



เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

การกักเก็บน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบไลโปโซมเพื่อใช้เป็น
เครื่องสำอางที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดสิว

PREPARATION OF LIPOSOMES ENTRAPPING ESSENTIAL OILS
FOR ANTI-ACNE COSMETIC PRODUCTS

ชญานี วงศ์แหลมทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรเครื่องสำอาง)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

พ.ศ. 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

การกักเก็บน้ำมันระเหยในรูปแบบไลโปโซมเพื่อใช้เป็นเครื่องสำอางที่มีฤทธิ์
ในการต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดสิว

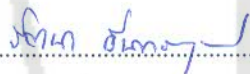
PREPARATION OF LIPOSOMES ENTRAPPING ESSENTIAL OILS
FOR ANTI-ACNE COSMETIC PRODUCTS

ชญาณี วงศ์แหลมทอง

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ตรวจสอบและอนุมัติให้
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
เมื่อวันที่ 30 มิถุนายน พ.ศ. 2560



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัฐพล อาษาสุจริต
ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ



รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุปกรณ์
กรรมการ



อาจารย์ ดร.ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์
กรรมการ



อาจารย์ ดร.ปารภัทร โสภารักษ์
กรรมการ



รองศาสตราจารย์ ดร.ฤดี เสาวคนธ์
กรรมการ



รองศาสตราจารย์ อิสยา จันทน์วิทยานุชิต
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย



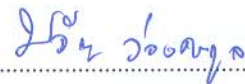
รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุปกรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก



อาจารย์ ดร.ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม



อาจารย์ ดร.ปารภัทร โสภารักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม



อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล
ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)



ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชานู จันทน์วิทยานุชิต
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

การกักเก็บน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบไลโปโซมเพื่อใช้เป็นเครื่องสำอาง ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดสิว

ชญานี วงศ์แหลมทอง 566077

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รัตนา อินทรานุกุล, Ph.D., ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์, Ph.D.,
ปารภัทร โสภารักษ์, Ph.D.

บทคัดย่อ

น้ำมันหอมระเหยมีความไม่คงตัวและสลายตัวได้ง่ายในที่ที่มีออกซิเจน แสงแดด และอุณหภูมิ ไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหยคาดว่าสามารถลดการระเหยและเพิ่มความคงตัวให้กับน้ำมันหอมระเหยได้ ในการศึกษาครั้งนี้เบื้องต้นได้มีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวของน้ำมันหอมระเหยแล้วทำการพัฒนาระบบนำส่งสารเพื่อกักเก็บและเพิ่มความคงตัวให้กับน้ำมันหอมระเหย การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวดูเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) และ *Propionibacterium acnes* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหยที่พบบ่อยทั้งแบบเดี่ยวและแบบผสมซึ่งประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยอบเชย (*Cinnamomum burmannii*) เสม็ดขาว (*Melaleuca leucadendron*) และไพล (*Zingiber cassumunar Roxb*) น้ำมันหอมระเหยผสมจากอบเชยและเสม็ดขาว (CM) มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) ทั้งสองชนิดข้างต้น เท่ากับ 1.024 และ 0.512 mg/mL ตามลำดับ จึงเลือกนำมากักเก็บในตำรับไลโปโซม จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบหลัก eucalyptol และ cinnamaldehyde ของ CM ด้วยวิธีวิเคราะห์ GC-MS ที่พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องแล้ว พบว่า ปริมาณของสารสำคัญทั้ง 2 ชนิดใน CM เท่ากับ 47.27 % และ 58.20 % ตามลำดับ การเตรียมตำรับไลโปโซมซึ่งประกอบด้วย phospholipid, cholesterol และ CM (2 mg/mL) เตรียมโดยใช้วิธี thin-film hydration และทำการศึกษาผลของอัตราส่วน phospholipid/cholesterol (60:40, 70:30, 80:20 และ 90:10) และระยะเวลา sonication (0, 2 และ 5 นาที) ต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย พบว่า ตำรับ F8 ซึ่งเป็นตำรับที่มีอัตราส่วน phospholipid/cholesterol เท่ากับ 80:20 และ ผ่านการ sonicate 2 นาที เป็นตำรับที่นำฟิงพอใจ มีปริมาณ CM สูงที่สุด (87.90%) และใช้ในการศึกษาความคงตัวต่อไป จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า F8 มีลักษณะเป็นถุงทรงกลมที่บรรจุ CM ไว้ภายใน เมื่อศึกษาความคงตัวของ F8 ที่อุณหภูมิ 4°C และที่อุณหภูมิห้อง 25°C เป็นเวลา 2 เดือน ผลการทดลองพบว่า F8 เป็นตำรับที่ค่อนข้างคงตัว ณ อุณหภูมิที่เก็บทั้งสองอุณหภูมิภายในระยะเวลา 2 เดือน ลักษณะทางกายภาพไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ขนาดของอนุภาคไลโปโซมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและประสิทธิภาพในการกักเก็บ CM ลดลงเท่ากับ 8.78 และ 12.83% สำหรับตำรับที่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C ตามลำดับ ดังนั้น ไลโปโซมที่บรรจุ CM หากเก็บที่อุณหภูมิ 4°C มีความคงตัวมากกว่าเก็บที่อุณหภูมิ 25°C โดยมีการ leak ของน้ำมัน และขนาดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย นอกจากนี้ยังได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวของไลโปโซมที่บรรจุ CM ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4°C จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหย CM สามารถคงตัวได้ภายในถุงไลโปโซมและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) สูงกว่าน้ำมันหอมระเหย CM ที่ไม่ได้กักเก็บในไลโปโซม การศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่มีแนวโน้มพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในการยับยั้งสิวได้

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย ไลโปโซม สิว ด้านอนุมูลอิสระ

PREPARATION OF LIPOSOMES ENTRAPPING ESSENTIAL OILS FOR ANTI-ACNE COSMETIC PRODUCTS

CHAYANEE WONGLAMTHONG 566077

MASTER OF SCIENCE (COSMETIC SCIENCES)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: RATANA INDRANUPAKORN, Ph.D.,

TRIWIT RATTANAROJPONG, Ph.D., PARAPAT SOBHARAKSHA, Ph.D.

ABSTRACT

Essential oils are unstable and susceptible to degradation reaction in the presence of ambient oxygen, light and temperature. Essential oil-loaded liposome has been proposed for their capability of decreasing volatility and enhancing stability. In this study, the anti-acne-inducing microbial activity of common essential oils was initially evaluated and a vesicular delivery system was developed to entrap and stabilize essential oils. The anti-acne-inducing bacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) and *Propionibacterium acnes* (DMST 14916) of the single and combinations of common essential oils such as cinnamon (*Cinnamomum burmannii*), cajuput (*Melaleuca leucadendron*), and plai (*Zingiber cassumunar* Roxb) oils were investigated. The combination of cinnamon and cajuput oils (CM) was particularly effective with the same minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values for both bacterial species at 1.024 and 0.512 mg/mL, respectively and selected for incorporation into liposome. CM was analyzed by a validated GC-MS method for the two major compounds, eucalyptol and cinnamaldehyde, contents. The amounts of both main components in CM were 47.27 and 58.20%, respectively. The liposomal formulations composed of phospholipid, cholesterol and CM (2 mg/mL) were prepared using a thin film hydration method. The effects of different mass ratios of phospholipid/cholesterol (60:40, 70:30, 80:20, 90:10) and sonication time (0, 2 and 5 min) on oil entrapment efficiency were evaluated. The most satisfactory formulation, F8, containing the mass of phospholipid to cholesterol ratio of 80:20 and was sonicated for 2 min, emerged the maximum amount of CM content (87.90%) and was used for further stability studies. Transmission electron microscopy revealed the spherical nature of the CM loaded vesicles. The stability of F8 at 4°C and the room temperature, 25°C, for 2 months were also investigated. The results obtained have shown that F8 was quite stable within two months at both storage temperatures. No significant change in the physical appearance was observed. The size of liposomes increased slightly and the encapsulation efficiencies decreased by 8.78 % and 12.83 % for the formulations at 4°C and 25°C, respectively. Thus, the liposomes at 4°C were more stable with a slight oil leakage and slight increase in size than those at 25°C. Furthermore, the effect of the encapsulation on the antibacterial activity of the essential oil-loaded liposomes at 4°C was also evaluated. The results indicated that CM could be stabilized in the vesicles and its antibacterial activity against *S. epidermidis* (ATCC 14990) and *P. acnes* (DMST 14916) was superior to that of the free CM. The present study indicates the potential of essential oil-loaded liposomes as a promising technology which could be further developed to a suitable anti-acne cosmetic products.

Keywords: Essential oils, Liposome, Acne, Antioxidant

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ซึ่งได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุกุลกรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์ และ อาจารย์ ดร.ปารภัทร โศภารักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และคำปรึกษา เสนอข้อคิดเห็น ชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหาและตรวจทานแก้ไขจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ เป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเภสัชเวชและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ได้อำนวยความสะดวกในการเบิกจ่าย อุปกรณ์ สารเคมี รวมถึงให้คำแนะนำ ปรึกษาเกี่ยวกับการใช้เครื่องมือต่าง ๆ

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่อบรมสั่งสอน ตลอดจนให้คำปรึกษา แนะนำพร้อมช่วยเหลือทั้งเรื่องค่าใช้จ่ายในการเล่าเรียนให้โอกาสในการเรียนรู้แก่ผู้วิจัย ขอบพระคุณ สำหรับการดูแล ความเอาใจใส่และเป็นกำลังใจอันสำคัญยิ่ง ทำให้ผู้วิจัยสามารถผ่านพ้นทุกปัญหา และประสบความสำเร็จในการเรียนตลอดมา

ขอขอบคุณคนรัก ที่คอยเป็นกำลังใจ สนับสนุน และเป็นแรงผลักดันให้ต่อสู้กับปัญหาอย่างไม่ย่อท้อ ทำให้ผู้วิจัยมีกำลังใจในการศึกษาเล่าเรียนจนประสบความสำเร็จได้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ ที่เรียนร่วมกันในระดับมหาบัณฑิตที่คอยให้ความช่วยเหลือเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา

ชญาณี วงศ์แหลมทอง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญแผนภูมิ	ฉ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 คำนิยามศัพท์หรือคำนิยามเชิงปฏิบัติการ	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 สิวและชนิดของสิว	5
2.2 สาเหตุของการเกิดสิว	6
2.3 การรักษาสิว	7
2.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว	8
2.5 น้ำมันหอมระเหย	11
2.6 สมุนไพรที่เลือกนำมาศึกษาวิจัย	11
2.7 การทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาต้านจุลินทรีย์	17
2.8 อนุมูลอิสระ	18
2.9 ปฏิกริยาการเกิดอนุมูลอิสระ	19
2.10 สารต้านอนุมูลอิสระ	20
2.11 การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน	21
2.12 แก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี	23
2.13 ไลโปโซม	24
2.14 กลไกการเกิดไลโปโซม	26

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.15 ส่วนประกอบของไลโปโซม	26
2.16 วิธีการเตรียมไลโปโซม	27
2.17 ข้อดีของไลโปโซม	28
2.18 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	29
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี	32
3.2 วิธีการศึกษาวิจัย	35
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การตรวจสอบยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	49
4.2 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) และ <i>P. acne</i> (DMST 14916) โดยวิธี Disc diffusion method	50
4.3 การศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ของน้ำมันหอมระเหย	53
4.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	54
4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหย ชนิดผสมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว ได้ดีที่สุดด้วยเครื่อง GC-MS	56
4.6 การศึกษาความคงตัวของการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมในไลโปโซม	64
4.7 การศึกษาสัณฐานวิทยาของตำรับไลโปโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหย ได้ดีที่สุดด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรซ์ (polarized light microscopy) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	79
4.8 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของตำรับ ไลโปโซม F8 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์	80
4.9 การประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) และ <i>P. acnes</i> (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ถูกกักเก็บและไม่มีถูกกักเก็บในไลโปโซมเป็นเวลา 8 สัปดาห์	89

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	
5.1 สรุปผลการวิจัย	94
5.2 อภิปรายผล	95
5.3 ข้อเสนอแนะ	101
บรรณานุกรม	102
ประวัติผู้เขียน	108



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์	37
2 Programmed Temperature ของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี ของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม CM	42
3 การออกแบบตำรับไลโปโซม	45
4 Programmed Temperature ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ในน้ำมันหอมระเหยที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม (F1-F12) ด้วยวิธี GC-MS	46
5 ขนาด inhibition zone จากผลการตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990)	51
6 ขนาด inhibition zone จากผลการตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. acnes</i> (DMST 14916)	52
7 ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสมต่อ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) และ <i>P. acnes</i> (DMST 14916)	54
8 ค่า IC ₅₀ ของน้ำมันหอมระเหยและสารมาตรฐานด้วยวิธี DPPH ^{••} radical scavenging assay	55
9 ค่า IC ₅₀ ของน้ำมันหอมระเหยและสารมาตรฐานด้วยวิธี ABTS ^{••} radical scavenging capacity assay	56
10 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่า correlation coefficient ของ eucalyptol	60
11 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่า correlation coefficient ของ cinnamaldehyde	61
12 การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ eucalyptol และ cinnamaldehyde ในน้ำมันผสมโดยวิเคราะห์ในวันเดียวกันและวิเคราะห์ต่างวันกัน	62
13 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ eucalyptol และ cinnamaldehyde	63
14 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันเสม็ดขาวและน้ำมันอบเชย	64
15 ขนาดอนุภาคและ ค่า Polydispersity index ของตำรับไลโปโซมในวันที่ 0	66
16 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่า correlation coefficient ของ eucalyptol	71
17 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่า correlation coefficient ของ cinnamaldehyde	72
18 การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ eucalyptol และ cinnamaldehyde ที่กักเก็บในตำรับไลโปโซมโดยวิเคราะห์ในวันเดียวกันและต่างวันกัน	73

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
19 การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ eucalyptol และ cinnamaldehyde ที่อยู่ใน CM	74
20 ปริมาณสารสำคัญ eucalyptol และ cinnamaldehyde ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่นำไปบรรจุในตำรับไลโปโซม	75
21 peak area และเปอร์เซ็นต์การกักเก็บน้ำมันหอมระเหย CM ในไลโปโซมทั้ง 12 ตำรับ	76
22 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับไลโปโซม F8 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์	81
23 ประเมินความคงตัวทางเคมีของตำรับไลโปโซม F8 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์	82
24 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับไลโปโซม F8 ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์	86
25 ประเมินความคงตัวทางเคมีของตำรับไลโปโซม F8 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์	87
26 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>S.epidermidis</i> (ATCC 14990) ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มด้วยไลโปโซมเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	91
27 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ <i>P.acnes</i> (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มด้วยไลโปโซมเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	92

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่	หน้า
1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน eucalyptol	60
2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน cinnamaldehyde	61
3 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน eucalyptol	71
4 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน cinnamaldehyde	72
5 เปรียบเทียบขนาด inhibition zone ของ CM ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มด้วยไลโปโซมต่อเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	93
6 เปรียบเทียบขนาด inhibition zone ของ CM ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการ ห่อหุ้มด้วยไลโปโซมต่อเชื้อ <i>P. acnes</i> (DMST 14916) เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	93

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การเกิดสิว	6
2 ลักษณะโคโลนีบนจานเพาะเชื้อและการเรียงตัวของ จากการย้อม สีแกรมของ <i>S. epidermidis</i>	8
3 รูปร่าง การเรียงตัวจากการย้อมสีแกรมและลักษณะโคโลนีบนจาน เพาะเชื้อของเชื้อจุลินทรีย์ <i>P. acnes</i>	10
4 ลักษณะของไฟล	11
5 ลักษณะของเสม็ดขาว	14
6 ลักษณะของอบเชย	16
7 องค์ประกอบพื้นฐานของแมสสเปกโตรเมทรี	24
8 ลักษณะของไลโปโซมและแสดงบริเวณที่กักเก็บสารสำคัญ ที่มีสมบัติชอบชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ	25
9 ตำแหน่งการวาง disc ในวิธี disc diffusion	38
10 ขั้นตอนการเจือจางแบบวิธี serial two-fold dilution	39
11 ลักษณะเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาด 100X และบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ, ลักษณะเชื้อ <i>P. acnes</i> (DMST 14916) ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ขนาด 100X และบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ	49
12 ตัวอย่างขนาด inhibition zone, ของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) และ <i>P. acnes</i> (DMST 14916) ของสารละลาย CM (cinnamon: cajuput) ใน DMSO เปรียบเทียบกับ ampicillin 10 µg และตัวทำละลาย DMSO	53
13 GC โครมาโทแกรมของ eucalyptol และ cinnamaldehyde ในน้ำมัน CM, mass spectra ของ eucalyptol และ mass spectra ของ cinnamaldehyde	57
14 GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน eucalyptol และโครมาโทแกรมของ สารมาตรฐาน cinnamaldehyde	58
15 mass spectram ของสารมาตรฐาน eucalyptol และ mass spectram ของ สารมาตรฐาน cinnamaldehyde	59
16 ตัวอย่างไลโปโซมตำรับ 80:20 ที่ผ่านการ sonicate ที่เวลา 0, 2 และ 5 นาที	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
17 GC โครมาโทแกรมของ eucalyptol และ cinnamaldehyde, mass spectra ของ eucalyptol และ mass spectram ของ cinnamaldehyde	67
18 GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน eucalyptol และ GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน cinnamaldehyde	69
20 ลักษณะของไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหย CM ในตำรับ F8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโพลาไรซ์, กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 71000X และกำลังขยาย 135000X	79
21 GC โครมาโทแกรมของตำรับไลโปโซม F8 ที่บรรจุน้ำมันหอมระเหย CM ในสัปดาห์ที่ 0 และ สัปดาห์ที่ 8	84
22 ตัวอย่างขนาดของ inhibition zone ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ <i>S.epidermidis</i> สัปดาห์ที่ 0 ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ผ่านกระบวนการห่อหุ้ม (a) และ CM ที่ไม่ผ่านกระบวนการห่อหุ้ม (b)	90

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สิวเป็นปัญหาที่พบบ่อยในวัยรุ่นและสามารถพบได้เล็กน้อยในวัยผู้ใหญ่ สิวอาจจะเป็นปัญหาที่ไม่รุนแรง แต่มีผลทางด้านจิตใจของผู้ที่เป็นสิว โดยเฉพาะกลุ่มวัยรุ่นซึ่งจัดเป็นประชากรกลุ่มใหญ่ของประเทศ ซึ่งเป็นวัยที่ให้ความสนใจในด้านความสวยความงามมากเป็นพิเศษ จึงทำให้เกิดความกังวลแล้วนำไปสู่การปฏิบัติที่ไม่ถูกต้อง และหากดูแลรักษาไม่ดีอาจก่อให้เกิดการเรื้อรัง ไม่หายขาด ทำให้เกิดรอยดำและแผลเป็นจากสิวง่ผลทำให้ผิวพรรณไม่เรียบเนียน ซึ่งส่งผลกระทบต่อทั้งทางร่างกายจิตใจและคุณภาพชีวิตของผู้ที่เป็นสิว ดังนั้นสิวจึงถือว่าเป็นปัญหาใหญ่อีกปัญหาหนึ่งที่วัยรุ่นต้องการการแก้ไข ซึ่งยาแผนปัจจุบันที่นำมาใช้ในการรักษาสิวมักมีผลข้างเคียงและมีราคาแพง ทั้งในส่วนของตัวยาและใช้ระยะเวลาในการรักษา ทำให้สิ้นเปลืองและมีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งยาบางตัวต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ ปัจจุบันประเทศไทยต้องมีการนำเข้ายาจากต่างประเทศมากถึงร้อยละ 75 ของยาที่ใช้ทั้งหมด คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1 แสนล้านบาทต่อปี ในขณะที่ตลาดยาในประเทศไทยมีมูลค่าประมาณ 60,000-70,000 ล้านบาทเท่านั้น จึงทำให้ประเทศไทยมีค่าใช้จ่ายทางด้านยาในระบบสาธารณสุขไทยจำนวนมหาศาล⁽¹⁾ ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว จึงต้องมีการวิจัยและพัฒนาสิ่งที่จะมาทดแทนยาเหล่านี้ โดยผู้วิจัยได้เลือกศึกษาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการรักษาสิวเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบันได้ในแง่ของราคาและความปลอดภัย

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยสนใจศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรที่หาง่ายและมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (*Cinnamomum burmannii*) จัดเป็นพืชสมุนไพรและเครื่องเทศที่มีกลิ่นหอมและมีรสหวานอบเชยถูกจัดว่าเป็น Queen of spices เนื่องจากเป็นพืชเศรษฐกิจ อีกทั้งน้ำมันที่กลั่นได้จากเปลือกของอบเชยยังมีสรรพคุณในการฆ่าเชื้อโรคได้ดีอีกด้วย⁽²⁾ จากรายงานการวิจัย พบว่า สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย คือ cinnamondehyde และ eugenol สารสำคัญนี้มีความสามารถในการทำลายผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียได้ ทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย⁽³⁾ น้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว (*Melaleuca leucadendron*) เป็นพืชที่สามารถพบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย เสม็ดขาวสามารถสกัดน้ำมันออกมาใช้ประโยชน์ได้ เรียกว่าน้ำมันเสม็ดขาว หรือน้ำมันเจียว (cajuput oil) แก้อาการปวดเมื่อย บรรเทาอาการอักเสบ รักษาสิว จากรายงานการวิจัย พบว่า น้ำมันเสม็ดขาว มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดสิวได้ดี⁽⁴⁾ และน้ำมันหอมระเหยจากไพล (*Zingiber cassumunar Roxb*) เป็นพืชสมุนไพรที่เป็นเครื่องเทศ มีสมบัติทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ในการขับลม รักษาโรคผิวหนัง ฆ่าเชื้อราและแบคทีเรีย เป็นต้น จากรายงาน

การวิจัย พบว่า เจลโพลที่ความเข้มข้น 1% สามารถรักษาสิวได้เล็กน้อยถึงปานกลางแต่ไม่ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังของอาสาสมัคร โดยสามารถเห็นผลในการรักษาได้ภายในเดือนแรกเมื่อเทียบกับยาหลอก⁽⁵⁾ นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำมันหอมระเหยอบเชย (*C. cassia*) ผสมกับน้ำมันหอมระเหยโหระพา (*Ocimum basilicum*) ในอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้น 2.5% v/v สามารถยับยั้งสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* CFR 223 ได้ดีกว่าการใช้ น้ำมันหอมระเหยที่เป็นชนิดเดียว⁽⁶⁾ แต่ยังไม่พบรายงานการวิจัยที่มีการใช้น้ำมันหอมระเหยชนิดผสมกับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว

ดังนั้นผู้วิจัยสนใจศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดสิว (*Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium acnes*)⁽⁷⁾ ของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดียว (ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย น้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว และ น้ำมันหอมระเหยจากโพล) และน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม (ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมกับเสม็ดขาว น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมกับโพลและน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวผสมกับโพล) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษางานประกอบทางเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้งชนิดเดียวและชนิดผสม ทำการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิคไลโปโซม เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมของสารสำคัญเข้าสู่ผิวหนัง และช่วยป้องกันการสลายตัวของน้ำมันหอมระเหยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อากาศ และ แสง เป็นต้น⁽⁸⁾ ซึ่งคาดว่าจะผลการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาสิว เพื่อช่วยลดต้นทุนการใช้จ่ายผู้ป่วยและลดปัญหาผลข้างเคียงจากการใช้ยาสังเคราะห์ อีกทั้งเป็นการส่งเสริมให้มีการปลูกพืชสมุนไพรเพื่อเพิ่มรายได้ให้กับประชากรในประเทศ และมีส่วนในการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดียว (ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (*C. burmannii*) น้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว (*M. leucadendron*) และน้ำมันหอมระเหยจากโพล (*Z. cassumunar* Roxb)) และชนิดผสม (ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมเสม็ดขาว น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมโพลและน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวผสมโพล)

2. คัดเลือกชนิดน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ที่ดีที่สุด มาศึกษาองค์ประกอบหลักทางเคมีด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรสโคปี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)

3. พัฒนาคำรับน้ำมันหอมระเหยจากข้อ 2 ในรูปแบบไลโปโซมและประเมินสมบัติทางกายภาพ ความคงตัวของน้ำมันหอมระเหยในคำรับไลโปโซม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. เปรียบเทียบฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว (ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย น้ำมันหอมระเหยจากเสมีดขาว และน้ำมันหอมระเหยจากไพล) และชนิดผสม (ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมเสมีดขาว น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมไพลและน้ำมันหอมระเหยจากเสมีดขาวผสมไพล) ด้วยวิธี disc diffusion, minimal Inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC)

2. ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว (ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย น้ำมันหอมระเหยจากเสมีดขาว และน้ำมันหอมระเหยจากไพล) และชนิดผสม (ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมเสมีดขาว น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมไพลและน้ำมันหอมระเหยจากเสมีดขาวผสมไพล) โดยใช้วิธี 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH⁺) และ วิธี 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline6-sulfonic acid) cation radical scavenging assay

3. วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีที่สุดด้วยเครื่อง GC-MS

4. ศึกษาและพัฒนาการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. acnes* ที่ดีที่สุดด้วยเทคนิคไลโปโซม โดยศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของปริมาณน้ำมันหอมระเหยและสารห่อหุ้มในการกักเก็บ

5. ศึกษาและประเมินลักษณะทางกายภาพ และความคงตัว ของน้ำมันหอมระเหยในตำรับไลโปโซมโดยศึกษาปริมาณการกักเก็บของน้ำมันหอมระเหยในตำรับ

1.4 คำนิยามศัพท์หรือคำนิยามเชิงปฏิบัติการ

°C	องศาเซลเซียส
nm	นาโนเมตร
µL	ไมโครลิตร
mL	มิลลิลิตร
v/v	ปริมาตร/ปริมาตร
µg/mL	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
mg/mL	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
%	ร้อยละ
g	กรัม
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
CFU/ml	Colony forming units per milliliter
TSB	Tryptic soy broth
TSA	Tryptic soy agar
MHB	Mueller hinton broth
MHA	Mueller hinton agar
MIC	Minimal inhibitory concentration
MBC	Minimal bactericidal concentration
OD	Optical density
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
PDI	Polydispersity index
DI	Diameter
EtOH	Ethanol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
C	น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย
M	น้ำมันหอมระเหยจากเสมีดขาว
Z	น้ำมันหอมระเหยจากไพล
CM	น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมเสมีดขาว
CZ	น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมไพล
MZ	น้ำมันหอมระเหยจากเสมีดขาวผสมไพล

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางในการพัฒนาและเพิ่มมูลค่าน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรด้วยองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ ให้เกิดการนำไปใช้ประโยชน์และเป็นที่ยอมรับ
2. เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ทางเครื่องสำอาง

บทที่ 2

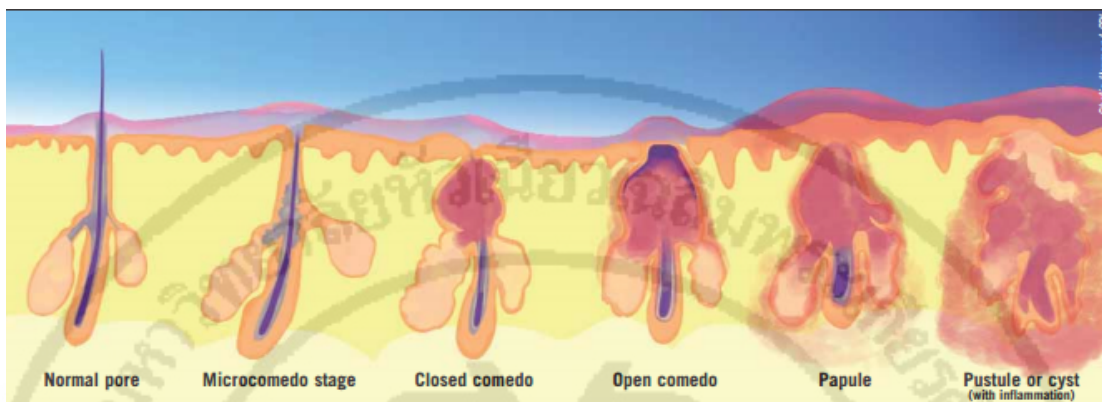
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สิวและชนิดของสิว⁽⁹⁾

สิว เป็นโรคที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรังที่รูขุมขนและต่อมไขมัน สามารถพบได้บ่อยโดยเฉพาะผิวหนังที่บริเวณใบหน้าและส่วนบนของลำตัว สิวที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (Acne vulgaris) คือ สิวที่เกิดขึ้นในระยะวัยรุ่น สิวเกิดจากความผิดปกติของ pilosebaceous units ซึ่ง pilosebaceous units ประกอบไปด้วยต่อมไขมัน (sebaceous gland), เส้นขน (hair) และเซลล์บุล้อมรอบเส้นขน เพื่อเปิดออกสู่ผิวส่วนนอก (infundibulum) สิวจึงเกิดจากการผลิตไขมัน (sebum) ในต่อมไขมันใต้ผิวหนังที่เพิ่มมากขึ้นร่วมกับการเพิ่มจำนวนอย่างผิดปกติของเคราติน (keratin) ที่บริเวณนั้น ภายใน pilosebaceous unit การรวมตัวกันของเซลล์ผิวชั้น stratum corneum ซึ่งอยู่บริเวณรูเปิดของท่อไขมัน ทำให้เกิดการอุดตันแน่น จนบวมเป็นตุ่มนูนที่เรียกว่า ไมโครคอมิโดน (microcomedones) ถ้าปล่อยทิ้งไว้จะมีขนาดใหญ่ขึ้น เพิ่มมากขึ้นและอัดแน่น ก่อให้เกิดสภาพเป็นสิิวหัวปิด (closed comedones หรือ white head) ถ้าสภาพนี้ยังคงดำเนินต่อไปจะเกิดการดันและแตกของปลายเปิดของท่อต่อมไขมันสู่ผิวหน้าส่วนนอกกลายเป็นสิิวหัวเปิด (opened comedones) เซลล์เยื่อภายในท่อเมื่อถูกแสงจะทำให้สารเมลานิน มีสีคล้ำลง เห็นเป็นสิิวหัวดำ (blackhead) และพบเชื้อแบคทีเรีย *P. acnes* ได้ตามปกติภายในต่อมไขมัน โดยเชื้อจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ไลเปส (lipase) ไปทำลายไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) ในไขมันใต้ผิวหนังเกิดเป็นกรดไขมัน นอกจากนี้ *P. acnes* ยังหลั่งเอนไซม์ protease, hyaluronidase และ low molecular weight chemotactic factor ซึ่งทำให้ต่อมไขมันระคายเคืองและเกิดกระบวนการอักเสบขึ้น หากเกิดการอุดตันของท่อต่อมไขมัน ผังของ pilosebaceous unit จะแตกออก แล้วปล่อยกรดไขมันสู่เนื้อเยื่อรอบๆ ทำให้บวมและมีเซลล์เม็ดเลือดขาวสะสม เกิดเป็นสิิวอักเสบเป็นตุ่มแดง (papules) ตุ่มหนอง (pustules) สิวหัวช้าง (nodulocystic acne) การติดเชื้อในระหว่างที่ยังเป็นสิิวหัวปิดอยู่ ผังของคอมิโดนจะแตกสู่ชั้นหนังกำพร้าด้านล่างและหนังแท้เกิดเป็นกระเปาะนูนใหญ่ที่เรียกว่า สิวหัวช้าง (nodulocystic acne) และหากสิิวมีการอักเสบรุนแรงมากขึ้น เช่น มีการบีบเค้นสิิว สิวที่อักเสบจะเกิดเป็นหนองขึ้น หัวสิิวสามารถทำให้เกิดการอักเสบได้ไม่เท่ากันในแต่ละคน การรักษาจึงมีความจำเป็นในรายที่มีความกังวลกับสิิวหรือเป็นสิิวอักเสบรุนแรง ส่วนใหญ่สิิวจะสามารถหายขาดได้เมื่อพ้นวัยรุ่น แต่ถ้าเคยเป็นมากจะทิ้งรอยแผลเป็นไว้ให้เห็นได้ การรักษามักจะต้องใช้เวลานาน ประมาณ 6 เดือน ถึงจะเห็นผลชัดเจนผู้ที่ เป็น สิวเพียงเล็กน้อยอาจจะใช้เพียงยาทาที่เพียงพอ สำหรับสิิวที่พบในผู้ใหญ่ มักจะเกิดจากสาเหตุอื่น เช่น เครื่องสำอาง หรือความผิดปกติของฮอร์โมน เป็นต้น

2.2 สาเหตุของการเกิดสิว⁽¹⁰⁾

ภาพที่ 1 การเกิดสิว



ที่มา: Clinical Pharmacist. 2009⁽¹⁰⁾

เกิดจากการอุดตันของระบบต่อมไขมันที่อยู่ภายในรูขุมขน ซึ่งโดยปกติแล้วไขมันจะสามารถถูกขับออกมาจากรูขุมขนได้ แต่ถ้าหากเกิดการอุดตันภายในรูขุมขน จะส่งผลทำให้ไขมันไม่สามารถเดินทางออกมาภายนอกได้ จึงทำให้เกิดลักษณะของตุ่มเม็ดเล็ก ๆ มีลักษณะเป็นก้อนสีขาว ๆ อยู่ในหากมีการกระตุ้นจากปัจจัยอื่น ๆ เพิ่มเติม ก็สามารถทำให้เกิดการอักเสบของสิว และถ้าเกิดการอักเสบแบบรุนแรงจะทำให้เกิดตุ่มหนองขึ้นได้ ซึ่งสิวสามารถเกิดจากปัจจัยหลักได้ 4 อย่าง ดังนี้

1. การอุดตันของต่อมขน โดยปกติแล้วรูเปิดของต่อมขนจะมีโปรตีน keratin อยู่รวมกันอยู่อย่างหลวม ๆ ในกรณีของคนที่เป็นสิวมักมีความผิดปกติของการสร้าง keratin ในบริเวณรูเปิดของต่อมขน keratin จะจับตัวกันแน่นอุดรูเปิดเอาไว้ ทำให้ keratin และน้ำมันจากต่อมไขมันหลังออกมาสู่ผิวหนังไม่ได้ ทำให้ต่อมขนพองออกเป็น cyst ขนาดเล็กที่เรียกว่า comedone ซึ่งจะมี 2 ชนิด คือ สิวหัวปิด (closed comedone) หรือสิวหัวขาว เป็นตุ่มขาวเล็ก ๆ ซึ่งไม่มีรูเปิดหรือถ้ามีก็จะเป็นขนาดเล็ก และ สิวหัวเปิด (open comedone) หรือสิวหัวดำ เป็นตุ่มที่มีรูเปิดสีดำ (ดังภาพที่ 1)

2. การทำงานของต่อมน้ำมัน (sebaceous glands) ในภาวะปกติต่อมน้ำมันพบอยู่มากบริเวณตอนกลางของใบหน้า หน้าอก หลังและหนังศีรษะ ต่อมน้ำมันจะถูกกระตุ้นโดยฮอร์โมนเพศชาย (testosterone) ให้มีขนาดใหญ่ขึ้นและเริ่มทำงานเมื่อเข้าสู่วัยรุ่น ทำให้ผิวหนังบริเวณนี้มีไขมันต่อมน้ำมันจะหลั่งสารไขมัน (sebum) ที่ประกอบด้วย fatty acid, triglyceride, squalene และ wax ester ความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานที่มากผิดปกติของต่อมไขมันและการเกิดสิวยังไม่ทราบมากกว่าคนที่ไม่เป็น คนที่เป็นสิวงุนแรงต่อมน้ำมันจะทำงานมากยิ่งขึ้น พบว่า sebum สามารถ

กระตุ้นให้เกิด comedone ได้และคนเริ่มเป็นสิวก็คือต่อเมื่อต่อมน้ำมันเริ่มทำงานเต็มที่ นอกจากยาหลายตัวที่ลดการทำงานของต่อมไขมันก็ทำให้สิวหายไปด้วย จากเหตุผลดังกล่าวทำให้เชื่อว่าต่อมไขมันน่าจะมีส่วนต่อการเกิดสิวไม่มากนัก

3. แบคทีเรียที่อยู่ภายในต่อมจะมี normal flora คือ *P. acnes* ในคนที่ เป็นสิว พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้เพิ่มจำนวนมากขึ้น *P. acnes* ทำให้เกิดการอักเสบของสิวได้ 2 วิธี คือ

1) lipolytic activities โดยแบคทีเรียตัวนี้จะสร้างเอนไซม์ lipase ซึ่งจะสามารถปล่อยเอนไซม์ไปย่อยพวก esterified fatty acids ได้ fatty acid จึงทำให้ผิวหนังบริเวณนั้นเกิดการระคายเคืองและการอักเสบ

2) หลัง chemotactic factors ที่สามารถดึงเม็ดเลือดขาวให้เข้ามาอยู่ในบริเวณรอบ ๆ ต่อมน้ำมัน ซึ่งเม็ดเลือดขาวจะเข้ามาทำลายแบคทีเรียและปล่อย enzyme ออกมาทำให้เกิดการย่อยทำลายผนังต่อมน้ำมันและเกิดการอักเสบขึ้นได้ ทำให้ผิวหนังไม่เรียบเนียน ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะจึงจะช่วยยับยั้งหรือฆ่าเชื้อ แบคทีเรียเพื่อรักษาสิวอักเสบจากการเกิดสิวทั้ง 2 สาเหตุนี้ได้

4. ฮอโมน ฮอโมนเพศชายจะไปกระตุ้นต่อมน้ำมันให้โตขึ้นทำให้ต่อมน้ำมันผลิตน้ำมันออกมาเยอะขึ้นและทำงานโดยการหลั่ง sebum ออกมาที่ผิวหนัง ในคนที่ เป็นสิวจากฮอโมนอาการจะเกิดขึ้นพร้อมกับช่วงที่ฮอโมนเพศสร้างออกมา

2.3 การรักษาสิว

วิธีในการรักษาสิว คือ การเลือกรับประทานอาหาร สุคนธ์บำบัด และธรรมชาติบำบัด ตัวอย่างสมุนไพรที่ได้มีการศึกษาและนำมาใช้ในการรักษาสิว ได้แก่ กระเทียม หัวหอมแดง ขมิ้นชัน ว่านหางจระเข้ น้ำมันกานพลู สารสกัดโรสแมรี่ สารสกัดแคลรีเสจ สารสกัดมังกุด นอกจากนี้ยังมีน้ำมันหอมระเหยจากพืชอีกหลายชนิด เช่น tea tree, lemon, myrtle oil, black pepper, clove, geranium, nutmeg, oregano, thyme, australian eucalyptus และ juniper twig เป็นต้น โดยหลักการรักษาสิวมีอยู่ 4 ประการ คือ

1. ลดการสร้างของต่อมไขมัน
2. ปรับขบวนการการสร้างเซลล์ที่รูขุมขน
3. ลดจำนวนแบคทีเรียในการก่อสิวกอักเสบที่สำคัญ คือ *P. acnes*
4. ลดการอักเสบของสิว คือ ลดอาการบวมแดงยาที่ใช้ในการรักษาสิวจะมีทั้งในรูปแบบของยากินและยาทาเฉพาะที่ ซึ่งจะพิจารณาตามความรุนแรงของสิวและลักษณะของสิวที่เป็น

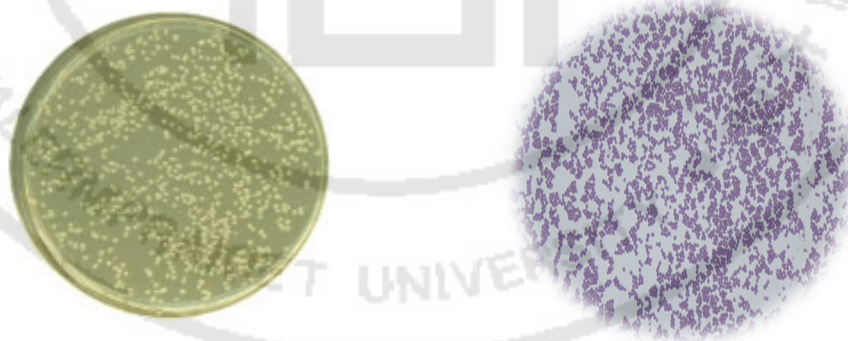
2.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว

1. *Staphylococcus epidermidis* ⁽¹¹⁾

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) ที่มีรูปร่างกลม (cocci) จัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีการเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายองุ่น (ดังภาพที่ 2) ไม่มีการเคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ โคโลนีมีขนาดเล็กเป็นสีขาว ขนาดประมาณ 1-4 มิลลิเมตร มีลักษณะกลม เรียบ ชุ่ม นูนเล็กน้อย เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีอากาศหรือมีเพียงเล็กน้อย บนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 37°C มีมากกว่า 40 สายพันธุ์ *S. epidermidis* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบมากได้ทั่วไปตามผิวหนังของมนุษย์โดยเชื้อจะมีความจำเพาะกับโฮสต์ที่เป็นมนุษย์ แล้วยังเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากในการปนเปื้อนอีกด้วย แม้ว่า *S. epidermidis* จะเป็นจุลินทรีย์ที่ตามปกติไม่ก่อให้เกิดโรค แต่ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง และผู้ป่วยที่มีการสวนท่อ อาจเกิดการติดเชื้อขึ้นได้ นอกจากนี้ในการรักษาการติดเชื้อดังกล่าวยังพบการดื้อยาเพิ่มขึ้นมาก โดยเฉพาะยาในกลุ่ม penicillin

ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีบนจานเพาะเชื้อและการเรียงตัวจากการย้อมสีแกรมของ *S. epidermidis*



ที่มา: MLST Multi Locus Sequence Typing. 2558: ออนไลน์ ⁽¹²⁾, Wikipedia. 2558: ออนไลน์.

(13)

S. epidermidis สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีอากาศ (aerobe) การทดสอบทางชีวเคมี (biochem) บ่งชี้ว่า *S. epidermidis* สามารถให้ผลเป็นบวกเล็กน้อยในการทดสอบ nitrate reductase ให้ผลเป็นบวกในการผลิตเอนไซม์ urease ให้ผลเป็นลบในการทดสอบ oxidase และ

สามารถใช้น้ำตาลซูโครสและแลคโตสในรูปแบบกรด ในการใช้น้ำตาลแลคโตส *S. epidermidis* ยังมีสามารถผลิตก๊าซได้ *S. epidermidis* ไม่ได้มีเอนไซม์ gelatinase ดังนั้นจึงไม่สามารถย่อยสลายเจลาติน จุลินทรีย์ชนิดนี้มีความไวต่อ novobiocin

การก่อให้เกิดโรค

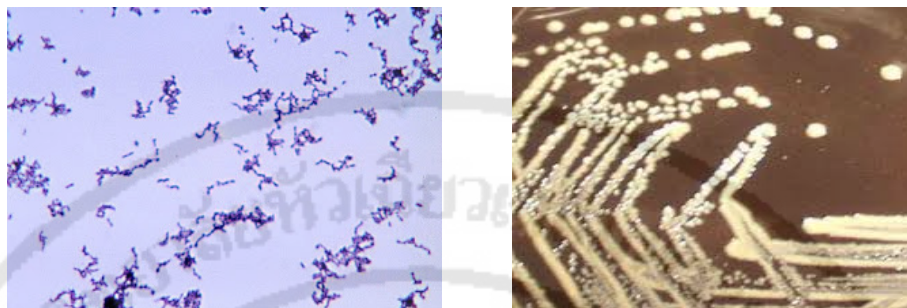
S. epidermidis ทำให้เกิด biofilm ที่สามารถเติบโตบนพลาสติกที่อยู่ภายในร่างกาย ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้มากที่สุดในผู้ที่มีการสวนสายทางหลอดเลือดดำและขาเทียมทางการแพทย์ การติดเชื้อยังสามารถเกิดขึ้นในผู้ป่วยล้างไตหรือทุกคนที่มีพลาสติกฝัง อุปกรณ์ที่อาจมีการปนเปื้อน นอกจากนี้ยังทำให้เกิดเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ส่วนใหญ่มักจะอยู่ในผู้ป่วยที่มีลิ้นหัวใจที่มีความบกพร่อง ยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่จะไม่ได้ผลในการกำจัดไบโอฟิล์ม การรักษาที่พบบ่อยที่สุดสำหรับการติดเชื้อเหล่านี้คือการถอดหรือเปลี่ยนอุปกรณ์ที่มีการติดเชื้อ แต่ในทุกกรณีควรมีการป้องกันเหมาะสม ยาที่เป็นทางเลือกที่มักจะใช้บ่อย ๆ คือ vancomycin ซึ่ง rifampin หรือ aminoglycoside สามารถใช้ร่วมด้วยได้ การล้างมือได้แสดงให้เห็นว่าสามารถลดการแพร่กระจายของเชื้อได้ การวิจัยเบื้องต้นยังระบุว่า *S. epidermidis* สามารถพบได้ในรูขุมขนที่เกิดสิว ซึ่งโดยปกติมักพบ *P. acnes* เพียงชนิดเดียว⁽¹⁴⁾

2. *Propionibacterium acnes*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา⁽¹⁵⁾

เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) ที่มีรูปร่างแท่ง (rod) (ดังภาพที่ 3) ไม่สร้างสปอร์ (spore) เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ไร้อากาศ (anaerobic gram-positive non-spore-forming bacilli) สามารถแบ่งได้เป็น 2 stains คือ hemolytic และ non-hemolytic⁽¹⁶⁾ เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของเลือดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อกลุ่มนี้เดิมที่จัดอยู่ในสกุล *Corynebacterium* เนื่องจากมีรูปร่างลักษณะเหมือนพวก diphtheroid แต่ในปัจจุบันจัดอยู่ในสกุล *Propionibacterium* เนื่องจากพบว่า มีลักษณะโครงสร้างส่วนประกอบของผนังเซลล์ และสารทางพันธุกรรม (DNA) ตลอดจนให้ผลผลิตเป็นกรดโพรพิโอนิก และอะซิติก ซึ่งแตกต่างจากพวก *Corynebacterium* เชื้อ *P. acnes* นี้พบได้ทั่วไปตามผิวหนัง (skin normal flora) เยื่อบุตา และในลำไส้ อาจมีรูปร่างได้หลายแบบ (pleomorphism) คือ เป็นแท่งหรือเป็นสายที่มีกึ่งก้านเส้นสั้น ๆ แต่ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นแท่งโค้งสั้น ๆ (curved rod) หัวท้ายโตไม่เท่ากัน (club shaped) มีสีขาว-ชมพู ไม่มีสปอร์ เชื้อกลุ่มนี้สามารถทนออกซิเจนได้นานหลายชั่วโมง และมีการเจริญเติบโตช้า ใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน โดยเฉพาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อครั้งแรก แต่เมื่อมีการเพาะเลี้ยงเชื้อครั้งต่อไป จะสามารถเจริญเติบโตขึ้นได้ภายใน 3 วัน การทำให้เกิดโรคในคนของเชื้อ *P. acnes* ยังไม่ทราบแน่ชัดแต่สามารถพบเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้จากสิ่งตรวจต่าง ๆ ของผู้ป่วยที่เป็นโรคเยื่อตาอักเสบ สิวผิที่สมอง และโลหิตติดเชื้อ เป็นต้น^(15, 16)

ภาพที่ 3 รูปร่าง การเรียงตัวจากการย้อมสีแกรม และลักษณะโคโลนีบนจานเพาะเชื้อของ เชื้อจุลินทรีย์ *P. acnes*



ที่มา: Wikipidia.2558: ออนไลน์⁽¹⁷⁾, microbiology2009. 2560: ออนไลน์⁽¹⁸⁾

การทำให้เกิดโรค

พบเชื้อนี้ตามผิวหนัง เป็นเชื้อประจำถิ่นที่บริเวณผิวหนัง รูขุมขน ต่อมเหงื่อ สามารถสร้าง เอนไซม์ lipase และ hyaluronidase เป็นสาเหตุให้เกิดโรคจึงเป็นแบคทีเรียสำคัญที่ก่อให้เกิดสิว *P. acnes* ผลิตกรด propionic ชอบอาศัยอยู่บริเวณจมูก สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสแบบไม่ใช้ออกซิเจน เป็นต้นเหตุสำคัญของสิวและบางครั้งอาจทำให้เกิดเยื่อหูหัวใจอักเสบ ต้นเหตุของสิว เริ่มต้นเนื่องจากการอุดตันของรูขุมขนที่เชื่อว่าเกิดจากผิวหนังที่ตายแล้วไม่ยอมหลุดลอกออกไป จับตัวกันแน่นอยู่ในรูขุมขน เมื่อรวมตัวกับเชื้อสาเหตุโดยเฉพาะ *P. acnes* และไขมันที่ต่อมไขมันบริเวณ รูขุมขนขับออกมา จะกลายเป็นก้อนอุดตันขึ้น เรียกว่า คอมิโดนซึ่งจะเห็นเป็นหัวขาว ๆ อยู่ที่ผิวหนัง ต่อมาเชื้อ *P. acnes* จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสามารถย่อยไขมันดังกล่าว (ซึ่งปกติไขมันเหล่านี้ ไม่มีปฏิกิริยาต่อผิวหนัง) ให้กลายเป็นกรดไขมันซึ่งจะไปรบกวนผิวหนัง ทำให้เกิดการอักเสบและมีผื่นแดง เมื่อมีการอักเสบขึ้นมาก ๆ จะเกิดเป็นตุ่มหนอง เกิดเป็นลักษณะสิิวหัวหนองถ้าแตกออกมากจะหายเป็นรอยดำและถ้าเป็นหัวหนองใหญ่จะมีแผลเป็นร่วมด้วย⁽¹⁹⁾

2.5 น้ำมันหอมระเหย ⁽²⁰⁾

น้ำมันหอมระเหย เป็นสารอินทรีย์ที่มีองค์ประกอบสลับซับซ้อนได้จากการสกัดน้ำมันที่พืชสมุนไพรสร้างขึ้นโดยเก็บไว้ในส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพร เช่น เมล็ด ดอก ใบ ผล เปลือก ลำต้น หรือที่รากและเหง้า เป็นต้น ลักษณะทั่วไป เป็นของเหลวใสไม่มี สีหรือมีสีอ่อนๆ มีกลิ่นหอมเฉพาะตัวระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิปกติ เมื่อได้รับความร้อนน้ำมันจะระเหยได้ดียิ่งขึ้น กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยจะมีสมบัติที่แตกต่างกันไปขึ้นกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ในพืชสมุนไพรแต่ละชนิด เช่น น้ำมันตะไคร้หอม ประกอบด้วย genaniol, citronella และ borneol ซึ่งทำให้มีสมบัติในการไล่แมลงหรือน้ำมันตะไคร้ประกอบด้วย citral, linalool และ geraniol ซึ่งทำให้มีสมบัติช่วยในการขับลม แก้อุจจาระ เป็นต้น นอกจากนี้จากผลวิจัยทางการแพทย์พบว่าโครงสร้างทางโมเลกุลของน้ำมันหอมระเหยต่าง ๆ ซึ่งเป็น aromatic compounds นั้นมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรค (antiseptic) ได้ดี ซึ่งมีการใช้ในทางการแพทย์มาเป็นระยะเวลาอันยาวนานแล้ว

2.6 สมุนไพรที่เลือกนำมาศึกษาวิจัย

1. ไพล ⁽²¹⁻²²⁾

ภาพที่ 4 เหง้าไพล



ที่มา: สมอ สาร. 2545 ⁽²¹⁾

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Zingiber cassumunar* Roxb

ชื่อพ้อง: *Zingiber cassumunar* Roxb., *Zingiber purpureum* Roscoe.

ชื่อวงศ์: Zingiberaceae

ชื่ออื่นๆ: ปูลอย ปูเลย มั่นสะล่าง ว่านไฟ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไพลเป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใหญ่ เป็นพันธุ์ไม้ชนิดล้มลุก เปลือกนอกมีสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อในสีเหลืองแกมเขียว มีกลิ่นหอมเฉพาะ แทงหน่อหรือลำต้นเทียมขึ้นเป็นกอ ใบเรียวยาวปลายแหลมดอกออกรวมกันเป็นช่ออยู่บนก้านช่อดอก กลีบดอกสีนวล ใบประดับสีม่วง ผลเป็นผลแห้ง รูปกลม ช่วงเวลาที่เก็บเป็นยา เก็บเหง้าแก่จัด หลังจากต้นไพลลงหัวแล้ว ไพลเป็นไม้ล้มลุกสูง 0.7-1.5 เมตร ปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย เจริญเติบโตได้ดีในฤดูฝน ส่วนที่นำมาใช้นำมาทำยา จะเป็นส่วนของเหง้าและน้ำมัน เพื่อรักษาอาการบวมช้ำและอักเสบ

สารสำคัญ

เหง้าไพลประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีสารสำคัญที่เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ เช่น sabinene, -terpinene, terpinen-4-ol, -pinene เหง้าไพลยังมีสารสีเหลืองที่เรียกว่า curcumin และสาร butanoids derivatives ที่เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือสาร D หรือ(E)-4-(3',4'-dimethoxyphenyl)but-3-en-1-ol และ (E)-1-(3',4'-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) นอกจากนี้ยังมีสาร cassumunarin A, B และ C ซึ่งเป็น complexcurcuminoids ซึ่งมีฤทธิ์ antioxidant แรงกว่า curcumin เหง้าไพลที่มีคุณภาพได้มาตรฐานต้องมีน้ำมันหอมระเหยไม่น้อยกว่า 2 % โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก (v/w)

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สำคัญ

การศึกษาในสัตว์ทดลองหรือในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดหรือสารสำคัญของไพลมีฤทธิ์ทางยาหลายประการ ดังนี้

(1) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

เหง้าไพลมีสารสำคัญ คือ สาร D และสาร DMPBD มีฤทธิ์ต้านอักเสบ โดยกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้ง cyclooxygenase และ lipoxygenase pathways คล้าย NSAID

(2) ฤทธิ์แก้หอบหืด

สาร D สามารถต้านฤทธิ์ของฮีสตามีนในการทำให้หลอดลมหดตัวได้ จึงมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นยาบำบัดอาการหอบหืดได้

(3) ฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อเรียบ

สารสกัดไพลสามารถลดการบีบตัวของมดลูก ลำไส้ และกระเพาะอาหารของหนูขาว ซึ่งสารออกฤทธิ์ชนิดหนึ่งในสารสกัดน่าจะเป็น สาร D เนื่องจากพบว่า สาร D มีฤทธิ์คลายกล้ามเนื้อมดลูกและลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูขาว

(4) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

สารสกัดจากไพลด้วย dichloromethane แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (แบคทีเรียแกรมบวก) และ *Pseudomonas aeruginosa* (แบคทีเรีย แกรมลบ) แต่สาร

สกัดจากไพลด้วยเมทานอลไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทั้งสอง ส่วนสารสกัดจากไพลด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคของระบบทางเดินหายใจแต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P.aeruginosa*, *S. aureus* และ *Klebsiella pneumoniae* ได้

(5) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

สารสกัดที่สกัดด้วย dichloromethane และ methanol ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ส่วนสารสกัดที่สกัดด้วย ethanol สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในพืชได้หลายชนิด เช่น *C.albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhizopus sp.* และ *Trichophyton mentagrophytes* นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยจากไพลยังมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีผลเสียต่ออาหาร

ความเป็นพิษทั่วไป

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดไพลด้วยแอลกอฮอล์ร้อยละ 50 และสารสกัด D ไม่พบความเป็นพิษ ในหนูเม้าส์ การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรัง ไม่พบอาการผิดปกติใด ๆ ทั้งจากการตรวจดูลักษณะภายนอก และจากการตรวจสอบทางพยาธิวิทยา เมื่อทดสอบความเป็นพิษของน้ำมันไพลต่อสัตว์ทดลอง 3 ชนิด ได้แก่ หนูแรท หนูเม้าส์ และกระต่าย โดยการให้ทางปาก พบว่าน้ำมันไพลมีความเป็นพิษเล็กน้อย

2. เสม็ดขาว

ภาพที่ 5 เสม็ดขาว ⁽²³⁾



ที่มา: pharmacymahidol. 2560: ออนไลน์ ⁽²³⁾

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Melaleuca leucadendron*

ชื่อวงศ์: Myrtaceae

ชื่อพื้นเมือง: เสม็ด (ทั่วไป) เสม็ดขาว (ภาคตะวันออก) ก้อแล (มลายู-ปัตตานี) เม็ด, เหม็ด (ภาคใต้)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พรรณไม้สกุลเสม็ดในวงศ์ Myrtaceae พบทั่วโลก ประมาณ 95 สกุล 3,600 ชนิด กระจายอยู่กว้างขวางในเขตร้อน โดยเฉพาะทางซีกโลกใต้ในออสเตรเลีย มีถึง 250 ชนิด มีเพียง 9 ชนิด ที่พบนอกประเทศ และมีเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่แพร่กระจายสู่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศอินเดีย เสม็ดขาว เป็นต้นไม้ไม่ผลัดใบ มีขนาดเล็กถึงขนาดกลาง 5 - 25 เมตร เรือนยอดแคบ เป็นพุ่มทรงสูง เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งและเจริญเติบโตได้ดีในดินหลายสภาพ พบได้ทั่วไปในพื้นที่ภาคใต้และภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยเฉพาะในจังหวัดที่มีพื้นที่ป่าพรุเป็นจำนวนมาก เช่น จังหวัดนครศรีธรรมราช นราธิวาส และพัทลุง เนื่องจากเป็นพันธุ์ไม้ที่สามารถเจริญเติบโตได้เร็วที่สุดเมื่อเทียบกับพันธุ์ไม้อื่น ๆ ทุกส่วนของเสม็ดขาวนำมาใช้ประโยชน์ได้ ทั้งส่วนของเนื้อไม้ เปลือกของลำต้น และใบ โดยส่วนของเนื้อไม้ใช้ทำเครื่องมือเครื่องใช้ ใช้ก่อสร้าง เปลือกต้นใช้ทำฝ้ายบ้าน มุงหลังคา ใบใช้ต้มแทนน้ำชา เมื่อนำมากลั่นจะได้น้ำมันหอมระเหยที่มีสีเขียวอ่อน

หรือสีเขียวอมเหลือง เรียกว่า น้ำมันเสม็ดขาวหรือน้ำมันเขียว (cajuput oil หรือ melaleuca oil) มีกลิ่นคล้ายการบูร ช่วยบรรเทาอาการปวดเมื่อย รักษาโรคไข้ซ้ออักเสบ รักษาโรคผิวหนัง รักษาสิว ใช้ฆ่าเชื้อโรค ช่วยกระตุ้นการขับลม แก้อุจจาระเสีย ลดอาการเกร็งของกล้ามเนื้อในกระเพาะ ลำไส้ เป็นต้น ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ แผ่นใบรูปหอกโค้งเล็กน้อย ยอดอ่อนมีขนคล้ายเส้นไหมปกคลุม สีขาวเป็นมัน ดอก ออกเป็นช่อเชิงลดตามซอกใบหรือใกล้ปลายกิ่ง ซ่อคล้ายหางกระรอก แบบผลแอปเปิ้ลคล้าย ถั่วฝักยาว หรือหอมอบปลายตัดเว้ามีร่องแคบ ๆ อยู่ทางด้านบน (ดังภาพที่ 5)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำมันเสม็ดขาว

เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ดขาวมีสาร cineole, beta-pinene, alpha-terpineol จึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae* และ *C. minutissium* เชื้อรา *Penicillium notatum* และ *Aspergillus niger* เชื้อราก่อโรคผิวหนัง *Epidermophyton floccosum* และ *Trichophyton rubrum* เชื้อยีสต์ *C. albican* ⁽²⁴⁾

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดขาว

น้ำมันเสม็ดขาวเป็นน้ำมันหอมระเหยที่มีสารออกไซด์ (oxides) เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ 1,8-cineole หรือ eucalyptol หรือ 1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo (2,2,2) octane สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{18}O$ นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยพวกโมโนเซสควิเทอร์พีน (monosesquiterpene) และไบไซคลิกเซสควิเทอร์พีน (bicyclic sesquiterpene) อื่น ๆ ได้แก่ α -terpineol, α -pinene และ limonene ⁽²⁵⁾

3. อบเชย ⁽²⁶⁾

ภาพที่ 6 อบเชย



ที่มา: 2candles. 2558: ออนไลน์ ⁽²⁷⁾

ชื่อวงศ์: Lauraceae

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Cinnamomum burmannii*

ชื่อพ้องทางวิทยาศาสตร์: *C. verum J.Presl*

ชื่อสามัญ: Cassia vera, Korinjii cassia

เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง มีอายุหลายปี มีความสูง 5-10 เมตร ไม่มีการผลัดใบ เปลือกมีความหนาและมีสีเทา กิ่งขนานกับพื้นและตั้งชันขึ้น เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวออกเรียงสลับกันตาม ลำต้น ลักษณะของใบเป็นรูปไข่หรือรูปหอก ปลายใบแหลม สีเขียวเข้ม ออกดอกเป็นช่อ ตามปลายกิ่ง ดอกมีสีเหลืองขนาดเล็กและมีกลิ่นหอม ผลเป็นสีดำมีลักษณะคล้ายรูปไข่ เปลือกของอบเชย (ดังภาพ ที่ 6) มี รสหวาน ใช้เป็นเครื่องเทศ ยาหอม ยานัตถุ ช่วยทำให้สดชื่น น้ำมันที่กลั่นได้จากเปลือกใช้เป็นยาฆ่าเชื้อโรคและกันบูด รากและใบ ช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยไขมัน ช่วยลดความดันโลหิต น้ำมันหอมระเหย ใช้ปรุงแต่งกลิ่นเครื่องสำอาง ยารักษาโรค สามารถปลูกได้ดีในประเทศไทย อบเชยชนิดนี้มาจากประเทศอินโดนีเซียหรือลังกาแต่พบได้มากที่เกาะสุมาตรา เกาะชวา และฝั่งตะวันตกของติมอร์ เป็นอบเชยที่ได้รับความนิยมสูงสุดในปัจจุบัน ปลูกได้ดีในประเทศไทย⁽²⁾ สารสำคัญที่พบมากในน้ำมันจากเปลือกอบเชย คือ (E)-cinnamaldehyde ซึ่งเชื่อว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ⁽²⁸⁾

การนำมาใช้ประโยชน์

อบเชยจากประเทศอินโดนีเซียเป็นอบเชยที่มีการใช้ประโยชน์เป็นเครื่องเทศและเป็นสารให้กลิ่นรสเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีการบริโภคมากในทวีปอเมริกา ภูมิภาคเอเชียใต้และประเทศอินโดนีเซีย โดยมีกลิ่นคล้ายกับอบเชยจีน นอกจากนี้ยังมีสมบัติทางยา เช่น บรรเทาอาการคลื่นไส้ ส่วนสารสกัดจากส่วนใบและราก สามารถใช้เป็นยารักษาสิว และพบว่าสีม่วงเข้มของส่วนผลซึ่งเป็นสีจากสารแอนโทไซยานินซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี⁽²⁶⁾

2.7 การทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาต้านจุลินทรีย์⁽²⁹⁾

การทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อยาต้านจุลินทรีย์ เป็นการวัดหรือทดสอบความสามารถของยาต้านจุลินทรีย์ว่ามีความสามารถยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์นั้นได้หรือไม่ โดยศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro) มีวิธีการหลักทำได้ 2 วิธี คือ dilution method และ diffusion method ซึ่งในการทดสอบจำเป็นต้องคำนึงถึงผลกระทบจากสิ่งต่อไปนี้ คือ การเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวนของ inoculums ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงอุณหภูมิ และชนิดของเชื้อที่ต้องการทดสอบ

1. Dilution method

เป็นการทดสอบหาปริมาณ เนื่องจากสามารถหาความเข้มข้นของยาที่ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยืนยันผลวิธี diffusion ที่ให้ผลความไวปานกลางหรือดีเยี่ยมและใช้ทดสอบความไวของเชื้อ anaerobe มีหลักการสำคัญ คือ เจือจางยาต้านจุลินทรีย์ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ช่วงความเข้มข้นที่ใช้จะต่างกันไปขึ้นกับชนิดของยา เชื้อที่ใช้ในการทดสอบและบริเวณที่ติดเชื้อโดยเลือกช่วงความเข้มข้นให้ใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นของยาที่พบในกระแสเลือดหลังจากได้รับยาขนาดปกติ ทำการเจือจางยาแบบ two-fold serial dilution ถ้าความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วงที่พบได้โดยเฉลี่ยในเลือดภายหลังการให้ยาขนาดธรรมดา ถือว่าเชื้อไวต่อยา ผลการทดสอบประเมินได้ 2 ทาง คือ ผลเชิงประสิทธิภาพ (qualitative) และผลเชิงปริมาณ (quantitative) เช่น ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (minimal inhibitory concentration, MIC) การทดสอบวิธีนี้แบ่งออกเป็น

1) Agar dilution method

ข้อดี คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนจานอาหารเดียวกันได้และถ้ามีเชื้ออื่นปนเปื้อนหรือฆ่าเหล่าเชื้อยาสามารถมองเห็นได้ ข้อเสีย คือ ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (minimal bactericidal concentration, MBC) ได้

2) Broth dilution method

ข้อดี คือ สามารถอ่านค่าได้ละเอียดให้ผลเชื่อถือได้เหมาะกับงานวิจัยใช้ทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อของสารโดยยาด้านจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจะมีค่า MIC และ MBC ใกล้เคียงกัน ส่วนยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมักมีค่า MIC และ MBC แตกต่างกัน ข้อเสีย คือการทดสอบวิธีนี้สิ้นเปลือง ใช้เวลามากไม่สามารถดูการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้และการทดสอบในแต่ละชุดสามารถทดสอบเชื้อได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น

2. Diffusion method

เป็นวิธีที่ใช้กันแพร่หลายมากที่สุดคือ disc diffusion method เป็นวิธีทดสอบเชิงคุณภาพเท่านั้น บอกผลได้เพียงว่าเชื้อมีความไวต่อยามาก มีความไวปานกลางหรือดื้อยา ไม่อาจทราบค่า MIC หรือ MBC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้าแต่อย่างไรก็ตามเป็น วิธีการทดสอบประจำห้องปฏิบัติการที่ดีที่สุดและอาจใช้วิธี dilution method ร่วมด้วยเมื่อจำเป็น หลักการทั่วไป คือ การทำให้ตัวยาคั่งเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อแบคทีเรียจำนวนพอเหมาะไว้อาศัยหลักการแพร่ของยาจากภาชนะบรรจุยา เช่น หลุม (well) ที่เจาะลงในเนื้อของอาหารวุ้น ถ้วยทรงกระบอก (cylinder cup) เม็ดยา (tablet) หรือกระดาษชั้บวงกลม (filter paper disc) เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบอยู่แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโตในขณะที่ยาแพร่เข้าไปในอาหารวุ้นแบคทีเรียที่อยู่ในอาหารวุ้นและไม่ถูกยับยั้งโดยยาจะแบ่งตัวจนทำให้เห็นเชื้อขึ้นเต็มพื้นที่อ่านผลการทดสอบโดยวัดขนาดของ zone of inhibition ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบ disc ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกยับยั้งโดยยาจะไม่มีอาการเจริญและเกิดเป็นวงใสรอบภาชนะบรรจุยาขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของยาขนาดของ zone of inhibition

2.8 อนุมูลอิสระ (free radical, reaction oxygen species; ROS) ⁽³⁰⁾

อนุมูลอิสระ คือ โมเลกุล (molecule) ที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) ไม่เสถียร อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอน โคจรอยู่รอบนอกสุดของอะตอมและมีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ 10^{-3} - 10^{-10} วินาที มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีจะเกิดขึ้นเมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกตัวออกและมีอิเล็กตรอนเดี่ยวคงเหลืออยู่ อิเล็กตรอนเดี่ยวนี้ทำให้อนุมูลอิสระเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีในลักษณะเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) โดยการดึงอิเล็กตรอนหรือให้อิเล็กตรอนกับโมเลกุลข้างเคียงอย่างรวดเร็ว ทำให้อนุมูลเกิดความเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียอิเล็กตรอนหรือรับอิเล็กตรอน จะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ ต่อไป ซึ่งจะเกิดต่อเนื่องไปจนกระทั่งถูกหยุดด้วยสารต้านออกซิเดชั่น (antioxidant) การศึกษาปฏิกิริยาดังกล่าวจะทำการศึกษาจากการเกิดปฏิกิริยา

lipid peroxidation ซึ่งเชื่อว่าเป็นสาเหตุสำคัญจากการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และเกิดความเสียหายต่อเซลล์อื่นตามมา

2.9 ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ⁽³⁰⁾

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (free radical chain) ซึ่งมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ

1. Initiation step

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์มักเกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสลายพันธะด้วยน้ำ (Hydrolysis) แสง (Photolysis) รังสี (Radiolysis) หรือปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox reaction) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่น ๆ อีกหลายชนิดที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์รวมถึงโมเลกุลที่มีความไวสูงในการทำปฏิกิริยา เช่น nitric oxide (NO) และ singlet oxygen (1O_2) ซึ่งหมายถึงออกซิเจนในสถานะที่ถูกกระตุ้น (Excited state) สิ่งเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดขั้นตอน initiation ของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระดังเช่นสมการที่ 1



2. Propagation step

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอน initiation จะดำเนินปฏิกิริยาต่อไปในขั้นตอน Propagation โดยเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทางคือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียงหรือโดยการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ ground state ทำให้ได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ดังสมการที่ 2 - 4



3. Termination step

เป็นขั้นตอนที่มีอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 อนุมูลมารวมกันแล้วได้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระดังสมการที่ 5 และ 6



2.10 สารต้านอนุมูลอิสระ⁽³¹⁾

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่มีหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในนี้ รวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ เช่น amino acid, ascorbic acid, carotenoids, flavonoids, tannins, tocopherols เป็นต้น โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

1. Primary antioxidant

สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันนอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสังเคราะห์ (Natural and synthetic tocopherol) ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

2. Oxygen scavenger

สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ ascorbic acid หรือวิตามินซีเป็นต้นสารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

3. Secondary antioxidant

สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ dilaurylthiopropionate และ thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

4. Enzymic antioxidant

สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งแบ่งเป็น primary antioxidant enzyme และ auxiliary antioxidant enzyme สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

5. Chelating agent หรือ sequestrant

สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริกกรดอะมิโน เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะเช่นเหล็กและทองแดงซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร

2.11 การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity)

การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชันมีหลายวิธี ได้แก่

1. การวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการจากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen atom transfer, HAT)

ปฏิกิริยาส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบของ HAT เป็นปฏิกิริยา competitive reaction คือ มีการแย่งกันระหว่างสารต้านออกซิเดชัน (AH) กับสารตั้งต้น ในการจับกับ peroxy radicals (ROO[•]) ที่ถูกสร้างจากการสลายตัวของสารกลุ่มเอ

ตัวอย่างเทคนิคการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการ HAT เช่น

- วิธี Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC) และ
- วิธี Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)

2. การวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการจากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Electron transfer, ET หรือSET)

เป็นการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการให้อิเล็กตรอนแก่สารออกซิแดนซ์นำไปสู่การเปลี่ยนสี เมื่อสารออกซิเดชันนั้นได้รับอิเล็กตรอนระดับที่เปลี่ยนแปลงไปมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชัน เมื่อทำการพล็อตกราฟเส้นตรงระหว่างการเปลี่ยนสีในรูปการดูดกลืนแสง (absorbance) กับความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ ค่าความชันที่คำนวณได้จะแสดงถึงความสามารถในการถ่ายเทอิเล็กตรอนของสารต้านอนุมูลอิสระ

ตัวอย่างเทคนิคการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการ ET เช่น

- วิธี Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH)
- วิธี The ferric reducing ability of plasma assay (FRAP)
- วิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

1) การวิเคราะห์การถ่ายเทอิเล็กตรอนด้วยวิธี 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{•+}) assay

ในการศึกษานี้จะใช้วิธี DPPH โดยอนุมูล DPPH^{•+} เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัวมีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้วโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลการวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์การวัดทำโดยใช้เครื่องสเปกโตรวัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านอนุมูลลงไปโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

ข้อดี ของวิธีนี้ คือ ง่ายใช้เครื่องมือสามัญที่มีทั่วไปนิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลจากธรรมชาติยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน

2.12 แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (gas chromatograph - mass spectrometer GC-MS) ⁽³²⁾

การวิเคราะห์โดยใช้วิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรีเป็นวิธีที่สามารถทำนายชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารได้อย่างค่อนข้างแม่นยำโดยอาศัยการเปรียบเทียบ Fingerprint ของเลขมวล (mass number) ของสารตัวอย่างนั้น ๆ กับข้อมูลที่มีอยู่ใน library นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณ (quantitative analysis) และเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) GC-MS ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของเครื่อง GC (gas chromatography) และส่วนของเครื่อง MS (mass spectrometer) (ดังภาพที่ 7)

1. หลักการแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี

แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี เป็นเทคนิคการแยกสารเนื้อเดียวออกจากกัน โดยตัวอย่างที่จะนำเข้าสู่ระบบจะต้องสามารถระเหยกลายเป็นไอได้ และมีความเสถียรเมื่อถูกความร้อน ตัวอย่างที่เป็นไอจะถูกพาด้วยก๊าซเฉื่อย (mobile phase) ไปยังคอลัมน์ (stationary phase) เพื่อทำการแยกสารออกจากกัน สารที่แยกได้จะถูกบันทึกเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

กลไกที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในสารตัวอย่างอาศัยหลักการความชอบที่แตกต่างกันขององค์ประกอบในตัวอย่างที่มีต่อเฟสทั้ง 2 เฟส คือ stationary phase และ mobile phase ประสิทธิภาพการแยกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันระเหยโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ดังนี้

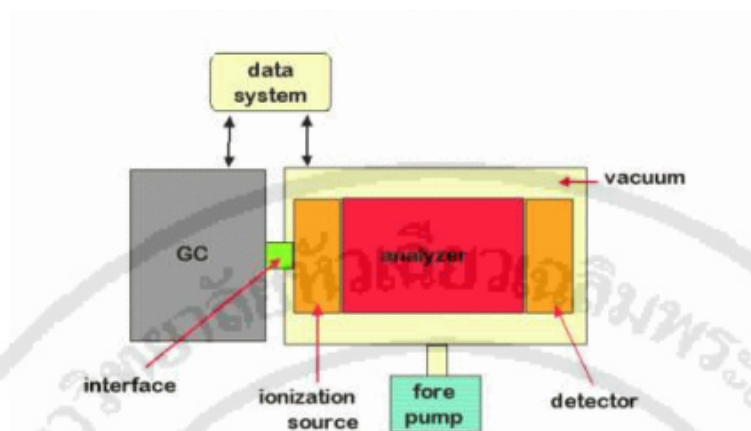
- ชนิดของคอลัมน์
- ขนาดของคอลัมน์
- ปัจจัยอื่น ได้แก่ ความหนาของ liquid phase อุณหภูมิในการแยกอัตราการไหลของ

แก๊สตัวพาเป็นต้นการเลือกสมบัติเหล่านี้พิจารณาจากสมบัติของสารและโดยอาศัยการทดลอง

2. หลักการแมสสเปกโตรเมทรี (mass spectrometry; MS)

เป็น detector ที่ใช้ตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างโดยอาศัยกลไก คือ โมเลกุลขององค์ประกอบที่ถูกแยกออกมาจากสารตัวอย่างโดยเครื่อง GC จะถูกไอออไนซ์ในสภาวะสุญญากาศแล้วตรวจวัดออกมาเป็นเลขมวล (mass number) เทียบกับฐานข้อมูลอ้างอิง แล้วแปลผลออกมาเป็นชื่อขององค์ประกอบนั้น ๆ

ภาพที่ 7 องค์ประกอบพื้นฐานของ GC-MS

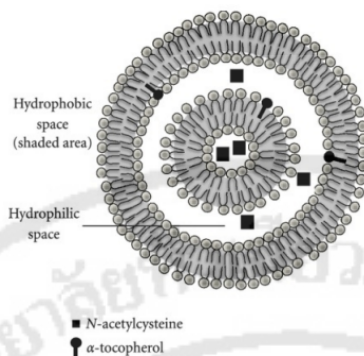


ที่มา: ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3. 2556. ⁽³²⁾

2.13 ไลโปโซม (Liposomes)⁽³³⁾

ไลโปโซม คือ อนุภาคที่มีขนาดเล็ก มีลักษณะเป็นถุงกลมๆของสารไขมันที่อยู่ในสารละลายน้ำ โดยสารไขมันเหล่านี้เป็นไขมันประเภท phospholipids เมื่อผสมลงในสารละลายน้ำโมเลกุลของสารไขมันประเภท phospholipids สามารถจัดเรียงตัวเป็นชั้นสลับกับชั้นโมเลกุลของน้ำในสารละลายน้ำได้ เพราะโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยทั้งส่วนมี 2 ขั้ว (polar) ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนที่ไม่มีขั้ว (nonpolar) ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เมื่ออยู่ในน้ำจะจัดเรียงตัวโดยนำส่วนที่มีขั้วหรือมีประจุหันออกมาโมเลกุลน้ำ ในขณะที่ส่วนที่ไม่มีขั้วหันเข้าหาส่วนที่ไม่มีขั้วของโมเลกุลพวกเดียวกันโดยจะอยู่ในลักษณะของการเรียงตัวเป็นแถวของโมเลกุลไขมันซ้อนกันเป็นผนังสองชั้นหรือ lipid bilayer ตัวยาหรือสารสำคัญที่มีสมบัติชอบน้ำจะกักเก็บอยู่ในส่วนของชั้นที่มีขั้วส่วนตัวยาหรือสารสำคัญที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำจะแทรกอยู่ใน lipid bilayer โดยทั่วไปตัวยาหรือสารสำคัญที่มีสมบัติชอบน้ำจะถูกกักเก็บในไลโปโซม ได้มากกว่าพวกที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ ⁽³⁴⁾ รูปตัวอย่างแสดงดังภาพที่ 8

ภาพที่ 8 ลักษณะของไลโปโซมและแสดงบริเวณที่กักเก็บสารสำคัญที่มีสมบัติชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ



ที่มา: ไลโปโซมสำหรับยาผ่านทางผิวหนังและเครื่องสำอาง. 2550⁽³⁵⁾

ไลโปโซมส่วนใหญ่จะมีขนาดอยู่ในช่วง 50 นาโนเมตรจนถึงหลายร้อยนาโนเมตรโดยสามารถแบ่งประเภทออกได้ตามขนาดของอนุภาคหรือตามจำนวนชั้นของ lipid bilayer ถ้าแบ่งตามขนาดของอนุภาคจะแบ่งได้เป็น 4 ประเภทนี้

1. ไลโปโซมที่มีผนังสองชั้นหลายชุด (multilamella vesicles, MLV) คือ ไลโปโซมที่มีผนังสองชั้นมากกว่าหนึ่งชุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.08-0.1 ไมครอน สามารถเตรียมได้โดยวิธีการเขย่า
2. ไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นหลายชุด (large multilamellar vesicles, LMV) คือ ไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชั้นหลายชุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.05-10.0 ไมครอน สามารถเตรียมได้โดยวิธีการเขย่า ในขณะที่ทำการเตรียมไลโปโซมต้องใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิทรานซิชั่นของส่วนประกอบไขมัน ถ้านำไลโปโซมประเภทนี้ผ่านกระบวนการกลั่นความถี่สูงหรือผ่านแรงดันสูง จะทำให้ได้ไลโปโซมที่มีขนาดเล็กกลางคือมีผนังสองชั้นชุดเดียว (small unilamellar liposome)
3. ไลโปโซมขนาดเล็กที่มีผนังสองชุดชั้นเดียว (small unilamellar vesicles, SUV) คือ ไลโปโซมขนาดเล็กที่มี lipid bilayer ชุดเดียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.025-0.10 ไมครอน สามารถเตรียมได้โดย ethanol injection, dialysis และการใช้คลื่นความถี่สูง เปลี่ยน LMV หรือ MLV เป็น SUV
4. ไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มีผนังสองชุดชั้นเดียว (large unilamellar vesicles, LUV) คือ ไลโปโซมขนาดใหญ่ที่มี lipid bilayer ชุดเดียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1-4.0 ไมครอน เป็นไลโปโซมที่สามารถเก็บสารสำคัญที่ละลายน้ำได้ดี สามารถเตรียมได้โดยวิธี reverse phase evaporation, ether vaporization และการหลอมรวมตัวของ SUV ที่เหนี่ยวนำโดยแคลเซียมไอออน⁽³⁶⁾

2.14 กลไกการเกิดไลโปโซม⁽³⁴⁾

การเกิดไลโปโซมเกิดจากไขมันที่มีขั้วเมื่ออยู่ในสารละลายน้ำจะเกิดเป็นไลโปโซมได้เอง แต่ในขณะเดียวกันไขมันเหล่านี้ก็จะเกิดเป็นอนุภาคที่มีโครงสร้างอื่น ๆ ในน้ำได้เช่นกัน ได้แก่ ไมเซลล์ทรงกลม ไมเซลล์ทรงกระบอก ผงสองชั้นลักษณะแบนราบ และไมเซลล์กัณฑ์ การเกิดไลโปโซมจะขึ้นอยู่กับสมบัติของไขมัน หรือฟอสโฟลิพิด หรือสารอื่น ๆ ซึ่งได้แก่สมดุลของส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโมเลกุลของสารเหล่านี้ เรียกว่า HLB (hydrophilic-lipophilic balance) รวมทั้งรูปทรงทางเรขาคณิตของโมเลกุล และแรงดึงดูดหรือแรงผลักรหว่างส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของโมเลกุลมิติ ของโมเลกุลไขมันต่าง ๆ ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้เป็นตัวกำหนดว่าโครงสร้างที่เกิดขึ้นของสารละลายน้ำจะเป็นรูปแบบใด

2.15 ส่วนประกอบของไลโปโซม⁽³⁴⁾

โดยทั่วไปไลโปโซมจะเตรียมจากส่วนประกอบต่างๆ 3 ส่วน ได้แก่ สารไขมัน คอเลสเตอรอล (cholesterol) และสารมีประจุ (amphiphiles) โดยสามส่วนนี้จะผสมกันตามอัตราส่วนของน้ำหนักโมลของสาร (molar ratio) เช่น ฟอสโฟลิพิด/คอเลสเตอรอล/สารมีประจุ อาจเป็นอัตราส่วน 7:2:1 หรือ 6:3:1 ขึ้นกับสมบัติและชนิดขององค์ประกอบทั้งสามชนิด รวมทั้งการนำไลโปโซมไปใช้และสมบัติของสารที่นำมาเก็บไว้ในไลโปโซม

1. สารไขมัน

ส่วนใหญ่เป็นฟอสโฟลิพิดที่ใช้เป็นโครงสร้างของไลโปโซม กลไกการเกิดไลโปโซมจะเกิดจากปฏิกิริยาทางกายภาพระหว่างสายของส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือส่วนที่ไม่มีขั้วซึ่งเป็นสายไฮโดรคาร์บอนของโมเลกุลไขมัน ในขณะที่ส่วนที่ชอบน้ำหรือส่วนที่มีขั้วของโมเลกุลเดียวกันนี้จะเรียงตัวหันเข้าหาโมเลกุลของน้ำ ผลจากแรงระหว่างโมเลกุลเหล่านี้จะทำให้ไลโปโซมสามารถเกิดขึ้นได้เองตามกฎทางอุณหพลศาสตร์

2. คอเลสเตอรอล (cholesterol)

เป็นสารประกอบที่พบในธรรมชาติ เป็นสารที่มีทั้งส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้วอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน ดังนั้นส่วนที่มีขั้วของคอเลสเตอรอลจะยื่นเข้าหาสารละลายน้ำของโครงสร้างไลโปโซม ส่วนที่ไม่มีขั้วจะเรียงตัวขนานกับโมเลกุลของฟอสโฟลิพิดที่ประกอบเป็นผนังของไลโปโซม คอเลสเตอรอลจะทำให้ไลโปโซมที่เตรียมได้มีความคงตัวยิ่งขึ้น เพราะไปเพิ่มค่า T_c ของไลโปโซมได้บ้าง แต่ที่สำคัญคือจะทำให้ T_c มีค่าพิสัยที่กว้างขึ้น ทำให้ไลโปโซมมีความแข็งแรงมากขึ้น และลดการไหลหรือลดความเป็นของเหลวช่วยให้สารที่ถูกกักเก็บอยู่ในไลโปโซมมีสภาพซึมได้ลดลง สารจะถูกกักเก็บอยู่ในไลโปโซมได้นานยิ่งขึ้น

3. สารมีประจุ (amphiphiles)

เป็นสารช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บกักสารในไลโปโซม ตัวอย่างเช่น สเตียร์ลลามีน (stearylamine) จะทำให้ไลโปโซมที่มีประจุบวกบนผิว การผสมฟอสฟาติลเซอร์รีน (phosphatidyl serine) หรือไดเซทิลฟอสเฟต (dicetyl phosphate) หรือกรดฟอสฟาติค (phosphatidic acid) จะทำให้ไลโปโซมที่เตรียมได้มีประจุลบบนผิว

2.16 วิธีการเตรียมไลโปโซม⁽³⁴⁾

สามารถแบ่งวิธีการเตรียมไลโปโซมเป็น 3 วิธีใหญ่ ๆ คือ physical dispersion technique, solvent dispersion technique และ detergent solubilization technique

1. การเตรียมโดยวิธี physical dispersion technique

อาศัยการกระจายโมเลกุลฟอสโฟลิพิดในน้ำด้วยพลังงานกลหรือพลังงานคลื่นเสียงโดยฟอสโฟลิพิดถูกละลายในสารละลายอินทรีย์ จากนั้นกระจายตัวสารละลายขณะที่ค่อย ๆ ระบายตัวทำละลายออกไปจนได้ฟิล์มบาง ๆ ของสารฟอสโฟลิพิดเคลือบอยู่ จากนั้นเติมวัตถุน้ำ (ซึ่งอาจมีสารสำคัญละลายอยู่) แผ่นฟิล์มจะเกิดการไฮเดรชันและพองตัว เนื่องจากมีโมเลกุลของน้ำมาล้อมรอบส่วนหัวที่มีขั้วของไขมัน จากนั้นแผ่นฟิล์มจะหลุดลอกออกมาและมันตัวประสานกันเป็นอนุภาคไลโปโซม ซึ่งส่วนใหญ่จากวิธีนี้จะได้ไลโปโซมชนิด MLV ข้อดีของวิธีนี้ คือ เตรียมได้ง่าย สะดวก แต่ปริมาณส่วนที่ถูกกักเก็บคือวัตถุน้ำค่อนข้างต่ำประมาณ 5-10% ของปริมาณวัตถุน้ำทั้งหมด ดังนั้นจึงกักเก็บยาที่ละลายน้ำได้น้อยแต่กักเก็บยาที่ละลายในไขมันได้ดี ทั้งนี้อาจละลายยาที่ละลายในไขมันในสารละลายฟอสโฟลิพิดตั้งแต่แรก

การใช้พลังงานคลื่นเสียงสามารถย่อยขนาดของ MLV ให้เล็กลงทำให้ได้ SUV ที่มีการกระจายตัวของขนาดที่แคบ ข้อเสียของการใช้คลื่นเสียง คือ อาจทำให้ฟอสโฟลิพิดหรือสารสำคัญสลายตัวได้เนื่องจากความร้อนที่เกิดขึ้น หรือจากการกระบวนกรออกซิเดชัน ดังนั้นควรควบคุมอุณหภูมิของระบบไม่ให้สูงเกินไปและไล่อากาศเหนือภาชนะด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจน

2. การเตรียมโดย solvent dispersion technique

ฟอสโฟลิพิดในสารละลายอินทรีย์ ถูกนำมากระจายในวัตถุน้ำที่มีสารสำคัญละลายอยู่ ซึ่งบริเวณผิวที่สัมผัสกันระหว่าง 2 วัตถุนั้น ส่วนโมเลกุลฟอสโฟลิพิด จะเรียงตัวเป็น monolayer ซึ่งเป็นจุดตั้งต้นของการเกิด bilayer ของไลโปโซม ตัวอย่างเช่น การเตรียมผ่านระบบอิมัลชันโดยละลายสารสำคัญในวัตถุน้ำและเติมในสารละลายฟอสโฟลิพิด ซึ่งอนุภาคของวัตถุน้ำจะกระจายตัวและถูกทำให้คงตัวด้วยฟอสโฟลิพิด ซึ่งส่วนหนึ่งจะเรียงตัวที่สัมผัสรอบๆ หนว้วัตถุวัตถุน้ำ เกิดเป็น monolayer ขึ้น ซึ่งจะเป็นแผ่นชั้นในของชั้น bilayer ปริมาณของฟอสโฟลิพิดที่ใช้ต้องมากพอจะไปเพิ่มความคงตัวของหยดน้ำและเหลือในวัตถุน้ำมันในปริมาณที่มากพอที่จะเกิดเป็นแผ่นชั้นนอกของ

ชั้น bilayer โดยมาประกบกับแผ่นชั้นใน เทคนิคที่นิยม ได้แก่ double emulsion technique และ reverse phase evaporation technique

3. การเตรียมโดยวิธี detergent solubilization

วิธีนี้ใช้สารช่วยละลายฟอสโฟลิพิดในน้ำ สารกลุ่ม detergent เป็นสารลดแรงตึงผิวซึ่งจะเกิดเป็น mixed micelle ระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับฟอสโฟลิพิดชั้น ในตัวกลางที่เป็นน้ำ จากนั้นกำจัดสารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้ออกด้วยกระบวนการ dialysis หรือ gel permeation chromatography ซึ่งจะทำให้โมเลกุลฟอสโฟลิพิดเรียงตัวเป็น bilayer และก่อตัวเป็น unilamellar vesicle โดยไลโปโซมที่ได้จะถูกแยกออกจากตัวกลางหรือสารสำคัญอิสระอาจทำได้โดยวิธี centrifugation, dialysis หรือ gel permeation chromatography

2.17 ข้อดีของไลโปโซม⁽³⁴⁾

ไลโปโซมมีข้อได้เปรียบหลายประการในการเป็นตัวพาหุ เครื่องสำอาง และสารต่าง ๆ ดังนี้

1. ไลโปโซมไม่มีความเป็นพิษ

เนื่องจากไลโปโซมเตรียมได้จากไขมัน จึงไม่เป็นพิษ และเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตซึ่งสามารถถูกทำลายได้ในร่างกาย ดังนั้นจึงไม่เป็นอันตรายและไม่ทำให้เกิดอาการแพ้เมื่อเข้าสู่ร่างกาย อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษา พบว่า ถ้าใช้สารไขมันที่ไม่บริสุทธิ์ในการเตรียมไลโปโซมก็อาจก่อให้เกิดอาการแพ้ได้เช่นกัน

2. ไลโปโซมช่วยเพิ่มความคงตัวของสารที่ถูกกักเก็บ

ไลโปโซมจะช่วยป้องกันการสลายตัวของสารเคมีที่ถูกกักเก็บไว้ในไลโปโซม ทั้งสารที่ถูกกักเก็บไว้ในชั้นน้ำและชั้นไขมันของไลโปโซม โดยอาจเป็นการป้องกันสารจากการถูกทำลายโดยสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต หรือน้ำย่อยในร่างกาย

3. ไลโปโซมช่วยลดความเป็นพิษของสารที่ถูกกักเก็บ

เนื่องจากการดัดแปลงสมบัติของไลโปโซมให้สามารถควบคุมการกระจายตัวและการออกฤทธิ์ของไลโปโซม ทำให้ด้วยส่วนใหญ่จะถูกนำส่งไปยังเซลล์เป้าหมาย ด้วยเป็นส่วนน้อยที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์อื่น ๆ

4. ไลโปโซมสามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง

การฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ฉีดเข้าช่องท้อง การให้ทางปาก การสูดดม เข้าทางจมูกและปอด และการใช้ทาทางผิวหนัง เป็นต้น

5. ไลโปโซมมีสมบัติเป็นแอดจูแวนต์ (adjuvant)

มีประสิทธิภาพดีและราคาถูกเมื่อเทียบกับแอดจูแวนต์ตัวอื่น ๆ จึงมีประโยชน์ในการใช้เตรียมวัคซีน

6. ไลโปโซมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารที่ถูกกักเก็บ

เนื่องจากไลโปโซมสามารถเพิ่มการดูดซึมสารที่ถูกกักเก็บได้ ในการให้สารทางผิวหนังพบว่า สารให้ความชุ่มชื้น (humectants) ที่เก็บกักในไลโปโซมจะสามารถให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวได้มากกว่าและนานกว่าสารที่ไม่ได้กักเก็บในไลโปโซม ทั้งนี้เนื่องจากไลโปโซมมีส่วนประกอบของไขมัน และสามารถดูดซึมเข้าผิวหนังได้มากกว่า นอกจากนี้ไลโปโซมยังทำหน้าที่เป็นดีโพ (depot) ที่ค่อย ๆ ปลดปล่อยสารให้ความชุ่มชื้นออกมาทีละน้อยหลังจากไลโปโซมถูกดูดซึมผ่านผิวแล้ว จึงให้ฤทธิ์ความชุ่มชื้นอยู่ได้นานขึ้น

7. ไลโปโซมสามารถกักเก็บสารต่าง ๆ ได้หลายชนิด

เนื่องจากการจับสารต่าง ๆ ไว้ภายในโครงสร้างของไลโปโซมนั้นเป็นกระบวนการทางกายภาพที่ไม่จำเพาะเจาะจง ดังนั้นจึงไม่มีข้อจำกัดเกี่ยวกับโครงสร้างหรือสมบัติของสารที่จะนำมาเก็บในไลโปโซม

8. ไลโปโซมช่วยทำให้สารสำคัญออกฤทธิ์ได้นานขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการให้ยาอิสระ

มีการพัฒนารูปแบบยาเพื่อให้ยืดยาวระยะเวลาการดูดซึมโดยใช้เทคโนโลยีไลโปโซม ซึ่งส่วนมากเป็นการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งจะช่วยให้ระยะเวลาการออกฤทธิ์โดยการหน่วงเหนี่ยวการดูดซึมตัวยาที่ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ⁽³⁴⁾

2.19 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ณิชากร เจริญกุล และคณะ⁽³⁷⁾ ได้ทำการศึกษาการพัฒนาเจลทาผิวที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีน (*Cinnamomum cassia*) โดยทำการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อสิว 2 สายพันธุ์ คือ *S. epidermidis* และ *P. acnes* จากผลการทดลอง พบว่าน้ำมันอบเชยจีนมีค่า MIC เท่ากับ 156 µg/mL ต่อเชื้อ *S. epidermidis* และ 625 µg/mL ต่อเชื้อ *P. acnes* เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าองค์ประกอบหลักเป็น cinnamaldehyde (C₉H₈O) จากการศึกษาข้อมูลพบว่าผู้บริโภคร้อย 15-25 ปี ต้องการให้ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปแบบเจลทาผิว เมื่อพัฒนาสูตรร่วมกับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวที่ความเข้มข้น 10⁸ CFU/mL พบว่าสูตรที่เหมาะสมมีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีน 0.5% เมื่อเปรียบเทียบกับเจลทาผิวตามท้องตลาด พบว่าสามารถต้านเชื้อ *S. epidermidis* ได้ไม่แตกต่างจากผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด และผู้บริโภคร้อยรับผลิตภัณฑ์ที่ 58.9% จากผู้บริโภคร้อยจำนวน 109 คน

จุฬารัตน์ ลิ้มวัฒนานนท์ และคณะ⁽⁵⁾ ศึกษาประสิทธิภาพทางคลินิกของเจลไพลที่ทาจากน้ำมันไพลปริมาณ 1% ในการรักษาสิวชนิดเล็กน้อยถึงปานกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับยาหลอก ในอาสาสมัครสุขภาพดี 60 ราย โดยผลการทดลอง พบว่าอาสาสมัครกลุ่มที่ได้รับเจลไพลมีร้อยละของการลดลงของจำนวนสิวทั้งหมด (สิวชนิดอักเสบและไม่อักเสบ) สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอก ณ

สัปดาห์ที่ 2 และ 4 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และ ณ สัปดาห์ที่ 8 พบว่าร้อยละของการลดลงของจำนวนสิวไม่แตกต่างกันระหว่างเจลไฟลและยาหลอก โดยสรุป เจลไฟลมีแนวโน้มให้ผลการรักษาสิวล็กน้อยถึงปานกลางโดยสามารถเห็นผลการรักษาได้ภายในเดือนแรกเมื่อเทียบกับยาหลอก จากการทดสอบด้วยวิธี broth dilution พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากไฟลที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P.acnes* มีค่าเท่ากับ 25 µg/mL และทำการศึกษาด้วยวิธี disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยไฟลความเข้มข้นตั้งแต่ 15% v/v ใน propylene glycol มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของสิว คือ *P.acnes* และ *S. epidermidis* และมีค่า MBC ต่อเชื้อ *P.acnes* เท่ากับ 0.62% v/v ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า MBC ของน้ำมัน tea tree oil ต่อเชื้อ *P.acnes* เท่ากับ 0.5% v/v และที่ความเข้มข้นของน้ำมันไฟล 5% พบว่ามีค่า MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* เท่ากับ 2.2 mg/mL จากการทดสอบด้านความปลอดภัย ไม่พบอาการแพ้ต่อผิวหนังสัตว์ทดลองใน skin irritation test

ธนพรและนาชนิน⁽³⁸⁾ ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม โดยทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสมของน้ำมันลาเวนเดอร์ น้ำมันแคลรีเสจ และน้ำมันกระดังงาไทย ในสัดส่วนที่แตกต่างกันจำนวน 3 สูตร ทดสอบโดยใช้วิธี DPPH assay และ ABTS assay เพื่อหาค่า IC₅₀ เทียบกับ น้ำมันหอมระเหยเดี่ยว และใช้สารมาตรฐาน คือ trolox จากผลการทดลอง พบว่า น้ำมันหอมระเหยสูตรผสมทั้ง 3 สูตร มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว โดยน้ำมันหอมระเหยเดี่ยว ได้แก่ น้ำมันลาเวนเดอร์ น้ำมันแคลรีเสจ และน้ำมันกระดังงาไทย มีค่า IC₅₀ เท่ากับร้อยละ 3.92, 6.75 และ 0.40 ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ มีค่า IC₅₀ เท่ากับร้อยละ 1.84, 2.95 และ 0.06 ตามลำดับเมื่อทดสอบด้วยวิธี ABTS assay อย่างไรก็ตามพบว่าตำรับที่ 3 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ทั้งการทดสอบด้วยวิธี DPPH assay และ ABTS assay โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับร้อยละ 1.13 และ 0.16 ตามลำดับ กล่าวโดยสรุป คือ น้ำมันหอมระเหยสูตรผสมมีผลเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถลดปริมาณการใช้น้ำมันเดี่ยวได้ ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของน้ำมันหอมระเหย

Jiulin Wu และคณะ⁽³⁹⁾ ศึกษาการเตรียมนาโนไลโปโซม ศึกษาสมบัติ ความคงตัวในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Aspergillus niger* และศึกษาการปลดปล่อยของน้ำมันหอมระเหยอบเชยในถุงนาโนไลโปโซม ในการศึกษา เติร์มไลโปโซมด้วยวิธี thin film ultrasonic dispersion โดยใช้ soybean lecithin เป็น phospholipids จากผลการทดลองพบว่า ขนาดของนาโนไลโปโซมที่ห่อหุ้มน้ำมันหอมระเหยอบเชยมีขนาด 107 nm ค่า zeta potential มีค่ามากกว่า 30 mV และประสิทธิภาพในการกักเก็บ 92% และสามารถเพิ่มความ

คงตัวในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ยาวนานขึ้น เพราะน้ำมันหอมระเหยอบเชยจะค่อยๆปลดปล่อยออกมาจากนาโนไลโปโซม

Cui Haiying และคณะ⁽⁸⁾ ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย clove และห่อหุ้มน้ำมันหอมระเหย clove ด้วยเทคนิคไลโปโซมแบบ thin film เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีความคงตัวที่ต่ำ ในการห่อหุ้มด้วยตำรับไลโปโซมจะทำให้เพิ่มความคงตัวของน้ำมันหอมระเหยได้ โดยทำการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* จากผลการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหย clove สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* และ *S. aureus* โดยมีค่า MIC และ MBC ที่ 0.5 mg/mL ผลการห่อหุ้มด้วยไลโปโซม พบว่าค่า optimal polydispersity index (PDI) เท่ากับ 0.196 ค่า zeta potential เท่ากับ -24.5 mV และประสิทธิภาพในการกักเก็บ เท่ากับ 20.41% ความสามารถในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 5.0 mg/mL เมื่อทำการห่อหุ้มน้ำมันหอมระเหยแล้วนำไปทดสอบการเชื้อแบคทีเรียอีกครั้ง พบว่า ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ได้ เนื่องจาก *E. coli* ไม่มี utilizing pore-forming toxins (PFTs) ที่ช่วยกระตุ้นน้ำมันหอมระเหย clove ให้ปลดปล่อยออกมาจากไลโปโซม แต่แบคทีเรีย *S. aureus* มี PFTs จึงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้

Sebaaly Carine และคณะ⁽⁴⁰⁾ ศึกษาการเตรียมและศึกษาสมบัติของน้ำมันหอมระเหย clove ที่เตรียมด้วยเทคนิคไลโปโซมแบบ thin film hydration ตั้งตำรับโดยใช้ soybean phospholipid เป็น vesicles เพื่อพัฒนาให้น้ำมันหอมระเหย clove มีความคงตัวเพิ่มมากขึ้น ใช้ ethanol ในการเตรียม ใช้ phospholipids ที่อิมิตัว (phospholipon 80H, phospholipon 90H) และใช้ phospholipids จากถั่วเหลืองที่ไม่อิมิตัว (lipoid S100) ผสมในคลอเรสเตอรอล จากผลการทดลอง พบว่า ไลโปโซมที่ไม่ได้โหลดน้ำมันหอมระเหย clove ลงไป phospholipids ชนิด phospholipon 80H มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กที่สุด lipoid S100 และ phospholipon 90H ตามลำดับ ประสิทธิภาพในการกักเก็บ พบว่า phospholipids ที่อิมิตัว (phospholipon 80H, phospholipon 90H) มีประสิทธิภาพในการกักเก็บสูงกว่า phospholipids ไม่อิมิตัว (lipoid S100) แต่ Lipoid S100 มีความหนาแน่นที่ต่ำกว่า จึงให้ความยืดหยุ่นมากกว่า phospholipon 80H และ phospholipon 90H จากผลการทดลอง พบว่า ไลโปโซมสามารถปกป้องน้ำมันหอมระเหยการถูกทำลายด้วย UV ได้ โดยการยีนยันจาก DPPH-scavenging และเก็บได้ 2 เดือนที่อุณหภูมิ 4°C

จากรายงานการวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น พบว่ายังมีพืชสมุนไพรอีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว และยังมีพืชสมุนไพรอีกหลายชนิดที่ยังไม่มีการทดสอบ อีกทั้งในรายงานการวิจัย ยังไม่มีการทดลองศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว และพัฒนาประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม เพื่อใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบันและเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการรักษาสิว

บทที่ 3 ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 1) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรสโคปี (Beckman, USA)
- 2) GC Column (ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เมตร, เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร, Film Thickness 0.25 μm) (Phenomenex[®], USA)
- 3) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปคโตรสโคปี (Agilent Technology, USA)
- 4) GC Column ชนิด Aqua Wax-DA (ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เมตร, เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร, Film Thickness 0.25 μm) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 5) เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (b-78532 Tuttlinger, Hettich Zentrifugen, Germany)
- 6) เครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (DelsaTM Nano C, Beckman Coulter, USA)
- 7) กล้องจุลทรรศน์ (DS-Fi, Nikon Digital sight, Japan)
- 8) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (SX-700, Tomy, Japan)
- 9) ตู้เขี่ยเชื้อ (lamina flow) (MASK II, Dwyer, USA)
- 10) ตู้เย็น (Hitachi, Japan)
- 11) เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (GF-3000, And, Japan)
- 12) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (AB204-S, Mettler Toledo, Switzerland)
- 13) Fume Hood (Major, Thailand)
- 14) ตู้แช่ควบคุมอุณหภูมิ -20°C (Sanyo, Japan)
- 15) เครื่องระเหยสารแบบลดความดัน (Rotavapor[®] R-300, BUCHI, Japan)
- 16) เครื่อง microwave (Samsung, Korea)
- 17) hot air oven (Mettmert, Germany)
- 18) vortex mixer (Scientific Industries, USA)
- 19) Incubator
- 20) UV spectrophotometer (V-2900, Hitachi, Japan)
- 21) Sonicator (vibra cell, SONIC, USA)
- 22) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) (รุ่นTECNAI T20 G², Philips, Japan)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 1) จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 2) Paper disc, 6 mm. (Whatman, England)
- 3) Disc ยามาตรฐานแอมพิซิลลิน (ampicillin) (Fisher Scientific, England)
- 4) หม้อปราศจากออกซิเจน (Anarobic Jar)
- 5) ท่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 6) ปิเปตดูดวัดถ่ายของเหลว (Micropipette) ขนาด 10 ml (GILSON, France)
- 7) ปิเปตดูดวัดถ่ายของเหลว (Micropipette) ขนาด 200 (Accumax, India)
- 8) หลอดทดลอง (Test Tube) ขนาด 10 และ 20 มล.
- 9) ปิเปตแบบปริมาตร (Transfer Pipette) ขนาด 1, 2, 4, 5 และ 10 ml
- 10) ลูกยางดูดปิเปต (Rubber Bulb)
- 11) ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask) ขนาด 10, 25 และ 50 ml
- 12) บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 25, 50, 100 และ 250 ml
- 13) ที่วางหลอดทดลอง (Test Tube Rack)
- 14) หลอดหยด (Dropper)
- 15) GC Autosampler Vials ขนาด 2 ml
- 16) พาราฟิล์ม (Parafilm)
- 17) ท่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 18) ตะเกียงบุนเสน (Bunsen Burner)
- 19) ปิเปต ทิป (Pipette tips) ขนาด 10, 200, 1000 μ l
- 20) Glass Cuvette

3. เชื้อแบคทีเรียในการวิจัย

- 1) *S. epidermidis* (ATCC 14990) จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
- 2) *P. acnes* (DMST 14916) จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

4. สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

- 1) น้ำมันหอมระเหยอบเชย (Botanicessence essential oil, Thailand)
- 2) น้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว (Tropicalife, Thailand)
- 3) น้ำมันหอมระเหยไพล (Botanicessence essential oil, Thailand))
- 4) น้ำกลั่น (distilled water)
- 5) Ethanol 95% (Merck, Germany)
- 6) Barium chloride dehydrate (HiMedia, India)
- 7) Conc. Sulfuric acid (Merck, Germany)
- 8) Tryptic Soy Broth (Difco, France)
- 9) Tryptic Soy Agar (Difco, France)
- 10) Mueller Hinton Broth (HiMedia, India)
- 11) Mueller Hinton Agar (HiMedia, India)
- 12) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl 95% (Sigma-Aldrich, Germany)
- 13) Dimethylsulfoxide (Fisher Scientific, England)
- 14) Methanol AR grade (Merck, Germany)
- 15) Hexane AR grade (Merck, Germany)
- 16) 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma-Aldrich, Germany)
- 17) potassium persulfate (ajax finechem, australia)
- 18) L(+)-Ascorbic acid 99.7% (Sigma-Aldrich, Germany)
- 19) Crystal violet (Merck, Germany)
- 20) Ammonium oxalate (Fisher Scientific, England)
- 21) Iodine (Merck, Germany)
- 22) Sodium chloride (Merck, Germany)
- 23) Safranin (Merck, Germany)
- 24) Cholesterol (Sigma-Aldrich, Germany)
- 25) Dichloromethane (Fisher Scientific, England)
- 26) Tween 80 (Merck, Germany)
- 27) Disodium hydrogen phosphate (Fisher Scientific, England)
- 28) Sodium cholate (HiMedia, India)
- 29) potassium chloride (Merck, Germany)

- 30) Sodium phosphate dibasic dehydrate (Merck, Germany)
- 31) Potassium dihydrogenphosphate (Merck, Germany)
- 30) L-alpha-Lecithin from egg (Sigma-Aldrich, Germany)
- 31) สารมาตรฐาน cinnamaldehyde (Sigma-Aldrich, Germany)
- 32) สารมาตรฐาน eucalyptol (Sigma-Aldrich, Germany)

3.2 วิธีการศึกษาวิจัย

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดสอบจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง ได้แก่ mueller hinton agar (MHA) และ tryptic soy agar (TSA) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว ได้แก่ mueller hinton broth (MHB) และ tryptic soy broth (TSB) ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้

1) อาหารแข็ง (Agar) 1000 ml

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 38 กรัม สำหรับ MHA และ 40 กรัม สำหรับ TSA ผสมในน้ำกลั่น 1000 mL จากนั้นให้ความร้อนจนเดือด เพื่อให้อาหารละลายจนหมด นำไป sterile ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 15 lbs (121 °C) เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิ 45-50°C แล้วจึงเทลงบนจานเพาะเชื้อ รอจนผิวหน้าอาหารแห้ง ก่อนนำไปใช้

2) อาหารเหลว (Broth) 1000 ml

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 21 กรัม สำหรับ MHB และ 30 กรัม สำหรับ TSB ผสมในน้ำกลั่น 1000 mL จากนั้นให้ความร้อนจนเดือด เพื่อให้อาหารละลายจนหมด และแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 mL นำไป sterile ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 15 lbs (121°C) เป็นเวลา 15 นาที

2. การตรวจสอบยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของเชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* และ *P. acnes* ที่ใช้ในการทดลองว่ามีความบริสุทธิ์ ไม่มีเชื้อชนิดอื่นปนเปื้อน ดังนี้ นำเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการจะศึกษาลักษณะ สัมฐานมาเกลี่ยลงบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นทิ้งให้แห้ง แล้ว fix เซลล์ ด้วยเปลวไฟ 2-3 ครั้ง จากนั้นหยดสี ammonium oxalate crystal violet ลงบนเชื้อจุลินทรีย์ ทิ้งไว้ 1-2 นาที แล้วเทสีทิ้ง เพื่อให้เซลล์ติดสีได้ดีขึ้น หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 2 นาที เทสีทิ้ง นำจุลินทรีย์มาล้างสีด้วย EtOH ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำ จากนั้นหยดสี safranin ทิ้งไว้ 15-30 วินาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำ ซับให้แห้ง ตรวจสอบลักษณะ รูปร่างของจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916)

1) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916)

(1) เชื้อเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) จากจานเพาะเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มา 2-3 โคโลนี นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MHB สำหรับเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และเลี้ยงในอาหาร TSB สำหรับเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916)

(2) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน หากเป็นเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) เลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

(3) จากนั้นนำมาเปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อโดยการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของอาหารเหลวที่มีเชื้อแขวนลอยอยู่ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 686 nm. เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน McFarland standard No. 0.5 เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 1×10^6 CFU/ml

2) การเตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ

(1) การเตรียมความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว

เจือจางน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (C) น้ำมันหอมระเหยจากไพล (Z) และน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว (M) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายให้มีความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 mg/mL เพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

(2) การเตรียมความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม

เจือจาง C, Z และ M โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายให้มีความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.50 และ 5.00 mg/mL นำสารละลายน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด คือ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมเสม็ดขาว (CM) น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมไพล (CZ) และน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวผสมไพล (MZ) มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นรวมของของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม เป็น 0.625, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 mg/mL ดังตารางที่ 1 เพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์

ความเข้มข้น ของ C (mg/mL)	ความเข้มข้น ของ M (mg/mL)	ความเข้มข้น ของ Z (mg/mL)	ความเข้มข้น ของ CM (mg/mL)	ความเข้มข้น ของ CZ (mg/mL)	ความเข้มข้น ของ MZ (mg/mL)
0.3125	0.3125	-	0.625	-	-
0.625	0.625	-	1.25	-	-
1.25	1.25	-	2.500	-	-
2.50	2.50	-	5.00	-	-
5.00	5.00	-	10.00	-	-
0.3125	-	0.3125	-	0.625	-
0.625	-	0.625	-	1.25	-
1.25	-	1.25	-	2.500	-
2.50	-	2.50	-	5.00	-
5.00	-	5.00	-	10.00	-
-	0.3125	0.3125	-	-	0.625
-	0.625	0.625	-	-	1.25
-	1.25	1.25	-	-	2.500
-	2.50	2.50	-	-	5.00
-	5.00	5.00	-	-	10.00

3) การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) โดยวิธี disc diffusion

(1) ทำการเตรียม disc ของน้ำมันหอมระเหยทั้งชนิดเดี่ยวและชนิดผสมโดยใช้น้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม ปริมาตร 20 μ L หยดลงบนแผ่น disc นำไปอบที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(2) เตรียม disc ของตัวทำละลาย (negative control) โดยใช้ DMSO ปริมาตร 20 μ L หยดใส่แผ่น disc นำไปอบที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

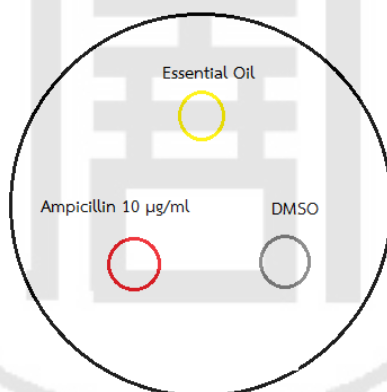
(3) ใช้ไม้พันสำลี จุ่มสารละลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ ป้ายลงบนผิวหน้าของอาหาร MHA สำหรับ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และอาหาร TSA สำหรับ *P. acnes* (DMST 14916) ให้ทั่วจานอาหาร โดยป้าย 3 ครั้ง แต่ละครั้งให้หมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้อไป 60 องศา

(4) ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาที จนกว่าผิวหน้าของจานอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งจึงนำ disc ตัวอย่าง (น้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม), negative control disc (DMSO) และ positive control disc (แอมพิซิลลิน 10 µg) มาวางบนผิวหน้าอาหาร แล้วกดเบา ๆ ในการวาง disc ควรให้แต่ละ disc อยู่ห่างจากขอบจานให้มากที่สุด ดังภาพที่ 9

(5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ *S. epidermidis* และ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ใน anaerobic jar แล้วใส่ gaspak® ปิดฝาทันที สำหรับ *P. acnes*

(6) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณ inhibition zone โดยทำการวัดใน 3 ทิศทางแต่ละ ทิศทางทำมุม 60 องศา หาค่าเฉลี่ยและบันทึกผลการทดลองที่ได้ โดยเปรียบเทียบกับ negative control และ positive control และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ภาพที่ 9 ตำแหน่งการวาง disc ในวิธี disc diffusion



4) การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration, MIC) ของน้ำมันหอมระเหย

- (1) เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ *P. acnes*
- (2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB สำหรับ *S. epidermidis* และอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB สำหรับ *P. acnes* ใส่ในหลอดทดลองจำนวน 10 หลอด หลอดละ 1 mL
- (3) เติมน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม ที่ความเข้มข้น 32.768 mg/mL ลงในหลอดทดลองที่ 1 ปริมาณ 1 mL แล้วทำการเจือจางส่วนผสมในหลอดที่ 1 จนถึง หลอดที่ 9 ด้วยวิธี serial two-fold dilution โดยการดูดสารละลายจากหลอดที่ 1 ปริมาณ 1 mL ใส่ลงในหลอดที่ 2

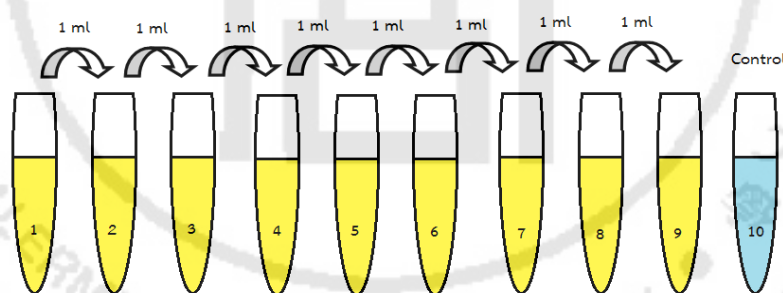
ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายจากหลอดที่ 2 ปริมาณ 1 mL ใส่ลงในหลอดที่ 3 ทำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนถึงหลอดที่ 9 โดยหลอดที่ 9 ดูดสารละลายทิ้ง 1 mL ดังภาพที่ 10

(4) เติมเชื้อลงในหลอดที่ 1 จนถึงหลอดที่ 10 หลอดละ 1 mL ดังนั้น ปริมาตรสุดท้ายในหลอดทดลองแต่ละหลอดจะเท่ากับ 2 mL. (ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยในหลอดที่ 1-9 จะเท่ากับ 1:2, 1:4, 1:8, 1:16,...จนถึง 1:512 ตามลำดับ) ส่วนหลอดที่ 10 เป็นหลอดควบคุม (Control) ที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อจุลินทรีย์และใช้สาร DMSO แทนน้ำมันหอมระเหย

(5) นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ *S. epidermidis* และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน สำหรับ *P. acnes* ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

(6) บันทึกความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดียวและชนิดผสมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (หลอดที่ไม่ขุ่น, MIC)

ภาพที่ 10 ขั้นตอนการเจือจางแบบวิธี serial two-fold dilution



5) การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (minimal bactericidal concentration, MBC) ของน้ำมันหอมระเหย

(1) นำหลอดทดลองจากการทดสอบหาค่า MIC ที่ยังใสอยู่ทุกหลอดมา spread ลงบนอาหาร MHA สำหรับ *S. epidermidis* บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ spread ลงบนอาหาร TSA สำหรับ *P. acnes* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

(2) หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (MBC) บันทึกผลการทดลอง

4. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1) DPPH[•] radical scavenging assay (ดัดแปลงจากวิธีของ กนกวรรณ ศักดิ์สกุล ไกร, วรมิตา ปิยะศิรินันท์. 2556)⁽⁴¹⁾

การเตรียมสารละลาย DPPH[•]

ชั่ง DPPH[•] 7.9 mg ใส่ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL เติม methanol ปริมาณครึ่งหนึ่งของ volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรจนถึงขีดที่กำหนดจะได้ สารละลาย DPPH[•] ความเข้มข้น 0.1 mM

การเตรียมสารละลาย L-ascobic acid (positive control)

เตรียม สารละลาย L-ascobic acid ความเข้มข้นทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ในช่วง 0.01-10.0 mg/mL โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

การเตรียมสารละลายน้ำมันหอมระเหย

เจือจางน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว (C, M และ Z) และชนิดผสม (CM, CZ และ MZ) ในช่วงความเข้มข้น 0.01-10.00 mg/mL โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานและตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

1. เติมสารละลาย L-ascobic acid หรือสารละลายของน้ำมันหอมระเหยตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น จำนวน 1 mL ลงในหลอดทดลอง เจือจางด้วย methanol
2. เติมสารละลาย DPPH[•] จำนวน 2 mL
3. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของสารละลายข้อ 3 โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 515 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง
5. นำค่า absorbance ที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ย แล้วนำมาคำนวณ %inhibition แล้วรายงานผลเป็นค่า IC₅₀

2) 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline6-sulfonic acid) cation radical scavenging assay (ดัดแปลงจากวิธีของ ปริยนันท์ บัวสด. 2549)⁽⁴²⁾

การเตรียมสารละลาย potassium persulfate (K₂S₂O₈)

ชั่ง K₂S₂O₈ 0.0662 g ใน ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนครบ 100 ml จะได้สารละลาย K₂S₂O₈ ความเข้มข้น 2.45 mM

การเตรียมสารละลาย ABTS^{•+} (2,2'-Azino-bis(3ethylbenzothiazoline6-sulfonic acid)

ชั่ง ABTS^{•+} จำนวน 0.3841 g ใน volumetric flask 100 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 100 mL ได้สารละลาย ABTS^{•+} ความเข้มข้น 7 mM

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน L-ascobic acid (positive control)

เตรียม สารละลาย L-ascobic acid ความเข้มข้นทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ในช่วง 0.01-10.0 mg/mL โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

การเตรียมสารละลายของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

เจือจางน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว (C, M และ Z) และชนิดผสม (CM, CZ และ MZ) ในช่วงความเข้มข้น 0.01-10.00 mg/mL โดยใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย

การทดสอบสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารมาตรฐานและตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

1. เติมสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายของน้ำมันหอมระเหยตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้น จำนวน 0.5 mL ลงใน test tube
2. เติมสารละลาย ABTS^{•+} จำนวน 2.5 mL
3. เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
4. นำสารมาวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงโดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 734 nm ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง
5. นำค่า absorbance ที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ยแล้ว นำมาคำนวณหา %inhibition ABTS^{•+} จากสมการ

$$\% \text{ inhibition ABTS}^{\bullet+} = [(Ac-As)/Ac] \times 100$$

โดย As = absorbance ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐาน

Ac = absorbance ที่วัดได้ของสารละลาย ABTS^{•+} ใน methanol

6. หาความสัมพันธ์ระหว่าง %inhibition ABTS^{•+} กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโดยการสร้างกราฟ เพื่อหาค่า IC₅₀

5. การศึกษาหาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีที่สุดด้วยเครื่อง GC-MS

1) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยชนิดผสม

ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้อุณหภูมิของส่วนที่ฉีดสาร 250 °C คอลัมน์เป็นชนิด ZB-5MSI (ยาว 30 m, เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 μm , film thickness 0.25 mm), ก๊าซพาเป็นฮีเลียม, อัตราการไหลของก๊าซพา 1 mL/min, ปริมาตรที่ฉีด 1 μL , ionization source เป็นชนิด electron impact 70 eV, mass analyzer เป็น quadrupole, อุณหภูมิของส่วน ionization คือ 250 °C อุณหภูมิของส่วน mass analyzer 50 °C และ 280 °C ช่วงมวลในการวิเคราะห์ 50-650 amu โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Programmed Temperature ของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรีของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม CM

Ramps	Rate ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Hold time
Initial	-	50	5.00
Ramp 1	10.0	80	0.00
Ramp 2	5.0	180	0.00
Ramp 3	30.0	240	5.00

2) การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ของน้ำมันหอมระเหยผสม

(1) การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

ทำการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหย CM โดยใช้สภาวะที่ได้พัฒนาวิเคราะห์ ตรวจสอบว่าสารสำคัญ eucalyptol และ cinnamaldehyde มีพีคครบถ้วนหรือไม่เปรียบเทียบกับ mass spectra และ RT ของสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน เพื่อตรวจสอบว่า mass spectra และ RT ของสารตัวอย่างมีความจำเพาะกับ mass spectra และ RT ของสารมาตรฐาน

(2) การทดสอบความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity)

- เตรียมสารมาตรฐาน eucalyptol และ cinnamaldehyde ที่ความเข้มข้น 0.25-4.00 mg/mL ปรับปริมาตรด้วย hexane

- นำสารละลายมาตรฐาน eucalyptol และ cinnamaldehyde ไปฉีดด้วยเครื่อง GC-MS โดยใช้สภาวะที่ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์แล้ว ฉีดทั้ง 5 ความเข้มข้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ หาค่าเฉลี่ย

- สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (pearson correlation coefficient: r)

(3) การทดสอบความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ (precision)

ฉีดน้ำมันหอมระเหยตัวอย่าง ปริมาตร 1 μL ทำการทดลอง 6 ซ้ำ ด้วยเครื่อง GC-MS โดยวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยตัวอย่างในวันเดียวกัน (intraday) และต่างวันกัน (inter-day) เพื่อคำนวณหาความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ในรูป % RSD (relative standard deviation) ดังนี้

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}} \times 100$$

SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

\bar{X} = ค่าเฉลี่ยของพื้นที่พีคของสารสำคัญ

(4) การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

- เตรียมสารละลาย CM ความเข้มข้น 0.1 mg/mL
- เติมสารมาตรฐาน eucalyptol และ cinnamaldehyde ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงใน CM โดยครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของปริมาณ eucalyptol และ cinnamaldehyde ใน CM 3 ระดับ ที่ร้อยละ 80, 100 และ 120
- ฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง แล้วคำนวณผลเป็นค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_a - C_b}{C_c} \times 100$$

โดย C_a = ความเข้มข้นของ cinnamaldehyde หรือ eucalyptol ที่วิเคราะห์ได้จาก spiked sample (mg/mL)

C_b = ความเข้มข้นของ cinnamaldehyde หรือ eucalyptol ที่วิเคราะห์ได้จาก unspiked sample (mg/mL)

C_c = ความเข้มข้นของ cinnamaldehyde หรือ eucalyptol ที่เติมลงใน spiked sample (mg/mL)

3) หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีที่สุด

น้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดจะถูกวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ด้วยเครื่อง GC-MS โดยเทียบกับสารมาตรฐานของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า CM มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.024 mg/mL วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ eucalyptol และ cinnamaldehyde ด้วยสภาวะดังตารางที่ 3.2 ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ และนำพื้นที่ใต้กราฟมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำพื้นที่ใต้กราฟมาเทียบกับ standard curve ของสารมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาปริมาณสารสำคัญ cinnamaldehyde และ eucalyptol ในน้ำมันหอมระเหย CM

6. การเตรียมไลโปโซมที่มีฤทธิ์ดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว

เตรียมน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบไลโปโซม (essential oil-loaded liposome) ด้วยวิธี thin-film hydration ดัดแปลงตามวิธีของ C.C. Liolios. et.al, 2008)⁽⁴³⁾

1) ชั่งน้ำหนัก phospholipids (L-alpha-lecithin from egg) และ cholesterol ตามตารางที่ 3 น้ำหนักรวม 100 mg และชั่งน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม CM 80 mg ลงในขวดก้นกลม จากนั้นละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ dichloromethane: methanol (อัตราส่วน 3:1) ปริมาตร 40 mL

2) เทสารละลายในส่วนของไขมันและสารละลายของน้ำมันหอมระเหยลงในฟลาส ก้นกลม ขนาด 250 mL

3) ทำการระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิ 40°C โดยใช้ความเร็วในการหมุน 120 rpm จนได้ฟิล์มของไขมันที่แห้งสนิท ไม่มีกลิ่นของ dichloromethane และ methanol จะได้ฟิล์มบางๆ ของไขมันเกิดขึ้นที่บริเวณด้านล่างของฟลาสก้นกลม

4) เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 ปริมาตร 40 mL แล้วทำการไฮเดรตฟิล์มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 2 ชั่วโมง

5) นำไลโปโซมที่ได้ไปทำการ sonicate ที่ความถี่ 50 Hz เพื่อลดขนาดของอนุภาค ใช้ระยะเวลาในการลดขนาดอนุภาคตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การออกแบบตำรับไลโปโซม

ตำรับ ที่	อัตราส่วนของ phospholipids: cholesterol	ส่วนประกอบ (mg)		CM (mg)	ระยะเวลา sonicate (min)
		phospholipids	Cholesterol		
F1	60:40	60	40	80	0
F2	60:40	60	40	80	2
F3	60:40	60	40	80	5
F4	70:30	70	30	80	0
F5	70:30	70	30	80	2
F6	70:30	70	30	80	5
F7	80:20	80	20	80	0
F8	80:20	80	20	80	2
F9	80:20	80	20	80	5
F10	90:10	90	10	80	0
F11	90:10	90	10	80	2
F12	90:10	90	10	80	5

7. การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพของไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม ลักษณะภายนอกทางมหภาคและจุลภาค

1) ประเมินคุณลักษณะภายนอกของตำรับไลโปโซมที่มีน้ำมันหอมระเหย และการเกิดตะกอนของตำรับด้วยตาเปล่า

2) วัดขนาดอนุภาคและดูการกระจายตัวของไลโปโซมที่เตรียมได้ ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (particle size analyzer) โดยการนำไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหย(F1-F12) ที่เตรียมใส่ลงใน quartz cuvette จากนั้นใส่ลงในช่องสำหรับตรวจวัดขนาดของเครื่อง ซึ่งเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ที่มีระบบประมวลผล ได้ผลเป็นขนาดอนุภาคและค่าการกระจายของอนุภาค โดยแต่ละตัวอย่างทำการตรวจวัด 3 ครั้ง และทำการบันทึกผล

8. การทดสอบความสามารถในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม

1) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่บรรจุในตำรับไลโปโซม

ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้อุณหภูมิ injection เท่ากับ 250 °C คอลัมน์เป็นชนิด AquaWax-DA capillary columns (ยาว 30 m, เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 mm, film thickness 0.25 µm) ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา 1.0 mL/min ปริมาตรที่ฉีด 0.4 µL มี ionization source เป็นชนิด electron impact 70 eV mass analyzer เป็นแบบ quadrupole ใช้ mass range ตั้งแต่ 50-500 m/z โดยใช้สภาวะดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 Programmed Temperature ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม (F1-F12) ด้วยวิธี GC-MS

Ramps	Rate (°C/min)	Temperature (°C)	Hold time
Initial	-	50	5.00
Ramp 1	10.0	80	0.00
Ramp 2	5.0	180	0.00
Ramp 3	30.0	240	5.00

2) การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยผสมที่บรรจุในตำรับไลโปโซมด้วยเครื่อง GC-MS

ทำการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ (specificity) ความเที่ยง (precision) ความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) และความแม่นยำ (accuracy)

3) การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันหอมระเหย CM ที่กักเก็บในตำรับไลโปโซม (F1-F12) ด้วยเครื่อง GC-MS (ดัดแปลงตามวิธีของ เพชรชมพู ศิริพันธุ์และคณะ)⁽⁴³⁾

1) นำไลโปโซมที่ห่อหุ้มน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม (F1-F12) ที่เตรียมได้มาใส่ในหลอด centrifuge จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 30,000 rpm เป็นเวลา 120 นาที

2) นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง (supernatant) ออกไปจนเหลือแต่ส่วนของตะกอน (sedimentation) ที่กั้นหลอดซึ่งเป็นตะกอนของไลโปโซมผสมกับน้ำมันหอมระเหย CM

3) นำส่วนของตะกอน (sedimentation) มาทำลายผนังไลโปโซมให้แตกด้วย dichloromethane: ethanol (อัตราส่วน 1:1)

4) นำสารละลายข้อ 3) ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC-MS โดยใช้สภาวะที่พัฒนาวิธีวิเคราะห์แล้ว ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ถูกกักเก็บในไลโปโซมกับกราฟมาตรฐานของ CM ที่

ละลายใน dichloromethane: ethanol (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง หาค่าเฉลี่ย

5) คำนวณหาร้อยละการกักเก็บปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยในไลโปโซม (% entrapment efficiency) โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละการกักเก็บปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยในไลโปโซม} = \frac{X}{Y} \times 100$$

X = ปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม

Y = ปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ใส่ในตำรับไลโปโซม

9. การประเมินลักษณะของตำรับไลโปโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหย

1) การศึกษาลักษณะของตำรับไลโปโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ดีที่สุดด้วยกล้อง Polarized light microscopy และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

เลือกตำรับไลโปโซมที่มีความสามารถในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ดีที่สุด 1 ตำรับ ศึกษาลักษณะของตำรับด้วยกล้อง Polarized light microscopy และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ปรับกำลังไฟฟ้าแรงสูงกำเนิดอิเล็กตรอน ในช่วง 75 kV ถึง 80 kV

2) การประเมินสมบัติของตำรับไลโปโซมที่สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ศึกษาความคงตัวของตำรับไลโปโซมที่มีความสามารถในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ดีที่สุด 1 ตำรับ ทำการศึกษาโดยเก็บตำรับไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหย ที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ประเมินสมบัติตำรับไลโปโซมทุก 7 วัน โดยศึกษาความเป็นกรดต่าง ความหนืด ขนาดอนุภาคของตำรับ การกระจายตัวของตำรับ และเปอร์เซ็นต์การกักเก็บน้ำมันหอมระเหยในแต่ละสัปดาห์

3) การประเมินฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ของตำรับไลโปโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ถูกกักเก็บในตำรับไลโปโซม

ทำการเปรียบเทียบความคงตัวของตำรับน้ำมันหอมระเหยที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม และไม่ถูกกักเก็บในไลโปโซม ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะชนิดเดียวกัน ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการเก็บวิเคราะห์ผลทุกสัปดาห์ เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) โดยวิธี disc diffusion

(1) ใช้ไม้พันสำลีขนาดมาตรฐานชุบ suspension ของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) แล้วนำมาป้ายบนผิวหน้าของอาหาร MHA และ TSA ให้ทั่วจานอาหาร

(2) ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง 3 - 5 นาที จึงนำ disc ของส่วนไลโปโซมน้ำมันหอมระเหย, disc น้ำมันหอมระเหยที่ไม่ถูกกักเก็บในตำรับไลโปโซม, disc สารละลาย dichloromethane: ethanol (อัตราส่วน 1:1) (negative control) และ disc ยาแอมพิซิลลิน 10 µg (positive control) มาวางบนผิวหน้าอาหาร

(3) นำจานอาหารที่ผสมเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) ไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนอาหารที่ผสมเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) ให้วางเรียงซ้อนกันใน anaerobic jar แล้วใส่ gaspak® ปิดฝาทันที นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

(4) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นโดยทำการวัดใน 3 ทิศทาง แต่ละทิศทางทำมุมกัน 60 องศา หาค่าเฉลี่ย และบันทึกผลการทดลองที่ได้

10. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ใช้ในงานวิจัย

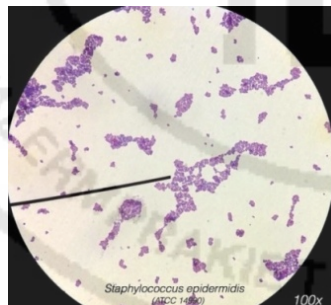
วิเคราะห์ผลของข้อมูลทางสถิติ ด้วยโปรแกรม SPSS 16.0

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ใช้วิธีการย้อมสีแกรม จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะสัญญาณของโคโลนีบนจานเพาะเชื้อและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X เพื่อตรวจสอบยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อนนำไปศึกษาต่อไป จากการทดลองพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด มีความบริสุทธิ์ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อน โดยเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) มีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังนี้ มีลักษณะกลม ติดสีย้อมแกรมสีม่วง อยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายรวงงู ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาดเล็กเป็นสีขาว เหลืองอ่อน มีลักษณะกลม เรียบ ชุ่ม นูนเล็กน้อยส่วนเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) มีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เป็นแท่งสั้น ติดสีย้อมแกรมสีม่วง ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาดเล็กเป็นสีขาว มีลักษณะกลม ดังภาพที่ 11

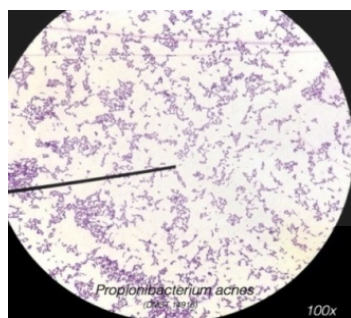
ภาพที่ 11 ลักษณะเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาด 100X (a) และบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (b), ลักษณะเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขนาด 100X (c) และบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (d)



(a)



(b)



(c)



(d)

4.2 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) โดยวิธี disc diffusion

ผลการตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว (C, M และ Z) และน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม (CM, CZ และ MZ) ด้วยวิธี disc diffusion ที่ความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 mg/mL พบว่า น้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสมทุกชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแตกต่างกันโดยมีการสร้าง inhibition zone ต่อเชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 5 และ 6 โดยชนิดของน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ CM ที่ความเข้มข้น 10.00 mg/mL มี inhibition zone ต่อเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) เท่ากับ 32.33 ± 0.58 mm และ 35.67 ± 0.58 mm ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเคียงกับ Ampicillin (positive control) ที่มี inhibition zone ต่อเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) เท่ากับ 29.00 และ 30.00 สำหรับ DMSO ซึ่งเป็น negative control ไม่มีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 5 ขนาด inhibition zone จากผลการตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990)

สารที่ใช้ทดสอบ	ขนาด inhibition zone (mm)*				
	ของน้ำมันหอมระเหยในแต่ละความเข้มข้น				
	0.625 mg/mL	1.25 mg/mL	2.50 mg/mL	5.00 mg/mL	10.00 mg/mL
C	9.67±0.58 ^d	11.00±0.00 ^c	13.33±0.58 ^c	19.00±0.00 ^{ab}	30.67±1.53 ^d
M	7.67±0.58 ^b	8.00±0.00 ^a	12.33±0.58 ^{bc}	18.67±0.58 ^a	27.33±0.58 ^c
Z	6.00±0.00 ^a	7.33±0.58 ^a	11.00±1.00 ^a	17.33±0.58 ^a	21.67±1.15 ^a
CM	10.33±0.58 ^d	12.00±0.00 ^d	17.67±0.58 ^d	20.67±1.53 ^b	32.33±0.58 ^e
CZ	8.67±0.58 ^c	9.33±0.58 ^b	12.00±0.00 ^{ab}	18.33±1.53 ^a	25.00±0.00 ^b
MZ	6.67±0.58 ^a	7.33±0.58 ^a	11.67±0.58 ^{ab}	18.67±0.58 ^a	23.67±1.15 ^b
DMSO	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : วัดรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (6 mm)

* ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, a, b, c, d, e, หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูล ที่เป็นตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ab, bc หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแต่ละความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), Ampicillin 10 μ g (positive control) มีขนาด inhibition zone เท่ากับ 29.00±0.00 mm

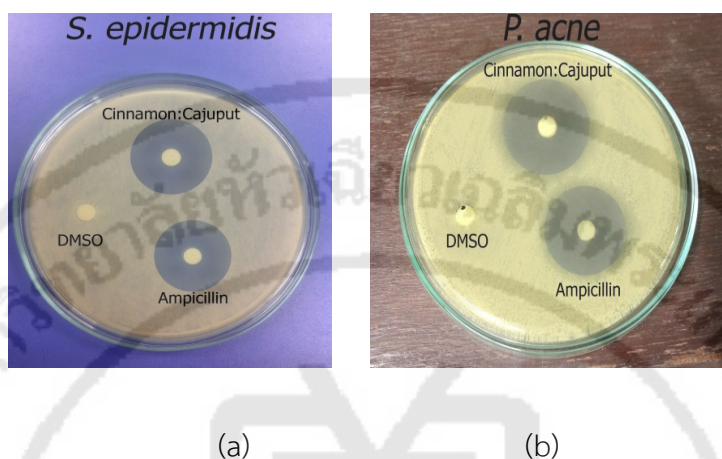
ตารางที่ 6 ขนาด inhibition zone จากผลการตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916)

สารที่ใช้ทดสอบ	ขนาด inhibition zone (mm)*				
	ของน้ำมันหอมระเหยในแต่ละความเข้มข้น				
	0.625 mg/mL	1.25 mg/mL	2.50 mg/mL	5.00 mg/mL	10.00 mg/mL
C	10.00±0.00 ^c	13.67±0.58 ^c	17.67±0.58 ^c	21.33±0.58 ^d	32.67±0.58 ^d
M	9.33±0.58 ^c	10.67±0.58 ^b	15.00±0.00 ^b	19.67±0.58 ^{bc}	30.67±1.53 ^c
Z	7.33±0.58 ^{ab}	9.33±0.58 ^a	12.33±0.58 ^a	18.33±0.58 ^a	23.00±0.00 ^a
CM	12.00±1.00 ^d	16.67±0.58 ^d	19.67±0.58 ^d	25.33±0.58 ^e	35.67±0.58 ^e
CZ	8.00±0.00 ^b	12.56±0.58 ^c	16.00±1.00 ^b	20.67±0.58 ^{cd}	30.00±1.00 ^c
MZ	7.00±0.00 ^a	9.33±0.58 ^a	13.00±1.00 ^a	19.00±1.00 ^{ab}	28.33±0.58 ^b
DMSO	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : วัดรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (6 mm)

* ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, a, b, c, d, e หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูล ที่เป็นตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ab, bc, cd หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในแต่ละความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), Ampicillin 10 μg (positive control) มีขนาด inhibition zone เท่ากับ 30.00 ± 0.00 mm

ภาพที่ 12 ตัวอย่างขนาด inhibition zone, ของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) (a) และ *P. acnes* (DMST 14916) (b) ของสารละลาย CM (cinnamon: cajuput) ใน DMSO เปรียบเทียบกับ ampicillin 10 µg และตัวทำละลาย DMSO



4.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (MBC) ของน้ำมันหอมระเหย

จากการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ (MBC) โดยทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม ต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวทั้ง 2 ชนิด โดยจากผลการทดลองหาค่า MIC และ MBC พบว่า CM มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวของเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* เท่ากันและเท่ากับ 1.024 mg/mL และต่อเชื้อ *P. acnes* มีค่าเท่ากันและเท่ากับ 0.512 mg/mL ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสมต่อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916)

ชนิดของน้ำมัน หอมระเหย	<i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990)		<i>P. acnes</i> (DMST 14916)	
	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*
	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)
C	2.048	2.048	1.024	1.024
M	4.096	4.096	2.048	2.048
Z	16.384	32.468	8.192	16.384
CM	1.024	1.024	0.512	0.512
CZ	4.096	8.192	2.048	4.096
MZ	8.192	8.192	4.096	8.192

หมายเหตุ : * ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

4.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

1. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม โดย DPPH⁺ radical scavenging assay

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม เปรียบเทียบกับ L-ascorbic acid (positive control) โดยทำการวัดค่า absorbance ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว ชนิดผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ และ L-ascorbic acid ที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำมาเฉลี่ย เพื่อคำนวณหา % Inhibition แล้วนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibitory concentration และความเข้มข้น เพื่อหาค่า IC₅₀ ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 8 พบว่า CZ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.041± 0.003 mg/mL และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับ C โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.045± 0.003 mg/mL แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับน้ำมันหอมระเหย M, Z, CM และ MZ เมื่อเปรียบเทียบกับ L-ascorbic acid ซึ่งเป็น positive control พบว่า มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน โดย L-ascorbic acid มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.037 ± 0.001 mg/mL

ตารางที่ 8 ค่า IC₅₀ ของน้ำมันหอมระเหยและสารมาตรฐานด้วยวิธี DPPH^{·+} radical scavenging assay

สารที่ใช้ทดสอบ	DPPH ^{·+} assay* IC ₅₀ (mg/mL)
C	0.045± 0.003 ^b
M	0.602± 0.003 ^f
Z	0.231± 0.003 ^c
CM	0.416± 0.003 ^d
CZ	0.041± 0.003 ^b
MZ	0.501± 0.003 ^e
L-ascorbic acid	0.037 ± 0.001 ^a

หมายเหตุ * ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, a, b, c, d, e, f หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูล± SD โดยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น (P<0.05)

2. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม โดย ABTS^{·+} radical scavenging capacity assay

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม เปรียบเทียบกับ L-ascorbic acid (positive control) โดยทำการวัดค่า absorbance ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว ชนิดผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ และ L-ascorbic acid ที่ความยาวคลื่น 734 nm โดยวัดซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำมาเฉลี่ย เพื่อคำนวณหา % Inhibition แล้วนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง % Inhibitory concentration และความเข้มข้น เพื่อหาค่า IC₅₀ ซึ่งได้ผลดังตารางที่ 9 พบว่า CZ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.021± 0.003 mg/mL และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับ C โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.027± 0.004 mg/mL แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับน้ำมันหอมระเหย M, Z, CM และ MZ เมื่อเปรียบเทียบกับ L-ascorbic acid ซึ่งเป็น positive control พบว่า มีฤทธิ์ใกล้เคียงกัน โดย L-ascorbic acid มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.024 ± 0.002 mg/mL

ตารางที่ 9 ค่า IC₅₀ ของน้ำมันหอมระเหยและสารมาตรฐานด้วยวิธี ABTS^{•+} radical scavenging capacity assay

สารที่ใช้ทดสอบ	ABTS ^{•+} assay* IC ₅₀ (mg/mL)
C	0.027± 0.004 ^a
M	0.398± 0.004 ^e
Z	0.107± 0.002 ^b
CM	0.270± 0.01 ^c
CZ	0.021± 0.003 ^a
MZ	0.313± 0.003 ^d
L-ascorbic acid	0.024 ± 0.002 ^a

หมายเหตุ * ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, a, b, c, d, e หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูล ที่เป็นตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น (P<0.05)

4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีที่สุดด้วยเครื่อง GC-MS

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ใช้สภาวะดังนี้ คือ อุณหภูมิ injection เท่ากับ 250 °C อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้น จาก 50 °C (คงที่ไว้ 5 นาที) เพิ่มอุณหภูมิ 10 °C/นาที จนถึง 80 °C จากนั้นเพิ่ม 5 °C/นาที จนกระทั่งอุณหภูมิ 180 °C และเพิ่มขึ้นในอัตรา 30 °C/นาทีจนเป็น 240 °C (คงที่ไว้ 5 นาที) โดยทำการทดสอบดังนี้

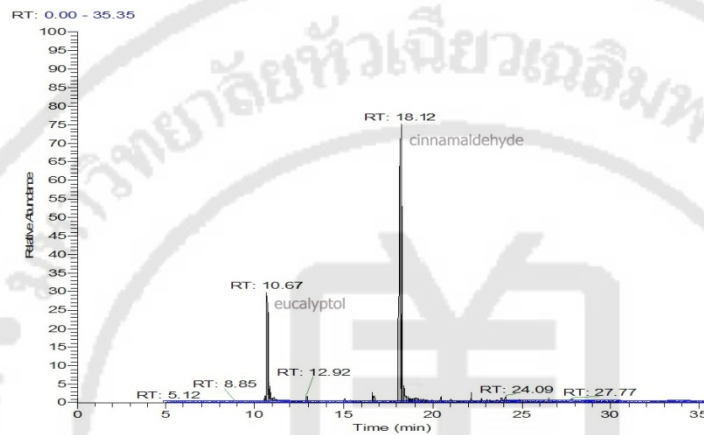
1. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยผสม

1) การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

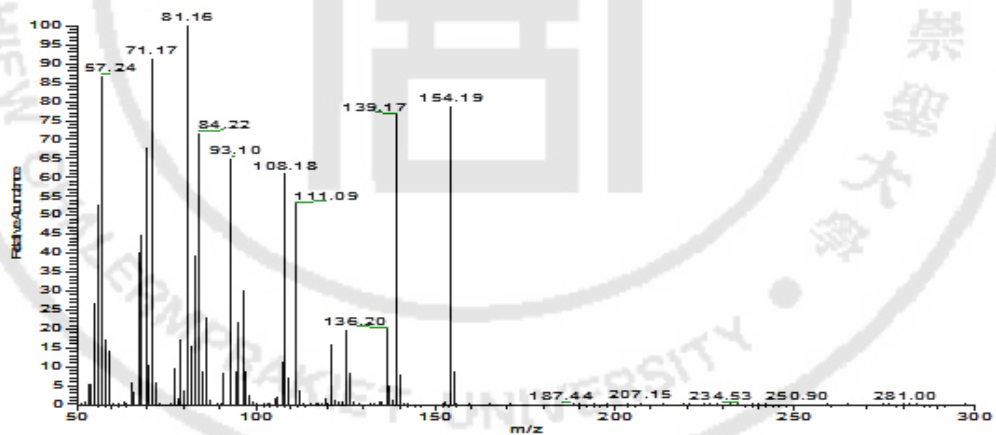
จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของน้ำมัน CM ได้โครมาโทแกรมดังภาพ ที่ 13 พบว่า พีคของสารสำคัญ eucalyptol และ cinnamaldehyde มีค่า RT เท่ากับ 10.67 และ 18.12 ตามลำดับ พีคของสารสำคัญแยกจากกันโดยเด็ดขาด และไม่มีการรบกวนของสารอื่นๆ เมื่อฉีดสารมาตรฐาน eucalyptol และ cinnamaldehyde เพื่อเทียบกับสารตัวอย่าง พบว่า มีค่า RT เท่ากับ 10.67 และ 18.11 ตามลำดับ (ภาพที่ 14 (a) และ (b) ตามลำดับ) ซึ่งค่า RT ของสารมาตรฐานมีค่าใกล้เคียงกับค่า RT ของสารตัวอย่าง นอกจากนี้ mass spectra ของสารสำคัญ eucalyptol (ภาพที่ 13 (b)) และ cinnamaldehyde (ภาพที่ 13 (c)) ทั้งสองในน้ำมันหอมระเหย

สอดคล้องกับ mass spectra ของสารมาตรฐาน eucalyptol (ภาพที่ 15 (a)) และ cinnamaldehyde (ภาพที่ 15 (b))

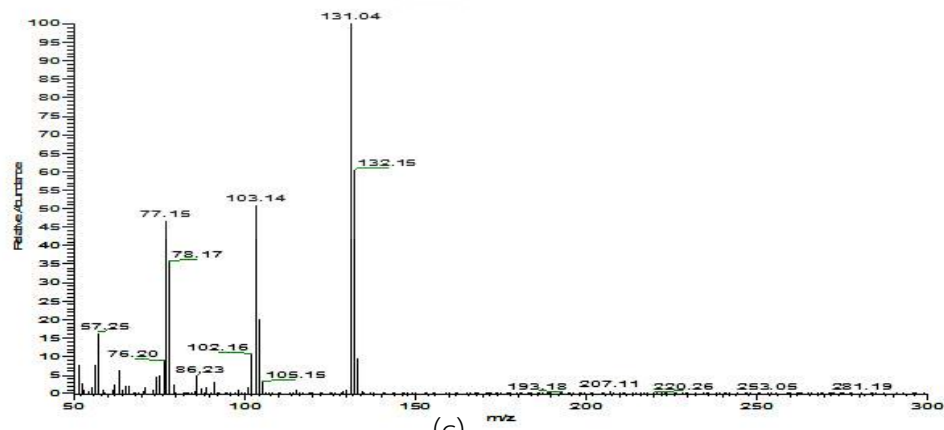
ภาพที่ 13 GC โครมาโทแกรมของ eucalyptol และ cinnamaldehyde ในน้ำมัน CM (a), mass spectra ของ eucalyptol (b) และ mass spectra ของ cinnamaldehyde (c)



(a)

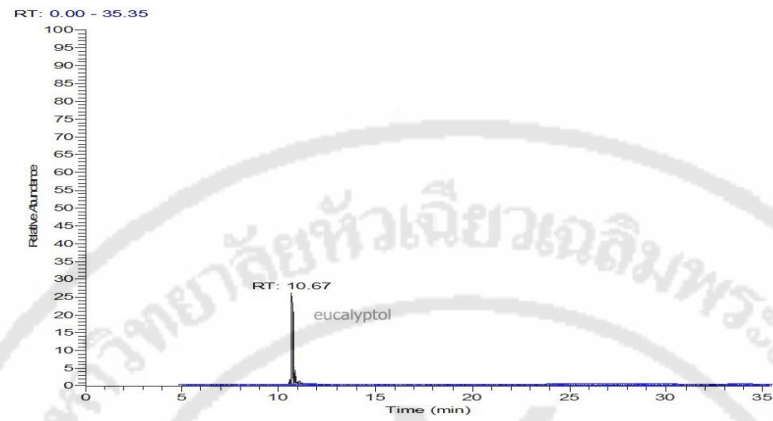


(b)

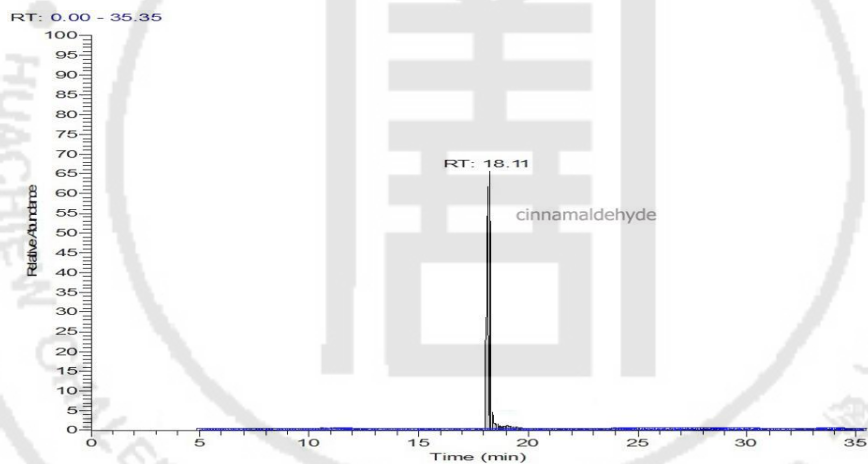


(c)

ภาพที่ 14 GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน eucalyptol (a) และโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน cinnamaldehyde (b)

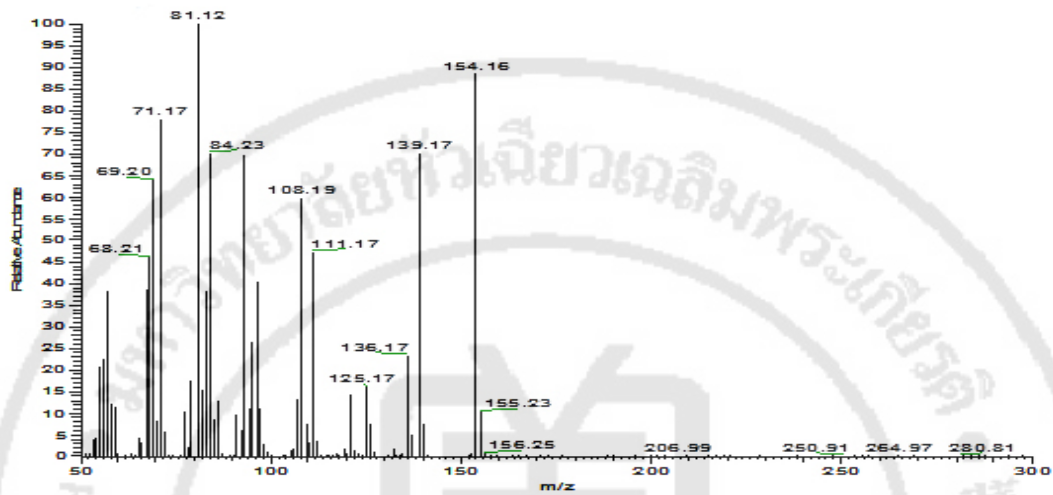


(a)

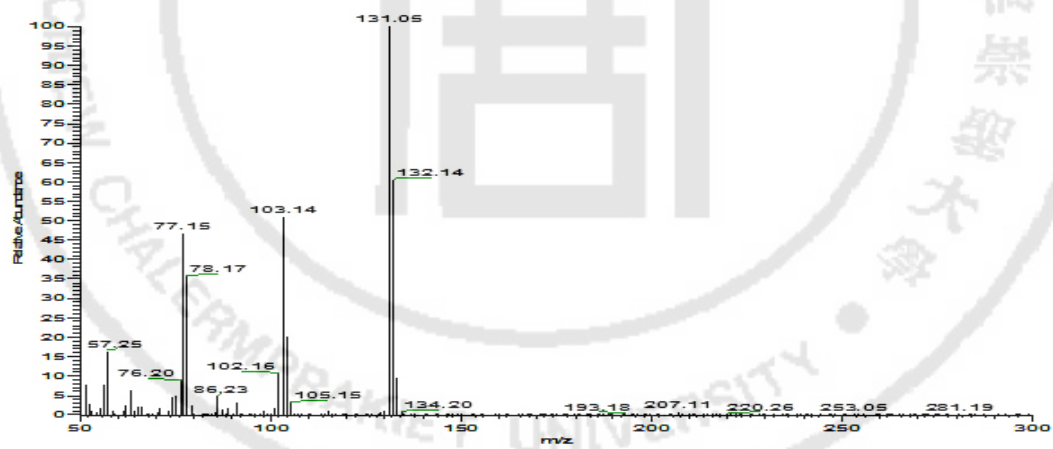


(b)

ภาพที่ 15 mass spectram ของสารมาตรฐาน eucalyptol (a) และ mass spectram ของสารมาตรฐาน cinnamaldehyde (b)



(a)



(b)

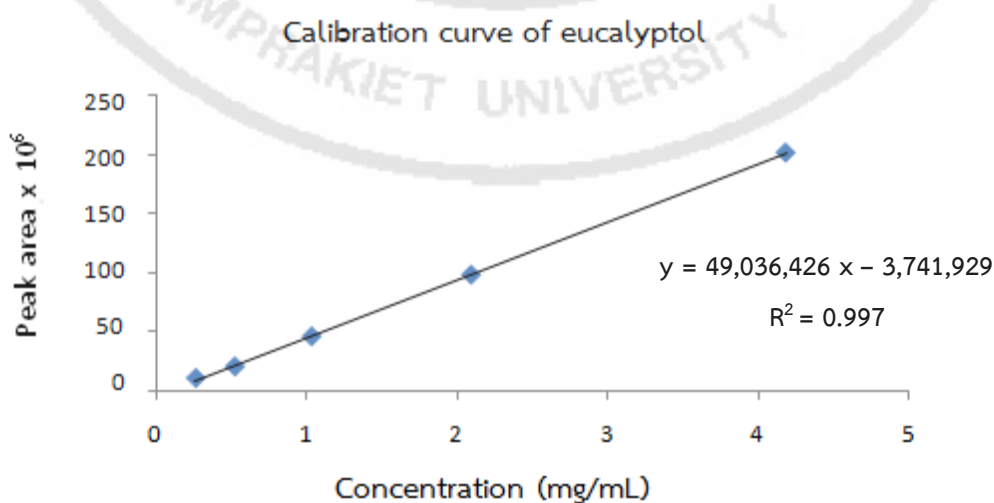
2) การทดสอบความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity)

สร้างกราฟมาตรฐานของ eucalyptol และ cinnamaldehyde โดยฉีดสารมาตรฐาน eucalyptol ความเข้มข้น 0.26, 0.52, 1.03, 2.09 และ 4.18 mg/mL, สารมาตรฐาน cinnamaldehyde ความเข้มข้น 0.28, 0.56, 1.02, 2.07 และ 4.26 mg/mL สมการเส้นตรงหาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และ peak area ที่วิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9997 ของ eucalyptol และ 0.998 ของ cinnamaldehyde ดังตารางที่ 10-11 และแผนภูมิที่ 1 และ 2

ตารางที่ 10 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่า correlation coefficient ของ eucalyptol

Concentration (mg/mL)	Peak area			Average	R ²
	n1	n2	n3		
0.26	11025321	10985321	10471741	10827461	0.9997
0.52	20458213	20785421	20664840	20636158	
1.03	45826310	45914752	46642497	46127853	
2.09	97584631	98153242	99026482	98254785	
4.18	204784274	201963895	198227097	201658422	

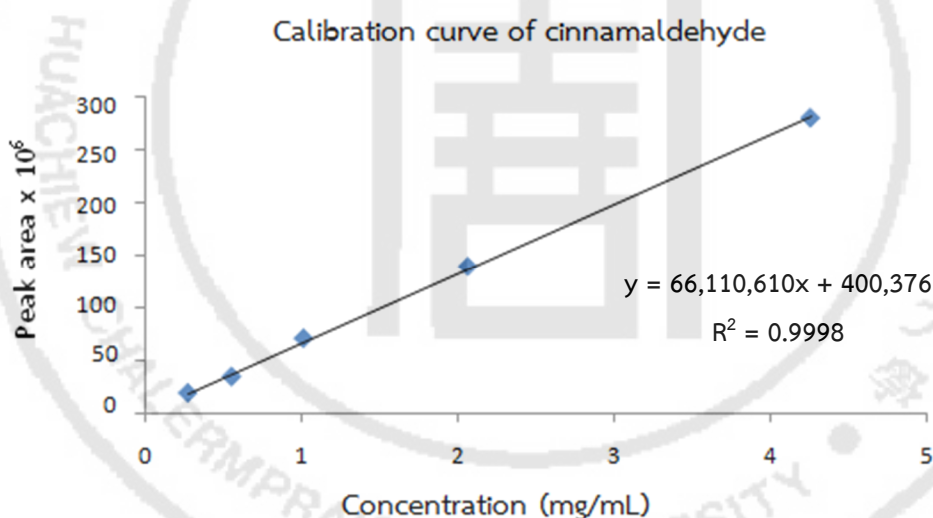
แผนภูมิที่ 1 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน eucalyptol



ตารางที่ 11 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่า correlation coefficient ของ cinnamaldehyde

Concentration (mg/mL)	Peak area			Average	R ²
	n1	n2	n3		
0.28	18435795	18195426	19295187	18642136	0.9998
0.56	33945278	34318794	34200565	34154879	
1.02	69974831	70125465	71510566	70536954	
2.07	140854624	142784204	134137701	139258843	
4.26	283105463	282473127	276986308	280854966	

แผนภูมิที่ 2 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน cinnamaldehyde



3) การทดสอบความเที่ยง (precision)

จากการทดสอบความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS โดยการนำ CM มาทำการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ 6 ครั้ง โดยวิเคราะห์ในวันเดียวกันและต่างวันกัน คำนวณความเที่ยงในรูปของ %RSD ซึ่งค่า %RSD ต้องมีค่าน้อยกว่า 2 จึงจะยอมรับความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้ผลดังตารางที่ 12 โดยผลการคำนวณค่า %RSD ได้ค่าไม่เกิน 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, (2002)

ตารางที่ 12 การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ eucalyptol และ cinnamaldehyde ในน้ำมันผสมโดยวิเคราะห์ในวันเดียวกันและวิเคราะห์ต่างวันกัน

Injection	eucalyptol		cinnamaldehyde	
	วิเคราะห์วันเดียวกัน	วิเคราะห์ต่างวันกัน	วิเคราะห์วันเดียวกัน	วิเคราะห์ต่างวันกัน
1	1758436	1789654	4125876	4125874
2	1784596	1748542	4112536	4136752
3	1765894	1765842	4193964	4168572
4	1784596	1763542	4187593	4092536
5	1774582	1725685	4135742	4196852
6	1788543	1758654	4146534	4230587
\bar{X}	1776107.833	1758653.167	4150374.167	4158528.833
SD	11980.61408	21098.66057	33304.80245	50314.07824
RSD (%)	0.6745	1.1997	0.8025	1.2099

4) การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การคืนกลับ โดยฉีดยามาตรฐาน eucalyptol และ cinnamaldehyde ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้วลงไปน้ำมันหอมระเหยตัวอย่าง แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าร้อยละการคืนกลับ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 13 ซึ่งจากการทดลองมีค่าร้อยละการคืนกลับตั้งแต่ 98.54 ± 1.38 - 104.52 ± 0.86 ซึ่งอยู่เกณฑ์ที่ยอมรับได้ของ AOAC, (2002)

ตารางที่ 13 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ eucalyptol และ cinnamaldehyde

ปริมาณเฉลี่ยของสารสำคัญในน้ำมันที่ได้จากการวิเคราะห์ (mg/mL)	สารมาตรฐาน	ระดับความเข้มข้น (%)	ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม (mg/mL)	ปริมาณเฉลี่ยที่พบ (mg/mL)	%Recovery
0.0512	eucalyptol	80	0.041	0.0868	104.52±0.86
		100	0.0511	0.0959	101.89±2.37
		120	0.0614	0.1057	101.57±2.63
0.0571	cinnamaldehyde	80	0.0455	0.1034	101.76±2.35
		100	0.0572	0.1161	103.15±1.94
		120	0.0683	0.1244	98.54±1.38

หมายเหตุ: ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2. หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีที่สุด

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยหาค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ โดยพบว่า CM (1:1 v/v) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 1.024 mg/mL โดยมีความเข้มข้นของ C: M (1:1 v/v) เท่ากับ 0.512 mg/mL พบว่ามีปริมาณของสารสำคัญ eucalyptol ในน้ำมันเสม็ดขาว และ cinnamaldehyde ในน้ำมันอบเชย ดังตารางที่ 14 จากผลการทดลอง พบว่า ปริมาณสารสำคัญของ eucalyptol และ cinnamaldehyde มีค่า 0.242 และ 0.298 mg/mL ในน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวและในน้ำมันหอมระเหยอบเชยที่ความเข้มข้น 0.512 mg/mL จากผลการคำนวณ จึงบรรจุน้ำมันหอมระเหยผสมปริมาณ 2 mg/mL ลงในไลโปโซม เพื่อให้มีความเข้มข้นเกินพอในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันเสม็ดขาวและน้ำมันอบเชย

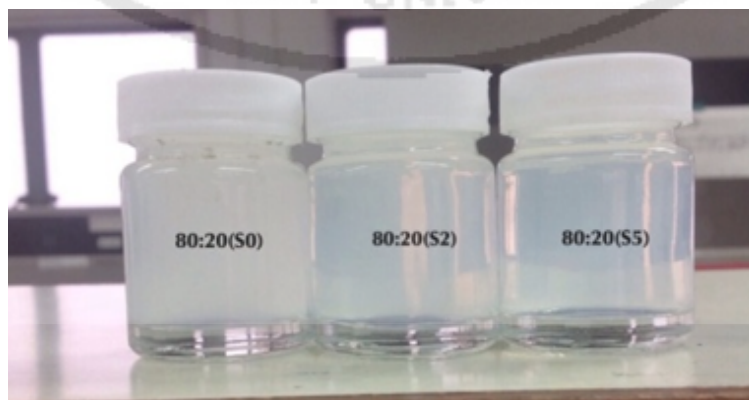
น้ำมันหอมระเหย	ปริมาณ (mg/mL)	สารสำคัญ	Peak Area ของสารสำคัญ	ปริมาณของสารสำคัญเฉลี่ย (mg/mL)	ปริมาณสารสำคัญ (%)
น้ำมันเสม็ดขาว	0.512	eucalyptol	8222959	0.242±0.002	47.27 %
			8124886		
น้ำมันอบเชย	0.512	cinnamaldehyde	8026813	0.298±0.002	58.20 %
			19574239		
			19875219		
			19675426		

4.6. การศึกษาความคงตัวของการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมในไลโปโซม

1. การศึกษาลักษณะของไลโปโซม

จากการเตรียมไลโปโซมด้วยวิธี thin-film hydration โดยใช้อัตราส่วนของ phospholipids:cholesterol และเวลาที่ใช้ในการ sonicate ที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 ตำรับ โดยบรรจุน้ำมันหอมระเหย CM ที่ความเข้มข้น 2.00 mg/mL ลงในตำรับ พบว่า ไลโปโซมทุกตำรับมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ สีขาวใส เหลว และไม่เกิดการตกตะกอน ดังภาพที่ 16

ภาพที่ 16 ตัวอย่างไลโปโซมตำรับ 80:20 ที่ผ่านการ sonicate ที่เวลา 0, 2 และ 5 นาที



2. การวัดขนาดอนุภาคและการกระจายตัวของไลโปโซม

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของไลโปโซมด้วยเครื่องมือ particle size analyzer โดยทำการวัดขนาดอนุภาคและการกระจายตัวของไลโปโซมทั้ง 12 ตำรับ ในวันที่ 0 พบว่าทุกตำรับคงตัวดี ขนาดอนุภาคและการกระจายตัวค่อนข้างคงที่ โดยพบว่าตำรับที่ไม่ผ่านการ sonicate มีขนาดอนุภาคที่ใหญ่อยู่ในช่วง 786-876.8 nm ซึ่งตำรับ F10 เป็นตำรับที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเท่ากับ 876.8 ± 2.26 nm ตำรับที่ผ่านการ sonicate 5 นาที มีขนาดอนุภาคเล็กอยู่ในช่วง 210.7-321.7 nm ซึ่งตำรับ F9 เป็นตำรับที่มีขนาดเล็กที่สุดเท่ากับ 210.7 ± 1.31 nm. แสดงว่าเมื่อใช้เวลาในการ sonicate เพิ่มขึ้นขนาดอนุภาคของไลโปโซมจะมีขนาดเล็กลง ค่าการกระจายตัวของอนุภาคทั้ง 12 ตำรับอยู่ในช่วง 0.191-0.487 แต่เมื่อใช้ระยะเวลาในการ sonicate เพิ่มขึ้น พบว่าค่า PDI มีค่าลดลง ดังตารางที่ 15



ตารางที่ 15 ขนาดอนุภาคและ ค่า Polydispersity index ของตำรับไลโปโซมในวันที่ 0

ตำรับที่	อัตราส่วนของ phospholipids: cholesterol	เวลาที่ใช้ Sonicate (min)	Diameter เฉลี่ย (nm) ±SD	Polydispersity index เฉลี่ย ±SD
F1	60 : 40	0	786.3±1.16	0.355±0.02
F2		2	367.9±1.97	0.241±0.02
F3		5	237.2±2.15	0.251±0.01
F4	70 : 30	0	816.7±2.35	0.460±0.01
F5		2	435.3±2.15	0.278±0.01
F6		5	321.7±1.47	0.191±0.01
F7	80 : 20	0	856.2±1.45	0.447±0.01
F8		2	456.9±2.25	0.287±0.01
F9		5	210.7±1.31	0.209±0.01
F10	90 : 10	0	876.8±2.26	0.487±0.01
F11		2	471.1±2.80	0.232±0.01
F12		5	221.2±2.08	0.201±0.01

หมายเหตุ : ทำการทดลองวัดขนาดอนุภาคซ้ำ 3 ครั้ง

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมในไลโปโซม

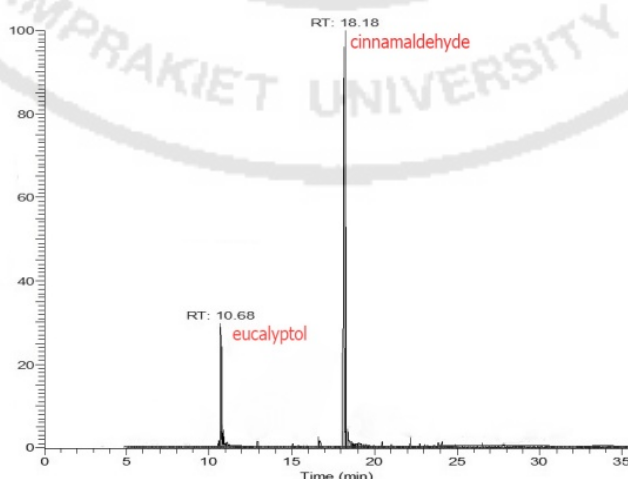
จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ใช้สภาวะดังนี้ คือ อุณหภูมิ injection เท่ากับ 250 °C อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้น จาก 50 °C (คงที่ไว้ 5 นาที) เพิ่มอุณหภูมิ 10 °C/นาที จนถึง 80 °C จากนั้นเพิ่ม 5 °C/นาที จนกระทั่งอุณหภูมิ 180 °C และเพิ่มขึ้นในอัตรา 30 °C/นาทีจนเป็น 240 °C (คงที่ไว้ 5 นาที) โดยทำการทดสอบดังนี้

1) การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยผสมที่บรรจุในตำรับไลโปโซมด้วยเครื่อง GC-MS

(1) การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

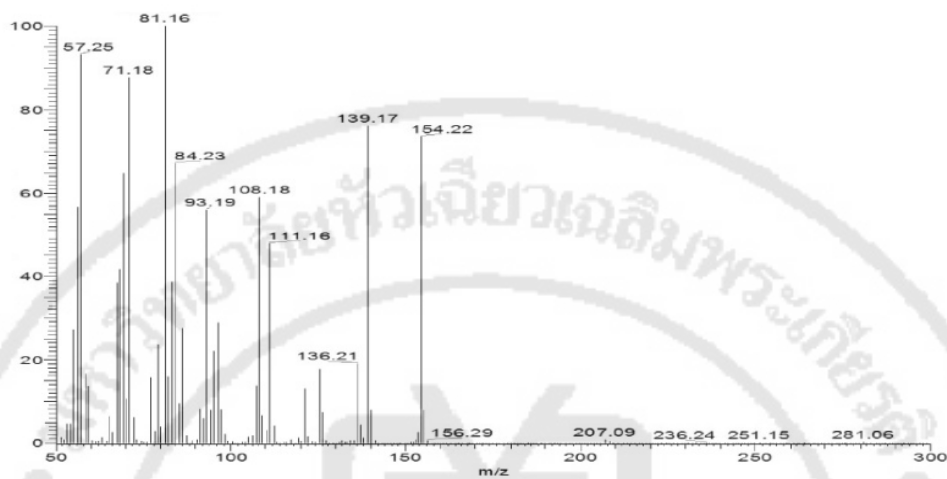
จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของน้ำมัน CM ได้โครมาโทแกรมดังภาพที่ 17 พบว่า พีคของสารสำคัญ eucalyptol และ cinnamaldehyde มีค่า RT เท่ากับ 10.68 และ 18.18 ตามลำดับ พีคของสารสำคัญแยกจากกันโดยเด็ดขาด และไม่มีการรบกวนของสารอื่น ๆ เมื่อฉีดสารมาตรฐาน eucalyptol และ cinnamaldehyde เพื่อเทียบกับสารตัวอย่าง พบว่า มีค่า RT เท่ากับ 10.69 และ 18.17 ตามลำดับ (ภาพที่ 18) ซึ่งค่า RT ของสารมาตรฐานมีค่าใกล้เคียงกับค่า RT ของสารตัวอย่าง นอกจากนี้ mass spectra ของสารสำคัญ eucalyptol (ภาพที่ 17 (b)) และ cinnamaldehyde (ภาพที่ 17 (c)) ทั้งสองในน้ำมันหอมระเหยสอดคล้องกับ mass spectra ของสารมาตรฐาน eucalyptol (ภาพที่ 19 (a)) และ cinnamaldehyde (ภาพที่ 19 (b))

ภาพที่ 17 GC โครมาโทแกรมของ eucalyptol และ cinnamaldehyde (a), mass spectram ของ eucalyptol (b) และ mass spectram ของ cinnamaldehyde (c)

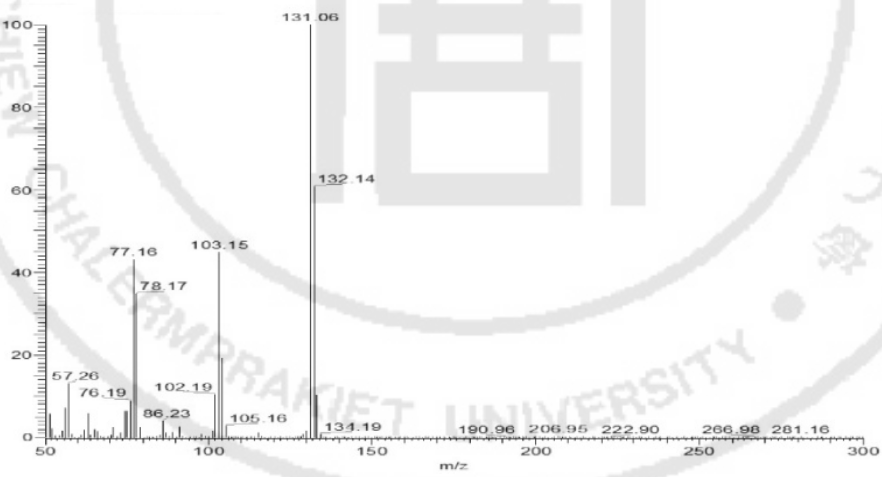


(a)

ภาพที่ 17 (ต่อ)

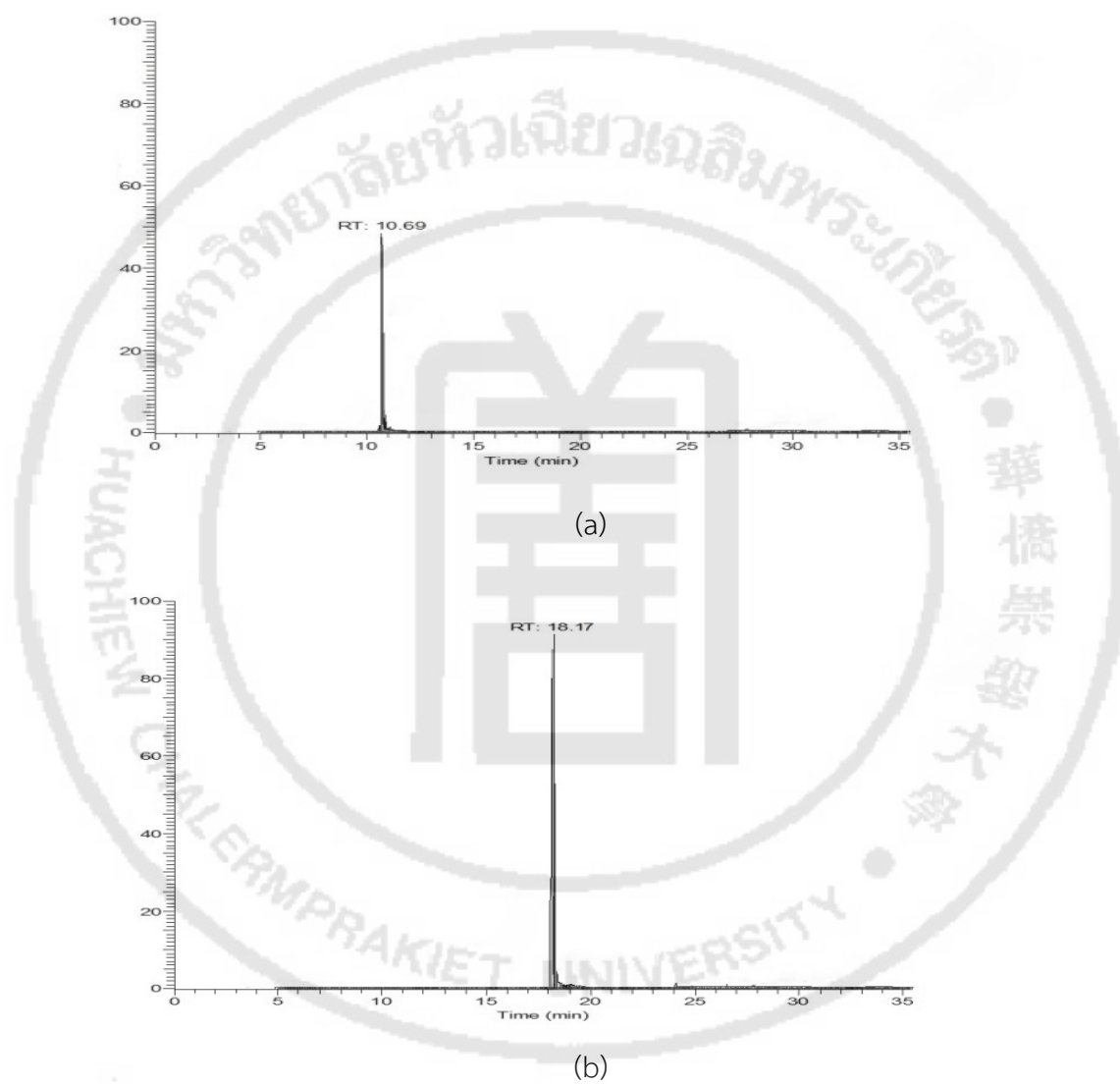


(b)

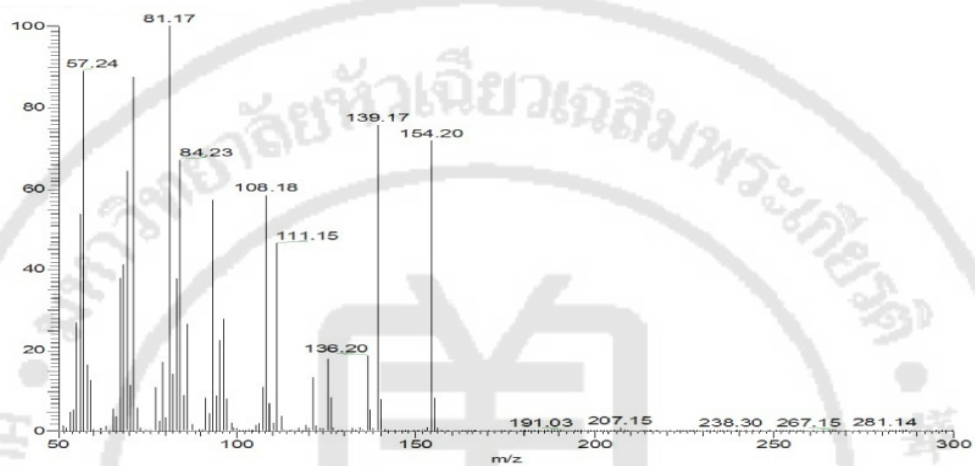


(c)

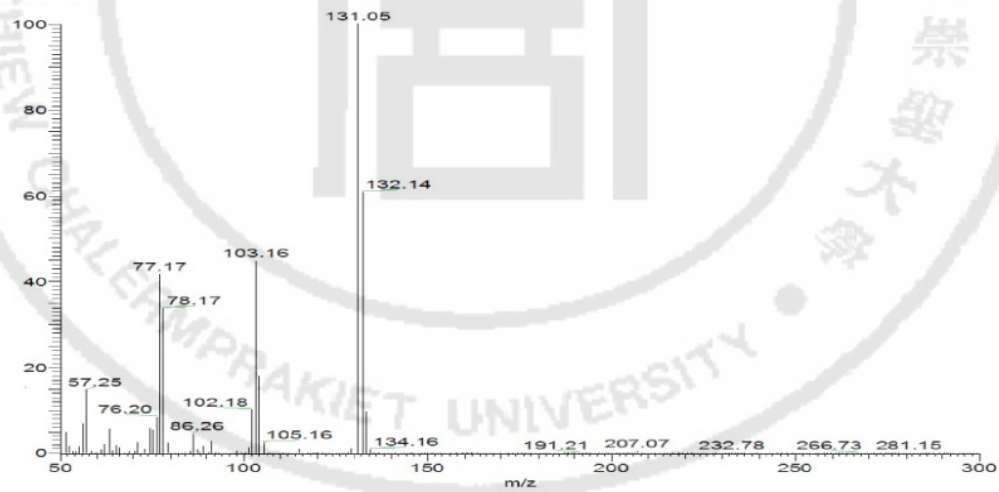
ภาพที่ 18 GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน eucalyptol (a) และ GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน cinnamaldehyde (b)



ภาพที่ 19 GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน eucalyptol (a), และ GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน cinnamaldehyde (b)



(a)



(b)

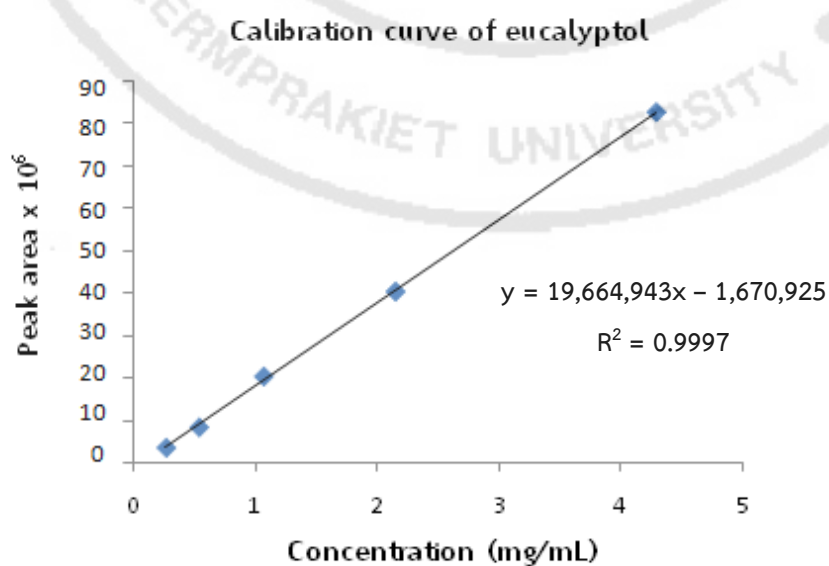
(2) การทดสอบความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity)

สร้างกราฟมาตรฐานของ eucalyptol และ cinnamaldehyde โดยฉีดสารมาตรฐาน eucalyptol ความเข้มข้น 0.27, 0.54, 1.07, 2.15 และ 4.29 mg/mL, สารมาตรฐาน cinnamaldehyde ความเข้มข้น 0.26, 0.52, 1.03, 2.06 และ 4.12 mg/mL สมการเส้นตรงหาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน และ peak area ที่วิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่า correlation coefficient เท่ากับ 0.9997 ของ eucalyptol และ 0.998 ของ cinnamaldehyde ดังตารางที่ 16-17 และแผนภูมิที่ 3 และ 4

ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่า correlation coefficient ของ eucalyptol

Concentration (mg/mL)	Peak area			Average	R ²
	n1	n2	n3		
0.27	3563772	3513916	3530846	3536178	0.9997
0.54	8309483	8319283	8455815	8361527	
1.07	20485741	20284711	20241124	20337192	
2.15	40283748	40584718	40255376	40374614	
4.29	83192834	82717282	82034460	82648192	

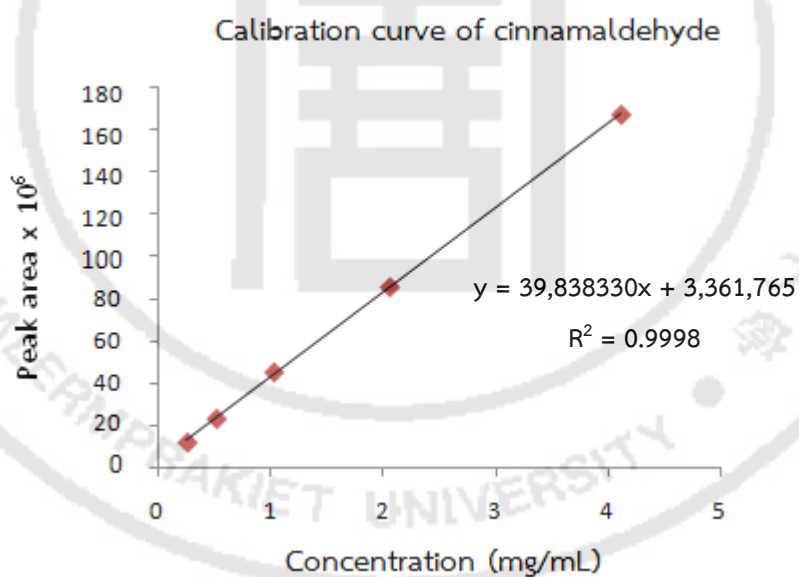
แผนภูมิที่ 3 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน eucalyptol



ตารางที่ 17 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและค่า correlation coefficient ของ cinnamaldehyde

Concentration (mg/mL)	Peak area			Average	R ²
	n1	n2	n3		
0.26	12536278	12628379	12777486	12647381	0.9998
0.52	24082715	23716278	23712511	23837168	
1.03	45384719	45838173	45985861	45736251	
2.06	85473615	86013263	86053867	85846915	
4.12	165374618	168273615	167499880	167049371	

แผนภูมิที่ 4 ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงของสารมาตรฐาน cinnamaldehyde



(3) การทดสอบความเที่ยง (Precision)

จากการทดสอบความเที่ยงของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS โดยการนำ CM ที่กักเก็บในตำรับไลโปโซม มาทำการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำ 6 ครั้ง โดยวิเคราะห์ในวันเดียวกันและต่างวันกัน คำนวณความเที่ยงในรูปของ %RSD ซึ่งค่า %RSD ต้องมีค่าน้อยกว่า 2 จึงจะยอมรับความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ได้ผลดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 การทดสอบความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ eucalyptol และ cinnamaldehyde ที่กักเก็บในตำรับไลโปโซมโดยวิเคราะห์ในวันเดียวกันและต่างวันกัน

Injection	eucalyptol		cinnamaldehyde	
	วิเคราะห์วันเดียวกัน	วิเคราะห์ต่างวันกัน	วิเคราะห์วันเดียวกัน	วิเคราะห์ต่างวันกัน
1	2736597	2786541	6947361	6825168
2	2753641	2836571	7162883	7083381
3	2770144	2754875	7028372	7193823
4	2753002	2741134	6967849	7082738
5	2762415	2816542	7058472	6933412
6	2783654	2806347	7172865	7022371
\bar{X}	2759908.833	2790335	7056300	7023482
SD	16157.37666	36806.26	95313.49	129273
RSD (%)	0.5854	1.3190	1.3508	1.840582

(4) การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

จากการทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ และวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การคืนกลับโดยฉีดสารมาตรฐาน eucalyptol และ cinnamaldehyde ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนแล้วลงไปในการละลายตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์หาค่าร้อยละการคืนกลับ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 19 ซึ่งจากผลการทดลองมีค่าร้อยละการคืนกลับตั้งแต่ $98.62 \pm 4.69 - 104.52 \pm 1.37$ ซึ่งอยู่เกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 19 การตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ eucalyptol และ cinnamaldehyde ที่อยู่ใน CM

ปริมาณเฉลี่ยของ น้ำมันที่ได้จากการ วิเคราะห์ (mg/mL)	สารมาตรฐาน	ระดับ ความ เข้มข้น (%)	ปริมาณสาร มาตรฐานที่ เติม (mg/mL)	ปริมาณ เฉลี่ยที่พบ (mg/mL)	%Recovery
0.0475	eucalyptol	80	0.0376	0.0868	104.52±1.37
		100	0.0475	0.0959	101.89±1.94
		120	0.0573	0.1057	101.57±3.82
0.0574	cinnamaldehyde	80	0.0468	0.1055	101.28±2.97
		100	0.0581	0.1147	98.62±4.69
		120	0.0694	0.1268	98.70±3.54

2) การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ eucalyptol และ cinnamaldehyde ของ น้ำมันหอมระเหย CM ในไลโปโซม

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ eucalyptol และ cinnamaldehyde ของ น้ำมันหอมระเหย CM ก่อนนำไปบรรจุลงในตำรับไลโปโซม ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาและตรวจสอบ ความถูกต้องแล้ว โดยฉีดน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่ความเข้มข้น 2 mg/mL (อัตราส่วนน้ำมันหอม ระเหยชนิดผสม 1:1 v/v) จะได้ปริมาณความเข้มข้นของ eucalyptol และ cinnamaldehyde เท่ากับ 0.465 ± 0.001 และ 0.579 ± 0.001 mg/mL ตามลำดับ ดังตารางที่ 20

หลังจากบรรจุน้ำมันหอม CM ในตำรับไลโปโซมและทำการวิเคราะห์หาปริมาณ สารสำคัญของ CM ทั้ง 12 ตำรับ ดังตารางที่ 21 พบว่า ตำรับไลโปโซมทั้ง 12 ตำรับมีปริมาณกักเก็บ น้ำมันหอมระเหย CM ในช่วง 60.43-87.90% และพบว่า ตำรับ F8 ที่ใช้อัตราส่วน phospholipid: cholesterol เท่ากับ 80:20 และใช้เวลาในการ sonicate 2 นาที มีปริมาณการกักเก็บน้ำมันหอม ระเหย CM สูงสุด เท่ากับ 87.90% และตำรับ F3 ที่ใช้อัตราส่วน phospholipid: cholesterol เท่ากับ 60:40 และใช้เวลาในการ sonicate 5 นาที มีปริมาณการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย CM ต่ำสุด เท่ากับ 60.43% จึงเลือกตำรับ F8 ซึ่งมีปริมาณการกักเก็บมากที่สุดและมีขนาดอนุภาคเท่ากับ 456.9 nm และการกระจายตัวเท่ากับ 0.287 ซึ่งตำรับ F8 มีขนาดอนุภาคไม่เกิน 500 nm และการกระจายตัวของไลโปโซมไม่เกิน 1 จัดเป็นตำรับที่มีความคงตัวจึงเลือกตำรับ F8 มาทำการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 20 ปริมาณสารสำคัญ eucalyptol และ cinnamaldehyde ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่นำไปบรรจุในตำรับไลโปโซม

น้ำมัน หอมระเหย	ปริมาณ (mg/mL)	สารสำคัญ	Peak Area ของ สารสำคัญ	ปริมาณ สารสำคัญ เฉลี่ย (mg/mL)	ปริมาณ สารสำคัญ (%)
น้ำมันเสม็ดขาว	1.00	eucalyptol	7500124	0.465±0.001	46.5 %
			7449464		
			7491531		
น้ำมันอบเชย	1.00	cinnamaldehyde	26471032	0.579±0.001	57.9 %
			26413569		
			26441196		

ตารางที่ 21 peak area และเปอร์เซ็นต์การกักเก็บน้ำมันหอมระเหย CM ในไลโปโซมทั้ง 12 ตำรับ

ตำรับที่	peak area ของ eucalyptol	peak area ของ cinnamaldehyde	ปริมาณ eucalyptol (mg/mL)	ปริมาณ cinnamaldehyde (mg/mL)	%entrapment
F1	4378755	18395301	0.3076	0.3774	66.22±0.54
	4392082	18703766	0.3083	0.3851	
	4376847	18827352	0.3075	0.3882	
F2	4717024	19164204	0.3248	0.3967	69.32±0.44
	4802561	19283375	0.3292	0.3997	
	4584003	19397048	0.3181	0.4025	
F3	3915720	16965209	0.2841	0.3415	60.43±0.61
	3884729	17173402	0.2825	0.3467	
	3909352	17472264	0.2838	0.3542	
F4	4729461	19572419	0.3255	0.4069	70.49±0.38
	4750736	19642916	0.3266	0.4087	
	4750680	19837042	0.3266	0.4136	

ตารางที่ 21 (ต่อ)

ตำรับที่	peak area ของ eucalyptol	peak area ของ cinnamaldehyde	ปริมาณ eucalyptol (mg/mL)	ปริมาณ cinnamaldehyde (mg/mL)	%entrapment
F5	5238627	21064175	0.3514	0.4444	75.71±0.45
	5275419	20681539	0.3532	0.4348	
	5271966	20666159	0.3531	0.4344	
F6	4357813	18925104	0.3066	0.3907	66.63±0.23
	4368321	18729326	0.3071	0.3857	
	4374552	18866372	0.3074	0.3892	
F7	6057257	22032056	0.3930	0.4687	82.78±0.40
	6015229	22410251	0.3909	0.4781	
	5992117	22176944	0.3897	0.4723	
F8	6479724	23493615	0.4145	0.5053	87.90±0.47
	6394182	23719201	0.4101	0.5110	
	6389191	23367632	0.4099	0.5022	

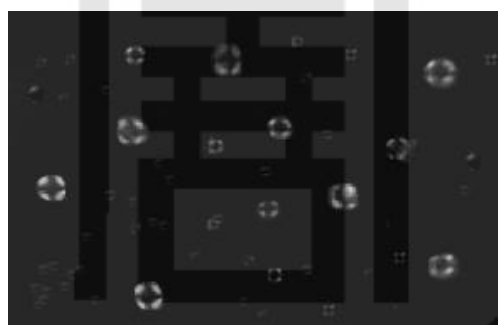
ตารางที่ 21 (ต่อ)

ตำรับที่	peak area ของ eucalyptol	peak area ของ cinnamaldehyde	ปริมาณ eucalyptol (mg/mL)	ปริมาณ cinnamaldehyde (mg/mL)	%entrapment
F9	5481528	21692182	0.3637	0.4601	78.62±0.38
	5508162	21572917	0.3651	0.4571	
	5529021	21295553	0.3661	0.4502	
F10	5528216	21582163	0.3661	0.4574	79.00±0.26
	5562891	21682110	0.3679	0.4599	
	5536017	21545612	0.3665	0.4564	
F11	5851526	22247291	0.3825	0.4741	81.80±0.24
	5825172	22181375	0.3812	0.4724	
	5847457	22060342	0.3823	0.4694	
F12	5127391	20462263	0.3457	0.4292	74.83±0.52
	5157213	20778264	0.3472	0.4372	
	5137622	20815710	0.3462	0.4381	

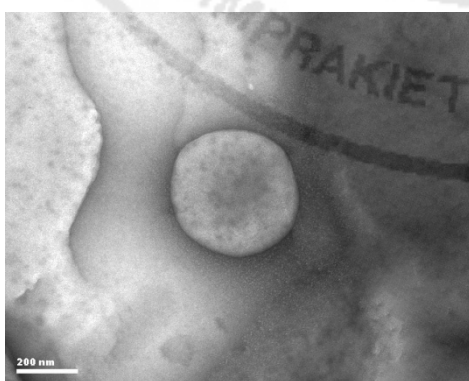
4.7 การศึกษาสัณฐานวิทยาของตำรับไลโปโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ดีที่สุดด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรซ์ (polarized light microscopy) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

นำตำรับไลโปโซม F8 ที่เตรียมได้ไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโพลาไรซ์ได้ลักษณะดังภาพที่ 20 (a) พบว่า อนุภาคขนาดเล็ก มีการกระเจิงแสง (scattering, ดังภาพที่ 20 (a)) และจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบลักษณะไลโปโซม เป็นถุงค่อนข้างกลม (ดังภาพที่ 20 (b) และ(c))

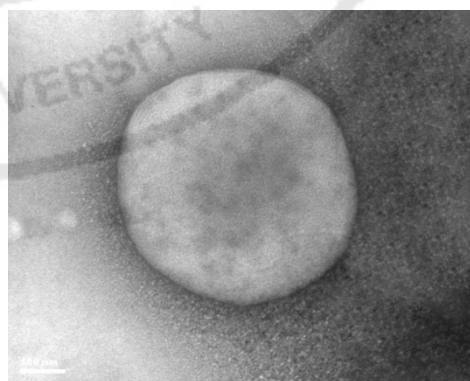
ภาพที่ 20 ลักษณะของไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหย CM ในตำรับ F8 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโพลาไรซ์ (a) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านที่กำลังขยาย 71000X (b) และกำลังขยาย 135000X (c)



(a)



(b)



(c)

4.8 การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของตำรับไลโปโซม F8 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

1. การทดสอบความคงตัวของตำรับไลโปโซม ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เมื่อนำตำรับ F8 ที่เตรียมได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สังเกตลักษณะทางกายภาพ ทำการวัดค่าความเป็นกรดต่าง ความหนืด ขนาดอนุภาค และเปอร์เซ็นต์การ กักเก็บได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 22-23 และ ภาพที่ 21 โดยลักษณะภายนอกของทุกตำรับมีความคงตัวดี โดยสังเกตได้จากการไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง ค่าความเป็นกรดต่างมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย อยู่ในช่วง 5.52-5.81 ค่าความหนืดมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอยู่ในช่วง 0.9-1.2 cp ขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อยู่ในช่วง 456.8-518.3 nm ค่าการกระจายตัวของอนุภาคมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยอยู่ในช่วง 0.286-0.309 และค่าเปอร์เซ็นต์การกักเก็บสารสำคัญลดลงเล็กน้อยอยู่ในช่วง 79.62-88.40% เมื่อเวลาผ่านไป 3 สัปดาห์ พบว่า ขนาดอนุภาค และเปอร์เซ็นต์การกักเก็บมีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ CM ในสัปดาห์ที่ 0 ถึงสัปดาห์ที่ 8 อยู่ในช่วง 1.769-1.597 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. acnes*

ตารางที่ 22 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับไลโปโซม F8 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	ลักษณะภายนอก	ความเป็นกรด	ความหนืด (cp)	ขนาดอนุภาค	การกระจายอนุภาค
		ต่าง±SD	±SD	(nm)±SD	±SD
0	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.78±0.04	0.9±0.2	456.8±4.5	0.286±0.003
1	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.65±0.10	1.1±0.4	459.2±3.8	0.287±0.002
2	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.70±0.14	1.0±0.2	461.7±3.1	0.289±0.002
3	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.63±0.15	1.0±0.1	478.3±1.8*	0.293±0.005
4	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.62±0.07	1.1±0.3	482.6±1.9*	0.295±0.004*
5	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.52±0.07	1.1±0.1	496.1±3.8*	0.301±0.003*
6	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.62±0.12	0.9±0.1	498.4±3.4*	0.303±0.002*
7	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.61±0.04	1.0±0.2	503.2±1.9*	0.304±0.001*
8	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.81±0.08	1.2±0.1	518.5±2.9*	0.309±0.002*

หมายเหตุ : ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, * หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 23 ประเมินความคงตัวของตำรับไลโปโซม F8 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	Peak area ของสารสำคัญ		ปริมาณสารสำคัญ		ความเข้มข้น CM (mg/mL)	% entrapment
	eucalyptol	cinnamaldehyde	eucalyptol	cinnamaldehyde		
0	6441587	23601578	0.4125	0.5080	1.769	88.40±0.22
	6484175	23701576	0.4147	0.5106		
	6440524	23693458	0.4125	0.5104		
1	6401375	23614652	0.4105	0.5084	1.766	88.30±0.38
	6402743	23910734	0.4106	0.5158		
	6390064	23696075	0.4099	0.5104		
2	6426304	23604163	0.4118	0.5081	1.762	88.11±0.31
	6441251	23701452	0.4125	0.5106		
	6306214	23716120	0.4057	0.5109		
3	6317062	22913521	0.4062	0.4908	1.718	85.75±0.16*
	6302965	22814310	0.4055	0.4883		
	6317621	22826985	0.4062	0.4886		
4	6270165	22847156	0.4038	0.4891	1.709	85.28±0.29*
	6329630	22647424	0.4068	0.4841		
	6289521	22569820	0.4048	0.4822		

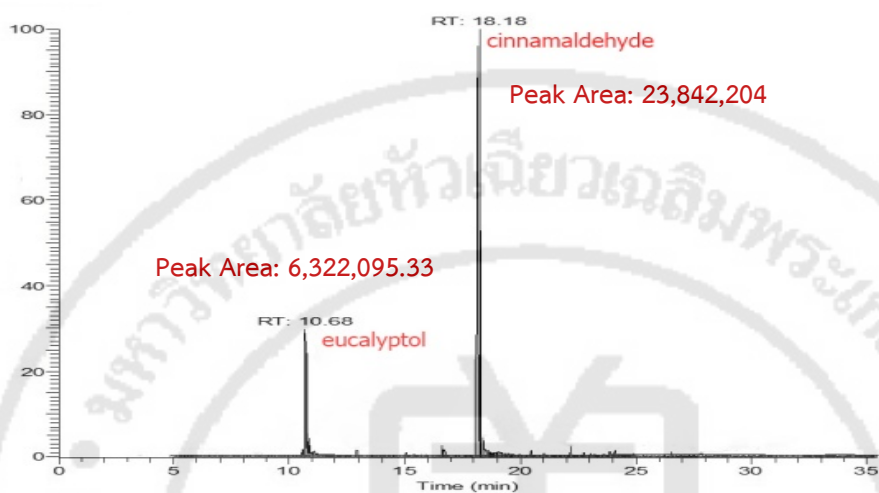
หมายเหตุ : * หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 23 (ต่อ)

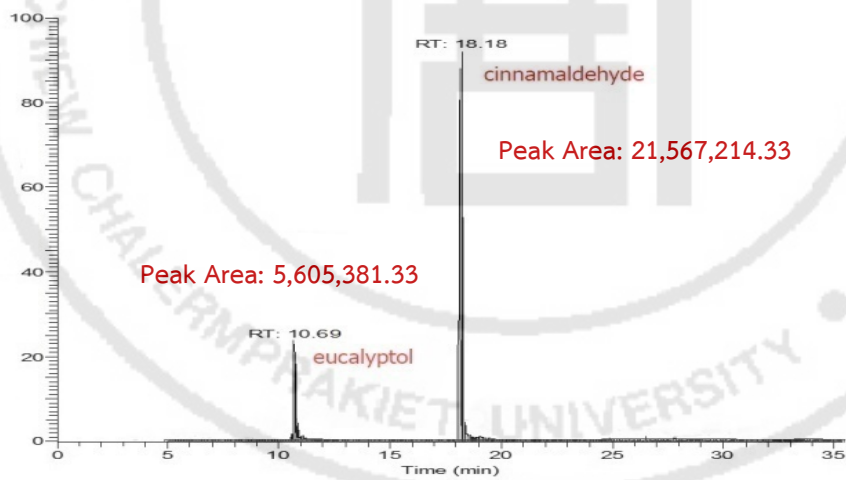
สัปดาห์ที่	Peak area ของสารสำคัญ		ปริมาณสารสำคัญ		ความเข้มข้น CM (mg/mL)	% entrapment
	eucalyptol	cinnamaldehyde	eucalyptol	cinnamaldehyde		
5	6060892	21927463	0.3932	0.4660	1.659	82.74±0.44*
	6123287	22167424	0.3964	0.4720		
	6089336	22047385	0.3946	0.4690		
6	6087098	21947036	0.3945	0.4665	1.655	82.55±0.24*
	6107365	21859324	0.3955	0.4643		
	6051963	22163045	0.3927	0.4719		
7	6087216	21986071	0.3945	0.4675	1.649	82.17±0.35*
	6029384	21824963	0.3916	0.4635		
	6127314	21687352	0.3966	0.4600		
8	5817931	21326001	0.3808	0.4509	1.597	79.62±0.25*
	5791093	21247308	0.3795	0.4490		
	5802120	21428334	0.3800	0.4535		

หมายเหตุ : * หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ภาพที่ 21 GC โครมาโทแกรมของตำรับไลโปโซม F8 ที่บรรจุน้ำมันหอมระเหย CM ในสัปดาห์ที่ 0 (a) และ สัปดาห์ที่ 8 (b)



(a)



(b)

2. การทดสอบความคงตัวของตำรับไลโปโซม ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เมื่อนำตำรับ F8 ที่เตรียมได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สังเกตลักษณะทางกายภาพ ทำการวัดค่าความเป็นกรดต่าง ความหนืด ขนาดอนุภาค และเปอร์เซ็นต์การกักเก็บ ได้ผลการทดลอง ดังตารางที่ 24 - 25 โดยลักษณะภายนอกของทุกตำรับมีความคงตัวดี โดยสังเกตได้จากการไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง ค่าความเป็นกรดต่างมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอยู่ในช่วง 5.51-5.76 ค่าความหนืดมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอยู่ในช่วง 0.9-1.2 cp ขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อยู่ในช่วง 456.8-532.1 nm ค่าการกระจายตัวของอนุภาคมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยอยู่ในช่วง 0.286-0.327 และค่าเปอร์เซ็นต์การกักเก็บสารสำคัญลดลงเล็กน้อยอยู่ในช่วง 75.57-88.40% เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ พบว่า ขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค และเปอร์เซ็นต์การกักเก็บ เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงจากสัปดาห์ที่ 0 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ความเข้มข้นของ CM ในสัปดาห์ที่ 0 ถึงสัปดาห์ที่ 8 อยู่ในช่วง 1.769-1.508 mg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* และ *P. acnes*

ตารางที่ 24 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับไลโปโซม F8 ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	ลักษณะภายนอก	ความเป็นกรด	ความหนืด (cp)	ขนาดอนุภาค	การกระจายอนุภาค
		ต่าง±SD	±SD	(nm)±SD	±SD
0	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.78±0.04	0.9±0.2	456.8±4.5	0.286±0.003
1	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.53±0.04	1.0±0.1	461.2±4.3*	0.291±0.003*
2	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.59±0.17	1.0±0.2	465.7±3.6*	0.294±0.002*
3	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.73±0.08	1.1±0.2	481.3±1.6*	0.299±0.002*
4	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.51±0.05	1.0±0.3	488.8±1.4*	0.302±0.004*
5	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.57±0.05	0.9±0.1	499.4±2.4*	0.309±0.003*
6	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.71±0.08	1.2±0.1	506.3±3.4*	0.313±0.004*
7	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.69±0.21	1.0±0.1	525.7±1.9*	0.320±0.005*
8	ไม่แยกชั้น มีสีขาว ไม่เปลี่ยนแปลง	5.76±0.07	1.2±0.1	532.1±2.9*	0.327±0.004*

หมายเหตุ : ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, * หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 25 ประเมินความคงตัวของตำรับไลโปโซม F8 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สัปดาห์ที่	Peak area ของสารสำคัญ		ปริมาณสารสำคัญ		ความเข้มข้น CM (mg/mL)	% entrapment
	eucalyptol	cinnamaldehyde	eucalyptol	cinnamaldehyde		
0	6441587	23601578	0.4125	0.5080	1.769	88.40±0.22
	6484175	23701576	0.4147	0.5106		
	6440524	23693458	0.4125	0.5104		
1	6448320	23641021	0.4129	0.5090	1.765	88.21±0.17*
	6457421	23620452	0.4133	0.5085		
	6438533	23540469	0.4124	0.5065		
2	6313541	23564571	0.4060	0.5071	1.753	87.64±0.29*
	6409587	23581524	0.4109	0.5075		
	6322748	23554512	0.4065	0.5069		
3	6140255	23206254	0.3972	0.4981	1.715	85.75±0.12*
	6145221	23241541	0.3975	0.4990		
	6190745	23046521	0.3998	0.4941		
4	5926354	22884756	0.3863	0.4901	1.678	83.96±0.15*
	6002415	22803675	0.3902	0.4880		
	5920544	22847596	0.3860	0.4891		

หมายเหตุ : * หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 25 (ต่อ)

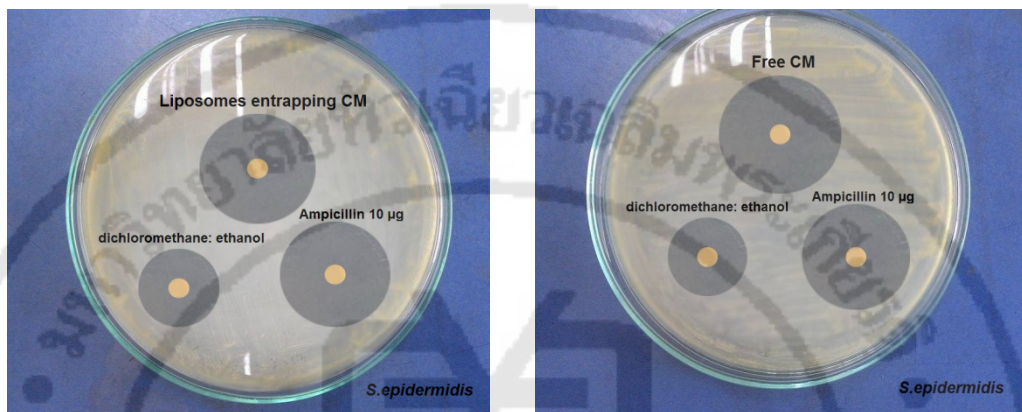
สัปดาห์ที่	Peak area ของสารสำคัญ		ปริมาณสารสำคัญ		ความเข้มข้น CM (mg/mL)	% entrapment
	eucalyptol	cinnamaldehyde	eucalyptol	cinnamaldehyde		
5	5881251	22561478	0.3840	0.4819	1.650	82.55±0.50*
	5851652	22521574	0.3825	0.4809		
	5782541	22364895	0.3790	0.4770		
6	5645132	22021485	0.3720	0.4684	1.615	80.85±0.36*
	5642415	22165742	0.3719	0.4720		
	5621462	22364785	0.3708	0.4770		
7	5481469	21846987	0.3637	0.4640	1.577	78.96±0.28*
	5448751	21724587	0.3620	0.4609		
	5436687	21726854	0.3614	0.4610		
8	5074718	21205874	0.3430	0.4479	1.508	75.57±0.21*
	5028547	21126858	0.3407	0.4459		
	5082271	21128453	0.3434	0.4460		

หมายเหตุ : * หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.9 การประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ถูกกักเก็บและไม่มีถูกกักเก็บในไลโปโซม

จากการศึกษาความคงตัวของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่บรรจุอยู่ในตำรับไลโปโซม โดยเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ถูกกักเก็บในตำรับไลโปโซม ทำการวิเคราะห์ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี disc diffusion ทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ดังตารางที่ 25 และ 26) จากผลการทดลองพบว่า ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ถูกกักเก็บในตำรับไลโปโซมสัปดาห์ที่ 0-5 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่เมื่อผ่านไป 6 สัปดาห์พบว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากขนาด inhibition zone 14.00 ± 0.00 mm เป็น 12.33 ± 0.58 mm และในสัปดาห์ที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ถูกกักเก็บในตำรับไลโปโซมมีขนาด inhibition zone เท่ากับ 10.33 ± 0.58 mm ซึ่งคิดเป็นร้อยละของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) เท่ากับ 100-71.43% ส่วนน้ำมันหอมระเหย CM ที่ไม่ถูกกักเก็บในตำรับไลโปโซมพบว่า เมื่อผ่านไป 2 สัปดาห์ ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากขนาด inhibition zone 16.00 ± 1.00 mm เป็น 14.67 ± 0.58 mm และในสัปดาห์ที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ไม่ถูกกักเก็บในตำรับไลโปโซมมีขนาด inhibition zone เท่ากับ 4.33 ± 0.58 mm ซึ่งคิดเป็นร้อยละของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) เท่ากับ 100-25.00% ส่วนผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) พบว่า น้ำมันหอมระเหย CM ที่กักเก็บในตำรับไลโปโซมในสัปดาห์ที่ 0-4 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่เมื่อผ่านไป 5 สัปดาห์พบว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากขนาด inhibition zone 16.33 ± 0.58 mm เป็น 14.33 ± 0.58 mm และในสัปดาห์ที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ถูกกักเก็บในตำรับไลโปโซมมีขนาด inhibition zone เท่ากับ 12.33 ± 0.58 mm ซึ่งคิดเป็นร้อยละของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) เท่ากับ 100-75.00% ส่วนน้ำมันหอมระเหย CM ที่ไม่ถูกกักเก็บในตำรับไลโปโซมพบว่า เมื่อผ่านไป 2 สัปดาห์ ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากขนาด inhibition zone 19.33 ± 0.58 mm เป็น 17.67 ± 0.58 mm และในสัปดาห์ที่ 8 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ไม่ถูกกักเก็บในตำรับไลโปโซมมีขนาด inhibition zone เท่ากับ 5.00 ± 1.00 mm ซึ่งคิดเป็นร้อยละของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) เท่ากับ 100-26.32% ดังตารางที่ 26-27

ภาพที่ 22 ตัวอย่างขนาดของ inhibition zone ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *S.epidermidis* สัปดาห์ที่ 0 ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ผ่านกระบวนการห่อหุ้ม (a) และ CM ที่ไม่ผ่านกระบวนการห่อหุ้ม (b)



(a)

(b)

ตารางที่ 26 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S.epidermidis* (ATCC 14990) ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มด้วยไลโปโซมเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สัปดาห์ ที่	ขนาด inhibition zone ของน้ำมัน หอมระเหยที่ผ่าน กระบวนการห่อหุ้ม ด้วยไลโปโซม (mm)	ร้อยละของ ประสิทธิภาพ การยับยั้งเชื้อ	ขนาด inhibition zone ของน้ำมัน หอมระเหยที่ไม่ผ่าน กระบวนการห่อหุ้ม ด้วยไลโปโซม (mm)	ร้อยละของ ประสิทธิภาพการ ยับยั้งเชื้อ
0	14.00±0.00	100%	16.00±1.00	100%
1	14.33±0.58	100%	15.33±1.00	93.75%
2	14.67±0.58	100%	14.67±0.58*	87.50%
3	14.00±0.00	100%	12.33±0.58*	75.00%
4	13.33±0.58	92.86%	10.33±0.58*	62.50%
5	13.67±0.58	92.86%	8.67±0.58*	50.00%
6	12.33±0.58*	85.71%	7.33±0.58*	43.75%
7	12.00±0.00*	85.71%	6.67±1.00*	37.50%
8	10.33±0.58*	71.43%	4.33±0.58*	25.00%

หมายเหตุ : วัดรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (6 mm), ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, ผลขนาด inhibition zone หักลบกับ negative control แล้ว * หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กำหนดให้สัปดาห์ที่ 0 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เท่ากับ 100%

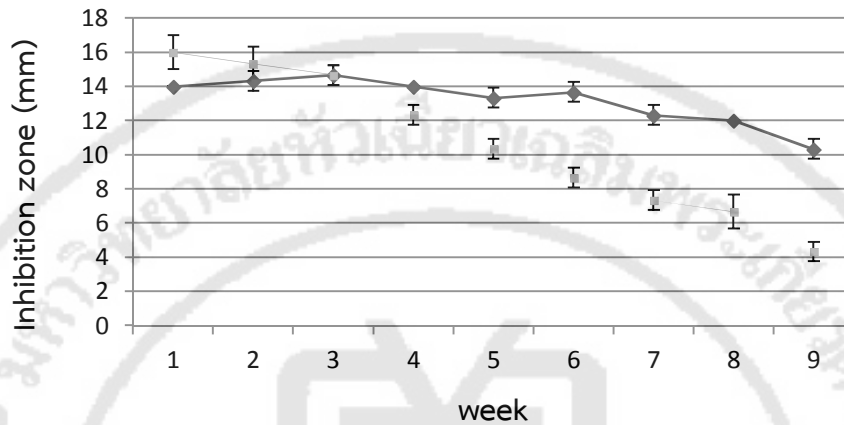
ตารางที่ 27 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *P.acnes* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย CM ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มด้วยไลโปโซมเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

สัปดาห์ ที่	ขนาด inhibition zone ของน้ำมัน หอมระเหยที่ผ่าน กระบวนการห่อหุ้ม ด้วยไลโปโซม (mm)	ร้อยละของ ประสิทธิภาพการ ยับยั้งเชื้อ	ขนาด inhibition zone ของน้ำมัน หอมระเหยที่ไม่ผ่าน กระบวนการห่อหุ้ม ด้วยไลโปโซม (mm)	ร้อยละของ ประสิทธิภาพการ ยับยั้งเชื้อ
0	16.33±0.58	100%	19.33±0.58	100%
1	16.00±0.00	100%	17.67±0.58*	89.47%
2	16.67±0.58	100%	16.00±1.00*	84.21%
3	15.33±0.58	93.75%	14.67±0.58*	75.00%
4	15.67±0.58	93.75%	12.33±0.58*	73.68%
5	14.33±0.58*	87.50%	11.33±0.58*	57.89%
6	14.00±0.00*	87.50%	9.00±1.00*	47.37%
7	14.67±0.58*	87.50%	8.00±0.58*	42.11%
8	12.33±0.58*	75.00%	5.00±1.00*	26.32%

หมายเหตุ : วัดรวมเส้นผ่านศูนย์กลางของ disc (6 mm), ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง, ผลขนาด inhibition zone หักลบกับ negative control แล้ว * หมายถึง ข้อมูลมีความแตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กำหนดให้สัปดาห์ที่ 0 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เท่ากับ 100%

แผนภูมิที่ 5 เปรียบเทียบขนาด inhibition zone ของ CM ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการทอหุ้มด้วยไลโปโซมต่อเชื้อ *S.epidermidis* (ATCC 14990) เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

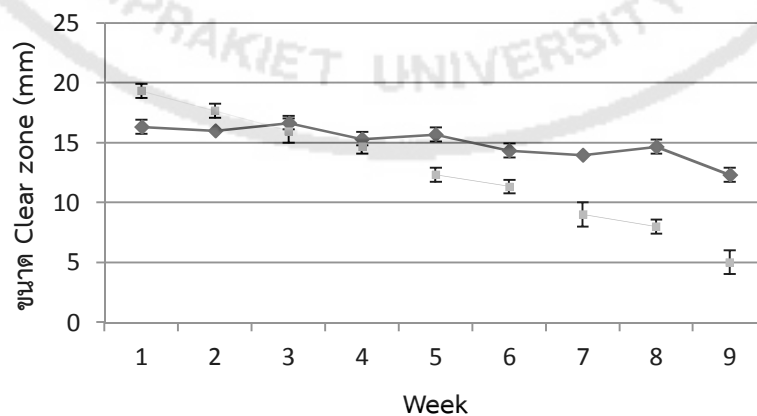
Inhibition zone ของเชื้อ *S.epidermidis* 8 สัปดาห์



หมายเหตุ ◆ คือ น้ำมันหอมระเหย CM ที่ผ่านกระบวนการทอหุ้มด้วยไลโปโซม ■ คือ น้ำมันหอมระเหย CM ที่ไม่ผ่านกระบวนการทอหุ้มด้วยไลโปโซม

แผนภูมิที่ 6 เปรียบเทียบขนาด inhibition zone ของ CM ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการทอหุ้มด้วยไลโปโซมต่อเชื้อ *P.acnes* (DMST 14916) เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Inhibition zone ของเชื้อ *P.acnes*
8 สัปดาห์



หมายเหตุ ◆ คือ น้ำมันหอมระเหย CM ที่ผ่านกระบวนการทอหุ้มด้วยไลโปโซม ■ คือ น้ำมันหอมระเหย CM ที่ไม่ผ่านกระบวนการทอหุ้มด้วยไลโปโซม

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

เลือกตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน 3 ชนิด คือ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (C) น้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว (M) และน้ำมันหอมระเหยจากไพล (Z) และชนิดผสม คือน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมเสม็ดขาว (CM) น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมไพล (CZ) และน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวผสมไพล (MZ)

ตรวจสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว ได้แก่ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ด้วยวิธี disc diffusion พบว่า CM มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีที่สุด และมีค่า MIC, MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) เท่ากับ 1.024 และ 0.512 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม CM ด้วยวิธี GC-MS ใช้สภาวะที่พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องแล้วพบว่า มีปริมาณ eucalyptol 0.242 mg/mL และ cinnamaldehyde 0.298 mg/mL

เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยสลายตัวได้ง่ายจึงเตรียมน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบไลโปโซม โดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ phospholipid ต่อ cholesterol (60:40, 70:30, 80:20 และ 90:10) และระยะเวลา sonication (0, 2 และ 5 นาที) แตกต่างกันรวม 12 คำรับ พบว่าทุกคำรับมีขนาดและการกระจายอนุภาคใกล้เคียงกัน จากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS โดยใช้สภาวะที่พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องแล้วพบว่า สูตรคำรับ F8 มีปริมาณสารสำคัญ eucalyptol และ cinnamaldehyde ในน้ำมันผสม CM มากที่สุด จึงเลือกคำรับ F8 มาศึกษาความคงตัวต่อไป

จากนั้นศึกษาความคงตัวของคำรับ F8 ที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C ทุก ๆ สัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า คำรับไลโปโซมที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C ลักษณะทางกายภาพไม่มีการเปลี่ยนแปลง คือ มีสีขาวขุ่น เป็นเนื้อเดียวกัน ค่าความเป็นกรดต่าง ความหนืด ขนาดอนุภาคและการกระจายตัวของอนุภาคมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย พบว่า คำรับที่เก็บอุณหภูมิ 4°C มีการกักเก็บลดลง 8.78% ซึ่งลดลงน้อยกว่าคำรับไลโปโซมที่อุณหภูมิ 25°C มีการกักเก็บลดลง 12.83% ดังนั้นอุณหภูมิ 4°C จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษา คำรับไลโปโซม จึงเลือกคำรับ F8 เก็บที่อุณหภูมิ 4°C มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวต่อไป

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว ได้แก่ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ของคำรับ F8 เปรียบเทียบกับ CM ที่ไม่ผ่านการกักเก็บที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 4°C วิเคราะห์ผลทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ด้วยวิธี disc diffusion พบว่า CM ที่ผ่านการกักเก็บในไลโปโซมสามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ในถุงไลโปโซมจึงทำให้มี

ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้ยาวนานกว่า CM ที่ไม่ผ่านการกักเก็บในไลโปโซม จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวให้มีฤทธิ์ที่ดีและออกฤทธิ์ได้นานขึ้น ซึ่งมีประโยชน์สำหรับนำไปพัฒนาในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางสำหรับต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวต่อไป

5.2 อภิปรายผล

1. การตรวจสอบยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข 2 ชนิด คือ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* (ATCC 14990) มีลักษณะโคโลนีกลม ขนาดเล็ก เป็นสีขาวขุ่น ขอบเรียบ นูนเล็กน้อย บนจานเพาะเชื้อ เมื่อนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X พบว่า เชื้อจุลินทรีย์มีการติดสีม่วงของ crystal violet จึงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นพวงงุ่น⁽¹²⁾ ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ *P. acnes* (DMST 14916) มีลักษณะโคโลนีกลม ขนาดเล็ก เป็นสีขาว ขอบเรียบ นูนเล็กน้อย บนจานเพาะเชื้อ เมื่อนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X พบว่า เชื้อจุลินทรีย์มีการติดสีม่วงของ crystal violet จึงจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น⁽¹⁶⁾ จากการศึกษาลักษณะโคโลนีและสัณฐานของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ก่อนนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไปนั้น พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น จึงสามารถนำไปใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไปได้

2. การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสมในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) โดยวิธี Disc diffusion

จากการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวของน้ำมันหอมระเหยที่เป็นพืชสมุนไพรที่หาได้ง่าย โดยทำการศึกษาน้ำมันหอมระเหยทั้งชนิดเดี่ยวและชนิดผสม ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (*C. burmannii*, C), น้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว (*M. leucadendron*, M) และน้ำมันหอมระเหยจากไพล (*Z. cassumunar* Roxb, Z) และชนิดผสม ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมเสม็ดขาว (CM), น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยผสมไพล (CZ) และน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวผสมไพล (MZ) โดยทำการทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion ที่ความเข้มข้น 0.625-10.00 mg/mL พบว่า CM ที่ความเข้มข้น 10.00 mg/mL (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* และ *P. acnes* ได้ดีที่สุดมีขนาด 32.33, 35.67 mm. และ C มีประสิทธิภาพรองลงมา มีขนาด 30.67, 32.67 mm. เนื่องจากค่า inhibition zone ที่ได้จากการ

ทดลองมีค่า ≥ 8 mm แสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบมีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้น ๆ⁽⁴⁵⁾ ซึ่งการที่น้ำมันหอมระเหย สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากองค์ประกอบหลักที่พบใน C, M และ Z นี้สามารถทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้เกิดรอยรั่ว (leakage) ทำให้สารต่างๆ เข้า-ออกเซลล์ (osmotic barrier) ระบบการขนส่งอิเล็กตรอนและปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชัน (oxidative phosphorylation) เกิดความเสียหายทำให้พลังงาน (ATP) ในเซลล์ของจุลินทรีย์ถูกปลดปล่อยออกมาได้น้อยลง ส่งผลให้จุลินทรีย์อ่อนแอและตาย ซึ่งทั้ง C, M และ Z สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾ เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ได้จากข้างต้น จึงมีการศึกษาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (MIC) และ หาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ (MBC) ในขั้นตอนการทดสอบต่อไป

3. การศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) และการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) ของน้ำมันหอมระเหย

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว *S.epidermidis* (ATCC14990) และ *P.acnes* (DMST14916) พบว่า น้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีที่สุด คือ C รองลงมา คือ M และ Z มีฤทธิ์น้อยที่สุด แต่จากผลการวิจัยพบว่า CM เสริมฤทธิ์กันสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้กว่าน้ำมันหอมระเหยชนิดเดียวเนื่องจาก cinnamondehyde และ eucalyptol ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักใน C และ M สามารถทำลายผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียได้จึงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย^(3, 26)

4. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม โดย DPPH[•] radical scavenging assay และ ABTS^{•+} radical scavenging capacity assay

นอกจากน้ำมันหอมระเหยจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวแล้วยังสามารถช่วยลดกระบวนการอักเสบที่เกิดจากการที่ร่างกายตอบสนองต่อการติดเชื้อจุลินทรีย์ได้⁽⁴⁹⁾ ในขณะที่เกิดการอักเสบเซลล์แมคโครฟาจซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวจะหลั่งสารสื่อกลางในการอักเสบ เช่น ไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) และไซโตไคน์ (cytokine) เป็นต้น⁽⁵⁰⁾ ในการลดสารสื่อกลางในการอักเสบนั้นจึงนำน้ำมันหอมระเหยที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบซึ่งมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้ในการลดการอักเสบที่เกิดขึ้นได้⁽⁵¹⁾ จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH^{•+} และ ABTS^{•+} ของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม พบว่า C เป็นน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด⁽⁵²⁾ รองลงมา คือ Z และพบว่าน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม CZ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด เนื่องจากองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย C ประกอบด้วย cinnamaldehyde, α -copaene, α -pinene, limonene และ Z ประกอบด้วย sabinene, terpinene-4-ol, β -

pinene เมื่อผสมน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดนี้เข้าด้วยกันจึงอาจมีการเสริมฤทธิ์กัน^(53, 54) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับค่า IC₅₀ ของ L-ascorbic acid (positive control) พบว่า CZ มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ L-ascorbic acid และ CZ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่า C โดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5. การศึกษาหาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีที่สุดด้วยเครื่อง GC-MS

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหย CM (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีที่สุด ด้วย GC-MS โดยใช้สภาวะที่พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องแล้ว โดยฉีดน้ำมันหอมระเหยผสมที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MIC เท่ากับ 1.024 mg/mL ซึ่งมี C และ M ผสมกันที่ความเข้มข้น 0.512 mg/mL พบว่า สารสำคัญ cinnamaldehyde และ eucalyptol ของ CM เท่ากับ 0.54 mg/mL

6. การเตรียมไลโปโซมของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม

การเตรียมไลโปโซม ด้วยวิธี thin-film hydration method ได้เลือกใช้ phospholipids ชนิด L-alpha-lecithin from egg เนื่องจาก ชนิดของ phospholipids ในการเตรียมไลโปโซมมีผลต่อปริมาณการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยและพบว่า phospholipids ชนิด phosphatidylcholine จากไข่แดง สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ดีกว่า phospholipids ชนิดอื่น ๆ⁽⁵⁵⁾ โดยในการศึกษาจะใช้อัตราส่วนของ phosphatidylcholine ต่อ cholesterol เท่ากับ 60:40, 70:30, 80:20 และ 90:10 และมีการลดขนาดด้วยการ sonication เป็นระยะเวลา 0, 2 และ 5 นาที รวม 12 ดำรับโดยในขั้นตอนการเตรียมไลโปโซมจะใช้น้ำมันหอมระเหย CM ความเข้มข้น 2 mg/mL เพื่อให้มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่ใส่ลงในตำรับมากพอสำหรับการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว ลักษณะตำรับที่ได้ทั้ง 12 ตำรับมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ ขุ่นขาว เป็นเนื้อเดียวกัน ตำรับที่มีการ sonicate ไลโปโซมใสมากกว่าตำรับที่ไม่มีการ sonicate เนื่องจากไลโปโซมที่เตรียมด้วยเทคนิค thin-film hydration method จะได้ไลโปโซมชนิด MLV ซึ่งเป็นไลโปโซมที่มีผนังสองชั้นหลายชุด มีขนาดใหญ่ แต่เมื่อมีการใช้เทคนิค sonication จะทำให้ไลโปโซมที่เตรียมได้แตกออกแล้วกลับมาเรียงตัวกันใหม่ ทำให้ได้ไลโปโซมที่มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอยิ่งขึ้น⁽³⁵⁾ การ sonicate จะทำให้เกิดความร้อนในระหว่างลดขนาด ถ้าใช้เวลานานจะทำให้เกิดการสลายตัวของผนังไขมันของไลโปโซม โดยไลโปโซมที่ผ่านกระบวนการลดขนาดอนุภาคด้วย sonicate จะมีลักษณะเป็นสารละลายที่ใสขึ้น ซึ่งเกิดจากการกระเจิงแสงของอนุภาคที่ยังมีขนาดใหญ่ที่อยู่ในสารละลาย⁽⁵⁶⁾

7. การประเมินสมบัติทางกายภาพของไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม

1) การประเมินลักษณะภายนอกของไลโปโซม

จากการประเมินลักษณะภายนอกของไลโปโซมที่บรรจุ CM ด้วยตาเปล่า ทั้ง 12 ตำรับ ในวันที่ 0 พบว่า ทุกตำรับ มีลักษณะเป็นคอลลอยด์ สีขุ่นขาว เป็นเนื้อเดียวกัน

2) การศึกษาการกระจายตัวและวัดขนาดอนุภาคของไลโปโซม

จากการศึกษาการกระจายตัวและวัดขนาดอนุภาคของไลโปโซมทั้ง 12 ตำรับด้วยเครื่องมือ particle size analyzer โดยเปรียบเทียบขนาดและการกระจายตัวของไลโปโซมในวันที่ 0 พบว่า ทุกอัตราส่วนของ phosphatidylcholine: cholesterol ที่ไม่ได้ผ่านการ sonicate จะมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 786.3-876.8 nm และมีการกระจายอนุภาค (Polydispersity index, PDI) ในช่วง 0.355-0.487 ส่วนตำรับที่ sonicate เป็นเวลา 2 นาที พบว่า ขนาดอนุภาคของไลโปโซมมีขนาดเล็ก ลง อยู่ในช่วง 367.9-471.1 nm และมีค่า PDI ลดลงเท่ากับ 0.232-0.287 ซึ่งแสดงว่าเมื่อมีการ sonicate อนุภาคของไลโปโซมจะมีค่าการกระจายตัวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีผลต่อความคงตัวของไลโปโซมในแต่ละตำรับ และเมื่อเพิ่มระยะเวลา sonicate เป็น 5 นาที พบว่า ขนาดอนุภาคของไลโปโซมเล็กลงมากกว่าตำรับที่ใช้ sonicate 2 นาที มีค่าอยู่ในช่วง 210.7-321.7 nm และค่า PDI เท่ากับ 0.191-0.251 จากผลการทดลอง พบว่า ค่า PDI ของทุกตำรับมีค่าน้อยกว่า 1 แสดงว่าอนุภาคของไลโปโซมที่เตรียมได้มีการกระจายดี⁽⁵⁷⁾

8. การศึกษาความสามารถในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่บรรจุอยู่ในไลโปโซมด้วยเทคนิค GC-MS

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ eucalyptol และ cinnamaldehyde ของน้ำมันหอมระเหยชนิด CM ปริมาณ 2.00 mg/mL (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) ที่ถูกกักเก็บในไลโปโซม วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้สภาวะที่พัฒนา และตรวจสอบความถูกต้องแล้วโดยปริมาณองค์ประกอบหลัก eucalyptol และ cinnamaldehyde พบว่า ตำรับ F8 สามารถกักเก็บ CM ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การกักเก็บเท่ากับ 87.90% โดยมีปริมาณ eucalyptol และ cinnamaldehyde ในตำรับเท่ากับ 0.412 และ 0.506 mg/mL ตามลำดับ ซึ่งปริมาณดังกล่าวมีค่ามากกว่าค่า MIC จึงเพียงพอที่จะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ที่ก่อให้เกิดสิวได้ ตำรับที่กักเก็บรองลงมาคือ ตำรับ F7 สามารถกักเก็บได้ 82.78% ส่วนตำรับ F3 มีเปอร์เซ็นต์การกักเก็บต่ำที่สุด เท่ากับ 60.43%

ความสามารถในการกักเก็บ ขึ้นกับปริมาณ phospholipids ในตำรับหากมีปริมาณ phospholipids สูง ประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจาก เกิดการเรียงตัวกันของโมเลกุลไขมันเรียงซ้อนกันเป็นสองชั้นมากขึ้นซึ่งน้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ จึงสามารถแทรกเข้าไปอยู่ในส่วนของไขมันได้ ดังนั้น ตำรับที่มีปริมาณ phospholipids มาก

จึงสามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ได้ดีกว่าตำรับที่มีปริมาณ phospholipids น้อย⁽⁵⁸⁾ สัดส่วนของคลอเรสเตอรอล มีความสำคัญต่อตำรับโดยจะเพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังไลโปโซม อีกทั้งทำให้ผนังของไลโปโซมมีความชอบไขมันมากขึ้น อาจทำให้น้ำมันหอมระเหยสามารถละลายอยู่ในผนังของไลโปโซมได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามสัดส่วนของคลอเรสเตอรอลต้องไม่มากเกินไป เพราะคลอเรสเตอรอลอาจไปแย่งที่น้ำมันหอมระเหยซึ่งอยู่ภายในผนังของไลโปโซมได้⁽⁵⁶⁾ นอกจากนี้ปัจจัยของปริมาณอัตราส่วนของ phospholipid ต่อ cholesterol และระยะเวลา sonicate ซึ่งทำให้ขนาดอนุภาคเล็กลงนั้นก็มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การกักเก็บน้ำมันหอมระเหย หากใช้เวลาในการ sonicate เพิ่มขึ้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์ในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยลดลง⁽⁵⁸⁾ (ตั้งผลการทดลองในตารางที่ 20) เนื่องจากตำรับ F8 มีความสามารถในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย CM ได้ดีที่สุดในที่สุดจึงเลือกตำรับ F8 มาทำการศึกษาความคงตัว ที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C ระยะเวลา 8 สัปดาห์ และศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวต่อไป

9. การศึกษาลักษณะของตำรับไลโปโซมด้วยที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ดีที่สุดด้วยกล้อง Polarized light microscope และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

จากการศึกษาลักษณะตำรับ F8 ภายใต้กล้อง Polarized light microscope พบว่าลักษณะไลโปโซม ภายใต้กล้อง มีการกระเจิงของแสง เป็นรูปใบพัด เนื่องจาก ไลโปโซมเป็นอนุภาคทรงกลม เมื่อมีแสงตกกระทบบนอนุภาคของไลโปโซมจึงถูกกระเจิงแสงออกมา และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (TEM) พบว่า อนุภาคของไลโปโซมมีลักษณะเป็นทรงกลม และมีขนาดเล็กระดับนาโนเมตรซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองวัดขนาดอนุภาคของไลโปโซมข้างต้น

10. การทดสอบความคงตัวของตำรับไลโปโซมที่มีความสามารถในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 4 °C และ 25 °C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการศึกษาความคงตัวของตำรับ F8 ที่บรรจุ CM ที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ลักษณะทางกายภาพของตำรับที่อุณหภูมิ 4°C มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ ขนาดอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากไลโปโซมมีสมบัติเป็นคอลลอยด์ขนาดอนุภาคและการกระจายตัวที่มีการเปลี่ยนแปลงจึงเกิดจากปรากฏการณ์ออสวาล์ดริเพนนิ่ง (ostwald ripening) ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปค่าการกระจายตัวของอนุภาคมีค่าเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อนุภาคของไลโปโซมเข้ามาอยู่ใกล้ชิดกันมากขึ้น อนุภาคไลโปโซมอาจเกิดการหลอมรวมตัวกันทำให้ขนาดอนุภาคของไลโปโซมมีค่าเพิ่มมากขึ้น⁽⁶⁰⁾ และมีขนาดอนุภาคไม่เกิน 500 nm ซึ่งเป็นขนาดอนุภาคที่มีความคงตัวดี⁽⁶¹⁾ ค่าการกระจายตัวของขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและมีเปอร์เซ็นต์การกักเก็บลดลงเพียง 8.78 % เมื่อเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C สามารถรักษาคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยที่บรรจุอยู่ในไลโปโซมได้ดีกว่าตำรับไลโปโซมที่เก็บที่อุณหภูมิ 25°C ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของสมลักษณ์ คงเมืองและคณะ⁽⁶²⁾

จากการศึกษาความคงตัวของตำรับไลโปโซม F8 บรรจุ CM ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ในขณะที่ลักษณะทางกายภาพของตำรับ F8 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25°C มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่า ขนาดอนุภาคและค่า PDI เพิ่มขึ้น และมีเปอร์เซ็นต์การกักเก็บลดลง 12.83% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 4°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาไลโปโซมมากกว่าเก็บที่อุณหภูมิ 25°C ⁽⁶²⁾

11. การทดสอบความคงตัวของประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยที่ถูกกักเก็บและไม่มีถูกกักเก็บในไลโปโซมในการยับยั้งการเจริญของ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย

จากการศึกษาความคงตัวของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวของ CM ที่บรรจุอยู่ในตำรับ F8 โดยเปรียบเทียบกับ CM ที่ไม่ถูกกักเก็บในตำรับไลโปโซมซึ่งเก็บไว้ในขวดแก้วใส ที่อุณหภูมิ 4°C ทำการวิเคราะห์ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ที่ก่อให้เกิดสิว ด้วยวิธี disc diffusion ทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของ CM ที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มด้วยไลโปโซมในสัปดาห์ที่ 1 มีขนาดของ inhibition zone มากกว่าเมื่อเทียบกับ CM ที่กักเก็บในไลโปโซม แต่เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 8 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของ CM ที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มมีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ CM มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้คงที่มากกว่าเมื่อเวลาผ่านไป แสดงให้เห็นว่า CM ที่ผ่านการห่อหุ้มด้วยไลโปโซมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวทั้ง 2 ชนิด ได้ยาวนานกว่า CM ที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มด้วยไลโปโซม เนื่องจากไลโปโซมสามารถป้องกันน้ำมันหอมระเหยจากสภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น อากาศ และแสงแดด จึงทำให้ลดการเสื่อมสภาพของน้ำมันหอมระเหยได้มากกว่าน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ได้ห่อหุ้มด้วยไลโปโซมซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วใส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jiulin Wu และคณะ ⁽³⁹⁾ อธิบายได้ว่าการห่อหุมน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิคไลโปโซมสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวได้น้อยกว่าน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มในช่วงเริ่มต้น ซึ่งจากรายงาน พบว่าการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ถูกบรรจุอยู่ภายในไลโปโซม จะมีการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ได้ยาวนานขึ้น และช่วยเพิ่มความคงตัวทางกายภาพให้กับน้ำมันหอมระเหย ปกป้องน้ำมันหอมระเหยจากสภาวะแวดล้อมภายนอก ลดการระเหย และเพิ่มประสิทธิภาพทางชีวภาพ ลดความเป็นพิษ ⁽⁶¹⁾ แสดงให้เห็นว่าการเตรียมน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิคไลโปโซม เป็นวิธีที่ทำให้สารสำคัญมีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นและมีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ยาวนานขึ้น

5.3 ข้อเสนอแนะ

ผู้วิจัยขอเสนอแนะแนวทางการพัฒนา ปรับปรุงเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้

1. ศึกษาน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมโดยให้ความหลากหลายมากขึ้นทั้งชนิดและอัตราส่วนในการผสมของน้ำมันหอมระเหย
2. ศึกษาความคงตัวของตำรับไลโปโซมและประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยในตำรับให้มีระยะเวลาที่นานขึ้น (3 เดือน หรือ 6 เดือน)
3. ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์
4. ศึกษาค่าศักย์ซีตา (Zeta potential) ของตำรับไลโปโซมเพื่อประกอบการพิจารณาในการคัดเลือกตำรับ
5. ในการคัดเลือกตำรับไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหย อาจคัดเลือกจากตำรับที่มีขนาดอนุภาค และการกระจายตัวซึ่งมีความคงตัวดีมาใช้ในการศึกษาแทนการคัดเลือกตำรับ โดยเลือกจากร้อยละการกักเก็บ
6. ในการนำตำรับ F8 มาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อาจมีการเติมสารเพิ่มความหนืด (thickener) และ เพิ่มสารแต่งกลิ่นหอม (Fragrance) เพื่อให้ตำรับมีความเหมาะสมในการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางมากขึ้น

บรรณานุกรม

1. ไทยรัฐออนไลน์. องค์การเภสัชฯจับมือมหิดล เร่งวิจัยยาชื่อสามัญ หวังลดนำเข้ายาต่างประเทศ ไทยรัฐ [หนังสือพิมพ์ออนไลน์]. 19 พฤศจิกายน 2556 [เข้าถึง 3 ธันวาคม 2558]; สาธารณสุข: สืบค้นจาก: <http://www.thairath.co.th/content/383830>
2. สานิตย์ สุขสวัสดิ์, แสงมณี ชิงดวง, สุภาภรณ์ สาชาติ. ศึกษารวบรวมพันธุ์อบเชย. จันทร์บุรี; 2553
3. Mehmet Unlu, Emel Ergene, Gulhan Vardar Unlu, Hulya Sivas Zeytinoglu, Nilufer Vural. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blum (Lauraceae). Food Chem Toxicol. 2010;48:3274-80
4. Sidra Sabir, Muhammad Arshad, Kulsoom Zahara, Shaista Tabassum, Sunbal Khalil Chaudhari. Pharmacological attributes and nutritional benefits of tea tree oil. International Journal of Biosciences. 2014;5(2):80-91.
5. จุฬารัตน์ ลิ้มวัฒนานนท์, ธนรรรจ์ รัตนโชติพานิช, อารีวรรณ เขียวชาญวัฒนา, อรอนงค์ วลีขจรเลิศ, รัตน์ศิริ จิวานนท์, เจริญ ชูณหากัญจน์ และคณะ. ประสิทธิภาพทางคลินิกของเจลไฟลที่ทำจากน้ำมันไพลปริมาณ 1% ในการรักษาผิวหนังเล็กน้อยถึงปานกลาง. IJPS journal. 2008;42:121-33
6. Atanda OO, Akpan I, Oluwafemi F. The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. Food Control. 2007;18:601-7.
7. สุมนา จินดาพงษ์, สุมาลี ปานทอง, อรุณพร อิฐรัตน์, บรรณาธิการ. การประชุมเครือข่ายวิชาการบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 1 เรื่องการศึกษาทฤษฎีการต้านจุลชีพที่ก่อให้เกิดสิวของสารสกัดสมุนไพรในตำรับเบญจโลกวิเชียร; 18 ธันวาคม 2555; มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2555.
8. Haiying Cui, chengting Zhao, Lin Lin. The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. Food Control. 2015; 56:128-34.
9. Sara Tuchayi, Evgenia Makrantonaki, Ruta Ganceviciene, Clio Dessinioti, Steven R. Feldman, Christos C. Acne vulgaris. Nature reviews disease primers. 2015;1:1-20.
10. Christine Clark. Acne causes and clinical features. Clinical Pharmacist. 2009;1:162-66.
11. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: NOBLE PRINT; 2544.

บรรณานุกรม (ต่อ)

12. David Aanensen. MLST Multi Locus Sequence Typing [โฮมเพจบนอินเทอร์เน็ต]. [ไม่ทราบสถานที่]: [ไม่ทราบผู้ผลิต] [เข้าถึงเมื่อ 14 ธันวาคม 2558]. เข้าถึงได้จาก:
<http://sepidermidis.mlst.net/>
13. Wikipidia. *Staphylococcus epidermidis*. [โฮมเพจบนอินเทอร์เน็ต]. [ม.ป.ท.]: [ม.] [เข้าถึงเมื่อ 6 ธันวาคม 2558]. เข้าถึงได้จาก:
https://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_epidermidis
14. Bergey, David Hendricks. Bergey's manual of determination bacteriology. 8thed. Md: Waverly press;1974.
15. Gottfried Heinrich Dasen. Molecular Identification and Applied Genetics of *Propionibacteria*. [dissertation]. Zürich: citizen of Dübendorf ZH and Täuffelen BE; 1998.
16. Perry Alexandra, Lambert Peter. *Propionibacterium acnes*. Infection beyond the skin. Expert Review of Anti-infective Therapy. Dec 2011;9(12): 1149-56.
17. Wikipidia. *Propionibacterium acnes*. [โฮมเพจบนอินเทอร์เน็ต]. [ม.ป.ท.]: [ม.] [เข้าถึงเมื่อ 15 ธันวาคม 2558]. เข้าถึงได้จาก: https://en.wikipedia.org/wiki/Propionibacterium_acnes
18. Microbiology2009. The Wonderful of Acne. [โฮมเพจบนอินเทอร์เน็ต]. [ไม่ทราบสถานที่]: [ไม่ทราบผู้ผลิต] [เข้าถึงเมื่อ 7 มิถุนายน 2560]. เข้าถึงได้จาก:
<https://microbiology2009.wikispaces.com/The+Wonderful+World+of+Acne>
19. Perry AL, Lambert PA. *Propionibacterium acnes*. Letters in applied microbiology. 2005;42:185-88.
20. พิมพ์กร ลีลาพรพิสิฐ. สุกนธบำบัด. เชียงใหม่: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่;2545.
21. ไพล [โฮมเพจบนอินเทอร์เน็ต]. [ม.ป.ท.]: [ม.] [เข้าถึงเมื่อ 15 ธันวาคม 2558]. เข้าถึงได้จาก:
<http://medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/zincus.html>
22. สิริลักษณ์ มาลานิยม. น้ำมันหอมระเหยสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย. สมอ สาร. กรกฎาคม 2545;28(325):3-4.
23. เสริมดี [โฮมเพจบนอินเทอร์เน็ต]. [กรุงเทพมหานคร]: [มหาวิทยาลัยมหิดล] [เข้าถึงเมื่อ 29 พฤษภาคม 2560]. เข้าถึงได้จาก:
http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/siri/index.php?page=search_detail&medicinal_id=314

บรรณานุกรม (ต่อ)

24. Brophy J.J, ศิรินันท์ ทับทิมเทศ, ทรรศนีย์ กิติรัตน์ตระการ, ชูจิตร อนันต์โชค. รายงานการประชุมวิชาการป่าไม้ ประจำปี 2545 น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ด (cajuput Oil); 2002.
25. Ismail Amri, Emilia Mancini, Laura De Martino, Aurelio Marandino, Hamrouni Lamia ,Hanana Mohsen et.al. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oils from Three *Melaleuca* Species Grown in Tunisia. International Journal of Molecular Sciences. 2012;13:16580-91.
26. ฤดีมาศ พุ่มกล้า. ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเปลือกอบเชยอินโดนีเซีย [วิทยานิพนธ์]. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2555.
27. จัสติน รัตนมงคล. อบเชย [โฮมเพจบนอินเทอร์เน็ต]. [ไม่ทราบสถานที่]: [ไม่ทราบผู้ผลิต] [เข้าถึงเมื่อ 21 ธันวาคม 2558]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.2candles.com/showtopic.php?id=54>
28. Mariam Ahmad, Chung Pin Lim, Gabriel Akyirem Akowuah, Nur Najihah Ismail, Mohd Akmal Hashim, Sook Yee Hor, et al. Safety assessment of standardized methanol extract of *Cinnamomum burmannii*. Phytomedicine. 2013;20:1124-30.
29. มาลัย วรจิตร, วันทนา ปวีณกิตติพร, สุวรรณ ตระกูลสมบุรณ์, สุรางค์ เดชศิริเลิศ. คู่มือแบคทีเรียและราสำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: บริษัท ธนาเพรส จำกัด; 2557.
30. โอภา วัชระคุปต์. สารต้านอนุมูลอิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: นิวไทม์มิตรการพิมพ์; 2550.
31. Md. Nur Alam, Nusrat Jahan Bristi, Md. Rafiquzzaman. Review on *in vivo* and *in vitro* method evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal. 2013;21:142-52.
32. โลมไสล วงศ์จันทาและคณะ. คู่มือพีซีดี GC-MS. นครสวรรค์: คณะกรรมการการจัดการความรู้ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3; 2556. หน้า 1-17.
33. อรัญญา มโนสร้อย, จีรเดช มโนสร้อย. โลโปโซมทางยาและเครื่องสำอาง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์; 2545.
34. Suntres ZE. Liposome Antioxidant for protection against Oxidant-induced Damage. J Toxicol. Aug 2011;2011:1-16.
35. อรัญญา มโนสร้อย, จีรเดช มโนสร้อย. โลโปโซมสำหรับยาผ่านทางผิวหนังและเครื่องสำอาง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์; 2550.

บรรณานุกรม (ต่อ)

36. กนกวรรณ เวธน์ภาคิน, กัญญา มัชฌิมาวิวัฒน์. การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อก่อให้เกิดสิวของน้ำมันหอมระเหยจากพืช [วิทยานิพนธ์]. มหาวิทยาลัยมหิดล; 2552.
37. ณิชากร เจริญกุล, ทศวรรษ ริมศิริ, เพ็ญขวัญ ชมปรีดา, อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, ชื่นจิตต์ แจ่มเจนกิจ. การพัฒนาเจลทาผิวที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยจีน [วิทยานิพนธ์]. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2547.
38. ธนพร ใจสวย, นาชนัน ข่านเคน. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยสูตรผสม [วิทยานิพนธ์]. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2554.
39. Jiulin Wu, Hui Liu, Shangying Ge, Shuang Wang, Zhiqing Qin, Li Chen, et al. The preparation characterization antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. Food Hydrocolloids. 2015;43:427-35.
40. Carine Sebaaly, Alia Jraij, Hatem Fessi, Catherine Charcosset, Helene Greige-Gerges. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. Food Chemistry. 2015;178:52-62.
41. กนกวรรณ ศักดิ์สกุลไกร, วรมิตา ปิยะศิรินันท์. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันจากเมล็ดฟักข้าว [วิทยานิพนธ์]. มหาวิทยาลัยมหิดล; 2556.
42. ปรียนันท์ บัวสด. การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไฮคลิกโวลแทมเมตรี [วิทยานิพนธ์]. มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2549
43. Liolios CC, Gortzi O, Lalas S, Tsaknis J, Chinou I. Liposome incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. Food Chemistry. 2008;112:77-83.
44. เพชรชมพู ศิริพันธ์, ลักษมีวรรณ เครือแพทย์, วิลาสินี หงษ์หิน. ผลิตภัณฑ์ลดริ้วรอยจากสารสกัดชะเอมเทศโดยเทคนิคการนำส่งยาแบบนีโอโซม [วิทยานิพนธ์]. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2548.
45. พรเทพ เต็มรังษี. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อที่แยกจากแผลติดเชื้อ [วิทยานิพนธ์]. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2554.
46. Goñi P, López P, Sánchez C, Gómez-Lus R, Becerril R, Nerín C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chemistry. 2009;116:982-89.

บรรณานุกรม (ต่อ)

47. Sávia Perina Portilho Falci, Manoel Araujo Teixeira, Pablo Ferreira das Chagas, Beatriz Bertolaccini Martinez, Ana Beatriz Alkmim Teixeira Loyola, Lydia Masako Ferreira, et al. Antimicrobial activity of *Melaleuca* sp. oil against clinical isolates of antibiotics resistant *Staphylococcus aureus*. Acta Cir Brass. 2015 Jun; 30(6):401-6.
48. ณัฐกานต์ วงศ์สีสม, จามจรี จินะตา, บุษบา มะโนแสน, จิรัชต์ กันทะขู้, สุรีพร วันควร, สุภาวดี ศรีแย้ม. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของน้ำมันหอมระเหยจากมะแขว่น. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 2557; 37:3-15.
49. Mequanint W, Makonnen E, Urga K. *In vivo* Anti-Inflammatory activities of leaf extracts of *Ocimumlamiifolium* in mice model. Journal of Ethnopharmacology. 2011;134:32-6.
50. Van der Vliet A, Elserich JP, Cross CE. Nitric oxide: a proinflammatory mediator in lung disease?. Respiratory Research. 2000;1:67-72.
51. Huang WH, Lee AR, Yang CH. Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellariabaicalensis* Georgi. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 2006;70:2371-80.
52. พรรณี เต็มรุ่งเรือง. รายงานผลงานวิจัย ประจำปี 2550 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของเปลือกต้นวงศ์อบเชย, กรุงเทพมหานคร; 2550.
53. ทรรคนิย์ พัฒนเสรี. องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยไพลจากจังหวัดเชียงราย พืชสมุนไพร และ สุราษฎร์ธานี, สำนักวิจัยและพัฒนาการป่าไม้; 2553.
54. Bander E. Al-Dhubiab. Pharmaceutical applications and phytochemical profile of *Cinnamomum burmannii*. Pharmacognosy Review. 2012; 6(12): 125-31.
55. Alina Ortan, Campeanu GH, Cristina Dinu-Pirvu, Lidia Popescu. Studies concerning the entrapment of *Anethum graveolens* essential oil in liposomes. Roumanian Biotechnological Letters. 2009;14(3):4411-17.
56. Avanti Polar Lipids. Liposome Preparation. [โฮมเพจบนอินเทอร์เน็ต]. [ม.ป.ท.]: [ม.] [เข้าถึง 30 ตุลาคม 2559] เข้าถึงได้จาก:
<https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>

บรรณานุกรม (ต่อ)

57. Sarmad Al-Edresi, Saringat Baie. Formulation and stability of whitening VCO-in-water nano-cream. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009; 373: 174-78.
58. ขวัญหทัย กิตติภัสสร, นัชภรณ์ เทศวงศ์. การเตรียมซินนามาลดีไฮด์ไลโปโซม [วิทยานิพนธ์]. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยมหิดล;2553.
59. สุรีย์วัลย์ ดวงจิตต์, ธนัญญา อินทร์ตา, ภัทรพร เรื่องกาญจนไพศาล, วันดี รังสีวิจิตรประภา. ผลของคลอเรสเตอรอลและกรดโอเลอิกต่อคุณสมบัติทางกายภาพและความคงตัวของไลโปโซม. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*. 2559;11:1-13.
60. Yechezkel Barenholz, Danilo D. Lasic. *Nonmedical Applications of Liposomes*. 3th ed. New York: CRC Press;1996.
61. Anna Rita Bilia, Clizia Guccione, Benedetta Isacchi, Chiara Righeschi, Fabio Firenzuoli, Maria Camilla Bergonzi. Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014 May;2014:1-14.
62. สมลักษณ์ คงเมือง, มาลัย สติรพันธุ์, อุทัย โสธนะพันธุ์. ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมไลโปโซมที่บรรจุน้ำมันกานพลูและความคงตัวของไลโปโซม [วิทยานิพนธ์]. นครปฐม: มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2550.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ - สกุล นางสาวชญาณี วงศ์แหลมทอง
วัน เดือน ปีเกิด 4 ตุลาคม 2534
ที่อยู่ปัจจุบัน 28/675 ซอยกระทู้มลิ้ม 27 ถนนพุทธมณฑลสาย 4
อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม
ประวัติการศึกษา
พ.ศ. 2556 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา)

