



เรียนรู้เพื่อรับใช้สังคม

การเตรียมนิโโซมกักเก็บน้ำมันหอมระเหยสำหรับผลิตภัณฑ์ดูแลผิว
PREPARATION OF NIOSOMES ENTRAPPING ESSENTIAL OILS
FOR SKIN CARE PRODUCTS

มัลลิกา ปัสสาโก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
พ.ศ. 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

การเตรียมนิโอโซมกักเก็บน้ำมันหอมระเหยสำหรับผลิตภัณฑ์ดูแลผิว
PREPARATION OF NIOSOMES ENTRAPPING ESSENTIAL OILS
FOR SKIN CARE PRODUCTS

มัลลิกา ปัสสาโก

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

รองศาสตราจารย์ ดร.อรลักษณ์ แพรัตกุล
ประธานกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุปกรณ์
กรรมการ

อาจารย์ ดร.ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์
กรรมการ

อาจารย์ ดร.ปารภัทร โสภารักษ์
กรรมการ

อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล
กรรมการ

รองศาสตราจารย์ อีสยา จันทรวิธานุชิต
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุปกรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

อาจารย์ ดร.ไตรวิทย์ รัตนโรจน์พงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ ดร.ปารภัทร โสภารักษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล
ประธานหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชาญ จันทรวิธานุชิต
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

การเตรียมนิโโซมกักเก็บน้ำมันหอมระเหยสำหรับผลิตภัณฑ์ดูแลผิว

มัลลิกา ปัสสาโก 566078

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง)

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

บทคัดย่อ

น้ำมันหอมระเหยถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งทางยาและเครื่องสำอาง อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยง่ายต่อการระเหยและสลายตัวเมื่อถูกแสง ออกซิเจน และอุณหภูมิสูง จึงเป็นข้อจำกัดในการนำน้ำมันหอมระเหยไปใช้ ด้วยเหตุนี้จึงทำการศึกษาและพัฒนาการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิคนิโโซม เพื่อเพิ่มเสถียรภาพของน้ำมันหอมระเหย โดยทำการทดสอบน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสมจากกะเพรา (*Ocimum sanctum L.*) โหระพา (*Ocimum basilicum L.*) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa L.*) ด้านการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) และ *Propionibacterium acnes* (DMST 14916) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกะเพราผสมโหระพา (HS) สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ดีที่สุด โดยมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) ต่อเชื้อทั้ง 2 ชนิดเป็น 0.512 และ 0.256 mg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ HS ยังสามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ จากวิธี 2,2-diphenylhydramine-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging เป็น 0.024±0.001 and 0.012±0.002 mg/mL ตามลำดับ จึงเลือกนำมากักเก็บในตำรับนิโโซม เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของ HS ด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้วิธีที่พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องแล้ว พบว่ามี methyl eugenol และ estragole เป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณ 61.72 และ 60.55 % ตามลำดับ การเตรียมตำรับนิโโซมประกอบด้วย Span[®] 60 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวไม่มีขั้ว, cholesterol และ HS (1 mg/mL) โดยใช้เทคนิค thin film hydration ได้ทำการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิว:cholesterol (60:40, 70:30, 80:20, 90:10) และเวลาในการ sonicate (0, 2 และ 4 นาที) ต่อประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย พบว่าสูตร F2 ซึ่งเตรียมจาก Span[®] 60:cholesterol ที่อัตราส่วน 60:40 และ sonicate 2 นาที มีประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยสูงที่สุด เท่ากับ 91.20±0.74% เมื่อเปรียบเทียบกับตำรับอื่นๆ จึงใช้ในการศึกษาความคงตัวต่อไป เมื่อทำการศึกษาลักษณะโครงสร้างของนิโโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่าอนุภาคนิโโซมซึ่งมี HS ถูกกักเก็บอยู่ภายในมีโครงสร้างเป็นทรงกลม ผลจากการศึกษาความคงตัวในการเก็บรักษาตำรับ F2 ที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่า F2 มีความคงตัวที่ค่อนข้างคงที่ในสภาวะการเก็บรักษาทั้ง 2 อุณหภูมิ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพ แต่ขนาดของนิโโซมมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยและประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยลดลงเล็กน้อย โดยลดลง 8.10% และ 15.22% ณ อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 4°C และ 25°C ตามลำดับ ดังนั้นนิโโซมที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 4°C จึงมีความคงตัวทั้งในด้านขนาดและการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยมากกว่าที่ 25°C และเมื่อทำการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของนิโโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C พบว่า HS จะมีความคงตัวเมื่อถูกกักเก็บในนิโโซม และมีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) และ *Propionibacterium acnes* (DMST 14916) ได้ดีกว่า HS ที่ไม่ถูกกักเก็บในนิโโซม งานวิจัยนี้จึงบ่งชี้ได้ว่าการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยในนิโโซมสามารถนำไปพัฒนาใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลผิวได้

คำสำคัญ: นิโโซม น้ำมันหอมระเหย สิว Span[®] 60 คอเลสเทอรอล

PREPARATION OF NIOSOMES ENTRAPPING ESSENTIAL OILS FOR SKIN CARE PRODUCTS

MALLIKA PASSAGO 566078

MASTER OF SCIENCE (COSMETIC SCIENCES)

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

TRIWIT RATTANAROJPONG, Ph.D.,

PARAPAT SOBHARAKSHA, Ph.D.

ABSTRACT

Essential oils have been widely used for medical and cosmetic purposes. However, their constituents are high volatility and susceptible to degradation on exposure to light, oxygen and high temperature, which limit the utilization of essential oils. Hence, in the present investigation, niosome entrapping essential oils has been developed in order to improve their stability. First, the single and combinations of common essential oils such as the holy basil (*Ocimum sanctum* L.), sweet basil (*Ocimum basilicum* L.), and turmeric (*Curcuma longa* L.) oils were tested for antimicrobial activity against bacteria that induce acne, including *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) and *Propionibacterium acnes* (DMST 14916). The mixture of holy basil and sweet basil oils (HS) exhibited the strongest antibacterial activity with minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values for both bacterial species at 0.512 and 0.256 mg/mL, respectively. Additionally, HS showed the highest antioxidant activities which its IC_{50} values of 2,2-diphenylhydramine-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging assays were 0.024 ± 0.001 and 0.012 ± 0.002 mg/mL, respectively and was selected for incorporation into niosome. The amounts of the two major compounds, methyl eugenol and eustragole, of HS based on the validated GC-MS analyses were 61.72 and 60.55 %, respectively. Niosomes composed of Span[®] 60 as non-ionic surfactant, cholesterol and HS (1 mg/mL) was prepared using a thin film hydration technique. The effects of different mass ratios of surfactant/cholesterol (60:40, 70:30, 80:20, 90:10) and sonication time (0, 2 and 4 min) on oil entrapment efficiency were evaluated. The formulation F2 prepared using Span[®] 60 and cholesterol in the ratio of 60:40 and sonication time 2 min gave an optimum oil entrapment of $91.20 \pm 0.74\%$ compared to other formulations and was used for further studies. Transmission electron microscopy revealed the spherical nature of the HS loaded vesicles. The stability of F2 at 4°C and the room temperature, 25°C, for 2 months were also investigated. The results revealed that F2 was quite stable within two months at both storage temperatures. No significant change in the physical appearance was observed. The size of niosomes increased slightly and the encapsulation efficiencies decreased by 8.10% and 15.22% for the formulations at 4°C and 25°C, respectively. Thus, the niosomes 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 niosomes at 4°C was also evaluated. The results indicated that HS 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 HS. The present study indicates the potential of essential oil-loaded niosomes as a promising technology which could be further developed to a suitable skin care products.

Keywords: Niosomes, Essential oil, Acne, Span[®] 60, Cholesterol

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา อินทรานุปกรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ไตรวิทย์ โรจนพงศ์ และ อาจารย์ ดร.ปารภทร โศภารักษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่คอยชี้แนะ ให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือจนกระทั่งลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อรลักษณ์ แพรัตกุล และ อาจารย์ ดร.ปวีณา ว่องตระกูล คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำปรึกษา และให้แนวความคิดที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนช่วยตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนการศึกษามาตลอดจนความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และคอยเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมา

มัลลิกา ปัสสาโก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญแผนภูมิ	ช
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การศึกษา	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 สิว	5
2.2 สาเหตุสำคัญของการเกิดสิว	6
2.3 แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว	7
2.4 การป้องกันการเกิดสิว	9
2.5 สมุนไพรที่สนใจศึกษาวิจัย	9
2.6 น้ำมันหอมระเหย (Essential oil)	13
2.7 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ	14
2.8 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)	16
2.9 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination)	18
2.10 นิโอโซม (Niosome)	20
2.11 การตรวจสอบน้ำมันระเหยและผลิตภัณฑ์จากน้ำมันระเหยโดยวิธี แกสโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมทรี	23
2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	27

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีในการวิจัย	31
3.2 วิธีการวิจัย	34
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ	48
4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวิธี disc diffusion	49
4.3 การทดสอบหาค่า MIC และ MBC	52
4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี DPPH และวิธี ABTS	53
4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิค GC-MS	54
4.6 ผลการเตรียมนิโอโซมน้ำมันหอมระเหย HS และการประเมินสมบัติ	63
4.7 การประเมินสมบัติของตำรับนิโอโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหย HS ได้ดีที่สุด	77
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	88
5.2 อภิปรายผล	90
5.3 ข้อเสนอแนะ	94
บรรณานุกรม	95
ภาคผนวก	
คำย่อหรือสัญลักษณ์	102
ประวัติผู้เขียน	103

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมสำหรับศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) และ <i>P. acne</i> (DMST 14916)	34
2	สูตรตำรับนิโอโซม	44
3	ขนาดโซนยับยั้ง (mm) จากผลการทดสอบประสิทธิภาพสารละลายน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990)	50
4	ขนาดโซนยับยั้ง (mm) จากผลการทดสอบประสิทธิภาพสารละลายน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. acne</i> (DMST 14916)	51
5	ผลการทดสอบค่า MIC และค่า MBC ต่อเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) และ <i>P. acnes</i> (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย	52
6	ค่า IC ₅₀ จากวิธี DPPH และ ABTS radical scavenging ของน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวและชนิดผสม เปรียบเทียบกับ ascorbic acid	53
7	พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน methyl eugenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ	58
8	พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน estragole ที่ความเข้มข้นต่างๆ	59
9	ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงในวันเดียวกันและต่างวันกัน	60
10	ร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐาน methyl eugenol และ estragole ใน HS	61
11	ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญใน H และ S ด้วยเครื่อง GC-MS	62
12	ขนาดและการกระจายตัวของตำรับนิโอโซมที่เตรียมได้	64
13	พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน methyl eugenol ที่ความเข้มข้นต่างๆ	70
14	พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน estragole ที่ความเข้มข้นต่างๆ	71
15	ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงในวันเดียวกันและต่างวันกัน	72
16	ร้อยละการคืนกลับของการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์	73
17	ปริมาณสารสำคัญ methyl eugenol และ estragole ของน้ำมันหอมระเหย HS ที่บรรจุในตำรับนิโอโซม	74
18	ร้อยละการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย HS ในตำรับนิโอโซมทั้ง 12 ตำรับ	75
19	การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนิโอโซม F2 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์	79
20	ร้อยละการกักเก็บสารของตำรับนิโอโซม F2 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์	80

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
21 การประเมินความคงตัวของตัวทางกายภาพของตำรับนิโอโซม F2 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์	83
22 ร้อยละการกักเก็บสารของตำรับนิโอโซม F2 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์	84
23 ร้อยละการลดลงของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) และ <i>P. acne</i> (DMST 14916)	86



สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่	หน้า
1	Calibration curve ของสารมาตรฐาน methyl eugenol 58
2	Calibration curve ของสารมาตรฐาน estragole 59
3	ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยของตำรับนิโอโสมที่เตรียมได้ 65
4	Calibration curve ของ methyl eugenol 70
5	Calibration curve ของ estragole 71
6	ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 ของน้ำมันหอมระเหย HS ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มด้วยนิโอโสม 87
7	ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย <i>P. acne</i> (DMST 14916) ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 ของน้ำมันหอมระเหย HS ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มด้วยนิโอโสม 87

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การเกิดสิวอักเสบ	6
2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>P. acnes</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ chocolate agar	7
3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar	8
4 กะเพรา	9
5 ขมิ้นชัน	11
6 โหระพา	12
7 ผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อผิวหนังจากรังสี UV	17
8 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของนิโอโซม	20
9 ขั้นตอนการเกิดนิโอโซมจากโพรนิโอโซม	23
10 เครื่อง GC-MS	24
11 ส่วนประกอบหลักของเครื่อง GC	24
12 การแยกสารภายใน GC column	25
13 โครมาโทแกรมของสารผสมซึ่งประกอบด้วยสารองค์ประกอบอย่างน้อย 6 ชนิด	25
14 ส่วนประกอบของแมสสเปกโตรมิเตอร์	26
15 ตำแหน่งการวาง disc ในวิธี disc diffusion	37
16 ขั้นตอนการเจือจาง serial two-fold dilution ในวิธี MIC	38
17 ขั้นตอนในวิธี MBC โดยคัดเลือกหลอดที่ไม่มีเชื้อเจริญ (ไม่มีความขุ่น) จากวิธี MIC มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง	39
18 ตำแหน่งการวาง disc ในวิธี disc diffusion	47
19 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์	48
20 ตัวอย่างลักษณะโซนยับยั้งเชื้อ	51
21 GC โครมาโทแกรมของ methyl eugenol และ estragole ในน้ำมัน HS	54
22 GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน estragole และ methyl eugenol	55
23 mass spectra ของ methyl eugenol ใน HS และ mass spectra ของสารมาตรฐาน methyl eugenol	56
24 mass spectra ของ estragole ใน HS และ mass spectra ของสารมาตรฐาน estragole	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
25 ตัวอย่างลักษณะของนิโอโซมอัตราส่วนของ Span [®] 60:cholesterol ที่ 60:40 โดยผ่านการ sonicate ที่ 0, 2 และ 5 นาที	63
26 GC โครมาโทแกรมของ methyl eugenol และ estragole ในน้ำมัน HS ที่ถูกกักเก็บในนิโอโซม	66
27 GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน estragole และ methyl eugenol	67
28 mass spectra ของ estragole ใน HS ที่ถูกเก็บกักในนิโอโซม และ mass spectra ของสารมาตรฐาน estragole	68
29 mass spectra ของ methyl eugenol ใน HS ที่ถูกเก็บกักในนิโอโซม และ mass spectra ของสารมาตรฐาน methyl eugenol	69
30 ลักษณะของนิโอโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหยตำรับ F2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิดแสงโพลาไรซ์ และภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่กำลังกำลังขยาย 175000X	77
31 GC โครมาโทแกรมของตำรับนิโอโซม F2 ที่บรรจุน้ำมันหอมระเหย HS ในสัปดาห์ที่ 0 และ สัปดาห์ที่ 8	81
32 ตัวอย่างลักษณะโซนยับยั้งเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) ของ HS ที่ถูกกักเก็บในนิโอโซม และ HS ที่ไม่ได้ถูกกักเก็บในนิโอโซม	86

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโลกของเราหันมานิยมใช้สมุนไพรเพื่อเสริมสุขภาพกันมากขึ้น ทั้งในแง่เป็นยา อาหารเสริม และเครื่องสำอาง ซึ่งสมุนไพรเป็นสิ่งที่ได้มาจากธรรมชาติบางชนิดสามารถใช้ทดแทนยา แพทย์แผนปัจจุบันได้โดยมีประสิทธิผลและความปลอดภัยไม่แตกต่างกัน⁽¹⁾ โดยด้านเครื่องสำอางได้มีการศึกษาวิจัยสมุนไพรเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในรูปของสารสกัด ซึ่งสะดวกต่อการผลิตในอุตสาหกรรม และยังมีการนำความรู้ทางด้านเภสัชกรรมมาช่วยพัฒนารูปแบบของยาและเครื่องสำอางให้สะดวก และมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทั้งนี้การนำสมุนไพรมาใช้ จะต้องมีการคำนึงถึงความปลอดภัย⁽²⁾ และ ประสิทธิภาพในการรักษาอย่างแท้จริงของสมุนไพรชนิดนั้น ๆ จึงจะได้ประโยชน์สูงสุด

สิวเป็นปัญหาที่พบได้ในทั้งกลุ่มของวัยรุ่น และพบบ้างในผู้ใหญ่ การเกิดสิวทำให้เกิดความ กังวลและอาจทำให้เกิดการปฏิบัติตนที่ไม่ถูกต้อง เช่น การบีบเค้นหัวสิวทำให้มีแผลเป็นเกิดขึ้น⁽³⁾ ส่งผลกระทบต่อทั้งทางด้านร่างกายและจิตใจต่อผู้ที่ประสบปัญหาที่เกิดจากการเป็นสิว ซึ่งอาจมีผลต่อ คุณภาพชีวิต⁽⁴⁾ ดังนั้นสิวจึงเป็นปัญหาหนึ่งที่ต้องได้รับการแก้ไข และยาแผนปัจจุบันที่ใช้ในการรักษา สิวมีราคาค่อนข้างแพง จากราคาของตัวยาเองรวมถึงช่วงเวลาในการรักษาที่ค่อนข้างใช้เวลานาน ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงมีการนำสมุนไพรที่มีฤทธิ์รักษาสิวมาใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบัน แต่ยังคงมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของประสิทธิภาพและความเป็นพิษในระยะยาว ซึ่งสมุนไพรที่ นำมาใช้รักษาสิว ได้แก่ สารสกัดจากเปลือกมังคุด⁽⁵⁾ สารสกัดจากใบชา⁽⁶⁾ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมี น้ำมันหอมระเหยจากพืชอีกหลายชนิด เช่น น้ำมันจากดอกกุหลาบ น้ำมันจากดอกลาเวนเดอร์ น้ำมัน หอมระเหยจากไทม์ ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้จะช่วยควบคุมความมันของผิว ช่วยให้เซลล์หลุดลอกจากต่อม ไขมัน และยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดตุ่มหนองสิว⁽⁷⁾ นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นองค์ประกอบในพืชหอมเหล่านี้จะถูกเก็บไว้เฉพาะที่ เช่น ในเปลือก ดอก หรือในเมล็ด น้ำมันหอมระเหยนอกจากจะมีกลิ่นเฉพาะตัวในแต่ละชนิดแล้วยังมีสมบัติในหลาย ด้าน เช่น ฆ่าและยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ช่วยฟื้นฟูสภาพผิวหนัง ด้านไวรัส ด้านการอักเสบ ด้าน อนุมูลอิสระ ช่วยกระตุ้นหรือทำให้ผ่อนคลาย ทำให้สงบเยือกเย็น⁽⁸⁾ ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่า น้ำมันหอมระเหยสามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์เพื่อใช้ในด้านเวชสำอางต่อไปได้

อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์ร่างกายเสื่อมโทรม ซึ่งเซลล์ผิวหนังมีโอกาสเสียหาย จากอนุมูลอิสระสูงโดยเกิดจากการถูกกระตุ้นด้วยแสง UV โดยตรงและจากกระบวนการเมแทบอลิซึม ภายในเซลล์ผิวหนัง เมื่อเกิดอนุมูลอิสระขึ้นมากภายในเซลล์จะทำให้เซลล์นั้นเกิดความผิดปกติขึ้น

หากความเสียหายมีมากจนถึงระดับ DNA จะทำให้เซลล์นั้นไม่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ภายในเซลล์ต่าง ๆ ได้ตามปกติ หรือไม่สามารถสร้างได้เลย เช่น หาก gene ที่ควบคุมการสร้าง collagen เสียหาย จะทำให้เซลล์มีความยืดหยุ่นต่ำ ส่งผลให้เกิดริ้วรอย เป็นต้น และอนุมูลอิสระยังส่งผลให้เกิดการอักเสบในร่างกาย⁽⁹⁾ ยิ่งไปกว่านั้น อนุมูลอิสระยังเป็นสาเหตุของโรคหลายชนิด ดังนั้นเพื่อไม่ให้เซลล์ร่างกายเสียหาย ในร่างกายจึงมีระบบต้านอนุมูลอิสระเพื่อทำลายอนุมูลอิสระโดยการจับ หรือให้อิเล็กตรอนจึงเป็นการลดหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิไดซ์ โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิด ได้แก่ วิตามินเอ ซี และ อี ซีลีเนียม แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะพบในพืชสมุนไพรพื้นบ้านไทยหลายชนิด⁽¹⁰⁾

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบนำส่งยาในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อนำส่งยาไปยังบริเวณที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น ลิโปโซม (liposomes) ซึ่งเป็นระบบนำส่งยาที่มีข้อดีกว่าระบบนำส่งยาอื่น ๆ หลายประการ เช่น สามารถใช้เป็นตัวพาสารเข้าสู่ผิวหนังได้ดี สามารถเก็บกักสารเคมีทางเครื่องสำอางได้หลายประเภท แต่ลิโปโซมมีส่วนประกอบเป็นฟอสโฟลปิด จึงมีปัญหาเรื่องความคงตัวโดยการเกิดออกซิเดชันและไฮโดรไลซิส จากข้อจำกัดของลิโปโซมเหล่านี้จึงทำให้มีการพัฒนาการนำส่งยาแบบประยุกต์รูปแบบใหม่ขึ้นมาที่เรียกว่านิโอโซม (niosomes) ซึ่งนิโอโซมเป็นอนุภาคหรือถุงทรงกลมขนาดเล็กคล้ายกระเปาะ (vesicle) มีผนังซึ่งประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) มีข้อดีว่าลิโปโซมคือสามารถเตรียมได้สะดวกกว่า มีราคาถูก และที่สำคัญคือมีความคงตัวมากกว่าลิโปโซม⁽¹¹⁾ ปกติน้ำมันหอมระเหยจากธรรมชาติมักไม่คงตัว เนื่องจากระเหยได้ที่อุณหภูมิห้อง และสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสงหรือความร้อน⁽¹²⁾ จึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคในการนำส่งยาเข้ามาช่วย โดยเตรียมน้ำมันหอมระเหยให้อยู่ในรูปของนิโอโซม เพื่อช่วยให้มีความคงตัวมากยิ่งขึ้น

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยมุ่งศึกษาไปที่น้ำมันหอมระเหยที่พบในสมุนไพรพื้นบ้านของไทยที่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบในการประกอบอาหาร ได้แก่ กะเพรา (*Ocimum sanctum* L.) โหระพา (*Ocimum basilicum* L.) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เพื่อตรวจหาฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ โดยเฉพาะเชื้อที่ก่อให้เกิดสิวได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990) และ *Propionibacterium acnes* (DMST 14916)⁽¹³⁾ โดยทำการศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดข้างต้นทั้งแบบชนิดเดี่ยว และชนิดผสมเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งเชื้อจุลชีพที่ก่อให้เกิดสิวได้ดียิ่งขึ้น และทำการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว และชนิดผสมด้วย นำน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ทำให้เกิดสิว และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดไปพัฒนาตำรับนิโอโซม เพื่อเพิ่มความคงตัวของน้ำมันหอมระเหยและความคงตัวในประสิทธิภาพด้านการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว

1.2 วัตถุประสงค์การศึกษา

1. ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อให้เกิดสิว ได้แก่ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา (*O. sanctum* L.) โหระพา (*O. basilicum* L.) และขมิ้นชัน (*C. longa* L.) และน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากกะเพราผสมน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน, น้ำมันหอมระเหยจากกะเพราผสมน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา และน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันผสมน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา
2. คัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ดีที่สุด (จากข้อ 1) มาทำการศึกษาค่าประกอบทางเคมีและนำมาสกัดเก็บในรูปแบบตำรับนิโอโซม เพื่อเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเชื้อที่ก่อให้เกิดสิว *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS^{•+} radical scavenging ของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา (*O. sanctum* L.) โหระพา (*O. basilicum* L.) และขมิ้นชัน (*C. longa* L.) และชนิดผสม (น้ำมันหอมระเหยจากกะเพราผสมน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน, น้ำมันหอมระเหยจากกะเพราผสมน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา และน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชันผสมน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา) และทำการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ดีที่สุด
2. วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas Chromatograph - Mass Spectrometer, GC-MS)
3. พัฒนาตำรับนิโอโซมเพื่อใช้ในการเก็บกักน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด รวมทั้งประเมินคุณลักษณะทางเคมีกายภาพ ความคงตัว ขนาดของนิโอโซม และปริมาณการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเชื้อที่ก่อให้เกิดสิว *S. epidermidis* และ *P. acnes* และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว 3 ชนิด ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา ขมิ้นชัน และโหระพา และ ชนิดผสม

2. เป็นการนำน้ำมันหอมระเหยมาใช้ในการด้านเครื่องสำอาง สามารถเพิ่มมูลค่าแก่ผลิตภัณฑ์ และนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ได้

3. ใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาตำรับนิโอโซมกับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ ได้



บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สิว ⁽¹⁴⁻¹⁵⁾

สิว คือ การอักเสบของหน่วยรูขุมขนและต่อมไขมัน (pilosebaceous unit) ซึ่งมักจะพบบริเวณหน้า คอ และลำตัวส่วนบน ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีต่อมไขมันขนาดใหญ่อยู่หนาแน่น โดยลักษณะของสิวสามารถแบ่งลักษณะทางคลินิกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ

1. สิวชนิดไม่อักเสบ (non-inflammatory Acne) คือ สิวที่เกิดจากการอุดตันของรูขุมขน เรียกว่า comedone (ductal hypercornification) มี 2 ชนิด

ก. สิวหัวปิด (closed comedone) มีลักษณะเป็นตุ่มกลมเล็กแข็งสีขาวและจะเห็นชัดขึ้นเมื่อดึงผิวหนังให้ตึงหรือโดยการคลำ

ข. สิวหัวเปิด (open comedone) มีลักษณะเป็นตุ่มกลมเล็กแข็งคล้าย closed comedone แต่ตรงยอดจะมีรูเปิดและมีก้อนสีดำอุดอยู่

2. สิวชนิดอักเสบ (inflammatory Acne) ⁽¹⁵⁾ คือ เกิดจากการที่แบคทีเรีย *P. acne* สร้างเอนไซม์มาย่อยไตรกลีเซอไรด์ ให้กลายเป็นกลีเซอ cholesterol และกรดไขมันอิสระเพื่อใช้เป็นอาหาร และเมื่อ comedone มีการแตก สิ่งสกปรกต่าง ๆ รวมถึงแบคทีเรียก็จะเกิดการแพร่กระจายเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเพื่อต่อต้านสิ่งแปลกปลอม ซึ่งกลไกการกำจัดเชื้อโรคของเม็ดเลือดขาวนั้นทำให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อโดยรอบ มีผลทำให้เกิดเป็นสิวอักเสบและเป็นหนอง

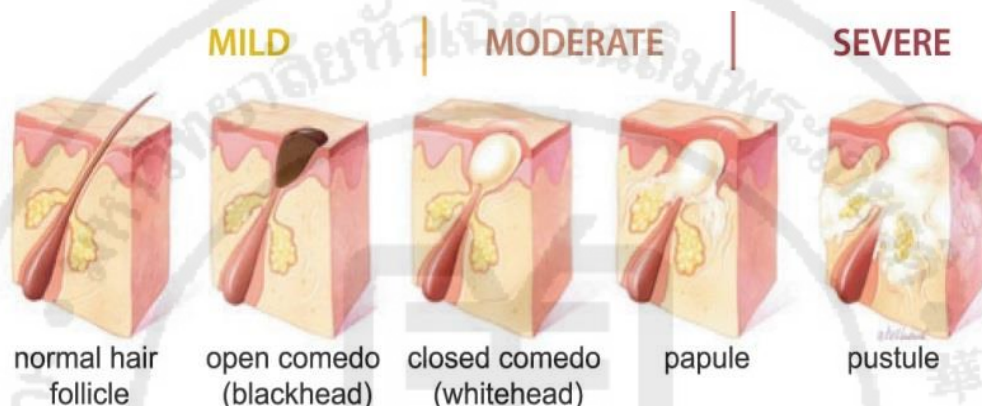
ก. สิวูนแดง (papule) มีลักษณะเป็นตุ่มสีแดงขนาดเล็ก พัฒนามาจากสิวหัวปิด หรือสิวหัวเปิด ที่มีการอุดตันมากขึ้น

ข. สิวหัวหนอง (pustule) รุนแรงกว่าสิวูนแดง มีทั้งชนิดลึกและชนิดตื้น ถ้าเป็นสิวชนิดตื้นจะสังเกตเห็นหัวหนองนูนออกมา เมื่อหนองแตกจะหายค่อนข้างเร็ว ถ้าเป็นสิวชนิดลึกบริเวณรอบ ๆ หัวสิวจะมีอาการบวมแดง เมื่อสัมผัสจะรู้สึกเจ็บมาก ถ้าบีบหัวหนองหรือหัวหนองแตกจะมีน้ำหนองสีเหลืองไหลออกมาพร้อมเลือด

ค. สิวหัวช้าง (nodules) สิวที่เกิดจาก comedone เกิดการแตกรั่ว จนทำให้เกิดการกระจายตัวของเชื้อโรคและไขมันใต้ผิวหนัง ทำให้ร่างกายสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวขึ้นมาทำลายเชื้อโรคทำให้เกิดการอักเสบ บวมแดงในวงกว้าง จนกลายเป็นสิวอักเสบขนาดใหญ่ มีลักษณะเป็นก้อนสีแดงภายในมีหนองปนเลือด บางครั้งอาจเกิดเป็นสิวลายหัวติดกัน

ง. สิวซีสต์ (cyst) สิวอักเสบรุนแรงมีลักษณะคล้ายถุงอยู่ใต้ผิวหนังที่เกิดจากไขมันอุดตันอยู่ภายใต้ผิวหนังและเกิดการอักเสบติดเชื้อ และแพร่ลามออกไปภายในถุงใต้ผิวหนังดังกล่าวจะมีหนอง บางครั้งสิวนิดนี้จะเกิดพร้อมสิมหิวข้าง ทำให้การอักเสบยิ่งทวีความรุนแรงขึ้น

ภาพที่ 1 การเกิดสิวกักเสบ⁽¹⁶⁾



2.2 สาเหตุสำคัญของการเกิดสิว⁽¹⁷⁾

สิวเกิดจากสาเหตุสำคัญร่วมกัน 3 ประการ คือ

1. เกิดจากการที่ต่อมไขมันสร้าง sebum เพิ่มขึ้น การที่ระดับของ sebum สูงขึ้นกว่าปกติ ซึ่งเกิดจากเหตุผลดังนี้

ก. ในระยะวัยรุ่นขึ้นไปจะมีการสร้าง sebum ซึ่งถูกสร้างจากต่อมไขมัน โดยต่อมไขมันเป็นอวัยวะเป้าหมายของ androgen ที่มีปริมาณมากในผิวหนังของมนุษย์

ข. การออกฤทธิ์ของ iso-enzyme 5 alpha-reductase (type I) ซึ่งเปลี่ยน androgen ที่สำคัญที่สุดคือ testosterone ไปเป็นสารที่มีฤทธิ์มากกว่า คือ 5 alpha- dihydrotestosterone ภายในเซลล์ของต่อมไขมัน

2. เกิดจากการหนาตัวของ keratin ชั้น corneum⁽¹³⁾

มีการหนาตัวของชั้น corneum (hyper-cornification) เกิดจากการลดลงของ linoleic acid และการสร้าง keratin เพิ่มมากขึ้นทำให้เกิดการอัดแน่นเป็นสิมหิวขาวและสิมหิวดำ

3. บทบาทของ เชื้อจุลินทรีย์ซึ่งอาศัยอยู่ที่ผิวหนังและภายในต่อมไขมัน เชื้อจุลินทรีย์สำคัญที่ตรวจพบได้ส่วนใหญ่มีดังนี้

ก. *P. acnes* ⁽¹³⁾ เชื้อตัวนี้ย่อยไขมันจากต่อมไขมันให้เป็น free fatty acid โดยอาศัย เอนไซม์ lipase นอกจากนี้ *P. acnes* ยังหลั่งเอนไซม์ protease, hyaluronidase และ low molecular weight chemotactic factor ซึ่งสารเหล่านี้จะทำให้เกิดกระบวนการอักเสบขึ้น

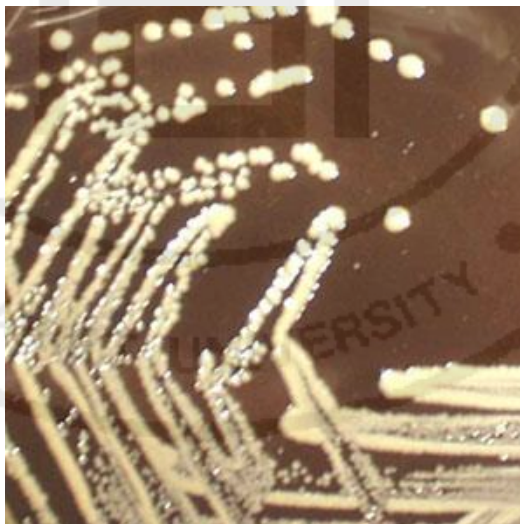
ข. *S. epidermidis* ⁽¹³⁾ เป็นพวกไม่สร้าง enzyme coagulase ปกติพบทั่วไปในอากาศ และสิ่งแวดล้อม พบอยู่ตามผิวหนังบน mucous membrane ของทางเดินหายใจส่วนบน และทางเดินอาหารของคนและสัตว์ แม้ว่าโดยปกติเชื้อนี้ไม่เป็นอันตราย แต่ก็อาจทำให้เกิดโรคได้ หากเข้าไปอยู่ในผิวหนังส่วนลึก

2.3 แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว

ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะ *P. acnes* และ *S. epidermidis* ที่นำมาใช้ในการศึกษาวิจัย

1. *P. acnes* ⁽¹⁸⁻¹⁹⁾

ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *P. acnes* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ chocolate agar ⁽²⁰⁾



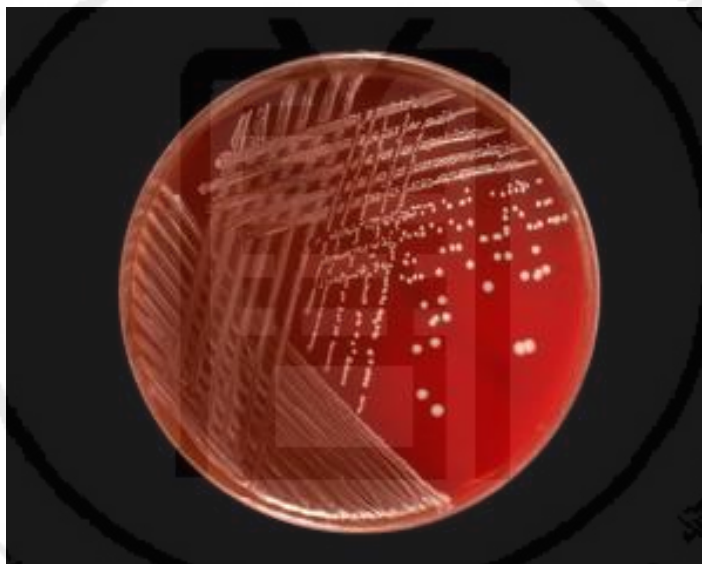
P. acnes เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช้อากาศ ไม่สร้างสปอร์และไม่มีแคปซูล มีรูปร่างได้ กล้องจุลทรรศน์เป็น pleomorphic rod ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้และสามารถสร้างผลผลิตจากการหมักได้หลายอย่าง เช่น propionic acid จุลินทรีย์ชนิดนี้เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่บริเวณช่องปาก ลำไส้ใหญ่ เยื่อぶลูกตา ช่องหูชั้นนอก และผิวหนัง ในขณะที่เดียวกัน *P. acnes* ยังถูกจัดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคแบบฉวยโอกาสอีกด้วย ซึ่งสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อได้หลายช่องทางและนำไปสู่การอักเสบ

ได้หลากหลาย ซึ่งจุลินทรีย์ชนิดนี้มักถูกพบและกล่าวถึงเป็นอย่างมากในการเป็นสาเหตุของการเกิดสิว โดยการก่อให้เกิดการอักเสบด้วยการสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ จากกระบวนการเมแทบอลิซึม

เนื่องจาก *P. acnes* เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตในสภาวะไร้อากาศ โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 30-37 °C โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่แนะนำสำหรับการเพาะเลี้ยงคือ Tryptone Yeast Extract, Glucose Medium ที่มี 0.5% Tween[®] 80 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. *S. epidermidis* ⁽²¹⁻²²⁾

ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. epidermidis* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar ⁽²²⁾



S. epidermidis เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่มีการสร้างเอนไซม์ coagulase มีรูปร่างได้กล็องจุลทรรศน์เป็นวงกลมเกาะตัวรวมกันคล้ายพวงองุ่น โดยมีกาศัยอยู่ที่บริเวณผิวผนังและเยื่อเมือกของมนุษย์ โดยปกติจะไม่ก่อโรคในผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ในปัจจุบันพบว่า *S. epidermidis* สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถสร้าง biofilm ลงบนเครื่องมือแพทย์และเจริญอยู่ได้ อีกทั้งจุลินทรีย์ชนิดนี้มีความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด การรักษาจึงจำเป็นต้องใช้ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะเป็นแนวทาง อีกทั้ง *S. epidermidis* สามารถก่อให้เกิดสิวจากการทำงานร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่อาศัยบนผิวหนังของมนุษย์ ⁽²³⁾

2.4 การป้องกันการเกิดสิว⁽¹³⁾

การป้องกันสิว คือการหลีกเลี่ยงปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดสิว เช่น สารสัมผัสจำพวก chlorinated, hydrocarbon, corticosteroid, mineral oil, เครื่องสำอาง,นอนหลับให้เพียงพอ และหลีกเลี่ยงการจับหัวสิว สัมผัสผิวให้น้อยที่สุดเพราะฝ่ามือของเรามีทั้งความสกปรก และแบคทีเรีย ซึ่งเป็นตัวก่อให้เกิดสิว

การรักษาสิวนั้นควรมีการป้องกันและแก้ไขที่สาเหตุ เช่น การรักษาด้วยยา เพื่อกำจัดและป้องกันการเกิด comedone และรักษาการอักเสบ การใช้ยารับประทาน (เช่น ยาปฏิชีวนะ เอสโตรเจน สเตอรอยด์วิตามินเอ และเรตินอยด์) ยาเฉพาะที่ (ได้แก่ สารยับยั้งไขมันหนัง สารขจัด comedone สารทำให้เกิดการหลุดลอกของผิวหนัง และสารระงับน้ำหรือเหงื่อ) การบำบัดทางกายภาพ (ได้แก่ การผ่าตัด การฉายรังสี และการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต) การรักษาด้วยการกดหัวสิว โดยใช้เครื่องมือ การผ่าหรือดูดเอาหนองออก และการรักษาแผลเป็น นอกจากนี้ยังมีการรักษาทางเลือก (ได้แก่ การกดจุด อาหาร สุขณบำบัด และธรรมชาติบำบัด)

2.5 สมุนไพรที่สนใจศึกษาวิจัย

1. กะเพรา (Holy Basil)⁽²⁴⁾

ภาพที่ 4 กะเพรา⁽²⁴⁾



ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ocimum sanctum* L.

ชื่อสามัญ : Holy Basil

ชื่อวงศ์ : Labiatae

ชื่อท้องถิ่น : กอมก้อดง, กอมก้อ, กะเพราขาว, กะเพราแดง, ห่อกวอซู, ห่อตุปลู, อิมคิมหล่า

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก มีเนื้อไม้ มีอายุหลายปี สูงได้ถึง 1 เมตร ทุกส่วนมีกลิ่นหอม แตกกิ่งก้านอ่อนรูปสี่เหลี่ยม มีขนปกคลุม ใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามสลับตั้งฉาก แผ่นใบรูปรีกว้าง ๆ ขอบใบหยักแบบจักฟันเลื่อย มีขนสั้น ๆ ทั้ง 2 ด้าน ก้านใบยาว ช่อดอกแบบช่อกระจุกรอบ กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันปลายแยกเป็น 5 กลีบ กลีบดอกยาว 3 มิลลิเมตร เชื่อมกันเป็นหลอดสั้น ปลายแยกเป็น 2 ปาก สีชมพู ขาว เกสรเพศผู้ 4 อัน โพล์พันหลอดดอก ผลเปลือกแข็งขนาดเล็ก สีน้ำตาล เมื่อเปียกน้ำจะเป็นเมือกหุ้มเมล็ด

ส่วนที่นำมาใช้และสารสำคัญที่ออกฤทธิ์

ursolic acid มีฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง histamine จาก mast cell และ eugenol ในน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และขับน้ำดี นอกจากนี้ยังมีสารที่ลดการอักเสบ ได้แก่ cirsilineol, cirsimaritin, isothymonin, apigenin, rosmaric acid และ eugenol

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ก. ฤทธิ์ขับลม กะเพรามีน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีฤทธิ์ขับลม eugenol ในน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดท้องเสีย

ข. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย น้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรายังมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว *P. acnes* นอกจากนี้ น้ำมันกะเพรายังสามารถออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, *Bacillus pumilus* และ *P. aeruginosa* ได้

ค. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารฟีนอลิก เช่น cirsilineol, cirsimaritin, isothymusin, apigenin, rosmarinic acid และ eugenol และสารฟลาโวนอยด์ ได้แก่ orientin และ vicenin ในใบกะเพรามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสามารถลดการเกิดออกซิเดชันของไขมันที่เกิดจากการฉายแสงในตับหนูเม้าส์ น้ำมันหอมระเหยจากใบกะเพรามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่ากรดแอสคอร์บิก (วิตามิน ซี)

2. ขมิ้นชัน (Turmeric) ⁽²⁵⁾

ภาพที่ 5 ขมิ้นชัน ⁽²⁵⁾



ชื่อวิทยาศาสตร์: *Curcuma longa* Linn.

ชื่ออังกฤษ: Turmeric

ชื่อวงศ์: Zingiberaceae

ชื่อท้องถิ่น: ขมิ้นแกง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว ขมิ้น ตายอ สะยอ หมิ้น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ไม้ล้มลุก มีเหง้าใต้ดิน เนื้อในสีเหลืองอมส้ม มีกลิ่นหอม ใบออกเป็นรัศมีติดผิวดิน รูปหอกแกมขอบขนาน ดอกออกเป็นช่อ ทรงกระบอก แทงออกจากเหง้า มีใบประดับรูปหอก สีเขียวอ่อนหรือสีขาว เรียงซ้อนกัน ร่องรับดอกย่อยแต่ละดอก กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นรูปท่อ มีขน กลีบดอกสีขาว โคนเชื่อมติดกันเป็นท่อยาวปลายแยกเป็น 3 แฉก เกสรเพศผู้ลักษณะคล้ายกลีบดอก ยอดเกสรเพศเมียรูปปากแตร รังไข่มี 3 ช่อง แต่ละช่องมีไข่อ่อน 2 ใบ

ส่วนที่นำมาใช้ และสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ ⁽²⁶⁾

ในเหง้าขมิ้นชันมีสารสำคัญในการ ออกฤทธิ์ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) ได้แก่ turmerone, zingiberene, borneol เป็นต้น และกลุ่มสารสีเหลืองส้มที่ เรียกว่า เคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) ได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxy curcumin ซึ่งสารทั้ง 2 กลุ่มจะออกฤทธิ์เสริมกันในการ รักษาอาการแน่นจุกเสียด

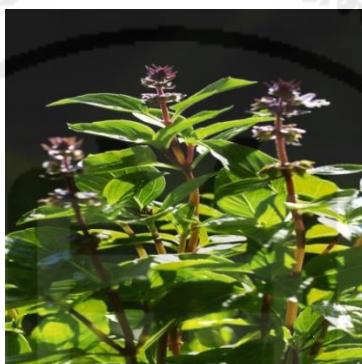
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ก. ขมิ้นชันมีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและสารพิษที่สร้างโดยแบคทีเรียหลายชนิดในหลอดทดลอง เช่น *Staphylococci* ซึ่งเป็นสาเหตุของหนอง *Samonella*, *Shigella* และ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร

ข. ขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวน้ำหนักรากได้หลายชนิด โดยเฉพาะในรูปน้ำมันหอมระเหยจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคกลาก เช่น *Microsporum*, *Trichophyton*

3. โหระพา (Sweet Basil) ⁽²⁷⁻²⁸⁾

ภาพที่ 6 โหระพา ⁽²⁸⁾



ชื่อวิทยาศาสตร์: *Ocimum basilicum* L.

ชื่อสามัญ: Sweet Basil

วงศ์: Labiatae

ชื่ออื่น: ห่อกายหาว ห่อวอซู (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) อิมคิมขาว (ฉาน-แม่ฮ่องสอน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ⁽²⁷⁾

เป็นพืชล้มลุก ลำต้นมีขนาดเล็ก มีลักษณะหรือลักษณะพิเศษของโหระพาดังนี้ เป็นพืชที่มีอายุได้หลายฤดู มีลักษณะลำต้นเป็นสี่เหลี่ยมและเป็นพุ่ม ลำต้นจะแตกแขนงได้มากมาย กิ่งก้านมีสีม่วงแดง มีขนอ่อน ๆ ที่ผิวลำต้น ใบมีรูปร่างแบบรูปไข่ปกติจะยาวไม่เกิน ๒ นิ้ว ใบจะเรียงตัวแบบตรงกันข้ามกัน ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ใบมีสีเขียวอมม่วงและมีก้านใบยาว ดอกโหระพา ดอกมีขนาดเล็กสีขาวหรือม่วงจะออกเป็นช่อคล้ายฉัตรที่ยอด ดอกมีทั้งสีม่วง แดงอ่อน และสีขาว ในแต่ละดอกจะมีเกสรตัวผู้ 4 อัน รังไข่แต่ละอันจะมีสีม่วง เมล็ดมีสีดำมีกลิ่นหอมทั้งต้น

ส่วนที่นำมาใช้และสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ ⁽²⁸⁾

สารสกัดใบโหระพาที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ มีสีเหลืองอ่อนถึงไม่มีสี และใบโหระพายังมีน้ำมันหอมระเหยอยู่ประมาณร้อยละ 0.1-1.5 เมื่อทำการตรวจสอบด้วย gas chromatography พบว่าในน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสาร methyl chavical เป็นสารหลัก (ร้อยละ 93) และสาร

กลุ่มเทอร์พีน ได้แก่ linalool และ 1,8 cineol นอกจากนี้ยังมีสาร eugenol, caffeic acid และ rosmarinic acid เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยจากโหระพาช่วยในการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย อีกทั้งยังสามารถช่วยขับลมแก้ท้องอืดท้องเฟ้อได้อีกด้วย

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ⁽²⁸⁾

ก. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย : สารสกัดจากโหระพามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Staphylococcus*, *Enterococcus* และ *Pseudomonas* น้ำมันหอมระเหยจากโหระพาที่สกัดด้วยวิธี hydrodistillation มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ

ข. ฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อสิว : จากงานวิจัยจากมหาวิทยาลัยนเรศวรพบว่า สารสกัด ethanol ของใบโหระพามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นต้นเหตุของการเกิดสิิว *P. acnes* ได้ดีที่สุดในเมื่อเทียบกับสารสกัดจากพืชร่วมตระกูลโหระพาอื่น ๆ เช่น กะเพรา

ค. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา : น้ำมันโหระพามีสารสำคัญคือ linalool และ eugenol ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *Rhizopus stolonifer* and *Mucos spp.* น้ำมันโหระพาในขนาด 1.5 mL/L มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของไมซีเลียมเชื้อรา 22 ชนิด รวมถึงสายพันธุ์ที่สร้างไมโคท็อกซินของ *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* ด้วย

2.6 น้ำมันหอมระเหย (Essential oils) ⁽²⁹⁾

น้ำมันหอมระเหยเป็นน้ำมันที่พืชผลิตขึ้นตามธรรมชาติ โดยเก็บไว้ตามส่วนต่าง ๆ เช่น กลีบดอก ใบ ผิวของผล เกสร รากหรือเปลือกของลำต้น ซึ่งเวลาได้รับความร้อน อนุภาคเล็ก ๆ ของน้ำมันหอมระเหยเหล่านี้จะระเหยออกมาเป็นกลุ่มไอรอบ ๆ ทำให้เราได้กลิ่นหอมซึ่งกลิ่นหอมนี้จะดึงดูดแมลงให้มาผสมเกสรดอกไม้ ป้องกันการรุกรานจากศัตรูพืช ส่วนสำหรับประโยชน์ต่อมนุษย์นั้น น้ำมันหอมระเหยมีสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค บรรเทาอาการอักเสบหรือลดบวม คลายเครียด หรือกระตุ้นให้สดชื่น ทั้งนี้ขึ้นกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยค่อนข้างซับซ้อนและแปรผันตามระยะเวลาในการปลูก ฤดูกาลในการเก็บเกี่ยว ส่วนของพืชที่นำมาใช้ (เช่น ราก ใบ ลำต้น ดอก ผล เมล็ด และเปลือกต้น หรือเนื้อไม้)

น้ำมันหอมระเหยเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะมีผลเกิดขึ้น 2 ทาง คือ ถ้าให้โดยรับประทาน ทางผิวหนัง หรือทางทวารและช่องคลอดก็ตาม โมเลกุลของสารจะสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดไปมีผลต่ออวัยวะต่าง ๆ และถูกขับออกได้เช่นเดียวกับโมเลกุลของยาเมื่อเข้าสู่ร่างกาย แต่ถ้าให้โดยการสูดดม โมเลกุลของน้ำมันหอมระเหยจะซึมผ่านเยื่อช่องจมูกหรือลงสู่ปอดและเข้าสู่กระแสเลือดได้เช่นเดียวกับการให้โดยวิธีอื่น ขณะเดียวกันโมเลกุลของน้ำมันหอมระเหยที่สูดดมเข้าไปจะไปจับกับตัวรับ (receptor) บนเยื่อช่องจมูก และแปลสัญญาณเป็นสื่อระบบประสาทหรือสัญญาณไฟฟ้าทาง

เคมี ผ่านทาง olfactory nerve เข้าสู่ limbic system ในสมอง ซึ่งควบคุมความรู้สึกสัมผัส เพศ อารมณ์ และระบบย่อยอาหาร มีผลกระตุ้นหรือระงับระบบประสาทสมอง รวมทั้งระบบต่อมไร้ท่อ ต่าง ๆ ด้วย ซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้น ๆ ดังนั้น จึงถูกนำมาใช้ บำบัดโรคเกี่ยวกับอารมณ์และจิตใจ ตลอดจนการหลังฮอร์โมนบางชนิดด้วย

นอกจากนี้จากผลการวิจัยทางการแพทย์ยังพบว่าโครงสร้างทางโมเลกุลของน้ำมันหอมระเหย ต่าง ๆ ซึ่งเป็น aromatic compounds นั้น มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโรคได้ดี จึงมีการใช้อย่างกว้างขวาง ในการให้ทางผิวหนังโดยการนวด ตลอดจนการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านเครื่องสำอางได้อีกด้วย

2.7 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์⁽³⁰⁾

ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ คือ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญ (microbiostatic) และ/หรือ ความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (microbicidal) ซึ่งแบ่งเป็น 2 วิธีหลัก ๆ ดังนี้

1. Dilution Susceptibility Test

การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี dilution test จะเป็นการทดสอบในเชิง ปริมาณ เพราะสามารถทราบค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่ทำลายเชื้อได้ นิยมใช้ทดสอบเชื้อ ที่เจริญได้ช้า ใช้ทดสอบยืนยันผลวิธี diffusion ที่ให้ความไวปานกลางหรือดีเยี่ยม เพื่อว่าจะสามารถใช้ สารสกัดสมุนไพรนั้นในจำนวนสูง ๆ ได้ และใช้ทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการ ดำรงชีพ (anaerobe) หลักการโดยทั่วไปของวิธีทดสอบแบบ broth และ agar dilution susceptibility test จะคล้ายคลึงกัน คือ จะเจือจางสารสกัดสมุนไพรใน medium ให้ได้ความเข้มข้น ต่าง ๆ จากนั้นจึงใส่เชื้อลงใน / บน medium ที่มีสมุนไพร ภายหลังการบ่มเพาะ ให้ดูค่า minimal inhibitory concentration ทั้งนี้โดยสังเกตความขุ่นหรือใสของ broth และมีหรือไม่มีเชื้อเจริญขึ้น บนอาหารแข็ง

1) Broth dilution test

เป็นการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อสมุนไพรที่ละเอียดวิธีหนึ่ง การทดสอบนี้จะทำให้ ทราบทั้ง MIC และ minimal bactericidal concentration ของสมุนไพรนั้น ๆ กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ ทำการทดสอบ หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ซึ่งมีสารสกัดสมุนไพรในปริมาณต่าง ๆ กันผสมอยู่ และสังเกตการณ์เจริญเติบโตของเชื้อ

MIC เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ หน่วยที่ใช้ โดยทั่วไปคือ ไมโครกรัม (μg) ต่อมิลลิลิตร (mL) หรือหน่วยสากล (IU, international unit) ต่อ มิลลิลิตร ค่า MIC นี้ สามารถนำมาใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่ง ๆ ต่อยาต้านจุล ชีพหลาย ๆ ชนิด หรือความไวของเชื้อหลาย ๆ ชนิดต่อยาหนึ่ง ๆ และรวมทั้งเพื่อประเมินค่าอื่นที่

เกี่ยวข้องกับยาหรือแปรผลของยาต่อเชื้อ ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC ยา ควรได้รับการเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงทุก 2 เท่า ไปเรื่อย ๆ (2-fold serial dilution)

MLC (minimal lethal concentration) เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าทำลายเชื้อ (หรือมีเชื้อเจริญไม่เกินกำหนด) หากเชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรีย อาจใช้คำที่จำเพาะเจาะจงกว่า คือ MBC แต่ถ้าเป็นรา อาจใช้คำว่า MFC (minimal fungicidal concentration) ยาต้านจุลชีพที่มีวิธีการออกฤทธิ์เป็นชนิดฆ่าทำลาย (microbicidal) จะมีค่า MIC และ MLC เหมือนหรือใกล้เคียงกัน (ไม่เกินหนึ่งหรือสองความเข้มข้น; $MLC/MIC \leq 4$)

2) Agar dilution test

เป็นการทดสอบความไวของเชื้อแบบปริมาณวิเคราะห์โดยมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ broth dilution method ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น กล่าวคือทำการทดสอบโดยการเจือจางสารทดสอบในอาหารวุ้น และถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารวุ้น ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันได้ วิธีนี้สามารถหาค่า MIC ได้ แต่ไม่สามารถหาค่า MLC ได้ ค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อเป็นค่า MIC

2. Agar diffusion Test

วิธีที่ใช้แพร่หลายมากที่สุด คือ disc diffusion method (Kirby-Bauer) เนื่องจากสะดวกประหยัด และใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ วิธีนี้เป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ สามารถบอกผลได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ ไม่อาจทราบค่า MIC หรือ MLC ได้ ไม่เหมาะในการทดสอบเชื้อที่เจริญช้า และเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศในการดำรงชีพ หลักการทั่วไปคือ การทำให้สารสกัดสมุนไพรที่มีในแผ่นกระดาษกรอง (paper disc) ที่เตรียมไว้ก่อน ซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้กระจายเชื้อ (spread) ในจำนวนที่เหมาะสมไว้ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญเติบโต อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสไม่มีโคโลนีเชื้อรอบ ๆ แผ่น disc ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแปรตามขนาดของ inhibition zone วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบสมุนไพรเพียงความเข้มข้นเดียว และใช้เป็นการตรวจกรองฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรเบื้องต้น นอกจากขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่ได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบแล้ว ยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ขนาดโมเลกุลของสารสกัดสมุนไพร ความสามารถในการละลายหรือซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อของสมุนไพร อัตราการเจริญของเชื้อ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเพาะเชื้อ

การแปรผลของวิธีนี้จะสามารถบอกได้เพียงว่าสมุนไพรที่ความเข้มข้นนั้น ๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากหรือน้อยตามขนาดของบริเวณใสเท่านั้น และอาจใช้การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เกิดจากยาปฏิชีวนะมาตรฐานก็ได้

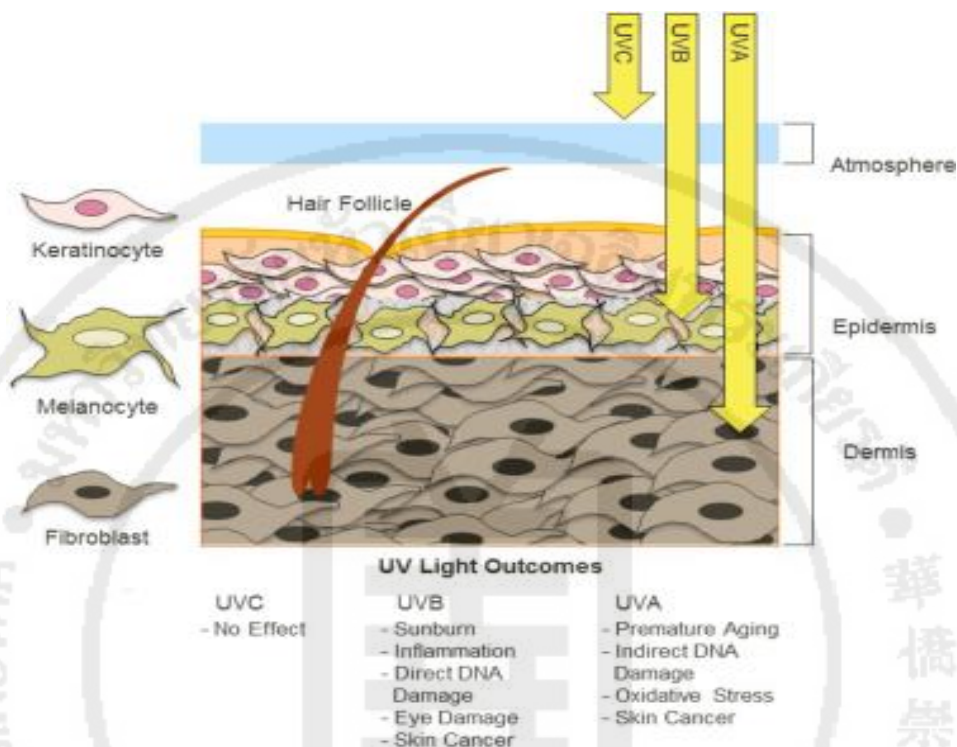
2.8 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

อนุมูลอิสระ (free radicals) ⁽³¹⁾ หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจนทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุลกลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา (ดังสมการ 1 และ 2)

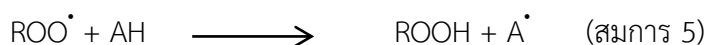


ในทางเครื่องสำอาง แสงแดดก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งของการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งแสงแดดส่วนที่มาถึงพื้นโลก ประกอบด้วย รังสีอัลตราไวโอเล็ต หรือยูวี (คือ รังสียูวีเอ รังสียูวีบี และรังสียูวีซี) เป็นรังสีที่มองเห็นด้วยตาเปล่า และรังสีอินฟราเรด ซึ่งรังสีเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อผิวหนังต่างกัน โดนทั่วไปแล้วเมื่อรังสีจากแสงแดดผ่านเข้าสู่ผิวหนังจะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาลูกโซ่ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) โดยเป้าหมายการทำลายของอนุมูลอิสระ คือฟอสโฟลิพิด เป็นไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นส่วนประกอบของผิวหนัง ไขมันเหล่านี้จะถูกเปลี่ยนเป็นลิปิดเปอร์ออกไซด์ เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีนจะเกิดเม็ดสีหรือ Lipofuscin และมีการสะสมตามอายุมากขึ้น ส่วนที่ได้จากการสลายตัวของลิปิดเปอร์ออกไซด์ คือ มาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) จะเข้าจับและทำลายคอลลาเจน จึงเป็นสาเหตุทำให้ความยืดหยุ่นของผิวหนังลดลง และดูแก่ก่อนวัย ⁽³²⁾

ภาพที่ 7 ผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อผิวหนังจากรังสี UV



สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ คือสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระโดยประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ไขมันและสารประกอบที่ละลายในน้ำ โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการต้านอนุมูลอิสระหลายแบบ เช่น ให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ (free radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะหนักที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ได้ (metal chelation) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibition) เป็นต้น กลไกการต้านอนุมูลอิสระ ดังสมการ 3, 4 และ 5⁽³¹⁾



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

ซึ่งสารอนุมูลอิสระสำหรับป้องกันการออกซิเดชันของผิวหนังส่วนใหญ่จะใช้เป็นส่วนผสมทางด้านเครื่องสำอาง มีหลายชนิดด้วยกัน อาจจัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

ในกลุ่มวิตามิน (เช่น วิตามินอี วิตามินซี วิตามินเอ ไนอะซินาไมด์ เป็นต้น) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (เช่น butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole) และสารอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ (เช่น สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ โคเอนไซม์คิวเทน เบต้า แคโรทีน ไลโคปีน รวมไปถึงสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ เช่น ชาเขียว เปลือกสน เมล็ดองุ่น เมล็ดลิ้นจี่ คุมินอยด์จากขมิ้นชัน เปลือกมังคุด เป็นต้น) ซึ่งสารอนุมูลอิสระแต่ละชนิดใช้เพื่อป้องกันภาวะเครียดออกซิเดชันของผิวหนังในตำรับเครื่องสำอาง ซึ่งจะมีจุดประสงค์การใช้ที่เหมือนกันและต่างกันในบางประเด็นของสารแต่ละชนิด⁽³²⁾

2.9 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination)⁽³¹⁾

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแต่ละประเภทจะมียุทธวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน โดยปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบและสรุปผล

1. วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพเป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่าง ๆ เช่น การทำให้เกิดสี การทำให้เกิดตะกอน ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย และการถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่าง ๆ (เช่น Shinoda test และ Pew test) โครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) และการตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

2. วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ วิธีที่นิยมได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH[•]) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น ABTS^{•+} และ DPPH[•] การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน (เช่น trolox, vitamin C และ ferrous sulfate) หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

แสดงได้ 2 แบบ คือ แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และ (2) แบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50 % (IC₅₀, 50 % of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ทั้งสองแบบสามารถแสดงหน่วยได้หลากหลาย ได้แก่ $\mu\text{M}/\text{mg}$, mM/mg , $\mu\text{M}/\text{mL}$, mM/mL เป็นต้น

วิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH[•] เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระ DPPH[•] (DPPH[•], diphenyl-picrylhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัวและมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ DPPH[•] ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วย ethanol (สารที่ให้อิเล็กตรอน) จะทำให้สีม่วงจางลง ๆ จนเป็นสีเหลือง (ดังสมการ 5) ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มีดเป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถหาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้



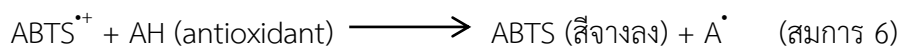
$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

A_s = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ trolox แสดงค่าเป็น trolox equivalent antioxidant capacity มีหน่วยเป็น mM/mg หรือ $\mu\text{M}/\text{mg}$ ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

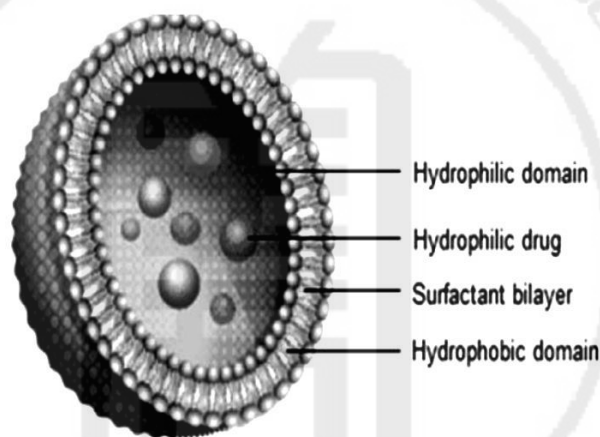
วิธี TEAC เป็นวิธีการวัดความสามารถในการฟอกสี ABTS^{•+} เป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนน้ำเงินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เนื่องจากสีของ ABTS^{•+} ปกติจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูง จึงต้องทำการเจือจาง ABTS^{•+} ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ ABTS^{•+} ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างที่ละลายด้วย ethanol เจือจางซึ่งจะทำให้สีจางลง (ดังสมการ 6) และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา จึงสามารถหาความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ซึ่งวิธีการคำนวณและการเทียบกับสารมาตรฐาน trolox กระทำเช่นเดียวกับวิธี DPPH ข้อดีของวิธีการนี้ คือ ABTS^{•+} ละลายได้ดีในน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์จึงทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH กว้าง



2.10 นีโอโซม (Niosome)⁽¹¹⁾

นีโอโซมมีลักษณะเป็นถุงทรงกลมขนาดเล็กคล้ายกระเปาะที่เก็บกักสารต่าง ๆ ไว้ภายใน อนุภาคเหล่านี้มีลักษณะโครงสร้างของผนังเซลล์เป็นผนังสองชั้น ซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวของ โมเลกุลสารลดแรงตึงผิวที่มีสมบัติขั้ว และไม่มีขั้วอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวโดย นำส่วนที่มีสมบัติเหมือนกันเข้าหากันและมีการซ้อนกันเป็นผนังอาจเรียงตัวเป็นชั้นเดียวหรืออาจเกิด ได้มากกว่าหนึ่งชั้น นีโอโซมส่วนใหญ่มีขนาดอนุภาคในช่วง 30-120 nm (ภาพที่ 8)

ภาพที่ 8 โครงสร้างและการจัดเรียงตัวของนีโอโซม⁽¹¹⁾



1. ข้อดีของนีโอโซม⁽¹¹⁾

- 1) นีโอโซมเป็นอนุภาคที่กระจายตัวในวัฏภาคน้ำจึงได้รับการยอมรับจากผู้ป่วยมากกว่า ระบบที่มีรูปแบบยาเตรียมเป็นน้ำมัน (oil base system)
- 2) โครงสร้างของนีโอโซมมีส่วนที่ชอบน้ำและชอบน้ำมัน ดังนั้น จึงสามารถใช้กับตัวยา ที่มีสมบัติการละลายแตกต่างกันได้หลายชนิด
- 3) ลักษณะของนีโอโซมที่เป็นถุงทรงกลมซึ่งกักเก็บตัวยาไว้ภายใน สามารถควบคุมการ ปลดปล่อยและเพิ่มความคงตัวของยาได้ทั้งนี้ความสามารถในการซึมผ่าน (permeability)
- 4) นีโอโซมเป็นระบบนำส่งที่สามารถควบคุมสมบัติต่าง ๆ เช่น ขนาด จำนวนชั้น (lamellarity) ประจุที่ผิวอนุภาค ปริมาตรของอนุภาค และความเข้มข้นของยาได้ตามต้องการ
- 5) นีโอโซมสามารถเพิ่มชีวประสิทธิผลของยา
- 6) นีโอโซมสามารถเพิ่มการซึมผ่านยาทางผิวหนังได้
- 7) สารลดแรงตึงผิวที่เป็นองค์ประกอบของนีโอโซมสามารถสลายตัวได้ในร่างกาย เข้า กันได้กับร่างกายและไม่เป็นสารก่อให้เกิดภูมิคุ้มกัน

- 8) เป็นระบบที่สามารถบริหารยาได้หลายวิธี เช่น ทางรับประทาน ยาฉีด และ ยาที่ใช้สำหรับผิวหนัง เป็นต้น และยังใช้เป็นตำรับสำหรับดวงตาได้ โดยพบว่านิโอโซมไม่ระคายเคืองต่อดวงตาและเพิ่มการดูดซึมยาผ่านดวงตาได้
- 9) เป็นระบบที่ทำให้ยาอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้น
- 10) นิโอโซมสามารถนำส่งยาสู่เซลล์หรืออวัยวะเป้าหมายได้

2. การเตรียมนิโอโซม⁽¹¹⁾

วิธีการเตรียมนิโอโซมมีหลายวิธี โดยทั่วไปแล้วกระบวนการเตรียมนิโอโซมมักใช้พลังงานมาเกี่ยวข้อง เช่น ความร้อนและแรงเฉย่า เป็นต้น วิธีการเตรียมมีผลต่อลักษณะของนิโอโซม โดยนิโอโซมอาจมีลักษณะเป็นอนุภาคชั้นเดียวหรือหลายชั้นก็ได้ ซึ่งนิโอโซมอาจมีขนาดเล็กได้ถึงระดับนาโนเมตร นอกจากนี้วิธีการเตรียมมีผลต่อจำนวนชั้นของอนุภาค แล้วยังมีผลต่อขนาดและการกระจายตัวของขนาดอนุภาค ประสิทธิภาพในการกักเก็บยา และความสามารถในการซึมผ่านเมมเบรนของอนุภาคด้วย วิธีการเตรียมนิโอโซมมีดังนี้

การเตรียมนิโอโซมโดยการใช้อีเธอร์ (Ether injection method) เตรียมโดยการนำสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุมาละลายในอีเธอร์ แล้วฉีดสารละลายนี้ด้วยเข็มเบอร์ 14 ลงในน้ำหรือบัฟเฟอร์ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 60°C คนสารละลายทิ้งไว้เพื่อระเหยอีเธอร์ ขณะที่อีเธอร์ระเหยออกไปจะเกิดการเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวเกิดเป็นอนุภาคชั้นเดียว ขนาดอนุภาค 50-1000 nm

การเตรียมนิโอโซมโดยทำให้เกิดฟิล์มและเฉย่าด้วยมือ (Hand-shaking method) สารลดแรงตึงผิวและ cholesterol ถูกละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (เช่น อีเธอร์ คลอโรฟอร์ม หรือ methanol เป็นต้น) ในขวดก้นกลมแล้วนำมาระเหยตัวทำละลายออกไปด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จนกระทั่งเกิดเป็นแผ่นฟิล์มแห้งแล้วเติมบัฟเฟอร์หรือน้ำ เพื่อให้เกิดการพองตัวที่อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสถานะ (Phase transition temperature: T_c) ของสารลดแรงตึงผิวและ cholesterol ที่ใช้ แล้วเฉย่าของเหลวในระหว่างที่แผ่นฟิล์มพองตัวเข้ากับบัฟเฟอร์ จะเกิดการฟอร์มตัวเป็นอนุภาคนิโอโซมที่มีการจัดเรียงตัวหลายชั้น การเติมตัวยาในขั้นตอนใดจะขึ้นกับสมบัติการละลายของตัวยา หากตัวยาละลายน้ำได้ดีตัวยาจะถูกผสมในน้ำหรือบัฟเฟอร์ และจะถูกกักเก็บไว้ภายในนิโอโซม หากตัวยาละลายน้ำน้อย ตัวยาจะถูกผสมในตัวทำละลายอินทรีย์และจะถูกกักเก็บในชั้นที่ไม่ชอบน้ำของนิโอโซม ความสามารถในการกักเก็บยาเมื่อเตรียมโดยวิธีนี้ประมาณ 78%

การเตรียมนิโอโซมโดยการใช้เครื่องไมโครฟลูอิดไดเซอร์ (Microfluidizer) การเตรียมนิโอโซมวิธีนี้เตรียมโดยการนำสารละลายของยามาเติมลงในของผสมสารลดแรงตึงผิวกับ cholesterol แล้วนำมาผ่านเครื่องไมโครฟลูอิดไดเซอร์ซึ่งใช้แรงดันของเหลวผ่านช่องที่มีขนาดเล็ก

ด้วยความเร็วสูง(100 mL/min) ทำให้อนุภาคที่ได้มีขนาดเล็กและการกระจายขนาดอนุภาคแคบหากใช้เวลาในการผ่านเครื่องไมโครฟลูอิดโตเซอร์นานขึ้นจะส่งผลทำให้ขนาดเฉลี่ยของอนุภาคเล็กลง

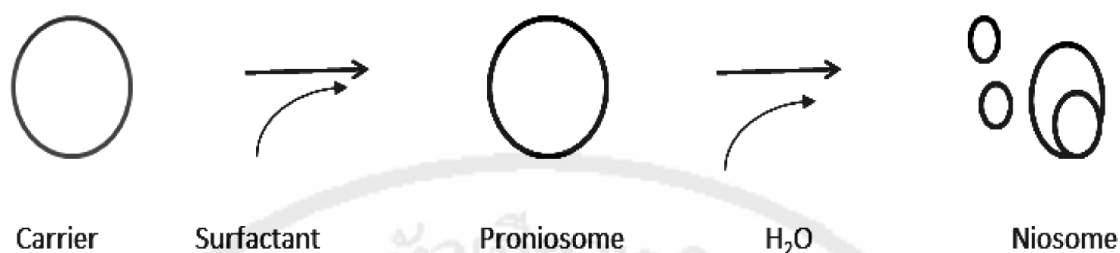
การเตรียมนิโอโซมโดยใช้แรงดันผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาดเล็ก (Multiple membrane extrusion method) สารลดแรงตึงผิว cholesterol และ dicetyl phosphate ถูกละลายในคลอโรฟอร์มแล้วนำมาระเหยให้เกิดแผ่นฟิล์ม เติมน้ำหรือบัฟเฟอร์เพื่อทำให้แผ่นฟิล์มเกิดการพองตัว นำของผสมมาลดขนาดอนุภาคโดยใช้แรงดันผ่านแผ่นกรองชนิดโพลีคาร์บอเนตที่มีขนาดรูพรุน 100-200 nm จำนวน 8 รอบ ซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดสำหรับการควบคุมขนาดอนุภาคโดยเฉพาะกับสารที่ละลายตัวเมื่อถูกความร้อน

การเตรียมนิโอโซมโดยวิธีการกลับวัฏภาค (Reverse Phase Evaporation Technique: REV)วิธีนี้เตรียมโดยการละลายสารลดแรงตึงผิวกับ cholesterol ในอัตราส่วน 1: 1 ในคลอโรฟอร์ม เติมหาละลายยาลงไปจะเกิดของเหลวขาวขุ่น ควบคุมสถานะของผสมให้มีอุณหภูมิ 4-5 °C แล้วใช้คลื่นเสียง จนได้เจลที่มีลักษณะใสหลังจากนั้นเติมหาละลายบัฟเฟอร์ลงไปพร้อมกับเขย่า นำของผสมมาระเหยตัวทำละลายอินทรีย์โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 40 °C และลดความดันด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน ยาเตรียมที่ได้จะมีลักษณะหนืด นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 10 นาที จนเกิดเป็นนิโอโซมที่มีการจัดเรียงชั้นเดียวขนาดอนุภาค 500 nm

การเตรียมนิโอโซมโดยกักเก็บยาจากความแตกต่างของสถานะความเป็นกรดต่าง เป็นวิธีเตรียมนิโอโซมแบบใหม่ที่สามารถเตรียมตำรับโดยใช้เพียงชั้นตอนเดียวและไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ระบบจะเป็นขวดกักกลมที่มีข้อต่อทั้งหมด 3 ส่วน ข้อต่อนี้จะทำให้เกิดการควบแน่นของไอน้ำให้กลับเข้ามาในระบบและมีข้อต่อหนึ่งที่มีช่องทางสำหรับให้ก๊าซไนโตรเจนเข้ามาแทนที่ก๊าซออกซิเจนในระบบ วิธีนี้เตรียมโดยผสมองค์ประกอบทั้งหมดในสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ที่อยู่ในขวดกักกลมภายใต้อุณหภูมิ 70 °C หลังจากนั้นปั่นผสมด้วยเครื่องปั่นผสมความแรงสูงทันทีเป็นเวลานาน 15 วินาทีของผสมจะมีการเกิดเป็นนิโอโซมเนื่องจากใช้อุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงและควบคุมขนาดอนุภาคให้มีขนาดเล็ก

การเตรียมนิโอโซมจากโพรนิโอโซม (proniosome) วิธีนี้เป็นการเตรียมนิโอโซมโดยการเคลือบผงของสารที่ละลายน้ำได้ เช่น ซอร์บิทอล ซูโครสสเตียเรท กลูโคสโมโนไฮเดรต แล็กโทสโมโนไฮเดรต ผงสเปรย์แลคโตสแห้งและมอลโตเดกซ์ทริน เป็นต้น ด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุสารที่ละลายน้ำนี้เปรียบเสมือนเป็นตัวกลางที่ช่วยกระจายตัวของสารลดแรงตึงผิวเมื่อน้ำเติมเข้ามาในระบบ (ภาพที่ 9) ทั้งนี้ น้ำหรือบัฟเฟอร์ที่เติมลงไปจะต้องมีอุณหภูมิมากกว่าค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสถานะ (Tc) ของสารลดแรงตึงผิว และในระหว่างการเติมบัฟเฟอร์ ให้เขย่าเพื่อให้เกิดการกระจายตัว ดังนั้นโพรนิโอโซมจึงมีลักษณะเป็นผงที่พร้อมจะเกิดนิโอโซมเมื่อมีการเติมสารละลายบัฟเฟอร์นั่นเอง

ภาพที่ 9 ขั้นตอนการเกิดนิโอโซมจากโพรนิโอโซม (33)



2.11 การตรวจสอบน้ำมันระเหยและผลิตภัณฑ์จากน้ำมันระเหยโดยวิธีแกสโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC-MS) ⁽³⁴⁻³⁵⁾

การวิเคราะห์น้ำมันระเหยนั้นสามารถจำแนกตามลักษณะการวิเคราะห์ได้ เป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและการวิเคราะห์เชิงปริมาณ ผลการวิเคราะห์สามารถทราบถึงองค์ประกอบทางเคมีว่าประกอบด้วยสารเคมีอะไรบ้าง ทราบความเข้มข้น ทราบสัดส่วนของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ในน้ำมันระเหยนั้น ๆ ซึ่งนำไปสู่การกำหนดมาตรฐานและการตรวจสอบมาตรฐานของน้ำมันระเหย วิธีการหรือเทคนิควิเคราะห์ทางเคมีนั้น มีหลายวิธี แต่วิธีที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์น้ำมันระเหย คือ วิธีแกสโครมาโทกราฟี เพราะวิธีนี้สิ่งที่วิเคราะห์นั้น ต้องสามารถอยู่ในสภาพแกสได้ที่อุณหภูมิเหมาะสม

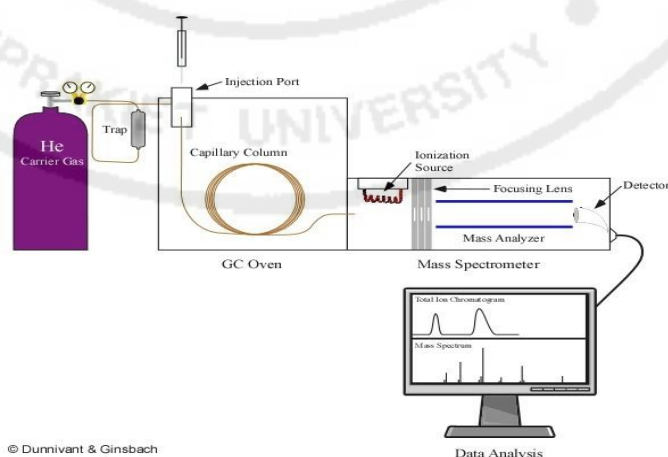
GC-MS สามารถทำนายชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารได้อย่างค่อนข้างแม่นยำโดยอาศัยการเปรียบเทียบ fingerprint ของเลขมวล (mass number) ของสารตัวอย่างนั้น ๆ กับข้อมูลที่มีอยู่ใน library นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณ (quantitative analysis) และเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) GC-MS (ภาพที่ที่ 10) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของเครื่อง GC และ MS สารผสมออกจากกัน และจำแนกชนิดของสารรวมทั้งหาปริมาณของสารได้ ⁽³⁴⁾

ภาพที่ 10 เครื่อง GC-MS



ส่วนประกอบหลักของเครื่อง ได้แก่ ส่วนหัวฉีด (injector) ส่วนตู้อบ (oven) ซึ่งบรรจุคอลัมน์ที่ใช้แยกสาร (GC column) และส่วนหัววัด (detector) อุปกรณ์ประกอบที่สำคัญคือ ถังบรรจุแก๊สตัวพา (carrier gas) อุปกรณ์ควบคุมการไหลของแก๊สตัวพา (GC pneumatics) และอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิของส่วนหัวฉีด ตู้อบ และส่วนหัววัด (ภาพที่ 11)

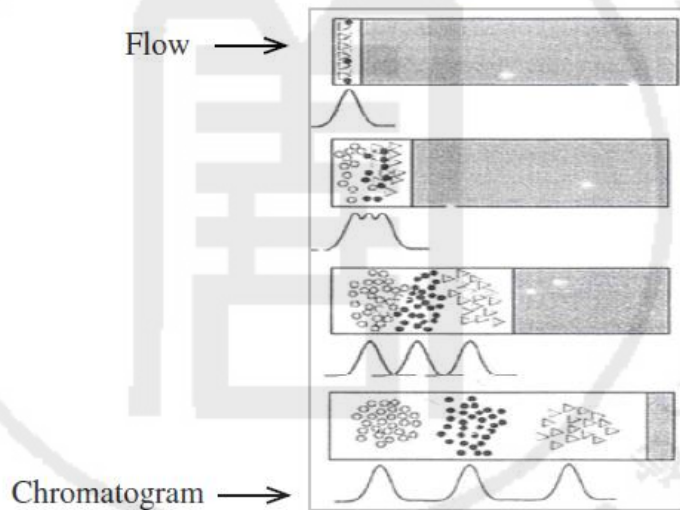
ภาพที่ 11 ส่วนประกอบหลักของเครื่อง GC



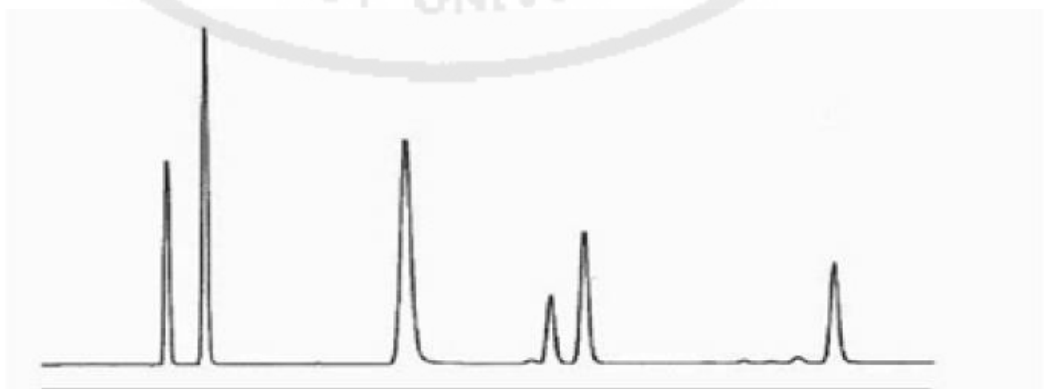
หลักการแยกสารโดยวิธีนี้ คือ เมื่อฉีดน้ำมันระเหยตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เข้าไปในส่วนหัวฉีดซึ่งตั้งอุณหภูมิไว้ในระดับที่น้ำมันจะระเหยกลายเป็นไอ แก๊สพา (ซึ่งต้องมีสมบัติเป็นแก๊สเฉื่อย ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสารที่จะวิเคราะห์ได้ เช่น ฮีเลียม ไนโตรเจน เป็นต้น) จะพาสารในสภาพไอ

ไหลเข้าสู่คอลัมน์ซึ่งเคลือบผิวภายในด้วยสารที่มีสมบัติเหมาะสมในการแยกองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันระเหย ด้วยการปรับอุณหภูมิของส่วนต้อบ ประกอบกับการปรับอัตราการไหลของแก๊สตัวพา จะทำให้สารเคมีแต่ละชนิดที่มีสมบัติต่างกันแยกออกจากกันได้ ในขณะที่ถูกตัวพาพาไหลผ่านคอลัมน์ สารเคมีที่โมเลกุลเล็กกว่า ระเหยเป็นไอได้ดีกว่า มีสมบัติการละลาย การดูดซึม ดูดซับกับสารเคลือบผิวของคอลัมน์น้อยกว่า ก็จะผ่านออกมาจากคอลัมน์ และเข้าสู่ส่วนหัววัดก่อนสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในน้ำมันระเหยจะทยอยแยกออกจากกันในระหว่างการเดินทางผ่านคอลัมน์และเข้าสู่ส่วนหัววัด ปริมาณสารที่ผ่านส่วนหัววัดในช่วงเวลาต่าง ๆ จะถูกแปลงเป็นสัญญาณไฟฟ้าส่งเข้าเครื่องประมวลผลและพิมพ์ผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม (chromatogram) (ภาพที่ 12-13)

ภาพที่ 12 การแยกสารภายใน GC column ⁽³⁴⁾



ภาพที่ 13 โครมาโทแกรมของสารผสมซึ่งประกอบด้วยสารองค์ประกอบอย่างน้อย 6 ชนิด (6 พีค) ⁽³⁴⁾



ส่วนเครื่องตรวจวัดของเครื่อง GC (GC detector) มีหลายประเภท แต่ที่เหมาะกับการแยกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันระเหยซึ่งมักประกอบด้วยสารเคมีหลายสิบชนิดและหลายกลุ่มสาร คือ MS (ภาพที่ 14)

ภาพที่ 14 ส่วนประกอบของแมสสเปกโตรมิเตอร์⁽³⁴⁾



เทคนิค MS อาศัยหลักการว่า เมื่อโมเลกุลของสารได้รับพลังงานจำนวนหนึ่งที่เหมาะสมจะทำให้โมเลกุลของสารแตกตัวเป็นไอออนย่อย ๆ ทั้งที่เป็นกลาง เป็นไอออนบวก และอิเล็กตรอน เครื่อง MS จะวัดมวลและประจุของไอออนที่เกิดขึ้น แล้วแปลผลออกมาเป็นอัตราส่วนของมวลต่อประจุของไอออน ซึ่งสารเคมีชนิดหนึ่ง ๆ จะมีลักษณะการแตกตัวเป็นไอออนแบบเฉพาะตัวค่าของมวลต่อประจุของไอออนของสารแต่ละชนิดแสดงได้เป็นแมสสเปกตรัม จนถึงปัจจุบันนี้มีการศึกษาแมสสเปกตรัมของสารเคมีชนิดต่าง ๆ รวมประมาณ 190,000 ชนิด แล้วนำมาเก็บรวบรวมเป็นฐานข้อมูลเพื่อการอ้างอิง (mass spectral database and search program) เช่น NIST data library, Wiley library เป็นต้น

โดยองค์ประกอบสำคัญของ MS แบ่งออกเป็น 3 ส่วนสำคัญคือ ionization source, mass analyzer และ detector โดยที่ส่วน ionization source ที่นิยมใช้มี 2 แบบ⁽³⁵⁾ คือ

ก. Electron Ionization หรือ Electron Impact (EI) เป็นการทำให้สารเกิด fragment ion โดยใช้ลำ electron ซึ่งแหล่งกำเนิดไอออน (ionization chamber) เป็นระบบสุญญากาศที่ความดันต่ำประมาณ 10^{-8} Torr โดย electron จาก filament ที่ร้อนจะถูกไฟกัสน่านห้องนี้และถูกดึงเข้าหา repeller voltage ที่มีความต่างศักย์ 70 โวลต์ ซึ่งจะให้พลังงานกับ electron เป็น 70 eV ทำให้ของผสมที่ซับซ้อนของไอออนเกิดการแตกหัก (fragmentation ion) ที่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างและความอุดมสัมพัทธ์ (relative abundance)

ข. Chemical Ionization (CI) เป็นการทำให้สารเกิดการ fragment ด้วยวิธีทางเคมีโดยผสมสารตัวอย่าง (ความดัน 10^{-4} Torr) เข้ากับแก๊สที่ทำปฏิกิริยาด้วย (ความดัน 1 Torr) แล้วผ่านสารผสมเข้าไปใน Ionization chamber โดยการทำให้เกิดการ fragment ด้วยการชนกับ electron เช่นเดียวกันแก๊สที่ใช้ได้แก่ methane, isobutane, ammonia

เมื่อองค์ประกอบทางเคมีแต่ละชนิดในน้ำมันระเหยแยกออกจากกันโดยวิธี GC แล้วจะผ่านต่อมายัง MS ได้รับพลังงานจนแตกตัวเป็นไอออน MS จะวัดมวลและประจุของไอออนที่เกิดแปรผลเป็นแมสสเปกตรัม นำแมสสเปกตรัมที่ได้ไปเทียบกับแมสสเปกตรัมของสารเคมีในฐานข้อมูลประมวลผลออกมาเป็นชนิดของสารเคมี

ปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีแต่ละชนิดคำนวณได้จากพื้นที่ใต้พีก (peak area) ซึ่งขนาดของพื้นที่หรือความสูงของพีกจะสัมพันธ์กับปริมาณของสารเคมีนั้น ๆ เทคนิค MS จึงเป็นเทคนิคที่วิเคราะห์ได้ทั้งชนิดของสารและปริมาณของสารด้วย

2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีหลากหลายงานวิจัยที่ศึกษาความสามารถของพืชสมุนไพรและน้ำมันหอมระเหยของพืชชนิดต่าง ๆ รวมถึงกะเพรา โหระพา และขมิ้นชัน ในด้านยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และมีบางงานวิจัยที่ศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม รวมทั้งมีศึกษาการนำน้ำมันหอมระเหยไปเก็บกักในนิโอโซม

Lertsatitthanakorn, P et al. (2006)⁽³⁶⁾ ได้ศึกษาความไวต่อยาของ *P. acnes* กับน้ำมันหอมระเหยจากพืช 7 ชนิดคือ ตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* L.), ตะไคร้ (*C. citratus* DC), มะกรูด (*Citrus hystrix* DC) กะเพรา (*Ocimum sanctum* L.) โหระพา (*O. basilicum* L.) ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxb) และขิง (*Z. officinale* Roscoe) ด้วยวิธี broth microdilution พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมให้ค่า MIC และ MBC ต่ำที่สุด โดยมีค่าอยู่ที่ 0.005–0.3 และ 0.6–1.2 $\mu\text{L/mL}$ ตามลำดับ ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ อยู่ที่ 0.6 $\mu\text{L/mL}$ และจากน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูด กะเพรา และโหระพาอยู่ที่ 5 $\mu\text{L/mL}$ และ 50 $\mu\text{L/mL}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH free radical scavenging assay ให้ค่า IC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา (0.03 $\mu\text{L/mL}$), น้ำมันหอมระเหยจากไพล (6.9 $\mu\text{L/mL}$) น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม (2 $\mu\text{L/mL}$) และน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา (3.0 $\mu\text{L/mL}$) ต่ำกว่าของ ascorbic acid (7.9 $\mu\text{L/mL}$) ฤทธิ์การต้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหยสามารถวัดค่าได้ด้วยวิธี 5-lipoxygenase inhibition assay พบว่า ค่า IC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา (0.04 $\mu\text{L/mL}$) น้ำมันหอมระเหยจากมะกรูด (0.05 $\mu\text{L/mL}$) น้ำมันหอมระเหยจาก

ตะไคร้หอม (0.15 $\mu\text{L/mL}$) มีค่าต่ำกว่าของ nordihydroquaretic acid (1.7 $\mu\text{g/mL}$) และน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา (มากกว่า 0.06 $\mu\text{L/mL}$)

นุศวัตติ พจนานุกิจ และคณะ (2013)⁽³⁷⁾ ได้ทดสอบการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* และเชื้อ *S. aureus* ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ เปลือกมังคุด ขมิ้นชัน และใบบัวบก จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและใบบัวบก พบว่าโซนยับยั้งเชื้อ (Inhibition zone) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุดมีค่ามากกว่าสารสกัดจากขมิ้นชันและใบบัวบก ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากัน และการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและ ใบบัวบก สำหรับเชื้อ *P. acnes* มีค่าเท่ากับ 12.5, 25 และ 200 mg/mL ตามลำดับและเชื้อ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 6.25, 12.5 และ 200 mg/mL ตามลำดับ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและใบบัวบก สำหรับเชื้อ *P. acnes* มีค่าเท่ากับ 25, 50 และ 200 mg/mL ตามลำดับและเชื้อ *S. aureus* มีค่าเท่ากับ 12.5, 25 และ 200 mg/mL ตามลำดับ

Bunrathep, S et al. (2007)⁽³⁸⁾ ทำการศึกษาส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา แมงลัก ยี่หระ และกะเพรา ด้วยวิธี hydrodistillation และ GC-MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดนั้นมีองค์ประกอบของ terpenoids และ phenylpropanoids ซึ่งประกอบด้วย methyl chavicol (92.48%), citral (71.99%), and (Z)- β -ocimene (48.28%) ซึ่งพบเป็นหลักในโหระพา, แมงลัก และยี่หระตามลำดับ ในขณะที่กะเพราแดง และกะเพราขาว มีองค์ประกอบหลักเป็น methyl eugenol ที่ 47.18% และ 53.67% ตามลำดับ จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดไปศึกษา กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH radical scavenging method พบว่าค่า EC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา แมงลัก ยี่หระ กะเพราแดง และกะเพราขาว และจาก α -tocopherol, BHT เป็น 47057.45, 8343.19, 30.20, 343.56, 767.82, 62.77 และ 19.77 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ นั่นคือ น้ำมันหอมระเหยจากยี่หระมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

Viyoch, J et al. (2006)⁽³⁹⁾ ได้ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา กะเพรา และแมงลัก ต่อ *Propionibacterium acnes* ด้วยวิธี agar dilution assay พบว่าค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา และกะเพราเป็น 2.0% และ 3.0% v/v ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากแมงลักไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* และจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่า methyl chavicol (93.0%) เป็นองค์ประกอบหลักในโหระพา ส่วน methyl eugenol (41.5%), gamma-caryophyllene (23.7%) และ eugenol (11.8%) เป็นองค์ประกอบหลักในกะเพรา และแมงลักมีองค์ประกอบส่วนมากเป็น geraniol (32.0%) และ neral (27.2%) และพบ methyl chavicol (0.8%) ในปริมาณน้อย

ประภัสสร วีระพันธ์ และคณะ (2011)⁽⁴⁰⁾ ได้ทำการศึกษาพืช 8 ชนิด คือ กะเพรา กานพลู ตะไคร้หอม ตะไคร้บ้าน แผลหอม มะนาว โรสแมรี่ และอบเชย นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย ด้วยวิธี GC-MS พบว่าองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำมันคือ citral, methyl eugenol, cinnamaldehyde, citronellal, eugenol, limonene, 1,8-cineole และ zizanoic acid ตามลำดับ และทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี DPPH พบว่า IC₅₀ ที่ใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุดในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH คือ น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา (0.037±0.003) และรองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (0.134±0.005) และ lipid peroxidation inhibition (TBARs) IC₅₀ ในการยับยั้ง การเกิด lipid peroxidation ด้วยวิธี TBARs ต่ำที่สุดคือ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (0.012±0.048) และรองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้บ้าน (0.019±0.006), น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา (0.037±0.048), น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู (0.279±0.048) และน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม (1.490±0.350) ตามลำดับ การศึกษานี้พบว่า น้ำมันหอมที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุุดจากทั้ง 2 วิธีคือ น้ำมันจากกะเพรา และรองลงมาคือ กานพลู อย่างไรก็ตาม การที่น้ำมันหอมจากสมุนไพรแต่ละชนิด มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ไม่เท่ากัน เนื่องจากองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดต่างกัน

Sharafati, R et al. (2015)⁽⁴¹⁾ ทำการทดลองเพื่อหาองค์ประกอบ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ น้ำมันหอมระเหยจาก *O. basilicam* น้ำมันหอมระเหยถูกแยกด้วยวิธี hydrodistillation แล้ววิเคราะห์ด้วย GC MS ผลความแตกต่างต่างของความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย (0.00, 0.062, 0.125, and 0.25%) ต่อ lipid oxidation และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่อุณหภูมิในการเก็บรักษา 4±1 °C เป็นเวลา 12 วัน พบว่าสารประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหย คือ methyl chavicol (85.19%), 1,8 cineol (3.96%), trans-alpha bergamotene (1.18%) and linalool (1.03%) และน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ในเบอร์เกอร์เนื้อได้ (P<0.05) อีกทั้งเบอร์เกอร์เนื้อยังมีกลิ่นที่ดีขึ้นเมื่อประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย 0.125% (P<0.05) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเพื่อลด lipid oxidation ในเบอร์เกอร์เนื้อดิบ (P> 0.05) ดังนั้น น้ำมันหอมระเหยสามารถใช้เป็นสารต้านการเจริญของแบคทีเรียและเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น เบอร์เกอร์เนื้อได้

Gounder, DK et al. (2012)⁽⁴²⁾ ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นสด, แห้ง และผง พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับองค์ประกอบของขมิ้น ซึ่งพบว่าองค์ประกอบหลักคือ ar-turmerone (21.0–30.3%), α-turmerone (26.5–33.5%) and β-turmerone (18.9–21.1%) จากการทดสอบการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระด้วย ABTS assay พบว่าค่า TEAC ของน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นสด, แห้ง และผงเป็น 38.9, 68.0 and

66.9 μM ที่ น้ำมันหอมระเหย 1mg/mL มีค่า IC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นสด, แห้ง และผง เพื่อกำจัดอนุมูล DPPH เป็น 4.4, 3.5 and 3.9 mg ของน้ำมันหอมระเหย/mL ตามลำดับ

อรัญญา มโนสร้อย และคณะ (2551)⁽⁴³⁾ ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง *P. acne* จากครีมที่ประกอบด้วยส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิดซึ่งถูกกับเก็บในไนโอโซม โดยน้ำมันหอมระเหยสกัดจาก มะกรูด, แมงลัก, กะเพรา, โหระพา และตะไคร้ พบว่าส่วนผสมของครีมที่มีน้ำมันหอมระเหยร่วมกับ 2% salicylic acid และ ครีมที่ประกอบด้วย 2% salicylic acid เพียงอย่างเดียว มีความสามารถในการยับยั้ง *P. acne* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone อยู่ที่ 21.33 ± 0.5 และ 17.66 ± 0.5 mm. ตามลำดับ และ standard erythromycin มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone อยู่ที่ 26.33 ± 0.5 mm

Atanda, O et al. (2007)⁽⁴⁴⁾ ได้นำน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา อบเชย ผักชี และใบกระวานทดสอบกับเชื้อรา *A. parasiticus* CFR 223 และสารพิษ aflatoxin จากเมล็ดข้าวสาลี พบว่าน้ำมันหอมระเหยโหระพาความเข้มข้น 5% (v/v) เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา *A. parasiticus* CFR 223 ในสภาพห้องปฏิบัติการ และหยุดการพัฒนาของเชื้อบนเมล็ดข้าวสาลี ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย และใบกระวานกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา แต่ลดความเข้มข้นของสาร aflatoxin (B1+G1) จาก 97.92% เหลือ 55.21% ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากผักชีไม่มีผลใด ๆ กับการเจริญเติบโตและการสร้างสาร aflatoxin ของเชื้อรา ในขณะที่การรวมกันของน้ำมันหอมระเหยโหระพาและอบเชยความเข้มข้นชนิดละ 2.5% (v/v) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. parasiticus* CFR 223 ได้อย่างสมบูรณ์

บทที่ 3
ระเบียบวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave SX-700, Tomy, Japan)
- 2) ตู้ปลอดเชื้อ Cass II (Laminar air flow, MARK II, Dwyer, USA)
- 3) ตู้เย็น (Hitachi, Japan)
- 4) เครื่องชั่ง (GF-300, AND, Japan)
- 5) จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
- 6) กระดาษกรอง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม.) (Filter paper, Whatman)
- 7) ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 8) หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 10 และ 20 มล.
- 9) ไม้พันสำลี
- 10) ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)
- 11) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert, Germany)
- 12) พาราฟิล์ม (Para film)
- 13) ห่วงเช็ยเชื้อ (loop)
- 14) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 15) ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette Tip) ขนาด 10, 200, 1000 μ L
- 16) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer, Scientific Industries, USA)
- 17) UV spectrophotometer (U-2900, Hitachi, Japan)
- 18) คิวเวทท์ (Cuvette)
- 19) ขวดรูปชมพู่แบบมีฝาจุก (Erlenmeyer flask)
- 20) เครื่องส่งคลื่นความถี่สูง (Sonicator, SONICS Vibra cell, USA)
- 21) ขวดก้นกลม (round-bottom flask)
- 22) เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator, BUCHI (Thailand) Ltd.)
- 23) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM, TECNAI G 20, Philips, USA)
- 24) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Ultracentrifuge, Avanti J-26 XPI, Beckman Coulter, USA)
- 25) เครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (Particle Size Analyzer, Japan)

26) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Beckman, USA)

27) GC Column (ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เมตร, เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร, Film Thickness 0.25 μm , Phenomenex[®], USA)

28) เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Agilent Technology, USA)

29) GC Column ชนิด Aqua Wax-DA (ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เมตร, เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร, Film Thickness 0.25 μm , Thermo Fisher Scientific, USA)

2. สารเคมี

- 1) น้ำกลั่น (distilled water)
- 2) Disc ยามาตรฐานแอมพิซิลลิน (Ampicillin, Fisher Scientific, England)
- 3) Ethanol (Merck, Germany)
- 4) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, Germany))
- 5) Methanol (Merck, Germany)
- 6) Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, Germany)
- 7) 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS, Sigma-Aldrich, Germany))
- 8) Potassium Persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, ajax finechem, australia))
- 9) Sorbitan monostearate (Span[®] 60, Sigma-Aldrich, Germany)
- 10) Cholesterol (Sigma-Aldrich, Germany)
- 11) Dichloromethane (Fisher Scientific, England)
- 12) Dimethyl sulfoxide (Fisher Scientific, England)
- 13) Crystal violet (Merck, Germany)
- 14) Iodine (Merck, Germany)
- 15) Potassium Iodide (KI, ajax finechem, australia))
- 16) Safranin (Merck, Germany)
- 17) Sodium chloride (NaCl, Merck, Germany)
- 18) Potassium chloride (KCl, Merck, Germany)
- 19) Sodium phosphate dibasic dehydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck, Germany)
- 20) Potassium Dihydrogenphosphate (KH_2PO_4 , Merck, Germany)
- 21) สารมาตรฐาน methyl eugenol (Sigma-Aldrich, Germany)

22) สารมาตรฐาน estragole (Sigma-Aldrich, Germany)

3. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

- 1) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990, จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)
- 2) *Propionibacterium acnes* (DMST 14916, จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) Mueller Hinton Agar (MHA, HiMedia, India)
- 2) Mueller Hinton Broth (MHB, HiMedia, India)
- 3) Tryptic Soy Agar (TSA, Difco, France)
- 4) Tryptic Soy Broth (TSB, Difco, France)

5. พืชสมุนไพรที่ใช้ศึกษา(น้ำมันหอมระเหย)

- 1) น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา (H, จากบริษัท Botanicessence, Thailand)
- 2) น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน (T, จากบริษัท Botanicessence, Thailand)
- 3) น้ำมันหอมระเหยจากโหระพา (S, จากบริษัท Botanicessence, Thailand)

3.2 วิธีการวิจัย

1. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย

1) การเตรียมสารละลายตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

(1) การเตรียมน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยว

เจือจางน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวทั้ง 3 ชนิด คือ น้ำมันหอมระเหยจากกะเพรา (H) น้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน (T) และน้ำมันหอมระเหยจากโหระพา (S) โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ให้มีความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 mg/mL เพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

(2) การเตรียมน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม

เจือจางน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด คือ H, T และ S โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย ให้มีความเข้มข้น 0.3125, 0.625, 1.25, 2.50 และ 5.00 mg/mL แล้วนำสารละลายน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด มาผสมกันในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งจะให้ได้ความเข้มข้นรวมของของน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม คือ น้ำมันกะเพราผสมขมิ้นชัน (HT), กะเพราผสมโหระพา (HS) และขมิ้นผสมโหระพา (TS) เท่ากับ 0.625, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 mg/mL (ดังตารางที่ 1) เพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารละลายน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมสำหรับศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916)

ความเข้มข้นของ H (mg/mL)	ความเข้มข้นของ T (mg/mL)	ความเข้มข้นของ S (mg/mL)	ความเข้มข้นของ สารละลายน้ำมันหอม ระเหยชนิดผสม (mg/mL)
0.3125	0.3125	-	0.625
0.625	0.625	-	1.25
1.25	1.25	-	2.50
2.50	2.50	-	5.00
5.00	5.00	-	10.00

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ความเข้มข้นของ H (mg/mL)	ความเข้มข้นของ T (mg/mL)	ความเข้มข้นของ S (mg/mL)	ความเข้มข้นของ สารละลายน้ำมันหอม ระเหยชนิดผสม (mg/mL)
0.3125	-	0.3125	0.625
0.625	-	0.625	1.25
1.25	-	1.25	2.50
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	2.50
-	2.50	2.50	5.00
-	5.00	5.00	10.00

2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

(1) การเตรียมอาหารแข็ง (Agar)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามน้ำหนักที่กำหนด (38 กรัม สำหรับ Mueller Hinton Agar (MHA) และ 40 กรัม สำหรับ Tryptic Soy Agar (TSA) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ให้ความร้อนพร้อมกับคนไปด้วยจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด ใส่ภาชนะ (ขวดแก้ว) แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว ทิ้งให้แห้งนำมาผึ่งใน sterile hood ให้ผิวหน้าแห้ง ใช้ทดสอบทันทีหรือเก็บไว้ในตู้เย็น 4°C

(2) การเตรียมอาหารเหลว (Broth)

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามน้ำหนักที่กำหนด (21 กรัม สำหรับ Mueller Hinton Agar (MHB) และ 30 กรัม สำหรับ Tryptic Soy Broth (TSB)) เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ให้ความร้อนพร้อมกับคนไปด้วยจนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายหมด แบ่งใส่ภาชนะ (ขวดแก้ว) และแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 mL แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3) การตรวจสอบยืนยันความบริสุทธิ์ของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990)

และ *P. acne* (DMST 14916)

เชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) จำแนกโดยคุณลักษณะรูปร่างของเชื้อด้วยการย้อมติดสีแกรม โดยนำเชื้อที่ต้องการย้อมมาเกลี่ยบนสไลด์ ทิ้งให้แห้งแล้ว heat fix โดยผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แห้งยึดติดกับสไลด์ หยดสี ammonium oxalate crystal violet บนเชื้อที่เกลี่ยเป็นเวลา 1-2 นาที แล้วเทสีทิ้ง จากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนบนเชื้อที่เกลี่ย ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วเททิ้ง สารละลายไอโอดีนจะช่วยให้เซลล์ติดสีย้อมได้ดีขึ้น นำแบคทีเรียมาล้างสีด้วย ethanol ประมาณ 30 วินาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำ ทำการหยดสี safranin นาน 15-30 วินาที ล้างน้ำ ซับให้แห้ง ทำการตรวจดูรูปร่างของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

4) การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916)

(1) ทำการเชื้อเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารแข็งที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง ประมาณ 2-3 โคโลนี ใส่ในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองซึ่งมีปริมาตรหลอดละ 5 mL โดยเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) เลี้ยงใน MHB ส่วนเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) เลี้ยงใน TSB

(2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C โดย *S. epidermidis* (ATCC 14990) เลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่ *P. acnes* (DMST 14916) เลี้ยงภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

(3) จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland No. 0.5 เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 1×10^6 Colony forming unit /mL

5) การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) โดยวิธี disc diffusion เทียบกับยา Ampicillin

(1) การเตรียม disc ของน้ำมันหอมระเหย

นำสารละลายน้ำมันหอมระเหยชนิดเดี่ยวและชนิดผสม ที่เตรียมได้ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดใส่แผ่น disc แล้วนำไปอบที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(2) การเตรียม disc ของตัวทำละลาย (negative control)

นำ DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายปรับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดใส่แผ่น disc แล้วนำไปอบที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

(3) นำอาหาร MHA ปริมาตร 14 mL มาตัม จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงอุณหภูมิประมาณ 50°C จึงนำมาเทใส่จานเพาะเลี้ยงเชื้อ

(4) ใช้ไม้พันสำลีขนาดมาตรฐานชุบ suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้ นำมาป้ายบนผิวหน้าของอาหาร MHA ให้ทั่วจานอาหาร โดยป้าย 3 ครั้ง แต่แต่ละครั้งให้หมุนจานอาหารเลี้ยวเข้าไป 60°C

(5) ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง 3 - 5 นาที จึงนำ disc ของน้ำมันหอมระเหย, disc ของตัวทำละลาย และ disc ของยา Ampicillin 10 µg (positive control) มาวางบนผิวหน้าอาหาร กดเบา ๆ ให้แต่ละ disc อยู่ห่างจากกันและห่างจากขอบจาน ให้มากที่สุด (ดังภาพที่ 15)

(6) นำจานอาหารที่ผสมเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสถานะที่มีออกซิเจน ส่วนอาหารที่ผสมเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) ให้วางเรียงซ้อนกันใน anaerobic jar แล้วใส่ gaspak® ปิดฝาทันที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

(7) วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น โดยทำการวัดใน 3 ทิศทาง แต่ละทิศทางทำมุมกัน 60 องศา หาค่าเฉลี่ย และบันทึกผลการทดลองที่ได้ ขนาดโซนยับยั้งที่วัดได้เป็นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc และ ขนาดโซนยับยั้งของเชื้อ ลบด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc (6 มิลลิเมตร)

(8) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ภาพที่ 15 ตำแหน่งการวาง disc ในวิธี disc diffusion



6) การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ (minimal inhibitory concentration, MIC) ของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method)

(1) เตรียมเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) โดยมีปริมาณของเชื้อของเชื้อเท่ากับ 1×10^6 CFU/mL

(2) เตรียม MHB ใส่หลอดทดลอง ตั้งแต่หลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 10 หลอดละ 1 mL

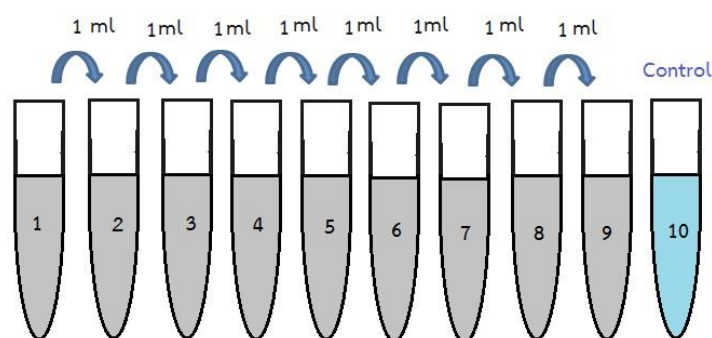
(3) เติมน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว และชนิดผสมที่ความเข้มข้น 32.768 mg/mL ลงในหลอดที่ 1 จำนวน 1 mL และทำการเจือจางส่วนผสมในหลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 9 แบบ serial two-fold dilution โดยดูดสารละลายในหลอดที่ 1 จำนวน 1 mL ใส่ในหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายในหลอดที่ 2 จำนวน 1 mL ใส่ในหลอดที่ 3 ผสมให้เข้ากัน ทำดังนี้ไปเรื่อย ๆ จนถึงหลอดที่ 9 และดูดสารละลายจากหลอดที่ 9 ที่จำนวน 1 mL (ดังภาพที่ 16)

(4) เติมเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) ที่เตรียมไว้ โดยมีความเข้มข้นประมาณ 10^6 CFU/mL ลงในหลอดที่ 1 ถึงหลอดที่ 10 จำนวนหลอดละ 1 mL ดังนั้นในปริมาตรสุดท้ายของแต่ละหลอดจะเป็น 2 mL. ผสมให้เข้ากัน (ความเข้มข้นน้ำมันหอมระเหย ที่มีอยู่ในหลอดทดลองที่ 1 ถึงหลอดที่ 9 จะเป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, ... จนถึง 1:512 ตามลำดับ หลอดที่ 10 เป็นหลอดควบคุม คือ มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อ) แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เพาะเลี้ยง

สำหรับเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) ทดสอบในทำนองเดียวกันแต่ใช้อาหารเหลวเป็น TSB และบ่มเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

(5) อ่านผลโดยดูความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (หลอดที่ไม่ขุ่น) ซึ่งถือเป็น MIC บันทึกหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ภาพที่ 16 ขั้นตอนการเจือจาง serial two-fold dilution ในวิธี MIC

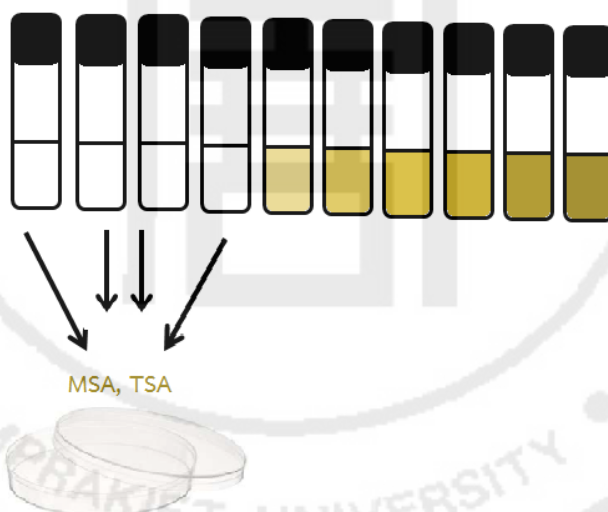


7) การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลชีพ (minimal bactericidal concentration, MBC) ของน้ำมันหอมระเหย

(1) นำหลอดที่ทำการทดสอบหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดไป spread plate บนอาหาร TSA (สำหรับเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) และอาหาร MHA (สำหรับเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) (ดังภาพที่ 17) แล้วนำไปบ่ม 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สำหรับเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และที่ 72 ชั่วโมง (สำหรับเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916)

(2) อ่านผล โดยดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบนจานอาหารเพาะเชื้อ ค่า MBC คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ทำให้ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถฆ่าเชื้อได้)

ภาพที่ 17 ขั้นตอนในวิธี MBC โดยคัดเลือกหลอดที่ไม่มีเชื้อเจริญ (ไม่มีความขุ่น) จากวิธี MIC มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง



2. การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ดัดแปลงจากวิธีของ Fatma et al. (2013)⁽⁴⁵⁾

(1) การเตรียมสารละลาย DPPH

ชั่ง DPPH จำนวน 4 mg ใน volumetric flask 100 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 100 ml ได้สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 mM

(2) เตรียมสารละลาย L-ascobic acid (positive control)

ชั่งสาร L-ascobic acid แล้วปรับความเข้มข้นด้วย methanol โดยปรับให้มีความเข้มข้น 0.01-10.00 mg/mL

(3) เตรียมน้ำมันหอมระเหย

เตรียมน้ำมันหอมระเหยโดยเจือจางน้ำมันหอมระเหยชนิดเดียว และชนิดผสม ด้วย methanol ที่ช่วงความเข้มข้น 0.01-10.00 mg/mL

ขั้นตอนการทดลอง

- ปิเปตสารละลาย L-ascobic acid หรือสารละลายน้ำมันหอมระเหยแต่ละความเข้มข้นมา จำนวน 1 mL ผสมกับสารละลาย DPPH จำนวน 2 mL จากนั้นนำมาเจือจางด้วย methanol
- ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย UV/VIS spectrophotometer ที่ 515 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- สร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง % inhibition และความเข้มข้น รายงานผลเป็นค่า IC_{50}

2) 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) assay

การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS^{•+} ดัดแปลงจากวิธีของ Li, S et al. (2013)⁽⁴⁶⁾

(1) การเตรียมสารละลาย potassium persulfate ($K_2S_2O_8$)

ชั่ง potassium persulfate จำนวน 0.0662 g ใน volumetric flask 100 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 100 mL ได้สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 2.45 mM

(2) การเตรียมสารละลาย ABTS^{•+}

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

(3) เตรียมสารละลาย L-ascobic acid (positive control)

ชั่ง L-ascobic acid แล้วปรับความเข้มข้นด้วย methanol ที่ช่วงความเข้มข้น 0.01-10.00 mg/mL

(4) เตรียมน้ำมันหอมระเหย

เตรียมน้ำมันหอมระเหยโดยเจือจางน้ำมันหอมระเหยชนิดเดียว และชนิดผสม ด้วย methanol ที่ช่วงความเข้มข้น 0.01-10.00 mg/mL

ขั้นตอนการทดลอง

- oxidize สารละลาย ABTS^{•+} ด้วย $K_2S_2O_8$ อัตราส่วน 1:1 ทิ้งให้ทำปฏิกิริยา นาน 12-16 ชั่วโมง
- จากนั้นนำมาเจือจางด้วย methanol นำไปวัดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.70 ± 0.05
- จากนั้นดูดสารละลาย ABTS^{•+} ที่ถูก oxidize มาจำนวน 2.5 mL ใส่หลอดทดลอง

- เติมน้ำมันหอมระเหย หรือ L-ascobic acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 0.5 mL ผสมให้เข้ากัน ทิ้งให้ทำปฏิกิริยาในที่มืด 30 นาที
- จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร บันทึกค่าที่ได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- นำค่า absorbance ที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ยแล้ว นำมาคำนวณหา % inhibition ABTS^{•+} จากสมการ

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

โดย As =

$$Ac = \text{absorbance ที่วัดได้ของ methanol ผสมกับสารละลาย ABTS}^{\bullet+}$$

- สร้างกราฟเส้นตรงระหว่าง % inhibition และความเข้มข้น รายงานผลเป็นค่า IC₅₀

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิค GC-MS

น้ำมันหอมระเหยชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อสิวและต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดจะถูกวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ ด้วยเครื่อง GC-MS โดยเทียบกับสารสำคัญมาตรฐานของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า HS มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) รวมทั้งสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหย ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ โดยใช้สภาวะ ดังนี้ คอลัมน์เป็นชนิด ZB-5MSi GC Columns (ยาว 30 mm, เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 μm, film thickness 0.25 mm) อุณหภูมิของส่วนที่ฉีดสาร (injector) 250°C อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นจาก 50°C (คงที่ไว้ 5 นาที) เพิ่มอุณหภูมิ 10°C/นาที จนถึง 80°C จากนั้นเพิ่ม 5°C/นาที จนกระทั่งอุณหภูมิ 180°C และเพิ่มขึ้นในอัตรา 30°C/นาที จนเป็น 240°C (คงที่ไว้ 5 นาที) ก๊าซพาเป็นก๊าซฮีเลียม อัตราการไหล 1 mL. ต่อนาที ปริมาณที่ฉีด 1 μL มีแมสสเปกโตรเมตรีเป็น detector ซึ่งมี ionization source เป็น electron impact 70 eV, mass analyzer เป็น quadrupole อุณหภูมิของส่วน ionization 200°C อุณหภูมิของส่วน mass analyzer 50°C และ 280°C ช่วงมวลในการวิเคราะห์ 50-650 amu

1) การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่องแกสโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (GC-MS, AOAC., 2002) ⁽⁴⁷⁾

(1) การทดสอบจำเพาะเจาะจง (specificity)

ทำการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหย HS โดยใช้สภาวะที่ได้พัฒนาวิเคราะห์โดยตรวจสอบว่าสารสำคัญ methyl eugenol และ estragole มีพีคบวมนหรือไม่ และเปรียบเทียบ mass spectra และ retention time (RT) ของสารตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน เพื่อตรวจสอบว่า

mass spectra และ RT ของสารตัวอย่างมีความจำเพาะกับ mass spectrum และ RT ของสารมาตรฐาน

(2) การทดสอบความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity)

- เตรียมสารมาตรฐาน methyl eugenol ที่ความเข้มข้น 0.26-4.12 mg/mL และ estragole ที่ความเข้มข้น 0.27-4.21 mg/mL โดยใช้เฮกเซน

- ฉีดสารละลายมาตรฐาน โดยฉีดซ้ำความเข้มข้นละ 3 ครั้ง นำค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคของแต่ละความเข้มข้นพล็อตกับความเข้มข้น (mg/mL) ของสารละลายมาตรฐานเพื่อทำกราฟมาตรฐาน

- หาค่า correlation coefficient ของสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ทั้ง 5 ความเข้มข้น

(3) การทดสอบความเที่ยง (Precision)

- ฉีดสารละลายน้ำมันหอมระเหย HS ปริมาตร 1 μ L เข้าเครื่อง GC-MS ซ้ำ 6 ครั้ง ทำการวิเคราะห์ในวันเดียวกัน (intra-day) และวิเคราะห์ในวันต่างกัน (inter-day)

- คำนวณค่าความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ในรูป %RSD ดังนี้

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

โดยที่ SD = Standard deviation

\bar{X} = ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้พีคของน้ำมันหอมระเหย HS

(4) การทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

- เตรียมสารละลาย HS ความเข้มข้น 0.1 mg/mL

- เติมสารละลายมาตรฐาน methyl eugenol และ estragole ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนลงใน HS โดยครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของปริมาณ methyl eugenol และ estragole ในน้ำมัน HS 3 ระดับ ที่ร้อยละ 80, 100 และ 120

- วิเคราะห์สารละลายด้วยเครื่อง GC-MS แต่ละความเข้มข้นทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณผลเป็นค่าร้อยละการกลับคืน (%recovery)

$$\%recovery = \frac{Ca - Cb}{Cc} \times 100$$

โดย Ca = ปริมาณ methyl eugenol และ estragole ที่วิเคราะห์ได้จาก HS ที่เติมสารมาตรฐาน methyl eugenol และ estragole

Cb = ปริมาณ methyl eugenol และ estragole ใน HS

Cc = ปริมาณสารมาตรฐาน methyl eugenol และ estragole ที่เติมลงไป ใน HS
เกณฑ์การยอมรับของร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 80.00-120.00 ในแต่ละระดับ
(AOAC.,2002)

2) การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของ HS

ทำวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญใน HS ด้วยเครื่อง GC-MS โดยเทียบกับสารมาตรฐาน methyl eugenol และ estragole ด้วยสภาวะที่พัฒนาแล้ว โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ
คำนวณหาปริมาณสารสำคัญ methyl eugenol และ estragole ในน้ำมันหอมระเหย HS

4. การเตรียมนิโอโซมน้ำมันหอมระเหย HS และการประเมินสมบัติ

1) การเตรียมนิโอโซมบรรจุน้ำมันหอมระเหย

เตรียมโดย thin-film method ซึ่งทำตามขั้นตอนต่อไปนี้ ดัดแปลงจากวิธีของ Navya et al., 2014⁽⁴⁸⁾

(1) ชั่ง Span[®] 60 cholesterol และน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม (ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด) ตามสูตรตำรับจากตารางที่ 2 ลงใน round-bottom flask ขนาด 1 ลิตร

(2) เติม co-solvent (สารละลาย dichloromethane: methanol อัตราส่วน 4:1) ปริมาตร 40 mL ลงใน round-bottom flask แล้วเขย่าจน Span[®] 60 และ cholesterol ละลายหมด

(3) ระเหยเอา co-solvent ออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°C จนได้ฟิล์มที่แห้งสนิท ไม่มีกลิ่นของ dichloromethane

(4) เติม phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 ปริมาตร 40 mL แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง vortex จนกระทั่งฟิล์มหลุดออกจากผนัง round-bottom flask จนหมด

(5) นำไปหมุนต่อโดยใช้เครื่อง rotary evaporator เพื่อให้เกิดนิโอโซมที่มีขนาดสม่ำเสมอ

(6) เทนิโอโซมที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง นำไป sonicate ด้วยเครื่อง Probe Sonicator ที่ความถี่ 50 Hz เพื่อลดขนาดอนุภาคเป็นเวลา 0, 2 และ 5 นาที

(7) นำนิโอโซมที่ได้ไปทำการทดลองเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การเก็บกักน้ำมันหอมระเหยในนิโอโซม

ตารางที่ 2 สูตรตำรับนิโอโซม

ตำรับ	ส่วนประกอบ (มิลลิกรัม)			เวลาที่ใช้ sonicate (นาที)
	Span [®] 60	Cholesterol	น้ำมัน HS	
F1	60	40	40	0
F2	60	40	40	2
F3	60	40	40	5
F4	70	30	40	0
F5	70	30	40	2
F6	70	30	40	5
F7	80	20	40	0
F8	80	20	40	2
F9	80	20	40	5
F10	90	10	40	0
F11	90	10	40	2
F12	90	10	40	5

2) การตรวจสอบสมบัติ (characterization) นิโอโซมน้ำมันหอมระเหย HS

(1) การตรวจสอบคุณลักษณะภายนอก (Appearance)

ตรวจสอบลักษณะภายนอกและการเกิดตะกอนของสูตรตำรับที่เตรียมได้ด้วยตาเปล่า สังเกตและบันทึกผลการทดลอง

(2) การวัดขนาด และการกระจายตัวของอนุภาค

วัดขนาดอนุภาคแบบการกระจายตัวของนิโอโซมที่เตรียมได้ โดยเครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (DelsaTM Nano C, Particle Size Analyzer, Japan) ทำได้โดยการการนำตำรับนิโอโซมที่เตรียมใส่ลงไปใน quartz cuvette จากนั้นใส่ลงในช่องสำหรับตรวจวัดขนาดของเครื่อง ซึ่งเชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ที่มีระบบประมวลผล บันทึกผลเป็นขนาดอนุภาคและค่าการกระจายของอนุภาค โดยแต่ละตัวอย่างทำการตรวจวัด 3 ครั้ง

(3) การทดสอบหาความสามารถในการเก็บกักน้ำมันหอมระเหย HS ของ นิโอโซม

(3.1) การพัฒนาวิธีวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหย HS ที่บรรจุในตำรับนิโอโซม ด้วยเทคนิค GC-MS

ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้ คอลัมน์ชนิด AquaWax-DA capillary columns (ยาว 30 m, เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m) อุณหภูมิ injection เท่ากับ 250°C อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นจาก 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) ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา 1.0 mL/min ปริมาตรที่ฉีด 0.4 μ L มี ionization source เป็นชนิด electron impact 70 eV, mass analyzer เป็นแบบ quadrupole ใช้ mass range ตั้งแต่ 50-500 m/z

(3.2) การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยผสม ที่บรรจุในตำรับนิโอโซมด้วยเครื่อง GC-MS

ทำการทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) ความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้น (linearity) ความเที่ยง (Precision) และความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีวิเคราะห์

(3.3) การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันหอมระเหย HS ที่ถูกกักเก็บในตำรับ นิโอโซม (F1-F12) ด้วยเครื่อง GC-MS

- นำตำรับนิโอโซมที่เตรียมได้ไปปั่นแยกตะกอน โดยใช้เครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็วรอบ 65,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C

- ตูดส่วนใสออกไปให้เหลือแต่ตะกอนของนิโอโซมผสมน้ำมันหอมระเหย และเติมสารละลาย dichloromethane และ ethanol ในอัตราส่วน 1:1 เพื่อทำละลายผนังของนิโอโซมให้แตกและปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ภายในออกมา นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

- นำส่วนของสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ถูกเก็บกักไว้ในนิโอโซมด้วยเครื่อง GC-MS โดยใช้สภาวะที่พัฒนาวิธีวิเคราะห์แล้ว เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน methyl eugenol และ estragole ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีใน H และ S โดยเจือจางในสารละลาย dichloromethane และ ethanol ในอัตราส่วน 1:1 ที่ช่วงความเข้มข้นของ 0.25-4.00 mg/mL บันทึกค่าที่อ่านได้

- นำค่าที่บันทึกได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกักเก็บน้ำมันหอมระเหยใน
 นิโอโซม (% entrapment) คัดเลือกตำรับนิโอโซมที่มีร้อยละการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยดีที่สุด
 เพื่อทำการทดสอบต่อไป

$$\text{ร้อยละการกักเก็บ} = \frac{\text{ปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยที่ถูกกักเก็บ}}{\text{ปริมาณน้ำมันหอมระเหยทั้งหมดที่ใช้}} \times 100$$

3) การประเมินสมบัติของตำรับนิโอโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหย HS ได้ดีที่สุด

(1) การศึกษาสัณฐานวิทยาของตำรับนิโอโซม

ทำการตรวจสอบลักษณะรูปร่างของนิโอโซมตำรับที่มีร้อยละการกักเก็บน้ำมัน
 หอมระเหยได้ดีที่สุด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรซ์ (polarized light microscopy) และ
 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)

(2) การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของตำรับนิโอโซม

นำตำรับนิโอโซมเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4°C และ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สังเกต
 ลักษณะทางกายภาพโดยทำการวัด ค่าความเป็นกรดต่าง ความหนืด ขนาดอนุภาค การกระจายตัว
 และวิเคราะห์หาปริมาณการกักเก็บน้ำมัน HS ของนิโอโซมที่เตรียมได้ โดยทำการประเมินทุก ๆ
 สัปดาห์เป็นเวลาระยะเวลา 8 สัปดาห์

(3) การทดสอบความคงตัวของประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ
 เชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย HS
 ที่ถูกกักเก็บ และไม่ถูกกักเก็บในนิโอโซม

ทำการเปรียบเทียบความคงตัวของสูตรตำรับน้ำมันหอมระเหยที่ถูกกักเก็บในนิ
 โอโซม และไม่ถูกกักเก็บในนิโอโซม ซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะชนิดเดียวกัน ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8
 สัปดาห์ ทำการเก็บวิเคราะห์ผลทุกสัปดาห์ เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC
 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) โดยวิธี disc diffusion

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

- ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง 3 - 5 นาที จึงนำ disc น้ำมันหอมระเหยในรูป
 นิโอโซม, disc น้ำมันหอมระเหย (ที่ไม่ได้ถูกกักเก็บในนิโอโซม), disc สารละลาย dichloromethane
 และ ethanol ในอัตราส่วน 1:1 (negative control) และ disc ยา Ampicillin 10 µg (positive
 control) มาวางบนผิวหน้าอาหาร (ดังภาพที่ 18)

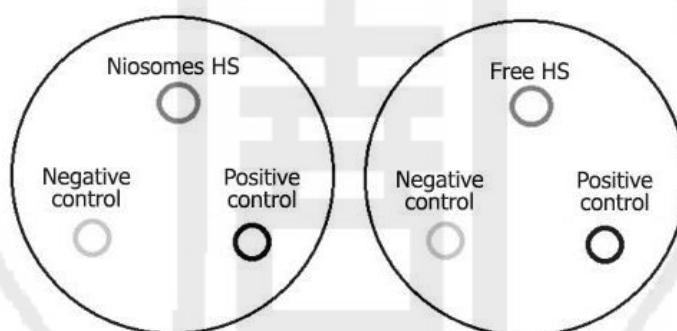
- นำจานอาหารที่ผสมเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) ไปบ่มเพาะเชื้อที่
 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนอาหารที่ผสมเชื้อ *P. acnes*

(DMST 14916) ให้วางเรียงซ้อนกันใน anaerobic jar แล้วใส่ gaspak[®] ปิดฝาทันที นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

- วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง ที่เกิดขึ้นโดยทำการวัดใน 3 ทิศทาง แต่ละทิศทางทำมุมกัน 60 องศา หาค่าเฉลี่ย และบันทึกผลการทดลองที่ได้ ขนาดโซนยับยั้งที่วัดได้เป็นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc และขนาดโซนยับยั้งของเชื้อ ลบด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc (6 มิลลิเมตร) และลบด้วย negative control (รายงานผลเป็นร้อยละของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับสปีดดาห์ที่ 0 โดยกำหนดให้สปีดดาห์ที่ 0 เท่ากับ 100%)

- ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

ภาพที่ 18 ตำแหน่งการวาง disc ในวิธี disc diffusion

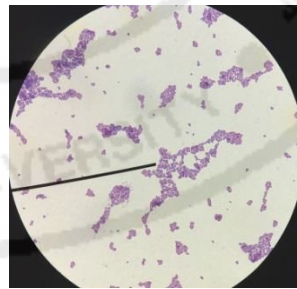
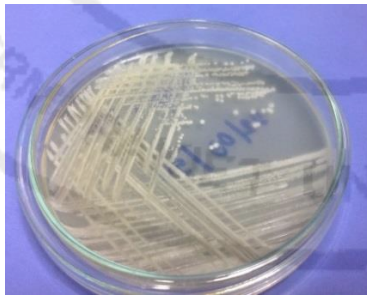


บทที่ 4 ผลการวิจัย

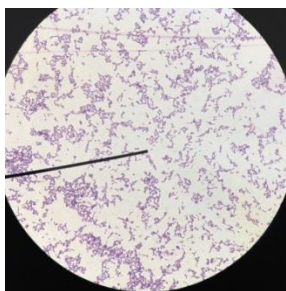
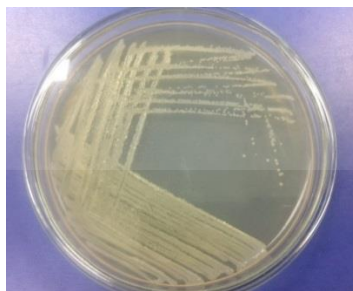
4.1 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) โดยสังเกตลักษณะบนอาหารแข็ง และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) บนอาหารแข็งมีลักษณะเหมือนกันคือ โคโลนีมีสีขาวครีม กลม ขอบเรียบ และมีลักษณะนูน และไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีความแตกต่างกัน โดยที่เชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะกลม (cocci) เกาะรวมตัวกันคล้ายรวงอู่น ส่วนเชื้อ *P. acne* (DMST 14916) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะ pleomorphic rod ดังแสดงในภาพที่ 19 และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เช่นเดียวกับบนอาหารแข็ง

ภาพที่ 19 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) บนอาหาร MHA (ซ้าย, a) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ขวา, a) ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *P. acne* (DMST 14916) บนอาหาร TSA (ขวา, a) และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ขวา, b)



a



b

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

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 3 ชนิด คือ H, T และ S ทั้งแบบเดี่ยว และชนิดผสม (HT, HS และ TS) ที่ระดับความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 mg/mL ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว 2 ชนิด คือ เชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) โดยทำการทดสอบด้วยวิธี disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยทุกชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อไม่เท่ากัน (ตารางที่ 3-4) พบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ช่วงความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ 0.625-10.00 mg/mL ยิ่งความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยสูงขึ้นส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวมากขึ้น โดยชนิดของน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ HS ที่ความเข้มข้น 10.00 mg/mL มีโซนยับยั้งต่อเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) เท่ากับ 37.33 ± 0.58 mm และ 39.00 ± 1.00 mm ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเคียงกับ Ampicillin 10 μ g (Positive control) ที่มีโซนยับยั้งต่อเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) เท่ากับ 29.00 ± 0.00 mm และ 30.00 ± 0.00 mm ตามลำดับ สำหรับ DMSO (negative control) ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่นำมาทำการทดสอบ

ตารางที่ 3 ขนาดโซนยับยั้ง (mm) จากผลการทดสอบประสิทธิภาพสารละลายน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990)

สารที่ใช้ทดสอบ	ขนาดโซนยับยั้ง (mm) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>S. epidermidis</i> (ATCC 14990) ของน้ำมันหอมระเหยในแต่ละความเข้มข้น*				
	0.625 mg/mL	1.25 mg/mL	2.50 mg/mL	5.00 mg/mL	10.00 mg/mL
H	7.33±0.58 ^b	9.67±1.15 ^{b^c}	13.00±1.00 ^{bc}	19.67±0.58 ^{cd}	30.67±0.58 ^d
S	10.33±0.58 ^d	12.00±0.00 ^e	15.33±0.58 ^e	21.00±1.00 ^e	35.33±0.58 ^e
T	5.00±0.00 ^a	7.33±0.58 ^a	10.00±0.00 ^a	15.67±0.58 ^a	18.33±0.58 ^a
HS	13.00±0.00 ^e	15.33±0.58 ^f	18.33±0.58 ^f	23.00±0.00 ^f	37.33±0.58 ^f **
HT	7.33±0.58 ^b	8.67±0.58 ^b	12.33±0.58 ^b	18.00±0.00 ^b	24.00±0.00 ^b
ST	8.67±1.53 ^c	10.67±0.58 ^{cd}	14.00±1.00 ^c	19.33±0.58 ^c	26.33±0.58 ^c
DMSO	-	-	-	-	-

* ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* ค่าเฉลี่ย (a,b,c,...) ที่อยู่ในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

* ค่าเฉลี่ย cd, bc ที่อยู่ในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

** เทียบเคียงกับ Ampicillin 10 µg (positive control) มีโซนยับยั้ง 29.00±0.00 mm

ตารางที่ 4 ขนาดโซนยับยั้ง (mm) จากผลการทดสอบประสิทธิภาพสารละลายน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. acne* (DMST 14916)

สารที่ใช้ทดสอบ	ขนาดโซนยับยั้ง (mm) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>P. acne</i> (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหยในแต่ละความเข้มข้น*				
	0.625 mg/mL	1.25 mg/mL	2.50 mg/mL	5.00 mg/mL	10.00 mg/mL
H	9.33±0.58 ^c	11.33±0.58 ^{ab}	16.33±0.58 ^c	21.00±0.00 ^c	32.33±0.58 ^c
S	12.33±0.58 ^d	15.67±0.58 ^c	18.67±0.58 ^d	22.00±1.73 ^c	36.00±0.00 ^e
T	6.33±0.58 ^a	9.67±1.15 ^a	12.67±0.58 ^a	16.33±0.58 ^a	20.00±0.00 ^a
HS	15.67±0.58 ^e	18.67±1.53 ^d	21.00±0.00 ^e	24.33±0.58 ^d	39.00±1.00 ^f **
HT	8.00±0.00 ^b	10.33±0.58 ^a	15.33±0.58 ^b	19.33±0.58 ^b	30.67±1.53 ^b
ST	10.00±1.00 ^c	12.33±0.58 ^b	17.00±0.00 ^c	21.33±0.58 ^c	33.67±0.58 ^d
DMSO	-	-	-	-	-

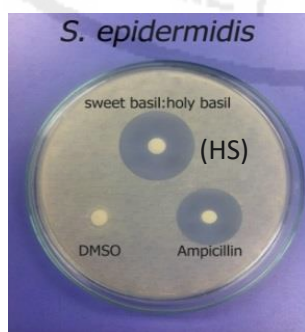
* ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* ค่าเฉลี่ย (a,b,c,...) ที่อยู่ในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

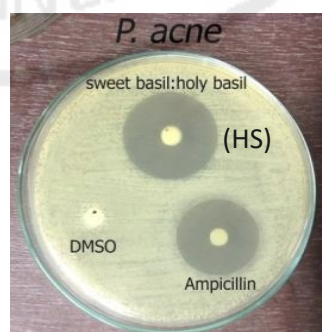
* ค่าเฉลี่ย ab ที่อยู่ในแต่ละความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

** เทียบเคียงกับ Ampicillin 10 µg (positive control) มีโซนยับยั้ง 30.00±0.00 mm

ภาพที่ 20 ตัวอย่างลักษณะโซนยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) ของ HS (a) และลักษณะโซนยับยั้งเชื้อ *P. acne* (DMST 14916) ของ HS (b) เทียบกับ Ampicillin (positive control) และสารละลาย DMSO (negative control)



a



b

4.3 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพ (minimal inhibitory concentration, MIC) และการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อจุลชีพ (minimal bactericidal concentration, MBC) ของน้ำมันหอมระเหย

จากการทดสอบค่าการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของ H, S และ T ทั้งแบบเดี่ยว และ ชนิดผสม พบว่าน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ S โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) เท่ากับ 1.024 mg/mL และต่อเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) เท่ากับ 0.512 mg/mL ส่วนน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่ดีที่สุดคือ HS มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อ แต่ละชนิดเท่ากันที่ 0.512 และ 0.256 mg/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 5) และมีฤทธิ์ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวและชนิดผสมอื่น ๆ

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบค่า MIC และค่า MBC ต่อเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย

ชนิดของน้ำมัน หอมระเหย	<i>S. epidermidis</i>		<i>P. acne</i>	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
H	2.048	4.096	1.024	1.024
S	1.024	1.024	0.512	0.512
T	32.768	32.768	8.192	16.834
HS	0.512	0.512	0.256	0.256
HT	16.384	32.768	4.096	4.096
ST	8.192	8.192	2.048	2.048

4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และวิธี 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้งแบบเดี่ยวและชนิดผสมพบว่า HS มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} จากวิธี DPPH และ ABTS radical scavenging assays เท่ากับ 0.024 ± 0.001 และ 0.012 ± 0.002 mg/mL ตามลำดับ (ตารางที่ 6) และแตกต่างจากน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวและชนิดผสมชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า HS มีประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า L-ascorbic acid ซึ่งใช้เป็น positive control (ซึ่ง L-ascorbic acid มีค่า IC_{50} จากวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 0.038 ± 0.001 และ 0.024 ± 0.002 mg/mL ตามลำดับ) อันเนื่องมาจาก HS มีสมบัติเสริมฤทธิ์กัน ทำให้ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระดีกว่า H หรือ S แบบเดี่ยว

ตารางที่ 6 ค่า IC_{50} จากวิธี DPPH และ ABTS radical scavenging ของน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวและชนิดผสม เปรียบเทียบกับ ascorbic acid

สารที่ใช้ทดสอบ	DPPH assay* IC_{50} (mg/mL)	ABTS assay* IC_{50} (mg/mL)
H	0.032 ± 0.002^b	0.016 ± 0.002^b
S	0.153 ± 0.003^d	0.070 ± 0.002^d
T	0.308 ± 0.005^s	0.206 ± 0.002^s
HS	0.024 ± 0.001^a	0.012 ± 0.002^a
HT	0.163 ± 0.003^e	0.124 ± 0.004^e
ST	0.205 ± 0.003^f	0.181 ± 0.002^f
Ascorbic acid	0.038 ± 0.001^c	0.024 ± 0.002^c

* ค่าเฉลี่ย (a,b,c,...) ที่อยู่ในแต่ละวิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิค GC-MS

ในการวิเคราะห์ที่ใช้สภาวะ ดังนี้ อุณหภูมิ injection เท่ากับ 250°C อุณหภูมิของคอลัมน์ เริ่มต้น 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)

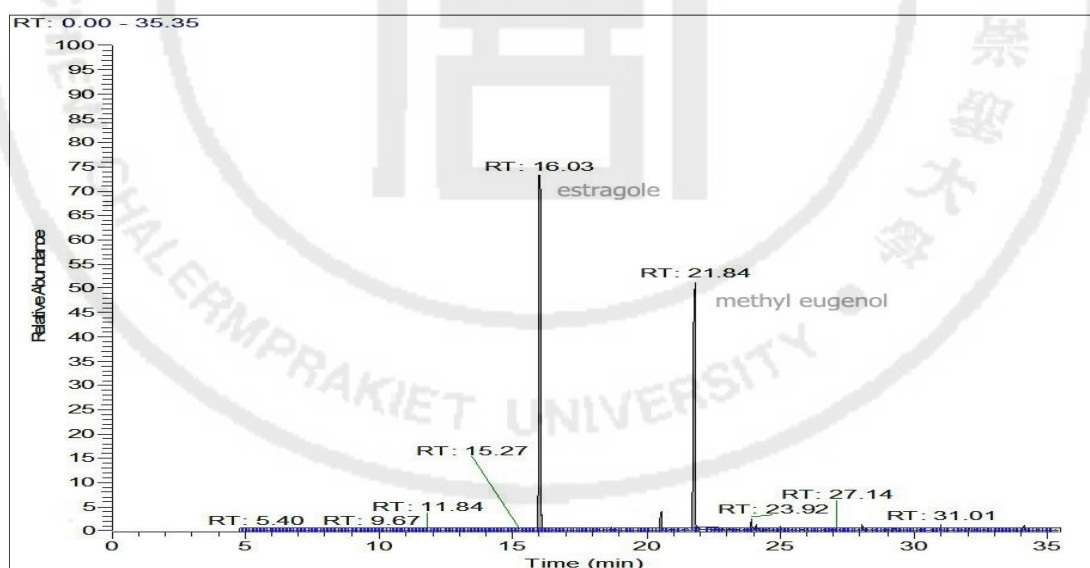
1. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้ โดยทำการทดสอบ ดังนี้

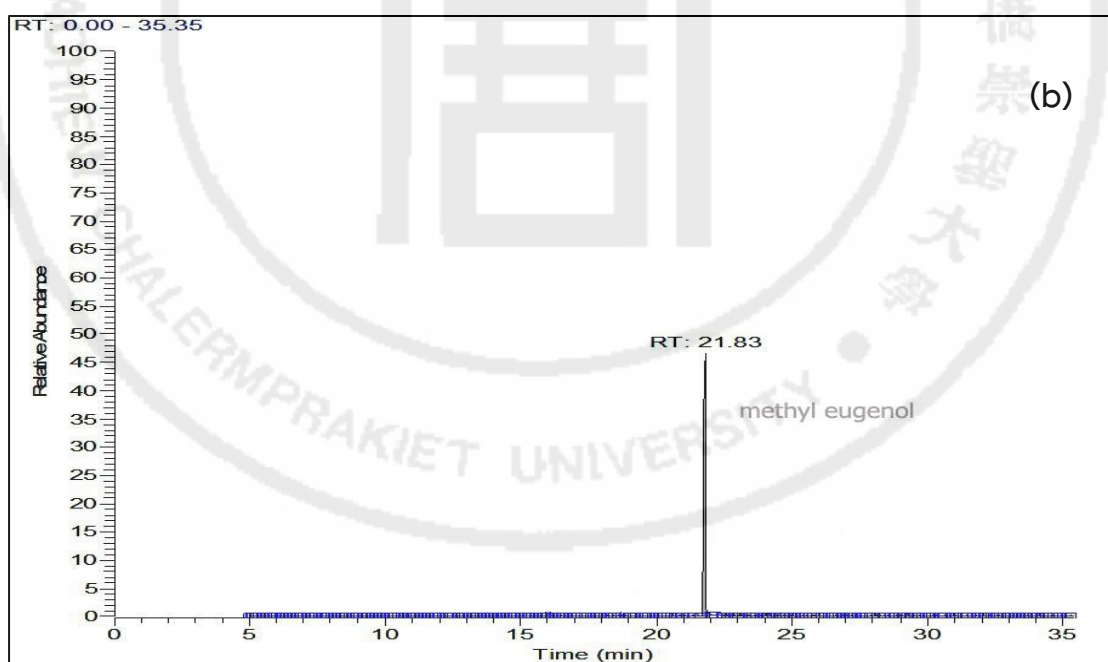
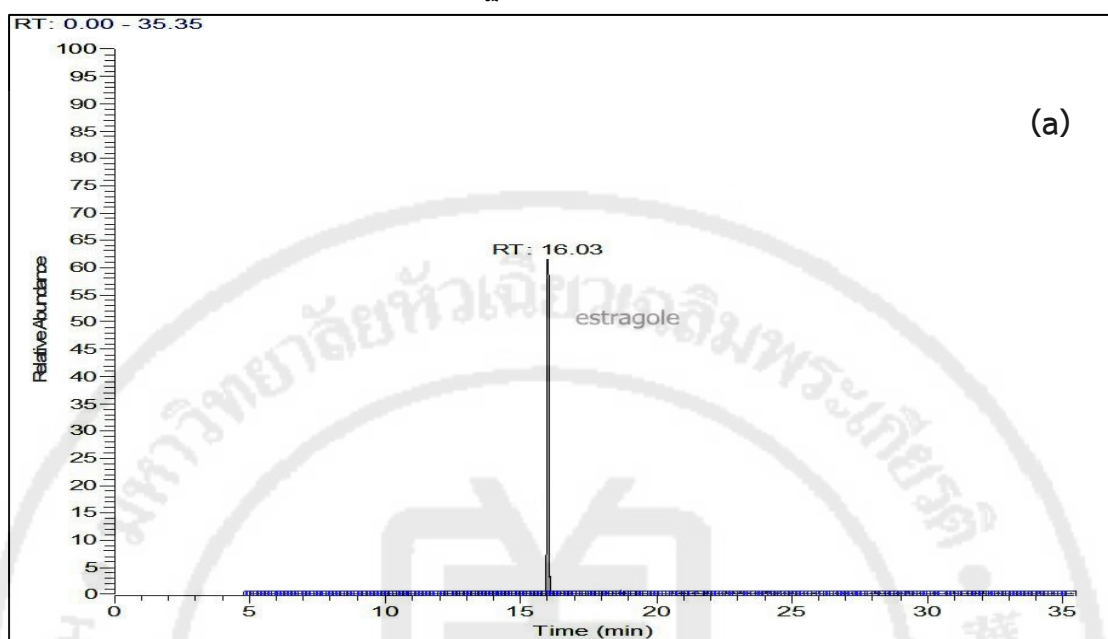
1) การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของน้ำมัน HS ได้โครมาโทแกรม ดังภาพที่ 21 พบว่าพีคของสารสำคัญ methyl eugenol และ estragole มีค่า RT เท่ากับ 21.84 และ 16.03 ตามลำดับ พีคของสารสำคัญแยกจากกันโดยเด็ดขาด และไม่มีการรบกวนของสารอื่น ๆ นอกจากนี้ mass spectra ของสารสำคัญทั้งสองในน้ำมันหอมระเหยสอดคล้องกับ mass spectra ของสารมาตรฐาน methyl eugenol และ estragole

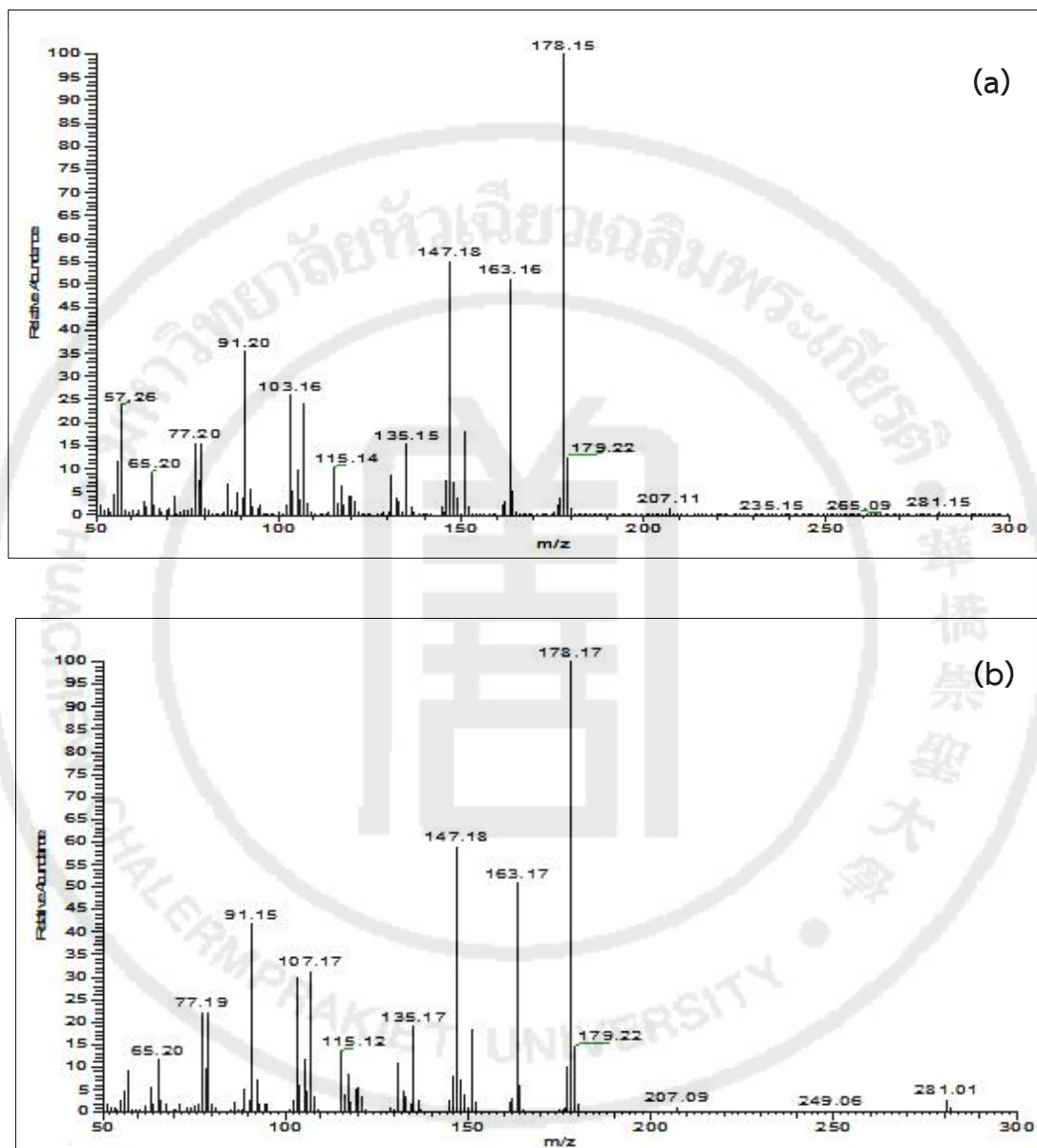
ภาพที่ 21 GC โครมาโทแกรมของ methyl eugenol และ estragole ในน้ำมัน HS



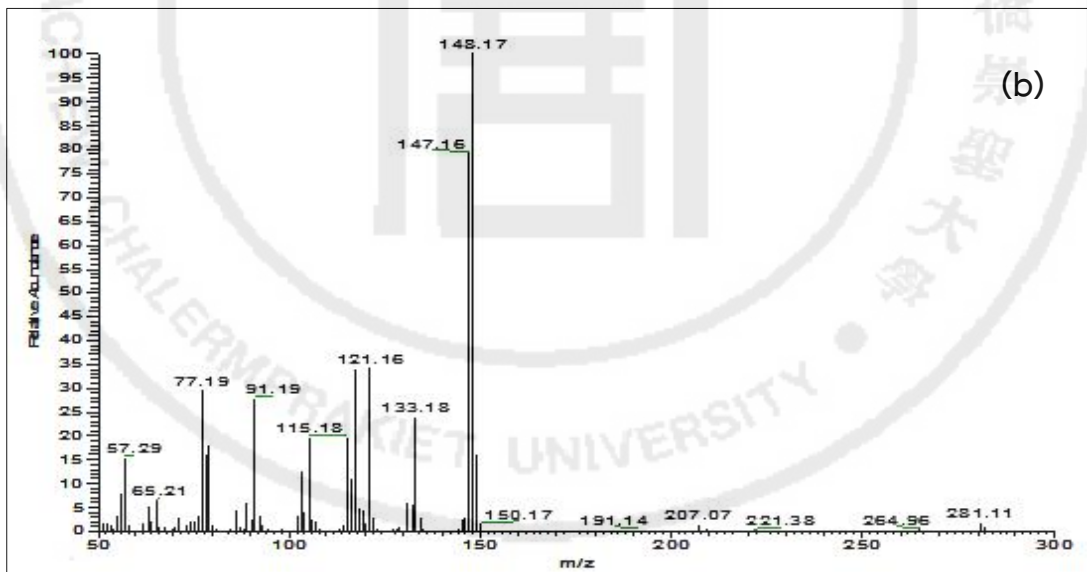
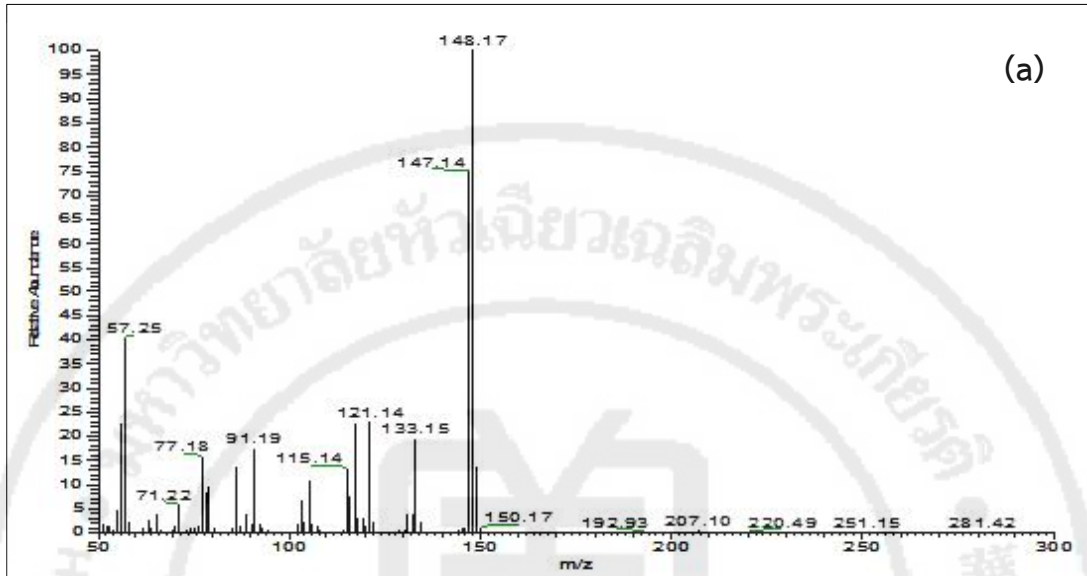
ภาพที่ 22 GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน estragole (a) และ methyl eugenol (b)



ภาพที่ 23 mass spectra ของ methyl eugenol ใน HS (a) และ mass spectra ของสารมาตรฐาน methyl eugenol (b)



ภาพที่ 24 mass spectra ของ estragole ใน HS (a) และ mass spectra ของสารมาตรฐาน estragole (b)



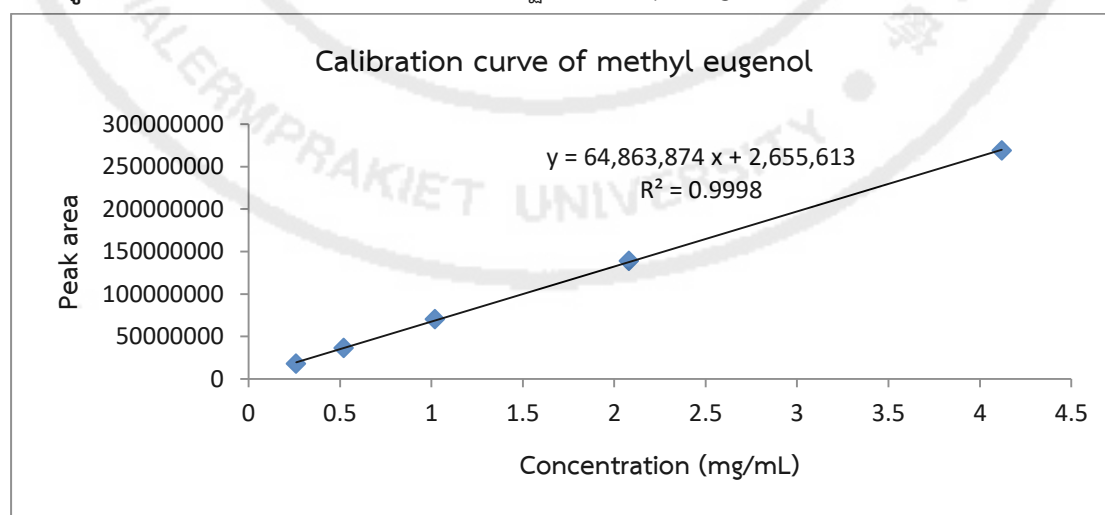
2) การทดสอบความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

จากการตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น ของสารมาตรฐาน methyl eugenol และ สารมาตรฐาน estragole ที่ความเข้มข้นช่วง 0.26-4.12 mg/mL และ ที่ความเข้มข้นช่วง 0.27-4.21 mg/mL ตามลำดับ สมการเส้นตรงหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย มาตรฐาน และพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ (r^2) ของสารมาตรฐาน methyl eugenol และสารมาตรฐาน estragole เท่ากับ 0.9998 ดังแสดงในตารางที่ 7-8 และแผนภูมิที่ 1-2

ตารางที่ 7 พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน methyl eugenol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Concentration (mg/mL)	Peak area			Average	R^2
	n1	n2	n3		
0.26	17589654	18025631	17612668	17742651	0.9998
0.52	36058429	36365952	36131888	36185423	
1.02	71625363	70953640	68477429	70352144	
2.08	139653151	139652142	137558588	138954627	
4.12	270859632	267845932	268157072	268954212	

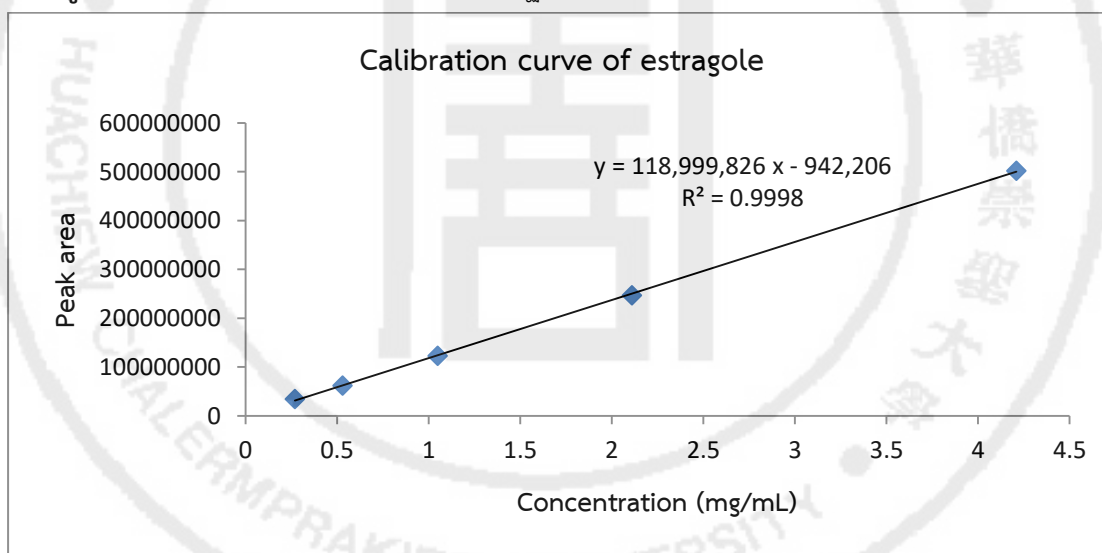
แผนภูมิที่ 1 Calibration curve ของสารมาตรฐาน methyl eugenol



ตารางที่ 8 พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน estragole ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Concentration (mg/mL)	Peak area			Average	R ²
	n1	n2	n3		
0.27	34685421	34120584	34290231	34365412	0.9998
0.53	61521337	61284531	62490467	61765445	
1.05	120152130	124963745	122845678	122653851	
2.11	245875433	242015752	252681084	246857423	
4.21	504694541	500854631	500077091	501875421	

แผนภูมิที่ 2 Calibration curve ของสารมาตรฐาน estragole



3) การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การทดสอบความเที่ยงทราบได้จากการวิเคราะห์ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง รายงานผลเป็นค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ต้องมีค่าน้อยกว่า 2 จึงจะยอมรับค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา 2 ลักษณะคือ ความเที่ยงในวันเดียวกัน และความเที่ยงต่างวันกัน โดยวิเคราะห์หาปริมาณ methyl eugenol และ estragole ในน้ำมันผสม HS ได้ผลดังตารางที่ 9 โดยผลการคำนวณค่า %RSD ได้ค่าไม่เกิน 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC., (2002)

ตารางที่ 9 ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงในวันเดียวกันและต่างวันกัน

Injection	methyl eugenol		estragole	
	วิเคราะห์วันเดียวกัน	วิเคราะห์ต่างวันกัน	วิเคราะห์วันเดียวกัน	วิเคราะห์ต่างวันกัน
1	6894257	6786952	7396954	7298545
2	6758756	6685421	7365985	7425364
3	6798542	6895347	7285634	7145823
4	6815423	6685231	7346548	7365842
5	6769354	6678954	7236953	7369854
6	6838542	6725844	7418547	7258963
\bar{X}	6812479	6742958	7341770	7310732
SD	49630.14	85076.66	68828.82	99696.09
RSD (%)	0.7285	1.2617	0.9375	1.3636

*หมายเหตุ: %RSD คือ ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

4) การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอนแล้วลงไปในการสกัดตัวอย่าง HS แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หรือการกลับคืน (% recovery) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 10 มีค่าร้อยละการกลับคืนของ methyl eugenol อยู่ในช่วง 99.69 ± 0.62 - 104.80 ± 1.41 และ estragole อยู่ในช่วง 98.35 ± 1.84 - 103.72 ± 2.01 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับของ AOAC., (2002) คืออยู่ในช่วงร้อยละ 80-120

ตารางที่ 10 ร้อยละการกลับคืนของสารมาตรฐาน methyl eugenol และ estragole ใน HS

ปริมาณเฉลี่ยของน้ำมันที่ได้จากการวิเคราะห์ (mg/mL)	สารมาตรฐานที่เติม	ระดับความเข้มข้น (%)	ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงไป (mg/mL)	ปริมาณเฉลี่ยที่พบ (mg/mL)	% recovery*
0.0646	methyl eugenol	80	0.0513	0.1168	101.75±1.26
		100	0.0645	0.1289	99.69±0.62
		120	0.0771	0.1454	104.80±1.41
0.0545	estragole	80	0.0432	0.0986	102.08±0.38
		100	0.0546	0.1082	98.35±1.84
		120	0.0645	0.1214	103.72±2.01

* ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของ HS

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยหาค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ โดยพบว่า HS (สัดส่วน 1:1 โดยปริมาตร) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อดีที่สุด โดยมีค่า MIC 0.512 mg/mL ซึ่งมีปริมาณน้ำมันหอมระเหย H และ S เท่ากับ 0.256 mg/mL

จากการวิเคราะห์โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องแล้ว พบว่าในน้ำมันหอมระเหย HS 0.512 mg/mL มีปริมาณสารสำคัญ methyl eugenol 0.158 ± 0.001 mg/mL และ สารสำคัญ estragole 0.155 ± 0.002 mg/mL ตามลำดับ (ดังตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญใน H และ S ด้วยเครื่อง GC-MS

สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย	ความเข้มข้นของตัวอย่าง (mg/mL)	Peak Area ของสารสำคัญ	ความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/mL)	ความเข้มข้นของสารสำคัญเฉลี่ย (mg/mL)*
H	0.256	12826853	0.157	0.158±0.001
		12956854	0.159	
		12966102	0.159	
S	0.256	17359714	0.154	0.155±0.002
		17689654	0.157	
		17296385	0.153	

* ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

4.6 ผลการเตรียมนิโอดีเอ็มน้ำมันหอมระเหย HS และการประเมินสมบัติ

1. การตรวจสอบลักษณะภายนอก (Appearance)

จากการเตรียมนิโอดีเอ็มทั้ง 12 ตำรับด้วยวิธี thin-film method โดยใช้อัตราส่วนของ Span[®] 60:cholesterol ที่แตกต่างกัน คือ 60:40, 70:30, 80:20 และ 90:10 และนำไปผ่านการลดขนาดด้วยการ sonicate ที่ 0, 2 และ 5 นาที พบว่าลักษณะทางกายภาพของนิโอดีเอ็มทุกตำรับมีลักษณะเป็นของเหลว สีขาวขุ่น ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และไม่เกิดตะกอน พบว่าตำรับนิโอดีเอ็มที่ผ่านการ sonicate จะมีลักษณะของนิโอดีเอ็มที่ใสขึ้น (ดังภาพที่ 25)

ภาพที่ 25 ตัวอย่างลักษณะของนิโอดีเอ็มอัตราส่วนของ Span[®] 60:cholesterol ที่ 60:40 โดยผ่านการ sonicate ที่ 0, 2 และ 5 นาที



2. การวัดขนาด และการกระจายตัวของอนุภาค

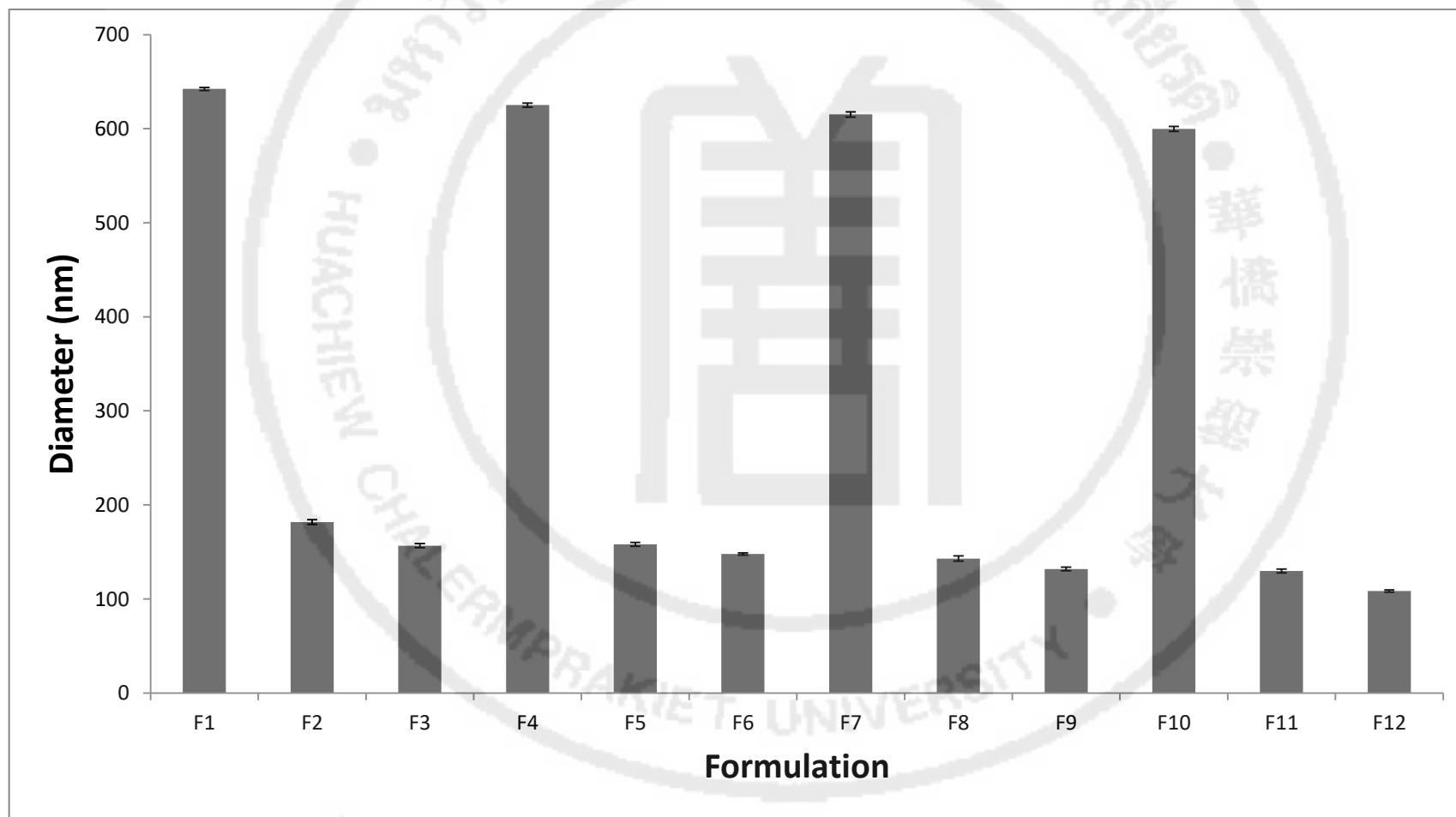
จากผลการทดลองวัดขนาดขนาดหยาบของอนุภาคเฉลี่ย และค่าการกระจาย (PI) ของตำรับนิโอโซมผสมน้ำมันหอมระเหยในแต่ละอัตราส่วน เมื่อผ่านกระบวนการ sonicate ที่เวลา 0,2 และ 5 นาที ทำการวิเคราะห์โดยเครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (Delsa™ Nano C, Particle Size Analyzer, Japan) มีขนาดหยาบของอนุภาคเฉลี่ยอยู่ที่ 108.4-642.3 นาโนเมตร และค่าการกระจาย (PI) อยู่ในช่วง 0.148-0.374 ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ขนาดและการกระจายตัวของตำรับนิโอโซมที่เตรียมได้

ตำรับ	อัตราส่วนของ Span® 60:cholesterol	เวลาที่ใช้ Sonicate (min)	Diameter* เฉลี่ย(nm) ±SD	Polydispersity index* เฉลี่ย±SD
F1	60:40	0	642.3±1.55	0.374±0.01
F2	60:40	2	181.8±2.37	0.279±0.01
F3	60:40	5	156.7±2.21	0.168±0.02
F4	70:30	0	625.1±2.25	0.358±0.01
F5	70:30	2	158.0±1.97	0.271±0.01
F6	70:30	5	147.8±1.25	0.161±0.01
F7	80:20	0	615.1±2.75	0.356±0.01
F8	80:20	2	143.0±2.64	0.262±0.02
F9	80:20	5	131.9±1.91	0.152±0.01
F10	90:10	0	599.8±2.56	0.354±0.01
F11	90:10	2	129.7±2.08	0.258±0.02
F12	90:10	5	108.4±1.07	0.148±0.01

* ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

แผนภูมิที่ 3 ขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยของตำรับนโโซมที่เตรียมได้



3. การทดสอบหาความสามารถในการเก็บกักน้ำมันหอมระเหย HS ของนิโอโซม

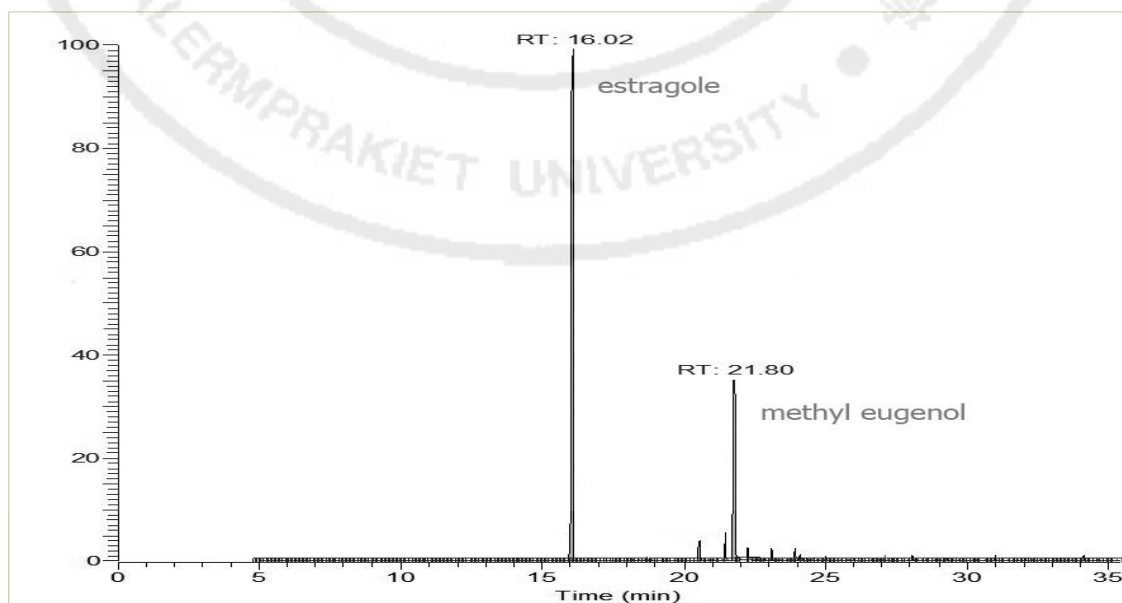
1) การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

ในการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะ ดังนี้ ใช้คอลัมน์ชนิด AquaWax-DA capillary columns (ยาว 30 m, เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m) อุณหภูมิ injection เท่ากับ 250°C อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มต้นจาก 50°C (คงที่ไว้ 5 นาที) เพิ่มอุณหภูมิ 10°C/นาที จนถึง 80°C จากนั้นเพิ่ม 5°C/นาที จนกระทั่งอุณหภูมิ 180°C และเพิ่มขึ้นในอัตรา 30°C/นาที จนเป็น 240°C (คงที่ไว้ 5 นาที) ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพา 1.0 mL/min ปริมาตรที่ฉีด 0.4 μ L มี ionization source เป็นชนิด electron impact 70 eV, mass analyzer เป็นแบบ quadrupole ใช้ mass range ตั้งแต่ 50-500 m/z และทำการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ดังนี้

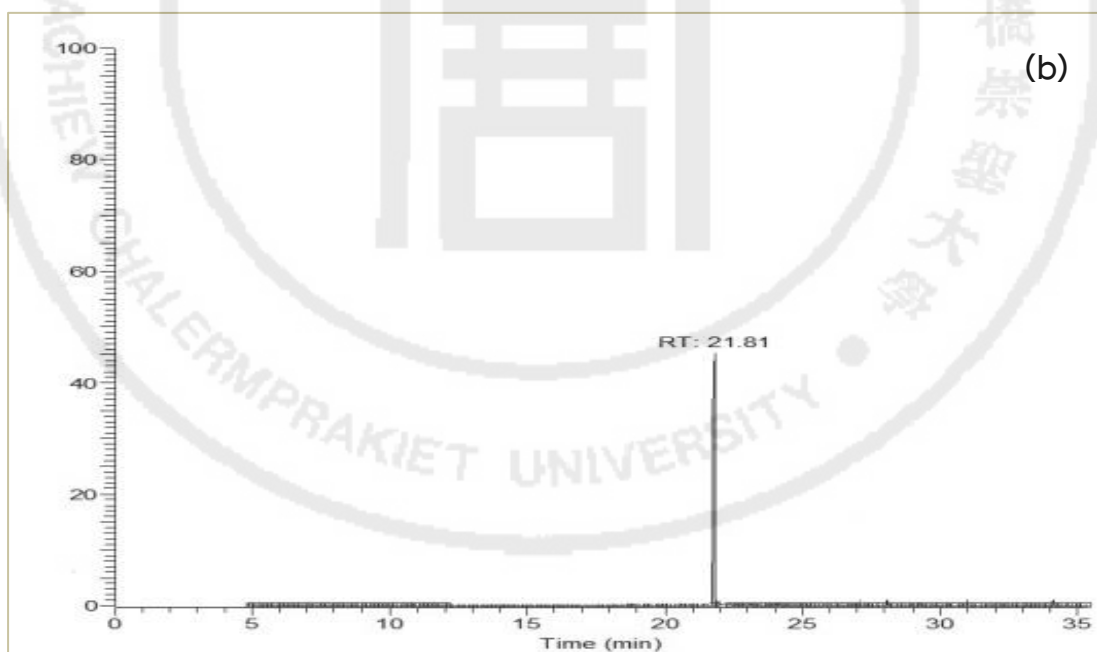
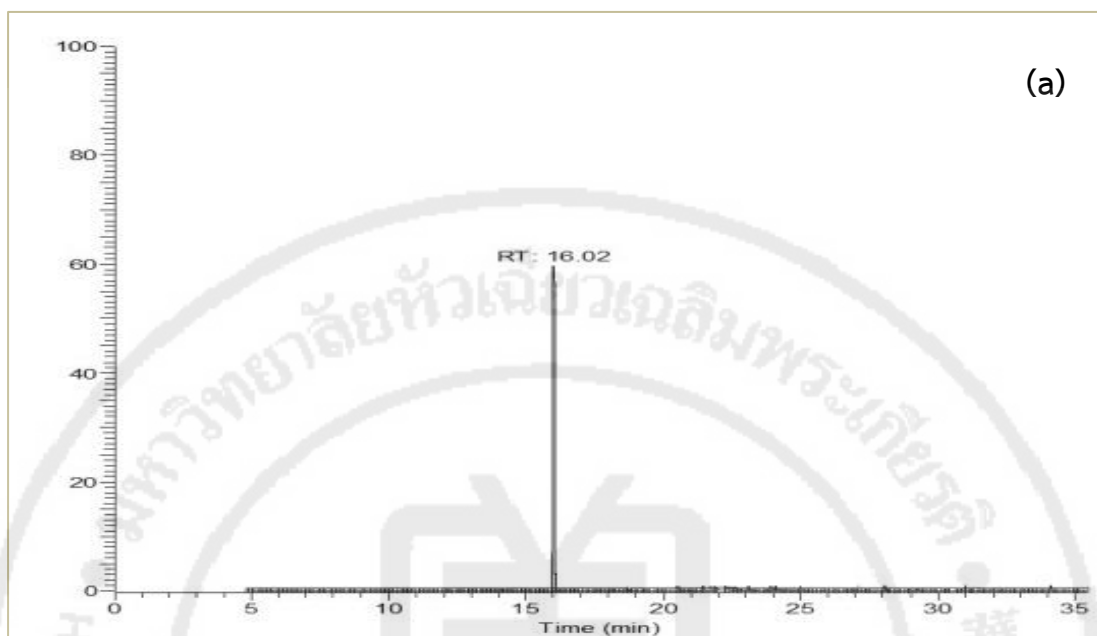
(1) การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

จากการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของน้ำมัน HS ได้โครมาโทแกรม ดังภาพที่ 26 พบว่าพีคของสารสำคัญ methyl eugenol และ estragole มีค่า RT เท่ากับ 21.80 และ 16.02 ตามลำดับ พีคของสารสำคัญแยกจากกันโดยเด็ดขาด และไม่มีการรบกวนของสารอื่น ๆ นอกจากนี้ mass spectra ของสารสำคัญทั้งสองในน้ำมันหอมระเหยสอดคล้องกับ mass spectra ของสารมาตรฐาน methyl eugenol และ estragole

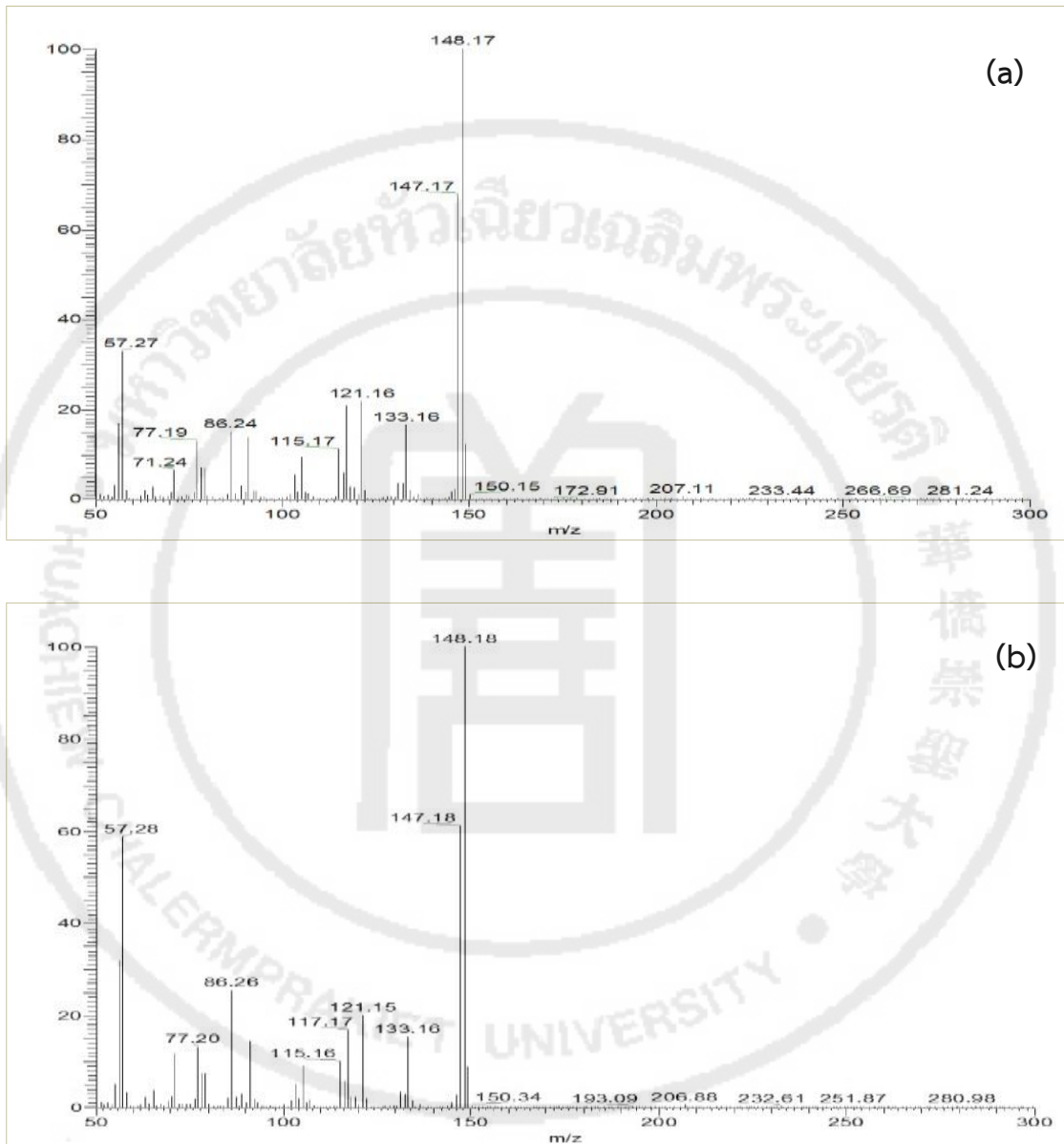
ภาพที่ 26 GC โครมาโทแกรมของ methyl eugenol และ estragole ในน้ำมัน HS ที่ถูกกักเก็บในนิโอโซม



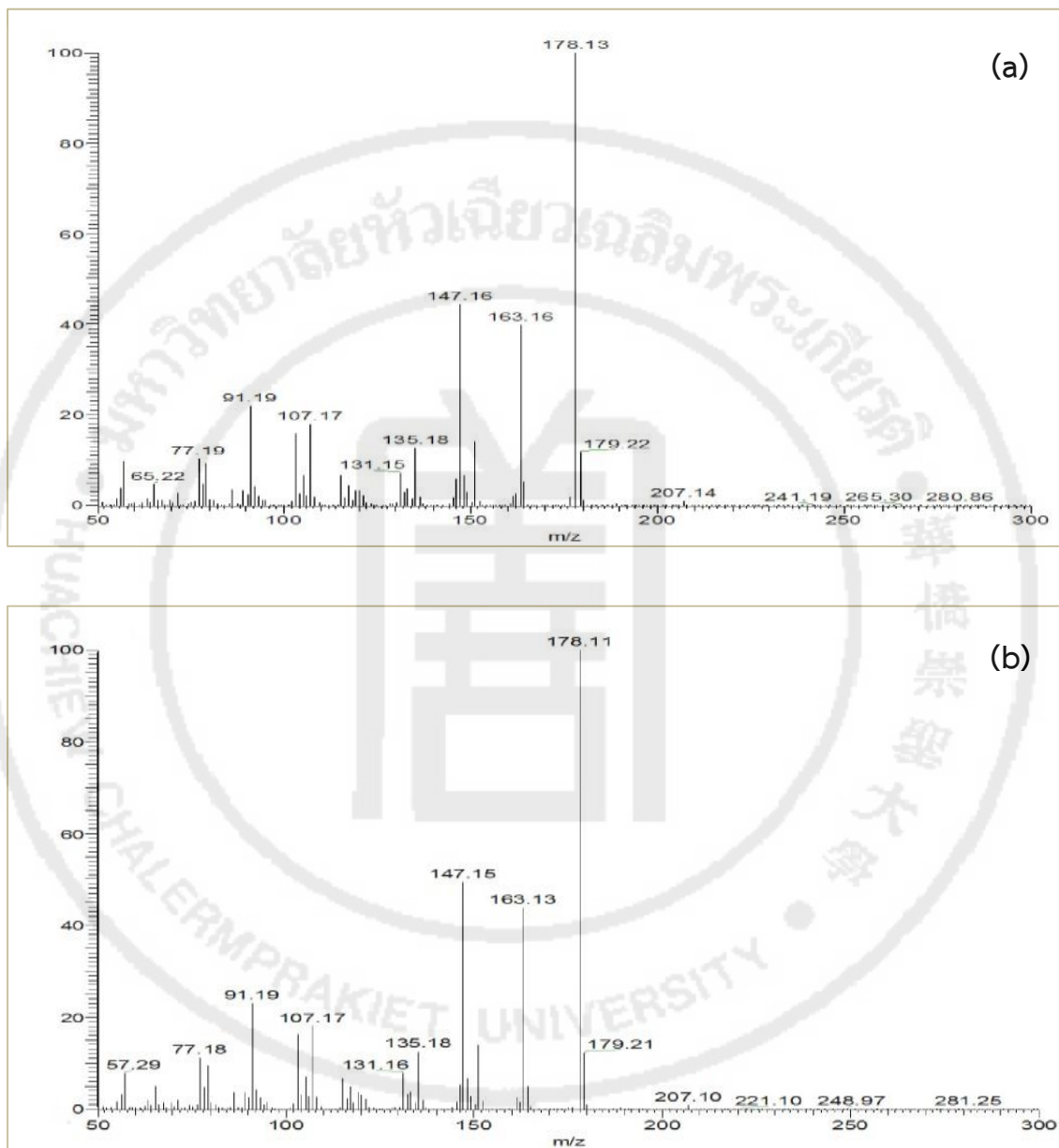
ภาพที่ 27 GC โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน estragole (a) และ methyl eugenol (b)



ภาพที่ 28 mass spectra ของ estragole ใน HS ที่ถูกเก็บกักในนิโอโซม (a) และ mass spectra ของสารมาตรฐาน estragole (b)



ภาพที่ 29 mass spectra ของ methyl eugenol ใน HS ที่ถูกเก็บกักในไนโอโซม (a) และ mass spectra ของสารมาตรฐาน methyl eugenol (b)



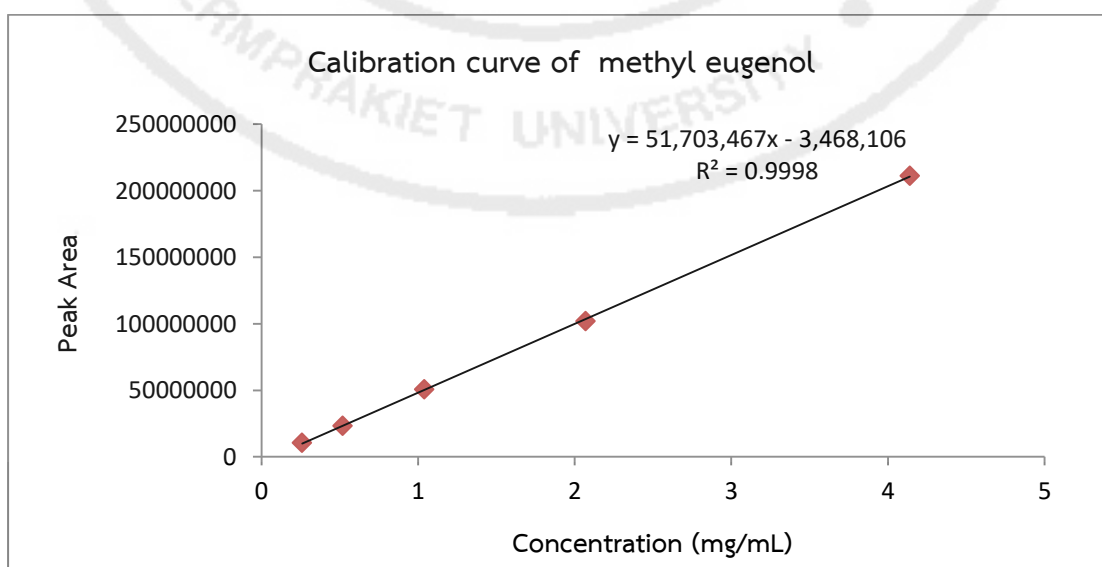
(2) การทดสอบความเป็นเส้นตรงหรือความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity)

จากการตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงเส้น ของสารมาตรฐาน methyl eugenol และสารมาตรฐาน estragole ที่ความเข้มข้นช่วง 0.26-4.14 mg/mL และ ที่ความเข้มข้นช่วง 0.26-4.19 mg/mL ตามลำดับ สมการเส้นตรงหาได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานและพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ (r^2) ของสารมาตรฐาน methyl eugenol และสารมาตรฐาน estragole เท่ากับ 0.9998 และ 0.9997 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 13-14 และแผนภูมิที่ 4-5

ตารางที่ 13 พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน methyl eugenol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Concentration (mg/mL)	Peak area			Average	R^2
	n1	n2	n3		
0.26	10594821	10739183	10604809	10646271	0.9998
0.52	23148273	23352134	23260450	23253619	
1.04	50381728	50584716	51242105	50736183	
2.07	101837381	102193848	101784019	101938416	
4.14	211374618	210983782	211433057	211263819	

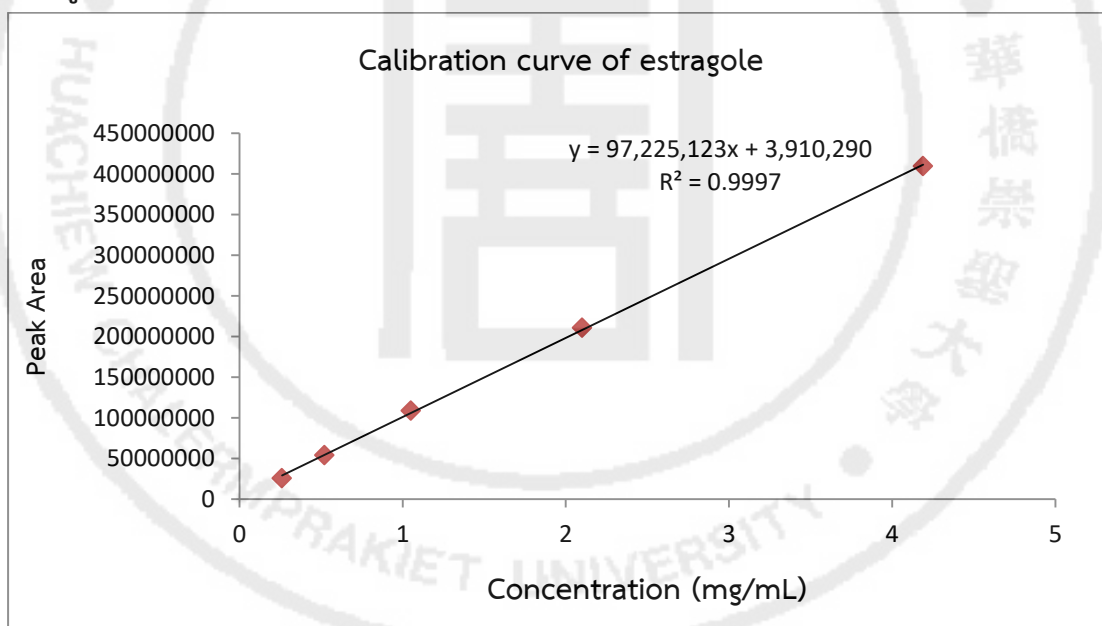
แผนภูมิที่ 4 Calibration curve ของ methyl eugenol



ตารางที่ 14 พื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐาน estragole ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Concentration (mg/mL)	Peak area			Average	R ²
	n1	n2	n3		
0.26	25576389	25862718	25466427	25635178	0.9997
0.52	53984738	54371628	54464488	54273618	
1.05	103094837	102738471	102679075	102837461	
2.10	211049381	210637384	210825651	210837472	
4.19	408982718	409374819	409949620	409435719	

แผนภูมิที่ 5 Calibration curve ของ estragole



(3) การทดสอบความเที่ยง (Precision)

การทดสอบความเที่ยงทราบได้จากการวิเคราะห์ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง รายงานผลเป็นค่าร้อยละส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ต้องมีค่าน้อยกว่า 2 จึงจะยอมรับค่าความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษา 2 ลักษณะคือ ความเที่ยงในวันเดียวกัน และความเที่ยงต่างวันกัน โดยวิเคราะห์หาปริมาณ methyl eugenol และ estragole ในน้ำมันผสม HS ที่ถูกเก็บกักในไนโอโซม ได้ผลดังตารางที่ 15 โดยผลการคำนวณค่า %RSD ได้ค่าไม่เกิน 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC., (2002)

ตารางที่ 15 ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของความเที่ยงในวันเดียวกันและต่างวันกัน

Injection	methyl eugenol		estragole	
	วิเคราะห์วันเดียวกัน	วิเคราะห์ต่างวันกัน	วิเคราะห์วันเดียวกัน	วิเคราะห์ต่างวันกัน
1	4587613	4558754	12152617	11927391
2	4548763	4533965	12038471	12362718
3	4605742	4635874	11997281	12048361
4	4573154	4581548	12029381	12177364
5	4568542	4618759	12011838	12027382
6	4578542	4655866	12152617	12521527
\bar{X}	4577059	4597461	12063701	12177457
SD	19103.68	47166.74	70324.84	225578
RSD (%)	0.4174	1.0259	0.6068	1.8524

*หมายเหตุ: %RSD คือ ร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

(4) การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy)

การทดสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ โดยการเติมสารละลายมาตรฐานที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอนแล้วลงไปในการละลายตัวอย่าง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ร้อยละการกลับคืน (% recovery) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 16 มีค่าร้อยละการกลับคืนของ methyl eugenol อยู่ในช่วง 98.41 ± 1.36 - 103.03 ± 0.47 และ estragole อยู่ในช่วง 99.19 ± 3.14 - 102.84 ± 2.03 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับของ AOAC., (2002) คืออยู่ในช่วงร้อยละ 80-120

ตารางที่ 16 ร้อยละการคืนกลับของการตรวจสอบความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ปริมาณเฉลี่ยของน้ำมันที่ได้จากการวิเคราะห์ (mg/mL)	สารมาตรฐานที่เติม	ระดับความเข้มข้น (%)	ปริมาณสารมาตรฐานที่เติมลงไป (mg/mL)	ปริมาณที่พบ (mg/mL)	% Recovery*
0.0578	methyl eugenol	80	0.0462	0.1054	103.03 ± 0.47
		100	0.0574	0.1162	101.74 ± 2.42
		120	0.0692	0.1259	98.41 ± 1.36
0.0608	estragole	80	0.0492	0.1103	99.19 ± 3.14
		100	0.0618	0.1228	100.32 ± 0.71
		120	0.0739	0.1381	102.84 ± 2.03

* ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

2) การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันหอมระเหย HS ที่ถูกกักเก็บในตำรับนิโอโซม (F1-F12) ด้วยเทคนิค GC-MS

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ methyl eugenol และ estragole ของน้ำมันหอมระเหย HS ก่อนนำไปบรรจุลงในตำรับนิโอโซม ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องแล้ว โดยฉีดน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่มีความเข้มข้น 1 mg/mL (อัตราส่วนน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม 1:1 โดยปริมาตร) จะได้ปริมาณความเข้มข้นของ methyl eugenol และ estragole ดังตารางที่ 17

หลังจากบรรจุน้ำมันหอมระเหย HS ในตำรับนิโอโซมและทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของ HS ทั้ง 12 ตำรับ ดังตารางที่ 18 พบว่าตำรับนิโอโซมทั้ง 12 ตำรับมีปริมาณกักเก็บน้ำมันหอมระเหย HS ในช่วง 68.58-91.20% และพบว่า ตำรับ F2 ที่ใช้อัตราส่วน Span[®] 60: cholesterol เท่ากับ 60:40 และ sonicate 2 นาที มีปริมาณการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย HS สูงสุด เท่ากับ 91.20±0.71% โดยมีประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยมากกว่าตำรับอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และตำรับ F12 ที่ใช้อัตราส่วน Span[®] 60:cholesterol เท่ากับ 90:10 และ sonicate 5 นาที มีปริมาณการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย HS ต่ำสุด นอกจากนี้ F2 มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 181.8±2.37 nm ซึ่งขนาดอนุภาคไม่เกิน 500 nm ตำรับจะมีความเสถียร และมีการกระจายตัวเท่ากับ 0.279±0.01 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 1 บ่งบอกได้ว่าอนุภาคนิโอโซมที่เตรียมได้มีการกระจายตัวที่ดี จึงเลือกตำรับ F2 มาทำการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 17 ปริมาณสารสำคัญ methyl eugenol และ estragole ของน้ำมันหอมระเหย HS ที่บรรจุในตำรับนิโอโซม

สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย	Peak Area	ความเข้มข้นของสารสำคัญ (mg/mL)	ความเข้มข้นของสารสำคัญเฉลี่ย* (mg/mL)
methyl eugenol	12841223	0.315	0.313±0.003
	12684147	0.312	
	12547195	0.310	
estragole	33584136	0.305	0.306±0.002
	33874541	0.308	
	33642259	0.306	

* ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 18 ร้อยละการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย HS ในตำรับนิโอสัมทั้ง 12 ตำรับ

ตำรับ	Peak Area ของ methyl eugenol	Peak Area ของ estragole	ปริมาณ methyl eugenol	ปริมาณ estragole	%entrapment
F1	10500324	29801652	0.270	0.266	87.31±0.97
	10706524	29513854	0.274	0.263	
	10748080	30393870	0.275	0.272	
F2	11361330	31302654	0.287	0.282	91.20±0.74*
	11206257	30716235	0.284	0.276	
	11183375	31341603	0.283	0.282	
F3	10052151	29515426	0.261	0.263	84.04±0.68
	9950162	28903426	0.260	0.257	
	10028750	29010778	0.261	0.258	
F4	10150592	28513624	0.263	0.253	82.96±0.42
	10011204	28306859	0.261	0.251	
	10000752	28409723	0.261	0.252	
F5	10750624	30302463	0.275	0.271	88.13±0.57
	10948512	30127461	0.279	0.270	
	10859906	29626163	0.277	0.264	
F6	9810012	28343265	0.257	0.251	80.91±1.16
	9714035	27801664	0.255	0.246	
	9436098	27645566	0.250	0.244	

* แตกต่างจากตำรับอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ตำรับ	Peak Area ของ methyl eugenol	Peak Area ของ estragole	ปริมาณ methyl eugenol	ปริมาณ estragole	%entrapment
F7	9513027	27749365	0.251	0.245	79.35±1.04
	9251385	27046235	0.246	0.238	
	9441982	27602160	0.250	0.244	
F8	9749113	27738516	0.256	0.245	80.39±0.45
	9601305	27625136	0.253	0.244	
	9452963	27779316	0.250	0.246	
F9	8351642	25144621	0.229	0.218	72.64±0.41
	8554326	25036257	0.233	0.217	
	8453622	25450316	0.231	0.222	
F10	8150362	25014238	0.225	0.217	71.20±0.15
	8004625	25106490	0.222	0.218	
	8157497	24883680	0.225	0.216	
F11	8551324	25714023	0.232	0.224	74.29±0.52
	8803595	25526485	0.237	0.222	
	8605059	26238194	0.234	0.230	
F12	8002462	24016852	0.222	0.207	68.58±0.59
	7751543	23827460	0.217	0.205	
	7797089	23860660	0.218	0.205	

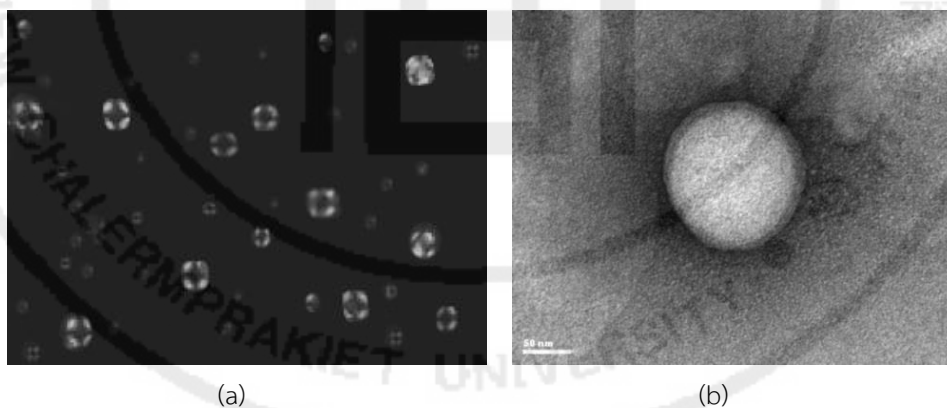
4.7 การประเมินสมบัติของตำรับนิโอโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหย HS ได้ดีที่สุดใน

ทำการคัดเลือกนิโอโซมจากผลของร้อยละการกักเก็บสารสำคัญไว้ในนิโอโซม ซึ่งตำรับที่มีร้อยละการกักเก็บสารสำคัญไว้ในนิโอโซมสูงที่สุดคือ ตำรับ F2 จึงนำมาทำการทดสอบความคงตัวด้านต่าง ๆ ดังนี้

1. การศึกษาสัณฐานวิทยาของตำรับนิโอโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยดีที่สุดในด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรซ์ (polarized light microscopy) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

นำตำรับนิโอโซม F2 ที่เตรียมได้ ไปตรวจวัดด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโพลาไรซ์ พบว่าอนุภาคเล็กมีการกระจายแสงรูปตัวเอ็กซ์หรือเครื่องหมายกากบาท (ภาพที่ 30 (a)) และจากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบลักษณะของนิโอโซม เป็นถุงค่อนข้างกลม (ภาพที่ 30 (b))

ภาพที่ 30 ลักษณะของนิโอโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหยตำรับ F2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงโพลาไรซ์ (a) และภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ที่กำลังกำลังขยาย 175000X (b)



2. การทดสอบความคงตัวโดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และปริมาณการกักเก็บสารของตำรับนิโอโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหย HS ได้ดีที่สุด

1) การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและปริมาณการกักเก็บสารของตำรับนิโอโซม F2 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เมื่อนำตำรับ F2 ที่เตรียมได้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สังเกตลักษณะทางกายภาพและทางเคมี โดยทำการวิเคราะห์ความเป็นกรดต่าง ค่าความหนืด ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัว และร้อยละการกักเก็บ ของตำรับ F2 ได้ผลการทดลองดังนี้

ลักษณะภายนอกของทุกตำรับมีความคงตัวดี โดยสังเกตได้จากการไม่แยกชั้น มีสีขา สัปดาห์ที่ 0-8 ไม่เปลี่ยนแปลง (ดังตารางที่ 19)

ค่าความเป็นกรดต่างของสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ 5.73 ± 0.05 และ 5.57 ± 0.05 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 19) และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดต่างของทุก ๆ สัปดาห์เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ค่าความหนืดของสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ 1.1 ± 0.2 และ 1.1 ± 0.3 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 19) และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความหนืดของทุก ๆ สัปดาห์ เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ขนาดอนุภาคมีการเพิ่มขึ้น โดยสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 179.4 ± 4.1 nm และ 204.8 ± 2.4 nm ตามลำดับ (ดังตารางที่ 19) และเมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคของทุก ๆ สัปดาห์ พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 มีขนาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0

ค่าการกระจายตัวของสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ 0.274 ± 0.004 และ 0.298 ± 0.003 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 19) และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าการกระจายตัวของทุก ๆ สัปดาห์ เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 มีค่าการกระจายตัวที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

นอกจากนี้พบว่าร้อยละการกักเก็บลดลง โดยสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 มีร้อยละการกักเก็บเท่ากับ 91.62 ± 1.16 และ 83.52 ± 0.36 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 20) และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าร้อยละการกักเก็บของทุก ๆ สัปดาห์ เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 มีร้อยละการกักเก็บที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 19 การประเมินความคงตัวของกายภาพของตำรับนีโอโซม F2 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สัปดาห์	ลักษณะภายนอก	pH* เฉลี่ย ±SD	Viscosity* เฉลี่ย ±SD (cps.)	Diameter* เฉลี่ย ±SD (nm)	PDI* เฉลี่ย ±SD
0	ไม่แยกชั้น มีสีขาว	5.73±0.05	1.1±0.2	179.4±4.1	0.274±0.004
1	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.56±0.09	1.0±0.2	180.6±1.1	0.278±0.002
2	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.58±0.15	1.1±0.2	181.4±2.4	0.281±0.002
3	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.75±0.13	1.0±0.2	183.2±0.8	0.282±0.004
4	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.72±0.14	1.2±0.2	190.1±2.9**	0.285±0.002**
5	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.57±0.12	1.0±0.3	195.8±1.4**	0.290±0.003**
6	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.67±0.08	1.0±0.1	196.3±3.4**	0.292±0.004**
7	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.69±0.18	1.1±0.1	198.5±4.2**	0.293±0.001**
8	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.57±0.05	1.1±0.3	204.8±2.4**	0.298±0.003**

* ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

** แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

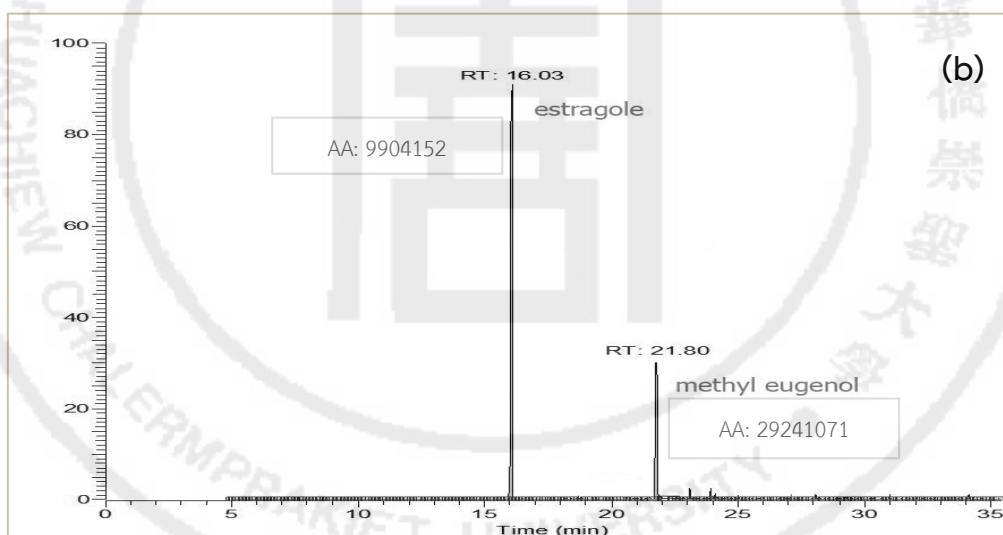
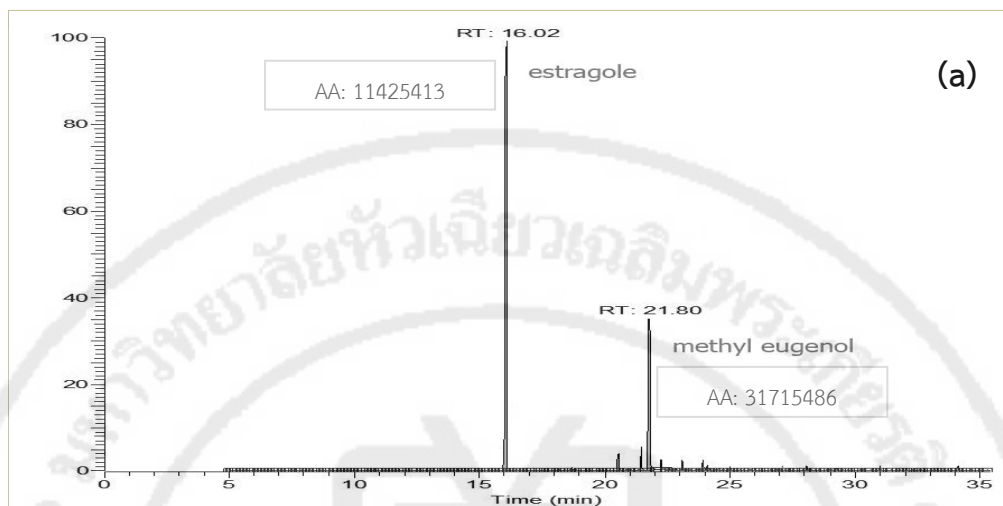
ตารางที่ 20 ร้อยละการกักเก็บสารของตำรับนิโอโซม F2 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สัปดาห์ ที่	Peak Area ของ methyl eugenol	Peak Area ของ estragole	ปริมาณ methyl eugenol	ปริมาณ estragole	% Entrapment*
0	11425413	31715486	0.288	0.286	91.62±1.16
	11206534	30735201	0.284	0.276	
	11316098	31304526	0.286	0.282	
1	11125412	31425314	0.282	0.283	91.34±0.14
	11416527	30815421	0.288	0.277	
	11354162	31104278	0.287	0.280	
2	11103485	30529634	0.282	0.274	91.22±1.26
	11453743	31215422	0.289	0.281	
	11519652	31032410	0.290	0.279	
3	11254035	30416523	0.285	0.273	91.03±0.98
	11450684	30640127	0.289	0.275	
	11357421	31406524	0.287	0.283	
4	10654068	30124625	0.273	0.270	88.65±0.85**
	10754175	30714216	0.275	0.276	
	11005072	30436201	0.280	0.273	
5	10616985	29658745	0.272	0.265	86.77±0.03**
	10645484	29574874	0.273	0.264	
	10634281	29617850	0.273	0.264	
6	10569851	29701584	0.272	0.265	86.45±0.29**
	10518774	29454751	0.271	0.263	
	10504986	29683140	0.270	0.265	
7	10651186	28990123	0.273	0.258	86.10±0.69**
	10320457	29514309	0.267	0.263	
	10554210	29832652	0.271	0.267	
8	9904152	29241071	0.259	0.261	83.52±0.36**
	10112475	28412400	0.263	0.252	
	10021451	28814635	0.261	0.256	

* ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

** แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาพที่ 31 GC โครมาโทแกรมของตำรับนิโอโซม F2 ที่บรรจุน้ำมันหอมระเหย HS ในสัปดาห์ที่ 0 (a) และ สัปดาห์ที่ 8 (b)



2) การประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและปริมาณการกักเก็บสารของตำรับนิโอโซม F2 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

เมื่อนำตำรับ F2 ที่เตรียมได้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ สังเกตลักษณะทางกายภาพและทางเคมี โดยทำการวิเคราะห์ความเป็นกรดต่าง ค่าความหนืด ขนาดอนุภาค การกระจายตัว และร้อยละการกักเก็บ ของตำรับ F2 ได้ผลการทดลองดังนี้

ลักษณะภายนอกของทุกตำรับมีความคงตัวดี โดยสังเกตได้จากการไม่แยกชั้น มีสีขาว สัปดาห์ที่ 0-8 ไม่เปลี่ยนแปลง (ดังตารางที่ 21)

ค่าความเป็นกรดต่างของสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ 5.58 ± 0.16 และ 5.62 ± 0.17 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 21) และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดต่างของทุก ๆ สัปดาห์ เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ค่าความหนืดของสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ 1.0 ± 0.3 และ 1.0 ± 0.2 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 21) และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าความหนืดของทุก ๆ สัปดาห์ เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ขนาดอนุภาคมีการเพิ่มขึ้น โดยสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 174.4 ± 3.7 และ 238.2 ± 1.6 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 21) และเมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดอนุภาคของทุก ๆ สัปดาห์ พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 มีขนาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0

ค่ากระจายตัวของสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ 0.274 ± 0.002 และ 0.304 ± 0.002 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 21) และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าการกระจายตัวของทุก ๆ สัปดาห์ เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 มีค่าการกระจายตัวที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

นอกจากนี้พบว่าร้อยละการกักเก็บลดลง โดยสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 มีร้อยละการกักเก็บเท่ากับ 91.62 ± 1.16 และ 76.40 ± 0.28 ตามลำดับ (ดังตารางที่ 22) และเมื่อทำการเปรียบเทียบค่าร้อยละการกักเก็บของทุก ๆ สัปดาห์ เทียบกับสัปดาห์ที่ 0 พบว่าตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 มีร้อยละการกักเก็บที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 21 การประเมินความคงตัวทางกายภาพของตำรับนิโอโซม F2 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สัปดาห์	ลักษณะภายนอก	pH* เฉลี่ย \pm SD	Viscosity* เฉลี่ย \pm SD (cps.)	Diameter* เฉลี่ย \pm SD (nm)	PDI* เฉลี่ย \pm SD
0	ไม่แยกชั้น มีสีขาว	5.58 \pm 0.16	1.0 \pm 0.3	174.4 \pm 3.7	0.274 \pm 0.002
1	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.59 \pm 0.07	1.1 \pm 0.3	185.1 \pm 2.6	0.278 \pm 0.001
2	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.63 \pm 0.15	1.0 \pm 0.3	190.0 \pm 2.5**	0.283 \pm 0.002**
3	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.51 \pm 0.09	1.0 \pm 0.3	191.6 \pm 0.8**	0.284 \pm 0.003**
4	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.54 \pm 0.21	0.9 \pm 0.1	199.1 \pm 1.5**	0.290 \pm 0.001**
5	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.63 \pm 0.14	1.2 \pm 0.2	208.8 \pm 0.6**	0.292 \pm 0.002**
6	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.74 \pm 0.09	1.0 \pm 0.2	218.9 \pm 1.9**	0.297 \pm 0.001**
7	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.54 \pm 0.07	1.1 \pm 0.2	222.7 \pm 2.3**	0.299 \pm 0.002**
8	ไม่เปลี่ยนแปลง	5.62 \pm 0.17	1.0 \pm 0.2	238.2 \pm 1.6**	0.304 \pm 0.002**

* ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

** แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 22 ร้อยละการกักเก็บสารของตำรับนิโอโซม F2 ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สัปดาห์ ที่	Peak Area ของ methyl eugenol	Peak Area ของ estragole	ปริมาณ methyl eugenol	ปริมาณ estragole	% Entrapment*
0	11425413	31715486	0.288	0.286	91.62±1.16
	11206534	30735201	0.284	0.276	
	11316098	31304526	0.286	0.282	
1	11124531	31104521	0.282	0.280	91.26±0.59
	11310045	30930124	0.286	0.278	
	11214851	31620146	0.284	0.285	
2	10853415	30918547	0.277	0.278	89.44±0.43**
	10804625	30602143	0.276	0.275	
	11054317	30614325	0.281	0.275	
3	10701460	30421541	0.274	0.273	88.00±0.43**
	10554134	30206241	0.271	0.270	
	10703647	30321451	0.274	0.272	
4	10459654	29931540	0.269	0.268	86.74±0.03**
	10304175	30233251	0.266	0.271	
	10453692	29913521	0.269	0.267	
5	10054271	29036428	0.262	0.258	84.16±0.30**
	9903210	29305684	0.259	0.261	
	10054217	29345631	0.262	0.262	
6	9553621	28514712	0.252	0.253	82.20±0.73**
	9754136	28406357	0.256	0.252	
	9801124	28911475	0.257	0.257	
7	9403657	27702116	0.249	0.245	79.12±0.55**
	9254713	27403354	0.246	0.242	
	9253621	27415241	0.246	0.242	
8	8854123	26834152	0.238	0.236	76.40±0.28**
	8953210	26342004	0.240	0.231	
	8901247	26710341	0.239	0.235	

* ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

** แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3. การทดสอบความคงตัวของประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย HS ที่ ถูกกักเก็บ และไม่ถูกกักเก็บในนิโอโซม

จากการศึกษาความคงตัวของน้ำมันหอมระเหย HS ที่บรรจุอยู่ในตำรับนิโอโซม F2 โดยเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ถูกกักเก็บในตำรับนิโอโซม ทำการวิเคราะห์ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) ที่ก่อให้เกิดสิวทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี disc diffusion ทุก ๆ 7 วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าน้ำมันหอมระเหย HS ที่กักเก็บในตำรับนิโอโซม F2 มีแนวโน้มของประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) ลดลงอย่างช้า ๆ โดยสัปดาห์ที่ 8 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อต่อเชื้อแต่ละชนิดลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 เท่ากับ 27.29% และ 19.17% ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหย HS ที่ไม่ถูกกักเก็บในนิโอโซมจะมีแนวโน้มของประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว โดยสัปดาห์ที่ 8 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) ลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 เท่ากับ 78.73% และ 69.82% ตามลำดับ

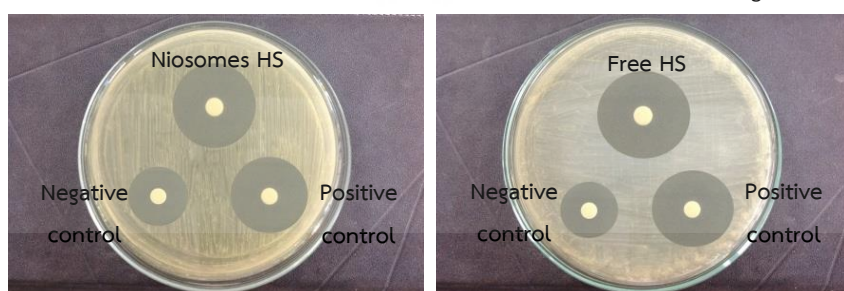
ตารางที่ 23 ร้อยละการลดลงของประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916)

สัปดาห์	ร้อยละของประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>S. epidermidis</i> *		ร้อยละของประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ <i>P. acne</i> *	
	Niosomes entrapping HS (%)	Free HS (%)	Niosomes entrapping HS (%)	Free HS (%)
0	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
1	100±0.00	91.47±3.68	95.72±0.00	84.89±0.00**
2	95.43±0.00	76.58±0.00**	97.85±3.68	81.12±3.27**
3	93.16±7.87	63.82±6.38**	95.72±0.00	71.68±3.27**
4	90.89±3.94	53.18±3.68**	93.60±3.68	62.25±0.00**
5	84.07±3.94**	48.93±3.68**	87.22±3.68**	52.82±3.27**
6	86.34±7.87**	38.29±0.00**	82.96±0.00**	49.05±3.27**
7	81.80±0.00**	31.91±0.00**	82.96±0.00**	39.62±0.00**
8	72.71±3.94**	21.27±3.68**	80.83±3.68**	30.18±3.27**

* ค่าที่แสดงคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ของร้อยละการลดลงของประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยกำหนดให้สัปดาห์ที่ 0 เป็น 100%

** แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

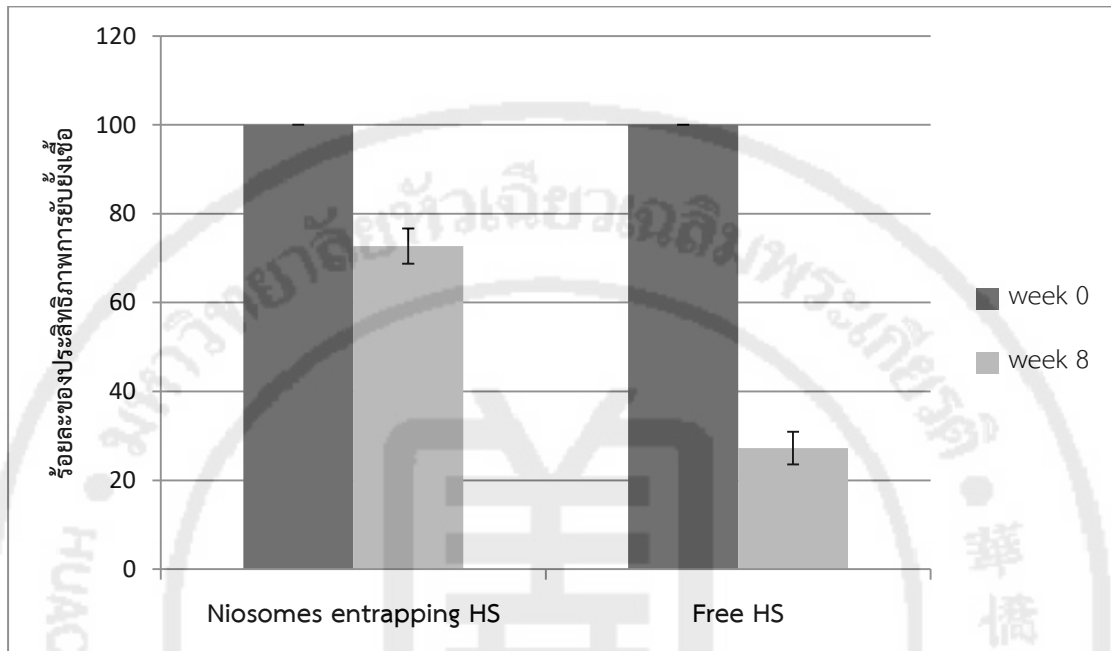
ภาพที่ 32 ตัวอย่างลักษณะโซนยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) ของ HS ที่ถูกกักเก็บในนิโอโซม (a) และ HS ที่ไม่ได้ถูกกักเก็บในนิโอโซม (b) เทียบกับ Ampicillin 10 µg (positive control) และสารละลาย dichloromethane: ethanol ในอัตราส่วน 1:1 (negative control)



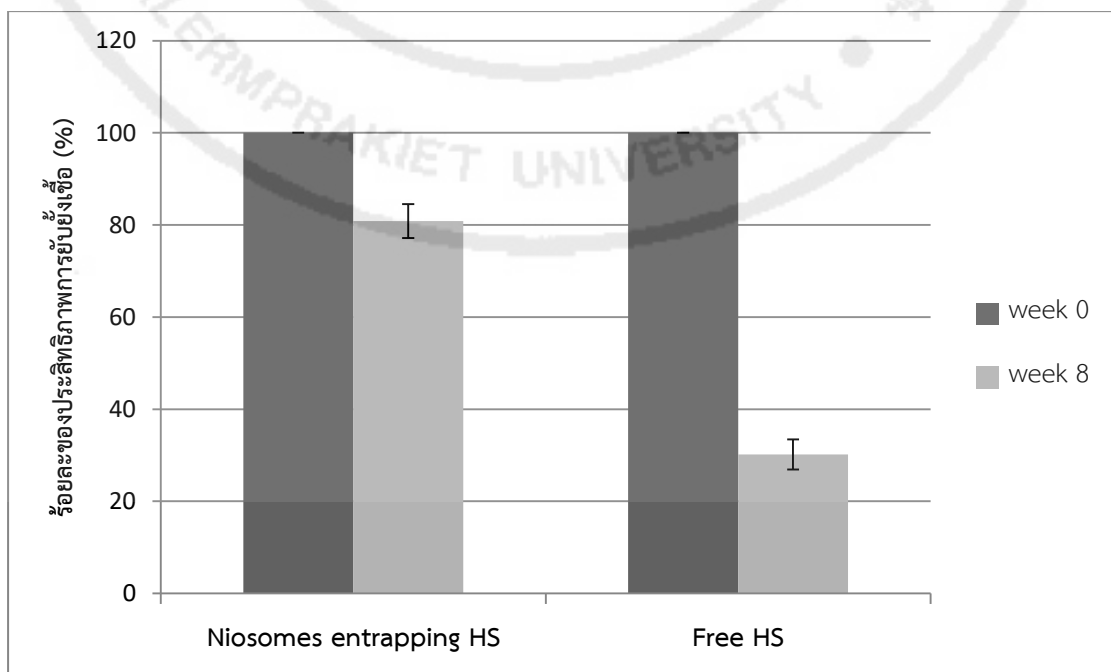
(a)

(b)

แผนภูมิที่ 6 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* (ATCC 14990) ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 ของน้ำมันหอมระเหย HS ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มด้วยนิโอโซม



แผนภูมิที่ 7 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *P. acne* (DMST 14916) ในสัปดาห์ที่ 0 และสัปดาห์ที่ 8 ของน้ำมันหอมระเหย HS ที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มด้วยนิโอโซม



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ H (*O. sanctum* L.), S (*O. basilicum* L.) และ T (*C. longa* L.) ทั้งแบบเดี่ยว และชนิดผสม HS, HT และ ST เพื่อตรวจหาฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิว 2 ชนิด ได้แก่ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) ด้วยวิธี disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหย HS (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดย 10.00 mg/mL มีโซนยับยั้ง เท่ากับ 37.33 ± 0.58 mm ต่อเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ 39.00 ± 1.00 mm ต่อเชื้อ *P. acnes* (DMST 14916) (ฤทธิ์ใกล้เคียงกับ Ampicillin 10 µg, positive control) แต่มีประสิทธิภาพดีกว่าน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยว และแบบผสมอื่น ๆ เมื่อนำมาศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) พบว่า น้ำมันหอมระเหย HS มีค่า MIC และ MBC น้อยที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC ต่อเชื้อแต่ละชนิดเท่ากันที่ 0.512 และ 0.256 mg/mL ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ methyl eugenol และ estragole ใน HS ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้สภาวะที่พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องแล้ว (ตามเกณฑ์ AOAC, 2002) พบว่า ใน HS 0.512 mg/mL มีปริมาณ methyl eugenol และ estragole เท่ากับ 0.158 ± 0.001 และ 0.155 ± 0.002 mg/mL ตามลำดับ

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด ทั้งแบบเดี่ยวและชนิดผสม ด้วยวิธี DPPH และ ABTS radical scavenging assays พบว่า HS มีประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} จากวิธี DPPH และ ABTS radical scavenging assays เท่ากับ 0.024 ± 0.001 และ 0.012 ± 0.002 mg/mL ตามลำดับ แตกต่างจากน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวและชนิดผสมอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า L-ascorbic acid ซึ่งใช้เป็น positive control (โดย L-ascorbic acid มีค่า IC_{50} จากวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 0.038 ± 0.001 และ 0.024 ± 0.002 mg/mL ตามลำดับ)

เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยสลายตัวได้ง่าย จึงใช้รูปแบบนิโอโซมเพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย จึงเตรียม HS โดยใช้ Span[®] 60:cholesterol เป็นสารหล่อหุ้มด้วยอัตราส่วนที่แตกต่างกัน คือ 60:40, 70:30, 80:20 และ 90:10 และนำไปผ่านการลดขนาดด้วยการ sonicate ที่ 0, 2 และ 5 นาที รวม 12 ตำรับ ทำการประเมินคุณลักษณะของนิโอโซมพบว่าลักษณะ

ทางกายภาพของนิโอโซมทุกตำรับมีลักษณะเหลว สีขาวขุ่น ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน มีขนาดหยดอนุภาคเฉลี่ยในช่วง 108.4-642.3 nm และค่าการกระจาย (PDI) ในช่วง 0.148-0.374 ลักษณะตำรับจากการวิเคราะห์ร้อยละการกักเก็บสารสำคัญของ HS ภายในนิโอโซม ด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้สภาวะที่พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องแล้ว พบว่าตำรับนิโอโซม F2 (อัตราส่วนของ Span[®] 60: cholesterol ที่ 60:40 ระยะเวลา sonication 2 นาที) สามารถกักเก็บสารสำคัญ methyl eugenol และ estragole ของ HS ได้มากที่สุดที่ $91.20 \pm 0.74\%$ โดยมีปริมาณ methyl eugenol และ estragole เท่ากับ 0.285 และ 0.280 mg/mL ตามลำดับ

ผู้วิจัยได้เลือกตำรับนิโอโซม F2 ซึ่งมีร้อยละการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย HS ดีที่สุด มาทำการประเมินคุณลักษณะโดยการตรวจสอบลักษณะรูปร่างของนิโอโซมด้วยกล้อง TEM กำลังขยาย 175000x พบว่านิโอโซมที่เตรียมได้มีเป็นทรงกลมสีขาว ส่วนลักษณะของนิโอโซมภายใต้กล้อง polarized light microscopy มีลักษณะการกระเจิงแสงเป็นรูปตัวเอ็กซ์หรือเครื่องหมายกากบาท เมื่อทำการประเมินสมบัติของตำรับนิโอโซม F2 ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าค่าความเป็นกรดต่าง ความหนืด และการกระจายตัวของอนุภาคไม่เปลี่ยนแปลง โดยอยู่ในช่วง 5.51-5.75, 0.9-1.2 cps. และ 0.274-0.304 ตามลำดับ แต่ขนาดอนุภาคของนิโอโซมมีขนาดใหญ่ขึ้นเล็กน้อย โดยที่อุณหภูมิ 25 °C มีอัตราการเพิ่มขนาดของอนุภาคนิโอโซมมากกว่าที่ 4 °C เท่ากับ 22.42% และร้อยละการกักเก็บทั้งสองอุณหภูมิมีค่าลดลง โดยที่อุณหภูมิ 25°C มีแนวโน้มของการลดลงมากกว่าที่ 4°C เท่ากับ 7.12%

จากการประเมินสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ของตำรับนิโอโซม F2 (น้ำมันหอมระเหยที่ถูกกักเก็บในรูปแบบนิโอโซม เปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ถูกกักเก็บ พบว่าน้ำมันหอมระเหย HS ที่กักเก็บในตำรับนิโอโซม F2 มีแนวโน้มของประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) ลดลงอย่างช้า ๆ โดยสัปดาห์ที่ 8 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อต่อเชื้อแต่ละชนิดลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 เท่ากับ 27.29% และ 19.17% ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหย HS ที่ไม่ถูกกักเก็บในนิโอโซมจะมีแนวโน้มของประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว โดยสัปดาห์ที่ 8 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) ลดลงจากสัปดาห์ที่ 0 เท่ากับ 78.73% และ 69.82% ตามลำดับ

5.2 อภิปรายผล

1. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในสมุนไพรพื้นบ้านของไทยที่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบในการประกอบอาหาร ได้แก่ กะเพรา (*O. sanctum* L., H) โหระพา (*O. basilicum* L., S) และขมิ้นชัน (*C. longa* L., T) ด้านการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ก่อให้เกิดสิว ได้แก่ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acnes* (DMST 14916) โดยทำการศึกษาศักยภาพของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดข้างต้น ทั้งแบบเดี่ยว และชนิดผสม HS, HT, ST ในช่วงความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย 0.625-10.00 mg/mL ด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่า HS (อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร) ที่ความเข้มข้น 10.00 mg/mL มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดสิวทั้ง 2 ชนิด และมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ ampicillin 10 µg โดยประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อของน้ำมันหอมระเหยจะแปรผันตามความเข้มข้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lodhia et al. (2009)⁽⁴⁹⁾ ที่ทำการศึกษาศักยภาพการยับยั้งแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย จากกลีบดอกไม้ 4 ชนิด พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกลีบดอกไม้ทั้ง 4 ชนิด มีประสิทธิภาพการยับยั้งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย

จากการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) ของ H, S และ T ทั้งแบบเดี่ยว และชนิดผสม พบว่าน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวที่มีฤทธิ์ดีที่สุดคือ H ส่วนน้ำมันหอมระเหยชนิดผสมที่ดีที่สุดคือ HS และมีฤทธิ์ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวและชนิดผสมอื่น ๆ จากผลการทดลองนี้ อาจกล่าวได้ว่าน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม HS มีสมบัติเสริมฤทธิ์กันในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว เนื่องจากองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดย H มี eugenol และ methyl eugenol (36) และ S มี estragole⁽⁵⁰⁾ เป็นองค์ประกอบหลัก และจัดเป็นสารฟีนอลที่สามารถทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แตกและโปรตีนเสียสภาพ อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้⁽⁵¹⁾

2. การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้งแบบเดี่ยวและชนิดผสม พบว่า HS มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด แตกต่างจากน้ำมันหอมระเหยแบบเดี่ยวและชนิดผสมอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่า IC_{50} จากวิธี DPPH และ ABTS radical scavenging assays เท่ากับ 0.024 ± 0.001 และ 0.012 ± 0.002 mg/mL ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า L-ascorbic acid ซึ่งใช้เป็น positive control control (โดย L-ascorbic acid มีค่า IC_{50} จากวิธี DPPH และ ABTS เท่ากับ 0.038 ± 0.001 และ 0.024 ± 0.002 mg/mL ตามลำดับ)

อาจเนื่องจาก HS มีสมบัติเสริมฤทธิ์กัน ทำให้ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระดีกว่า H หรือ S แบบเดี่ยว ซึ่งประสิทธิภาพของการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยนั้นขึ้นกับองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย โดยสารสำคัญใน H และ S เป็นสารประกอบฟีนอล มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจน ทำให้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ⁽⁵²⁾ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaurinovic et al. (2011)⁽⁵³⁾ ซึ่งทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดโหระพา พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแปรผันตามปริมาณสารประกอบฟีนอล

3. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิค GC-MS

จากการศึกษาวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณสารสำคัญที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหย HS ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดีที่สุด ด้วยเทคนิค GC-MS โดยใช้สภาวะที่พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องแล้ว พบว่าน้ำมันหอมระเหยชนิด HS ซึ่งค่า MIC เท่ากับ 0.512 mg/mL มี methyl eugenol และ estragole ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ H และ S ที่ปริมาณเท่ากับ 0.158 ± 0.001 mg/mL และ 0.155 ± 0.002 mg/mL ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นดังกล่าวของสารสำคัญทั้งสองชนิดจึงเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ และจะใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดความเข้มข้นของ HS เพื่อเตรียมในตำรับนิโอโซม

4. การเตรียมนิโอโซมบรรจุน้ำมันหอมระเหย HS และการประเมินสมบัติ

น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากจากธรรมชาติมักไม่คงตัว เนื่องจากสามารถสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกแสงหรือความร้อน⁽¹²⁾ จึงประยุกต์ใช้เทคนิคการนำส่งยาเพื่อให้มีความคงตัวของน้ำมันหอมระเหยมากขึ้น โดยเตรียมน้ำมันหอมระเหย HS ให้อยู่ในรูปแบบนิโอโซม ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ได้กับตัวยาหรือสารสำคัญได้หลากหลายชนิด เนื่องจากมีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ Span[®] 60 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิด ester type surfactant มีความคงตัวและความเป็นพิษน้อย อีกทั้งยังมีค่าความชอบน้ำต่อไขมัน (Hydrophilic-lipophilic Balance: HLB) อยู่ระหว่าง 4-8 สามารถเปิดเป็นถุงอนุภาคได้ดีกว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีค่าสูงซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เตรียมนิโอโซม อีกทั้งถุงอนุภาคที่เกิดจาก Span[®] 60 มีโอกาสรั่วน้อย ทำให้นิโอโซมมีความคงตัวมาก ร่วมกับการใช้ cholesterol เพื่อเสริมความแข็งแรงของผนังนิโอโซม⁽⁵⁴⁾

1) การตรวจสอบคุณลักษณะภายนอก (Appearance) ขนาด และความสามารถในการกักเก็บสารของนิโอโซมน้ำมันหอมระเหย

จากการศึกษาดำรับนิโอโซมบรรจุน้ำมันหอมระเหย HS ด้วยอัตราส่วนของ Span[®] 60: cholesterol ที่แตกต่างกัน คือ 60:40, 70:30, 80:20 และ 90:10 และลดขนาดด้วยการ sonicate เป็นระยะเวลาเวลา 0, 2 และ 5 นาที ทั้งหมด 12 ดำรับ พบว่าทุกอัตราส่วนได้นิโอโซมที่มีลักษณะเป็นอิมัลชันสีขาวขุ่น เป็นเนื้อเดียวกัน และมีความคงตัวไม่เกิดตะกอน โดยทุกอัตราส่วนของ Span[®] 60:cholesterol ที่ไม่ได้ผ่านการ sonicate มีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 599.8-642.3 nm และ PDI ในช่วง 0.354-0.374 ส่วนดำรับที่เตรียมโดย sonication เป็นเวลา 2 นาที พบว่าขนาดอนุภาคของนิโอโซมมีขนาดเล็กลง อยู่ในช่วง 129.7-181.8 nm และมีค่า PDI ลดลงเท่ากับ 0.258-0.279 และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการ sonicate เป็น 5 นาที พบว่าขนาดอนุภาคของนิโอโซมเล็กลงมากกว่าดำรับที่ sonicate 2 นาที มีค่าอยู่ในช่วง 108.4-156.7 nm และ PDI เท่ากับ 0.148-0.168 ดังนั้นระยะเวลา sonication มีผลต่อการลดลงของขนาดอนุภาค ส่วนค่า PDI ของนิโอโซมที่เตรียมได้ทุกดำรับมีค่าน้อยกว่า 1 แสดงว่าอนุภาคนิโอโซมที่เตรียมได้มีการกระจายตัวที่ดี⁽⁵⁵⁾

จากการหาปริมาณการเก็บกักน้ำมันหอมระเหยในนิโอโซม ทั้ง 12 ดำรับ พบว่าอัตราส่วนของ Span[®] 60:cholesterol ที่ต่างกัน มีผลต่อการกักเก็บสารในนิโอโซม รวมไปถึงเวลาที่ใช้ในการ sonicate แตกต่างกันก็มีผลต่อปริมาณของสารที่เก็บกักไว้ภายในเช่นเดียวกัน โดยดำรับที่กักเก็บสารไว้ภายในดีที่สุดคือจะใช้เวลาในการ sonication 2 นาที เท่ากับ 91.20±0.74% ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Ruckmani (2010)⁽⁵⁶⁾ ที่ทำการทดสอบผลของการ sonicate ต่อการเก็บสารสำคัญในนิโอโซม โดยพบว่าเมื่อใช้เวลาในการ sonicate 2 นาที จะสามารถเก็บสารไว้ภายในได้มากที่สุด แต่ถ้าใช้เวลาในการ sonicate ที่ 5 นาที จะทำให้ผนังของนิโอโซมเกิดการรั่วได้ ส่งผลให้กักเก็บสารได้น้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนของ Span[®] 60:cholesterol 60:40 เป็นอัตราส่วน ที่เหมาะสมมากกว่าอัตราส่วนอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง โดย cholesterol นั้นมีผลต่อความแข็งแรงของผนัง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mokhtar et al. (2008)⁽⁵⁷⁾ ที่ทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อโครงสร้างของนิโอโซม พบว่าอัตราส่วนของ cholesterol ที่เพิ่มขึ้น และมีปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้มีเสถียรภาพและมีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญของนิโอโซมเพิ่มมากขึ้น จากข้อมูลและเหตุผลดังกล่าวจึงทำการเลือกดำรับ F2 ซึ่งมีร้อยละการกักเก็บ HS ในนิโอโซมมากที่สุด มีค่าการกระจายตัวที่ดี และมีขนาดไม่เกิน 500 nm⁽⁵⁸⁾ มาใช้ในการทดสอบความคงตัวต่อไป

2) การศึกษาสัณฐานวิทยาของตำรับนิโอโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยที่ดีที่สุดด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดโพลาไรซ์ (polarized light microscopy) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

จากการตรวจสอบรูปร่างของนิโอโซมผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบว่าลักษณะของตำรับนิโอโซม F2 มีลักษณะเป็นทรงกลม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Arunothayanun et al. (2000)⁽⁵⁹⁾ ส่วนลักษณะของนิโอโซมภายใต้กล้อง polarized light microscopy พบการกระเจิงแสงของนิโอโซมเป็นรูปตัวเอ็กซ์หรือเครื่องหมายกากบาท ทำให้ยืนยันได้ว่าโครงสร้างของนิโอโซมมีลักษณะเป็นผนังสองชั้น⁽⁶⁰⁾

3) การทดสอบความคงตัวโดยวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ และปริมาณการกักเก็บสารของตำรับนิโอโซมที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหย HS ได้ดีที่สุด

จากการวิเคราะห์ความคงตัวของนิโอโซมน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบนิโอโซม (ตำรับ F2) ที่ 4°C และ 25°C เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บ 8 สัปดาห์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างและความหนืด เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และจากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ 4°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษานิโอโซม โดยที่ทั้งสองอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคนิโอโซม แต่พบว่าที่อุณหภูมิ 25°C มีอัตราการเพิ่มขึ้นของขนาดนิโอโซมมากกว่าที่ 4°C เท่ากับ 22.42% ซึ่งขนาดที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นส่งผลถึงประสิทธิภาพของการกักเก็บสารสำคัญภายในนิโอโซม โดยที่อุณหภูมิ 25°C มีแนวโน้มของการกักเก็บสารลดลงมากกว่าที่ 4°C เท่ากับ 7.12% จากงานวิจัยของ Ruckmani et al. (2000)⁽⁶¹⁾ รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงขนาดนิโอโซมอาจเป็นผลมาจากโครงสร้างของนิโอโซมที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้น และงานวิจัยของ Wissing et al. (2004)⁽⁶²⁾ พบว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของนิโอโซมทำให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บสารลดลง

4) การทดสอบความคงตัวของประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. epidermidis* (ATCC 14990) และ *P. acne* (DMST 14916) ของน้ำมันหอมระเหย HS ที่ถูกกักเก็บ และไม่ถูกกักเก็บในนิโอโซม

จากการศึกษาความคงตัวของประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวทั้ง 2 ชนิด คือ *S. epidermidis* และ *P. acne* ของน้ำมันหอมระเหย HS ที่ถูกกักเก็บในนิโอโซม เปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหย HS ที่ไม่ถูกกักเก็บในนิโอโซม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยชนิดผสม HS ที่ถูกกักเก็บในนิโอโซม ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพลดลงอย่างช้า ๆ แต่ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย HS ที่ไม่ได้ถูกกักเก็บในนิโอโซมจะลดลงอย่างรวดเร็ว อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของน้ำมันหอมระเหยที่มีความไวต่อแสงเมื่อไม่ถูกห่อหุ้มด้วยนิโอโซม ทำให้เกิดการสลายตัวได้ง่าย

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wu et al. (2015)⁽⁶³⁾ ได้เก็บกักน้ำมันหอมระเหยไว้ในไลโปโซมซึ่งเป็น nanoparticle ที่มีโครงสร้างเป็น bilayer เหมือนกับนิโอโซม พบว่าการเก็บกักน้ำมันหอมระเหยไว้ภายในจะช่วยเพิ่มเสถียรภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

5.3 ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยด้านการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว การต้านอนุมูลอิสระ และการศึกษาการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยในนิโอโซมให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ผู้วิจัยขอเสนอแนวทางการพัฒนาดังนี้

1. ควรศึกษาประสิทธิภาพจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรอื่น ๆ ในด้านการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว และต้านอนุมูลอิสระ เพื่อให้เกิดความหลากหลายในด้านการเสริมฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่าง ๆ และเพื่อให้ประสิทธิภาพในด้านการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว และต้านอนุมูลอิสระที่ดีขึ้น
2. ควรศึกษาความคงตัวของตำรับนิโอโซมที่บรรจุน้ำมันหอมระเหย HS โดยตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ควบคู่ไปกับการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ทำให้เกิดสิว

บรรณานุกรม

1. Joshi LS, Pawar HA. Herbal cosmetics and cosmeceuticals: An overview. *Nat Prod Chem Res.* 2015;3(1):1-8.
2. Mills S, Bone K. *The essential guide to herbal safety.* Elsevier Health Sciences; 2005.
3. Kilkenny M, Merlin K, Plunkett A, Marks R. The prevalence of common skin conditions in Australian school students: 3. Acne vulgaris. *Br J Dermatol.* 1998;139(5):840–845.
4. พูลศรี เขตโสภณ. ปัจจัยที่มีผลต่อความรู้ในการรักษาสิวของนักศึกษาระดับปริญญาตรี ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม [วิทยานิพนธ์]. นครปฐม: มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2548.
5. อุดมลักษณ์ สุขอัติตะ, อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์, ประภัสสร รักษาวรร, สิริพร ศิริวรรณ, พจมาน พิศเพียงจันทร์. การสกัดและการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมังคุด. ใน: เอกสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. กรุงเทพมหานคร: สาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2549. หน้า 529-536.
6. ชัชสินี กาญจนอลงกรณ์, ธีรวัฒน์ จันทวีชรากร. การพัฒนาตำรับเจลของสารสกัดชาเพื่อใช้ในการรักษาสิว [วิทยานิพนธ์]. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยมหิดล; 2556
7. Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, et al. (2010). Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules.* 2010;15(5):3200-3210.
8. ตำราวิชาการสุคนธ์บำบัด. กรุงเทพมหานคร: สำนักกิจการโรงพิมพ์ องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2545.
9. Pelle E, Muizzuddin N, Mammone T, Marenus K, Maes D. Protection against endogenous and UVB-induced oxidative damage in stratum corneum lipids by an antioxidant-containing cosmetic formulation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1999;15(3-4):115-9.
10. ประภาพรรณ พรหมหิรัญกุล. การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเครื่องสำอางและไวน์ไทย. *เวชสารโรงพยาบาลมหาราชานครราชสีมา.* 2551;32(2):101-108.
11. Oranuch Thanaketspaisarn. Niosome delivery systems in pharmaceutical applications. *IJPS.* 2012;8(2):12-26.

บรรณานุกรม (ต่อ)

12. นิจศิริ เรืองรังษี. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับน้ำมันหอมระเหยตำราวิชาการสูคนธบำบัด.
กรุงเทพมหานคร: สำนักกิจการโรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2550.
13. ชัมมทิวต์ นรรัตน์วันชัย. เรื่องของสิว ที่คุณอาจไม่รู้ [ออนไลน์]. 2558 [เข้าถึงเมื่อ 11 ธันวาคม 2558] เข้าถึงได้จาก:
<http://www.mfu.ac.th/school/antiaging/admin/uploadCMS/research/SLWed12>
14. Williams HC, Dellavalle RP, Garner S. Acne vulgaris. The Lancet. 2012;379(9813):361-372.
15. ปณิธิ พุทธกรรณา. เรื่องสิวลิว เพื่อผิวหน้าใส. กรุงเทพมหานคร: มายิกสำนักพิมพ์; 2556.
16. Canadian Dermatology Association. Stages of acne [Online]. 2016 [cited 2015 December 11]. Available form: <http://www.dermatology.ca/skin-hair-nails/skin/acne/stages-of-acne>
17. Jappe U. Pathological mechanisms of acne with special emphasis on *Propionibacterium acnes* and related therapy. Acta dermato-venereologica. 2003;83:241-248.
18. Perry AL, Lambert PA. *Propionibacterium acnes*. Letters in Applied Microbiology. 2006;42:185-188.
19. tzhak Brook. *Propionibacterium acnes* [Online]. 2016 [cited 2015 December 11]. Available form: <http://www.antimicrobe.org/b225.asp#t6>
20. Microbiology2009. The Wonderful World of Acne [Online]. 2009 [cited 2015 December 11]. Available form:
<https://microbiology2009.wikispaces.com/The+Wonderful+World+of+Acne>
21. Otto M. *Staphylococcus epidermidis*-the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol. 2009;7(8):555-567.
22. Bacteria in photos. Bacteria under Microscope *Staphylococcus epidermidis* [Online]. 2013 [cited 2015 December 11]. Available form:
<http://www.bacteriainphotos.com/bacteria%20under%20microscope/staphylococcus%20epidermidis%20microscopy.html>

บรรณานุกรม (ต่อ)

23. Nishino C, Enoki N, Tawata S, Mori A, Kobayashi K, Fukushima M. Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. *Agricultural and biological chemistry*. 1987;51(1): 139-143.
24. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. กะเพรา [ออนไลน์]. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล [เข้าถึงเมื่อ 11 ธันวาคม 2558] เข้าถึงได้จาก: <http://medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/ocimten.html>
25. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. ขมิ้นชัน [ออนไลน์]. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล [เข้าถึงเมื่อ 11 ธันวาคม 2558] เข้าถึงได้จาก: <http://medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/curcuma.html>
26. Labban L. Medicinal and pharmacological properties of Turmeric (*Curcuma longa*): A review. *Int J Pharm Biomed Sci*. 2014;5(1):17-23.
27. Jayasinghe C, Gotoh N, Aoki T, Wada S. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem*. 2003;51(15):4442-4449.
28. สุชาติภพ ภมรประวัติ. โหระพา คุณค่าที่มากกว่าความอร่อย [ออนไลน์]. นิตยสารหมอชาวบ้าน [เข้าถึงเมื่อ 11 ธันวาคม 2558] เข้าถึงได้จาก: <http://www.doctor.or.th/article/detail/582>
29. พิมพ์พร สีสภาพพิสิฐ. สுகนธบำบัด Aromatherapy. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2545.
30. ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทย ภาณุบุตร, สาธิต พรตระกูลพิพัฒน์. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ. ใน: เอกสารการประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 9. ขอนแก่น: สาขาสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2551. หน้า 91-101.
31. บุหรีน พันธุ์สุวรรณค์. อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2556;21:266-284.
32. ไมตรี สุทธิจิต, รัตนา บรรเจิดพงษ์ชัย, วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, ศิริธร ศิริอมรรพวรรณ, ไชยวัฒน์ ไชยสุด, สุพัตรา ปรศุพัฒนา. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. เชียงใหม่: นวัตกรรมสุขภาพสำนักพิมพ์; 2555.
33. Kumar A, Pal J, Jaiswal A, Singh V. Review on niosomes as novel drug delivery system. *Int Res J Pharm*. 2011;2(5): 61-65.

บรรณานุกรม (ต่อ)

34. นิจศิริ เรืองรังษี. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับน้ำมันหอมระเหย. กรุงเทพมหานคร: สำนักกิจการโรงพิมพ์ องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2550.
35. คณะกรรมการจัดการความรู้. คู่มือพิชิต GC-MS [ออนไลน์]. ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 3 [เข้าถึงเมื่อ 11 ธันวาคม 2558] เข้าถึงได้จาก : <http://rmscns.dmsc.moph.go.th/2011/file/คู่มือพิชิต%20G1.pdf>
36. Lertsatitthanakorn P, Taweechaisupapong S, Aromdee C, Khunkitti W. In vitro bioactivities of essential oils used for acne control. *Int J Aromatherapy*. 2006;16(1):43-49.
37. นุศวดี พจนานุกิจ, สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม. เปรียบเทียบการยับยั้ง เชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุด ขมิ้นชันและใบบัวบก. *วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร*. 2013;18(1):1-9.
38. Bunrathep S, Palanuvej C, Ruangrunsi N. Chemical composition and antioxidative activities of essential oils from four *Ocimum* species endemic to Thailand. *J.Health Res*. 2007;21(3):201-206.
39. Viyoch J, Pisutthanan N, Faikreua A, Nupangta K, Wangtorpol K, Ngokkuen J. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of Thai basil oils and their micro-emulsion formulas against *Propionibacterium acnes*. *Int J Cosmet Sci*. 2006;28(2):125-33.
40. ประภัสสร วีระพันธ์, วัชรีย์ คุณกิตติ. คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยในหลอดทดลอง. *วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน*. 2554;7(3):30-38.
41. Sharafati R, Rokni N, Rafieian M, Drees F, Salehi E. Antioxidant and antibacterial activity of basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil in beef burger. *J Agr Sci Tech*. 2015;17(4):817-826.
42. Gounder DK, Lingamallu J. Comparison of chemical composition and antioxidant potential of volatile oil from fresh, dried and cured turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes. *Industrial crops and products*. 2012;38:124-131.
43. อรัญญา มโนสร้อย, จีระเดช มโนสร้อย. การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ครีมเวชสำอางที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย ที่เก็บกักในถุงขนาดนาโนสำหรับใช้รักษาสิว. *วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก*. 2551;6:136.

บรรณานุกรม (ต่อ)

44. Atanda OO, Akpan A, Oluwafemi F. The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control*. 2007;18(5):601-607.
45. Fatma A, Sokindra K, Khan A. Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*" *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(8):623-627.
46. Li S, Li SK., Gan RY, Song FL, Kuang L, Li HB. Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 233 medicinal plants. *Industrial Crops and Products*. 2013;51:289-298.
47. AOAC International. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals [Online]. 2002 [cited 2015 December 11]. Available form: http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf
48. Navya MN, Parthiban S, Senthilkumar GP, Tamizh T. The effect of span 60 in the formulation of niosome containing flutamide. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences*. 2014;3(5):444-449.
49. Lodhia MH, Bhatt KR, Thaker S. Antibacterial activity of essential oils from Palmarosa, Evening Primrose, Lavender and Tuberosa. *Indian J Pharm Sci*. 2009;71(2):134-136.
50. Stanko KC, Orlic S, Politeo O, Strikic F. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum taxa*. *Food Chemistry*. 2010;119:196-201.
51. ภญ.วรรณพร ศรีสุคนธ์รัตน์. สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุข. นนทบุรี: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข; 2558.
52. โอภา วัชรคุปต์. สารต้านอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging Agent). กรุงเทพมหานคร: บริษัทนิวไทยมิตรการพิมพ์; 2550.
53. Kaurinovic B, Popovic M, Vlaisavljevic S, Trivic S. (2011). Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. *Molecules*. 2011;16(9):7401-7414.

บรรณานุกรม (ต่อ)

54. อรุณช รัตนไพศาล. ระบบนำส่งนีโอโซมในทางเภสัชกรรม. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 2555;8(2):12-26.
55. Pithchayawan Srimongkon. Development of niosome as a drug delivery system of *Kaempferia parviflora* extract. *IJPS*. 2015;11(5):70-79.
56. Ruckmani K, Sankar V. Formulation and optimization of zidovudine niosomes. *Aaps Pharmscitech*. 2010;11(3):1119-1127.
57. Mokhtar M, Sammour OA, Hammad MA, Megrab NA. Effect of some formulation parameters on flurbiprofen encapsulation and release rates of niosomes prepared from proniosomes. *Int J Pharm*. 2008;361(1):104-111.
58. Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014;2014:1-14.
59. Arunothayanun P, Bernard MS, Craig DQM, Uchegbu IF, Florence AT. The effect of processing variables on the physical characteristics of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) formed from a hexadecyl diglycerol ether. *Int J Pharm*. 2000;201(1):7-14.
60. Manosroi A, Wongtrakul P, Manosroi J, Sakai H, Sugawara F, Yuasa M, et al. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2003;30(1):129-138.
61. Ruckmani K, Jayakar B, Ghosal SK. Nonionic surfactant vesicles (niosomes) of cytarabine hydrochloride for effective treatment of leukemias: encapsulation, storage, and in vitro release. *Drug Dev Ind Pharm*. 2000;26(2): 217-222.
62. Wissing SA, Kayser O, Muller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(9):1257-1272.
63. Wu J, Liu H, Ge S, Wang S, Qin Z, Chen L, 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;43:427-435.



ภาคผนวก

คำย่อหรือสัญลักษณ์

°C	องศาเซลเซียส
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
CFU/mL	Colony forming units per milliliter
Mm	มิลลิเมตร
nm	นาโนเมตร
μL	ไมโครลิตร
TSB	Tryptic soy broth
TSA	Tryptic soy agar
MHB	Mueller hinton broth
MHA	Mueller hinton agar
MIC	Minimal inhibitory concentration
MBC	Minimal bactericidal concentration
mL	มิลลิลิตร
OD	Optical density
v/v	ปริมาตร/ปริมาตร
μg/mL	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
mg/mL	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
%	ร้อยละ
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline6-sulfonic acid)
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
g	กรัม
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
K ₂ S ₂ O ₈	Potassium Persulfate
Span [®] 60	Sorbitan monostearate
PBS	Phosphate buffer saline
KI	Potassium Iodide

คำย่อหรือสัญลักษณ์ (ต่อ)

NaCl	Sodium chloride
KCl	Potassium chloride
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Sodium phosphate dibasic dehydrate
KH ₂ PO ₄	Potassium Dihydrogenphosphate
HCl	Hydrochloric acid
NaOH	Sodium hydroxide
PDI	Polydispersity index
DI	Diameter



