การพัฒนาอิมัลชันที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษจากสารสกัดหมาก *Areca catechu* Linn. และน้ำมันหอมระเหยจากพืช

นางสาวอัจจิมา ก๋าพรม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF ANTIFOOD POISONING BACTERIA EMULSION FROM BETEL NUT *Areca catechu* Linn. EXTRACTS AND PLANT ESSENTIAL OIL

Miss Ajima Kaprom

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาอิมัลชันที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษจากสารสกัดหมาก *Areca catechu* Linn. และน้ำมันหอมระเหยจากพืช
โดย	นางสาวอัจจิมา กำพรม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พาสวดี ประทีปะเสน
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พาสวดี ประทีปะเสน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัจจิมา กำพรม : การพัฒนาอิมัลชันที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษจากสารสกัดหมาก *Areca catechu* Linn. และน้ำมันหอมระเหยจากพืช. (DEVELOPMENT OF ANTIFOOD POISONING BACTERIA EMULSION FROM BETEL NUT *Areca catechu* Linn. EXTRACTS AND PLANT ESSENTIAL OIL) **อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร. สุเมธ ตันตระเธียร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. พาสวดี ประทีปะเสน และ ผศ.สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป 70 หน้า.**

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC1729 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Escherichia coli* ATCC 25922 และ*Salmonella* Typhimurium ATCC 13811 จากสารสกัดหมาก โดยศึกษาผลของหมากที่มีทรงผลต่างกันคือกลมและรี และที่มีอายุต่างกันคืออ่อนและแก่ และผลของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดได้แก่ น้ำ 95% เอทานอล อะซิโตนและเอธิลอะซิเตต ต่อ % yield และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดที่ได้ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดที่ได้จากหมากแก่พันธุ์ผลรีแบบที่สกัดด้วยน้ำ และสารสกัดที่ได้จากหมากแก่พันธุ์ผลกลมที่สกัดด้วย 95% เอทานอล เป็นสารสกัดที่ละลายน้ำได้ดี มี % yield สูง (เท่ากับ 15.01±4.59 และ 27.11±9.18 ตามลำดับ) และมีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ในการยับยั้ง *B. cereus S. aureus* และ *E. coli* เท่ากับ 7.81 x 10^{-1} mg/ml และ *S.* Typhimurium เท่ากับ 1.56 mg/ml ในขณะที่สารสกัดที่ได้จากการสกัดหมากด้วยอะซิโตนมีค่า MIC สำหรับแบคทีเรียที่ศึกษาทุกตัวเท่ากับ 7.81 x 10^{-1} mg/ml แต่ละลายน้ำได้น้อยกว่าสารสกัดหมากที่สกัดด้วยน้ำและ 95% เอทานอล และไม่ละลายในน้ำมันถั่วเหลือง จึงนำสารสกัดที่ได้จากหมากแก่พันธ์ผลรีที่สกัดด้วยน้ำผสมกับสารสกัดที่ได้จากหมากแก่พันธุ์ผลกลมที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ โดยทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกน้ำมันหอมระเหย (จากโหระพา สะระแหน่ มะนาวและส้ม) มาผสมกับสารสกัดหมากดังกล่าวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าน้ำมันสะระแหน่ให้วงใสที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางสูงสุดเท่ากับ 10.00±0.00 17.00±2.65 15.33±4.16 และ 17.33±3.06 มิลลิเมตร สำหรับ *B. cereus S. aureus E. coli* และ *S.* Typhimurium ตามลำดับ และค่า MIC ของอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ในสารละลายน้ำของ 1% Tween 20 เท่ากับ 56 56 56 และ 225 mg/ml สำหรับ *B. cereus E. coli S.* Typhimurium และ *S. aureus* ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดที่ได้จากหมากแก่ทรงรีที่สกัดด้วยน้ำร้อยละ 0.15 โดยน้ำหนัก ผสมกับสารสกัดที่ได้จากหมากแก่ทรงกลมที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ร้อยละ 0.15 โดยน้ำหนัก และน้ำมันสะระแหน่ร้อยละ 5.60 โดยน้ำหนัก และใช้ Tween 20 ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวทำอิมัลชัน ไปผ่านคลื่นเหนือเสียงที่ 300 watt และ 20 kHz นาน 30 นาที พบว่าผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 มากกว่าร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ได้ของเหลวใสและมีความเสถียรจากการแยกชั้นสูง ส่วนผลิตภัณฑ์ที่มี Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก มีการแยกชั้นหลังการเตรียม 1 วัน แต่เมื่อนำไปผ่านคลื่นเหนือเสียงซ้ำอีก 15 นาที หลังการเตรียม 7 วัน ก็ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสและมีความเสถียรจากการแยกชั้นสูง โดยขนาดอนุภาคเฉลี่ยของวัฏภาคกระจายสำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีและไม่มีสารสกัดหมากเท่ากับ 0.068±0.007 และ 0.136±0.074 μm ตามลำดับ และขนาดอนุภาคของวัฏภาคกระจายอยู่ในช่วง 6.503x10^{-3} ถึง 5.56 x10^{-1} และ 7.531x10^{-3} ถึง 1.990 μm ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ให้ค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) เท่ากับ 60 30 และ 30 μl/ml สำหรับ *B. cereus E. coli* และ *S.* Typhimurium ตามลำดับ และปริมาณที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* เท่ากับ 500 μl/ml

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต อัจจิมา กำพรม

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

4872544823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : BETEL NUT EXTRACTION / PEPPER MINT OIL / ANTIBACTERIAL / MICELLAR EMULSION

AJIMA KAPROM : DEVELOPMENT OF ANTIFOOD POISONING BACTERIA EMULSION FROM BETEL NUT *Areca catechu* Linn. EXTRACTS AND PLANT ESSENTIAL OIL.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph.D.,

THESIS COADVISIR : ASST. PROF. PASAWADEE PRADIPASENA, Sc.D. and ASST. PROF. SUTTISAK SUKNAISILP, 70 pp.

The aim of this research was to develop an antibacterial product from betel nut extracts. The bacteria of interest was food poisoning bacteria including *Bacillus* cereus ATCC 1729, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella* Typhimurium ATCC 13811. The effects shape and age of betel nut as well as solvent used for extraction (water, 95% ethanol, acetone and ethyl acetate) on % yield and antibacterial activity were determined. The water extract of ripe oblong-shape nut and 95% ethanol extract of ripe round-shape nut had % yield of 15.01±4.59 and 27.11±9.18, respectively. Their Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was 7.81×10^{-1} mg/ml for *B. cereus*, *S. aureus*, and *E. coli* and 1.56 mg/ml for *S.* Typhimurium. All acetone extracts had MIC of 7.81×10^{-1} mg/ml for all bacteria used in this study. However, its water solubility was low and it did not dissolve in soybean oil. Therefore, the mixture of water extract of ripe oblong-shape nut and 95% ethanol extract of ripe round-shape nut was selected to be active ingredient in the product. To enhance the antibacterial activity of the product, essential oils from basil, peppermint, lemon and orange were tested for their antibacterial activity, and then selected to be used as an active ingredient in the product. Peppermint oil was selected as it gave the largest clear zone of diameter of 10.00±0.00, 17.00±2.65, 15.33±4.16 and 17.33±3.06 mm. for *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* and *S.* Typhimurium, respectively. The MICs of peppermint oil in water emulsion having Tween 20 (1 %wt) as emulsifier were 56, 56, 56 and 225 mg/ml for *B. cereus E. coli S.* Typhimurium and *S. aureus*, respectively. Products were prepared by mixing 5.60 %wt peppermint oil into water or aqueous solution of the betel nut extract mixture (0.15 %wt of water extract of ripe oval-shape nut and 0.15 %wt of 95% ethanol extract of young round-shape nut) using Tween 20 (15-30 %wt) as emulsifier. The mixtures were ultrasonicated at 300 watt and 20 kHz for 30 min. Samples containing > 20 %wt Tween 20 were clear solution and stable against phase separation. After 1 day, phase separation was observed for samples containing 20 %wt Tween 20. However, upon remixing with ultrasonication for 15 min after 7 day storage, they became clear solution and stable against phase separation. The average diameter of oil particles in these products was 0.068±0.007 and 0.136±0.074 μm in the presence and in the absence of the betel nut extract mixture, respectively. The range of oil particle size was 6.503×10^{-3}-5.56×10^{-1} and 7.531×10^{-3}-1.990 μm, respectively. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of these products was 60, 30 and 30 μl/ml for *B. cereus*, *E. coli* and *S.* Typhimurium, respectively. At 500 μl/ml, they could inhibit growth of *S. aureus*.

Field of Study : Biotechnology

Academic Year : 2008

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิตเกิดปัญหาและอุปสรรค์มากมายในการทำวิจัยซึ่งก็ได้คำปรึกษา คำแนะนำความทุ่มเทเอาใจใส่รวมทั้งงบประมาณในการทำวิจัยครั้งนี้จากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พาสวดี ประทีปะเสน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ จึงทำให้การวิจัยครั้งนี้ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ต้องขอกราบขอบพระคุณสำหรับทุกสิ่งทุกอย่าง

ขอกราบขอบพระคุณ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ช่วยชี้แนะแนวทางการปรับปรุงจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ โครงการวิจัยการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสมุนไพรและ/หรือเครื่องเทศเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจาก สกว. ที่สนับสนุนทุนในส่วนของการวิเคราะห์น้ำมันสะระแหน่

ขอขอบพระคุณ รองศาตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษในการทำวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์และพี่ ๆ ห้องปฏิบัติการอนุภาคภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ Food Microbiology Food Chemistry และ Food Process ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ อำนวยความสะดวกตลอดการใช้งานและให้กำลังใจตลอดการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพและเจ้าหน้าที่ศูนย์คอมพิวเตอร์ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาและมอบโอกาสที่ดีในการขอทุนและทำงานพิเศษต่างๆ เพื่อแบ่งเบาภาระทางการเงินในการศึกษาจนจบหลักสูตร

ขอขอบคุณนางสาวอังคณา เข็มทอง ที่คอยช่วยเป็นธุระจัดการหาวัตถุดิบในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ที่ได้ทำงานวิจัยและทำงานพิเศษร่วมกันมา ที่ให้คำปรึกษาและให้กำลังใจมาโดยตลอด ตลอดจนทุกท่านที่ได้มีส่วนช่วยเหลือแต่มิได้กล่าวนาม ขอได้รับความขอบคุณจากผู้วิจัยไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

สุดท้ายนี้ต้องขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว ญาติทุกคนรวมไปถึงเพื่อนสนิททุกคนที่ช่วยสนับสนุนและช่วยเหลือทุกเรื่องตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย……	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง……	ฌ
สารบัญภาพ……...	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	2
2.1 หมาก.....	2
2.2 น้ำมันหอมระเหย……	6
2.3 อิมัลชัน……...	7
2.4 กลไกการออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย……	10
2.5 แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ……..	11
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย……	13
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง……	24
4.1 การสกัดสารจากหมาก……..	24
4.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหมาก……	25
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการละลายของสารสกัดหมากที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำในน้ำมันถั่วเหลืองและในน้ำ……	27
4.4 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสาสกัดหมากแบบผสม……..	27
4.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืชและตัวทำละลาย……	28
4.6 การผลิตอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำที่ประกอบด้วยสารสกัดจากหมาก……...	31
4.7 ความเข้มข้นของสารละลายตัวทำอิมัลชัน Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ในน้ำในระบบที่มีและไม่มีสารสกัดหมาก….	34

หน้า

4.8 ความเข้มข้นของสารละลายตัวทำอิมัลชัน Tween 20 ต่อฤทธิ์
ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหมากที่ละลายในตัวทำอิมัลชัน
และอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ในน้ำซึ่งเป็นระบบที่มีและ
ไม่มีสารสกัดหมาก..... 44
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 54
ข้อเสนอแนะ..... 56
รายการอ้างอิง..... 57
ภาคผนวก..... 66
ภาคผนวก ก..... 67
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 70

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แหล่งปลูกหมากที่สำคัญ 10 จังหวัดแรกในประเทศไทย……..	4
3.1	รหัสการเจือจางสารที่เป็นของแข็งด้วยน้ำหรือ 1% DMSO ความเข้มข้น 0.01-200 mg/ml……	16
3.2	รหัสการเจือจางสารที่เป็นของเหลวด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 15-1000 µl/ml (14-900 mg/ml)……..	16
3.3	ส่วนประกอบของสารละลายน้ำของ Tween 20 และ/หรือสารสกัดหมาก วัฏภาคน้ำและอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ในน้ำที่ความเข้มข้นของน้ำมันสะระแหน่ร้อยละ 5.60 โดยน้ำหนัก……..	22
4.1	พันธุ์ อายุ และตัวทำละลายที่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหมากที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ……...	24
4.2	พันธุ์หมาก อายุ และตัวทำละลายที่มีผลต่อค่า MIC ของสารสกัดหมาก (หน่วยมิลลิกรัม:มิลลิลิตร)……	26
4.3	ผลของสารสกัดหมากต่อค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรีย (หน่วยมิลลิกรัม:มิลลิลิตร)……	28
4.4	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืช (5 µl) ที่นำมาทดสอบ……..	29
4.5	ค่า MIC ของน้ำมันสะระแหน่ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (หน่วยมิลลิกรัม : มิลลิลิตร)……..	30
4.6	ค่า MIC ของน้ำมันสะระแหน่ที่ละลายในชนิดและความเข้มข้นของ Tween ต่างกันต่อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (หน่วยมิลลิกรัม:มิลลิลิตร)……..	31
4.7	ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อลักษณะของอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากในน้ำ โดยใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที ……	33
4.8	ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากในน้ำ โดยใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที……	35
4.9	ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดจากเมล็ดหมากในน้ำ โดยใช้คลื่นเหนือเสียงซ้ำนาน 15 นาที …..	37

ตารางที่		หน้า
4.10	ผลความเข้มข้นของ Tween 20 และอายุการเก็บต่อขนาดและการกระจายขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง) ของอนุภาคน้ำมันสะระแหน่ในน้ำ ทำการวัดหลังการเตรียมอิมัลชัน 1 วัน 7 วัน และ 14 วัน โดยใช้คลื่นเหนือเสียงเป็นเวลา 30 นาที	41
4.11	ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อปละอายุการเก็บขนาดและการกระจายขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง) ของอนุภาคน้ำมันสะระแหน่ในน้ำ ทำการวัดหลังการเตรียมอิมัลชัน 1 วัน และ 7 วัน โดยใช้คลื่นเหนือเสียงซ้ำเป็นเวลา 15 นาที..	42
4.12	ผลความเข้มข้นของ Tween 20 และอายุการเก็บต่อขนาดและการกระจายขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง) และค่าเฉลี่ย zeta potential ของอนุภาคน้ำมันสะระแหน่ในน้ำ.ทำการวัดหลังการเตรียมอิมัลชัน 56 วัน โดยใช้คลื่นเหนือซ้ำเป็นเวลา 45 นาที ด้วย เครื่อง (Zetasizer ZS, Malvern)....	43
4.13	ผลของความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 ในสารสกัดหมากและผลิตภัณฑ์สารละลายไมเซลล์น้ำมันสะระแหน่ที่ผสมและไม่ผสมสารสกัดหมากต่อค่า MIC ของแบคทีเรียทดสอบที่อายุการเก็บต่าง ๆ.....	46
4.14	ประสิทธิภาพการยับยั้ง *B. cereus* ของผลิตภัณฑ์สารละลายสารสกัดหมาก สารละลายน้ำมันสะระแหน่อิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากร่วมกับ Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 25.....	50
4.15	ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S. aureus* ของผลิตภัณฑ์สารละลายสารสกัดหมาก สารละลายน้ำมันสะระแหน่ อิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากร่วมกับ Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 25.....	51
4.16	ประสิทธิภาพการยับยั้ง *E. coli* ของผลิตภัณฑ์สารละลายสารสกัดหมาก สารละลายน้ำมันสะระแหน่ อิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากร่วมกับ Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 25.....	52

ตารางที่ หน้า

4.17 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S.* Typhimurium ของผลิตภัณฑ์ สารละลายสารสกัดหมาก สารละลายน้ำมันสะระแหน่ อิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ และสารสกัดหมากร่วมกับ Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 25..... 53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะผลหมาก……..	3
2.2	ฤดูกาลที่ให้ผลผลิตหมากปี และหมากทวาย……	3
2.3	ขนาดของอนุภาคกระจายต่อการจำแนกอิมัลชัน……	9
3.1	รูปแบบการวาง paper disc ปลอดเชื้อที่หยดสารตัวอย่างตามรหัส การเจือจางสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 5 ไมโครลิตรต่อดิสก์……..	17
3.2	รูปแบบการวางยาปฏิชีวนะ (positive control) ……....	17
4.1	ปริมาณ yield ของสารสกัดหมากที่มี พันธุ์ อายุ และตัวทำละลายที่ใช้สกัดต่างกัน……	25
4.2	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับความเข้มข้นของ Tween 20 (ร้อยละโดยน้ำหนัก).....	32
4.3	ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์เมื่อผสมน้ำมันสะระแหน่ในน้ำโดยใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที……....	33
4.4	ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์เมื่อผสมน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากในน้ำโดยใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที….	34
4.5	ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์หลังเก็บไว้นาน 1 วันโดยใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที.....	36
4.6	ผลของ Tween 20 ร้อยละ 15 และ 20 โดยน้ำหนัก ต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บไว้นาน 7 วัน และผสมซ้ำด้วยคลื่นเหนือเสียงนาน 15 นาที……..	38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

หมาก Betel nut (*Areca catechu* Linn.) อยู่ในวงศ์ Arecaceae (Palame) เดิมคนไทยขบเคี้ยวประจำเป็นผลทำให้เหงือกและฟันคงทน นอกจากนั้นภูมิปัญญาท้องถิ่นยังใช้หมากเพื่อรักษาอาการท้องร่วงอีกด้วย บ่งว่าหมากมีสารต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ปัจจุบันถึงแม้ว่าการขบเคี้ยวหมากไม่เป็นที่นิยม หมากยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอื่น เช่น ฟอกหนัง ทำสีย้อมแหอวน เป็นต้น จึงยังมีการปลูกและส่งออกหมากแห้งไปยังต่างประเทศเป็นมูลค่าหลายร้อยล้านบาท แต่ยังไม่มีการศึกษาการนำสารสกัดจากหมากมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เพื่อลดจำนวนแบคทีเรียดังกล่าวบนพื้นผิวสัมผัสอาหาร ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักและต้องการกลิ่นที่ผู้บริโภคคุ้นเคย โดยผลิตภัณฑ์สารจากธรรมชาติกำลังเป็นที่นิยมของผู้บริโภคในปัจจุบัน งานวิจัยนี้จึงศึกษาการนำน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่ใช้เป็นอาหาร มาใช้ร่วมกับสารสกัดหมาก ดังนั้น เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันและสามารถกระจายตัวในน้ำได้ดีเมื่อนำไปใช้ จึงจำเป็นต้องทำให้อยู่ในรูปของอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำที่มีความเสถียร โดยใช้ตัวทำอิมัลชันที่ปัจจุบันได้รับการยอมรับให้ใช้ในอาหารได้

งานวิจัยนี้นำไปสู่การใช้ประโยชน์จากหมากให้หลากหลายมากขึ้นและยังอาจช่วยเพิ่มมูลค่าของหมากให้สูงกว่าการส่งออกในรูปวัตถุดิบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วรสารปริทัศน์

2.1 หมาก

หมากเป็นไม้ยืนต้นตระกูลปาล์ม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Areca catechu* Linn. ชื่อวงศ์ Arecaceae (Palame) มีชื่อสามัญหลายชื่อดังนี้คือ betel nut areca nut areca nut palm areca plam betel plam betelnut plam เป็นต้นนอกจากนี้ยังมีชื่อที่เรียกในท้องถิ่นต่าง ๆ อีกเช่น หมาก เมีย (ทั่วไป) เค็ด พลา สะลา (เขมร) เซียน (ชาวบน-นครราชสีมา) แซ (กระเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) ปีแน (มลายู-ภาคใต้) มะ (ชอง-ตราด) สีซะ (กระเหรี่ยง-ภาคเหนือ) เป็นต้น (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ, 2527) เนื่องจากมีการปลูกหมากกันมากทางตอนใต้ของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแพร่กระจายไปสู่ชมพูทวีป ประกอบกับมีการค้นพบหนังสือที่เขียนถึงต้นหมากป่าในปี ค.ศ. 1593 โดยใช้คำว่า “Pinlang” ซึ่งตรงกับคำที่คนในแหลมมาลายูและสุมาตราเรียกต้นหมาก ดังนั้นจึง สันนิษฐานกันว่าหมากน่าจะมีถิ่นกำเนิดในแถบตอนกลางทางใต้ของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (คะนอง คลอดเพ็ง, 2530; พิสมัย พึ่งวิกรัย และ พิมพ์ใจ พัฒนศิริพงศ์, 2543) ปัจจุบันมีการนำหมากไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ทำสีเพื่อย้อมแหอวน ฟอกหนังและฟอกเส้นใย และที่สำคัญคือใช้ทำยารักษาโรคด้วย หมากปลูกง่าย ดูแลรักษาไม่ยุ่งยาก ถูกรบกวนด้วยโรคแมลงน้อยและลงทุนไม่สูง ดังนั้น หมากจึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่น่าสนใจ (คะนอง คลอดเพ็ง, 2530; พิสมัย พึ่งวิกรัย และ พิมพ์ใจ พัฒนศิริพงศ์, 2543)

สำหรับประเทศไทย คนไทยสมัยก่อนนิยมเคี้ยวหมากกับพลู แต่คนไทยสมัยปัจจุบันเลิกเคี้ยวหมาก แต่มีการปลูกหมากเชิงการค้าเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรม จากข้อมูลปี พ.ศ. 2543 (พิสมัย พึ่งวิกรัย และ พิมพ์ใจ พัฒนศิริพงศ์, 2543) ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งหมากออกในรูปวัตถุดิบทั้งสดและแห้งที่สำคัญของโลก และมีรายได้เข้าประเทศคิดเป็นมูลค่าหลายร้อยล้านบาทอย่างสม่ำเสมอต่อเนื่องเป็นเวลานานนับสิบปี พันธุ์หมาก (ซึ่งแบ่งพันธุ์ตามลักษณะผล) ที่ปลูกในประเทศไทยมี 2 แบบ คือพันธุ์ผลกลม และพันธุ์ผลรี ดังแสดงในภาพที่ 2.1 พันธุ์ผลกลมมีผลทรงกลมขนาดใหญ่ ทรงและขนาดของเนื้อหรือเมล็ดเป็นเช่นเดียวกับผลคือกลมและใหญ่ ความหนาของเปลือกค่อนข้างสม่ำเสมอ ส่วนพันธุ์ผลรีมีผลทรงรีขนาดเล็กกว่าชนิดแรก เมล็ดอาจมีทรงกลมหรือรีก็ได้ เปลือกทางขั้วผลมีความหนากว่าส่วนอื่น (คะนอง คลอดเพ็ง, 2530)

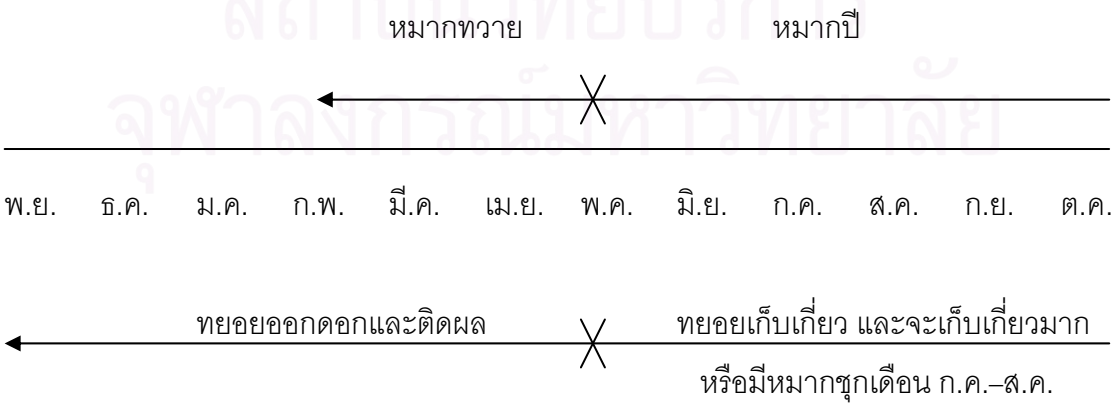
หมากพันธุ์ผลกลม

หมากพันธุ์ผลรี

ภาพที่ 2.1 ลักษณะผลหมาก

ในเนื้อหมากมีแทนนินทำให้หมากมีรสฝาดและสีเข้ม คุณภาพของหมากขึ้นอยู่กับปริมาณสารแทนนิน โดยหมากคุณภาพดีต้องมีปริมาณแทนนินสูง จึงกล่าวกันว่าหมากที่ดีต้องมีรสฝาดมาก เนื้อหมากที่มีแทนนินในปริมาณสูงมีเนื้อส่วนที่มีสีน้ำตาลแดงและมีลายเส้นในเนื้อมาก เนื้อละเอียดและมียางเยิ้มเป็นมันวาว มีส่วนเนื้อสีขาวขุ่นที่อยู่ตรงกลางน้อย เรียกว่าหมากหน้าฝาด ส่วนเนื้อหมากที่มีปริมาณแทนนินต่ำเนื้อมีสีเหลืองชีด ๆ ลายเส้นน้อย ไม่ละเอียด และมีส่วนเนื้อสีขาวขุ่นอยู่ตรงกลางมาก เรียกว่าหมากหน้าหวาน (คะนอง คลอดเพ็ง, 2530)

หมากให้ผลผลิตเกือบตลอดทั้งปี โดยมีระยะเวลาการเก็บเกี่ยว 2 ช่วง ดังแสดงในภาพที่ 2.2 คือหมากปี (ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม) และหมากทวาย (ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงพฤษภาคม) ดังนั้น ในช่วงพฤศจิกายนถึงมกราคมจึงเป็นช่วงที่หมากขาดตลาด อายุของหมากที่เก็บเกี่ยวคือหมากอ่อน ซึ่งผลมีอายุ 3-6 เดือน มีเปลือกสีเขียว และหมากแก่หรือหมากสง ซึ่งผลมีอายุ 7-9 เดือน หมากที่มีอายุประมาณ 7 เดือน มีเปลือกสีเหลืองปนเขียว เนื้อยังไม่แข็งมาก จึงนิยมนำมาหั่นเป็นชิ้นบางๆแล้วตากแห้ง หมากที่มีอายุ 8 เดือนขึ้นไปมีเปลือกสีเหลือง เนื้อมีความแข็งมากและติดกับเปลือกแน่น ต้องนำไปตากแดดเพื่อให้เปลือกล่อนก่อนจึงสามารถแกะเนื้อออกจำน่ายได้ (พิสมัย พึ่งวิกรัย และ พิมพ์ใจ พัฒนศิริพงศ์, 2543)



ภาพที่ 2.2 ฤดูกาลที่ให้ผลผลิตหมากปี และหมากทะวาย
ที่มา: พิสมัย พึ่งวิกรัย และ พิมพ์ใจ พัฒนศิริพงศ์ (2543)

แหล่งปลูกหมากที่สำคัญในประเทศไทยส่วนใหญ่จะอยู่ทางภาคใต้และภาคกลาง (ตารางที่ 2.1) ส่วนแหล่งซื้อขายหมากที่สำคัญได้แก่ ตลาดเทศบาล อำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา ตลาดเทศบาล 1 และ 2 อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ตลาดสี่มุมเมือง รังสิต ถนนพหลโยธิน อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี ตลาดไท ถนนพหลโยธิน อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี ตลลาดหัวอิฐ อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช ตลาดส่งเสริมเกษตรไทยปากคลองตลาด ตลาดยอดพิมานและตลาดองค์การตลาด กรุงเทพฯ เป็นต้น (พิสมัย พึ่งวิกรัย และ พิมพ์ใจ พัฒนศิริพงศ์, 2543)

ตารางที่ 2.1 แหล่งปลูกหมากที่สำคัญ 10 จังหวัดแรกในประเทศไทย

จังหวัด	พื้นที่ปลูก (ไร่)	ผลผลิตเฉลี่ย (กก./ไร่)
ชุมพร	24,516	6,700
นครศรีธรรมราช	18,408	6,092
ระนอง	13,556	3,431
ฉะเชิงเทรา	9,583	1,958
พัทลุง	6,451	6,700
ตรัง	4,649	6,700
พังงา	4,282	5,363
ระยอง	4,048	2,090
สุราษฎร์ธานี	3,427	4,705
นครปฐม	3,409	3,172

ดัดแปลงจาก: กรมส่งเสริมการเกษตร (2545)

เมล็ดหมากนอกจากมีสารแทนนินทั้งประเภท hydrolysable tannin และ condense tannin โดยมี condense tannin ประมาณร้อยละ 15 ซึ่ง hydrolysable tannin และส่วนใหญ่ของ condensed tannin ละลายน้ำได้ดี และสารสีแดง (areca red) ในเมล็ดหมากยังมีสารอัลคาลอยด์ถึงประมาณร้อยละ 0.3-0.6 โดยมีอัลคาลอยด์ 9 ชนิดในกลุ่ม pyridine โดยมี 3 ชนิด ที่เป็นหลักคือ arecoline arecaine และ guvacine โดยมี arecoline เป็นส่วนใหญ่ arecoline มีลักษณะเป็นของเหลวคล้ายน้ำมัน (oily liquid) ที่ละลายในน้ำ แอลกอฮอล์และอีเทอร์ นอกจากนั้นยังมี arecaidine arecolidine isoguvacine guvacoline และ coniine เมล็ดสดมีปริมาณอัลคาลอยด์มากกว่าเมล็ดตากแห้ง (Arjungi, 1976; ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ,

2527; Duke, 1985) พบ catechin และ leucoanthocyanidin ใน endosperm นอกจากนี้ยังประกอบด้วยกรดไขมันร้อยละ 14 (ในส่วนของกรดไขมันนี้ประกอบด้วย lauric acid ร้อยละ 19.5 myristic acid ร้อยละ 46.2 palmitic acid ร้อยละ 12.7 stearic acid ร้อยละ 1.6 capric acid ร้อยละ0.3 oleic acid ร้อยละ 6.2 linoleic acid ร้อยละ 5.4 dodecanoic acid ร้อยละ 0.3 และ tetradecanoic acid ร้อยละ 7.2) และกรดอะมิโน โดยในส่วนของกรดอะมิโนมี proline มากกว่าร้อยละ 15 และมี tyrosine phenylalanine และ arginine รวมกันมากกว่าร้อยละ 10 (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ, 2527)

สารที่อยู่ในหมากทำให้หมากมีประโยชน์หลายด้านกล่าวคือแทนนินสามารถตกตะกอนโปรตีนที่หนังสัตว์ได้จึงนิยมนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง นอกจากนี้ยังใช้เป็นยาฝาดสมาน แก้ท้องเสีย ใช้กับบาดแผลบริเวณผิวหนัง เช่น รักษาแผลไฟไหม้ เป็นต้น ส่วน arecoline มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลาย ทำให้อัตราการเต้นของหัวใจ และความดันโลหิตเพิ่มขึ้น เพิ่มอัตราการใช้ประโยชน์กลูโคสในสมอง ทำให้ความจำของผู้ป่วยที่เป็นอัลไซเมอร์ดีขึ้น เป็นยาถ่ายพยาธิ กระตุ้นต่อมเหงื่อและการบีบตัวของลำไส้ และ arecaine กระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางและการทำงานของหัวใจ (วีณา จิรัชฉริยากูล, 2534) จากการวิจัยพบว่าสารพวกฟีนอล เช่นแทนนิน สามารถต้านไวรัส และต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ (Buhler and Miranda, 2000; Rodriguez Vaquero, Alberto and Manca de Nadra, 2007) เมล็ดหมากมีแทนนินซึ่งเป็นสาร polyphenol แทนนินในหมากมีทั้ง hydrolysable tannin และ condensed tannin (ซึ่งเป็น proanthocyanidin) ดังที่กล่าวข้างต้นว่า hydrolysable tannin และส่วนใหญ่ของ condensed tannin ละลายน้ำได้ดี ดังนั้น สารสกัดหมากด้วยน้ำจึงสามารถยับยั้ง *S. aureus Streptococcus mutans Streptococcus salivarius* และ *Candida albicans* ได้ และยังมีผลต่อเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังต่างๆ รวมทั้งโรคกลากเกลื้อน เนื่องจากในสารสกัดหมากมีสาร hydrolyzable tannins (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ, 2527; Miranda et al., 1996) โดย Wang and Lee (1996) พบว่าสารฟีนอลในหมากเป็นพวก condensed tannins 92 mg/g hydrolyzable tannin 69 mg/g และสาร phenolics อื่นๆ อีก 56 mg/g นอกจากนั้นยังพบสาร non-tannin flavons 84 mg/g สารสกัดหมากด้วยเอทานอลยังมีฤทธิ์ยับยั้ง *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเกี่ยวกับกระเพาะอาหารและลำไส้ นอกจากนี้ยังสามารถต้าน *H. pylori* สายพันธุ์ BCRC 17023 BCRC 17027 และ BCRC 15415 (Wang et al., 2005) และต้าน *Staphylococcus aureus Salmonella* sp. *Neisseria* sp. *Yersinia enterocolitica* และ *Listeria monocytogenes* (Yang and Chou, 1997) ส่วนสารสกัดจากเมล็ดหมากด้วยเอธิลอะซิเตตพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ (ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ และคณะ, 2527)

2.2 น้ำมันหอมระเหย

เป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นมา ซึ่งพืชเหล่านี้จะมีเซลล์พิเศษในการเก็บสารเหล่าไว้ สารเหล่านี้จะมีกลิ่นหอมและระเหยง่าย ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ในดึงดูดให้แมลงมาผสมพันธุ์และป้องกันตัวเองจากแบคทีเรียและเชื้อโรคต่าง ๆ น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสาร 2 กลุ่มคือ เทอปีน (terpenes) และฟีนีลโพรปานอยด์ (phenyl propanoids) โดยพืชที่มีน้ำมันหอมระเหยมีหลายวงศ์ ได้แก่ มินต์ (Labiatae) ส้ม(Rutaceae) ขิง (Zingiberaceae) และ ตะไคร้ (Gramineae) เป็นต้น (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2552)

ปัจจุบันนิยมนำน้ำมันหอมระเหยมาผสมในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในชีวิตประจำวันมากมาย เพื่อให้ได้กลิ่นที่ผู้บริโภคพึงพอใจ เช่น ผสมในอาหาร ลูกอม ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด เป็นต้น กลิ่นที่ผู้บริโภคคุ้นเคย ได้แก่ กลิ่นมินต์ กลิ่นส้ม กลิ่นมะนาว เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยกลิ่นมินต์เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย โดยมินต์ที่นิยมนำมาใช้คือสะระแหน่ (peppermint) ซึ่งมีใบและต้นที่ให้กลิ่นหอมเย็นสดชื่น สิ่งที่นำมาใช้ประโยชน์คือน้ำมันที่สกัดจากสะระแหน่ ซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหย การสกัดน้ำมันออกมานั้นได้จากหลายส่วน เช่น สารที่สกัดจากใบ ประกอบด้วย น้ำมันระเหย ร้อยละ 0.5-4 ซึ่งประกอบด้วย free menthol monoterpene menthofurane ถึงร้อยละ 50-78 (Dew and Evans, 1984) นอกจากนี้ยังพบสาร menthol ร้อยละ 3.54 tricyclene ร้อยละ 1.31 β-pinene ร้อยละ 2.20 α-terpinene ร้อยละ 20.11 และ trans-carveol ร้อยละ 19.48 เป็นต้น (Eteghad *et al*., 2009) สารที่สกัดจากดอกประกอบด้วย imonene hexenolphenyl acetate neo-menthone (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2552) สะระแหน่ oil นิยมนำมาใช้ในทางเภสัชกรรม ซึ่งมีฤทธิ์ช่วยในการบรรเทาอาการไข้หวัด และอาการผิดปกติอันเกิดจากระบบทางเดินหายใจ ช่วยเสริมประสิทธิภาพการทำงานของระบบประสาทให้ความรู้สึกปลอดโปร่ง ช่วยบรรเทาอาการเวียนศีรษะ เมารถ หรือช่วยบรรเทาอาการ เมาค้างจากการดื่มสุรา บรรเทาเวียนศีรษะ ดังนั้นจึงนิยมนำมาใช้เป็นส่วนผสมของยาแก้ไอ ยาแก้ปวดท้อง ยาทาแก้ขัดยอก ยาทาแก้หวัด และยาสูดดมต่าง ๆ เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้เพิ่มกลิ่นและรสชาติของอาหาร เช่น บุหรี่ หมากฝรั่ง ลูกกวาด ขนมหวาน ยาสีฟัน ยาอมบ้วนปาก เป็นต้น ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น น้ำหอม แป้งน้ำ ยาทาหลังโกนหนวด โลชัน แชมพู เป็นต้น (พิพิธ ศุภพิพัฒน์, 2518) และในปัจจุบันได้มีการนำน้ำมัน สะระแหน่ ไปใช้ในการบำบัดด้วยกลิ่น (aromatherapy) หรือใช้เป็นน้ำมันนวดตามร่างกาย ซึ่งเป็นที่นิยมมากในกลุ่มคนรักสุขภาพ น้ำมันส้มและมะนาวเป็นน้ำมันที่ผู้บริโภคคุ้ยเคยและมีการนำกลิ่นไปใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในชีวิตประจำวันต่างๆ มากมาย สารสำคัญที่พบของน้ำมันส้ม ได้แก่ limonene α-pinene sabinene β-myrcene เป็นต้น (Martinez และคณะ,1996) สารสำคัญที่พบในน้ำมัน

มะนาว ได้แก่ limonene myrcene octanal และ monoterpene เป็นต้น (Braze *et al*., 2006) นอกจากนี้น้ำมันจากโหระพาซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางเภสัชกรรมมากมาย ซึ่งจากการวิจัยของ Jean และ Mehmet (2008) พบสารสำคัญในน้ำมันโหระพาดังนี้คือ estragole limonene และ *p*-cymene เป็นต้น

น้ำมันหอมระเหยนอกจากให้กลิ่นที่ดีแล้วยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียได้ ตัวอย่างเช่น ในการวิจัยของ Gotshall (1949) พบว่าสารสกัดจากสะระแหน่ มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Streptococcus pyrogens S. aureus Serratia marcescens Escherichia coli* และ *Mycobacterium avium* เช่นเดียวกับ Diaz และคณะ (1988) ที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยนี้มีฤทธิ์ต้านได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยสารสกัดจากใบสะระแหน่ ด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดีกว่าสารที่สกัดด้วย chloroform petroleum ether ส่วนที่สกัดด้วยน้ำมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย *Bacillus subtillis Pseudomonas aerugenosa* ได้ดีกว่า *Streptococcus aureu Pseudomonas aureus* และ *Serratia marcesens* (Bupesh *et al*., 2007) และต้านไวรัส influenza herpes และ ไวรัส อื่นๆ ได้ดี ต้านเชื้อรา และสามารถยับยั้ง *C. albicans*, *Aspergillus albus* และ *Dermatophytic fungi* ได้ (Hirobe, 1994; Alkofahi *et al*., 1990; Chaumont and Senet, 1978) นอกจากนี้ Gupta และคณะ (2008) พบว่า สะระแหน่ oil มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus S. aureus* และ *E. coli* ได้อีกด้วย ในขณะที่น้ำมันส้มและมะนาวมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* และ *E. coli* (Prabuseenivasan *et al*., 2006) ได้ และจากงานวิจัยของ Jundia และคณะ (2006) พบว่าน้ำมันโหระพามีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus E. coli* และ *S.* Typhimurium เป็นต้น

2.3 อิมัลชัน

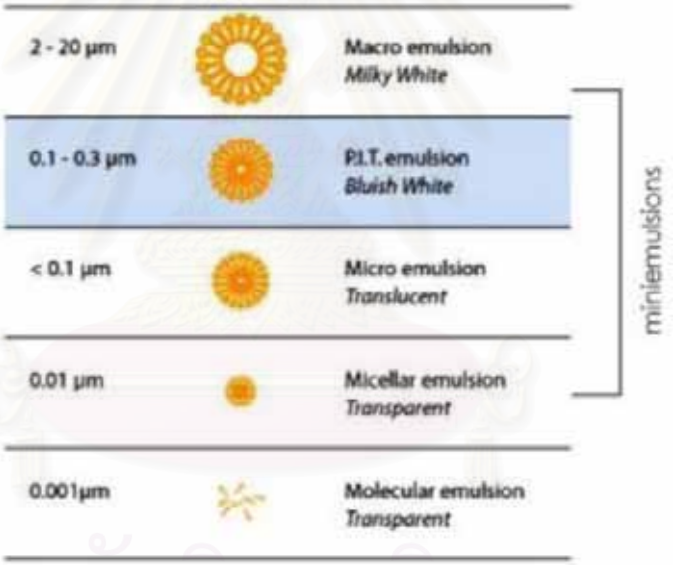
ในระบบของผสมที่มีส่วนผสมของของเหลวตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เช่นน้ำกับน้ำมัน การที่จะทำให้ระบบนี้มีลักษณะปรากฏเป็นเนื้อเดียวกันต้องตีให้น้ำมันเป็นอนุภาคเล็กๆกระจายแขวนลอยในน้ำหรือกลับกัน อย่างไรก็ตามเมื่อหยุดการตีก็เกิดการเกาะกันของอนุภาคเล็กๆนั้นเป็นกลุ่มแล้วหลอมรวมกันทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นในที่สุดก็แยกออกเป็นสองวัฏภาคซึ่งมักเรียกกันโดยทั่วไปว่าเกิดการแยกชั้น ทั้งนี้เนื่องจากแรงตึงระหว่างผิวระหว่างน้ำกับน้ำมันสูงมาก ดังนั้น นอกจากต้องใช้แรงตีให้เกิดอนุภาคขนาดเล็กแล้วเพื่อให้อนุภาคนี้ยังคงแขวนลอยอยู่ได้ไม่เกิดหรือชลอการแยกชั้นนั้นจำเป็นต้องลดแรงตึงระหว่างผิวระหว่างน้ำกับน้ำมันโดยเติมสารลดแรงตึง (surface active agent หรือ surfactant) ลงไปในระบบด้วย ระบบสารแขวนลอยของอนุภาคน้ำมัน (วัฏภาคกระจาย) ในน้ำ (วัฏภาคต่อเนื่อง) หรือของอนุภาคน้ำในน้ำมันเรียกว่าอิมัลชัน อิมัลชันส่วนใหญ่มีขนาดอนุภาคของวัฏภาคกระจายอยู่ในช่วง 0.1-10 μm

(Shaw, 1970; Hiemens, 1977) ขณะที่คอลลอยด์หมายถึงอนุภาคที่มีขนาดอยู่ในช่วง 0.001-1 μm (Shaw, 1970; Hiemens, 1977) ดังนั้น จึงถือได้ว่าอิมัลชันเป็นระบบคอลลอยด์ชนิดหนึ่ง อิมัลชันที่มีอนุภาคน้ำมันแขวนลอยในน้ำเรียกว่าอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water, o/w) ขณะที่อิมัลชันที่มีอนุภาคน้ำมันแขวนลอยในน้ำเรียกว่าอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil, w/o) สารลดแรงตึงผิวที่ใช้เรียกว่าตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) การทำให้ของเหลวหนึ่งที่เป็นวัฏภาคกระจายเกิดเป็นอนุภาคขนาดเล็กทำได้หลายวิธีเช่นการตี การตีปั่น และการใช้คลื่นเหนือเสียง เป็นต้น (Liu *et al*., 2006)

อิมัลชันจำแนกตามช่วงขนาดของอนุภาคของวัฏภาคกระจายได้เป็น 2 ชนิด ใหญ่ คือแมคโครอิมัลชัน (macroemulsion) ซึ่งมีขนาดของอนุภาคของวัฏภาคกระจาย 2-20 μm ทำให้มีลักษณะขุ่นและไมโครอิมัลชัน (microemulsion) ซึ่งมีขนาดของอนุภาคของวัฏภาคกระจาย 0.1-2 μm ทำให้มีลักษณะใส ไมโครอิมัลชันเสถียรกว่าแมคโครอิมัลชัน โดยไมโครอิมัลชันมีความเสถียรแบบอุณหพล หรือ thermodynamically stable ไม่พบการแยกชั้นภายใน 1 ปี หรือมากกว่านั้น ขณะที่ความเสถียรของแมคโครอิมัลชันเป็นแบบจลน์ หรือ kinetically stable (Lawrence and Rees, 2000) ปัจจุบันมีการจำแนกเพิ่มขึ้นนอกเหนือจากที่กล่าวข้างต้นคือนาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) ซึ่งได้มีรายงานช่วงขนาดอนุภาคของวัฏภาคกระจายหลากหลายดังนี้ 0.02-0.5 0.5-1 และ 0.1-0.2 μm โดยมีการสรุปว่าขนาดอนุภาคของวัฏภาคกระจายในนาโนอิมัลชันมีการกระจายในช่วงกว้างประมาณ 0.05-0.5 μm และอนุภาคของวัฏภาคกระจายส่วนใหญ่มีขนาด 0.1-0.2 μm (Forgiarini *et al*., 2001) จากช่วงขนาด ขนาดอนุภาคของวัฏภาคกระจายของนาโนอิมัลชันอยู่ในช่วงที่ไม่ใหญ่กว่าของไมโครอิมัลชัน จึงมีลักษณะใส อย่างไรก็ตามมักกล่าวกันว่านาโนอิมัลชันมีความเสถียรแบบจลน์สูง แต่ไม่ได้มีความเสถียรแบบอุณหพลเช่นไมโครอิมัลชัน (Lawrence and Rees, 2000) นอกจากนั้นยังมี micellar emulsion และ molecular emulsion โดยขนาดของอนุภาคของวัฏภาคกระจายเท่ากับ 0.01 และ 0.001 μm ตามลำดับ และมีลักษณะใส ที่สำคัญคือมีความเสถียรแบบอุณหพล แบบจำลองของอิมัลชันชนิดต่างๆแสดงในภาพที่ 2.3 (Shiv, 2009) เนื่องจากการที่อนุภาคของวัฏภาคกระจายที่มีขนาดเล็กให้อิมัลชันที่มีความเสถียรต่อการแยกชั้นสูงกว่า ดังนั้น การพัฒนาผลิตภัณฑ์อิมัลชันจึงมุ่งเน้นในการทำให้อนุภาคของวัฏภาคกระจายที่มีขนาดเล็กกว่า 1 μm พร้อมทั้งการใช้ตัวทำอิมัลชันชนิดและปริมาณที่เหมาะสม ถึงแม้ว่าอนุภาคของวัฏภาคกระจายที่มีขนาดอยู่ในช่วง 0.05-0.5 μm เช่นที่มีอยู่ในนาโนอิมัลชันก็ยังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคของวัฏภาคกระจายแบบ Ostwald ripening (Lawrence and Rees, 2000; Forgiarini *et al*., 2001) มีผลทำให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยสูงขึ้น ซึ่งนำไปสู่การแยกชั้นในที่สุด ซึ่งจะเร็วหรือช้าก็ขึ้นอยู่กับอัตราการโตของอนุภาค ดังนั้น การวิเคราะห์ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคของวัฏภาคกระจาย และการ

เปลี่ยนแปลงขนาดและการกระจายขนาด ก็เพื่อประเมินความเสถียรของผลิตภัณฑ์ (Liu *et al*., 2006)

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตและการนำอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำที่มีขนาดอนุภาคของวัฏภาคกระจายที่มีขนาดเล็กกว่า 1 μm ไปใช้ในการนำส่งและปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ต่างๆ ที่มี hydrophobic สูง เช่นน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเป็นต้น (Gupta *et al*., 2006; Gupta and Moulik, 2007; Gaysinsky *et al*., 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันที่ไม่มีสารต้านแบคทีเรีย เช่น ไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันถั่วเหลืองในน้ำ ก็มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ทั้งที่น้ำมันถั่วเหลืองไม่มีฤทธิ์นั้น ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันไปมีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเมนเบรนของแบคทีเรีย ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรีย (Adham *et al*., 2000; Hamouda and Baker, 2000; Teixeira *et al*., 2007;)



ภาพที่ 2.3 แบบจำลองของอิมัลชันชนิดต่างๆ
ที่มา: Shiv (2009)

2.4 กลไกลการออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย

2.4.1 การต้านแบคทีเรียของสารสกัดหมาก

สารที่ออกฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของหมากส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่ม polyphenol โดยเฉพาะสารในกลุ่มแทนนินซึ่งเป็นกลุ่มหลัก ตัวอย่างสารที่ออกฤทธิ์ เช่น tannic acid สารนี้มีกลไกลในการออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียโดยเฉพาะบริเวณผนังเซลล์ จากการศึกษาของ Smith (1974) พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะมีความไวต่อสาร tannic acid มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสารดังกล่าวจะไปจับกับ phospholipids บริเวณ outer membrane ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้ไปขัดขวางการเจริญเติบโตและพัฒนาของเซลล์ (Costerton et al., 1974) และยังยับยั้งการสร้าง flagella ของแบคทีเรียได้อีกด้วย (Weiser et al., 1972) นอกจากนี้ Shrager และคณะ, (1962) ยังพบว่าสาร tannic acid จะไปจับกับ cations เช่น calcium ion บริเวณของ outer cell wall membrane ของแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ ส่งผลถึงการซึมผ่านของสารต่าง ๆ บริเวณผนังเซลล์ได้น้อยลง เช่นเดียวกับ Weiser และคณะ (1972) ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวไปขัดขวางขบวนการขนส่ง calcium หรือ magnesium salts ของเซลล์ ดังนั้นจากการศึกษาที่ผ่านมาทั้งหมดนี้พบว่าสาร tannic acid จะไปมีผลต่อผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียโดยตรง ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกก็มีส่วนของผนังเซลล์ที่มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบจึงเป็นเหตุให้แบคทีเรียดังกล่าวมีความไวต่อสาร tannic acid มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

2.4.2 การต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยจะประกอบไปด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแล้วพบว่าสามารถนำส่วนที่ไม่ชอบน้ำนี้เข้าสู่ผนังเซลล์และ mitochondria ของแบคทีเรียได้ ซึ่งเป็นการรบกวนการแพร่ผ่านของสารและทำให้ ion เกิดการรั่วไหลภายในเซลล์ จนทำให้ ion ต่างๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียลดน้อยลงไป ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Knobloch et al., 1986; Sikkema et al., 1994)

สารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของ สะระแหน่ oil ส่วนใหญ่จะเป็นสารในกลุ่ม menthol ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารในกลุ่ม monoterpenes สารดังกล่าวจะเป็นพิษต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียต้องเพิ่มการแลกเปลี่ยนสารเข้าสู่เซลล์ และยังไปขัดขวางกระบวนการหายใจของเซลล์ (Sikkema et al., 1995) ซึ่ง Hirakura และคณะ (1996) ยังพบอีกว่าสารดังกล่าวมีผลแบคทีเรียแกรมลบโดยมีผลต่อการแลกเปลี่ยนสารบริเวณ outer membrane ส่งผลให้บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรียเกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นกัน นอกจากนี้ Helender และคณะ, (1998) ยังพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกมีความไวต่อสารดังกล่าวมากกว่า

แบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบจะมี negative charge ที่แข็งแรง ประกอบไปด้วย lipopolysaccharide และมีรูปแบบการรวมตัวเป็น hydrophilic permeability ช่วยป้องกันสารแปลกปลอมเข้าสู่เซลล์ได้ ดังนั้นจากการศึกษาที่ผ่านมาทั้งหมดนี้พบว่าสาร menthol ออกฤทธิ์โดยตรงกับผนังของเซลล์แบคทีเรียโดยแบคทีเรียแกรมลบสามารถทนต่อสารนี้ได้มากกว่าแบคทีเรีย แกรมบวกเนื่องจากมีส่วนประกอบและรูปแบบการรวมตัวของผนังเซลล์ที่แข็งแรงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

สารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของส้ม มะนาว และโหรพา ส่วนใหญ่จะเป็นสาร limonene ซึ่งมีกลไกลในการยับยั้งขบวนการหายใจของเซลล์ และยับยั้งกระบวนการขนส่ง ion ที่สำคัญของเซลล์ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (Andrews et al., 1980) นอกจากนี้สาร pinene ซึ่งพบได้ในน้ำมันส้มมีผลกับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้การสังเคราะห์สารสำคัญต่างๆ ที่จำเป็นกับโครงสร้างภายในเซลล์ลดน้อยลง (Wikins and Board, 1989) ในขณะที่สาร cymene ซึ่งมีในน้ำมันโหระพาก็มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Bacillus cereus* เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์โดยเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการขยายตัวทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ (Ultee et al., 2002) เป็นต้น

2.5 แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ

โรคอาหารเป็นพิษเป็นผลกระทบของการบริโภคอาหารที่ไม่ปลอดภัย ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ หรือสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น โดยจุลินทรีย์จะปนเปื้อนมากับอาหารหรือมากับอุจจาระของคนและสัตว์เลือดอุ่น เข้าสู่สิ่งแวดล้อม หรือจากการสัมผัสผ่านนิ้วมือของผู้ประกอบอาหาร สัตว์นำโรค น้ำ ภาชนะใส่อาหารเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่สำคัญได้แก่ *Bacillus cereus Staphylococcus aureus Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhimurium เป็นต้น ลักษณะสำคัญของแบคทีเรียแต่ละชนิดมีดังต่อไปนี้

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน (rod) มีขนาด 1.5x2-6 ไมโครเมตร เป็นแบคทีเรียประเภท facultative anaerobe (Pual และ Diana, 1988) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ เซลล์จะมีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียทั่วไป สร้างสปอร์ได้ พบการกระจายได้ในธรรมชาติ *B. cereus* ที่ทำให้เกิดอาการท้องเดินมักจะเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีเนื้อ ซุป ผัก พุดดิ้ง และซอสต่างๆ อาการอาเจียนจะเกิดจากอาหารจำพวกแป้ง เช่น ข้าวและพาสต้า (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) นอกจากนี้อาหารที่พบเชื้อบ่อยได้แก่ ข้าวที่หุงสุกแล้วบริโภคไม่หมด (Burt, 2004)

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม (cocci) อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น มีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร (Pual และ Diana, 1988) เป็นแบคทีเรียประเภท facultative anaerobe คลื่นที่ไม่ได้ อยู่ในกลุ่มแสตปฟิลโลคอกไคที่สร้างสารพิษแล้วสามารถขับออกนอกเซลล์ได้ซึ่งเรียกว่า เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxins) ทำให้ให้เกิดอาการท้องเดินหรืออาการผิดปกติของระบบทางเดินอาหารเกิดจากจากการรับประทานอาหารที่มีทอกซินนี้เข้าไป อาหารที่มีทอกซินอยู่จะต้องมีแบคทีเรียเจริญอยู่นานพอที่จะสามารถสร้างทอกซินได้ ทอกซินนี้ ทนความร้อนได้ถึง 100 องศาเซลเซียส นานกว่า 30 นาที และยังสามารถทนต่อกรดและเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ด้วย อาหารที่พบเชื้อนี้ได้แก่ แซนวิช เนื้อสัตว์ที่หั่นเป็นแผ่น ผลิตภัณฑ์จากนมที่ตั้งทิ้งไว้ อาหารพวกครีม คัสตาร์ด และอาหารปรุงเสร็จที่ทิ้งไว้โดยไม่แช่ตู้เย็น นอกจากนี้เชื้อยังมาจากผู้ปรุงอาหารที่เป็นพาหะนำโรค โดยเชื้อจะเข้าไปติดอยู่ตามแผล ฝี หนอง มือ ตามซอกจมูก ตามในหน้าที่เป็นสิวของผู้ปรุงอาหารโดยเชื้อจะเข้าไปเจริญอยู่ในอาหารที่ปรุงแล้ว (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน (rod) มีขนาดประมาณ 0.5-1.0x1-6 ไมโครเมตร (Pual และ Diana, 1988) อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งถือว่าเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น แบคทีเรียนี้มักจะทำให้เกิดอาการท้องเดินในเด็กทารก จากการที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ในลำไส้จึงพบได้ในอุจจาระของคนและสัตว์ ดังนั้นจึงใช้แบคทีเรียนี้เป็นดรรชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) ผลิตภัณฑ์อาหารที่มักพบเชื้อนี้ ได้แก่ ผักกาดหอม แครอท มะเขือยาว และในสลัด เป็นต้น (Burt, 2004)

Salmonella Typhimurium เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ มีขนาดประมาณ 0.5x1.0 ไมโครเมตร (Pual และ Diana, 1988) เจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษรุนแรงและเป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) เชื้อนี้อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ได้ เช่นสัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน และในมนุษย์ ซึ่งบางครั้งอาจพบบริเวณร่างกายของมนุษย์และสัตว์ปีกได้ โดยแบคทีเรียที่จะออกมากับอุจจาระ โดยอาศัยแมลงสัตว์และน้ำแพร่กระจายเชื้อเข้าสู่สิ่งแวดล้อม ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีมักพบเชื้อนี้ ได้แก่ เนื้อ นม ไข่ และผักเป็นส่วนประกอบ ซึ่งสัตว์ปีกเป็นแหล่งที่มีการปนเปื้อนเชื้อที่สำคัญ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) นอกจากนี้ยังพบในปลาที่แล่เป็นเส้นๆ (Burt, 2004)

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

แบคทีเรียที่ศึกษาเป็นแบคทีเรียแกรมบวกก่อโรคในอาหารได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 1729 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และแบคทีเรียแกรมลบก่อโรคในอาหาร ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13811 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย การดำเนินการวิจัยประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

3.1 การสกัดสารจากหมาก

ผลหมากสดทั้งอ่อนและแก่ที่ปลูกในเขตพื้นที่อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย ที่เก็บในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2550 โดยซื้อมาจากตลาดสดพระโขนง กทม. ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยศึกษาปัจจัยของ พันธุ์หมาก คือหมากพันธุ์กลมและพันธุ์รี ปัจจัยของอายุ ผลหมากคือผลอ่อนและผลแก่ และชนิดของตัวทำละลายต่อ % yield และค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดที่ได้ โดยทำการทดลองแบบ CRD

อายุของผลหมากประเมินจากสีผิวของผลและลักษณะเนื้อในเมล็ดควบคู่กัน ผลอ่อนมีผิวสีเขียวและเนื้อในเมล็ดอ่อนนิ่มมีน้ำเยิ้มเล็กน้อยและแกะออกง่าย ส่วนผลแก่มีสีเขียวอมเหลืองและเนื้อในเมล็ดแข็งและแห้ง เป็นเสี้ยนและแกะออกยาก

3.1.1 วิธีการสกัด

เมล็ดหมากที่ถูกจำแนกตามพันธุ์และอายุนำมาฝานเป็นชิ้นบางเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร แล้ววางใส่ถาดอลูมิเนียม นำไปอบให้แห้งในตู้อบลมร้อน (Memmert 600, Germany) ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 3 วัน แล้วนำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นแบบโลหะ นำมาสกัดด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก maceration ของรัตนา อินทรานุปกรณ์ (2547) โดยเลือกตัวทำละลายที่ใช้ 4 ชนิด คือ น้ำกลั่น เอทานอล 95% (Commercial Grade, ยูเนียนเคมิคอลแอนด์อีควิปเม้นท์ จำกัด, บางพลัด, กทม, ประเทศไทย) อะซิโตน (AR grade, QReC^{tn}, New Zealand) และเอทิลอะซิเตต (AR grade, QReC^{tn}, New Zealand) นำผงหมากแห้ง 75 กรัม ผสมกับตัวทำละลายน้ำกลั่น หรือ เอทานอล 95% หรืออะซิโตน หรือเอทิลอะซิเตต 150 กรัม ใน flask ขนาด 500 ml ในกรณีที่ใช้น้ำเป็นตัวทำลาย นำสารแขวนลอยไปเขย่าใน water bath shaker

(GFL Model 1083, UK) ที่อุณหภูมิ 80 °C ความเร็วรอบ 100 rpm นาน 2 ชั่วโมง ส่วนเมื่อใช้ตัวทำละลายอื่นนำสารแขวนลอยไปเขย่าใน rotary shaker (New Brunswick Scientific, Edision, N.J, U.S.A.) ที่ความเร็วรอบ 200 rpm นาน 48 ชั่วโมง แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง นำของเหลวที่กรองได้ไปกรองซ้ำผ่านกระดาษกรองหยาบ (Whatman No. 1) และกระดาษกรองละเอียด (Whatman No. 42) ตามลำดับ เพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายในตัวทำละลายออกเอาแต่ส่วนที่ละลายในตัวทำละลายเท่านั้น จากนั้นทำส่วนที่ละลายในตัวทำละลายไปทำให้เข้มข้น (concentration) โดยนำสารสกัดหมากที่กรองได้แต่ละแบบไประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R-200, BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland) ตั้งอุณหภูมิให้ต่ำกว่าจุดเดือดของตัวทำละลาย (โดยให้อุณหภูมิที่ 80°C เมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและที่ 60°C เมื่อใช้ตัวทำละลายอื่น) จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนเหมือนกันกับตู้อบชิ้นหมากตั้งอุณหภูมิ 80 °C นาน 5 วัน จนสารแห้งเป็นของแข็ง นำสารที่แห้งแข็งไปบดให้เป็นผงละเอียด นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาค่า % yield จากสมการที่ 3.1 จากนั้นนำสารสกัดหมากแต่ละแบบใส่ภาชนะพลาสติกที่มีฝาปิดสนิทแล้วเก็บใน desiccator แบบโถแก้ว แต่สารที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต ซึ่งมีลักษณะเป็นไขไม่แห้ง และกลายเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง 28°C นั้นเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5°C ทำการทดลองสกัด 2 ซ้ำ สังเกตลักษณะของสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ด้วยตาเปล่า

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของสารสกัดหมาก}}{\text{น้ำหนักของเมล็ดหมากบดแห้ง}} \times 100 \qquad [3.1]$$

3.2 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

3.2.1 การตรวจสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion method

เตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 4 ชนิด โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจาก NCCLS (1999) โดยเลี้ยงแบคทีเรียในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว MHB (Muller Hinton Broth, Himedia, Mumbai, India) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปรับความขุ่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A_{625}) ประมาณ 0.1 ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer (Spectronic Genesys 10 UV, USA) ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ซึ่งความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นนำไปเจือจาง 10 เท่าด้วยสารละลายของ NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ 10^7 CFU/ml

เตรียมสารทดสอบในกรณีสารตัวอย่างเป็นของแข็งให้ชั่งสารประมาณ 200 มิลลิกรัม ในหลอด ependrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อหรือเติม 1% DMSO ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในสารนั้น แล้วนำแต่ละหลอดไปปั่นด้วยเครื่อง vortex mixer (Maxi Max II, Thermolyne, Sybron) จากนั้นทำการเจือจางเป็นลำดับ (two fold serial dilutions) จนความเข้มข้นของสารเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 3.1 แต่ถ้าสารตัวอย่างเป็นของเหลวให้ดูดสารตัวอย่างประมาณ 1000 ไมโครลิตร ในหลอด ependrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางเป็นลำดับด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเช่นเดียวกันจนสารมีความเข้มข้นเท่ากับ 15 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร แสดงในตารางที่ 3.2 (คำนวนสารให้อยู่ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งชั่งสาร 1000 µl มีค่าเท่ากับ 900 mg)

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยการหาค่า (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ด้วยวิธี paper disc diffusion method ดัดแปลงจากวิธีของ NCCLS (1999) โดยหยดสารละลายของสารตัวอย่างปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงใน paper disc ปลอดเชื้อ (Whatman No. 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร) แล้วนำ paper disc ไปวางบนอาหารวุ้นแข็ง MHA (Muller Hinton Agar, Himedia, Mumbai, India) ที่ spread แบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ โดยเรียงลำดับความเข้มข้นของสารสกัดหมากตามภาพที่ 3.1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18±2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) ของวงใสที่เกิดขึ้นด้วยเวอร์เนีย ทำการทดลอง 2 ซ้ำ บันทึกค่า MIC ของสาร แต่ละตัวอย่าง (ค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่ทำให้เกิดวงใส) ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแต่ละชนิด ในการทดลองนี้ใช้ยาปฏิชีวนะแบบ paper disc สำเร็จรูป (Papper Discs, Becton, Dickinson and Company, Irelamd) 3 ชนิดคือ Ampicillin ปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อแผ่น Chloramphenicol ปริมาณ 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น และ Vancomycin ปริมาณ 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น เป็น positive control โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับสารสกัดหมากข้างต้น แต่วางยาปฏิชีวนะตามภาพที่ 3.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

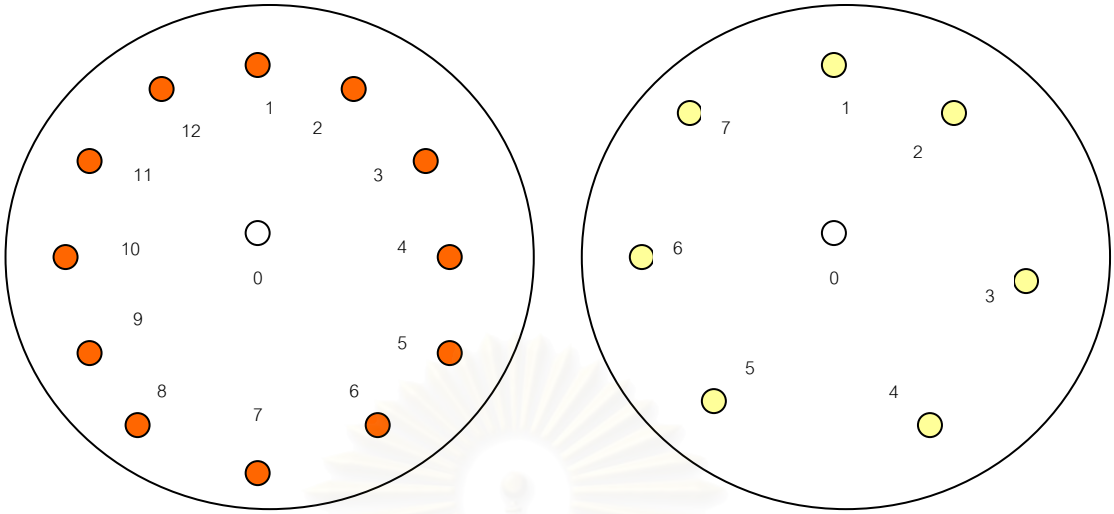
ตารางที่ 3.1 รหัสการเจือจางสารที่เป็นของแข็งด้วยน้ำหรือ 1% DMSO ความเข้มข้น 0.01-200 mg/ml

รหัส	ความเข้มข้นของสารสกัดหมาก (mg/ml)	รหัส	ความเข้มข้นของสารสกัดหมาก (mg/ml)	รหัส	ความเข้มข้นของสารสกัดหมาก (mg/ml)
1	200.00	5	12.50	9	0.78
2	100.00	6	6.25	10	0.39
3	50.00	7	3.13	11	0.20
4	25.00	8	1.56	12	0.01

ตารางที่ 3.2 รหัสการเจือจางสารที่เป็นของเหลวด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 15-1000 µl/ml (14-900 mg/ml)

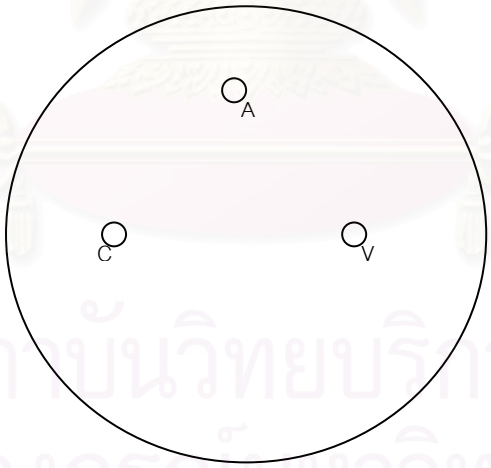
รหัส	ความเข้มข้นของสาร (µl/ml)	ความเข้มข้นของสาร (mg/ml)
1	1000.00	900.00
2	500.00	450.00
3	250.00	225.00
4	125.00	112.50
5	62.50	56.25
6	31.25	28.13
7	15.62	14.06

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สารที่เจือจางเป็นของแข็ง (ก) สารที่เจือจางเป็นของเหลว (ข)

ภาพที่ 3.1 รูปแบบการวาง paper disc ปลอดเชื้อที่หยดสารตัวอย่างตามรหัสการเจือจางสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 5 ไมโครลิตรต่อดิสก์ โดย negative control (รหัส 0) คือน้ำ หรือ 1% DMSO (ก) สารที่เจือจางเป็นของแข็ง (ข) สารที่เจือจางเป็นของเหลว



ภาพที่ 3.2 รูปแบบการวางยาปฏิชีวนะ (positive control)

A: Ampicillin ปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อแผ่น

C: Chloramphenicol ปริมาณ 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น

V: Vancomycin ปริมาณ 30 ไมโครกรัมต่อแผ่น

3.2.2 การตรวจสอบด้วยวิธี macro broth dilution method

เตรียมแบคทีเรียและสารที่จะใช้ทดสอบ (เตรียมแบบของเหลว) เช่นเดียวกับ ข้อ 3.2.1 ต่างกันที่ใช้อาหารเหลว MHB ในการเจือจางเป็นลำดับแทนน้ำและในหลอดสุดท้ายให้ดูดสารทิ้งไป 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำแบคทีเรียที่เตรียมไว้ปริมาณ 500 ไมโครลิตรผสมในสารแต่ละหลอด นำแต่ละหลอดไปผสมให้เข้ากันด้วย Vortex Mixer แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18±2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแต่ละหลอดมา spread ในอาหารวุ้นแข็ง MHA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18±2 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นบันทึกค่า (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) โดยบันทึกความเข้มข้นต่ำสุดที่แบคทีเรียไม่ขึ้นในอาหารวุ้นแข็ง MHA ถือว่าความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC

ในการทดลองนี้ negative control ใช้อาหารเหลว MHB ปริมาณ 500 ไมโครลิตรผสมกับแบคทีเรียทดสอบปริมาณ 500 ไมโครลิตร และใช้ positive control แบบดิสก์สำเร็จรูปเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1 จำนวน 1 ดิสก์ใส่ลงไปในแบคทีเรียทดสอบที่เจือจางด้วยอาหารเหลวเช่นกัน ปริมาณ 1000 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มพร้อมกับสารที่จะทดสอบเช่นเดียวกับข้างต้น เมื่อนำไป spread ในอาหาร MHA ค่า MIC จะประเมินได้จากความเข้มข้นของสารในหลอดถัดจากค่า MBC ที่มีจำนวนแบคทีเรียขึ้นซึ่งน้อยกว่าจำนวนแบคทีเรียที่เจริญใน negative control โดยคำนวณจำนวนโคโลนีที่ขึ้นเป็น log CFU/ml

3.3 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหมาก

นำหมากที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ จากข้อ 3.1 ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยการหาค่า MIC ตามวิธีในข้อ 3.2.1

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพในการละลายของสารสกัดหมากในน้ำมันถั่วเหลืองและในน้ำ

3.4.1 การละลายในน้ำมันถั่วเหลือง

นำสารสกัดหมากกลุ่ม nonpolar คือสารสกัดหมากด้วยอะซิโดตและเอธิลอะซิเตต มาละลายในน้ำมันถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 28°C และ 50°C โดยชั่งสารสกัดหมากประมาณ 0.002 กรัม ในหลอด ependrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำมันถั่วเหลือง (มรกต บริษัท มรกต อินดัสตรีส์ ,พระประแดง, สมุทรปราการ) ประมาณ 0.5 กรัม ลงไปในสารสกัดหมาก ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ทิ้งไว้สักครู่ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge (Mikro 22R, Hettich AG, Tuttlingen, Germany) ความเร็วรอบ 31876 RCF ที่ 25°C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้ดูดส่วนใสเก็บใส่หลอด ependrof หลอดใหม่ ชั่งปริมาณสารสกัดใน

หลอดเดิมเพื่อคำนวณหาปริมาณสารที่ละลายในน้ำมันถั่วเหลือง ในกรณีที่สารละลายได้น้อยมาก ให้เติมน้ำมันถั่วเหลืองประมาณ 0.5 กรัมลงในหลอดเดิม นำไปเขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker ความเร็วรอบ 200 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เช่นเดิม ดูดส่วนใสเก็บใส่หลอด ependrof หลอดใหม่แล้วชั่งปริมาณสารสกัดที่เหลือในหลอดเดิมเพื่อคำนวนหาปริมาณสารที่ละลายในน้ำมันถั่วเหลืองอีกครั้ง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยที่อุณหภูมิ 50 °C ทำวิธีเช่นเดียวกับที่ 28 °C ต่างกันที่อุณหภูมิการเก็บและการนำไปเขย่าด้วยเครื่อง water bath shaker แทน rotary shaker ตั้งอุณหภูมิที่ 50 °C ความเร็วรอบ 100 rpm

3.4.2 การละลายในน้ำ

ชั่งสารสกัดหมากที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอล 95% และอะซิโตน ประมาณ 0.002 กรัม ในหลอด ependrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่นปลอดเชื้อประมาณ 0.5 กรัม แล้วทำวิธีเช่นเดียวกับการละลายในน้ำถั่วเหลืองต่างกันที่ไม่ต้องดูดส่วนใสออก ไม่ต้องนำไปเขย่าข้ามคืน และไม่ต้องทำที่อุณหภูมิ 50 °C โดยใส่สารครั้งละ 0.002 กรัม ในหลอดเดิม ปั่นเหวี่ยงทำซ้ำเรื่อย ๆ จนสารไม่ละลาย

3.5 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหมากแบบผสม

นำสารสกัดหมากที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสูงสุด 2 อันดับมาผสมกันที่ ความเข้มข้น MIC มากที่สุดในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด แล้วละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 1000 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเจือจางเป็นลำดับและหาค่า MIC เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

3.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืชและตัวทำละลาย

3.6.1 การคัดเลือกและหาค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียดีที่สุด

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย 4 ชนิด คือน้ำมันโหระพา (sweet basil oil) น้ำมันสะระแหน่ (peppermint oil) น้ำมันมะนาว (lemon oil) และน้ำมันส้ม (orange b oil) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทยจีน นนทบุรี ประเทศไทย ตามวิธีใน ข้อ 3.2.1 โดยใช้น้ำมันหอมระเหย 100% เลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสมากที่สุด

การหาค่า MIC ของน้ำมันสะระแหน่ทำตามวิธีในข้อ 3.2.1 โดยเตรียมสารแบบที่เป็นของเหลวและเจือจางน้ำมันด้วยสารละลายน้ำ Tween 20 ร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก

3.6.2 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียสูงสุดซึ่งละลายในชนิดและความเข้มข้นของ Tween ต่างกัน

ทดสอบหาค่า MIC เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1 แต่ใช้สารละลาย Tween 20 และ Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0 โดยน้ำหนักเป็นสารเจือจางน้ำมันที่ได้จากข้อ 3.5.1

3.7 การผลิตอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำที่ประกอบด้วยสารสกัดจากหมากและน้ำมันสะระแหน่

3.7.1 การหาค่า cmc (critical micelle concentration) ของสารละลายตัวทำอิมัลชัน Tween 20 ในน้ำ

เตรียมสารละลายตัวทำอิมัลชัน Tween20 (analytical grade, Merck, Germany) ให้มีความเข้มข้นร้อยละตั้งแต่ 100 ถึง 1.67 x 10^{-5} โดยน้ำหนัก โดยทำการเจือจางลงเป็นลำดับด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายตัวทำอิมัลชันดังกล่าวไปวัดแรงตึงผิวด้วยวิธี pendant drop โดยเครื่อง goniometer (FTA 100, First Ten Angstroms, Inaporated, USA) ทำการวัดตัวอย่างละ 5 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย plot ค่าแรงตึงผิวกับความเข้มข้นของ Tween 20 เพื่อหาค่า cmc ของ Tween 20

3.7.2 การเตรียมอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ในน้ำที่ไม่มีและมีสารสกัดหมาก

3.7.2.1 การเตรียมวัฏภาคน้ำ

เตรียมวัฏภาคน้ำที่แปรปริมาณของ Tween 20 และสารสกัดหมากด้วยน้ำและด้วยเอทานอลดังที่แสดงในตารางที่ 3.1 ละลาย Tween 20 ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาณที่ต้องการก่อนเขย่าเบาๆให้ Tween 20 ละลายอย่างช้าๆที่อุณหภูมิห้อง (28 °C) ระวังไม่ให้เกิดฟองจน Tween 20 ละลายหมด ในกรณีที่มีสารสกัดหมากด้วยน้ำและด้วยเอทานอลเป็นองค์ประกอบ ละลายสารสกัดหมากด้วยน้ำและด้วยเอทานอลในสารละลายน้ำของ Tween 20 ที่เตรียมได้ข้างต้นให้ได้ปริมาณที่ต้องการซึ่งเท่ากับค่า MIC ของสารสกัดหมากด้วยน้ำและด้วยเอทานอลที่สูงสุดที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 3.3 นำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียตามรายละเอียดในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2

3.7.2.2 การเตรียมอิมัลชัน

เตรียมอิมัลชันให้มีความเข้มข้นของน้ำมันสะระแหน่เท่ากับค่า MIC ของน้ำมันสะระแหน่สูงสุดที่วิเคราะห์ได้จากข้อ 3.5.1 คือร้อยละ 5.6 โดยน้ำหนัก โดยแปรความเข้มข้นของสารสกัดหมากด้วยน้ำและด้วยเอทานอล และ Tween 20 ดังที่แสดงในตารางที่ 3.1 โดยเติมน้ำมันสะระแหน่ลงในวัฏภาคน้ำต่างๆ ที่เตรียมได้ในข้อ 3.7.2.1 พร้อมกวนให้หยดน้ำมันสะระแหน่แขวนลอยในสารละลายน้ำ แล้วนำไปทำให้หยดน้ำมันแตกมีขนาดเล็กลงและกระจายในสารละลายน้ำได้ดีขึ้นโดยใช้คลื่นเหนือเสียง (SONOPLUS ULTRASONIC HOMOGENIZERS HD 2200, KE 76 Titanium tapered Tip Order no. 530 diameter 6 mm, Germany) ที่ 300 watt 20 kHz เป็นเวลา 30 นาที มีการหล่อภาชนะที่ใช้เตรียมอิมัลชันด้วยน้ำผสมน้ำแข็งตลอดเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงเพื่อถ่ายเทความร้อน ต้านแบคทีเรียดีที่สุดจากการทดสอบแบบ [illegible] จากนั้นเก็บอิมัลชันที่เตรียมได้ในขวดแก้วสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28°C) เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป สำหรับอิมัลชัน ที่มีความเข้มข้นของ Tween 20 ร้อยละ 15 และ 20 โดยน้ำหนักนำไปทำให้หยดน้ำมันแตกมีขนาดเล็กลงและกระจายในสารละลายน้ำได้ดีขึ้นโดยใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 300 watt 20 kHz เป็นเวลา 15 นาที ผสมซ้ำหลังการเตรียมครั้งแรก 7 วัน แล้วจึงนำไปเก็บที่สภาวะดังกล่าวข้างต้นจึงนำไปวิเคราะห์ขั้นต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของสารละลายน้ำของ Tween 20 และ/หรือสารสกัดหมาก วัฏภาคน้ำและอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ในน้ำที่ความเข้มข้นของน้ำมันสะระแหน่ร้อยละ 5.60 โดยน้ำหนัก

ตัวอย่าง			**วัฏภาคน้ำ**				**วัฏภาคน้ำมัน**
สารละลายน้ำของ Tween 20 และสารสกัดหมากที่มีความเข้มข้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก) ของ			**ปริมาณ (กรัม) ของ**				**ปริมาณ (กรัม) ของ น้ำมันสะระแหน่**
Tween 20	**สารสกัดหมากด้วย**		**น้ำ**	Tween 20	**สารสกัดหมากด้วย**		
	น้ำ	**เอทานอล**			**น้ำ**	**เอทานอล**	
15	-	-	85.00	15.00	-	-	-
15	0.15	0.15	84.70	15.00	0.15	0.15	-
20	-	-	80.00	20.00	-	-	-
20	0.15	0.15	79.70	20.00	0.15	0.15	-
25	-	-	75.00	25.00	-	-	-
25	0.15	0.15	74.70	25.00	0.15	0.15	-
30	-	-	70.00	30.00	-	-	-
30	0.15	0.15	69.70	30.00	0.15	0.15	-
อิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ในน้ำที่มีความเข้มข้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก) ของ			**ปริมาณ (กรัม) ของ**				**ปริมาณ (กรัม) ของ น้ำมันสะระแหน่**
Tween 20	**สารสกัดหมากด้วย**		**น้ำ**	Tween 20	**สารสกัดหมากด้วย**		
	น้ำ	**เอทานอล**			**น้ำ**	**เอทานอล**	
15	-	-	79.40	15.00	-	-	5.60
15	0.15	0.15	79.10	15.00	0.15	0.15	5.60
20	-	-	74.40	20.00	-	-	5.60
20	0.15	0.15	74.10	20.00	0.15	0.15	5.60
25	-	-	69.40	25.00	-	-	5.60
25	0.15	0.15	79.10	25.00	0.15	0.15	5.60
30	-	-	64.40	30.00	-	-	5.60
30	0.15	0.15	64.10	30.00	0.15	0.15	5.60

3.8 ศึกษาผลความเข้มข้นของสารละลายตัวทำอิมัลชัน Tween 20 ต่อความเสถียรอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ในน้ำในระบบที่มีและไม่มีสารสกัดหมาก

นำอิมัลชันในข้อ 3.6.2 ไปวิเคราะห์ขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคของน้ำมันและระยะเวลาที่พบการแยกชั้นของอิมัลชัน ในกรณีที่เกิดการแยกชั้น ให้นำส่วนที่ยังคงมีลักษณะเป็นอิมัลชันมาวิเคราะห์

3.8.1 ขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคของน้ำมัน

นำผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะขุ่นไปวิเคราะห์หาขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคหลังการเตรียม 1 7 14 และ 56 วัน ด้วยเครื่อง Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK) ในกรณีที่เป็นของเหลวใสซึ่งคาดว่าเป็น micellar emulsion นำไปวัดด้วยเครื่อง Zetasizer (NanoZS, Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK) โดยส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ถ.พหลโยธิน ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ประเทศไทย

3.8.2 ระยะเวลาที่พบการแยกชั้นของอิมัลชัน

ตรวจสอบการแยกชั้นอิมัลชันด้วยตาเปล่าโดยเก็บอิมัลชันที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์นี้ในขวดแก้วใสเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ใส่อิมัลชันปริมาณ 10 มิลลิลิตร (สูง 4 เซนติเมตร) แทนขวดแก้วสีชาและเก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง และนำออกมาตรวจสอบทุกวันในสัปดาห์แรก จากนั้นนำออกมาตรวจสอบเดือนละครั้งจนครบ 84 วัน หรือจนกว่าจะมีการแยกชั้น

3.9 ศึกษาผลความเข้มข้นของสารละลายตัวทำอิมัลชัน Tween 20 ต่อฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของสารละลายน้ำของสารสกัดหมากและอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ในน้ำในระบบที่มีและไม่มีสารสกัดจากผลหมาก

นำตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 3.6.2 (ที่เก็บในขวดแก้วสีชาแยกตามวันที่จะทดสอบ คือ 1 7 14 28 42 56 และ 84 วัน) ไปวิเคราะห์ค่า MIC และ MBC ตามวิธีในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 โดยวิธีในข้อ 3.2.2 ให้ทดสอบที่อายุการเก็บ 1 7 14 28 98 และ 154 วัน ในกรณีที่เกิดการแยกชั้น ให้นำส่วนที่ยังคงมีลักษณะเป็นอิมัลชันมาวิเคราะห์ขนาดและการกระจายขนาด และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

บทที่ 4

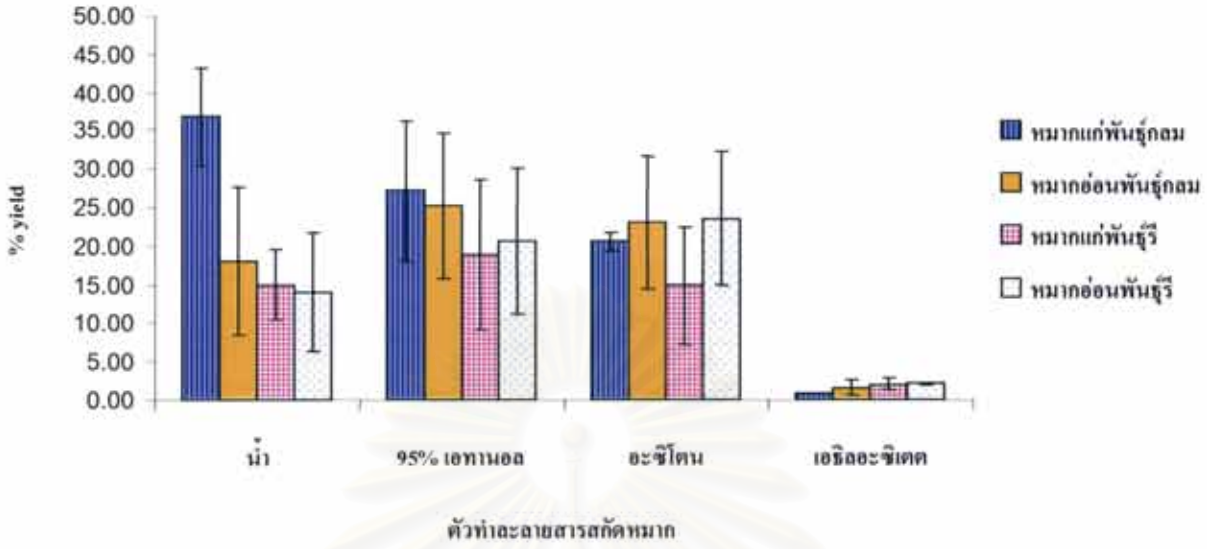
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสกัดสารจากหมาก

สารสกัดที่ได้จากหมากส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นของแข็งสีเข้มโดยผลแก่จะมีสีเข้มกว่าผลอ่อน ยกเว้นสารสกัดจากเอธิลอะซิเตตจะมีลักษณะเป็นไข ตามตารางที่ 4.1 และสารสกัดหมากส่วนใหญ่ที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลจะมี % yield มากกว่าที่สารสกัดหมากด้วยอะซิโตนและเอธิลอะซิเตต ตามภาพที่ 4.1 พบว่าสารสกัดหมากแก่พันธุ์กลมที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลจะมี % yield สูงสุดดังนี้คือ 36.81±6.47 % และ 27.11±9.18% ตามลำดับ แต่ในสารสกัดหมากอ่อนพันธุ์รีที่สกัดด้วยอะซิโตนและสารสกัดหมากแก่พันธุ์รีที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตตกลับมี % yield สูงสุดดังนี้คือ 23.57±8.71% และ 2.06±0.83% ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 พันธุ์ อายุ และตัวทำละลายที่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของสารสกัดหมากที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ

พันธุ์หมาก	อายุหมาก	ตัวทำละลาย	ลักษณะทางกายภาพ
กลม	แก่	น้ำ	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
กลม	อ่อน	น้ำ	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
รี	แก่	น้ำ	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
รี	อ่อน	น้ำ	ของแข็งสีน้ำตาลอ่อน
กลม	แก่	เอทานอล 95%	ของแข็งสีดำ
กลม	อ่อน	เอทานอล 95%	ของแข็งสีน้ำตาลแดงเข้ม
รี	แก่	เอทานอล 95%	ของแข็งสีดำ
รี	อ่อน	เอทานอล 95%	ของแข็งสีน้ำตาลแดงเข้ม
กลม	แก่	อะซิโตน	ของแข็งสีดำ
กลม	อ่อน	อะซิโตน	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
รี	แก่	อะซิโตน	ของแข็งสีดำ
รี	อ่อน	อะซิโตน	ของแข็งสีน้ำตาลเข้ม
กลม	แก่	เอธิลอะซิเตต	ไขสีเหลืองเข้ม
กลม	อ่อน	เอธิลอะซิเตต	ไขสีน้ำตาลอ่อน
รี	แก่	เอธิลอะซิเตต	ไขสีเหลืองเข้ม
รี	อ่อน	เอธิลอะซิเตต	ไขสีน้ำตาลอ่อน



ภาพที่ 4.1 ปริมาณ yield ของสารสกัดหมากที่มี พันธุ์ อายุ และตัวทำละลายที่ใช้สกัดต่างกัน

4.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหมาก

ค่า MIC ของสารสกัดหมากด้วยวิธี paper disc diffusion method แสดงตามตารางที่ 4.2 พบว่าสารสกัดหมากแก่พันธุ์รีที่สกัดด้วยอะซิโตนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้สูงสุดซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 0.78 mg/ml รองลงมาคือหมากแก่พันธุ์รีที่สกัดด้วยน้ำและหมากแก่พันธุ์กลมที่สกัดด้วยเอทานอลซึ่งให้ผลเหมือนกันคือค่า MIC ในการยับยั้ง *B. cereus* *S. aureus* *E. coli* เท่ากับ 0.78 mg/ml และค่า MIC ในการยับยั้ง *S.* Typhimurium เท่ากับ 1.56 mg/ml ส่วนสารสกัดหมากด้วยเอธิลอะซิเตต ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้ต่ำกว่าสารสกัดอื่น จากงานวิจัยของ Panomporn และ Savitri (2009) ได้หาค่า MIC ของสารสกัดหมากที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลในการยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* ประเมินจากค่าเฉลี่ยวงใสที่มากกว่า 10 มิลลิเมตร และใส่สารสกัดหมากลงใน paper disc ปริมาณ 20 ไมโครลิตรต่อดิสก์ พบว่าค่า MIC เท่ากับ 125 mg/ml และ 62.5 mg/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสอง พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้ง *B. cereus* ต่ำกว่า *S. aureus* ในขณะที่ผลการทดลองข้อนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* เท่ากัน คือ 0.78 mg/ml ที่เป็นเช่นนี้เพราะพันธุ์หมาก อายุและแหล่งการปลูกหมากที่ต่างกัน ส่งผลให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียต่างกัน (Mathew และ Govindarajan, 1964) ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงคัดเลือกสารสกัดหมากที่มีประสิทธิภาพในการ

ยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด 3 ชนิด คือ สารสกัดหมากแก่พันธุ์รีที่สกัดด้วยอะซิโตน สารสกัดหมากแก่พันธุ์รีที่สกัดด้วยน้ำและสารสกัดหมากแก่ พันธุ์กลมที่สกัดด้วยเอทานอล 95%

ตารางที่ 4.2 พันธุ์หมาก อายุ และตัวทำละลายที่มีผลต่อค่า MIC ของสารสกัดหมาก (หน่วยมิลลิกรัม:มิลลิลิตร)

พันธุ์หมาก	อายุหมาก	ตัวทำละลาย	MIC (mg/ml)			
			B. cereus ATCC 1729	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*S.* Typhimurium ATCC 13811
กลม	แก่	น้ำ	0.78	0.78	1.56	1.56
กลม	อ่อน	น้ำ	0.78	0.78	1.56	1.56
รี	แก่	น้ำ	0.78	0.78	0.78	1.56
รี	อ่อน	น้ำ	1.56	1.56	1.56	3.13
กลม	แก่	เอทานอล 95%	0.78	0.78	0.78	1.56
กลม	อ่อน	เอทานอล 95%	0.78	1.56	0.78	0.78
รี	แก่	เอทานอล 95%	0.78	1.56	0.78	1.56
รี	อ่อน	เอทานอล 95%	0.78	1.56	0.78	1.56
กลม	แก่	อะซิโตน	0.78	0.78	1.56	0.78
กลม	อ่อน	อะซิโตน	0.78	0.78	0.78	1.56
รี	แก่	อะซิโตน	0.78	0.78	0.78	0.78
รี	อ่อน	อะซิโตน	1.56	1.56	0.78	1.56
กลม	แก่	เอธิลอะซิเตต	6.25	6.25	6.25	6.25
กลม	อ่อน	เอธิลอะซิเตต	1.56	1.56	1.56	1.56
รี	แก่	เอธิลอะซิเตต	6.25	6.25	6.25	6.25
รี	อ่อน	เอธิลอะซิเตต	1.56	3.13	1.56	3.13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการละลายของสารสกัดหมากที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำในน้ำมันถั่วเหลืองและในน้ำ

สารสกัดหมากด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ คือ สารสกัดหมากด้วยอะซิโตนและเอธิลอะซิเตตมีการละลายในน้ำมันถั่วเหลืองได้ต่ำมาก โดยสารสกัดทั้งสองมีการละลายในน้ำมันถั่วเหลืองได้น้อยกว่า 4 mg/ml ถึงแม้จะมีการเพิ่มอุณหภูมิและเขย่าข้ามคืนก็ไม่ทำให้การละลายนั้นเพิ่มขึ้น ส่วนสารสกัดหมากที่สกัดด้วยน้ำและ เอทานอล 95%เป็นสารที่มีขั้วสูงจึงไม่นำไปละลายในน้ำมันถั่วเหลือง

สารสกัดหมากที่สกัดด้วยอะซิโตนมีการละลายในน้ำได้ 48 mg/ml ในขณะที่สารสกัดหมากที่สกัดด้วยน้ำและ เอทานอล 95% มีการละลายในน้ำได้ 60 mg/ml ส่วนสารสกัดหมากด้วยเอธิลอะซิเตตเป็นสารที่มีขั้วต่ำมากจึงไม่ทำการทดสอบการละลายในน้ำ

ดังนั้นสารสกัดหมากที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำ คือ สารสกัดหมากที่สกัดด้วยเอธิลอะซิเตตซึ่ง มี % yield ต่ำที่สุดและมีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด และสารสกัดหมากที่สกัดด้วยอะซิโตนซึ่งแม้ว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงสุดแต่มีประสิทธิภาพในการละลายในน้ำมันต่ำมากและมีประสิทธิภาพในการละลายในน้ำได้ต่ำกว่าสารสกัดหมากที่สกัดด้วยน้ำและ เอทานอล 95% จึงไม่นำไปทำการทดลองในขั้นต่อไป แต่เลือกสารสกัดหมากที่สกัดด้วยน้ำและ เอทานอล 95% ไปทำการทดลองในขั้นต่อไปแทน ที่เป็นเช่นนี้เพราะสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสกัดได้จากตัวทำละลายที่มีขั้วสูงโดยเฉพาะสารในกลุ่มแทนนิน (Wang and Lee,1996)

4.4 ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสาสกัดหมากแบบผสม

สารสกัดหมากแก่พันธุ์รีที่สกัดด้วยน้ำและสารสกัดหมากแก่พันธุ์กลมที่สกัดด้วย 95% เอทานอล ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสูง โดยมีค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้มากที่สุดคือ 1.56 mg/ml ดังนั้นจึงนำสารสกัดหมากทั้งสองแบบมาผสมกันอย่างละ 1.56 mg/ml เพื่อหวังให้ผลการยับยั้งดีขึ้น ผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* และ *S.* Typhimurium เพิ่มขึ้นสองเท่าเมื่อเทียบกับประสิทธิภาพในการยังยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหมากแต่ละชนิดที่ไม่ได้ผสมกัน โดยค่า MIC ของ *B. cereus* จาก 0.75 mg/ml เป็น 0.38 mg/ml และ *S.* Typhimurium จาก 1.56 mg/ml เป็น 0.75 mg/ml แต่ค่า MIC ของ *S. aureus* และ *E. coli* มีค่าเท่าเดิมคือ 0.75 mg/ml ตามตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลของสารสกัดหมากต่อค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรีย (หน่วยมิลลิกรัม:มิลลิลิตร)

แบคทีเรีย	ค่า MIC (mg/ml)		
	สกัดด้วยน้ำ	สกัดด้วย เอทานอล 95%	สกัดด้วยน้ำ 1.5 mg/ml ผสม สกัดด้วย เอทานอล 95% 1.5 mg/ml
B. cereus ATCC 1729	0.78	0.78	0.38
S. aureus ATCC 25923	0.78	0.78	0.75
E. coli ATCC 25922	0.78	0.78	0.75
S. Typhimurium ATCC 138111	1.56	1.56	0.75

4.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืชและตัวทำละลาย

4.5.1 ผลการคัดเลือกและหาค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชที่ให้ผลในการต้านแบคทีเรียดีที่สุด

ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืชตามผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย ดังในตารางที่ 4.4 พบว่าน้ำมันสะระแหน่มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดสูงสุด รองลงมาคือ น้ำมันโหระพา มะนาว และส้ม ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Prabuseenivasan และคณะ (2006) ศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียจากน้ำมันหอมระเหยจากพืช โดยน้ำมันมะนาวและส้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* เท่ากัน แต่จากการทดลองน้ำมันมะนาวมีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำมันส้ม นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ในน้ำมันส้มมีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำมันมะนาว แต่จากการทดลองพบว่าน้ำมันมะนาวมีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำมันส้ม

น้ำมันที่ให้ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสสูงสุดคือน้ำมันสะระแหน่ โดยมีค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus S. aureus E. coli* และ *S.* Typhimurium เท่ากับ 56 225 56 และ 56 mg/ml ตามลำดับ ตามตารางที่ 4.5 และจากงานวิจัยของ Gupta และคณะ (2008) พบว่าค่า MIC ของน้ำมันสะระแหน่ในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus S. aureus* และ *E. coli* เท่ากับ 125 62.5 และ 500 mg/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้ง

แบคทีเรียจากสูงไปต่ำ คือ *S. aureus* *B. cereus* และ *E. coli* ตามลำดับ แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียจากการทดลอง คือ *B. cereus* เท่ากับ *E. coli* แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ต่ำสุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะน้ำมันสะระแหน่ที่ใช้และแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบต่างกัน ทำให้ค่าที่ได้ต่างกัน

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากพืช (5 µl) ที่นำมาทดสอบ

แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเฉลี่ย (มิลลิเมตร)			
	น้ำมันโหระพา	น้ำมันสะระแหน่	น้ำมันมะนาว	น้ำมันส้ม
B .cereus ATCC 1729	9.67^{ab}±2.08	10.00^{a}±0.00	9.67^{ab}±0.58	8.00^{b}±1.00
S. aureus ATCC 25923	15.33^{ab}±0.58	17.00^{a}±2.65	13.67^{ab}±2.08	10.33^{b}±0.58
E. coli ATCC 25922	10.67^{ab}±2.08	15.33^{a}±4.16	10.67^{ab}±1.15	8.33^{b}±0.58
S. Typhimurium ATCC 138111	15.67^{ab}±4.04	17.33^{a}±3.06	13.33^{ab}±5.77	11.33^{b}±3.21

หมายเหตุ: ตัวอักษร a, b, c, ... ที่แสดงในแถวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ค่า MIC ของน้ำมันสะระแหน่ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (หน่วยมิลลิกรัม : มิลลิลิตร)

แบคทีเรีย	ค่า MIC (mg/ml)
B .cereus ATCC 1729	56
S. aureus ATCC 25923	225
E. coli ATCC 25922	56
S. Typhimurium ATCC 138111	56

4.5.2 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียซึ่งละลายในชนิดและความเข้มข้นของ Tween ต่างกัน

ค่า MIC ที่ได้จากการเจือจางกับสารละลาย Tween 20 และ Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 โดยน้ำหนักพบว่าเมื่อเจือจางกับสารละลาย Tween 20 จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสูงกว่าการเจือจางกับสารละลาย Tween 80 และพบว่าเจือจางกับ Tween ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสูงกว่าเจือจางกับ Tween ที่มีความเข้มข้นต่ำ ตามตารางที่ 4.6 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก Tween 20 เป็นสารลดแรงตึงผิวเมื่อใช้ในปริมาณที่เข้มข้นอาจมีผลต่อเซลล์ของแบคทีเรียได้ดังงานวิจัยของ Rodrigues Brito และ Melo (2009) ที่พบว่าสารลดแรงตึงผิว Tween 20 มีผลในการลดอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* โดยมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียเมื่อมีความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 10 และเมื่อความเข้มข้นสูงจนถึงร้อยละ 50 จะเป็นพิษต่อเซลล์ โดยทำให้เซลล์เกิดความเสียหายและอาจทำให้เซลล์ตายได้ ดังนั้นการนำ Tween 20 มาใช้ในความเข้มข้นสูงจึงมีผลให้การเจริญของแบคทีเรียลดลงได้ ซึ่งจากงานวิจัยและการทดลองนี้เป็นไปในทำนองเดียวกัน

นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันสะระแหน่ที่เจือจางด้วย Tween 20 ร้อยละ 1 มีความเสถียรสูงสุดเมื่อเทียบกับตัวอื่น เมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดการแยกชั้นได้ เกิดเป็นความไม่เสถียรของสารเกิดขึ้นซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียต่ำกว่าที่ควรจะเป็น

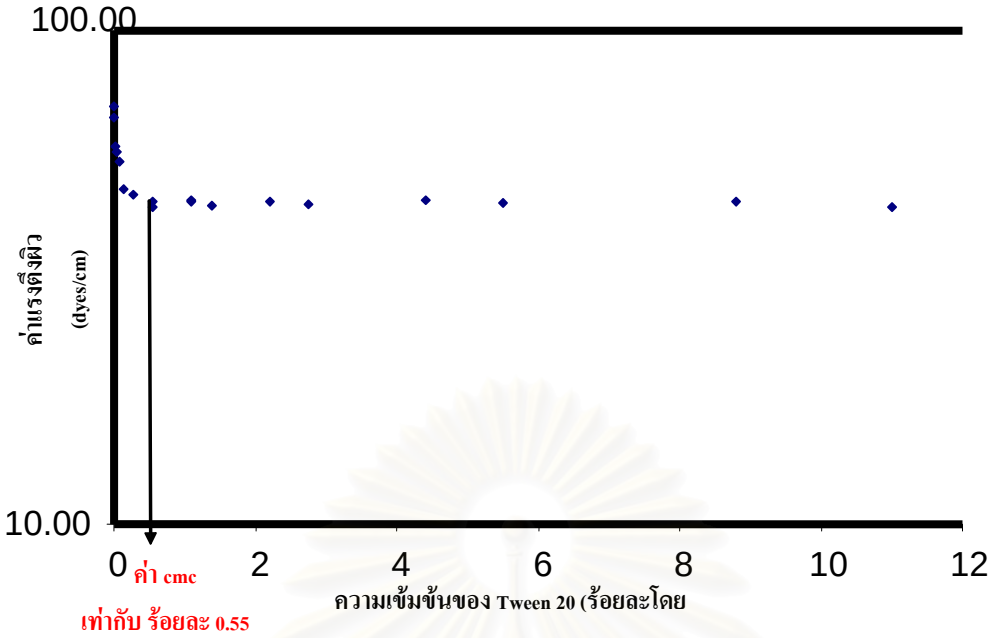
ตารางที่ 4.6 ค่า MIC ของน้ำมันสะระแหน่ที่ละลายในชนิดและความเข้มข้นของ Tween ต่างกันต่อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (หน่วยมิลลิกรัม:มิลลิลิตร)

แบคทีเรีย	MIC (mg/g)			
	Tween 20		Tween 80	
	ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก	ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก	ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก	ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก
B .cereus ATCC 1729	112	56	225	112
S. aureus ATCC 25923	225	225	225	225
E. coli ATCC 25922	56	56	56	56
S. Typhimurium ATCC 138111	56	56	112	56

4.6 การผลิตอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำที่ประกอบด้วยสารสกัดจากหมากและน้ำมันสะระแหน่

4.6.1 ผลการหาค่า cmc (critical micelle concentration) ของสารละลายตัวทำอิมัลชัน Tween 20 ในน้ำ

เมื่อนำความเข้มข้นของสารละลาย Tween 20 และค่าแรงตึงผิวมาหาความสัมพันธ์ที่อุณหภูมิ 28 °C ตามภาพที่ 4.2 พบว่าค่า cmc ของ Tween 20 เท่ากับร้อยละ 0.55 โดยน้ำหนัก จากงานวิจัยของ Chunhee และ Hsieh (2001) และ Koga Ohyashiki Murakami และ Kawashima (2000) มีการหาค่า cmc เช่นกันแต่ ค่าที่ได้ต่างจากค่าที่ได้จากการทดลองนี้ เนื่องจากค่า cmc จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการทดลอง ชนิดตัวทำละลายและสารที่ปนเปื้อนในตัวทำละลายนั้น



ภาพที่ 4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวกับความเข้มข้นของ Tween 20 (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

4.6.2 ผลการเตรียมอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ในน้ำที่ไม่มีและมีสารสกัดหมาก

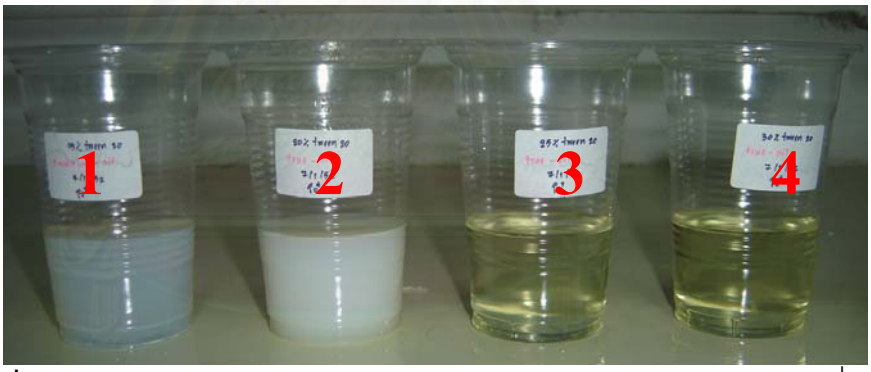
ลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์แสดงผลในตารางที่ 4.7 โดยผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 15 และ 20 โดยน้ำหนัก จะมีลักษณะขุ่นสีขาวแต่ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 25 และ 30 โดยน้ำหนัก จะเกิดเป็นสารละลายไมเซลล์ซึ่งมีลักษณะใส โดยมี Tween 20 ล้อมรอบน้ำมันสะระแหน่ในน้ำ แสดงในภาพที่ 4.3 ส่วนผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดหมากเป็นส่วนผสมจะมีลักษณะเช่นเดียวกันแต่จะมีสีแดงเข้มของหมากซึ่งอยู่ในวัฏภาคน้ำ แสดงในภาพที่ 4.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อลักษณะของอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากในน้ำ โดยใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที

องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)				ลักษณะของอิมัลชัน
น้ำมันสะระแหน่	Tween 20	น้ำ	สารสกัดเมล็ดหมาก	
5.60	15	79.40	no	อิมัลชันขุ่นสีขาวอมฟ้า
5.60	20	74.40	no	อิมัลชันขุ่นสีขาว
5.60	25	69.40	no	อิมัลชันใสสีเหลืองอ่อน
5.60	30	64.40	no	อิมัลชันใสสีเหลืองอ่อน
5.60	15	79.10	0.30	อิมัลชันขุ่นสีน้ำตาลอ่อน
5.60	20	74.10	0.30	อิมัลชันขุ่นสีน้ำตาลเข้ม
5.60	25	69.10	0.30	อิมัลชันใสสีน้ำตาลเข้ม
5.60	30	64.10	0.30	อิมัลชันใสสีน้ำตาลเข้ม

หมายเหตุ: no คือ ไม่ใส่



ภาพที่ 4.3 ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์เมื่อผสมน้ำมันสะระแหน่ในน้ำโดยใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที

1 คือ อิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก

2 คือ อิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก

3 คือ อิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 25 โดยน้ำหนัก

4 คือ อิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก

ภาพที่ 4.4 ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์เมื่อผสมน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากในน้ำโดยใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที

5 คือ อิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 15

6 คือ อิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 20

7 คือ อิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 25

8 คือ อิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 30

4.7 ความเข้มข้นของสารละลายตัวทำอิมัลชัน Tween 20 ต่อความเสถียรอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ในน้ำในระบบที่มีและไม่มีสารสกัดหมาก

4.7.1 ระยะเวลาที่พบการแยกชั้นของอิมัลชัน

ความเสถียรของผลิตภัณฑ์ผสมน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมาก แสดงในตารางที่ 4.8 ผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก จะมีการแยกชั้นหลังการเตรียมไว้ 7 วัน แต่เมื่อใส่สารสกัดหมากผสมด้วยในผลิตภัณฑ์จะพบการแยกชั้นหลังการเตรียม 1 วัน ส่วนผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนักทั้งที่มีและไม่มีสารสกัดหมาก จะพบการแยกชั้นหลังการเตรียมไว้ 1 วัน ส่วนผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 25 และ 30 โดยน้ำหนัก ไม่พบการแยกชั้น

เมื่อเตรียมผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง 28 °C ผลิตภัณฑ์มีลักษณะปรากฏแสดงในภาพที่ 4.5 โดยผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 15 และ 20 โดยน้ำหนัก ที่เกิดการแยกเป็น 2 ชั้น คือผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 20 ทั้งที่มีและไม่มีสารสกัดหมาก และผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 15 และมีสารสกัดหมากเป็นส่วนผสม โดยผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 20 จะเห็นการแยกเป็น 2 ชั้นอย่างชัดเจน ซึ่งในส่วนบนจะมีลักษณะขุ่นสีขาว ส่วนล่างจะมีลักษณะใส ที่เป็นเช่นนี้เพราะเกิดเป็นสารละลายไมเซลล์ได้ในส่วนที่ใส แต่ยังคงมีบางส่วนที่ยังมีลักษณะเป็นอิมัลชัน ต้องอาศัยแรง

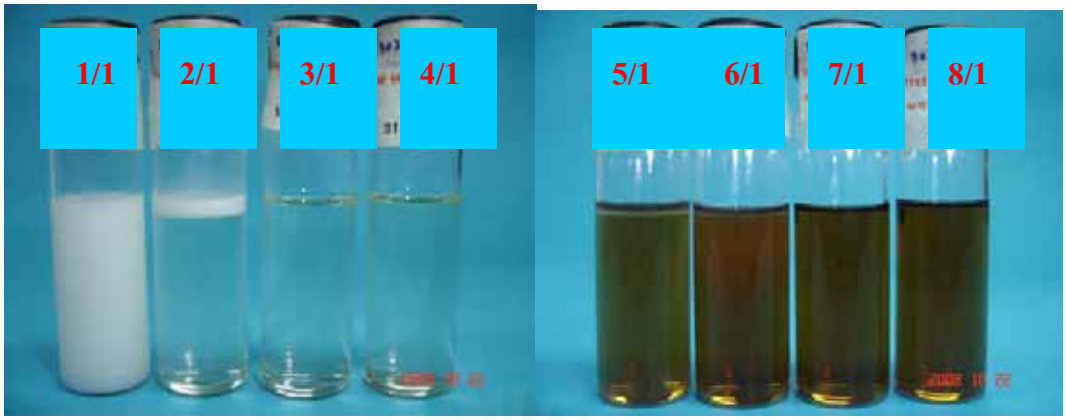
ในการผสมเพิ่มจึงจะทำให้วัฏภาคภายในมีขนาดเล็กลงจนผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นสารละลายไมเซลล์ได้ทั้งหมด ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก และไม่มีสารสกัดหมากเป็นส่วนผสม ผลิตภัณฑ์นี้จะมีลักษณะเป็นอิมัลชันขุ่นสีขาวเช่นเดิม ยกเว้นผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดหมากเป็นส่วนผสมจะเริ่มเห็นหยดน้ำมันบนผิวหน้าซึ่งถือว่าผลิตภัณฑ์เกิดความไม่เสถียรขึ้น แต่ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 25 และ 30 โดยน้ำหนัก ทั้งที่มีและไม่มีสารสกัดหมากยังคงมีลักษณะเป็นสารละลายไมเซลล์ใสเช่นเดิม

ตารางที่ 4.8 ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากในน้ำ โดยใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที

องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)				เวลาที่แยกชั้นหลังการเตรียม (วัน)
น้ำมันสะระแหน่	Tween 20	น้ำ	สารสกัดเมล็ดหมาก	
5.60	15	79.40	no	7
5.60	20	74.40	no	1
5.60	25	69.40	no	-
5.60	30	64.40	no	-
5.60	15	79.10	0.30	1
5.60	20	74.10	0.30	1
5.60	25	69.10	0.30	-
5.60	30	64.10	0.30	-

หมายเหตุ: no คือ ไม่ใส่ - คือ ไม่แยกชั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.5 ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์หลังเก็บไว้นาน 1 วันโดยใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที

1/1 คือ อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 15

2/1 คือ อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 20

3/1 คือ อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 25

4/1 คือ อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 30

5/1 คือ อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 15

6/1 คือ อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 20

7/1 คือ อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 25

8/1 คือ อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 30

เมื่อนำผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 15 และ 20 โดยน้ำหนักซึ่งแยกชั้น หลังเก็บไว้นาน 7 วัน มาผสมซ้ำด้วยคลื่นเหนือเสียงนาน 15 นาที พบว่าผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 15 มีลักษณะปรากฏเช่นเดิมคือ มีลักษณะขุ่นและไม่แยกชั้นเช่นเดียวกับตอนผสมด้วยคลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาทีในวันแรก แต่ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก จะไม่พบการแยกชั้นซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4.9

ผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 15 และ 20 โดยน้ำหนัก เมื่อเก็บไว้นานไว้ 7 วัน พบว่าผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก จะมีลักษณะขุ่นเล็กน้อยแต่เมื่อนำไปผสมด้วยคลื่นเหนือเสียงซ้ำอีก 15 นาที พบว่ามีลักษณะเป็นสารละลายไมเซลล์ใสเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 25 และ 30 โดยน้ำหนัก แต่อิมัลชันที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก จะพบการแยกชั้นก่อนการผสมซ้ำ แต่เมื่อนำไปผสมซ้ำจะมีลักษณะขุ่นและไม่แยกชั้น โดยลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวทั้งก่อนและหลังการผสมซ้ำแสดงในภาพที่ 4.6 ในผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ

Tween 20 ร้อยละ 25 และ 30 โดยน้ำหนัก ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังทิ้งไว้นาน 7 วัน จึงไม่ต้องนำไปผสมซ้ำ

ตารางที่ 4.9 ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดจากเมล็ดหมากในน้ำ โดยใช้คลื่นเหนือเสียงซ้ำนาน 15 นาที

องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)				เวลาที่แยกชั้นหลังการเตรียม (วัน)
น้ำมันสะระแหน่	Tween 20	น้ำ	สารสกัดเมล็ดหมาก	
5.60	15	79.40	no	1
5.60	20	74.40	no	-
5.60	15	79.10	0.30	1
5.60	20	74.10	0.30	-

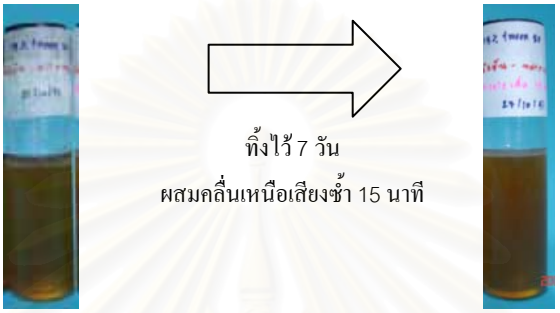
หมายเหตุ: no คือ ไม่ใส่

- คือ ไม่แยกชั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Tween 20 ร้อยละ 15 อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ในน้ำ

Tween 20 ร้อยละ 15 อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ในน้ำ

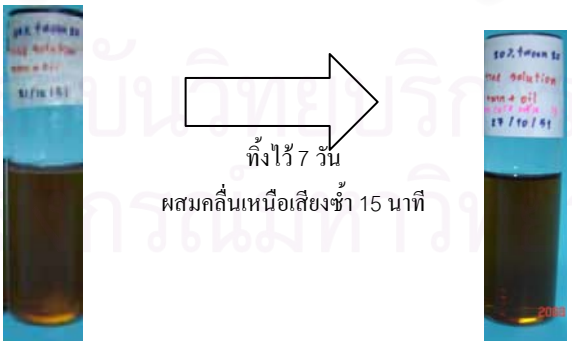


Tween 20 ร้อยละ 15 อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากในน้ำ

Tween 20 ร้อยละ 15 อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสสกัดหมากในน้ำ

Tween 20 ร้อยละ 20 อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ในน้ำ

Tween 20 ร้อยละ 20 สารละลายไมเซลล์น้ำมันสะระแหน่ในน้ำ



Tween 20 ร้อยละ 20 อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากในน้ำ

Tween 20 ร้อยละ 20 สารละลายไมเซลล์น้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากในน้ำ

ภาพที่ 4.6 ผลของ Tween 20 ร้อยละ 15 และ 20 โดยน้ำหนัก ต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บไว้นาน 7 วันและผสมซ้ำด้วยคลื่นเหนือเสียงนาน 15 นาที

4.7.2 ขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคของน้ำมัน

ผลิตภัณฑ์ที่มีและไม่มีสารสกัดหมากที่ผสมด้วยคลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที และผลิตภัณฑ์ที่ทำการผสมด้วยคลื่นเหนือเสียงซ้ำ 15 นาทีหลังเก็บไว้นาน 7 วัน แสดงขนาดและรูปแบบการกระจายขนาดในภาคผนวก ก. โดยผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 15 และ 20 เก็บไว้นาน 1 7 และ 14 วัน มีขนาดและการกระจายขนาดแสดงในตารางที่ 4.10 โดยผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 15 มีขนาดอนุภาคของหยดวัฏภาคภายในเล็กกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 20 และผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดหมากจะมีขนาดอนุภาคใหญ่กว่าผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีสารสกัดหมากและมีขนาดเพิ่มขึ้นตามอายุการเก็บ ที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 15 การกระจายขนาดมีรูปแบบที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามอายุการเก็บ ถึง 14 วัน แต่ที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 การกระจายขนาดมีรูปแบบเปลี่ยนแปลงไป โดยผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีสารสกัดหมากจะเปลี่ยนจาก bimodal เป็น unimodal ที่อายุการเก็บ 14 วัน และผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดหมากจะเปลี่ยนจาก unimodal เป็น bimodal เมื่ออายุการเก็บ 7 วัน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเกิดความไม่เสถียรขึ้นจึงทำให้ การกระจายขนาดมีรูปแบบเปลี่ยนแปลงไป โดยความไม่เสถียรนั้นอาจเนื่องจากเกิดการรวมตัวกันของหยดวัฏภาคภายใน หรือ ostwald ripening ซึ่งทำให้วัฏภาคภายในและภายนอกละลายเข้ากันได้บ้าง แต่ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นสารละลายไมเซลล์ใสคือความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 25 และ 30 โดยน้ำหนัก มีขนาดของวัฏภาคภายในเล็กมากจึงไม่สามารถวิเคราะห์หาขนาดและการกระจายขนาดอนุภาคได้ด้วยเครื่อง Mastersizer เมื่อนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไปผสมด้วยคลื่นเหนือเสียงซ้ำอีก 15 นาที แล้วขนาดและการกระจายขนาดแสดงในตารางที่ 4.11 แสดงผลเฉพาะที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 15 โดยน้ำหนักเท่านั้น ผลการวิเคราะห์พบว่าโดยส่วนใหญ่ให้ผลเช่นเดียวกับก่อนการผสมซ้ำ แต่มีขนาดวัฏภาคภายในที่ใหญ่กว่าเล็กน้อย ส่วนผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 20 มีลักษณะเป็นสารละลายไมเซลล์ใส จึงไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยเครื่องนี้ได้

เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ทั้งหมดไว้นาน 56 วัน ส่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Zetasizer ซึ่งแสดงขนาดและการกระจายขนาดตามตารางที่ 4.12 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 15 มีขนาดของวัฏภาคภายในใหญ่ที่สุด และผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ร้อยละ 25 มีขนาดเล็กที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ร่วมด้วย Tween 20 ร้อยละ 15 และ 20 มีขนาดของวัฏภาคภายในใหญ่กว่าผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่มีสารสกัดหมากเป็นส่วนผสม แต่ที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 25 และ 30 มีลักษณะตรงข้ามโดยผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดหมากเป็นส่วนผสมจะมีขนาดใหญ่กว่า ส่วนการกระจายขนาดมีรูปแบบเป็นแบบ unimodal และbimodal เฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 15 นอกนั้นเป็น

แบบ trimodal ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของ Tween 20 ความเข้มข้นสูงจะมีรูปแบบการกระจายขนาดเป็นแบบ trimodal ซึ่งตามทฤษฎีถือว่าเกิดความไม่เสถียรขึ้น แต่เมื่อพิจารณาขนาดที่เล็กมากและลักษณะปรากฏที่เป็นสารละลายไมเซลล์ใสและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏเมื่อมีอายุการเก็บนาน ดังนั้นจึงถือว่าผลิตภัณฑ์นั้นยังคงมีความเสถียรอยู่ และพบว่าค่า zeta potential ในผลิตภัณฑ์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นร้อยละโดยน้ำหนักของ Tween 20 เพิ่มขึ้น จากงานวิจัยของ Gupta และคณะ (2005) ซึ่งผลิตไมโครอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีองค์ประกอบ คือ clove oil : Tween20 : water เท่ากับ 5 : 30 : 65 พบว่า ขนาดของวัฏภาคภายในเท่ากับ 9-20 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับผลการทดลองในผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารละลายไมเซลล์ แต่ การกระจายขนาดมีรูปแบบต่างกันคือ งานวิจัยนี้รูปแบบเป็น unimodal แต่จากผลการทดลองมีรูปแบบเป็น trimodal ที่ต่างกันอาจเป็นเพราะชนิด สัดส่วนของสารและเครื่องมือในการวิเคราะห์ต่างกันจึงทำให้ผลต่างกัน จากงานวิจัยนี้พบว่าผลิตภัณฑ์มีความเสถียรได้ถึง 1 ปีแต่ไม่ได้รายงานถึงลักษณะปรากฏว่าเป็นสารละลายไมเซลล์หรือไม่ ดังนั้นหากจะเปรียบเทียบความเสถียรอาจจะใกล้เคียงกัน หรืออาจจะมีอายุและการเก็บที่นานกว่าเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นสารละลายไมเซลล์ใส

จากการทดลองดังกล่าวจึงได้คัดเลือกผลิตภัณฑ์สารละลายไมเซลล์น้ำมันสะระแหน่ซึ่งผสมและไม่ผสมสารสกัดหมากร่วมด้วย Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 ไปทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียต่อไป เนื่องจากผลิตภัณฑ์ทั้งสองใช้ความเข้มข้น Tween 20 ไม่สูงมากนักทำให้ไม่สิ้นเปลืองสารโดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเป็นสารละลายไมเซลล์ที่มีความเสถียรสูงได้เช่นกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 ผลความเข้มข้นของ Tween 20 และอายุการเก็บต่อขนาดและการกระจายขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง) ของอนุภาคน้ำมันสะระแหน่ในน้ำ ทำการวัดหลังการเตรียมอิมัลชัน 1 วัน 7 วัน และ 14 วัน โดยใช้คลื่นเหนือเสียงเป็นเวลา 30 นาที

อายุการเก็บ (วัน)	องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)				ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมัน					
	วัฏภาคน้ำมัน	วัฏภาคน้ำ								
	น้ำมันสะระแหน่	Tween 20	น้ำ	สารสกัดหมาก	รูปแบบ	ช่วงขนาด (μm)	ปริมาณที่อยู่ในแต่ละช่วงขนาด (ร้อยละโดยปริมาตร)	ขนาดเฉลี่ย (μm)	ขนาดที่มีปริมาณมากที่สุด (μm)	ร้อยละ 90 มีขนาดเล็กกว่า (μm)
1	5.60	15	79.40	-	bimodal	0.052 – 0.316 0.631 – 45.709	94.73 5.24	0.490±0.198	0.104 – 0.141	0.195
	5.60	15	79.10	0.30	unimodal	0.832 - 104.713	100.00	12.408±2.322	9.024 - 12.258	22.420
	5.60	20	74.40	-	bimodal	0.040 - 39.811 60.256 - 275.423	81.88 18.10	31.632±22.608	11.911 - 16.179	131.112
	5.60	20	74.10	0.30	unimodal	0.631 - 69.183	100.00	6.692±2.930	4.233 - 5.750	13.882
7	5.60	15	79.40	-	bimodal	0.035 - 0.724 1.096 - 30.200	46.69 53.31	3.999±2.985	6.837 - 9.287	11.345
	5.60	15	79.10	0.30	unimodal	1.445 - 138.038	100.00	19.985±3.289	7.563 - 10.273	59.975
	5.60	20	74.40	-	bimodal	0.724 - 34.674 69.183 - 208.930	100.00 0	22.538±0.000	11.043 - 14.999	35.307
	5.60	20	74.10	0.30	bimodal	0.046 - 0.631 6.607 - 549.541	43.07 56.93	72.434±57.861	124.400 -169.000	191.427
14	5.60	15	79.40	-	bimodal	0.832 - 39.811 79.433 - 416.869	92.82 7.81	25.121±24.354	10.238 - 13.906	25.434
	5.60	15	79.10	0.30	unimodal	1.445 - 1659.587	100.00	48.810±47.007	12.215 - 16.592	73.388
	5.60	20	74.40	-	unimodal	1.096 - 239.883	100.00	34.782±4.954	13.858 - 18.823	104.479
	5.60	20	74.10	0.30	bimodal	0.052 - 0.631 7.586 - 239.883	27.34 72.66	67.935±47.370	101.700-138.100	148.741

ตารางที่ 4.11 ผลความเข้มข้นของ Tween 20 ต่อปละอายุการเก็บขนาดและการกระจายขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง) ของอนุภาคน้ำมันสะระแหน่ในน้ำ ทำการวัดหลังการเตรียมอิมัลชัน 1 วัน และ 7 วัน โดยใช้คลื่นเหนือเสียงซ้ำเป็นเวลา 15 นาที

อายุการเก็บ (วัน)	องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)				ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมัน					
	วัฏภาคน้ำมัน	วัฏภาคน้ำ								
	น้ำมันสะระแหน่	Tween 20	น้ำ	สารสกัดหมาก	รูปแบบ	ช่วงขนาด (μm)	ปริมาณที่อยู่ในแต่ละช่วงขนาด (ร้อยละโดยปริมาตร)	ขนาดเฉลี่ย (μm)	ขนาดที่มีปริมาณมากที่สุด (μm)	ร้อยละ 90 มีขนาดเล็กกว่า (μm)
1	5.60	15	79.40	-	unimodal	1.096 - 239.883	100.00	28.674±27.920	2.311 - 3.138	5.458
	5.60	15	79.10	0.30	unimodal	1.096 - 52.481	100.00	11.408±2.708	1.986 - 2.698	6.037
7	5.60	15	79.40	-	unimodal	1.096 - 158.489	100.00	14.087±2.460	12.215 -16.592	24.801
	5.60	15	79.10	0.30	unimodal	1.096 - 208.930	100.00	21.882±6.293	14.212 - 19.304	35.307

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.12 ผลความเข้มข้นของ Tween 20 และอายุการเก็บต่อขนาดและการกระจายขนาด (เส้นผ่านศูนย์กลาง) และค่าเฉลี่ย zeta potential ของอนุภาคน้ำมันสะระแหน่ในน้ำ ทำการวัดหลังการเตรียมอิมัลชัน 56 วัน โดยใช้คลื่นเหนือซ้ำเป็นเวลา 45 นาที ด้วยเครื่อง (Zetasizer ZS, Malvern)

อายุการเก็บ (วัน)	องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)				ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมัน				
	วัฏภาคน้ำมัน	วัฏภาคน้ำ							
	น้ำมันสะระแหน่	Tween 20	น้ำ	สารสกัดหมาก	รูปแบบ	ช่วงขนาด (μm)	ปริมาณที่อยู่ในแต่ละช่วงขนาด (ร้อยละโดยปริมาตร)	ขนาดเฉลี่ย (μm)	ร้อยละ 90 มีขนาดเล็กกว่า (μm)
56	5.60	15	79.40	-	unimodal	4.187 - 5.615	100.00	17.070±0.580	-0.97±0.21
	5.60	20	74.40	-	trimodal	7.531 - 21.040 4.382 - 122.400 1106.000 – 1990.000	60.60, 33.11, 6.29	0.136±0.074	-0.76±0.31
	5.60	25	69.40	-	trimodal	1.736 - 4.187 6.503 - 32.670 7.882 - 396.100	66.32, 26.80, 6.88	0.022±0.005	-0.48±1.07
	5.60	30	64.40	-	trimodal	1.499 - 3.615 7.531 - 32.670 12.240 - 39.610	60.87, 29.04, 10.08	0.044±0.007	0.18±1.19
	5.60	15	79.10	0.30	bimodal	8.721-13.540 9.128 – 12.240	62.65, 37.35	1.910±0.589	-2.44±0.19
	5.60	20	74.10	0.30	trimodal	6.503 - 24.360 50.750 - 190.100 71.240 – 556.000	48.41, 32.93, 18.66	0.068±0.007	-0.87±0.34
	5.60	25	69.10	0.30	trimodal	6.503 - 28.210 78.820 - 3.961 199.000 – 556.000	47.08, 36.22, 16.69	0.051±0.005	-0.18±0.38
	5.60	30	64.10	0.30	trimodal	2.010- 4.187 10.100 - 32.670 164.200 - 531.200	48.47, 42.74, 8.78	0.188±0.012	0.08±1.05

4.8 ความเข้มข้นของสารละลายตัวทำอิมัลชัน Tween 20 ต่อฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหมากที่ละลายในตัวทำอิมัลชัน และอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ในน้ำซึ่งเป็นระบบที่มีและไม่มีสารสกัดหมาก

สารสกัดหมากที่สกัดด้วยน้ำผสมกับสารสกัดหมากด้วยเอทานอล 95% ซึ่งละลายในตัวทำอิมัลชัน Tween 20 และผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ซึ่งผสมและไม่ผสมสารสกัดหมากร่วมด้วย Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 เมื่อนำมาหาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี paper disc diffusion method แสดงผลในตารางที่ 4.13 พบว่าผลิตภัณฑ์สารสกัดหมากในสารละลาย Tween 20 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดลดลง โดยพิจารณาเปรียบเทียบกับค่า MIC ของสารสกัดหมากแบบผสมในตารางที่ 4.3 ซึ่งเท่ากับ 0.38-0.75 mg/ml ส่วนเมื่อเทียบกับสารสกัดหมากในน้ำซึ่ง MIC ของผลิตภัณฑ์อิมัลชันจะอยู่ระหว่าง 250-500 µl/ml ซึ่งที่ความเข้มข้นนี้จะมีสารสกัดหมากเท่ากับ 0.78-1.50 mg/ml เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของ Tween 20 ก็ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหมากที่อยู่ในผลิตภัณฑ์

แต่เมื่อนำผลิตภัณฑ์อิมัลชันซึ่งมีน้ำมันสะระแหน่เป็นส่วนผสมไปเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของน้ำมันสะระแหน่ในตารางที่ 4.5 พบว่า ค่า MIC ของผลิตภัณฑ์ในการยับยั้ง *B. cereus* โดยส่วนใหญ่จะเท่ากับ 500 µl/ml ยกเว้นผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดหมากเป็นส่วนผสมร่วมด้วย Tween 20 ร้อยละ 20 จะมีค่า MIC เท่ากับ 250 µl/ml ซึ่งจากความเข้มข้นดังกล่าวมีน้ำมันสะระแหน่อยู่เท่ากับ 14-28 mg/ml ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่า MIC ของน้ำมันสะระแหน่ซึ่งมีค่าเท่ากับ 56.30 mg/ml ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง *B. cereus* ของน้ำมันสะระแหน่ประมาณ 2-4 เท่า ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะน้ำมันในผลิตภัณฑ์เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแล้วน้ำมันสามารถแทรกซึม เข้าสู่ผนังเซลล์และ mitochondria ของแบคทีเรียได้ ซึ่งเป็นผลให้เกิดการรบกวนการแพร่ผ่านของสารและทำให้ ion เกิดการรั่วไหล จนทำให้ ion ต่างๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียลดน้อยลงไป ท้ายสุดแบคทีเรียก็ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (Knobloch *et al*., 1986; Sikkema *et al*., 1994)

ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Tween 20 เป็นร้อยละ 25 และพบว่าประสิทธิภาพลดลงอย่างรวดเร็วหลังการเก็บ 14 วัน เมื่อเป็นสารสกัดหมากในอิมัลชัน พบว่าสารสกัดหมากไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง *S. aureus* ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะสารสกัดหมากที่นำมาใช้สกัดได้จากตัวทำละลาย

ที่มีขั้วสูงเมื่อนำไปละลายใน Tween 20 ทำให้สารมีความหนืดสูงกว่าเดิมจึงทำให้สารสกัดหมากไม่สามารถออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้อย่างเต็มที่

ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่โดยที่ไม่มีสารสกัดหมากเป็นส่วนผสมจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าผลิตภัณฑ์อื่น การเพิ่มความเข้มข้นของ Tween 20 ไม่มีผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไป แต่การเพิ่มสารสกัดหมากในอิมัลชันลดประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ส่วนประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S.* Typhimurium พบว่าทุกผลิตภัณฑ์มีประสิทธิภาพเท่ากัน การเพิ่มปริมาณ Tween 20 และการเติมสารสกัดหมากในอิมัลชันไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง *S.* Typhimurium

แต่ถึงอย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยวิธีนี้อาจมีข้อจำกัดในเรื่องการซึมผ่านของสารลงสู่อาหารที่มีเชื้อ โดยสารที่ผสมอยู่ในของเฟสอาจมีการแพร่ได้ไม่เท่ากันทำให้การออกฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียด้อยประสิทธิภาพลง ผลการทดลองที่ได้ไม่ค่อยแน่นอนและอ่านผลยาก ดังนั้นจึงนำผลิตภัณฑ์เหล่านี้ไปทดสอบด้วยวิธี macro broth dilution method อีกที ซึ่งวิธีดังกล่าวจุลินทรีย์จะสามารถสัมผัสกับสารทดสอบซึ่งละลายและแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อได้โดยไม่ต้องพึ่งความสามารถในการแพร่ผ่านของสาร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.13 ผลของความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 ในสารสกัดหมากและผลิตภัณฑ์สารละลายไมเซลล์น้ำมันสะระแหน่ที่ผสมและไม่ผสมสารสกัดหมากต่อค่า MIC ของแบคทีเรียทดสอบที่อายุการเก็บต่าง ๆ

อายุการเก็บ (วัน)	MIC (µl/ml)							
	สารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 20				สารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 25			
	B .cereus ATCC 1729	*S. aureus* ATCC 25923	*E .coli* ATCC 25922	*S.* Typhimurium ATCC 13811	*B. cereus* ATCC 1729	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*S.* Typhimurium ATCC 13811
1	250	>500	500	500	500	>500	500	500
7	250	>500	500	500	500	>500	500	500
14	250	>500	500	500	500	>500	500	500
28	250	>500	500	500	500	>500	500	500
42	500	>500	500	500	500	>500	500	500
56	500	>500	500	500	>500	>500	500	500
84	500	>500	500	500	>500	>500	>500	>500
อายุการเก็บ (วัน)	อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20				อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 25			
	B. cereus ATCC 1729	*S. aureus* ATCC 25923	*E .coli* ATCC 25922	*S.* Typhimurium ATCC 13811	*B. cereus* ATCC 1729	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*S.* Typhimurium ATCC 13811
1	500	>500	250	500	500	250	250	500
7	500	>500	250	500	250	250	250	500
14	500	>500	500	500	250	250	500	500
28	>500	>500	500	500	500	>500	500	500
42	>500	>500	500	500	500	>500	500	500
56	>500	>500	500	500	500	>500	500	500
84	>500	>500	500	500	500	>500	500	500
อายุการเก็บ (วัน)	อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20				อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 25			
	B. cereus ATCC 1729	*S. aureus* ATCC 25923	*E .coli* ATCC 25922	*S.* Typhimurium ATCC 13811	*B. cereus* ATCC 1729	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*S.* Typhimurium ATCC 13811
1	250	>500	500	500	500	>500	500	500
7	250	>500	500	500	500	>500	500	500
14	250	>500	500	500	500	>500	500	500
28	250	>500	500	500	500	>500	500	500
42	500	>500	500	500	500	>500	500	500
56	500	>500	500	500	>500	>500	500	500
84	500	>500	500	500	>500	>500	>500	>500

เมื่อนำอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียด้วย macro broth dilution method ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4.14-4.17 และมีการเจริญของแบคทีเรียแสดงตามรายละเอียดในภาคผนวก ก จากการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์อิมัลชันดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้เพิ่มขึ้น โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อเทียบกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของน้ำมันสะระแหน่ และเมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของ Tween 20 จาก ร้อยละ 20 เป็น ร้อยละ 25 พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ทั้งสองไม่เปลี่ยนแปลง โดยมีค่า MBC ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 60 µl/ml และค่า MIC เท่ากับ 30 µl/ml แสดงในตารางที่ 4.14 ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้น 30 µl/ml จะมีน้ำมันสะระแหน่เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 1.80 mg/ml เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า MIC ของน้ำมันสะระแหน่ซึ่งมีค่าเท่ากับ 56.30 mg/ml ซึ่งน้ำมันสะระแหน่ที่มีในอิมัลชันมีค่าน้อยกว่าค่า MIC ของน้ำมันสะระแหน่ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง *B. cereus* ประมาณ 31 เท่า และเมื่อใส่สารสกัดหมากลงไปในอิมัลชันทั้งสองนี้พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียยังคงเท่าเดิม การใส่สารสกัดหมากลงไปในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว พบว่าค่า MIC ของผลิตภัณฑ์ที่ 30 µl/ml นี้จะมีสารสกัดหมากเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 0.10 mg/ml ซึ่งก็น้อยกว่าค่า MIC ของสารสกัดหมากแต่ไม่ได้ช่วยให้อิมัลชันมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น นอกจากนี้อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ก็ไม่มีผลต่อการลดประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยเช่นกัน

ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ของอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 ก็ให้ผลในทำนองเดียวกันกับ *B. cereus* แต่มีค่า MBC และ MIC ของผลิตภัณฑ์ที่ต่างกัน ซึ่งมีค่า มากกว่า 500 µl/ml และ 250 µl/ml ตามลำดับ แสดงผลในตารางที่ 4.15 โดยความเข้มข้น 250 µl/ml นี้จะมีน้ำมันสะระแหน่เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 14 mg/ml เมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ของน้ำมันสะระแหน่ซึ่งมีค่าเท่ากับ 225 mg/ml พบว่าน้ำมันสะระแหน่ที่มีในอิมัลชันมีค่าน้อยกว่าค่า MIC ของน้ำมันสัระแหน่ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ประมาณ 16 เท่า ในส่วนผลของการใส่สารสกัดหมากลงไปในผลิตภัณฑ์และผลของอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ต่อการลดลงของประสิทธิภาพมีลักษณะเช่นเดียวกันกับ *B. cereus*

ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ของอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 พบว่ามีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับ *B. cereus* และ *S. aureus* โดยมีค่า MBC ของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 30 µl/ml และค่า MIC เท่ากับ 15 µl/ml แสดงในตารางที่ 4.16 ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้น 15 µl/ml นี้จะมีน้ำมันสะระแหน่เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 0.90 mg/ml เมื่อ

เปรียบเทียบกับค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli* ของน้ำมันสะระแหน่ซึ่งมีค่าเท่ากับ 56.30 mg/ml พบว่ามีค่าน้อยกว่าจึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อประมาณ 63 เท่า เมื่อใส่สารสกัดหมากลงไปในผลิตภัณฑ์พบว่าค่า MIC ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งเท่ากับ 15 µl/ml จะมีสารสกัดหมากเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 0.06 mg/ml ซึ่งไม่ได้ช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น แต่การใส่สารสกัดหมากลงไปจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่มี Tween 20 ร้อยละ 20 เป็นส่วนผสมมีอายุการเก็บต่อการลดลงของประสิทธิภาพนานกว่าผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใส่สารสกัดหมาก และการเพิ่มความเข้มข้นของ Tween 20 ในผลิตภัณฑ์ที่มีสารสกัดหมาก ร่วมด้วย Tween 20 เป็นร้อยละ 25 พบว่าทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเท่าเดิมแต่มีอายุการเก็บที่ลดลงจาก 98 วัน เหลือเพียง 28 วัน กล่าวคือผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากร่วมด้วย Tween 20 ร้อยละ 20 นี้จะมีอายุการเก็บที่ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียลดลงนานกว่าผลิตภัณฑ์ที่มี Tween 20 ร้อยละ 25 เป็นส่วนผสม แต่การใส่สารสกัดหมากลงในผลิตภัณฑ์จะมีผลให้อายุการเก็บนานกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผสมสารสกัดหมากเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มี Tween 20 ร้อยละ 20 เท่านั้น แต่ในผลิตภัณฑ์ที่มี Tween 20 ร้อยละ 25 เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ซึ่งมีและไม่มีสารสกัดหมากเป็นส่วนผสมจะมีอายุการเก็บที่เท่ากัน

ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S.* Typhimurium ของอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ในน้ำที่มี Tween 20 ร้อยละ 25 ต่างกับอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ในน้ำที่มี Tween 20 ร้อยละ 20 ที่อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ โดยผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 20 เป็นส่วนผสมจะมีอายุการเก็บ 98 วันจึงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อลดลง แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ Tween 20 เป็นร้อยละ 25 กลับพบว่าอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ลดลงเหลือเพียง 7 วัน ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก็ลดลงแล้ว และเมื่อใส่สารสกัดหมากลงไปในอิมัลชันให้ผลที่อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ โดยอิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20 เป็นส่วนผสมจะมีอายุการเก็บที่น้อยกว่าอิมัลชันที่ไม่มีสารสกัดหมากเป็นส่วนผสม แต่ในขณะที่อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 25 เป็นส่วนผสมกลับมีอายุการเก็บที่นานกว่าอิมัลชันที่ไม่มีสารสกัดหมากเป็นส่วนผสม

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ด้วยวิธี macro broth dilution method พบว่าผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มีและไม่มีสารสกัดหมากร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดเพิ่มขึ้น โดยพิจารณาจากค่า MIC ขององค์ประกอบภายในผลิตภัณฑ์เทียบกับค่า MIC ของสารองค์ประกอบนั้น นอกจากนี้ยังพบว่า ผลิตภัณฑ์อิมัลชันทั้งหมดนี้ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ คือ *E. coli* และ

S. Typhimurium ได้ดีกว่าแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก คือ *B. cereus* และ *S. aureus* ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะในผลิตภัณฑ์มีส่วนของน้ำมันสะระแหน่ขนาดเล็ก ซึ่งมีกลไกลการออกฤทธิ์ของสาร menthol ในน้ำมันสะระแหน่ที่เป็นพิษต่อผนังเซลล์แบคทีเรีย (Sikkema *et al*., 1995) แต่ในแบคทีเรียแกรมลบสามารถทนต่อสารนี้ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากมีส่วนประกอบและรูปแบบการรวมตัวของผนังเซลล์ที่แข็งแรงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Helender *et al*., 1998) และเมื่อเปรียบเทียบอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่มีและไม่มีสารสกัดหมากพบว่าการใส่สารสกัดหมากลงไปทำให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บที่นานขึ้น ซึ่งจะมีผลเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น โดยประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* เมื่อใส่สารสกัดหมากลงไปในผลิตภัณฑ์จะทำให้อายุการเก็บนานขึ้นเฉพาะอิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 20 เป็นส่วนผสมเท่านั้น ในขณะที่ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S.* Typhimurium เมื่อใส่สารสกัดหมากลงไปในผลิตภัณฑ์จะทำให้อายุการเก็บนานขึ้นเฉพาะอิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 25 เป็นส่วนผสม นอกจากนี้การใส่สารสกัดหมากลงไปในผลิตภัณฑ์จะมีผลทำให้แบคทีเรียแกรมบวกมีการเจริญน้อยกว่าอิมัลชันที่ไม่ใส่สารสกัดหมากแต่การเจริญที่ลดลงนี้จะมีผลต่อผลิตภัณฑ์หลังการเตรียมเพียง 1 วันเท่านั้น หลังจากนั้นการเจริญของแบคทีเรีย จะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ในแบคทีเรียแกรมลบการใส่สารสกัดหมากลงไปในผลิตภัณฑ์อิมัลชัน จะไม่ทำให้การเจริญของแบคทีเรียลดลง แสดงผลในภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.14 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *B. cereus* ของผลิตภัณฑ์สารละลายสารสกัดหมาก สารละลายน้ำมันสะระแหน่ อิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากร่วมกับ Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 25

อายุการเก็บ (วัน)	สารสกัดหมาก		น้ำมันสะระแหน่	อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 20						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 20					
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ	
					สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)
1	0.38	0.80	56.30	30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
7	0.75	0.80		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
14	0.75	0.80		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
28	0.75	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
98	0.75	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
154	0.75	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
อายุการเก็บ (วัน)	สารสกัดหมาก		น้ำมันสะระแหน่	อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 25						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 25					
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ	
					สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)
1	0.38	0.80	56.30	30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
7	0.75	0.80		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
14	0.75	0.80		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
28	0.75	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
98	0.75	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
154	0.75	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50

ตารางที่ 4.15 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S. aureus* ของผลิตภัณฑ์สารละลายสารสกัดหมาก สารละลายน้ำมันสะระแหน่ อิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากร่วมกับ Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 25

อายุการเก็บ (วัน)	สารสกัดหมาก		น้ำมันสะระแหน่	อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 20						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 20					
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ	
					สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)
1	0.75	> 1.56	225	250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28
7	1.56	> 1.56		250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28
14	1.56	> 1.56		250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28
28	1.56	> 1.56		250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28
98	1.56	> 1.56		250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28
154	1.56	> 1.56		250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28
อายุการเก็บ (วัน)	สารสกัดหมาก		น้ำมันสะระแหน่	อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 25						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 25					
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ	
					สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)
1	0.75	> 1.56	225	250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28
7	1.56	> 1.56		250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28
14	1.56	> 1.56		250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28
28	1.56	> 1.56		250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28
98	1.56	> 1.56		250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28
154	1.56	> 1.56		250	0	14	> 500	0	> 28	250	0.80	14	> 500	>1.56	> 28

ตารางที่ 4.16 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *E. coli* ของผลิตภัณฑ์สารละลายสารสกัดหมาก สารละลายน้ำมันสะระแหน่ อิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากร่วมกับ Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 25

อายุการเก็บ (วัน)	สารสกัดหมาก		น้ำมันสะระแหน่	อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 20						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 20					
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ	
					สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)
1	0.75	> 1.56	56.30	15	0	0.90	30	0	1.80	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
7	1.56	> 1.56		15	0	0.90	30	0	1.80	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
14	>1.56	> 1.56		15	0	0.90	30	0	1.80	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
28	> 1.56	> 1.56		15	0	0.90	30	0	1.80	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
98	> 1.56	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
154	> 1.56	> 1.56		60	0	3.50	125	0	7.00	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
อายุการเก็บ (วัน)	สารสกัดหมาก		น้ำมันสะระแหน่	อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 25						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 25					
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ	
					สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)
1	0.75	> 1.56	56.30	15	0	0.90	30	0	1.80	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
7	1.56	> 1.56		15	0	0.90	30	0	1.80	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
14	>1.56	> 1.56		15	0	0.90	30	0	1.80	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
28	> 1.56	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
98	> 1.56	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
154	> 1.56	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50

ตารางที่ 4.17 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S.* Typhimurium ของผลิตภัณฑ์สารละลายสารสกัดหมาก สารละลายน้ำมันสะระแหน่ อิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่ และอิมัลชันของน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากร่วมกับ Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 25

อายุการเก็บ (วัน)	สารสกัดหมาก		น้ำมันสะระแหน่	อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 20						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 20					
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ	
					สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)
1	0.75	> 1.56	56.30	15	0	0.90	30	0	1.80	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
7	1.56	> 1.56		15	0	0.90	30	0	1.80	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
14	>1.56	> 1.56		15	0	0.90	30	0	1.80	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
28	> 1.56	> 1.56		15	0	0.90	30	0	1.80	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
98	> 1.56	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
154	> 1.56	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
อายุการเก็บ (วัน)	สารสกัดหมาก		น้ำมันสะระแหน่	อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ที่มี Tween 20 ร้อยละ 25						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่มี Tween 20 ร้อยละ 25					
	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MIC (µl/ml)	องค์ประกอบ		MBC (µl/ml)	องค์ประกอบ	
					สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)		สารสกัดหมาก (mg/ml)	น้ำมันสะระแหน่ (mg/ml)
1	0.75	> 1.56	56.30	15	0	0.90	30	0	1.80	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
7	1.56	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
14	>1.56	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	15	0.06	0.90	30	0.10	1.80
28	> 1.56	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
98	> 1.56	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50
154	> 1.56	> 1.56		30	0	1.80	60	0	3.50	30	0.10	1.80	60	0.20	3.50

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกสารสกัดหมากและน้ำมันหอมระเหยจากพืชเพื่อนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้ง 4 ชนิด โดยคัดเลือกสารสกัดหมากจากประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียและประสิทธิภาพในการละลายในน้ำมันและในน้ำ คือ สารสกัดหมากแก่พันธุ์ผลรีที่สกัดด้วยน้ำและสารสกัดหมากแก่พันธุ์กลมที่สกัดด้วยเอทานอล 95% เมื่อนำสารสกัดหมากทั้งสองมาผสมกันมีค่า MIC ในการยับยั้ง *B. cereus* เท่ากับ 0.38 mg/ml แต่ *S. aureus E. coli* และ *S.* Typhimurium เท่ากับ 0.75 mg/ml ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากพืชที่คัดเลือกได้คือ น้ำมันสะระแหน่ ซึ่งมีค่า MIC ในการยับยั้ง *B. cereus E. coli* และ *S.* Typhimurium เท่ากับ 56.30 mg/ml และ *S. aureus* เท่ากับ 225 mg/ml เมื่อนำสารทั้งสองมาผลิตเป็นอิมัลชันที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 15 20 25 และ 30 โดยน้ำหนัก จะได้ผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่มีความเสถียรสูงที่มีลักษณะเป็นสารละลายไมเซลล์เมื่อใช้ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 25 และ 30 โดยใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาทียกเว้นที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 ที่ต้องผ่านคลื่นเหนือเสียงซ้ำหลังเก็บครบ 7 วัน โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีขนาดของวัฏภาคภายในอยู่ระหว่าง 0.022 ถึง 1.910 ไมโครเมตร และมีรูปแบบการกระจายขนาดแบบ bimodal จนถึง trimodal

ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์คัดเลือกผลิตภัณฑ์สารละลายไมเซลล์น้ำมันสะระแหน่ที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 ซึ่งมีองค์ประกอบคือ น้ำมันสะระแหน่ : Tween 20 : น้ำ เท่ากับ 5.60 : 20.00 : 74.40 และ 5.60 : 25.00 : 69.40 ตามลำดับ และผลิตภัณฑ์สารละลายไมเซลล์น้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมากที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 ซึ่งมีองค์ประกอบคือ น้ำมันสะระแหน่ : Tween 20 : น้ำ : สารสกัดหมาก เท่ากับ 5.60 : 20.00 : 74.10 : 0.30 และ 5.60 : 25.00 : 69.10 : 0.30 ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงขึ้น และผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสูงสุดและมีอายุการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (28 °C) นานกว่าผลิตภัณฑ์อื่นจนประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดลดลงครึ่งหนึ่ง คือผลิตภัณฑ์สารละลายไมเซลล์น้ำมันสะระแหน่ที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก

เห็นได้ว่าเมื่อนำสารสกัดหมากและน้ำมันสะระแหน่ผลิตอยู่ในรูปอิมัลชันที่เป็นสารละลายไมเซลล์ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียให้ดีขึ้นมากเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหมากและน้ำมันสะระแหน่ที่ไม่ได้ผลิตให้อยู่ในรูปอิมัลชัน นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังมีอายุการเก็บนานและคงประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

ในการผลิตอิมัลชันที่มีสารสกัดหมากถ้ามีการพัฒนาให้สารสกัดหมากที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยหรือไม่มีขั้วสามารถละลายอยู่ในน้ำมันซึ่งเป็นที่ยอมรับในการบริโภคได้ สามารถผลิตอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำได้ และอาจจะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียสูงขึ้นเนื่องจากสารสกัดหมากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่าน้ำมันสะระแหน่ การนำสารสกัดหมากดังกล่าวร่วมกับน้ำมันสะระแหน่มาใช้ในการผลิตอิมัลชันอาจเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียและการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังมีกลิ่นหอมของสะระแหน่

นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 20 เป็นส่วนผสมในการยับยั้งแบคทีเรียซึ่งมีประสิทธิภาพสูงและเก็บไว้ได้นานแต่มีขั้นตอนการเตรียมที่พิเศษกว่าผลิตภัณฑ์อิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 25 และ 30 เป็นส่วนผสม โดยต้องทำการผสมด้วยคลื่นเหนือเสียงซ้ำหลังการเก็บนาน 7 วัน จึงจะได้เป็นสารละลายไมเซลล์ ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้น Tween 20 นี้เป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ผลิตภัณฑ์จะสามารถเป็นสารละลายไมเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังต้องใช้เวลาในการจัดเรียงตัวและต้องใช้แรงในการผสมเพิ่ม ซึ่งกลไกลการเกิดเป็นสารละลายไมเซลล์ที่ความเข้มข้น Tween 20 นี้คงต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาตค และถ้าในการเตรียมผลิตภัณฑ์นี้โดยผ่านคลื่นเหนือเสียงที่มีกำลังไฟ และ Amplitude ที่มากกว่านี้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจไม่ต้องผสมเพิ่มหลังเก็บครบ 7 วัน จึงจะเกิดเป็นสารละลายไมเซลล์ก็ได้ทั้งนี้จึงต้องมีการทดลองทำต่อไป เมื่อได้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวแล้วก็อาจจะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกับอุปกรณ์ในการประกอบอาหารต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกสร จันทร์ศิริ. 2549. อิมัลชันทางเภสัชกรรม. มหาวิทยาลัยศิลปากร. คณะเภสัชกรรม.

คทา บัณฑิตานุกูล. 2544. ตำราการใช้ยาและสมุนไพร .กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

คะนอง คลอดเพ็ง. 2530. เอกสารวิชาการที่ 16 เรื่องหมาก. กรมส่งเสริมการเกษตร.

ชัยโย ชัยชาญทิพยุทธ วชิรา แดนตะวัน สถาพร ลิ้มมณี ชะนะ ครองรักษา และทิพวัลย์ ทรัพย์เจริญ บรรณาธิการ. 2527. สมุนไพร. การรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นสำหรับงานวิจัยของโครงการศึกษาวิจัยสมุนไพร อันดับ 03 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

พิพิธ ศุภพิพัฒน์. 2518. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับตลาดน้ำมันมินต์และเมนธอล. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์แห่งประเทศไทย แผนการวิจัยที่ 62 แผนการวิจัยและส่งเสริมการผลิตน้ำมันมินต์ โครงการวิจัยที่ 62/1 การศึกษาทางด้านเศรษฐกิจและตลาดของน้ำมันมินต์ และเมนธอล. กรุงเทพฯ : สวป.

พิสมัย พึ่งวิกรัย และ พิมพ์ใจ พัฒนศิริพงศ์. 2543. การปลูกหมากเพื่อการค้า. กองส่งเสริมพืชสวน.กรมส่งเสริมการเกษตร.กลุ่มไม้ยืนต้นอุตสาหกรรม.

รัตนา อินทรานุปกรณ์ 2547. การตรวจสอบและการแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, สถาบันวิจัย. ฝ่ายเภสัชศาสตร์และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ 2552. พืชให้น้ำมันหอมระเหย [Online] Available from: http://www.rspg.thaigov.net/plant data/use/perfume1-1.htm [2009, May 5].

วีณา จิรัจฉริยากูล บรรณาธิการ. 2534. ยาและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยมหิดล. คณะเภสัชศาสตร์. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ส่งเสริมการเกษตร, กรม. ฝ่ายประมวลผล กองแผนงาน ข้อมูลสถิติการปลูกหมาก. 2545. [Online] Available from:http://www.doae.go.th/LIBRARY/html/detail/futureofac/inde.htm [2009, May 5].

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Al-Adham, I.S.I., Khalil, E., Al-Hmoud, N.D., Kierans, M. and Collier, P.J. 2000. Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems. Journal of Applied Microbiology. 89: 32-39.

Alkofahi, P. I. and Irobi, O. N. 1993. Antimicrobial activity of crude leaf extracts of *Acalypha wilkensiana*. Journal of Ethanopharmacol. 39: 171-174.

Arjungi, K.N. 1996. Areca nut: a review. Journal of Arzneimittelforschung . 26:951-956.

Andrews, R. E., Parks, L. W. and Spence, K. D. 1980. Some effects of douglas fir terpenes on certain microorganisms. Journal of Apply Environment Microbiology. 40: 301-304.

Bupesh, G., Amutha, C., Nandagopal, S., Ganeshkumar, A., Sureshkumar, P. and Saravanamurali, K. 2007. Antibacterial activity of *Mentha piperita* L. (peppermint) fromleaf extracts – a medicinal plant. Journal of Acta Agriculturae Slovenica. 89: 73-79.

Buhler, D.R. and Miranda, C. 2000. Antioxidant activities of flavonoids. [Online] Available from: http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html . [21/01/2009].

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food-a review. Journal of Food Microbiology. 94: 223-253.

Chalchat, J-C. and Ozcan, M-M. 2008. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum L.*) used as herb. Journal of Food Chemistry. 110: 501-503.

Chaumont, J.P. and Senet, J.M. 1978. Antagonistic properties of higher plants against fungal parasites of man from food contaminants: screening of 200 fungi. Journal of Plant Met. Phototherapy. 12:186-196.

Chumhee, K. and Hsieh, Y-L. 2001. Wetting and absorbency of nonionic surfactant solutions on cotton fabrics. Journal of Colloids and Surfaces. 187: 385-397.

Costertion, J. W., Ingram, J. M. and Cheng, K. J. 1974. Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. Journal of Bact. 38: 87.

Dew, M. J. and Evans, J. R. 1984. Peppermint oil for the irritable bowel syndrome; a multi center trialm. Journal of Clin Pract. 38: 394-395.

Diaz, R., Quevedo-Sarmiiento, J., Ramos-Cormenzana, A., Cabo, P. and Cabo, J. 1988. Phytochemical and antibacterial screening of some species of *Spanish Lamiaceae*. Journal of Fitoterpia. 59: 330-333.

Duke, J.A. Handbook of Medicinal Herbs.1985. Boca Raton, FL. CRC Press.

Eteghad, S. S., Jirzaei, H., Pour, S. F. and Kahnamui, S. 2009. Inhibitory effect of endemic *Thymus vulgaris* and *Mentha piperita* essential oils on *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Biological Sciences. 4: 340-344.

Forgiarini, A., Esquena, J., González, C. and Solans, C. 2001. Formation and stability of nano-emulsions in mixed nonionic surfactant systems. Progress Colloid Polymer Science. 118: 184-189.

Gamarra, F. M., Sakanaka, L. S., Tambourgi, E. B. and Cabral, F. A. 2006. Influence on the quality of essential lemon *(Citrus aurantifolia)* oil by distillation process. Journal of Chemical Engineering. 23: 147-151.

Gaysinsky, S., Davidson, P.M., Bruce, B.D. and Weiss, J. 2005. Stability and antimicrobial efficiency of eugenol encapsulated in surfactant micelles as affected by temperature and pH. Journal of Food protection. 68: 1359-1366.

Gotshall, R.Y., Lucas, E.H., Lickfeldt, A. and Roberts, J.M. 1949. The occurrence of antibacterial substance active against mycobacterium tuberculosis in seed plants. Journal of Clinical Investigation, 28: 920-923.

Gupta, Charu., Garg, Amar P., Uniyal, Ramesh C. and Kumari Archana. 2008. Antimicrobial activity of some herbal oils against common food-borne pathogens. Journal of Microbiology Research. 2: 258-261.

Gupta, S., Moulik, S.P., Hazra, B., Ghosh, R., Sanyal, S.K., and Datta, S. 2006. New phamasutical microemulsion system for encapsulation and delivery of diospyrin, a plant-derived bioactive quinonoid compund.
Journal of Drug delivery. 13, 193-199.

Gupta, S. and Moulik, S.P. 2007. Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. Journal of Pharmaceutical Science. 97, 22-45.

Hamouda, T. and Baker Jr., J.R. 2000. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. Journal of Applied Microbiology 89, 397-403.

Hiemens, P. C. 1977. Principles of Colloid and Surface Chemistry. Marcel Dekker, Inc. N.Y.

Helander, I. M., Alakomi, H. L., Kyostil, K., Mattiala-andhoim, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, G.M. and Von W. A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. Journal of Agricultural Food Chemistry. 46: 3590-3595.

Hirobe, C., Palevitch, D., Tayeka, K. and Itokawa, H. 1994. Screening for antitumor activity of crude drugs (IV): studies on catatonic activity Israeli medicinal plants. Journal of Natural Medicine. 48: 168-170.

Hirakura, Y., Alvarez-Bravo, J., Kurata, S., Natori, S. and Kirino, Y.1996. Selective interaction of synthetic antimicrobial peptides derived from sapecin B with lipid bilayers. Journal of Biochem. 120:1130–1140.

Junaid, S. A., Olabode, A. O., Onwuliri, F. C., Okwori, A. E. J. and Agina, S. E. 2006. The antimicrobial properties of *Ocimum gratissimum* extracts on some selected bacterial gastrointestinal isolates. Journal of Biotechnology. 5: 2315-2321.

Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarn, H-M. and Vigenschow, H. 1986. Action of terpenoids on energy metabolism In: Brunke, E.J.(Ed), Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oil. De Gruyter, Berlin, pp. 429-445.

Koga, K., Ohyashiki, T., Murakami, M. and Kawashima, S. 1999. Modification of ceftibuten transport
by the addition of non-ionic surfactants. Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 49: 17-25.

Lawrence, M.J., Rees, G.D. 2000. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews. 45: 59-121.

Liu, W., Sun, D., Caifu, Li, C., Liu, Q. and Xu, J., 2006. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. Journal of Colloids and Interface Science. 303, 557-563.

Mathew, A. G. and Govindarajan, V. S. 1964. Polyphenolic substnces of arecanut II. changes during maturation and ripening. Journal of Phytochemistry. 3: 657-665.

Miranda, C. M., Van, C.W., Van Der Bijl, P. and. Basson, N. J. 1996. The effect of areca nut on salivary and selected oral microorganisms. Journal of International Dental. 45: 350-356.

NCCLS. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. 1999. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial. Volume 19 Number 18, Pennsylvania, USA.

Panomporn Panutat and Savitri Vatanyoopaisarn. 2009. Inhibitory effects of Thai herbs and spices on some food borne bacteria. King Mongkut Institute of Technology North Bangkok, Faculty of Applied Sciences, Department of Agro-Industrial Technology.

Prabuseenivasan, S., layakumar, M. and Ignacimuthu, S. 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. [Online] Available from; www. Biomedicental.com. [11 May 2009].

Rodrigues, A. C., Brito, A. G. and Melo, L. F. 2009. Effect of the surfactants tween 20 and CTAB on fluoranthene and anthracene degradation by *P. PUTIDA*. [Online] Available from: http://repositorium.sdum.uminho.pt/. [21/01/2009].

Rodríguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R. and Manca de Nadra, M.C. 2005. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. Journal of Food Control. 18: 93-101.

Shaw, D. J. 1970. Introduction to Colloid and Surface Chemistry. Butterworths. London.

Shiv, M. 2009. Microemulsion as solid dosage. [Online] Available from: http://www.pharmainfo.net/majumdarshiv/microemulsion-solid-dosage-form [21/01/2009]

Shrager, P. G. Macey, R. I. and Strickholm, A. 1969. Internal perfusion of crayfish giant axons: action of tannic acid, DDT, and tea. Journal of Cell Physiology. 74: 77.

Sikkema, J., De Bont, J.A.M. and Poolman, B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. Journal of Biological Chemistry. 269: 8022-8028.

Singleton, P. and Sainsbury, D. 1998. Dictionary of microbiology and molecular biology. second edition,A Wiley-Interscience Publication John wiley & sons, Singapore.

Smith, D. G. 1974. Inhibition of swarming in *Proteus* spp. By tannic acid. Journal of apply Bacteria. 38: 29-32.

Stashenko, E. E., Martinez, R., Pinzon, M. H. and Ramirez, J. 1996. Changes in chemical composition of catalytically hydrogenated orange oil *(Citrus sinessis)*. Journal of chromatography. 752: 217-222.

Teixeira, P.C., Leite, G.M., Domingues, R.J., Silva, J., Gibbs, P.A. and Ferreira, J.P. 2007. Antimicrobial effects of a microemulsion and a nanoemulsion on enteric and other pathogens and biofilms. International Journal of Food Microbiology. 118: 15–19.

Thailabonline healthsite. 2009. Essential oil database. [Online] Available from; http://www.thailabonline.com/aromatherapy6.htm#PEPPERMINT. [11 May 2009].

Ultee, A., Bennik, M. H. J. and Moezelaar, R. 2002. The Phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 68: 1561-1568.

Wang, C-K. and Lee, W-H. 1996. Separation, characteristics, and biological activates of phenolics in areca Fruit. Journal of Agricultural Food chemistry. 44: 2014-2019.

Wang, Y. C. and Huang, T. L. 2005. Screening of anti-*helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanaese folk medicinal plants. Journal of FEMS Immunology and Medical Microbiology. 43: 295-300.

Weiser, R., Moffat, D. B., Wimpenny, J. C., Asscher, A. W. and Sussman, M. 1972. Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) induced morphological changes in *Proteus mirabilis*. Journal of Orig. 222: 52.

Wilkins, K. M. and Board, R. G. 1989. Natural antimicrobial systems. In: Gould, G. W., Ed. Mechanisms of action of food Preservation Procedures. London, Elsevier, P. 285.

Yang, J. N. and Chou, C. C. 1997. Antimicrobial activity of various solvent extracts of betel quid ingredients [in Chinese]. [Online] Available from: www.drugs.com/npp/betel-nut.html. [11 May 2009].

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
การเจริญของแบคทีเรีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 จำนวนของ *E. coli* และ *S.* Typhimurium (log CFU/ml) ในอาหารเลี้ยงเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Broth (MHB) ที่มีผลิตภัณฑ์อิมัลชันร่วมกับความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18±2 ชั่วโมง โดยมี control ในการเทียบคือ MHB MHB+A MHB+C และ MHB+V

อายุการเก็บ (วัน)	จำนวนของ *B. cereus* (log CFU/ml)																								
	control				อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20					อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 25					อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมาก ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20					อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมาก ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 25				
	MHB	MHB +A	MHB +C	MHB +V	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)
1	9.68	9.29	2.27	1.98	no	no	no	no	5.96	no	no	no	no	5.57	no	no	no	no	5.05	no	no	no	no	4.71
7	9.60	8.07	1.52	1.85	no	no	no	no	5.59	no	no	no	no	5.28	no	no	no	no	7.56	no	no	no	no	6.13
14	9.93	8.80	1.55	1.39	no	no	no	no	7.96	no	no	no	no	5.24	no	no	no	no	7.58	no	no	no	no	7.83
28	10.77	8.85	2.43	1.59	no	no	no	no	7.03	no	no	no	no	6.73	no	no	no	no	7.79	no	no	no	no	7.86
94	9.51	7.68	2.44	1.84	no	no	no	no	6.62	no	no	no	no	7.39	no	no	no	no	7.83	no	no	no	no	7.42
154	8.33	7.50	1.48	1.97	no	no	no	no	6.15	no	no	no	no	7.40	no	no	no	no	7.86	no	no	no	no	8.15
อายุการเก็บ (วัน)	จำนวนของ *S. aureus* (log CFU/ml)																								
	control				อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20					อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 25					อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมาก ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20					อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมาก ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 25				
	MHB	MHB +A	MHB +C	MHB +V	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)
1	11.44	2.61	5.10	2.81	no	2.34	-	-	-	no	2.26	-	-	-	no	1.87	-	-	-	no	1.86	-	-	-
7	11.94	2.96	5.20	3.47	no	2.28	-	-	-	no	2.47	-	-	-	no	2.32	-	-	-	no	2.31	-	-	-
14	12.16	3.15	4.45	3.16	no	2.77	-	-	-	no	2.42	-	-	-	no	2.77	-	-	-	no	3.14	-	-	-
28	11.98	2.42	4.93	2.59	no	2.13	-	-	-	no	3.49	-	-	-	no	3.78	-	-	-	no	3.58	-	-	-
94	12.02	3.12	4.85	2.57	no	3.20	-	-	-	no	3.70	-	-	-	no	2.58	-	-	-	no	3.92	-	-	-
154	11.93	3.87	4.89	3.71	no	3.53	-	-	-	no	3.65	-	-	-	no	2.00	-	-	-	no	3.60	-	-	-

หมายเหตุ: MHB คือ Muller Hinton Broth MHB+A คือ Ampicillin 10 µg/ml ใน Muller Hinton Broth

MHB+C คือ Chloramphenecol 30 µg/ml ใน Muller Hinton Broth

MHB+V คือ Vancomycin 30 µg/ml ใน Muller Hinton Broth

no คือ เชื้อไม่เจริญ - คือ ไม่ได้ทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 จำนวนของ *E. coli* และ *S.* Typhimurium (log CFU/ml) ในอาหารเลี้ยงเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton Broth (MHB) ที่มีผลิตภัณฑ์อิมัลชันร่วมกับความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 25 บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18±2 ชั่วโมง โดยมี control ในการเทียบคือ MHB MHB+A MHB+C และ MHB+V

อายุการเก็บ (วัน)	จำนวนของ *E. coli* (log CFU/ml)																											
	control				อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 25						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมาก ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมาก ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 25					
	MHB	MHB +A	MHB +C	MHB +V	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	15 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	15 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	15 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	15 (µl/ml)
1	11.82	2.89	3.29	9.74	no	no	no	no	no	6.85	no	no	no	no	no	8.93	no	no	no	no	no	8.47	no	no	no	no	no	7.45
7	11.99	2.75	3.13	9.92	no	no	no	no	no	8.92	no	no	no	no	no	8.14	no	no	no	no	no	8.59	no	no	no	no	no	8.03
14	11.55	2.67	3.44	9.59	no	no	no	no	no	8.65	no	no	no	no	no	8.81	no	no	no	no	no	8.22	no	no	no	no	no	8.94
28	11.87	3.04	3.7	9.77	no	no	no	no	no	8.90	no	no	no	no	8.59	-	no	no	no	no	no	9.90	no	no	no	no	9.64	-
94	11.70	3.00	3.95	9.75	no	no	no	no	8.98	-	no	no	no	no	8.04	-	no	no	no	no	9.42	-	no	no	no	no	9.26	-
154	11.54	2.22	3.17	9.80	no	no	no	8.84	-	-	no	no	no	no	8.16	-	no	no	no	no	9.39	-	no	no	no	no	10.02	-
อายุการเก็บ (วัน)	จำนวนของ *S.* Typhimurium (log CFU/ml)																											
	control				อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่ ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 25						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมาก ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 20						อิมัลชันน้ำมันสะระแหน่และสารสกัดหมาก ร่วมกับ Tween 20 ร้อยละ 25					
	MHB	MHB +A	MHB +C	MHB +V	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	15 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	15 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	15 (µl/ml)	500 (µl/ml)	250 (µl/ml)	125 (µl/ml)	60 (µl/ml)	30 (µl/ml)	15 (µl/ml)
1	11.88	2.53	4.27	9.73	no	no	no	no	no	6.85	no	no	no	no	no	8.93	no	no	no	no	no	8.47	no	no	no	no	no	7.45
7	11.69	2.63	3.23	9.66	no	no	no	no	no	8.92	no	no	no	no	no	8.14	no	no	no	no	no	8.59	no	no	no	no	no	8.03
14	11.88	2.44	4.10	9.48	no	no	no	no	no	8.65	no	no	no	no	no	8.81	no	no	no	no	no	8.22	no	no	no	no	no	8.94
28	11.51	2.61	4.32	9.64	no	no	no	no	no	8.90	no	no	no	no	8.59	-	no	no	no	no	no	9.90	no	no	no	no	9.64	-
94	11.81	2.73	3.64	9.69	no	no	no	no	8.98	-	no	no	no	no	8.04	-	no	no	no	no	9.42	-	no	no	no	no	9.26	-
154	11.02	2.10	4.53	9.03	no	no	no	8.84	-	-	no	no	no	no	8.16	-	no	no	no	no	9.39	-	no	no	no	no	10.02	-

หมายเหตุ: MHB คือ Muller Hinton Broth MHB+A คือ Ampicillin 10 µg/ml ใน Muller Hinton Broth

MHB+C คือ Chloramphenecol 30 µg/ml ใน Muller Hinton Broth

MHB+V คือ Vancomycin 30 µg/ml ใน Muller Hinton Broth

no คือ เชื้อไม่เจริญ

- คือ ไม่ได้ทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอัจจิมา ก๋าพรม เกิดวันที่ 13 สิงหาคม 2525 ที่จังหวัดเชียงราย สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย เมื่อปีการศึกษา 2547 และเข้าศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย