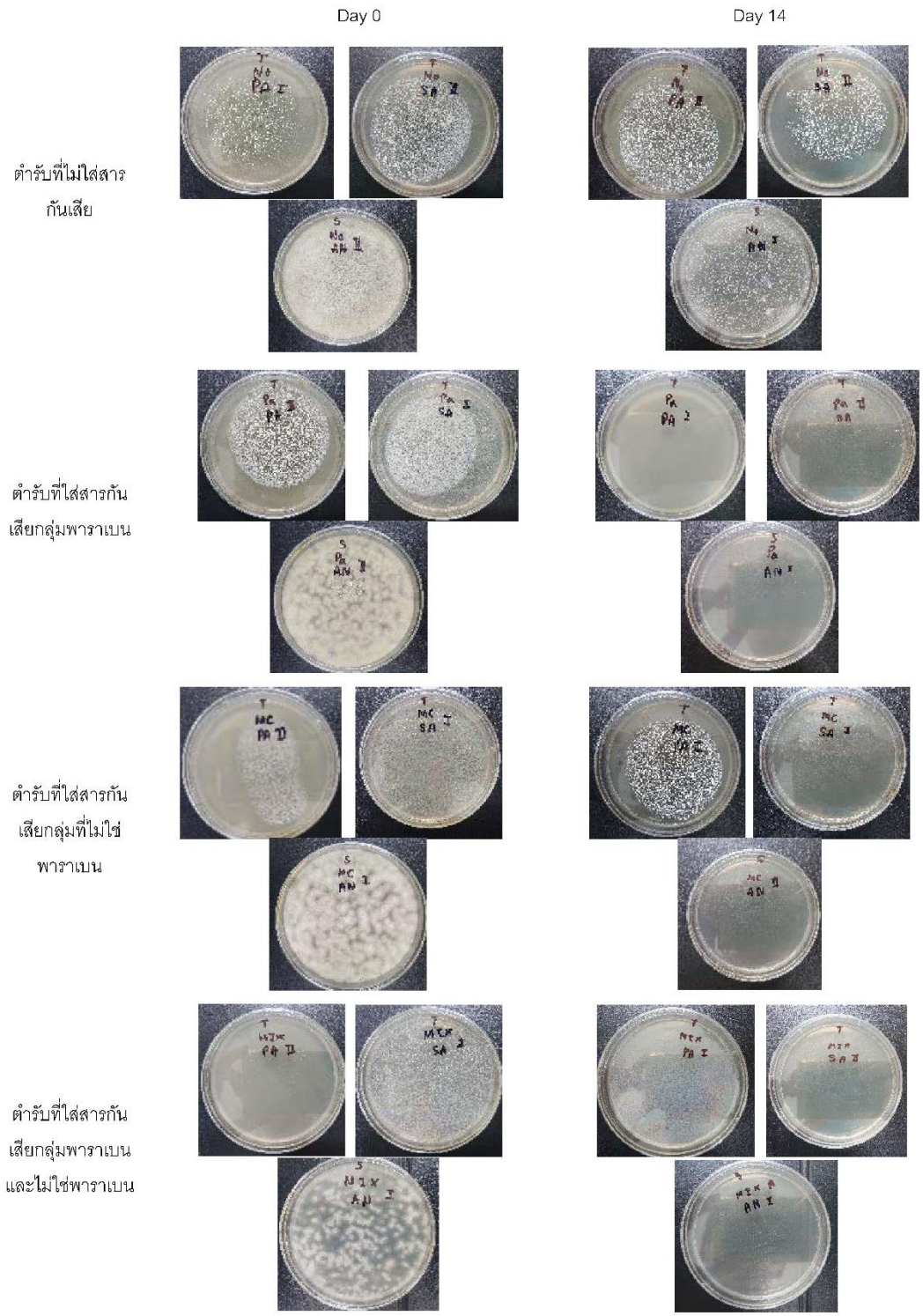
ศึกษาความเปลี่ยนแปลงของเนื้อเซรั่มโดยสังเกตการแยกชั้นของเนื้อเซรั่ม และการเปลี่ยนสีของเซรั่ม ในวันที่ 0, 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 ตัวอย่างผลการศึกษาแสดงในภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 ตัวอย่างลักษณะของผลิตภัณฑ์ในวันที่ 0 กับวันที่ 84

3.ทดสอบประสิทธิภาการยับยั้งเชื้อของสารกันเสีย

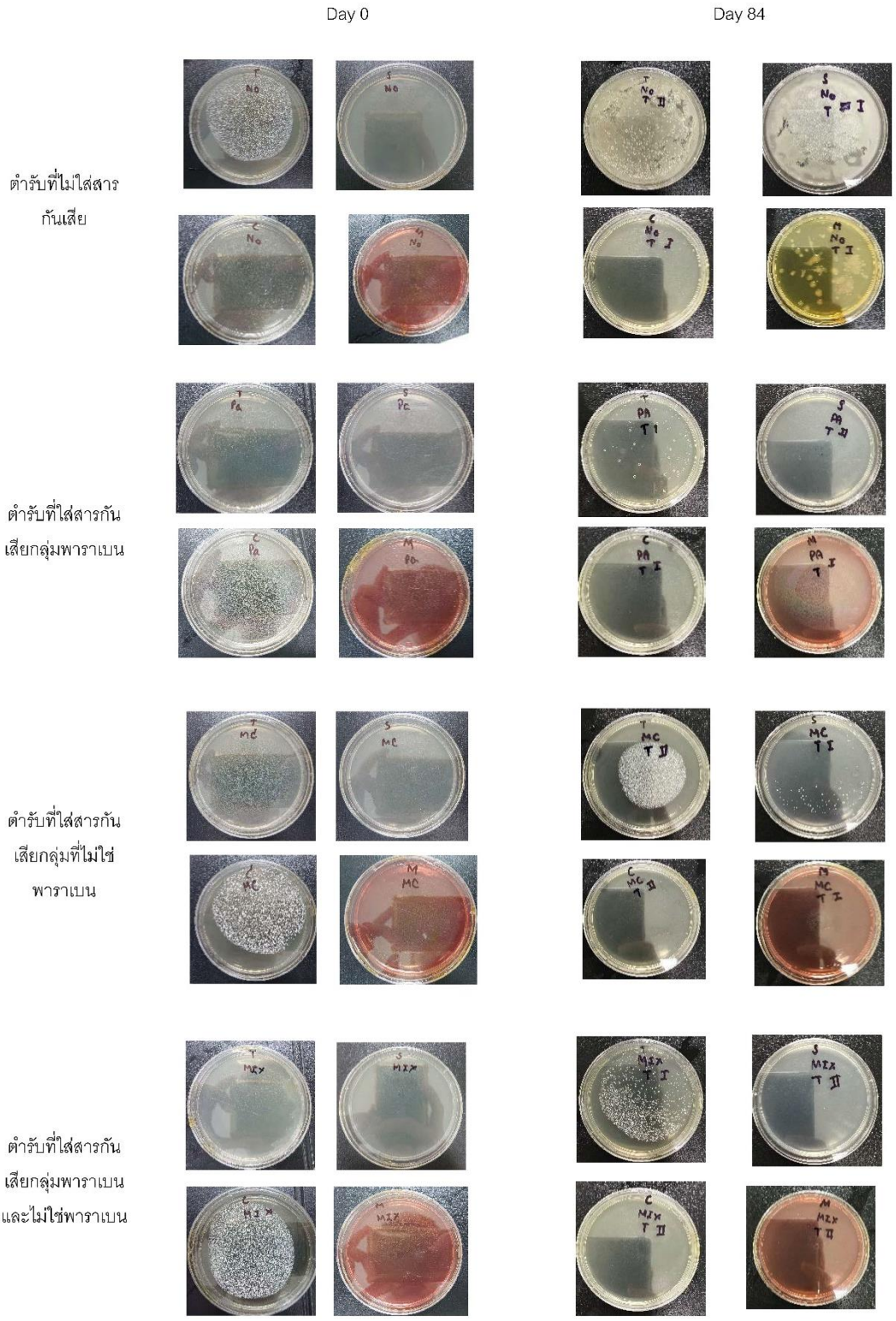
ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของสารกันเสียในตำรับเซรั่มต่าง ๆ โดยใส่เชื้อจุลินทรีย์ 6 ชนิด ในผลิตภัณฑ์ตัวอย่าง 4 สูตร ทดสอบด้วยวิธีการจาก USP หัวข้อ 51 Antimicrobial effectiveness test ในวันที่ 0, 7, 14, 28 และ 56 โดยแสดงตัวอย่างผลการทดสอบตามภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 ตัวอย่างการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของสารกันเสียในตำรับเซรั่มต่าง ๆ ในวันที่ 0 กับวันที่ 14

4.การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในตำรับเซรั่ม

ทดสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ด้วยการเก็บตำรับเซรั่มทั้ง 4 สูตร ในสภาวะที่แตกต่างกัน ดังนี้ เก็บในอุณหภูมิห้อง, อุณหภูมิ 40°C และสภาวะ Accelerated Stability โดยเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 6 รอบ แล้วนำตัวอย่างมาทดสอบเพาะเชื้อจุลินทรีย์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้ Trypticase soyagar (TSA), Sabouraud dextrose agar (SDA), Cetrimide agar และ Mannitol salt agar วันที่เริ่มการทดสอบ วันที่ 28, 56, 84, 112, 140 และ 168 โดยแสดงตัวอย่างผลการทดสอบตามภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 ตัวอย่างการทดสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ด้วยการเก็บตำรับเซรั่มทั้ง 4 สูตร ในวันที่ 0 กับวันที่ 84

5.การวิเคราะห์ผลการทดสอบทางสถิติ

เปรียบเทียบปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสารกันเสียในแต่ละสูตรตำรับ ระหว่างวันที่ 0 (%remaining = 100%) กับวันที่ 168 แต่ละสภาวะการเก็บผลิตภัณฑ์ ด้วยสถิติ one sample t-test ได้ตัวอย่างผลการวิเคราะห์จากโปรแกรม SPSS ดังที่แสดงในตาราง 22-27

ตาราง 22 ผลการวิเคราะห์ one sample t-test ของปริมาณ chlorphenesin ในตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

One-Sample Test						
	Test Value = 100					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Remaining	3.059	2	.092	6.09589	-2.4796	14.6714

ตาราง 24 ผลการวิเคราะห์ one sample t-test ของปริมาณ chlorphenesin ในตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและไม่ใช่พาราเบน ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

One-Sample Test						
	Test Value = 100					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Remaining	4.381	2	.048	8.81070	.1575	17.4639

ตาราง 23 ผลการวิเคราะห์ one sample t-test ของปริมาณ propylparaben ในตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C

One-Sample Test						
	Test Value = 100					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Remaining	-.295	2	.796	-.45633	-7.1020	6.1893

ตาราง 25 ผลการวิเคราะห์ one sample t-test ของปริมาณ propylparaben ในตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและไม่ใช่พาราเบน ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C

One-Sample Test						
	Test Value = 100					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Remaining	-.409	2	.722	-.37344	-4.3000	3.5532

ตาราง 26 ผลการวิเคราะห์ one sample t-test ของปริมาณ methylparaben ในตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบน ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40°C

One-Sample Test						
	Test Value = 100					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Remaining	-.590	2	.615	-1.07423	-8.9063	6.7578

ตาราง 27 ผลการวิเคราะห์ one sample t-test ของปริมาณ phenoxyethanol ในตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบน ที่เก็บไว้ในสภาวะ Accelerated Stability

One-Sample Test						
	Test Value = 100					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Remaining	2.021	2	.181	2.80709	-3.1683	8.7825

เปรียบเทียบปริมาณ %remaining เฉลี่ยของสารกันเสียชนิดเดียวกัน ในวันที่ 168 ระหว่างสูตรตำรับเซรั่มที่ใช้สารกันเสียกลุ่มพาราเบนกับสูตรตำรับที่ใช้สารกันเสียทั้ง 2 กลุ่ม และเปรียบเทียบระหว่างสูตรตำรับเซรั่มที่ใช้สารกันเสียกลุ่มไม่ใช่พาราเบนกับสูตรตำรับที่ใช้สารกันเสียทั้ง 2 กลุ่ม ในแต่ละสภาวะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ด้วยสถิติ independent t-test ได้ตัวอย่างผลการวิเคราะห์จากโปรแกรม SPSS ดังที่แสดงในตาราง 28-31

ตาราง 29 ผลการวิเคราะห์ independent t-test ของปริมาณ phenoxyethanol ในตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบนเปรียบเทียบกับ ตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและไม่ใช่พารา

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Remaining	Equal variances assumed	.221	.663	2.233	4	.089	1.90791	.85439	-.46426	4.28008
	Equal variances not assumed			2.233	3.817	.093	1.90791	.85439	-.50983	4.32565

ตาราง 28 ผลการวิเคราะห์ independent t-test ของปริมาณ chlorphenesin ในตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบนเปรียบเทียบกับ ตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและไม่ใช่พาราเบน ที่เก็บไว้ในสภาวะ Accelerated Stability

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Remaining	Equal variances assumed	6.751	.060	.533	4	.622	1.96688	3.69181	-8.28323	12.21698
	Equal variances not assumed			.533	2.399	.639	1.96688	3.69181	-11.63672	15.57048

ตาราง 30 ผลการวิเคราะห์ independent t-test ของปริมาณ methylparaben ในตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบนเปรียบเทียบกับ ตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและไม่ใช่พารา

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Remaining	Equal variances assumed	.205	.674	-.699	4	.523	-2.74665	3.92807	-13.65272	8.15942
	Equal variances not assumed			-.699	3.804	.525	-2.74665	3.92807	-13.87846	8.38516

ตาราง 31 ผลการวิเคราะห์ independent t-test ของปริมาณ propylparaben ในตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มที่ไม่ใช่พาราเบนเปรียบเทียบกับ ตำรับที่ใส่สารกันเสียกลุ่มพาราเบนและไม่ใช่พาราเบน ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Remaining	Equal variances assumed	6.966	.058	-.292	4	.785	-.54521	1.86986	-5.73679	4.64637
	Equal variances not assumed			-.292	2.220	.796	-.54521	1.86986	-7.87384	6.78342

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ชฎาธาร ดิถีเพ็ง
วัน เดือน ปี เกิด	15 ตุลาคม 2538
สถานที่เกิด	จังหวัดราชบุรี
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2563 เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรเภสัชกรรม จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	7 ถนน มิตรเสถียร ตำบล บ้านโป่ง อำเภอ บ้านโป่ง จังหวัด ราชบุรี 70110
ผลงานตีพิมพ์	Chadartharn D, Wattanaporn P and Sarin T. Simultaneous Determination of Methylparaben, Propylparaben, Phenoxyethanol, Chlorphenesin by High Performance Liquid Chromatography. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2021; 16(4).