

เสถียรภาพและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันที่เตรียมจากน้ำมันหอมระเหยอบเชยและส้ม



นางสาวฐิติภา บุญยืน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

ปีการศึกษา 2556

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตที่ส่งมาขึ้นทะเบียนวิทยานิพนธ์ที่ส่งมาทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

STABILITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EMULSIONS PREPARED FROM
CINNAMON AND CITRUS VOLATILE OILS

Miss Thitipa Boonyune

The logo of Chulalongkorn University, featuring a central emblem with a sunburst and a tiered structure, set against a light background.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เสถียรภาพและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันที่เตรียมจากน้ำมันหอมระเหยอบเชยและส้ม
โดย	นางสาวฐิติภา บุญยืน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาสวดี ประทีปะเสน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ ดร. สุวิมล อริยประกาย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ ทารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาสวดี ประทีปะเสน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. สุวิมล อริยประกาย)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. จันท์เพ็ญ จันท์เจ้า)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. อรอน จันท์ประสาทสุข)

ฐิติภา บุญยืน : เสถียรภาพและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันที่เตรียมจากน้ำมันหอมระเหยอบเชยและส้ม. (STABILITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EMULSIONS PREPARED FROM CINNAMON AND CITRUS VOLATILE OILS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. พาสวดี ประทีปะเสน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา, อ. ดร. สุวิมล อริยประกาย, 59 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาอิมัลชันที่ให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ น้ำมันอบเชยและน้ำมันส้มจากเปลือกส้ม ตัวทำอิมัลชันที่ใช้เป็นสารเจือปนอาหาร โดยใช้ polysorbate ได้แก่ polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) หรือ polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween 80) เป็นตัวทำอิมัลชันหลักและใช้ ester ของ sorbitan ได้แก่ sorbitan monolaurate (Span 20), sorbitan monostearate (Span 60) หรือ sorbitan monooleate (Span 80) เป็นตัวทำอิมัลชันร่วม ในการพัฒนาได้ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ตัวทำอิมัลชันหลักและตัวทำอิมัลชันร่วม ต่อความเสถียร ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชัน แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาคือ *Bacillus cereus* ATCC 6228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ผลการทดลองพบว่าอิมัลชันน้ำมันอบเชยมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดีกว่าอิมัลชันน้ำมันส้ม อิมัลชันน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และ Tween 80 ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเล็กที่สุด (0.130 μm) และให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (minimum bactericidal concentration, MBC) น้อยที่สุดคือ 8.8 mg/ml ต่อเชื้อ 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *E. coli* แต่ไม่มีฤทธิ์ต่อ *B. cereus* และแยกชั้นหลังการเก็บ 21 วัน การใช้ Span 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก เป็นตัวทำอิมัลชันร่วม โดยความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ทำให้สามารถการเก็บนานกว่า 3 เดือน โดยไม่แยกชั้น และให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่วิเคราะห์เมื่อเก็บนาน 21 วัน เท่ากับเมื่อใช้ Tween 80 เป็นตัวทำอิมัลชันเพียงชนิดเดียว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5372238623 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: CINNAMON OIL ORANGE OIL EMULSION ANTIBACTERIAL

THITIPA BOONYUNE: STABILITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EMULSIONS PREPARED FROM CINNAMON AND CITRUS VOLATILE OILS. ADVISOR: ASST. PROF. PASAWADEE PRADIPASEAN, Sc.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., SUWIMON ARIYAPRAKAI, Ph.D., 59 pp.

The objective of this research was to develop an antibacterial emulsion from essential oils, namely cinnamon oil and orange peel oil. Emulsifiers used were food grade. Polysorbate, namely polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) or polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween 80), was used as a main emulsifier. Ester of sorbitan, namely sorbitan monolaurate (Span 20), sorbitan monostearate (Span 60) and sorbitan monooleate (Span 80), was used as a co-emulsifier. The effects of type and concentration of essential oils, main emulsifier and co-emulsifier on stability, average particle size and antibacterial activity of the emulsion were investigated. The bacteria used in the study were *Bacillus cereus* ATCC 6228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The results showed that cinnamon oil emulsion gave more antibacterial effect than orange oil emulsion. For cinnamon oil emulsion, cinnamon concentrations of 2.5 % w/w and Tween 80 concentrations of 0.8 % w/w had the smallest average particle size of oil (0.130 μm) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of 8.8 mg/ml for *S. aureus* and *E. coli*. This emulsion had no antibacterial effect on *B. cereus* and separated after storage for 21 days. Using Span 20 at concentration of 0.2 % w/w as co-emulsifier resulted in higher stability of the emulsion (up to 3 months without separation), and antibacterial activity analyzed at 21 days after preparing was equal to that of emulsion using Tween 80 alone.

Field of Study: Biotechnology

Academic Year: 2013

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาสวดี ประทีปะเสน และ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา และ อาจารย์ ดร. สุวิมล อริยประกาย จึงทำให้การวิจัยครั้งนี้ผ่านพ้นไปได้ ตลอดจนให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ ต้องขอกราบขอบพระคุณอย่างยิ่งสำหรับทุกสิ่งทุกอย่าง

ขอกราบขอบพระคุณ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ช่วยแนะแนวทางการปรับปรุงสำหรับวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์แบคทีเรียก่อโรคในอาหารสำหรับงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์เครื่องมือวัดขนาดอนุภาค ตลอดจนการทำวิจัยนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำ อำนวยความสะดวกตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ รสพร เจียมจริยธรรม และพี่ วชิราภรณ์ พูนัน ที่ช่วยตรวจทานวิทยานิพนธ์นี้ และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่ให้คำปรึกษาและกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายต้องกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัวรวมถึงเพื่อนสนิททุกคนที่ช่วยเหลือทุกเรื่องและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 น้ำมันอบเชย	3
2.2 น้ำมันส้ม	5
2.3 อิมัลชัน (Emulsion).....	7
2.4 แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร.....	13
2.5 โครงสร้างของผนังเซลล์แกรมบวกและแกรมลบของแบคทีเรีย.....	13
2.6 กลไกการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย	14
2.7 ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันต่อฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย	15
บทที่ 3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย.....	16
3.1 ผลของชนิดน้ำมันหอมระเหยและชนิดตัวทำอิมัลชัน ต่อค่า minimum inhibition concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) สำหรับแบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร	16
3.2 ผลของชนิดและปริมาณน้ำมันหอมระเหย และ ชนิดและปริมาณตัวทำอิมัลชันต่อการเกิดอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยในน้ำ ความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคทางอาหาร	16
3.3 ผลของเวลาที่ใช้ในการตีปั่นอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ	18
3.4 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 80 ต่อความเสถียร ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันอบเชย.....	18
3.5 วิธีวิเคราะห์	19
3.5.1 ความเสถียรของอิมัลชัน.....	19
3.5.1.1 การแยกชั้นในสภาวะปกติของอิมัลชัน.....	19

3.5.1.2 ขนาดอนุภาคและการกระจายของอนุภาคน้ำมันของอิมัลชัน.....	19
3.5.2 ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย	19
3.5.2.1 วิเคราะห์หาค่า MIC ของน้ำมันอบเชยน้ำมันส้ม อิมัลชันน้ำมันอบเชยและอิมัลชันน้ำมันส้ม	19
3.5.2.2 วิเคราะห์หาค่า MBC ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันส้ม อิมัลชันของน้ำมันอบเชยหรืออิมัลชันน้ำมันส้ม.....	20
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	20
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	21
4.1 ผลของชนิดน้ำมันหอมระเหยต่อค่า minimum inhibition concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) สำหรับแบคทีเรียที่ก่อโรคทางอาหาร ...	21
4.2 ผลของชนิดและปริมาณน้ำมันหอมระเหย และ ชนิดและปริมาณตัวทำอิมัลชันต่อการเกิดอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยในน้ำ ความเสถียรของอิมัลชัน และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย	22
4.3 ผลของเวลาที่ใช้ในการตีปั่นต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ... ..	25
4.4 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันอบเชย ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ	25
4.5 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 80 ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ความเสถียร และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันอบเชย	29
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	33
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	33
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	33
รายการอ้างอิง	34
ภาคผนวก.....	38
ภาคผนวก ก การกระจายขนาดอนุภาคน้ำมัน ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย	39
ภาคผนวก ข การคำนวณสถิติ	52
รายการอ้างอิง	57
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	59

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันอบเชยจากเปลือกไม้และใบ.....	4
ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยในน้ำ.....	17
ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ โดยใช้ตัวทำอิมัลชัน Tween 80	18
ตารางที่ 4.1 ผลของชนิดน้ำมันหอมระเหยต่อค่า MIC และ MBC สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เมื่อใช้น้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้น 112 mg/ml หรือน้ำมันส้มความเข้มข้น 86.5 mg/ml โดยใช้สารละลายน้ำของ Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลาย.....	22
ตารางที่ 4.2 ผลของชนิดน้ำมันหอมระเหยและตัวทำอิมัลชันต่อการกระจายขนาดอนุภาคน้ำมัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยหลังการเตรียม 1 วัน และเวลาในการแยกชั้นของอิมัลชัน ที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัว ทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก.....	23
ตารางที่ 4.3 ผลของเวลาในการตีปั่นอิมัลชันที่ความเร็ว 22000 รอบต่อนาที ต่อขนาดอนุภาคน้ำมัน เฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ ที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 5 โดย น้ำหนัก และความเข้มข้นของ Tween 20 ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก.....	25
ตารางที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันอบเชย ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันต่อขนาด อนุภาคน้ำมันเฉลี่ยหลังการเตรียม 1 วัน	26
ตารางที่ 4.5 ผลของชนิดตัวทำอิมัลชันและเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของเชื้อ E. coli ATCC 25922 และ S. aureus ATCC 25923 สำหรับอิมัลชันน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นน้ำมันอบเชย ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก.....	28
ตารางที่ 4.6 ผลของชนิดและความเข้มข้นตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 80 ต่อ ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อย ละ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก .	30
ตารางที่ 4.7 ผลของชนิดและความเข้มข้นตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 80 และ เวลาเก็บอิมัลชันต่อค่า MIC และ MBC ของเชื้อ E. coli ATCC 25922 และ S. aureus ATCC 25923 ที่ความเข้มข้นน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้น ของตัวทำอิมัลชัน รวมร้อยละ 0.8	32

สารบัญรูปร่าง

รูปที่ 2.1 เปลือกอบเชย.....	3
รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ cinnamaldehyde และ eugenol.....	4
รูปที่ 2.3 ใบส้ม.....	6
รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ limonene.....	6
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของอิมัลชัน.....	8
รูปที่ 2.6 ลักษณะความไม่เสถียรและการแยกชั้นของอิมัลชัน.....	9
รูปที่ 2.7 การเกิดออสวาร์ดโรเพนิง (Ostwaldripening).....	9
รูปที่ 2.8 โครงสร้างของตัวทำอิมัลชันกลุ่มของ polysorbates (Tween).....	11
รูปที่ 2.9 โครงสร้างของตัวทำอิมัลชันกลุ่มของ sorbitan ester (Span).....	11
รูปที่ 2.10 การจัดเรียงตัวของตัวทำอิมัลชัน Tween 80 และ Span 80.....	12
รูปที่ 2.11 โครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ.....	14
รูปที่ 4.1 ผลของเวลาการเก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยที่ ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำ อิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก.....	24
รูปที่ 4.2 การแยกชั้นของอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก.....	24
รูปที่ 4.3 ผลของเวลาเก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก.....	27
รูปที่ 4.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 80 และเวลา เก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดย น้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก.....	31
รูปที่ 4.5 การแยกชั้นของอิมัลชันน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก ตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ ใช้ร่วมกับ Tween 80.....	31

บทที่ 1

บทนำ

การทำความสะอาดวัตถุดิบที่นำมาประกอบอาหาร เช่น ผักและผลไม้ที่ไม่ได้ผ่านการปรุงสุกก่อนบริโภค มีความสำคัญต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคอย่างมาก เนื่องจากมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ระหว่างการเพาะปลูก หรือการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ โดยปนเปื้อนมาจากดิน และ ปุ๋ยคอก เป็นต้น (นภาพร เชี่ยวชาญ, 2546) ถ้าในกรณีที่แบคทีเรียปนเปื้อนกับวัตถุดิบเป็นชนิดที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* รวมถึง *Listeria monocytogenes* (สุดสายชล หอมทอง และคณะ, 2554) ส่งผลให้ผู้บริโภคเกิดอาการอาหารเป็นพิษ โดยอาจมีอาการตั้งแต่ท้องร่วงเล็กน้อยไปจนกระทั่งอาการรุนแรงถึงชีวิตซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้หลักการสุขาภิบาลในระหว่างการเตรียมอาหาร โดยเฉพาะในขั้นตอนการทำความสะอาดและลดการปนเปื้อนของวัตถุดิบการล้างน้ำสะอาดเพียงอย่างเดียว อาจไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อน ในปัจจุบันจึงมีผลิตภัณฑ์ล้างผักและผลไม้ที่มาจากสารสังเคราะห์ทางเคมีผู้บริโภคในปัจจุบันมีความกังวลด้านสุขอนามัยมากขึ้น และหลีกเลี่ยงผลิตภัณฑ์ที่มาจากสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการบริโภค ดังนั้น จึงมีการเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากสารสกัดจากธรรมชาติ มาใช้ทดแทนมากขึ้น ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์ล้างผักและผลไม้ที่มาจากน้ำมันหอมระเหย เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียหลายชนิด ซึ่งสามารถนำมาทดแทนสารต้านแบคทีเรียสังเคราะห์ทางเคมีได้ งานวิจัยนี้จึงสนใจน้ำมันอบเชยและน้ำมันส้มจากเปลือก ซึ่งมีผลงานวิจัยรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้อย่างกว้างขวาง อีกทั้งมีกลิ่นที่ไม่รุนแรงและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้เพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ และมีน้ำเป็นตัวทำละลายเพราะน้ำเหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมไม่เป็นอันตรายและสามารถล้างออกได้ง่าย อย่างไรก็ตามการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายจะทำให้เกิดการแยกชั้นขึ้น ส่งผลให้ฤทธิ์ในการต้านทานแบคทีเรียลดลงเนื่องจากสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (Gupta et al., 2008) ผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมควรอยู่ในลักษณะอิมัลชันน้ำมันในน้ำ ที่มีความเสถียรและยังคงฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดังนั้นจึงใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) หรือตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) เพื่อทำให้อนุภาคน้ำมันมีการกระจายตัวในน้ำได้ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันซึ่งทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำมันและน้ำ (Porras et al., 2004) โดยงานวิจัยนี้มีสมมุติฐานว่าการจัดเรียงตัวของตัวทำอิมัลชันแบบ 2 ชนิดจะช่วยเพิ่มความหนาแน่นของชั้นอิมัลชันไฟเออร์ และไม่เกิดการเกิดการแยกชั้นของอิมัลชัน โดยจะใช้ตัวทำอิมัลชันชนิด food grade ซึ่งได้รับการยอมรับให้ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมอาหารจาก JointFAO/WHOExpertCommitteeonFood-Additives (1974) ได้แก่กลุ่มของ polysorbates (Tween) และ sorbitanester (Span) ตัวทำอิมัลชันทั้ง 2 กลุ่ม มีลักษณะที่ไม่มีประจุ (non-ionicemulsifier) ความเป็นพิษต่ำ Tween ละลายได้ในน้ำ ส่วน Span ไม่ละลายในน้ำ การใช้ตัวทำอิมัลชันร่วมกันจึงจัดเรียงล้อมรอบอนุภาคน้ำมันได้ดีขึ้น นอกจากนี้ผลของขนาดอนุภาคน้ำมันต่อฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยยังมีรายงานที่ขัดแย้งกัน ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย

ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันและการทำงานร่วมกันของตัวทำอิมัลชันทั้ง 2 ชนิด ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ความเสถียรและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันอบเชยหรือน้ำมันส้มในน้ำ และผลของขนาดอนุภาคน้ำมันต่อฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำมันอบเชย

อบเชย (cinnamon) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Lauraceae สกุล *Cinnamomum* ซึ่งมีความแตกต่างกันหลายชนิดตามถิ่นกำเนิด เป็นไม้ต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ไม่ผลัดใบ เปลือกสีน้ำตาลเรียบ เปลือกและเนื้อไม้มีกลิ่นหอม ใบเรียงเดี่ยวแบบสลับ กว้าง 3 – 7 cm ยาว 7 – 25 cm ใบหนาปลายใบเรียว ดอกมีขนาดเล็กสีเหลือง ลักษณะเป็นช่อ กระจายที่ปลายยอด ยาว 10 – 25 cm ผลขนาดเล็กยาวประมาณ 1 cm ลักษณะแข็ง กิ่งทรงกลม มีคราบสีขาวบริเวณผิวของผล เป็นพืชพื้นเมืองในเขตร้อนของเอเชียและทวีปออสเตรเลีย พบในจีน ศรีลังกา เป็นต้น ประเทศไทยสามารถปลูกได้จากเมล็ด และพบตามธรรมชาติในป่า (เต็ม สมิตินันท์, 2544) เปลือกของอบเชย(รูปที่ 2.1) ในตำราไทยว่ามีกลิ่นหอม รสฝาด เนื่องจากมีแทนนิน (tannin) สูง มีสรรพคุณแก้ไอ ขับเสมหะ บำรุงกำลัง ขับลม แก้ไข้ น้ำต้มเปลือกไม้อบเชยเป็นยาแก้อาหารไม่ย่อย ท้องเสีย ตับอักเสบ จุกเสียด แน่นท้อง รากและใบใช้ต้มเป็นยาขับลม แก้ท้องอืด (เต็ม สมิตินันท์, 2544)



รูปที่ 2.1 เปลือกอบเชย

ที่มา: <http://www.thaicrudedrug.com/>

น้ำมันอบเชยที่สกัดจากเปลือกโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ มีลักษณะสีเหลืองใส เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลานานจะเปลี่ยนเป็นสีแดง และน้ำมันอบเชยที่กลั่นด้วยไอน้ำจากใบ มีลักษณะเหลวสีน้ำตาลแดงถึงสีน้ำตาลเข้ม องค์ประกอบของน้ำมันอบเชยเป็นกลุ่มพวก aromatic compounds แสดงในตารางที่ 2.1 นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานว่าพบองค์ประกอบอื่นอีก เช่น benzaldehyde, benzyl alcohol, benzoic acid, alpha phellandrene, linalool, linalyl acetate และ benzyl cinnamate

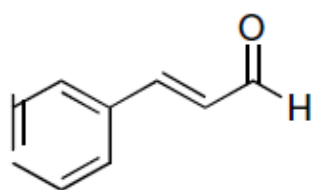
(ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร และคณะ, 2555) องค์ประกอบที่สำคัญที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย คือ cinnamaldehyde (3-phenylprop-2-enal: C_9H_8O) และ eugenol (2-methoxy-4-prop-2-enylphenol: $C_{10}H_{12}O_2$) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในรูปที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันอบเชยจากเปลือกไม้และใบ

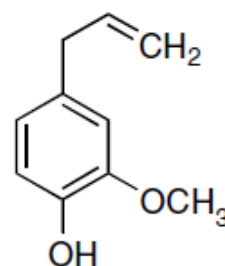
องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณร้อยละ	
	เปลือกไม้	ใบ
cinnamaldehyde	60.0 – 75.0	1.3 - 2.0
ρ -cymene	0.6 - 1.2	0.4 - 1.2
α -pinene	0.2 - 0.6	0.2 - 0.1
eugenol	0.8	70.0 – 96.0
cinnamyl acetate	5.0	0.8 - 1.7
caryophyllene	1.4 - 3.3	1.9 - 5.8
benzyl benzoate	0.7 - 1.0	2.7 - 3.5

ที่มา: ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร และคณะ, 2555

Aldehyde
Cinnamaldehyde



Phenol
Eugenol



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ cinnamaldehyde และ eugenol

ที่มา: Bakkali, 2008

ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันอบเชย สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง จากงานวิจัยของ Prabuseenivasan และคณะ (2006) และ Gupta และคณะ (2008) รายงานค่า minimum inhibition concentration (MIC) ของน้ำมันอบเชยต่อเชื้อ *E.coli*, *B. subtilis* และ *S.aureus* เท่ากับ >1.6, >1.6 และ 3.2 (mg/ml) ตามลำดับ และค่าของ MIC ต่อเชื้อ *Listeria*

monocytogenes และ *Klebsiella sp.* เท่ากับร้อยละ 1.25 โดยปริมาตร อีกทั้งน้ำมันอบเชยยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา อย่างเช่น *Candida albicans* โดยงานวิจัยของ ชญานิศ ศรชัยธวัชวงศ์ และคณะ (2549) ได้พัฒนาเจลรักษาโรคติดเชื้อรา *C. albicans* ในปากจากน้ำมันอบเชย พบว่า น้ำมันอบเชยร้อยละ 5 ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดี (inhibition zone เท่ากับ 2.65 cm) นำมาทำเป็นเจลที่น้ำมันอบเชยร้อยละ 5 โดยปริมาตร โดยมีสารก่อเจลที่ประกอบไปด้วยของ methylcellulose 4000, sodium carboxymethylcellulose และ Tween 80 ปริมาณร้อยละ 4, 2.5 และ 8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ได้เจลที่มีลักษณะขุ่นเนื้อเดียวกัน สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ดี (inhibition zone เท่ากับ 2.33 cm) จรงค์ศักดิ์ พุ่มนวน และ อัมร อินทร์สังข์ (2553) ทดสอบฤทธิ์ในการต้านไรฝุ่นของน้ำมันหอมระเหยจากใบและเปลือกของต้นอบเชยพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบมีฤทธิ์ที่ดีกว่าจากเปลือก องค์ประกอบทางเคมีที่อยู่ในน้ำมันอบเชย ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ cinnamaldehyde ที่พบปริมาณมากเป็นสารประเภท aldehyde ออกฤทธิ์โดยการ ยับยั้งกระบวนการเมทาบอลิซึมและการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียโดยทำการ cross-linked ที่หมู่อะมิโนระหว่างโมเลกุลโปรตีนภายในเซลล์ ส่งผลต่อการยับยั้งเชื้อ และทำให้เชื้อตาย Nirmala และคณะ (2013) ทำการนำยา fluconazole ที่เป็นสารต้านเชื้อรา เตรียมในรูปแบบ microemulsion โดยใช้ น้ำมันอบเชย Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 และ 25 โดยปริมาตร พบว่ามีการเกิดเป็น microemulsion มีขนาดอนุภาคน้ำมัน 10 – 45 nm

2.2 น้ำมันส้ม

ส้มเป็นพืชที่อยู่ สกุล *Citrus* วงศ์ Rutaceae ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด กระจายอยู่ทั่วโลกมีต้นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แถบเขตร้อนและร้อนชื้น เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ลักษณะต้นเป็นไม้พุ่มขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ สูง 5 – 15 m ใบสลับไม่ผลัดใบ ลักษณะใบเรียวยาว รูปไข่ ขอบใบหยัก ดังแสดงในรูปที่ 2.3 บนแผ่นใบมีต่อมน้ำมัน (oil gland) กระจายอยู่ทั่ว ดอกเกิดที่ปลายยอด เป็นดอกเดี่ยวหรือช่อดอก สีขาวยาว กลีบดอก 5 กลีบ ส่วนปลายเป็นเกสรสีเหลือง ผลส้มมีเปลือกชั้นนอกสุดเป็นสีเขียว เมื่อสุกอาจเปลี่ยนเป็นสีอื่น เปลือกชั้นในมีลักษณะบาง สีขาว ด้านในสุดเป็นกลีบ ทำหน้าที่เก็บสะสมน้ำ และน้ำตาล สารอาหารต่างๆ เมล็ดส้มรูปร่างคล้ายหยดน้ำ พบได้ในธรรมชาติและนำมาเพาะปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจ (ก่องกานดา ชยามฤต, 2548)

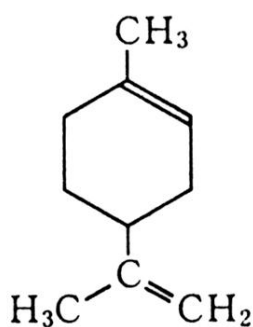
สรรพคุณของส้ม ผลสามารถใช้แก้ไอ น้ำลายเหนียว เป็นยาระบายอ่อนๆ เปลือก แก้อาการเป็นลม หน้ามืด ใจสั่น และท้องอืด (นันทวัน บุญยประภัสร์ และ อรุณช โชคชัยเจริญพร, 2543) เมื่อนำมาสกัดเป็นน้ำมันส้มช่วยให้นอนหลับ ขับลม ช่วยในการย่อยอาหาร คลายกล้ามเนื้อเรียบ ลดไข้ แก้หวัด ช่วยซ่อมแซมผิวที่มีริ้วรอย เสริมสร้างคอลลาเจนในผิว



รูปที่ 2.3 ใบส้ม

ที่มา: โครงการสารานุกรม ออนไลน์

การสกัดน้ำมันส้มมีวิธีที่นิยม 2 ประเภทคือ สกัดด้วยไอน้ำ และ การบีบเย็น (cold pressure) จะได้น้ำมันร้อยละ 0.03 – 0.05 นิยมใช้ เปลือกผิวส้มหรือดอกมาใช้ในการสกัดทำน้ำมัน องค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันส้มคือ limonene (1-methyl-4-(1-methylethenyl)-cyclohexene: $C_{10}H_{16}$) ที่มีมากถึงร้อยละ 60 – 75 มีสมบัติการละลายน้ำได้สูง และที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย (Williams and Pierce, 1998) มีสูตรโครงสร้างทางเคมี ดังแสดงในรูปที่ 2.4 นอกจากนี้ น้ำมันส้มยังมีองค์ประกอบอื่นอีก เช่น borneol, citral, capraldehyde, citronellol, terpinolene, linalool, α -thujene, α -pinene, camphene และ citranelyl acetate (Ahmad *et. al*, 2006)



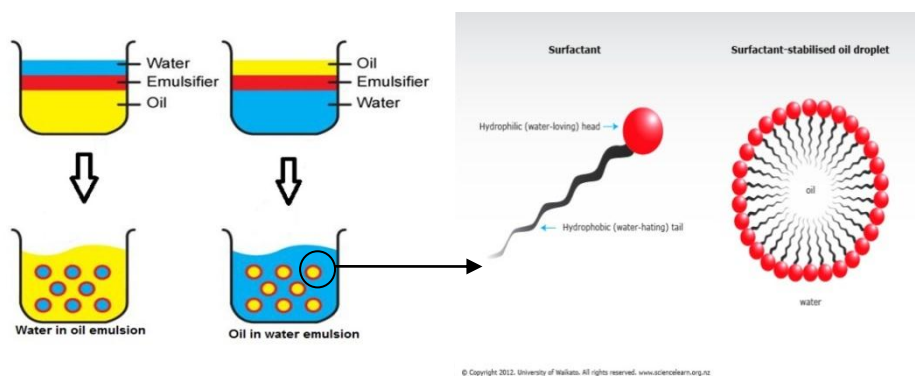
รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ limonene

ที่มา: Stashenko *et. al*, 1996

จากการศึกษาของ Prabuseenivasan และคณะ (2006) พบว่าค่า MIC ของน้ำมันส้มในการยับยั้ง *E.coli*, *Klebsiella pneumonia* และ *Pseudomonas aeruginosa* มากกว่า 12.8 mg/ml และ *Proteus vulgaris*, *B. subtilis* และ *S. aureus* มากกว่า 6.4 mg/ml และในงานวิจัยของ Qian และคณะ (2010) ที่เตรียมอิมัลชันน้ำมันส้มโดยเปรียบเทียบการใช้ biopolymer ได้แก่ β -lactoglobulin, gum arabic และแป้งตัดแปร เป็นตัวทำอิมัลชัน ที่ความเข้มข้นน้ำมันส้มร้อยละ 5 พบว่าอนุภาคขนาดน้ำมันเฉลี่ยที่ได้มีขนาด 0.171, 0.497 และ 0.254 μm ตามลำดับ

2.3 อิมัลชัน (Emulsion)

อิมัลชันคือระบบของเหลวที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างน้อย 2 ชนิด ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน โดยที่ชนิดหนึ่งมีความเป็น hydrophilic สูง อีกชนิดมีความเป็น hydrophobic สูง เช่นน้ำกับน้ำมันการที่จะทำให้ระบบเป็นเนื้อเดียวกันได้นั้นต้องอาศัยการตีปั่น เพื่อให้ไขมันแตกตัวเป็นอนุภาคขนาดเล็ก กระจายในน้ำหรือในทางตรงกันข้าม เมื่อทำการหยุดให้แรงกลในการตีปั่น อนุภาคที่กระจายออกกลับมาหลอมรวมกันอีกให้เกิดอนุภาคที่มีขนาดใหญ่และเกิดการแยกชั้นขึ้น เนื่องจากมีแรงดึงระหว่างผิวประจันของน้ำและน้ำมันที่สูง ดังนั้น กระบวนการแรงกลที่ทำให้อนุภาคกระจายตัวอย่างเดียวยังไม่พอ ต้องมีตัวลดแรงดึงผิวระหว่างน้ำและน้ำมัน (surface active agent หรือ surfactant) หรือ ตัวทำให้เกิดอิมัลชัน (emulsifier) อยู่ในระบบด้วย ดังรูปที่ 2.5 อิมัลชันที่เกิดขึ้นเป็นเนื้อเดียวกันที่มีอนุภาคของของเหลวที่มีอนุภาคขนาดเล็ก เรียกว่าวิฎภาคภายในหรือวิฎภาคกระจาย (internal or dispersed phase) กระจายตัวอยู่ในของเหลวอีกชนิด ที่เรียกว่าวิฎภาคภายนอกหรือวิฎภาคต่อเนื่อง (external or continuous phase) ขนาดของอนุภาคในวิฎภาคกระจายส่วนใหญ่มีขนาด 0.1 – 10 μm ในระบบคอลลอยด์มีอนุภาค 0.001 – 1 μm อิมัลชันจึงจัดอยู่ในระบบคอลลอยด์ (Hiemens, 1977; Shaw, 1970) อิมัลชันที่มีวิฎภาคน้ำมันกระจายแขวนลอยที่วิฎภาคต่อเนื่องที่เป็นน้ำเรียกอิมัลชันชนิดนี้ว่า อิมัลชันน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsion หรือ o/w) มีลักษณะที่เหลว และง่ายต่อการล้างออก กลับกันอิมัลชันที่มีวิฎภาคน้ำแขวนลอยที่วิฎภาคต่อเนื่องที่เป็นน้ำมันเรียกอิมัลชันชนิดนี้ว่า อิมัลชันน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion หรือ w/o) ลักษณะเหนียว เหนอะหนะ เพราะมีองค์ประกอบของน้ำมันสูงกว่าน้ำ



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของอิมัลชัน

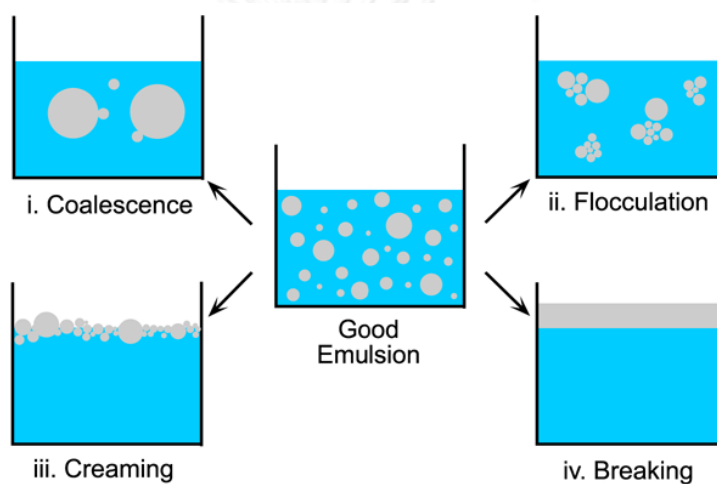
ที่มา: University of Waikato online, 2012

อิมัลชันที่จำแนกตามลักษณะของขนาดอนุภาคกระจายได้แก่ แมคโครอิมัลชัน (macroemulsion) อนุภาควิภูภาคกระจาย มีขนาดตั้งแต่ $0.25 - 10 \mu\text{m}$ ลักษณะสีขาวขุ่น เกิดจากการหักเหของแสง ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) มีขนาดตั้งแต่ $0.01 - 0.75 \mu\text{m}$ ลักษณะโปร่งใส แสงสามารถทะลุผ่านได้เนื่องจากอนุภาคของวิภูภาคกระจายมีขนาดเล็ก มีความเสถียรด้านเทอร์โมไดนามิก (thermodynamically stable) ปัจจุบันมีการจำแนกอิมัลชันที่มีอนุภาคของวิภูภาคกระจายที่มีขนาดเล็ก อยู่ในช่วง $0.02 - 0.20 \mu\text{m}$ เรียกว่า นาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) (Shah *et al.*, 2010) เนื่องจากอนุภาคกระจายที่มีขนาดเล็ก ทำให้มีความเสถียรต่อการแยกชั้นของอิมัลชัน (Nirmala *et al.*, 2013) ความเสถียรของอิมัลชันเกิดจาก

- อนุภาคของวิภูภาคกระจายที่มีขนาดเล็ก (Nirmala *et al.*, 2013)
- ความหนาและความแข็งแรงของชั้นฟิล์มที่ตัวทำอิมัลชันจัดเรียงตัวล้อมรอบอนุภาคของวิภูภาคกระจาย (Dai *et al.*, 1996)
- การละลายของน้ำมันส่งผลต่อการเพิ่มขนาดของอิมัลชัน ทำให้มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยใหญ่ขึ้น (Rao and McClement, 2012)

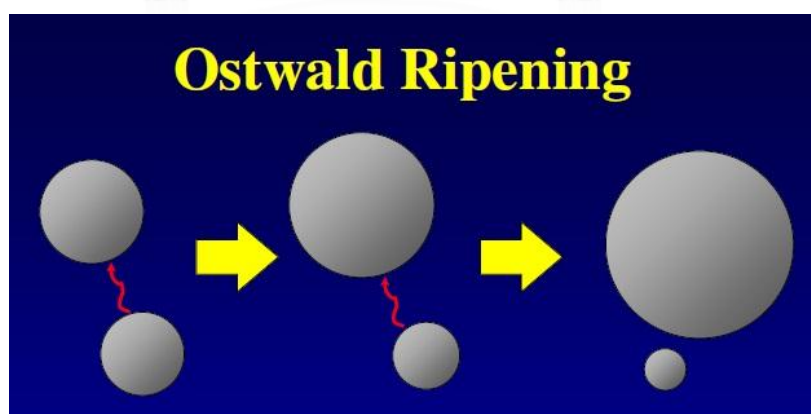
ดังนั้นการพัฒนาอิมัลชันจึงเน้นไปที่ทำให้ขนาดอนุภาคกระจายมีขนาดเล็กกว่า $1 \mu\text{m}$ โดยศึกษาชนิดและความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันที่เหมาะสมต่ออิมัลชันน้ำมันหอมระเหย ซึ่งน้ำมันหอมระเหย (volatile oils) สามารถละลายน้ำได้ดีกว่าน้ำมันชนิดไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride oils) ส่งผลให้น้ำมันหอมระเหยมีความเสถียรที่ต่ำกว่าน้ำมันชนิดไตรกลีเซอไรด์ ทำให้ง่ายต่อการแยกชั้นของน้ำมันกับน้ำ ความไม่เสถียรของอิมัลชันที่ทำให้เกิดอิมัลชันเกิดการแยกชั้นไม่ได้เกิดจากกลไกเดียวแต่มาจากหลายกลไกด้วยกัน (VanderGraaf *et al.*, 2005) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 ได้แก่ การจับกลุ่มกันอย่างหลวม ๆ ของอนุภาคน้ำมันด้วยแรงไม่มากนัก (flocculation) คือการที่ อนุภาคของวิภูภาคกระจายมาจับหรือเกาะกันเป็นกลุ่ม แต่ยังไม่หลอมรวมเข้าด้วยกัน ส่วนการหลอมรวมกันของอนุภาคน้ำมัน (coalescence) นั้น อนุภาคกระจายอยู่ประชิดกันจนหลอมรวมเข้าด้วยกัน ทำให้ขนาด

อนุภาคเฉลี่ยใหญ่ขึ้น และเกิดการแยกชั้นขึ้นการแยกเป็น 2 ชั้น ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่างความหนาแน่นของน้ำกับน้ำมัน (creaming) และ การเกิดออสวาร์ดไรเพนนิ่ง (Ostwaldripening) แสดงในรูปที่ 2.7 ซึ่งเกิดจากน้ำมันละลายและแพร่ออกจากอนุภาคน้ำมันขนาดเล็กไปรวมตัวกับอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดใหญ่กว่า เป็นผลทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยใหญ่ขึ้น (วริชฎา ศิลาอ่อน, 2009) อิมัลชันไม่มีขาคเสถียรภาพ การเพิ่มความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันในน้ำ โดยลดแรงตึงผิวระหว่างของน้ำมันและน้ำ ลดความแตกต่างของความหนาแน่นระหว่างชั้นน้ำและน้ำมัน และเพิ่มความหนืดให้กับน้ำที่เป็นวัฏภาคต่อเนื่อง ทำให้อนุภาคของน้ำมันมีการเคลื่อนที่ช้าลง (Dederidis *et al.*, 2009)



รูปที่ 2.6 ลักษณะความไม่เสถียรและการแยกชั้นของอิมัลชัน

ที่มา: <http://sparror.cubecinema.com/cola/chemistry/cola1.htm>

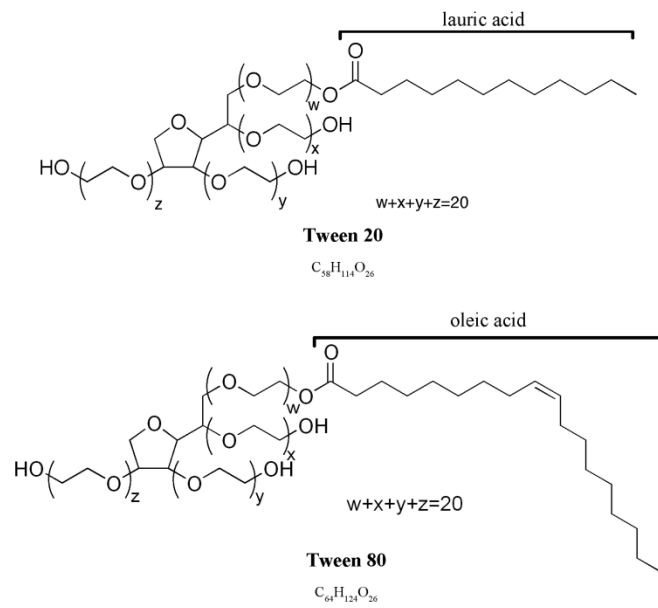


รูปที่ 2.7 การเกิดออสวาร์ดไรเพนนิ่ง (Ostwaldripening)

ที่มา: McClements, 2008

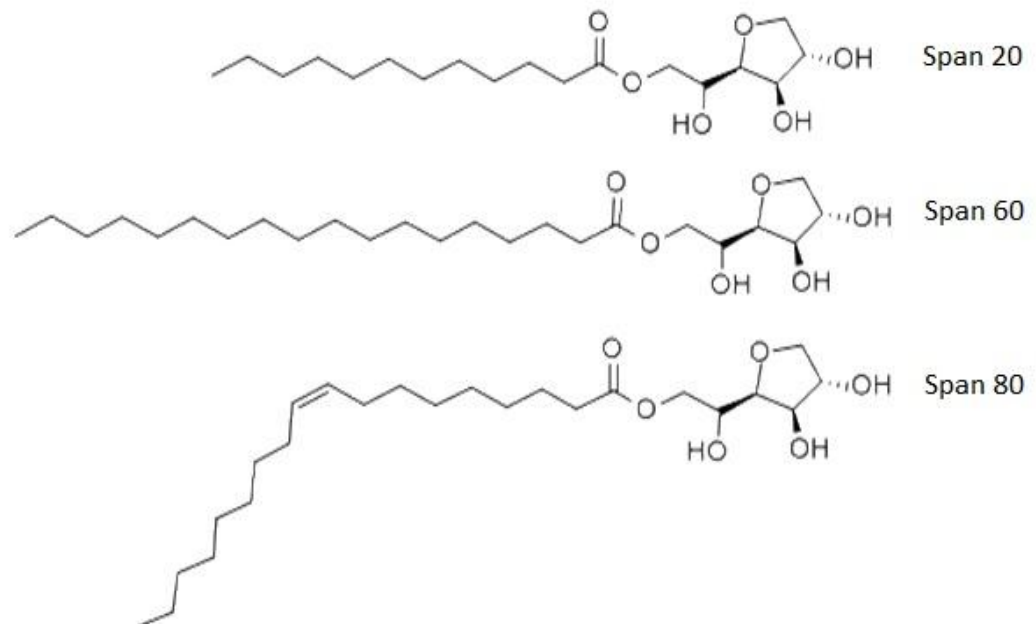
Nirmala และคณะ (2013) รายงานว่า เมื่อใช้ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชันสำหรับอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ พบว่าที่องค์ประกอบของอิมัลชันน้ำมันอบเชย Tween 20 และน้ำ เท่ากับร้อยละ 5, 25 และ 70 โดยปริมาตรตามลำดับ มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยขนาดเล็ก อยู่ในช่วง 0.010 – 0.045 μm และมีความเสถียรของอิมัลชัน และจากรายงานของ Ghosh และคณะ (2013) ใช้ตัวทำอิมัลชัน Tween 80 ที่ความเข้มข้นขององค์ประกอบอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำที่เหมาะสม มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเท่ากับ 0.065 μm Li และ Chiang (2012) เตรียม d-limonene-in-water nanoemulsion โดยใช้ตัวทำอิมัลชันร่วม 2 ชนิดคือ Span 85 และ Tween 80 รายงานว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นรวมของตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.6 มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่เล็กอยู่ในช่วง 0.024 – 0.033 μm ขนาดอนุภาคเฉลี่ยมีการเพิ่มขึ้นจนขนาดใหญ่สุดประมาณ 0.059 μm โดยใช้เวลา 49 วัน หลังการเตรียม และมีขนาดคงที่หลังการเตรียม 8 สัปดาห์ ผลจากการวิจัยชี้ให้เห็นว่าการใช้ตัวทำอิมัลชัน 2 ชนิดร่วมกันส่งผลต่อขนาดของอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่เล็ก กระจายตัวได้ดีกว่าการใช้ตัวทำอิมัลชันเพียงชนิดเดียว เนื่องจากตัวทำอิมัลชันทั้ง 2 ชนิดสามารถจัดเรียงตัวกันรอบอนุภาคน้ำมันได้ดีกว่าทำให้ลดแรงตึงผิวได้มากกว่า นอกจากนี้ยังทำให้ชั้นฟิล์มของตัวทำอิมัลชันหนาแน่นและแข็งแรง จึงป้องกันการหลอมรวมกันของอนุภาคน้ำมันได้ดี

ตัวทำอิมัลชันที่ยอมรับในอุตสาหกรรมอาหาร และสามารถใช้ในกระบวนการผลิตอาหารได้ (JointFAO/WHOExpertCommitteeonFoodAdditives, 1974) ที่งานวิจัยนี้สนใจในการนำมาศึกษาคือ กลุ่มของ polysorbates (Tween) 2 ชนิดได้แก่ polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate หรือ Tween 20 มีค่า hydrophile - lipophile balance (HLB) เท่ากับ 16.7 และ polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate หรือ Tween 80 มีค่า HLB เท่ากับ 15.0 แสดงสูตรโครงสร้างในรูปที่ 2.8 และการใช้ตัวทำอิมัลชันร่วมในกลุ่มของ sorbitan ester (Span) 3 ชนิด ได้แก่ sorbitan monolaurate (Span 20) ค่า HLB เท่ากับ 8.6 sorbitan monostearate (Span 60) ค่า HLB เท่ากับ 4.7 และ sorbitan monooleate (Span 80) ค่า HLB เท่ากับ 4.3 แสดงสูตรโครงสร้างของ Span 3 ชนิดในรูปที่ 2.9 ค่า HLB คือสัดส่วนร้อยละของส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ มีค่ากำหนดอยู่ในช่วง 0 – 20 โดยค่า 4 – 6 ใช้สำหรับอิมัลชันน้ำในน้ำมัน และ 8 – 18 ใช้สำหรับอิมัลชันน้ำมันในน้ำ ตัวทำอิมัลชันทั้ง 2 กลุ่ม มีลักษณะที่ไม่มีประจุ (non-ionic emulsifier) ความเป็นพิษต่ำ Tween ละลายได้ในน้ำ ส่วน Span ไม่ละลายในน้ำ การใช้ร่วมกันจึงจัดเรียงล้อมรอบอนุภาคน้ำมันได้ดีขึ้น



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของตัวทำอิมัลชันกลุ่มของ polysorbates (Tween)

ที่มา: Johnson online, 2014

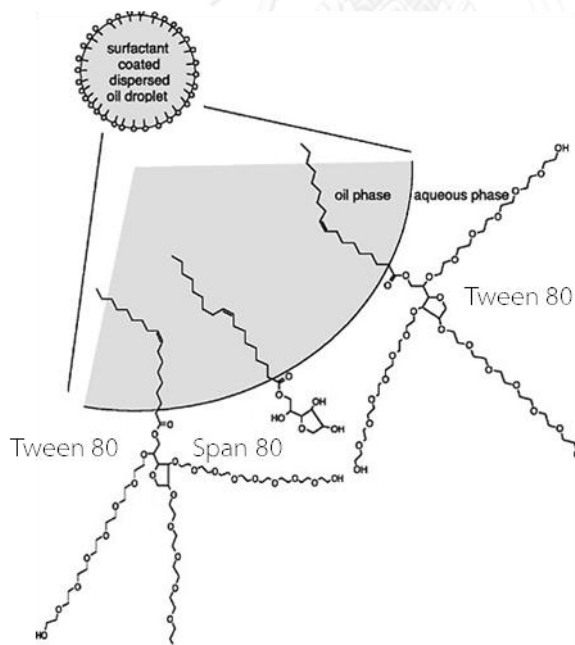


รูปที่ 2.9 โครงสร้างของตัวทำอิมัลชันกลุ่มของ sorbitan ester (Span)

ที่มา: Chemicalbook online, 2008

โครงสร้างทางเคมีของตัวทำอิมัลชันที่ไม่มีประจุ ซึ่งมีสายไฮโดรคาร์บอนที่ไม่ละลายน้ำ มีพันธะคู่ ลักษณะงอ เช่น Tween 80 และ Span 80 พบว่า การจัดเรียงตัวกันของตัวทำอิมัลชันล้อมรอบอนุภาคน้ำมัน โดยการเรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเล็กกว่าการเรียงตัวกันอย่างแน่น ๆ ของตัวทำอิมัลชันที่มีสายไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีพันธะคู่ ลักษณะเป็นเส้นตรง เช่น Tween20, Span 20 และ Span 60 (Ghosh *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 1996)

การทำงานร่วมกันระหว่างตัวทำอิมัลชัน 2 กลุ่ม คือ Tween กับ Span ที่จัดเรียงตัวแบบสลับล้อมรอบอนุภาคน้ำมัน ส่งเสริมให้อิมัลชันน้ำมันในน้ำ มีความเสถียรมากขึ้น จากรูปที่ 2.10 แสดงการจัดเรียงตัวของตัวทำอิมัลชัน 2 ชนิด คือ Tween 80 และ Span 80 ที่มีปริมาณของ Tween 80 มากกว่า Span 80 ความสมดุลของการจัดเรียงตัวของตัวทำอิมัลชันส่งเสริมให้อิมัลชันมีความเสถียรมากขึ้น เพราะลักษณะเด่นของส่วนที่ชอบน้ำของตัวทำอิมัลชันผสมทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของอนุภาคน้ำมันในน้ำ การใช้ตัวทำอิมัลชัน 2 ชนิดหรือมากกว่าที่มีค่า HLB ที่แตกต่างกัน แต่มีค่า HLB รวมอยู่ในช่วง 9 -11 ช่วยให้การจัดเรียงตัวของตัวทำอิมัลชันที่บริเวณผิวประจันระหว่างชั้นน้ำและน้ำมันแน่นมากกว่าการใช้ตัวทำอิมัลชันเพียงชนิดเดียว ที่ช่วง HLB เดียวกัน (Porter, 1991) การใช้ตัวทำอิมัลชันร่วมกัน ทำให้เกิดเป็นลักษณะฟิล์มที่ชั้นระหว่างน้ำกับน้ำมันที่แข็งแรง (Efficacy and Effects, 2005)



รูปที่ 2.10 การจัดเรียงตัวของตัวทำอิมัลชัน Tween 80 และ Span 80

ที่มา: Efficacy and Effects, 2005

2.4 แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการเจ็บป่วย การปนเปื้อนของผักและผลไม้อาจมาจากแหล่งเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การขนส่ง โดยอาจปนเปื้อนมาจากดิน และ ปุ๋ยคอก (นภาพรเชียวชาญ, 2546) หรือ กระบวนการเตรียมอาหาร จากอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียม แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *E.coli*, *B.cereus* และ *S.aureus*

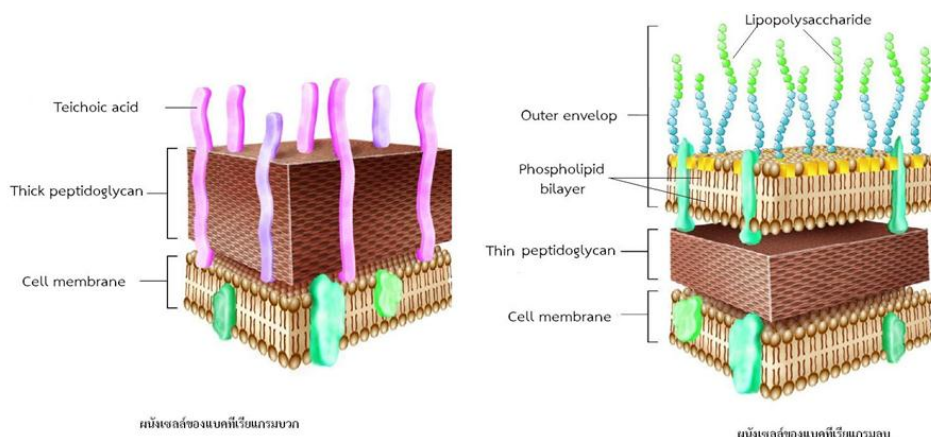
E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นท่อน (Gram negative rod) อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae หากได้รับเชื้อนี้จะเกิดอาการท้องร่วง (diarrhea) มักพบในพืชผัก ผลไม้ (Burt, 2004) เจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 7 - 10 จนถึง 50 องศาเซลเซียส อาศัยออกซิเจนหรือไม่ใช้ออกซิเจนก็ได้ เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญ ได้แก่ O:157 H:7 และ O:104 H:4 ที่สร้างสารพิษ ทำให้ผู้ที่ได้รับเชื้อ มีอาการ ไข้ต่ำ ปวดท้องเกร็ง อุจจาระเหลว คล้ายอาการโรค อหิวาตกโรค (เสกสรรค์ สโมสรรสุข, 2554)

B. cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน (Gram positive rod) เจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ มีการสร้างสปอร์ เซลล์มีลักษณะใหญ่ อาการของโรคคือ ปวดท้อง คลื่นไส้ และท้องร่วง มักพบปนเปื้อน ธัญพืช อาหารแห้ง ข้าว (สุเมธธา วัฒนสินธุ์, 2545) เชื้อนี้ส่วนใหญ่ปนเปื้อนในรูปของสปอร์

S. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม (cocci) อยู่ในวงศ์ Micrococcaceae อยู่รวมกันลักษณะคล้ายพวงอุ้งน แต่อาจจะพบเป็นเซลล์เดี่ยวเป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 - 37 องศาเซลเซียส อาหารที่มักพบปนเปื้อนได้แก่เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อเนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์จากไข่ เมื่อได้รับเชื้อนี้จะเกิดอาการคลื่นไส้อาเจียนท้องร่วงอย่างรุนแรงจนอ่อนเพลียมาก (สุเมธธา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.5 โครงสร้างของผนังเซลล์แกรมบวกและแกรมลบของแบคทีเรีย

ผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียเป็นโครงสร้างที่ทำการห่อหุ้มเซลล์ให้มีคงรูปอยู่ได้ ควบคุมการผ่านเข้าออกของน้ำและสารอาหาร การแบ่งตัวของเซลล์ รักษาความดันภายในเซลล์ และป้องกันการแตกของเซลล์ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก มีชั้นของ peptidoglycan เป็นส่วนใหญ่ ประกอบด้วย N-acetyl glucosamine และ N-acetyl muramic acid ที่ต่อแบบสลับกัน และพบ teichoic acid แทรกอยู่ ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการขยายตัวของผนังเซลล์ในระหว่างการแบ่งเซลล์ ส่วนแบคทีเรียแกรมลบบมีลักษณะที่ซับซ้อนกว่า แกรมบวกดังแสดงในรูปที่ 2.9 เนื่องจากมีชั้นไขมันของ phospholipid และ lipopolysaccharide ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน และ endotoxin ทำให้มีการก่อโรคเกิดขึ้น สามารถทนต่อสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ (Gao *et al.*, 1999) และ ชั้นของ peptidoglycan ที่บางกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่พบ teichoic acid (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544; Mandelstam, 1982)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

ที่มา: <http://www.foodnetworksolution.com/>

2.6 กลไกการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยมีโครงสร้างทางเคมีที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ hydrophobicity ที่สามารถเข้าไปสู่ผนังเซลล์ และ mitochondria ของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นการรบกวนโครงสร้างของเซลล์และทำให้สารของน้ำมันหอมระเหยซึมเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น (Knobloch *et al.*, 1986) เกิดการรั่วไหลของไอออนและสารภายในเซลล์แบคทีเรียส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตอยู่

สารที่ออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของน้ำมันอบเชย ได้แก่ eugenol พบมากในการสกัดน้ำมันจากใบอบเชย ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟีนอล (phenol) จากงานวิจัยของ Farag และคณะ (1989) พบว่า eugenol สามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์ amylase และ proteases ของเชื้อ *B. cereus* โดยทำให้ผนังเซลล์เสื่อมสภาพและเพิ่มการสลายตัวของเซลล์ องค์ประกอบของ eugenol ที่เป็น hydroxyl group ทำหน้าที่จับกับโปรตีนและต่อต้านการผลิตเอนไซม์ ส่วน cinnamaldehyde ที่พบมาจากการสกัดน้ำมันจากเปลือกอบเชย ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม aldehyde ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* O157:H7 และ *S. typhimurium* หมู่ carbonyl group ของ cinnamaldehyde ทำหน้าที่จับกับโปรตีนและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ amino acid carboxylase (Wendakoon และ Sakaguchi, 1995)

สารที่ออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของน้ำมันส้ม คือ limonene ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม alkyl group จากงานวิจัยของ Espina และคณะ (2013) พบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* ซึ่งมีกลไกในการยับยั้งกระบวนการหายใจของเซลล์ และการถ่ายโอนอิเล็กตรอนภายในเซลล์ ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Andrew *et al.*, 1980; Zhang *et al.*, 2014)

2.7 ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันต่อฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย

ปัจจุบันการศึกษาผลของขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยในอิมัลชันน้ำมันในน้ำต่อฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียยังไม่แน่นอน Saranya และคณะ (2012) พบว่า เมื่อเตรียมอิมัลชันน้ำมันยูคาลิปตัส มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยระดับนาโนเมตรมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าการใช้ น้ำมันยูคาลิปตัสเพียงอย่างเดียว และในรายงานของ Teixeira และคณะ (2007) พบว่า อิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วงนาโนเมตรมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ซึ่งน้ำมันถั่วเหลือง ไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ส่วนรายงานของ Buranasuksombat และคณะ (2011) ทำการเตรียมอิมัลชันน้ำมันในน้ำ จากน้ำมัน lemon myrtle ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และ น้ำมันถั่วเหลืองที่ไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย พบว่า ที่ระดับขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย มิลลิเมตร ไมโครเมตร และ นาโนอิมัลชัน ไม่มีผลต่อการต้านแบคทีเรีย และรายงานของ Liang และคณะ (2012) พบว่านาโนอิมัลชันของน้ำมันสะระแห่นในน้ำมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียมากกว่าน้ำมันสะระแห่น ขณะที่ Terjung และคณะ (2012) รายงานว่า carvacrol และ eugenol ที่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย ร่วมกับ triacylglyceride เตรียมเป็นอิมัลชันน้ำมันในน้ำ กลับพบว่า อิมัลชันที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ ออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียได้ดีกว่าอิมัลชันที่มีอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยขนาดเล็ก

บทที่ 3

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด คือน้ำมันอบเชย (บริษัทของฮวดจำกัด, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย) กับน้ำมันส้ม (บริษัทของฮวดจำกัด, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย) ตัวทำอิมัลชัน 2 กลุ่ม คือ Tween 2 ชนิด ได้แก่ Tween 20 (LABCHEM, Taren Point NSW, Australia) และ Tween 80 (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany) กับ Span 3 ชนิด ได้แก่ Span 20 (Sigma-Aldrich, Louis, USA) Span 60 (Sigma-Aldrich, Louis, USA) และ Span 80 (Fluka, Steinheim, Spain) แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้คือ *Bacillus cereus* ATCC 6228 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 แบคทีเรียแกรมลบที่ใช้คือ *Escherichia coli* ATCC 25922

3.1 ผลของชนิดน้ำมันหอมระเหยและชนิดตัวทำอิมัลชัน ต่อค่า minimum inhibition concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) สำหรับแบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร

การเตรียมอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยในน้ำ ในหลอด centrifuge tube ขนาด 1.5 ml โดยใช้ น้ำมันหอมระเหย 100 μ l ผสมกับสารละลายตัวทำอิมัลชันในน้ำ 900 μ l ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร (คำนวณสารให้อยู่ในหน่วย mg/ml น้ำมันอบเชย 1000 μ l มีน้ำหนักเท่ากับ 1120 mg ส่วนน้ำมันส้ม 1000 μ l มีน้ำหนัก 865 mg ดังนั้น ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยและน้ำมันส้มเท่ากับ 112 และ 86.5 mg/ml ตามลำดับ) ปั่นด้วยเครื่อง vortex mixer (vortex genie 2, scientific industries, USA) ปรับความเร็วเครื่องเบอร์ 5 เป็นเวลา 10 นาทีนำสารละลายที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์หาค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli* ตามรายละเอียดในข้อ 3.5.2.1 และ 3.5.2.2

3.2 ผลของชนิดและปริมาณน้ำมันหอมระเหย และ ชนิดและปริมาณตัวทำอิมัลชันต่อการเกิดอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยในน้ำ ความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคทางอาหาร

ปริมาณน้ำมันหอมระเหย ตัวทำอิมัลชันและน้ำสำหรับอิมัลชัน 100 กรัม เตรียมสารละลายตัวทำละลายอิมัลชันในน้ำก่อน โดยชั่งตัวทำอิมัลชันเติมลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ กวนด้วยแท่งแก้วอย่างช้าๆ ระวังไม่ให้เกิดฟองให้ตัวทำอิมัลชันละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกัน ชั่งน้ำมันหอมระเหยแล้วค่อยๆหยดลงในสารละลายตัวทำละลายอิมัลชันขณะที่ทำการตีปั่นด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์แบบแกน probe 10G (Ystral X10/20 homogenizer GmbH, Ballrechten-Dottingen, Germany) ที่ความเร็ว 22,000 รอบต่อนาที ให้หล่อเย็นภาชนะที่ใช้ในการเตรียมอิมัลชันด้วยน้ำแข็งตลอดเวลาทำการตีปั่นเพื่อถ่ายเทความร้อนที่เกิดขึ้นในกระบวนการตีปั่น ในการตีปั่นให้ทำการตีปั่น 5 นาที สลับ

กับหยุดการตีปั่น 5 นาที จนครบเวลาที่ต้องการตีปั่น นำอิมัลชันที่เตรียมได้เก็บในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 °C) แล้วนำไปวิเคราะห์ ความเสถียรในสภาวะปกติทุกวัน ตามวิธีข้อ 3.5.1.1 ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเชิงปริมาตร (mean volumn diameter, $D[4,3]$) หลังเตรียมอิมัลชัน 1 วัน ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.1.2 และค่า MIC และ MBC โดยวิเคราะห์ตามข้อ 3.5.2.1 และ 3.5.2.2 รายงานค่า MIC และ MBC ในหน่วย mg/ml

การทดลองทำการแปรชนิดน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด (น้ำมันอบเชยและน้ำมันส้ม) ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย 4 ระดับ (ร้อยละ 2.5, 5, 7.5 และ 10 โดยน้ำหนัก) ชนิดตัวทำอิมัลชัน 2 ชนิด (Tween 20 และ Tween 80) และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน 3 ระดับ (ร้อยละ 0.2, 0.4 และ 0.8 โดยน้ำหนัก) แสดงในตารางที่ 3.1 วางแผนการทดลองแบบ factorial design $2 \times 4 \times 2 \times 3$ คำนวณทางสถิติตามข้อ 3.6

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยในน้ำ

อิมัลชันที่มีความเข้มข้นของ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		ปริมาณของ (กรัม)		
น้ำมันหอม ระเหย	ตัวทำอิมัลชัน	น้ำมันหอม ระเหย	ตัวทำอิมัลชัน	น้ำกลั่น
2.5	0.2	2.5	0.2	97.3
	0.4	2.5	0.4	97.1
	0.8	2.5	0.8	96.7
5.0	0.2	5.0	0.2	94.8
	0.4	5.0	0.4	94.6
	0.8	5.0	0.8	94.2
7.5	0.2	7.5	0.2	92.3
	0.4	7.5	0.4	92.1
	0.8	7.5	0.8	91.7
10.0	0.2	10.0	0.2	89.8
	0.4	10.0	0.4	89.6
	0.8	10.0	0.8	89.2

3.3 ผลของเวลาที่ใช้ในการตีปั่นอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ

เตรียมอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ (วิธีเตรียมจากข้อ 3.2.1) ที่มีองค์ประกอบของ น้ำมันอบเชยร้อยละ 5 โดยน้ำหนักและ Tween 20 ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก แปรเวลาที่ใช้ในการตีปั่น 4 ระดับ คือ 10, 15, 20 และ 30 นาที เก็บอิมัลชันในขวดแก้วสีชา เป็นเวลา 1 วันหลังการตีปั่น วิเคราะห์ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเชิงปริมาตร ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.1.2 วางแผนการทดลองแบบ CRD คำนวณทางสถิติตามข้อ 3.6

3.4 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 80 ต่อความเสถียร ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันอบเชย

ปริมาณน้ำมันอบเชย ตัวทำอิมัลชันและน้ำสำหรับอิมัลชัน 100 กรัม แสดงในตารางที่ 3.2 เตรียมอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำตามวิธีข้อ 3.2 โดยละลายตัวทำอิมัลชัน Tween 80 ที่ได้จากผลการทดลองที่ 4.4 ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และละลายตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ลงในน้ำมันอบเชย ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันรวมคงที่ ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก เวลาที่ใช้ตีปั่น 10 นาที นำอิมัลชันที่เตรียมได้เก็บในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 °C) แล้วนำไปวิเคราะห์ ความเสถียรในสภาวะปกติทุกวัน ตามวิธีข้อ 3.5.1.1 ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเชิงปริมาตร หลังเตรียมอิมัลชัน 1 วัน ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 3.5.1.2 และค่า MIC และ MBC โดยวิเคราะห์ตามข้อ 3.5.2.1 และ 3.5.2.2 รายงานค่า MIC และ MBC ในหน่วย mg/ml

การทดลองทำการแปรชนิดของ Span 3 ชนิด (Span 20, Span 60 และ Span 80) ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน Span 3 ระดับ (ร้อยละ 0.2, 0.6 และ 0.8) วางแผนการทดลองแบบ factorial design 3x2 คำนวณทางสถิติตามข้อ 3.6

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ โดยใช้ตัวทำอิมัลชัน Tween 80

องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)					
น้ำมันอบเชย	ตัวทำอิมัลชัน				น้ำ
	Tween 80	Span20	Span60	Span80	
2.5	0.6	0.2	-	-	96.7
	0.6	-	0.2	-	96.7
	0.6	-	-	0.2	96.7
2.5	0.2	0.6	-	-	96.7
	0.2	-	0.6	-	96.7
	0.2	-	-	0.6	96.7

3.5 วิธีวิเคราะห์

3.5.1 ความเสถียรของอิมัลชัน

3.5.1.1 การแยกชั้นในสภาวะปกติของอิมัลชัน

ตรวจสอบอิมัลชันหลังจากการเตรียมทุกวัน โดยเก็บอิมัลชันใส่ขวดแก้วใส เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 cm สูง 10 cm เติมอิมัลชันลงไป 10 ml (4 cm) ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 °C) ในที่ไม่มีแสง นำออกมาตรวจการแยกชั้นของอิมัลชันบันทึกและรายงานเวลาที่เก็บซึ่งพบการแยกชั้น

3.5.1.2 ขนาดอนุภาคและการกระจายของอนุภาคน้ำมันของอิมัลชัน

นำอิมัลชันที่เตรียมไปวิเคราะห์หาขนาดอนุภาคและการกระจายขนาดอนุภาคหลังการเตรียม 1 - 7 วัน ด้วยเครื่อง Mastersizer (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) ที่ใช้หลักการ laser light scattering โดยใช้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวกระจายอนุภาคน้ำมัน (McClements *et al.*, 2012) ซึ่งค่า refractive index ของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้สามารถวัดได้โดยเครื่อง refractometer (Atago 1T, Atago, Japan) ค่า refractive index ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันส้มที่วัดได้มีค่าเท่ากับ 1.578 และ 1.470 ตามลำดับ

3.5.2 ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli* โดยใช้ลูปแตะโคโลนีจาก Nutrient Agar (NA) ลงไปเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) 5 ml เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เจือจางเชื้อใน 0.85% NaCl ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ $10^6 - 10^7$ cfu/ml

3.5.2.1 วิเคราะห์หาค่า MIC ของน้ำมันอบเชย น้ำมันส้ม อิมัลชันน้ำมันอบเชย และอิมัลชันน้ำมันส้ม

นำน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 และอิมัลชันน้ำมันอบเชยหรือน้ำมันส้มที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 และ 3.4 มาวิเคราะห์หาค่า MIC ใช้วิธีการทดสอบแบบ broth microdilution assay (Bassole *et al.*, 2003) โดยนำอิมัลชันมาเจือจางกับอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) (Himedia laboratories, India) ด้วยเทคนิค serial dilution เจือจางใน 96-well microtiter plate โดยให้มีปริมาตรรวมหลุมละ 100 μ l และเติมคัลเจอร์ที่เตรียมข้างต้น ปริมาตร 25 μ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมง โดยใช้ตัวควบคุม 2 แบบ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ผสมกับเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (negative control) และอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB อย่างเดียวเป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) หาค่า MIC ประเมินจากการสังเกตความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ ลักษณะของเหลวในหลุมมีความใส ยืนยันโดยการนำของเหลวไปทำการ spread ใน Mueller Hinton Agar (MHA) (Himedia laboratories, India) ความเข้มข้นที่ทำให้เชื้อมีปริมาณลดลง 1 log phase ของเชื้อเริ่มต้น (Levison, 2004)

3.5.2.2 วิเคราะห์หาค่า MBC ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันส้ม อิมัลชันของน้ำมัน อบเชยหรืออิมัลชันน้ำมันส้ม

นำสารที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2.1 หาค่า MBC ใช้วิธีการทดสอบแบบ broth microdilution assay ต่อจากข้างบน ตรวจสอบค่า MBC โดยการขีด (steak) คัลเจอร์จากแต่ละหลุมบนอาหาร MHA เชื้อแต่ละหลุมการทดลองที่ไม่มีเชื้อเจริญลงบนอาหารแข็ง MHA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมงโดยการขีดตัวควบคุมเชิงบวกและเชิงลบลงบนอาหารแข็ง MHA ประเมินได้จากการสังเกตความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง MHA ถือว่าความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC ในหน่วย mg/ml ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตัวอย่างอิมัลชันทุกตัวอย่าง ถูกเตรียม 2 ซ้ำ แต่ละซ้ำทำการวิเคราะห์ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 3 ซ้ำ ประเมินผลการทดลองทางสถิติโดยใช้ ANOVA ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS statistics 17.0 (SPSS Inc., USA) ในการหาค่าสถิติ

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของชนิดน้ำมันหอมระเหยต่อค่า minimum inhibition concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) สำหรับแบคทีเรียที่ก่อโรคทางอาหาร

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด คือ *B. cereus*, *S. aureus* และ *E. coli* เมื่อใช้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 100 μ l สารละลาย Tween 20 ในน้ำ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลาย ได้ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชย 112 mg/ml และความเข้มข้นของน้ำมันส้ม 86.5 mg/ml ซึ่งพบว่า น้ำมันอบเชยให้ค่า MIC ต่ำกว่าน้ำมันส้มสำหรับแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ส่วนค่า MBC นั้นน้ำมันอบเชยให้ค่าต่ำกว่าน้ำมันส้มสำหรับ *S. aureus* และ *E. coli* แต่กลับกันสำหรับ *B. cereus* นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันอบเชยให้ทั้งค่า MIC และ MBC สำหรับ *E. coli* ต่ำสุด และ *B. cereus* สูงสุด ส่วนน้ำมันส้มให้ค่า MIC สำหรับ *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากัน และต่ำกว่าค่านี้สำหรับ *B. cereus* ขณะที่น้ำมันส้มให้ค่า MBC สำหรับ *S. aureus* ต่ำสุด บ่งว่าน้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้ได้ดีกว่าน้ำมันส้ม โดยที่น้ำมันอบเชยสามารถยับยั้ง *E. coli* ดีที่สุดและ *B. cereus* น้อยที่สุด ส่วนน้ำมันส้มยับยั้ง *S. aureus* ดีที่สุด จากค่า MIC และ MBC ที่หาได้นี้ได้นำมาเพื่อใช้ในการบอกความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

น้ำมันหอมระเหยที่มี aldehydes เช่น cinnamaldehyde หรือ phenols (เช่น eugenol) เป็นองค์ประกอบหลักให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงสุด ขณะที่น้ำมันหอมระเหยที่มี ketones หรือ esters เป็นองค์ประกอบหลักมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่ำกว่า ส่วนน้ำมันหอมระเหยซึ่งมี terpene hydrocarbon เช่น limonene มักไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Henri *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตาม ยังพบว่า limonene ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันส้ม มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย เนื่องจาก limonene ปลอดภัยหรือเปลี่ยนแปลงกรดไขมันประเภทไม่เสถียร หรือการสะสมของสาร terpene hydrocarbons ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์รั่วและมีโปรตรอนไหลออกมา ส่วน phenol สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ amino acid carboxylase ในกระบวนการถ่ายโอนอิเล็กตรอน โดยทำปฏิกิริยากับไนโตรเจน จึงยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Gupta *et al.*, 2008) ดังนั้น น้ำมันอบเชยซึ่งมี cinnamaldehyde และ eugenol เป็นองค์ประกอบหลัก โดยน้ำมันอบเชยที่สกัดจากเปลือกมี cinnamon oil อยู่เป็นส่วนใหญ่ (ร้อยละ 60 - 75) และมี eugenol ประมาณร้อยละ 0.8 ขณะที่น้ำมันอบเชยที่สกัดจากใบมี eugenol เป็นส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 70 - 96 (ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร และคณะ, 2555) จึงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงกว่าน้ำมันส้มที่มี limonene ร้อยละ 60 - 75 (Williams and Pierce, 1998)

ตารางที่ 4.1 ผลของชนิดน้ำมันหอมระเหยต่อค่า MIC และ MBC สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เมื่อใช้น้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้น 112 mg/ml หรือน้ำมันส้มความเข้มข้น 86.5 mg/ml โดยใช้สารละลายน้ำของ Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลาย

ชนิดของ น้ำมันหอม ระเหย	MIC (mg/ml) สำหรับ			MBC (mg/ml) สำหรับ		
	<i>B. cereus</i> ATCC 6228	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. cereus</i> ATCC 6228	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
น้ำมัน อบเชย	56.0	4.4	2.2	112.0	17.6	4.4
น้ำมันส้ม	86.5	21.7	21.7	>86.5	43.4	86.5

* ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.2 ผลของชนิดและปริมาณน้ำมันหอมระเหย และ ชนิดและปริมาณตัวทำอิมัลชันต่อการเกิดอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยในน้ำ ความเสถียรของอิมัลชัน และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของชนิดน้ำมันหอมระเหย (ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก) และตัวทำอิมัลชัน (ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก) ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยหลังการเตรียม 1 วันและเวลาในการแยกชั้นของอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยพบว่า อิมัลชันน้ำมันอบเชยมีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเล็กกว่าอิมัลชันน้ำมันส้ม กล่าวคืออิมัลชันน้ำมันอบเชยมีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยอยู่ที่ 0.146 – 0.184 μm ขณะที่อิมัลชันน้ำมันส้มมีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเกิน 1 μm ชนิดของตัวทำอิมัลชันมีผลทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยแตกต่างกันน้อยกว่า 0.040 μm นอกจากนี้ยังพบว่าอิมัลชันน้ำมันอบเชยแยกชั้นช้ากว่าอิมัลชันน้ำมันส้ม จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคน้ำมันตามระยะเวลาที่เก็บนาน 7 วัน (รูปที่ 4.1) สำหรับอิมัลชันน้ำมันอบเชยที่ใช้ตัวทำอิมัลชันทั้ง 2 ชนิด ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยไม่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่เก็บ ขณะที่ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันส้มเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่เก็บ อย่างไรก็ตามพบว่าอิมัลชันน้ำมันอบเชยแยกชั้นหลังการเก็บ 7 วันโดยลักษณะการแยกชั้นคือแยกตัวเป็นหยดน้ำมัน บริเวณก้นขวดที่เก็บและมีหยดน้ำมันบางส่วนที่ลอยอยู่บนสุดของอิมัลชัน น้ำมันอบเชยตกตะกอนเพราะมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ ขณะที่อิมัลชันน้ำมันส้มเริ่มมีการแยกชั้นเป็นชั้นครีมลอยอยู่ชั้นบนของอิมัลชันหลังการเก็บ 3 วัน การแยกชั้นครีมของน้ำมันส้มพบได้เร็วกว่าการตกตะกอนของน้ำมันอบเชย เนื่องจากอนุภาคน้ำมันส้มมีขนาดใหญ่กว่า จึงแยกชั้นเร็วกว่า ดังแสดงในรูปที่ 4.2 ชนิดของตัวทำอิมัลชันไม่ทำให้ระยะเวลาในการแยกชั้นของอิมัลชันแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.2)

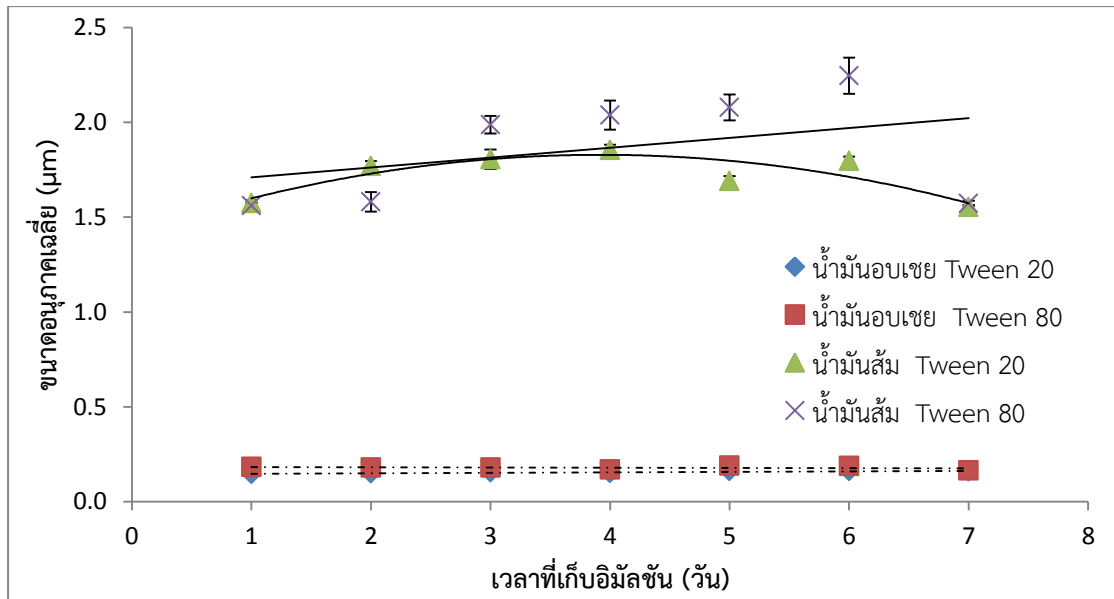
อิมัลชันน้ำมันอบเชยมีอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเล็กกว่าและเสถียรกว่าอิมัลชันน้ำมันส้ม จึงเลือกอิมัลชันน้ำมันอบเชยมาศึกษาในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.2 ผลของชนิดน้ำมันหอมระเหยและตัวทำอิมัลชันต่อการกระจายขนาดอนุภาคน้ำมันขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยหลังการเตรียม 1 วัน และเวลาในการแยกชั้นของอิมัลชันที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	ชนิดของตัวทำอิมัลชัน	ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย* (μm)	เวลาในการแยกชั้นของอิมัลชันหลังการเตรียม (วัน)
น้ำมันอบเชย	Tween 20	0.040 – 1.096	$0.146^a \pm 0.001$	7
	Tween 80	0.040 – 1.259	$0.184^b \pm 0.001$	7
น้ำมันส้ม	Tween 20	0.240 – 7.589	$1.575^d \pm 0.002$	3
	Tween 80	0.275 – 13.183	$1.561^c \pm 0.029$	3

* ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ในแต่ละคอลัมน์ตัวอักษร a, b, .. ที่แตกต่างกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน ($p < 0.05$)



รูปที่ 4.1 ผลของเวลาการเก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก



รูปที่ 4.2 การแยกชั้นของอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

4.3 ผลของเวลาที่ใช้ในการตีปั่นต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ

ตารางที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มเวลาที่ใช้ในการตีปั่นนานมากกว่า 10 นาที ไม่ได้ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยลดลงโดยเวลาที่ใช้ตีปั่นระหว่าง 15 - 30 นาที ไม่ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เวลาในการตีปั่นที่มากขึ้นเป็นการเพิ่มเวลาในการให้แรงเฉือนเพื่อลดขนาดอนุภาคน้ำมัน แต่ก็ส่งผลให้เกิดความร้อนเพิ่มขึ้นซึ่งชักนำให้อนุภาคน้ำมันเกิดการรวมตัวทำให้อนุภาคน้ำมันเพิ่มขึ้น (Gardoub *et. al.*, 2012) ดังนั้น จึงเลือกการตีปั่นนาน 10 นาที มาใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.3 ผลของเวลาในการตีปั่นอิมัลชันที่ความเร็ว 22000 รอบต่อนาที ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ ที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของ Tween 20 ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

เวลาในการตีปั่นอิมัลชัน (นาที)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย* หลังการเตรียม 1 วัน (μm)
10	0.146 ^a \pm 0.002
15	0.149 ^b \pm 0.003
20	0.149 ^b \pm 0.002
30	0.150 ^b \pm 0.004

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษร a, b, ... ที่แตกต่างกันแสดงว่าขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

4.4 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันอบเชย ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ

ตารางที่ 4.4 แสดงว่าขนาดของอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยเพิ่มขึ้น แต่ลดลงเมื่อความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้น ที่ความเข้มข้นของน้ำมันและตัวทำอิมัลชันคงที่พบว่าเมื่อใช้ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชันให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเล็กกว่าเมื่อใช้ Tween 80 เป็นตัวทำอิมัลชัน ยกเว้นที่ความเข้มข้นของน้ำมันร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ซึ่งให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยไม่ต่างกับรูปที่ 4.3 แสดงว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยไม่เพิ่มขึ้นตามเวลาที่เก็บ 21 วัน เมื่อใช้ Tween 80 เป็นตัวทำอิมัลชัน ขณะที่ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เก็บเมื่อใช้ Tween 20 เป็นตัวทำ

อิมัลชันการเพิ่มความเข้มข้นตัวทำอิมัลชันทำให้มีตัวทำอิมัลชันจัดเรียงตัวกันที่ผิวประจันระหว่างอนุภาคน้ำมันกับน้ำได้แน่นขึ้น และพอสำหรับการล้อมรอบผิวอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดเล็กลงได้จึงทำให้ได้อนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่มีขนาดเล็กลง (Porras *et al.*, 2004)

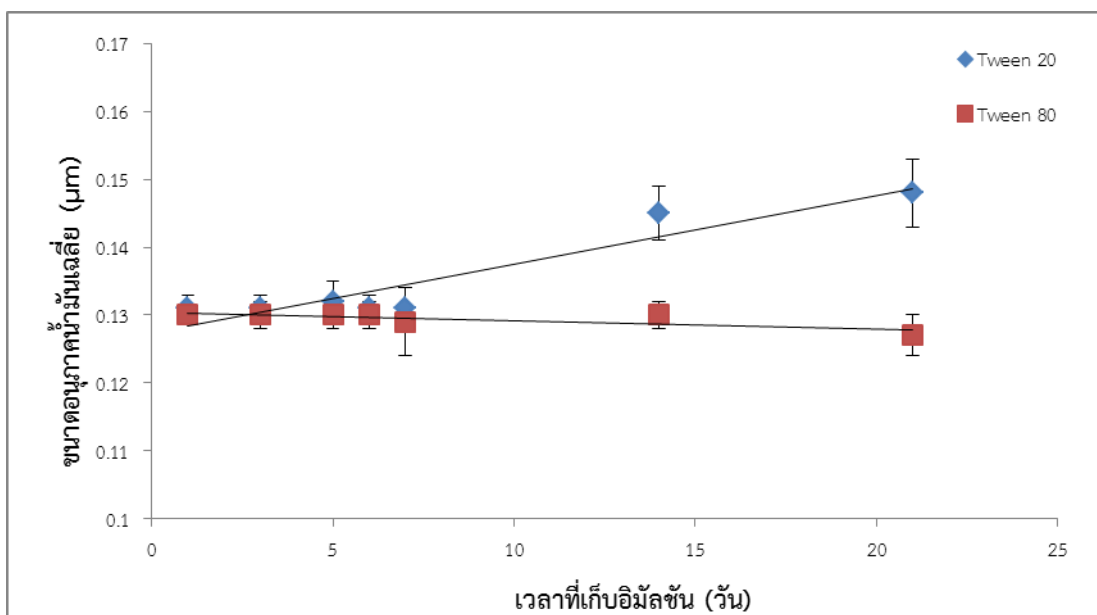
อิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชันประเภทที่ไม่มีประจุนั้น ความเสถียรนอกจากขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาคน้ำมันแล้วยังขึ้นอยู่กับความหนาและความแข็งแรงของชั้นตัวทำอิมัลชันที่ล้อมรอบอนุภาคน้ำมันด้วย Ghosh และคณะ (2013) รายงานว่าโครงสร้างเคมีของตัวทำอิมัลชันมีผลต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและความเสถียรของอิมัลชัน ตัวทำอิมัลชันประเภทไม่มีประจุซึ่งมีพันธะคู่ที่ส่วนสายไฮโดรคาร์บอน (ส่วนที่เป็น hydrophobic) เช่น Tween 80 เรียงตัวกันล้อมรอบอนุภาคน้ำมันอย่างหลวม ๆ ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเล็กกว่าการเรียงตัวกันอย่างแน่นๆ ส่วนสายของไฮโดรคาร์บอนของตัวทำอิมัลชันประเภทไม่มีประจุ ซึ่งไม่มีพันธะคู่ เช่น Tween 20 ซึ่งส่วนสายของไฮโดรคาร์บอน มีลักษณะเป็นสายตรงซึ่งทำให้การเรียงตัวรอบอนุภาคน้ำมันแน่น จากรูปที่ 4.3 ซึ่งพบว่าอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 ที่มีขนาดอนุภาคน้ำมันที่เล็กกว่า การใช้ตัวทำอิมัลชัน Tween 80 เกิดการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย เนื่องจากอนุภาคน้ำมันขนาดเล็กมีแรงผลักรันที่สูง ทำให้สามารถละลายน้ำได้มากกว่าอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งอนุภาคน้ำมันขนาดเล็กแพร่ไปยังอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดใหญ่ เป็นผลทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเพิ่มขึ้น (Rao and McClement, 2012)

ตารางที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันอบเชย ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยหลังการเตรียม 1 วัน

ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย* (μm) สำหรับอิมัลชันที่มีองค์ประกอบ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)						
น้ำมัน อบเชย	Tween 20			Tween 80		
	0.2	0.4	0.8	0.2	0.4	0.8
2.5	0.274 ^{dA} ±0.005	0.149 ^{bA} ±0.052	0.131 ^{aA} ±0.001	0.360 ^{eA} ±0.003	0.157 ^{cA} ±0.001	0.130 ^{aA} ±0.001
5.0	1.174 ^{eB} ±0.091	0.305 ^{cB} ±0.004	0.146 ^{aB} ±0.001	1.273 ^{fB} ±0.020	0.484 ^{dB} ±0.003	0.184 ^{bB} ±0.002
7.5	1.361 ^{eC} ±0.014	0.333 ^{bC} ±0.002	0.213 ^{aC} ±0.007	1.888 ^{fC} ±0.037	0.794 ^{dC} ±0.028	0.402 ^{cC} ±0.006
10.0	1.578 ^{eD} ±0.068	0.814 ^{cD} ±0.724	0.433 ^{aD} ±0.002	1.963 ^{fD} ±0.573	0.975 ^{dD} ±0.755	0.657 ^{bD} ±0.349

ตัวอักษร a, b, ..ค่าในแถวเดียวกันตามแนวนอนที่แตกต่างกันแสดงว่าขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ตัวอักษร A, B, ..ค่าในแถวเดียวกันตามแนวตั้งที่แตกต่างกันแสดงว่าขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$



รูปที่ 4.3 ผลของเวลาเก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

จากผลการศึกษาฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของน้ำมันอบเชยในข้อ 4.1 พบว่าน้ำมันอบเชยมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้สำหรับ *E. coli* และ *S. aureus* แต่ฤทธิ์ในการต้านที่ต่ำสำหรับ *B. cereus* และตัวทำอิมัลชันทั้งสองชนิดก็ไม่มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ศึกษา เมื่อเตรียมอิมัลชันอบเชยในน้ำพบว่าไม่มีฤทธิ์ต้าน *B. cereus* ในขั้นตอนนี้จึงวิเคราะห์ค่า MBC เฉพาะ *E. coli* และ *S. aureus* ตารางที่ 4.5 แสดงว่าค่า MBC สำหรับ *S. aureus* ต่ำกว่าค่า MBC สำหรับ *E. coli* อิมัลชันน้ำมันอบเชยที่ใช้ตัวทำอิมัลชันชนิด Tween 80 ให้ค่า MBC ของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* เท่ากับ 8.8 mg/ml ระยะเวลาที่เก็บอิมัลชัน 1 วัน โดยที่ให้ค่า MBC ของเชื้อ *S. aureus* ต่ำกว่าที่ใช้ Tween 20 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองตารางที่ 4.1 ของน้ำมันอบเชยที่ใช้ Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลาย อิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียได้ดีกว่าในสารละลายน้ำมันอบเชย แต่กลับกัน ค่า MBC ของ *E. coli* มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเตรียมอยู่ในรูปอิมัลชันในน้ำ อิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus* ได้ดีกว่า แบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างของผนังเซลล์ (cell wall) และเยื่อชั้นนอก (outer membrane) มีลักษณะซับซ้อนกว่าแกรมบวก จึงทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายได้ยากกว่า (Shan *et al.*, 2007) ทั้งนี้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วยชั้นของไขมันที่ซึ่งไม่ค่อยพบในแบคทีเรียแกรมบวกอาจส่งผลให้การเข้าทำลายผนังเซลล์ของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำเป็นไปได้ช้ากว่าแกรมบวก ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการเคลื่อนที่ผ่านชั้นไขมันของแกรมลบสารที่มีฤทธิ์ในการทำลายอาจถูกปลดปล่อยออกจากชั้นน้ำที่ห่อหุ้มได้น้อย จนไม่เพียงพอต่อการทำลายจุลินทรีย์ และ/หรือ ปลดปล่อยได้ช้าจนจุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้ทนต่อสารดังกล่าวได้ เช่น ซ่อมแซมผนังเซลล์ที่ถูกทำลายและฟื้นตัวได้ หรือเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากขึ้น

จนกระทั่งฤทธิ์ต้านไม่เพียงพอต่อการทำลายเซลล์ได้ทั้งหมด ส่วน *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ ดังนั้นการมีสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวอาจเป็นตัวเร่งให้แบคทีเรียนี้สร้างสปอร์มากขึ้นจึงสามารถทนต่อการเข้าทำลายของสารต้านจุลินทรีย์ได้ จึงอาจทำให้อิมัลชันน้ำมันอบเชยไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียนี้ ในขณะที่เดียวกันผนังชั้นนอกของสปอร์ของจุลินทรีย์มักมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ ดังนั้นจึงทำให้สารที่มีฤทธิ์ในการทำลายที่ถูกห่อหุ้มด้วยน้ำซึมผ่านเข้าไปทำลายเซลล์ได้ยาก งานวิจัยนี้ไม่พบว่าขนาดอนุภาคน้ำมันมีผลต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ซึ่งผลของขนาดอนุภาคน้ำมันต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียนั้นมีรายงานว่าอนุภาคน้ำมันหอมระเหยที่มีขนาดเล็กระดับนาโนนั้นให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงกว่าอนุภาคน้ำมันหอมระเหยที่มีขนาดใหญ่ เนื่องจากสามารถถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์ได้ดีกว่า (Donsi *et al.*, 2011) แต่ Terjung และคณะ (2012) พบว่าอิมัลชันที่มีอนุภาคน้ำมันหอมระเหยขนาดใหญ่ให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีกว่า และผลการวิเคราะห์พบว่าอิมัลชันที่มีอนุภาคน้ำมันหอมระเหยขนาดใหญ่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ละลายอยู่ในวัฏภาคน้ำโดยบรรจุอยู่ในไมเซลล์ของตัวทำอิมัลชันสูงกว่า

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก ที่ใช้ Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเล็กที่สุด ขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลาที่เก็บ และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียดีที่สุด ดังนั้น จึงนำอิมัลชันนี้มาทำการพัฒนาต่อเพื่อทำให้ความเสถียรเพิ่มขึ้นโดยศึกษาผลของการนำตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span มาใช้ร่วมกับ Tween 80 เพื่อให้มีการจัดเรียงตัวของตัวทำอิมัลชันทั้ง 2 ชนิด ส่งผลให้ความหนาแน่นของตัวทำอิมัลชันรอบอนุภาคน้ำมันเพิ่มขึ้น ความเสถียรของอิมัลชันจึงสูงขึ้น ตัวทำอิมัลชันกลุ่ม Span 3 ชนิด ที่ศึกษาคือ Span 20, Span 60 และ Span 80 โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันรวมคงที่คือร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก และทำการแปรความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันกลุ่ม Span 2 ระดับ คือร้อยละ 0.2 และ 0.6 โดยน้ำหนัก ทำให้ค่า HLB อยู่ในช่วง 7.0 – 13.4

ตารางที่ 4.5 ผลของชนิดตัวทำอิมัลชันและเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 สำหรับอิมัลชันน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

ชนิดตัวทำอิมัลชัน	ค่า MBC (mg/ml) ของอิมัลชัน สำหรับยับยั้งแบคทีเรียที่มีองค์ประกอบที่เก็บในเวลาที่แตกต่างกัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922				<i>S. aureus</i> ATCC 25923			
	1 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	1 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน
Tween 20	22.4	22.4	22.4	25.2	8.8	10.0	17.6	17.6
Tween 80	8.8	8.8	13.7	13.7	8.8	8.8	8.8	17.6

4.5 ผลของชนิดและปริมาณของตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 80 ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ความเสถียร และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันอบเชย

ตารางที่ 4.6 แสดงว่า Span 20 และ Span 80 และความเข้มข้นของ Span ทั้ง 2 นี้ให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยหลังการเตรียม 1 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยนี้อยู่ในช่วง 0.13 - 0.36 μm ซึ่งเป็นช่วงเดียวกับการใช้ Tween 80 เป็นตัวทำอิมัลชันชนิดเดียวที่ความเข้มข้นของ Tween 80 ร้อยละ 0.2-0.8 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.4) ขณะที่การใช้ Span 60 เป็นตัวทำอิมัลชันร่วมทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยใหญ่กว่าอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่ง Span 60 มีส่วนของไฮโดรคาร์บอนที่ยาวและไม่ละลายน้ำ เกิดลักษณะเจลขึ้น (Akhilesh *et al.*, 2012; Junyaprasert *et al.*, 2012) ความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนของ Span 60 เท่ากับ Span 80 แต่ที่สายไฮโดรคาร์บอนของ Span 80 มีพันธะคู่ทำให้การละลายน้ำได้ดีกว่า ไม่เกิดเป็นเจล นอกจากนี้ยังพบว่า Span 20 และ Span 80 ที่ทั้ง 2 ความเข้มข้น ไม่ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเปลี่ยนแปลงตลอดการเก็บนาน 21 วัน (รูปที่ 4.4) แต่ Span 60 ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาที่เก็บนานขึ้น จากการผลการศึกษาผลของเวลาที่เก็บต่อการแยกชั้นพบว่าอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ร่วมกับ Tween 80 ช่วยยืดเวลาการแยกชั้นของอิมัลชันให้ช้ากว่าการใช้ Tween 80 เพียงชนิดเดียว โดยพบว่าเมื่อใช้ Span 20 หรือ Span 80 ทำให้ไม่พบการแยกชั้นเมื่อเก็บนานกว่า 3 เดือน และเมื่อใช้ Span 60 ทำให้เกิดการแยกชั้นหลังการเก็บ 2 เดือน (ตารางที่ 4.6 และ รูปที่ 4.5) ขณะที่การใช้ Tween 80 เพียงชนิดเดียวพบว่าแยกชั้นหลังการเก็บ 24 วัน ความเสถียรของอิมัลชันขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาคน้ำมันแล้ว ยังพบว่าขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของชั้นฟิล์มของตัวทำอิมัลชันด้วย โดยตัวทำอิมัลชันที่ให้ชั้นฟิล์มหนากว่ามียุทธศาสตร์ทำให้อิมัลชันมีความเสถียรกว่าการใช้ตัวทำอิมัลชันผสมหรือร่วมกันระหว่างตัวทำอิมัลชันที่ชอบน้ำ (กลุ่ม Tween) และไม่ชอบน้ำ (กลุ่ม Span) และมีสายไฮโดรคาร์บอนของตัวทำอิมัลชัน Tween และ Span เท่ากัน การไม่มีพันธะคู่ ทำให้ตัวทำอิมัลชันมีการเรียงตัวแบบสลับระหว่าง Tween และ Span ที่ผิวประจันระหว่างน้ำมันกับน้ำได้แน่น ซึ่งเพิ่มความเสถียรของอิมัลชันการเรียงตัวของสายไฮโดรคาร์บอนที่เท่ากัน เช่น Tween 80 กับ Span 80 และมีพันธะคู่ ทำให้การเรียงตัวแบบหลวม ส่งผลให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเล็กกว่า (Dai *et al.*, 1996)

ตัวทำอิมัลชันชนิด Span ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ จากตารางที่ 4.7 แสดงค่า MBC ต่ำที่สุดของเชื้อ *S. aureus* คือ 8.8 mg/ml ซึ่งเท่ากับการใช้ตัวทำอิมัลชัน Tween 80 ชนิดเดียว แต่ค่า MBC ของเชื้อ *E. coli* มากกว่าการใช้ Tween 80 ชนิดเดียว Span 20 ร่วมกับความเข้มข้นร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก มีค่า MBC ของเชื้อ *S. aureus* ต่ำสุด เท่ากับ 8.8 mg/ml และมีค่า MBC ของ *E. coli* เท่ากับ 39.2 mg/ml ไม่ทำให้ค่า MBC เปลี่ยนแปลงตลอดการเก็บนาน 14 และ 21 วัน ตามลำดับ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ดีที่สุด (MIC เท่ากับ 8.8 mg/ml) และไม่เปลี่ยนแปลงตลอดการเก็บนาน 21 วัน Span 60 ที่มีอนุภาคขนาดใหญ่กลับมีฤทธิ์ในการต้าน *E. coli* ได้ดีกว่า อนุภาคน้ำมันเฉลี่ยขนาดเล็ก ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Terjung และคณะ (2012) พบว่าผลของอิมัลชันที่มีอนุภาคขนาดใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโต

และการทำงานของเซลล์แบคทีเรียได้ดีกว่าอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคที่เล็กเนื่องจากมีปริมาณสารต้านแบคทีเรียมากกว่าในอิมัลชันที่มีขนาดเล็ก

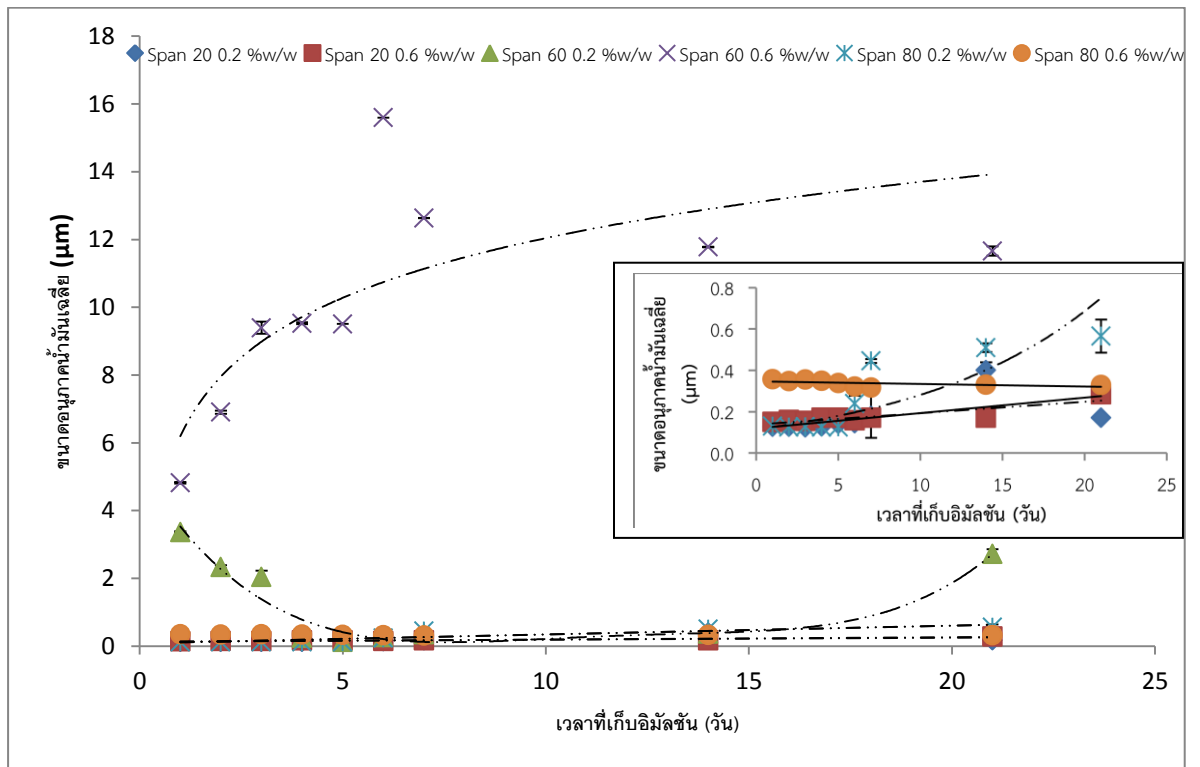
การใช้ตัวทำอิมัลชัน Span ร่วมมีความเสถียรและสามารถเก็บได้นานเกิน 2 - 3 เดือน โดยไม่แยกชั้นฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ซึ่งเท่ากับการใช้ตัวทำอิมัลชัน Tween 80 ชนิดเดียวแต่ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของ *E. coli* ต่ำกว่าการใช้ Tween 80 ชนิดเดียว

ตารางที่ 4.6 ผลของชนิดและความเข้มข้นตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 80 ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

ชนิดตัวทำอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)				HLB	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย*(μm) หลังการเตรียม 1 วัน	ระยะเวลาในการแยกชั้น (วัน)
Tween 80	Span20	Span60	Span80			
0.6	0.2	-	-	13.4	$0.128^a \pm 0.001$	<90
0.6	-	0.2	-	12.4	$3.371^b \pm 0.024$	60
0.6	-	-	0.2	12.3	$0.131^a \pm 0.005$	<90
0.2	0.6	-	-	10.2	$0.150^a \pm 0.006$	<90
0.2	-	0.6	-	7.3	$4.819^c \pm 0.414$	60
0.2	-	-	0.6	7.0	$0.357^a \pm 0.005$	<90

*ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอักษร a, b,.... ค่าในแถวเดียวกันตามแนวตั้งที่แตกต่างกันแสดงว่าขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$



รูปที่ 4.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 80 และ เวลาเก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก



รูปที่ 4.5 การแยกชั้นของอิมัลชันน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก ตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 80

ตารางที่ 4.7 ผลของชนิดและความเข้มข้นตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 80 และเวลาเก็บอิมัลชันต่อค่า MIC และ MBC ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 ที่ความเข้มข้นน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน รวมร้อยละ 0.8

ตัวทำอิมัลชัน		เวลาที่เก็บ (วัน)	MIC (mg/ml)		MBC (mg/ml)	
ชนิด	ความเข้มข้น		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Span 20	0.2	1	31.4	8.8	39.2	8.8
		7	39.2	8.8	39.2	8.8
		14	39.2	8.8	39.2	8.8
		21	39.2	8.8	39.2	13.7
	0.6	1	8.8	13.7	42.0	15.7
		7	13.7	15.7	42.0	15.7
		14	15.7	15.7	42.0	17.6
		21	17.6	15.7	42.0	17.6
Span 60	0.2	1	13.7	8.8	39.2	8.8
		7	13.7	8.8	39.2	8.8
		14	17.6	8.8	39.2	13.7
		21	17.6	13.7	42.0	13.7
	0.6	1	8.8	8.8	27.4	8.8
		7	15.7	8.8	19.2	13.7
		14	15.7	8.8	19.2	13.7
		21	19.6	13.7	27.4	19.6
Span 80	0.2	1	8.8	8.8	42.0	8.8
		7	15.7	8.8	42.0	15.7
		14	15.7	13.7	42.0	15.7
		21	15.7	13.7	42.0	15.7
	0.6	1	8.8	13.7	39.2	15.7
		7	13.7	13.7	39.2	15.7
		14	15.7	13.7	39.2	15.7
		21	15.7	13.7	39.2	15.7

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

อิมัลชันน้ำมันอบเชยมีความเสถียรและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่ดีกว่าอิมัลชันน้ำมันส้ม อิมัลชันน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก ตัวทำอิมัลชัน Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย 0.130 μm และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 ที่ดี โดยมีค่า MBC ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์เท่ากับ 8.8 mg/ml แต่ไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *B. cereus* ATCC 6228 เมื่อใช้ Span 20 ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก มีอายุการเก็บโดยไม่เกิดการแยกชั้นนานกว่า 3 เดือนฤทธิ์ต้าน *S. aureus* เท่ากับการใช้ตัวทำอิมัลชัน Tween 80 เพียงตัวเดียวแต่ฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *E. coli* น้อยกว่าอิมัลชันที่ไม่ใช้ตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span เป็นตัวทำอิมัลชันร่วม

5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาการเพิ่มความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ โดยเลือกใช้ตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม biopolymer หรือ สารที่เพิ่มความหนืดในชั้นน้ำ โดยศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของ biopolymer หรือสารเพิ่มความหนืด ต่อความเสถียรของอิมัลชันและฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และนอกจากนั้นศึกษาการลดขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยโดยใช้แรงปั่นด้วยเครื่อง high pressure homogenizer ต่อความเสถียรของอิมัลชันและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วย

รายการอ้างอิง

- ก่องกานดา ชนนามฤต. 2548. **ลักษณะประจำวงศ์พันธุ์ไม้**. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด.
- จรงค์ดี พุมนวนและ อัมร อินทร์สังข์. 2553. ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยในการควบคุมไรฝุ่น *Dermatophagoides pteronyssius*. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า**. 28(3):84-91
- ชญาณิชศรีชัยรัชวงศ์, ฤทธิวัฒน์ชัยยิ่งเจริญ, รัตนาเจษฎุทธนาและชัยวัฒน์อนันตสิทธิ์สกุล. 2549. การเตรียมตำรับเจลสมุนไพรสำหรับรักษาการติดเชื้อแคนดิดาในปาก. **Thai Pharmaceutical and Health Science Journal**. 1(3):204-208.
- เต็ม สมิตินันท์. 2544. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย**. ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ
แหล่งที่มา: http://eherb.hrdi.or.th/search_result_details.php?herbariumID=292&name=Cinnamon, 5 กุมภาพันธ์ 2557
- โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวเล่มที่ 26 เรื่องที่ 7 แหล่งที่มา: <http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=26&chap=7&page=t26-7-infodetail02.html>. 5 กุมภาพันธ์ 2557.
- นันทวัน บุญยประภัสร์ และ อรุณช โขชัยเจริญพร. 2543. **สมุนไพรพื้นบ้าน (4)**. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- นภาพร เชี่ยวชาญ. 2546. **การควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผักและผลไม้**. แหล่งที่มา: http://www.tistrfoodprocess.net/download/article/control_microorganism_th.htm, 8 ตุลาคม 2556.
- ปิลันธนาเลิศสถิตธนกร, กรองกาญจน์มนตรี, จารุวรรณบรรจง, เบญจวรรณสำรวลและศิริณาโคตรจันทร์. 2555. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำมันจากเปลือกอบเชยเทศ. **วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ**. 7(1):39-43.
- วริษฐา ศิลาอ่อน. 2552. เทคโนโลยีการผลิตและการประยุกต์ใช้ลิปิดอิมัลชันทางเภสัชกรรม. **Thai Pharmaceutical and Health Science Journal**. 4(3):397-408.
- สุดสายชล หอมทอง, นพวัฒน์ ภูคำ, วาทินีพิทักษ์พงศ, ฐิติพรรณ บางบำรุง และ ญัฐฐาพร เกตุรัตนมาล. 2554. การแพร่กระจายของ *Staphylococcus aureus* ในผลไม้พร้อมบริโภคบริเวณอำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**. 13(4):52-58.
- สุดาร์ตน์หอมหวาน 2553. **ฐานข้อมูลเครื่องยาสมุนไพรไทย** คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. แหล่งที่มา: <http://www.thaicrudedrug.com/>, 5 กุมภาพันธ์ 2557.

- สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- เสกสรรค์ สโมสรรสุข. 2554. โรคติดต่ออุบัติใหม่ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
แหล่งที่มา:http://allied.tu.ac.th/MedicalTechnology/Documents/Articles/Articles_mt_gen_SeksunS_2554_06_20.pdf, 29 มิถุนายน 2557.
- Andrew, R.E., Parks, L.W. and Spence, K.D. 1980. Some effects of Douglas Fir terpenes on certain microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. 40(2):301-304
- Bassole, I.H.N., Ouattara, A.S., Nebie, R., Ouattara, C.A.T., Karbore, Z.I. and Traore, S.A. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippichevalieri* and *Lippiamultiflora* from Burkina Faso. **International Journal of Phytochemistry**. 62:209-212.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food a review. **Journal of Food Microbiology**. 94:223-253.
- Chemicalbook. 2008. **Product** [online]. Available from: http://www.chemicalbook.com/Product-index_EN.aspx. [2012, December 23].
- Espina, L., Gelaw, T.K., Lamo-Castellvi, S., Pagan, R. and Gonzalo, D.G. 2013. Mechanism of Bacterial Inactivation by (+)-Limonene and its potential use in food preservation combined processes. **Plos one** [www.plosone.org]. 8(2):e56769
- Farag R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M. and El-Baroty, G.S.A. 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**. 52(9):665– 667.
- Ghosh, V., Saranya, S.S., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N. 2013. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 105:152– 157.
- Gupta, C., Garg, A.P., Uniyal, R.C. and Kumari, A. 2008. Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. **African Journal of Microbiology Research**. 2(9): 247-251.
- Henri, I., Bassolé, N. and Juliani H.R. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Journal Molecules**. 17, 3989-4006
- Hiemens, P.C. 1977. Principles of colloid and surface chemistry. Marcel Dekker, Inc. N.Y.

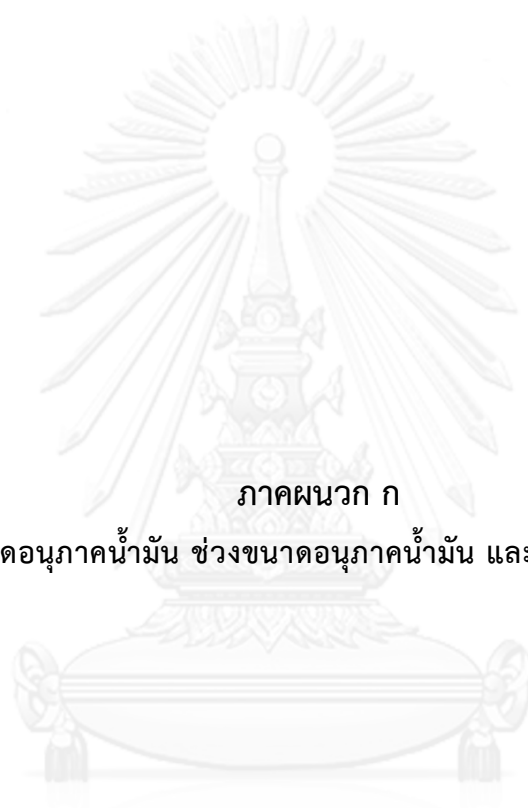
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 1974. Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. **WHO Food Additives Series No.5.**World Health Organization.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarn, H.M. and Vigenschow, H. 1986. Action of terpenoids on energy metabolism. **Progress in essential oil research.** Berlin, Germany. 429–445.
- Li P.H. and Chiang B.H. 2012. Process optimization and stability of D-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry.** 19:192–197.
- Maharjan, D., Singh, A., Lekhak, B., Basnyat, S. and Gautam, L.S. 2011. Study on antibacterial activity of common spices. **Nepal Journal of Science and Technology.** 12: 312-317.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V. and Parker, M. 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology.** 107: 180-185.
- Nirmala, M.J., Allanki, S., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N. 2013. Enhancing the solubility of fluconazole using a new essential oil based microemulsion system. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.** 5(3): 697-699.
- Porras, M., Solans, C., Gonzalez, C., Matinez, A., Guinart, A. and Gutierrez, J.M. 2004. Studies of formation of W/O nano-emulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects.** 249:115–118.
- Porter, M.R. 1991. **Handbook of Surfactants.** Blackie and Sons, Ltd., Glasgow, Scotland.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S. 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** 6:39.

- Qian, C., Decker, E.A., Xiao, H. and McClements, D.J. 2011. Comparison of biopolymer emulsifier performance in formation and stabilization of orange oil-in-water emulsions. Journal of the American Oil Chemists Society. 88:47–55
- Rao, J. and McClements, D.J. 2012. Impact of lemon oil composition on formation and stability of model food and beverage emulsions. **Journal of Food Chemistry**.134:749–757.
- Stashenko, E.E., Martfnez, R., Pinzdn M.H. and JesfsRamfrez. 1996. Changes in chemical composition of catalytically hydrogenated orange oil (*Citrus sinensis*). **Journal of Chromatography A**. 752:217-222
- Shah, P., Bhalodia, D. and Shelat, P. 2010. Nanoemulsion: A pharmaceutical review.Systematic Reviews in Pharmacy.1:24-32
- Shaw, D.J. 1970. Introduction to colloid and surface chemistry. Butterworths. London.
- Van der Graaf, S.V.D., Schroen, C.G.P.H. and Boom, R.M. 2005. Preparation of double emulsions by membrane emulsification—a review. Journal of Membrane Science. 251:7–15.
- Wendakoon, C.N. and Sakaguchi, M. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal Food Protection**. 58(3):280– 283.
- Williams, K.R. and Pierce, R.E. 1998. The analysis of orange oil and the aqueous solubility of d-limonene – two complementary gas chromatography experiments. **Journal of Chemical Education**. 75(2):223–226.
- Zhang, Z., Vriesekoop, F., Yuan, Q. and Liang H.2014. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. **Food Chemistry**. 150: 307–312



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

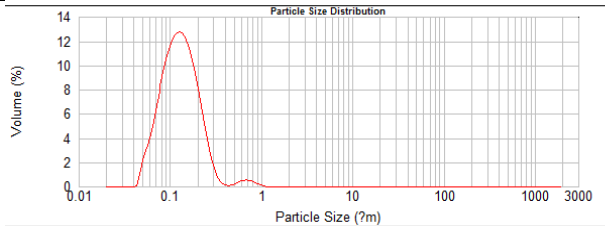
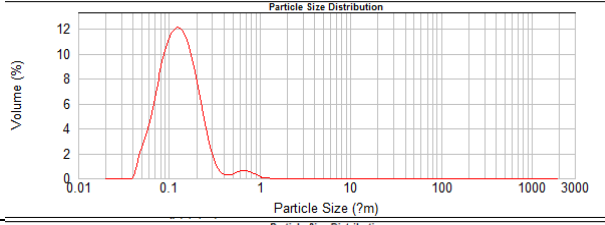
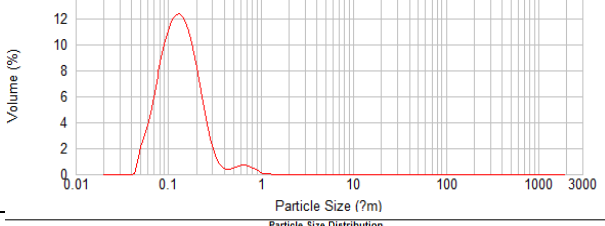
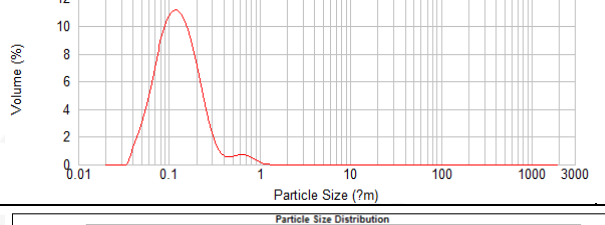
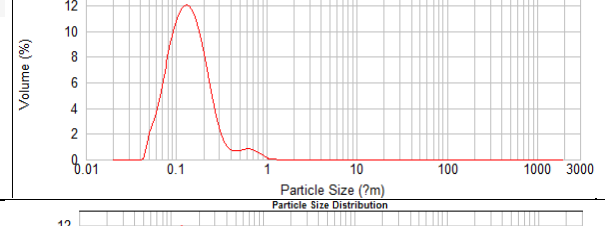
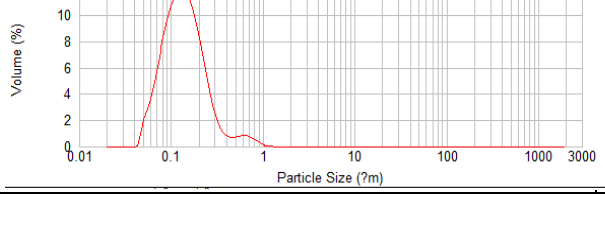


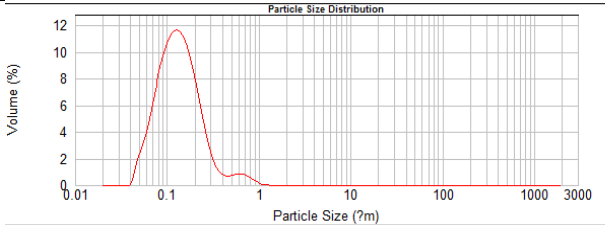
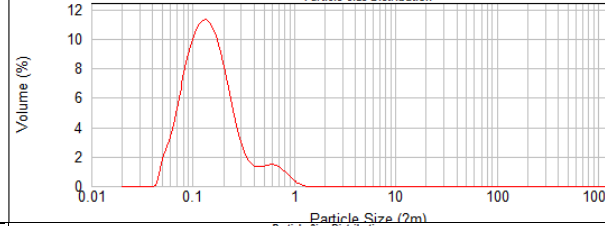
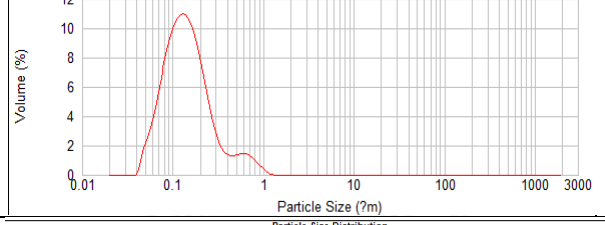
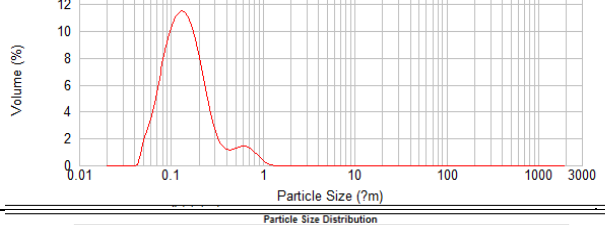
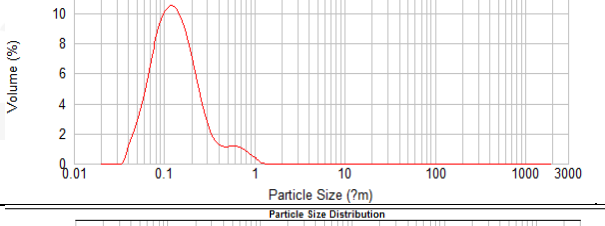
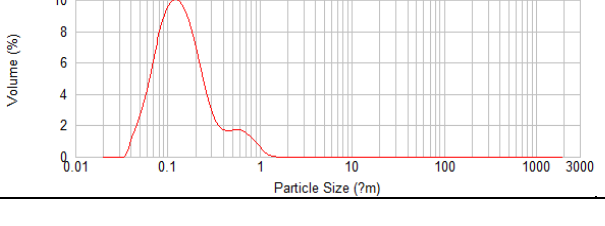
ภาคผนวก ก

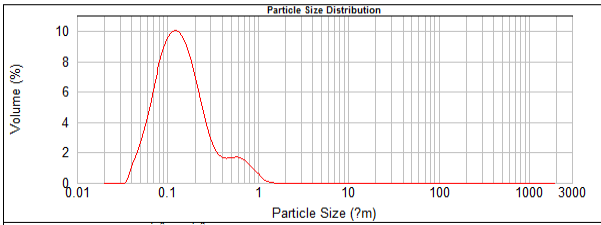
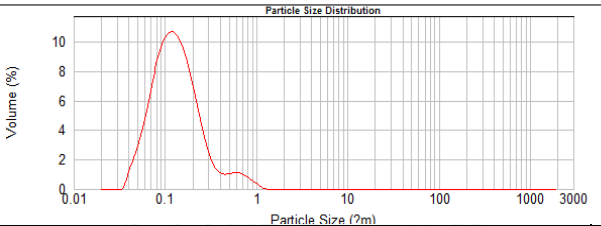
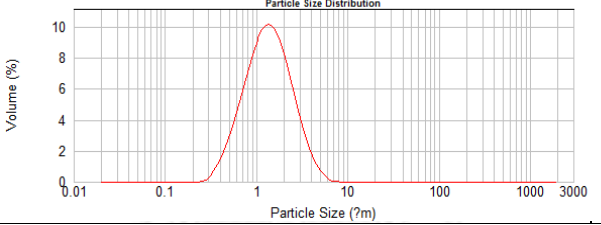
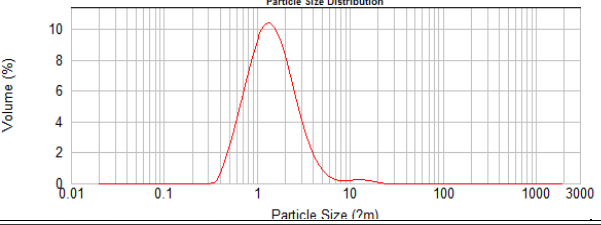
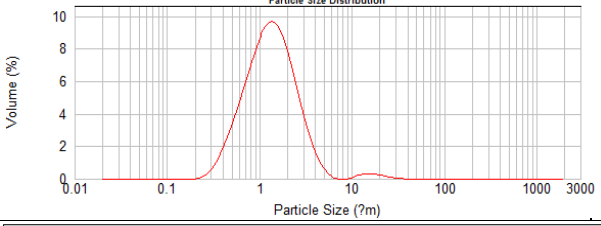
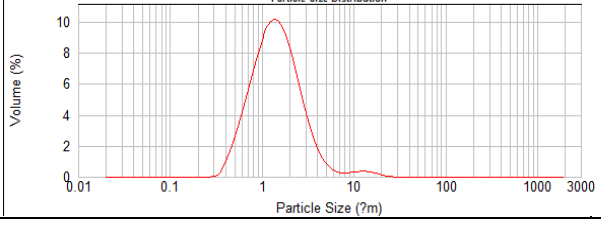
การกระจายขนาดอนุภาคน้ำมัน ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย

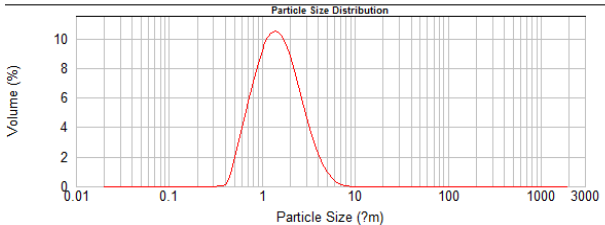
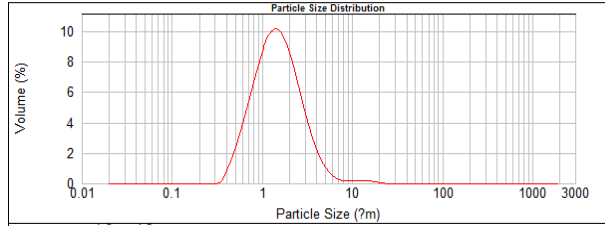
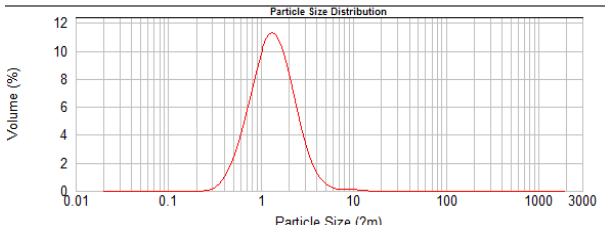
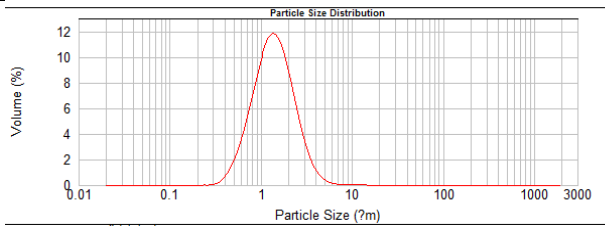
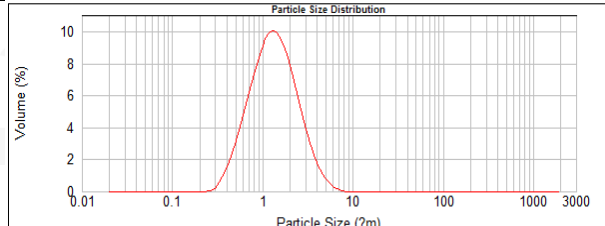
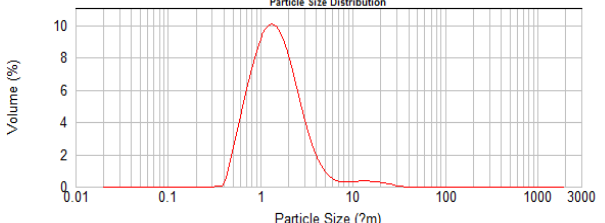
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

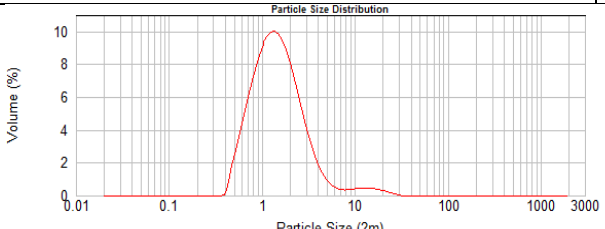
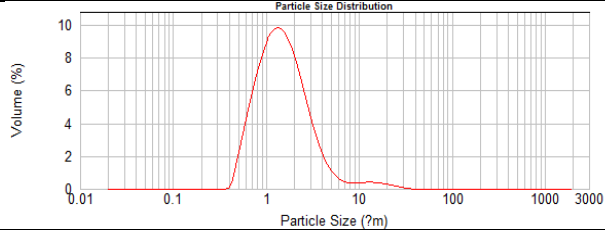
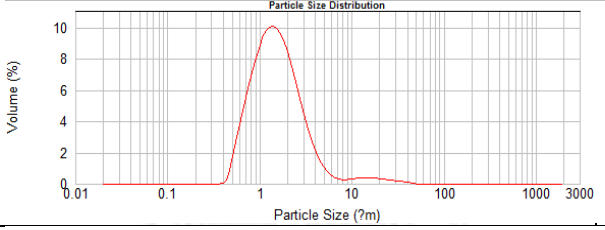
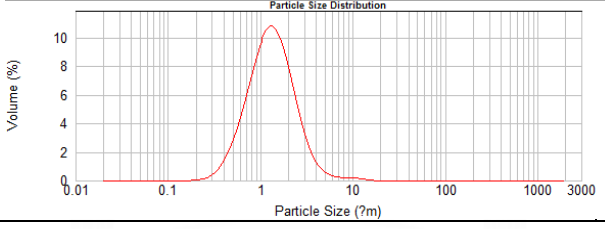
ตาราง 1 ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย การกระจายขนาดและช่วงขนาดของอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ความเข้มข้นตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

อิมัลชัน	เวลาที่เก็บ (วัน)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
		รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm)
น้ำมันอบเชย และ Tween 20	1		0.040 – 1.096	0.146±0.001
	2		0.040 – 1.259	0.149±0.004
	3		0.040 – 1.096	0.155±0.002
	4		0.035 – 1.259	0.151±0.002
	5		0.040 – 1.259	0.161±0.002
	6		0.040 – 1.259	0.162±0.002

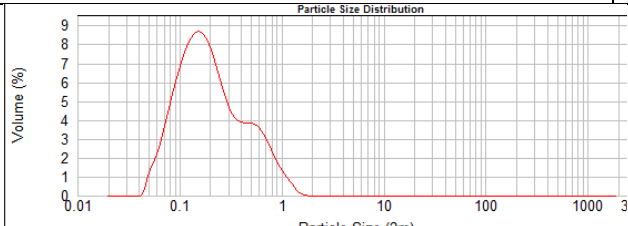
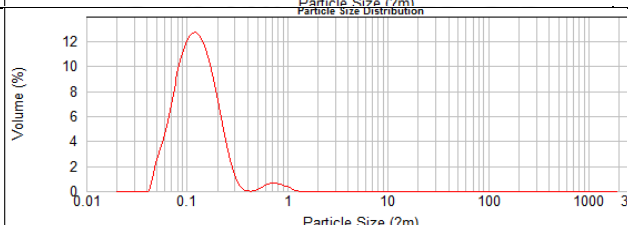
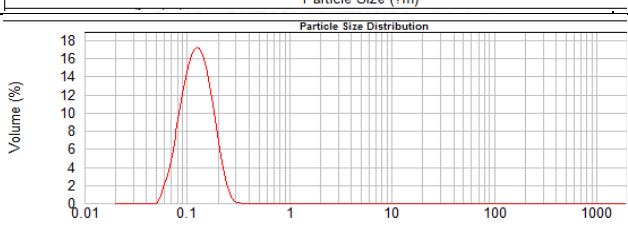
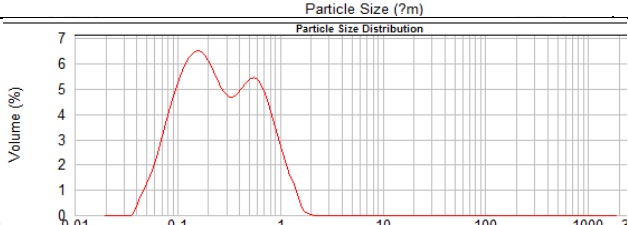
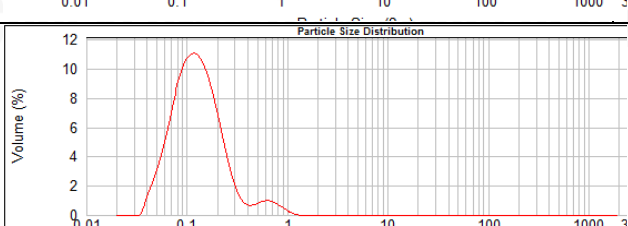
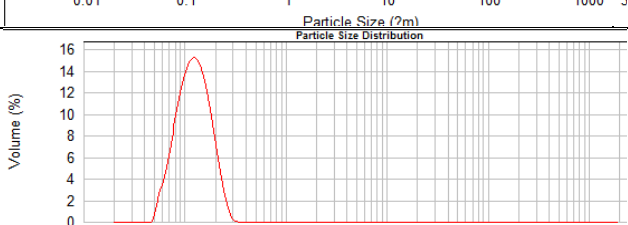
อิมัลชัน	เวลาที่เก็บ (วัน)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
		รูปกราฟ	ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm)
น้ำมัน อบเชย และ Tween 20	7		0.040 – 1.259	0.160±0.003
	1		0.040 – 1.259	0.184±0.001
	2		0.040 – 1.259	0.181±0.005
	3		0.040 – 1.259	0.180±0.002
	4		0.035 – 1.259	0.170±0.001
น้ำมัน อบเชย และ Tween80	5		0.035 – 1.445	0.190±0.002

อิมัลชัน	เวลาที่เก็บ (วัน)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
		รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm)
น้ำมัน อบเชย และ Tween80	6		0.035 – 1.445	0.188±0.001
	7		0.035 – 1.259	0.166±0.001
น้ำมันส้ม และ Tween20	1		0.240 – 7.589	1.575±0.002
	2		0.316 – 22.909	1.769±0.027
	3		0.209 – 6.607, 10.000 – 34.674	1.806±0.051
	4		0.316 – 26.303	1.854±0.028

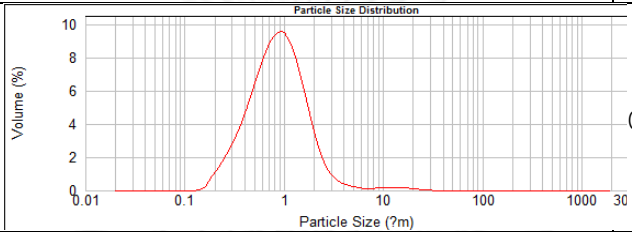
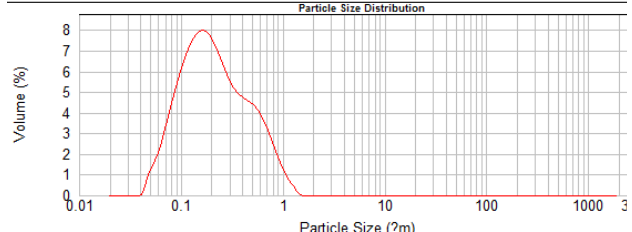
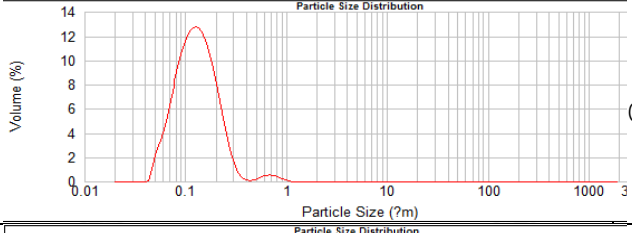
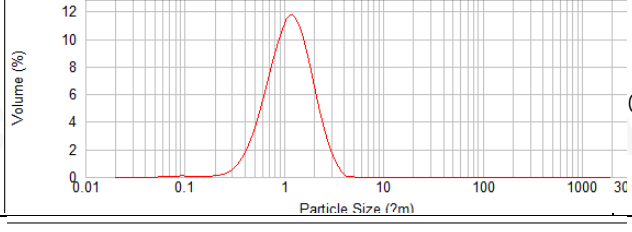
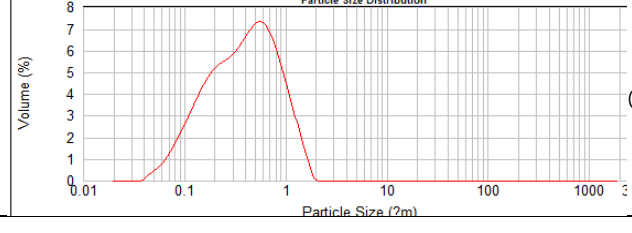
อิมัลชัน	เวลาที่เก็บ (วัน)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
		รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm)
น้ำมันส้ม และ Tween20	5		0.363 – 8.710	1.691±0.025
	6		0.316 – 22.909	1.798±0.023
	7		0.240 – 13.183	1.554±0.011
น้ำมันส้ม และ Tween80	1		0.275 – 13.183	1.561±0.029
	2		0.240 – 7.586	1.581±0.051
	3		0.363 – 34.674	1.987±0.046

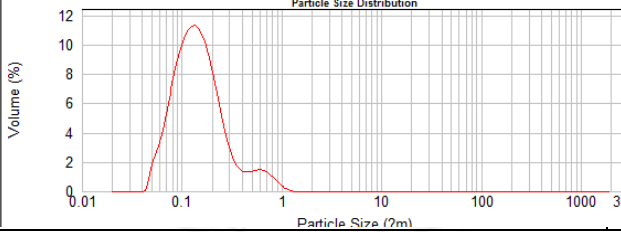
อิมัลชัน	เวลาที่เก็บ (วัน)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
		รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm)
น้ำมันส้ม และ Tween80	4		0.363 – 30.200	2.038±0.077
	5		0.417 – 34.674	2.078±0.068
	6		0.417 – 45.709	2.245±0.096
น้ำมันส้ม และ Tween80	7		0.209 – 15.136	1.573±0.014

ตารางที่ 2 การกระจายขนาดอนุภาคน้ำมัน ช่วงขนาด และ ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของผลความเข้มข้นของตัวทำ
อิมัลชันที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักหลังการเตรียม 1 วัน

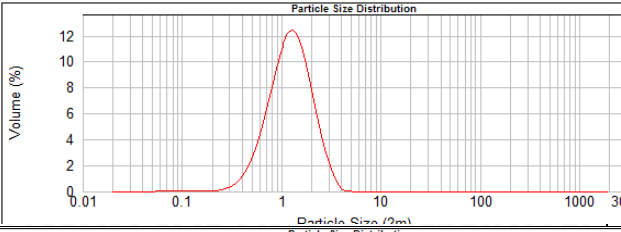
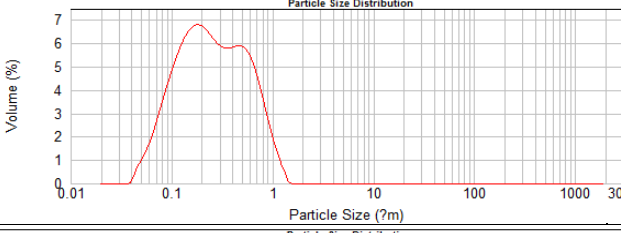
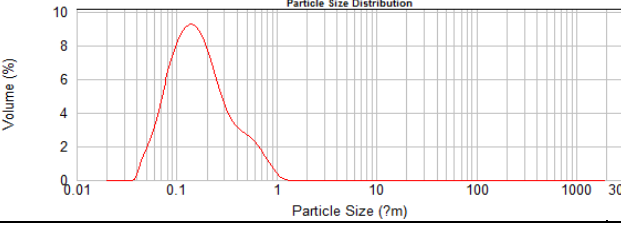
ชนิด / ความ เข้มข้นของตัวทำ อิมัลชัน (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
	รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาค น้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)
Tween20, 0.2		0.040 – 1.660	0.274±0.005
Tween20, 0.4		0.040 – 0.417, 0.479 - 1.259	0.176±0.052
Tween20, 0.8		0.052 – 0.275	0.131±0.001
Tween 80, 0.2		0.035 – 1.905	0.360±0.003
Tween 80, 0.4		0.035 – 1.259	0.157±0.001
Tween 80, 0.8		0.046 – 0.316	0.130±0.001

ตารางที่ 3 การกระจายขนาดอนุภาคน้ำมัน ช่วงขนาด และ ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของผลความเข้มข้นของตัวทำ
อิมัลชันที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 5 โดยน้ำหนักหลังการเตรียม 1 วัน

ชนิด / ความ เข้มข้นของตัวทำ อิมัลชัน (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
	รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm)
Tween20, 0.2		0.138 – 30.200	1.174±0.091
Tween20, 0.4		0.040 – 1.445	0.305±0.004
Tween20, 0.8		0.040 – 1.096	0.146±0.001
Tween 80, 0.2		0.052 – 5.012	1.273±0.020
Tween 80, 0.4		0.040 – 1.905	0.484 ±0.003

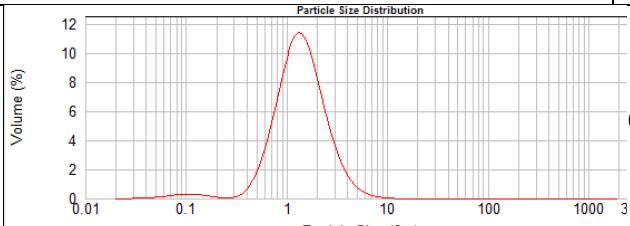
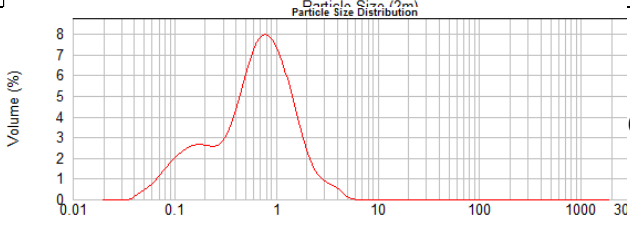
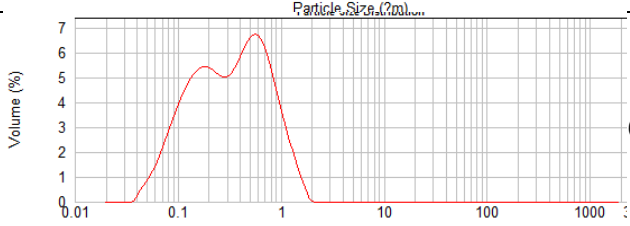
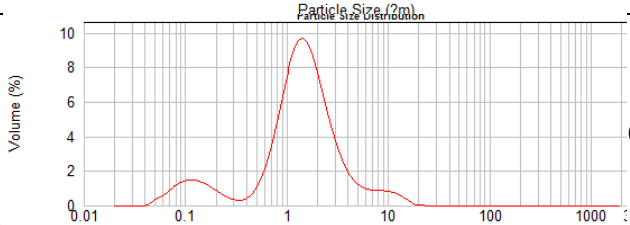
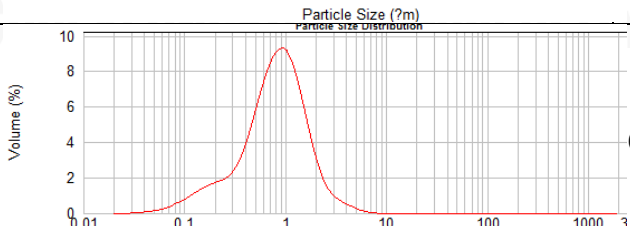
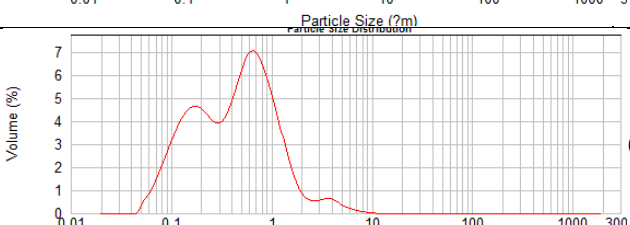
ชนิด / ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
	รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm)
Tween 80, 0.8		0.040 – 1.259	0.184±0.002

ตารางที่ 4 การกระจายขนาดอนุภาคน้ำมัน ช่วงขนาด และ ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของผลความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนักหลังการเตรียม 1 วัน

ชนิด / ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
	รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm)
Tween20, 0.2		0.060 – 5.012	1.361±0.014
Tween20, 0.4		0.040 – 1.445	0.333±0.002
Tween20, 0.8		0.040 – 1.259	0.213±0.007

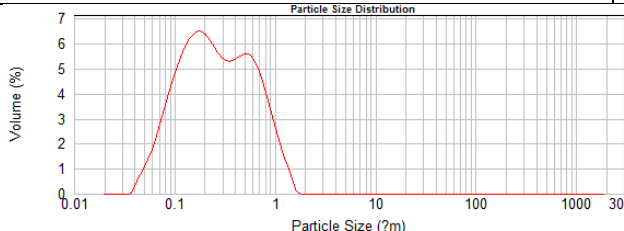
ชนิด / ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
	รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm)
Tween 80, 0.2		0.832 – 5.754	1.888±0.037
Tween 80, 0.4		0.030 – 8.710	0.794±0.028
Tween 80, 0.8		0.035 – 2.188	0.402±0.006

ตารางที่ 5 การกระจายขนาดอนุภาคน้ำมัน ช่วงขนาด และ ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของผลความเข้มข้นของตัวทำ
อิมัลชันที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 10 โดยน้ำหนักหลังการเตรียม 1 วัน

ชนิด / ความ เข้มข้นของตัวทำ อิมัลชัน (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
	รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาค น้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)
Tween20, 0.2		0.030 – 10.000	1.578 \pm 0.068
Tween20, 0.4		0.035 – 5.754	0.814 \pm 0.724
Tween20, 0.8		0.035 – 1.905	0.433 \pm 0.002
Tween 80, 0.2		0.040 – 22.909	1.963 \pm 0.573
Tween 80, 0.4		0.030 – 7.586	0.975 \pm 0.755
Tween 80, 0.8		0.046 – 10.000	0.657 \pm 0.349

ตารางที่ 6 การกระจายขนาดอนุภาคน้ำมัน ช่วงขนาด และ ขนาดอนุภาคเฉลี่ยที่ใช้ตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ร่วมกับ Tween 80 ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักหลังการเตรียม 1 วัน

ชนิด / ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน Span (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
	รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm)
Span 20, 0.2		0.052 – 0.316	0.128±0.001
Span 20, 0.6		0.035 – 1.259	0.150±0.006
Span 60, 0.2		0.052 – 0.550, 1.259 – 22.909	3.371±0.024
Span 60, 0.6		0.046 – 0.724, 1.259 – 39.811	4.819±0.414
Span 80, 0.2		0.046 – 0.363	0.131±0.005

ชนิด / ความ เข้มข้นของตัวทำ อิมัลชันSpan (ร้อยละโดย น้ำหนัก)	ขนาดและการกระจายของอนุภาคน้ำมัน		
	รูปภาพ	ช่วงขนาดอนุภาค น้ำมัน (μm)	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)
Span 80, 0.6	 <p>Particle Size Distribution</p> <p>Volume (%)</p> <p>Particle Size (μm)</p>	0.035 – 1.660	0.357 \pm 0.005



ภาคผนวก ข
การคำนวณสถิติ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ 2 ชนิด ได้แก่ น้ำมันอบเชยและน้ำมันส้ม และ ตัวทำอิมัลชัน 2 ชนิด ได้แก่ Tween 20 และ Tween 80 เมื่อทำการคำนวณทางสถิติโดยให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเป็นตัวแปรอิสระ พบว่า ปัจจัยทั้ง 2 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญร้อยละ 95 และคำนวณหาความแตกต่างของแต่ละปัจจัย โดยวางแผนแบบ ANOVA ศึกษาผลแต่ละปัจจัย

ตาราง 1 สถิติของผลของชนิดน้ำมันหอมระเหยและตัวทำอิมัลชันต่อการกระจายขนาดอนุภาคน้ำมันขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยหลังการเตรียม 1 วัน และเวลาในการแยกชั้นของอิมัลชัน ที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5.908 ^a	3	1.969	1969229.000	.000
Intercept	9.010	1	9.010	9009867.000	.000
oil	5.905	1	5.905	5905227.000	.000
tween	.000	1	.000	432.000	.000
oil * tween	.002	1	.002	2028.000	.000
Error	8.000E-006	8	1.000E-006		
Total	14.918	12			
Corrected Total	5.908	11			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

ตารางที่ 2 การคำนวณ Duncan ของขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก

Duncan ^{a,b}	N	Subset			
		1	2	3	4
น้ำมันอบเชย Tween 20	3	.14600			
น้ำมันอบเชย Tween 80	3		.18400		
น้ำมันส้ม Tween 80	3			1.56100	
น้ำมันส้ม Tween 20	3				1.57500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = .05.

ผลของขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยต่อเวลาในการตีปั่นอิมัลชันที่ความเร็ว 22000 รอบต่อนาที ของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ ที่ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นของ Tween 20 ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก โดยคำนวณ ANOVA ผลไม่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นร้อยละ 95

ตารางที่ 3 การคำนวณ ANOVA ของขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยต่อเวลาในการตีปั่นอิมัลชัน

size	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	9.000	.006
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.000	11			

ตารางที่ 4 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันอบเชย ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ชนิดของตัวทำอิมัลชัน 2 ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน 3 ระดับ ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยหลังการเตรียม 1 วัน วางแผนแบบ factorial design

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	23.173 ^a	23	1.008	18067.641	.000
Intercept	32.291	1	32.291	579072.360	.000
oil	7.245	3	2.415	43309.975	.000
concentration tween	12.039	2	6.020	107949.449	.000
tween	.660	1	.660	11844.288	.000
oil * concentration tween	2.718	6	.453	8125.003	.000
oil * tween	.332	3	.111	1984.834	.000
ctween * tween	.100	2	.050	898.267	.000
oil * concentration tween * tween	.077	6	.013	230.264	.000
Error	.003	48	5.576E-005		
Total	55.467	72			
Corrected Total	23.176	71			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = 1.000)

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของน้ำมันอบเชย 4 ระดับ ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ที่แตกต่างกัน โดยใช้ Duncan

oil	N	Subset			
		1	2	3	4
2.5	18	.20022			
5	18		.59039		
7.5	18			.83172	
10	18				1.05644
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.000.

b. Alpha = .05.

ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน 3 ระดับ ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ที่แตกต่างกัน โดยใช้ Duncan

concentration tween	N	Subset		
		1	2	3
0.8	24	.27721		
0.4	24		.49812	
0.2	24			1.23375
Sig.		1.000	1.000	1.000

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24.000.

b. Alpha = .05.

รายการอ้างอิง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ฐิติภา บุญยืน เกิดเมื่อ วันที่ 24 มิถุนายน 2529 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2551 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2553

เสนอผลงานภาคโปสเตอร์ชื่อเรื่องเสถียรภาพและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันอบเชยในน้ำ ในงานการประชุมวิชาการแห่งชาติ ครั้งที่ 10 ระหว่างวันที่ 6 - 7 ธันวาคม 2556 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY