ครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิง

Facial scrub cream contained ginger-enzyme

จิราภรณ์ บุราคร[1]* สุบงกช ทรัพย์แตง[1] จิตต์เรขา ทองมณี[1] และ ศรีสมพร ปรีเปรม[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิง โดยพบว่าเอนไซม์โปรติเอสจากขิง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity) เท่ากับ 15 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตรต่อนาทีและค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 377 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำเอนไซม์โปรติเอสจากขิงมาผลิตเป็น เอนไซม์ผงแห้งด้วยวิธีอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งและเพิ่มความเสถียรด้วยการเติมเคซีนและโบรอก เอนไซม์ผงแห้งจะมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1,025 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเมื่อนำเอนไซม์โปรติเอสจากขิงไปเป็นส่วนผสม ในครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงโดยให้มีเอนไซม์ร้อยละ 20 ของน้ำหนักรวมจะได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 9.9 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตรต่อนาที หลังจากนั้นนำครีมขัดผิวผสมเอนไซม์ขิงไปทดสอบการระคายเคืองในสัตว์ทดลองพบว่า ไม่มีการระคายเคือง โดยค่าดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้นเท่ากับ 0.6 จากการทดสอบประสิทธิภาพครีมขัดหน้าผสมเอนไซม์จากขิงเปรียบเทียบกับครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุมในอาสาสมัครผู้หญิงที่มีสุขภาพดี จำนวน 20 คน เป็นเวลา 14 วัน พบว่าครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงและครีมขัดผิวตัวอย่างควบคุมมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญและไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง นอกจากนั้นยังพบว่าเม็ดสีเข้มที่กระจายเป็นจุดด่างดำบนผิวหน้าลดลงอย่างชัดเจน และผลการตอบแบบสอบถามความพึงพอใจของอาสาสมัครจากการใช้ครีมขัดผิวด้านกลิ่นหอม เนื้อผลิตภัณฑ์ ความกระจ่างใส ความเรียบเนียน ความชุ่มชื่น การลดริ้วรอย และความพึงพอใจโดยรวม พบว่า อาสาสมัครมีความพึงพอใจครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงมากกว่าครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุมในทุกด้าน โดยมีความพึงพอใจโดยรวมครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงและครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุมเท่ากับร้อยละ 90 และ 64 ตามลำดับ

Abstract

This study was performed to develop facial scrub cream containing ginger enzyme. It was found that activity and specific activity of the crude ginger protease were 15 Units/ml/min and and 377 Units/mg protein, respectively. First, a crude preparation of ginger protease was lyophilized using a freeze dryer. Its stability was improved by mixing casein and borox and the protease powder. The specific activity value of the stabilized ginger protease was 1,025 Units/mg protein. The stabilized ginger protease was mixed with scrub cream. The mixture contain 20% (w/w) of the enzyme, equivalent to 9.9 Unit/ml/min. Then, the ginger enzyme scrub cream was tested on animals for primary irritant properties. No irritation was observed, as indicated by the primary irritation index of 0.6. In the efficiency study, the ginger enzyme scrub cream and control scrub cream were used by 20 healthy female for 14 days. There were no significant difference between the ginger enzyme scrub cream and the control scrub cream. Besides, dark spots on faces of certain volunteers who used the ginger enzyme scrub cream were dramatically decreased. The volunteers' satisfaction on the quality, brightness, moisturizer, wrinkle and total satisfaction of the ginger enzyme scrub cream were evaluated by the questionnaires. The results showed that the volunteers were more satisfied with the ginger enzyme scrub cream than the control scrub cream, as shown by total satisfaction score of 90 and 64%, respectively.

คำสำคัญ : ขิง, เอนไซม์โปรติเอส, ครีมขัดผิว

Keywords : Ginger protease, Scrub cream, *Zingiber officinale*

[1]สำนักเทคโนโลยีชุมชน กรมวิทยาศาสตร์บริการ

[2] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*E-mail address: bjiraporn@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

ขิง (ginger) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber officinale* Roscoe อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณหลายอย่าง ได้แก่ ต้านการคลื่นไส้ อาเจียน ลดอาการจุกเสียด ขับลม ขับน้ำดี ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร [1] ขิงมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยมีรายงานว่าสารสกัดขิงด้วยเอทานอลและน้ำสามารถต้านการอักเสบได้ [2][3] นอกจากนี้ขิงมีเอนไซม์โปรติเอส (ginger protease หรือ zingibain) ซึ่งมีสมบัติช่วยย่อยโมเลกุลของโปรตีน [4][5] เอนไซม์โปรติเอสจากขิงค้นพบครั้งแรกโดย Ichikawa *et al*., 1973 [6] ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสจากขิงมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงในการย่อยซับสเตรต (substrate) ที่เป็นโปรตีนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ casein, bovine serum albumin, และ collagen [4][5][7] เอนไซม์โปรติเอสจากขิงจัดอยู่ในกลุ่มซีสเตอีนโปรติเอส (cysteine protease) เช่นเดียวกับเอนไซม์จากพืชอื่นๆ ได้แก่ เอนไซม์ปาเปน (papain) จากมะละกอ เอนไซม์แอคตินิดิน (actinidin) จากผลกีวี และเอนไซม์โบรมิเลน (bromelain) จากสับปะรด เป็นต้น เอนไซม์โปรติเอสจากขิงส่วนใหญ่นำมาประยุกต์ใช้ในด้านอาหาร เช่น การหมักเนื้อเพื่อให้เนื้อมีความนุ่ม การตกตะกอนน้ำนมในกระบวนการผลิตเนย การผลิต ginger milk curd [8] ผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ผลิตภัณฑ์น้ำนมถั่วเหลืองรสขิง [9] เป็นต้น มีรายงานการนำเอนไซม์ปาเปนซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มเดียวกับเอนไซม์โปรติเอสจากขิงมาประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง โดยเอนไซม์ปาเปนจะใช้ในการผลัดเซลล์ผิวที่ตาย ออกจากผิวชั้นนอก (stratum corneum) ใช้รักษาผิวหนังที่ชราหรือเสื่อมลง (aging skin) สำหรับลดริ้วรอย รักษาผิวที่ถูกทำลายด้วยแสงแดด สิว ผิวแห้ง และผิวอื่นๆ เอนไซม์ปาเปนสามารถใช้เป็นส่วนผสมในเจล โลชั่นและครีมได้ มีความอ่อนโยนต่อผิว ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ปัจจุบันมีครีมขัดผิวหน้าที่จำหน่ายทางการค้ามีส่วนประกอบของ Alphahydroxy acids (AHAs) เช่น glycolic acid และ lactic acid, Beta hydroxyl acids (BHAs) และ retinoids ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเกิดการแพ้ ผิวแดง ผิวพุพอง โดยเฉพาะผิวที่ถูกทำลายด้วยแสงแดด ผิวที่ถูกแสงแดดเป็นประจำหรือผิวที่มีความไวต่อแสงมากเป็นพิเศษ โดยเฉพาะผู้ที่มีสีผิวเข้ม ดังนั้นจึงต้องการครีมขัดผิวหน้าที่มีประสิทธิภาพ ไม่ก่อให้เกิดการแพ้และระคายเคือง [10] งานวิจัยนี้จึงได้มีแนวทางการผลิตครีมขัดผิวหน้าที่มีส่วนประกอบของขิงสารจากธรรมชาติและสารสกัดสมุนไพร โดยนำเอนไซม์โปรติเอสจากขิงผสมในครีมขัดผิวหน้าเพื่อช่วยให้ผลัดเซลล์ผิวในชั้น stratum corneum ซึ่งให้สารจากธรรมชาติและสารสกัดสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดบัวบก ว่านหางจระเข้ผง น้ำมันมะพร้าว น้ำมันงาและน้ำผึ้ง ที่ผสมในครีมสามารถซึมซาบเข้าสู่ผิวชั้นในได้อย่างดี เป็นการบำรุงและเพิ่มความชุ่มชื่นให้ผิว นอกจากนี้ในครีมขัดผิวหน้ายังใช้ขิงผง (ginger powder) เป็นเม็ดขัดผิวในผลิตภัณฑ์ทดแทนเม็ดขัดผิวอื่นๆที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศและมีราคาแพง การประยุกต์ใช้ขิง สารจากธรรมชาติและสารสกัดสมุนไพรเป็นส่วนประกอบในครีมขัดผิวหน้าเป็นการเพิ่มมูลค่าวัตถุดิบทางการเกษตร ช่วยลดปัญหาราคาผลผลิตตกต่ำในช่วงฤดูกาลผลิต โดยการนำมาแปรรูป ยังเป็นการยกระดับคุณภาพผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางให้มีคุณภาพ มีความปลอดภัยในการใช้และราคาไม่แพง จึงเป็นทางเลือกใหม่ให้ผู้บริโภคหันมาใช้ผลิตภัณฑ์ที่สามารถผลิตขึ้นเองในประเทศนับเป็นการพัฒนาอย่างยั่งยืนภายใต้ทฤษฎีเศรษฐกิจพอเพียงอีกทางหนึ่ง

2. วิธีการวิจัย (Experimental)

2.1 วัตถุดิบและสารเคมี

- ขิง (*Zingiber officinale*Roscoe)
- โบรอกซ์ (Borox: $Na_2B_4O_7.10H_2O$)
- เคซีน (Casein)
- กรดแลกติก (Lactic acid)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- กรดไตรคลอโรแอซีติก (Trichloroacetic acid)
- โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA)
- ทริส (ไฮโดรเมทิล) อะมิโนมีเทน (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)
- แอสคอร์บิก แอซิด (Ascorbic acid)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- สีย้อม (Dye reagent)
- สารมาตรฐานไทโรซีน (Tyrosine)

2.2 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

- ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet Level II)
- ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิได้ (Incubator)
- ตู้อบเพาะเชื้อแบบใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator)
- เครื่องทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV/VIS Spectrophotometer)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
- เครื่องผสม (Homogenizer)
- เครื่องวัดความยืดหยุ่นและถ่ายภาพผิว Multi dermascope MDS 800
- เครื่อง Mexameter MX 18
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)
- เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
- กระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1

2.3 การผลิตเอนไซม์จากขิง

นำขิงแก่ 1 กิโลกรัม ปอกเปลือก หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปปั่นในโถปั่น แล้วนำไปแยกเอนไซม์ดิบ (crude enzyme) ออกจากส่วนของแข็งโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้ส่วนสารละลายแยกออกมาเป็นส่วนเอนไซม์ดิบ จากนั้นนำไปผลิตเอนไซม์ผงโดยนำเอนไซม์ดิบปริมาณ 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร แช่แข็งตัวอย่าง (pre freeze) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเอนไซม์ดิบกลายเป็นเกล็ดน้ำแข็ง แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็ง ที่อุณหภูมิห้อง และลดความดันลง จะได้เอนไซม์ผง

2.3.1. การเพิ่มความเสถียรเอนไซม์

นำเอนไซม์ดิบและเอนไซม์ผงจากวิธีการข้อ 2.3 มาทำการทดลองเพิ่มความเสถียร วิธีการดัดแปลงจากสิทธิบัตรสหรัฐอเมริกา (US patent 4,842,758) [11] ดังนี้

1) ชั่งเคซีน 20 กรัม ผสมกับ 0.17N NaOH 80 กรัม กวนให้เข้ากัน ให้ความร้อน 50 องศาเซลเซียส เพื่อละลายเคซีนจากนั้นเติมเอนไซม์ 10 กรัม จะได้สารละลายเอนไซม์ผสมเคซีน จากนั้นเติม 1M Ascorbic acid 3 มิลลิลิตร

2) ชั่งโบรอก 113 กรัม ผสมกับสารละลายกรดแลกติกเข้มข้น 253 กรัม แล้วทำให้เป็นกลาง (Nutralized) ด้วย 12 N NaOH 115 กรัม ได้สารละลายกรดแลกติกผสมโบรอก นำสารผสมกรดแลกติกและโบรอกซ์มา 5 มิลลิลิตรผสมกับ 1M Ascorbic acid 5 มิลลิลิตร

3) นำสารละลายข้อ 1) (สารละลายเอนไซม์ผสมเคซีน) 24 กรัม ผสมกับสารละลายข้อ 2) (สารละลายกรดแลกติกผสมโบรอกซ์) 33 กรัม จะได้เอนไซม์ที่มีความเสถียร (Stabilized enzyme)

2.3.2. การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (protease activity)

วิธีการดัดแปลงจาก Kunitz, 1947 [12]

สารละลายเคซีนในบัฟเฟอร์ทริส 0.05M pH 7.5 ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใช้เป็นซับสเตรต (substrate) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายเคซีน หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 30 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เพื่อให้โปรตีนตกตะกอนแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank และคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์จากกราฟมาตรฐานไทโรซีน

1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเปปไทด์หรือกรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยเคซีนร้อยละ 1 ด้วยเอนไซม์ ที่ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดลองโดยเปรียบเทียบเป็นไมโครโมลของไทโรซีน

2.3.3. การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Bradford

1) การเตรียมสารละลาย Dye reagent จากบริษัท BIORAD® dye reagent 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 เก็บไว้ในตู้เย็น ไม่เกิน 2 สัปดาห์

2) สารละลาย BSA หรือสารละลายตัวอย่าง 800 ไมโครลิตร เติม dye reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ dye reagent ผสมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์เป็น blank

2.4 การพัฒนาครีมขัดผิว

ทำการผลิตครีมขัดผิวโดยมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนี้

1) นำส่วนประกอบ (ลำดับที่ 1-6) ซึ่งเป็นวัฏภาคน้ำมัน ผสมกันในบีกเกอร์แล้วให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

2) นำส่วนประกอบ (ลำดับที่ 7-8) ซึ่งเป็นวัฏภาคน้ำ ผสมกันในบีกเกอร์แล้วให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

3) นำส่วนผสมของวัฏภาคน้ำมันในข้อ 1) ผสมกับวัฏภาคน้ำในข้อ 2) แล้วผสมด้วยเครื่องผสมที่ความเร็วรอบ 550 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

4) ทิ้งให้เย็นจกระทั่งมีอุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส จะเกิดเนื้อครีม

5) ใส่ส่วนประกอบอื่นๆ (ลำดับที่ 9-16) ลงในเครื่องผสมจนกระทั่งส่วนผสมเข้ากันดี

Table 1 ตำรับครีมขัดผิวหน้า

ลำดับที่	ส่วนประกอบ	ตำรับขัดผิวหน้า (ร้อยละ)
วัฏภาคน้ำมัน		
1	Coconut oil	3
2	Sesame oil	3
3	Stearic acid	3
4	Cetyl alcohol	3
5	Cremophor®A6	1.88
6	Cremophor®A25	6.46
วัฏภาคน้ำ		
7	Propylene glycol	3
8	น้ำ	36.96
ส่วนประกอบอื่นๆ		
9	น้ำหอม กลิ่น Sunsilk	1
10	Germaben®II (0.5%)	0.5
11	วิตามินซี (1M Ascorbic acid)	15
12	น้ำผึ้ง	1
13	ขิงผง	2
14	สารสกัดบัวบก	0.1
15	ว่านหางจระเข้ผง	0.1
16	เอนไซม์จากขิง	20

2.4.1. การวิเคราะห์คุณภาพครีมขัดผิว

1) วิเคราะห์ทดสอบทางกายภาพ โดยสังเกตสี กลิ่น วิเคราะห์ความเป็นกรด-เบส

2) ทดสอบความคงตัวของสูตรด้วยวิธี Freeze-Thaw cycle โดยบ่มครีมขัดผิวในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ จำนวน 5 รอบ โดยแต่ละรอบบ่มที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่น ความเป็นกรด-เบส รวมถึงการแยกชั้นของครีมขัดผิว

3) การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ตามวิธีมาตรฐานที่ระบุไว้ใน Bacteriological Analytical Manual (BAM)

2.5 การทดสอบการระคายเคืองของครีมขัดผิวในสัตว์ทดลอง(Primary Skin Irritation Test)

ทดสอบการระคายเคืองของครีมขัดผิวต่อผิวหนังของกระต่าย ณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยใช้กระต่ายสายพันธุ์ albino ขนสีขาว ตาสีแดง น้ำหนักไม่น้อยกว่า 2 กิโลกรัม จำนวน 3 ตัว ทดลองทาครีมขัดผิวที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจสอบดูลักษณะผิวหนังโดยบันทึกผลของการก่อให้เกิดความระคายเคืองในด้านความแดง (Erythema) และการบวม (Oedema) ของผิวหนัง

2.6 การทดสอบประสิทธิภาพครีมขัดผิวในอาสาสมัคร

ทดสอบประสิทธิภาพครีมขัดผิวในอาสาสมัคร ดำเนินการ ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยรับสมัครอาสาสมัครหญิงสุขภาพดี จำนวน 20 คน อายุระหว่าง 30 – 50 ปีเข้าสู่โครงการและตรวจสภาพผิวทั้งก่อนและหลังการใช้ครีมขัดผิวโดยทดสอบความยืดหยุ่นของผิวหนังด้วยเครื่องมือวัดความยืดหยุ่นและถ่ายภาพผิว Multi dermascope MDS 800 ทดสอบความเข้มของสีผิวด้วยเครื่องมือ Mexameter MX 18 ในการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ดังนี้

1) ช่วงก่อนการทดลอง เป็นระยะเวลา 14 วัน เก็บข้อมูลเบื้องต้นของอาสาสมัคร ให้อาสาสมัครหยุดการใช้ผลิตภัณฑ์ขัดผิวที่ทำให้เกิดการผลัดเซลล์หรือหลุดลอกชนิดอื่นๆ ในบริเวณผิวหนังที่ทำการทดสอบตั้งแต่ในช่วงนี้เป็นต้นไปจนสิ้นสุดการทดลอง ทำการตรวจสภาพผิวและทดสอบโดยวิธี patch test โดยทาผลิตภัณฑ์ที่ท้องแขนแล้วปิดทับด้วยพลาสเตอร์ไว้ไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมงเพื่อดูว่ามีอาการแพ้หรือไม่ หากอาสาสมัครคนใดมีอาการแพ้จะถูกคัดออกจากการทดลอง

2) ช่วงระยะการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ ก่อนการทาผลิตภัณฑ์ขัดผิวบริเวณท้องแขนแต่ละข้างต้องล้างมือให้สะอาดแล้วเช็ดให้แห้ง โดยตักเนื้อสารด้วยช้อน (ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร) ที่เตรียมมาให้พูนช้อนและปาดส่วนที่เกินออก นำตัวอย่างที่ได้รับทาลงบนผิวหน้า โดยทาครีมขัดผิวผสมเอนไซม์ขิงส่วนแก้มด้านซ้ายและทาครีมขัดผิวตัวอย่างควบคุมที่ซื้อจากท้องตลาดส่วนแก้มด้านขวา นวดเบาๆ เป็นวงกลมไปในทางเดียวกัน กำหนดพื้นที่ขนาด 4 x 4 ซม. เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด เช็ดผิวให้แห้ง โดยให้อาสาสมัครทาผลิตภัณฑ์ขัดผิววันละ 1 ครั้งหลังอาบน้ำตอนเย็น เป็นระยะเวลาต่อเนื่อง 14 วัน และนัดอาสาสมัครมาเพื่อทำการประเมินสภาพผิววันแรก วันที่ 7 และวันที่ 14 นัดอาสาสมัครมาเพื่อทำการประเมินสภาพผิวและวัดความพึงพอใจต่อการใช้ผลิตภัณฑ์โดยใช้แบบสอบถามให้อาสาสมัครตอบภายหลังการใช้ผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 14 วัน

3. ผลและวิจารณ์ (Results and Discussion)

3.1 การผลิตเอนไซม์จากขิง

ขิงแก่เมื่อนำมาสกัดเอนไซม์จะได้สารละลายสีน้ำตาลเข้ม ทำให้เป็นผงด้วยวิธีทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็งแล้วเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ ตามวิธีข้อ 2.4 จากผลการทดลองดังตารางที่ 2 พบว่าเอนไซม์ดิบมีแอคติวิตี 15.48 หน่วยเอนไซม์ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะ 377.56 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำเอนไซม์ดิบไปผ่านการทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็งและเพิ่มความเสถียรมีค่ากิจกรรมจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 1,025 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Table 2 แอคติวิตีของเอนไซม์ดิบและเอนไซม์ผงเมื่อผ่านกระบวนการเพิ่มความเสถียร

Sample	Enzyme activity (Unit/ml/min) ± SD	Protein (mg)	Specific activity (Unit/mg protein)
เอนไซม์ดิบ	15.48±0.25	0.041	377.56
เอนไซม์ดิบเพิ่มความเสถียร	0.76±0.24	0.013	58.46
เอนไซม์ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง	30.87±1.14	0.140	220.50
เอนไซม์ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเพิ่มความเสถียร	12.30±1.81	0.012	1,025.00

3.2 การพัฒนาครีมขัดผิว

จากการทดลองพัฒนาสูตรครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิง (ตารางที่ 1) ได้ครีมขัดผิวมีลักษณะเป็นครีมสีเหลืองอ่อน กลิ่นหอม มีค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 มีความคงตัว ไม่แยกชั้นเมื่อผ่านกระบวนการทดสอบ ด้วยวิธี Freeze-Thaw cycle และมีจำนวนแบคทีเรียน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัม และจำนวนยีสต์และราน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ประประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 40) พ.ศ.2548 ที่ห้ามพบแบคทีเรีย ยีสต์และราที่ใช้อากาศเกินกว่า 1,000 โคโลนีต่อกรัมและเมื่อวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ในครีมขัดผิว ผลการทดลองดังตารางที่ 3 พบว่าเอนไซม์ผ่านการทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็งเพิ่มความเสถียรเมื่อผสมในครีมขัดผิวมีแอคติวิตี 9.9 หน่วยเอนไซม์

Figure 1 ครีมขัดผิวหน้า

Table 3 แอคติวิตีของเอนไซม์ในครีมขัดผิว

Sample	Enzyme activity (Unit/ml/min) ± SD
เอนไซม์ดิบผสมครีมขัดผิว	0.86±0.15
เอนไซม์ดิบเพิ่มความเสถียรผสมครีมขัดผิวหน้า	0.09±0.05
เอนไซม์ผ่านการทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็งเพิ่มความเสถียรผสมครีมขัดผิวหน้า	9.9±0.76

3.3 การทดสอบการระคายเคืองในสัตว์ทดลอง

ทดสอบการระคายเคืองของครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงต่อผิวหนังของกระต่ายจำนวน 3 ตัว พบว่าครีมขัดผิวหน้าไม่มีผลต่อการเกิดความแดงและบวมในกระต่าย มีค่าดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้น (Primary irritation index, PII) เท่ากับ 0.6 ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง

3.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงและครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุมในอาสาสมัคร

อาสาสมัครผู้หญิงจำนวน 20 คน ทดลองใช้ครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงบริเวณแก้มด้านซ้ายและใช้ครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุมบริเวณแก้มด้านขวา ใช้หลังอาบน้ำทุกวันตอนเย็นอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน แล้ววัดค่าความยืดหยุ่นของผิว การแดงของสีผิว ความเข้มของสีผิว ทั้งก่อนและหลังใช้ครีมขัดผิว ผลการทดลองดังตารางที่ 4 -6 พบว่าผิวหน้าของอาสาสมัครที่ใช้ครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงมีค่าความยืดหยุ่นของผิว ค่าความเข้มของสีผิว และการแดงของผิว มากกว่าครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุม เล็กน้อย และเมื่อเปรียบเทียบวันที่ทดสอบวันแรก วันที่ 7 และวันที่ 14 พบว่าความยืดหยุ่น ความเข้มของสีผิว และ การแดงของผิว เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าครีมขัดผิวหน้าทั้งสองชนิดเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง ไม่ทำให้สีผิวเปลี่ยนและความยืดหยุ่นของผิวไม่เปลี่ยนไป และเมื่อให้อาสาสมัครตอบแบบสอบถามความพึงพอใจการใช้ครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงและครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุม ด้านกลิ่นหอม เนื้อผลิตภัณฑ์ ความกระจ่างใส ความเรียบเนียน ความชุ่มชื่น การลดริ้วรอย ความพึงพอใจโดยรวม ผลการทดลองดังตารางที่ 7 พบว่าอาสาสมัครมีความพึงพอใจต่อครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงมากกว่าครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุมในทุกด้าน และมีความพึงพอใจโดยรวมร้อยละ 90 และร้อยละ 64 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภาพถ่ายผิวหน้าอาสาสมัครที่ทดลองใช้ครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิง (รูปที่ 2) ในวันแรกที่ทดสอบ วันที่ 7 และวันที่ 14 พบว่าผิวหน้ามีความเรียบเนียนเพิ่มขึ้น ส่วนผิวที่มีจุดด่างดำลดจางลงอย่างชัดเจน

Table 4 เปรียบเทียบค่าความยืดหยุ่นของผิวของครีมขัดผิวหน้าเอนไซม์ขิงและครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุม

วันที่ทดสอบ	ค่าความยืดหยุ่นของผิว	
	ครีมขัดผิวหน้าเอนไซม์ขิง ± SD	ครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุม ± SD
วันที่ 0	61.43±10.47	51.93±8.89
วันที่ 7	60.90±14.29	52.28±13.45
วันที่ 14	59.35±13.06	55.92±14.49

Table 5 เปรียบเทียบ ค่าความเข้มของสีผิว ของครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงและครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุม

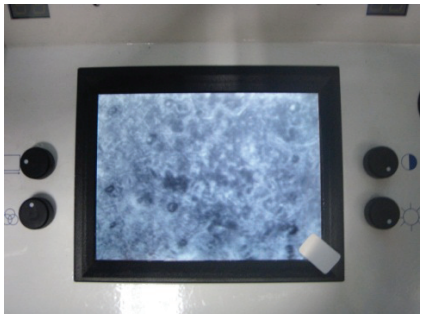
วันที่ทดสอบ	ค่าความเข้มของสีผิว	
	ครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิง ± SD	ครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุม ± SD
วันที่ 0	212.5±64.0	200.5 ±62.6
วันที่ 7	213.3 ±61.8	196.2 ±60.8
วันที่ 14	218.1±72.8	199.2±61.5

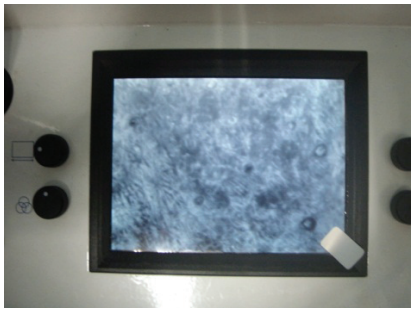
Table 6 เปรียบเทียบ ค่าการแดงของสีผิว ของครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงและครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุม

วันที่ทดสอบ	ค่าการแดงของสีผิว	
	ครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิง ± SD	ครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุม ± SD
วันที่ 0	307.4±43.1	301.3±37.3
วันที่ 7	316.7±49.8	307.4±47.3
วันที่ 14	316.2±43.8	308.2 ±47.9

Table 7 คะแนนความพึงพอใจโดยรวมของอาสาสมัครจำนวน 20 คน เมื่อใช้ครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงเปรียบเทียบกับครีมขัดผิวหน้า ตัวอย่างควบคุม

ความพึงพอใจ	ครีมขัดผิวหน้าเอนไซม์ขิง ± SD	ครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุม ± SD
กลิ่นหอม	7.3±2.3	6.1±2.7
เนื้อผลิตภัณฑ์	8.7±1.4	5.9±2.9
ความกระจ่างใส	8.4±1.4	6.4±2.2
ความเรียบเนียน	8.3±1.4	7.0±2.3
ความชุ่มชื่น	7.8±1.9	7.1±2.1
การลดริ้วรอย	8.1±1.7	6.8±1.6
ความพึงพอใจโดยรวม	9.0±1.1	6.4±2.3


วันที่ 0


วันที่ 7

วันที่ 14

Figure 2 ผิวหน้าของอาสาสมัครเมื่อทดลองใช้ครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน

4. สรุป (Conclusion)

เอนไซม์โปรติเอสจากขิงมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 377.56 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำเอนไซม์ดิบมาทำให้เป็นผงแห้งด้วยวิธีอบแห้งแช่เยือกแข็งแล้วนำผงเอนไซม์มาเพิ่มความเสถียร พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1,025 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน นำเอนไซม์โปรติเอสที่เพิ่มความเสถียรแล้วไปเป็นส่วนผสมร้อยละ 20 ในครีมขัดผิวหน้า พบว่าครีมขัดผิวมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 9.9 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงนำไปทดสอบการระคายเคืองในสัตว์ทดลอง พบว่าไม่มีการระคายเคือง โดยค่าดัชนีการระคายเคืองเบื้องต้น เท่ากับ 0.6 และทดสอบประสิทธิภาพครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงเปรียบเทียบกับครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุมในอาสาสมัครผู้หญิงอายุระหว่าง 30-50 ปี จำนวน 20 คน พบว่าครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงและครีมขัดผิวตัวอย่างควบคุมมีความยืดหยุ่น ความเข้มของสีผิว การแดงของผิวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง เมื่อสอบถามความพึงพอใจการใช้ครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงและครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุมด้านกลิ่นหอม เนื้อผลิตภัณฑ์ ความกระจ่างใส ความเรียบเนียน ความชุ่มชื่น การลดริ้วรอย ความพึงพอใจโดยรวม พบว่าอาสาสมัครมีความพึงพอใจครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงมากกว่าครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุมในทุกด้าน โดยมีความพึงพอใจรวมครีมขัดผิวหน้าผสมเอนไซม์จากขิงและครีมขัดผิวหน้าตัวอย่างควบคุมเท่ากับร้อยละ 90 และ 64 ตามลำดับ

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์บริการที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยตลอดโครงการนี้

6. เอกสารอ้างอิง (References)

[1] ฐานข้อมูลสมุนไพร มหาวิทยาลัยมหิดล. [ออนไลน์] สามารถเข้าถึงได้จาก http://www.medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/zinoff.html. 2555, เข้าถึงข้อมูลวันที่ 9 เมษายน 2555

[2] [2] Mascolo N, Jain R, Jain SC, Capasso F. Ethnopharmacologic investigation of ginger (Zingiber officinale). J Ethnopharmacol. 1989, 27(1/2):129-40.

[3] Basavarajaiah CR, Lucas DS, Anadarajashekhar R, Parmesh RR. Fundamentals of ayurvedic pharmacetuicals: anti-inflammatory activity of different preparations of three medicinal plants. J. Res. Edu. Ind. Med. 1990, 9(3): 25-30

[4] Thompson, E. H., and Allen, C. E. Ginger rhizome: a new source of proteolytic enzyme. J. Food Sci. 1973, 38, 652-655.

[5] Choi, K. H., Laursen, R. A. and Allen, K. N. The 2.1A Structure of a cysteine protease with proline specificity from ginger rhizome, Zingeber officinale. Biochem. 1999, 38, 11624-11633.

[6] Ichikawa, Y., Sasa, H., and Michi, K. Purification of ginger protease. J. Jpn. Soc. Food Nutr. 1973, 26, 377-383

[7] Hashimoto, A., Takeuti, Y., Kawahara, Y., and Yasumoto, K. Proteinase and collagenase activities in ginger rhizome. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 1991, 44, 127-132.

[8] Su, H. P., Huang, M. J. and Wang, H. T. Characterization of ginger proteases and their potential as a rennin replacement. **J. Sci. Food. Agric**. 2009, **89**, 1178-1185.

[9] นันทพร สุขกระจ่าง. การแปรรูปและการใช้ประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ขิงผงที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.2548.

[10] US Patent 6,416,769 B1. Cosmetic compositions comprising exfoliating enzymes and uses thereof. Jacob Vromen, Inventor. 2002.

[11] US patent 4,842,758. Stabilized enzyme system for use in aqueous liquid built detergent compositions. Andre Crutzen, inventor. 1989.

[12] Kunitz, M. Crystalline soybean Trypsin Inhibitor, II. General properties. **J. Gen. Physiology**. 1947, **30**, no. 4, 291-310.