



เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

การพัฒนาอนุภาคไขมันชนิดโครงสร้างนาโนที่บรรจุสารสกัดไวโอลาซีน
สำหรับผลิตภัณฑ์รักษาสิว

DEVELOPMENT OF VIOLACEIN EXTRACT LOADED
NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS FOR ANTI-ACNE PRODUCTS

พรพรรณ ลีลาอุดมลิปิ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
พ.ศ. 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

การพัฒนาอนุภาคไขมันชนิดโครงสร้างนาโนที่บรรจุสารสกัดไวโอลาซินสำหรับผลิตภัณฑ์รักษาสิว
DEVELOPMENT OF VIOLACEIN EXTRACT LOADED NANOSTRUCTURED
LIPID CARRIERS FOR ANTI-ACNE PRODUCTS

พรพรรณ ลีลาอุตมลิปิ

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
เมื่อวันที่ 30 มิถุนายน พ.ศ. 2564

รองศาสตราจารย์ ดร.กัมปนาท หวลบุตตา
ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

อาจารย์ ดร.ปารภัทร โสภารักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลินี อัสวเหม
กรรมการ

อาจารย์ ดร.ปิยาภรณ์ สุภักด์ำรงกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ ดร.ปารภัทร โสภารักษ์
กรรมการ

อาจารย์ ดร.สมกมล อินทวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ ดร.สมกมล อินทวงศ์
กรรมการ

อาจารย์ ดร.ปารภัทร โสภารักษ์
ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

อาจารย์ ดร.ปิยาภรณ์ สุภักด์ำรงกุล
กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทรวิธานุชิต
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

การพัฒนาอนุภาคไขมันชนิดโครงสร้างนาโนที่บรรจุสารสกัดไวโอลาซินสำหรับผลิตภัณฑ์รักษาสิว

พรพรรณ ลีลาอุตมลิป 606039

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ปารภัทร โศภารักษ์, Ph.D.,

ปิยาภรณ์ สุภักด์ดำรงกุล, Ph.D.,

สมกมล อินทวงศ์, Ph.D.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดไวโอลาซินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เรียกว่า สิว โดยศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าสารไวโอลาซินที่สกัดได้จาก *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) อยู่ระหว่าง 0.0146-0.4688 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่า *Cutibacterium acnes* มีค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการฆ่าแบคทีเรีย (MBC) ต่ำที่สุดเท่ากับ 0.0146 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารไวโอลาซินยังสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ โดยมีค่า IC_{50} จากวิธี 2,2 diphenhydramine-1 picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2 azino-bis (3 ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) (ABTS^{•+}) radical scavenging เท่ากับ 0.72 และ 0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์รักษาสิวในรูปแบบของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของ NLC-Base ได้จากการใช้ Oleic acid ต่อ Compritol[®] 888 ATO ในอัตราส่วน 3:1 ความเข้มข้น Tween[®] 20 เท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเวลาที่ใช้ลดขนาดอนุภาค ด้วยวิธี sonicate เท่ากับ 10 นาที ซึ่งมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 213.7 ± 2.42 นาโนเมตร ค่าดัชนีการกระจายตัว 0.239 ± 0.003 และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเท่ากับ -26.6 ± 0.45 มิลลิโวลต์ จากนั้นนำ NLC-Base ที่คัดเลือกได้มาบรรจุสารสกัดไวโอลาซิน (NLCs-Vio) ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาและโครงสร้างของหยดไขมันภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน พบว่ามีสารไวโอลาซินถูกกักเก็บอยู่ภายใน มีโครงสร้างเป็นทรงกลม ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของ NLCs-Vio โดยวิธี Agar dilution พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Cutibacterium acnes* ได้เป็นระยะเวลาการเก็บรักษา 60 วัน และสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ได้เป็นระยะเวลา 30 วันของการเก็บรักษา งานวิจัยนี้จึงบ่งชี้ได้ว่าการกักเก็บสารไวโอลาซินในอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs สามารถนำไปพัฒนาใช้ในผลิตภัณฑ์รักษาสิวได้

คำสำคัญ: สิว ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Chromobacterium violaceum* อนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs สารไวโอลาซิน

DEVELOPMENT OF NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS LOADING VIOLACEIN EXTRACT FOR ANTI-ACNE PRODUCTS.

PORNPHAN LEELAUDOMLIPI 606039

MASTER OF SCIENCE (COSMETIC SCIENCES)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PARAPAT SOBHARAKSHA, Ph.D.

PIYAPORN SUPAKDAMRONGKUL, Ph.D.

SOMKAMOL INTAWONG, Ph.D.

ABSTRACT

The objective of this research is to evaluate the antimicrobial activity of Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) loading with violacein extract. The extract was tested for the antimicrobial activities against 3 strains of pathogenic bacteria; namely *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 by agar well diffusion. The result indicated that the violacein extract from *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 has strongest antibacterial effect against *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* with MIC values in range of 0.0146-0.4688 mg/mL and with the lowest MBC value of 0.0146 mg/mL against *Cutibacterium acnes*. Additionally, violacein showed the antioxidant activities which its IC₅₀ values of DPPH[•] and ABTS^{•+} radical scavenging assays were 0.72 and 0.11 mg/mL, respectively. On the second experiment, the test was designed to study factors that affect the particle size NLCs for anti-acne products loaded with violacein extract. Dependent variables are the ratio of liquid lipid and solid lipid, surfactant concentration and sonication time. The ratio of Oleic acid and Compritol[®] 888 ATO (3:1) with Tween[®] 20 (1.5% w/w) and sonication time of 10 minute are an optimal condition for NLCs-Base. With this condition, NLC-Base had average particle size of 213.7±2.42 nm with a polydispersity index of 0.239±0.003 and Zeta potential of -26.6±0.45 mV. After that, violacein extract 1 and 2 (%w/w) was loaded into the NLCs (NLCs-Vio). Transmission electron microscope (TEM) was used to identify structural and morphological properties of the droplets. The result revealed the spherical nature of the violacein loaded vesicles. Antibacterial activity of NLCs-Vio 2 % was determined by using agar dilution. The result showed that NLCs-Vio 2 % can inhibit the growth of *Cutibacterium acnes* for 60 days during storage. Furthermore, NLCs-Vio 2 % can also act as *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* inhibitor within 30 days shelf life. The present study indicates the potential of violacein-loaded NLCs as a promising technology which could be further developed to a suitable anti-acne products.

Keywords: Acne, Antibacterial activity, *Chromobacterium violaceum*, Nanostructured Lipid Carrier, Violacein

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือเป็นอย่างยิ่งของอาจารย์ ดร.ปารภัทร โสภารักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ปิยาภรณ์ สุภักด์ดำรงกุล และดร.สมกมล อินทวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ท่านได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์และคอยให้กำลังใจตลอดการทำวิทยานิพนธ์นี้ ตลอดจนได้กรุณาตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กัมปนาท หวลบุตตา ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชวาลินี อัครเวม กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำ ให้นำแนวความคิดที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะเภสัชศาสตร์ และคณะวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเบิกเครื่องมืออุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นสถานที่ปฏิบัติงานวิจัย

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนการศึกษา ให้กำลังใจ จนสามารถทำวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พรพรรณ ลีลาอุตมลิปิ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญแผนภูมิ	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
1.5 คำย่อหรือสัญลักษณ์	5
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคผิวหนัง	7
2.2 สิว ลักษณะและชนิดของสิว	11
2.3 สาเหตุหลักของการเกิดสิว	12
2.4 ปัจจัยที่ทำให้เกิดสิว	13
2.5 การรักษาสิว	14
2.6 สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ	14
2.7 รงควัตถุ (pigment)	15
2.8 สารไวโอลาซีน (violacein)	16
2.9 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	20
2.10 อนุมูลอิสระ (free radicals) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	22
2.11 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)	24
2.12 อนุภาคนาโนไขมัน (lipid nanoparticles)	26
2.13 ส่วนประกอบสำคัญของอนุภาคนาโนไขมัน	28
2.14 การผลิตอนุภาคนาโนไขมัน (nanostructured lipid carriers: NLCs)	30

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.15 วิธีการเตรียมอนุภาคนาโนไขมัน	31
2.16 ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนไขมัน	35
2.17 การทดสอบความคงสภาพของตำรับ	35
2.18 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	37
บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย	
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย	42
3.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดไวโอลาซิน	45
3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไวโอลาซิน	50
3.4 การเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ด้วยวิธี melt-emulsification	52
3.5 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอนุภาคนาโนไขมันระดับนาโนชนิด NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน	55
3.6 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของอนุภาคนาโนไขมันระดับนาโนชนิด NLCs	55
3.7 การทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนไขมันที่บรรจุสารไวโอลาซินซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Agar dilution plate	56
บทที่ 4 ผลการวิจัย และอภิปรายผล	
4.1 การศึกษาผลของการเขย่าให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซินของเชื้อ <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472	57
4.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่สร้างสารไวโอลาซินจาก <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472	58
4.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซินของเชื้อ <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472	59
4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดไวโอลาซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง โดยวิธี Agar well diffusion	62
4.5 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดไวโอลาซิน จาก <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472	63

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.6 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถใช้ฆ่าเชื้อทดสอบ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัดไวโอลาซีน จาก <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472	66
4.7 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไวโอลาซีนจาก <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472 โดยวิธี DPPH*	67
4.8 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไวโอลาซีนจาก <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472 โดยวิธี ABTS ⁺	69
4.9 ผลการศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ด้วยวิธี Melt-emulsification	72
4.10 การพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs	75
4.10.1 ผลของอัตราส่วนของไขมันเหลวต่อไขมันแข็ง (LL:SL)	75
4.10.2 ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (%SC)	76
4.10.3 ผลของเวลาที่ใช้ในการลดขนาดอนุภาคด้วยวิธีการ sonicate	77
4.11 การพัฒนาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซีน	78
4.12 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs	79
4.12.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่ไม่บรรจุสารสำคัญ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน	79
4.12.2 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่ไม่บรรจุสารสำคัญ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน	79
4.12.3 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่ไม่บรรจุสารสำคัญ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน	80
4.12.4 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่ไม่บรรจุสารสำคัญ ที่สภาวะอุณหภูมิสูงสลับต่ำ (Heating cooling cycle: 4°C และ 45°C) จำนวน 6 รอบ	80
4.12.5 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซีนที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 90 วัน	83

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.13 การตรวจสอบโครงสร้างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM)	90
4.14 การทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนไขมันที่บรรจุสารไวโอลาซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนัง โดยวิธี Agar dilution	91
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	96
5.2 ข้อเสนอแนะ	98
บรรณานุกรม	99
ภาคผนวก	111
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมอาหารเพาะเชื้อ และสารเคมี	112
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงและการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง <i>Cutibacterium acnes</i> ATCC 6919	115
ภาคผนวก ค ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ค่าความเข้มข้นของสารไวโอลาซิน	117
ภาคผนวก ง วิธีการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum inhibitory concentration : MIC)	118
ประวัติผู้เขียน	120

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ชนิดของไขมันและสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เตรียมอนุภาคนาโนไขมัน	28
2 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อจำกัดต่าง ๆ ของวิธีการผลิตอนุภาคนาโนไขมัน	34
3 ส่วนประกอบของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs (สูตรตำรับที่ 1-12)	53
4 การพัฒนาส่วนประกอบของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs (สูตรตำรับที่ 13-20)	53
5 ส่วนประกอบในการพัฒนาอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน	54
6 การศึกษาผลของการเขย่าให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซินของ <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472	58
7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่สร้างสารไวโอลาซินจาก <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472	59
8 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและการผลิตสารไวโอลาซินของเชื้อ <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472	60
9 ผลการศึกษาระยะเวลาต่อการเจริญของเชื้อ <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472 ที่มีผลต่อการผลิตสารสีไวโอลาซิน	60
10 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดไวโอลาซินในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง 3 สายพันธุ์ โดยวิธี Agar well diffusion	63
11 ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง Minimum Inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดไวโอลาซินจาก <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472 ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.0073 - 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	64
12 ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง Minimum Bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดไวโอลาซินจาก <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472	67
13 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลายมาตรฐาน vitamin C ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี DPPH*	67
14 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดไวโอลาซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี DPPH*	69
15 ค่า IC ₅₀ ของสารสกัดไวโอลาซินเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยวิธี DPPH*	69
16 เพอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลายมาตรฐาน vitamin C ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี ABTS**	70

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดไวโอลาซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี ABTS ⁺	71
18	ค่า IC ₅₀ ของสารสกัดไวโอลาซินเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยวิธี ABTS ⁺	71
19	ขนาดของอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายตัว และผลการประเมินลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 1-12	73
20	ลักษณะของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่เตรียมโดยการแปรผันอัตราส่วนของไขมันเหลวต่อไขมันแข็ง (LL:SL)	75
21	ลักษณะของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่เตรียมโดยการแปรผันอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิว	76
22	ลักษณะของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่เตรียมโดยการแปรผันเวลาในการ sonicate (ST)	77
23	ส่วนประกอบในการพัฒนาอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน	78
24	ขนาดของอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายตัว ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า และลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน	78
25	ขนาดของอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายตัว ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า และลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLCs-Base โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน	81
26	ขนาดของอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายตัว ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า และลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLCs-Vio1% โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน	85
27	ขนาดของอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายตัว ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า และลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLCs-Vio2% โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน	87
28	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ NLCs ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคผิวหนัง 3 สายพันธุ์ โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	94
29	ผลการทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ NLCs ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคผิวหนัง 3 สายพันธุ์ โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	95

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่	หน้า
1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไวโอลาซินต่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง <i>Chromobacterium violaceum</i> สายพันธุ์ ATCC 12472 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ	61
2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลาย vitamin C ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี DPPH• (การทดลองครั้งที่ 1)	68
3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลาย vitamin C ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี ABTS ^{•+} (การทดลองครั้งที่ 1)	70
4 ขนาดอนุภาคของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน	84
5 ขนาดอนุภาคของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซินความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน	84

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> บนอาหาร Tryptic Soy Agar	8
2	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Staphylococcus epidermidis</i> บนอาหาร Tryptic Soy Agar	9
3	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Cutibacterium acnes</i> บนอาหาร Sheep Blood Agar	10
4	กลไกการเกิดสิวในรูปแบบต่าง ๆ	12
5	โครงสร้างของสารไวโอลาซิน	16
6	โครงสร้างของวิตามินซี	23
7	ลักษณะของอนุภาคนาโนไขมันชนิด SLNs (ซ้าย) และ NLCs (ขวา)	26
8	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกของอนุภาคนาโนไขมัน	27
9	การเตรียมผลิตภัณฑ์อนุภาคนาโนไขมันชนิด nanostructured lipid carriers	30
10	กระบวนการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันแบบอุณหภูมิต่ำและสูง	32
11	การเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ด้วยวิธี melt-emulsification	52
12	ฤทธิ์ของสารสกัดไวโอลาซินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังด้วยวิธี Agar well diffusion	62
13	โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวก	64
14	ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุด Minimum inhibitory concentration (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ <i>Cutibacterium acnes</i> โดยสารสกัดไวโอลาซิน ด้วยวิธี Modified broth microdilution ตาม CLSI	65
15	ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดไวโอลาซินที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง (MBC) ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์	66
16	อนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่เตรียมได้จากไขมันเหลว ไขมันแข็ง และ สารลดแรงตึงผิวชนิดต่าง ๆ	74
17	ลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์	89
18	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่เตรียมจาก Tween 20 ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และ 3 เปอร์เซ็นต์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	90

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซีน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	91
20	ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>Cutibacterium acnes</i> ของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซีนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Agar dilution	92
21	ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>Staphylococcus epidermidi</i> และ <i>Staphylococcus aureus</i> ของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซีนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Agar dilution	93

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคผิวหนังติดเชื้อเป็นภาวะที่พบได้ในคนทุกเพศทุกวัย ส่วนใหญ่เกิดจากการอักเสบของผิวหนัง โดยสาเหตุของการอักเสบนั้นเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ หรือรา เป็นต้น เชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ที่อาศัยอยู่บริเวณผิวหนังของมนุษย์นั้นมีอยู่หลายชนิด โดยปกติแล้วจะไม่ก่อให้เกิดโรค แต่ถ้าสภาพผิวหนังมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น เกิดบาดแผล มีสุขอนามัยที่ไม่ดี หรือมีภูมิคุ้มกันต่ำ เชื้อเหล่านี้ อาจก่อให้เกิดโรคได้ โดยเชื้อประจำถิ่นบริเวณผิวหนังที่พบบ่อยได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งสามารถพบ *Staphylococcus epidermidis* ได้ถึง 10-24 สายพันธุ์ที่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณผิวหนัง (1) อาการทั่วไปของโรคผิวหนังติดเชื้อ พบว่ามีผื่นแดง คัน เกิดตุ่มน้ำใส หรือมีหนองเกิดขึ้น บริเวณผิวหนัง จากสถิติของสถาบันโรคผิวหนังพบว่าโรคผิวหนังที่พบบ่อยที่สุด 3 อันดับแรกคือ สิว (acne) ผิวหนังอักเสบ (eczema) และสะเก็ดเงิน (psoriasis) ตามลำดับ (2)

สิว (acne vulgaris) เป็นความผิดปกติของผิวหนังที่พบได้บ่อย มีทั้งแบบที่แสดงอาการอักเสบ และไม่แสดงการอักเสบ สามารถพบได้ในคนทุกวัยโดยเฉพาะวัยรุ่น และจะลดลงตามอายุที่เพิ่มมากขึ้น ส่วนมากมักพบบริเวณใบหน้า ลำคอ และลำตัวส่วนบน ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีต่อมไขมันขนาดใหญ่อยู่หนาแน่น (3) สาเหตุของการเกิดสิวนั้นเกิดจากการอักเสบของต่อมรูขุมขนและต่อมไขมัน (pilosebaceous unit) โดยต่อมไขมันสร้างไขมันกึ่งเหลว (sebum) ประกอบด้วยไขมันร้อยละ 60 เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ และเกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อประจำถิ่นบนผิวหนัง จึงส่งผลให้เกิดการอักเสบและเป็นสิว (4-7) เมื่อต่อมไขมันสร้างไขมันมากขึ้นทำให้เกิดการสะสมของไขมัน ส่งผลทำให้เกิดเป็นสิวลุดตัน (comedone) แบคทีเรียสำคัญที่ทำให้เกิดสิวคือ *Cutibacterium acnes* (ชื่อเดิมคือ *P. acnes*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ ดังนั้นจึงอาศัยอยู่ในส่วนลึกของต่อมไขมันเนื่องจากมีความต้านออกซิเจนต่ำ เชื้อจะสร้างเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ไฮโดรเลส (hydrolases) และไลเปส (lipase) ย่อยสลายไขมันให้เกิดเป็นกรดไขมัน (fatty acid) ทำให้เนื้อเยื่อรอบข้างถูกทำลายและเกิดการอักเสบ นอกจากนี้บริเวณใบหน้าหรือผิวหนังยังเป็นที่อยู่อาศัยของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* หากสิวเกิดการติดเชื้อจะส่งผลให้เกิดสิวลอักเสบมีหนองที่รุนแรงมากขึ้น (8,9) จากการศึกษาเมื่อนำตัวอย่างสิวลของผู้ป่วยมาเพาะเชื้อ พบว่าสาเหตุของการเกิดสิวนั้นส่วนใหญ่จะพบ *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* (10)

การสะสมของแบคทีเรียเป็นอีกสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการอักเสบบริเวณผิวหนัง ซึ่งจะปล่อยสารเคมีที่กระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลมาสะสม ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species (ROS) โดยสารอนุมูลอิสระจะไปทำลายชั้นผนังไขมันของเซลล์ และเกิดการทำลายเนื้อเยื่อ มีการศึกษาภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ในผู้ที่เป็ยสิ่ว พบว่าผู้ป่วยจะมีระดับภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล ซึ่งเป็นภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากเกินไปและมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอ นอกจากนี้พบว่า oxidative stress และการอักเสบมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดสิ่ว โดยเฉพาะการอักเสบของต่อมรูขุมขนและต่อมไขมัน (11) โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิด ได้แก่ วิตามินเอ ซี และ อี แครโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะพบในพืชสมุนไพรไทยหลายชนิด (12)

การรักษาสิ่วในปัจจุบันนั้นมีหลายรูปแบบ เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะในรูปแบบรับประทานหรือรูปแบบยาใช้ภายนอกเพื่อยับยั้งแบคทีเรียเป็นสาเหตุของการเกิดสิ่ว ซึ่งสามารถเกิดผลข้างเคียงขึ้นได้ เช่น เกิดการแพ้ยา ผิวระคายเคือง เกิดผื่นคัน ผิวไวต่อแสง และที่สำคัญการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อฆ่าเชื้อ *Cutibacterium acnes* จะทำให้เชื้อเกิดการดื้อยามากขึ้น (13,14) โดยมีการศึกษาการป่วยเชื้อจากผู้ป่วยสิ่ว จำนวน 622 คน พบว่าผู้ป่วย 82.8 เปอร์เซ็นต์มีปัญหาเชื้อดื้อยา ซึ่งตัวยาคลินดามัยซิน (clindamycin) และอิริโทรมัยซิน (erythromycin) พบปัญหามากที่สุด (15)

การนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) เช่น การนำส่วนต่าง ๆ ของสมุนไพรมาใช้ในการรักษาสิ่วเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะ เช่น กระเทียม หัวหอมแดง ขมิ้นชัน ใบกะเพรา สารสกัดจากเปลือกมังคุด เป็นต้น (16) นอกจากนี้สมุนไพรแล้วยังพบว่ารังควัตถุที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพเช่นกัน จากการศึกษาการสร้างรงควัตถุจากจุลินทรีย์ส่วนมากจะพบสารสีเหลือง สีส้ม และสีแดง ซึ่งเป็นรงควัตถุที่อยู่ในกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) (17) ส่วนรงควัตถุอีกชนิดหนึ่งที่ยังไม่ค่อยรู้จักกันแพร่หลาย คือ สารไวโอลาซีน (violacein) โดยเป็นสารประกอบที่มีสีม่วงเข้ม ผลิตได้จาก *Chromobacterium violaceum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (18) ทั้งนี้ไวโอลาซีนเป็นสารที่น่าสนใจในทางเภสัชศาสตร์เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ สารยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เนื้องอก และมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (19) จึงมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการแพทย์ การวิเคราะห์ อุตสาหกรรมอาหาร และการผลิตเครื่องสำอาง

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อนำส่งยาไปยังบริเวณที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ลิโปโซม (liposomes) ซึ่งเป็นระบบนำส่งที่สามารถใช้เป็นตัวพาสารเข้าสู่ผิวหนังได้ดี แต่มีข้อเสียในเรื่องของความคงตัว เนื่องจากลิโปโซมมีส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิด จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและไฮโดรไลซิส จากข้อจำกัดของลิโปโซมนี้จึงมีการพัฒนาอนุภาคนาโนไขมัน ได้แก่ อนุภาคนาโนไขมันประกอบด้วยไขมันแข็ง (Solid Lipid Nanoparticles: SLNs)

และอนุภาคนาโนไขมันที่ผสมระหว่างไขมันแข็งและไขมันเหลว (Nanostructured Lipid Carriers: NLCs) อนุภาคนาโนไขมันทั้งสองชนิดเตรียมจากไขมันที่มีความปลอดภัยต่อร่างกายโดยไม่หลอมละลายที่อุณหภูมิห้องหรือร่างกาย อนุภาคนาโนไขมันมีข้อดีในการนำส่งสารสำคัญที่ดีกว่าระบบอื่น ๆ เนื่องจากมีไขมันเป็นส่วนประกอบในตำรับ ทำให้การยึดเกาะกับผิวหนังสูงขึ้น และยังมีคุณสมบัติในการเพิ่มการแทรกผ่านผิวหนัง ทำให้การซึมผ่านของสารสำคัญที่ปล่อยออกจากอนุภาคเพิ่มสูงขึ้น (20) ซึ่งข้อได้เปรียบของ NLCs คือเตรียมได้จากไขมันแข็งและไขมันเหลว ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญและมีการควบคุมการปลดปล่อยสารสำคัญออกมาจากตำรับได้ดีกว่า SLNs ที่เตรียมจากไขมันแข็งเพียงอย่างเดียว (21)

สารไวโอลาซินที่สกัดได้จาก *Chromobacterium violaceum* มีคุณสมบัติในหลายด้าน เช่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (22) และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยพบว่าสารไวโอลาซินสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (23) *Staphylococcus* Sp., *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., และ *Mycobacterium* sp. (24) อย่างไรก็ตามการนำสารไวโอลาซินมาใช้ในวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้ง *Cutibacterium acnes* และการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไวโอลาซินยังไม่เป็นที่เป็นที่แพร่หลายมากนัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจการนำสารไวโอลาซินมายับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว และศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารไวโอลาซิน จากนั้นนำไปพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs เพื่อเพิ่มความคงตัวของสารสกัดและความคงตัวในประสิทธิภาพด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารไวโอลาซินต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว และศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ
2. เพื่อศึกษาสภาวะและอัตราส่วนที่เหมาะสมในการตั้งตำรับอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs
3. เพื่อพัฒนาตำรับอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่กักเก็บสารไวโอลาซินซึ่งเป็นสารสำคัญของตำรับ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาการผลิตสารไวโอลาซินจาก *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารไวโอลาซินจากแบคทีเรีย ได้แก่ ความเร็วรอบในการให้อากาศ อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซิน โดยแต่ละปัจจัยจะทำการวัดค่าความเข้มข้นของสารไวโอลาซิน และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

2. สกัดสารไวโอลาซินจาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 ด้วย Ethyl acetate และศึกษาการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งของสารไวโอลาซิน

3. ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารไวโอลาซิน โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cutibacterium acnes* สายพันธุ์ ATCC 6919, *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ 6538 และ *Staphylococcus epidermidis* สายพันธุ์ ATCC 12228 โดยวิธี Agar well diffusion

4. ทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (Minimal inhibitory concentration, MIC) โดยวิธี Modified broth microdilution และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดไวโอลาซิน

5. ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH[•] และ ABTS^{•+} radical scavenging ของสารสกัดไวโอลาซิน

6. เตรียมตำรับอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ด้วยวิธี melt-emulsification โดยทำการแปรผันปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ อัตราส่วนของไขมันเหลวต่อไขมันแข็ง ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว และเวลาที่ใช้ในการลดขนาดอนุภาคด้วยวิธีการ sonicate ทำการเลือกสูตรตำรับที่เหมาะสมไปพัฒนาตำรับ NLCs เพื่อใช้ในการกักเก็บสารไวโอลาซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว

7. ทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอนุภาค NLCs โดยวัดขนาดอนุภาค (Particle size) ค่าดัชนีการกระจายตัว (Polydispersity index) ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (Zeta potential) และศึกษาโครงสร้างของอนุภาคด้วยเทคนิค Transmission electron microscope (TEM)

8. ศึกษาความคงตัว และศึกษาประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนไขมันที่บรรจุสารไวโอลาซิน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Agar dilution plate

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารไวโอลาซินในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคสิว ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Cutibacterium acnes* รวมไปถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารไวโอลาซิน

2. สามารถนำสารไวโอลาซินไปพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ได้

3. สามารถพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคนาโนไขมัน NLCs ที่กักเก็บสารไวโอลาซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.5 คำย่อหรือสัญลักษณ์

°C	องศาเซลเซียส
%	เปอร์เซ็นต์
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>C. acnes</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>
	ชื่อเดิมคือ <i>Propionibacterium acnes</i> (<i>P. acnes</i>)
<i>C. violaceum</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
BHI broth	Brain heart infusion broth
BHI agar	Brain heart infusion agar
DMSO	Dimethyl sulfoxide
MIC	ความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ
MBC	ความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ
nm	นาโนเมตร
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
OD	การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density)
g	กรัม
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
μg	ไมโครกรัม
μl	ไมโครลิตร
mg/ml	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
μg/ml	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
% w/w	ร้อยละน้ำหนักโดยน้ำหนัก
mM	มิลลิโมลาร์
mV	มิลลิโวลต์

1.5 คำย่อหรือสัญลักษณ์ (ต่อ)

ABTS ^{•+}	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline6-sulfonic acid)
DPPH [•]	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
IC ₅₀	ความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระลดลงครึ่งหนึ่งของปริมาณอนุมูลอิสระทั้งหมด
% inhibition	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
SLNs	Solid lipid nanoparticles
NLCs	Nanostructured lipid carriers
Miglyol [®] 812	Caprylic/capric triglycerids
Compritol [®] 888 ATO	Glyceryl behenate
TEM	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope)
r ²	สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient)
SD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation)
rpm	อัตราเร็วรอบต่อนาที

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคผิวหนัง

โรคผิวหนังเกิดจากความผิดปกติบริเวณผิวหนังสามารถเกิดได้ในทุกส่วนของร่างกาย โดยลักษณะอาการที่แสดงออกมาส่วนมากจะพบ ผื่น ตุ่ม ที่สามารถมองเห็นได้ชัดเจน และอาจเกิดอาการคันหรือแสบบริเวณที่เป็นรอยโรค ซึ่งโรคผิวหนังนั้นมีหลายชนิด เช่น โรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โรคผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อรา โรคผิวหนังที่ติดเชื้อจากไวรัส เป็นต้น

เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อบนผิวหนัง เช่น การติดเชื้อในกลุ่ม *Staphylococci* จะทำให้เกิดโรคผิวหนังอักเสบ รูขุมขนอักเสบ โรคไฟลามทุ่ง เชื้อในกลุ่ม *Staphylococci* ที่พบในมนุษย์มีหลายสายพันธุ์ ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนังมากที่สุด คือ *Staphylococcus aureus* โดยมีความสามารถก่อให้เกิดหนองบริเวณผิวหนังได้ (25) นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีเชื้ออีกหลายสายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคผิวหนัง เช่น *Staphylococcus epidermidis* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) ซึ่งพบบริเวณผิวหนัง หนึ่งศรีษะ (26) *Candida albicans* เป็นยีสต์ชนิดหนึ่งซึ่งก่อโรคในคนและสามารถฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (27) และ *Cutibacterium acnes* เป็นอีกเชื้อแบคทีเรียสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคสิวอักเสบ มีรายงานที่ศึกษาเพาะเชื้อจากผู้ป่วยสิว พบว่าเชื้อที่พบมากที่สุดคือ *Staphylococcus aureus* จึงเป็นไปได้ว่าสิวมักมีสาเหตุจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* มากกว่า *Cutibacterium acnes* ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยบางฉบับที่พบว่าเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*, *Malassezia furfur* และ *Cutibacterium acnes* เป็นสาเหตุของสิว ซึ่งในการศึกษาดังกล่าวพบว่าภูมิประเทศ อาจจะสัมพันธ์กับเชื้อที่ก่อให้เกิดสิว (10)

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการก่อให้เกิดสิวในที่นี้จะขอกกล่าวถึงเชื้อแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาวิจัยเท่านั้น ได้แก่

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Cutibacterium acnes* (ชื่อเดิมคือ *Propionibacterium acnes*)

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* บนอาหาร Tryptic Soy Agar



ที่มา: www.bacteriainphotos.com. 2013 : ออนไลน์ (28)

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญได้ง่ายบนอาหารเพาะเชื้อชนิดธรรมดา สามารถสลายน้ำตาลแมนนิทอลได้ ลักษณะโคโลนี กลม สีครีมหรือเหลืองทอง ขอบเรียบ นูน ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่ไม่มีแคปซูล (ภาพที่ 1) มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (29) สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 7- 46 องศาเซลเซียส พบว่าเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบได้บริเวณผิวหนังและโพรงจมูกส่วนหน้าของระบบทางเดินหายใจ (30) และอาจพบได้ที่ ใบหน้า ฝ่ามือ รักแร้ ขาหนีบ เป็นต้น

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียก่อโรคในคนได้บ่อยที่สุด มีความสามารถในการสร้างสารพิษ ได้หลายชนิด เช่น enterotoxin exfoliative toxin เป็นต้น สามารถก่อโรคติดเชื้อผิวหนังที่รุนแรง เป็นแผลพุพอง อาจนำไปสู่ผิวหนังหลุดลอก (staphylococcal scalded skin syndrome) ซึ่งมักพบได้ในเด็กทารกแรกเกิด การติดเชื้อ *S. aureus* นำไปสู่การเป็นรูขุมขนอักเสบ สิว ผิรวมไปถึงการทำให้แผลหลังการผ่าตัดเกิดการอักเสบได้ (31)

จากรายงานในประเทศอิตาลี พบว่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* ตื้อต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม penicillin เช่น ampicillin, amoxicillin, carbenicillin และ methicillin เนื่องจากใช้ปริมาณยาไม่ถูกวิธีทำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นเชื้อ MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) (32) ส่วนมากมักพบในผู้ป่วยที่รักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาล มาจากการติดเชื้อที่ผิวหนัง และเนื้อเยื่ออ่อน บริเวณที่ติดเชื้อจะมีสีแดง มีหนอง และอาจเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด (33)

2.1.2 *Staphylococcus epidermidis*

ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* บนอาหาร Tryptic Soy Agar



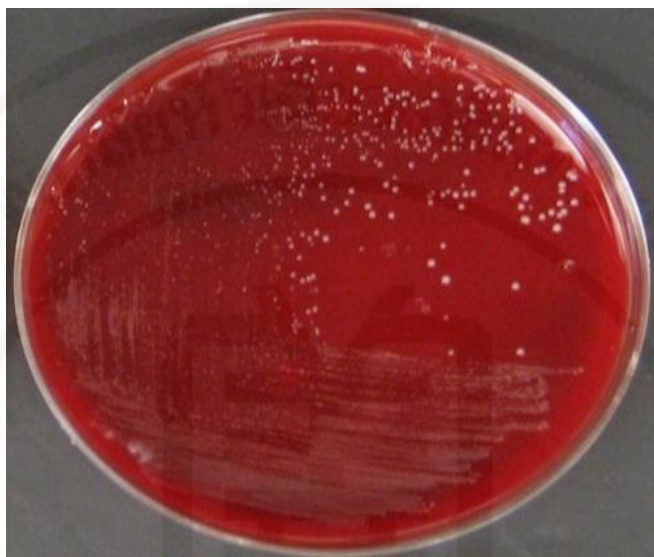
ที่มา: www.bacterialphotos.com. 2013 : ออนไลน์ (34)

เชื้อ *Staphylococcus epidermidis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงต่อกันคล้ายพวกองุ่น ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาว (ภาพที่ 2) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ไม่พบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (35) ไม่ก่อให้เกิดโรคในคนทั่วไป เป็นเชื้อประจำถิ่นพบได้บริเวณผิวหนัง โพร่งจมูก และทางเดินปัสสาวะส่วนปลาย

Staphylococcus epidermidis มีความสำคัญในการก่อการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากขึ้น เป็นเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง (26) นอกจากนี้เชื้อสามารถทนต่อยาปฏิชีวนะบางชนิดได้ เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มจึงยากต่อการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ มีรายงานพบการติดเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด 39.8 เปอร์เซ็นต์ การติดเชื้อที่ผิวหนัง 29.8 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ 58.3 เปอร์เซ็นต์ (36)

2.1.3 *Cutibacterium acnes*

ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Cutibacterium acnes* บนอาหาร Sheep Blood Agar



ที่มา: Science Learning Hub. 2012 : ออนไลน์ (37)

Cutibacterium acnes (ชื่อเดิมคือ *Propionibacterium acnes*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไร้อากาศ หรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย จึงเติบโตได้ช้า ใช้เวลาในการเพาะเชื้ออย่างน้อย 72 ชั่วโมงขึ้นไป ลักษณะโคโลนีเป็นโดม สีขาว ไม่สร้างสปอร์และไม่มีแคปซูล (ภาพที่ 3) ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และสามารถสร้างผลผลิตจากการหมักได้หลายอย่าง เช่น propionic acid แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่บริเวณช่องปาก ลำไส้ใหญ่ เยื่อぶลูกตา ช่องหูชั้นนอก และผิวหนัง ในขณะเดียวกัน *Cutibacterium acnes* ยังถูกจัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคแบบฉวยโอกาสอีกด้วย ซึ่งสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้หลายช่องทางและนำไปสู่การอักเสบได้ โดยเฉพาะเป็นสาเหตุของการเกิดสิว การตรวจสอบเพื่อยืนยันเชื้อ *Cutibacterium acnes* สามารถทำได้โดยทดสอบคุณสมบัติทางเคมีต่าง ๆ ได้แก่ ทดสอบ DNAase ให้ผลลบ และให้ผลบวกกับการทดสอบ indole, casein hydrolase และ gelatinase (38-40)

2.2 สิว ลักษณะและชนิดของสิว

สิว (acne vulgaris) เป็นโรคผิวหนังชนิดหนึ่งที่เกิดจากความผิดปกติของหน่วยของต่อมรูขุมขน และ ไขมัน (pilosebaceous unit) ซึ่งประกอบด้วย ต่อมไขมัน (sebaceous gland) เส้นขน (hair) และเซลล์บุล้อมรอบเส้นขน บริเวณที่มักเกิดสิว ได้แก่ ใบหน้า โดยเฉพาะบริเวณหนังศีรษะหน้าผาก แก้ม และคาง ซึ่งมีจำนวนต่อมไขมันประมาณ 400-900 ต่อมต่อตารางเซนติเมตร และสามารถพบได้บริเวณคอ หน้าอกส่วนบน ไหล่ และ หลัง แม้ว่าสิวจะเป็นโรคผิวหนังที่มีความรุนแรงไม่มากนักแต่มีผลต่อความสวยงาม จึงทำให้เกิดความกังวลและหงุดหงิด เมื่อรักษาหายแล้วมักจะทิ้งรอยแดง รอยดำ หลุมสิว หรือ แผลนูน (3,41,42) กลไกของการเกิดสิวแสดงดังภาพที่ 4 สามารถแบ่งลักษณะทางคลินิกได้เป็น 2 ลักษณะ ได้แก่

2.2.1 สิวชนิดไม่อักเสบ (non-inflammatory acne หรือ comedone)

สิวที่เกิดจากการอุดตันของรูขุมขน เรียกว่า คอมมีโด (comedone) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ (3)

1) สิวหัวเปิด หรือสิวหัวดำ (black head) มีลักษณะเป็นตุ่มนูนเล็ก หัวดำ มีจุดสีดำอยู่ตรงกลาง เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1-3 มิลลิเมตร เกิดจากกลุ่มเซลล์ผิวหนังที่ตายแล้ว ไขมัน และเชื้อ *Cutibacterium acnes* ไปอุดตันในท่อเปิดของต่อมไขมัน

2) สิวหัวปิด หรือสิวหัวขาว (white head) มีลักษณะเป็นตุ่มนูนเล็ก แฉ่ง หัวขาว มีสีเดียวกับผิวหนังปกติ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1-3 มิลลิเมตร สิวประเภทนี้เกิดจากการอุดตันสะสมอยู่ในท่อเปิดของต่อมไขมันและรูขุมขน pilosebaceous unit ซึ่งไปอุดตันเมื่อคลำแล้วจะพบว่าเป็นตุ่มแข็ง

2.2.2 สิวชนิดอักเสบ (inflammatory acne)

มีลักษณะเป็นเม็ดสิวบวมแดง เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* สร้างเอนไซม์ไลเปสไปทำลายไตรกลีเซอไรด์ในไขมันทำให้เกิดเป็นกรดไขมัน นอกจากนี้เชื้อมีการหลั่งเอนไซม์โปรตีเอสทำให้ต่อมไขมันเกิดการระคายเคืองและเกิดการอักเสบ ส่งผลทำให้เกิดเป็นสิิวอักเสบและเกิดหนองโดยสิิวอักเสบแบ่งออกได้หลายชนิด ได้แก่ (42)

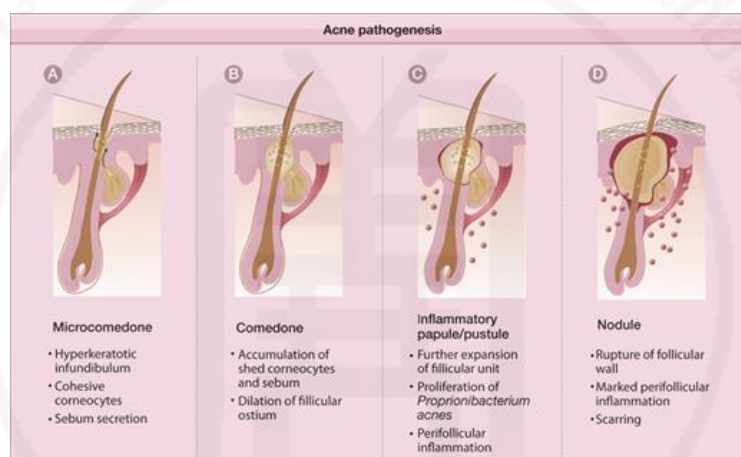
1) สิวตุ่มนูนแดง (papule) มีลักษณะเป็นตุ่มสีแดงขนาดเล็ก พัฒนามาจากสิวหัวปิดหรือสิวหัวเปิดที่มีการอุดตันมากขึ้น ถ้าอักเสบมากจะมีสีแดง

2) สิวหัวหนอง (pustule) หัวสิิวที่เป็นหนองนูนออกมา มีทั้งชนิดลึกและชนิดตื้น เมื่อหนองแตกจะหายค่อนข้างเร็ว ถ้าเป็นสิิวชนิดลึกบริเวณรอบ ๆ จะมีอาการบวม แดง และเจ็บเวลาสัมผัส ถ้าหัวหนองเกิดการแตกจะมีน้ำหนองสีเหลืองไหลออกมาพร้อมเลือด

3) สิวหัวช้าง (nodules) สิวอักเสบแดงเป็นก้อนลึก มีขนาดใหญ่ 8 มิลลิเมตรขึ้นไป ภายในมีหนองปนเลือด บางครั้งอาจเกิดเป็นสิวลายหัวติดกัน ใช้เวลาในการรักษาช้า และมักเกิดรอยแผลเป็นตามมา

4) สิวซีสต์ (cyst) สิวที่เกิดการอักเสบอย่างรุนแรงอยู่ที่ใต้ผิวหนัง สาเหตุเกิดจากไขมันอุดตันอยู่ภายใต้ผิวหนังและเกิดการอักเสบติดเชื้อ มีลักษณะเป็นถุงขนาดใหญ่ที่มีหนองอยู่ข้างใน บางครั้งสิวนิดนี้จะเกิดพร้อมกับสิิวหัวช้าง ทำให้การอักเสบทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น

ภาพที่ 4 กลไกการเกิดสิิวในรูปแบบต่าง ๆ



ที่มา: Zaenglein AL, Thiboutot DM. 2012 (43)

2.3 สาเหตุหลักของการเกิดสิิว

สาเหตุใหญ่ ๆ ของการเกิดสิิว คือ เกิดการอุดตันของท่อต่อมไขมัน โดยสิิวเกิดจากสาเหตุสำคัญร่วมกัน 4 ประการ คือ (42)

2.3.1 ต่อมไขมันสร้างซีบัม (sebum) เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ

ซีบัม (sebum) นั้นเป็นไขมันกึ่งเหลวประกอบด้วยไขมันร้อยละ 60 ได้แก่ squalene, wax esters, sterol esters, cholesterol, polar lipids และ triglycerides พบว่าผู้ที่เป็นสิิวจะมีปริมาณของ squalene และ wax esters สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการอุดตันของท่อไขมันและต่อมไขมัน การที่ต่อมไขมันสร้าง sebum เพิ่มขึ้นมากกว่าปกตินั้นเนื่องจาก

1) มีการสร้างฮอร์โมน androgen เพิ่มขึ้น

2) androgen อิสระเพิ่มขึ้นเพราะขาด Sex-Hormone-Binding Globulin (SHBG)

ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณของ testosterone ที่จะถูกนำไปยังต่อมไขมันเพิ่มมากขึ้นและกระตุ้นให้ต่อมไขมันผลิตไขมันเพิ่มขึ้น

3) การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนซึ่งส่งผลให้เกิดความไวต่อการกระตุ้นของต่อมไขมัน จากระดับปกติของฮอร์โมนในเลือด โดยฤทธิ์ของเอนไซม์ 5-alpha-reductase ซึ่งจะเปลี่ยน testosterone ไปเป็นสารที่มีฤทธิ์มากกว่าคือ 5-alpha-dihydrotestosterone ภายในเซลล์ของต่อมไขมัน ซึ่งระดับเอนไซม์ดังกล่าวในคนที่เป็นสิวจะสูงกว่าคนปกติ

2.3.2 เกิดความผิดปกติในการสร้างเคราติน (keratin) ภายในต่อมไขมัน

ภายในต่อมไขมันมีการสร้างเคราตินเพิ่มขึ้น (hyperkeratosis) ทำให้เกิดการขยายตัวของต่อมไขมัน ส่งผลให้เกิดการอุดตันเกิดเป็นสิิวหัวขาว (closed comedone) และสิิวหัวดำ (open comedone)

2.3.3 จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณผิวหนังและภายในต่อมไขมัน

สาเหตุของการเกิดสิิวอักเสบนั้นเกิดจากการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *P. acnes* และเชื้อประจำถิ่นบริเวณผิวหนัง โดยมีการรายงานที่ศึกษาการเพาะเชื้อจากผู้ป่วยสิิวนั้น พบเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดสิิวคือ *S. aureus* มากกว่า *P. acne* ซึ่งขัดแย้งกับรายงานบางฉบับที่พบว่าเชื้อ *S. epidermidis*, *Malassezia furfur* และ *P. acne* เป็นสาเหตุของการเกิดสิิว ซึ่งในการศึกษาดังกล่าวพบว่าภูมิภาคจะสัมพันธ์กับเชื้อที่ก่อให้เกิดสิิว (10)

2.3.4 ปฏิกริยาการอักเสบ

การอักเสบที่เกิดจากการอุดตันบริเวณต่อของต่อมไขมัน ทำให้เกิดการฟองโตขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อรูขุมขนแตกออก สารที่อยู่ภายในจะกระจายออกสู่ผิวหนังข้างเคียง เกิดเป็นสิิวอักเสบหรืออาจเป็นผลมาจากเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ในต่อมไขมันใช้เอนไซม์ไลเปส ย่อยไขมันจนเกิดเป็น free fatty acid ซึีมออกมาภายนอกจนก่อให้เกิดการอักเสบได้ ถ้าการอักเสบอยู่บริเวณส่วนบนของผิวหนังสิิวจะเกิดเป็นลักษณะตุ่มนูนแดง (papule) หรือ ตุ่มหนอง (pustule) แต่ถ้าการอักเสบนั้นอยู่บริเวณส่วนล่างของผิวหนัง สิิวจะมีลักษณะเป็นก้อนบวม (nodule) หรือถุงสิิว (cyst) นอกจากนี้การอักเสบของผิวหนังมีผลร่วมมาจาก pH ที่เปลี่ยนแปลงและการส่งผ่านออกซิเจนภายใต้ผิวหนัง (44)

2.4 ปัจจัยที่ทำให้เกิดสิิว

นอกจากสาเหตุหลักของการเกิดสิิวแล้วยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดสิิวได้ เช่น การเกิดสิิวจากการกระตุ้นของสารเคมีภายนอกซึ่งเป็นสารเคมีที่อยู่ในยา เครื่องสำอาง น้ำมัน โดยสารเหล่านี้สามารถรบกวนการทำงานของต่อมไขมัน ส่งผลให้เกิดการอุดตันเป็นสิิวขึ้นมาได้ นอกจากนี้การเกิดสิิวขึ้นอยู่กัปัจจัยร่วมต่าง ๆ เช่น กรรมพันธุ์หรือยีนส์ ความเครียดทางอารมณ์ การพักผ่อนไม่เพียงพอ รับประทานอาหารที่เป็นผลิตภัณฑ์นม อาหารที่มีปริมาณไขมันมาก และสารก่อภูมิแพ้ในเครื่องสำอาง เป็นต้น (45,46)

2.5 การรักษาสิว

การรักษาสิวนั้นสามารถรักษาได้หลายวิธี โดยแบ่งออกตามวิธีการใช้ (41,47)

2.5.1 การให้ยาเข้าสู่ร่างกาย (Systemic therapy)

การให้ยาเข้าสู่ร่างกายนั้นจะใช้รักษาสิวอักเสบที่มีความรุนแรงค่อนข้างมาก เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะออกฤทธิ์ขัดขวางเชื้อแบคทีเรียในการสร้างกรดไขมันอิสระจากไตรกลีเซอไรด์ จึงลดการอักเสบลงได้ ตัวอย่างที่ใช้ได้แก่ tetracycline และ erythromycin และการใช้วิตามินเอ ซึ่งต้องใช้เฉพาะกับผู้ป่วยที่เกิดสิวอักเสบรุนแรง เป็นต้น

2.5.2 การใช้ยาภายนอก (Topical therapy)

ยาภายนอกจะใช้รักษาสิวที่ไม่อักเสบและสิวที่มีการอักเสบปานกลาง แบ่งออกได้ดังนี้

1) สารยับยั้งไขมันหนัง (sebostatics) เป็นสารต้านแอนโดรเจนซึ่งสามารถลดการสร้างไขมันหนังได้ ได้แก่ สารยับยั้งการเปลี่ยน testosterone ให้เป็น 5-alpha-dihydro-testosterone, retinoic acid และ zinc sulphate

2) สารขจัดcomedo (comedolytics) ทำให้เคราตินที่อัดแน่นอยู่ภายในหลอดออก และป้องกันการเกิดcomedoขึ้นอีก ซึ่งสารขจัดcomedoทุกตัวมีผลให้ผิวหนังระคายเคืองอย่างมาก สารกลุ่มนี้ได้แก่ retinoic acid และ benzoyl peroxide

3) สารยับยั้งแบคทีเรีย (antimicrobials) จะช่วยลดการเปลี่ยนไตรกลีเซอไรด์เป็นกรดไขมันอิสระจากเอนไซม์ไลเปสของ *P. acnes* ยาปฏิชีวนะที่ให้ผลในการรักษาสิวอักเสบชนิดรุนแรง ได้แก่ clindamycin phosphate, erythromycin และ tetracycline hydrochloride

2.5.3 การบำบัดทางกายภาพ (Physical/Surgical treatment)

วิธีนี้มักใช้กับสิวที่มีการอักเสบรุนแรง เช่น สิวหัวช้างหรือฝี โดยการฉีดสารจำพวกสเตียรอยด์เข้าไปบริเวณแผลเพื่อลดขนาด และลดการอักเสบลงในเวลาอันรวดเร็ว

2.6 สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ เมแทบอลิต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) (48)

2.6.1 เมแทบอลิต์ปฐมภูมิ (primary metabolites)

สารที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ตัวอย่างของสารเหล่านี้ประกอบด้วยกลุ่มของกรดอะมิโน (amino acids) กลุ่มของกรดไขมัน (fatty acids) นิวคลีโอไทด์ (nucleotides) น้ำตาล (sugar) สารเหล่านี้จะเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเมแทบอลิต์ทุติยภูมิหรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

2.6.2 เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites)

พบในสิ่งมีชีวิตบางจำพวกเท่านั้น และไม่จำเป็นต่อการดำรงชีพ แต่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตที่ผลิตสารนั้น ๆ เช่น อาจจะเป็นสารที่ใช้ในขบวนการป้องกันตัวเอง (self-defense) หรือจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ยกตัวอย่างเช่น สารปฏิชีวนะ สารสี สารหอมระเหย หรือสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติส่วนใหญ่มีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อนและมีความหลากหลาย ทำให้ขั้นตอนของการแยกสารประกอบนั้น ๆ ออกจากกันเป็นสิ่งที่สำคัญ ซึ่งต้องอาศัยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การสกัด (extraction) การตกตะกอน (precipitation) การแยกด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี (chromatography) และการตกผลึก (crystallization) เป็นต้น เพื่อให้ได้สารที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งรงควัตถุหรือสารสีจัดเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ โดยสารสีส่วนใหญ่แล้วได้มาจากการใช้สีสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งมักมีสารก่อมะเร็งเป็นองค์ประกอบและเป็นอันตรายต่อร่างกายมนุษย์ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว การเลือกใช้สารสีที่ได้จากธรรมชาติจึงน่าจะเป็นหนทางที่ปลอดภัยที่สุด สีที่ได้จากธรรมชาตินั้นมักได้มาจากการสกัดจากพืชและสัตว์ รวมทั้งสารสีที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์

2.7 รงควัตถุ (pigment)

รงควัตถุ หมายถึง สารสีที่ผลิตมาจากสิ่งมีชีวิตหรือเกิดจากการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งสารสีนี้มีหลักฐานในการใช้ตั้งแต่สมัยโบราณ โดยพบว่าสีมีบทบาทสำคัญในการดำรงชีวิตของมนุษย์ สารสีที่ได้จากธรรมชาติโดยส่วนใหญ่มักจะได้มาจากพืช สัตว์ และแร่ธาตุต่าง ๆ

การจำแนกสารสีโดยส่วนมากจะจำแนกตามแหล่งหรือคุณสมบัติของสารสี แต่ละกลุ่มจะมีคุณลักษณะและตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ สารสีที่ได้จากธรรมชาติ (natural pigment) คือสารสีที่ได้จากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ส่วนสารสีที่ได้จากการสังเคราะห์แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารสีที่ได้จากสารอินทรีย์ และสารสีที่ได้จากสารอนินทรีย์ (49)

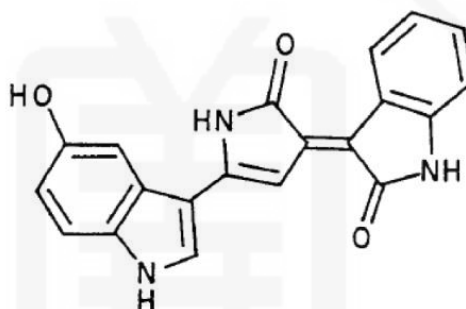
สารสีจากจุลินทรีย์สามารถแบ่งออกได้หลายกลุ่ม เช่น แคโรทีนอยด์ (carotenoids), ไพโอไซยานิน (pyocyanin) และไพโอเวอร์ดีน (pyoverdins) ซึ่งจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า มีทั้งพวกที่เป็นเซลล์เดี่ยวและหลายเซลล์ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมทั้งในดิน น้ำ อากาศ ทะเลลึก ปล่องภูเขาไฟ และทั้งในและนอกร่างกายมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์มีอยู่มากมายหลายชนิดสามารถแบ่งเป็นกลุ่ม ๆ ได้คือ แบคทีเรีย รา สาหร่าย โปรโตซัว และไวรัส

ในงานวิจัยนี้ขอกว่าถึงเฉพาะสารสีที่นำมาศึกษา คือสารไวโอลาซินซึ่งเป็นสารสีที่ผลิตโดยจุลินทรีย์

2.8 สารไวโอลาซีน (violacein)

ไวโอลาซีนเป็นสารรงควัตถุสีม่วงที่ได้จากการสังเคราะห์โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เป็นสารที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ มีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ กล่าวคือสารดังกล่าวนี้ป้องกันแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา และป้องกันการเกิดเนื้องอกได้ สารไวโอลาซีนเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งสำหรับอุตสาหกรรม ยา เครื่องสำอาง และการย้อมผ้า ซึ่งมีรายงานการยืนยันการศึกษาในแบคทีเรียในกลุ่ม *Chromobacterium violaceum* (26) และ *Janthinobacterium lividum* (50)

ภาพที่ 5 โครงสร้างของสารไวโอลาซีน



ที่มา: Rettori และ Durán. 1998 (51)

ไวโอลาซีนจัดเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากแบคทีเรีย มีสูตรทางเคมี คือ $C_{20}H_{13}N_3O_3$ แสดงดังภาพที่ 5 เป็นอนุพันธ์ของสารประกอบอินโดล เกิดจากการรวมตัวกันของ ทริปโตเฟน (tryptophan) 2 โมเลกุล (52) น้ำหนักโมเลกุล 343.33 ไม่ละลายในน้ำหรือตัวทำละลาย อินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว แต่ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล เอทานอล และยังสามารถละลายได้ในอะซิโตน โดยดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร (53) มีความคงตัวในสภาวะช่วง pH 5-9 อุณหภูมิ 25-100 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีแสง หรือโลหะหนักและสารอนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) แต่อย่างไรก็ตามสารไวโอลาซีนจะถูกย่อยและสลายไปอย่างช้า ๆ เมื่อถูกแสง

โครงสร้างทางเคมีของไวโอลาซีนประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย ได้แก่ 5-hydroxyindol, 2-oxindol และ 2-pyrrolidone ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวมาจากกระบวนการสังเคราะห์ โดยมี แอลทริปโตเฟนเป็นสารตั้งต้น (54) อย่างไรก็ตามหน้าที่ของไวโอลาซีนในเชิงสรีรวิทยาของแบคทีเรีย นั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่มีหลักฐานจากพฤติกรรมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้เกิดข้อสมมติฐานว่า แบคทีเรียน่าจะสร้างสารดังกล่าวมาเพื่อป้องกันการรบกวน หรือการถูกล่าโดย โปรโตซัว หรือเชื้อรา (55,56)

2.8.1 จุลินทรีย์ที่ผลิตสารไวโอลาซิน

1) *Chromobacterium violaceum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งสั้น (rod) หรือ coccobacilli เป็น facultative anaerobe ไม่สร้าง endospore เคลื่อนที่ด้วย single polar flagellum เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในน้ำ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 30-35 องศาเซลเซียส จะผลิตสารสีม่วงเข้มบนอาหารเพาะเชื้อ nutrient agar ลักษณะโคโลนี กลม นูนเล็กน้อยมีสีม่วง ผิวโคโลนีเรียบ นอกจากนี้ *C. violaceum* จะผลิตกรดจากน้ำตาล กลูโคส N-acetylglucosamine, gluconate แต่จะไม่หมัก L-arabinose, D-galactose และ D-maltose สามารถเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ ให้ผลบวกในการทดสอบออกซิเดสและคะตะเลส (24)

2) *Janthinobacterium lividum* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง ขนาดเล็ก บางครั้งมีรูปร่างเป็นแท่งโค้งหรืออยู่เป็นคู่ ๆ แม้บางครั้งจะเกิดการสร้างเมือก แต่การสร้างแคปซูลยังไม่ชัดเจน การเคลื่อนที่ที่ใช้ flagella ที่ด้านข้างของตัวเชื้อ ต้องการอากาศในการเจริญบนอาหารเพาะเชื้อแข็ง มีการผลิตโคโลนีสีม่วง นูน กลม ส่วนในอาหารเพาะเชื้อเหลวจะมีการสร้างวงแหวนสีม่วงบนผิวหน้าของอาหาร และบริเวณรอบ ๆ ของภาชนะบรรจุ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ คือ 2 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 32 องศาเซลเซียส ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 7-8 และไม่สามารถเจริญได้ที่อาหารที่มีค่า pH ต่ำกว่า 5 หรือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 6 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป สามารถพบได้ในน้ำและดิน บางครั้งก็เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสีย เชื้อ *Janthinobacterium lividum* สามารถผลิตได้เป็นจำนวนมาก แยกได้จากเส้นใยของไหมที่มีสีฟ้าม่วง ซึ่งเจริญในอาหารบางชนิดที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบเช่น ในอาหาร wakimoto เม็ดสีถูกสกัดด้วยเมทานอล พบว่าเป็นส่วนผสมของดีออกซีไวโอลาซินและไวโอลาซิน ซึ่งเม็ดสีนี้ไม่เพียงแต่นำไปใช้ย้อมเส้นใยธรรมชาติ เช่น ผ้าไหม ผ้าฝ้าย และผ้าขนสัตว์เท่านั้น แต่สามารถใช้ย้อมเส้นใยสังเคราะห์ เช่น ไนลอนได้อีกด้วย (57)

นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติในการผลิตสารไวโอลาซิน ได้แก่ *Alteromonas luteoviolacea*, *Duganella violaceinigua* (58)

2.8.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารสีไวโอลาซิน

การผลิตสารสีโดยแบคทีเรียขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น แหล่งของสารอาหาร สิ่งแวดล้อม อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง และการให้อากาศ

1) แหล่งคาร์บอน

เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันออกไปและสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในรูปที่แตกต่างกัน โดยสารประกอบที่มีคาร์บอนอยู่ ได้แก่ น้ำตาลต่าง ๆ เช่น กลูโคส ฟรุคโตส เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์ โดย Mendes et al. (59) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารสีไวโอลาซินโดยใช้เชื้อ *C. violaceum* พบว่า

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ คือ กลูโคสซึ่งจะทำให้เชื้อเจริญอย่างรวดเร็วแต่มีผลต่อการลดการผลิตสารไวโอลาซิน ในทางกลับกันถ้าต้องการผลิตสารไวโอลาซินให้ได้ปริมาณสูงควรใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครส

2) แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความต้องการไนโตรเจนที่แตกต่างกันและสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปแบบที่แตกต่างกัน โดยสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น โปรตีน กรดอะมิโน กรดไขมันของแอมโมเนียม และไนเตรต เป็นต้น Mendes *et al.* (59) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซินโดยใช้ response surface methodology เป็นเครื่องมือในการศึกษาสภาวะพบว่า สารสกัดจากยีสต์มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตสารไวโอลาซิน ในขณะที่ Rettori *et al.* (51) พบว่า ทริปโตเฟนเป็นตัวกระตุ้นการสังเคราะห์รงควัตถุสีม่วงใน 9 สายพันธุ์ของ *Chromobacterium sp.* เมื่อเติมลงไปในการเพาะจะช่วยให้เพิ่มการผลิตของสารไวโอลาซิน

3) แร่ธาตุ

Lu *et al.* (60) ทำการศึกษานิตของแร่ธาตุต่อการผลิตสารไวโอลาซินจากเชื้อ *Janthinobacterium lividum* พบว่าปริมาณแร่ธาตุในอาหารที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มการผลิตไวโอลาซิน คือ แคลเซียมไนเตรต 0.6 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร เพอร์รัสซัลเฟต 0.01 กรัมต่อลิตร ไรโบฟลาวิน 0.078 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดนิโคติน 1.08 มิลลิกรัมต่อลิตร และจากการศึกษาของ Wang *et al.* (58) ที่ได้ทำการศึกษาในเชื้อแบคทีเรียพบว่า ปริมาณของแมกนีเซียม ไนเตรท แอมโมเนียมเพอร์รัสซัลเฟต ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต มีผลต่อการผลิตสารไวโอลาซินด้วยเช่นกัน

4) อุณหภูมิ สภาวะกรดต่าง และการให้อากาศ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีอุณหภูมิและ ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีที่แตกต่างกัน เช่น *Chromobacterium sp.* ที่แยกได้จากตะกอนดินในทะเลสาบ ontario พบว่า อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เชื้อยังสามารถเจริญได้แต่จะไม่มีการผลิตสารสีม่วง ในขณะที่อุณหภูมิระหว่าง 15-25 องศาเซลเซียส เชื้อจะมีการเจริญและสร้างสารสีม่วง (61)

Durán *et al.* (62) พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส pH 7.0 จะให้ผลผลิตของสารไวโอลาซินที่สูง ในขณะที่การศึกษาของ Lu *et al.* (60) พบว่าการผลิตสารไวโอลาซินโดยเชื้อ *Janthinobacterium lividum* อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 4-20 องศาเซลเซียส ปริมาณของไวโอลาซินมีการผลิตที่สูงสุดที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ค่า pH ที่เหมาะสมในการผลิตไวโอลาซิน อยู่ในช่วง 7-8 และ Wang *et al.* (58) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารสีม่วง คือ ค่า pH ของอาหารอยู่ที่ 6.71 ซึ่งจะให้ผลิตไวโอลาซินได้ 1.62 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 32

ส่วนแบคทีเรียที่แยกได้จากฟองน้ำจะผลิตไวโอลาซินได้ในอาหารเพาะเชื้อเหลวที่ไม่มีการกวน ถ้าหากเพิ่มการกวนจะทำให้การผลิตสารสีม่วงลดลง (50)

2.8.3 การใช้ประโยชน์จากสารไวโอลาซิน

แบคทีเรียกลุ่มนี้อาศัยอยู่ในดินและน้ำ การป้องกันตัวเองจะทำโดยการสร้างคราบเมือก หรือฟิล์มบาง ๆ และจะสร้างสารไวโอลาซินไว้ที่บริเวณเซลล์เมมเบรน เมื่อผู้ล่าเข้ามากิน จะเกิดอาการเป็นพิษ ทำให้พวกที่เหลืออยู่รอดได้ (56) เนื่องจากลักษณะการมีความเป็นพิษต่อผู้ล่า ทำให้สารสีม่วงดังกล่าวได้รับความสนใจ เมื่อมีการนำไปศึกษาเพิ่มเติมโดย Hoshino *et al.* (52) พบว่าโครงสร้างทางเคมีของไวโอลาซินนั้นมีองค์ประกอบที่เป็นโครงสร้างวงแหวนถึง 5 วง ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงในช่วง 550-600 นาโนเมตร ทำให้สารดังกล่าวมีสีน้ำเงิน-ม่วง นอกจากนี้ด้วยลักษณะโครงสร้างดังกล่าวทำให้ไวโอลาซินแสดงสมบัติเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในหลายด้าน (51) ได้แก่

1) สารต้านอนุมูลอิสระ

สารไวโอลาซินแสดงสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยมีความเข้มข้นในการจับกับอนุมูล DPPH[•] ที่ 50% (Inhibitory Concentration, IC₅₀) เท่ากับ 30 ไมโครโมลาร์ มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลของไนตริกออกไซด์ในระดับ IC₅₀ เท่ากับ 21 ไมโครโมลาร์ มีความสามารถในการจับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ที่ระดับ IC₅₀ เท่ากับ 125 ไมโครโมลาร์ และยังแสดงผลลดค่าสัญญาณจากการเกิดอนุมูลไฮดรอกซิลโดยการทดสอบ ERP (Electron paramagnetic resonance) เนื่องจากสมบัติในการละลายน้ำของไวโอลาซินนั้นต่ำมาก ทำให้การเข้าไปทำปฏิกิริยาของไวโอลาซินในเฟสไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยได้ดี จึงเป็นจุดที่ทำให้ไวโอลาซินมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (22) สารไวโอลาซินจะมีหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ และหมู่อะมิโน 3 หมู่ ซึ่งมีความสำคัญในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยไวโอลาซินจะมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมแก่สารอนุมูลอิสระ ทำให้สารอนุมูลอิสระมีความเสถียร

2) สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

สารไวโอลาซินมีความสามารถยับยั้ง *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Neisseria sp.* และ *Pseudomonas sp.* (24) เนื่องจากแบคทีเรียผลิตสารไวโอลาซินไว้เพื่อป้องกันการล่าจากศัตรูและเชื้อราก็สามารถเป็นผู้ล่าของแบคทีเรียกลุ่มนี้ Brucker *et al.* (55) รายงานว่า ไวโอลาซินที่มีอยู่ใน *J. lividum* นั้นมีสมบัติในการป้องกันเชื้อราก่อโรคสายพันธุ์ *Batrachochytrium dendrobatidis* ซึ่งเป็นเชื้อราที่อยู่บนซาลาแมนเดอร์ สารไวโอลาซินที่ผสมระหว่างสารไดออกซีไวโอลาซินกับสารไวโอลาซินของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RT102 พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *B. lichenniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *S. aureus* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *P. aeruginosa* สารไวโอลาซินสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์แบคทีเรียได้โดยอยู่ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (63)

3) สารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

จากการศึกษาของ Baretto *et al.* (64) ได้ทำการศึกษาสารไวโอลาซินที่ผลิตจากเชื้อ *C. violaceum* สายพันธุ์ Brazilian Amazon และสายพันธุ์ ATCC 12472 โดยศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 7 สายพันธุ์ พบว่ามีฤทธิ์ที่สูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus sp.*, *Botryodiplodia sp.*, *Cercospora kikuchi*, *Colletotrichum sp.*, *Corynespora sp.*, *Fusarium sp.* และ *Phomopsis sp.*

4) การใช้สารไวโอลาซินทางเครื่องสำอาง

มีการนำสารไวโอลาซินจากเชื้อ *C. violaceum* มาทำเป็นโลชั่นทาผิวโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเพาะเชื้อที่ประกอบด้วยเกล็ด, wood hydrolyzate, anthranilic acid และสารสกัดยีสต์ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) ในเลือด (65) เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารไวโอลาซินและอนุพันธ์ของไวโอลาซิน สามารถนำไปทำเป็นเครื่องสำอางประเภท ลิปสติก และ eye makeup ได้ (66)

2.9 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลินทรีย์นั้น เป็นการทดสอบความสามารถของสารที่ใช้ทดสอบ เช่น ยาปฏิชีวนะ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ว่าสามารถยับยั้ง หรือ ฆ่า เชื้อจุลินทรีย์ได้หรือไม่ ซึ่งจะศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro study*) ส่วนใหญ่วิธีทดสอบที่นิยมใช้คือ dilution method และ diffusion method ซึ่งแต่ละวิธีนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของงาน จำนวนเชื้อที่ทำการทดสอบ ชนิดของสารที่นำมาทดสอบ และความชำนาญของผู้ทดสอบ (67,68)

2.9.1 Dilution method

หลักการของวิธีนี้คือ การเจือจางสารที่ใช้ทดสอบแบบ two-folded serial dilution ในอาหารเพาะเชื้อให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจะใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบลงในอาหารที่มีสารทดสอบ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้จะมองไม่เห็นว่ามีเชื้อเจริญ โดยสังเกตได้จากสีของอาหารเพาะเชื้อจะไม่พบความขุ่น ซึ่งความเข้มข้นของสารทดสอบนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อทดสอบ วิธีนี้ให้ผลได้ 2 ประเภท คือ ผลเชิงคุณภาพ (qualitative) เช่น เชื้อที่นำมาใช้ทดสอบนั้นมีความไวต่อยามากน้อยเพียงใด สามารถแบ่งออกได้เป็น เชื้อมีความไวต่อยามาก (susceptible) ไวต่อยปานกลาง (intermediate) หรือ เชื้อดื้อยา (resistant) และผลเชิงปริมาณ (quantitative) ได้แก่ค่า MIC คือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

การทำ dilution method สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ ได้แก่

1) Broth dilution test เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสารทดสอบที่ละเอียด การทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้งค่า MIC และค่า MBC ของสารทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้คือ เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารชนิดเหลวซึ่งมีสารทดสอบในปริมาณต่าง ๆ ผสมอยู่ และสังเกตการณ์เจริญของเชื้อ โดยวิธีนี้ให้ผลที่เชื่อถือได้ เหมาะกับงานวิจัยสามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ แต่ข้อเสียคือ ไม่สามารถสังเกตการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้

ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไปคือ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า MIC สามารถนำมาใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อสายพันธุ์หนึ่งต่อยาต้านเชื้อ (สารทดสอบ) หลาย ๆ ชนิด หรือความไวของเชื้อหลาย ๆ สายพันธุ์ต่อยาต้านเชื้อหนึ่งชนิด และรวมทั้งเพื่อประเมินค่าอื่นที่เกี่ยวข้องกับยาหรือแปรผลของยาต่อเชื้อ ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC โดยสารทดสอบนั้นจะเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่า ไปเรื่อย ๆ (2-fold serial dilution)

ค่า MBC หรือ MLC (Minimal Lethal Concentration) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อได้ หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรีย จำใช้ค่าที่เฉพาะเจาะจงกว่า คือ MBC (Minimum Bactericidal Concentration) แต่ถ้าเป็นเชื้อราจะใช้คำว่า MFC (Minimal Fungicidal Concentration) ยาต้านเชื้อที่มีวิธีการออกฤทธิ์เป็นชนิดฆ่าทำลาย จะมีค่า MIC และ MBC เหมือนหรือใกล้เคียงกัน (ไม่เกินหนึ่งหรือสองความเข้มข้น; $MBC/MIC \leq 4$)

2) Agar dilution test เป็นการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์ โดยมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ broth dilution method แต่ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเพาะเชื้อเท่านั้น กล่าวคือทำการทดสอบโดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารเพาะเชื้อแบบวุ้นแข็ง (agar) และถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารแข็ง ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารเพาะเชื้อจานเดียวกันได้ และสามารถสังเกตการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ ซึ่งวิธีนี้สามารถหาค่า MIC ได้ แต่ไม่สามารถหาค่า MLC (MBC)

2.9.2 Diffusion method

Agar diffusion Test หลักการของวิธีนี้คือการแพร่ของสารที่ใช้ทดสอบ โดยแบ่งวิธีที่บรรจุสารทดสอบได้หลายประเภท ได้แก่ ถ้วยทรงกระบอก (cylinder cup) เม็ดยา (tablet) กระดาษกรองวงกลม (filter paper disc) หรือการเจาะหลุมโดยใช้ cork bore เจาะลงในอาหารวุ้น (well) ซึ่งบริเวณผิวหน้าอาหารเพาะเชื้อนั้นจะมีเชื้อทดสอบป้ายอยู่ ในขณะที่ยาหรือสารทดสอบแพร่เข้าไปในอาหารวุ้น เชื้อที่อยู่ในอาหารวุ้นและไม่ถูกยายับยั้งจะแบ่งตัวทำให้เชื้อเจริญเต็มพื้นที่ ส่วนบริเวณที่ถูกสารทดสอบยับยั้งจะไม่มี การเจริญของเชื้อ โดยสังเกตได้จากโซนใส (inhibition zone)

รอบภาชนะหรือหลุมที่เจาะเอาไว้ ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนในสีที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ใช้ทดสอบ วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว สามารถปรับใช้ได้กับยาหลาย ๆ ตัว แต่ผลการทดสอบเป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น ไม่สามารถหาค่า MIC ได้ จึงเหมาะกับงานที่ทดสอบเบื้องต้นเท่านั้นว่าสารทดสอบมีฤทธิ์ต้านเชื้อได้หรือไม่

2.10 อนุมูลอิสระ (free radicals) และสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

2.10.1 อนุมูลอิสระ (free radicals)

อนุมูลอิสระ คือ สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิตและในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก สามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้เกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อไปเรื่อย ๆ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา (69) ดังสมการ 1 และสมการ 2



อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ในทางชีววิทยาสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Oxygen Species: ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Nitrogen Species: RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive Chlorine Species: RCS)

2.10.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ กล่าวคือ สารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ โดยประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในไขมัน และสารประกอบที่ละลายในน้ำ โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ ยกตัวอย่างเช่น ให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (free radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen (singlet oxygen quenching) การจับกับโลหะหนักที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน

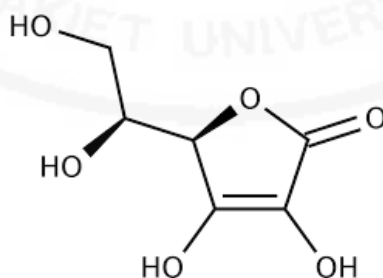
(metal chelation) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) เป็นต้น กลไกการต้านอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 3 4 และ 5 (69)



โดย R^{\bullet} , RO^{\bullet} และ ROO^{\bullet} คือ อนุมูลอิสระ ส่วน AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

สารอนุมูลอิสระสำหรับป้องกันการเกิดออกซิเดชันของผิวหนังส่วนใหญ่จะใช้เป็นส่วนผสมทางด้านเครื่องสำอาง ซึ่งมีหลายชนิดโดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มวิตามิน เช่น วิตามินอี วิตามินซี (ภาพที่ 6) วิตามินเอ ไนอะซินาไมด์ เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) และสารอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ เช่น สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โคเอนไซม์คิวเทน เบต้าแคโรทีน ไลโคปีน รวมไปถึงสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ เช่น เปลือกสน ชาเขียว เมล็ดองุ่น เมล็ดลิ้นจี่ คุมินอยด์จากขมิ้นชัน เปลือกมังคุด เป็นต้น สารอนุมูลอิสระแต่ละชนิดใช้เพื่อป้องกันภาวะ Oxidative stress ของผิวหนังในตำรับเครื่องสำอาง (70) ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ใช้วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน

ภาพที่ 6 โครงสร้างของวิตามินซี



ที่มา: smart science. 2019 ออนไลน์ (71)

วิตามินซีหรือกรดแอสคอร์บิก (AsC_2H_2) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี จึงทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์และอวัยวะที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก แต่ถูกทำลายได้ง่าย โดยความร้อนและแสง วิตามินซีมีหมู่ไฮดรอกซี 2 หมู่ที่แตกตัวให้ไฮโดรเจนแล้วเปลี่ยนให้อยู่ในรูป ascorbate anion (AsC^-) ซึ่งเมื่อให้อิเล็กตรอนและไฮโดรเจนแก่อนุมูลอิสระ เช่น อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลเปอร์ออกซิล และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน จะให้อนุมูล semi dehydroascorbate ($\text{Asc}^{\cdot-}$) ที่มีความเสถียร

2.11 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ซึ่งในแต่ละประเภทจะมีหลายวิธีด้วยกัน โดยแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน ปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (69)

2.11.1 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ เป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่าง ๆ เช่น การทำให้เกิดสี การทำให้เกิดตะกอน ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ เช่น Shinoda test และ Pew test โครมาโทกราฟีแบบผิวนบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

2.11.2 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ วิธีที่นิยมได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH $^{\cdot}$ วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระ ABTS $^{+\cdot}$ และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay)

ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น ABTS $^{+\cdot}$ และ DPPH $^{\cdot}$ การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ หาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน เช่น trolox, vitamin C และ ferrous sulfate หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ คือ แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง โดยค่าตัวเลขสูง แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และแบบ

ปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (50 % of inhibitory concentration: IC₅₀) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

1) วิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH^{*})

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH^{*} เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีสมบัติเป็นอนุมูลอิสระ DPPH^{*} (diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วง สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

เมื่อ DPPH^{*} ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ทดสอบที่ จะทำให้สีม่วงจางลง จนเกิดเป็นสีเหลือง (สมการที่ 6) ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงนั้นต้องตั้งทิ้งไว้ที่มีดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา วิธีนี้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH^{*} คำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่าง เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้นก่อนใส่ตัวอย่าง ดังนี้



$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

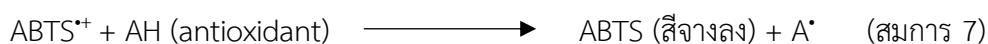
โดย A₀ = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ trolox แสดงค่าเป็น trolox equivalent antioxidant capacity มีหน่วยเป็น mM/mg หรือ μM/mg ข้อดีของวิธีนี้คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

2) วิธี 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+})

TEAC เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสี ABTS^{•+} ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS^{•+} ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS^{•+} จากนั้นนำ ABTS^{•+} ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วย ethanol ซึ่งจะทำให้สีจางลง (ดังสมการ 7) จากนั้นตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา สามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ABTS^{•+} สามารถละลายได้ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และยังทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง



2.12 อนุภาคนาโนไขมัน (lipid nanoparticles)

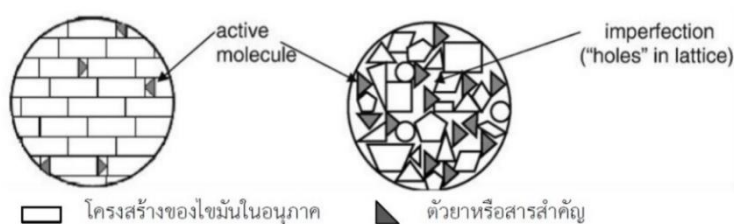
อนุภาคนาโนไขมัน แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ อนุภาคนาโนที่ประกอบด้วยไขมันสถานะของแข็ง ที่เรียกว่า โซลิดลิปิดนาโนพาร์ทิเคิล (Solid Lipid Nanoparticles: SLNs) และส่วนผสมระหว่างไขมันสถานะของแข็ง (solid lipid) รวมกับไขมันสถานะของเหลว (liquid lipid) ที่เรียกว่า นาโนสตรักเจอร์ลิปิดแครีเออร์ (Nanostructured Lipid Carriers: NLCs) โดยอนุภาคนาโนไขมันทั้ง 2 ชนิดนี้เกิดจากการทำอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w) เป็นระบบนำส่งคอลลอยด์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้ในเครื่องสำอางและยาทาผิวหนัง เช่น มีการยึดติดที่ดีเมื่อทาบริเวณผิวหนัง ทำให้ผิวเกิดความชุ่มชื้น การเสริมการซึมผ่านของสารสำคัญ สามารถควบคุมการปลดปล่อยได้ดี เพิ่มความคงตัวทางเคมีของยาที่นำมากักเก็บ สามารถกักเก็บตัวยาได้ทั้งชนิดที่ละลายในไขมันและชนิดที่ละลายน้ำ ซึ่งไขมันที่ใช้นั้นมีความปลอดภัยต่อร่างกาย จึงทำให้ปราศจากความเป็นพิษ (72-75)

1) โซลิดลิปิดนาโนพาร์ทิเคิล (Solid Lipid Nanoparticles: SLNs)

อนุภาคไขมันชนิด SLNs ถูกพัฒนามาตั้งแต่ ค.ศ. 1990 ผลิตโดยแทนที่ไขมันเหลวในระบบอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water emulsion) ด้วยไขมันแข็งเพียงชนิดเดียวหรือไขมันแข็งหลายชนิดผสมกันก็ได้ ซึ่งไขมันนั้นเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมिर่างกาย SLNs ประกอบด้วย ไขมันแข็งปริมาณ 0.1-30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักที่กระจายในวัฏภาคน้ำ และเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) 0.5 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เข้าไปในระบบเพื่อความเสถียร อนุภาคเฉลี่ยของ SLNs อยู่ในช่วง 40 ถึง 1000 นาโนเมตร (76)

สมบัติที่สำคัญของ SLNs คือ มีความคงตัวทางกายภาพสูง ป้องกันการสลายตัวของสารสำคัญที่กักเก็บ สามารถควบคุมการปลดปล่อย และมีการนำส่งสู่เป้าหมายเฉพาะที่ สำหรับข้อเสีย คือ ความสามารถในการกักเก็บสารสำคัญน้อย โครงสร้างของ SLNs นั้นเป็นโครงสร้างที่เป็นระเบียบจึงสามารถทำให้ตัวยาถูกขับออกจากอนุภาคหลังการเกิดการเปลี่ยนแปลงพหุสัณฐานระหว่างการเก็บและมีปริมาณน้ำในระบบค่อนข้างสูงถึง 70-99.9 เปอร์เซ็นต์ (77)

ภาพที่ 7 ลักษณะของอนุภาคนาโนไขมันชนิด SLNs (ซ้าย) และ NLCs (ขวา)

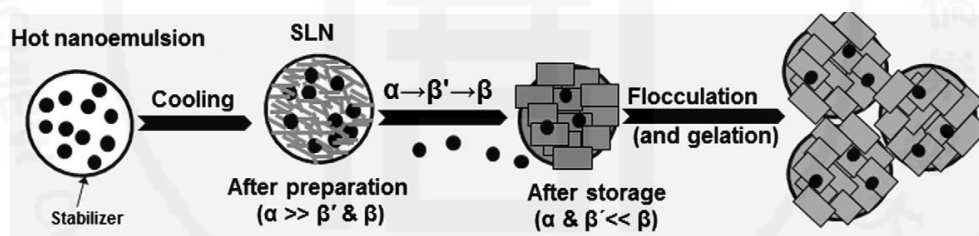


ที่มา: Müller *et al.* 2007 (78)

2) นาโนสตรักเจอร์ลิปิดแครีเออร์ (Nanostructured Lipid Carriers: NLCs)

ระบบ NLCs ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อลดข้อจำกัดของระบบ SLNs ที่มีความสามารถในการบรรจุที่ค่อนข้างจำกัด เนื่องจากการผลิตรายะเริ่มต้นอนุภาคไขมันจะฟอร์มตัวในรูปแบบพลังงานสูงเป็น α หรือ β' -crystal แต่ภายหลังระยะเวลาเก็บรักษา ธรรมชาติของไขมันแข็งจะฟอร์มโครงสร้างผลึกให้มีระเบียบในรูปแบบของ β -crystal ทำให้สารสำคัญมีโอกาสถูกขับออกจากเมทริกซ์ไขมันได้ (ภาพที่ 8) การเติมไขมันเหลวลงไปในระบบจึงช่วยให้อนุภาคคงรูปแบบที่ไร้ระเบียบเป็น α หรือ β' -crystal ได้ดีและมีช่องว่างเพียงพอที่จะสามารถเพิ่มการบรรจุสารสำคัญและลดโอกาสการขับสารสำคัญออกจากอนุภาคระหว่างการเก็บรักษา (79,80) โดย NLCs เป็นการผลิตอนุภาคไขมันด้วยของผสมระหว่างไขมันแข็งและไขมันเหลว (น้ำมัน) อัตราส่วนของไขมันแข็งต่อไขมันเหลวที่ใช้อยู่ในช่วง 70 : 30 ถึง 99.9 : 0.1 แต่จากการทดลองพบว่าไขมันผสมในอัตราส่วนนี้ยังคงเป็นของแข็งที่อุณหภูมิร่างกาย (75)

ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกของอนุภาคนาโนไขมัน (81)



ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการพัฒนาระบบ NLCs เพื่อพัฒนาให้ได้อนุภาคไขมันที่มีโครงสร้างระดับนาโน (nanostructure) ที่อยู่ในรูปแบบไร้ระเบียบเพื่อให้มีช่องว่างเพียงพอที่จะสามารถเพิ่มการบรรจุสารสำคัญและป้องกันการถูกขับออกจากอนุภาค ซึ่งสามารถพัฒนาได้ 3 รูปแบบ ดังนี้

1) รูปแบบผลึกไม่สมบูรณ์ (imperfect crystal type) โดยการนำโมเลกุลไขมันต่างชนิดที่มีโครงสร้างผลึกต่างกันผสมเข้าด้วยกัน จะทำให้เกิดการเรียงตัวที่ไม่สมบูรณ์ เกิดเป็นช่องว่างที่รองรับให้สารสำคัญอยู่ในเมทริกซ์นี้ได้

2) รูปแบบอสัณฐาน (amorphous type) เป็นการขัดขวางกระบวนการเกิดผลึก โดยการเติมไขมันพิเศษบางชนิดลงไปให้ไขมันอยู่ในรูปแบบอสัณฐาน

3) รูปแบบซ้อน (multiple type) ลักษณะคล้ายอิมัลชันเชิงซ้อน (w/o/w) ซึ่งมีลักษณะเป็นสารกระจายของน้ำมันในไขมันแข็งในน้ำ (o/solid lipid/w) รูปแบบซ้อนนี้ช่วยเพิ่มการบรรจุสารสำคัญ โดยใช้หลักการที่ว่าสารสำคัญส่วนมากจะละลายในไขมันเหลวได้ดีกว่าไขมันแข็ง

2.13 ส่วนประกอบสำคัญของอนุภาคนาโนไขมัน

1) ไขมัน หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกไขมันจะพิจารณาจากความสามารถในการละลายของสารสำคัญในไขมันเหลวและโมเลกุลของไขมัน ชนิดของไขมันแข็งและไขมันเหลวนั้นมีผลต่อสภาพความเป็นผลึกของอนุภาคที่เตรียมได้ ซึ่งไขมันทั้งสองชนิดไม่ควรละลายในกันและกัน แต่สามารถผสมเป็นเนื้อเดียวกันได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดหลอมเหลวของไขมันแข็ง หลังจากพอร์มเป็นอนุภาคแล้ว ไขมันแข็งจะเรียงเป็นโครงสร้างผลึกอย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ไขมันเหลวจะกระจายตัวเป็นหยดอนุภาค โดยไขมันแข็งและไขมันเหลวที่มักนิยมใช้ในงานวิจัย ได้แก่ stearic acid และ Medium Chain Triglyceride (MCT) ตามลำดับ ซึ่งอัตราส่วนของไขมันแข็งต่อไขมันเหลวที่ใช้เป็นได้ตั้งแต่ร้อยละ 70:30 ถึงร้อยละ 99.9:0.1 ปริมาณไขมันที่เหมาะสมจะมีผลต่อความสามารถในการบรรจุสารสำคัญในอนุภาคด้วย (80)

2) สารลดแรงตึงผิว มีหน้าที่ในการช่วยลดการเกาะกลุ่มกัน (floculated) ของอนุภาคแขวนตะกอนระดับนาโนเมตรซึ่งมีพลังงานอิสระที่พื้นผิวสูง บ่งบอกถึงลักษณะของการรักษาความคงตัวที่ดีของระบบ การคัดเลือกสารลดแรงตึงผิวอาศัยหลักการ 2 ข้อ ได้แก่ การเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวที่ช่วยเพิ่มแรงผลักทางไฟฟ้าที่พื้นผิวอนุภาค ซึ่งประเมินได้จากการตรวจวัดค่าศักย์ซีต้า หรือการเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวไม่มีประจุที่มีโครงสร้างโมเลกุลขนาดใหญ่เพื่อลดการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค หากเลือกใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุร่วมกับสารไม่มีประจุจะช่วยให้เกิดแรงผลักทางไฟฟ้าที่สมดุลบนผิวอนุภาคและเกิดระบบที่มีความคงตัวดียิ่งขึ้น โดยไขมันและสารลดแรงตึงผิวที่สามารถนิยมใช้เตรียมอนุภาคนาโนไขมัน แสดงดังตาราง 1

ตารางที่ 1 ชนิดของไขมันและสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เตรียมอนุภาคนาโนไขมัน (82)

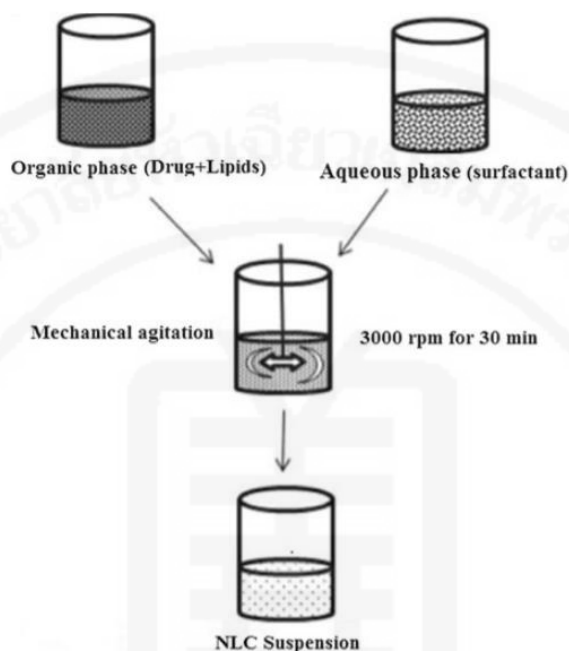
Formulation	Examples
Ingredients	
liquid lipids	Soybean oil Medium chain triglycerides (MCT)/caprylic and capric triglycerides Oleic Acid (OA) Isopropyl Myristate α -tocopherol/ Vitamin E Corn oil Squalene

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Formulation Ingredients	Examples
Solid lipids	Stearic acid Palmitic acid Glyceryl Monostearate (GMS) Cetyl palmitate Carnauba wax Beeswax Cetyl palmitate Glyceryl Palmitostearate (Precirol [®] ATO 5) Glyceryl Behenate (Compritol [®] 888 ATO) Grades of Witepsol [®] Grades of Softisan [®] Gelucire [®]
Surfactants	Poloxamer 188 Poloxamer 407 Poloxamine 908 Tween [®] 80 Tween [®] 20 Span [®] 85 Span [®] 80 Span [®] 20 Brij78 Myverol [™] 18-04 K Sodium dodecyl sulfate (SDS) Sodium deoxy cholate (SDC) Lecithin Solutol [®] HS 15 Polyoxyl castor oil

2.14 การผลิตอนุภาคนาโนไขมัน (nanostructured lipid carriers: NLCs)

ภาพที่ 9 การเตรียมผลิตภัณฑ์อนุภาคนาโนไขมันชนิด nanostructured lipid carriers



ที่มา: Selvamuthukumar, *et al.* 2007 (83)

การเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs จะประกอบไปด้วยวัฏภาคไขมัน (lipid phase) และวัฏภาคน้ำ (aqueous phase) ในส่วนของวัฏภาคไขมันนั้นจะมีส่วนผสมของไขมัน (lipids) และตัวยาหรือสารสำคัญ (drug) และวัฏภาคน้ำจะประกอบไปด้วย สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ดังแสดงในภาพที่ 9

เริ่มจากการหลอมละลายวัฏภาคไขมัน โดยทำการผสมสารสำคัญหรือตัวยาลงไปในวัฏภาคไขมัน จากนั้นกระจายวัฏภาคไขมันที่มีสารสำคัญผสมอยู่ลงในวัฏภาคน้ำ โดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ใช้หลอมละลายไขมัน จากนั้นทำการปั่นผสมด้วยความเร็วรอบสูง ๆ สารละลายที่ได้จะเกิดเป็น pre-emulsion จากนั้นนำอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w emulsion) ที่ังไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิต่ำจึงเกิดเป็นอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs (83)

อิมัลชันที่ได้จะมีลักษณะเป็นของเหลวใส มีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์สูง ขนาดของอนุภาคในตำรับมีขนาดอยู่ระหว่าง 100-400 นาโนเมตร โดยสารลดแรงตึงผิวทำให้อนุภาคแยกกันอยู่ในสารละลาย ไม่เกิดการรวมตัวกัน ระบบ NLC นี้เหมาะสำหรับตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติทั้งชอบน้ำหรือไม่ชอบน้ำก็ได้ (78)

2.15 วิธีการเตรียมอนุภาคนาโนไขมัน

วิธีการเตรียม SLNs และ NLCs สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันที่ความดันสูง (High Shear Homogenization: HPH) การปั่นด้วยความเร็วสูงหรือใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (high speed stirring or ultrasound) เทคนิคไมโครอิมัลชัน (microemulsion technique) และการทำให้เกิดอิมัลชันด้วยตัวทำละลายและการระเหย (solvent emulsification and evaporation) เป็นต้น (84) ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อดี ข้อเสียที่แตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้ว วิธี HPH เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากสามารถขยายการผลิตขนาดใหญ่ได้ง่าย

2.15.1 High speed homogenization หรือ Ultrasonication

การเตรียมอนุภาคนาโนไขมันด้วยวิธี High speed homogenization เป็นเทคนิคที่ทำงานง่าย ใช้เครื่องมือที่อยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ซึ่งวิธีนี้จะไม่ใช่ตัวทำละลายอินทรีย์หรือสารเติมแต่งอื่น ๆ ทำได้โดยการหลอมละลายไขมันเหนือจุดหลอมเหลวประมาณ 5 องศาเซลเซียส นำวัฏภาคไขมันไปกระจายในวัฏภาคน้ำซึ่งมีตัวทำอิมัลชันละลายอยู่ โดยต้องหลอมวัฏภาคน้ำให้มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับวัฏภาคไขมันก่อน จากนั้นนำไปปั่นผสมที่ความเร็วสูงหรือใช้ Ultrasonicate probe จะได้เป็นสารละลายนาโนอิมัลชัน และนำไปลดอุณหภูมิให้ได้เท่ากับอุณหภูมิห้องจะได้สารละลายอนุภาคนาโนไขมัน ข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุภาคที่ได้มีการกระจายของขนาดที่กว้างมากไปจนถึงช่วงไมโครเมตร และมีความคงตัวทางกายภาพต่ำเมื่อผ่านระยะเวลาการเก็บรักษาและมีการปนเปื้อนของโลหะจากการใช้ prob (85)

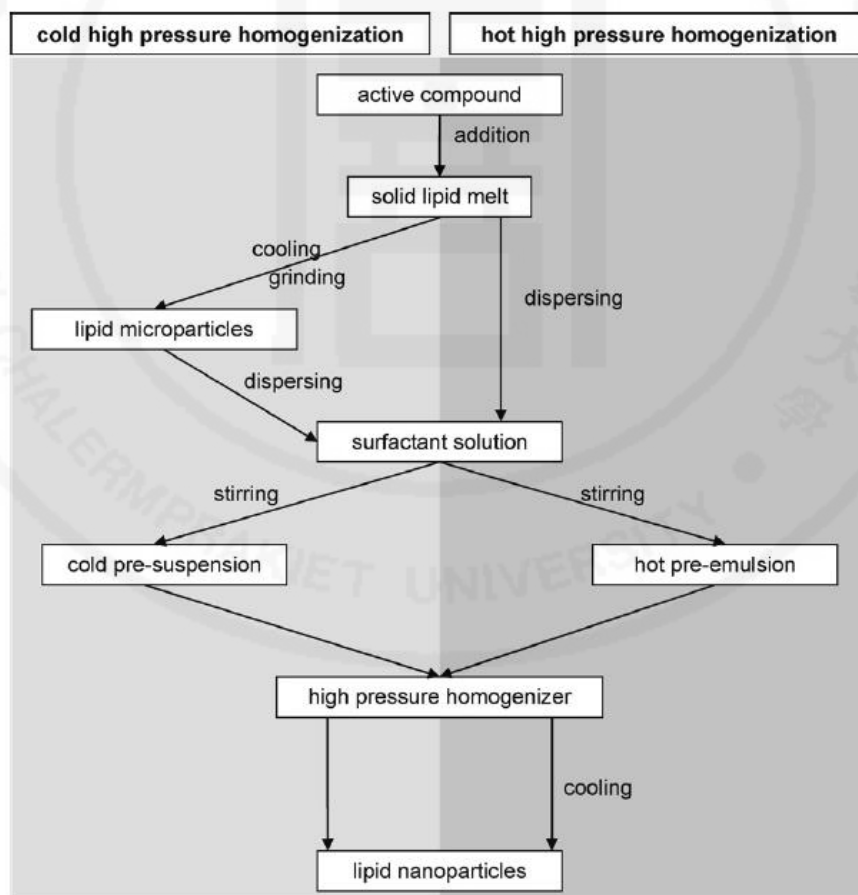
2.15.2 High Pressure Homogenization (HPH)

วิธีการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันความดันสูงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเตรียม SLNs และ NLCs สามารถแบ่งออกได้เป็นการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันแบบอุณหภูมิต่ำและสูง (cold and hot homogenization) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตัวยาหรือสารสำคัญว่าเหมาะสมกับวิธีใด ซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์ปนเปื้อน

1) Cold high pressure homogenization เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการผลิตยาหรือสารสำคัญที่ละลายตัวได้ง่ายและยาที่ชอบน้ำ (hydrophilic drugs) ในการเตรียมจะผสมตัวยารวมกับไขมันที่ถูกหลอมเหลว ถ้าตัวยาละลายได้ไม่ดีในไขมันต้องเพิ่มสารลดแรงตึงผิวเพื่อทำให้ผสมกันได้ สารผสมจะถูกทำให้เป็นของแข็งด้วยน้ำแข็งแห้งหรือไนโตรเจนเหลว เพื่อเกิดเป็นอนุภาคไขมันแข็ง (SLNs) จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็วสูงในสารละลายของสารลดแรงตึงผิวในน้ำที่เย็นจนได้เป็นอิมัลชันเริ่มต้น แล้วนำไปผ่านเครื่อง High pressure homogenizer ที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับอุณหภูมิห้อง วิธีนี้จึงเหมาะสมกับตัวยาที่ไวต่อความร้อนเนื่องจากตัวยามีเวลาในการสัมผัสความร้อนต่ำ (86)

2) Hot high pressure homogenization เตรียมได้โดยละลายตัวยาหรือสารสำคัญลงในไขมันที่หลอมเหลวด้วยอุณหภูมิเหนือกว่าจุดหลอมเหลวของไขมันประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพที่ 10 จากนั้นส่วนผสมนี้เข้ากับสารละลายของสารลดแรงตึงผิวในน้ำที่อุณหภูมิเดียวกัน ปั่นด้วยความเร็วสูงจนเกิดเป็น pre-emulsion ที่ยังร้อนจากนั้นนำไปปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันความเร็วสูงที่อุณหภูมิควบคุม โดยปั่นที่ความดันสูง 100-1500 บาร์ ประมาณ 1-3 รอบจะได้เป็นนาโนอิมัลชัน หลังการปั่นและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาโนอิมัลชันจะเกิดการกลับมาตกผลึกจนได้เป็น SLNs หรือ NLCs วิธีนี้ เหมาะสำหรับตัวยาหรือสารสำคัญที่ละลายในน้ำมัน (lipophilic drugs) ไม่เหมาะอย่างยิ่งสำหรับตัวยาที่ละลายน้ำ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาด่ำ (86)

ภาพที่ 10 กระบวนการปั่นผสมเป็นเนื้อเดียวกันแบบอุณหภูมิต่ำและสูง



ที่มา: Pardeike *et al.* 2009 (21)

2.15.3 Microemulsion technique

วิธีนี้ทำได้โดยการเตรียมไมโครอิมัลชันที่ร้อนด้วยการผสมไขมันหอมประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสารลดแรงตึงผิว 15 เปอร์เซ็นต์ และสารลดแรงตึงผิวร่วม (cosurfactant) 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นกระจายไมโครอิมัลชันในน้ำเย็นปริมาณมาก (2-3 องศาเซลเซียส) อัตราส่วนไมโครอิมัลชันต่อน้ำ เท่ากับ 1:50 ในขั้นตอนนี้ต้องทำการปั่นตลอดเวลา และนำมากรองเพื่อกำจัดปริมาณน้ำออกโดยวิธีการกรองแบบ ultrafiltration หรือการทำแห้งเยือกแข็ง (lyophilization) เพื่อให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของอนุภาคเพิ่มขึ้น ข้อคำนึงถึงของวิธีนี้คือ ความยุ่งยากในการกำจัดปริมาณน้ำจำนวนมากออกจากระบบ เนื่องจากอนุภาคที่ผลิตได้นั้นมีขนาดเล็กมาก นอกจากนั้นยังใช้ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมในปริมาณที่สูง อาจส่งผลให้เกิดอันตรายได้ (85)

2.15.4 Solvent diffusion method

วิธีการนี้ใช้หลักการของการตกตะกอนในสารละลายที่เหมาะสม โดยละลายไขมันในสารละลายอินทรีย์ที่ไม่เข้ากับน้ำ เช่น คลอโรฟอร์มและโทลูอีน จากนั้นเติมไขมันที่ละลายแล้วลงในน้ำ จนเกิดเป็นอิมัลชัน ซึ่งตัวยาหรือสารสำคัญนั้นสามารถใช้ได้ทั้งชนิดที่ละลายน้ำและละลายไขมัน จากนั้นนำไประเหยเอาสารละลายออกภายใต้สภาวะการลดความดัน โดยช่วงที่ระเหยนั้นจะเกิดการตกตะกอนของอนุภาคนาโนไขมันกระจายอยู่ในวัฏภาคน้ำ (87) ขนาดของอนุภาค NLC ที่เตรียมได้นั้นจะมีขนาดอยู่ในช่วง 164.4 - 429.2 นาโนเมตร (88) วิธีนี้เหมาะกับการกักเก็บตัวยาหรือสารสำคัญที่ละลายตัวง่าย เนื่องจากไม่ใช้ความร้อนในระหว่างการเตรียม แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ มีสารตกค้างของตัวทำละลาย และถ้าทำการกักเก็บตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติละลายได้ในไขมัน ในระหว่างการเตรียมตัวยาจะหลุดออกมาเนื่องจากตัวยาหรือสารสำคัญสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (89)

2.15.5 Melt-emulsification technique

การเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด SLNs หรือ NLCs ด้วยวิธีนี้ มีวิธีการเตรียมคล้ายกับวิธี Solvent diffusion ในข้างต้น ซึ่งข้อดีของวิธี melt-emulsification คือ ไม่เกิดการตกค้างของตัวทำละลายอินทรีย์ แต่เป็นการให้ความร้อนและลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วโดยอนุภาคที่เตรียมได้จะมีขนาดที่ใหญ่กว่าวิธีที่ใช้ตัวทำละลายเล็กน้อย อนุภาคจะอยู่ในช่วง 340.6 ถึง 485.5 นาโนเมตร แต่จะมีค่าดัชนีการกระจายตัวและค่าความคงตัวไม่ต่างกัน (89)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อจำกัดต่าง ๆ ของวิธีการผลิตอนุภาคนาโนไขมัน

วิธีการเตรียม	ข้อดี	ข้อจำกัด
High pressure homogenization (HPH) (90)	<ul style="list-style-type: none"> - สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก - มีสภาวะผลิตซ้ำได้ (reproducibility) - เหมาะสมที่จะใช้ผลิตตัวยาที่เสื่อมสลายง่าย โดยการใช้อุณหภูมิต่ำ - หลีกเลี่ยงการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 	<ul style="list-style-type: none"> - มีประสิทธิภาพต่ำในการกักเก็บตัวยาที่ชอบน้ำ - เกิดอุณหภูมิสูงขึ้นในระหว่างการผลิตหรือปั่นผสมเป็นเนื้อเดียว
High speed stirring or Ultrasonication (91)	<ul style="list-style-type: none"> - ใช้เครื่องมือที่อยู่แล้วในห้องปฏิบัติการทั่วไป - เป็นวิธีที่ผลิตได้ง่าย ทำได้ง่าย 	<ul style="list-style-type: none"> - ใช้เวลานานในการ sonicate และอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของโลหะจาก probe - ไขมันต่างชนิดกันต้องการกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน - ได้ไมโครพาร์ทิเคิลติดมาด้วย
Microemulsion technique (91)	<ul style="list-style-type: none"> - สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก - ไม่ต้องใช้พลังงาน - กักเก็บได้ทั้งยาชอบน้ำและยาชอบลิพิด - ใช้เครื่องมือธรรมดาทั่วไปในการผลิต 	<ul style="list-style-type: none"> - ต้องใช้สารทำอิมัลชันปริมาณสูง - อาจทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นไขมันต่ำ เนื่องจากต้องทำการเจือจาง
Solvent diffusion method (98)	<ul style="list-style-type: none"> - ได้อนุภาคขนาดเล็ก - หลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิสูง 	<ul style="list-style-type: none"> - การตกค้างของตัวทำละลายอินทรีย์ - มีข้อจำกัดเรื่องขนาดการผลิต
Melt emulsification Technique (89)	<ul style="list-style-type: none"> - ไม่เกิดการตกค้างของตัวทำละลายอินทรีย์ - ไม่มีการปลดปล่อยสารสำคัญในขั้นตอนเริ่มต้น - อนุภาคนาโนไขมันที่เตรียมได้มีความเข้มข้นของไขมันสูง 	<ul style="list-style-type: none"> - ขนาดอนุภาคที่เตรียมได้จะใหญ่กว่าการเตรียมด้วยวิธี solvent diffusion

2.16 ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนไขมัน

2.16.1 ขนาดอนุภาคและการกระจายตัวของอนุภาค

การวัดขนาดอนุภาคเป็นหนึ่งใน การตรวจสอบลักษณะเฉพาะขั้นพื้นฐาน และใช้ในการระบุลักษณะของอนุภาคที่เตรียมได้ ซึ่งระบบที่ได้นั้นต้องให้การกระจายตัวของขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงแคบและมีขนาดอนุภาคเล็กกว่าระดับไมครอน (submicron) กล่าวคือมีขนาดเล็กกว่า 1 ไมโครเมตร (86) โดยใช้เครื่องมือที่มีชื่อว่า Delsa™ Nano C ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ ได้แก่

- 1) ขนาดอนุภาค (particle size)
- 2) ดัชนีการกระจายตัว (polydispersity index, PI)
- 3) ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา (zeta potential)

2.16.2 ดัชนีการกระจายตัว (Polydispersity index, PI)

การวัดค่าดัชนีการกระจายตัว (PI) เป็นการวัดเพื่อยืนยันว่าอนุภาคในสารละลายนั้นมีขนาดเท่า ๆ กันทั้งระบบ ซึ่งค่า PI จะมีค่าอยู่ในช่วง 0-1 โดยค่าที่น้อยกว่า 0.3 แสดงถึงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงแคบ (92,93)

จากงานวิจัยของ Das *et al.* (94) รายงานว่าชนิดของไขมันและชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการเตรียม SLNs นั้นส่งผลให้ค่า PI ของระบบมีความแตกต่างกัน โดยความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ค่า PI ลดลง รวมไปถึงเวลาในการ sonicate เพิ่มขึ้นถึง 15 นาที ทำให้ค่า PI ลดลง แต่พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นมากกว่า 15 นาทีนั้นไม่ส่งผลต่อค่า PI

2.16.3 ค่าศักย์ไฟฟ้าซีตา (Zeta potential)

ค่าไฟฟ้าซีตา (Zeta potential, ZP) เป็นตัวช่วยคาดการณ์เกี่ยวกับความคงตัวในการเก็บรักษาของสารละลายคอลลอยด์ โดยประจุที่ผิวของอนุภาคเกิดขึ้นจากกลุ่มหรือหมู่ที่แตกตัวที่ผิวหรือเกิดจากการดูดซับไอออนที่ผิวของอนุภาค โดยทั่วไปค่า ZP ควรมากกว่า 30 มิลลิโวลต์ แสดงว่าอนุภาคมีความคงตัวทางกายภาพที่ดี และค่าที่สูงถึง 60 มิลลิโวลต์ แสดงถึงความคงตัวทางกายภาพที่ดีมากตลอด shelf life โดยค่า ZP จะลดลงเมื่อมีการเพิ่มพลังงานจากแสงหรือความร้อน เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะไปเพิ่มพลังงานจลน์ให้กับระบบ ทำให้เกิดการรวมตัวของอนุภาคและค่าศักย์ไฟฟ้าซีตาลดลง พลังงานดังกล่าวยังสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึกของไขมันอีกด้วย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างผลึก จึงทำให้ค่าประจุไฟฟ้าเปลี่ยนไป (92,93)

2.17 การทดสอบความคงสภาพของตำรับ

ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีคุณภาพนั้นต้องเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรฐานด้านคุณภาพ ความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพการใช้ตามสรรพคุณที่อ้างถึง ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาความคงตัว เพื่อความปลอดภัย ได้มาตรฐาน มีปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์สม่ำเสมอตลอดระยะเวลาตามอายุ

ของผลิตภัณฑ์ (shelf life) เนื่องจากการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดการเสื่อมสภาพทั้งทางกายภาพและทางเคมี มีผลต่อประสิทธิภาพในการใช้งาน หากเกิดการสลายตัว สารที่ได้ต้องไม่มีพิษต่อร่างกาย (95-99)

2.17.1 การประเมินความคงสภาพในด้านต่าง ๆ

- 1) ความคงสภาพทางกายภาพ หมายถึง ความคงสภาพในลักษณะต่าง ๆ ที่สัมผัสได้ด้วยประสาทสัมผัส ได้แก่ สี กลิ่น รส ความหนืด ค่าความเป็นกรดต่าง และคุณสมบัติการไหล เป็นต้น
- 2) ความคงสภาพทางเคมี หมายถึง ความคงสภาพในคุณสมบัติทางด้านเคมีของสารสำคัญ ทำได้โดยการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในตำรับ
- 3) ความคงสภาพทางจุลชีววิทยา หมายถึง ความคงสภาพของวัตถุดิบเสียในตำรับ โดยเฉพาะตำรับที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้
- 4) ความคงสภาพทางการรักษา หมายถึง ตัวยายังคงฤทธิ์ทางการรักษาหรือตามสรรพคุณที่อ้างอิงตลอดจนอายุของผลิตภัณฑ์
- 5) ความคงสภาพทางด้านความเป็นพิษ หมายถึง ความเป็นพิษไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตลอดอายุของผลิตภัณฑ์

2.17.2 การทดสอบความคงตัวของตำรับ

การทดสอบความคงสภาพแบบระยะยาว (long term testing) หมายถึง การศึกษาความคงสภาพที่สภาวะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ตามที่แจ้งไว้บนฉลาก หากฉลากไม่แจ้งสภาวะการเก็บให้เก็บตามภูมิอากาศของประเทศนั้น ๆ (95)

การทดสอบในสภาวะเร่ง (accelerated testing) หมายถึง การศึกษาในสภาวะที่จะเร่งให้เกิดปฏิกิริยาการสลายตัวหรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือฟิสิกส์ของตัวยาหรือสารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งวิธีนี้จะพิจารณาประกอบกับข้อมูลการศึกษาความคงสภาพแบบระยะยาว โดยข้อมูลการทดสอบแบบเร่งยังใช้ประเมินผลกระทบในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงช่วงสั้น ๆ ของสภาวะการเก็บที่แตกต่างจากการเก็บปกติ เช่น การขนส่ง การทดสอบความคงสภาพแบบเร่งทำได้หลายวิธีได้แก่

- 1) เก็บที่อุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ (RH) $75\% \pm 5\%$ เป็นเวลา 6 เดือน ทำการทดสอบที่เดือน 0, 1, 3 และ 6
- 2) เก็บที่อุณหภูมิ 45 ± 2 องศาเซลเซียส ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ $75\% \pm 5\%$ เป็นเวลา 4 เดือน ทำการทดสอบที่เดือน 0, 1, 2, 3 และ 4
- 3) เก็บที่อุณหภูมิ 50 ± 2 องศาเซลเซียส ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ $75\% \pm 5\%$ เป็นเวลา 3 เดือน ทำการทดสอบที่เดือน 0, 1, 2 และ 3

ทั้งสามวิธีข้างต้นเทียบได้กับการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ปี

4) เก็บที่อุณหภูมิ 50 ± 2 องศาเซลเซียส ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ $75\% \pm 5\%$ เป็นเวลา 3 เดือน ทำการทดสอบที่เดือน 0, 1, 2 และ 3

5) ทำ heating-cooling cycle โดยเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเข้าตู้อบที่ 45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ (cycle) ทำการทดสอบจำนวน 6-8 รอบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์มาประเมินโดยทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น การแยกชั้น การตกตะกอน การเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น เป็นต้น และประเมินคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ เช่น ค่า pH ความหนืด ขนาดและการกระจายตัวของอนุภาค ปริมาณสารสำคัญ เป็นต้น

6) ทำ Freeze-thaw cycle โดยเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำมาเข้าตู้อบที่ 45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ (cycle) ทำการทดสอบจำนวน 6-8 รอบ แล้วนำผลิตภัณฑ์มาประเมินคุณสมบัติในด้านต่าง ๆ

7) การปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3750 รอบต่อนาที นาน 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถเทียบได้กับการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ปี

8) การเขย่าในอัตรา 60 ครั้งต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.18 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ณิชากร และคณะ (100) ทำการพัฒนาเจลทาผิวที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจาก อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia*) เป็นสารยับยั้งแบคทีเรีย ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ก่อสิว 2 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium acnes* พบว่า น้ำมันอบเชยจีนต้านเชื้อดังกล่าวได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด (MICs) 156 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าอบเชยจีน มีองค์ประกอบหลักเป็นซินนามาลดีไฮด์ (C_9H_8O) จากการศึกษาข้อมูลผู้บริโภคอายุ 15-25 ปี พบว่า ผู้บริโภคส่วนใหญ่ต้องการให้ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปของเจลทาผิว เมื่อพัฒนาสูตรร่วมกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อสิวที่ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าสูตรที่เหมาะสมมีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย จากอบเชยจีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเจลทาผิวในตลาด พบว่าสามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* ได้ไม่แตกต่างจากผลิตภัณฑ์ในตลาด

พรพิมล และคณะ (101) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว *Propionibacterium acnes* จากสารสกัดของสาหร่ายทะเลที่พบในประเทศไทย 14 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Agar disc diffusion พร้อมทั้งหาปริมาณสารสกัด และสารโพลีฟีนอล ผลจากการศึกษาพบว่า สาหร่ายสีน้ำตาล *Lobophora australis* มีปริมาณสารสกัดและค่าโพลีฟีนอลสูงที่สุด และพบว่าสารสกัดของ *Padina minor*, *Lobophora australis* และ *Padina tetrastomatica* มีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียดีที่สุดโดย มีโซนใส (clear zone) เท่ากับ 12.83 ± 0.75 , 12.2 ± 0.34 และ 11.6 ± 0.36 มิลลิเมตร ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามผลที่ได้ยังมีค่าน้อยกว่ายาปฏิชีวนะคลินดามัยซิน (44.89 ± 2.30 มิลลิเมตร) นอกจากนี้ยังพบว่าสารยีสน้ำตาลโดยเฉพาะใน Family Dictyotaceae มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีที่สุด ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นองค์ความรู้ที่ช่วยส่งเสริมการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายทะเล และนำไปสู่การศึกษาต่อยอดหรือพัฒนาผลิตภัณฑ์รักษาสิวได้ต่อไปในอนาคต

วันวิสาข์ และคณะ (102) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อสิิว *P. acnes* จากสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ สมุนไพรที่มีน้ำหอมระเหยเป็นองค์ประกอบ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เทียนตาตักแดน เทียนขาว เทียนยาวพาดณี และ มะแขว่น และสมุนไพรที่มีสารฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบจาก หอมแดง ด้วยวิธี agar disc diffusion method และ broth dilution method และนำมาหาปริมาณสารสำคัญของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสิิว *P. acnes* ที่ดีที่สุด โดยหาปริมาณน้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่องมือ GC-MS ผลการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเทียนยาวพาดณี มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อดีที่สูงสุดมีค่า inhibition zone เท่ากับ 85.00 ± 0.00 มิลลิเมตร และค่า MIC เท่ากับ 3.555 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเทียนยาวพาดณี พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีทั้งหมดจำนวน 32 ชนิด โดยมี Thymol เป็นองค์ประกอบหลัก

ชลทิตา และวรรณรัตน์ (103) พัฒนาผลิตภัณฑ์รักษาสิิวักเสบรุนแรงเรื้อรังด้วยการใช้ส่วนผสมของสมุนไพรที่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียต้นเหตุสิิว และกำจัดอนุมูลอิสระเพื่อฟื้นฟูสภาพผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้ทำการศึกษาวิจัยน้ำมันสมุนไพรธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสูง และพบว่าน้ำมันสมุนไพรหลายชนิดมีความสามารถต้านทานแบคทีเรียได้ดีกว่า tea tree oil ที่นิยมใช้กันอยู่ในผลิตภัณฑ์รักษาสิิวในท้องตลาด โดยน้ำมันสมุนไพรเหล่านี้มีสารออกฤทธิ์ต้านทานแบคทีเรียที่มีโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถซึมผ่านชั้นผิวได้ดี และเมื่อใช้น้ำมันสมุนไพรหลายชนิดร่วมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม ทำการทดสอบในกลุ่มอาสาสมัครที่มีอาการเป็นสิิวักเสบรุนแรง พบว่าสามารถลดการอักเสบของสิิวลงได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่จำเป็นต้องรับประทานยาปฏิชีวนะร่วมด้วย และเมื่อทำการทดสอบการใช้อย่างต่อเนื่องเป็นประจำ พบว่าสามารถป้องกันการเกิดสิิวใหม่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นำน้ำมันสมุนไพรที่ประกอบด้วยสมุนไพร 4 ชนิด คือ *Melaleuca alternifolia*, *Eugenia caryophyllus*, *Cymbopogon martini* และ *Hyssopus officinalis* และนำสารออกฤทธิ์โมเลกุลขนาดเล็กในกลุ่มเทอร์ปีนหลายชนิดมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รักษาสิิว ได้แก่ โฟมล้างหน้า เจลแต้มสิิว และเจลล้างหน้า โดยผลการทดสอบในอาสาสมัคร พบว่าสามารถใช้รักษาอาการสิิวักเสบรุนแรงได้ผลดี เมื่อใช้ร่วมกับโฟมล้างหน้ากับเจลล้างหน้าที่ให้ความชุ่มชื้นสูง และมีค่า pH ที่เหมาะสม สามารถทำให้ผิวหน้าดีขึ้นได้ในระดับที่น่าพอใจ

วีระศักดิ์ (104) รายงานว่าไวโอลาซินเป็นสารรงควัตถุสีม่วงที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบ สารรงควัตถุนี้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และยังใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งได้ด้วย ในการศึกษานี้ได้ทำการแยกเชื้อจากโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่ พบเชื้อที่มีโคลิโนสีม่วงบนอาหาร nutrient broth ที่เติมทริปโตเฟน ความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย VB.1 ที่แยกได้โดยวิธีการด้านชีวเคมี และ 16S rDNA พบว่ามีความเหมือนเท่ากับ 99.7 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ *Chromobacterium violaceum* VB.1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Pseudomonas* sp. ที่ค่า MIC เท่ากับ 4.07, 8.13, 8.13 และ 8.13 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสารไวโอลาซินมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจำนวน 6 สายพันธุ์ พบว่าสารไวโอลาซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Aspergillus niger* และ *Fusarium* sp. ได้ดีที่สุดโดยให้ค่า MIC เท่ากับ 65 ไมโครกรัมต่อลิตร การตรวจสอบการต้านอนุมูลอิสระของไวโอลาซินได้ทำในระบบ 2 ระบบ คือ ซุปเปอร์ออกไซด์และการจับเหล็ก พบว่า มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 20 และ 3.01 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Durán และคณะ (105) ได้ทำการศึกษาศาสตร์ไวโอลาซินจากเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าสารไวโอลาซินบริสุทธิ์จากเชื้อ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์บราซิลเลียนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แต่มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี สารไวโอลาซินที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *Janthinobacterium lividum* เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ 21 สายพันธุ์ (18 species) พบว่า สารไวโอลาซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ 5 สายพันธุ์ (4 species) และอีกหนึ่งสายพันธุ์ของ *Bacillus subtilis*

Nakamura และคณะ (85) ได้ทำการศึกษาศาสตร์ไวโอลาซินที่ผสมระหว่างสารคือออกซิไวโอลาซินกับสารไวโอลาซินของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ RT102 พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus lichenniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Pseudomonas aeruginosa* สารไวโอลาซินสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์แบคทีเรียได้โดยอยู่ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสารไวโอลาซิน แต่ไวโอลาซินนอกจากจะยับยั้งการเจริญ และยังทำให้แบคทีเรียตายด้วยและการยับยั้งของสารไวโอลาซินขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย

Aoki และ Nomura (63) ศึกษาการทำเครื่องสำอางผสมสารไวโอลาซินจาก *Chromobacterium violaceum* ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อที่ประกอบด้วยเกลือ wood hydrolyzate, anthranilic acid และสารยีสต์สกัด พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของกรดลิโนเลอิกในเลือด รวมทั้งสามารถพัฒนาทำเป็นโลชั่นได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของสารไวโอลาซินและอนุพันธ์ยังสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางประเภทต่าง ๆ เช่น ลิปสติกและผลิตภัณฑ์ตกแต่งดวงตา (eye makeup) ได้อีกด้วย

Chidambaram และคณะ (106) ทำ spray drying ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งของ encapsulation โดยผงสีม่วงเข้มที่ผลิตจาก *Chromobacterium violaceum* UTM 5 จะถูกห่อหุ้มและสเปรย์ให้แห้ง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตผงสีม่วงจะมีการตรวจสอบเม็ดสีที่ห่อหุ้ม โดยมีความเสถียรสูงสุดตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 30 วัน ที่ pH 7 อุณหภูมิ 25-60 องศาเซลเซียส ผงสีม่วงที่ผลิตได้จะนำมาใช้เกี่ยวกับสีแต่งอาหาร เช่น โยเกิร์ต และวุ้น นอกจากนี้มีผลการยืนยันว่าการใช้สีข้อมจากธรรมชาติถือได้ว่าเป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งรายงานฉบับนี้เป็นรายงานแรกของการทำ spray drying ของสารสีม่วงจาก *Chromobacterium violaceum* และยังมีศักยภาพในการนำไปใช้ในด้านของผลิตภัณฑ์อาหาร

Hu และคณะ (107) ทำการเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด SLNs ด้วยวิธี Emulsion solvent diffusion method โดยใช้โมโนสเตียรีน (monostearin) เป็นไขมันแข็งห่อหุ้ม โคลปีทาซอล โพรพิโอเนต (clobetasol propionate) ซึ่งเป็นตัวยารักษาโรคเกี่ยวกับผิวหนัง เป็นตัวยาที่ละลายในไขมัน และใช้พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (Polyvinyl Alcohol, PVA) เป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาค่าศักย์ไฟฟ้าซิตาประสิทธิภาพการกักเก็บและการนำส่งตัวยา โดยทำการทดสอบการปลดปล่อยตัวยาเป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่าตัวยาที่ถูกกักเก็บในตัวพาไขมันชนิด SLNs ปลดปล่อยออกมาประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละวัน นอกจากนี้ยังศึกษาการเตรียม SLNs ที่สภาวะปกติ pH 5.73 เปรียบเทียบกับสภาวะที่เป็นกรด pH 1.1 โดยขนาดอนุภาคที่เตรียมได้ มีค่าเท่ากับ 312.2 และ 381.1 นาโนเมตร ค่าศักย์ไฟฟ้าซิตา เท่ากับ -14.3 และ 4.3 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ โดยภายใต้สภาวะที่เป็นกรด เป็นการเพิ่มไอออนบวก ในสารละลาย ทำให้ค่าศักย์ไฟฟ้าซิตาของอนุภาคไขมันจากติดลบไปจนถึงค่าใกล้ศูนย์ จึงทำให้อนุภาคเกิดการรวมตัวกัน

Hu และคณะ (88) ทำการเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด SLNs เปรียบเทียบกับชนิด NLCs ด้วยวิธี Solvent diffusion method โดยการเตรียม NLCs ใช้กรดสเตียริกเป็นไขมันชนิดแข็งและกรดโอเลอิกเป็นไขมันชนิดเหลว ห่อหุ้มตัวยาคือโคลปีทาซอล โพรพิโอเนต (clobetasol propionate) จากผลการทดลองรายงานว่าอนุภาคไขมันชนิด NLCs มีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยาได้มากกว่าชนิด SLNs เนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้างระหว่างไขมันแข็งและไขมันเหลว ทำให้โครงสร้างเมทริกซ์ของอนุภาคมีโครงสร้างที่ไม่เป็นระเบียบ จึงส่งผลให้ตัวยาสามารถแทรกตัวอยู่ใน NLCs ในปริมาณมากกว่าโครงสร้างที่เป็นระเบียบของ SLNs จากการศึกษาการปลดปล่อยตัวยาของอนุภาคทั้ง 2 ชนิด พบว่า SLNs ปลดปล่อยตัวยาออกมาได้ช้ากว่าชนิด NLCs โดยให้เหตุผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Yuan และคณะ (89) ที่รายงานว่าอัตราการปลดปล่อยตัวยามากขึ้นเมื่อปริมาณกรดโอเลอิกเพิ่มขึ้น เนื่องจากตัวยาสามารถแทรกตัวผ่านไขมันชนิดเหลวได้ดีกว่าไขมันแข็ง

Patel และคณะ (108) ศึกษาการขึ้นรูปอนุภาคนาโนไขมันด้วยกรดสเตียริกร่วมกับกรดโอเลอิก ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ melt-emulsification, low temperature-solidification และ high-speed homogenization พบว่าอนุภาค NLC ที่อยู่ในสารละลายมีขนาดอยู่ระหว่าง 233

และ 286 นาโนเมตร มีประสิทธิภาพในการกักเก็บตัวยา aceclofenac ที่ละลายในไขมันได้สูงถึง 67-82 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการกระจายตัวของอนุภาคที่ดี และตัวยามีการออกฤทธิ์การต้านอาการอักเสบได้ดีกว่าสินค้าที่ขายในท้องตลาดเกือบสองเท่า

ขวัญศิริ (109) ทำการเตรียม NLC ด้วยเทคนิค melt-emulsification โดยมีวิตามินอีและสารสกัดจากเมล็ดอ่อนเป็นตัวแทนของสารสำคัญที่ละลายในไขมันและละลายในน้ำ ทำการศึกษาการแปรผันในปัจจัยต่าง ๆ คือการใช้อัตราส่วนไขมันเหลวต่อไขมันแข็ง คือ ไขมันเมล็ดเตาะ (SF) ต่อกรดสเตียริก (SA) เท่ากับ 3:1 ความเข้มข้น Tween 20 เท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เวลาในการ sonicate เท่ากับ 10 นาที และความเข้มข้นวิตามินอี เท่ากับ 5.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อนุภาคตัวพาไขมันระดับนาโนเมตรบรรจุวิตามินอี มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 139.43 ± 1.15 นาโนเมตร โดยมีค่า PI เท่ากับ 0.165 ± 0.017 และค่า ZP เท่ากับ -31.0 ± 0.8 มิลลิโวลต์ ความคงตัวทางกายภาพภายใต้อุณหภูมิการเก็บรักษาที่แตกต่างกันเป็นระยะเวลา 2 เดือนพบว่า NLCs ที่บรรจุวิตามินอี มีเสถียรภาพที่ดี มีการปลดปล่อยของวิตามินอีและสารสกัดจากเมล็ดอ่อนมะม่วงออกจากอนุภาคตัวพาไขมันระดับนาโนเมตรแสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างกัน

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) (JEM 1400 Flash, Jeol, Ltd., Japan)
2. เครื่องกลั่นระเหยสารสูญญากาศแบบหมุน (Rotary evaporator) (Model Laborota 4011, Heidolph[®], Germany)
3. เครื่องกวนผสมสาร (Mechanical stirrer) (Heidolph[®], Germany)
4. เครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicator) (SONICS[®] Vibra cell, USA)
5. เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (METTLER TOLEDO[®], Switzerland)
6. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) (Alpha 1-2 Id plus, CHRIST[®], UK)
7. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (G560E, Scientific Industries, USA)
8. เครื่องวัดขนาดอนุภาคนาโนเมตร (Particle analyzer) (Delsa[™] Nano C, BECKMAN COULTER[®], USA)
9. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (UV1800, Shimadzu, Japan)
10. เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate Reader) (EZ Read 2000, UK)
11. เครื่องเพาะเชื้อแบบเขย่า (Shaker) (VS-2030, VISION SCIENTIFIC, USA)
12. เครื่องเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูง (Model 3700, Kubota, Japan)
13. ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ (-80 °c) (ULT2586-10-A, Thermo Fisher Scientific, USA)
14. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Mettmert, Germany)
15. ตู้ปลอดเชื้อ Cass II (Laminar air flow) (MARK II, Dwyer, USA)
16. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (D06062 modell600, Metmert, Germany)
17. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอน้ำ (Autoclave) (Ha-300 MII, Japan)
18. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Sv1422, Metmert, Germany)
19. กรวยกรอง (Funnel)
20. กรวยแยกสาร (Separatory funnel) ขนาด 500 มิลลิลิตร
21. ขวดก้นกลม (Round-bottom flask)
22. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
23. เข็มฉีดยา (Needle)

24. คิวเวตต์วัดค่าการดูดกลืนแสง (Cuvette)
25. งานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร
26. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
27. โถบ่มไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar) (Thermo Scientific™, USA)
28. แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
29. แท่นให้ความร้อน (Hot plate)
30. แท่นกวนสาร (Stirrer)
31. บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100, 250, 600 และ 1000 มิลลิลิตร (Pyrex®, Germany)
32. ปิเปตต์ (Pipette) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร (Precicolor, Germany)
33. พาราฟิล์ม (Parafilm) (Parafilm M, Bemis, USA)
34. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette) (Bio-Rad®, USA)
35. ไมโครปิเปตต์ทิวป์ (Micropipette Tip) ขนาด 10, 200, 1000 ไมโครลิตร
36. ไม้พันสำลี (Cotton swab) ขนาด S
37. หลอดทดลอง (Test tube) (Pyrex®, Germany)
38. หลอดทดลองขนาด 2 มิลลิลิตร (Microtube) (Eppendorf, Germany)
39. หัวง่ายเชื้อ (Inoculating loop)
40. Cork borer No.4
41. Gaspak 2.5 L (Thermo Scientific™, USA)
42. Syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร
43. 96 well micro titer plate

2. สารเคมี

1. ABTS⁺ (2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) (Sigma-Aldrich, Germany)
2. Ampicillin (บริษัท ทีพี ตรี๊ก แลบบอราทอรี่ส์ (1969) จำกัด ประเทศไทย)
3. Caprylic/capric triglycerids (Lexol® GT-865) (Inolex Chemical, USA)
4. Clindamycin (600mg/4mL) (บริษัท มิลลิเมต จำกัด ประเทศไทย)
5. Deionized water
6. Dimethyl sulfoxide (Fisher Scientific, England)
7. DPPH* (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich, Germany)
8. Ethanol (Merck, Germany)

9. Ethyl acetate (Merck, Germany)
10. Glycerol (Fisher scientific, England)
11. Glyceryl behenate (Compritol[®] 888 ATO) (Gattefossé, France)
12. L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Germany)
13. Methanol (Merck, Germany)
14. Oleic acid
15. Poloxamer-188 (บริษัท วันรัต (หน้าเซียน) จำกัด ประเทศไทย)
16. Polysorbate 20 (Tween[®]20) (Ajax finechem, Australia)
17. Polysorbate 80 (Tween[®]80) (Ajax finechem, Australia)
18. Potassium Persulfate (K₂S₂O₈) (Ajax finechem, Australia)
19. Resazurin (Sigma-Aldrich, Germany)
20. Stearic acid (บริษัท วันรัต (หน้าเซียน) จำกัด ประเทศไทย)

3. อาหารเพาะเชื้อ

1. Brain Heart Infusion agar (BHI agar) (Himedia, India)
2. Brain Heart Infusion broth (BHI broth) (Himedia, India)
3. Muller Hinton Agar (MHA) (Himedia, India)
4. Muller Hinton Broth (MHB) (Himedia, India)
5. Nutrient Agar (NA) (Himedia, India)
6. Nutrient Broth (NB) (Himedia, India)
7. Trypticase Soy Agar (TSA) (Himedia, India)
8. Trypticase Soy Broth (TSB) Himedia, India)

4. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

1. *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 ซึ่งใช้ในการสกัดสารไวโอลาซิน
2. *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 (ชื่อเดิม *Propionibacterium acnes*)
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
4. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ในการทดสอบ (Stock culture)

นำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* มาทำการเพิ่มจำนวนในอาหารเพาะเชื้อเหลว Trypticase Soy broth (TSB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมา streak ลงบนอาหารเพาะเชื้อแข็ง Trypticase Soy agar (TSA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

นำเชื้อ *Cutibacterium acnes* ทำการเพิ่มจำนวนในอาหารเพาะเชื้อเหลว Brain heart infusion broth (BHI broth) โดยผสม 1% glucose (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีออกซิเจน (anaerobic) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยสังเกตความขุ่นของอาหารเพาะเชื้อเหลว ถ้าอาหารเพาะเชื้อเกิดความขุ่นขึ้นเพียงเล็กน้อยให้บ่มต่อไปประมาณ 60-72 ชั่วโมง จากนั้นนำไป streak บนอาหารเพาะเชื้อแข็ง Brain heart infusion agar (BHI agar) ซึ่งผสม 1% glucose (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) และทำการบ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ภาคผนวก ข)

เมื่อบ่มเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์บนอาหารเพาะเชื้อแข็งตามเวลาที่กล่าวมาในข้างต้นแล้ว นำโคโลนีเดี่ยวทำการย้อมสีแกรม และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยดูลักษณะการติดสีแกรม การเรียงตัวของเซลล์ จากนั้นทำการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอาหารเหลวสำหรับเชื้อแต่ละชนิดผสมกับกลีเซอรอล 45% (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.2 การศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซิน

1. การศึกษาผลของการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซิน

แบ่งชุดการทดลองเป็น 4 ชุด ได้แก่

ชุดที่ 1 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที

ชุดที่ 2 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

ชุดที่ 3 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

ชุดที่ 4 เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

1) นำ *C. violaceum* ATCC 12472 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) โดยแบ่งเป็น 4 ชุดการทดลองข้างต้น โดยแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

2) ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย (ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.08-0.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเชื้อปริมาณ 100 มิลลิลิตร

3) นำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้อง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบตามแต่ละชุดการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ ทำการวัดค่าความเข้มข้นของสารสีไวโอลาซินที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งของสารไวโอลาซินโดยวิธี (AOAC, 1999) (ภาคผนวก ค)

2. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซิน

แบ่งชุดการทดลองเป็น 3 ชุด ได้แก่

ชุดที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ชุดที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ชุดที่ 3 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

1) นำ *C. violaceum* ATCC 12472 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ Nutrient Broth (NB) โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ดังรายละเอียดข้างต้น และแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

2) ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย (ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.08-0.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเชื้อปริมาณ 100 มิลลิลิตร

3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิตามชุดการทดลอง โดยเขย่าที่ความเร็วรอบที่คัดเลือกได้จากการศึกษาผลของการให้อากาศที่เหมาะสม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ ทำการวัดค่าความเข้มข้นของสารสีไวโอลาซินที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งของสารไวโอลาซิน

3. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซิน

แบ่งชุดการทดลองเป็น 5 ชุด ได้แก่

ชุดที่ 1 บ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 0 วัน

ชุดที่ 2 บ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 1 วัน

ชุดที่ 3 บ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 3 วัน

ชุดที่ 4 บ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 5 วัน

ชุดที่ 5 บ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน

- 1) นำ *C. violaceum* ATCC 12472 ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ Nutrient Broth (NB) โดยแบ่งเป็น 5 ชุดการทดลอง ดังรายละเอียดข้างต้น และแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ
- 2) ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย (ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.08-0.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
- 3) นำไปบ่มเขย่าโดยใช้อุณหภูมิที่คัดเลือกจากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งบ่มเขย่าเป็นระยะเวลาตามชุดการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น โดยเขย่าที่ความเร็วรอบที่คัดเลือกได้
- 4) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ ทำการวัดค่าความเข้มข้นของสารสีไวโอลาซินที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้งของสารไวโอลาซิน

3.2.3 การสกัดสารไวโอลาซินจากเชื้อ *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472

- 1) นำเชื้อ *C. violaceum* ATCC 12472 มาทำการเพาะเลี้ยงใน Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยบ่มเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเชื้อ NB ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยกำหนดค่าความขุ่นให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.08-0.1
- 3) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง
- 4) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาสกัดด้วยตัวทำละลาย ethyl acetate จำนวน 3 รอบ โดยรอบที่ 1 ใช้ ethyl acetate ปริมาตร 60 มิลลิลิตร จากนั้นทำการสกัดซ้ำอีก 2 รอบโดยใช้ ethyl acetate 40 และ 30 มิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อให้ตัวทำละลายสกัดสารไวโอลาซินออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์
- 5) นำสารไวโอลาซินที่สกัดได้มาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- 6) เมื่อระเหยตัวทำละลายออกหมดแล้ว นำสารสกัดที่ได้ไปทำแห้งเยือกแข็งแบบสุญญากาศ ด้วยวิธีการ freeze dried เป็นเวลาประมาณ 72-96 ชั่วโมง เพื่อให้สารไวโอลาซินที่สกัดได้มีความแห้ง
- 7) เมื่อสารสกัดแห้งสนิทแล้ว ชั่งน้ำหนักสารสีที่ได้ด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และทำการเก็บตัวอย่างใส่ขวดสีชา ปิดฝาให้สนิท พันทับด้วย parafilm จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดไวโอลาซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Agar well diffusion

1) นำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* streak ลงบนอาหารเพาะเชื้อแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *Cutibacterium acnes* นำมา streak บนอาหาร BHI agar+1% glucose นำไปบ่มที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60-72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ

2) ถ่ายเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ชนิดลงอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียมเชื้อเริ่มต้น โดยวัดค่าความขุ่นให้อยู่ในช่วง 0.08-0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สำหรับเชื้อ *C. acnes* ให้ถ่ายเชื้อลงใน BHI Broth+ 1% glucose ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน ทำการเตรียมเชื้อเริ่มต้น โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.4 ± 0.025

3) ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มลงในหลอดเพาะเชื้อเริ่มต้น จากนั้นนำมา swab ให้ทั่วบนผิวหน้าอาหารเพาะเชื้อแข็งโดยป้ายเป็น 3 ระบายให้ถี่ที่สุด (three dimension swab) ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 5-10 นาที

4) นำ cork borer เบอร์ 4 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร) เจาะหลุมบนอาหาร MHA หรือ BHI agar+ 1% glucose ที่ทำการป้ายเชื้อไว้ในข้อที่ 3

5) ปิเปตต์สารสกัดไวโอลาซินที่ละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 30 mg/ml ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ได้ทำการเจาะไว้

6) ปิเปตต์ DMSO และ ยาปฏิชีวนะ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้โดยกำหนดให้ negative control คือ DMSO และ ยาปฏิชีวนะ คือ positive control ได้แก่ Ampicillin 200 $\mu\text{g/ml}$ ใช้สำหรับ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ส่วนยา Clindamycin 200 $\mu\text{g/ml}$ ใช้สำหรับ *C. acnes* (ภาคผนวก ก หมายเลข 9)

7) นำจานเพาะเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* บ่มที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. acnes* บ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยการใช้ vernier caliper วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (inhibition zone) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร โดยขนาดโซนยับยั้งที่วัดได้เป็นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ cork borer และขนาดโซนยับยั้งของเชื้อ หักลบด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ cork borer (8 มิลลิเมตร)

8) ทำการทดลองทั้งหมดซ้ำอีก 2 การทดลอง จะรวมทั้งสิ้นเท่ากับ 3 การทดลอง จากนั้นนำผลการทดสอบที่ได้ทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.2.5 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัด

ในการศึกษาค่าต่ำสุด Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัด จะดำเนินการตามวิธีมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ซึ่งการหาค่าดังกล่าวจะทำให้ทราบปริมาณสารสกัดที่ทดสอบอย่างน้อยที่สุดที่แสดงผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยดำเนินการดังนี้

เตรียมเชื้อทดสอบให้มีค่า OD₆₀₀ อยู่ในช่วง 0.08-0.1 จากนั้นปิเปตต์อาหาร MHB สำหรับ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมทดสอบ จากนั้นปิเปตต์สารไวโอลาซินใส่ลงในหลุม 50 ไมโครลิตร แล้วเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้น 15-0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ง) ทำการปิเปตต์เชื้อทดสอบ 50 ไมโครลิตร ลงในสารสกัดทุกความเข้มข้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม resazurin 1.8 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) ลงในหลุมทดสอบ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

สำหรับ *Cutibacterium acnes* ทำการเตรียมเชื้อทดสอบให้มีค่า OD₅₉₅ อยู่ในช่วง 0.4±0.025 จากนั้นปิเปตต์อาหาร BHI broth+1% glucose ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมทดสอบ จากนั้นปิเปตต์สารไวโอลาซินใส่ลงในหลุม 50 ไมโครลิตร แล้วเจือจางสารสกัดให้มีความเข้มข้น 15-0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการปิเปตต์เชื้อทดสอบ 50 ไมโครลิตร ลงในสารสกัดทุกความเข้มข้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 ชั่วโมงขึ้นไป ในสภาวะไม่มีออกซิเจน (anaerobic jar)

การอ่านผลสังเกตจากการเปลี่ยนสีของริซาซูริน (resazurin) ที่ให้สีน้ำเงิน โดยถ้าไม่มีการเจริญของเชื้อทดสอบจะเป็นสีน้ำเงินคงเดิม แต่ถ้ามีการเจริญของเชื้อทดสอบสีของ resazurin จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพู ดังนั้นหลุมสุดท้ายที่เป็นสีน้ำเงินคือความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) จากนั้นใช้หัววงถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อจากทุกหลุมทดสอบ มาขีดลงบนอาหารเพาะเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าไม่พบการเจริญของเชื้อทดสอบ แสดงว่าสามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ (MBC)

3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไวโอลาซีน

3.3.1 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{*})

ในการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH^{*} radical scavenging ใช้ L-ascorbic acid (vitamin C) เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียม vitamin C (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) เข้มข้น 6, 8, 10, 12 และ 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารละลาย DPPH^{*} ในเอทานอลความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (mM) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) จากนั้นเตรียมสารตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ โดยนำสารสกัดไวโอลาซีนละลายในเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 5 ความเข้มข้น ทำการปิเปตต์สารตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH^{*} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันใน 96 well micro titer plate โดยแต่ละหลุมจะมีปริมาตรรวมทั้งสิ้นเท่ากับ 150 ไมโครลิตร (110) ดังนี้

หลุมที่	สารตัวอย่าง หรือ สารมาตรฐาน (μl)	เอทานอล (μl)	สารละลาย DPPH [*] (μl)
1	Blank	50	100
2	Sample	50	0
3	Positive control	0	50
4	Negative control	0	150

จากนั้นนำไปปมที่อุณหภูมิห้อง ในที่มีดเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท โดยใช้ L-ascorbic acid เป็นตัวเทียบมาตรฐาน ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการที่ 8

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[(A_{\text{positive}} - A_{\text{negative}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})] \times 100}{(A_{\text{positive}} - A_{\text{negative}})} \quad (\text{สมการ 8})$$

นำค่าจากการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่างที่วัดได้ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition (แกน y) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัด (แกน x) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH^{*} ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀)

3.3.2 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2(2,2'-azinobis-[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) (ABTS^{•+})

ในการวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS^{•+} ใช้ L-ascorbic acid (vitamin C) เป็นสารมาตรฐาน โดยเตรียม vitamin C เข้มข้น 9, 11, 13, 15 และ 17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารละลาย ABTS^{•+} เข้มข้น 7 mM (ภาคผนวก ก หมายเลข 13) และสารละลาย Potassium persulfate (K₂S₂O₈) เข้มข้น 2.45 mM (ภาคผนวก ก หมายเลข 14)

ผสมสารละลาย ABTS^{•+} และ สารละลาย K₂S₂O₈ อัตราส่วน 1:1 ในขวดแก้ว สีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มีดให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จะได้สารละลาย ABTS^{•+} radical cation จากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS^{•+} radical cation ด้วยเอทานอลให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรเท่ากับ 0.7±0.02

นำสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มา 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย ABTS^{•+} 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ใช้เอทานอลเป็น blank และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการที่ 9

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A_b - A_s) \times 100}{A_b} \quad (\text{สมการ 9})$$

เมื่อกำหนดให้

A_b คือค่าการดูดกลืนแสงเมื่อไม่มีสารมาตรฐาน

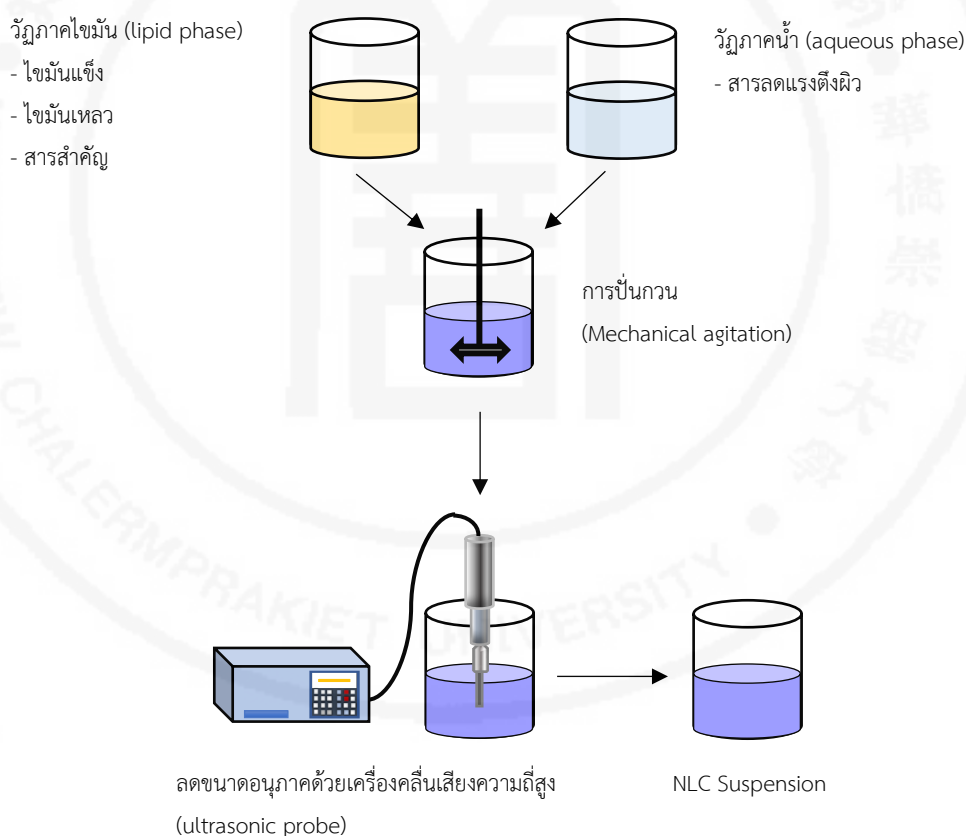
A_s คือค่าการดูดกลืนแสงเมื่อมีสารมาตรฐานหรือสารตัวอย่าง

นำค่าจากการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานหรือสารตัวอย่างที่วัดได้ มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Inhibition (แกน y) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัด (แกน x) เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานหรือสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูล ABTS^{•+} ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC₅₀)

3.4 การเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ด้วยวิธี melt-emulsification

การเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs สามารถเตรียมได้โดยแบ่งสารออกเป็น 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคไขมัน (lipid phase) และวัฏภาคน้ำ (aqueous phase) โดยนำส่วนผสมของ วัฏภาคไขมันไปหลอมละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อย ๆ เทผสมลงในวัฏภาคน้ำที่มี อุณหภูมิใกล้เคียงกันกับวัฏภาคไขมัน ทำการปั่นกวนด้วยเครื่องปั่นผสม สารละลายจะเกิดเป็นอิมัลชัน และนำไปลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic probe) เพื่อให้เกิดเป็นอิมัลชัน ขนาดเล็ก (mini-emulsion) จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วในน้ำเย็นซึ่งต้องทำการกวนอย่างต่อเนื่องจนเกิดเป็นอนุภาคนาโนที่กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ โดยแสดงขั้นตอนการเตรียมในภาพที่ 11

ภาพที่ 11 การเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ด้วยวิธี melt-emulsification



การวิจัยในครั้งนี้ทำการเตรียมอนุภาคนาโนไขมันพื้น (NLCs-Base) ออกเป็น 12 สูตร ดัดแปลงจาก (89,109,111,112) แสดงดังตารางที่ 3 ซึ่งเป็นขั้นตอนเริ่มต้นในการคัดเลือกชนิดของ ไขมันแข็ง ไขมันเหลว และสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสม ซึ่งจะคัดเลือกจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของอนุภาค (particle size) และค่าดัชนีการกระจายตัว (polydispersity index, PI) จากนั้นจะ นำ 1 สูตรตำรับที่เหมาะสมที่คัดเลือกได้ไปทำการพัฒนาสูตรตำรับที่เหมาะสมในลำดับต่อไป

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs (สูตรตำรับที่ 1-12)

สารเคมี (%w/w)	สูตรตำรับ (%w/w)											
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Oil phase												
Lexol [®] GT-865	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
Oleic acid	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1
Compritol [®] 888 ATO	1	1	1	-	-	-	1	1	1	-	-	-
Stearic acid	-	-	-	1	1	1	-	-	-	1	1	1
Water phase												
Tween 20	1.5	-	-	1.5	-	-	1.5	-	-	1.5	-	-
Tween 80	-	1.5	-	-	1.5	-	-	1.5	-	-	1.5	-
Poloxamer 188	-	-	1.5	-	-	1.5	-	-	1.5	-	-	1.5
Deionized water	q.s. to100											

ตารางที่ 4 การพัฒนาส่วนประกอบของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs (สูตรตำรับที่ 13-20)

สูตรที่	การแปรผัน	ชนิดของไขมัน เหลวและ ไขมันแข็ง	ชนิดของ สารลด แรงตึงผิว	อัตราส่วน ไขมัน (LL:SL)	%SC	ST (min)
F13	อัตราส่วน ไขมันเหลว:ไขมันแข็ง (LL:SL)	คัดเลือกจาก สูตรที่ 1-12	คัดเลือกจาก สูตรที่ 1-12	1:2	1.5	5
F14				2:1		
F15				1:3		
F16				3:1		
F17	ความเข้มข้นสาร ลดแรงตึงผิว (%SC)	สูตรที่ 1-12	สูตรที่ 1-12	คัดเลือก จากสูตรที่ 13-16	2	10
F18					3	
F19	ระยะเวลาในการ sonicate (ST)	สูตรที่ 1-12	สูตรที่ 1-12	คัดเลือก จากสูตร ที่ 17-18	เลือก จากสูตร ที่ 17-18	10
F20						15

3.4.1 การพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs (109)

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเลือก 1 สูตรตำรับจากหัวข้อ 3.4 ที่เหมาะสม คือสูตรที่ 7 นำมาพัฒนาสูตรตำรับต่อไป โดยศึกษาการแปรผันต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 4 ได้แก่

- อัตราส่วนของไขมันเหลวต่อไขมันแข็ง (Liquid Lipid:Solid Lipid) (LL:SL)
- ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (Surfactant Concentration) (%SC)
- เวลาที่ใช้ในการลดขนาดอนุภาคด้วยวิธีการ sonicate (Sonication Time) (ST)

3.4.2 การพัฒนาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่บรรจุสารสกัดไวโอลาซิน

นำสูตรตำรับที่เหมาะสมซึ่งทำการคัดเลือกจากสูตรที่ 13-20 มาทำการพัฒนาสูตรตำรับโดยทำการทดสอบการบรรจุสารไวโอลาซินที่มีความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยละลายสารไวโอลาซินความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบด้วย Ethyl alcohol และใส่ในวัฏภาคไขมัน นำส่วนผสมของวัฏภาคไขมันไปหลอมละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อย ๆ เทผสมลงในวัฏภาคน้ำที่มีอุณหภูมิใกล้เคียงกันกับวัฏภาคไขมัน ทำการปั่นกวนด้วยเครื่องปั่นผสมเป็นเวลา 10 นาที สารละลายจะเกิดเป็นอิมัลชัน จากนั้นนำไปลดขนาดอนุภาคด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic probe) เพื่อให้เกิดเป็นอิมัลชันขนาดเล็ก (mini-emulsion) จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วในน้ำเย็นซึ่งต้องทำการกวนอย่างต่อเนื่องจนเกิดเป็นอนุภาคนาโนที่กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบในการพัฒนาอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน

วัฏภาค	สารเคมี	สูตรตำรับ (%w/w)	
		F21	F22
วัฏภาคน้ำมัน	Oleic acid	3	3
	Compritol® 888 ATO	1	1
	Violacein*	1	2
วัฏภาคน้ำ	Tween 20	1.5	1.5
	Deionized water	q.s. to100	

*ความเข้มข้นของสารไวโอลาซินใน Ethyl alcohol

3.5 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของอนุภาคนาไขมันระดับนาโนชนิด NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน

3.5.1 การประเมินลักษณะทางกายภาพ (113)

- สี: ทำการสังเกตดูลักษณะสีของตำรับ แล้วบันทึกผล
- กลิ่น: ทำการดมกลิ่นของตำรับที่ได้แล้วบันทึกผล
- การแยกชั้น: สังเกตดูลักษณะการแยกชั้นที่เกิดขึ้นแล้วบันทึกผล

3.5.2 การวัดหาขนาดอนุภาค (Particle size) ค่าดัชนีการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (Polydispersity index, PI) และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (Zeta-potential) โดยใช้เครื่อง Particle size analyzer

ทำการเจือจางตัวอย่าง NLCs ลง 20 เท่าด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นนำไปตรวจสอบโดยใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาค Delsa™ Nano C ซึ่งจะแสดงผลทั้งในส่วนของขนาดอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายตัว และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (109)

3.5.3 การตรวจสอบโครงสร้างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาไขมันระดับนาโนชนิด NLCs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Transmission electron microscope (TEM)

นำตัวอย่างสารละลายอนุภาค NLCs ทำการเจือจางในน้ำปราศจากไอออน 10 เท่า ทำการดูดสารละลาย 1 หยด หยดลงบนแผ่นโลหะทองแดง และทำการย้อมด้วย 2% uranyl acetate จากนั้นทิ้งให้แห้งสนิท (ประมาณ 18-24 ชั่วโมง) และนำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องชนิด TEM รุ่น JEM 1400 Flash (ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

3.6 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของอนุภาคนาไขมันระดับนาโนชนิด NLCs

เตรียมตัวอย่างอนุภาคนาไขมันระดับนาโนชนิด NLCs ปริมาณ 30 กรัม ในขวดแก้วที่ปิดสนิท ทำการเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่

- เก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงสลับต่ำ (heating cooling cycle) โดยการเก็บไว้ในตู้เย็น (4 °C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเข้าตู้อบ (45 °C) 48 ชั่วโมง ซึ่งนับเป็น 1 รอบ ทำการสลับอุณหภูมิทั้งหมด 6 รอบ โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ เช่น ลักษณะของสี กลิ่น และการแยกชั้นของตำรับ

- เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 7, 15, 30, 60 และ 90 วันตามลำดับ ซึ่งเมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดไว้จะนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ ขนาดของอนุภาค (particle size) ดัชนีการกระจายตัว (polydispersity index, PI) ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (zeta potential) และการยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคสัตว์ด้วยวิธี Agar dilution plate

3.7 การทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนไขมันที่บรรจุสารไวโอลาซินซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี Agar dilution plate (114)

1. เตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Cutibacterium acnes* โดยวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับขั้นตอนการทำ Agar well diffusion (หัวข้อที่ 3.2.4)

2. เตรียมอาหารเพาะเชื้อแข็ง MHA เพื่อใช้ทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* สำหรับ *Cutibacterium acnes* ใช้ BHI agar+1% glucose โดยทำการอุ่นอาหารเพาะเชื้อแข็งปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส

3. นำตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซินในความเข้มข้นต่าง ๆ เติมลงไปผสมกับอาหารเพาะเชื้อที่อุ่นไว้ ผสมให้ตำรับเป็นเนื้อเดียวกันกับอาหารเพาะเชื้อ

4. เทอาหารที่มีตำรับ NLCs ลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเพาะเชื้อแข็งตัว และผิวหน้าของอาหารแห้งสนิท

5. นำเชื้อทดสอบที่เตรียมได้จากข้อที่ 1 ทำการหยด (spot) ลงบนอาหารเพาะเชื้อ โดยทำการหยดจุดละ 2 ไมโครลิตร รอให้เชื้อที่หยดแห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *Cutibacterium acnes* บ่มที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 3 วัน

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาผลของการเขย่าให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซีนของเชื้อ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472

เมื่อทำการเพาะเชื้อ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 ในอาหารเพาะเชื้อเหลว Nutrient Broth โดยเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.08 – 0.10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่ออาหารเพาะเชื้อ 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเขย่าให้อากาศโดยใช้ความเร็วรอบที่แตกต่างกัน ได้แก่ 100 150 200 และ 250 รอบต่อนาที จากการทดลองเมื่อเก็บตัวอย่างที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ส่งผลให้เชื้อ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 มีการเจริญและผลิตสารไวโอลาซีนได้มากที่สุด โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งของสารสีไวโอลาซีนเท่ากับ 2.87 กรัมต่อลิตร และค่าความเข้มข้นของสารไวโอลาซีนเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือที่อัตราการเขย่าที่ 250, 150 รอบต่อนาที ตามลำดับ ซึ่งให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของสารไวโอลาซีนเท่ากับ 2.56 และ 2.49 กรัมต่อลิตร และค่าความเข้มข้นของสารไวโอลาซีนเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร ทั้งสองความเร็วรอบในการเขย่าเมื่อพิจารณาการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที พบว่าเชื่อดังกล่าว มีอัตราการเจริญของเชื้อส่งผลให้ผลิตสารไวโอลาซีนได้น้อยที่สุด โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งของสารสีไวโอลาซีนเท่ากับ 1.91 กรัมต่อลิตร และค่าความเข้มข้นของไวโอลาซีนเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 6 ดังนั้นความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศจึงมีผลต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตสารไวโอลาซีน เนื่องจากในขั้นตอนการสังเคราะห์สารไวโอลาซีนนั้นเชื้อ *Chromobacterium violaceum* จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการออกซิไดซ์สารตั้งต้นให้กลายเป็นสารไวโอลาซีนที่สมบูรณ์ (24)

ตารางที่ 6 การศึกษาผลของการเขย่าให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซินของ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472

ความเร็วรอบที่เขย่าให้อากาศ (รอบต่อนาที)	น้ำหนักแห้งของ สารสีไวโอลาซิน (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเข้มข้นของ สารสีไวโอลาซิน (กรัมต่อลิตร)
100	1.91±0.01	0.01±0.01
150	2.49±0.02	0.01±0.01
200	2.87±0.03	0.02±0.01
250	2.56±0.02	0.01±0.02

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

4.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่สร้างสารไวโอลาซินจาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472

เมื่อทำการเพาะเชื้อ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 ในอาหารเพาะเชื้อเหลว Nutrient Broth โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้เท่ากับ 0.08 – 0.10 ทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีและบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ซึ่งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ให้ปริมาณสารไวโอลาซินมากที่สุดเท่ากับ 2.14 กรัมต่อลิตร ค่าความเข้มข้นของสารไวโอลาซินเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ปริมาณสารไวโอลาซินเท่ากับ 1.51 กรัมต่อลิตร ค่าความเข้มข้นของสารไวโอลาซินเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร และพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ให้ปริมาณสารไวโอลาซินน้อยที่สุดเท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 7)

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 สามารถเจริญและสร้างสารไวโอลาซินได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส (mesophilic bacteria) แต่ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อ *Chromobacterium violaceum* ไม่มีความสามารถในการผลิต สารไวโอลาซินและเจริญได้น้อยมาก สอดคล้องกับการศึกษาของเชื้อ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ VB.1 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 25-37 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและมีการผลิตสารไวโอลาซินมากที่สุด (104)

ตารางที่ 7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่สร้างสารไวโอลาซินจาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักแห้งของ สารสีไวโอลาซิน (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเข้มข้นของ สารสีไวโอลาซิน (กรัมต่อลิตร)
25	1.51±0.01	0.01±0.01
30	2.14±0.01	0.02±0.01
40	0.04±0.02	0

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

4.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซินของเชื้อ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472

เมื่อทำการศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน จากผลการทดลองพบว่า ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลาที่ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งของสารสีไวโอลาซินมากที่สุดเท่ากับ 2.59 กรัมต่อลิตร และปริมาณความเข้มข้นของสารสีไวโอลาซินเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 8) ผลจากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารไวโอลาซิน พบว่าเชื้อมีการผลิตสาร ไวโอลาซินตั้งแต่เริ่มมีการเจริญและมีการผลิตสารไวโอลาซินสูงสุดเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะ stationary phase โดยสังเกตจากสีของอาหารเพาะเชื้อจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีม่วงที่ชั่วโมงที่ 12 และจะให้สีม่วงเข้มมาก ๆ ที่ชั่วโมงที่ 36 แสดงดังแผนภูมิที่ 1 เมื่อทำการหาปริมาณสารไวโอลาซินพบว่าให้ปริมาณของสารไวโอลาซินมีค่าเท่ากับ 2.59 กรัมต่อลิตร และจากการทดลองพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อมากกว่า 36 ชั่วโมงขึ้นไป ส่งผลให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ลดลงตามลำดับ (ตารางที่ 9)

สอดคล้องกับผลการทดลองของวีระศักดิ์ (104) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารไวโอลาซินของ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ VB.1 พบว่าในชั่วโมงที่ 12 เริ่มมีการผลิตสารไวโอลาซินและค่าการเจริญของเชื้อที่เจริญได้ดีที่สุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 36 โดยให้ปริมาณของสารไวโอลาซินเท่ากับ 0.51 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 8 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและการผลิตสารไวโอลาซินของเชื้อ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472

ระยะเวลา (วัน)	น้ำหนักแห้งของ สารสีไวโอลาซิน (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเข้มข้นของ สารสีไวโอลาซิน (กรัมต่อลิตร)
0	0	0
1	1.73±0.01	0.02±0.01
3	2.59±0.02	0.03±0.01
5	1.34±0.02	0.02±0.01
7	0.91±0.01	0.01±0.01

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 9 ผลการศึกษาระยะเวลาต่อการเจริญของเชื้อ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 ที่มีผลต่อการผลิตสารสีไวโอลาซิน

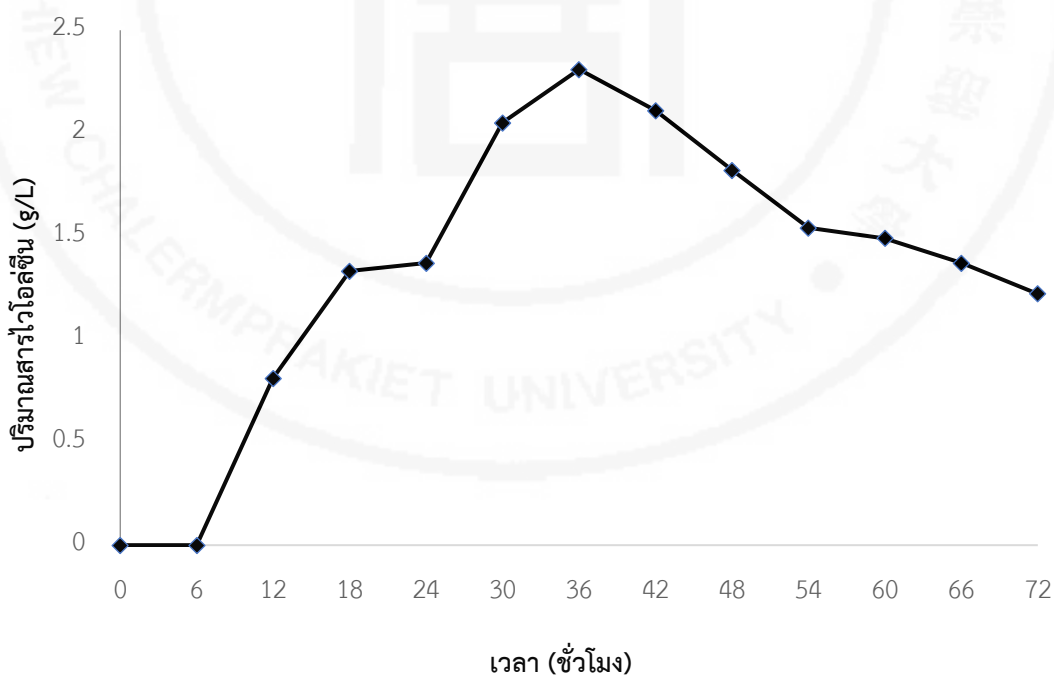
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักแห้งของ สารสีไวโอลาซิน (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเข้มข้นของ สารสีไวโอลาซิน (กรัมต่อลิตร)
0	0	0
6	0	0
12	0.81±0.05	0.01±0.01
18	1.33±0.02	0.02±0.01
24	1.37±0.02	0.04±0.02
30	2.05±0.03	0.05±0.01
36	2.31±0.01	0.07±0.01
42	2.11±0.01	0.06±0.01
48	1.82±0.01	0.05±0.02

ตารางที่ 9 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักแห้งของ สารสีไวโอลาซีน (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเข้มข้นของ สารสีไวโอลาซีน (กรัมต่อลิตร)
54	1.54±0.01	0.05±0.01
60	1.49±0.09	0.04±0.01
66	1.37±0.01	0.03±0.02
72	1.22±0.02	0.02±0.02

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

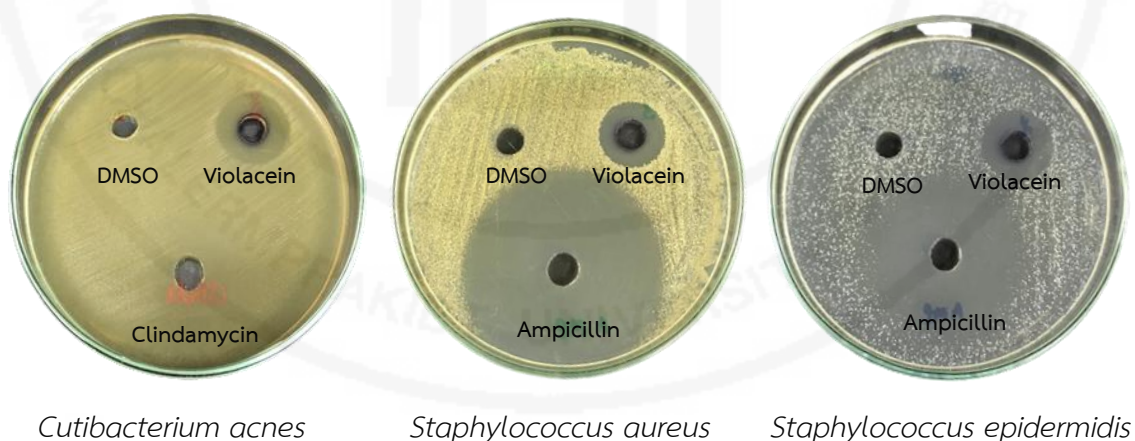
แผนภูมิที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารไวโอลาซีนต่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ



4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดไวโอลาซีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง โดยวิธี Agar well diffusion

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดไวโอลาซีนจาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* พบว่า เมื่อใช้สารสกัดไวโอลาซีนที่มีความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทดสอบกับเชื้อทดสอบ ความเข้มข้นเฉลี่ย 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร สารสกัดไวโอลาซีนสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus epidermidis* ได้ดีที่สุด ซึ่งมีขนาดโซนยับยั้งเท่ากับ 14.21 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *Cutibacterium acnes* มีขนาดโซนการยับยั้งเท่ากับ 14.07 มิลลิเมตร และสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้น้อยที่สุดเท่ากับ 12.43 มิลลิเมตร ผลแสดงดังภาพที่ 12 และตารางที่ 10

ภาพที่ 12 ฤทธิ์ของสารสกัดไวโอลาซีนในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังด้วยวิธี Agar well diffusion



ตารางที่ 10 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดไวโอลาซินในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง 3 สายพันธุ์ โดยวิธี Agar well diffusion

เชื้อจุลินทรีย์	ขนาดโซนยับยั้ง(มิลลิเมตร)			
	ไวโอลาซิน 30 mg/ml	DMSO	Ampicillin 200 µg/ml	Clindamycin 50 µg/ml
<i>Cutibacterium acnes</i>	14.07±0.058	-	NT	13.01±0.012
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.43±0.025	-	47.01±0.010	NT
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14.21±0.032	-	30.00±0.032	NT

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) - คือไม่เกิดโซนยับยั้ง NT หมายถึง not test

4.5 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) ของสารสกัดไวโอลาซิน จาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472

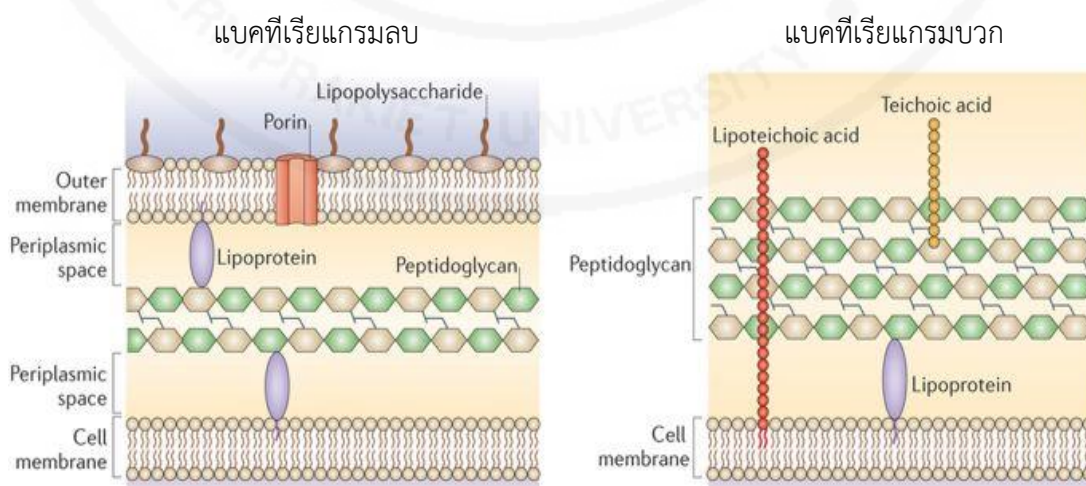
เมื่อนำสารสกัดไวโอลาซินจากเชื้อ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง ความเข้มข้นเฉลี่ย 10^7 CFU/ml ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) โดยใช้สารสกัดไวโอลาซินความเข้มข้นระหว่าง 0.0073 - 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใช้ยาแอมพิซิลลิน และคลินดามัยซินเป็นสารมาตรฐาน พบว่าค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Cutibacterium acnes* เท่ากับ 0.0146 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 14) รองลงมาคือ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเท่ากับ 0.0586 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 0.4688 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตารางที่ 11 จึงกล่าวได้ว่าสารไวโอลาซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิวได้ โดยพบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบนั้นเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งสิ้น สอดคล้องกับผลการทดลองของ Duran *et al.* (105) ได้ทำการศึกษาพบว่าสารไวโอลาซินบริสุทธิ์จากเชื้อ *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์บราซิลเลียนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แต่มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า และสารไวโอลาซินที่สกัดจากเชื้อ *Janthinobacterium lividum* เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสิ้น 21 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดไวโอลาซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียบวกได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ

เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากกว่า โดยแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ช่องว่าง periplasmic space ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียแกรมบวก และสารไลโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อชั้นนอกจะเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารได้ดี ขณะที่แบคทีเรียแกรมบวกไม่มีโครงสร้างเหล่านี้ สารต่าง ๆ จึงซึมผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (115) แสดงดังภาพที่ 13

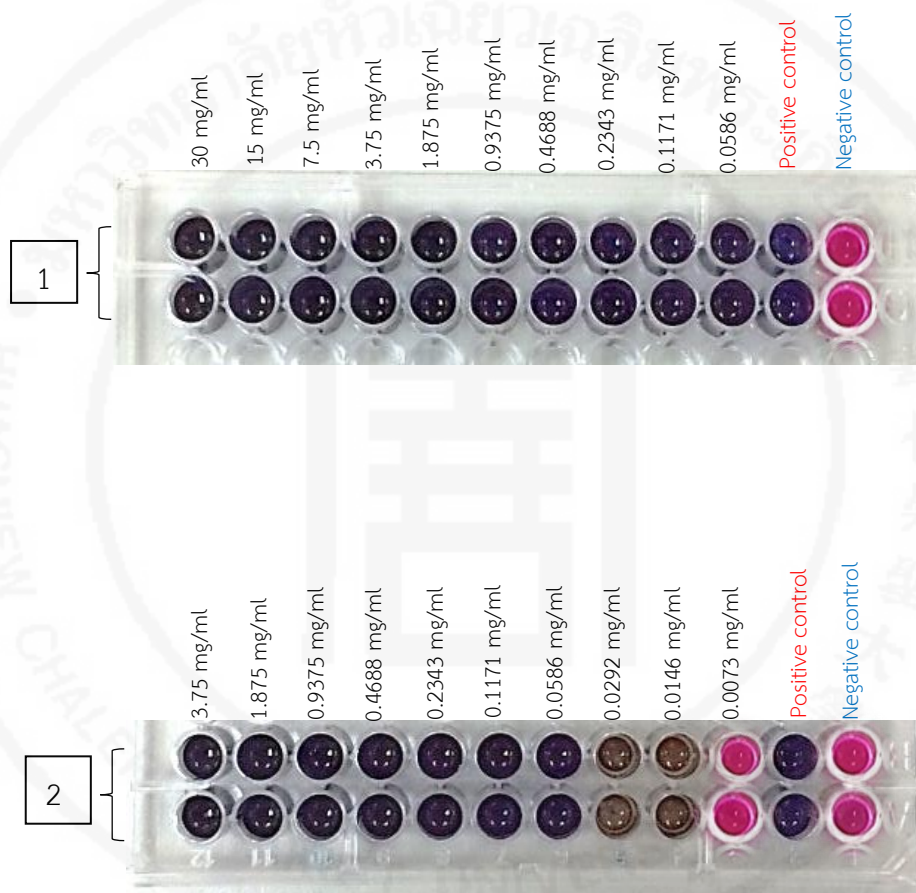
ตารางที่ 11 ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง Minimum Inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดไวโอลาซีนจาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.0073 - 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ค่า MIC ของสารสกัดไวโอลาซีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
<i>Cutibacterium acnes</i>	0.0146
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.4688
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.0586

ภาพที่ 13 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ และแกรมบวก (115)



ภาพที่ 14 ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุด Minimum inhibitory concentration (MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Cutibacterium acnes* โดยสารสกัดไวโอลาซิน ด้วยวิธี Modified broth microdilution ตาม CLSI



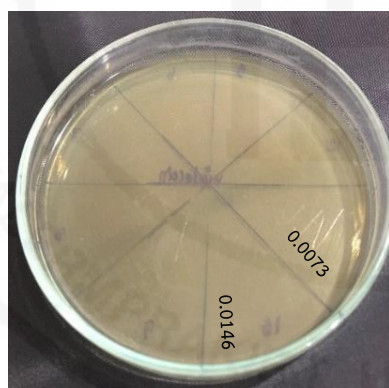
หมายเหตุ อ่านผลโดยดูจากการเปลี่ยนสีของ resazurin ถ้าเป็นสีน้ำเงินแสดงว่าเชื้อถูกยับยั้ง และถ้าเปลี่ยนเป็นสีชมพูแสดงถึงเชื้อมีการเจริญ

หมายเลข 1 คือ ความเข้มข้นของสารไวโอลาซินเริ่มต้นที่ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
 หมายเลข 2 คือ ความเข้มข้นของสารไวโอลาซินเริ่มต้นที่ 3.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
 Positive control คือ ยาคลินดามัยซินความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
 Negative control คือ น้ำปราศจากเชื้อ

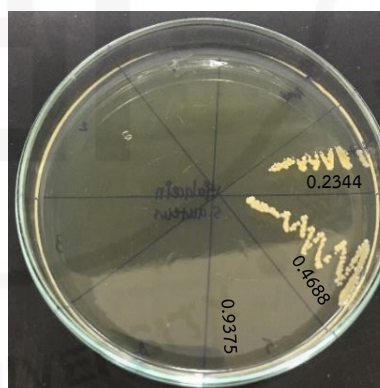
4.6 การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถใช้ฆ่าเชื้อทดสอบ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัดไวโอลาซีน จาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472

จากการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุด (MIC) ของสารไวโอลาซีนจาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังนำผล MIC ที่ได้มาทำการศึกษาประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคนี้อีกครั้ง พบว่าความเข้มข้นต่ำสุด ของสารสกัดไวโอลาซีนที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Cutibacterium acnes* เท่ากับ 0.0146 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทดสอบ (MBC) เท่ากับ 0.4688 และ 0.9375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 15 และตารางที่ 12)

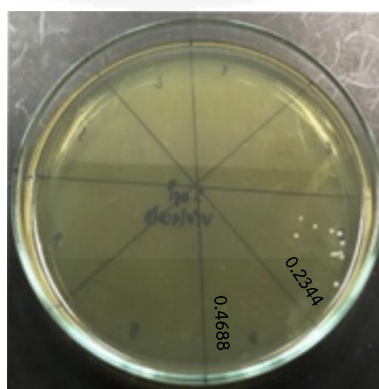
ภาพที่ 15 ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดไวโอลาซีนที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง (MBC) ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ หมายเลข (1) คือ *C. acnes* หมายเลข (2) คือ *S. aureus* และ หมายเลข (3) คือ *S. epidermidis*



(1)



(2)



(3)

ตารางที่ 12 ผลค่าความเข้มข้นต่ำสุดมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง Minimum Bactericidal concentration (MBC) ของสารสกัดไวโอลาซีนจาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ค่า MBC ของสารสกัดไวโอลาซีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
<i>Cutibacterium acnes</i>	0.0146
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.9375
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.4688

4.7 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไวโอลาซีนจาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 โดยวิธี DPPH*

4.7.1 ผลการหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐานโดยวิธี DPPH*

เมื่อนำสารละลายมาตรฐาน vitamin C ไปวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH* ซึ่งวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) ของ vitamin C แสดงดังตารางที่ 13

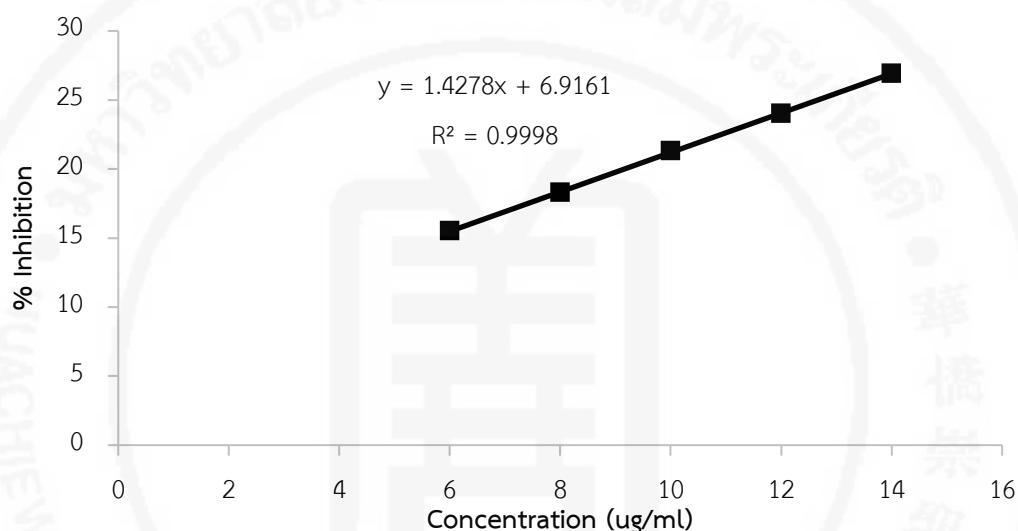
ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลายมาตรฐาน vitamin C ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี DPPH*

ความเข้มข้นของสารละลาย vitamin C ($\mu\text{g/mL}$)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%)
6	15.470 \pm 0.016
8	18.268 \pm 0.009
10	21.290 \pm 0.01
12	23.974 \pm 0.02
14	26.905 \pm 0.002

\pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

เมื่อได้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้ว ทำการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง แสดงดังแผนภูมิที่ 2 (กราฟแสดงเฉพาะการทดลองครั้งที่ 1 เท่านั้น)

แผนภูมิที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารละลาย vitamin C ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี DPPH• (การทดลองครั้งที่ 1)



4.7.2 ผลการหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไวโอลาซีนโดยวิธี DPPH•

เมื่อนำสารสกัดไวโอลาซีนจากเชื้อ *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 วิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH• ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ในช่วง 200 ถึง 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดไวโอลาซีนเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 14) และจากผลการทดลองพบว่าสารสกัดไวโอลาซีนให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 729.63 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งพบว่าสารสกัดไวโอลาซีนมีความสามารถดักจับอนุมูลอิสระ DPPH• ได้ไม่ดีนักเมื่อเปรียบเทียบกับ vitamin C ที่ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 30.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (แสดงดังตารางที่ 15) แสดงว่าระดับการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน่าจะขึ้นกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดนั้น ๆ และจากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดไวโอลาซีนของที่สกัดได้จากเชื้อ *Chromobacterium vaccinii* สายพันธุ์ CV5 พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH• ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 297.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (116) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดไวโอลาซีนที่ได้จากเชื้อต่างสายพันธุ์และแหล่งที่คัดแยกเชื้อต่างกัน ส่งผลต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ไม่เท่ากัน

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดไวโอลาซีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี DPPH*

ความเข้มข้นของสารสกัด ไวโอลาซีน ($\mu\text{g/mL}$)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%)
200	11.592 \pm 0.04
300	19.468 \pm 0.05
400	26.650 \pm 0.03
500	33.456 \pm 0.05
600	40.499 \pm 0.01

\pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 15 ค่า IC₅₀ ของสารสกัดไวโอลาซีนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยวิธี DPPH*

สารที่ใช้ทดสอบ	ค่า IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย \pm SD
สารสกัดไวโอลาซีน	729.62	729.59	729.69	729.63 \pm 0.05
สารมาตรฐาน vitamin C	30.175	30.168	30.164	30.169 \pm 0.005

4.8 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไวโอลาซีนจาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 โดยวิธี ABTS⁺

4.8.1 ผลการหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐานโดยวิธี ABTS⁺

เมื่อนำสารละลายมาตรฐาน (vitamin C) โดยเตรียม vitamin C เข้มข้น 9, 11, 13, 15 และ 17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปวิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี ABTS⁺ ซึ่งวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของ vitamin C แสดงดังตารางที่ 16

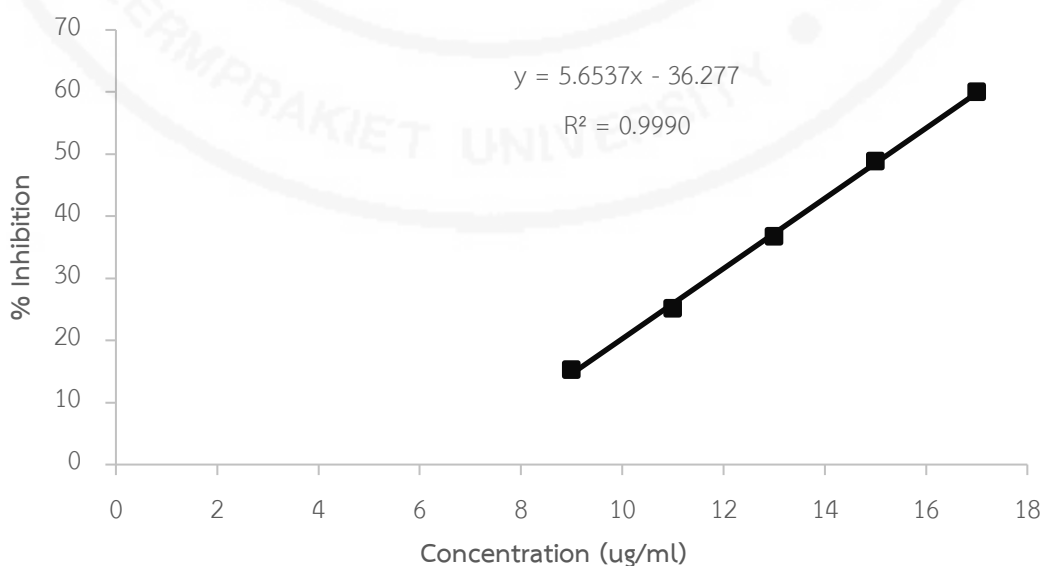
ตารางที่ 16 เปอร์เซนต์การยับยั้งของสารละลายมาตรฐาน vitamin C ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี ABTS⁺

ความเข้มข้นของสารละลาย vitamin C (µg/mL)	เปอร์เซนต์การยับยั้ง (%)
9	15.174±0.188
11	25.206±0.10
13	36.749±0.031
15	48.783±0.072
17	60.026±0.232

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

เมื่อได้ค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้ว จากนั้นทำการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับเปอร์เซนต์การยับยั้ง แสดงดังแผนภูมิที่ 3 (กราฟแสดงเฉพาะการทดลองครั้งที่ 1 เท่านั้น)

แผนภูมิที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์การยับยั้งของสารละลาย vitamin C ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี ABTS⁺ (การทดลองครั้งที่ 1)



4.8.2 ผลการหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไวโอลาซีนโดยวิธี ABTS⁺⁺

เมื่อนำสารสกัดไวโอลาซีนจาก *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 วิเคราะห์หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS⁺⁺ ทำการทดลองที่ความเข้มข้นของสารสกัดอยู่ในช่วง 20 – 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดไวโอลาซีนเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 17) จากผลการทดลองจะเห็นว่าสารสกัดไวโอลาซีนให้ค่า IC₅₀ เฉลี่ยเท่ากับ 116.547 ± 0.049 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งแสดงว่าสารสกัดไวโอลาซีนมีความสามารถดักจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺⁺ ได้ไม่ด้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ vitamin C ที่ให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 15.262 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร แสดงดังตารางที่ 18 เนื่องจากสารไวโอลาซีนมีสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในโครงสร้าง ซึ่งความสามารถให้อิเล็กตรอนของสารประกอบฟีนอลิกนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับอิทธิพลของจำนวนหมู่ฟีนอลิกอย่างเดียวเท่านั้น แต่อาจขึ้นกับตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซิล เนื่องจากมีหลักฐานว่า หมู่ *ortho*-dihydroxyl บนวงแหวนบี (B-ring) ของฟลาโวนอยด์ สามารถให้อิเล็กตรอนได้ดีกว่าหมู่ไฮดรอกซิล ที่ตำแหน่งอื่น ๆ บนโมเลกุลเดียวกัน (118)

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของสารสกัดไวโอลาซีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี ABTS⁺⁺

ความเข้มข้นของสารสกัด ไวโอลาซีน (µg/mL)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%)
20	13.344±0.001
40	21.220±0.028
50	24.078±0.002
60	28.236±0.034
80	36.397±0.015

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ตารางที่ 18 ค่า IC₅₀ ของสารสกัดไวโอลาซีนเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานโดยวิธี ABTS⁺⁺

สารที่ใช้ทดสอบ	ค่า IC ₅₀ (µg/mL)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย ± SD
สารสกัดไวโอลาซีน	116.541	116.501	116.599	116.547 ± 0.049
สารมาตรฐาน vitamin C	15.260	15.284	15.242	15.262 ± 0.021

4.9 ผลการศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ด้วยวิธี Melt-emulsification

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาการเตรียม NLCs ด้วยวิธี Melt-emulsification ซึ่งทำการเตรียมตำรับจำนวน 12 ตำรับเริ่มต้นเพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ชนิดของไขมันแข็ง ชนิดของไขมันเหลว และชนิดของสารลดแรงตึงผิว โดยมีเกณฑ์คัดเลือกจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของอนุภาค (particle size) และดัชนีการกระจายตัว (polydispersity index, PI) จากนั้นทำการคัดเลือกตำรับที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำไปบรรจุสารสกัดไวโอลาซินและศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ในลำดับต่อไป

จากการเตรียมสูตรตำรับอนุภาคนาโนไขมันทั้ง 12 สูตรตำรับ พบว่าชนิดของไขมันเหลวไขมันแข็ง และสารลดแรงตึงผิวที่ต่างชนิดกัน ส่งผลทำให้ขนาดของอนุภาค และดัชนีการกระจายตัวแตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 19 เมื่อพิจารณาอนุภาค NLCs พบว่ามีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 290.2 ± 0.93 ถึง 6238.8 ± 2.61 นาโนเมตร โดยอนุภาค NLCs ที่เตรียมจาก Caprylic/Capric Triglyceride (CCT) กรดสเตียริก (SA) และ Tween 20 มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 6238.8 ± 2.61 นาโนเมตร (สูตรที่ 4) ซึ่งเป็นขนาดอนุภาคที่ใหญ่มาก จึงส่งผลให้ตำรับที่เตรียมได้เกิดการแยกชั้นสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ทั้งนี้อนุภาค NLCs ที่เตรียมจากกรดโอเลอิก (OA) Glyceryl Behenate (GB) และ Tween 20 (สูตรที่ 7) มีขนาดอนุภาคเล็กที่สุดเท่ากับ 290.2 ± 0.93 นาโนเมตร

ค่า Polydispersity Index (PI) คือค่าดัชนีการกระจายตัวของอนุภาค มีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 โดยค่า PI ที่น้อยกว่า 0.3 แสดงถึงการกระจายตัวของขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงแคบ ซึ่งบ่งบอกถึงการกระจายตัวที่ดีของอนุภาคในตำรับ (92,93) จากผลการทดลองทั้ง 12 สูตร พบว่ามีค่า PI อยู่ในช่วง 0.295 ± 0.06 ถึง 0.613 ± 0.049 และยังพบว่าสูตร F7 มีค่า PI เท่ากับ 0.295 ± 0.06 ซึ่งเป็นค่าที่น้อยที่สุด แสดงว่าอนุภาคส่วนใหญ่มีขนาดไม่แตกต่างกันมาก

จากตารางที่ 19 จะเห็นได้ว่าสูตร F7 ซึ่งเตรียมจากกรดโอเลอิก (OA) และ Glyceryl Behenate (GB) และใช้ Tween 20 เป็นสารลดแรงตึงผิวนั้นมีขนาดอนุภาคที่เล็กที่สุด จึงสรุปได้ว่าการเลือกใช้ชนิดของสารลดแรงตึงผิวส่งผลต่อระบบและขนาดของอนุภาค เนื่องจากการตั้งตำรับได้เตรียมอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (o/w emulsifier) ดังนั้นเพื่อให้ระบบมีความเสถียร ต้องมีสัดส่วนระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำมัน (Hydrophile-lipophile balance; HLB) อยู่ในช่วง 12-16 จึงถือว่าเป็นค่าที่เหมาะสม โดยสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ Tween20, Tween80 และ Poloxamer 188 ซึ่งมีค่า HLB เท่ากับ 16.7, 15 และ 24 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า Poloxamer 188 มีค่า HLB ที่สูงมาก อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่กว่า โดยสอดคล้องกับผลการทดลองของ Das และคณะ พบว่าการใช้ Poloxamer 188 ทำให้อนุภาค NLCs ที่เตรียมได้มีขนาดใหญ่กว่าอนุภาค NLC ที่เตรียมจาก Tween20 และ Tween80 (94)

เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของอนุภาคนาโนชนิด NLCs ทั้ง 12 สูตร เมื่อเวลาผ่านไป 15 วัน พบว่าสูตร F7, F8 และ F9 นั้นไม่เกิดการแยกชั้น ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสูตรอื่น ๆ จะเห็นว่าตำรับเกิดการแยกชั้น และเกิดการรวมตัวกันของอนุภาคจึงส่งผลให้ตำรับมีความขุ่นขึ้น (ภาพที่ 16)

จากผลการทดลองที่ในตารางที่ 19 สามารถสรุปได้ว่าการคัดเลือกการเตรียมอนุภาคนาโนชนิด NLCs ที่เหมาะสมนั้น สามารถเตรียมได้โดยใช้ ไขมันเหลว ไขมันแข็ง และสารลดแรงตึงผิว คือ Oleic acid, Glycerol Behenate และ Tween 20 ตามลำดับ

ตารางที่ 19 ขนาดของอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายตัว และผลการประเมินลักษณะทางกายภาพของตำรับที่ 1-12

สูตร ที่	LL : SL	สารลด แรงตึงผิว	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่ากระจายตัว (PI)	สี	ลักษณะทาง กายภาพ
F1	CCT : GB	TW 20	927.4±2.57	0.379±0.006	ขาว	แยกชั้น
F2	CCT : GB	TW 80	586.0±2.70	0.317±0.030	ขาว	แยกชั้น
F3	CCT : GB	P188	1133.7±2.85	0.443±0.005	ขาวขุ่น	แยกชั้น
F4	CCT : SA	TW 20	6238.8±2.61	0.419±0.030	ขาว	ชั้นหนืด
F5	CCT : SA	TW 80	2646.3±3.45	0.820±0.027	ขาว	แยกชั้น
F6	CCT : SA	P188	462.7±2.58	0.326±0.010	ขาวขุ่น	ชั้น
F7	OA : GB	TW 20	290.2±0.93	0.295±0.060	ขาว	ไม่แยกชั้น
F8	OA : GB	TW 80	430.6±1.75	0.339±0.011	ขาว	ไม่แยกชั้น
F9	OA : GB	P188	434.1±1.08	0.335±0.013	ขาวขุ่น	ไม่แยกชั้น
F10	OA : SA	TW 20	1840.0±1.56	0.613±0.049	ขาว	แยกชั้น
F11	OA : SA	TW 80	1736.2±1.24	0.601±0.062	ขาว	แยกชั้น
F12	OA : SA	P188	901.3±1.55	0.361±0.017	ขาวขุ่น	ชั้น

หมายเหตุ LL= Liquid lipid, SL = Solid lipid, PI = Polydispersity Index, ZP = Zeta Potential

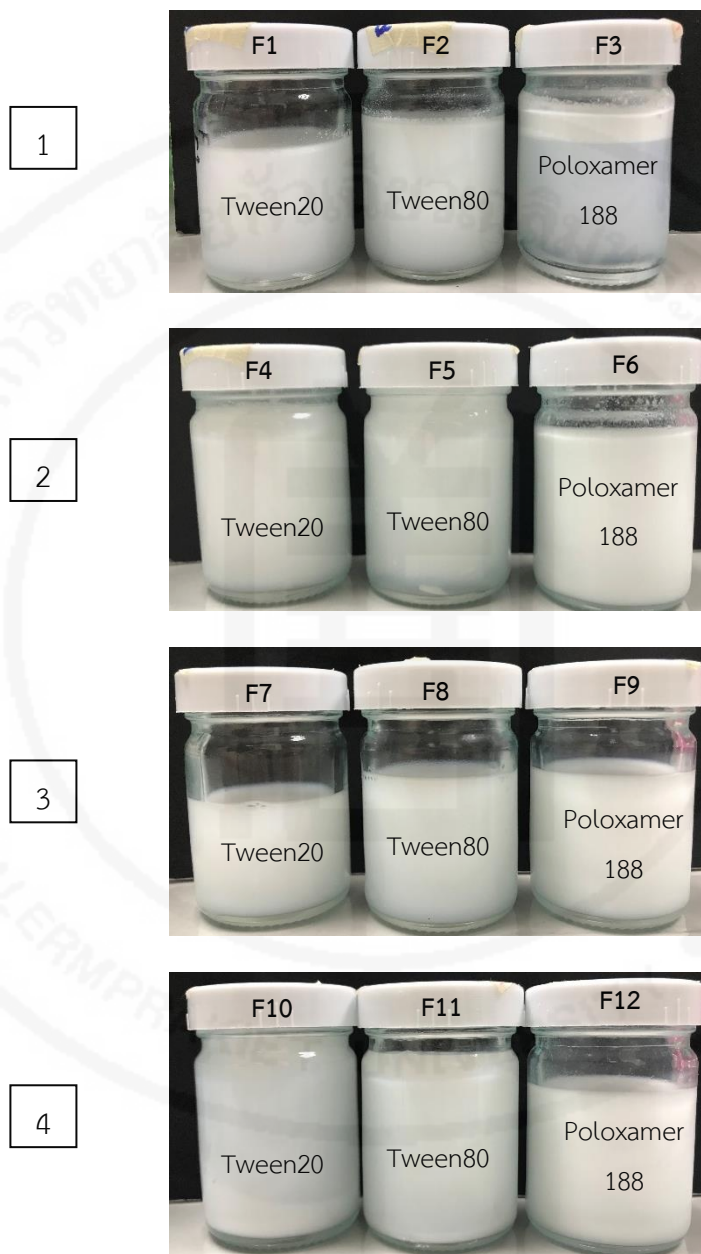
CCT= Caprylic/Capric Triglyceride หรือ (Lexol® GT-865)

GB = Glycerol Behenate หรือ Compritol® 888 ATO

SA = Stearic acid, OA = Oleic acid, TW 20 = Tween 20, TW 80 = Tween 80

P188 = Poloxamer 188

ภาพที่ 16 อนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่เตรียมได้จากไขมันเหลว ไขมันแข็ง และสารลดแรงตึงผิวชนิดต่าง ๆ



หมายเลข 1 คือ NLC ที่เตรียมจาก Caprylic/Capric Triglyceride และGlyceryl Behenate

หมายเลข 2 คือ NLC ที่เตรียมจาก Caprylic/Capric Triglyceride และStearic acid

หมายเลข 3 คือ NLC ที่เตรียมจาก Oleic acid และ Glyceryl Behenate

หมายเลข 4 คือ NLC ที่เตรียมจาก Oleic acid และ Stearic acid

4.10 การพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs

จากผลการทดลองได้เตรียมสูตรตำรับทั้งสิ้น 12 สูตร สามารถคัดเลือกสูตรที่เหมาะสมที่สุดคือ สูตรที่ 7 โดยจะนำสูตรที่คัดเลือกได้ไปพัฒนาสูตรตำรับต่อไปโดยศึกษาการแปรผันต่าง ๆ ดังนี้

4.10.1 ผลของอัตราส่วนของไขมันเหลวต่อไขมันแข็ง (LL:SL)

จากผลการทดลองข้างต้นในตารางที่ 19 เป็นการศึกษาค่าเตรียม NLCs-Base โดยใช้อัตราส่วนของไขมันเหลวต่อไขมันแข็งคือ 1:1 แต่เนื่องจากอัตราส่วนของปริมาณไขมันเหลวและไขมันแข็งส่งผลต่อขนาดอนุภาค ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาอัตราส่วนของ LL:SL โดยแปรผันอัตราส่วนเป็น 1:2, 2:1, 1:3 และ 3:1 ผลการทดลองพบว่าขนาดของอนุภาคขึ้นอยู่กับอัตราส่วนการแปรผันชนิดของไขมันแสดงดังตารางที่ 20 ซึ่งเมื่อเพิ่มปริมาณของไขมันเหลว 3 ส่วน ลงในสูตร F16 อนุภาคจะมีขนาดเล็กลงเท่ากับ 250.5 ± 1.45 นาโนเมตร ค่า PI อยู่ในช่วงแคบคือ 0.280 ± 0.018 ซึ่งหมายถึงขนาดอนุภาคในตำรับมีขนาดเท่าๆ กันทั้งระบบ และมีค่าศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ -27.5 ± 0.29 มิลลิโวลต์ ซึ่งถือว่าสภาวะในการเตรียมตัว NLCs ดังกล่าวเป็นระบบที่มีความเสถียรทางกายภาพที่ดี

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hu และคณะ (2005) ได้รายงานว่าการเพิ่มปริมาณกรดโอเลอิกส่งผลทำให้ขนาดของอนุภาคเล็กลง เนื่องจากไขมันเหลวจะไปช่วยลดความหนืด ส่งผลให้เกิดการลดของแรงตึงผิวภายในอนุภาค NLCs ดังนั้นอนุภาคที่เตรียมได้จึงมีขนาดเล็กลงและยังมีประสิทธิภาพการกักเก็บสารสำคัญที่ดีมากขึ้นด้วย (88) จากผลการทดลองที่ได้จึงทำการคัดเลือกการเตรียมอนุภาคชนิด NLCs ด้วยอัตราส่วนไขมันเหลว 3 ส่วนต่อไขมันแข็ง 1 ส่วน และนำไปพัฒนาสูตรตำรับในลำดับต่อไป

ตารางที่ 20 ลักษณะของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่เตรียมโดยการแปรผันอัตราส่วนของไขมันเหลวต่อไขมันแข็ง (LL:SL)

สูตร ที่	LL:SL	Tween 20 (%)	ST (min)	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าดัชนีการ กระจายตัว (PI)	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)
F13	1:2	1.5	5	324.3 ± 3.56	0.281 ± 0.012	-22.3 ± 0.17
F14	2:1	1.5	5	275.1 ± 2.76	0.309 ± 0.016	-24.1 ± 0.24
F15	1:3	1.5	5	348.3 ± 3.12	0.308 ± 0.008	-22.4 ± 0.34
F16	3:1	1.5	5	250.5 ± 1.45	0.280 ± 0.018	-27.5 ± 0.29

4.10.2 ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (%SC)

เมื่อได้อัตราส่วนของไขมันที่เหมาะสมจากข้อที่ 4.10.1 คือสูตร F16 โดยมีอัตราส่วนไขมันเหลวต่อไขมันแข็งเท่ากับ 3:1 จากนั้นทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งทำการแปรผันความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว คือ Tween20 ที่ความเข้มข้น 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ขนาดอนุภาค ดัชนีการกระจายตัว และศักย์ไฟฟ้าซีต้า ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 21

ผลการทดลองพบว่าอนุภาคไขมันชนิด NLC สูตร F17 และ F18 มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 261.5 และ 280.6 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยสูตร F18 มีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (Tween20) 3 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่กว่าสูตร F17 ที่ประกอบไปด้วย Tween20 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่มากขึ้น ส่งผลให้อนุภาคใหญ่ขึ้น เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินจะห่อหุ้มอนุภาคเอาไว้ทำให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น (117)

ตารางที่ 21 ลักษณะของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่เตรียมโดยการแปรผันอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิว

สูตร ที่	LL:SL	Tween 20 (%)	ST (min)	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าดัชนีการ กระจายตัว (PI)	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)
F17	3:1	2	5	261.5±1.76	0.286±0.011	-29.4±0.57
F18	3:1	3	5	280.6±1.71	0.302±0.023	-30.2±0.30

เมื่อพิจารณาค่าดัชนีการกระจายตัว (PI) ของสูตร F16, F17 และ F18 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Tween 20 จาก 1.5 ถึง 3.0 เปอร์เซ็นต์ ค่า PI จะเพิ่มขึ้นจาก 0.280-0.302 ซึ่งเป็นค่าการกระจายตัวที่ไม่แตกต่างกันมากนัก และพบว่าผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่เปลี่ยนแปลงนั้นไม่ส่งผลต่อความคงตัวทางกายภาพของตำรับอนุภาค NLCs โดยสังเกตได้จากค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้ามีค่าอยู่ระหว่าง -27.5 ถึง -30.2 มิลลิโวลต์

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า สูตรตำรับอนุภาคนาโนไขมัน F16 เป็นสูตรที่มีขนาดอนุภาคเล็กและมีค่าการกระจายตัวอยู่ในช่วงแคบ ผู้วิจัยจึงนำสูตรตำรับดังกล่าวไปทดลองในขั้นต่อไป

4.10.3 ผลของเวลาที่ใช้ในการลดขนาดอนุภาคด้วยวิธีการ sonicate

ทำการศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการ sonicate โดยใช้อัตราส่วนไขมันเหลวต่อไขมันแข็งเท่ากับ 3:1 และใช้ 1.5 เปอร์เซ็นต์ Tween20 เป็นสารลดแรงตึงผิว โดยทำการ sonicate เป็นเวลา 5 นาที (สูตร F16) ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองในหัวข้อ 4.10.1 และ 4.10.2 ในขั้นตอนต่อไปทำการศึกษาการแปรผันเวลาในการ sonicate จาก 5 นาที โดยเพิ่มเวลาเป็น 10 และ 15 นาที ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 22

ผลการทดลองพบว่าขนาดอนุภาคไขมันชนิด NLC ในสูตรที่ F16, F19 และ F20 มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงระหว่าง 213.7-250.5 นาโนเมตร โดยเมื่อเพิ่มเวลาในการ sonicate จาก 5 นาทีเป็น 10 นาที จะเห็นได้ว่าอนุภาคมีขนาดเล็กลง (สูตร F19) แต่พบว่าสูตร F20 เมื่อทำการเพิ่มเวลาที่ใช้ sonicate จาก 10 นาทีเป็น 15 นาทีนั้นส่งผลให้อนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Das และคณะ โดยทำการทดลองการแปรผันเวลาในการ sonicate ที่เวลา 1 ถึง 30 นาที พบว่าเมื่อทำการ sonicate มากกว่า 10 นาที ทำให้อนุภาคที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากการ sonicate ที่ใช้เวลานานมากขึ้นจะทำให้เกิดฟอง (bubble foam) และส่งผลให้อนุภาคเกิดการรวมตัวทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น (94)

เมื่อพิจารณาค่าดัชนีการกระจายตัว (PI) พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการ sonicate เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ค่า PI ลดลง โดยการ sonicate ที่ 5, 10 และ 15 นาที มีค่า PI เท่ากับ 0.280, 0.239 และ 0.216 ตามลำดับ และยังพบว่าค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (ZP) มีค่าลดลงเช่นเดียวกันเมื่อเวลาที่ใช้ในการ sonicate เพิ่มขึ้น โดยค่า ZP ลดลงจาก -27.5 ถึง -23.6 มิลลิโวลต์

ตารางที่ 22 ลักษณะของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่เตรียมโดยการแปรผันเวลาในการ sonicate (ST)

สูตร ที่	LL:SL	Tween 20 (%)	ST (min)	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าดัชนีการ กระจายตัว (PI)	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)
F19	3:1	1.5	10	213.7±2.42	0.239±0.003	-26.6±0.45
F20	3:1	1.5	15	214.9±1.54	0.216±0.031	-23.6±0.59

4.11 การพัฒนาสูตรตำรับที่เหมาะสมในการเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซีน

จากผลการทดลองข้างต้นได้ทำการพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ทั้งสิ้น 8 สูตร (F13-F20) โดยทำการศึกษาการแปรผันในด้านต่าง ๆ จะเห็นได้ว่า สูตร F19 มีขนาดอนุภาคเล็กที่สุด จึงเป็นสูตรที่เหมาะสมต่อการนำมาบรรจุสารสกัดไวโอลาซีน เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดเล็กจะทำให้มีการกระจายตัวและมีความคงตัวที่ดี โดยทำการพัฒนาสูตรตำรับดัง แสดงในตารางที่ 23

ค่าความเข้มข้นของสารไวโอลาซีนที่นำมาใส่ในสูตรตำรับ อ้างอิงได้จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (MBC) ซึ่งแสดงในตารางที่ 12 โดยพบว่าเมื่อใช้สารไวโอลาซีนทดสอบกับเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ค่า MBC ที่สามารถฆ่าเชื้อได้มีค่าเท่ากับ 0.9375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงทำการพัฒนาสูตรตำรับขึ้นมาอีก 2 สูตร โดยบรรจุสารไวโอลาซีนที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (สูตร F21-F22)

ตารางที่ 23 ส่วนประกอบในการพัฒนาอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซีน

วัสดุ	สารเคมี	สูตรตำรับ (%w/w)	
		F21	F22
วัสดุไขมัน	Oleic acid	3	3
	Compritol® 888 ATO	1	1
	Violacein	1	2
วัสดุค้ำน้ำ	Tween 20	1.5	1.5
	Deionized water	qs to 100	

ตารางที่ 24 ขนาดของอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายตัว ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า และลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซีน

สูตรที่	ไวโอลาซีน (%)	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าการกระจายตัว (PI)	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
F21	1	252.7±1.27	0.176±0.002	-25.45±0.03	สีม่วง ไม่แยกชั้น
F22	2	268.2±2.10	0.186±0.001	-21.00±0.07	สีม่วง ไม่แยกชั้น

จากผลการทดลองในตารางที่ 24 จะเห็นได้ว่าอนุภาคนาโนไขมัน ชนิด NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน (NLCs-Vio) จะมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่า NLCs-Base (สูตรF19) ซึ่งมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 213.7 ± 2.42 นาโนเมตร โดยอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นนั้นเกิดจากการรวมตัวกันของสารไวโอลาซินภายในอนุภาคไขมัน และจากผลการทดลองพบว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารไวโอลาซินเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองพบว่าสูตรตำรับที่บรรจุสารไวโอลาซินที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 252.7 ± 1.27 และ 268.2 ± 2.10 นาโนเมตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (ZP) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารไวโอลาซินเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ค่า ZP ลดลง จากผลการทดลองสูตรตำรับที่บรรจุสารไวโอลาซินที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ มีค่า ZP เท่ากับ -25.45 ± 0.03 และ -21.00 ± 0.07 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ซึ่งค่า ZP ที่ลดลงนั้น เกิดจากปริมาณของสารไวโอลาซินที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคนั้นจะนำไปสู่ความหนาแน่นของประจุอนุภาคให้มีค่าที่ลดลงได้

4.12 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs

เมื่อทำการทดสอบความคงตัวของสูตรตำรับทั้งหมด 3 สูตรคือ ตำรับ NLCs-Base (F19) ตำรับ NLCs-Vio1% (F21) และตำรับ NLCs-Vio2% (F22) โดยทำการทดสอบที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน และเก็บที่อุณหภูมิสูงสลับต่ำ (heating-cooling) ทั้งหมด 6 รอบ ผลการทดลองที่ได้ แสดงดังตารางที่ 25 ถึงตารางที่ 27

4.12.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่ไม่บรรจุสารสำคัญ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน

จากการศึกษาความคงตัวเป็นระยะเวลา 90 วัน ตำรับ NLCs ที่ไม่บรรจุสารสำคัญ (NLCs-Base) พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขนาดอนุภาคของ NLCs มีขนาดอยู่ในช่วง 226.1 ± 0.35 ถึง 777.2 ± 1.30 นาโนเมตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าอนุภาคเกิดการแยกชั้นในระยะเวลา 90 วันของการเก็บรักษา (ตารางที่ 25) เมื่อพิจารณาค่าดัชนีการกระจายตัว (PI) พบว่าในช่วงระยะเวลา 1-60 วัน พบว่าค่า PI เกิดการกระจายตัวที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ค่า PI จะเริ่มมากขึ้น ในวันที่ 90 ซึ่งสังเกตได้ว่าลักษณะทางกายภาพของตำรับมีความขุ่นหนืดขึ้น และในส่วนของค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (ZP) พบว่า ค่า ZP จะลดลงเรื่อย ๆ โดยลดลงจาก -28.90 ± 0.17 ถึง -14.89 ± 0.11 มิลลิโวลต์

4.12.2 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่ไม่บรรจุสารสำคัญ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน

จากการศึกษาความคงตัวเป็นระยะเวลา 90 วัน ตำรับ NLCs ที่ไม่บรรจุสารสำคัญ (NLCs-Base) พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสดงดังตารางที่ 25 ขนาดอนุภาคของ NLCs มีขนาดระหว่าง 220.8 ± 1.25 ถึง 981.4 ± 1.50 นาโนเมตร ซึ่งจะเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 60

ของการเก็บรักษา โดยตำรับ NLCs มีขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น เกิดความข้นหนืด และพบว่าอนุภาคเกิดการแยกชั้นในวันที่ 90 ของการเก็บรักษา เมื่อพิจารณาค่า PI จะเห็นได้ว่าในวันที่ 90 ค่า PI มีค่าเท่ากับ 0.508 ± 0.008 ซึ่งเป็นการกระจายตัวที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 1 ของการเก็บรักษาซึ่งค่าที่วัดได้เท่ากับ 0.202 ± 0.006 และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (ZP) พบว่า ค่า ZP พบว่าค่า ZP จะลดลงเรื่อย ๆ โดยลดลงจาก -24.14 ± 0.24 ถึง -13.51 ± 0.25 มิลลิโวลต์

4.12.3 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่ไม่บรรจุสารสำคัญ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน

จากการศึกษาความคงตัวเป็นระยะเวลา 90 วัน ตำรับ NLCs-Base ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าตำรับ NLCs มีความคงตัวเพียงแค่ 15 วันของการเก็บรักษา และพบว่าอนุภาคใหญ่ขึ้นเกินกว่าเครื่องมือจะสามารถตรวจจับอนุภาคเฉลี่ยได้ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 60 และ 90 วัน ค่าการกระจายตัวของอนุภาคพบว่าค่า PI มีการกระจายที่กว้างขึ้นจากวันที่ 1 ถึงวันที่ 30 โดยมีค่าเท่ากับ 0.250 ± 0.001 ถึง 0.355 ± 0.001 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (ZP) ในวันที่ 30 พบว่าค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้ามีประสิทธิภาพลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่า ZP ในวันที่ 1 โดยมีค่าเท่ากับ -8.43 ± 0.04 มิลลิโวลต์ และ -22.51 ± 0.20 มิลลิโวลต์ตามลำดับ

4.12.4 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่ไม่บรรจุสารสำคัญ ที่สภาวะอุณหภูมิสูงสลับต่ำ (Heating cooling cycle: 4°C และ 45°C) จำนวน 6 รอบ

จากการเก็บรักษาตำรับ NLCs-Base ที่อุณหภูมิสูงสลับต่ำ ทั้งหมด 6 รอบ ผลการทดลองพบว่า ตำรับเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพคือ เกิดการแยกชั้นและเกิดความหนืดมาก ทั้งนี้การเก็บในสภาวะอุณหภูมิสูงสลับต่ำนั้นจะเกิดการผ่นผวนของอุณหภูมิเก็บรักษาอย่างมาก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของขนาดผลึกไขมันได้โดยขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัว (PI) และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (ZP) ที่วัดได้ มีค่าเท่ากับ 1511.0 ± 3.75 นาโนเมตร 0.456 ± 0.002 , และ -6.1 ± 0.08 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 25 ขนาดของอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายตัว ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า และลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLCs-Base โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน

ตัวอย่าง	อุณหภูมิในการเก็บรักษา	ระยะเวลาการเก็บรักษา	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าดัชนีการกระจายตัว (PI)	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
NLCs (F19)	4°C	วันที่ 1	226.1±0.35	0.206±0.002	-28.90±0.17	สีขาว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 7	238.7±0.55	0.246±0.003	-27.06±0.19	สีขาว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 15	265.0±0.78	0.280±0.003	-26.31±0.12	สีขาว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 30	287.7±0.35	0.285±0.004	-21.98±0.40	สีขาว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 60	383.5±2.51	0.206±0.002	-19.46±0.44	สีขาว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 90	777.2±1.30	0.358±0.002	-14.89±0.11	สีขาว แยกชั้น มีความขุ่นหนืดมาก
	30°C	วันที่ 1	220.8±1.25	0.202±0.006	-24.14±0.24	สีขาว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 7	236.0±0.60	0.305±0.004	-23.66±0.27	สีขาว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 15	277.9±1.19	0.284±0.003	-16.61±0.40	สีขาว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 30	381.8±0.80	0.352±0.003	-15.43±0.14	สีขาว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 60	494.4±1.59	0.265±0.006	-14.10±0.13	สีขาว ขุ่นหนืด
		วันที่ 90	981.4±1.50	0.508±0.008	-13.51±0.25	สีขาว แยกชั้น มีความขุ่นหนืดมาก

ตารางที่ 25 (ต่อ)

ตัวอย่าง	อุณหภูมิในการเก็บรักษา	ระยะเวลาการเก็บรักษา	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าดัชนีการกระจายตัว (PI)	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
NLCs (F19)	45 °C	วันที่ 1	278.3±1.73	0.250±0.001	-22.51±0.20	สีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น
		วันที่ 7	337.2±2.08	0.296±0.006	-19.18±0.16	สีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น
		วันที่ 15	525.0±1.59	0.286±0.004	-17.67±0.07	สีขาว ไม่เกิดการแยกชั้น
		วันที่ 30	1114.2±1.81	0.355±0.001	-8.43±0.04	สีขาว แยกชั้น
		วันที่ 60		unstable		สีขาว แยกชั้น
		วันที่ 90		unstable		สีขาว แยกชั้น
	Heating-Cooling 4°C - 45°C	6 cycles	1511.0±3.75	0.456±0.002	-6.1±0.08	สีขาว แยกชั้น และมีความขุ่นหนืด

4.12.5 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซินที่ความเข้มข้น 1 และ 2เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 90 วัน

จากการศึกษาความคงตัวของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซินความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 90 วัน โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า ลักษณะทางกายภาพ ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัว และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า แสดงดังตารางที่ 26 และตารางที่ 27

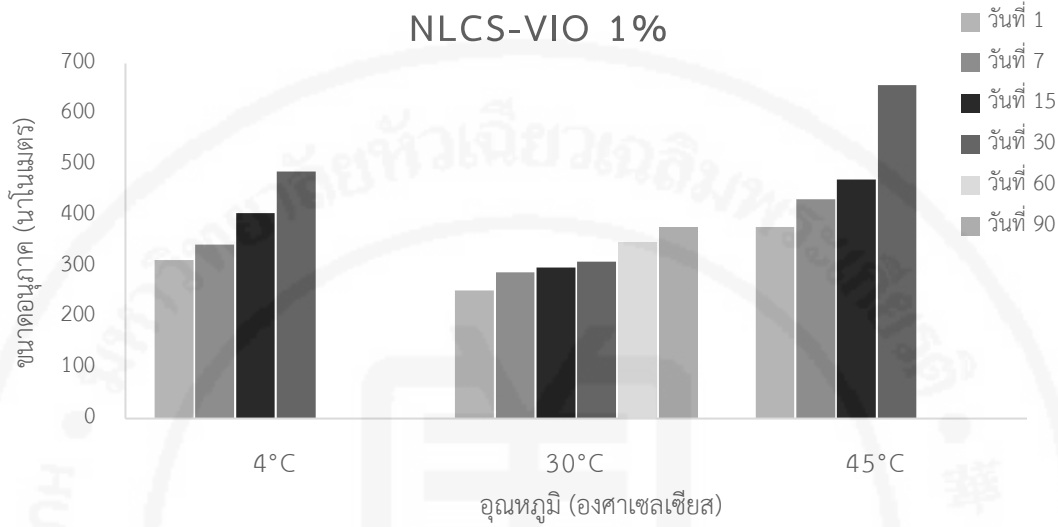
จากแผนภูมิที่ 4 แสดงถึงระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแตกต่างกันของตำรับ NLCs-Vio1% ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิที่ 4°C และ 45°C สามารถวัดขนาดอนุภาคได้ที่ 30 วันของระยะเวลาเก็บรักษา และเมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นอุณหภูมิที่ทำให้ตำรับ NLCs-Vio1% มีความคงตัวสูงที่สุด โดยสังเกตได้จากขนาดอนุภาคที่วัดได้มีขนาดเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 4°C และ 45°C นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 30°C ยังสามารถวัดขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัว และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า ได้ตลอดระยะเวลา 90 วันของการเก็บรักษา เช่นเดียวกับตำรับ NLCs-Vio2% แสดงดังแผนภูมิที่ 5

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLCs-Vio1% และ NLCs-Vio2% ที่อุณหภูมิ 4°C จะเห็นได้ว่าตำรับมีการเปลี่ยนแปลงของสี โดยสีม่วงจะเริ่มจางลงในวันที่ 60 ส่วนที่อุณหภูมิ 30°C สีม่วงเริ่มจางลงเป็นสีม่วงอ่อนในวันที่ 7 และที่ 45°C พบว่าสีม่วงจางลงไปจนกลายเป็นสีขาวในวันที่ 7 และเกิดการแยกชั้นในวันที่ 30 ของการเก็บรักษา (ภาพที่ 17) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญในการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของตำรับ

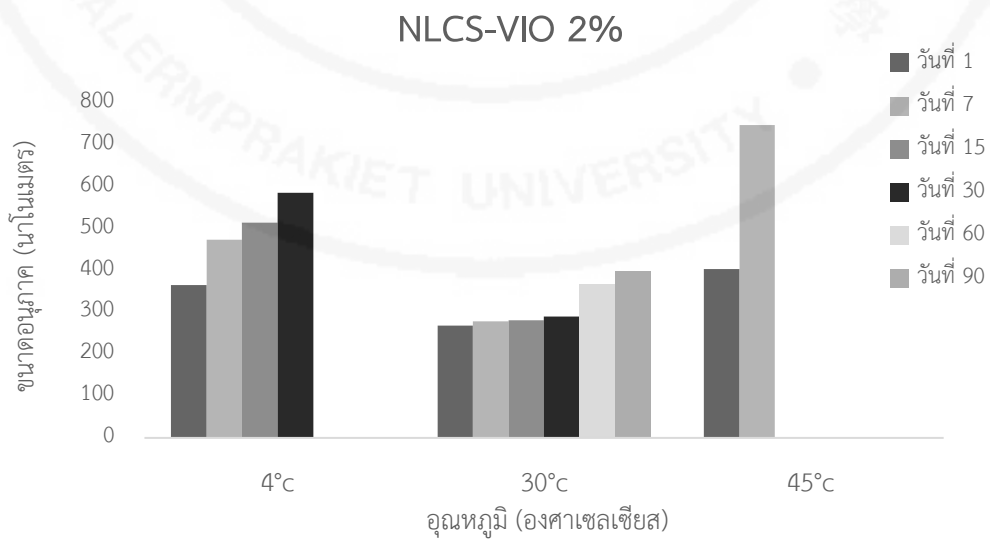
จากการเก็บรักษาตำรับ NLCs-Vio1% ที่อุณหภูมิสูงสลับต่ำ (4°C และ 45°C) ทั้งหมด 6 รอบ ผลการทดลองพบว่า ตำรับมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ คือเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีม่วงเป็นสีขาว ตำรับเกิดการแยกชั้นและมีความหนืด โดยขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัว (PI) และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (ZP) ที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 703.6 ± 2.71 นาโนเมตร 0.310 ± 0.004 และ -8.17 ± 0.15 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ

ผลการทดลองที่อุณหภูมิสูงสลับต่ำทั้งหมด 6 รอบ พบว่าตำรับ NLCs-Vio2% มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 2526.5 ± 2.01 นาโนเมตร ค่าการกระจายตัวเท่ากับ 0.730 ± 0.01 และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้าเท่ากับ -5.85 ± 0.14 มิลลิโวลต์ โดยค่าที่วัดได้ส่งผลให้ตำรับมีความข้นหนืด ซึ่งเกิดจากขนาดอนุภาคที่ใหญ่มากเป็นระดับไมโครเมตร

แผนภูมิที่ 4 ขนาดอนุภาคของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน



แผนภูมิที่ 5 ขนาดอนุภาคของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซินความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน



ตารางที่ 26 ขนาดของอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายตัว ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า และลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLCs-Vio1% โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน

ตัวอย่าง	อุณหภูมิในการเก็บรักษา	ระยะเวลาในการเก็บรักษา	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าดัชนีการกระจายตัว (PI)	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
NLC-1%VIO (F21)	4°C	วันที่ 1	312.1±1.26	0.219±0.003	-21.40±0.04	สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 7	343.3±1.78	0.281±0.003	-21.40±0.15	สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 15	405.3±1.55	0.239±0.003	-17.73±0.07	สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 30	487.5±2.00	0.297±0.001	-16.00±0.03	สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 60		unstable		สีม่วงเริ่มจางลง ตกตะกอน
		วันที่ 90		unstable		สีม่วงเริ่มจางลง ตกตะกอน
	30°C	วันที่ 1	252.7±1.27	0.176±0.003	-25.45±0.03	สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 7	288.1±0.60	0.211±0.002	-24.97±0.15	สีม่วงจางลง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 15	297.9±1.49	0.235±0.003	-24.69±0.07	สีม่วงจางลง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 30	309.5±2.25	0.246±0.002	-24.17±0.19	สีขาว กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 60	348.4±1.03	0.249±0.003	-23.50±0.10	สีขาว กลิ่นเริ่มจางลง ไม่แยกชั้น
		วันที่ 90	378.0±1.36	0.277±0.002	-22.44±0.11	สีขาว กลิ่นเริ่มจางลง ไม่แยกชั้น

ตารางที่ 26 (ต่อ)

ตัวอย่าง	อุณหภูมิในการเก็บรักษา	ระยะเวลาการเก็บรักษา	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าดัชนีการกระจายตัว (PI)	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
NLC-1%VIO (F21)	45 °C	วันที่ 1	377.4±0.21	0.235±0.002	-29.35±0.05	สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 7	432.4±1.35	0.268±0.002	-28.45±0.16	สีขาว กลิ่นเฉพาะตัว ชั้นหนืดเล็กน้อย
		วันที่ 15	471.2±1.39	0.281±0.001	-27.50±0.11	สีขาว กลิ่นเฉพาะตัว ชั้นหนืดเล็กน้อย
		วันที่ 30	657.7±1.75	0.313±0.001	-26.20±0.09	สีเหลืองอ่อน ชั้นหนืด และเริ่มแยกชั้น
		วันที่ 60		unstable		สีเหลืองอ่อน แยกชั้น
		วันที่ 90		unstable		สีเหลืองอ่อน ตกตะกอน
	Heating-Cooling 4°C - 45°C	6 cycles	703.6±2.71	0.310±0.004	-8.17±0.15	สีขาว แยกชั้น และมีความข้นหนืด

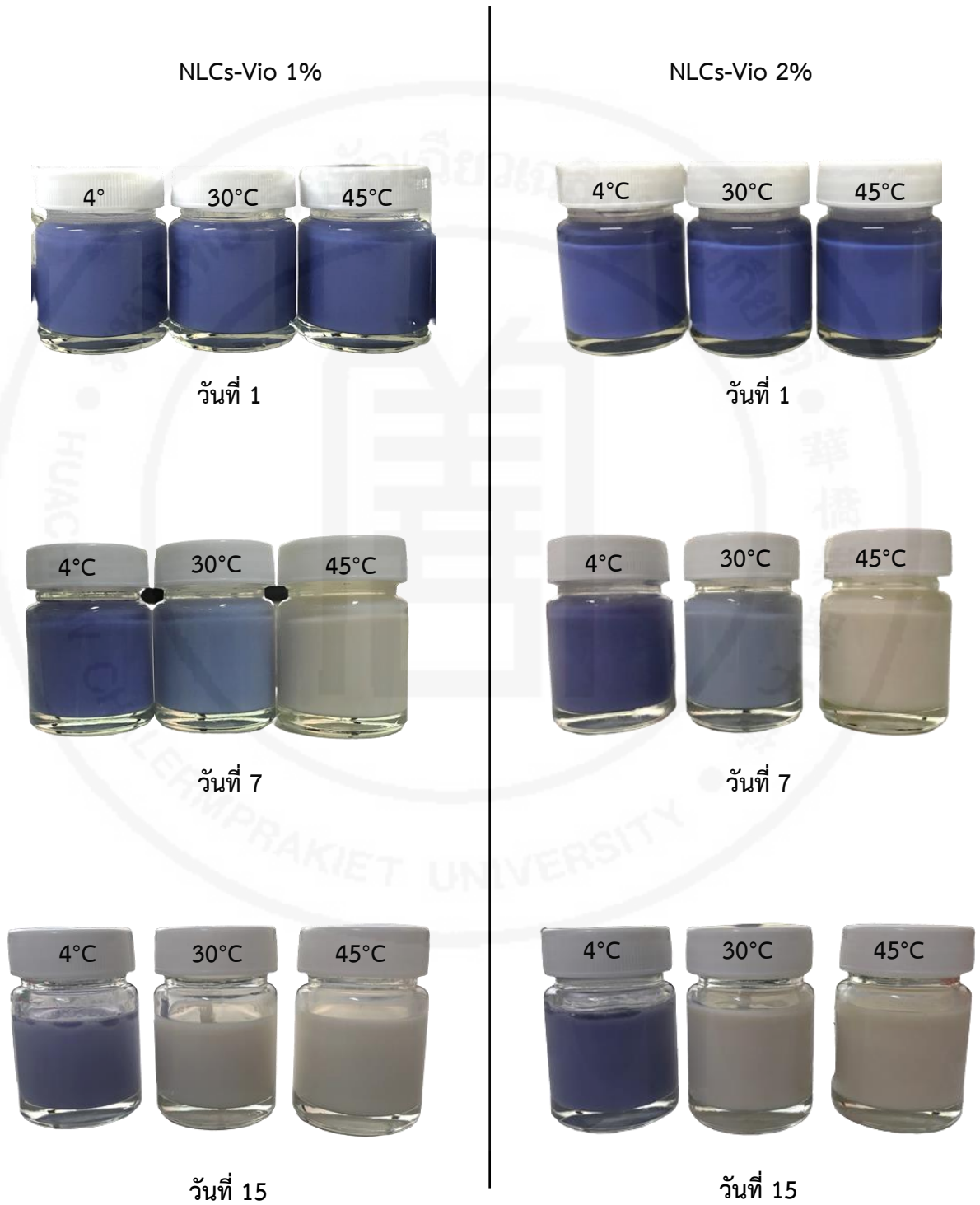
ตารางที่ 27 ขนาดของอนุภาค ค่าดัชนีการกระจายตัว ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า และลักษณะทางกายภาพของตำรับ NLCs-Vio2% โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน

ตัวอย่าง	อุณหภูมิในการเก็บรักษา	ระยะเวลาในการเก็บรักษา	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าดัชนีการกระจายตัว (PI)	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
NLC-2%VIO (F22)	4°C	วันที่ 1	364.4±1.87	0.268±0.001	-23.96±0.05	สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 7	472.4±2.18	0.306±0.002	-21.42±0.11	สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 15	513.5±1.24	0.330±0.002	-19.74±0.20	สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 30	585.4±2.65	0.364±0.002	-19.29±0.09	สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 60		unstable		สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ชั้นหนืด
		วันที่ 90		unstable		สีม่วงจางลง กลิ่นเฉพาะตัว ชั้นหนืด
	30°C	วันที่ 1	268.2±2.10	0.186±0.001	-21.00±0.07	สีม่วง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 7	277.9±1.10	0.269±0.001	-20.72±0.07	สีม่วงจางลง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 15	280.4±0.47	0.252±0.001	-20.45±0.02	สีม่วงจางลง กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 30	289.3±0.87	0.253±0.002	-19.95±0.03	สีขาว กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 60	367.0±0.75	0.287±0.001	-18.96±0.03	สีขาว กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 90	397.4±1.60	0.298±0.003	-16.90±0.04	สีขาว กลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น

ตารางที่ 27 (ต่อ)

ตัวอย่าง	อุณหภูมิในการเก็บรักษา	ระยะเวลาการเก็บรักษา	ขนาดอนุภาค (nm)	ค่าดัชนีการกระจายตัว (PI)	ค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (mV)	ลักษณะทางกายภาพ
NLC-2%VIO (F22)	45 °C	วันที่ 1	403.0±1.79	0.246±0.007	-29.86±0.21	สีม่วง มีกลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 7	746.1±2.21	0.414±0.002	-24.43±0.09	สีขาว มีกลิ่นเฉพาะตัว ไม่แยกชั้น
		วันที่ 15		unstable		สีเหลืองอ่อน เริ่มแยกชั้น
		วันที่ 30		unstable		สีเหลืองอ่อน แยกชั้นชัดเจน
		วันที่ 60		unstable		สีเหลืองอ่อน แยกชั้นชัดเจน
		วันที่ 90		unstable		สีเหลืองอ่อน แยกชั้นชัดเจน
	Heating-Cooling 4°C - 45°C	6 cycles	2526.5±2.01	0.730±0.01	-5.85±0.14	สีขาว แยกชั้น และมีความขุ่นหนืด

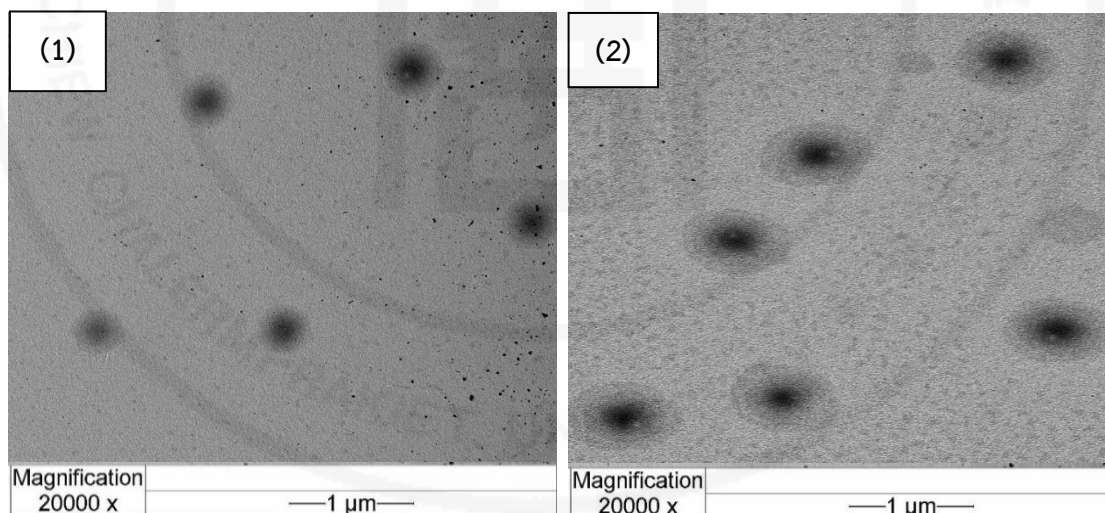
ภาพที่ 17 ลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ซ้าย) และ 2 เปอร์เซ็นต์ (ขวา)



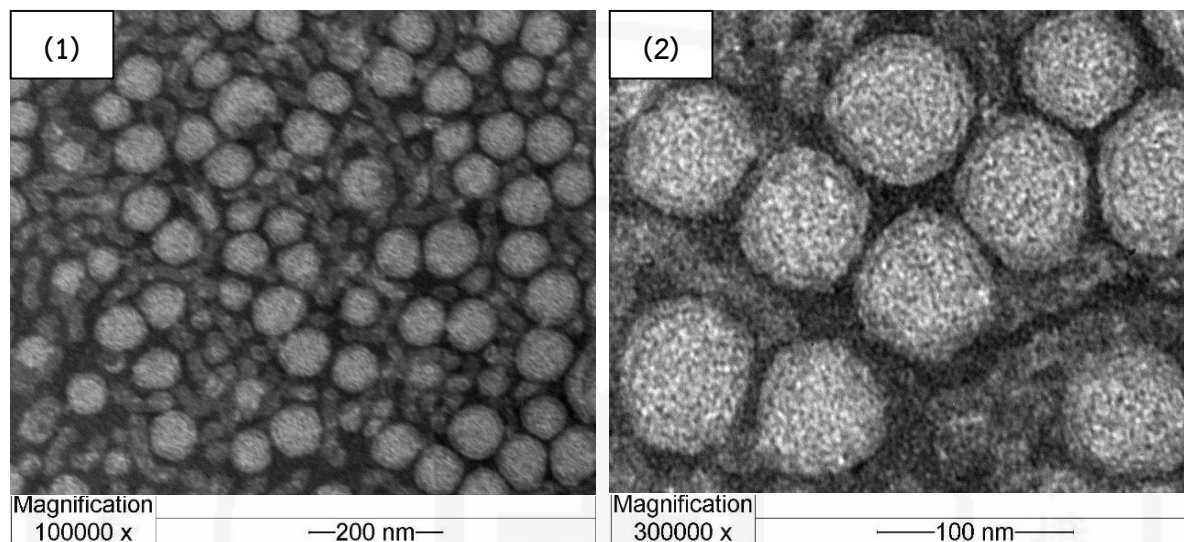
4.13 การตรวจสอบโครงสร้างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่เตรียมจาก Oleic acid ร่วมกับ Glycerol Behenate ในอัตราส่วน 3:1 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน แสดงดังภาพที่ 18 ซึ่งเป็นการยืนยันขนาดของอนุภาค NLCs โดยทั้ง 2 ภาพเป็นการเปรียบเทียบขนาดอนุภาค NLCs ที่เตรียมจากความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่แตกต่างกัน โดยจากภาพจะเห็นได้ว่าอนุภาคที่เตรียมได้จาก Tween 20 ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเล็กกว่าการเตรียมด้วย Tween20 ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีแนวโน้มสอดคล้องกับการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาคในหัวข้อการทดลองที่ 4.10.2

ภาพที่ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่เตรียมจาก Tween 20 ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (1) และ 3 เปอร์เซ็นต์ (2) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)



ภาพที่ 19 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่กำลังกำลังขยาย 100000X (1) และ 300000X (2) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)



ผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่าง NLCs ที่บรรจุสารสกัดไวโอลาซิน (NLCs-Vio) ด้วยกล้องชนิด TEM แสดงดังภาพที่ 19 พบว่าอนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลม ขนาดของอนุภาคไม่แตกต่างกันมากนัก และยังพบว่าเกิดการตกผลึกของสารสำคัญบนอนุภาค NLCs ส่งผลทำให้อนุภาคมีความเป็นอสัณฐานมากขึ้น (amorphous type)

4.14 การทดสอบประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนไขมันที่บรรจุสารไวโอลาซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนัง โดยวิธี Agar dilution

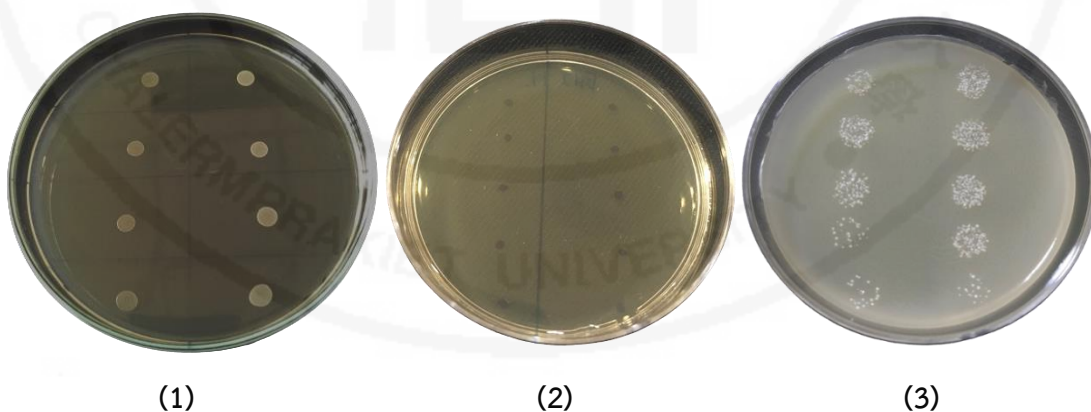
จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคผิวหนังของตำรับอนุภาค NLCs บรรจุสารไวโอลาซินความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 90 วัน พบว่าตำรับ NLCs-Vio 1% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อผิวหนัง 3 ชนิด ได้แก่ *C. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้เป็นระยะเวลา 7 วัน แสดงดังตารางที่ 28

อุณหภูมิ 4°C ตำรับ NLCs-Vio 2% ยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้เป็นระยะเวลาสูงสุด 30 วัน แต่เนื่องจากตำรับเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพในวันที่ 60 ของการเก็บรักษาทางผู้วิจัยจึงไม่นำมาทดสอบ จึงสรุปได้ว่าตำรับ NLCs-Vio 2% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้เป็นระยะเวลา 30 วัน

จากผลการทดสอบความคงตัวของตำรับที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าสีของตำรับมีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่วันที่ 7 ของการเก็บรักษา (ภาพที่ 17) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีนั้นไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว โดยผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 90 วัน พบว่าตำรับที่ NLCs-Vio 1% มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อสิวทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ *C. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้เป็นระยะเวลา 7 วัน ส่วนประสิทธิภาพของตำรับ NLCs-Vio 2% ยังคงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้เป็นระยะเวลาสูงสุด 60 วัน และสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้เป็นระยะเวลา 30 วัน แสดงดังตารางที่ 29

จากภาพที่ 20 และภาพที่ 21 แสดงให้เห็นว่าสารไวโอลาซินที่ไม่ได้กักเก็บในอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้น้อยกว่าสารไวโอลาซินที่ถูกกักเก็บใน NLCs โดยพบการเจริญของ *C. acnes*, *S. aureus* และ *S. epidermidis* ในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา

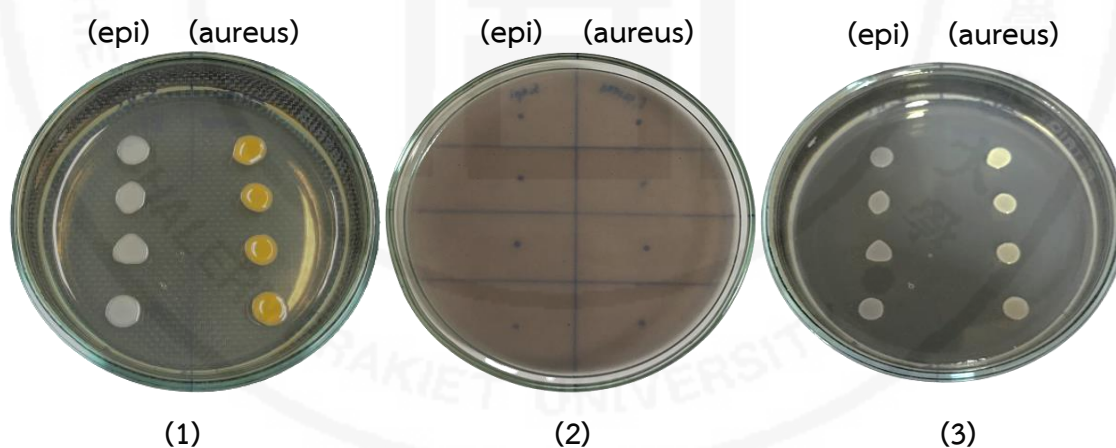
ภาพที่ 20 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Cutibacterium acnes* ของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซินความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Agar dilution



- หมายเลข (1) คือ สารไวโอลาซิน โดยการทดสอบการยับยั้งเชื้อในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา
 หมายเลข (2) คือ อนุภาค NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน 2% โดยทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อในวันที่ 1 ของการเก็บรักษา
 หมายเลข (3) คือ อนุภาค NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน 2% โดยทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อในวันที่ 90 ของการเก็บรักษา

ผลการทดลองพบว่าสารไวโอลาซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Cutibacterium acnes* ได้เป็นเวลาถึง 60 วัน เนื่องจากสารไวโอลาซินมีโครงสร้างหลักเป็นสารประกอบพวกอินโดล (indole) และสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีส่วนที่เป็นฟีนอล 1 วงอยู่ในโครงสร้าง จึงส่งผลให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้ นอกจากนี้ยังมีการรายงานจากสารที่มีโครงสร้างหลักกลุ่มอินโดล คือ กรดอินโดลอะซิติก (Indole-3-acetic acid) ซึ่งเป็นฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของพืช ก็พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้เช่นกัน (118) ซึ่งสอดคล้องกับบอร์พิน และคณะ ที่พบว่าสารประกอบที่มีโครงสร้างของฟีนอล มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้ดี โดยทำการทดสอบกับสารรีซอร์ซินอล (resorcinol) และ ทรานส์ออกซิรีเวอร์ราทรอล (trans-oxyresveratrol) ที่มีโครงสร้างของสารประกอบฟีนอล 1 วงและ 2 วง ตามลำดับ (119)

ภาพที่ 21 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* ของตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซินความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Agar dilution



- หมายเลข (1) คือ สารไวโอลาซิน โดยการทดสอบการยับยั้งเชื้อในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา
 หมายเลข (2) คือ อนุภาค NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน 2% โดยทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อ ในวันที่ 1 ของการเก็บรักษา
 หมายเลข (3) คือ อนุภาค NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน 2% โดยทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อ ในวันที่ 60 ของการเก็บรักษา
 (epi) คือ เชื้อ *Staphylococcus epidermidis*
 (aureus) คือ เชื้อ *Staphylococcus aureus*

ตารางที่ 28 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ NLCs ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคผิวหนัง 3 สายพันธุ์ โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

สูตรที่	สายพันธุ์แบคทีเรีย	สารไวโอลาซิน (%)	agar dilution	ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย					
				วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 15	วันที่ 30	วันที่ 60	วันที่ 90
F21	<i>Cutibacterium acnes</i>			-	-	+	NT	NT	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0.5	-	-	+	NT	NT	NT
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			-	-	+	NT	NT	NT
F22	<i>Cutibacterium acnes</i>			-	-	-	-	NT	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1	-	-	-	-	NT	NT
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			-	-	-	-	NT	NT
Violacein	<i>Cutibacterium acnes</i>			-	+	NT	NT	NT	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1	-	+	NT	NT	NT	NT
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			-	+	NT	NT	NT	NT

- ไม่พบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย
 + พบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย
 NT Not test

ตารางที่ 29 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของตำรับ NLCs ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคผิวหนัง 3 สายพันธุ์ โดยทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สูตรที่	สายพันธุ์แบคทีเรีย	สารไวโอลาซิน (%)	agar dilution	ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย					
				วันที่ 1	วันที่ 7	วันที่ 15	วันที่ 30	วันที่ 60	วันที่ 90
F21	<i>Cutibacterium acnes</i>			-	-	+	NT	NT	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0.5	-	-	+	NT	NT	NT
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			-	-	+	NT	NT	NT
F22	<i>Cutibacterium acnes</i>			-	-	-	-	-	+
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1	-	-	-	-	+	NT
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			-	-	-	-	+	NT
Violacein	<i>Cutibacterium acnes</i>			-	+	NT	NT	NT	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1	-	+	NT	NT	NT	NT
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			-	+	NT	NT	NT	NT
หมายเหตุ	-	ไม่พบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย							
	+	พบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย							
	NT	Not test							

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1. แบคทีเรีย *Chromobacterium violaceum* สายพันธุ์ ATCC 12472 มีประสิทธิภาพในการผลิตสารสไวโอลาซินด้วยการบ่มเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส โดยมีประสิทธิภาพในการผลิตสารสไวโอลาซินได้ดีที่สุดคือ 36 ชั่วโมง

2. ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสไวโอลาซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ที่ก่อโรคผิวหนังที่ใช้ทดสอบ 3 สายพันธุ์ อยู่ในช่วงระหว่าง 0.0146-0.4688 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *Cutibacterium acnes* ได้ดีที่สุด และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสไวโอลาซินที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ที่ก่อโรคผิวหนัง โดยทดสอบกับเชื้อ *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus* มีค่าเท่ากับ 0.0146, 0.4688 และ 0.9375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3. ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสไวโอลาซินด้วยวิธี DPPH[•] และ ABTS^{•+} พบว่าสารสไวโอลาซินมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีค่า IC₅₀ จากวิธี DPPH[•] และ ABTS^{•+} เท่ากับ 729.63 และ 116.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+} ของสารมาตรฐาน vitamin C มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 30.16 และ 15.26 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. การเตรียมอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs ด้วยวิธี Melt-emulsification โดยทำการเตรียมสูตรตำรับจำนวน 12 ตำรับ เพื่อเป็นตำรับพื้นฐาน (NLCs-Base) พบว่าชนิดของไขมันเหลว ไขมันแข็ง และสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมในการเตรียมตำรับ ได้แก่ Oleic acid, Glyceryl Behenate และ Tween 20 ตามลำดับ (สูตรF7) โดยลักษณะทางกายภาพของตำรับมีสีขาว ไม่แยกชั้น ซึ่งมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 290.2 นาโนเมตร และค่าดัชนีการกระจายตัว (PI) เท่ากับ 0.295

5. การพัฒนาสูตรตำรับอนุภาคนาโนไขมันชนิด NLCs โดยศึกษาการแปรผันในด้าน ต่าง ๆ ได้แก่ ผลของอัตราส่วนของไขมันเหลวต่อไขมันแข็ง (LL:SL) การแปรผันความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว และผลของเวลาที่ใช้ในการลดขนาดอนุภาคด้วยวิธีการ sonicate พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของ Oleic acid ต่อ Glyceryl Behenate คือ 3:1 (สูตรF16) ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณไขมันเหลวที่เพิ่มขึ้นส่งผลทำให้ขนาดอนุภาคมีขนาดเล็กลงเท่ากับ 250.5 นาโนเมตร ค่า PI และค่าศักย์ไฟฟ้าซีต้า (ZP) มีค่าเท่ากับ 0.28 และ -27.5 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ความเข้มข้นของ

สารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมคือ Tween20 ที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าที่ 10 นาที เป็นเวลาที่เหมาะสมในการ sonicate โดยมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 213.7 นาโนเมตร (สูตร F19)

6. การพัฒนาตำรับ NLCs ที่บรรจุสารไวโอลาซิน (NLCs-Vio) ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (สูตร F21 และ F22) พบว่าเมื่อบรรจุสารสำคัญลงในตำรับจะส่งผลให้อนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 252.7 และ 268.2 นาโนเมตร ตามลำดับ

7. ลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของ NLCs-Base พบว่าที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส มีลักษณะที่ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาในการเก็บรักษาผ่านไป 60 วัน แต่จะเห็นได้ว่าที่ระยะเวลา 90 วัน ตำรับเกิดการแยกชั้นและมีความหนืดเกิดขึ้น ส่วนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เกิดการแยกชั้นในวันที่ 30 ของการเก็บรักษา และเมื่อนำ NLCs-Base ไปเก็บไว้ในที่ร้อน-เย็นสลับกัน จำนวน 6 รอบ พบว่าตำรับเกิดการแยกชั้น และมีความข้นหนืด

8. ลักษณะทางกายภาพและความคงตัวของ NLCs-Vio1% และ NLCs-Vio2% พบว่าที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ตำรับไม่เกิดการแยกชั้น ซึ่งสามารถวัดขนาดอนุภาค ค่า PI และค่า ZP ได้ครบทั้ง 90 วันของการเก็บรักษา แต่ที่อุณหภูมิดังกล่าวนั้นพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสีม่วงที่จางลง ตั้งแต่วันที่ 7 ของการเก็บรักษา

9. ผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ NLCs-Vio1% และ NLCs-Vio2% ด้วยกล้อง TEM พบว่าอนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลมขนาดของอนุภาคไม่แตกต่างกันมากนัก และพบว่าเกิดการตกผลึกของสารสำคัญบนอนุภาค NLCs ส่งผลทำให้อนุภาคมีความเป็นอสัณฐาน (amorphous type)

10. การยับยั้งเชื้อก่อโรคผิวหนังด้วยวิธี Agar dilution พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตำรับ NLCs-Vio2% มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. acnes* ได้เป็นเวลา 60 วันของการเก็บรักษา และสามารถยับยั้ง *S. epidermidis* และ *S. aureus* ได้ 30 วันของการเก็บรักษา

11. การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสของตำรับ NLCs-Vio2% พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 60 วัน ขนาดอนุภาคใหญ่เกินที่เครื่องมือสามารถวัดได้ (ระดับไมโครเมตร) สูตรตำรับมีความหนืดมากขึ้น ดังนั้นการยับยั้งเชื้อก่อโรคผิวหนังด้วยวิธี Agar dilution จึงสามารถทดสอบได้เพียง 30 วัน และพบว่าตำรับดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคผิวหนังทั้ง 3 สายพันธุ์ได้เป็นเวลา 30 วัน

12. อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้สีของตำรับที่จางลง โดยการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ จะส่งผลให้เกิดการจางของสีไวโอลาซินได้ช้ากว่าการเก็บที่อุณหภูมิสูง แต่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของสีที่จางลงนั้นไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำสารสกัดให้บริสุทธิ์มากขึ้นเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณของสารไวโอลาซินเพิ่มขึ้น และคำนึงถึงการปรับขนาดสเกล เช่นการผลิตโดยใช้ถังหมัก เพื่อให้ได้ผลผลิตของสารไวโอลาซินในระดับที่สูงยิ่งขึ้น

2. ควรเพิ่มการศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียให้ครอบคลุมถึงเชื้อกลุ่มอื่นที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคติดเชื้อทางแบคทีเรียทางผิวหนัง เช่น เชื้อรา เชื้อยีสต์

3. ควรมีการพัฒนาตำรับ NLCs ให้มีความคงตัวมากขึ้น และมีกลิ่นที่น่าใช้

4. ควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ หรือทดสอบการแพ้ในอาสาสมัคร เป็นต้น เพื่อสามารถใช้ประโยชน์จากตำรับ NLCs ที่ผสมสารไวโอลาซินในด้านอื่น ๆ มากขึ้น

บรรณานุกรม

1. นิธิ ตั้งศิริทรัพย์. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกกล้วยหอมดิบต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อสิวและการติดเชื้อผิวหนังที่พบได้บ่อย. ปรินญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา, บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ; 2555.
2. สถิติโรคของสถาบันโรคผิวหนัง กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ศูนย์ข้อมูลและสถิติงานพัฒนานโยบายและยุทธศาสตร์การแพทย์ สถาบันโรคผิวหนัง [อินเทอร์เน็ต]. 2560 [เข้าถึงเมื่อ 2 ก.ค. 2561]. เข้าถึงได้จาก:
http://inderm.go.th/news/myfile/13437592539cac7886_OPD%203%2059.pdf
3. Nguyen R. Symposium: Dermatology, treatment of acne vulgaris. J Paediatr Child Health 2010;21:119-25.
4. Eshtiaghi MN, Kuldiloke J. Formulation of anti acne cream containing natural Antimicrobials. Int Res J Pharm 2013;4(11):230-407.
5. Gopal MG, Farahana B. Effectiveness of Herbal Medications in the Treatment of Acne Vulgaris – A Pilot Study. Indian Pract 2001;54(10):710-23.
6. Gubelin W, Martinez A, Molina T, Zapata S, Valenzuela E. Antimicrobial susceptibility of strains of *Propionibacterium acnes* isolated from inflammatory acne. Rev Latinoam Microbiol 2006;48(1):14-16.
7. Lovečková Y and Havlíková I. A Microbiological approach to acne vulgaris. Biomed Papers 2002;146(2):29-32.
8. Lertsatitthanakorn P, Taweechaisupapong S, Aromdee C, Khunkitti W. In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. International Journal of Aromatherapy 2006;16(1):43-49.
9. Viyoch J, Pisutthanan N, Faikreua A, Nupangta K, Wangtorpol K, Ngokkuen J. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of Thai basil oils and their microemulsion formulas against *Propionibacterium acnes*. Int L Cosmet Sci. 2006;28(2):125-33.
10. Dhillon KS, Varshney KR. Study of Microbiological Spectrum in Acne Vulgaris: An *In Vitro* Study. Sch J App Med Sci 2013;1(6):724-727.
11. Sahib AS, Al-Anbari HH, and Abu Raghif AR. Oxidative stress in acne vulgaris: an important therapeutic target. J Mol Pathophysiol 2013;2(1): 27-31.

บรรณานุกรม (ต่อ)

12. ประภาพรรณ พรหมศิริกุล. การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเครื่องสำอางสมุนไพรและไวนีไทย. เวชสารโรงพยาบาลมหาราชานครราชสีมา. 2551;32(2):101-108.
13. Lee CJ, Chen LW, Chen LG, Chang TL, Huang CW, Huang MC, Wang CC. Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. JFDA 2013;21(2):169-176.
14. Musial W, Kubis A. Preliminary assessment of alginic acid as a factor buffering triethanolamine interacting with artificial skin sebum. Eur J Pharm Biopharm 2003;55(2):237-240.
15. Ross JI, Snelling AM, Carnegie E, Coates P, Cunliffe WJ, Bettoli V, Tosti G, Katsambas A, Galvan JI, Cove JH. Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. Br J Dermatol 2003; 148(3):467-78.
16. Kanlaya V, Lourith N. Therapeutic agents and herbs in topical application for acne treatment. Int J Cosmet Sci 2011;33(4):289-97.
17. Nelis HJ, De Leenheer, AP. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. J Appl Bacteriol. 1991;70:181-191.
18. Riveros R, Haun M, Campos V, Durán N. Complete characterization of violacein: an antibiotic and trypanocide pigment from *Chromobacterium violaceum*. J Biol Technol 1998;31(1):475-87.
19. Carvalho D, Costa F, Durán N, Huan M. Cytotoxicity activity of violacein in human colon cancer cells. J Toxicology in Vitro 2006;20 (8):1514-21.
20. Venugaranti VV, Perumal OP, Chapter 9, Nanosystems for Dermal and Transdermal Drug Delivery. In: Pathak Y, Thassu D. Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization. New York: Informa Healthcare USA, Inc., 2009:126-55.
21. Pardeike J, Hommos A, Muller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. Int J Pharm 2009;366(1-2):170-84.
22. Konzen M, Marco D, Cordova C, Viera T, Antonio R. Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. J Med Chem 2006;14 (24):8307-13.

บรรณานุกรม (ต่อ)

23. Aruldass CA, Masalamany SRL, Venil CK, Ahmad WA. Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Environ Sci Pollut Res* 2018;25:5164–5180
24. Durán N, Menck C. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspective. *J Crit Rev Microbiol* 2001;27(3):201-22.
25. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Meitzner TA. The Staphylococci. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. McGraw-Hill; 2010.
26. Kloos W, Schleifer K.H. A Selective Inhibitor of Staphylococci Reduces Biofilm Formation in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. S. M, ME. S, JG. H, editors. Williams & Wilkins.; 1986.
27. Ryan KJ, Ray CG. *Candida, Aspergillus, and Other Opportunistic Fungi*. 6th McGraw-Hill; 2004.
28. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* [อินเทอร์เน็ต]. 2556 [เข้าถึงเมื่อ 1 ก.ค. 2562]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.bacteriainphotos.com/s.aureus.html>
29. Ryan, K.J. and Ray, C.G. *Sherris Medical Microbiology*. 4th ed. Gaithersburg: McGraw Hill; 2004.
30. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(3):505-20.
31. Curran JP, Al-Salihi FL. Neonatal staphylococcal scalded skin syndrome : massive outbreak due to an unusual phage type. *Pediatrics* 1980;66(2):285–90.
32. Korzeniowski O, Sande MA. Combination antimicrobial therapy for *Staphylococcus aureus* endocarditis in patients addicted to parenteral drugs and in nonaddicts: a prospective study. *Ann Intern Med* 1982;97(4):496–503.
33. นิตินพงษ์ ศิริวงศ์, เอกชัย ชูเกียรติโรจน์. การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus* และแนวทางการควบคุม. *สงขลานครินทร์เวชสาร* 2552;27(4):348-358.

บรรณานุกรม (ต่อ)

34. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus epidermidis*. [อินเทอร์เน็ต]. 2558 [เข้าถึงเมื่อ 1 ก.ค. 2562]. เข้าถึงได้จาก: http://www.bacteriainphotos.com/staphylococcus_epidermidis_colony_morphology.html
35. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press; 2002.
36. Villari P, Samataro C, Acuzio L. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a Neonatal Intensive Care Unit over a Three-Year Period. J Clin Microbiol 2000; 38(5):1740–1746.
37. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Cutibacterium acnes* [อินเทอร์เน็ต]. 2557 [เข้าถึงเมื่อ 1 ก.ค. 2562]. เข้าถึงได้จาก: <https://www.sciencelearn.org.nz/images/2897-propionibacterium-acnes>
38. Perry AL, Lambert PA. *Propionibacterium acnes*. Letters in Applied Microbiology. 2006;42:185-188.
39. Sharon L, Bernard J. *Peptostreptococcus, Propionibacterium, Eubacterium* and other non-spore-forming anaerobic gram-positive bacteria. Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington DC: Academic Press; 1995. p. 578–99.
40. Nobble WC, Wade WG. *Propionibacterium, Bifidobacterium* and related organism. Topley & Wilson's microbiology and microbial infection. 9th ed. London: Dunitz; 1998. p. 519–21.
41. สุขาดา ประเสริฐรัฐวิทยาการ. ยาทาแก้สิว, การพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางผิวหนัง. ปรินญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเภสัชกรรม, มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ; 2533.
42. เพ็ญวดี ทิมพัฒน์พงศ์. สิว วิทยาการก้าวหน้าและโรคที่เกี่ยวข้อง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ข้าวฟ่าง; 2536.
43. Zaenglein AL, Thiboutot DM. Fitzpatrick's dermatology in general medicine: Acne vulgaris and acneiform eruptions. 8thed. New York: McGraw-Hill; 2012.
44. White GM. Recent findings in the epidemiologic evidence, classification, and subtypes of acne vulgaris. J Am Acad Dermatol 1998;39(2Pt3):S34-7.
45. Williams HC, Dellavalle RP, Garner S. Acne vulgaris. The lancet 2012;379(9813): 361-72.

บรรณานุกรม (ต่อ)

46. Spencer EH, Ferdowsian HR, Barnard ND. Diet and acne: A review of the evidence. *Int J Dermatol* 2009;48(4):339-47.
47. Brown SK, Shalita AR. Acne vulgaris. *The Lancet* 1998;351(9119):1871-6.
48. จิตรลดา เหมรา. สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Natural product). โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพกรมวิทยาศาสตร์บริการ [อินเทอร์เน็ต]. 2558 [เข้าถึงเมื่อ 25 มิ.ย. 2562]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.dss.go.th/images/st-article/bsp-4-2558-Natural.pdf>
49. Daniel M. Handbook of U.S. colorant for food, drugs and cosmetics. *Food Science and Technology* [Internet]. 1986 [cited 2018 July 30]. Available from: [https://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/coloradditives in specific products/incosmetics/ucm110032.htm](https://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/coloradditives%20in%20specific%20products/incosmetics/ucm110032.htm)
50. Yang LH, Xiong H, Lee OO, Qi SH, Qian PY. Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Lett Appl Microbiol* 2007;44(6):625-30.
51. Rettori D, Durán N. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produces by *Chromobacterium violaceum*. *J Biol Tecnol* 1998;14(5): 685-688.
52. Hoshino T, Kondo T, Uchiyama T, Ogasawara N. Biosynthesis of violacein: a novel rearrangement in tryptophan metabolism with a 1, 2-shift of the indole ring. *J Agric Biol Chem* 1987;51(3):965-68.
53. Blosser R, Gray K. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for n-acyl homoserine lactone. *J Microbiol Methods* 2000;40(1):47-55.
54. Azlina A, Zulaikha N, Nordiana N, Zainul A, Rezali M. Production and characterization of violacein by Locally Isolated *Chromobacterium violaceum* grown in agricultural wastes. *J Appl Biochem Biotechnol* 2012;167(5):1220-34.
55. Brucker RM, Harris RN, Schwantes CR, Gallaher TN, Flaherty DC, Lam BA, Minbiole KP. Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. *J Chem Ecol* 2008;34(11):1422-9.

บรรณานุกรม (ต่อ)

56. Matz C, Deines P, Boenigk J, Arndt H, Eberl L, Kjelleberg S, Jürgens K. Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(3):1593-9.
57. Shirata A, Tsukamoto T, Yasui H, Hata T, Hayasaka S, Kojima A, et al. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. *Japan Agric Res Quart* 2002;131-40.
58. Wang H, Jiang P, Lu Y, Ruan Z, Jiang R, Xing X. Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain *Duganella* sp. B2. *J Biochem Eng* 2009;44(2-3):119-24.
59. Mendes A, Carvalho J, Duarte M, Durán N, Bruns R. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. *J Biol* 2001;23(23):1963-69.
60. Lu Y, Wang L, Xue Y, Zhang C, Xing X. Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from glacier in Xinjiang, China. *J Biochem Eng* 2009;43(2):135-41.
61. Inniss W, Mayfield C. Seasonal variation of psychrotrophic bacteria in sediment from Lake Ontario. *J Water Res* 2005;3(6):481-4.
62. Durán N, Campos V, Riveros R, Joyas A, Pereira M, Haun M. Bacterial Chemistry-III. Preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products. *J Anais Da Academia Brasileira De Ciencias* 1989;61(1):31-6.
63. Nakamura Y, Asada C, Sawada T. Production of antibacterial violet pigment by psychrotrophic bacterium RT102 strain. *J Biotechnol Bioprocess* 2003;8(1):37-40.
64. Baretto A, Del C, Cardoso J, Morgado P, Munhoz R, Eid M. Hospital readmissions and death from heart failure-rates still alarming. *J Arq Bras Cardiol* 2008;91(5):309-14.
65. Aoki S, Nomura T. Violacein-containing natural bactericides their manufacture and cosmetics containing them. *J Japanese Kokai Tokkyo Koho* 1998;77(23):120-7.

บรรณานุกรม (ต่อ)

66. Meiring U, Lanzendoerfer G, Riedel H, Kallmayer V, Viala S, Mocigemba N, Baretto Schaefer J. Cosmetic preparations containing violacein as dye. [Internet].2007 [cited 2019 May 20]. Available from: http://www.academia.edu/26262482/Advances_in_Chromobacterium_violaceum
67. ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญจนบุตร, สาธิต พรตระกูลพิพัฒน์. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ. ใน: เอกสารการประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 9. สาขาสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น; 2551. หน้า 91-101.
68. ภัทรชัย กิรติสิน. ตำราวิทยาแบคทีเรียการแพทย์. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล; 2549.
69. บุهران พันธุ์สุวรรณ. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2556;21:275-286.
70. ไมตรี สุทธิจิต, รัตนา บรรเจิดพงศ์ชัย, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, ศิริธร ศิริอมรรพวรรณ, ไชยวัฒน์ ไชยสุต, สุภัตรา ประศุพัฒนา. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. เชียงใหม่: นวัตกรรมสุขภาพ สำนักพิมพ์; 2555.
71. โครงสร้างของวิตามินซี [cited 2015 April]. Available from: <https://www.smartsience.co.th/product/64614/l-ascorbic-acid>
72. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. นาโนเทคโนโลยีในการนำส่งทางผิวหนัง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยมหิดล; 2555. หน้า 211-12.
73. Zhang J, Carryn H, Smith EW. Solid Lipid Nanoparticles for Topical Drug Delivery. Am J Drug Deliv 2006;4(4):215-20
74. Müller RH, Mehnert W, Suoto EB. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for dermal delivery. In: Boronaugh L, editor. Percutaneous absorption. New York: Marcel Dekker; 2005. p. 719-38.
75. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. Adv Drug Deliv Rev 2002;54:S131-55.
76. Lucks JS, Müller RH. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres SLN). EP0000605497 (1991).

บรรณานุกรม (ต่อ)

77. Trotta M, Debernardi F, Caputo O. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm* 2003;257(1-2):153-60.
78. Müller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(6):522-30.
79. Guimarães KL, Ré MI. Lipid nanoparticles as carriers for cosmetic ingredients: the first (SLN) and the second generation (NLC). Springer. 2011;101-122.
80. Shah KA, Date AA, Joshi MD, Patravale VB. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: potential in topical delivery. *Int J Pharm*. 2007;345(1-2):163-71.
81. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpoura A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2013;19:29-43.
82. Khosa A, Reddi S, Saha RN. Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018;103:598-613
83. Selvamuthukumar S, Velmurugan R. Nanostructured lipid carriers: a potential drug carrier for cancer chemotherapy. *Lipids Health Dis* 2012;11:159.
84. Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;47(2-3):165-96.
85. Üner M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie* 2006; 61(5):375-86.
86. Müller RH, Runge Sa, Ravelli V, Pharmaceutical cyclosporin formulation of improved biopharmaceutical performance and improved physical quality and stability and process for producing same. *Deutsche Patentanmeldung* 1998;198(19):273.
87. Mukherjee S, Ray S, Thakur RS. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian J Pharm Sci* 2009;71(4):349-58.
88. Hu FQ, Jiang SP, Du YZ, Yuan H, Ye YQ, Zeng S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;45(3-4):167-73.

บรรณานุกรม (ต่อ)

89. Yuan H, Wang LL, Du YZ, You J, Hu FQ, Zeng S. Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-emulsification. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007;60(2):174-9.
90. Müller RH, Maaßen S, Weyhers H, Specht F, Lucks JS. Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 1996;138(1):85-94.
91. Wissing SA, Kayser O, Müller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56(9):1257-72.
92. Freitas C, Müller RH. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. *Int J Pharm* 1998;168(2):221-229.
93. Siekmann B, Westesen K. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1994;3(3):159-175.
94. Das S, Ng WK, Tan RB. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs. *Eur J Pharm Sci* 2012;47(1):139-51.
95. จินตนา ลือสุวรรณกิจ. การเตรียมและประเมินผลผลิตภัณฑ์เจลและยาน้ำใส่รักษาสิวจากพืชสมุนไพร. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม, บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่; 2551.
96. Dukes GR. General considerations for stability testing of topical pharmaceutical formulations. in : Osborne DW , editor. *Topical drug delivery formulations*. New York :Marcel Dekker 1990;197-211.
97. ฝ่ายทดสอบความคงตัวของยา กองวิเคราะห์ยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. การทดสอบความคงสภาพของยา. กรุงเทพฯ : ฝ่ายทดสอบความคงตัวของยา กองวิเคราะห์ยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2535.

บรรณานุกรม (ต่อ)

98. โรจนา โกวิทวัฒนพงศ์ และเยาวลักษณ์ วรรณนะพิศิษฐ์. แนวทางการทดสอบความคงสภาพของยาและผลิตภัณฑ์ยา. กรุงเทพฯ:กองควบคุมยา สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข; 2547.
99. ศิริพร โอโกโนกิ. ความคงตัวของเภสัชภัณฑ์. เชียงใหม่:ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2540.
100. นิชากร เจริญกุล, หทัยรัตน์ ริมศิริ, เพ็ญขวัญ ชมปรีดา, อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, ชื่นจิตต์ แจ่มเจนกิจ. การพัฒนาเจลทาสิวที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีน (*Cinnamomum cassia*). ใน: เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 วันที่ 3-6 กุมภาพันธ์ 2554. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2554. หน้า 481-7.
101. พรพิมล เพ็ชรโยธิน, จันทนา ไพรบูรณ์, อนงค์ จีระภัทร์. ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว (*Propionibacterium acnes*) จากสารสกัดของสาหร่ายทะเล. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 2558;38(3):273-82.
102. วันวิสาข์ คุณะวัฒนกุล, วนิตา ไทรชมภู, คัทลียา เมฆจรัสกุล, อมรรัตน์ เจริญมิตร, ชิตชนก เหล็กดี, ญัฐภาภานต์ ศรีจันทร์. ฤทธิ์ต้านเชื้อสิว (*Propionibacterium acnes*) จากสมุนไพรไทย (Anti-Propionibacterium acnes from Thai herbal medicines). J Sci Technol MSU 2560;36(5):607-13.
103. ชลธิชา ตันติธาดาพิทักษ์, วรรณรัตน์ พรศิริวงศ์. รักษาสิวกักเสบด้วยสมุนไพรรวม. [อินเทอร์เน็ต]. 2561 [เข้าถึงเมื่อ 18 มิ.ย. 2562]. เข้าถึงได้จาก: <https://www3.rdi.ku.ac.th>
104. วีระศักดิ์ คงพันธ์ระ. การผลิตและคุณลักษณะของสารไวโอลาซินจากแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา; 2556.
105. Durán N, Razo S, Campos V. Bacterial chemistry-II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. J Anais Da Academia Brasileira De Ciencias 1983;55(3):231-4.
106. Chidambaram K, Clair A, Mohd H, Ali R, Zainul A, Wan A. Spray drying of violet pigment from *Chromobacterium violaceum* UTM5 and its application in food model systems. J Int Biodeter Biodegr 2015;102:324-9.

บรรณานุกรม (ต่อ)

107. Hu FQ, Yuan H, Zhang HH, Fang M. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *Int J Pharm* 2002;239(1-2):121-8.
108. Patel D, Dasgupta S, Dey S, Ramani YR, Ray S, Mazumder B. Nanostructured Lipid Carriers (NLC)-Based Gel for the Topical Delivery of Aceclofenac: Preparation, Characterization, and In Vivo Evaluation. *Sci Pharm* 2012;80(3):749-64.
109. ขวัญศิริ อุไรวรรณ. การเตรียมตัวพาไขมันระดับนาโนจากไขมันเมล็ดเงาะด้วยวิธี Melt-emulsification. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี, บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ; 2558.
110. สุกัญญา เขียวสะอาด. องค์ประกอบทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ทางชีวภาพของ บุนนาค. ใน: รายงานการวิจัย ฉบับที่ 290 มหาวิทยาลัยพายัพ 2553.
111. Karimi N, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Mehramuz B, Kafil HS. Antioxidant, Antimicrobial and Physicochemical Properties of Turmeric Extract-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (NLC). *J Colloid Interface Sci* 2018;22:18-24.
112. Parizad Piran, Hossein Samadi Kafil, Saeed Ghanbarzadeh, Rezvan Safdari, Hamed Hamishehkar. Formulation of Menthol-Loaded Nanostructured Lipid Carriers to Enhance Its Antimicrobial Activity for Food Preservation. *Adv Pharm Bull* 2017;7(2):261–268.
113. ณัชชาริณี เหล่าศิริเสถียร. การพัฒนาและประเมินอนุภาคนาโนชนิดไขมันแข็งที่กักเก็บพรอพอลิสในตำรับยาทาต้านแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม, บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่; 2557.
114. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—tenth edition. Wayne, PA: CLSI; 2015 CLSI document M07-A10.
115. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology* 2015;13:620-30.

บรรณานุกรม (ต่อ)

116. Vishnu TS, Palaniswamy M. Systematic Approach on Evaluating the *in vitro* Antioxidant Activity of Violacein; Novel Isolate *Chromobacterium Vaccinii* CV5. Biomedical and Pharmacology 2018;11(2):703-09.
117. Suksiriworapong J, Rungvimolsin T, A-gomol A, Junyaprasert VB, Chantasart D. Development and Characterization of Lyophilized Diazepam-Loaded Polymeric Micelles. AAPS PharmSciTech 2014;15(1): 52–64.
118. Jung W, Chung M, Kim S, Ahmad A, Praveen N. In vitro antioxidant activity, total phenolics and flavonoids from celery (*Apium graveolens*) leaves. J Med Plants Res 2011;5(32):7022-30.
119. อรพิน โภมุดิบาล, สุนิตย์ สุขสำราญ.ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากใบนางแย้ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต. กรุงเทพฯ; 2560.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเพาะเชื้อ และสารเคมี

1. Tryptone Soya Broth (TSB)

ชั่งอาหารเพาะเชื้อ TSB หนัก 30 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ใส่ลงในปิกเกอร์ ทำให้ละลาย จากนั้นปิเปตใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาและปิดทับอีกครั้ง ด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Tryptone Soya Agar (TSA)

ชั่งอาหารเพาะเชื้อ TSA หนัก 40 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลี และปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเทลงจานเพาะเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเชื้อ และรอให้อาหารเพาะเชื้อแข็งตัว

3. Brain Heart Infusion broth (BHI broth) ผสมกลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอาหารเพาะเชื้อ BHI broth หนัก 37 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และชั่งกลูโคสหนัก 1 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในปิกเกอร์ ทำให้ละลาย จากนั้นปิเปตใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาและปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Brain Heart Infusion agar (BHI agar) ผสมกลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอาหารเพาะเชื้อ BHI agar หนัก 52 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และชั่งกลูโคสหนัก 1 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในปิกเกอร์ ทำให้ละลาย จากนั้นปิเปตใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 20 มิลลิลิตร ปิดฝาและปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาเทลงจานเพาะเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเชื้อ และรอให้อาหารเพาะเชื้อแข็งตัว

5. สารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ (45% glycerol)

นำน้ำบริสุทธิ์ ปริมาตร 27.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดฝาเกลียว ปีเปตต์กลีเซอรอลปริมาตร 22.5 มิลลิลิตรใส่ลงไป ทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Nutrient Broth (NB)

ซั่งอาหารเพาะเชื้อ NB หนัก 1.3 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในปิ๊งเกอร์ ทำให้ละลาย จากนั้นปีเปตต์ใส่ขวดรูปชมพู่ ปริมาตรขวดละ 20 มิลลิลิตร ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วย จุกสำลี และปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Mueller-Hinton Agar (MHA)

ซั่งอาหารเพาะเชื้อ MHA หนัก 38 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และนำไปให้ความร้อน คนให้่วนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปีเปตต์อาหารใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 20 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเทอาหารใส่จานเพาะเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ และรอให้อาหารเพาะเชื้อแข็งตัว

8. Mueller-Hinton Broth (MHB)

ซั่งอาหารเพาะเชื้อ MHB หนัก 21 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ใส่ลงในปิ๊งเกอร์ ทำให้ละลาย จากนั้นปีเปตต์ใส่หลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดฝาและปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. การเตรียมยาปฏิชีวนะสำหรับยับยั้งเชื้อทดสอบ

Ampicillin ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ซั่งยา Ampicillin 0.01 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการผสมให้สารละลายเข้ากัน จะได้ Ampicillin 200 µg/ml

Clindamycin ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ปีเปตต์ยา Clindamycin 20 ไมโครกรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 15 มิลลิลิตร ทำการผสมให้สารละลายเข้ากัน จะได้ Clindamycin 200 µg/ml

10. Resazurin 1.8 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง Resazurin sodium salt 1.8 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ทำการกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นเจือจางลง 10 เท่า โดยทำการปิเปตต์ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร จะได้ Resazurin 1.8 เปอร์เซ็นต์

11. Ascorbic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งสาร ascorbic acid 0.01 กรัม เติเมทานอลจนถึงขีดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเจือจางกับเอทานอลให้ได้ค่าความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบ

12. DPPH[•] ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์

เตรียมสารละลาย DPPH[•] 0.2 mM ในเอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (M.W. = 394.33)

$$\text{จาก } g / \text{M.W.} = \text{CV} / 1000$$

$$g = (0.2 \times 10^{-3}) \times 10 \times 394.33 / 1000$$

$$g = 0.00078 \text{ กรัม}$$

ดังนั้นชั่งสาร DPPH[•] 0.00078 กรัม ละลายในเอทานอลปริมาตร 10 มิลลิลิตร

13. ABTS^{•+} ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์

ชั่งสาร ABTS^{•+} 0.0384 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร

14. สารละลาย Potassium persulfate (K₂S₂O₈) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์

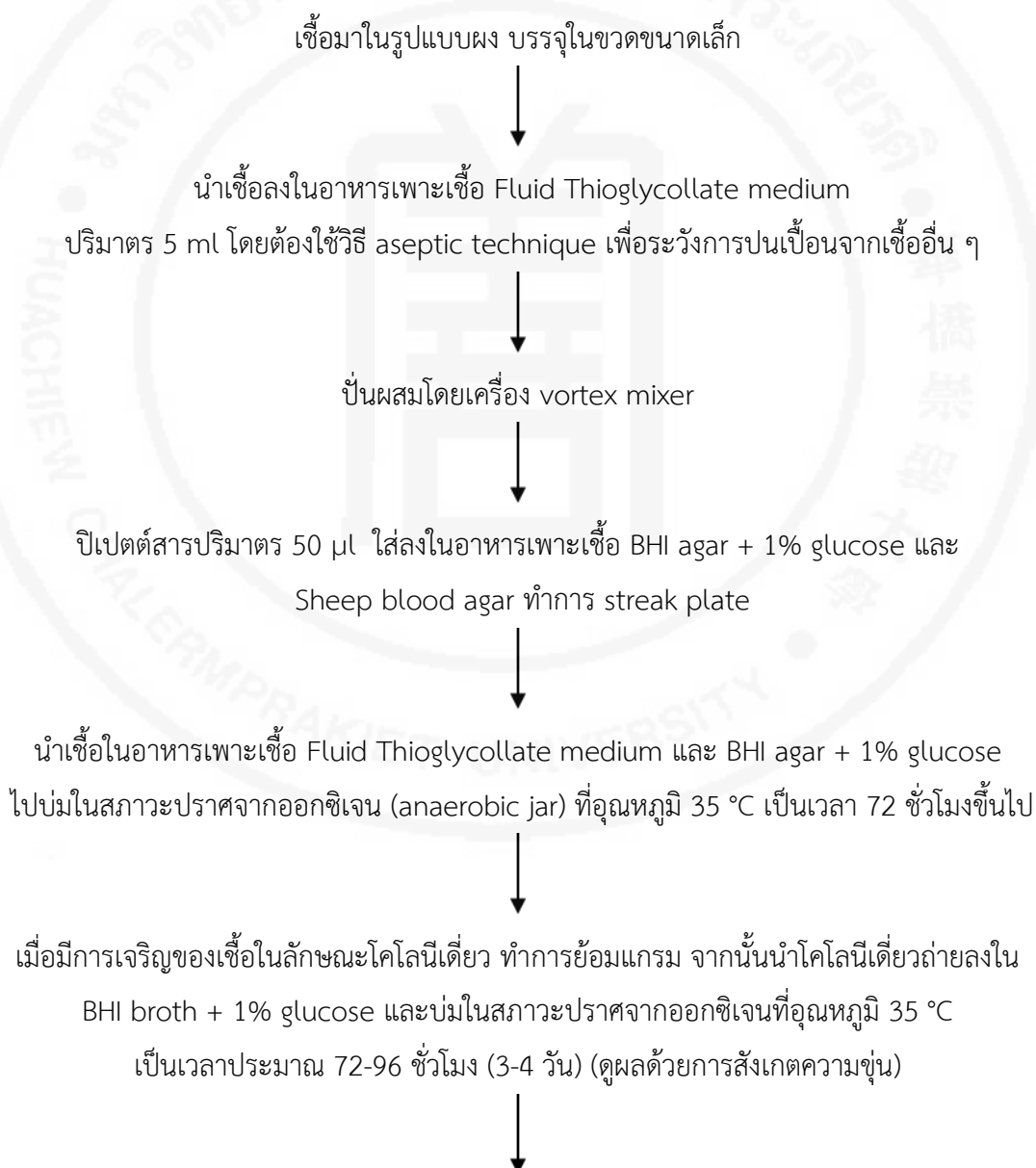
ชั่ง Potassium persulfate 0.0166 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนถึงขีดวัดปริมาตร 25 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงและการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคผิวหนัง

Cutibacterium acnes ATCC 6919

1. การเพาะเลี้ยงและการเตรียมต้นเชื้อทดสอบ

1.1 การเลี้ยงเชื้อ *Cutibacterium acnes* เพื่อเก็บ stock culture

ปิเปตต์ 45% glycerol ปริมาตร 100 μ l ใส่ลงใน microtube จากนั้นปิเปตต์เชื้อจาก
BHI broth + 1% glucose ปริมาตร 200 μ l ใส่ลงไปและผสมให้เข้ากัน



เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

หมายเหตุ อาหารเพาะเชื้อ Fluid Thioglycollate medium จะมี oxygen indicator ผสมอยู่ ซึ่งถ้ามีออกซิเจนซึมผ่านลงไปอาหารเพาะเชื้อ จะทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีชมพู ดังนั้นก่อนทำการเพาะเชื้อ ต้องสังเกตสีของอาหารเพาะเชื้อก่อนทุกครั้ง เพื่อให้เหมาะสมกับสภาวะการเจริญของเชื้อ *C. acnes*

1.2 การเตรียมต้นเชื้อทดสอบ

เพาะเชื้อทดสอบลงในอาหารเพาะเชื้อ BHI broth + 1% glucose บ่มในสภาวะปราศจากออกซิเจน
ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 72-96 ชั่วโมง (3-4 วัน)



ปรับค่า OD₅₇₅ ให้มีค่าอยู่ที่ 0.4 ± 0.025

หมายเหตุ ควรเพาะเลี้ยงเชื้อมากกว่า 72 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ค่า OD₅₇₅ เข้มข้น 0.4 ± 0.025 ตามที่ต้องการ และถ้าต้องการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง ควรมีการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวมาก่อนทุกครั้ง

ภาคผนวก ค

ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และ ค่าความเข้มข้นของสารไวโอลาซิน

1. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) ออบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่งให้เย็นในโถดูดความชื้นและนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้งโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง จากนั้นนำเซลล์ที่บรรจุในหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C ประมาณ 24 ชั่วโมง ที่งให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง และทำการคำนวณหาน้ำหนักของเซลล์โดยใช้สูตรคำนวณ (กรัมต่อลิตร)

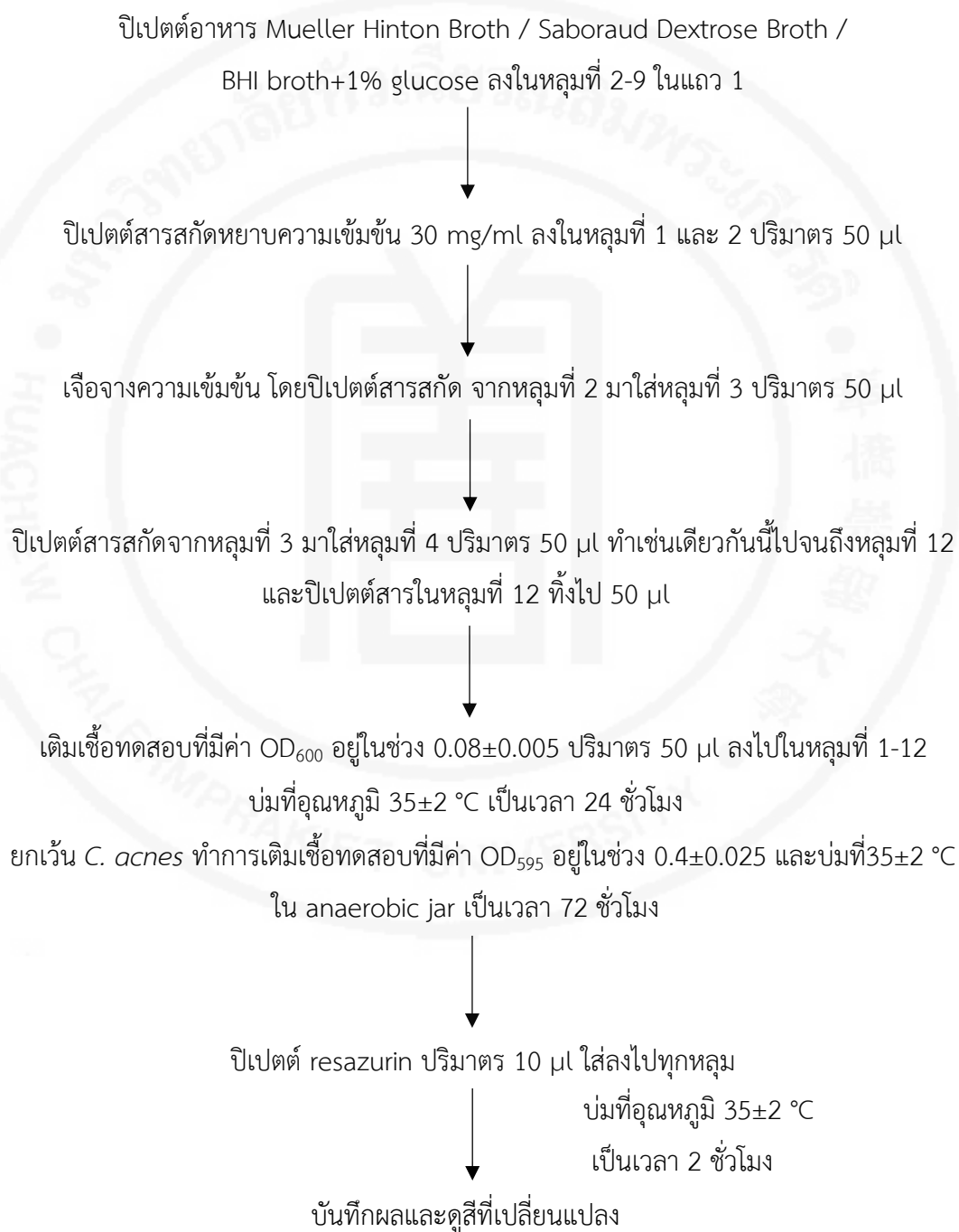
น้ำหนักหลอดทดลองที่มีเซลล์หลังอบแห้ง – น้ำหนักหลอดทดลองเปล่า $\times 1000$

2. ค่าความเข้มข้นของสารไวโอลาซิน

การวิเคราะห์สารสกัดสีม่วง-น้ำเงินหยาบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตรของสารสกัดตามวิธีของ Wang และคณะ (2009) โดยนำน้ำเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตรปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น นำไปปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยการ sonication เป็นเวลา 10 นาที แยกเซลล์ออกจากสารสกัดโดยปั่นที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร

ภาคผนวก ง

วิธีการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
(Minimum inhibitory concentration : MIC)



ตารางที่ 1 วิธีการทดสอบหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์
(Minimal inhibitory concentration: MIC) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หลุมที่	อาหารเพาะเชื้อ (μl)	สารสกัดหรือยาปฏิชีวนะ (30mg/ml)	เชื้อทดสอบ (μl)	Final concentration (mg/ml)
1	-	50	50	15
2	50	50	50	7.5
3	50		50	3.75
4	50		50	1.875
5	50		50	0.9375
6	50		50	0.4688
7	50		50	0.2343
8	50		50	0.1172
9	50		50	0.0586
10	50		50	0.0293
11	50	ปิเปตต์ทิ้ง 50 μl	50	0.0146

หมายเหตุ



ampicillin

clindamycin

DMSO

หมายถึง การเจือจางความเข้มข้นของแต่ละหลุม

positive control สำหรับ *S. aureus* และ *S. epidermidis*

positive control สำหรับ *C. acnes*

negative control

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล นางสาวพรพรรณ ลีลาอุตมลิปิ
วัน เดือน ปีเกิด 10 พฤษภาคม 2536
ที่อยู่ปัจจุบัน 30/209 หมู่ 1 ตำบลบางแก้ว อำเภอบางพลี
จังหวัดสมุทรปราการ 10540
ประวัติการศึกษา
พ.ศ. 2554 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬารัตนาวิทยาอุตสาหกรรม)
ประวัติการทำงาน
พ.ศ. 2559 นักวิทยาศาสตร์หน่วยทะเบียน แผนกวิจัยและพัฒนา
บริษัท เอฟ.ซี.พี. จำกัด