



ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน
ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

ANTI-ACNE INDUCING BACTERIAL ACTIVITY OF *OCIMUM GRATISSIMUM* LEAF OIL
MICROEMULSION AND NANOEMULSION

เนตรนภา อ้นเต่า

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน
ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ANTI-ACNE INDUCING BACTERIAL ACTIVITY OF *OCIMUM GRATISSIMUM* LEAF OIL
MICROEMULSION AND NANOEMULSION



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Pharmaceutical Product Development)
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University

2021

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน
ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

ของ

เนตรนภา อ้นเต่า

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ เกียรติสิน)

..... ที่ปรึกษาร่วม

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง)

(รองศาสตราจารย์ ดร.ฐาปนี หงส์รัตนาวรกิจ)

..... ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูดา จิตตสุโข)

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากไบบีหฺร่า
ผู้วิจัย	เนตรนภา อินเต่า
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2564
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ชูดา จิตตสุโก

สิวเป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรัง ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ของน้ำมันหอมระเหยจากไบบีหฺร่าด้วยวิธี agar disc diffusion method และ broth microdilution assay พัฒนาไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากไบบีหฺร่าด้วยวิธี titration method และ phase inversion composition ศึกษาความคงสภาพทางกายภาพ ประเมินความคงสภาพทางเคมีจากการวิเคราะห์ปริมาณยูจินอลซึ่งเป็นสารสำคัญด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry ผลการศึกษาพบว่า เมื่อนำไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากไบบีหฺร่าไปทดสอบฤทธิ์พบว่า มี inhibition zone กับเชื้อ *C. acnes* และ *S. epidermidis* ในขณะที่นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากไบบีหฺร่าพบเพียง bacteria static zone เนื่องจากไมโครอิมัลชันสามารถบรรจุปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่มากกว่า (7.5 %v/v ต่ำรับ) นาโนอิมัลชัน (1 %v/v ต่ำรับ) การเก็บรักษาไมโครอิมัลชันที่อุณหภูมิต่ำ (4 °C) นาโนอิมัลชันเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) ส่งผลต่อความคงสภาพกายภาพที่ดี ในด้านความคงสภาพทางเคมี ที่อุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลต่อการสลายตัวของสารสำคัญในไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน ดังนั้นในการศึกษารุ่นนี้แสดงให้เห็นว่าไมโครอิมัลชัน นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากไบบีหฺร่าเป็นอีกทางเลือกทางธรรมชาติสำหรับการรักษาโรคสิวและลดโอกาสในการดื้อยาปฏิชีวนะ

Title	ANTI-ACNE INDUCING BACTERIAL ACTIVITY OF <i>OCIMUM GRATISSIMUM</i> LEAF OIL MICROEMULSION AND NANOEMULSION
Author	NETNAPA ONTAO
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2021
Thesis Advisor	Assistant professor Sirivan Athikomkulchai , Ph.D.
Co Advisor	Associate professor Sarin Tadtong , Ph.D.
Co Advisor	Associate professor Chuda Chittasupho , Ph.D.

Acne vulgaris is a chronic inflammatory skin disease. The two common acne-associated bacteria are *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. This study aimed to evaluate the anti-acne properties of *Ocimum gratissimum* leaf oil using the agar disc diffusion method and broth microdilution assay. The microemulsion and nanoemulsion of *O. gratissimum* leaf oil were formulated by the titration method and phase inversion composition method. The active chemical stability of the formulations was indicated by analyzing the eugenol using a validated UV-Vis spectrophotometry. The anti-acne activity of microemulsion indicated the inhibition zone while nanoemulsion showed only the bacteria static zones against *C. acnes* and *S. epidermidis*. The microemulsion contained higher amount of *O. gratissimum* leaf oil (7.5 %v/v) compared with nanoemulsion (1 %v/v). The microemulsion and nanoemulsion showed an acceptable physical stability at 4 °C and 30 °C, respectively. The degradation of the active compounds in these formulations were dependent on both time and temperature. Thus, this study suggested that the microemulsion and nanoemulsion of *O. gratissimum* leaf oil was a potential natural and effective alternative for treatment of acne and overcoming emerging antibiotic resistance.

Keyword : *Ocimum gratissimum* L. oil, Microemulsion, Nanoemulsion, Eugenol

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รองศาสตราจารย์ ดร. ชูดา จิตตสุโก และ รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง อาจารย์ที่
ปรึกษาร่วม ที่มีความกรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ ให้ความเชื่อมั่น ไว้วางใจและเอาใจใส่
เป็นอย่างดีในเรื่องในการดำเนินงานวิจัยตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนสำเร็จเรียบร้อยสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึง
ขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ เกียรติสิน ที่ให้ความกรุณา เป็น
ประธานและผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกในการสอบปากเปล่าปริญญาโทฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ ที่ให้ความกรุณาเป็น
กรรมการร่วมในการสอบปากเปล่าปริญญาโทตลอดจนริเริ่มแนวคิดและให้ข้อเสนอแนะที่เป็น
ประโยชน์ในการทำวิจัยฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามิ ที่ให้สละเวลาอันมีค่าในการให้
คำแนะนำด้าน method validation ซึ่งเป็นประโยชน์ในการทำวิจัยฉบับนี้เป็นอย่างมาก

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา วิทยาการ
เภสัชภัณฑ์ที่ถ่ายทอดองค์ความรู้ ตลอดจนให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์สำหรับการนำไป
ประยุกต์ใช้ในการทำงานและการทำวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้คำปรึกษารวมถึงให้
กำลังใจและให้การช่วยเหลือที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ให้ความกรุณาให้
เข้าใช้เครื่องวัดขนาดอนุภาคและความต่างศักย์บนผิวอนุภาค Zetasizer จนการดำเนินการวิจัยเสร็จ
สมบูรณ์ลงได้เป็นอย่างดีและสุดท้ายนี้

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่สนับสนุนด้านกำลังใจและเรื่อง
การศึกษามาโดยตลอด ขอบพระคุณเพื่อนร่วมรุ่นรวมทั้งบุคคลที่ไม่ได้เอ่ยนามที่ให้ความช่วยเหลือที่ดี
มาโดยตลอดจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เนตรนภา อ้นเต่า

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ	છ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลังและความสำคัญของการวิจัย.....	1
ปัญหาการวิจัย	5
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	5
ปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษา.....	6
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	7
นิยามเชิงปฏิบัติการ	7
กรอบแนวคิดในงานวิจัย	8
สมมติฐานงานวิจัย.....	8
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
1. สิว (Acne vulgaris).....	9
1.1 ปัจจัยของการเกิดสิว	10
1.2 แนวทางในการรักษาสิว	11

1.3 ข้อมูลทั่วไปของแบคทีเรีย <i>Cutibacterium acnes</i> และ <i>Staphylococcus epidermidis</i>	12
2. ข้อมูลเกี่ยวกับยี่หว่า	14
2.1 ลักษณะพฤกษศาสตร์	14
2.2 องค์ประกอบทางเคมี	15
2.3 วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย	15
2.4 การวิเคราะห์สารสำคัญและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย	18
2.5 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	19
3. ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion)	20
3.1 ทฤษฎีการเกิดไมโครอิมัลชัน (theories of microemulsion)	21
3.2 ส่วนประกอบของไมโครอิมัลชันและการสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม	23
3.3 การเตรียมไมโครอิมัลชัน (Microemulsion Preparation)	24
4. นาโนอิมัลชัน	25
4.1 ทฤษฎีการเกิดนาโนอิมัลชัน	26
5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการประยุกต์ใช้ไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	30
1. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	30
1.1 วัสดุอุปกรณ์	30
1.2 เครื่องมือ	30
1.3 สารเคมี	31
1.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	31
1.5 พีชที่ใช้ในการทดสอบ	31
2. วิธีดำเนินงานวิจัย	32

2.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยวิธี hydrodistillation method	32
2.2 การวิเคราะห์สารสำคัญทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	32
2.3 หาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยจาก ใบยี่หระ ต่อเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี broth microdilution assay ทดสอบใน 96-well plate	33
2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol ในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry.....	34
2.5 การเตรียมไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยวิธี titration method	36
2.7 ศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ.....	40
2.8 การประเมินความคงสภาพทางกายภาพ	40
2.9 การวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol ในไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry	41
2.10 การประเมินความคงสภาพทางเคมีของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ.....	42
2.11 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิวของไมโครอิมัลชันและ นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยวิธี agar well diffusion.....	43
2.12 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	44
2.13 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	44
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย และอภิปรายผล	45
1. ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ตลาดไท จังหวัดปทุมธานี.....	45
2. ผลการวิเคราะห์สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	45
3. ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว.....	47

3.1 ผลการประเมินความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย <i>C. acnes</i>	47
3.2 ผลการประเมินความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย <i>S. epidermidis</i>	47
4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร eugenol ในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยเทคนิค UV-Visible spectrophotometry	48
4.1 ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงของความเข้มข้น (linearity and range)	49
4.2 ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy)	50
4.3 ผลการศึกษาความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ (precision)	50
4.4 ผลการศึกษาความไวของวิธีการวิเคราะห์ (sensitivity)	51
5. ผลไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมโดยวิธีการไตเตรท (titration method)	51
5.1 ผลความคงสภาพทางกายภาพของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหย จากใบยี่หระ	55
5.2 ผลความคงสภาพทางเคมีของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหย จากใบยี่หระ	61
6. ผลนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมด้วยวิธี phase inversion composition (PIC)	64
6.1 ผลความคงสภาพทางกายภาพนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ	66
6.2 ผลความคงสภาพทางเคมีของนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ	70
7. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดลิวของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระด้วยวิธี agar well diffusion	72
7.1 ผลการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดลิว <i>C. acnes</i>	72
7.2 ผลการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดลิว <i>S. epidermidis</i>	73
บทที่ 5 สรุปผล และข้อเสนอแนะ	75
บรรณานุกรม	78

ภาคผนวก..... 89

ประวัติผู้เขียน..... 96



สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1	ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ	20
ตาราง 2	อัตราส่วนของส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน.....	37
ตาราง 3	สัดส่วนองค์ประกอบของการเตรียมนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ	38
ตาราง 4	ข้อมูลขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ	46
ตาราง 5	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ของ <i>C. acnes</i> และ <i>S. epidermidis</i>	48
ตาราง 6	ร้อยละการคืนกลับของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Visible Spectrophotometer .	50
ตาราง 7	ความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ eugenol ด้วยเทคนิค UV-Visible spectrophotometry	51
ตาราง 8	ค่าขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาค ของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ในอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสม คือ Tween [®] 80 : propylene glycol (3:1) .	54
ตาราง 9	ค่าขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค และประจุบนผิวของอนุภาคของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ หลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ที่แต่ละช่วงเวลา	56
ตาราง 10	ผลร้อยละปริมาณคงเหลือของสารสำคัญ eugenol ในไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระหลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ที่แต่ละช่วงเวลา.....	62
ตาราง 11	ค่าขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และค่าประจุบนผิวของอนุภาคของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระหลังเตรียมเสร็จทันที	65
ตาราง 12	ค่าขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค และประจุบนผิวของอนุภาคของนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ หลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ที่แต่ละช่วงเวลา.....	66
ตาราง 13	ผลร้อยละปริมาณคงเหลือของสารสำคัญ eugenol ในนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระหลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ที่แต่ละช่วงเวลา.....	71

ตาราง 14 ค่า inhibition zone ของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบ ยี่ห่วยี่.....	74
--	----



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดสิวจนถึงระดับรุนแรงเป็นสิวกักเสบ.....	10
ภาพประกอบ 2 ลักษณะแบคทีเรีย <i>C. acnes</i>	12
ภาพประกอบ 3 ลักษณะแบคทีเรีย <i>S. epidermidis</i>	13
ภาพประกอบ 4 (ซ้าย) ใบและดอกของยี่หระ (ขวา) ต้นยี่หระ.....	14
ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ eugenol	15
ภาพประกอบ 6 ระบบการกลั่นด้วยน้ำ โดยใช้อุปกรณ์ clevenger (hydro-distillation clevenger apparatus system).....	16
ภาพประกอบ 7 ระบบการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation apparatus)	17
ภาพประกอบ 8 ส่วนประกอบเครื่อง gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS)	19
ภาพประกอบ 9 ลักษณะฟิล์มของระบบไมโครอิมัลชัน (film formation).....	21
ภาพประกอบ 10 แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียบแสดงขอบเขตของการเกิดไมโครอิมัลชัน	22
ภาพประกอบ 11 แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียบแสดงการเกิดไมโครอิมัลชัน.....	24
ภาพประกอบ 12 (ซ้าย) การเติมวัฏภาคลงในระบบ และ (ขวา) กลไกการเกิดนาโนอิมัลชันด้วยวิธี phase inversion composition (PIC)	27
ภาพประกอบ 13 (A) กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน eugenol กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 284.4 นาโนเมตร (B) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระกับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน eugenol (%v/v) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 284.4 นาโนเมตร.....	49
ภาพประกอบ 14 บริเวณเกิดไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระแผนวัฏภาคไตรภาคเทียบในอัตราส่วน Tween [®] 80 : propylene glycol 1:0 (A), 1:1 (B), 2:1 (C) และ 3:1 (D),	52
ภาพประกอบ 15 แสดงลักษณะภายนอกของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมเสร็จทันที	54

ภาพประกอบ 16 ผลระยะเวลาการเก็บไมโครมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อขนาดอนุภาค hydrodynamic diameter (nm)..... 58

ภาพประกอบ 17 ผลของระยะเวลาการเก็บไมโครมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อค่าการกระจายของขนาดอนุภาค (polydispersity index)..... 59

ภาพประกอบ 18 แสดงผลระยะเวลาการเก็บไมโครมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อค่าประจุบนผิวของอนุภาค (zeta potential) 60

ภาพประกอบ 19 ผลของระยะเวลาการเก็บไมโครมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อร้อยละคงเหลือปริมาณสารสำคัญ eugenol ในไมโครมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระตั้งแต่เตรียมเสร็จทันที ที่เวลา 2, 4, 6, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส..... 63

ภาพประกอบ 20 แสดงลักษณะภายนอกของนาโนมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมเสร็จทันที 65

ภาพประกอบ 21 (A) ผลของระยะเวลาการเก็บนาโนมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อค่าขนาดอนุภาค (size) (B) ผลของระยะเวลาการเก็บนาโนมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ต่อค่าการกระจายของขนาดอนุภาค (polydispersity index) (C) ผลของระยะเวลาการเก็บนาโนมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อค่าประจุบนผิวของอนุภาค (zeta potential) ตั้งแต่เตรียมเสร็จทันที ที่เวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส... 69

ภาพประกอบ 22 ผลของระยะเวลาการเก็บนาโนมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อร้อยละคงเหลือปริมาณสารสำคัญ eugenol ในนาโนมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมเสร็จทันที ที่เวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส 71

ภาพประกอบ 23 โครมาโทแกรม (chromatogram) ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ที่วิเคราะห์ด้วย GC-MS..... 90

ภาพประกอบ 24 นาโนมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมในอัตราส่วนของ 90

ภาพประกอบ 25 บริเวณเกิดไมโครมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระแผนวิภาคไตรภาคเทียมในอัตราส่วน Tween® 80 : propylene glycol 1:0 (A), 1:1 (B), 2:1 (C) และ 3:1 (D) 91

ภาพประกอบ 26 ผลระยะเวลาการเก็บนาโนมิลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อขนาดอนุภาค hydrodynamic diameter (nm)..... 92

ภาพประกอบ 27 ผลของระยะเวลาการเก็บนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ต่อค่าการกระจายของขนาดอนุภาค (polydispersity index) 93

ภาพประกอบ 28 แสดงผลระยะเวลาการเก็บนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อค่าประจุบนผิวของอนุภาค (zeta potential) 94

ภาพประกอบ 29 ผลของระยะเวลาการเก็บนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อร้อยละคงเหลือปริมาณสารสำคัญ eugenol ในไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ตั้งแต่เตรียมเสร็จทันที ที่เวลา 2, 4, 6, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส 94



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลังและความสำคัญของการวิจัย

สิวคือการอักเสบเรื้อรังที่พบบ่อยที่สุดของวัยรุ่น และ เป็นโรคผิวหนังอักเสบเรื้อรังที่พบบ่อย คิดเป็นร้อยละ 80 ของประชากรวัยรุ่น พบได้ทั้งในเพศชายและเพศหญิง (Najafi-Taher & Amani, 2017; Taleb et al., 2018) บริเวณที่เกิดสิวล้วนใหญ่ ได้แก่ บริเวณใบหน้า หน้าอก หลัง ส่วนบนและต้นแขน ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีต่อมไขมันอยู่หนาแน่น โดยสาเหตุของการเกิดสิวเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลัก ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์ซึ่งอาศัยอยู่ที่ผิวหนังและภายในท่อขุมขน เช่น แบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* ก่อนหน้านั้นเรียก *Propionibacterium acnes* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่ก่อให้เกิดสิว ในภาวะขาดออกซิเจนจะทำการย่อยไตรกลีเซอไรด์เป็นกรดไขมันสายสั้น 2 ชนิด คือ กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และกรดวาเลอริก (valeric acid) ซึ่งกรดไขมันทั้งสองชนิดนี้ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ histone deacetylase (HDAC) เมื่อเอนไซม์ตัวนี้หยุดการทำงาน เซลล์เคราติโนไซต์หรือเซลล์ในชั้นหนังกำพร้าจะหลั่งไซโตไคน์ออกมามากขึ้น กระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการระคายเคืองของผนังขุมขนและหนังแท้ โดยรอบจนเกิดการบวมของสิว หากสิวเกิดการติดเชื้อที่เพิ่มขึ้นจากแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis* จะทำให้เกิดสิวลอักเสบรุนแรงขึ้นและมีหนอง นอกจากนี้สิวยังอาจเกิดจากต่อมไขมันที่มีการผลิตไขมันเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดน้ำมันที่มากเกินไปจนเกิดการอุดตันของขุมขน ทั้งนี้การเกิดสิวยังขึ้นอยู่กับการใช้ชีวิตประจำวัน เช่น ความเครียด การสูบบุหรี่ ยาบางชนิด และการใช้เครื่องสำอาง เป็นต้น (Fox, Csongradi, Aucamp, Du Plessis, & Gerber, 2016a; Lee et al., 2013)

วิธีการรักษาสิวลขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความรุนแรงของอาการ อายุของผู้ป่วย ซึ่งการรักษาในรูปแบบใช้ยาเฉพาะที่เหมาะกับผู้ป่วยสิวลอาการระดับเล็กน้อยถึงระดับปานกลาง เช่น เบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ (benzoyl peroxide) เรตินอยด์ (retinoids) กรดซาลิไซลิก (salicylic acid) สำหรับอาการของสิวลระดับปานกลางถึงรุนแรง การรักษาอาจใช้ยา เช่น เรตินอยด์ (retinoids) ยาคุมกำเนิด ยาประเภท androgen receptor blockers (Harper, 2016; Harris & Cooper, 2017; Jantararat et al., 2018) และยาปฏิชีวนะ เช่น นีโอมัยซิน (neomycin) เตตราไซคลิน (tetracycline) และอีริโทรมัยซิน (erythromycin) การรักษาสิวลด้วยยาปฏิชีวนะแบบดั้งเดิมทำให้เกิดผลข้างเคียงต่าง ๆ เช่น เกิดความแห้งกร้าน แดง ระคายเคืองผิวหนัง และรอยดำ ในกรณีนี้ที่

รุนแรงอาจเกิดการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย หรือเกิดอาการดื้อยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นผลร้ายแรงต่อสุขภาพ (Hou et al., 2019; Lee et al., 2013)

จากปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่ง *S. aureus* สร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด จนเชื้อสามารถแบ่งตัวเจริญเติบโตและช่วยให้แบคทีเรียสามารถต่อสู้กับกลไกต่าง ๆ ที่ร่างกายใช้ในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียต่อร่างกายของมนุษย์ได้ โดยแพทย์ทางเลือกได้นำสมุนไพร เช่น tea tree oil, sandalwood oil, copaiba เป็นต้น มาใช้ในการรักษาสิวและโรคผิวหนังที่ติดเชื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งพืชเหล่านี้มาจากแหล่งที่เชื่อถือได้และมีประวัติการใช้มาอย่างยาวนาน มีความปลอดภัย ผลข้างเคียงที่น้อยลง (Nasri et al., 2015; Winkelman, 2018) มีงานวิจัยจำนวนมากยืนยันว่าน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว และมีประสิทธิภาพในการรักษาเทียบเท่าวิธีการรักษามาตรฐาน ตัวอย่างเช่น งานวิจัยของ Winkelman รายงานการศึกษาประสิทธิภาพผลทางคลินิกและความปลอดภัยในการรักษาสิวะระดับความรุนแรงสิวะเล็กน้อยถึงปานกลาง โดยศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันไม้จันทน์ สารสกัดจากโรสแมรี่ น้ำมันหอมระเหยส้มเชจู จากประเทศเกาหลี และ Tea tree oil พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก Tea tree oil ชื่อวิทยาศาสตร์ *Melaleuca alternifolia* ความเข้มข้น 5 %v/v มีประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีไม่ก่อให้เกิดรอยดำจากการอักเสบ (Winkelman, 2018) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ ศึกษา Tea tree oil ซึ่งสกัดด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ มีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ terpinen-4-ol, terpinolene, α -terpinene และ α -terpineol มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 0.625 %v/v และค่า minimum bactericidal concentration (MBC) เท่ากับ 1.25 %v/v ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 1.25 %v/v และค่า MBC เท่ากับ 2.5 %v/v ซึ่ง Tea tree leaf oil ความเข้มข้นน้อยกว่า 5 %v/v มีประสิทธิภาพการรักษาที่ดีและปลอดภัย (Lee et al., 2013) งานวิจัยของ Orchard และคณะ ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* และ *S. epidermidis* ของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในทางการค้า จำนวน 408 ชนิด พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชย ใบอบเชย ไม้จันทน์และหญ้าแฝก มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.13, 0.38, 0.50, 0.50 mg/mL ตามลำดับ และฤทธิ์ต้านต่อเชื้อ *S. epidermidis* มีค่า MIC เท่ากับ 0.25, 0.75, 0.25, 0.25 mg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยใบกระเพรา (*Ocimum tenuiflorum*) มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* และ *S. epidermidis* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.50 และ 1.00 mg/mL ตามลำดับ (Orchard, van Vuuren, Viljoen, & Kamatou, 2018) จากการศึกษาข้างต้นพบว่า พืชวงศ์ Myrtaceae, Lauraceae และ Labiatae มีฤทธิ์สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย

ก่อให้เกิดสิวได้ (Daud, Pande, Joshi, Pathak, & Wankhede, 2013; Lee et al., 2013; Orchard et al., 2018) ทั้งนี้ยังพบว่าพืชวงศ์ Labiatae ซึ่งเป็นพืชของไทยที่หาง่ายมีความน่าสนใจและอาจนำมาใช้ในการรักษาสิวได้ เช่น ใบยี่ห่วย (*Ocimum gratissimum*) ที่มีรายงานว่ามีฤทธิ์สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด (Matasyoh et al., 2008; Saliu, Usman, & Akolade, 2011) การใช้น้ำมันหอมระเหยมีข้อจำกัด เช่น ความคงสภาพทางกายภาพและเคมีต่ำ สมบัติการซึมผ่านผิวหนังต่ำ รวมทั้งอาจก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังได้ (Laothaweerungsawat, Neimkhum, Anuchapreeda, Sirithunyalug, & Chaiyana, 2020; Lv et al., 2018)

ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) เป็นระบบนำส่งยาในรูปแบบหนึ่งมีลักษณะเป็นเนื้อโปร่งแสงหรือโปร่งใส ประกอบด้วยวัฏภาคน้ำมัน (oil phase) และวัฏภาคน้ำ (water phase) ซึ่งทำให้เกิดเสถียรภาพโดยฟิล์มที่ผิวของสารลดแรงตึงผิวหรือของสารผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวร่วมกับสารลดแรงตึงผิวร่วม (surfactant/co-surfactant mixture) มีขนาดหยดอนุภาคอยู่ระหว่าง 10-100 นาโนเมตร โดยปกติจะอยู่ในช่วง 10-50 นาโนเมตร ไมโครอิมัลชันเกิดขึ้นเองได้ (spontaneous emulsification) ระบบมีความเสถียรทางอุณหพลศาสตร์จึงเหมาะสมต่อการใช้งานในระยะยาว ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการละลายของตัวยาหรือสารสำคัญ สามารถป้องกันการสลายตัวของสารสำคัญ เพิ่มอัตราการดูดซึมรวมถึงสามารถเข้ากับร่างกายได้ (bioavailability) และสามารถย่อยสลายเองได้

นาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) เป็นระบบนำส่งยามีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 100-1000 นาโนเมตร มีลักษณะโปร่งแสง (translucent) มีความหนืดต่ำ ข้อดี คือระบบนาโนอิมัลชันมีความคงตัวทางจลนศาสตร์ ช่วยเพิ่มความคงตัว การดูดซึม มีความคงสภาพที่ดี (Kale & Deore, 2017; Clements, 2012)

จากงานวิจัยของ Viyoch และคณะ ศึกษาและประเมินไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพา ใบกระเพรา และใบแมงลัก ต่อฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* ในหลอดทดลอง พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพาและน้ำมันหอมระเหยจากใบกระเพรามีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2 และ 3 %v/v ตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์กับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยใบโหระพา ซึ่งมี methyl chavicol เป็นองค์ประกอบหลัก และน้ำมันหอมระเหยใบกระเพรา ซึ่งมี eugenol เป็นองค์ประกอบหลัก จากผลการประเมินความคงตัวในสภาวะเร่งอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ที่ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยใบโหระพาหรือน้ำมันหอมระเหยใบกระเพราความเข้มข้น 3 %v/v มีความคงสภาพทางกายภาพ

และประสิทธิภาพในการต้านเชื้อได้ดีและเหมาะสมสามารถนำไปรักษาสิวได้ (Viyoch et al., 2006) งานวิจัยของ Sirimas และคณะ รายงานการทดสอบประสิทธิภาพในการรักษาสิทางคลินิกและทดสอบการระคายเคืองต่อผิวหนังของไมโครอิมัลชันที่ห่อหุ้มน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาไทย ในอาสาสมัครสุขภาพดีเพศชาย เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากโหระพาไทย มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* จากการประเมินผลประเมินที่ 0, 1, 48 และ 72 ชั่วโมง ไมโครอิมัลชันที่ห่อหุ้มน้ำมันหอมระเหย โหระพาความเข้มข้น 3 %v/v มีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองหรือผื่นแดงต่อผิวหนัง (Pansang, Maphanta, Tuntijarukorn, & Viyoch, 2010) งานวิจัยของ Wani และคณะ ได้ศึกษาออกแบบพัฒนาสูตร novel isotretinoin microemulsion-based spray และ microemulsion gel โดยใช้น้ำมันโหระพาร่วมกับตัวยาเรตินอยด์ สำหรับรักษาสิวและป้องกันการก่อตัวของ comedones พบว่า novel isotretinoin microemulsion-based spray สามารถซึมเข้าสู่ผิวได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเจลและ microemulsion gel (Wani, Sanghani, & Wani, 2018) งานวิจัยของ Najafi-Taher และ Amani ได้รวบรวมข้อมูลการศึกษาานาโนอิมัลชันระบบนำส่งชนิดคอลลอยด์เพื่อใช้ในการรักษาสิว ด้วยการพัฒนาตำรับนาโนอิมัลชันโดยใช้น้ำมันระเหยจากธรรมชาติชนิดต่าง ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะพร้าว น้ำมันมะกอก (Najafi-Taher & Amani, 2017) Taleb และคณะ ศึกษา น้ำมันหอมระเหยออริกานอในรูปแบบ นาโนอิมัลชันเพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านสิวในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง พบว่าน้ำมันหอมระเหยออริกานอ มีฤทธิ์สามารถต้านเชื้อ *C. acnes* มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.34 และ 0.67 mg/mL ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.67 และ 1.34 mg/mL และพัฒนาอยู่ในรูปแบบนาโนอิมัลชันมีประสิทธิภาพการรักษาที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะและไม่ก่อให้เกิดการดื้อยา (Taleb et al., 2018) งานวิจัยของ Poomanee และคณะ ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสกัดของ *Mangifera indica* ในรูปแบบนาโนอิมัลชัน เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิว ความคงตัวและการซึมผ่านผิวหนังเพื่อเป็นเวชสำอางในการรักษาสิว ซึ่งการซึมผ่านทางผิวหนังมีปัจจัยมาจากขนาดอนุภาค polydispersity index (PDI) ค่าประจุบนผิวของอนุภาค ค่า hydrophilic-lipophilic balance (HLB) ของสารลดแรงตึงผิว รวมทั้งผลจากสารลดแรงตึงผิวร่วม และอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวกับวัฏภาคน้ำมัน พบว่านาโนอิมัลชันที่กักเก็บสารสกัดมีขนาดหยดอนุภาคที่เล็กมาก เท่ากับ 26.14 ± 0.22 นาโนเมตร ค่าการกระจายตัวของ PDI ที่แคบ เท่ากับ 0.16 ± 0.02 และระบบนาโนอิมัลชันนี้ช่วยเพิ่มความคงตัวได้ดีมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัด (Poomanee, Khunkitti, Chaiyana, & Leelapornpisid, 2020a)

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจจะศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว *C. acnes* และ *S. epidermidis* ด้วยวิธี Broth microdilution assay ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ และ พัฒนาระบบนำส่งในรูปแบบไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน จากนั้นประเมินประสิทธิภาพของ ไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันที่เตรียมขึ้นด้วยวิธี agar well diffusion method และเนื่องจากยัง ไม่มีรายงานการพัฒนาระบบนำส่งของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระในรูปแบบดังกล่าว รวมทั้ง การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระและตรวจสอบ ความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Visible spectrophotometry

ปัญหาการวิจัย

1. น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดสิว *Cutibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* ได้หรือไม่
2. ไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุ ก่อให้เกิดสิว *C. acnes* และ *S. epidermidis* ได้หรือไม่
3. นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุ ก่อให้เกิดสิว *C. acnes* และ *S. epidermidis* ได้หรือไม่

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ต่ารับไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ
2. เพื่อพัฒนาต่ารับไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยของใบยี่หระ
3. เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระและตรวจสอบ ความใช้ได้ (method validation) ของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Visible spectrophotometry

ปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษา

ระยะที่ 1

- ตัวแปรต้น - ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ
- ตัวแปรตาม - ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อเชื้อ *C. acnes* และ *S. epidermidis*
- ตัวแปรควบคุม - สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดสิว *C. acnes* และ *S. epidermidis*
- สภาวะการบ่มเชื้อ

ระยะที่ 2

- ตัวแปรต้น - ตำรับไมโครอิมัลชัน/นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ
- ตัวแปรตาม - คุณลักษณะเอกลักษณ์ของตำรับ
- ค่า inhibition zone ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อเชื้อ *C. acnes* และ *S. epidermidis*
- ตัวแปรควบคุม - สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* และ *S. epidermidis*
- สภาวะการบ่มเชื้อ

ระยะที่ 3

- ตัวแปรต้น - ตำรับไมโครอิมัลชัน/นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เวลาต่างๆ
- ตัวแปรตาม - ความคงสภาพทางกายภาพ
- ปริมาณสารสำคัญที่คงเหลือ
- ตัวแปรควบคุม - อุณหภูมิ

นิยามศัพท์เฉพาะ

น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ หมายถึง น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่ได้จากการสกัดด้วยการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation)

ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) หมายถึง หยดอนุภาค ขนาด 10-100 นาโนเมตร ที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ภายใน ประกอบด้วย น้ำ สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม มีลักษณะโปร่งแสงหรือโปร่งใส (Sahu, Sharma, Gupta, & Kaur, 2015)

นาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) หมายถึง ของเหลวสองชนิดที่ไม่ผสมกันโดยมีสารลดแรงตึงผิว หรือสารลดแรงตึงผิวร่วมรวมอยู่ด้วย ซึ่งของเหลวชนิดหนึ่งที่กระจายตัวเป็นหยดทรงกลมขนาดเล็ก ($r < 1000$ nm) ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง มีระบบไอโซโทรปิกไม่เสถียรทางอุณหพลศาสตร์ มีความเสถียรทางจลนศาสตร์ (McClements, 2012)

ร้อยละการกักเก็บ (%entrapment) หมายถึง ร้อยละความสามารถในการกักเก็บปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระภายในไมโครอิมัลชันหรือนาโนอิมัลชัน ตั้งแต่เริ่มต้นของการเตรียม (Majeed et al., 2015)

ร้อยละการคงเหลือ (%remaining) คือ ร้อยละการคงเหลือของปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระภายในไมโครอิมัลชัน หรือนาโนอิมัลชัน เมื่อเวลาผ่านไป (Morales et al., 2017)

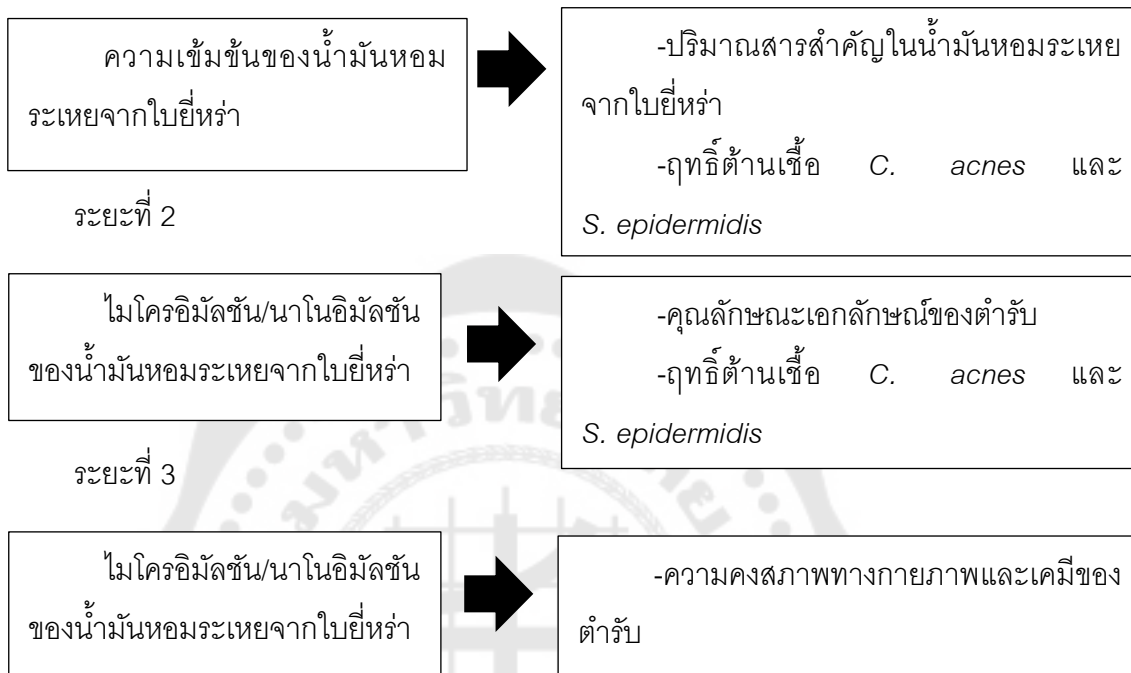
นิยามเชิงปฏิบัติการ

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (minimal inhibitory concentration, MIC) หมายถึง ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ที่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวต่อฤทธิ์ต้านเชื้อ *C. acnes* และ *S. epidermidis* ได้

ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย หมายถึง น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ไมโครอิมัลชันหรือนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว 2 ชนิด คือ *C. acnes* และ *S. epidermidis* อ่านผลการทดสอบโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง ซึ่งจะเป็นวงใสรอบหลุมบรรจุสารทดสอบ

กรอบแนวคิดในงานวิจัย

ระยะที่ 1



สมมติฐานงานวิจัย

1. น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* และ *S. epidermidis* ที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดสิว
2. ตำรับไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีความคงสภาพทางกายภาพและเคมี

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลงานวิจัยนี้ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการพัฒนาไมโครอิมัลชัน/นาโนอิมัลชันจากน้ำมันหอมระเหยใบยี่หระเพื่อรักษาสิว
2. เป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าของยี่หระให้เพิ่มมากขึ้น
3. หากมีการนำผลงานวิจัยไปต่อยอดจนได้ผลิตภัณฑ์ก็สามารถลดค่าการนำเข้ายารักษาสิวจากต่างประเทศ

บทที่ 2

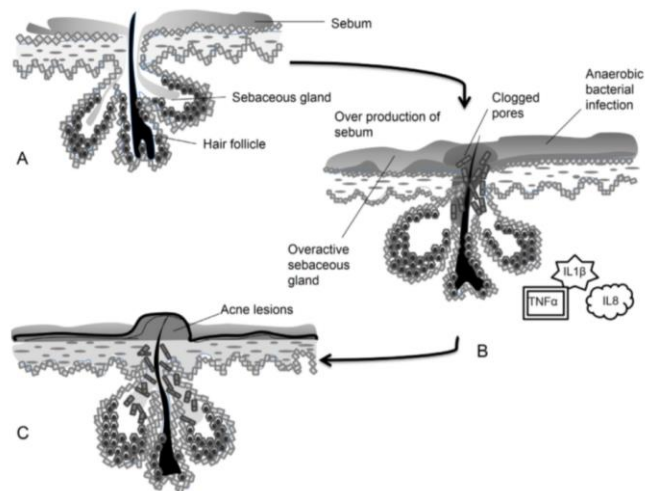
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. สิว (Acne vulgaris)

สิว (Acne vulgaris) เป็นโรคผิวหนังที่เกิดในประชากรวัยรุ่น ร้อยละ 94-95 ประชากรวัยผู้ใหญ่ร้อยละ 20-25 และพบในผู้หญิงร้อยละ 25 สิวเป็นการเกิดการอักเสบที่เรื้อรัง เกิดขึ้นได้จาก pilosebaceous unit (PSU) และต่อมไขมันใต้ผิวหนัง ก่อให้เกิดเป็นสิวได้ 2 ประเภท ได้แก่

- 1) สิวไม่อักเสบ เช่น สิวหัวดำ สิวหัวขาว
- 2) สิวอักเสบ คือ สิวที่มีลักษณะเป็น ตุ่มนูนแดง (papule) สิวตุ่มหนอง (pustule) สิวก้อนบวม (nodules) และถุงสิว (cyst)

สิวส่วนมากพบได้ที่ บริเวณใบหน้า หน้าอก หลังส่วนบน และต้นแขน ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีต่อมไขมันขนาดใหญ่อยู่หนาแน่น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดสิว เช่น ความเครียด การสูบบุหรี่ การใช้ยาบางชนิดและเครื่องสำอาง โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสิว ดังภาพประกอบ 1 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดสิว (A) pilosebaceous unit ปกติ (B) hyperkeratinization คือ เซลล์ผิวเสื่อมสภาพหรือ death cell ในชั้นหนังกำพร้ามากเกินไปทำให้รูขุมขนเกิดการอุดตัน sebum overproduction เป็นอิทธิพลจากฮอร์โมนเพศที่ทำให้การผลิตไขมันออกมาที่ผิวมากขึ้น (excess sebum production) ในขณะที่แบคทีเรียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (*C. acnes*) เกิดการแพร่กระจายจนเกิดการอักเสบ (C) การอักเสบที่เพิ่มขึ้นจนถึงระดับความรุนแรงจนเป็นสิิวอักเสบ



ภาพประกอบ 1 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดสิวจนถึงระดับรุนแรงเป็นสิวกักเสบ

ที่มา : Kanwar, et al. (2018). Models for acne: A comprehensive study p.331.

1.1 ปัจจัยของการเกิดสิว

1.1.1 excess sebum production: การผลิตไขมันส่วนเกิน ซึ่งฮอร์โมนแอนโดรเจนเป็นฮอร์โมนเพศชาย มีฤทธิ์กระตุ้นการผลิตซีบัมและการหลั่งไขมันที่เพิ่มขึ้น โดยการผลิตซีบัมที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความรุนแรงและชนิดของสิวที่เกิดขึ้น

1.1.2 epidermal hyper-proliferation and formation of comedones: ภายในรูขุมขนและต่อมไขมันของผู้ป่วยมีการสร้าง keratin ไขมันส่วนเกินจนเกิดการอุดตัน เป็นสิวกหัวดำ (ชนิดเปิด) และสิวกหัวขาว (ชนิดปิด)

1.1.3 *Cutibacterium acnes* infiltration: การเจริญเติบโตของเชื้อที่ก่อให้เกิดสิวกในรูขุมขนจะพบในคอมีโดน (comedone) แบบที่เรีย 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) เชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวกชนิดหนึ่ง ได้แก่ *S. epidermidis* 2) แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ *C. acnes* และ *Cutibacterium granulosum* และ 3) lipophilic yeasts คือ *Pityrosporum* species จะมีปริมาณเชื้อนี้มากกว่าผู้ที่ไม่เป็นสิวก

1.1.4 inflammation process: กระบวนการอักเสบ ที่เกิดจากเชื้อ *C. acnes* ในต่อมไขมันย่อยไขมันจนกลายเป็นกรดไขมันและซีบัมออกมาภายนอก หรือเกิดจากการอุดตัน (follicular plug) บริเวณต่อมไขมันจนเกิดการฟองตัวขึ้นเรื่อยๆจนรูขุมขนแตกออก สารภายในกระจายตัวออกสู่ผิวหนัง เกิดเป็นสิวกอักเสบลักษณะต่างๆ (Fox, Csongradi, Aucamp, du Plessis, & Gerber, 2016b; Kanwar et al., 2018)

1.2 แนวทางการรักษาสิว

เป้าหมายในการรักษาสิว คือการควบคุมและรักษารอยสิว อาจทำการรักษา 3-6 สัปดาห์ (Fox et al., 2016a) ขึ้นอยู่กับความรุนแรง และอายุของคนไข้

1.2.1 การรักษามาตรฐาน (First Line Treatment) แบ่งตามระดับความรุนแรงของสิว

1.2.1.1 ผู้ป่วยสิวอาการระดับเล็กน้อย (mild acne vulgaris) ใช้ยาทาเฉพาะที่ได้แก่ การใช้เบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ (benzoyl peroxide) หรือยาเรตินอยด์ (retinoid) หรือใช้ยาควบคู่กับยาปฏิชีวนะ เช่น คลินดามัยซิน (clindamycin) หรือ อิริโทรมัยซิน (erythromycin) และสามารถใช้อาหารเฉพาะที่ เช่น ตัวยา dapsone (Aczone) แพนเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ (benzoyl peroxide) หรือยาเรตินอยด์ (topical retinoid)

1.2.1.2 ผู้ป่วยสิวอาการระดับปานกลาง (moderate acne vulgaris) ใช้ยาทาเฉพาะที่ร่วมกับยารับประทาน ซึ่งยาทาเฉพาะที่ ได้แก่ เบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ (benzoyl peroxide) หรือยาเรตินอยด์ (retinoid) ร่วมกับการทานยาปฏิชีวนะ เช่น อิริโทรมัยซิน (erythromycin) หรือคลินดามัยซิน (clindamycin)

1.2.1.3 ผู้ป่วยสิวอาการระดับรุนแรง (severe acne vulgaris) ใช้ยารับประทาน ไอโซเตรทติโนอิน (isotretinoin) (Hauk, 2017)

1.2.2 ยาทางเลือกในการรักษา (complementary and alternative medicines, CAM) การบำบัดทางพฤกษศาสตร์ มีความปลอดภัยและหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงจากยาปฏิชีวนะ เช่น การใช้น้ำมันหอมระเหยที่ใช้เฉพาะที่ เช่น กายาน ยี่หวาดำ คาโมมายล์ ยูคาลิปตัส ตะไคร้ ไรสมารี หรืออย่างเช่น การใช้โลชั่นที่มีส่วนผสม 2% ของสารสกัดชา จะช่วยรักษาสิวะระดับปานกลาง ลักษณะสิวะเป็นเลือดคั่งและตุ่มหนองได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.2.3 การบำบัดทางกายภาพ (physical treatment) ด้วยเทคโนโลยีที่ล้ำสมัย เช่น การกดสิวะ (comedone extraction) การรักษาด้วยความเย็น (cryoslush therapy) การบำบัดด้วยความเย็นจัด (cryotherapy) การรักษาด้วยไฟฟ้า (electrocauterization) การฉีดสิวะ (corticosteroids intralesional) และการรักษาด้วยแสง (optical treatments) (Fox et al., 2016a)

1.3 ข้อมูลทั่วไปของแบคทีเรีย *Cutibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis*

1.3.1 แบคทีเรีย *Cutibacterium acnes*



ภาพประกอบ 2 ลักษณะแบคทีเรีย *C. acnes*

ที่มา : <https://www.biomerieux-industry.com/pharma->

[healthcare/resources/scientific-library/2020-02-25-cutibacterium-acnes-gram-positive](https://www.biomerieux-industry.com/pharma-healthcare/resources/scientific-library/2020-02-25-cutibacterium-acnes-gram-positive)

แบคทีเรีย *C. acnes* ก่อนหน้านี้เรียก *Propionibacterium acnes* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช้ออกซิเจน จะอาศัยอยู่บริเวณรูขุมขน ต่อมไขมัน โดยเฉพาะบริเวณหน้า หน้าอกและหลัง ทั้งนี้ยังสามารถพบในเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น ลำไส้ กระเพาะอาหาร ปอด ช่องปาก เยื่อหูตา ต่อมลูกหมาก และทางเดินปัสสาวะ (Dréno et al., 2018; Elston, Dupaux, Opanova, & Atkinson, 2019) มีปริมาณน้อยกว่า 2% ของแบคทีเรียทั้งหมด (Dréno et al., 2018) แบคทีเรีย *C. acnes* เป็นแบคทีเรียเจริญเติบโตช้าทนต่อออกซิเจนได้นานหลายชั่วโมง มีลักษณะรูปร่างหลายแบบ (pleomorphism) อาจพบเป็นรูปไข่ หัวท้ายไม่เท่ากัน แฉกสั้น (club shaped) รูปร่างเป็นท่อน (rod) หรือรูปร่างและการเรียงตัวส่วนใหญ่คล้ายพวก *Corynebacterium* การอยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรือไม่เป็นระเบียบ ไม่สามารถเคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และยังพบเป็นรูปง่าม (bifid) ย้อมแกรมติดสีม่วง (Gram-positive) (Aubin, Portillo, Trampuz, & Corvec, 2014)

สาเหตุสำคัญของการก่อให้เกิดสิว ซึ่งแบคทีเรีย *C. acnes* อยู่บริเวณตามผิวหนัง เป็นเชื้อประจำถิ่นที่บริเวณผิวหนัง ต่อมาเมื่อ รุขุมขน สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส (lipase) และไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) ผลิตกรดโพรพิโอนิก ซอบอาศัยอยู่บริเวณจมูก โดยสามารถใช้ น้ำตาลกลูโคสแบบไม่ใช้ออกซิเจน เป็นต้นเหตุสำคัญของสิว และอาจทำให้เกิดเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ นอกจากนี้เซลล์ของผิวหนังและผิวหนังชั้นนอก เช่น โปรตีน กรดไฮยาลูโรนิก และไกลโคซามิโน-ไกลแคน อื่นๆ อาจส่งเสริมต่อการแพร่กระจายของการอักเสบในระหว่างการเกิดสิว (Aubin et al., 2014; Hsu, Bumgarner, & Matsen, 2016)

1.3.2 แบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis*



ภาพประกอบ 3 ลักษณะแบคทีเรีย *S. epidermidis*

ที่มา : <https://www.sciencephoto.com/media/129706/view/staphylococcus-epidermidis-bacteria-sem>

S. epidermidis หรือ *Micrococcus epidermidis*, *Albococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis albus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นทรงกลม (cooci) พบอยู่ตามร่างกายทั่วไป ไม่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคแต่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการติดเชื้อ สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ โดยอาศัยน้ำ เกลือแร่ กรดอะมิโน กรดไขมันจากต่อมไขมันและต่อมเหงื่อจากผิวหนัง บริเวณตา สามารถเกาะติดกับเนื้อเยื่อบริเวณจมูกและหลังโพรงจมูกโดยไม่ถูกขับไปกับเมือกหรือน้ำมูก ซึ่งถ้าสิวกเกิดการติดเชื้อเพิ่มอีกจะเรียกว่า การติดเชื้อ

ทุติยภูมิ (secondary infection) ทำให้เกิดสิวอักเสบมีหนองที่รุนแรงมากขึ้น (Claudel et al., 2019; Otto, 2014; Schleifer & Kloos, 1975)

2. ข้อมูลเกี่ยวกับยี่หระ

ชื่อสมุนไพร (Common name)	: ยี่หระ
ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name)	: <i>Ocimum gratissimum</i>
ชื่อวงศ์ (Family name)	: Lamiaceae (Labiatae)
ชื่ออื่น (Local name)	: กะเพราญวน (กรุงเทพมหานคร) โหระพาข้าง กะเพราควาย (ภาคกลาง) และหระ (ภาคใต้)



ภาพประกอบ 4 (ซ้าย) ใบและดอกของยี่หระ (ขวา) ต้นยี่หระ

2.1 ลักษณะพฤกษศาสตร์

ต้น ลำต้นตรงมีความแตกแขนง เป็นไม้พุ่มสูง ความสูง 1-3 เมตร

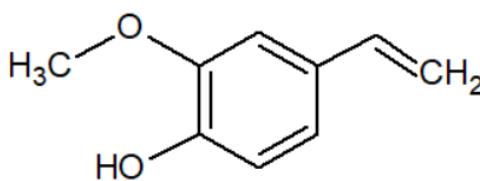
ใบ เป็นใบสีเขียวสด ลักษณะใบรูปกลมรี โคนใบสอบ ปลายใบแหลม ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย ลักษณะการออกของใบเดี่ยวออกตรงข้ามกันเป็นคู่ ๆ ผิวใบไม่เรียบมีขนสากมือ ดังภาพประกอบ 4

ดอก เป็นช่อที่บริเวณปลายยอด ช่อดอกจัดเป็นแบบช่อฉัตร (Verticillaster) โดยช่อฉัตรจะมีดอกย่อยขนาดเล็กประมาณ 50-100 ดอก

ผลยี่หระ หรือ เมล็ดยี่หระ มีลักษณะเป็นรูปกลมรี ภายในมีเมล็ดจำนวนมาก ผลมีขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร ผลอ่อนมีสีเขียว ผลสุกจะมีสีดำหรือสีน้ำตาลอ่อน (Okoye, Obonga, Onyegbule, Ndu, & Ihekwereme, 2014)

2.2 องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยของใบยี่หระจากการกลั่นด้วยน้ำ จากเทคนิค Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ มีองค์ประกอบหลักทางเคมี คือ eugenol ภาพประกอบ 5 ร้อยละ 61.9 cis-ocimene ร้อยละ 8.2 germacrene D ร้อยละ 4.4 β -pinene ร้อยละ 1.6 α -farnesene ร้อยละ 1.6 camphor ร้อยละ 1.5 และอื่น ๆ (Bolanle Saliu et al., 2011)



ภาพประกอบ 5 โครงสร้างของ eugenol

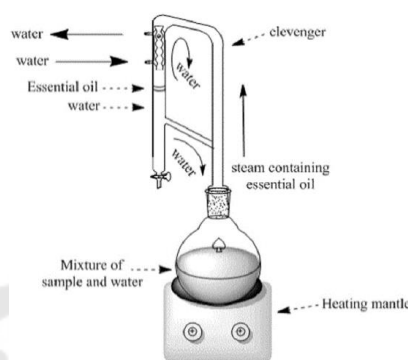
2.3 วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย

การสกัดแยกน้ำมันหอมระเหยจากพืช (รัตนาน อินทรานุกุลกรณ, 2547) มีหลายวิธีโดยพิจารณาจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น ลักษณะหรือส่วนของพืช คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันหอมระเหย วัตถุประสงค์การนำไปใช้ คุณค่าของสารสกัด และค่าใช้จ่ายในการสกัด ซึ่งวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยสามารถแบ่งออกได้ ดังนี้

2.3.1 การกลั่น (distillation) วิธีนี้เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่นิยม เนื่องจากเป็นวิธีที่ประหยัด กระบวนการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อนและสามารถให้แยกน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ได้เกือบทุกชนิด สิ่งที่ต้องควบคุม คือ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการกลั่น ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพและกลิ่นของน้ำมันหอมระเหยที่ได้ตรงกับกลิ่นของธรรมชาติมากที่สุด การกลั่นแบ่งออกได้ 3 วิธี คือ

2.3.1.1 การกลั่นด้วยน้ำ (water distillation/ hydro distillation) นิยมใช้กับพืชที่แห้งหรือพืชที่มีองค์ประกอบทางเคมีที่ไม่สลายตัวเมื่อถูกความร้อน เนื่องจากพืชที่นำมากลั่นด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำนี้จะต้องเติมน้ำจนท่วมพืชและแช่อยู่ในน้ำเดือดตลอดเวลา ซึ่งเหมาะต่อการกลั่นน้ำมันจากเปลือกไม้ โดยมีข้อควรระวังอาจก่อให้เกิดการไหม้หรือการสลายตัวของ

องค์ประกอบทางเคมีบางชนิด หรืออาจจะให้กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยเปลี่ยนไป ในกรณีที่ต้องใช้พืชปริมาณมาก ๆ ความร้อนที่ให้แก่ม้อกลั่นอาจจะไม่สม่ำเสมอทั้งหม้อกลั่น โดยชุดกลั่นที่ทำจากเครื่องแก้ว เรียกว่า ชุดกลั่นชนิด Clevenger ดังแสดงในภาพประกอบ 6

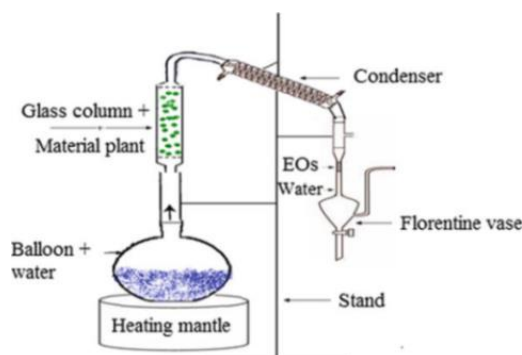


ภาพประกอบ 6 ระบบการกลั่นด้วยน้ำ โดยใช้อุปกรณ์ clevenger
(hydro-distillation clevenger apparatus system)

ที่มา : Samadi, et al (2016). Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil p. 217.

2.3.1.2 การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) มีความเหมาะสมต่อพืชสดและพืชแห้งที่มีองค์ประกอบทางเคมีสลายตัวเมื่อถูกความร้อนโดยตรง โดยใช้ตะแกรงรองพืชที่จะกลั่นให้เหนือระดับน้ำในหม้อกลั่น เติมน้ำให้ท่วม ไอน้ำจะเป็นตัวนำพาน้ำมันออกมา ซึ่งส่วนที่กลั่นได้มีทั้งน้ำมันและน้ำ โดยคุณภาพของน้ำมันที่ออกมาจะดีกว่าวิธีแรก วิธีนี้สะดวกที่สุด นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง

2.3.1.3 การกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) เหมาะต่อการใช้กับพืชสด ซึ่งจะนำพืชมาวางในตะแกรงที่อยู่เหนือหม้อกลั่นให้ผ่านความร้อนจากไอน้ำโดยตรง ไอน้ำจะเป็นตัวพาน้ำมันหอมระเหยของพืชออกมาอย่างรวดเร็ว มีข้อดี คือ ค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก ใช้เวลาดกลั่นสั้นและน้ำมันหอมระเหยที่ได้มีปริมาณและคุณภาพสูงกว่าสองวิธีแรก แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสมที่จะใช้ส่วนของพืชที่มีลักษณะบาง ภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ระบบการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation apparatus)

ที่มา : Sahraoui, et al (2014). Innovative process of essential oil extraction: steam distillation assisted by microwave p. 835.

2.3.2 การบีบอัดหรือการบีบเย็น (expression/cold expression) เหมาะต่อการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่ถูกทำลายด้วยความร้อนได้ง่าย เช่น น้ำมันหอมระเหยของพืชตระกูลส้ม โดยทำการบีบเปลือกของผลไม้ผ่านผนังชั้นนอก ทำให้เซลล์ของพืชแตกออกแล้วปล่อยน้ำมันออกมาซึ่งวิธีนี้ทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีกลิ่นใกล้เคียงกับพืชสด ข้อดีคือ ได้น้ำมันในปริมาณน้อยและไม่บริสุทธิ์

2.3.3 การสกัดโดยใช้ไขมัน (enfleurage) เป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม มักใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยของกลีบดอกไม้ต่าง ๆ วิธีนี้สามารถเก็บความหอมได้ดี

2.3.4 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) ทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีความเข้มข้นสูง ใช้ตัวทำละลายที่ระเหยในการสกัด จากนั้นจะแยกตัวทำละลายออกโดยการกลั่นภายใต้อุณหภูมิต่ำและภายใต้ระบบสุญญากาศ จะได้น้ำมันหอมระเหยชนิด ที่เรียกว่า absolute มีข้อดีคือสูญเสียตัวทำละลายและต้นทุนสูง (Younis, Riaz, Khan, Khan, & Pervez, 2008)

2.3.5 การสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (super critical carbon dioxide extraction) เป็นการสกัดน้ำมันหอมระเหยแบบใหม่ เหมาะสำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่สลายตัวง่ายจากความร้อน โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ในรูปของเหลวและแก๊สภายใต้ความดันและอุณหภูมิสูง น้ำมันหอมระเหยที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงและคุณภาพที่ดี ข้อดีคือเครื่องมือมีราคาแพงมาก ค่าใช้จ่ายสูง (Özkal, Salgin, & Yener, 2005)

2.4 การวิเคราะห์สารสำคัญและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

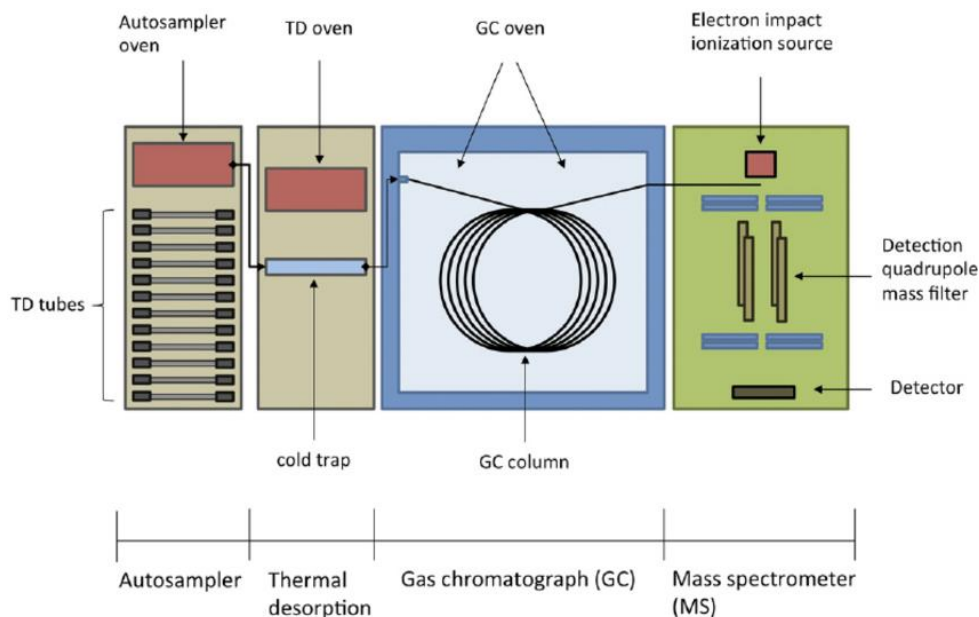
น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิด สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยหลายเทคนิค เช่น gas chromatography/ flame ionization detector (GC-FID), high performance liquid chromatography (HPLC), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) และ gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ (gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS) เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์หาสารประกอบอินทรีย์ประเภทต่าง ๆ สามารถวิเคราะห์ในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้อย่างถูกต้องแม่นยำสูง สามารถเปรียบเทียบผลวิเคราะห์กับฐานข้อมูล (library) หรือเทียบกับสารมาตรฐานเพื่อความถูกต้อง น่าเชื่อถือมากขึ้น ซึ่งเทคนิคนี้เครื่องมือแบ่งออกเป็น 2 ส่วนที่สำคัญ คือ เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatograph) และเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer)

หลักการทำงานของเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

หลักการทำงานในส่วนของเครื่อง GC อาศัยเทคนิคการแยกองค์ประกอบของสารผสม โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของแต่ละองค์ประกอบของสารผสมบนเฟสคงที่ (Stationary phase) คือ สารที่อยู่ภายในคอลัมน์ ภายใต้การพาของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ แก๊สฮีเลียม เมื่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าสู่เครื่อง GC สารในสถานะของเหลว (liquid) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสถานะแก๊ส (gas) และมีแก๊สฮีเลียมเป็นตัวพาสารผสมเข้าสู่คอลัมน์ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยา (interaction) ระหว่างสารผสมกับสารที่อยู่ภายในคอลัมน์ (stationary phase) จนเกิดการแยกสารผสม (separation) จากนั้นโมเลกุลของสารเชิงเดี่ยวจะถูกพาเข้าสู่เครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (mass spectrometer) และแตกตัวอยู่ในรูปประจุ เรียกว่า "molecular ion, M^+ หรือ M^+ " ซึ่งการแตกตัวแต่ละโมเลกุลมีลักษณะเฉพาะ เรียกว่า "mass spectrum" โดยจะแสดงการแตกตัว (fragmentation) ในรูปของ mass-to-charge ratio (m/z)



ภาพประกอบ 8 ส่วนประกอบเครื่อง gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS)

ที่มา : Materic, et al. (2015). Methods in Plant Foliar Volatile Organic

Compounds Research p. 3.

2.5 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

จากการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ ได้ปริมาณ 1.25 %v/w มีฤทธิ์ต้านการเกิดออกซิเดชัน เปรียบเทียบวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl และ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 23.66 ± 0.55 และ 23.91 ± 0.49 $\mu\text{g/ml}$ (Joshi, 2013) Okoye และคณะ ศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยใช้วิธี Xylene-induced ear edema พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ที่ขนาด 50 $\mu\text{g/ear}$ สามารถต้านการบวมของหูได้ 63.3% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสามารถลดความบวมได้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ hydrocortisone ที่ขนาด 100 $\mu\text{g/ear}$ hydrocortisone สามารถต้านการบวมได้ 54.8% (Okoye et al., 2014) ฤทธิ์รักษาแผล (Orafidiya, Fakoya, Agbani, & Iwalewa, 2005) ฤทธิ์ต้านเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus* sp. *Fusarium* sp. และ *Penicillium* sp. (Philippe et al., 2012) มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *S. epidermidis*, *Lactobacillus Casei* และ *Streptococcus mutans* และฤทธิ์ต้าน

แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* และ *Bacillus* spp. แสดงรายละเอียดดังตาราง ที่ 1

ตาราง 1 ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

ชนิดของแบคทีเรีย	MIC value	เอกสารอ้างอิง
<i>E. coli</i>	25 mg/ml	(Matasyoh et al., 2007)
<i>K. pneumoniae</i>	22.5 mg/ml	"
<i>S. aureus</i>	31.3 mg/ml	"
<i>Bacillus</i> spp.	26.3 mg/ml	"
<i>S. pyogenes</i>	5 %v/v	(Saliu et al., 2011)
<i>S. sanguis</i>	15 %v/v	"
<i>S. salivarius</i>	5 %v/v	"
<i>S. epidermidis</i>	5 %v/v	"
<i>L. casei</i>	40 %v/v	"
<i>S. mutans</i>	25 %v/v	"
<i>S. aureus</i>	5 %v/v	"

3. ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion)

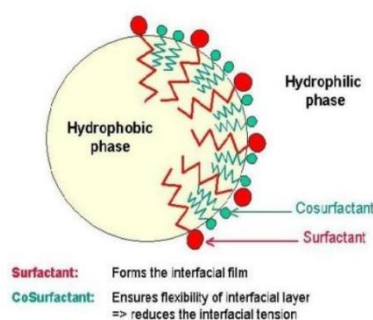
ไมโครอิมัลชันเป็นระบบนำส่งยาหรือสารสำคัญที่มีความคงสภาพสูง ลักษณะเป็นของเหลวเนื้อโปร่งแสงหรือโปร่งใส ขนาดอนุภาค 10-100 นาโนเมตร โดยปกติจะอยู่ในช่วง 10-50 นาโนเมตร และเป็นไมโครอิมัลชันที่เกิดขึ้นเองได้ (spontaneous emulsification) ประกอบด้วยวัฏภาคน้ำมัน (oil phase) และวัฏภาคน้ำ (water phase) จะเกิดเสถียรภาพโดยฟิล์มที่ผิวของสารลดแรงตึงผิวหรือของสารผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับสารลดแรงตึงผิวร่วม (surfactant/co-surfactant mixture) เป็นระบบที่เสถียรแบบไอโซโทรปิกและอุณหพลศาสตร์ (thermodynamics) สามารถจำแนกไมโครอิมัลชันตามลักษณะการกระจายตัวของวัฏภาคน้ำมันและวัฏภาคน้ำในระบบ แบ่งไมโครอิมัลชันได้เป็น 3 ประเภท

- (1) วิกฤตน้ำมันในวิกฤตน้ำ (oil-in-water, o/w)
- (2) วิกฤตน้ำในวิกฤตน้ำมัน (water-in-oil, w/o)
- (3) วิกฤตต่อเนื่องแบบคู่ (bi-continuous)

3.1 ทฤษฎีการเกิดไมโครอิมัลชัน (theories of microemulsion)

จากทฤษฎีการเกิดไมโครอิมัลชันและความคงสภาพ 3 ทฤษฎี ได้แก่ interfacial theory, solubilization theory และ thermodynamic theory

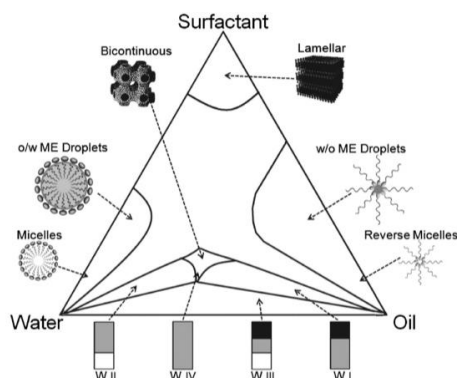
3.1.1 interfacial theory ถูกเรียกว่า mixed film หรือ dual film theory สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และสารลดแรงตึงผิว (co-surfactant) เรียงตัวกัน อยู่ในรูปแบบ complex film ที่ส่วนต่อประสานของน้ำมันและทำให้เกิดการสร้างอนุภาคไมโครอิมัลชัน



ภาพประกอบ 9 ลักษณะฟิล์มของระบบไมโครอิมัลชัน (film formation)

ที่มา : Jadhav, et al. (2018). Review on: Microemulsion a Novel Approach for Drug Delivery p. 61.

3.1.2 solubilization theory ไมโครอิมัลชันสามารถเกิดขึ้นเองได้ (spontaneous formation) เมื่อมีชนิดและความเข้มข้นของวิกฤตน้ำมัน วิกฤตน้ำ สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวรวมในอัตราส่วนที่เหมาะสมในระบบ จึงผลิตได้ง่ายโดยการผสมธรรมดาซึ่งไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน โดยสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวมเป็นตัวช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างผิวของวิกฤตน้ำมันและน้ำ ส่งผลให้พลังงานอิสระของระบบมีค่าลดลง จึงเกิดไมโครอิมัลชันขึ้นเกี่ยวกับทฤษฎีการสร้างไมเซลล์กลับเฟสไดอะแกรมตามภาพประกอบที่ 10



ภาพประกอบ 10 แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเติมแสดงขอบเขตของการเกิดไมโครอิมัลชัน

ที่มา : Xavier-Junior, et al. (2016). Microemulsion systems containing bioactive natural oils: an overview on the state of the art p. 2.

3.1.3 thermodynamic theory เมื่อแรงตึงระหว่างผิว (interfacial tension) ระหว่างสองเฟสลดลงเป็นศูนย์ทำให้เกิดอิมัลชันขนาดเล็กและพลังงานอิสระ (ΔG) ที่เป็นลบที่เกิดขึ้นจะช่วยให้อิมัลชันมีเสถียรภาพทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamics) ไมโครอิมัลชันเรียกอีกอย่างว่าอิมัลชันโป่งใส สวอลเลน (swollen) ไมเซลล์ และสารละลายไมเซลล์ พลังงานอิสระ (ΔG) ของการก่อตัวของไมโครอิมัลชัน สามารถพิจารณาว่าขึ้นอยู่กับขอบเขตของสารลดแรงตึงผิว การลดแรงตึงของวัฏภาคน้ำและน้ำมันจากการเปลี่ยนแปลงของเอนโทรปีของระบบ (S) ดังสมการต่อไปนี้ (Jadhav, Daundkar, Morale, Bhujbal, & Kshirsagar, 2018; Kale & Deore, 2017)

$$G_f = \gamma a - T S$$

โดย

G_f = พลังงานอิสระของการก่อตัว (free energy of formation)

A = การเปลี่ยนแปลงพื้นที่ของไมโครอิมัลชัน (change in interfacial area of micro emulsion)

S = การเปลี่ยนแปลงเอนโทรปีของระบบ (change in entropy of the system)

T = อุณหภูมิ (temperature)

γ = แรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน (surface tension of oil water interphase)

3.2 ส่วนประกอบของไมโครอิมัลชันและการสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม

3.2.1 วัฏภาคน้ำมัน (oil phase) เป็นวัฏภาคที่สำคัญที่สุดรองจากน้ำเนื่องจากมีคุณสมบัติในการละลายโมเลกุลยาที่ไม่ชอบละลายในน้ำ (lipophilic) และปรับปรุงการดูดซึมผ่านชั้นไขมันในร่างกาย น้ำมันมีคุณสมบัติเฉพาะของผนังเซลล์ จึงมีประโยชน์มากสำหรับการนำส่งยาที่มีสมบัติไม่ชอบละลายน้ำ (lipophilic) ยกตัวอย่าง วัฏภาคน้ำมัน เช่น saturated fatty acids, unsaturated fatty acids

3.2.2 วัฏภาคน้ำ (aqueous phase) คือ ส่วนประกอบที่ชอบน้ำ (hydrophilic) เช่น สารกันเสีย

3.2.3 สารลดแรงตึงผิว (surfactant) สามารถลดความตึงของน้ำสัมผัส (interfacial tension) ให้ใกล้เคียงกับศูนย์ ช่วยให้การกระจายตัวของส่วนประกอบทั้งหมดของระบบไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน สารลดแรงตึงผิวมี 4 ประเภท ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (cationic surfactant) สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) สารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและลบ (zwitterionic surfactant) และสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (non-ionic surfactant)

3.2.4 สารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล โพรพิลีนไกลคอล (PG) และโพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) ซึ่งช่วยในการละลายสารลดแรงตึงผิวที่ค่อนข้างเข้มข้น เช่นเดียวกับยาละลายไขมัน ดังนั้นตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวร่วม ได้แก่ short chain alcohols, short chain glycols, medium chain alcohols

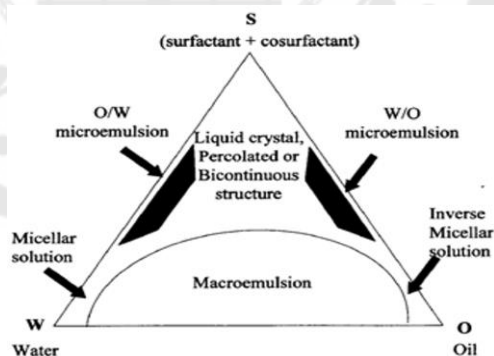
สารลดแรงตึงผิวช่วยเพิ่มความเสถียรของไมโครอิมัลชัน เกิดจากอันตรกิริยาระหว่าง dipole และพันธะไฮโดรเจนจะช่วยลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ และลดแรงตึงผิวที่มีประจุของ electrical double layer สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุจะมีผลกระทบจากความเข้มข้นของเกลือ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุมีผลต่อการคงตัวและความเป็นพิษที่มากกว่าสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ ซึ่งสามารถลดความเป็นพิษในรูปแบบของยาได้ (Kale & Deore, 2017) หลักการเลือกสารลดแรงตึงผิวให้เหมาะสมแต่ละประเภท ขึ้นกับค่าสมดุลความชอบน้ำและชอบไขมัน hydrophilic lipophilic balance (HLB) สารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ช่วง 3.5-6 ไมโครอิมัลชันหรือนาโนอิมัลชันประเภท

น้ำในน้ำมัน (w/o microemulsion) และสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ช่วง 8-18 ไมโครอิมัลชันหรือนาโนอิมัลชันประเภทน้ำมันในน้ำ (o/w microemulsion) (Komaiko & McClements, 2016)

3.3 การเตรียมไมโครอิมัลชัน (Microemulsion Preparation)

การเตรียมไมโครอิมัลชันสามารถเตรียมได้เป็น 2 วิธี ได้แก่ phase titration method และ phase inversion method

3.3.1 การเตรียมไมโครอิมัลชัน ด้วยวิธีไทเทรต (phase titration method) เป็นการหาอัตราส่วนของส่วนประกอบที่เหมาะสม เตรียมจากการกระจายตัวยาซึ่งทำการผสมวัฏภาคน้ำมันกับสารลดแรงตึงผิวผสม (สารลดแรงตึงผิวหลักและสารลดแรงตึงผิวร่วม) และทำการไทเทรตด้วยน้ำ หลังการเติมน้ำเข้าไปทุกครั้ง ต้องทำให้สารเข้ากันดีและรอจนกระทั่งระบบเข้าสู่สมดุล (equilibrium) จึงทำการไทเทรตต่อจนกระทั่งเห็นจุดเริ่มต้นที่เกิดไมโครอิมัลชันจะมีลักษณะใส จากนั้นจึงทำการไทเทรตต่อจนถึงจุดสิ้นสุดการเกิดไมโครอิมัลชันซึ่งจะมีลักษณะขุ่น หรือสังเกตเห็นเกิดการแยกชั้น และให้ทำการทดลองเช่นเดียวกันนี้กับส่วนผสมของวัฏภาคน้ำมันกับสารลดแรงตึงผิวผสม ในอัตราส่วนอื่นจนครอบคลุมทุกอัตราส่วนแล้วจึงนำปริมาณของวัฏภาคต่างๆ ที่ทำการทดลองได้ไปทำการเขียนกราฟในแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม (pseudoternary phase diagrams) ดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมแสดงการเกิดไมโครอิมัลชัน

ที่มา : Jadhav, et al. (2018). Review on Microemulsion a Novel Approach for Drug Delivery p. 62.

3.3.2. การเตรียมไมโครอิมัลชัน ด้วยวิธีกลับวัฏภาค (phase inversion method) เป็นกระบวนการทางกายภาพ โดยการเปลี่ยนสัดส่วนปริมาณน้ำ ตัวอย่างเช่น การเตรียมไมโครอิมัลชัน ชนิดวัฏภาคน้ำมันในวัฏภาคน้ำ โดยการเติมวัฏภาคน้ำลงในวัฏภาคน้ำมันอย่างต่อเนื่องและมีสารลดแรงตึงผิว (กลุ่มสายโซ่สั้น) และสารลดแรงตึงผิวร่วม มีผลต่อการทำให้สารลดแรงตึงผิวเกิดไฮเดรชัน ฟิล์มที่มีความแข็งแรง เกิดการจัดเรียงตัวรอบอนุภาคของสารลดแรงตึงผิวผสม บริเวณผิวประจันเปลี่ยนจากฟิล์มความโค้งงอเป็นลบ (negative curvature) เปลี่ยนไปเป็นศูนย์ (zero curvature) โดยจุดนี้มีค่าความชอบน้ำและน้ำมันเท่ากันเกิดเป็นไมโครอิมัลชันต่อเนื่องแบบคู่ (bi-continuous microemulsion) และเมื่อเติมวัฏภาคน้ำจนเกินโครงสร้างจะทำให้เกิดความโค้งงอเป็นบวก (positive curvature) จะเกิดการเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมห่อหุ้มหยดน้ำมัน ทำให้เกิดการกลับวัฏภาคเป็นไมโครอิมัลชันชนิดวัฏภาคน้ำมันในวัฏภาคน้ำ (Jadhav et al., 2018)

4. นาโนอิมัลชัน

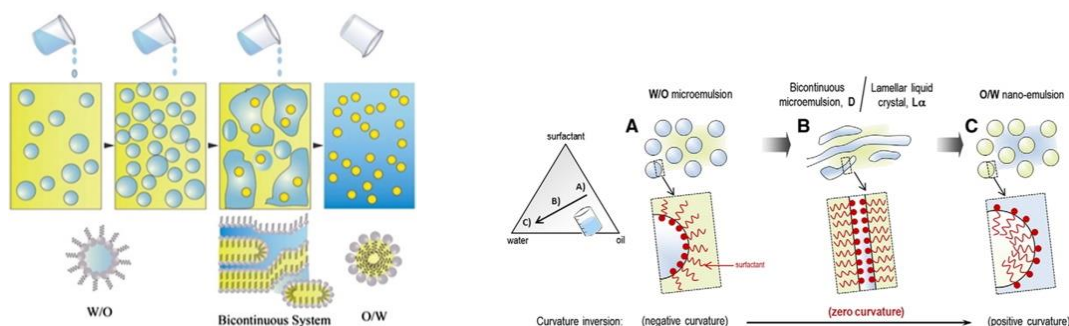
นาโนอิมัลชัน คือ ระบบนำส่งยาหรือระบบการกระจายตัวของคอลลอยด์เหลว 2 ชนิดไม่สามารถรวมเป็นเนื้อเดียวกัน ระหว่างวัฏภาคน้ำ (water phase) และวัฏภาคน้ำมัน (oil phase) โดยมีของผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวกับสารลดแรงตึงผิวร่วม (surfactant/ co-surfactant mixture) ขนาดอนุภาค 100-1000 นาโนเมตร ลักษณะโปร่งใส หรือ โปร่งแสง ความหนืดต่ำ มีความเสถียรทางจลนศาสตร์ (kinetic) การกระจายตัวดีกว่าไมโครอิมัลชันไม่เกิดการจับตัวกัน เกาะกลุ่มหรือแยกชั้นเพราะมีขนาดเล็ก ความเสถียรทางกายภาพในระยะยาวไม่มีการเกาะกลุ่มกัน (flocculation) หรือการหลอมรวมกัน (coalescence) เข้าใกล้เสถียรภาพทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic stability) อนุภาคนาโนสามารถเกิดขึ้นได้ในอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวต่อวัฏภาคน้ำมันต่ำ จึงมีอนุภาคนาโนอิมัลชันเป็นลักษณะทรงกลม (Jintapattanakit, 2018; Shaker, Ishak, Ghoneim, & Elhuoni, 2019) ประเภทของนาโนอิมัลชัน สามารถแบ่งออกตามปริมาณสัดส่วนองค์ประกอบของแต่ละตำรับ โดยแบ่งเป็น 4 ประเภท ได้แก่ วัฏภาคน้ำมันในวัฏภาคน้ำ (oil-in-water, o/w) วัฏภาคน้ำในวัฏภาคน้ำมัน (water-in-oil, w/o) วัฏภาคน้ำมันในวัฏภาคน้ำในวัฏภาคน้ำมัน (oil-in-water-in-oil, o/w/o) และวัฏภาคน้ำในวัฏภาคน้ำมันในวัฏภาคน้ำ (water-in-oil-in-water, w/o/w) (Kale & Deore, 2017)

4.1 ทฤษฎีการเกิดนาโนอิมัลชัน

ทฤษฎีของการรวมตัวของ 2 ทฤษฎี คือ turbulence และ cavitations เกี่ยวกับการลดขนาดของหยด (droplet) ในระหว่างกระบวนการ homogenization ของนาโนอิมัลชัน (Kale & Deore, 2017) การเตรียมนาโนอิมัลชัน เตรียมได้ 2 วิธี ดังนี้ high-energy method และ low-energy emulsification หรือ low-energy method ซึ่งข้อดี คือ ราคาไม่แพง แต่มีข้อจำกัดในการใช้วัตถุดิบน้ำมันและอิมัลซิไฟเออร์ที่สามารถใช้ได้ (Singh et al., 2017) โดย low-energy method มีวิธี

4.1.1 self-nanoemulsification method เป็นวิธีการเกิดอิมัลชันได้เองตามธรรมชาติ การก่อตัวของนาโนอิมัลชันเกิดจากส่วนผสมไอโซโทรปิก ที่เกิดการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วซึ่งระบบประกอบด้วยน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ซึ่งจากวัตถุดิบที่กระจายตัวไปยังวัตถุดิบต่อเนื่องจนทำให้เกิดความปั่นป่วนและเกิดเป็นอนุภาคนาโนอิมัลชัน โดยไม่ต้องเปลี่ยนความโค้งตามธรรมชาติของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ทั้งนี้จะขึ้นกับการเลือกชนิดความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมให้เหมาะสม

4.1.2 phase inversion emulsification method คือ การกลับวัตถุดิบของอิมัลชัน โดยจากการเปลี่ยนอัตราส่วนน้ำต่อน้ำมัน หรือการเจือจางน้ำหรือน้ำมัน โดยมีสารลดแรงตึงผิวในระบบ ทำได้โดยสัดส่วนจากการค่อยๆ เติมวัตถุดิบภายนอกลงในวัตถุดิบภายใน การเติมวัตถุดิบน้ำลงในวัตถุดิบน้ำมันที่มีสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ เช่น กลุ่ม alkyl polyglycol ethers เกิดสายโซ่อิมัลชันด้วยการเติมน้ำทำให้เกิดความโค้งของการจัดเรียงตัวรอบหยดน้ำ เปลี่ยนจากลบ (negative curvature) ผ่านการเป็นศูนย์ (zero curvature) โดยจุดนี้มีค่าความชอบน้ำและน้ำมันเท่ากันเกิดเป็นไมโครอิมัลชันต่อเนื่องแบบคู่ (bicontinuous microemulsion) และเปลี่ยนเป็นบวก (positive curvature) เกิดอนุภาคไขมันขนาดเล็กที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารลดแรงตึงผิวเป็นนาโนอิมัลชันชนิดวัตถุดิบน้ำมันในวัตถุดิบน้ำ (o/w nanoemulsion) ตามภาพประกอบ 12 (Kumar, Bishnoi, Shukla, & Jain, 2019; Perazzo, Preziosi, & Guido, 2015)



ภาพประกอบ 12 (ซ้าย) การเติมวัฏภาคลงในระบบ และ (ขวา) กลไกการเกิดนาโนอิมัลชันด้วยวิธี phase inversion composition (PIC)

ที่มา : Perazzo, A., et al. (2015). Phase inversion emulsification: Current understanding and applications p. 583-584.

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้ไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน

ปัจจุบันไมโครอิมัลชันมีบทบาทสำคัญและถูกนำมาใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ทางด้านยา เครื่องสำอาง อาหาร เชื้อเพลิงทางธรรมชาติ การเผาไหม้ การหล่อลื่น การตัดโลหะ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ปฏิกิริยาอินทรีย์และอินทรีย์ชีวภาพ และการสังเคราะห์สารเคมีของอนุภาคนาโน (Jadhav et al., 2018) ระบบไมโครอิมัลชันมีลักษณะความโปร่งใส ระบบคอลลอยด์ที่มีความเสถียรทางอุณหพลศาสตร์ ทำให้ระยะยาวมีความคงสภาพที่ดี ขนาดอนุภาคเล็กระดับนาโนเมตรเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจึงมีความนิยมในระบบเชิงพาณิชย์ อุตสาหกรรมอย่างมาก นอกจากนี้ยังเป็นระบบนำส่งตัวยาสู่ระบบเป้าหมายที่ช่วยเพิ่มการละลายของตัวยาและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ช่วยปกป้องการสลายของสารสำคัญทางชีวภาพ เพิ่มการซึมผ่าน และลดการการระคายเคืองต่อผิวหนัง งานวิจัยมากมายให้ความสำคัญต่อการนำน้ำมันจากธรรมชาติ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรค ยกตัวอย่างเช่น โรคมะเร็ง อัลไซเมอร์ โรคหลอดเลือดหัวใจ ด้านการอักเสบ ด้านเชื้อแบคทีเรีย และด้านไวรัส (Xavier-Junior, Vauthier, Morais, Alencar, & Egito, 2017) นอกจากนี้การเตรียมน้ำมันหอมระเหยให้อยู่ในรูปของไมโครอิมัลชันสามารถช่วยห่อหุ้มหรือกักเก็บสารสำคัญ ช่วยเพิ่มความคงสภาพกายภาพและเคมี เพิ่มการดูดซึม ส่งผลต่อประสิทธิภาพต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดีขึ้นอีกด้วย

จากงานวิจัยของ Nirmala และคณะ ได้ศึกษาการเตรียมไมโครอิมัลชันของน้ำมันยูคาลิปตัส ด้วยวิธีการใช้พลังงานต่ำ การสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม โดยมี Tween® 20 เป็นสารลดแรงตึงผิว เลือกตัวรับที่เหมาะสมจากการศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมี ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวและคุณสมบัติต่างๆ เช่น การดูดซึม ค่า pH ค่าความหนืดและขนาดของอนุภาค พบว่าไมโครอิมัลชันสูตรที่เหมาะสม มีความโปร่งใส มีความหนืดต่ำ ขนาดหยดอนุภาคในช่วง เท่ากับ 11.56 ± 0.6 นาโนเมตร โดยมีค่า PDI ต่ำสุด มีความเสถียร สามารถต้านเชื้อ *S. aureus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าน้ำมันหอมระเหย ยูคาลิปตัส เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar diffusion (Nirmala, Rakesh, & Nagarajan, 2018) และงานวิจัยของ Chaisri และคณะ ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อโดยเปรียบเทียบไมโครอิมัลชันของน้ำมันตะไคร้หอมกับตัวยา acaricide ร่วมกับน้ำมันตะไคร้หอม วิเคราะห์สารประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค gas chromatograph coupled mass selective detector (GC-MS) พบว่าไมโครอิมัลชันของตะไคร้หอม ช่วงความเข้มข้น 0.39 – 25 %w/w โดยมีสารลดแรงตึงผิว คือ Tween® 20 และ สารลดแรงตึงผิวร่วม propylene glycol ในอัตราส่วน 1:3 ได้ไมโครอิมัลชันที่มีลักษณะทางกายภาพและเคมีที่ดี มีขนาดอนุภาค เท่ากับ 19.6 ± 0.4 นาโนเมตร ถึง 47.3 ± 2.3 นาโนเมตร ค่า PDI ในช่วง 0.3 - 0.7 ซึ่งไมโครอิมัลชันของตะไคร้หอมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าตัวยา acaricide ร่วมกับน้ำมันตะไคร้หอม โดยมีค่า LC_{50} และ LC_{99} ที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เป็นผลมาจากสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมของระบบไมโครอิมัลชันช่วยเพิ่มความสามารถต่อการละลายตัวยาสำคัญและเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง เป็นการปรับปรุงการรักษาให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นกว่าการใช้ตัวยาและน้ำมันหอมระเหยโดยตรง (Chaisri, Chaiyana, Pikulkaew, Okonogi, & Suriyasathaporn, 2019) จากการศึกษาของ Tiwari และคณะ พบว่าตัวยาหรือสารสำคัญที่อยู่ในรูปแบบไมโครอิมัลชันช่วยปกป้องสารออกฤทธิ์ทางเภสัชกรรม (active pharmaceutical ingredient) และช่วยแก้ปัญหาในอุตสาหกรรมยา จากปัจจัยต่าง ๆ เช่น แสง สารเพิ่มปริมาณ การก่อกวนของสารพิษ การเปลี่ยนสีและรสชาติ (Tiwari et al., 2020)

นาโนอิมัลชัน เตรียมได้โดยใช้นาโนเทคโนโลยีนำมาประยุกต์ใช้ในด้านอาหาร เครื่องสำอางและอุตสาหกรรมยา เป็นเทคโนโลยีในด้านระบบการนำส่งยาแก่ผู้ป่วยให้ง่ายขึ้น ทั้งนี้สามารถบริหารยาได้หลายรูปแบบ ยกตัวอย่างเช่น การบริหารยาทางช่องปาก หลอดเลือดดำ ปอด และตา สามารถทำให้อยู่ในรูปเภสัชภัณฑ์ที่หลากหลาย เช่น ของเหลว ครีม สเปรย์ เจล และโฟม สามารถเตรียมได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้วิธีพลังงานสูงหรือเครื่องมือที่ซับซ้อน ทั้งนี้ระบบนาโนอิมัลชันมีคุณสมบัติทางกายภาพ ขนาดอนุภาคขนาดเล็ก ในระยะยาวไม่ก่อให้เกิดการตกตะกอนหรือ

การรวมตัว มีความเสถียรทางจลนศาสตร์ (kinetically stable) อีกทั้งการบริหารการนำส่งยา สามารถควบคุมและกำหนดเป้าหมายได้ มีการบริหารการไหลเวียนผ่านเมแทบอลิซึมของตับอย่างเป็นระบบนำไปสู่การการดูดซึมของยา และช่วยลดผลข้างเคียงของยาบางชนิด เช่น ยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ซึ่งมักจะเกี่ยวข้องกับการบริหารยาทางเดินอาหาร (Gupta, Eral, Hatton, & Doyle, 2016; Shaker et al., 2019; Singh et al., 2017) ปัจจุบันนาโนเทคโนโลยีกำลังเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เพิ่มการละลาย การดูดซึมของสารออกฤทธิ์ที่เป็นตัวยาทางธรรมชาติ จากงานวิจัยของ Jiang และคณะ ได้นำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการห่อหุ้มเคอร์คูมินซึ่งเป็นสารสำคัญของขมิ้นชัน ในรูปแบบนาโนอิมัลชัน โดยเตรียมด้วยวิธี phase inversion temperature, phase inversion composition, ultrasonication, high pressure homogenization และ micro fluidization และศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการนำส่งเคอร์คูมิน เช่น ชนิดของอิมัลซิไฟเออร์ ปริมาณของน้ำมัน และปฏิกริยาระหว่างน้ำมันกับอิมัลซิไฟเออร์ ทั้งนี้ทำให้ขมิ้นชันมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ดีขึ้น เช่น ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต่อต้านการอักเสบและยับยั้งมะเร็ง มีผลมาจากอิทธิพลของระบบนาโนอิมัลชันที่ช่วยแก้ปัญหาการละลายต่ำ เพิ่มการดูดซึมของสารสำคัญเคอร์คูมิน (Jiang, Liao, & Charcosset, 2020) และจากงานวิจัยของ Garzoli และคณะ ศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจาก Lavandula และ hydrolate ของ Lavandula ในรูปแบบนาโนอิมัลชันต่อการนำไปประยุกต์ใช้ด้านยา เครื่องสำอางและอาหาร โดยวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค Headspace-Gas Chromatography / Mass Spectrometry (HS-GC/MS) และประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี ประสิทธิภาพต่อฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก Lavandula มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *Bacillus cereus* ค่า MIC เท่ากับ 1.87 และ 0.94 %v/v และนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจาก Lavandula มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus* ค่า MIC เท่ากับ 0.37 และ 0.01 %v/v และ hydrolate ของ Lavandula ไม่มีสมบัติในการต้านเชื้อ เมื่ออยู่ในรูปแบบนาโนอิมัลชัน มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อ *E. coli* และ *B. cereus* ค่า MIC เท่ากับ 0.75 และ 0.06 %v/v ทั้งนี้การพัฒนาระบบนาโนอิมัลชันยังสามารถเพิ่มฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของ hydrolate ของ Lavandula ได้อีกด้วย และช่วยเพิ่มฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีผลจากอิทธิพลจากระบบนาโนอิมัลชันช่วยในการห่อหุ้มและป้องกันสารสำคัญทางเคมีจากการสลายตัว และช่วยเพิ่มความคงตัวของกายภาพและเคมี (Garzoli, Petralito, Ovidi, Turchetti, Laghezza Masci, et al., 2020)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. กระบอกฉีดยา (syringe), Nipro[®] ปริมาตร 3 ml ประเทศญี่ปุ่น
 2. บีกเกอร์ (Beaker), Pyrex[®] ขนาด 100 ml และ ขนาด 250 ml ประเทศเยอรมัน
 3. หลอดทดลอง (Test tube), Pyrex[®] ขนาด 20 ml ประเทศสหรัฐอเมริกา
 4. หลอดทดลองฝาเกลียว (Screw cap test tube), Pyrex[®] ขนาด 10 ml ประเทศสหรัฐอเมริกา
 5. หลอดไมโครเซนตริฟิว (Microcentrifuge tube), Axygen[®] ขนาด 1.5 ml และ ขนาด 5 ml ประเทศสหรัฐอเมริกา
 6. Autopipette, Biohit proline[®] ขนาด 20-200 μ l และ ขนาด 200-1,000 μ l ประเทศสหรัฐอเมริกา
 7. Microcuvettes quartz, Hellma[®] chamber volume 1,000 ml ประเทศเยอรมัน
 8. Pipette tip, Biotec[®] ขนาด 200 μ l ประเทศอังกฤษ
 9. Pipette tip, Kirgen[®] ขนาด 1,000 μ l ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ##### 1.2 เครื่องมือ
1. เครื่องเขย่าสาร Vortex mixer, Scientific Industries รุ่น G560E ประเทศสหรัฐอเมริกา
 2. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง, Sartorius รุ่น BP 221S ประเทศเยอรมนี
 3. เครื่องวัดขนาดอนุภาคและความต่างศักย์บนผิวอนุภาค Zetasizer, Malvern รุ่น Nano ZS ประเทศอังกฤษ
 4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu รุ่น UV 1601 ประเทศญี่ปุ่น
 5. ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย Clevenger Apparatus
 6. ตู้บ่มเชื้อ Incubator, Memmert รุ่น BE600 ประเทศเยอรมนี

7. ตู้ปลอดเชื้อ (biohazard safety cabinet class II, ESCO Air Stream รุ่น AC2-4E ประเทศสิงคโปร์

8. Anaerobic jar ขนาด 2.5 L, Merck ประเทศเยอรมัน

9. Anaerogen Oxoid ประเทศอังกฤษ

1.3 สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Eugenol FLUKA, PESTANAL[®] ประเทศเยอรมัน

2. Agar, Merck ประเทศเยอรมัน

3. Brain heart infusion medium, Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

4. Dimethyl sulfoxide; DMSO (Analytical grade) บริษัท อาริซีไอ แลบบสแกน ประเทศไทย

5. Ethyl alcohol (commercial grade) บริษัท อาริซีไอ แลบบสแกน ประเทศไทย

6. Hyaluronic acid (Standard Molecule) - MySkinRecipes[®] ประเทศญี่ปุ่น

7. Poloxamer 188 บริษัท BASF ประเทศเยอรมนี

8. Poly-oxyethylene sorbitan monooleate (Tween[®] 80) บริษัท หน้าเขียน ประเทศไทย

9. Propylene glycol; บริษัท หน้าเขียน ประเทศไทย

10. Tryptic soy medium, Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Cutibacterium acnes* ATCC 6919 American Type Culture Collection ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. *Staphylococcus epidermidis* DMST 15055 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประเทศไทย

1.5 พืชที่ใช้ในการทดสอบ

ยี่หระ (*Ocimum gratissimum*) ที่มาจากตลาดไท จังหวัดปทุมธานี เมื่อวันที่ 9 พฤศจิกายน 2562

2. วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยวิธี hydrodistillation method

2.1.1 ทำความสะอาดใบยี่หระสดให้สะอาดด้วยการล้าง

2.1.2 ชั่งใบยี่หระที่สะอาดแห้งและหั่นเรียบร้อยแล้ว น้ำหนัก 300 กรัม ใส่ลงในอุปกรณ์ Clevenger type apparatus เติมน้ำกลั่นปริมาตร 3,000 mL

2.1.3 ให้ความร้อนอย่างต่อเนื่องจนครบ 3 ชั่วโมง และสังเกตว่าไม่มีน้ำมันหอมระเหยออกมาอีก ทำการปิดเครื่องกลั่น

2.1.4 นำน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระลงในหลอดทดลอง เติม anhydrous sodium sulfate เพื่อดูดน้ำออก ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดชั้นน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระลงในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

2.1.5 คำนวณหา % yield จากสมการ (1)

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{ปริมาตรของสารสกัด (มิลลิลิตร)} \times 100}{\text{น้ำหนักของพืชสด (กรัม)}} \quad \text{สมการ (1)}$$

2.2 การวิเคราะห์สารสำคัญทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

การวิเคราะห์หา eugenol ในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณด้วยเทคนิค Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) โดยผลวิเคราะห์ค่า R_t และค่า m/z ของตัวอย่างเทียบกับฐานข้อมูล (library) หรือเทียบกับสารมาตรฐาน ซึ่งค่า retention index หรือ Kovat retention index (KI) ของพีคที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันระเหยจากใบยี่หระ คำนวณจากค่า retention time ของพีคสารที่สนใจเทียบกับค่า retention time ของพีคสารมาตรฐานอัลเคนที่แยกออกมาติดกันก่อนและหลังพีคที่สนใจ ซึ่งสอดคล้องกับค่า retention index ในฐานข้อมูลของ NIST ที่วิเคราะห์โดยใช้คอลัมน์ประเภทเดียวกัน

2.3 หาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อเชื้อจุลชีพ ด้วยวิธี broth microdilution assay ทดสอบใน 96-well plate

2.3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ Brain Heart Infusion (BHI) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามปริมาณที่ต้องการ (สัดส่วน TSB 3 กรัม : น้ำ 100 มิลลิลิตร, BHI 3.7 กรัม : น้ำ 100 มิลลิลิตร) ลงในขวดฝาเกลียวและเติมน้ำตามปริมาณที่ต้องการ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.3.2 เตรียมน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น โดยเจือจางด้วย 2 %v/v dimethyl sulfoxide (DMSO) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.3 เตรียมสารละลาย doxycycline ในน้ำปราศจากเชื้อ และ clindamycin ในน้ำปราศจากเชื้อ ความเข้มข้น 1 mg/mL เพื่อเป็น positive control สำหรับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นนำไปผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นสุดท้ายของ doxycycline และ clindamycin เท่ากับ 0.25 mg/mL และใช้สารละลาย 2 %v/v dimethyl sulfoxide (DMSO) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น solvent control และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเปล่าเป็น negative control

2.3.4 เตรียมสารแขวนตะกอนของเชื้อ 5 %v/v ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เชื้อจากการเตรียมสารแขวนตะกอนของเชื้อในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับความขุ่นของ McFarland No. 0.5 ซึ่งมีปริมาณเชื้ออยู่เท่ากับ 10^8 colony forming unit (CFU/mL)

2.3.5 ปิเปตสารละลาย ข้อ 2.3.3 ลงใน sterile 96-well plate หลุมละ 100 μ L และเชื้อในข้อ 2.3.4 หลุมละ 100 μ L นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *S. epidermidis* และสำหรับเชื้อ *C. acnes* ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.3.6 สังเกตด้วยตาเปล่าโดยพิจารณาหลุมที่เติมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อใส ให้พิจารณาค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างนั้นเป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (minimum inhibitory concentration, MIC) ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

2.3.7 ทำการทดลองทั้งหมด 3 กลุ่ม (n=3) กลุ่มละ 3 ซ้ำ

2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol ในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระและการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry

2.4.1 เตรียมสารมาตรฐาน eugenol ในสารละลาย DMSO โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน eugenol เจือจางด้วยสารละลาย DMSO ให้มีช่วงความเข้มข้น 0.001–0.015 %v/v

2.4.2 เตรียมสารตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระในสารละลาย DMSO โดยปิเปตสารตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ เจือจางด้วยสารละลาย DMSO ให้มีช่วงความเข้มข้น 0.001–0.015 %v/v

2.4.3 นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 200–400 nm เลือกความยาวคลื่นที่การดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max}) ของสารมาตรฐาน eugenol ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol

2.4.4 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงความเข้มข้น (linearity and range) จากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน eugenol เจือจางในสารละลาย DMSO ให้มีช่วงความเข้มข้น 0.001–0.015 %v/v นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max}) สร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยบ่งบอกจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient; r) ค่าไม่น้อยกว่า 0.995 และควรเข้าใกล้ 1 ซึ่งหมายถึง ตัวแปรทั้งสองมีความสัมพันธ์กันโดยตรงอย่างมาก

2.4.5 ศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy) เติมสารมาตรฐาน eugenol (standard addition) ลงในตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้น นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงหาความยาวคลื่นที่การดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max}) ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer นำมาคำนวณร้อยละการคืนกลับ (% recovery) ตามสมการ (2)

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ปริมาณ eugenol ใน spiked sample} - \text{ปริมาณ eugenol ใน unspiked sample}}{\text{ปริมาณสาร eugenol ที่เติมลงไป}} \times 100$$

ปริมาณสาร eugenol ที่เติมลงไป

สมการ (2)

2.4.6 ศักยภาพความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ (precision)

2.4.6.1 ศักยภาพ intraday precision (วิเคราะห์ภายในวันเดียว) จากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน eugenol ในสารละลาย DMSO ช่วงความเข้มข้น 0.001–0.015 %v/v ทำซ้ำ 3 ครั้ง

2.4.6.2 ศักยภาพ interday precision (วิเคราะห์ในวันที่ต่างกัน) จากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน eugenol ในสารละลาย DMSO ช่วงความเข้มข้น 0.001–0.015 %v/v ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ระดับความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ คำนวณจากค่าร้อยละของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%relative standard deviation, %RSD) หรือ ร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (%CV) จากสูตรสมการ (3) โดยค่า %RSD ไม่เกิน 2.0 ค่ายิ่งน้อยแสดงว่าวิธีการวิเคราะห์นั้นมีความแม่นยำสูง

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ย}} \times 100 \quad \text{สมการ (3)}$$

2.4.7 ศักยภาพความไวของวิธีการวิเคราะห์ (sensitivity)

2.4.7.1 ค่า limit of quantification (LOQ) คือ ค่าความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ในเชิงปริมาณได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma/S \quad \text{สมการ (4)}$$

2.4.7.2 ค่า limit of detection (LOD) คือ ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดได้

$$\text{LOD} = 3.3 \times \sigma/S \quad \text{สมการ (5)}$$

หมายเหตุ

σ คือ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉลี่ยของจุดตัด (intercept) ของกราฟมาตรฐาน eugenol (n = 3)

S คือ ค่าเฉลี่ยความชันของกราฟมาตรฐาน eugenol (n = 3) ที่ได้จากการค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นการดูดกลืนแสงสูงสุด

2.5 การเตรียมไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยวิธี titration method

2.5.1 เตรียมสารลดแรงตึงผิวผสม (สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม) คือ Tween[®] 80 และ propylene glycol ในอัตราส่วน 1:0, 1:1, 2:1 และ 3:1 %v/v

2.5.2 เติมน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระและสารลดแรงตึงผิว และ/หรือสารลดแรงตึงผิวร่วม ปริมาตรดังนี้ ได้แก่ 100:900, 200:800, 300:700, 400:500, 500:500, 600:400, 700:300, 800:200 และ 900:100 μ l

2.5.3 เติมน้ำบริสุทธิ์ลงในสารผสมระหว่างน้ำมันหอมระเหยกับสารลดแรงตึงผิวผสม ครั้งละ 100 μ l ทั้งหมด 10 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำบริสุทธิ์ ครั้งละ 1,000 ml จนครบ 10,000 ml ที่ อุณหภูมิห้อง ในแต่ละครั้งที่มีการเติมน้ำผสมสารผสมด้วย vortex เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้น สังเกตลักษณะของสารผสมใส โปร่งแสง หรือขุ่นขาว ตัวอย่างของส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน ดังแสดงในตารางที่ 2

2.5.4 ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตลักษณะภายนอกของไมโครอิมัลชันโดย มองด้วยตาเปล่าผ่านหลอดทดลองทะลุผ่านตัวหนังสือ

ตาราง 2 อัตราส่วนของส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน

oil (μ l)	Smix (μ l)	water (μ l)	total volume	oil (%)	Smix (%)	water (%)
100	900	100	1,100	9.09	81.82	9.09
100	900	200	1,200	8.33	75.00	16.67
100	900	300	1,300	7.69	69.23	23.08
100	900	400	1,400	7.14	64.29	28.57
100	900	500	1,500	6.67	60.00	33.33
100	900	600	1,600	6.25	56.25	37.50
100	900	700	1,700	5.88	52.94	41.18
100	900	800	1,800	5.56	50.00	44.44
100	900	900	1,900	5.26	47.37	47.37
100	900	1,000	2,000	5.00	45.00	50.00
100	900	1,100	2,100	4.76	42.86	52.38
100	900	2,000	3,000	3.33	30.00	66.67
100	900	3,000	4,000	2.50	22.50	75.00
100	900	4,000	5,000	2.00	18.00	80.00
100	900	5,000	6,000	1.67	15.00	83.33
100	900	6,000	7,000	1.43	12.86	85.71
100	900	7,000	8,000	1.25	11.25	87.50
100	900	8,000	9,000	1.11	10.00	88.89
100	900	9,000	10,000	1.00	9.00	90.00
100	900	10,000	11,000	0.91	8.18	90.91

หมายเหตุ oil คือ น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่ห่วย

Smix คือ Tween[®] 80 กับ Propylene glycol

2.6 การเตรียมนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยวิธี phase inversion composition (PIC)

2.6.1 วิธีการเตรียมสารละลาย

2.6.1.1 เตรียมสารละลาย 1 %w/v hyaluronic acid โดยค่อย ๆ โปรมอง hyaluronic acid น้ำหนัก 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) ที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที จนได้เป็นสารละลายใส

2.6.1.2 เตรียมสารละลาย 10 %w/v Poloxamer 188 โดยค่อย ๆ โปรมอง Poloxamer 188 น้ำหนัก 10 กรัม ลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) ที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที จนได้เป็นสารละลายใส

2.6.2 การเตรียมนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

2.6.2.1 เตรียมนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ซึ่งใช้สารลดแรงตึงผิว คือ Tween[®] 80 (HLB 15) และมีสารช่วยเพิ่มความหนืด คือ hyaluronic acid และ Poloxamer 188 โดยเตรียมทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 3

ตาราง 3 สัดส่วนองค์ประกอบของการเตรียมนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

Formulation	<i>O. gratissimum</i> Leaf oil (μL)	Polysorbate 80 (μL)	1% Hyaluronic acid solution (μL)	10% Poloxamer 188 solution (μL)	Purified water (μL)
1	100	200	-	-	9,700
2	100	200	1,500	-	8,200
3	100	200	1,500	6,000	2,200
4	100	300	1,500	-	7,100

2.6.2.2 สูตร 1 เติมน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระปริมาตร 100 μl เติม Tween[®] 80 ปริมาตร 200 μl เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 15 วินาที จนได้เป็นสารละลายใส

2.6.2.3 เติมน้ำบริสุทธิ์ (purified water) โดยผสมครั้งละประมาณ 1,000 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนครบปริมาตรน้ำบริสุทธิ์ ปริมาตร 9,700 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 30 วินาที

2.6.2.4 สูตร 2 เมื่อได้สารละลายในข้อ 2.6.2.2 เติมสารละลาย 1% hyaluronic acid โดยเติมครั้งละประมาณ 1,000 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนครบปริมาตร 1,500 μ l จากนั้นเติมน้ำบริสุทธิ์ครั้งละ 1,000 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนครบปริมาตร 8,200 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร ครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 30 วินาที

2.6.2.5 สูตร 3 เมื่อได้สารละลายในข้อ 2.6.2.2 ผสมสารละลาย 1% hyaluronic acid เติมครั้งละประมาณ 1,000 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนครบปริมาตร 1,500 μ l และเติมสารละลาย 10% Poloxamer 188 โดยเติมครั้งละประมาณ 1,000 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 15 วินาที จนครบปริมาตร 6,000 μ l จากนั้นเติมน้ำบริสุทธิ์ครั้งละ 1,000 μ l โดยเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนครบปริมาตร 2,200 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร ครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 30 วินาที

2.6.2.6 สูตร 4 เติมน้ำมันหอมระเหยจากไอบีหระาปริมาณ 100 μ l และ Tween[®] 80 ปริมาตร 300 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 15 วินาที จนได้เป็นสารละลายใส เติมสารละลาย 1% hyaluronic acid โดยเติมครั้งละประมาณ 1,000 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 15 วินาที จนครบปริมาตร 1,500 μ l จากนั้นเติมน้ำบริสุทธิ์ ครั้งละประมาณ 1,000 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนครบปริมาตร 8,200 μ l เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร ครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 30 วินาที

2.7 ศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

2.7.1 เตรียมตัวอย่างไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน ปริมาตร 1000 μ l บรรจุตัวอย่างลงใน disposable folded capillary cell นำไปวัดขนาดอนุภาค (size) การกระจายของอนุภาค (polydispersity Index; Pdl) และค่าประจุบนผิวของอนุภาค (zeta potential) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาค (polydispersity index) และค่าประจุบนผิวอนุภาค (zeta potential value) ด้วยเครื่อง zetasizer ยี่ห้อ Malvern รุ่น Nano ZS

2.8 การประเมินความคงสภาพทางกายภาพ

2.8.1 การประเมินความคงสภาพทางกายภาพของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

วิธีการเตรียมตัวอย่าง นำตัวอย่างไมโครอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ปริมาตร 1,000 μ l หลังเตรียมเสร็จทันที หรือที่ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ วัดขนาดอนุภาค (size) ค่าการกระจายของอนุภาค (polydispersity Index; Pdl) และค่าประจุบนผิวของอนุภาค (zeta potential) ด้วยเครื่อง zetasizer ยี่ห้อ Malvern รุ่น Nano ZS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.8.2 การประเมินความคงสภาพทางกายภาพของนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

วิธีการเตรียมตัวอย่าง นำตัวอย่างนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ปริมาตร 1,000 μ l หลังเตรียมเสร็จทันที หรือที่ถูกเก็บที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน วัดขนาดอนุภาค (size) ค่าการกระจายของอนุภาค (polydispersity Index; Pdl) และค่าประจุบนผิวของอนุภาค (zeta potential) ด้วยเครื่อง zetasizer ยี่ห้อ Malvern รุ่น Nano ZS ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.9 การวิเคราะห์หาปริมาณ eugenol ในไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระด้วยเทคนิค UV-Vis spectrophotometry

2.9.1 เตรียมสารละลาย blank คือวัฏภาคน้ำของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน นำมาเจือจาง 100 เท่า ด้วยตัวทำละลาย DMSO เขย่าสารด้วยเครื่องเขย่าสาร

2.9.2 นำไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ นำมาเจือจาง 100 เท่า ด้วยตัวทำละลาย DMSO เขย่าสารด้วยเครื่องเขย่าสาร

2.9.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่กักเก็บในไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max})

2.9.4 คำนวณหาร้อยละการกักเก็บสารสำคัญ (%entrapment) ตามสมการ (6)

$$\%entrapment = \frac{\text{ปริมาณ eugenol ที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณ eugenol ของน้ำมันหอมระเหยที่เติมลงไป}} \times 100 \quad \text{สมการ (6)}$$



2.10 การประเมินความคงสภาพทางเคมีของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

2.10.1 เตรียมตัวอย่างไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ หลังเตรียมเสร็จทันที หรือที่ถูกเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2, 4, 6, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ นำมาเจือจาง 1,000 เท่า ด้วยตัวทำละลาย DMSO เขย่าสารด้วยเครื่องเขย่าสาร

2.10.2 เตรียมตัวอย่างนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ หลังเตรียมเสร็จทันที หรือที่ถูกเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน นำมาเจือจาง 1,000 เท่า ด้วยตัวทำละลาย DMSO เขย่าสารด้วยเครื่องเขย่าสาร

2.10.3 นำตัวอย่างไมโครอิมัลชันหรือนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระจากข้อ 2.10.1 หรือ 2.10.2 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นดูดกลืนสูงสุด (λ_{max})

2.10.4 คำนวณปริมาณ eugenol ในไมโครอิมัลชันหรือนาโนอิมัลชัน จากการแทนค่าการดูดกลืนแสงลงในสมการแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ eugenol กับค่าการดูดกลืนแสง

2.10.5 คำนวณร้อยละการคงเหลือ (%remaining) ของปริมาณ eugenol equivalent ในไมโครอิมัลชัน และนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ตามสมการ (7)

$$\% \text{ remaining} = \frac{\text{ปริมาณ eugenol equivalent ที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ใช้เตรียมตำรับ}} \times 100 \quad \text{สมการ (7)}$$

2.11 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดสิวของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยวิธี agar well diffusion

2.11.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* และ BHI สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* โดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อตามปริมาณที่ต้องการ (สัดส่วน tryptic soy medium 3 กรัม, agar 1.5 กรัม : น้ำ 100 มิลลิลิตร, BHI 3.7 กรัม, agar 1.5 กรัม : น้ำ 100 มิลลิลิตร) ลงในขวดฝาเกลียวและเติมน้ำตามปริมาณที่ต้องการ เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธี autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.11.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการ autoclave จากข้อ 2.9.1 ลงใน sterile petri dish ปริมาณ 20 mL/dish ทิ้งไว้ให้แข็งตัวเป็น agar plate

2.11.3 เตรียมสารแขวนตะกอนของเชื้อในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีความขุ่นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับความขุ่นของ McFarland No. 0.5 ซึ่งมีปริมาณเชื้ออยู่เท่ากับ 10^8 colony forming unit (CFU/mL)

2.11.4 เจาะหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย cylinder cap ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm เพื่อบรรจุตัวรับทดสอบ

2.11.5 ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อชุบลงในสารแขวนตะกอนของเชื้อจากข้อที่ 2.10.3 จนชุ่ม บิดปลายสำลีกับข้างหลอดจนหมด แล้วนำไปทาให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อบน agar plate ที่เตรียมไว้ให้ทั่ว plate ภายใต้ biohazard safety cabinet class II

2.11.6 เตรียมน้ำมันหอมระเหยกานพลู ความเข้มข้น 1 %v/v เตรียมสารละลาย doxycycline ในน้ำปราศจากเชื้อ และ clindamycin ในน้ำปราศจากเชื้อ ความเข้มข้น 0.25 mg/mL เพื่อเป็น positive control สำหรับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และใช้วัฏภาคน้ำของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน เป็น negative control เตรียมตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ความเข้มข้น 1 %v/v เตรียมไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

2.11.7 หยดสารทดสอบ, positive control, negative control, eugenol 100 μ l ลงใน well ที่เจาะไว้ สำหรับเชื้อ *S. epidermidis* นำไปบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. acnes* ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.11.8 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone (mm) ที่เกิดขึ้น บนที่กผลแล้ว
เปรียบเทียบค่าที่ได้กับ control สารมาตรฐาน และสารตัวอย่างอื่นๆ

2.11.9 ทำการทดลองทั้งหมด 3 กลุ่ม (n=3) กลุ่มละ 3 ซ้ำ

2.12 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ในกรณีเปรียบเทียบ
ตัวอย่าง 2 ชนิด หรือวิเคราะห์หาความแตกต่างของค่ากลางของตัวอย่างด้วยการวิเคราะห์ผ่านค่า
ความแปรปรวน (Analysis of variance) และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ตัวทดสอบ
ทางสถิติ t-test

2.13 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ดำเนินการวิจัยและทำการทดลองที่

1. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ตำบลองครักษ์ อำเภอองครักษ์
จังหวัดนครนายก
2. สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) ตำบลทรายมูล
อำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย และอภิปรายผล

1. ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ตลาดไท จังหวัดปทุมธานี

จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยวิธีสกัดด้วยน้ำ (hydrodistillation) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า ลักษณะน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระเป็นของเหลว สีเหลืองใส ให้ร้อยละผลผลิตการสกัด (% yield) เท่ากับ 0.15 ± 0.03 %v/w ซึ่งมีปริมาณร้อยละผลผลิตการสกัดสอดคล้องกับรายงานของสุภาวรรณและคณะ รายงานว่าร้อยละผลผลิตการสกัดของการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระของประเทศไทยที่สกัดด้วยน้ำ เท่ากับ 0.15 %v/w (Bunrathep, Palanuvej, & Ruangrunsi, 2007) และจากรายงานของ Tangpao และคณะ พบว่าร้อยละผลผลิตการสกัดของการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระของประเทศไทยในภาคเหนือ เท่ากับ 0.19 ± 0.05 %v/w (Tangpao, Chung, & Sommano, 2018) ซึ่งมีร้อยละผลผลิตการสกัดที่ใกล้เคียงกันกับการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระในวิจัยนี้

2. ผลการวิเคราะห์สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระด้วยเทคนิค

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

การวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระด้วยวิธีเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีองค์ประกอบทางเคมี 20 ชนิด พบสารกลุ่มต่างๆ ได้แก่ monoterpenes, oxygenated monoterpenes, sesquiterpenes และ phenylpropenes โดยมี eugenol เป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 27.74) และ (*E*)- β -ocimene (ร้อยละ 24.24), germacrene D (ร้อยละ 16.28) เป็นองค์ประกอบรอง (*Z,E*)- α -Farnesene (ร้อยละ 7.68), α -*trans*-bergamotene (ร้อยละ 6.85) รวมทั้งสารอื่นๆ แสดงตามตารางที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tangpao และคณะ น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระทางภาคเหนือของประเทศไทย ที่สกัดด้วยวิธี hydrodistillation พบองค์ประกอบ eugenol มากที่สุด (Tangpao et al., 2018) และงานวิจัยของ Huong และคณะ ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบและดอกของยี่หระ ประเทศเวียดนาม ที่สกัดด้วยน้ำ (hydrodistillation process) พบว่าองค์ประกอบทางเคมี มี 25 ชนิด โดยมีองค์ประกอบเคมีที่สำคัญ คือ eugenol (ร้อยละ 59.448), *trans*- β -ocimene (ร้อยละ 10.382), β -cubebene (ร้อยละ 11.783), caryophyllene (ร้อยละ 6.966) และ copaene (ร้อยละ 2.479) (Huong et al., 2020) สรุปได้ว่าปริมาณ eugenol ที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS อยู่ในช่วงร้อยละ 25 - 62

(Bunrathep et al., 2007; Chimnoi et al., 2018; Saliu, Usman, Sani, Muhammad, & Akolade, 2011) ซึ่งปริมาณสารสำคัญหรือองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระขึ้นอยู่กับช่วงเวลาที่เก็บเกี่ยวพืช อายุของพืช รวมทั้งเทคนิคการสกัด (Matasyoh et al., 2007)

ตาราง 4 ข้อมูลขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

Chemical name	Kovat's Index	% Area
Monoterpenes		
Myrcene	990	0.46
allo-Ocimene	1132	0.48
(<i>E</i>)- β -Ocimene	1050	24.24
Oxygenated monoterpenes		
Linalool	1096	1.21
Sesquiterpenes		
Caryophyllene oxide	1583	0.32
α -Cadinol	1654	0.49
α -Copaene	1376	2.06
α -Humulene	1454	0.53
α - <i>trans</i> -Bergamotene	1434	6.85
β -Bourbonene	1388	0.39
β -Elemene	1390	1.72
β -Sesquiphellandrene	1522	0.6
(<i>Z,E</i>)- α -Farnesene	-	7.68
(<i>E,E</i>)- α -Farnesene	1505	0.51
(<i>E</i>)-Caryophyllene	1419	5.11
Germacrene D	1485	16.28
epi- α -Murrrolol	1642	0.27
Phenylpropenes		
Eugenol	1359	27.74
Methyl eugenol	1403	1.35
Other		
Unidentified	-	0.57

3. ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว

3.1 ผลการประเมินความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes*

จากการประเมินความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ด้วยวิธี broth microdilution assay โดยมี doxycycline และ clindamycin ความเข้มข้น 0.25 mg/mL เป็น positive control พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ที่ทำให้เกิดสิวของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระและน้ำมันหอมระเหยกานพลู มีค่า MIC เท่ากับ 0.125 และ 0.625 %v/v เทียบกับสารมาตรฐาน eugenol มีค่า MIC เท่ากับ 0.125 %v/v ดังตารางที่ 5 ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ได้เทียบเท่าสารมาตรฐาน eugenol อาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ มี eugenol (ร้อยละ 27.74) ที่มีฤทธิ์ต้าน *C. acnes* เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังมี (*E*)- β -ocimene (ร้อยละ 24.24) อยู่ในของกลุ่ม monoterpene และ germacrene D (ร้อยละ 16.28) อยู่ในกลุ่ม sesquiterpenes ซึ่งมีรายงานว่าสารกลุ่ม monoterpene และ sesquiterpenes สามารถต้านแบคทีเรียและเสริมฤทธิ์ยาปฏิชีวนะได้ (Fitri, Fatimah, Chabib, & Fajarwati, 2017; Pérez Zamora, Torres, & Nuñez, 2018) ซึ่งฤทธิ์การต้าน *C. acnes* อาจเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันของสารกลุ่มต่าง ๆ ในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ จึงมีฤทธิ์ที่ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลู ซึ่งมี eugenol (ร้อยละ 75-85)

3.2 ผลการประเมินความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย

S. epidermidis

จากการประเมินความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดสิว *S. epidermidis* ด้วยวิธี broth microdilution assay โดยมี doxycycline และ clindamycin ความเข้มข้น 0.25 mg/mL positive control เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ น้ำมันหอมระเหยกานพลู และ สารมาตรฐาน eugenol พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ สามารถต้านเชื้อ *S. epidermidis* มีค่า MIC เท่ากับ 1.000 %v/v ไม่แตกต่างกับน้ำมันหอมระเหยกานพลู และสารมาตรฐาน eugenol สอดคล้องกับงานวิจัยของ Saliu และคณะ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่สกัดด้วยน้ำ (hydrodistillation) ที่ปลูกภาคเหนือตอนกลางของประเทศไนจีเรีย มีผลต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. salivarius* มีค่า MIC เท่ากับ 5.0 %v/v [2] รายงานวิจัยของ Matasyoh และคณะ แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระจากสายพันธุ์และภูมิภาคต่างกันมีความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้แตกต่างกัน ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (Meru)

สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้สูง ได้แก่ *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *P. mirabilis* ซึ่งมีสาร eugenol ร้อยละ 68.8 เป็นองค์ประกอบทางเคมีสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย อยู่ในกลุ่ม phenylpropenes (Matasyoh et al., 2007; Matasyoh et al., 2008; Saliu et al., 2011)

ตาราง 5 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว ของ *C. acnes* และ *S. epidermidis*

Sample	MIC (%v/v) (n=3)	
	<i>C. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>
<i>O. gratissimum</i> leaf oil	0.125	1.000
Clove oil	0.625	0.125
Eugenol	0.125	0.250

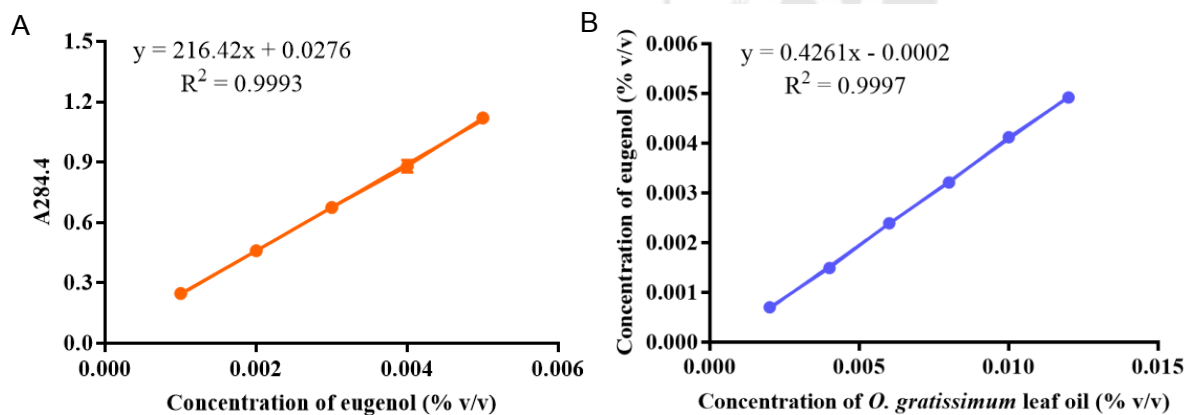
หมายเหตุ positive control = 0.25 mg/mL doxycycline, 0.25 mg/mL clindamycin

4. การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร eugenol ในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยเทคนิค UV-Visible spectrophotometry

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry อ้างอิงข้อกำหนดและเกณฑ์ที่ใช้ตาม Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) ซึ่งเป็นเกณฑ์มาตรฐานที่เป็นที่ยอมรับและน่าเชื่อถือที่สุด แนวทางปฏิบัติและพารามิเตอร์ที่กำหนดดังต่อไปนี้ ได้แก่ ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงของความเข้มข้น (linearity and range), ความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy), ความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ (precision) และความไวของการวิเคราะห์ (sensitivity)

4.1 ผลการศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงของความเข้มข้น (linearity and range)

จากกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน eugenol กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด 284.4 นาโนเมตร จากเกณฑ์การยอมรับของ AOAC ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ต้องไม่น้อยกว่า 0.995 หรือมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation Coefficient; r) เข้าใกล้ 1 โดยค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน eugenol ในช่วงความเข้มข้น 0.001 – 0.005 %v/v มีค่าสมการถดถอยเชิงเส้น $y = 216.42x + 0.0276$ ($R^2 = 0.9993$) ทั้งนี้กราฟมาตรฐานจึงมีความถูกต้องแม่นยำและน่าเชื่อถือ โดยในการศึกษาความคงสภาพทางเคมีและประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยในไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน จากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงของความเข้มข้นในการวิเคราะห์ (linearity and range) จากกราฟมาตรฐาน ดังแสดงตามภาพประกอบที่ 13 A และความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่ห่วยกับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน eugenol (%v/v) ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 284.4 นาโนเมตร มีค่าสมการถดถอยเชิงเส้น $y = 0.4261x - 0.0002$ ($R^2 = 0.9997$) ดังตามภาพประกอบที่ 13 B



ภาพประกอบ 13 (A) กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน eugenol กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 284.4 นาโนเมตร (B) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่ห่วยกับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน eugenol (%v/v) ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 284.4 นาโนเมตร

4.2 ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy)

การศึกษาความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (accuracy) ด้วยวิธี standard addition method โดยเติมสารมาตรฐาน eugenol (spiked sample) ที่มีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 0.0005, 0.001 และ 0.0015 %v/v ลงในตัวอย่างที่มี eugenol ความเข้มข้น 0.001 %v/v พบว่า ร้อยละการคืนกลับเฉลี่ย (% recovery) อยู่ระหว่าง 103.27 – 109.05 และ %RSD อยู่ระหว่าง 0.00 – 0.33 ซึ่งจากการศึกษาร้อยละการคืนกลับของ eugenol ค่าร้อยละความคลาดเคลื่อนที่ความเข้มข้นต่างระดับมีค่าต่ำ ซึ่งการวิเคราะห์นี้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้จึงชี้ให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์

ตาราง 6 ร้อยละการคืนกลับของวิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV-Visible Spectrophotometer

Excess of eugenol added (%)	Recovery \pm SD (%)	% RSD of recovery
50	109.05 \pm 0.36	0.33
100	103.35 \pm 0.13	0.12
150	103.27 \pm 0.00	0.00

4.3 ผลการศึกษาความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ (precision)

ความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ประเมินจากการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน (intraday precision) และ การวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน (interday precision) ซึ่งจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน eugenol ที่ช่วงความเข้มข้น 0.001 – 0.005 %v/v พบว่า % RSD อยู่ระหว่าง 1.11 – 1.72 ของความแม่นยำที่วิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกันและการวิเคราะห์ซ้ำต่างวัน ค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ มีค่า % RSD ต่ำกว่าร้อยละ 2 ดังนั้นการวิเคราะห์นี้จึงมีความถูกต้องแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณ eugenol ซึ่งความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ดังแสดงตามตารางที่ 7

ตาราง 7 ความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ eugenol ด้วยเทคนิค UV-Visible spectrophotometry

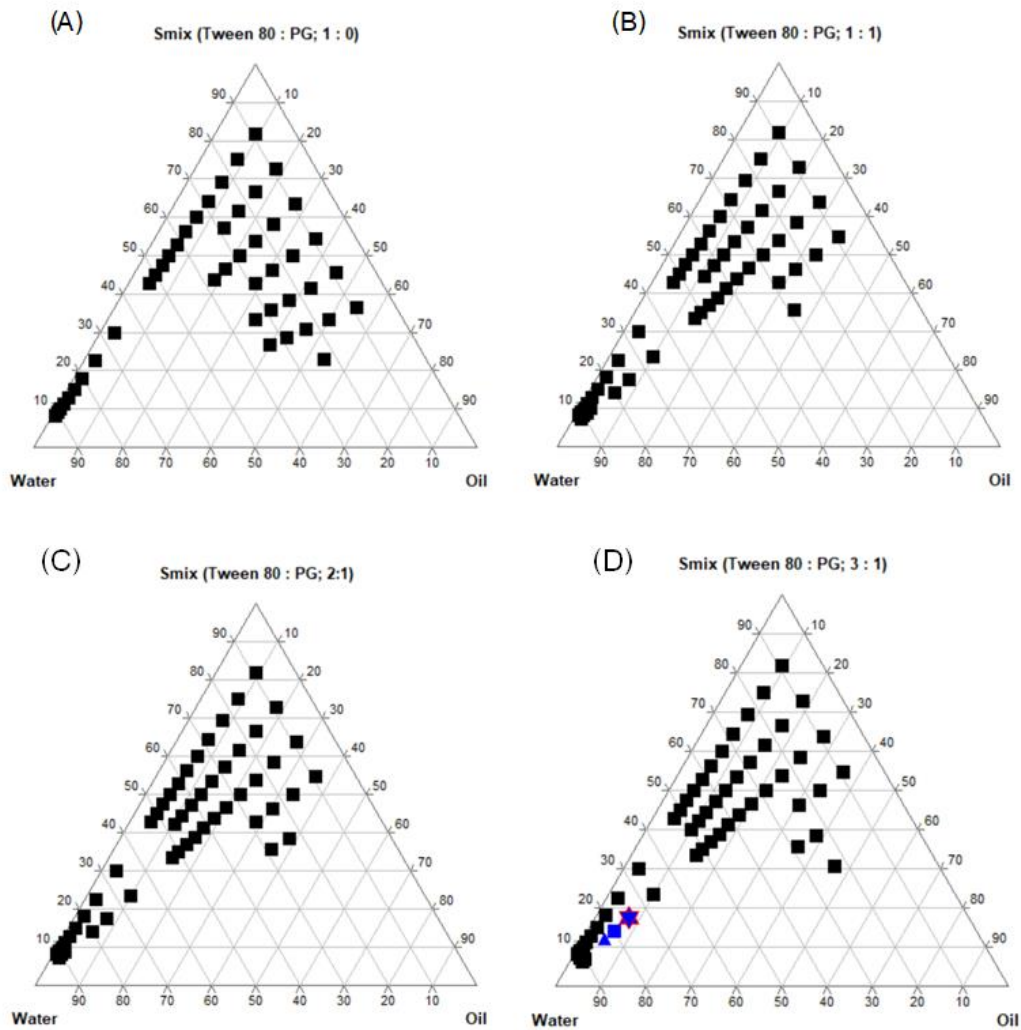
Eugenol (%v/v)	Intraday precision (n=3)		Interday precision (n=3)	
	Mean \pm SD (%v/v)	% RSD	Mean \pm SD (%v/v)	% RSD
0.001	0.00118 \pm 0.00001	1.19	0.00117 \pm 0.00001	1.11
0.002	0.00214 \pm 0.00003	1.61	0.00216 \pm 0.00003	1.60
0.003	0.00374 \pm 0.00002	0.58	0.00365 \pm 0.00005	1.57
0.004	0.00468 \pm 0.00005	1.10	0.00460 \pm 0.00008	1.72
0.005	0.00523 \pm 0.00006	1.06	0.00568 \pm 0.00007	1.25

4.4 ผลการศึกษาความไวของวิธีการวิเคราะห์ (sensitivity)

จากการศึกษาความไวของวิธีการวิเคราะห์ได้จาก ค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) และค่าความเข้มข้นของสารต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ (limit of quantification; LOQ) ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ตามเกณฑ์ของ AOAC/ICH โดยพบว่า ความไวของวิธีวิเคราะห์นี้มีค่า LOD เท่ากับ 1.05×10^{-4} %v/v และ LOQ เท่ากับ 3.17×10^{-4} %v/v

5. ผลไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมโดยวิธีการไตเตรท (titration method)

จากการเตรียมไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระด้วยวิธีไตเตรท (titration method) ผู้วิจัยเลือกใช้สารลดแรงตึงผิว คือ Tween[®] 80 และสารลดแรงตึงผิวร่วม คือ propylene glycol (PG) ในอัตราส่วน 1:0, 1:1, 2:1 และ 3:1 (%v/v) ทำให้เกิดไมโครอิมัลชันบริเวณกว้างบนแผนภาพวิภูภาคไตรภาคเทียม (pseudoternary phase diagram) ซึ่งอัตราส่วนของ Tween[®] 80 ต่อ propylene glycol เท่ากับ (1:0) และ (3:1) ให้พื้นที่เป็นไมโครอิมัลชันบริเวณกว้างที่สุดตามลำดับ ดังแสดงตามภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 บริเวณเกิดไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่ห่วย่าแผนภูมิภาคไตรภาค-
 เทียมในอัตราส่วน Tween[®] 80 : propylene glycol 1:0 (A), 1:1 (B), 2:1 (C) และ 3:1 (D),
 สัญลักษณ์รูปดาว (7.5% oil, 17.5 % Smix), สัญลักษณ์รูปสี่เหลี่ยม (6 % oil, 14 % Smix),
 สัญลักษณ์รูปสามเหลี่ยม (5% oil, 11.67 % Smix)

ผลจากการศึกษาองค์ประกอบหรืออัตราส่วนของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ซึ่งสารลดแรงตึงผิวผสมในอัตราส่วนของ Tween[®] 80 : propylene glycol เท่ากับ (1:0) และ (3:1) เกิดพื้นที่ไมโครอิมัลชันบริเวณกว้างที่สุดตามลำดับ ผู้วิจัยจึงเลือกสูตรที่มีอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวผสมของ Tween[®] 80 : propylene glycol (3:1) โดยอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมดังกล่าวเกิดพื้นที่ไมโครอิมัลชันกว้างที่สุด และประกอบไปด้วยทั้ง 3 ภูมิภาค ได้แก่ ภูมิภาคน้ำมัน ภูมิภาคน้ำ และของผสมสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวม ทั้งนี้ผู้วิจัยเลือกสูตรที่สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระได้สูงและมีสารลดแรงตึงผิวผสมไม่เกินร้อยละ 20 มีขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาคอย่างเหมาะสม ซึ่งได้ทำการเลือก 3 สูตรจากสูตรที่มีอัตราส่วนสารลดแรงตึงผิวผสมของ Tween[®] 80 : propylene glycol (3:1) ดังนี้คือ สูตรที่ 1 สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ (ร้อยละ 7.5) และมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวผสม (ร้อยละ 17.5) แสดงตามภาพประกอบ 14(D) ที่ใช้สัญลักษณ์แทนรูปดาว สูตรที่ 2 สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ (ร้อยละ 6) และมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวผสม (ร้อยละ 14) แสดงตามภาพประกอบ 14(D) ที่ใช้สัญลักษณ์แทนรูปสี่เหลี่ยมสีน้ำเงิน และสูตรที่ 3 สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ (ร้อยละ 5) และมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวผสม (ร้อยละ 11.67) แสดงตามภาพประกอบ 14(D) ที่ใช้สัญลักษณ์แทนรูปสี่เหลี่ยมสามเหลี่ยม แสดงค่าขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค ดังตารางที่ 8 ดังนั้นจึงได้เลือกสูตรที่ 1 สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ (ร้อยละ 7.5) และมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวผสม (ร้อยละ 17.5) ลักษณะภายนอกโปร่งแสง มีค่าขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาคที่เหมาะสม

ตาราง 8 ค่าขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาค ของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ในอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสม คือ Tween[®] 80 : propylene glycol (3:1)

Formulations	<i>O. gratissimum</i> Leaf oil (%)	Smix (%)	Hydrodynamic diameter (nm) [Mean ± SD]	Polydisoersity index [Mean ± SD]
1	7.5	17.5	103.8 ± 1.15 ^a	0.214 ± 0.004 ^a
2	6	14	202.9 ± 19.60 ^b	0.370 ± 0.028 ^a
3	5	11.67	145.43 ± 5.50 ^a	0.459 ± 0.015 ^b

หมายเหตุ Smix = Tween[®] 80 : propylene glycol เท่ากับ (3:1)

a, b = One-way analysis of variance



ภาพประกอบ 15 แสดงลักษณะภายนอกของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมเสร็จทันที

5.1 ผลความคงสภาพทางกายภาพของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

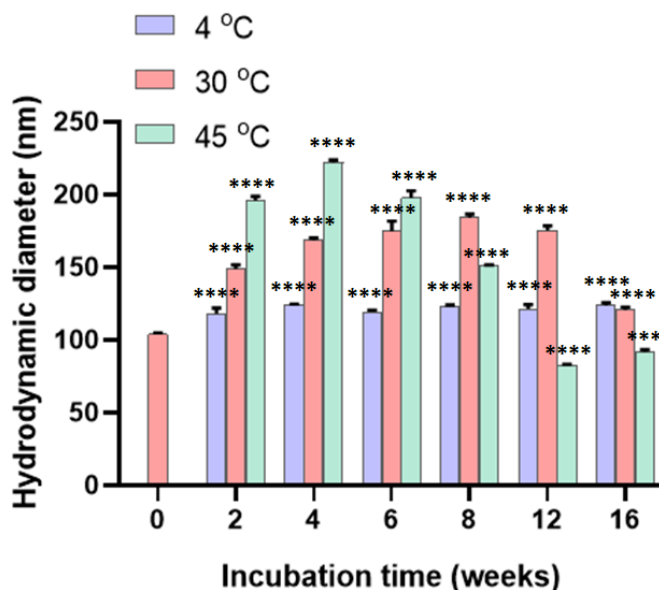
จากการเตรียมไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ เลือกสูตรที่ 1 สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ (ร้อยละ 7.5) และมีปริมาณสารลดแรงตึงผิวผสม (ร้อยละ 17.5) ลักษณะภายนอกสีขาวโปร่งแสง มีค่าขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาคที่เหมาะสมเพื่อศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ โดยเก็บไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาคและประจุพื้นผิวของอนุภาคหลังจากเตรียมเสร็จทันที ที่ช่วงเวลาผ่านไป 2, 4, 6, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ ดังแสดงในตารางที่ 9



ตาราง 9 ค่าขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค และประจุพื้นผิวของอนุภาคของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระฯ หลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ที่แต่ละช่วงเวลา

Microemulsion	Temperature	Hydrodynamic	Polydisoersity	Zeta potential (mV)
		diameter (nm) [Mean ± SD]	index [Mean ± SD]	[Mean ± SD]
Freash	30 °C	103.800 ± 1.153	0.214 ± 0.004	-6.697 ± 0.231
	4 °C	117.933 ± 4.038 ^d	0.168 ± 0.005	-6.323 ± 0.297
2 weeks	30 °C	148.600 ± 2.960 ^d	0.211 ± 0.005	-3.593 ± 0.067 ^d
	45 °C	195.933 ± 2.902 ^d	0.346 ± 0.012 ^d	-5.487 ± 0.431 ^d
4 weeks	4 °C	124.033 ± 0.751 ^d	0.146 ± 0.012 ^d	-6.307 ± 0.176 ^d
	30 °C	168.500 ± 1.609 ^d	0.287 ± 0.013 ^d	-4.847 ± 0.157 ^d
	45 °C	222.267 ± 1.528 ^d	0.471 ± 0.035 ^d	-4.380 ± 0.100 ^d
6 weeks	4 °C	119.267 ± 1.206 ^d	0.169 ± 0.008 ^a	-5.740 ± 0.281 ^d
	30 °C	174.633 ± 7.182 ^d	0.348 ± 0.001 ^d	-4.567 ± 0.270 ^d
	45 °C	197.867 ± 4.737 ^d	0.515 ± 0.012 ^d	-3.820 ± 0.072 ^d
8 weeks	4 °C	123.467 ± 0.603 ^d	0.162 ± 0.018 ^b	-5.793 ± 0.134 ^d
	30 °C	184.367 ± 2.272 ^d	0.345 ± 0.001 ^d	-4.353 ± 0.071 ^d
	45 °C	150.800 ± 0.854 ^d	0.510 ± 0.010 ^d	-3.193 ± 0.055 ^d
12 weeks	4 °C	121.433 ± 2.914 ^d	0.151 ± 0.007 ^c	-5.793 ± 0.121 ^b
	30 °C	175.233 ± 3.287 ^d	0.448 ± 0.031 ^d	-4.173 ± 0.231 ^d
	45 °C	82.323 ± 0.967 ^d	0.229 ± 0.002	-1.973 ± 0.021 ^d
16 weeks	4 °C	123.900 ± 1.652 ^d	0.174 ± 0.003	-4.537 ± 0.117 ^d
	30 °C	120.567 ± 2.013 ^d	0.471 ± 0.019 ^d	-4.063 ± 0.025 ^d
	45 °C	91.790 ± 1.456 ^c	0.262 ± 0.004 ^a	-1.553 ± 0.093 ^d

จากการประเมินความคงสภาพทางกายภาพ เมื่อเก็บไมโครอิมัลชันจากน้ำมันหอมระเหย จากไบบีหฺร่า ที่สภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ที่ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 16 สัปดาห์ มีค่า pH อยู่ระหว่าง 7-8 ไม่แตกต่างจากไมโครอิมัลชันหลังเตรียมเสร็จทันที ซึ่งไมโครอิมัลชันจาก น้ำมันหอมระเหยจากไบบีหฺร่าหลังจากเตรียมเสร็จทันที มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย (hydrodynamic diameter) เท่ากับ 103.80 ± 1.15 nm เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 16 สัปดาห์ มีความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับ หลังเตรียมเสร็จทันที โดยขนาดอนุภาคมีขนาดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ขนาดอนุภาค แต่ยังคงอยู่ในช่วง 100 – 200 nm ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ ลักษณะภายนอกมีสีขาวโปร่งแสง และจากรายงานของ Mori Cortes และคณะ (2019) ไมโครอิมัลชันของ fish oil มีลักษณะภายนอกโปร่งใส มีขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค มีความเสถียรทางความร้อนได้ดีในระหว่างการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่ามีขนาดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่าง เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจึงมีความคงสภาพทางกายภาพสูง (Mori Cortés, Califano, & Lorenzo, 2019) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ขนาดอนุภาคมีขนาดที่ใหญ่ขึ้นและเมื่อหลังจาก 4 สัปดาห์ขนาดอนุภาคมีขนาดที่เล็กลง ซึ่งจากการสังเกตด้วยตาเปล่าลักษณะภายนอกของ ไมโครอิมัลชัน เมื่อผ่านไป 4 สัปดาห์เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีเหลืองอาจเกิดจากการสลายตัวของน้ำมันจนเหลือเพียงสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ทำให้มีขนาดอนุภาคเล็กลง ซึ่งอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ก็เช่นเดียวกัน โดยที่อุณหภูมิสูงขึ้นส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยามีผล ต่อขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนขนาดอนุภาคตามสภาวะของปฏิกิริยา เช่น ความเข้มข้น อุณหภูมิ ประเภทของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ เป็นต้น (Chaudhary et al., 2021; Sánchez, Sánchez, Falcone, & Ritacco, 2021) แสดงผลระยะเวลาการเก็บไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอม ระเหยจากไบบีหฺร่าต่อขนาดอนุภาค hydrodynamic diameter (nm) ดังภาพประกอบที่ 16



ภาพประกอบ 16 ผลระยะเวลากการเก็บไมโครมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อขนาดอนุภาค hydrodynamic diameter (nm)

หมายเหตุ * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

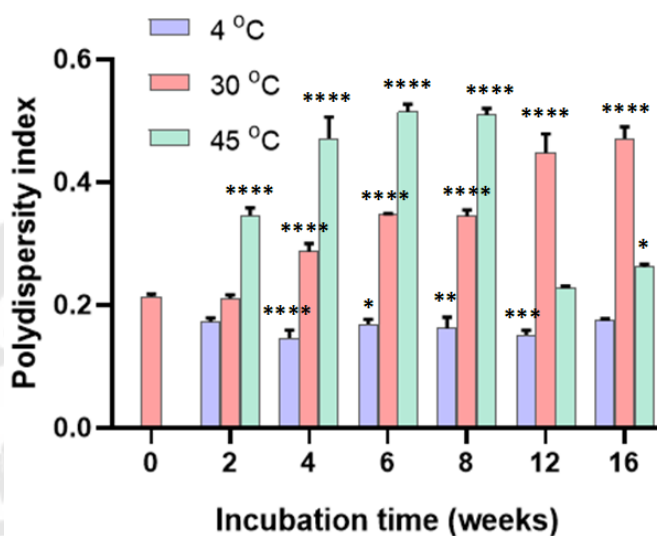
** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

*** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

**** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

พิจารณาผลความคงสภาพทางกายภาพของการกระจายของขนาดอนุภาค (polydispersity index) นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมเสร็จทันที มีค่าการกระจายตัวของอนุภาคเฉลี่ย เท่ากับ 0.214 ± 0.004 ที่เวลาผ่านไป 2 และ 16 สัปดาห์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่า PDI มีค่าการเปลี่ยนแปลงที่แคบไม่มีความแตกต่าง ที่เวลาผ่านไป 16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส การกระจายของขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นสูง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมเสร็จทันที ทั้งนี้ค่าการกระจายของขนาดอนุภาค บ่งบอกถึงความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาค (Golmohammadzadeh, Farhadian, Biriace, Dehghani, & Khameneh, 2017)

โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลต่อค่าการกระจายของขนาดอนุภาคที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นผลมาจากการหลอมรวม รวมตัวหรือเกิดการเกาะกลุ่มของอนุภาค (Cheong, Tan, & Nyam, 2017) แสดงผลระยะเวลาการเก็บไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ้าต่อค่าการกระจายของขนาดอนุภาค (polydispersity index; Pdl) ดังภาพประกอบที่ 17



ภาพประกอบ 17 ผลของระยะเวลาการเก็บไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ้าต่อค่าการกระจายของขนาดอนุภาค (polydispersity index)

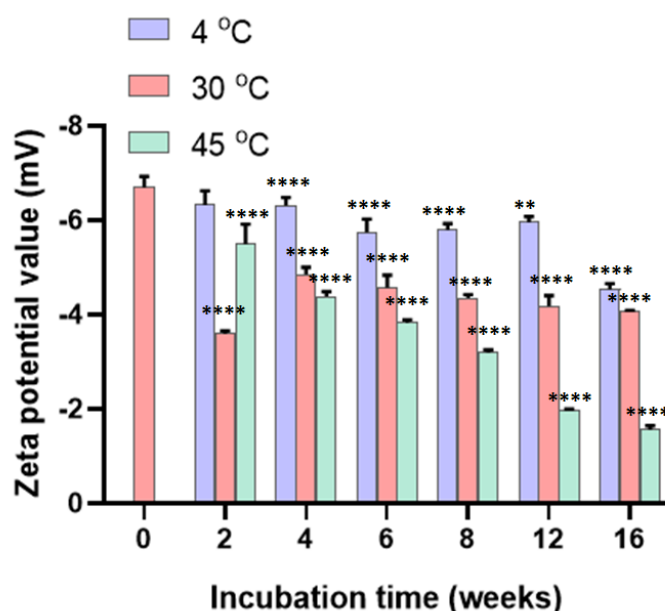
หมายเหตุ * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

*** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

**** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

พิจารณาผลความคงสภาพทางกายภาพของค่าประจุบนผิวของอนุภาค ไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่แต่ละช่วงเวลา (zeta potential) เท่ากับ -6.697 ± 0.231 ที่เวลาผ่านไปจนครบ 16 สัปดาห์ และที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ความเปลี่ยนแปลงของค่าประจุบนผิวของอนุภาคลดลง อยู่ในช่วงระหว่าง -1.55 ถึง -6.69 และเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ค่าประจุบนผิวของอนุภาคมาจากกลุ่มไฮดรอกซิล (OH^-) ของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมโดยมีอะตอมออกซิเจนที่มีอิเล็กโตรเนกาติวิตี (electronegativity) สูง (Golmohammadzadeh et al., 2017) ที่อุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลต่อค่าประจุบนผิวของอนุภาคมีขนาดลดลง เกิดจากแรงดึงดูดกันมีแนวโน้มว่าส่วนผสมจะจับตัวเป็นก้อนซึ่งค่าประจุบนผิวของอนุภาค -30 mV ถึง $+30$ mV บ่งบอกถึงความเสถียรทางกายภาพที่ดีของสารแขวนลอยเนื่องจากการผลักไฟฟ้าสถิตของอนุภาคแต่ละตัว ส่งผลต่อแรงผลักที่เพียงพอเพื่อให้มีความคงตัวคอลลอยด์ทางกายภาพที่ดีขึ้น ถือว่าเหมาะสมที่สุดสำหรับการรักษาเสถียรภาพที่ดีของการกระจายตัว (Joseph & Singhvi, 2019; Samimi, Maghsoudnia, Eftekhari, & Dorkoosh, 2019) แสดงผลระยะเวลาการเก็บไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อค่าประจุบนผิวของอนุภาค (zeta potential) ดังภาพประกอบที่ 18



ภาพประกอบ 18 แสดงผลระยะเวลาการเก็บไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อค่าประจุบนผิวของอนุภาค (zeta potential)

หมายเหตุ * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

*** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

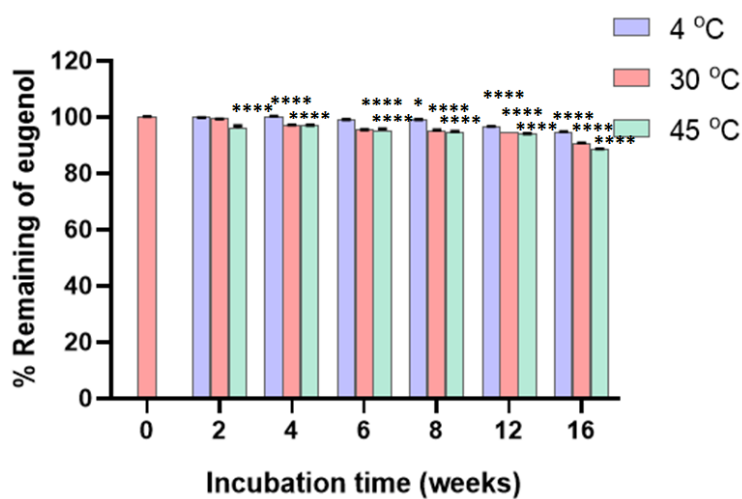
**** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

5.2 ผลความคงสภาพทางเคมีของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

ความคงสภาพทางเคมีของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ จากการตรวจสอบปริมาณ eugenol ที่คงเหลือในไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ หลังเตรียมเสร็จและเมื่อช่วงเวลาผ่านไป 2, 4, 6, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ ซึ่งเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ไมโครอิมัลชันที่เตรียมได้มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ 7.5 % v/v โดยร้อยละคงเหลือของสารสำคัญ eugenol เริ่มต้นเฉลี่ย เท่ากับ 100.00 ± 0.22 ที่สภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ แต่ละช่วงเวลา 2, 4, 6, 8, 12, และ 16 สัปดาห์ เนื่องจากค่า error bar มีค่าที่แคบ เมื่อมีค่าที่โดดเด่นส่งผลต่อค่า significant เมื่อเวลาผ่านไป 16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ร้อยละคงเหลือของสารสำคัญ eugenol มีแนวโน้มลดลงกว่าที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส โดยมีผลมาจากปัจจัยด้านอุณหภูมิความร้อน ซึ่งร้อยละคงเหลือปริมาณสารสำคัญ eugenol ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 10 ทั้งนี้ระบบไมโครอิมัลชันจึงมีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญได้ดีและช่วยลดการ เกิดออกซิเดชันลดลงเมื่อเทียบกับน้ำมัน ลดการเปลี่ยนแปลงของสารสำคัญเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน (Cortés et al., 2019) นอกจากนี้ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีมีความสัมพันธ์กับสีของน้ำมันหอมระเหยซึ่งสีและองค์ประกอบทางเคมีสามารถเปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการเสื่อมสภาพทางความร้อน (thermal degradation) การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation), ไอโซเมอไรเซชัน (isomerization), ดีไฮโดรจีเนชัน (dehydrogenation) และโพลีเมอไรเซชัน (polymerization) (Tangpao et al., 2018)

ตาราง 10 ผลร้อยละปริมาณคงเหลือของสารสำคัญ eugenol ในไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากไบบี่หว่าหลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ที่แต่ละช่วงเวลา

Microemulsion	Temperature	% Remaining \pm SD
Fresh	30 °C	100.00 \pm 0.22
	4 °C	99.83 \pm 0.07
2 weeks	30 °C	99.33 \pm 0.05
	45 °C	96.19 \pm 0.80 ^d
4 weeks	4 °C	99.91 \pm 0.47 ^d
	30 °C	97.06 \pm 0.24 ^d
6 weeks	45 °C	96.91 \pm 0.18
	4 °C	99.11 \pm 0.05
8 weeks	30 °C	95.46 \pm 0.06 ^d
	45 °C	95.20 \pm 0.69 ^d
12 weeks	4 °C	98.92 \pm 0.27 ^a
	30 °C	95.26 \pm 0.16 ^d
16 weeks	45 °C	94.62 \pm 0.28 ^d
	4 °C	96.61 \pm 0.17 ^d
20 weeks	30 °C	94.46 \pm 0.02 ^d
	45 °C	94.02 \pm 0.12 ^d
24 weeks	4 °C	94.49 \pm 0.37 ^d
	30 °C	90.48 \pm 0.32 ^d
28 weeks	45 °C	88.59 \pm 0.18 ^d
	4 °C	94.49 \pm 0.37 ^d



ภาพประกอบ 19 ผลของระยะเวลาการเก็บไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่ห่วยต่อร้อยละคงเหลือปริมาณสารสำคัญ eugenol ในไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่ห่วย ตั้งแต่เตรียมเสร็จทันที ที่เวลา 2, 4, 6, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

*** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

**** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

6. ผลนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมด้วยวิธี phase inversion composition (PIC)

ผลการเตรียมนาโนอิมัลชันจากน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมได้ทั้ง 4 สูตร โดยมีสารลดแรงตึงผิวคือ Tween[®] 80 และสารช่วยเพิ่มความหนืด 1% hyaluronic acid และ 10% Poloxamer 188 ปรับอัตราส่วนต่างๆ ผลแสดงดังตารางที่ 11 ซึ่งพบว่า อนุภาคนาโนอิมัลชันที่เตรียมเสร็จมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 87 – 106 nm ค่าการกระจายตัวของอนุภาคอยู่ในช่วง 0.303 – 0.586 และค่าประจุบนผิวของอนุภาค มีค่าอยู่ที่ 0 อยู่ในช่วง -0.562 – 0.139 mV ซึ่งการใช้ 10% Poloxamer 188 ไม่มีผลต่อระบบนาโนอิมัลชัน ไม่ส่งผลการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค และค่าประจุบนผิวของอนุภาค และการเพิ่มความเข้มข้นของ 1% hyaluronic acid ส่งผลให้ขนาดอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ส่งผลกระทบต่อการกระจายของอนุภาคที่ดีขึ้น (Chittasupho, Posritong, & Ariyawong, 2019) สำหรับสูตรที่ 4 ซึ่งประกอบไปด้วย Tween[®] 80 และสารเพิ่มความหนืด 1% hyaluronic acid ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป ส่งผลต่อการกระจายตัวของอนุภาคที่ดี ซึ่งนาโนอิมัลชันที่ถูกห่อหุ้มด้วย hyaluronic acid ช่วยเพิ่มความชอบน้ำ ความมีขั้วที่ผิวของนาโนอิมัลชัน ส่งผลต่อความคงสภาพทางกายภาพของนาโนอิมัลชัน และช่วยเพิ่มความยืดเกาะบนผิวหนังได้ดี และเนื่องจาก hyaluronic acid มีหมู่ฟังก์ชัน กรดคาบออกซิลิก (carboxylic acid function groups) ประจุเป็นลบ (Chittasupho et al., 2019; Kleinubing et al., 2021) ส่งผลต่อสูตรที่ 4 มีค่าประจุบนผิวของอนุภาคของ นาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระเป็นประจุลบ จากการพิจารณาลักษณะทางกายภาพดังกล่าว สูตรที่ 4 มีกลิ่นเฉพาะตัว ลักษณะภายนอกเป็นของเหลว โปร่งแสง ดังแสดงในภาพประกอบที่ 20 มีความเหมาะสมต่อการศึกษาการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย การประเมินความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมี ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน

ตาราง 11 ค่าขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค และค่าประจุบนผิวของอนุภาคของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระห์หลังเตรียมเสร็จทันที

Formulation	Hydrodynamic diameter (nm)	Polydisoersity index	Zeta potential value (mV)
	[Mean \pm SD]	[Mean \pm SD]	[Mean \pm SD]
1	105.13 \pm 2.89	0.488 \pm 0.027	0.128 \pm 0.753
2	67.68 \pm 6.37	0.586 \pm 0.027	0.112 \pm 0.314
3	89.51 \pm 2.11	0.523 \pm 0.021	0.139 \pm 0.571
4	106.40 \pm 3.32	0.303 \pm 0.009	-0.562 \pm 0.158



ภาพประกอบ 20 แสดงลักษณะภายนอกของนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระห์ที่เตรียมเสร็จทันที

6.1 ผลความคงสภาพทางกายภาพนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมด้วยวิธี phase inversion composition สูตรที่ 4 นำมาศึกษาความคงสภาพทางกายภาพโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาคและประจุบนผิวของอนุภาค หลังจากเตรียมเสร็จทันที และที่ช่วงเวลาผ่านไป 7, 14, 21 และ 28 วัน ดังแสดงในตารางที่ 12

ตาราง 12 ค่าขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค และประจุบนผิวของอนุภาคของนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ หลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ที่แต่ละช่วงเวลา

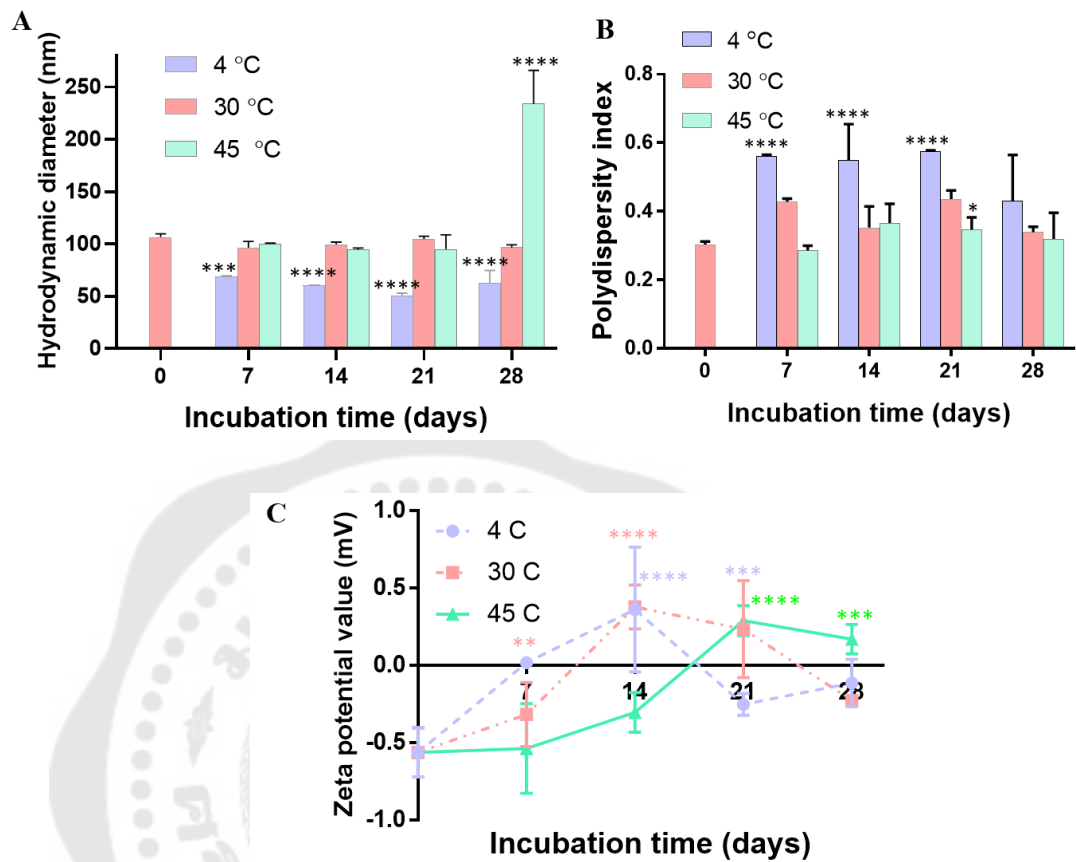
Nanoemulsion	Temperature	Hydrodynamic diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
		[Mean ± SD]	[Mean ± SD]	[Mean ± SD]
Fresh	30 °C	106.400 ± 3.318	0.303 ± 0.009	-0.562 ± 0.158
	4 °C	68.887 ± 0.700 ^c	0.560 ± 0.005 ^d	0.018 ± 0.005
7 days	30 °C	96.497 ± 6.154	0.428 ± 0.008	-0.317 ± 0.207
	45 °C	100.533 ± 0.379	0.286 ± 0.014	-0.341 ± 0.459
14 days	4 °C	60.34 ± 0.509 ^d	0.612 ± 0.005 ^d	0.360 ± 0.404 ^d
	30 °C	99.477 ± 2.473	0.352 ± 0.062	0.378 ± 0.142 ^d
	45 °C	94.667 ± 1.558	0.366 ± 0.055	-0.170 ± 0.145
21 days	4 °C	50.637 ± 2.333 ^d	0.574 ± 0.004 ^d	-0.253 ± 0.070 ^c
	30 °C	104.467 ± 2.948	0.436 ± 0.025	0.235 ± 0.315
	45 °C	94.973 ± 13.822	0.344 ± 0.032 ^a	0.045 ± 0.364 ^d
28 days	4 °C	62.590 ± 12.204 ^d	0.489 ± 0.117	-0.114 ± 0.154
	30 °C	96.763 ± 2.543	0.339 ± 0.016	-0.228 ± 0.025
	45 °C	233.930 ± 31.968 ^d	0.332 ± 0.023	0.059 ± 0.131 ^c

จากการพิจารณานาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ โดยทำการประเมิน ความสภาพทางกายภาพซึ่งวัดขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค และค่าประจุนผิวของ อนุภาคที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่า นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมเสร็จทันที มีขนาดอนุภาคเฉลี่ย เท่ากับ 106.40 ± 3.32 nm เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ขนาดอนุภาค เกิดการเปลี่ยนแปลงมีขนาดเล็กลงซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที โดยขนาดอนุภาคที่เล็กลงอาจเป็นผลมาจากความหนาแน่นของน้ำมันหอมระเหยที่ลดลงอาจได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิที่ต่ำลง (Porter & Lammerink, 1994) ในขณะที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส ที่ช่วงเวลาที่ 28 วัน เกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที โดยขนาดอนุภาคมีแนวโน้มใหญ่ขึ้นอาจเกิดจากการรวมตัวกันของอนุภาคจากการตกตะกอน จากปรากฏการณ์ Ostwald ripening ซึ่งเกิดขึ้นจากความแตกต่างของความสามารถในการละลายระหว่างหยดที่มีขนาดต่างกัน แต่ไม่เกิดการแยกชั้น (Kale & Deore, 2017; Clements, 2012) และสามารถป้องกันได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของ สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในระบบ ซึ่งการเพิ่มสารลดแรงตึงผิวทั้งที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำสามารถช่วยให้ นาโนอิมัลชันมีเสถียรขึ้นได้ (Chuacharoen, Prasongsuk, & Sabliov, 2019) โดยการเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีขนาดที่เล็กลง แต่ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับนาโนอิมัลชันของ น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมเสร็จทันที อาจเป็นผลมาจากความหนาแน่นของน้ำมันหอมระเหยที่ลดลง ซึ่งได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิที่ต่ำกว่า (Porter & Lammerink, 1994) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจึงมีความเหมาะสมในการเก็บรักษานาโนอิมัลชัน (Kwon, Kong, Cho, & Park, 2014; Ontao, Athikomkulchai, Tadtong, Leesawat, & Chittasupho, 2021) ดัง ภาพประกอบที่ 21(A) และมีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้รักษาผิวต่อไป

พิจารณาผลความคงสภาพทางกายภาพของการกระจายตัวของอนุภาค นาโนอิมัลชันของ น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมเสร็จทันที มีค่าการกระจายตัวของอนุภาคเฉลี่ย เท่ากับ 0.303 ± 0.009 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนครบ 28 วัน ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เตรียมเสร็จทันที เมื่อเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 7, 14 และ 21 วัน มีการกระจายของขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที ทั้งนี้ค่าการกระจายขนาดอนุภาค (polydispersity index) ของนาโนอิมัลชันที่เก็บไว้ภายในช่วงเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศา-

เซลเซียส มีแนวโน้มการกระจายของขนาดอนุภาคเล็กลงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมีขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นแต่ค่าการกระจายของอนุภาคเล็กลงอาจเกิดจากการเคลื่อนที่เกาะกลุ่มกันของอนุภาคเล็ก ๆ เกาะกันแบบ หลวม ๆ (agglomeration หรือ flocculation) การกระจายตัวของอนุภาคจึงต่ำ (McClements, 2012) ซึ่งค่าการกระจายของขนาดอนุภาคต่ำจะแสดงถึงการกระจายขนาดแคบ บ่งบอกถึงความสม่ำเสมอของขนาดอนุภาค ซึ่งค่าการกระจายของขนาดอนุภาคควรมีค่าไม่เกิน 0.3 (Garzoli, Petralito, Ovidi, Turchetti, Masci, et al., 2020) และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บไว้ที่ 28 วัน ขนาดอนุภาคและการกระจายของอนุภาคแนวโน้มไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาผ่านไป ดังภาพประกอบที่ 21(B)

พิจารณาผลความคงสภาพทางกายภาพของค่าประจุบนผิวของอนุภาคนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่เมื่อเวลาผ่านไป 28 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 28 วัน ทุกอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งค่าประจุบนผิวของอนุภาคอยู่ในช่วง -1 ถึง +1 ไม่มีผลกระทบต่อคุณสมบัติอื่นๆ ซึ่งประจุบนผิวของอนุภาคช่วง -30 mV ถึง +30 mV ซึ่งจะมีพลังงานอิสระที่ผิวสูงมาก จะเกิดการผลัดกันของอนุภาค ส่งผลต่อโอกาสการเข้าร่วมตัวกันน้อย มีแนวโน้มต่อการกระจายตัวต่ำ ขนาดอนุภาคคงที่และสม่ำเสมอ (Kale & Deore, 2017; Poomanee, Khunkitti, Chaiyana, & Leelapornpisid, 2020b) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิ 4 และ 45 องศาเซลเซียส ของค่าขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของขนาดอนุภาค และค่าประจุบนผิวของอนุภาค ที่อุณหภูมิดังกล่าว อาจมีผลมาจากระบบนาโนอิมัลชันไม่มีความคงสภาพทางอุณหพลศาสตร์ แต่ระบบนาโนอิมัลชันมีความคงสภาพทางจลนพลศาสตร์ที่สูง ไม่เกิดการแยกชั้น (Kale & Deore, 2017; Clements, 2012) ดังภาพประกอบที่ 21(C)



ภาพประกอบ 21 (A) ผลของระยะเวลาการเก็บนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระห่าต่อค่าขนาดอนุภาค (size) (B) ผลของระยะเวลาการเก็บนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระห่า ต่อค่าการกระจายของขนาดอนุภาค (polydispersity index) (C) ผลของระยะเวลาการเก็บนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระห่าต่อค่าประจุบนผิวของอนุภาค (zeta potential) ตั้งแต่เตรียมเสร็จทันที ที่เวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

*** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

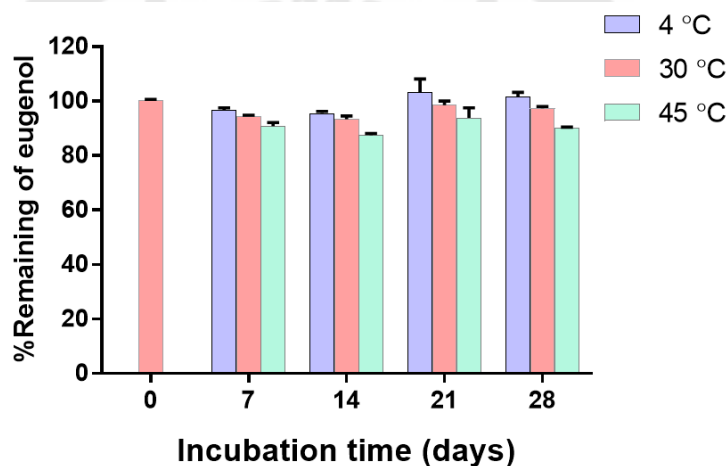
**** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

6.2 ผลความคงสภาพทางเคมีของนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

การศึกษาความคงสภาพทางเคมีของนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ โดยวิเคราะห์ร้อยละคงเหลือสารสำคัญ eugenol ในน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่ถูกกักเก็บในนาโนอิมัลชัน ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน ซึ่งนาโนอิมัลชันที่เตรียมได้มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ความเข้มข้น 1 %v/v และมีปริมาณ eugenol 0.4513 %v/v ในสูตร โดยมีร้อยละคงเหลือปริมาณสารสำคัญ eugenol เริ่มต้นเฉลี่ย เท่ากับ 100.00 ± 0.23 ที่สภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ แต่ช่วงเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน เมื่อเวลาผ่านไป 28 วัน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ร้อยละคงเหลือของสารสำคัญ อยู่ในช่วง 87-94 % ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ร้อยละคงเหลือของสารสำคัญ มากกว่า 93 % ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมีแนวโน้มลดลงกว่า 4 และ 30 องศาเซลเซียส โดยมีผลมาจากปัจจัยด้านอุณหภูมิ ความร้อน แสง และออกซิเจนถือเป็นผลกระทบสำคัญต่อความคงตัวของนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งที่อุณหภูมิสูงขึ้น การสลายตัวของยูจีนอลในน้ำมันหอมระเหยอยู่ในสภาวะเร่ง เนื่องจากอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นและกระตุ้นการก่อตัวของอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น (Turek & Stintzing, 2013) ซึ่งร้อยละคงเหลือปริมาณสารสำคัญ eugenol ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ และที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียสไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 13 ดังนั้นระบบนาโนอิมัลชันมีประสิทธิภาพในการกักเก็บสารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ได้ดีเมื่อเทียบกับการอยู่ในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหย (Garzoli, Petralito, Ovidi, Turchetti, Masci, et al., 2020) นอกจากนี้ เมื่อเวลาผ่านไป 21 วัน ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส %remaining of eugenol มีค่าเกิน หนึ่งร้อย อาจเกิดจากมีสารตัวอื่นที่มีค่าการดูดกลืนใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนของ eugenol (Harris, 2010; Perkampus, 2013) ดังนั้นควรเก็บรักษานาโนอิมัลชัน ไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C เพื่อความคงสภาพทางกายภาพและเคมีที่ดี

ตาราง 13 ผลร้อยละปริมาณคงเหลือของสารสำคัญ eugenol ในนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระหลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ที่แต่ละช่วงเวลา

Temperature	% Remaining of eugenol (Mean \pm SD)				
	Freash	7 days	14 days	21 days	28 days
4 °C	-	96.23 \pm 0.93	95.17 \pm 0.68	105.92 \pm 3.89	101.17 \pm 1.62
30 °C	100.00 \pm 0.23	93.90 \pm 0.53	92.93 \pm 1.20	105.96 \pm 6.18	96.92 \pm 0.74
45 °C	-	90.43 \pm 1.28	87.08 \pm 0.70	93.45 \pm 3.63	89.87 \pm 0.19



ภาพประกอบ 22 ผลของระยะเวลาการเก็บนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อ ร้อยละคงเหลือปริมาณสารสำคัญ eugenol ในนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ที่เตรียมเสร็จทันที ที่เวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส

7. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิวของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระด้วยวิธี agar well diffusion

7.1 ผลการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว *C. acnes*

เนื่องจากยังไม่มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิวของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ผู้วิจัยจึงสนใจจะศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิวในระบบนำส่งยาของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันดังกล่าว จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* ของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ โดยมีน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ความเข้มข้น 1 %v/v, สารมาตรฐานยา clindamycin และ doxycycline ความเข้มข้น 0.25 mg/mL เป็น positive control พบว่า ไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ มีความสามารถในการต้านเชื้อ *C. acnes* มีค่า inhibition zone เท่ากับ 1.45 ± 0.04 cm และนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ แสดงผลเป็น bacteria static zone ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของนาโนอิมัลชันที่สามารถยับยั้งเชื้อ แต่ปริมาณน้ำมันที่บรรจุอยู่ในนาโนอิมัลชันไม่เพียงพอต่อการต้านเชื้อ โดยน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระที่มีองค์ประกอบหลักทางเคมี eugenol ร้อยละ 27.74 มีค่า inhibition zone เท่ากับ 2.14 ± 6.43 cm ส่วนสารมาตรฐานยา clindamycin และ doxycycline ความเข้มข้น 0.25 mg/mL มีค่า inhibition zone เท่ากับ 2.33 ± 0.07 และ มากกว่า 3 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีความสามารถในการต้านเชื้อต่ำกว่า doxycycline และ clindamycin ซึ่งผลการต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* มีความสอดคล้องกับ รายงาน Luangnarumitchai และคณะ พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีความต้านเชื้อแบคทีเรีย *C. acnes* มีผลมาจากองค์ประกอบหลักหรือองค์ประกอบที่สำคัญทางเคมีและปริมาณสารสำคัญ (Abdullah, 2017) ซึ่งค่า Inhibition zone ดังแสดงในตารางที่ 14 ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว *C. acnes* มากกว่านาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระเป็นผลมาจากปริมาณการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ไมโครอิมัลชัน (คิดเป็น 7.5 %v/v ของตำรับ) และนาโนอิมัลชัน (คิดเป็น 1% ในตำรับ) มีผลมาจากปริมาณสารสำคัญ eugenol ที่มีผลต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Saliu et al., 2011) ทั้งนี้แม้ไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวน้อยกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระแต่ระบบนำส่งยาที่อยู่ในรูปแบบไมโครอิมัลชันหรือนาโนอิมัลชันมีความเหมาะสมมากกว่าต่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยา หรือเวชสำอาง เนื่องจากขนาดอนุภาคที่เล็กของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันส่งผลต่อความคง

สภาพทางกายภาพและทางเคมีที่ดี ส่งผลต่อช่วยการซึมผ่านผิวหนัง นำส่งสารสำคัญไปออกฤทธิ์ ต่อเชื้อทดสอบได้ดียิ่งขึ้น ส่งเสริมประสิทธิภาพการรักษาที่ดี (Poomanee et al., 2020b)

7.2 ผลการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิว *S. epidermidis*

จากการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ โดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ความเข้มข้น 1 %v/v, สารมาตรฐานยา doxycycline และ clindamycin ความเข้มข้น 0.25 mg/mL เป็น positive control พบว่า ไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. epidermidis* มีค่า inhibition zone เท่ากับ 1.64 ± 0.32 cm. ซึ่งนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ แสดงผลเป็น bacteria static zone ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของนาโนอิมัลชันที่สามารถยับยั้งเชื้อ แต่ปริมาณน้ำมันที่บรรจุอยู่ในนาโนอิมัลชันไม่เพียงพอต่อการต้านเชื้อ โดยน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ มีค่า inhibition zone เท่ากับ 1.57 ± 0.06 cm ส่วนสารมาตรฐานยา clindamycin และ doxycycline ความเข้มข้น 0.25 mg/mL มีค่า inhibition zone เท่ากับมากกว่า 3 cm อย่างไรก็ตามฤทธิ์การต้านของไมโครอิมัลชันไม่แตกต่างกับน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีความสามารถในการต้านเชื้อต่ำกว่า doxycycline และ clindamycin ซึ่งผลการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ดังแสดงในตารางที่ 14 ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. epidermidis* ได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ เนื่องจากระบบนำส่งไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันช่วยเพิ่มการละลายน้ำทำให้มีผลต่อการออกฤทธิ์ได้ดีกว่า (Kleinubing et al., 2021) รวมทั้งปริมาณน้ำมันที่ถูกกักเก็บปริมาณที่สูงส่งผลโดยตรงต่อปริมาณสารสำคัญ eugenol ส่งผลต่อฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว (Bednarczyk et al., 2021; Saliu et al., 2011) ทั้งนี้ไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระมีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว *S. epidermidis* สูงกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระแต่ต่ำกว่าสารมาตรฐาน doxycycline และ clindamycin นอกจากนี้นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ที่มีน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระบรรจุอยู่ 1 %v/v มีฤทธิ์น้อยกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ความเข้มข้น 1 %v/v อาจเป็นผลมาจากน้ำมันถูกห่อหุ้มอยู่ทำให้น้ำมันแพร่ออกมาได้น้อยจึงทำให้การออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียได้น้อยกว่า

ตาราง 14 ค่า inhibition zone ของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

Sample	Inhibition zone (cm)	
	<i>C. acnes</i>	<i>S. epidermidis</i>
base microemulsion	-	-
microemulsion of <i>O. gratissimum</i> leaf oil (7.5 %v/v)	1.45 ± 0.04 ^c	1.64 ± 0.32 ^a
base nanoemulsion	-	-
nanoemulsion of <i>O. gratissimum</i> leaf oil (1 %v/v)	bacteria static zone	bacteria static zone
1% v/v <i>O. gratissimum</i> leaf oil	2.14 ± 6.43 ^a	1.57 ± 0.06 ^a
0.25 mg/mL doxycycline	> 3 ^b	> 3 ^b
0.25 mg/mL clindamycin	2.33 ± 0.08 ^a	> 3 ^b

หมายเหตุ - คือ no inhibition zone was observed

a, b, c = One-way analysis of variance

บทที่ 5

สรุปผล และข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของ *C. acnes* และ *S. epidermidis* พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากไบบี่หระ ความเข้มข้น 1 %v/v มีฤทธิ์การต้านเชื้อ *C. acnes* และ *S. epidermidis* ได้ดีไม่มีความแตกต่างกับน้ำมันหอมระเหยจากานพลู ความเข้มข้น 1 %v/v ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากานพลูมีประสิทธิภาพสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวได้ โดยมีองค์ประกอบหลักสำคัญคือ eugenol ในงานวิจัยนี้ได้นำน้ำมันหอมระเหยจากไบบี่หระมาพัฒนาระบบนำส่งในรูปแบบไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน เพื่อเพิ่มการซึมผ่านยาทางผิวหนัง ลดการระคายเคือง ลดการสลายตัวและช่วยนำส่งสารสำคัญ (eugenol) ด้วยระบบไมโครอิมัลชันซึ่งเป็นระบบที่ประกอบด้วย น้ำมัน น้ำ สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม เมื่อมีองค์ประกอบดังกล่าวที่เหมาะสมไมโครอิมัลชันจะสามารถเกิดได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งงานวิจัยนี้เลือกใช้สารลดแรงตึงผิวเป็น Tween[®] 80 และสารลดแรงตึงผิวร่วมเป็น propylene glycol ปรับอัตราส่วน 1:0, 1:1, 2:1 และ 3:1 ตามลำดับ ร่วมกับน้ำบริสุทธิ์ และหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเกิดไมโครอิมัลชันที่กว้างที่สุด จากการวิจัยพบว่า อัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสม (3:1) เป็นอัตราส่วนที่ก่อให้เกิดพื้นที่ไมโครอิมัลชันที่กว้างที่สุด มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากไบบี่หระ ร้อยละ 7.5 และมีสารลดแรงตึงผิวผสมน้อยกว่าร้อยละ 20 ซึ่งมีความเหมาะสมในระบบไมโครอิมัลชัน สำหรับการศึกษาคงสภาพทางกายภาพ เมื่อเก็บไมโครอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ทำการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาค และค่าประจุของอนุภาค ในช่วงเวลาต่าง ๆ จนครบ 16 สัปดาห์ (4 เดือน) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ มีการเปลี่ยนแปลงค่าที่ยอมรับได้ ขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงระหว่าง 90 – 187 nm การกระจายของขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงระหว่าง 0.142 – 0.529 และค่าประจุบนผิวของอนุภาค -1.45 ถึง -6.94 ซึ่งที่อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของขนาดอนุภาค และค่าประจุบนผิวของอนุภาคน้อยกว่าเมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาคงสภาพทางเคมีของระบบไมโครอิมัลชันโดยติดตามร้อยละการคงเหลือของ eugenol ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักสำคัญทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไบบี่หระ ซึ่งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีร้อยละการคงเหลือที่มากกว่าเมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส ดังนั้นควรเก็บไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากไบบี่หระไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพราะมีคงสภาพทางกายภาพและเคมีที่ดี สำหรับการพัฒนาระบบนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากไบบี่หระ ด้วยวิธีเตรียม phase inversion composition โดยใช้สารลด

แรงดึงผิวเป็น Tween[®] 80 เพิ่มความหนืดด้วย hyaluronic acid และ Poloxamer 188 พบว่าการเติม Poloxamer 188 ทำให้การกระจายตัวของอนุภาคนาโนอิมัลชันสูงขึ้น และจากสูตรนาโนอิมัลชันที่ไม่มี Poloxamer 188 และเพิ่มปริมาณ hyaluronic acid ที่สูงขึ้นมีผลต่อขนาดอนุภาคและการกระจายตัวที่ดีและอยู่ในช่วงที่เหมาะสม มีค่าขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัวและประจุบนผิวของอนุภาค เท่ากับ 106.40 ± 3.32 nm, 0.303 ± 0.009 และ -0.562 ± 0.158 ตามลำดับ เมื่อนำมาศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและเคมี พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลาผ่านไป 28 วัน ค่าขนาดอนุภาค การกระจายตัวของอนุภาค และค่าประจุบนผิวของอนุภาค ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับตอนเตรียมเสร็จทันที ด้านความคงสภาพทางเคมี ที่อุณหภูมิสูงส่งผลต่อการสลายตัวขององค์ประกอบทางเคมี ดังนั้นควรเก็บนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพราะมีความคงสภาพทางกายภาพและเคมีที่ดี ซึ่งสำหรับทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ด้วยวิธี agar well diffusion method โดยมีน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ, doxycycline, clindamycin เป็น positive control พบว่า ไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *C. acnes* ต่ำกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ความเข้มข้น 1 %v/v แต่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. epidermidis* ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ความเข้มข้น 1% v/v และทั้งนี้ไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันสามารถต้านเชื้อก่อให้เกิดสิว *C. acnes* และ *S. epidermidis* ได้น้อยกว่า doxycycline และ clindamycin ในขณะที่นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ แสดงผลเป็น bacteria static zone ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของนาโนอิมัลชันที่สามารถยับยั้งเชื้อแต่ปริมาณน้ำมันที่บรรจุอยู่ในนาโนอิมัลชันไม่เพียงพอต่อการต้านเชื้อ ทั้งนี้เป็นผลมาจากปริมาณการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระของระบบไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชัน ซึ่งไมโครอิมัลชันสามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระได้สูงกว่าประมาณ 6.5 เท่า จึงทำให้มีฤทธิ์การต้านเชื้อที่ก่อให้เกิดสิวได้ดีกว่านาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้มีข้อเสนอแนะให้เตรียมนาโนอิมัลชันที่สามารถกักเก็บน้ำมันหอมระเหยให้ได้ปริมาณน้ำมันสูงสุด วิเคราะห์หาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันเพื่อเป็นประโยชน์สำหรับการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์รักษาผิวที่มีส่วนผสมธรรมชาติ ราคาต้นทุนต่ำ และวิธีการเตรียมที่ไม่ซับซ้อนเพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยต่อมนุษย์ต่อไป



บรรณานุกรม

- Aubin, G. G., Portillo, M. E., Trampuz, A., & Corvec, S. (2014). *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: From acne to implant-infections, from phylotype to resistance. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(6), 241-250. doi: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.02.004>
- Bednarczyk, Paulina, Wróblewska, Agnieszka, Markowska-Szczupak, Agata, Ossowicz-Rupniewska, Paula, Nowak, Małgorzata, Kujbida, Marcin, Czech, Zbigniew. (2021). UV curable coatings based on urethane acrylates containing eugenol and evaluation of their antimicrobial activity. *Coatings*, 11(12). doi: 10.3390/coatings11121556
- Bunrathep, Supawan, Palanuvej, Chanida, & Ruangrunsi, Nijsiri. (2007). Chemical compositions and antioxidative activities of essential oils from four *Ocimum* species endemic to Thailand. *J Health Res*, 21(3), 201-206.
- Chaisri, Wasana, Chaiyana, Wantida, Pikulkaew, Surachai, Okonogi, Siriporn, & Suriyasathaporn, Witaya. (2019). Enhancement of acaricide activity of citronella oil after microemulsion preparation. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 67(1), 15-23.
- Chaudhary, Gaurav, Ghosh, Ashesh, Kang, Jin, Braun, Paul, Ewoldt, Randy, & Schweizer, Kenneth. (2021). Linear and Nonlinear Viscoelasticity of Concentrated Thermoresponsive Microgel Suspensions.
- Cheong, Ai Mun, Tan, Chin Ping, & Nyam, Kar Lin. (2017). Physicochemical, oxidative and anti-oxidant stabilities of kenaf seed oil-in-water nanoemulsions under different storage temperatures. *Industrial Crops and Products*, 95, 374-382.
- Chimnoi, Nitirat, Reuk-Ngam, Nanthawan, Chuysinuan, Piyachat, Khlaychan, Panita, Khunnawutmanotham, Nisachon, Chokchaichamnankit, Daranee, Techasakul, Supanna. (2018). Characterization of essential oil from *Ocimum gratissimum* leaves: Antibacterial and mode of action against selected gastroenteritis pathogens. *Microbial pathogenesis*, 118, 290-300.

- Chittasupho, Chuda, Posritong, Penpitcha, & Ariyawong, Pakaporn. (2019). Stability, cytotoxicity, and retinal pigment epithelial cell binding of hyaluronic acid-coated PLGA nanoparticles encapsulating lutein. *AAPS PharmSciTech*, 20(1), 1-13.
- Chuacharoen, T., Prasongsuk, S., & Sabliov, C. M. (2019). Effect of surfactant concentrations on physicochemical properties and functionality of curcumin nanoemulsions under conditions relevant to commercial utilization. *Molecules*, 24(15). doi: 10.3390/molecules24152744
- Claudel, J. P., Auffret, N., Leccia, M. T., Poli, F., Corvec, S., & Dréno, B. (2019). *Staphylococcus epidermidis*: A potential new player in the physiopathology of acne? *Dermatology*, 235(4), 287-294. doi: 10.1159/000499858
- Daud, Farhat S, Pande, Gauri, Joshi, Mamta, Pathak, Ruchita, & Wankhede, Shubhangi. (2013). A study of antibacterial effect of some selected essential oils and medicinal herbs against acne causing bacteria. *Int J Pharm Sci Invent*, 2(1), 27-34.
- Dréno, B., Pécastaings, S., Corvec, S., Veraldi, S., Khammari, A., & Roques, C. (2018). *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 32(S2), 5-14. doi: <https://doi.org/10.1111/jdv.15043>
- Elston, Marlee J., Dupaix, John P., Opanova, Maria I., & Atkinson, Robert E. (2019). *Cutibacterium acnes* (formerly *Propionibacterium acnes*) and Shoulder Surgery. *Hawai'i journal of health & social welfare*, 78(11 Suppl 2), 3-5.
- Fitri, Noor, Fatimah, Ifat, Chabib, Lutfi, & Fajarwati, Febi Indah. (2017). Formulation of antiacne serum based on lime peel essential oil and in vitro antibacterial activity test against *Propionibacterium acnes*. *AIP Conference Proceedings*, 1823(1), 020123. doi: 10.1063/1.4978196
- Fox, Lizelle, Csongradi, Candice, Aucamp, Marique, Du Plessis, Jeanetta, & Gerber, Minja. (2016a). Treatment modalities for acne. *Molecules*, 21(8), 1063.
- Fox, Lizelle, Csongradi, Candice, Aucamp, Marique, du Plessis, Jeanetta, & Gerber, Minja. (2016b). Treatment modalities for acne. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(8), 1063. doi: 10.3390/molecules21081063

- Garzoli, Stefania, Petralito, Stefania, Ovidi, Elisa, Turchetti, Giovanni, Laghezza Masci, Valentina, Tiezzi, Antonio, .Paolicelli, Patrizia. (2020). Lavandula x intermedia essential oil and hydrolate: Evaluation of chemical composition and antibacterial activity before and after formulation in nanoemulsion. *Industrial Crops and Products*, 145, 112068. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112068>
- Garzoli, Stefania, Petralito, Stefania, Ovidi, Elisa, Turchetti, Giovanni, Masci, Valentina Laghezza, Tiezzi, Antonio, Giacomello, Pierluigi. (2020). Lavandula x intermedia essential oil and hydrolate: Evaluation of chemical composition and antibacterial activity before and after formulation in nanoemulsion. *Industrial Crops and Products*, 145, 112068.
- Golmohammadzadeh, Shiva, Farhadian, Nafiseh, Birihaee, Amir, Dehghani, Faranak, & Khameneh, Bahman. (2017). Preparation, characterization and in vitro evaluation of microemulsion of raloxifene hydrochloride. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(10), 1619-1625. doi: 10.1080/03639045.2017.1328430
- Gupta, Ankur, Eral, H Burak, Hatton, T Alan, & Doyle, Patrick S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft matter*, 12(11), 2826-2841.
- Harper, Julie C. (2016). Use of oral contraceptives for management of acne vulgaris: practical considerations in real world practice. *Dermatologic clinics*, 34(2), 159-165. doi: 10.1016/j.det.2015.11.005
- Harris, Daniel C. (2010). *Quantitative chemical analysis*: Macmillan.
- Harris, Victoria Rebecca, & Cooper, Alan J. (2017). Modern management of acne. *Medical Journal of Australia*, 206(1), 41-45. doi: 10.5694/mja16.00516
- Hauk, Lisa. (2017). Acne Vulgaris: Treatment Guidelines from the AAD. *American family physician*, 95(11), 740-741.
- Hou, He-Shuai, Bonku, Emmanuel Mintah, Zhai, Rong, Zeng, Rong, Hou, Ya-Li, Yang, Zhong-Hua, & Quan, Can. (2019). Extraction of essential oil from Citrus reticulata Blanco peel and its antibacterial activity against *Cutibacterium acnes* (formerly *Propionibacterium acnes*). *Heliyon*, 5(12), e02947. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02947>

- Hsu, Jason E., Bumgarner, Roger E., & Matsen, Frederick A., III. (2016). Propionibacterium in Shoulder Arthroplasty: What We Think We Know Today. *JBJS*, 98(7).
- Huong, N. C., Ngan, T. T. K., Anh, T. T., Le, X. T., Lam, T. D., Cang, M. H., Pham, N. D. Y. (2020). Physical and chemical profile of essential oil of vietnamese *Ocimum gratissimum* L. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 736(6), 062010. doi: 10.1088/1757-899x/736/6/062010
- Jadhav, Ashwini , Daundkar, Abhijeet , Morale, Deepak, Bhujbal, Nikhil, & Kshirsagar, Dr.Sandip. (2018). Review on: microemulsion a novel approach for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 52(2), 60-65
- Jantarat, Chutima, Sirathanarun, Pornpak, Chuchue, Tatsanee, Konpian, Aththaphon, Sukkua, Gorawit, & Wongprasert, Prutthicha. (2018). In vitro antimicrobial activity of gel containing the herbal ball extract against *Propionibacterium acnes*. *Scientia pharmaceutica*, 86(1), 8. doi: 10.3390/scipharm86010008
- Jiang, Tian, Liao, Wei, & Charcosset, Catherine. (2020). Recent advances in encapsulation of curcumin in nanoemulsions: A review of encapsulation technologies, bioaccessibility and applications. *Food Research International*, 132, 109035. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109035>
- Jintapattanakit, A. (2018). Preparation of nanoemulsions by phase inversion temperature (PIT) method. *Pharm Sci Asia*, 45(1), 1-12.
- Joseph, Emil, & Singhvi, Gautam. (2019). Chapter 4 - Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. In A. M. Grumezescu (Ed.), *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy* (pp. 91-116): William Andrew Publishing.
- Joshi, Dr R. K. (2013). Chemical Composition, In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils of *Ocimum Gratissimum*, *O. Sanctum* and their Major Constituents. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 75, 457-462. doi: 10.4103/0250-474X.119834
- Kale, Santosh Nemichand, & Deore, Sharada Laxman. (2017). Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8(1), 39.

- Kanwar, Indu Lata, Haider, Tanweer, Kumari, Anju, Dubey, Sandeep, Jain, Priyanka, & Soni, Vandana. (2018). Models for acne: A comprehensive study. *Drug discoveries & therapeutics*, 12(6), 329-340. doi: 10.5582/ddt.2018.01079
- Kleinubing, Sirlene Adriana, Outuki, Priscila Miyuki, Hoscheid, Jaqueline, Pelegrini, Bruna Luíza, Antonio da Silva, Edson, Renata de Almeida Canoff, Jéssica, Carvalho Cardoso, Mara Lane. (2021). Hyaluronic acid incorporation into nanoemulsions containing *Pterodon pubescens* Benth. fruit oil for topical drug delivery. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, 101939. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101939>
- Komaiko, Jennifer S., & McClements, David Julian. (2016). Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 331-352. doi: 10.1111/1541-4337.12189
- Kumar, Manish, Bishnoi, Ram Singh, Shukla, Ajay Kumar, & Jain, Chandra Prakash. (2019). Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review. *Preventive nutrition and food science*, 24(3), 225-234. doi: 10.3746/pnf.2019.24.3.225
- Kwon, Soon, Kong, Bong, Cho, Wan, & Park, Soo. (2014). Formation of stable hydrocarbon oil-in-water nanoemulsions by phase inversion composition method at elevated temperature. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32, 540-546. doi: 10.1007/s11814-014-0234-9
- Laothaweerungsawat, Natnaree, Neimkhum, Waranya, Anuchapreeda, Songyot, Sirithunyalug, Jakkapan, & Chaiyana, Wantida. (2020). Transdermal delivery enhancement of carvacrol from *Origanum vulgare* L. essential oil by microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 579, 119052. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119052>
- Lee, Chia-Jung, Chen, Li-Wei, Chen, Lih-Geeng, Chang, Ting-Lin, Huang, Chun-Wei, Huang, Ming-Chuan, & Wang, Ching-Chiung. (2013). Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. *Journal of*

Food and Drug Analysis, 21(2), 169-176. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.05.007>

- Lv, Xia, Cong, Zhongxiao, Liu, Zhihao, Ma, Xiaodong, Xu, Ming, Tian, Yan, Tang, Zeyao. (2018). Improvement of the solubility, photostability, antioxidant activity and UVB photoprotection of trans-resveratrol by essential oil based microemulsions for topical application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 48, 346-354. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.017>
- Majeed, Hamid, Bian, Yuan-Yuan, Ali, Barkat, Jamil, Anjum, Majeed, Usman, Khan, Qaiser Farid, Fang, Zhong. (2015). Essential oil encapsulations: uses, procedures, and trends. *RSC Advances*, 5(72), 58449-58463.
- Matasyoh, L. G., Matasyoh, J. C., Wachira, F. N., Kinyua, M. G., Muigai, A. W., & Mukiama, T. K. (2008). Antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum gratissimum* L. From different populations of Kenya. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 5(2), 187-193. doi: 10.4314/ajtcam.v5i2.31272
- Matasyoh, Lexa G, Matasyoh, Josphat C, Wachira, Francis N, Kinyua, Miriam G, Muigai, Anne W Thairu, & Mukiama, Titus K. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. *African journal of biotechnology*, 6(6).
- Matasyoh, Lexa G, Matasyoh, Josphat C, Wachira, Francis N, Kinyua, Miriam G, Muigai, Anne W Thairu, & Mukiama, Titus K. (2008). Antimicrobial activity of essential oils of *Ocimum gratissimum* L. from different populations of Kenya. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(2), 187-193.
- Matasyoh, lex, Matasyoh, Josphat, Wachira, Francis, Kinyua, Miriam, Muigai, Anne, & Mukiama, Titus. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. *African Journal of Biotechnology (ISSN: 1684-5315) Vol 6 Num 2, 6*.
- McClements, David Julian. (2012). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter*, 8(6), 1719-1729.
- Morales, Eduardo, Rubilar, Mónica, Burgos-Díaz, César, Acevedo, Francisca, Penning,

- Manfred, & Shene, Carolina. (2017). Alginate/Shellac beads developed by external gelation as a highly efficient model system for oil encapsulation with intestinal delivery. *Food Hydrocolloids*, 70, 321-328. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.012>
- Mori Cortés, Noelia, Califano, Alicia Noemí, & Lorenzo, Gabriel. (2019). Physical and chemical stability under environmental stress of microemulsions formulated with fish oil. *Food research international*, 119, 283-290.
- Najafi-Taher, Roqya, & Amani, Amir. (2017). Nanoemulsions: colloidal topical delivery systems for antiacne agents-A Mini-Review. *Nanomedicine Research Journal*, 2(1), 49-56.
- Nasri, Hamid, Bahmani, Mahmoud, Shahinfard, Najmeh, Moradi Nafchi, Atefeh, Saberianpour, Shirin, & Rafieian Kopaei, Mahmoud. (2015). Medicinal Plants for the Treatment of Acne Vulgaris: A Review of Recent Evidences. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(11), e25580-e25580. doi: 10.5812/jjm.25580
- Nirmala, M Joyce, Rakesh, Arjun, & Nagarajan, R. (2018). Antibacterial Activity of Eucalyptus Oil Microemulsion System. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 10(11), 1059-1065.
- Okoye, Festus BC, Obonga, Wilfred O, Onyegbule, Felix A, Ndu, Okechukwu O, & Ihekwereme, Chibueze P. (2014). Chemical composition and anti-inflammatory activity of essential oils from the leaves of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L.(Lamiaceae). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(6), 2174.
- Ontao, Netnapa, Athikomkulchai, Sirivan, Tadtong, Sarin, Leesawat, Phuriwat, & Chittasupho, Chuda. (2021). Formulation, physical and chemical stability of *Ocimum gratissimum* L. leaf oil Nanoemulsion. *Key Engineering Materials*, 901, 117-122. doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.901.117
- Orafidiya, Lara O, Fakoya, FA, Agbani, EO, & Iwalewa, EO. (2005). Vascular permeability-increasing effect of the leaf essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn as a mechanism for its wound healing property. *African Journal of Traditional*,

Complementary and Alternative Medicines, 2(3), 253–258–253–258.

- Orchard, A., van Vuuren, S. F., Viljoen, A. M., & Kamatou, G. (2018). The in vitro antimicrobial evaluation of commercially essential oils and their combinations against acne. *Int J Cosmet Sci*. doi: 10.1111/ics.12456
- Otto, Michael. (2014). *Staphylococcus epidermidis* Pathogenesis. In P. D. Fey (Ed.), *Staphylococcus Epidermidis: Methods and Protocols* (pp. 17-31). Totowa, NJ: Humana Press.
- Özkal, S. G., Salgın, U., & Yener, M. E. (2005). Supercritical carbon dioxide extraction of hazelnut oil. *Journal of Food Engineering*, 69(2), 217-223. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.07.020>
- Pansang, Sirimas, Maphanta, Sirada, Tuntijarukorn, Punpimol, & Viyoch, Jarupa. (2010). Skin irritation test of a microemulsion containing essential oil isolated from *Ocimum basilicum*. *Sci Asia*, 36, 355-358.
- Perazzo, A., Preziosi, V., & Guido, S. (2015). Phase inversion emulsification: Current understanding and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 222, 581-599. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.01.001>
- Pérez Zamora, Cristina M., Torres, Carola A., & Nuñez, María B. (2018). Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from verbenaceae species growing in south America. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(3), 544. doi: 10.3390/molecules23030544
- Perkampus, Heinz-Helmut. (2013). *UV-VIS Spectroscopy and its Applications: Science & Business Media*.
- Philippe, Sessou, Farougou, Souaibou, Alitonou, Guy, Djenontin, Sebastien, Boniface, Yèhouénu, Azokpota, Paulin, Sohounhloue, Dominique. (2012). Chemical composition and antifungal activity of essential oil of fresh leaves of *Ocimum gratissimum* from Benin against six mycotoxigenic fungi isolated from a traditional cheese wagashi. *International Research Journal of Biological Sciences*, 1, 22-27.
- Poomanee, Worrapan, Khunkitti, Watcharee, Chaiyana, Wantida, & Leelapornpisid, Pimporn. (2020a). Optimization of *Mangifera indica* L. kernel extract-loaded

- nanoemulsions via response surface methodology, characterization, stability, and skin permeation for anti-acne cosmeceutical application. *Pharmaceutics*, 12(5). doi: 10.3390/pharmaceutics12050454
- Poomanee, Worrapan, Khunkitti, Watcharee, Chaiyana, Wantida, & Leelapornpisid, Pimporn. (2020b). Optimization of *Mangifera indica* L. kernel extract-loaded nanoemulsions via response surface methodology, characterization, stability, and skin permeation for anti-acne cosmeceutical application. *Pharmaceutics*, 12(5), 454.
- Porter, Noel G., & Lammerink, J. Peter. (1994). Effect of temperature on the relative densities of essential oils and water. *Journal of Essential Oil Research*, 6(3), 269-277. doi: 10.1080/10412905.1994.9698375
- Sahu, GK, Sharma, H, Gupta, A, & Kaur, CD. (2015). Advancements in microemulsion based drug delivery systems for better therapeutic effects. *Int J Pharm Sci Dev Res* 1 (1): 008, 15(008).
- Saliu, BK, Usman, LA, Sani, A, Muhammad, NO, & Akolade, JO. (2011). Chemical composition and antibacterial (oral isolates) activity of leaf essential oil of *Ocimum gratissimum* L. grown in North central Nigeria. *International Journal of Current Research*, 33(3), 022-028.
- Samimi, Shabnam, Maghsoudnia, Niloufar, Eftekhari, Reza Baradaran, & Dorkoosh, Farid. (2019). Chapter 3 - Lipid-based nanoparticles for drug delivery systems. In S. S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. K. Mishra & S. Thomas (Eds.), *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery* (pp. 47-76): Elsevier.
- Sánchez, Jhon, Sánchez, Miguel, Falcone, R., & Ritacco, Hernán. (2021). Production of Pd nanoparticles in microemulsions. *Effect of Reaction Rate on Particle Size*. doi: 10.1039/D1CP05049D
- Schleifer, Karl H., & Kloos, Wesley E. (1975). Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new

- Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 25(1), 50-61. doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-25-1-50>
- Shaker, Dalia S, Ishak, Rania AH, Ghoneim, Amira, & Elhuoni, Muaeid A. (2019). Nanoemulsion: A review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. *Scientia Pharmaceutica*, 87(3), 17.
- Singh, Yuvraj, Meher, Jaya Gopal, Raval, Kavita, Khan, Farooq Ali, Chaurasia, Mohini, Jain, Nitin K., & Chourasia, Manish K. (2017). Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 252, 28-49. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
- Taleb, Mohammed H, Abdeltawab, Nourtan F, Shamma, Rehab N, Abdelgayed, Sherein S, Mohamed, Sarah S, Farag, Mohamed A, & Ramadan, Mohammed A. (2018). *Origanum vulgare* L. essential oil as a potential anti-acne topical nanoemulsion—In vitro and in vivo study. *Molecules*, 23(9), 2164.
- Tangpao, Tibet, Chung, Hsiao-Hang, & Sommano, Sarana Rose. (2018). Aromatic Profiles of Essential Oils from Five Commonly Used Thai Basils. *Foods*, 7(11), 175.
- Tiwari, Nisha, Ebenazer, Andrew, Franklyne, Jonathan Sampath, Sivakumar, A., Mukherjee, Amitava, & Chandrasekaran, N. (2020). Drug loaded essential oil microemulsions enhance photostability and evaluation of in vitro efficacy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 29, 101638. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.101638>
- Turek, Claudia, & Stintzing, Florian C. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40-53. doi: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- Viyoch, J., Pisutthanan, N., Faikreua, A., Nupangta, K., Wangtorpol, K., & Ngokkuen, J. (2006). Evaluation of in vitro antimicrobial activity of Thai basil oils and their microemulsion formulas against *Propionibacterium acnes*. *International Journal of Cosmetic Science*, 28(2), 125-133. doi: 10.1111/j.1467-2494.2006.00308.x
- Winkelman, Warren J. (2018). Aromatherapy, botanicals, and essential oils in acne. *Clinics*

in dermatology, 36(3), 299-305.

Xavier-Junior, F. H., Vauthier, C., Morais, A. R. V., Alencar, E. N., & Egito, E. S. T. (2017).

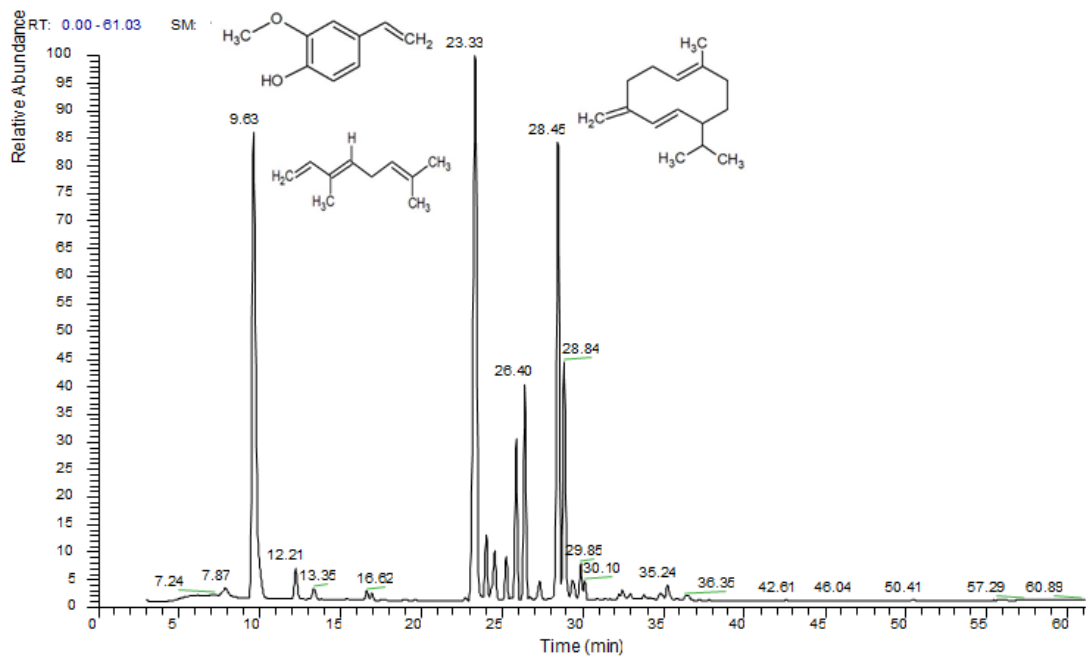
Microemulsion systems containing bioactive natural oils: an overview on the state of the art. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(5), 700-714. doi: 10.1080/03639045.2016.1235186

Younis, Adnan, Riaz, Atif, Khan, M. A., Khan, Asif, & Pervez, M. A. (2008). Extraction and identification of chemical constituents of the essential oil of Rosa species. *Acta Horticulturae*, 766, 485-492. doi: 10.17660/ActaHortic.2008.766.65

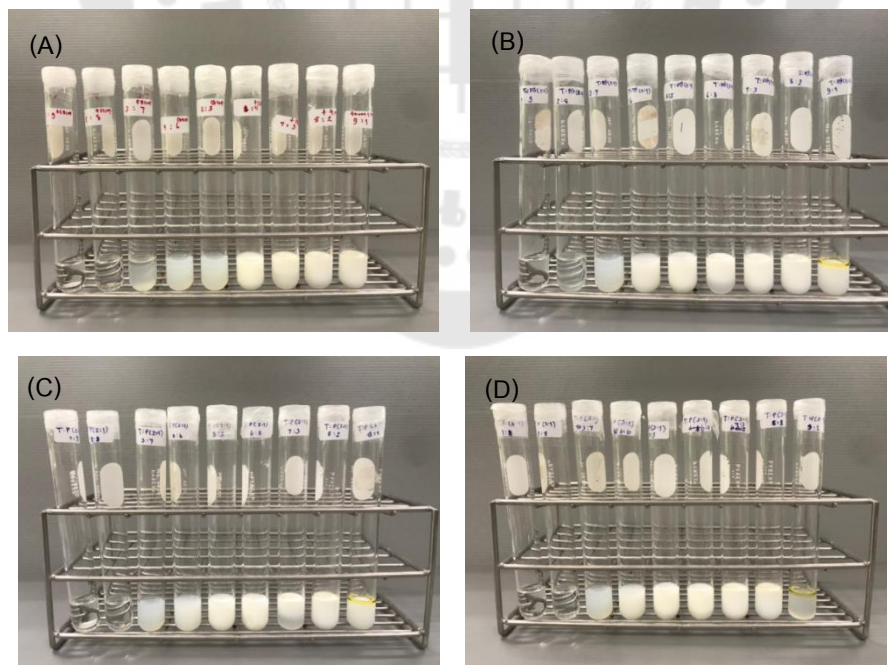
รัตนา, อินทรานุปกรณ์. (2547). การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพรมะนาว (พิมพ์ครั้งที่ 1 ed.). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.



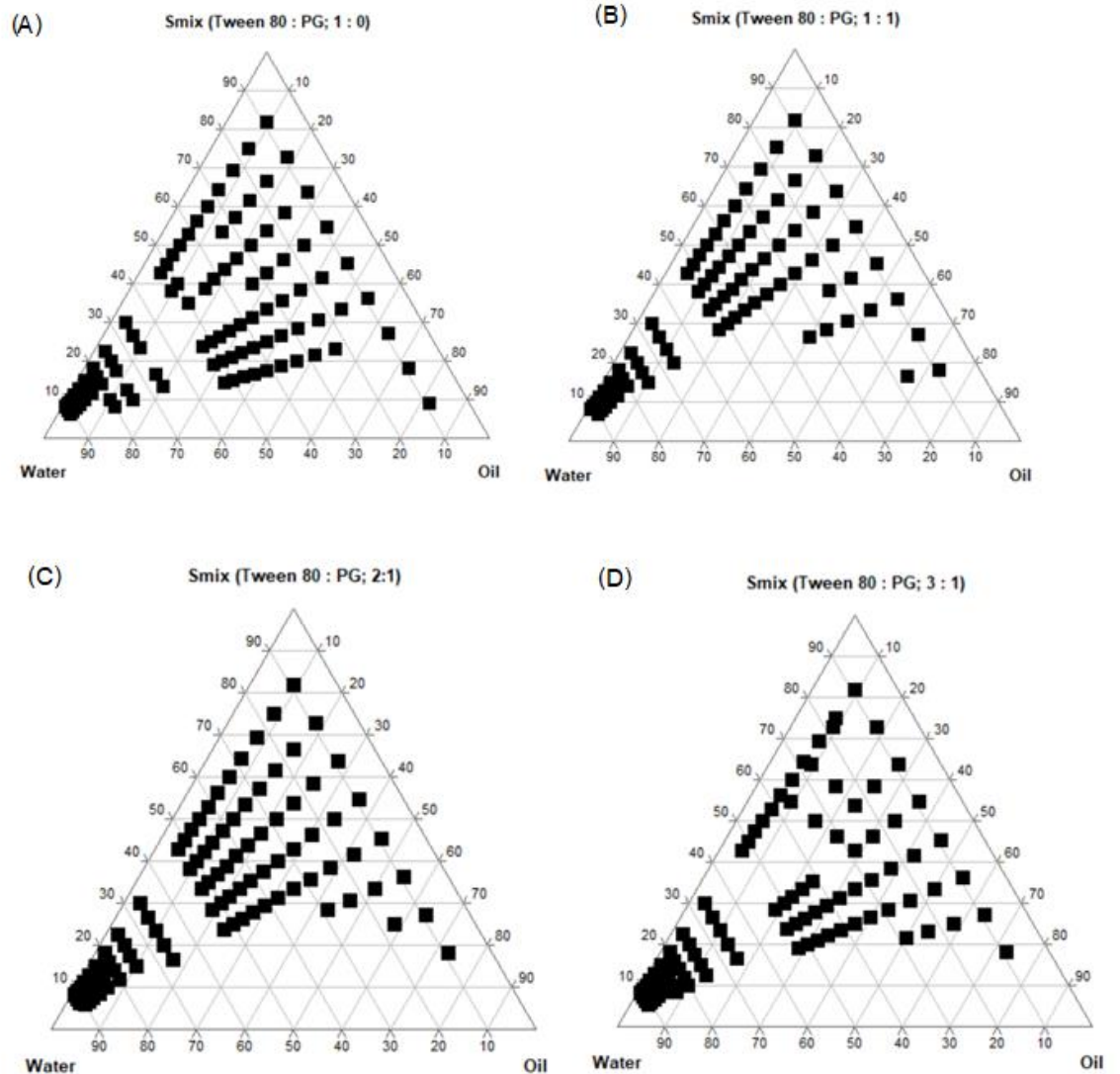




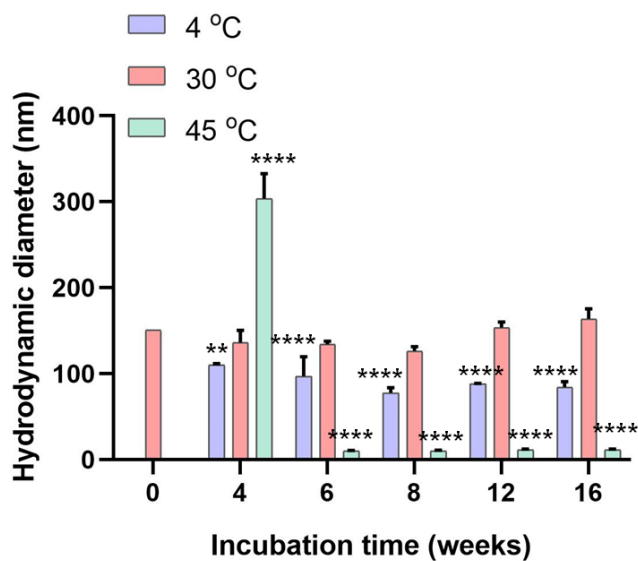
ภาพประกอบ 23 โครมาโทแกรม (chromatogram) ของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระห์ ที่วิเคราะห์ด้วย GC-MS



ภาพประกอบ 24 นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระห์ที่เตรียมในอัตราส่วนของ Tween[®] 80 :propylene glycol (A) 1:0, (B) 1:1, (C) 2:1, (D) 3:1



ภาพประกอบ 25 บริเวณเกิดไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ้าแผนภูมิกัดไตรภาค
 เทียมในอัตราส่วน Tween® 80 : propylene glycol 1:0 (A), 1:1 (B), 2:1 (C) และ 3:1 (D)



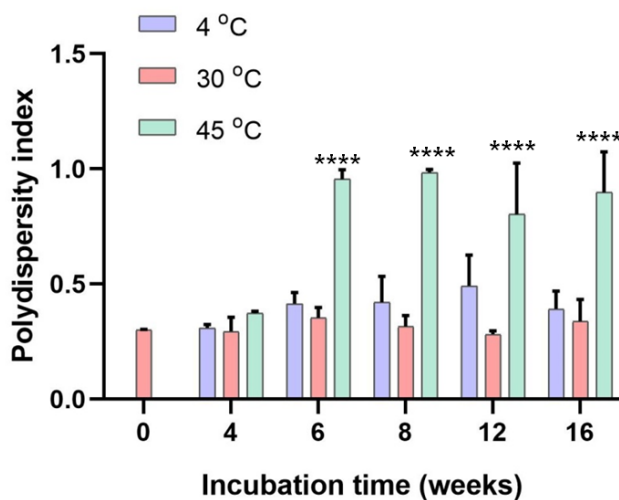
ภาพประกอบ 26 ผลระยะเวลาการเก็บนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อขนาดอนุภาค hydrodynamic diameter (nm)

หมายเหตุ : * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

*** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

**** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที



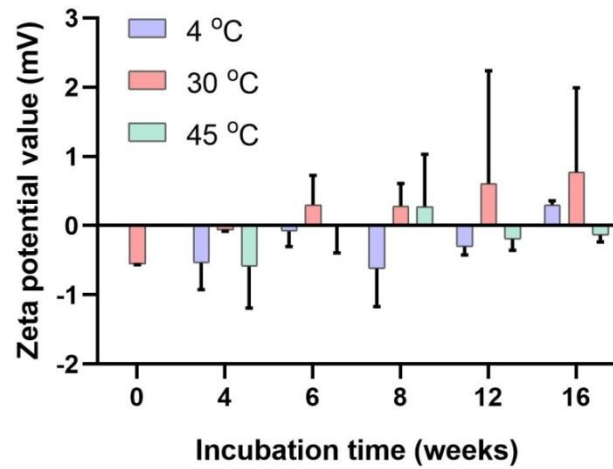
ภาพประกอบ 27 ผลของระยะเวลาการเก็บนานิโอมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ต่อค่าการกระจายของขนาดอนุภาค (polydispersity index)

หมายเหตุ : * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

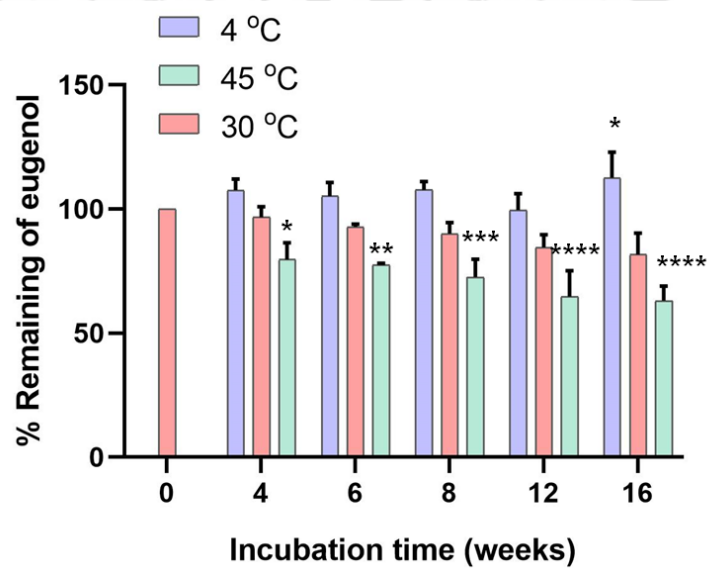
** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

*** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

**** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที



ภาพประกอบ 28 แสดงผลระยะเวลากการเก็บนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อค่าประจุบนผิวของอนุภาค (zeta potential)



ภาพประกอบ 29 ผลของระยะเวลากการเก็บนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระต่อร้อยละคงเหลือปริมาณสารสำคัญ eugenol ในไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบยี่หระ ตั้งแต่เตรียมเสร็จทันที ที่เวลา 2, 4, 6, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

*** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

**** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	เนตรนภา อินเต่า
วัน เดือน ปี เกิด	5 พฤษภาคม 2533
สถานที่เกิด	จังหวัดสมุทรปราการ
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2554 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเคมี (วท.บ.) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	75 หมู่ 3 ตำบลบึงศาล อำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก
ผลงานตีพิมพ์	Formulation, Physical and Chemical Stability of Ocimum gratissimum L. Leaf Oil Nanoemulsion

