



การตรวจหาฤทธิ์ต้านเชื้อราจากคุณและมะกรูด และการพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน
และนาโนอิมัลชันของน้ำมันมะกรูด

ANTIFUNGAL ACTIVITY SCREENING OF GOLDEN SHOWER AND KAFFIR LIME AND
DEVELOPMENT OF MICROEMULSION AND NANOEMULSION OF KAFFIR LIME OIL

ปิยะพงษ์ ภูมิवाल

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2562

การตรวจหาฤทธิ์ต้านเชื้อราจากคุณและมะกรูด และการพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน
และนาโนอิมัลชันของน้ำมันมะกรูด



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ANTIFUNGAL ACTIVITY SCREENING OF GOLDEN SHOWER AND KAFFIR
LIME AND DEVELOPMENT OF MICROEMULSION AND NANOEMULSION OF
KAFFIR LIME OIL



A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements
for MASTER OF SCIENCE (Pharmaceutical Product Development)

Faculty of Pharmacy Srinakharinwirot University

2019

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การตรวจหาฤทธิ์ต้านเชื้อราจากคุณและมะกรูด และการพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน
และนาโนอิมัลชันของน้ำมันมะกรูด
ของ
ปิยะพงษ์ ภูมิवाल

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูดา จิตตสุโก) (รองศาสตราจารย์ ดร.มนตรี จาตุรันต์
ภิญโญ)

..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง) (รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี่)

..... ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย)

ชื่อเรื่อง	การตรวจหาฤทธิ์ต้านเชื้อราจากคุณและมะกรูด และการพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชัน และนาโนอิมัลชันของน้ำมันมะกรูด
ผู้วิจัย	ปิยะพงษ์ ภูมิवाल
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. ชุตตา จิตตสุโก

โรคกลากส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อราในสกุล *Trichophyton* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากใบคุณ เนื้อในฝักคุณ เมล็ดคุณ และน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ด้วยวิธี broth macrodilution และทดสอบประสิทธิภาพตำรับไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธี agar well diffusion ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *T. mentagrophytes* ของสารสกัดจากใบ เนื้อในฝักและเมล็ดคุณเท่ากับ 2 mg/ml และสำหรับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดเท่ากับ 1.06 $\mu\text{g/ml}$ ตำรับไมโครอิมัลชันเกิดโซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* เฉลี่ยมากกว่า 4 cm ตำรับนาโนอิมัลชันเกิดโซนยับยั้งเชื้อราเฉลี่ย 1.91 ± 0.40 cm ประเมินคุณลักษณะทางกายภาพและความคงสภาพทางกายภาพของตำรับไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ด้วยการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้า ประเมินความคงสภาพทางเคมีของตำรับจากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ citronellal ด้วยวิธี UV-Visible spectrophotometry จากผลการศึกษาพบว่าตำรับไมโครอิมัลชันและนาโนอิมัลชันมีคุณลักษณะทางกายภาพ ความคงสภาพทางกายภาพและเคมีอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้พบวาระยะเวลาการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลต่อการสลายตัวของสารสำคัญในตำรับไมโครอิมัลชันและตำรับนาโนอิมัลชัน แต่ตำรับไมโครอิมัลชันสามารถบรรจุน้ำมันหอมระเหยได้ในปริมาณที่มากกว่า (คิดเป็น 5%v/v ของตำรับ) ในขณะที่นาโนอิมัลชันบรรจุปริมาณน้ำมันได้น้อยกว่า (คิดเป็น 1%v/v ของตำรับ) จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดอาจเป็นอีกทางเลือกสำหรับการรักษาโรคกลากที่เกิดจากการติดเชื้อรา *T. mentagrophytes* ได้

คำสำคัญ : น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด, ไมโครอิมัลชัน, นาโนอิมัลชัน, ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

Title	ANTIFUNGAL ACTIVITY SCREENING OF GOLDEN SHOWER AND KAFFIR LIME AND DEVELOPMENT OF MICROEMULSION AND NANOEMULSION OF KAFFIR LIME OIL
Author	PIYAPONG PUMIVAL
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2019
Thesis Advisor	Associate Professor Chuda Chittasupho , Ph.D.

Trichophyton is one of the most common causes of dermatophytosis. This study aimed to evaluate the antifungal properties of leaves, fruit, seed extract of golden shower and kaffir lime leaf oil against *Trichophyton mentagrophytes*. The evaluation of the antifungal properties of microemulsion and nanoemulsion revealed the effects of kaffir lime oil against *T. mentagrophytes*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract and kaffir lime leaf oil against *T. mentagrophytes* was determined using the broth macrodilution method. It was found that the leaves, fruit and seed extracts showed MIC of 2 mg/ml and kaffir lime leaf oil showed MIC of 1.06 µg/ml. The antifungal activity of microemulsion and nanoemulsion were confirmed by using an agar well diffusion assay, demonstrating an inhibition zone of more than 4 cm, while nanoemulsion had an inhibition zone of 1.91 ± 0.40 cm. The evaluation for microemulsion and nanoemulsion droplet sizes, the polydispersity index, the zeta potential, the physical characteristics and physical stability. The chemical stability of formulations were tested by analyzing citronellal in the formulations using a validated method of UV-Vis spectrophotometry. The size, size distribution, and surface charge of microemulsion and nanoemulsion were in acceptable ranges and showed good physical and chemical stability. The degradation of the active compounds in formulations were time and temperature dependent. However, microemulsion contained kaffir lime leaf oil (5%v/v) while nanoemulsion contained less kaffir lime leaf oil (1%v/v). This study showed that the microemulsion of kaffir lime leaf oil may be an alternative therapy against dermatophytosis caused by *T. mentagrophytes*.

Keyword : Kaffir lime leaf oil, Microemulsion, Nanoemulsion, Antifungal activity

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี เพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาจากคณาจารย์หลายท่านโดยเฉพาะอย่างยิ่งรองศาสตราจารย์ ดร. ชูดา จิตตสุโข ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลักที่ รองศาสตราจารย์ ดร. สริน ทัดทอง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริวรรณ อธิคมกุลชัย ที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม โดยได้เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำแนะนำ ส่งสอน ดูแลเอาใจใส่ในการดำเนินงานวิจัยตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนสำเร็จเรียบร้อยสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.มนตรี จาตุรันต์ภิญโญ ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานและผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วีระศักดิ์ สามี ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการร่วมในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนริเริ่มแนวคิดและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัยฉบับนี้

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วิภาพร เสรีเด่นชัย ที่ให้ความกรุณาสละเวลาในการถ่ายทอดความรู้การใช้เครื่องมือสกัดสารตลอดจนให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการทำวิจัย

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ ที่ถ่ายทอดความรู้ตลอดจนให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการทำงานและการทำวิจัย และขอขอบคุณนิศ อุบลทิพย์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้คำปรึกษารวมถึงให้กำลังใจและให้การช่วยเหลือที่ดีเสมอมา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่สาวที่ให้กำลังใจในการเรียนและการทำวิจัยตลอดจนคอยช่วยเหลือสนับสนุนด้านการศึกษาในด้านต่าง ๆ จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ปิยะพงษ์ ภูมิवाल

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ	๗
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลังและความสำคัญของการวิจัย.....	1
ปัญหาการวิจัย.....	3
ความมุ่งหมายของงานวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษา.....	4
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
กรอบแนวคิดในงานวิจัย	5
สมมุติฐานในงานวิจัย.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
1. โรคกลาก (Ringworm, Tinea หรือ Dermatophytosis)	7
1.1 อาการและแนวทางการรักษาโรคกลาก	7
1.2 สถานการณ์และความชุกของโรคกลากในปัจจุบัน	8
2. ข้อมูลเกี่ยวกับมะกรูด	9

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	9
2.2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	10
2.3 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช	10
2.4 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	11
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	11
3. ข้อมูลเกี่ยวกับคุณ	12
3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	12
3.2 องค์ประกอบทางเคมีของคุณ	13
3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลากของคุณ	13
4. ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion)	14
4.1 ทฤษฎีการเกิดไมโครอิมัลชัน (Theories of microemulsion)	15
4.2 ส่วนประกอบของของระบบไมโครอิมัลชันและการสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม	16
4.3 การเตรียมไมโครอิมัลชัน (Microemulsion Preparation)	18
4.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้ไมโครอิมัลชัน	19
5. นาโนอิมัลชัน (nanoemulsion)	21
5.1 การเตรียมนาโนอิมัลชัน (Nanoemulsions Preparation)	22
5.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้นาโนอิมัลชัน	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	24
1. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	24
1.1 วัสดุอุปกรณ์	24
1.2 เครื่องมือ	24
1.3 สารเคมี	25

1.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	25
2. วิธีดำเนินงานวิจัย	25
2.1 การเตรียมตัวอย่างและเตรียมสารสกัดใบคูน เนื้อในฝักคูน และเมล็ดคูน.....	25
2.2 การเตรียมตัวอย่างและการเตรียมสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	26
2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อรา <i>T. mentagrophytes</i> ด้วยวิธี broth macrodilution.....	26
2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา <i>T. mentagrophytes</i> ของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอม ระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธี agar well diffusion	28
2.5 การเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (Kaffir lime oil microemulsion).....	29
2.6 ศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหย จากใบมะกรูด.....	31
2.7 การวิเคราะห์ปริมาณ citronellal equivalent ในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วย เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี วิเคราะห์	31
2.8 การหาปริมาณ citronellal equivalent ในตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหย จากใบมะกรูด.....	33
2.9 ศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอม ระเหยจากใบมะกรูด	33
2.10 การเตรียมนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (Kaffir lime oil nanoemulsion).....	34
2.11 ศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหย จากใบมะกรูด.....	36
2.12 การหาปริมาณ citronellal equivalent ในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหย จากใบมะกรูด.....	36

2.13 ศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	37
2.14 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	38
2.15 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	38
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย	39
1. ผลการเตรียมสารสกัดจากใบคูน เนื้อในผักคูน เมล็ดคูน และใบมะกรูด	39
2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใบคูน เนื้อในผักคูน เมล็ดคูน และน้ำมันมะกรูดต่อการยับยั้งเชื้อรา <i>T. mentagrophytes</i>	39
3. ผลการวิเคราะห์หาสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (kaffir lime oil) ด้วย Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)	40
4. ผลการเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (Kaffir lime oil microemulsion) โดยวิธีการไทเทรต (titration method)	45
4.1 การวัดขนาดอนุภาค (size) การกระจายของขนาดอนุภาค (Pdl) และค่าศักย์ซีต้า (zeta potential)	46
4.2 การศึกษาความคงสภาพทางเคมีและปริมาณคงเหลือของ citronellal equivalent ในตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	50
5. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา <i>T. mentagrophytes</i> ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธี agar well diffusion	53
6. ผลการวิเคราะห์ปริมาณ citronellal equivalent ในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธี UV-Visible Spectrophotometry	54
6.1 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ด้วยวิธี UV-Visible Spectrophotometry เพื่อหาปริมาณ citronellal equivalent ในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	54
7. ผลการเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (Kaffir lime oil nanoemulsion) โดยวิธี phase inversion composition (PIC)	57

7.1 การวัดขนาดอนุภาค (size) การกระจายของขนาดอนุภาค (Pdl) และค่าศักย์ซีต้า (zeta potential)	57
7.2 การทดสอบความคงสภาพทางกายภาพของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	58
7.3 การศึกษาความคงสภาพทางเคมีและปริมาณคงเหลือของ citronellal equivalent ในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	62
8. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา <i>T. mentagrophytes</i> ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธี agar well diffusion	64
บทที่ 5 สรุปผลวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	66
ข้อเสนอแนะ	68
บรรณานุกรม	69
ภาคผนวก.....	74
ประวัติผู้เขียน.....	78

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงตัวอย่างอัตราส่วนของส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน	30
ตาราง 2 สูตรตำรับการเตรียมนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	35
ตาราง 3 แสดง %yield ของสารสกัดจากใบ เนื้อในฝัก เมล็ดคุณ และน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	39
ตาราง 4 แสดงค่า MIC ของสารสกัดใบคุณ เนื้อในฝักคุณ เมล็ดคุณ และน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดต่อเชื้อรา <i>T. mentagrophytes</i>	40
ตาราง 5 ข้อมูลทางเคมีของสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดจากการวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography-mass spectrometry).....	41
ตาราง 6 ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค และค่าศักย์ซีต้าของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด หลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ในแต่ละช่วงเวลา	47
ตาราง 7 แสดงปริมาณคงเหลือของ citronellal equivalent ในตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ในแต่ละช่วงเวลา	52
ตาราง 8 เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อรา <i>T. mentagrophytes</i>	54
ตาราง 9 ร้อยละการคืนกลับของความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย UV-Visible Spectrophotometry	56
ตาราง 10 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ citronellal equivalent ด้วยวิธี UV-Visible Spectrophotometry	56
ตาราง 11 แสดงขนาด การกระจายของขนาดอนุภาค และค่าความต่างศักย์ซีต้าของตำรับนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันที	58
ตาราง 12 แสดงขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค และค่าศักย์ซีต้าของตำรับนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด หลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ในแต่ละช่วงเวลา	59
ตาราง 13 แสดงปริมาณคงเหลือของ citronellal equivalent ในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ในแต่ละช่วงเวลา	63

ตาราง 14 เส้นผ่านศูนย์กลางของโคนยับยั้งเชื้อรา <i>T. mentagrophytes</i>	65
---	----



สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 แสดงลักษณะของใบ และผลของต้นมะกรูด	9
ภาพประกอบ 2 แสดงโครงสร้างของ citronellal, citronellol และ citronellol acetate.....	10
ภาพประกอบ 3 แสดงลักษณะของใบ ผัก และดอกของต้นคุณ	12
ภาพประกอบ 4 แสดงลักษณะของเนื้อในผัก และเมล็ดของคุณ	13
ภาพประกอบ 5 ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และไมโครอิมัลชันชนิดต่อเนื่องแบบคู่.....	15
ภาพประกอบ 6 บริเวณการเกิดไมโครอิมัลชัน ไมโครอิมัลชันชนิดต่อเนื่องแบบคู่ และอิมัลชันธรรมดา	17
ภาพประกอบ 7 แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม (pseudo-ternary phase diagrams) แสดงบริเวณเกิดไมโครอิมัลชัน และไมโครอิมัลชันต่อเนื่องแบบคู่	18
ภาพประกอบ 8 กลไกการเกิดนาโนอิมัลชันด้วยวิธี Phase Inversion Composition	22
ภาพประกอบ 9 บริเวณเกิดไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดบนแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมในอัตราส่วนของ Tween® 80 : propylene glycol (A) 1:0, (B) 1:1, (C) 2:1 และ (D) 3:1	45
ภาพประกอบ 10 ขนาดอนุภาค (size) ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจาก ใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14 และ 28 วัน	48
ภาพประกอบ 11 การกระจายขนาดอนุภาค (Pdl) ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14 และ 28 วัน	49
ภาพประกอบ 12 ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน	50

ภาพประกอบ 13 ความคงสภาพทางเคมีและปริมาณคงเหลือของ citronellal ในตำรับ ไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	53
ภาพประกอบ 14 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร citronellal ในตัวทำละลาย DMSO กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 292.4 nm.....	55
ภาพประกอบ 15 ขนาดอนุภาค (size) ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14 และ 28 วัน.....	60
ภาพประกอบ 16 การกระจายขนาดอนุภาค (Pdl) ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14 และ 28 วัน	61
ภาพประกอบ 17 ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน	62
ภาพประกอบ 18 ความคงสภาพทางเคมีและปริมาณคงเหลือของ citronellal ในตำรับ นาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด	64

สัญลักษณ์และคำย่อ

cm	=	เซนติเมตร
nm	=	นาโนเมตร
mg	=	มิลลิกรัม
mg/ml	=	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
mm	=	มิลลิเมตร
ml	=	มิลลิลิตร
mV	=	มิลลิโวลต์
µg	=	ไมโครกรัม
µg/ml	=	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µl	=	ไมโครลิตร
%	=	ร้อยละ
%v/v	=	ร้อยละโดยปริมาตร
%w/w	=	ร้อยละโดยมวล
%w/v	=	ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร
SD	=	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
°C	=	องศาเซลเซียส

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลังและความสำคัญของการวิจัย

โรคกลากเกิดจากเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* เป็นเชื้อราก่อโรคกลากในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ (Dermatophyte) ที่สามารถพบได้ทั้งในคนและในสัตว์ หากมีการติดเชื้อในคนอาจทำให้มีอาการอักเสบบริเวณที่ติดเชื้อและอาจทำให้โครงสร้างเคราตินที่ชั้นผิวหนังมีการเปลี่ยนแปลง (1, 2) เนื่องจากเชื้อราก่อโรคกลากสามารถย่อยเคราตินซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างชนิดหนึ่งพบที่ผิวหนัง เล็บ ขน และผม อาการที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันไปตามอวัยวะที่ติดเชื้อ เช่น กลากที่ผิวหนัง กลากที่ง่ามเท้า กลากที่เล็บและกลากที่หนังศีรษะ การก่อโรคกลากส่วนใหญ่มักเกิดในบริเวณที่อับชื้นโดยพบมากในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ กลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวาน และผู้ที่สัมผัสกับเชื้อราโดยตรงจากธรรมชาติ แม้ว่าโรคผิวหนังอักเสบที่เกิดจากเชื้อราก่อโรคกลากจะไม่ก่อให้เกิดอันตรายรุนแรงแต่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขและทางด้านระบาดวิทยาอย่างมาก เนื่องจากพบการติดเชื้อโรคผิวหนังอักเสบที่เกิดจากเชื้อราก่อโรคกลากในประชากรทั่วโลกสูงถึงร้อยละ 20 – 25 โดยเฉพาะผู้ที่อาศัยในภูมิประเทศแถบร้อนชื้น (3) สำหรับสถานการณ์ปัจจุบันพบว่าการเกิดอุบัติการณ์ดื้อยาต้านเชื้อรามากขึ้น หากมีการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมด้วยอาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สนับสนุนให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นหรือมีการใช้ยาปฏิชีวนะเกินจำเป็นซึ่งอาจส่งผลต่อการดื้อยาปฏิชีวนะในอนาคต

การรักษาโรคกลากในปัจจุบันนิยมใช้ยาทาในกลุ่ม azole derivatives, polyenes derivative, allylamine derivative และ ciclopirox olamine (3) ทั้งนี้ยังไม่มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติหรือจากสมุนไพรสำหรับใช้เป็นยารักษาโรคกลาก จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าพืชในวงศ์ Leguminosae ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลากกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ เช่น คุณ (Cassia fistula L.) (4) เป็นพืชที่นิยมปลูกและแพร่กระจายในทุกภาคของประเทศไทยและหลายประเทศในแถบทวีปเอเชีย ใช้เป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านสำหรับช่วยระบายในประเทศอินเดีย จีน ฮังการี ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย บังคลาเทศ ไทย ในการแพทย์พื้นบ้านของไทยนิยมใช้ใบสดคุณตำให้ละเอียด นำไปพอก หรือใช้ทาตามบริเวณที่เป็นโรคกลาก อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาวิจัยฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลากกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ของสารสกัดใบคุณ เนื้อในฝักคุณ และเมล็ดคุณที่สกัดด้วย 95% เอทานอล นอกจากนี้ มีรายงานว่าพืชในวงศ์ Rutaceae เช่น น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลากกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ โดยมีสารสำคัญคือ citronellal, citronellol และ citronellol acetate (5, 6) ข้อจำกัดของ

น้ำมันหอมระเหยคือไม่มีความคงสภาพทางเคมีและอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ หากนำมาใช้โดยตรง จึงเป็นที่มาของการพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจาก ใบมะกรูด และตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด เพื่อเพิ่มความคงสภาพทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดและลดการระคายเคืองในการใช้ยาผ่านทางผิวหนัง รวมถึงเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งยาผ่านทางผิวหนัง (7)

ไมโครอิมัลชัน (microemulsion) เป็นระบบนำส่งยาในรูปแบบหนึ่งประกอบด้วยวัฏภาค น้ำ วัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว (surfactant) และสารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) ในปริมาณที่มากกว่าร้อยละ 20 ของตำรับ โดยสารลดแรงตึงผิวจะจัดเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) มีลักษณะทรงกลมที่หันส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ออกมาด้านนอกและหันส่วนที่ชอบไขมัน (lipophilic) ไว้ด้านใน (8) มีขนาดอนุภาคประมาณ 10 – 100 nm มีลักษณะทางกายภาพโปร่งแสงหรือโปร่งใส รวมถึงมีความคงสภาพทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamically stable) สำหรับนาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) เป็นระบบของเหลวกระจายตัว ประกอบด้วยน้ำมัน น้ำ และสารลดแรงตึงผิว โดยทั่วไปมักใช้สารลดแรงตึงผิวปริมาณร้อยละ 3 – 10 ของตำรับ สารลดแรงตึงผิวจะจัดเรียงตัวเป็นชั้นเดียวมีลักษณะทรงกลมที่หันส่วนที่ชอบน้ำออกมาด้านนอก และหันส่วนที่ชอบไขมันไว้ด้านในลักษณะคล้ายคลึงกับไมโครอิมัลชัน มีขนาดอนุภาคประมาณ 20 – 500 nm ทั้งนี้ นาโนอิมัลชันเป็นระบบที่ไม่สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติดังนั้นจึงไม่มีความคงสภาพทางอุณหพลศาสตร์ (thermodynamically unstable) แต่มีความคงสภาพทางจลนศาสตร์ (kinetically stable) (9, 10)

งานวิจัยฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลาก *T. mentagrophytes* ของสารสกัด 95% เอทานอลของใบคุณ เนื้อในผักคุณ เมล็ดคุณ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (11, 12) และตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด นอกจากนี้ยังศึกษาความคงสภาพทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดและตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร citronellal ที่เป็นสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วยวิธี UV-Visible Spectrophotometry

ปัญหาการวิจัย

1. น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* หรือไม่
2. สารสกัด 95% เอทานอลจากใบคุณ เนื้อในฝักคุณ และเมล็ดคุณ มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* หรือไม่
3. ตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดช่วยเพิ่มความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดได้หรือไม่
4. ตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดช่วยเพิ่มความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดได้หรือไม่

ความมุ่งหมายของงานวิจัย

1. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด และตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัด 95% เอทานอลจากใบคุณ เนื้อในฝักคุณ และเมล็ดคุณ
3. เพื่อทดสอบความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด และตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* และประเมินความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด และตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด
2. ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* และประเมินความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราของสารสกัด 95% เอทานอลจากใบคุณ เนื้อในฝักคุณ และเมล็ดคุณ
3. ศึกษาและพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด
4. ศึกษาและพัฒนาตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด
5. ศึกษาและพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

6. ทดสอบความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ในตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด และในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

ปัจจัยหรือตัวแปรที่ศึกษา

ระยะที่ 1

ตัวแปรต้น สารสกัด 95% เอทานอลจากใบคูน เนื้อในฝักคูน และเมล็ดคูน

ตัวแปรตาม น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด
ร้อยละผลผลิตของสารสกัด
ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลาก *T. mentagrophytes*
ตัวแปรควบคุม สายพันธุ์ของราก่อโรคกลาก *T. mentagrophytes*
สภาวะการป้อนเชื้อ

ระยะที่ 2

ตัวแปรต้น ตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด
ตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด
ตัวแปรตาม ฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อโรคกลาก *T. mentagrophytes*
ตัวแปรควบคุม สายพันธุ์ของราก่อโรคกลาก *T. mentagrophytes*
สภาวะการป้อนเชื้อ

นิยามศัพท์เฉพาะ

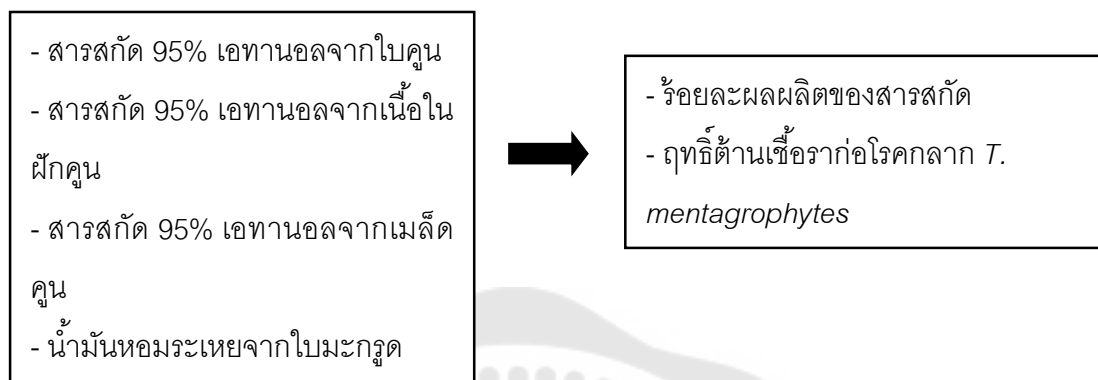
ไมโครอิมัลชัน หมายถึง ระบบของเหลวกระจายตัวที่ประกอบด้วย น้ำ น้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม

นาโนอิมัลชัน หมายถึง ระบบของเหลวกระจายตัวที่ประกอบด้วย น้ำ น้ำมัน และสารลดแรงตึงผิว

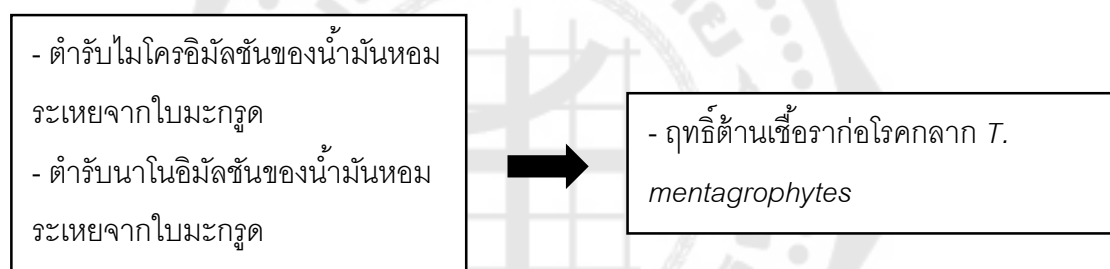
สารสกัด หมายถึง สารสกัด 95% เอทานอลจากใบคูน เนื้อในฝักคูน และเมล็ดคูน
น้ำมันหอมระเหย หมายถึง น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่กลั่นด้วยน้ำ

กรอบแนวคิดในงานวิจัย

ระยะที่ 1



ระยะที่ 2



สมมุติฐานในงานวิจัย

1. น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดและตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes*
2. น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดและตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes*
3. สารสกัด 95% เอทานอลจากใบคุณ เนื้อในฝักคุณ และเมล็ดคุณ มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes*
4. ตำรับไมโครอิมัลชันช่วยเพิ่มความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด
5. ตำรับนาโนอิมัลชันช่วยเพิ่มความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำสารสกัด 95% เอทานอลจากใบคูน เนื้อในฝักคูน เมล็ดคูน และน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมาพัฒนาต่อเป็นยารักษาโรคกลากจากการติดเชื้อรา *T. mentagrophytes*
2. เป็นแนวทางในการพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันจากน้ำมันใบมะกรูด และตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่มีความคงสภาพทางกายภาพและเคมี
3. สามารถใช้วิธีวิเคราะห์สารสำคัญ citronellal ในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ด้วยวิธี UV-Visible Spectrophotometry และการตรวจสอบความถูกต้องด้วยวิธี UV-Visible Spectrophotometry เป็นแนวทางในการทำวิจัยต่อไป



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคกลาก (Ringworm, Tinea หรือ Dermatophytosis)

โรคกลากเกิดจากเชื้อราก่อโรคกลาก เป็นเชื้อราที่สามารถย่อยเคอราตินซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างชนิดหนึ่งพบที่ผิวหนัง เล็บ ขน และผม ก่อให้เกิดพยาธิสภาพบริเวณผิวหนังชั้นนอก เส้นผม ขน และเล็บที่แตกต่างกันไปตามอวัยวะที่ติดเชื้อ โรคกลากมีการกระจายในแต่ละภูมิภาคแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ ความชื้นและลักษณะพฤติกรรมดำรงชีวิตของประชากร เชื้อราก่อโรคกลากที่พบบ่อยในเขตร้อนชื้นที่ก่อโรคกลากทั้งในมนุษย์และในสัตว์มีประมาณ 40 สายพันธุ์ โดยพบว่าเชื้อราก่อโรคกลากที่พบบ่อยในมนุษย์มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Trichophyton*, *Epidermophyton* และ *Microsporum* ตามลำดับ (3, 13) ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคกลากได้แก่ ภาวะความเจ็บป่วยที่ส่งเสริมให้ติดเชื้อโรคกลากได้ง่าย เช่น เบาหวาน โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน พยาธิสภาพทางผิวหนัง เช่น การเกิดแผล หรือรอยถลอก ภาวะอับชื้นหรือบริเวณซอกพับต่าง ๆ เช่น ขาหนีบ รักแร้ ซอกนิ้วเท้า (1)

การก่อโรคกลากในมนุษย์เกิดจากการเจริญของราก่อโรคกลากบริเวณผิวหนัง เนื่องจากเชื้อราก่อโรคกลากจัดเป็นกลุ่ม cutaneous mycoses คือกลุ่มเชื้อราที่เจริญบนชั้นหนังแท้ ได้แก่ บริเวณผม ขน เล็บ และสามารถลุกลามจากชั้น stratum corneum ที่เป็นชั้นหนังกำพร้าไปอยู่ที่รูขุมขน ผม โคนเล็บ และข้างเล็บได้ เมื่อมีการติดเชื้อราในกลุ่มนี้ร่างกายมักจะมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทางร่างกาย เช่น มีการอักเสบ บวม แดง หรือความผิดปกติต่อโครงสร้างผิวหนัง ผม และเล็บ (3)

1.1 อาการและแนวทางการรักษาโรคกลาก

โรคกลากมีลักษณะทางพยาธิสภาพของโรคจะเป็นผื่นมีวงขอบนูนแดงอาจมีลักษณะกลมหรือรีและสามารถลามออกได้ บางครั้งอาจพบขุยสีขาวบริเวณวงผื่นหรืออาจพบตุ่มน้ำหรือหนองบริเวณขอบผื่น ในทางการแพทย์มีการจำแนกชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปตามอวัยวะที่ติดเชื้อ ดังนี้ เช่น กลากบริเวณศีรษะ (*Tinea capitis*) กลากบริเวณใบหน้า (*Tinea faciei*) กลากบริเวณขาหนีบ (*Tinea cruris*) กลากบริเวณลำตัว (*Tinea corporis*) กลากบริเวณเท้า (*Tinea pedis*) กลากบริเวณเล็บ (*Tinea unguium*) เป็นต้น

ในปัจจุบันการรักษาโรคผิวหนังจากเชื้อราแบ่งเป็น 2 วิธี คือ การรักษาด้วยยาชนิดรับประทาน และการรักษาด้วยยาชนิดทาภายนอก ซึ่งเป็นวิธีที่ได้ความนิยมเนื่องจากสะดวก

รวดเร็ว และอาการข้างเคียงจากการใช้ยาก่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการรักษาด้วยยาชนิดรับประทาน แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของรอยโรคและพยาธิสภาพของผู้ป่วย สำหรับการรักษาด้วยยาชนิดทาภายนอกที่นิยมใช้มีดังนี้ (3, 14)

1.1.1 ยากลุ่ม Keratolytic agent มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งและช่วยเร่งการหลุดลอกของผิวหนังที่ทากยา เช่น Whitfield's ointment

1.1.2 ยากลุ่มอนุพันธ์ของ Azole มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้ง cytochrome P-450 ที่เป็นโคเอนไซม์สำหรับการสร้าง ergosterol ที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา เช่น ketoconazole, clotrimazole และ miconazole เป็นต้น

1.1.3 ยากลุ่มอนุพันธ์ของ Polyene มีกลไกการออกฤทธิ์จับกับ ergosterol ที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป เช่น nystatin oral suspension

1.1.4 ยากลุ่มอื่น ๆ เช่น terbinafine, tolnaftate, ciclopirox olamine

1.2 สถานการณ์และความชุกของโรคกลากในปัจจุบัน

จากรายงานความชุกของเชื้อก่อโรคของโรคกลากที่เท่าในคลินิกผู้ป่วยนอก หน่วยโรคผิวหนัง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในปี 2002 พบว่าจากผู้ป่วย 89 จาก 103 คน สามารถเพาะเชื้อได้คิดเป็นร้อยละ 86.41 ของผู้ป่วยทั้งหมด และแยกเป็นเชื้อ *T. mentagrophytes* ได้มากที่สุดถึงร้อยละ 51.46 ของเชื้อก่อโรคกลากทั้งหมด (15) จากการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อราก่อโรคในน้ำจากบริเวณที่มีน้ำท่วมในจังหวัดนราธิวาส ช่วงเดือนตุลาคมในปี 2012 ด้วยวิธีการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อและตรวจเอกลักษณ์ด้วยวิธีทางมหภาคและทางจุลภาค พบว่ามีเชื้อราก่อโรคกลากชนิด *T. mentagrophytes* มากที่สุดถึงร้อยละ 44 รองลงมาพบ *Trichophyton rubrum* และ *Microsporum canis* ประมาณร้อยละ 19 และร้อยละ 15 ตามลำดับ (16) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเชื้อราก่อโรคกลาก *T. mentagrophytes* มีความสำคัญทางระบาดวิทยา อุตสาหกรรมและความชุกของโรคกลากในประเทศไทย

2. ข้อมูลเกี่ยวกับมะกรูด

ชื่อสามัญ (Common name or English name)	: Kaffir Lime
ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name)	: <i>Citrus hystrix</i> DC.
วงศ์ (Family)	: Rutaceae
ชื่อท้องถิ่น (Local name)	: มะกรูด มะขุน มะขูด (พายัพ) ส้มกรูด ส้มมั่วผี (ใต้) มะหูด (หนองคาย)

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น เป็นไม้พุ่มขนาดเล็กสูง 2 - 12 เมตร ลำต้นแตกกิ่งก้านจำนวนมากตั้งแต่ระดับล่างของลำต้นทำให้มีลักษณะเป็นพุ่ม ตามลำต้นและกิ่งมีหนามแหลมยาว 0.5 - 1.5 เซนติเมตร

ใบ เป็นใบประกอบแบบขนานนิ้วมือแบบมีใบย่อยเดี่ยว (unifoliolate palmately compound leaf) ที่จัดเรียงตัวแบบสลับ (alternate) ปลายใบและโคนใบมน ขอบใบเรียบ แผ่นใบเรียบเป็นมันสีเขียวเข้ม มีต่อมน้ำมันอยู่ตามผิวใบ (pellucid dotted, pellucid punctate) มีกลิ่นหอมเฉพาะ ก้านใบมีปีก (wings) คู่คล้ายใบ



ภาพประกอบ 1 แสดงลักษณะของใบ และผลของต้นมะกรูด

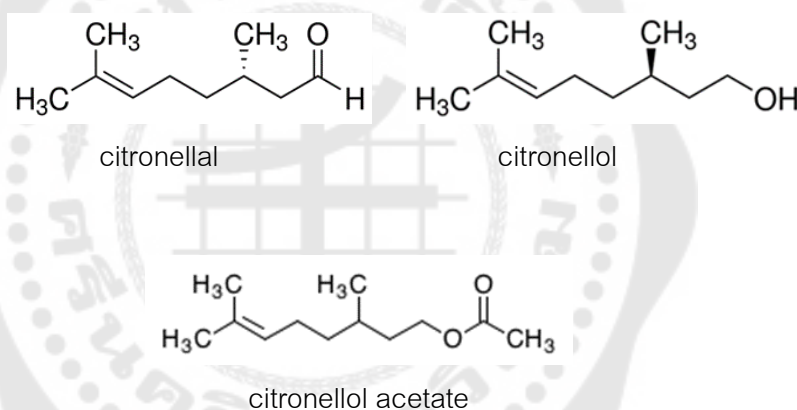
ดอก ออกเป็นช่อตามซอกใบที่ปลายกิ่ง ดอกสีขาว กลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ กลีบดอกมี 5 กลีบ โคนกลีบดอกติดกัน

รังไข่ รังไข่เหนือวงกลีบ (superior ovary) มีฐานรองดอกรูปจาน (disc) รองรับ

ผล แบบ hesperidium รูปทรงกลมหรือรูปไข่ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 - 7 เซนติเมตร โคนผลเรียวเป็นจุก ผิวขรุขระ มีต่อมน้ำมัน ผลอ่อนสีเขียวแก่ สุกเป็นสีเหลือง เมล็ดกลมรี สีขาว มีหลายเมล็ด เนื้อผลมีรสเปรี้ยวปนขมเล็กน้อยดังแสดงในภาพประกอบ 1 (17)

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

ใบมะกรูดเมื่อกลั่นด้วยไอน้ำจะได้น้ำมันหอมระเหยประมาณร้อยละ 0.66 %v/w มีองค์ประกอบหลักเป็น l-citronellal ประมาณร้อยละ 65, citronellol, citronellol acetate นอกจากนี้ยังพบ sabinene, alpha-pinene, beta-pinene, alpha-phellandrene, limonene, terpinene, cymene, linalool และสารอื่นที่พบ ในน้ำมันหรือสารสกัด เช่น rutin, hesperidin, diosmin (18, 19)



ภาพประกอบ 2 แสดงโครงสร้างของ citronellal, citronellol และ citronellol acetate

2.3 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช

การสกัดแยกน้ำมันหอมระเหยจากพืชขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยและคุณภาพของน้ำมันหอมระเหยโดยมีหลายวิธีดังนี้ (17)

2.3.1 การกลั่น (distillation) เป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่นิยมเนื่องจากกระบวนการสกัดไม่ยุ่งยากซับซ้อนและราคาไม่แพงการแยกดังกล่าวจะได้น้ำมันหอมระเหย (essential oil) และ น้ำปรุง (aromatic water) แบ่งออกเป็น การกลั่นด้วยน้ำ (water distillation), การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) และการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation)

2.3.2 การบีบ (expression) ใช้สำหรับพืชที่มีน้ำมันหอมระเหยที่สลายตัวได้ง่าย เมื่อถูกความร้อน

2.3.3 การสกัดโดยใช้ไขมัน (enfleurage) การสกัดโดยใช้ไขมันเป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม มักใช้กับดอกไม้กลีบบาง

2.3.4 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (solvent extraction) ใช้ตัวทำละลายที่ระเหยได้มาสกัดหลังจากนั้นจะแยกตัวทำละลายออกไปโดยการกลั่นภายใต้อุณหภูมิและความดันต่ำ จะได้น้ำมันหอมระเหยชนิด absolute

2.3.5 การสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวภายใต้ความดันสูง (Supercritical carbon-dioxide fluid extraction) เป็นเทคนิคใหม่เหมาะสำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่สลายตัวง่ายเมื่อถูกความร้อน แต่สูญเสียค่าใช้จ่ายมาก

2.4 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

สำหรับงานวิจัยนี้ผู้วิจัยเลือกการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำเนื่องจากเป็นวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยที่เป็นที่นิยม มีกระบวนการสกัดไม่ยุ่งยาก ซับซ้อนและราคาไม่แพง

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

จากการทบทวนวรรณกรรมที่ศึกษาองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดพบว่าองค์ประกอบสำคัญส่วนใหญ่เป็นสารพวก β -citronellal (ร้อยละ 46.40), L-linalool (ร้อยละ 13.11), β -citronellol (ร้อยละ 11.03), citronelyl acetate (ร้อยละ 6.76) และ sabinene (ร้อยละ 5.91) (20) ส่วนงานวิจัยของ Waikedre และคณะในปี 2010 ที่ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *C. hystrix* จากการวิเคราะห์ด้วย chromatography/mass spectrometry (GC/MS) พบว่าองค์ประกอบสำคัญส่วนใหญ่ในน้ำมันหอมระเหยเป็นสารประเภท monoterpenes เช่น terpinen-4-ol (ร้อยละ 13.0), α -terpineol (ร้อยละ 7.6), 1,8-cineole (ร้อยละ 6.4), และ citronellol (ร้อยละ 6.0) และจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดในการต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *C. macroptera* มีค่า MIC เท่ากับ 12.5 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *C. hystrix* มีค่า MIC มากกว่า 100 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูงและยังไม่สามารถหาค่า MIC ที่แท้จริงได้ (5) นอกจากนี้ในปี 2016 ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* ของสารสกัดสมุนไพรที่มีน้ำมันหอมระเหยได้แก่ cinnamon bark, sweet basil leaves, orange peel, spearmint leaves, lemon peel, fennel leaves และ kaffir lime leaves ด้วยวิธี agar disc diffusion จากสารสกัดที่มีความเข้มข้น 5 %v/v และ 10 %v/v พบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อราเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัด

โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีฤทธิ์ด้านการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบในระดับปานกลาง โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.781 $\mu\text{l/ml}$ หรือ 0.078 %v/v (21)

3. ข้อมูลเกี่ยวกับคุณ

ชื่อสามัญ (Common name or English name)	: Golden shower
ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name)	: <i>Cassia fistula</i> L.
วงศ์ (Family)	: Leguminosae
ชื่อท้องถิ่น (Local name)	: คุณ มะะหล່ออ ยู่ (กะเหรี่ยง - แม่ฮ่องสอน), ราชพฤกษ์ ชัยพฤกษ์ (ภาคกลาง), ลมแล้ง (ภาคเหนือ), ราชพฤกษ์ (ภาคใต้)

3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น ไม้ยืนต้น ผลัดใบ สูง 10 - 15 เมตร เปลือกต้นเกลี้ยง สีน้ำตาลอมเทา แตกกิ่งก้านเป็นพุ่มกลม



ภาพประกอบ 3 แสดงลักษณะของใบ ฝัก และดอกของต้นคุณ

ใบ เป็นใบประกอบแบบขนนกชั้นเดียว (uni-pinnate) ออกเรียงสลับ ใบย่อย 3 - 8 คู่ เรียงตรงข้าม รูปไข่แกมขอบขนาน กว้าง 4 - 8 เซนติเมตร ยาว 7 - 12 เซนติเมตร แกนกลางใบ

ประกอบยาว 30 - 40 เซนติเมตร ฐานใบมน ปลายใบแหลม ขอบเรียบเป็นคลื่นเล็กน้อย เนื้อใบเกลี้ยง ค่อนข้างบาง ใบบีมีขนาดเล็กและร่วงง่าย



ภาพประกอบ 4 แสดงลักษณะของเนื้อในฝัก และเมล็ดของคูณ

ดอก ช่อแบบช่อกระจุก (raceme) สีเหลืองสด ออกตามซอกใบหรือปลายยอด 1 - 3 ช่อ เป็นช่อห้อยลงเป็นโคมระย้า ยาว 20 - 40 เซนติเมตร ดอกย่อยจำนวนมาก ขนาดบานกว้างประมาณ 3 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 5 กลีบ รูปไข่แกมรูปรี ผิวด้านนอกมีขน กลีบดอก 5 กลีบ สีเหลือง รูปไข่ ปลายมน เกสรตัวผู้ 10 อัน สั้น 7 อัน ยาว 3 อัน อับเรณูมีขนาดเล็ก ก้านเกสรตัวเมียและรังไข่มีขนยาวคล้ายไหม

ผล เป็นฝักยาวแบบ lomentum รูปแท่งกลม กว้าง 1.5 - 2.5 เซนติเมตร ยาว 20 - 60 เซนติเมตร ฝักอ่อนสีเขียว ฝักแก่สีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ผิวเรียบเกลี้ยง เปลือกฝักแข็งกรอบ ฝักแก่ไม่แตก แต่จะหลุดร่วงทั้งฝัก และหักแตกเป็นชิ้น ภายในฝักจะมีผนังกันเป็นช่องๆ แต่ละช่องมีเมล็ด 1 เมล็ด

เมล็ด เมล็ดมีเนื้อเหนียวเปื่อยสีดำหุ้ม มีรสหวาน เมล็ดแบนรี สีน้ำตาล มีเมล็ด 50 - 70 เมล็ด (22)

3.2 องค์ประกอบทางเคมีของคูณ

เนื้อในฝัก พบสารกลุ่มแอนทราควิโนน เช่น aloin, fistulic acid, rhein, barbaloin, sennoside A, sennoside B เปลือกต้น พบ tannin, rhein, sennoside A, sennoside B, barbaloin, aloin, emodin, chrysophanol (22)

3.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ด้านเชื้อราก่อโรคกลากของคูณ

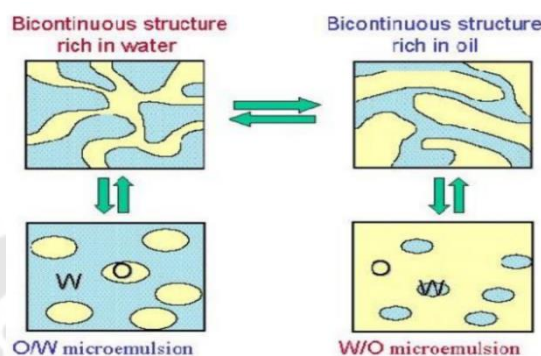
ในปี 2011 มีรายงานว่าสารสกัดใบคูณที่สกัดด้วยเมทานอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *T. rubrum*, *M. gypseum* และ *Penicillium marneffeii* ได้ร้อยละ 100 ที่

ความเข้มข้น 10 mg/ml (23) Duraipandiyan และคณะในปี 2007 ได้ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคกลาก 2 สายพันธุ์ได้แก่ *T. mentagrophytes* และ *Epidermophyton floccosum* พบว่าสารที่สกัดได้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรากลากทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยมี MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (24) และจากการแยกสารสำคัญในสารสกัดจากเอทิลอะซิเตทพบว่าสารสำคัญที่แยกได้คือ 4-hydroxy benzoic acid hydrate ซึ่งไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* และ *E. floccosum* สาร 4-hydroxy benzoic acid hydrate โดยสารกลุ่มดังกล่าวเป็นสารในกลุ่ม phenolic compounds สอดคล้องกับงานวิจัยของ Firedman และคณะในปี 2003 ที่ว่าสารอนุพันธ์ benzoic acid ที่พบในสารสกัดจากพืชสมุนไพรมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และเชื้อไวรัส (25) และงานวิจัยของ Chewchinda และคณะในปี 2013 ศึกษาพบว่าเนื้อในฝักคูนที่สกัดด้วยวิธีต้มในน้ำแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* และ *Microsporum gypseum* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 250 - 500 µg/ml สารสำคัญที่ออกฤทธิ์คือสาร rhein ซึ่งเป็นในกลุ่ม anthraquinone aglycones จากการศึกษาพบว่าสารสกัดฝักคูนให้ฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ดีและมีความคงสภาพดีหลังเก็บไว้นาน 24 เดือน (26) และงานวิจัยของ Bhalodia และคณะในปี 2011 ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของเมล็ดคูนจากการศึกษาพบว่าสารสกัดเมล็ดคูนที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* ดีกว่าเชื้อรา *Aspergillus niger* และ *Aspergillus calvatus* (23) จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดเนื้อในผลของฝักคูนพบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *C. albicans* ที่ดีกว่าเชื้อรา *A. niger* และ *A. calvatus* และจากการเปรียบเทียบตัวทำละลายพบว่าสารสกัดจากคลอโรฟอร์มให้ฤทธิ์ต้านเชื้อราดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำและแอลกอฮอล์ และสารสำคัญที่ทำให้เกิดฤทธิ์อาจเป็นสารกลุ่ม tannin และ phenolic compounds (27)

4. ไมโครอิมัลชัน (Microemulsion)

ไมโครอิมัลชันเป็นระบบกระจายตัว (dispersion) ที่มีรูปแบบการนำส่งยาระดับนาโนเมตร โดยแสงสามารถส่องผ่านโดยไม่มีการหักเหทำให้มีลักษณะทางกายภาพโปร่งใส (transparent) มีความหนืดที่ต่ำซึ่งมีข้อดีกว่าระบบนำส่งยาธรรมดา ระบบนำส่งยาไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่เกิดขึ้นได้เอง (spontaneous) ประกอบด้วยน้ำ น้ำมันและสารก่ออิมัลชัน (emulsifier หรือ emulsifying agent) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และสารลดแรงตึงร่วม (co-surfactant) ทำให้ระบบมีความคงตัวทางอุณหพลวัต (thermodynamically stable)

ไมโครอิมัลชันที่เตรียมอาจแบ่งได้เป็น 3 ประเภทคือ water in oil microemulsion (วัฏภาคน้ำกระจายในวัฏภาคน้ำมัน), oil in water microemulsion (วัฏภาคน้ำมันกระจายในวัฏภาคน้ำ) และ bi-continuous structure ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนขององค์ประกอบในแต่ละตำรับ ดังแสดงตามภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน และไมโครอิมัลชันชนิดต่อเนื่องแบบคู่

ที่ ม า : Muzaffar, Singh, & Chauhan. (2013). Review on microemulsion as futuristic drug delivery p. 40.

4.1 ทฤษฎีการเกิดไมโครอิมัลชัน (Theories of microemulsion)

ในอดีตมีการอ้างอิงทฤษฎีการเกิดและความคงสภาพของไมโครอิมัลชันไว้ 3 ทฤษฎี ได้แก่ Interfacial หรือ Mixed film theory, Solubilization theory และ Thermodynamic theory ในงานวิจัยนี้ขอกล่าวถึง ทฤษฎีทางอุณหพลศาสตร์ Thermodynamic theory ที่อธิบายการเกิดไมโครอิมัลชันจากการเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระ (free energy) ที่เป็นผลมาจากสารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วมระหว่างผิวประจันของวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมันกับการเปลี่ยนแปลงเอนโทรปี (entropy) ของระบบ จากสถานะที่มีสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมส่งผลให้แรงตึงระหว่างผิวประจันลดลง (γ) รวมถึงผลรวมของพื้นที่ผิวของหยดของเหลว (A) ลดลงเช่นกัน แต่ในขณะเดียวกันโมเลกุลของสารลดแรงตึงระหว่างผิวประจันที่มีการจัดเรียงตัวเป็นแบบมอนอเมอร์ไมเซลล์ (monomer-micelle surfactant) เกิดการแพร่กลับไป-มาส่งผลต่อเอนโทรปี (S) ของ

ระบบเพิ่มขึ้น ทำให้ผลลัพธ์การเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระของระบบไมโครอิมัลชันเป็นลบเสมอตามสมการดังต่อไปนี้

$$G_f = \gamma a - TS$$

โดยที่

G_f = free energy of formation

a = change in interfacial area of microemulsion

S = change in entropy of the system

T = temperature

γ = surface tension of oil water interphase

4.2 ส่วนประกอบของของระบบไมโครอิมัลชันและการสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม

1. วัฏภาคน้ำมัน (oil phase) ได้แก่ saturated fatty, unsaturated fatty, fatty acid และตัวยาหรือสารสำคัญที่มีคุณสมบัติชอบน้ำมัน (lipophilic)

2. วัฏภาคน้ำ (aqueous phase) ได้แก่ ส่วนประกอบที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ได้แก่ ตัวยาสำคัญที่ชอบน้ำ สารกันเสีย

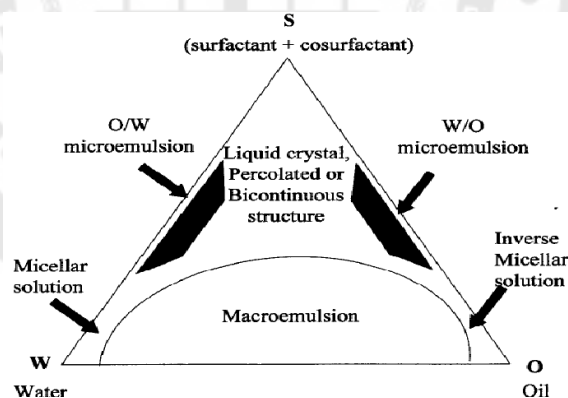
3. สารลดแรงตึงผิวหลัก (primary surfactant) เป็นสารที่ช่วยให้ระบบไมโครอิมัลชันมีความคงสภาพโดยมีหน้าที่หลักในการลดแรงตึงระหว่างผิวประจัน เกิดระบบกระจายตัวระหว่างของเหลวสองชนิด หากแบ่งสารลดแรงตึงผิวตามลักษณะส่วนที่ชอบน้ำของโมเลกุลสามารถแบ่งได้ 4 ประเภท ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (non-ionic surfactant) สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (cationic surfactant) สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) และสารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและลบ (zwitterionic surfactant)

4. สารลดแรงตึงผิวร่วม (co-surfactant) สารลดแรงตึงผิวร่วมเป็นสารจำพวกแอลกอฮอล์ที่มีหมู่ไฮโดรคาร์บอนสายสั้นจนถึงยาวปานกลางโดยแทรกตัวอยู่ในชั้นฟิล์มร่วมกับสารลดแรงตึงผิวหลักบริเวณผิวประจัน ทำให้ฟิล์มระหว่างผิวประจันมีคุณสมบัติยืดหยุ่นและแข็งแรง

สมดุลความชอบน้ำและชอบไขมัน hydrophilic lipophilic balance (HLB) เป็นแนวทางสำหรับอธิบายอัตราส่วนระหว่างสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ที่สนับสนุนการเกิดไมโครอิมัลชันในแต่ละชนิด โดยทั่วไปหากสารลดแรงตึงผิวมีค่า HLB ประมาณ 3-6 จะใช้

เตรียมไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน สารลดแรงตึงผิวมีค่า HLB ประมาณ 8-18 จะใช้เตรียมไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ และถ้าสารลดแรงตึงผิวมีค่า HLB มากกว่า 20 ซึ่งจะไม่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไมโครอิมัลชัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาสารลดแรงตึงผิวร่วมเพื่อลดค่า HLB ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไมโครอิมัลชัน

จากลักษณะไมโครอิมัลชันที่ประกอบด้วย วัฏภาคน้ำ วัฏภาคน้ำมัน สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม เป็นระบบที่สามารถเกิดได้เอง (spontaneous emulsification) โดยไม่อาศัยพลังงานในการเตรียม แต่การเตรียมนั้นก็มีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมและคุณสมบัติของ ไมโครอิมัลชัน รวมถึงการเลือกชนิด ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมให้เหมาะสม โดยการสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม (pseudo ternary phase diagram) จะเป็นสิ่งที่ช่วยหาอัตราส่วนขององค์ประกอบที่เหมาะสมจากการกำหนดแต้มุมของแผนภาพเป็นของส่วนประกอบแต่ละชนิด 100 ส่วน แล้วกำหนดให้อัตราส่วนขององค์ประกอบคู่หนึ่งให้คงที่แล้วเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบที่เหลือ (28) จากการสร้างแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมจะแสดงการเกิดไมโครอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ ไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ไมโครอิมัลชันชนิดต่อเนื่องแบบคู่และอิมัลชันธรรมดา ดังภาพประกอบ 6



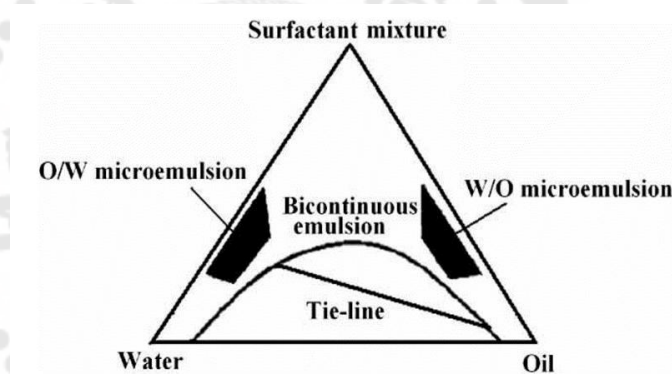
ภาพประกอบ 6 บริเวณการเกิดไมโครอิมัลชัน ไมโครอิมัลชันชนิดต่อเนื่องแบบคู่ และอิมัลชันธรรมดา

ที่ ม า : Muzaffar, Singh, & Chauhan. (2013). Review on microemulsion as futuristic drug delivery p. 43.

4.3 การเตรียมไมโครอิมัลชัน (Microemulsion Preparation)

การเตรียมไมโครอิมัลชันสามารถแบ่งการเตรียมได้เป็น 2 วิธีดังนี้ได้แก่ phase titration method และ phase inversion method

1. การเตรียมไมโครอิมัลชันด้วยวิธี phase titration method หรือ spontaneous emulsification method เป็นการเตรียมไมโครอิมัลชันโดยการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมจากการผสมวัฏภาคน้ำมันรวมกับสารลดแรงตึงผิวหลักและสารลดแรงตึงผิวร่วม จากนั้นค่อย ๆ เติมวัฏภาคน้ำพร้อมกับให้แรงเขย่าทุกครั้งหลังเติมวัฏภาคน้ำ โดยการเกิดระบบไมโครอิมัลชันที่สมดุลนั้นจะได้ของเหลวเนื้อเดียวใสความหนืดต่ำ โดยการเกิดไมโครอิมัลชันสามารถอธิบายอัตราส่วนที่เหมาะสมได้จากการเขียนกราฟในแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม (pseudo-ternary phase diagrams) รวมถึงการเกิดโครงสร้างระบบอื่น ดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 แผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม (pseudo-ternary phase diagrams) แสดงบริเวณเกิดไมโครอิมัลชัน และไมโครอิมัลชันต่อเนื่องแบบคู่

ที่ ม า : Muzaffar, Singh, & Chauhan. (2013). Review on microemulsion as futuristic drug delivery p. 43.

2. การเตรียมไมโครอิมัลชันด้วยวิธี phase inversion method โดยการเติมวัฏภาคน้ำในปริมาณมากเกินพอจนเกิดการกลับวัฏภาคหรือ โดยกลไกการกลับวัฏภาคสัมพันธ์กับความโค้งของการเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวรอบหยด ตัวอย่างของการเกิด oil in water microemulsion จากการเติมวัฏภาคน้ำลงในวัฏภาคน้ำมันที่ผสมสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วม ช่วงแรกจะเกิดไมโครอิมัลชันชนิด water in oil แต่เมื่อปรับเพิ่มอัตราส่วนวัฏภาคน้ำ

ส่งผลให้สารลดแรงตึงผิวเกิดไฮเดรชันเกิดการจัดเรียงตัวรอบหยดของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวมบริเวณผิวประจันเปลี่ยนจากความโค้งงอเป็นลบ (negative curvature) เป็นศูนย์ (zero curvature) โดยจุดนี้จะมีค่าความชอบน้ำและน้ำมันเท่ากันเกิดเป็นไมโครอิมัลชันต่อเนื่องแบบคู่ และเมื่อเติมน้ำจนเกินโครงสร้างจะทำให้เกิดความโค้งงอเป็นบวก เกิดการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวมห่อหุ้มหยดน้ำมันเกิดเป็น o/w microemulsion ขึ้น (12)

4.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้ไมโครอิมัลชัน

ไมโครอิมัลชันได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น ใช้ในระบบนำส่งยาทั้งยาที่ให้ทางหลอดเลือด ยารับประทาน เครื่องสำอาง อาหาร และอาหารเสริม เนื่องจากระบบไมโครอิมัลชันมีขนาดเล็กมากทำให้มีความคงตัวทางจุลนาศาสตร์ต่อแรงของแรงโน้มถ่วงที่มากกระทำต่อหยดภายในอิมัลชันรวมถึงการเคลื่อนที่ในระบบลดลง ทำให้ระบบไมโครอิมัลชันไม่เกิดการรวมกลุ่มกัน (coalescence) ที่ส่งผลให้อายุของผลิตภัณฑ์ยาวนานขึ้น (shelf life) และรวมถึงช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารสำคัญต่อผิวหนังทำให้การออกฤทธิ์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับในงานวิจัยนี้ได้นำประโยชน์ของไมโครอิมัลชันมาใช้ในการเพิ่มการละลายของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการห่อหุ้มสารสำคัญไว้ภายใน และลดอาการข้างเคียงทางผิวหนังหากนำสารสกัดนั้นมาใช้ต่อผิวหนังโดยตรง เช่น การระคายเคืองต่อผิวหนัง (8) นอกจากนี้ระบบของไมโครอิมัลชันสามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (spontaneous emulsification) ไม่จำเป็นต้องอาศัยความร้อนในการเตรียม ส่งผลดีต่อสารสำคัญที่เป็นน้ำมันหอมระเหยหรือสารสำคัญที่ไม่คงสภาพเมื่อสัมผัสความร้อน จากงานวิจัยของ Xia และคณะในปี 2017 ที่ศึกษาการเตรียมตำรับไมโครอิมัลชัน สำหรับนำส่ง Quercetin ทางผิวหนัง จากการเตรียมไมโครอิมัลชันด้วยวิธี water titration โดยใช้ Cremophor® EL และ 1,2-propanediol เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวม และศึกษาความคงสภาพทางเคมีของ quercetin ในตำรับไมโครอิมัลชันจากสภาวะความเป็นกรด-ด่าง พบว่าตำรับไมโครอิมัลชันสามารถช่วยป้องกันการสลายตัวของ quercetin ได้ ซึ่งเป็นผลจาก quercetin ของวัฏภาคภายในของไมโครอิมัลชันถูกห่อหุ้มด้วยฟิล์มของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวรวม (29) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของอัจฉราภรณ์ และคณะในปี 2015 ที่ศึกษาการเพิ่มความคงตัวของสารสกัดชาเขียวในตำรับไมโครอิมัลชัน โดยการวิเคราะห์ปริมาณ caffeine, epicatechin และ epigallocatechin gallate ในตำรับไมโครอิมัลชันและตำรับเจลด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) จากการทดสอบความคงสภาพโดยวิธีเร่งในสภาวะร้อนสลับเย็น จำนวน 6 รอบ พบว่าปริมาณสาร epicatechin และ epigallocatechin gallate ของทั้งสองตำรับ

คงเหลือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนปริมาณสาร caffeine คงเหลือของ ทั้ง 2 ตำรับ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เนื่องจากสาร caffeine เป็นสารที่มีความคงสภาพสูงเสื่อมสลายตัวค่อนข้างยาก ทั้งนี้สามารถอธิบายจากคุณสมบัติทาง อุณหพลศาสตร์ของตำรับไมโครอิมัลชัน ที่ช่วยเพิ่มความคงสภาพของสารสำคัญรวมถึงคุณสมบัติ การกักเก็บสารสำคัญในวัฏภาคภายในของตำรับไมโครอิมัลชัน ที่ช่วยป้องกันสารสำคัญจาก สภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดี (30) และระบบไมโครอิมัลชันยังมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มการ ละลายของตัวยาหรือสารสำคัญที่ละลายน้ำได้น้อย จากงานวิจัยของ Badawi และคณะในปี 2012 ที่ศึกษาประสิทธิภาพของยาด้านเชื้อรา ketoconazole ในรูปแบบไมโครอิมัลชันเปรียบเทียบกับ รูปแบบยาครีมไนโตรอลในการยับยั้งการเจริญเชื้อของเชื้อ *C. albicans* ด้วยวิธี Agar diffusion พบว่ารูปแบบไมโครอิมัลชันมี inhibition zones กว้างกว่ารูปแบบยาครีมไนโตรอล ซึ่งไมโคร อิมัลชันมี inhibition zones เท่ากับ 22.8 ± 2.0 มิลลิเมตร ในขณะที่ยาครีมไนโตรอลมี inhibition zones เท่ากับ 15.3 ± 1.2 มิลลิเมตร ทั้งนี้เป็นผลมาจากอิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวและสารลด แรงตึงผิวร่วมของระบบไมโครอิมัลชันที่ช่วยเพิ่มการละลายตัวยาสำคัญและเพิ่มการซึมผ่าน ผิวหนังทำให้มีผลทำให้ประสิทธิภาพของระบบไมโครอิมัลชันดีกว่ายาในรูปแบบครีม (31) จาก งานวิจัยของ Okonogi และคณะในปี 2012 ที่ศึกษาประสิทธิภาพในฤทธิ์ต้านเอนไซม์ cholinesterase และ เอนไซม์ butyryl-cholinesterase ของน้ำมันหอมระเหยและน้ำมัน หอมระเหยในตำรับไมโครอิมัลชันจากสารสกัดไหล *Zingiber cassumunar* ทดลองด้วยวิธี Ellman's method จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยในตำรับไมโครอิมัลชันช่วยเพิ่ม ประสิทธิภาพในฤทธิ์ต้านเอนไซม์ cholinesterase และ เอนไซม์ butyryl-cholinesterase สูงกว่า น้ำมันหอมระเหยธรรมดาถึง 20 เท่า และ 25 เท่า ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลมาจากการละลายของ น้ำมันหอมระเหยที่เพิ่มขึ้นและความเข้ากันได้กับกับเอนไซม์ทดสอบ (32) และระบบไมโครอิมัลชัน ยังช่วยการนำส่งยาทางผิวหนังสำหรับยาหรือสารสำคัญที่มีการซึมผ่านผิวหนังได้น้อยและไม่คงตัว จากงานวิจัยของ Boonme และคณะในปี 2016 ที่ศึกษาการแทรกผ่านด้วยวิธี Franz diffusion cells ของนิโคตินามายด์ในรูปแบบไมโครอิมัลชันเปรียบเทียบกับนิโคตินามายด์ในรูปแบบ สารละลาย จากการทดลองพบว่าปริมาณการแทรกผ่านของนิโคตินามายด์ในรูปแบบไมโคร อิมัลชันสูงกว่านิโคตินามายด์ในรูปแบบสารละลาย ซึ่งเป็นผลมาจากสารลดแรงตึงผิวในระบบไมโคร อิมัลชันที่ลดบทบาทการเป็นตัวกั้นการแพร่ของผิวหนัง และการกักเก็บสารสำคัญไว้ในวัฏภาค ภายใน รวมถึงขนาดอนุภาคที่เล็กระดับนาโนเมตร ส่งผลให้การนำส่งยาในรูปแบบไมโครอิมัลชันมี ประสิทธิภาพเหนือกว่าการนำส่งยารูปแบบดั้งเดิม (33) จากด้านความคงสภาพตำรับ

ไมโครอิมัลชันได้กล่าวถึงข้อได้เปรียบของตำรับไมโครอิมัลชันที่มีส่วนผสมของ mint oil ในตำรับประเภทน้ำมันในน้ำ ที่ช่วยชะลอการระเหยของน้ำมันหอมระเหย ช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชัน และการเสื่อมสลายของน้ำมันหอมระเหย โดยรายงานผลในรูปร้อยละประสิทธิภาพการกักเก็บ (encapsulation efficiency) จากการทดสอบที่อุณหภูมิ 30 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิมีผลเล็กน้อยต่อร้อยละประสิทธิภาพการกักเก็บ แต่เมื่อเปลี่ยนประเภทของตำรับไมโครอิมัลชันจากประเภทน้ำมันในน้ำเป็นประเภทน้ำในน้ำมัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าร้อยละประสิทธิภาพการกักเก็บลดลงจาก 79.4 เป็น 15.8 ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตำรับไมโครอิมัลชันประเภทน้ำมันในน้ำสามารถช่วยเพิ่มความคงสภาพของน้ำมันหอมระเหยได้ (34) และจากงานวิจัย Chaiyana และคณะในปี 2017 ที่ศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีในตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจาก *Z. cassumunar* Roxb. ด้วยวิธีการเร่งด้วยอุณหภูมิ (heating-cooling stability) พบว่าลักษณะภายนอกของไมโครอิมัลชัน ความหนืด ขนาดอนุภาค และการกระจายตัวของอนุภาคไม่เปลี่ยนแปลง สำหรับความคงสภาพทางเคมีผู้วิจัยใช้สารที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหย คือ sabinene และ terpinen-4-ol ที่ละลายในสารละลายโพพิลีนไกลคอลเปรียบเทียบกับตำรับไมโครอิมัลชัน หลังทดสอบด้วยวิธีการเร่งด้วยอุณหภูมิ พบว่า ปริมาณ sabinene ในสารละลายโพพิลีนไกลคอล ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลจากขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่า terpinen-4-ol สำหรับ Sabinene และ terpinen-4-ol ในตำรับอิมัลชันยังคงมีปริมาณเหมือนเดิม ดังนั้นสรุปว่าตำรับไมโครอิมัลชันมีแนวโน้มที่ช่วยป้องกันสารสำคัญของน้ำมันหอมระเหยจากการระเหยระหว่างการเก็บได้ (35)

5. นาโนอิมัลชัน (nanoemulsion)

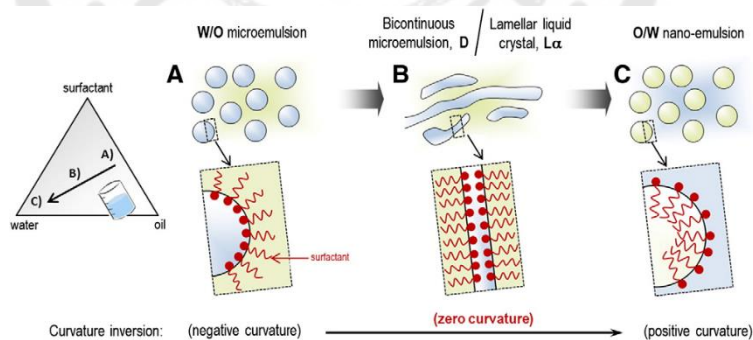
นาโนอิมัลชันเป็นรูปแบบการนำส่งยาระดับนาโนเมตรมีขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 20 - 500 nm มีลักษณะทางกายภาพโปร่งแสง (translucent) มีความหนืดที่ต่ำซึ่งมีข้อดีกว่าระบบนำส่งยาธรรมดา โดยระบบนาโนอิมัลชันแม้ว่าเป็นระบบที่ไม่มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์ แต่มีความคงตัวทางจลนศาสตร์ทั้งนี้ระบบนาโนอิมัลชันมักมีปัญหาด้านความคงสภาพ จากการเกิด ostwald ripening ซึ่งเป็นการแพร่ของโมเลกุลที่อยู่หยดเล็กไปสู่หยดใหญ่ เนื่องจากค่าศักย์เคมีหรือค่าการละลายในหยดเล็กมีค่าสูงกว่าในหยดใหญ่ ทำให้เกิดแรงขับสำหรับการเคลื่อนย้ายสาร จากหยดเล็กไปสู่หยดใหญ่ ทำให้หยดใหญ่มีขนาดเพิ่มขึ้นและหยดเล็กมีขนาดเล็กลง (10, 36)

นาโนอิมัลชันเป็นระบบกระจายตัว (dispersion) ที่ประกอบด้วยของเหลว 2 ชนิด ได้แก่ น้ำและน้ำมัน และทำให้เกิดเป็นนาโนอิมัลชันได้ด้วยสารก่ออิมัลชัน (emulsifier หรือ emulsifying

agent) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และสารลดแรงตึงร่วม (co-surfactant) โดยการเกิดนาโนอิมัลชันไม่สามารถเกิดเองได้ในธรรมชาติ ต้องอาศัยพลังงานช่วยในการเตรียมโดยประเภทอนุภาคนาโนอิมัลชันที่เตรียมอาจแบ่งได้เป็น 3 ประเภทคือ water in oil nanoemulsion (วัฏภาคน้ำกระจายในวัฏภาคน้ำมัน), oil in water emulsion (วัฏภาคน้ำมันกระจายในวัฏภาคน้ำ) และ bi-continuous nanoemulsion ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนขององค์ประกอบในแต่ละตำรับ (37)

5.1 การเตรียมนาโนอิมัลชัน (Nanoemulsions Preparation)

การเตรียมนาโนอิมัลชันสามารถแบ่งการเตรียมได้เป็น 2 วิธีดังนี้ได้แก่ high-energy emulsification methods และ low - energy emulsification methods สำหรับงานวิจัยนี้เน้นการเตรียมแบบใช้พลังงานต่ำ low - energy emulsification methods โดยการเกิด phase inversion composition (PIC) เป็นวิธีการกลับวัฏภาคโดยสัดส่วนจากการค่อยๆ เติมวัฏภาคภายนอกลงในวัฏภาคภายในที่มีสารก่ออิมัลชันหรือสารลดแรงตึงผิว เช่น การเติมน้ำลงในน้ำมันที่มีสารลดแรงตึงผิวประเภทกลุ่มของ polyoxyethylene (polyoxyethylene sorbitan monooleate; Tween 80) จะทำให้สายโซ่ของ polyoxyethylene อิ่มตัวด้วยน้ำทำให้ความโค้งของการจัดเรียงตัวรอบหยดน้ำจากเดิมเป็นลบ (negative curvature) ค่อยๆ เปลี่ยนเป็นบวก (positive curvature) เกิดองค์ประกอบอนุภาคน้ำมันขนาดเล็กที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารลดแรงตึงผิวโดยการเตรียมวิธีนี้เหมาะกับการใช้สารสำคัญที่ไม่ทนความร้อน (38) ดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 กลไกการเกิดนาโนอิมัลชันด้วยวิธี Phase Inversion Composition

ที่มา : Solans C & Solé I. (2012). Nano-emulsions: formation by low-energy methods p. 250

5.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้นาโนอิมัลชัน

นาโนอิมัลชันได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันมีการนำไปประยุกต์ใช้มากมาย เช่น ใช้ในระบบนำส่งยาทั้งยาที่ให้ทางหลอดเลือด ยารับประทาน เครื่องสำอาง อาหารและอาหารเสริม เนื่องจากหยดอนุภาคขนาดเล็กมากของนาโนอิมัลชันทำให้มีความคงตัวทางจลนศาสตร์ ส่งผลให้แรงโน้มถ่วงที่มากกระทำต่อหยดภายในอิมัลชันรวมถึงการเคลื่อนที่ในระบบลดลง ทำให้นาโนอิมัลชันไม่เกิดการแยกชั้น (coalescence) และช่วยเพิ่มการซึมผ่านของสารสำคัญต่อผิวหนัง ทำให้การออกฤทธิ์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับในงานวิจัยนี้ได้นำประโยชน์ของนาโนอิมัลชันมาใช้ในการเพิ่มการละลายของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการห่อหุ้มสารสำคัญไว้ภายใน และลดอาการข้างเคียงทางผิวหนังหากนำสารสกัดนั้นมาใช้ต่อผิวหนังโดยตรง เช่น การระคายเคืองต่อผิวหนัง นอกจากนี้นาโนอิมัลชันยังช่วยเพิ่มความคงสภาพของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยเมื่อเทียบกับอิมัลชันธรรมดา และศึกษาวิธีเตรียมนาโนอิมัลชันแบบกลับวัฏภาคโดยสัดส่วน ซึ่งเหมาะกับสารสำคัญที่ไม่ทนความร้อน

จากงานวิจัยของ Danielli และคณะในปี 2013 ที่ศึกษาประสิทธิภาพการต้านเชื้อราก่อโรคกลาก ที่สารสำคัญเป็นน้ำมันหอมระเหย และตำรับนาโนอิมัลชันจาก *Stenachaenium megapotamicum* (Spreng.) จากการเตรียมนาโนอิมัลชันวิธี spontaneous emulsification และใช้ polysorbate เป็นสารลดแรงตึงผิว คัดเลือกเชื้อรากลาก 3 สายพันธุ์ ที่ไวต่อสารสกัดน้ำมันหอมระเหยและ thymol ได้แก่ *Epidermophyton floccosum*, *T. rubrum* และ *Scytalidium dimiatum* เพื่อหาค่า Minimum inhibitory concentration; MIC ด้วยวิธี broth microdilution จากน้ำมันหอมระเหย thymol และตำรับนาโนอิมัลชัน โดยเปรียบเทียบกับยามาตรฐาน Terbinafine พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *E. floccosum* และ *T. rubrum* อยู่ในช่วง 20.81 - 166.25 µg/ml และตำรับนาโนอิมัลชันค่า MIC ต่อเชื้อ *E. floccosum* และ *T. rubrum* อยู่ในช่วง 5.18 - 41.50 µg/ml ทั้งนี้อาจเป็นผลจากระบบนาโนอิมัลชันที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งสารสำคัญไปออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์จุลชีพเป้าหมาย โดยเป็นที่ทราบกันดีว่าสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ นอกจากจะมีผลต่อลักษณะทางกายภาพของนาโนอิมัลชันแล้วยังมีต่อการตอบสนองต่อประสิทธิภาพทางชีวภาพด้วย (39)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1. กระบอกฉีดยา (syringe) ปริมาตร 3 ml
2. บีกเกอร์ (Beaker) ยี่ห้อ Pyrex® ขนาด 100 ml
3. บีกเกอร์ (Beaker) ยี่ห้อ Pyrex® ขนาด 250 ml
4. หลอดทดลองฝาเกลียว (Screw cap test tube) ยี่ห้อ Pyrex® ขนาด 10 ml
5. หลอดทดลอง (Test tube) ยี่ห้อ Pyrex® ขนาด 20 ml
6. หลอดไมโครเซนตริฟิว Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ยี่ห้อ Axygen®
7. หลอดไมโครเซนตริฟิว Microcentrifuge tube ขนาด 5 ml ยี่ห้อ Eppendorf®
8. Autopipette ยี่ห้อ Biohit proline® ขนาด 20-200 µl
9. Autopipette ยี่ห้อ Biohit proline® ขนาด 200-1,000 µl
10. Microcuvettes quartz ยี่ห้อ Hellma® chamber volume 1,000 µl
11. Pipette tip ยี่ห้อ Bioline® ขนาด 200 µl
12. Pipette tip ยี่ห้อ Kirgen® ขนาด 1,000 µl

1.2 เครื่องมือ

1. เครื่องเขย่าสาร Vortex mixer ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น G560E ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องวัดขนาดอนุภาคและความต่างศักย์บนผิวอนุภาค Zetasizer ยี่ห้อ Malvern รุ่น Nano ZS ประเทศอังกฤษ
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง UV-Visible Spectrophotometer ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV 1601 ประเทศญี่ปุ่น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP221S ประเทศเยอรมนี
5. ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย Clevenger Apparatus
6. ชุดสกัด Soxhlet (Soxhlet Extractor)
7. ตู้บ่มเชื้อ Incubator ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE600 ประเทศเยอรมนี
8. ตู้ปลอดเชื้อ Laminar hood (Biosafety cabinet class II ยี่ห้อ ESCO Air Stream รุ่น AC2-4E ประเทศสิงคโปร์

1.3 สารเคมี

1. น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด
2. สารสกัด 95% เอทานอล จากใบคุณ เนื้อในผักคุณ เมล็ดคุณ
3. สารมาตรฐาน Citronellal Sigma-aldrich® บริษัทชิกมา-อัลดริช คอร์ปอเรชั่น ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
4. สารมาตรฐาน Clotrimazole Sigma-aldrich® บริษัทชิกมา-อัลดริช คอร์ปอเรชั่น ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. สารมาตรฐาน Ketoconazole Sigma-aldrich® บริษัทชิกมา-อัลดริช คอร์ปอเรชั่น ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. Dimethyl sulfoxide; DMSO (Analytical grade) บริษัท อาร์ซีไอ แล็บสแกน ประเทศไทย
7. Ethyl alcohol (commercial grade) บริษัท อาร์ซีไอ แล็บสแกน ประเทศไทย
8. Hyaluronic acid MySkinRecipes® บริษัท จันท์เจ้า ลองจีวีดี จำกัด ประเทศไทย
9. Potato dextrose broth (PDB) Difco™ ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. Poloxamer 188 บริษัท BASF ประเทศเยอรมนี
11. Poly-oxyethylene sorbitan monooleate (Tween® 80) บริษัท หน้าเขียน ประเทศไทย

1.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 (American Type culture Collection, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2. วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 การเตรียมตัวอย่างและเตรียมสารสกัดใบคุณ เนื้อในผักคุณ และเมล็ดคุณ

- 2.1.1 ล้างใบสด และผลคุณให้สะอาด ผึ่งแดดให้แห้ง 3 วัน อบในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (อบลมร้อนซ้ำ 2 ครั้ง)
- 2.1.2 นำใบคุณมาบดลดขนาดด้วยเครื่องบดจนได้ผงหยาบ สำหรับเนื้อในผักคุณ ใช้อุปกรณ์ทุบผักให้แตกแยก เก็บเนื้อในผัก และเมล็ดออกจากกัน โดยนำเมล็ดคุณมาบดลดขนาดด้วยเครื่องบดจนได้ผงหยาบ

2.1.3 ชั่งผงใบคูน เนื้อในฝักคูน และเมล็ดคูนน้ำหนักประมาณ 14.00 กรัม, 20.75 กรัม และ 35.35 กรัม ตามลำดับ ลงในทิมเบิล (thimble) ของชุด soxhlet extractor สกัดสารตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด โดยต้มกับตัวทำละลาย 95% เอทานอล ปริมาตร 300 ml เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง

2.1.4 เมื่อครบเวลานำสารสกัดในตัวทำละลาย 95% เอทานอลที่ได้มาแยกเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)

2.1.5 นำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายต่อไปในถ้วยระเหย (evaporating dish) จนได้สารสกัดชิ้นเหนียว เก็บสารสกัดจากตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา คำนวณหา %yield จากสมการ (1)

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

2.2 การเตรียมตัวอย่างและการเตรียมสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.2.1 ล้างใบมะกรูดสดให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง พร้อมฉีกใบเพื่อลดขนาด

2.2.2 บรรจุใบมะกรูดสดประมาณ 600 กรัม ลงหม้อกลั่นเติมน้ำกลั่นพอท่วมสมุนไพร กลั่นน้ำมันหอมระเหยด้วย Clevenger Apparatus

2.2.3 กลั่นน้ำมันหอมระเหยระยะเวลา 2.5 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำมันหอมระเหยไม่เพิ่มขึ้น (กลั่นซ้ำทั้งหมด 7 ครั้ง จากใบมะกรูดสดรวม 4,097 กรัม)

2.2.4 ถายน้ำมันหอมระเหยลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งให้แยกชั้นแล้วใช้หลอดหยดดูดชั้นน้ำมันหอมระเหยออกจากชั้นน้ำ ใส่ลงในขวดสีชา และใช้ anhydrous sodium sulfate ดูดน้ำออกก่อน แยกเอาแต่ชั้นน้ำมันหอมระเหยบรรจุในขวดสีชา พันด้วยพาราฟิล์ม ติดฉลากเก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 องศาเซลเซียส

คำนวณหา %yield จากสมการ (1)

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ด้วยวิธี broth macrodilution

2.3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB)

2.3.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth จำนวน 100 ml โดยชั่งผง potato dextrose medium จำนวน 2.4 กรัม กระจายตัวในน้ำ 100 ml ในขวดฝาเกลียว

2.3.1.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีการนึ่งมาเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3.2 การเตรียมสารทดสอบจากใบคูน เนื้อในผักคูน และเมล็ดคูน

2.3.2.1 ชั่งสารสกัดใบคูน เนื้อในผักคูน และเมล็ดคูน อย่างละ 200 mg ละลายด้วยตัวทำละลาย 100% DMSO ปริมาตร 1 ml แยกแต่ละตัวอย่างใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 ml นำไปละลายด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) จนสารสกัดละลายหมด

2.3.2.2 ปิเปตสารสกัดจากหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ ปริมาตร 40 μ l ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth ปริมาตร 1,960 μ l ได้สารละลายเข้มข้น 4 mg/ml

2.3.2.3 ปิเปตสารทดสอบมาปริมาตร 1 ml เจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงแบบ 2 เท่า (two-folded serial dilution) ในสารละลาย 2% DMSO ใน potato dextrose broth ปริมาตร 1 ml ทำเช่นนี้จนครบทั้งหมด 7 ความเข้มข้น

2.3.3 การเตรียมสารทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.3.3.1 นำขวดน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดออกจากตู้เย็นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที ให้น้ำมันหอมระเหยคายความเย็น

2.3.3.2 ละลายน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วย 2 %v/v DMSO ใน potato dextrose broth ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 4 %v/v

2.3.3.3 ปิเปตสารทดสอบมาปริมาตร 1 ml เจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงแบบ 2 เท่า (two-folded serial dilution) ในสารละลาย 2% DMSO ใน potato dextrose broth ปริมาตร 1 ml ทำเช่นนี้จนครบทั้งหมด 7 ความเข้มข้น

2.3.4 การเพาะเชื้อทดสอบ

2.3.4.1 เพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. mentagrophytes* ใน potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.3.5. การตรวจสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อราการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราโดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ (Minimum inhibitory concentration, MIC) ของสารสกัดจากใบคูน เนื้อในผักคูน เมล็ดคูน และน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดต่อเชื้อรา *T. mentagrophytes*

2.3.5.1 ใส่สารทดสอบความเข้มข้นต่างกัน 2 เท่า ทั้งหมด 7 ความเข้มข้น โดยเริ่มที่ความเข้มข้น 4 %v/v ปริมาตร 1 ml สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด และเริ่มที่ความเข้มข้น 4 mg/ml ปริมาตร 1 ml สำหรับจากสกัดจากใบคูน เนื้อในฝักคูน เมล็ดคูน ในหลอดทดลองปราศจากเชื้อ

2.3.5.2 เตรียมสารแขวนตะกอนของเชื้อรา *T. mentagrophytes* ในน้ำปราศจากเชื้อให้มีความหนาแน่นเท่ากับ McFarland standard 0.5 ซึ่งจะมีเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU/ml แล้วนำสารแขวนตะกอนที่ได้มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อรา potato dextrose broth ให้มีปริมาณของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5% ปริมาตรต่อปริมาตร

2.3.5.3 ผสมเชื้อที่เตรียมขึ้นในข้อ 2.3.5.2 ปริมาตร 1 ml ลงในสารทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมขึ้น จะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของสารทดสอบลดลงครึ่งหนึ่งจากความเข้มข้นที่เตรียมขึ้นในข้อ 2.3.5.1 และปริมาณของเชื้อในการทดสอบจะลดลงครึ่งหนึ่งจากที่เตรียมขึ้นในข้อ 2.3.5.2 เช่นเดียวกัน รวมถึงปริมาณ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายก็จะลดลงครึ่งหนึ่งเช่นเดียวกัน

2.3.5.4 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) 2% DMSO ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกลุ่มตัวทำละลายควบคุม (solvent control) ซึ่งจะมีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 1% และใช้ clotrimazole และ Ketoconazole เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) ซึ่งจะมีความเข้มข้นสุดท้ายของ clotrimazole เท่ากับ 500 µg/ml และ ketoconazole เท่ากับ 10 µg/ml

2.3.5.5 บ่มชุดทดสอบในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน แล้วสังเกตการเจริญของเชื้อราด้วยตาเปล่า ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อราจะเป็นค่า minimum inhibitory concentration (MIC)

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ของไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธี agar well diffusion

2.4.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

2.4.1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar จำนวน 100 ml โดยชั่งผง potato dextrose medium จำนวน 2.4 กรัม และผง agar จำนวน 1.5 กรัม กระจายตัวใน น้ำ 100 ml ในขวดฝาเกลียว

2.4.1.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.4.1.3 เทออาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงในจานเพาะเชื้อปราศจากเชื้อ (sterile petri dish) ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเชื้อ แล้วทิ้งไว้ให้แห้งตัวเป็น agar plate

2.4.2 การเพาะเชื้อทดสอบ

2.4.2.1 เพาะเลี้ยงเชื้อรา *T. mentagrophytes* ATCC 9533 ใน potato dextrose broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดต่อฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ด้วยวิธี agar well diffusion

2.4.3.1 เตรียมสารแขวนตะกอนเชื้อรา *T. mentagrophytes* ในน้ำปราศจากเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 แล้วนำสารแขวนตะกอนที่ได้ 100 μ l หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง potato dextrose agar (PDA) ที่ทำการเจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ไว้แล้วด้วย cylinder cup จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อทำการป้ายเชื้อราให้ทั่วผิวหน้าอาหาร

2.4.3.2 ใส่ผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อราใส่ลงในรูที่เจาะไว้ให้เต็ม

2.4.3.3 ใช้ตำรับไมโครอิมัลชันเปล่าเป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) และใช้ clotrimazole ความเข้มข้น 10 mg/ml และ Ketoconazole 200 μ g/ml เป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) โดยหยด clotrimazole และ ketoconazole ลงไปในรูที่เจาะไว้ปริมาตร 100 μ l

2.4.3.4 บ่มชุดทดสอบที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น ทำการทดสอบซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ($n=3$) นำ inhibition zone ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยแล้วรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย inhibition zone $\pm$ SD

2.4.3.5 ทำการทดสอบแบบเดียวกันสำหรับผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อราที่เตรียมเสร็จทันที (freshly prepare) และผลิตภัณฑ์ต้านเชื้อราที่ทำการทดสอบความคงสภาพเสร็จสิ้นแล้ว

2.5 การเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (Kaffir lime oil microemulsion)

2.5.1 เตรียมสารผสมของสารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมโดยใช้ Tween 80[®] และ propylene glycol ในอัตราส่วน 1:0, 1:1, 2:1 และ 3:1 (%w/w)

2.5.2 ผสมน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดและสารลดแรงตึงผิว และ/หรือสารลดแรงตึงผิวร่วมในอัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 และ 9:1 (%v/v)

2.5.3 เติมน้ำปราศจากไอออนลงไปในส่วนผสมระหว่างน้ำมันหอมระเหยกับสารลดแรงตึงผิวครั้งละ 100 μ l ทั้งหมด 10 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออนครั้งละ 1,000 ml จนครบ 11,000 ml ที่อุณหภูมิห้องในแต่ละครั้งที่มีการเติมน้ำ ผสมสารผสมด้วย vortex เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นสังเกตลักษณะของสารผสมว่าใส โปร่งแสง หรือขุ่นขาว

2.5.4 ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่าและมองตำรับไมโครอิมัลชันในหลอดทดลองทะลุผ่านตัวหนังสือ

ตัวอย่างของส่วนประกอบของตำรับไมโครอิมัลชันดังแสดงในตาราง 1

ตาราง 1 แสดงตัวอย่างอัตราส่วนของส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน

Oil (μ l)	Smix (μ l)	Water (μ l)	Total volume	ลักษณะ ภายนอก	Oil (%)	Smix (%)	Water (%)
100	900	100	1100		9.09	81.82	9.09
100	900	200	1200		8.33	75.00	16.67
100	900	300	1300		7.69	69.23	23.08
100	900	400	1400		7.14	64.29	28.57
100	900	500	1500		6.67	60.00	33.33
100	900	600	1600		6.25	56.25	37.50
100	900	700	1700		5.88	52.94	41.18
100	900	800	1800		5.56	50.00	44.44
100	900	900	1900		5.26	47.37	47.37
100	900	1000	2000		5.00	45.00	50.00
100	900	1100	2100		4.76	42.86	52.38
100	900	2000	3000		3.33	30.00	66.67
100	900	3000	4000		2.50	22.50	75.00
100	900	4000	5000		2.00	18.00	80.00
100	900	5000	6000		1.67	15.00	83.33
100	900	6000	7000		1.43	12.86	85.71

ตาราง 1 แสดงตัวอย่างอัตราส่วนของส่วนประกอบของไมโครอิมัลชัน (ต่อ)

Oil (μ l)	Smix (μ l)	Water (μ l)	Total volume	ลักษณะ ภายนอก	Oil (%)	Smix (%)	Water (%)
100	900	7000	8000		1.25	11.25	87.50
100	900	8000	9000		1.11	10.00	88.89
100	900	9000	10000		1.00	9.00	90.00
100	900	10000	11000		0.91	8.18	90.91

2.6 ศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.6.1 ขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค (Polydispersity Index; Pdl) และศักย์ซีต้า (Zeta potential)

2.6.1.1 ดูดสารตัวอย่างของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดปริมาตร 100 μ l ผสมลงในกลั่นปริมาตร 900 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร

2.6.1.2 วัดขนาดอนุภาค (size) การกระจายของอนุภาค (Polydispersity Index; Pdl) และศักย์ซีต้า (Zeta potential) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคและความต่างศักย์บนผิวอนุภาค โดยใช้ disposable folded capillary cell บรรจุตัวอย่างวัดซ้ำ 3 ตัวอย่าง นำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.7 การวิเคราะห์ปริมาณ citronellal equivalent ในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยเทคนิค UV-Visible Spectrophotometry และการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

2.7.1 เตรียมสารมาตรฐาน citronellal ใน สารละลาย 100% DMSO โดยปิเปตสารละลายมาตรฐาน citronellal ปริมาตร 25 μ l เติมลงใน DMSO ปริมาตร 975 μ l เพื่อจางให้มีความเข้มข้นลดลงแบบ 2 เท่า (two-fold serial dilution) ในสารละลาย DMSO ให้มีช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ช่วงความเข้มข้น 0.02 – 1.25 %v/v

2.7.2 เตรียมสารตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด โดยดูดสารตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดปริมาตร 25 μ l เติมลงใน DMSO ปริมาตร 975 μ l เพื่อจางให้มีความเข้มข้นลดลงแบบ 2 เท่า (two-fold serial dilution) ในสารละลาย DMSO ให้มีช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ช่วงความเข้มข้น 0.02 – 1.25 %v/v

2.7.3 เลือกความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ max) ของสารมาตรฐาน citronellal ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 400 nm

2.7.4 ศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (Linearity and range) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน citronellal ใน DMSO ให้มีช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ช่วงความเข้มข้น 0.02 – 1.25 %v/v นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุด นำค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟเส้นตรงเพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้น โดยบ่งบอกจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ซึ่งควรเข้าใกล้ 1 หรือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R Square (R^2)) ไม่น้อยกว่า 0.995

2.7.5 ศึกษาความถูกต้องของวิธีทดสอบ (Accuracy) โดยการเติมสารมาตรฐาน citronellal (reference standard) ในความเข้มข้น 50, 100 และ 150% ของสารตัวอย่าง citronellal 0.15 %v/v คำนวณ %recovery จากสูตรต่อไปนี้ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุด

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ปริมาณสารที่วิเคราะห์ spiked sample} - \text{ปริมาณสารใน unspiked sample}}{\text{ปริมาณสารที่เติมลงไป}} \times 100$$

2.7.6 ศึกษาความแม่นยำของวิธีทดสอบ (Precision) จากการทำ intraday และ interday precision โดยศึกษา intraday precision จากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน citronellal ใน สารละลาย DMSO ให้มีช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ช่วงความเข้มข้น 0.02 – 1.25 %v/v ทำซ้ำ 3 ครั้ง (ภายในวันเดียว) และ ศึกษา interday precision จากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน citronellal ใน สารละลาย DMSO ให้มีช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ช่วงความเข้มข้น 0.02 – 1.25 %v/v ทำซ้ำ 3 ครั้ง (วิเคราะห์ในวันที่ย่างกัน) คำนวณ % relative standard deviation (% RSD) จากสูตรต่อไปนี้ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุด

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ย}} \times 100$$

2.7.7 ศึกษาความไวของวิธีทดสอบ (Sensitivity) ของ citronellal equivalent ในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดจากค่า limit of quantification (LOQ) และ limit of detection (LOD) คำนวณ limit of quantification (LOQ) จากสมการ $LOQ = 10 \times N/B$ และคำนวณ limit of detection (LOD) จากสมการ $LOD = 3.3 \times N/B$ โดยตัวแปร 'N' แทนส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉลี่ยของ intercept ของกราฟมาตรฐาน citronellal standard curve ($n = 3$) และ ตัวแปร 'B' แทนค่าเฉลี่ยของความชันของกราฟมาตรฐาน citronellal standard curve ($n = 3$) ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงมากที่สุด

2.8 การหาปริมาณ citronellal equivalent ในตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.8.1 เตรียมวัตถุดิบของตำรับไมโครอิมัลชันเป็นสารละลาย Blank

2.8.2 เจือจางตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด และสารละลาย Blank 10 เท่า ด้วย DMSO ในหลอดไมโครเซนติฟิวขนาด 1.5 ml เขย่าสารด้วยเครื่องเขย่าสาร

2.8.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่กักเก็บในตำรับไมโครอิมัลชันด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer วัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

2.8.4 คำนวณปริมาณ citronellal equivalent ในตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด โดยอาศัยสมการแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ citronellal และค่าการดูดกลืนแสง จาก %Assay ของปริมาณ citronellal equivalent ตามสูตรคำนวณดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Assay} = \frac{\text{ปริมาณ citronellal equivalent ที่วิเคราะห์ได้} \times 100}{\text{ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ใช้เตรียมตำรับ}}$$

2.9 ศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.9.1 เตรียมตัวอย่างตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.9.1.1 เตรียมตัวอย่างตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่มีขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาคและศักย์ซีต้าที่เหมาะสมที่สุด ปริมาตร 10 ml ด้วยวิธีการไทเตรทจำนวน 3 ตัวอย่าง

2.9.1.2 เก็บตัวอย่างตำรับไมโครอิมัลชันที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วันเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีที่เวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน

2.9.2 การประเมินความคงสภาพของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.9.2.1 การประเมินความคงสภาพทางกายภาพของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.9.2.2 วัดขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค และค่าศักย์ซีต้าของตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน คำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.9.3 การประเมินความคงสภาพทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.9.3.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันหอมระเหยในตำรับไมโครอิมัลชันที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer

2.9.3.2 คำนวณปริมาณน้ำมันหอมระเหยในตำรับไมโครอิมัลชัน จากสมการแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ citronellal และค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณ %Assay ของปริมาณ citronellal equivalent ตามสูตรคำนวณที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

2.10 การเตรียมนานอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (Kaffir lime oil nanoemulsion)

2.10.1 เตรียมสารละลาย 1% w/v Hyaluronic acid (small molecule)

2.10.1.1 โปรรยผง Hyaluronic acid (small molecule) 1 กรัม ลงในก้านปริมาตร 100 ml โดยกวนบนเครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) ที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที ได้สารละลายใส

2.10.2 เตรียมสารละลาย 10% w/v Poloxamer-188

2.10.2.1 โปรรยผง Poloxamer-188 น้ำหนัก 10 กรัม ลงในก้านปริมาตร 100 ml โดยกวนบนเครื่องกวนสารละลาย (magnetic stirrer) ที่ความเร็วรอบ 750 รอบต่อนาที จนได้สารละลายใส

2.10.3 เตรียมนาโนอิมัลชันด้วยวิธี phase inversion composition (PIC)

เตรียมนาน้ำมันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดโดยใช้ Tween 80® (HLB 15) เป็นสารก่ออิมัลชัน โดยเตรียมน้ำมันอิมัลชันทั้งหมด 3 ตำรับ ปริมาตร 10 ml ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 สูตรตำรับการเตรียมนาน้ำมันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ตำรับที่ 1	ตำรับที่ 2	ตำรับที่ 3
น้ำมัน	Kaffir lime oil	100	100	100
	Tween® 80	200	200	200
น้ำ	1% Hyaluronic acid	-	1,500	1,500
	10% Poloxamer-188	-	-	6,000
	Purified water	9,700	8,200	2,200

2.10.3.1 ตำรับที่ 1 เติม tween 80® ปริมาตร 200 µl ผสมกับน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดปริมาตร 100 µl ในหลอดทดลอง (test tube) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 15 วินาที จนได้สารละลายใส

2.10.3.2 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 9,700 µl โดยผสมครั้งละประมาณ 1,000 µl เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนน้ำหมด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 30 วินาที

2.10.3.3 สำหรับตำรับที่ 2 เมื่อได้สารละลายใสในข้อ 2.10.3.1 เติมสารละลาย 1% Hyaluronic acid ปริมาตร 1,500 µl โดยเติมครั้งละประมาณ 1,000 µl เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนสารละลาย 1% Hyaluronic acid หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 8,200 µl โดยเติมครั้งละประมาณ 1,000 µl เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนน้ำกลั่นหมด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร ครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 30 วินาที

2.10.3.4 สำหรับตำรับที่ 3 เมื่อได้สารละลายใสในข้อ 2.10.3.1 ผสมสารละลาย 1% Hyaluronic acid ปริมาตร 1,500 µl โดยเติมครั้งละประมาณ 1,000 µl เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนสารละลาย 1% Hyaluronic acid หมด และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10% Poloxamer-188 ปริมาตร 6,000 µl โดยเติมครั้งละประมาณ 1,000 µl เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนสารละลาย 10% Poloxamer-188 หมด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2,200

μl โดยเติมครั้งละประมาณ 1,000 μl เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 15 วินาที จนน้ำกลั่นหมด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร ครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 30 วินาที

2.11 ศึกษาคุณลักษณะ (characterization) ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.11.1 ขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาค (Polydispersity Index; Pdl) และ ศักย์ซีต้า (Zeta potential)

2.11.1.1 ดูดสารตัวอย่างของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดปริมาตร 100 μl ผสมลงในกลั่นปริมาตร 900 μl ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร

2.11.1.2 วัดขนาดอนุภาค (size) การกระจายของอนุภาค (Polydispersity Index; Pdl) และศักย์ซีต้า (Zeta potential) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคและความต่างศักย์บนผิวอนุภาค โดยใช้ disposable folded capillary cell บรรจุน้ำสารละลายตัวอย่าง วัดซ้ำ 3 ตัวอย่าง นำค่าที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.12 การหาปริมาณ citronellal equivalent ในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.12.1 เตรียมวัตถุดิบของตำรับนาโนอิมัลชันเป็นสารละลาย Blank

2.12.2 เจือจางตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด และสารละลาย Blank 10 เท่า ด้วย DMSO ในหลอดไมโครเซนติฟิวขนาด 1.5 ml เขย่าสารด้วยเครื่องเขย่าสาร

2.12.3 วิเคราะห์ปริมาณ citronellal equivalent ที่กักเก็บในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด

2.12.4 คำนวณปริมาณ citronellal equivalent ในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด โดยอาศัยสมการแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ citronellal และค่าการดูดกลืนแสง จาก %Assay ของปริมาณ citronellal equivalent ตามสูตรคำนวณดังต่อไปนี้

$$\% \text{Assay} = \frac{\text{ปริมาณ citronellal equivalent ที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ใช้เตรียมตำรับ}} \times 100$$

2.13 ศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.13.1 เตรียมตัวอย่างตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.13.1.1 เตรียมตัวอย่างตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่มีขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาคและศักย์ซีต้าที่เหมาะสมที่สุด ปริมาตร 10 ml ด้วยวิธีการไตเตรทจำนวน 3 ตัวอย่าง

2.13.1.2 เตรียมตัวอย่างตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่มีขนาดอนุภาค การกระจายของอนุภาคและศักย์ซีต้าที่เหมาะสมที่สุด ปริมาตร 10 ml ด้วยวิธีการกลับวัฏภาคจำนวน 3 ตัวอย่าง

2.13.1.3 เก็บตัวอย่างตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วันเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีที่เวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน

2.13.2 การประเมินความคงสภาพของตำรับไมโครอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.13.2.1 การประเมินความคงสภาพทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.13.2.2 วัดขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค และค่าศักย์ซีต้าของตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน คำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.13.3 การประเมินความคงสภาพทางเคมีของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

2.13.3.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำมันหอมระเหยในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer

2.13.3.2 คำนวณปริมาณน้ำมันหอมระเหยในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด จากสมการแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ citronellal และค่าการดูดกลืนแสงเพื่อคำนวณ %Assay ของปริมาณ citronellal equivalent ในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดตามสูตรคำนวณที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

2.14 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน พิสูจน์หาค่าความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ตัวทดสอบทางสถิติคือ t-test ในกรณีเปรียบเทียบตัวอย่าง 2 ชนิด หรือวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างค่ากลางของตัวอย่างโดยการวิเคราะห์ผ่านค่าความแปรปรวน (Analysis of variance) ในกรณีที่เปรียบเทียบตัวอย่างมากกว่า 2 ชนิด

2.15 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

การดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลองที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ตำบลองครักษ์ อำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก



บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

1. ผลการเตรียมสารสกัดจากใบคุณ เนื้อในผักคุณ เมล็ดคุณ และใบมะกรูด

จากการสกัดใบคุณ เนื้อในผักคุณ และเมล็ดคุณ ด้วยวิธี Soxhlet extraction โดยใช้ตัวทำละลาย 95% เอทานอล เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง พบว่าให้ร้อยละผลผลิตของสารสกัด (%yield) เท่ากับ 21.42, 20.62 และ 7.78 %w/w ตามลำดับ สำหรับการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (hydro-distillation) พบว่าให้ร้อยละผลผลิตของสารสกัดเท่ากับ 0.62 %w/w จากรายงานวิจัยของ Wulandari และคณะในปี 2017 พบว่าการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยการกลั่นด้วยน้ำให้ %yield ของน้ำมันหอมระเหยเท่ากับร้อยละ 0.65 ± 0.03 %w/w (40) ซึ่งใกล้เคียงกับ %yield ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ในการศึกษานี้ การสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่นด้วยน้ำเป็นวิธีที่สะดวกไม่ยุ่งยากซับซ้อน และให้ %yield ค่อนข้างมาก ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 แสดง %yield ของสารสกัดจากใบ เนื้อในผัก เมล็ดคุณ และน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

สมุนไพร	%yield
ใบคุณ	21.42
เนื้อในผักคุณ	20.26
เมล็ดคุณ	7.78
ใบมะกรูด	0.62

2. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดใบคุณ เนื้อในผักคุณ เมล็ดคุณ และน้ำมันมะกรูดต่อการยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes*

จากการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดในฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* ด้วยวิธี broth macrodilution เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *T. mentagrophytes* เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ketoconazole 500 µg/ml และ clotrimazole 10 µg/ml พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีค่า MIC ต่อเชื้อรา

T. mentagrophytes ต่ำที่สุดคือ 0.125 %v/v หรือ 1.06 µg/ml จากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีค่า MIC ต่อเชื้อรา *T. mentagrophytes* มากกว่า 100 µg/ml ซึ่งเป็นค่าค่อนข้างสูงและยังไม่สามารถหาค่า MIC ที่แท้จริงได้ แต่สำหรับงานวิจัยฉบับนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* ดีที่สุด เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้มีองค์ประกอบหลักทางเคมีเป็นสาร citronellal ซึ่งเป็นสารสำคัญที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* สำหรับงานวิจัยที่ศึกษาก่อนหน้าของ Waikedre และคณะ ในปี 2010 พบว่าองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดเป็นสาร terpinen-4-ol โดยมะกรูดที่นำมาทดสอบดังกล่าวเป็นมะกรูดที่ปลูกในนิวแคลิโดเนีย ประเทศฝรั่งเศส แม้ว่าสายพันธุ์ของมะกรูดจะเป็นสายพันธุ์เดียวกันหากปลูกในภูมิภาคที่แตกต่างกันก็อาจส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดรวมถึงการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ รองลงมาเป็นสารสกัดจากใบคูนมีค่า MIC เท่ากับ 2 mg/ml และสารสกัดจากเนื้อในฝักคูน และเมล็ดคูนมีค่า MIC > 2 mg/ml และตามตาราง 4 ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดจึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรากล่อโรคทางผิวหนังต่อไป

ตาราง 4 แสดงค่า MIC ของสารสกัดใบคูน เนื้อในฝักคูน เมล็ดคูน และน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดต่อเชื้อรา *T. mentagrophytes*

สมุนไพร	ค่า MIC ของ <i>T. mentagrophytes</i>
น้ำมันใบมะกรูด	0.125 %v/v
ใบคูน	2 mg/ml
เนื้อในฝักคูน	> 2 mg/ml
เมล็ดคูน	> 2 mg/ml

3. ผลการวิเคราะห์หาสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (kaffir lime oil) ด้วย Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)

จากการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธี Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) ที่ส่งวิเคราะห์โดยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่ามีองค์ประกอบของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยประมาณ 57 ชนิด ได้แก่ citronellal, citronellol,

linalool และอนุพันธ์ของสารเทอร์ปีน (terpene) โดยสาร citronellal เป็นสารสำคัญที่พบมากที่สุดตามตาราง 5 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Othman และคณะในปี 2016 ซึ่งศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของของส่วนผิวเปลือกและใบในพืชตระกูล *Citrus* species จากการสกัดด้วยวิธี hydro-distillation โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีสาร citronellal ในองค์ประกอบมากที่สุดร้อยละ 72.4 ต่างจากน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่มีสาร citronellal ในองค์ประกอบประมาณร้อยละ 11.7 (41) และจากงานวิจัยของ Muhammad Nor และคณะในปี 1999 ซึ่งศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดจากวิธีการสกัดที่แตกต่างกันและวิเคราะห์ด้วยวิธี GC-MS พบว่ามีสาร l-citronellal เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (19) จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าสาร citronellal เป็นสารประกอบโมโนเทอร์ปีน (monoterpenes) ประเภทออกซิเจนเตตโมโนเทอร์ปีน (oxygenated monoterpenes) ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. rubrum* ในสายพันธุ์ ATCC 1683 และ LM 422 โดยมี MIC เท่ากับ 128 µg/ml (42)

ตาราง 5 ข้อมูลทางเคมีของสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดจากการวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography-mass spectrometry)

Retention time (min)	Chemical name	CAS NO.	% Area
5.868	2-Hexenal, (E)-	006728-26-3	0.03
5.970	3-Hexen-1-ol, (Z)-	000928-96-1	0.16
6.469	1-Hexanol	000111-27-3	0.02
8.630	3-Thujene	002867-05-2	0.03
8.872	2-Pinene	000080-56-8	0.10
10.514	4(10)-Thujene	003387-41-5	2.31
10.595	2(10)-Pinene	000127-91-3	0.15
11.293	.beta.-Myrcene	000123-35-3	1.23
11.760	1-Phellandrene	2000048-82-3	0.04
11.981	3-Carene	013466-78-9	0.08

ตาราง 5 ข้อมูลทางเคมีของสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดจากการวิเคราะห์
โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography-mass spectrometry) (ต่อ)

Retention time (min)	Chemical name	CAS NO.	% Area
12.260	1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	000099-86-5	0.13
12.594	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-	000535-77-3	0.02
12.748	Limonene	000138-86-3	0.30
13.209	1,3,7-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-	006874-10-8	0.07
13.619	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)-	003779-61-1	0.75
13.841	2,6-DIMETHYL HEPT-5-EN-1-AL	000106-72-9	0.09
13.988	.gamma.-Terpinene	000099-85-4	0.25
14.333	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,2.alpha.,5.alpha.)-	017699-16-0	0.07
14.564	2-Furanmethanol, 5-ethanyltetrahydro-2.alpha.,.alpha.,5-trimethyl-, cis-	005989-33-3	1.28
15.184	Ethyl 2-(5-methyl-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl)-propan-2-yl carbonate	2000340-67-1	0.85
15.723	Linalool	000078-70-6	5.66
16.089	2H-Pyran, tetrahydro-4-methyl-2-(2-methyl-1-propenyl)-	016409-43-1	0.14
16.321	(E)-4,8-Dimethylnona-1,3,7-triene	019945-61-0	0.04
16.717	(2S,4R)-4-Methyl-2-(2-methylprop-1-en-1-yl)tetrahydro-2H-pyran	003033-23-6	0.05
17.119	5-Hepten-1-ol, 2,6-dimethyl-	004234-93-9	0.07
17.397	Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethenyl)-	007786-67-6	3.16

ตาราง 5 ข้อมูลทางเคมีของสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดจากการวิเคราะห์
โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography-mass spectrometry) (ต่อ)

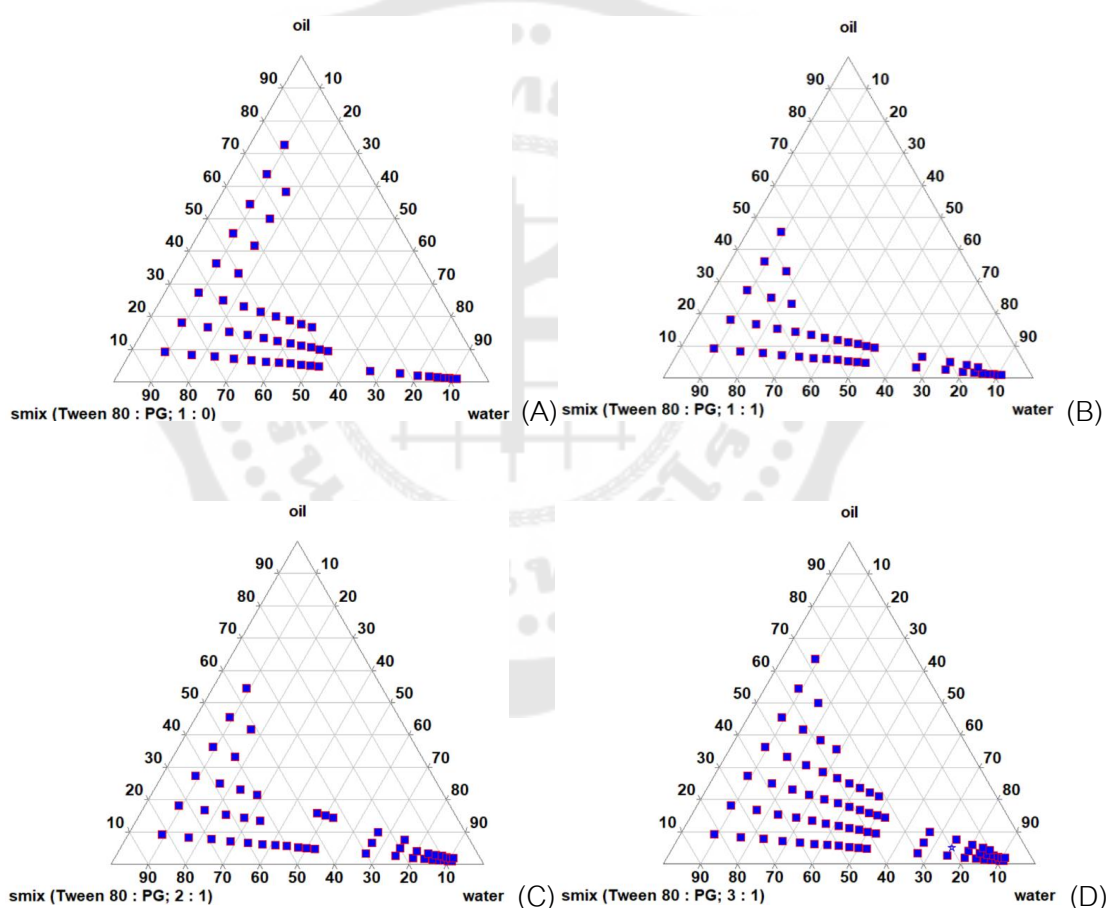
Retention time (min)	Chemical name	CAS NO.	% Area
18.233	Citronellal	000106-23-0	47.96
18.498	(+)-Neo-isopulegol	2000082-73-2	0.37
18.739	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	000562-74-3	0.72
19.158	.alpha.-Terpineol	000098-55-5	0.09
20.782	Citronellol	000106-22-9	19.24
21.392	(2S)-2,6-Dimethyl-5-hepten-1-ol	2000059-27-9	0.14
21.480	Geraniol	000106-24-1	0.49
21.641	6,7-Epoxy-3,7-dimethyloctanal	2000121-16-1	0.25
23.709	6-Octenoic acid, 3,7-dimethyl-	000502-47-6	0.35
24.135	(1S,2R,5R)-2-(2-Hydroxypropan-2-yl)-5-methylcyclohexanol	092471-23-3	0.53
24.840	2,6-Octadiene, 2,6-dimethyl-	002792-39-4	5.05
24.931	p-Menthane-3,8-diol, cis-1,3,trans-1,4-	003564-98-5	0.11
25.154	Neryl acetate	000141-12-8	0.25
25.515	.alfa.-Copaene	2000215-97-9	0.12
25.783	Geranyl acetate	000105-87-3	0.85
25.987	1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene, 2,3,3a.alpha.,3b.alpha.,4,5,6,7-octahydro-4.alpha.-isopropyl-7.beta.-methyl-3-methylene-	013744-15-5	0.05

ตาราง 5 ข้อมูลทางเคมีของสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดจากการวิเคราะห์
โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography-mass spectrometry) (ต่อ)

Retention time (min)	Chemical name	CAS NO.	% Area
26.929	Caryophyllene	000087-44-5	1.32
27.987	alpha-Humulene	006753-98-6	0.25
28.843	Germacrene	023986-74-5	0.12
29.323	Bicyclo[8.1.0]undeca-2,6-diene, 3,7,11,11-tetramethyl-, (1R*,2Z,6E,10R*)- (.+-.)-	100762-46-7	0.45
29.651	alpha-Farnesene	000502-61-4	0.15
29.885	(3R,3aR,3bR,4S,7R,7aR)-4-Isopropyl-3,7- dimethyloctahydro-1H-cyclopenta [1,3]cyclopropa[1,2]benzen-3-ol	038230-60-3	0.14
30.125	.delta.-Cadinene	000483-76-1	0.46
30.887	Elemol	000639-99-6	0.40
31.304	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	007212-44-4	1.36
31.896	(-)-Globulol	000489-41-8	0.19
33.548	.tau.-Muurolol	019912-62-0	0.21
33.902	.alpha.-Cadinol	000481-34-5	0.24
34.847	6,10-Dodecadien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-	051411-24-6	0.16
42.907	(E)-2,6,11,15-Tetramethyl-2,8,14- hexadecatriene	2000454-37-6	0.26
45.259	Phytol	000150-86-7	0.13

4. ผลการเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (Kaffir lime oil microemulsion) โดยวิธีการไตเตรท (titration method)

จากการเตรียมตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธีการไตเตรทเพื่อหาอัตราส่วนของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด น้ำปราศจากไอออน Tween[®] 80 และ propylene glycol ที่ทำให้เกิดไมโครอิมัลชันเป็นบริเวณกว้างบนแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม (pseudoternary phase diagram) จากการกำหนด Tween[®] 80 และ propylene glycol ในอัตราส่วน 1:0, 1:1, 2:1 และ 3:1 ตามลำดับ พบว่าสารลดแรงตึงผิวผสมในอัตราส่วน Tween[®] 80 : propylene glycol (3:1) ให้พื้นที่เป็นบริเวณกว้างที่สุด ดังแสดงตามภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 บริเวณเกิดไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดบนแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียมในอัตราส่วนของ Tween[®] 80 : propylene glycol (A) 1:0, (B) 1:1, (C) 2:1 และ (D) 3:1

4.1 การวัดขนาดอนุภาค (size) การกระจายของขนาดอนุภาค (Pdl) และค่าศักย์ซีต้า (zeta potential)

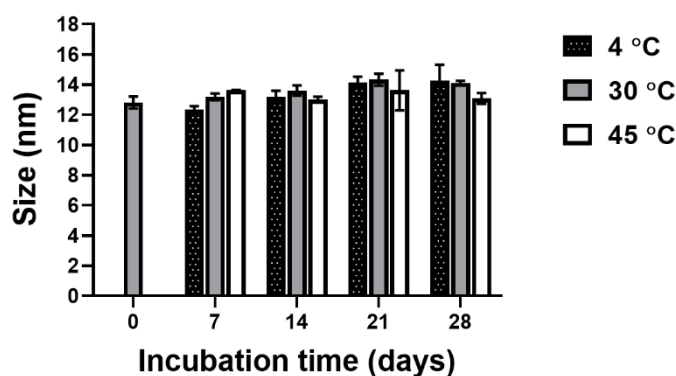
ผลจากการศึกษาอัตราส่วนขององค์ประกอบของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ในแต่ละตำรับทั้ง 4 ตำรับที่มีอัตราส่วนขององค์ประกอบของสารลดแรงตึงผิวหลักและสารลดแรงตึงผิวร่วมในตำรับที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยเลือกตำรับที่มีสารลดแรงตึงผิวหลัก Tween[®] 80 และสารลดแรงตึงผิวร่วม propylene glycol (3:1) เนื่องจากอัตราส่วนของสารลดแรงตึงผิวผสมดังกล่าวเกิดบริเวณไมโครอิมัลชันกว้างที่สุด และหากพิจารณาในอัตราส่วนขององค์ประกอบทั้ง 3 วัสดุ ได้แก่ oil, surfactant mix และน้ำ โดยผู้วิจัยเลือกตำรับที่มีสารลดแรงตึงผิวผสมไม่เกินร้อยละ 20 และสามารถ load ปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดได้มาก ดังแสดงตามภาพประกอบ 9(D) ที่ใช้สัญลักษณ์แทนรูปดาว เนื่องจากตำรับไมโครอิมัลชันดังกล่าวมีลักษณะภายนอกใสและสามารถบรรจุปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดได้มาก เพื่อนำมาศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด โดยการเก็บตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค ค่าศักย์ซีต้าของตำรับไมโครอิมัลชันน้ำมันของหอมระเหยจากใบมะกรูด หลังเตรียมเสร็จทันที และหลังจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ดังแสดงตามตาราง 6

ตาราง 6 ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค และค่าศักย์ซีต้าของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด หลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ในแต่ละช่วงเวลา

ตำรับ	อุณหภูมิ	Size (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)
หลังเตรียมเสร็จทันที	30 °C	12.82 ± 0.40	0.183 ± 0.072	-7.87 ± 0.06
หลังเก็บไว้ 7 วัน	4 °C	12.35 ± 0.23	0.199 ± 0.039	-9.15 ± 1.35
	30 °C	13.19 ± 0.22	0.273 ± 0.043	-6.75 ± 1.00
	45 °C	13.63 ± 0.02	0.231 ± 0.031	-5.29 ± 0.32
หลังเก็บไว้ 14 วัน	4 °C	13.18 ± 0.42	0.235 ± 0.028	-5.84 ± 0.30
	30 °C	13.61 ± 0.34	0.215 ± 0.014	-5.83 ± 1.35
	45 °C	13.01 ± 0.19	0.279 ± 0.085	-3.73 ± 0.43
หลังเก็บไว้ 21 วัน	4 °C	14.13 ± 0.40	0.238 ± 0.078	-7.23 ± 0.90
	30 °C	14.33 ± 0.39	0.225 ± 0.029	-5.87 ± 1.50
	45 °C	13.62 ± 1.32	0.217 ± 0.058	-4.73 ± 1.17
หลังเก็บไว้ 28 วัน	4 °C	14.27 ± 1.05	0.248 ± 0.053	-6.11 ± 1.06
	30 °C	14.10 ± 0.15	0.198 ± 0.015	-5.20 ± 0.59
	45 °C	13.09 ± 0.36	0.190 ± 0.021	-2.48 ± 0.46

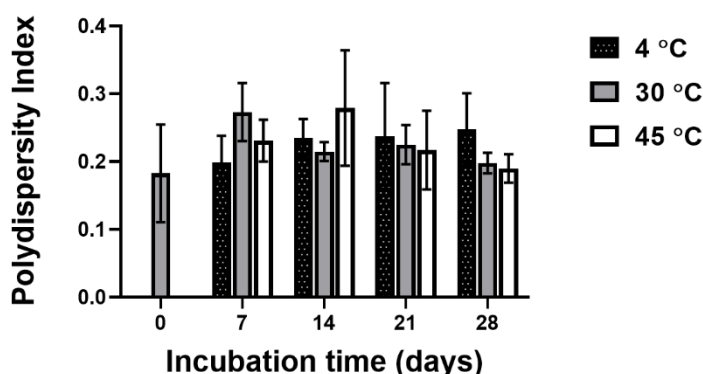
การประเมินขนาดอนุภาคของตัวอย่างที่เก็บไว้ในสภาวะที่แตกต่างกันคือ ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ที่เวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยขนาดอนุภาคหลังจากเตรียมเสร็จทันที มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 12.82 ± 0.40 nm เมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่าง ๆ จนครบ 28 วัน พบว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยไม่แตกต่างกับขนาดอนุภาคหลังเตรียมเสร็จทันที ดังแสดงตามภาพประกอบ 10 อาจเป็นเพราะระบบภายในของตำรับไมโครอิมัลชันมีความคงสภาพทางอุณหพลศาสตร์ (37) ทำให้การเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคภายในค่อนข้างต่ำดังตัวอย่างงานวิจัยที่เคยศึกษาการพัฒนาตำรับไมโครอิมัลชันเพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวของสารสกัดชาเขียว โดยผู้วิจัยพบว่าตำรับไมโครอิมัลชันช่วยเพิ่มความคง

สภาพทางกายโดยทั้งขนาดอนุภาคและการกระจายอนุภาคหลังทดสอบความคงสภาพไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคที่เตรียมเสร็จทันที (30)



ภาพประกอบ 10 ขนาดอนุภาค (size) ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7, 14 และ 28 วัน

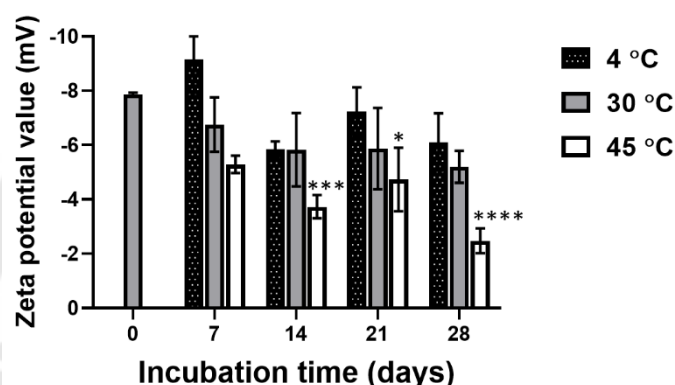
เมื่อพิจารณาผลของการศึกษาความคงสภาพในด้านการกระจายของขนาดอนุภาคของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ดังแสดงตามภาพประกอบ 11 มีการกระจายขนาดอนุภาคหลังจากเตรียมเสร็จทันทีที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.183 ± 0.072 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 28 วัน พบว่าตัวอย่างที่เก็บในทุกอุณหภูมิ มีค่าการกระจายของขนาดอนุภาคไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการกระจายของอนุภาคหลังเตรียมเสร็จทันที ทั้งนี้อาจเป็นผลจากระบบไมโครอิมัลชันมีความคงสภาพทางอุณหพลศาสตร์



ภาพประกอบ 11 การกระจายขนาดอนุภาค (PDI) ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14 และ 28 วัน

ค่าศักย์ซีต้าของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด หลังเตรียมเสร็จทันทีที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ -7.87 ± 0.06 mV แสดงให้เห็นว่าตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีประจุไฟฟ้าที่ผิวเป็นลบเล็กน้อย แม้ว่าสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุ จากงานวิจัยของ Ariviani และคณะในปี 2015 ซึ่งศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี β -carotene microemulsions ที่ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุเป็นสารก่ออิมัลชันพบว่าอนุภาคตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีผิวประจุเป็นลบ โดยอาจเกิดจากการดูดซับไฮดรอกซิลไอออน (OH^-) จากวัฏภาคน้ำที่ผิวของไมโครอิมัลชัน (43) เมื่อเก็บตำรับไมโครอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 28 วัน พบว่าตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน มีค่าศักย์ซีต้าของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด เป็นลบลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าศักย์ซีต้าของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันที แต่สำหรับตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่าง ๆ จนครบ 28 วัน มีค่าศักย์ซีต้าของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดอย่างไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าศักย์ซีต้าของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันที แสดงให้เห็นว่าการเก็บตัวอย่างตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่ 45 องศาเซลเซียส มีผลต่อค่าศักย์ซีต้าเปรียบเทียบกับตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แม้ว่าการเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส มีผลต่อค่าศักย์ซีต้าของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดให้ลดลงเล็กน้อยหลังจากเก็บไว้จนตลอดการทดสอบ 28 วัน ดัง

แสดงตามภาพประกอบ 12 ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ได้มีผลต่อลักษณะทางกายภาพในภาพรวม เช่น ชุ่น ตกตะกอน และแยกชั้น แม้ว่าตามทฤษฎีค่าศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมควรมีค่าในช่วงสูงกว่า ± 30 mV (44, 45) เพื่อป้องกันอนุภาคอื่นที่เข้ามาทำให้เกิดความไม่คงสภาพการกระจายตัวหรือเกิดการรวมกัน แต่สำหรับระบบไมโครอิมัลชันไม่ว่าพื้นผิวอนุภาคจะมีประจุหรือไม่ก็ตาม ไม่ได้ส่งผลต่อความคงสภาพทางกายภาพของระบบไมโครอิมัลชัน เนื่องจากขนาดอนุภาคที่มีเล็กมากทำให้ระบบไมโครอิมัลชันมีความคงสภาพ (46)



ภาพประกอบ 12 ค่าศักย์ไฟฟ้า (zeta potential) ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

* $p < 0.0078$, *** $p < 0.0009$ และ **** $p < 0.0001$ เปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

4.2 การศึกษาความคงสภาพทางเคมีและปริมาณคงเหลือของ citronellal equivalent ในตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

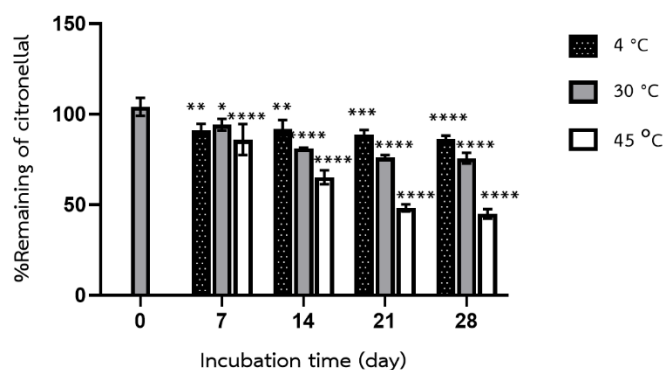
ความคงสภาพทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดในตำรับไมโครอิมัลชัน ตรวจสอบจากปริมาณของ citronellal equivalent ที่เหลืออยู่ในตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ศึกษาโดยการเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส จนครบกำหนดเวลา 28 วัน เพื่อวัดปริมาณคงเหลือของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดในตำรับไมโครอิมัลชันเมื่อเวลาผ่านไปแต่ละสัปดาห์ โดยตัวอย่างตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดเริ่มต้นจะแสดงผลเป็น %Assay ของปริมาณ citronellal equivalent มีค่าเฉลี่ยประมาณร้อยละ 104.11 ± 4.90 เมื่อเก็บตัวอย่างจนครบตามระยะเวลาที่กำหนดพบว่าที่อุณหภูมิ

30 และ 45 องศาเซลเซียส มีร้อยละปริมาณคงเหลือลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละปริมาณคงเหลือหลังเตรียมเสร็จทันที โดยลดลงจากเริ่มต้นประมาณร้อยละ 27.25 และ 56.77 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีร้อยละปริมาณคงเหลือลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละปริมาณคงเหลือหลังเตรียมเสร็จทันที โดยลดลงจากเริ่มต้นประมาณร้อยละ 17.05 ดังแสดงตามตาราง 7 และดังแสดงตามภาพประกอบ 13 แม้ว่าระบบไมโครอิมัลชันจะมีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์แต่หากเก็บในที่อุณหภูมิสูงเกินไปอาจส่งผลต่อร้อยละปริมาณคงเหลือได้เนื่องจากสารสำคัญในระบบประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยที่อาจเสื่อมสลายจากการระเหย และออกซิเดชัน เมื่อสัมผัสสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง (47)

ดังนั้นจากผลการศึกษาสนับสนุนชัดเจนว่าควรเก็บรักษาตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทำให้ตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีความคงสภาพทางเคมีมากที่สุด

ตาราง 7 แสดงปริมาณคงเหลือของ citronellal equivalent ในตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ในแต่ละช่วงเวลา

ตำรับ	อุณหภูมิ	ร้อยละคงเหลือ
หลังเตรียมเสร็จทันที	30 °C	104.11 ± 4.90
	4 °C	91.13 ± 3.55
หลังเก็บไว้ 7 วัน	30 °C	94.17 ± 3.29
	45 °C	85.95 ± 8.56
	4 °C	91.82 ± 4.98
หลังเก็บไว้ 14 วัน	30 °C	81.15 ± 0.39
	45 °C	65.14 ± 3.86
	4 °C	88.77 ± 2.57
หลังเก็บไว้ 21 วัน	30 °C	76.22 ± 1.17
	45 °C	48.24 ± 1.93
	4 °C	86.36 ± 1.77
หลังเก็บไว้ 28 วัน	30 °C	75.74 ± 2.99
	45 °C	45.01 ± 2.57



ภาพประกอบ 13 ความคงสภาพทางเคมีและปริมาณคงเหลือของ citronellal ในตำรับ
ไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ และ **** $p < 0.0001$ เปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

5. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธี agar well diffusion

จากการทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ketoconazole และ clotrimazole พบว่าตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดเกิดโซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* กว้างกว่าสารละลายมาตรฐาน ketoconazole และ clotrimazole โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ *T. mentagrophytes* มากกว่า 4 เซนติเมตร สำหรับตำรับไมโครอิมัลชันเปล่าไม่เกิดโซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* ดังแสดงตามตาราง 8 จะเห็นได้ว่ารับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* เหนือกว่าสารละลายมาตรฐาน ketoconazole และ clotrimazole ทั้งนี้ตำรับไมโครอิมัลชันสามารถบรรจุปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดได้มากโดยมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดในตำรับเท่ากับ 5%v/v และขนาดอนุภาคที่เล็กมากของตำรับไมโครอิมัลชันอาจส่งผลในการการนำส่งสารสำคัญไปออกฤทธิ์ต่อเชื้อทดสอบได้ดียิ่งขึ้น (48)

ตาราง 8 เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes*

plate No.	Inhibition zone (cm)			
	ไมโครอิมัลชัน เปล่า	ketoconazole (200 µg/ml)	clotrimazole (10 mg/ml)	ไมโครอิมัลชัน ของน้ำมันหอม ระเหยจากใบ มะกรูด
1	0.00	0.73	3.40	> 4
2	0.00	0.85	3.84	> 4
3	0.00	0.73	3.62	> 4
mean ± SD	0.00	0.77 ± 0.07	3.62 ± 0.22	> 4

6. ผลการวิเคราะห์ปริมาณ citronellal equivalent ในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธี UV-Visible Spectrophotometry

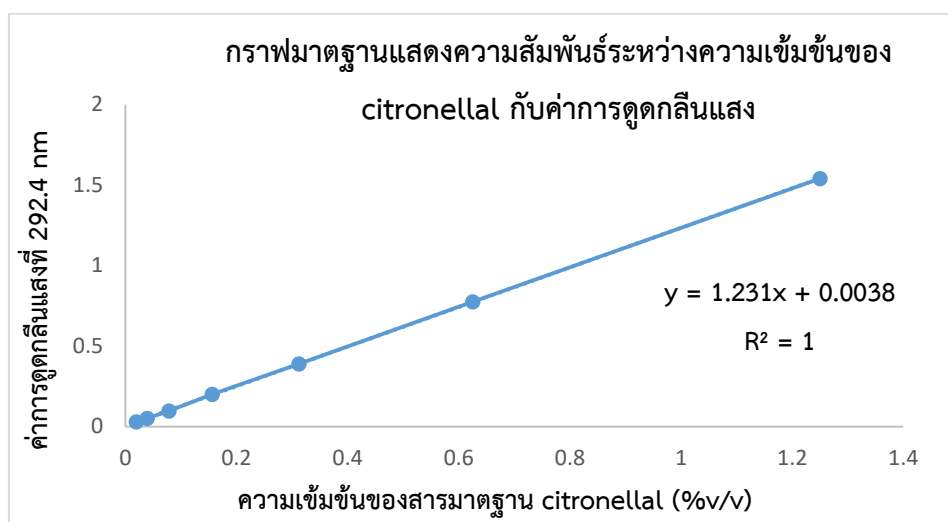
6.1 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation) ด้วยวิธี UV-Visible Spectrophotometry เพื่อหาปริมาณ citronellal equivalent ในน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีสำหรับข้อกำหนดและเกณฑ์ที่ใช้อ้างอิงตาม Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) ซึ่งเป็นมาตรฐานที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับ โดยมีแนวทางปฏิบัติตั้งขั้นตอนตามพารามิเตอร์ที่กำหนดดังต่อไปนี้ ได้แก่ linearity and range, accuracy และ precision

6.1.1 ผลของการศึกษาความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (linearity and range)

จากการศึกษาการทดสอบความคงสภาพทางเคมีและประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยในตำรับไมโครอิมัลชันได้โดยศึกษาจากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (Linearity and range) จากกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน citronellal ใน DMSO และค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 292.4 nm จากความเข้มข้นของสารมาตรฐาน citronellal ในช่วงความเข้มข้น 0.02 – 1.25 %v/v ที่แสดงสมการถดถอยเชิงเส้นตรง $y = 1.231x + 0.0038$ ($R^2 = 1$) สำหรับในการหาความสัมพันธ์เชิงเส้น

จำเป็นต้องมีการยืนยันว่าสมการหรือกราฟมาตรฐานดังกล่าวมีความถูกต้องน่าเชื่อถือโดยหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ควรมีค่าเข้าใกล้ 1 หรือค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ไม่น้อยกว่า 0.995 ดังแสดงตามภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร citronellal ในตัวทำละลาย DMSO กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 292.4 nm

6.1.2 ผลของการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (accuracy)

การศึกษาคำถามความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการเติม (spiked) สารทดสอบ citronellal ความเข้มข้น 0.075, 0.150 และ 0.225 %v/v ลงใน citronellal ความเข้มข้น 0.150 %v/v รายงานผลเป็นค่าร้อยละการคืนกลับ (%recovery) ที่พบและ % RSD โดยมีร้อยละของการคืนกลับเฉลี่ยระหว่าง 114.10 – 124.22 และ % RSD ระหว่าง 0.02 – 1.59 จากการศึกษาพบว่าร้อยละการคืนกลับของ citronellal ที่วิเคราะห์โดยวิธีนี้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ โดยชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นเล็กน้อยของ citronellal สามารถกำหนดความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นได้ ดังแสดงตามตาราง 9

ตาราง 9 ร้อยละการคืนกลับของความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ด้วย UV-Visible Spectrophotometry

%recovery level	mean recovery	SD	%RSD
50%	124.22	0.03	0.02
100%	119.24	1.89	1.59
150%	114.10	0.64	0.56

6.1.3 ผลของการศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (precision)

ความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ประเมินจากการทำซ้ำของการตอบสนองภายในวันเดียวกันและการตอบสนองระหว่างวัน จากการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน citronellal ใน DMSO ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ช่วงความเข้มข้น 0.02 – 1.25 %v/v ความแม่นยำของการวิเคราะห์แสดงเป็น % RSD โดยผลการวิจัยพบว่า % RSD ของความแม่นยำที่ตอบสนองภายในวันเดียวและที่ตอบสนองระหว่างวัน มี % RSD ต่ำกว่าร้อยละ 2 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้ให้ผลการตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของ citronellal equivalent ดังแสดงตามตาราง 10

ตาราง 10 ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ citronellal equivalent ด้วยวิธี UV-Visible Spectrophotometry

citronellal (%v/v)	Intraday precision (n=3)		Interday precision (n=3)	
	ปริมาณที่พบ	%RSD	ปริมาณที่พบ	%RSD
	(%v/v)		(%v/v)	
0.16	0.158 ± 0.003	1.74	0.150 ± 0.002	1.25
0.31	0.313 ± 0.002	0.59	0.313 ± 0.001	0.43
0.63	0.632 ± 0.004	0.56	0.631 ± 0.004	0.66
1.25	1.246 ± 0.002	0.18	1.243 ± 0.008	0.61

6.1.4 ผลของการศึกษาความไวของวิธีวิเคราะห์ (sensitivity)

ความไวของวิธีวิเคราะห์แสดงเป็นค่า LOD (limit of detection) และ LOQ (limit of quantitation) หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ ส่วน LOQ หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิธีทดสอบสามารถวิเคราะห์ได้ในเชิงปริมาณ ที่กำหนดตามเกณฑ์ AOAC/ICH โดยมีค่า LOD เท่ากับ 0.008 %v/v และ LOQ เท่ากับ 0.027 %v/v

7. ผลการเตรียมตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (Kaffir lime oil nanoemulsion) โดยวิธี phase inversion composition (PIC)

7.1 การวัดขนาดอนุภาค (size) การกระจายของขนาดอนุภาค (Pdl) และค่าศักย์ซีต้า (zeta potential)

เมื่อนำตำรับนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดทั้ง 3 ตำรับมาวัดขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาค และค่าความต่างศักย์ซีต้า ดังแสดงตามตารางที่ 10 พบว่าขนาดอนุภาคทั้ง 3 ตำรับอยู่ในช่วง 131.47 – 182.17 nm การกระจายของขนาดอนุภาคอยู่ในช่วง 0.266 – 0.615 และค่าความต่างศักย์ซีต้าอยู่ในช่วง -9.79 ถึง -15.70 mV การใช้ Tween® 80 เป็นสารลดแรงตึงผิวเพียงอย่างเดียวทำให้ขนาดอนุภาคของอะไรค่อนข้างใหญ่ และการกระจายของขนาดอนุภาคสูง สำหรับตำรับที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย Tween® 80 และ Hyaluronic acid ที่มีคุณสมบัติเป็นสารที่เพิ่มความหนืดแก่วัสดุภายนอกส่งผลให้การกระจายของขนาดอนุภาคต่ำลง การที่นาโนอิมัลชันถูกห่อหุ้มด้วย Hyaluronic acid นั้นยังส่งผลต่อความคงสภาพทางกายภาพของนาโนอิมัลชัน เนื่องจากช่วยเพิ่มความมีขั้วและความชอบน้ำที่ผิวของนาโนอิมัลชัน และเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะบนผิวหนัง (49) สำหรับตำรับที่ 3 การเติมสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุอีกหนึ่งชนิดคือ Poloxamer-188 เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมส่งผลให้ขนาดอนุภาคเล็กลง และมีการกระจายของขนาดอนุภาคต่ำลง โดยมีรายงานว่าตำรับที่ใช้สารลดแรงตึงผิวและสารลดแรงตึงผิวร่วมที่เหมาะสมส่งผลให้ขนาดอนุภาคเล็กลงและและการกระจายของขนาดอนุภาคแคบลง (50) จากการวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชันทั้ง 3 ตำรับพบว่าตำรับที่ 3 มีความเหมาะสมสำหรับการทดลอง เพื่อหาประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยในตำรับและประเมินความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วันที่เวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วันต่อไป ดังแสดงตามตาราง 11

ตาราง 11 แสดงขนาด การกระจายของขนาดอนุภาค และค่าความต่างศักย์ซีต้าของตำรับนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันที

	ตำรับที่ 1	ตำรับที่ 2	ตำรับที่ 3
Size	165.23 $\pm$ 11.89	182.17 $\pm$ 1.42	131.47 $\pm$ 7.74
Pdl	0.615 $\pm$ 0.049	0.392 $\pm$ 0.057	0.266 $\pm$ 0.007
Zeta potential	-15.70 $\pm$ 0.96	-10.97 $\pm$ 0.70	-9.79 $\pm$ 0.39

7.2 การทดสอบความคงสภาพทางกายภาพของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

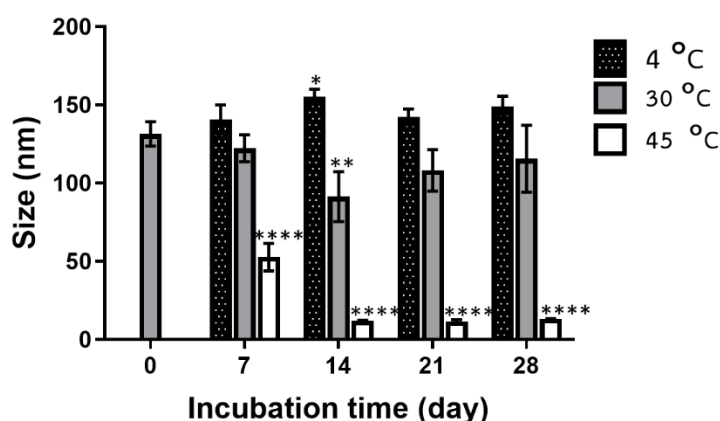
จากการศึกษาความคงสภาพทางกายภาพของนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค ค่าศักย์ซีต้า ของตำรับนาโนอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ที่เวลาหลังเตรียมเสร็จทันที 7, 14, 21 และ 28 วัน ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังแสดงตามตาราง 12

ตาราง 12 แสดงขนาดอนุภาค ค่าการกระจายของอนุภาค และค่าศักย์ไฟฟ้าของตัวรับนาโนอิมัลชัน น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด หลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ในแต่ละช่วงเวลา

ตัวรับที่ 3	อุณหภูมิ	Size (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)
หลังเตรียมเสร็จทันที	30 °C	131.47 ± 7.74	0.266 ± 0.007	-9.79 ± 0.39
	4 °C	140.80 ± 9.22	0.324 ± 0.058	-11.20 ± 1.18
หลังเก็บไว้ 7 วัน	30 °C	122.30 ± 8.57	0.459 ± 0.099	-8.86 ± 0.38
	45 °C	52.71 ± 8.84	0.841 ± 0.275	-15.7 ± 4.95
หลังเก็บไว้ 14 วัน	4 °C	186.15 ± 24.68	0.315 ± 0.075	-10.50 ± 0.69
	30 °C	91.41 ± 15.96	0.665 ± 0.203	-9.93 ± 0.37
	45 °C	11.91 ± 0.52	0.355 ± 0.271	-10.33 ± 4.57
หลังเก็บไว้ 21 วัน	4 °C	142.40 ± 5.05	0.307 ± 0.009	-11.67 ± 1.16
	30 °C	108.19 ± 13.27	0.299 ± 0.221	-13.10 ± 4.39
	45 °C	11.68 ± 1.01	0.393 ± 0.018	-15.73 ± 5.61
หลังเก็บไว้ 28 วัน	4 °C	148.87 ± 6.73	0.305 ± 0.068	-10.83 ± 0.93
	30 °C	115.65 ± 21.42	0.270 ± 0.197	-14.85 ± 9.56
	45 °C	13.18 ± 0.27	0.292 ± 0.057	-13.77 ± 4.19

หากพิจารณาความคงสภาพทางกายภาพของตัวรับที่ 3 จากการประเมินโดยการการวัดขนาดอนุภาคเมื่อเก็บตัวอย่างในสภาวะที่แตกต่างกันคือ ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ที่เวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยขนาดอนุภาคหลังจากเตรียมเสร็จทันทีมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 131.47 ± 7.74 nm เมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่าง ๆ จนครบ 28 วัน พบว่าขนาดอนุภาคที่วัดได้ในแต่ละช่วงเวลาไม่แตกต่างกันกับขนาดอนุภาคหลังเตรียมเสร็จทันที ในขณะที่ตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส มีขนาดอนุภาคในแต่ละช่วงเวลาเล็กลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดอนุภาคหลังเตรียมเสร็จทันที จากการที่ขนาดอนุภาคมีขนาดเล็กลงเมื่อเก็บ

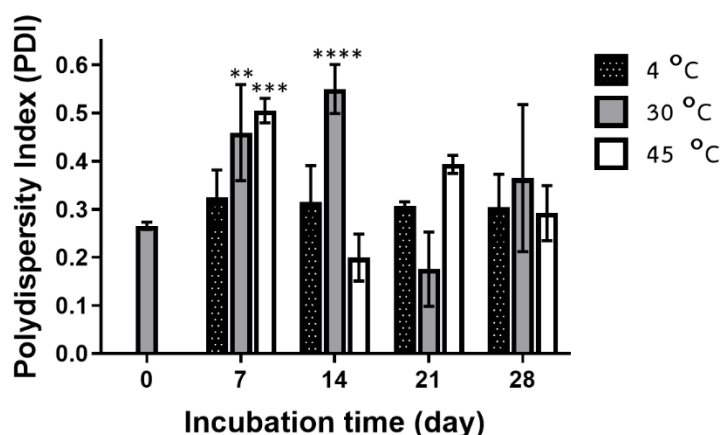
ไว้ที่อุณหภูมิสูง อาจเกิดจากการระเหยของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดในตำรับนาโนอิมัลชัน
 ดังแสดงตามภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 ขนาดอนุภาค (size) ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด
 หลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส
 เป็นเวลา 7, 14 และ 28 วัน

* $p < 0.05$, ** $p < 0.004$, **** $p < 0.0001$ เปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

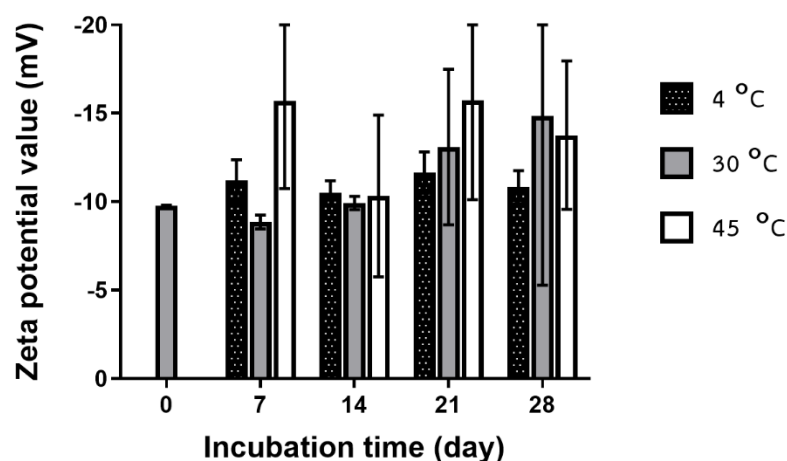
เมื่อพิจารณาผลของการศึกษาความคงสภาพในด้านการกระจายของขนาดอนุภาค
 ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันที มีการกระจาย
 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 0.266 ± 0.007 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 28 วัน พบว่า
 ตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีค่าการกระจายของขนาดอนุภาคไม่แตกต่างกันอย่าง
 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการกระจายของอนุภาคหลังเตรียมเสร็จทันที
 ในขณะที่ตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิ 45 และ 30 องศาเซลเซียส หลังเก็บไว้ 7 และ 21 วัน พบว่ามี
 การกระจายของขนาดอนุภาคแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0007$) และ
 ($p < 0.0001$) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการกระจายของขนาดอนุภาคหลังเตรียมเสร็จทันที
 โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลต่อความสม่ำเสมอต่อการกระจายของขนาดอนุภาคของตำรับนาโน
 อิมัลชัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการหลอมรวมของหยดอนุภาคหรือการเกาะกลุ่มของหยดอนุภาค
 (44) ดังแสดงตามภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 การกระจายขนาดอนุภาค (PDI) ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14 และ 28 วัน

** $p > 0.0076$, *** $p < 0.0007$ และ **** $p < 0.0001$ เปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

เมื่อพิจารณาผลการศึกษาคงสภาพทางกายภาพในด้านค่าศักย์ซีต้าของนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันที มีค่าศักย์ซีต้าเฉลี่ยเท่ากับ -9.79 ± 0.39 mV และเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 28 วัน พบว่าตัวอย่างที่เก็บในอุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส มีค่าศักย์ซีต้าของนาโนอิมัลชันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าศักย์ซีต้าของนาโนอิมัลชันหลังเตรียมเสร็จทันที ดังแสดงตามภาพประกอบ 17 ทั้งนี้สำหรับค่าศักย์ซีต้ามีประโยชน์ในการทำนายความคงสภาพของตำรับนาโนอิมัลชันได้ หากค่าศักย์ซีต้าเป็นบวกหรือลบน้อย ๆ จะไม่มีแรงป้องกันอนุภาคอื่นที่เข้ามาไม่เกิดความคงสภาพการกระจายตัวหรือเกิดการรวมกัน (aggregation) ซึ่งค่าศักย์ซีต้าที่เหมาะสมควรมีค่าในช่วงสูงกว่า ± 30 mV (44, 45) แต่นาโนอิมัลชันที่เตรียมนั้นมีค่าศักย์ซีต้าเป็นลบอ่อน ๆ จึงอาจไม่เกิดเสถียรภาพการกระจายตัวหรือเกิดการรวมกลุ่มอนุภาคกัน โดยเฉพาะเมื่อเก็บนาโนอิมัลชันที่อุณหภูมิสูง ดังจะเห็นได้ว่าค่า polydispersity index ของนาโนอิมัลชันที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส มีค่าสูงขึ้นในช่วง 14 วันแรกเมื่อเปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที



ภาพประกอบ 17 ค่าศักย์ซีต้า (zeta potential) ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันทีและหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

7.3 การศึกษาความคงสภาพทางเคมีและปริมาณคงเหลือของ citronellal equivalent ในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

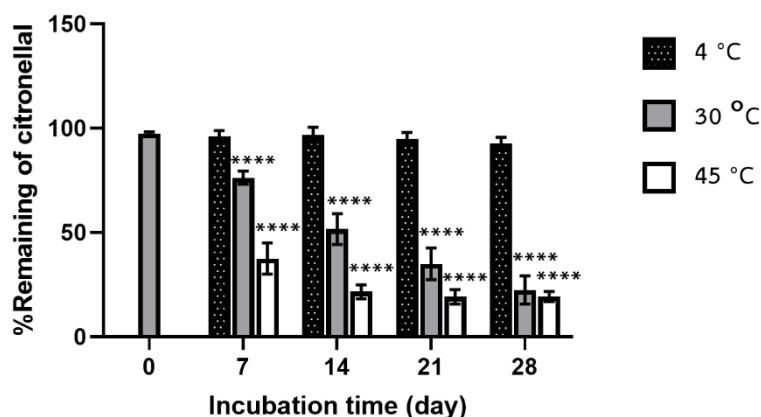
ศึกษาความคงสภาพทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดจากปริมาณ citronellal equivalent ที่เหลืออยู่ในตำรับนาโนอิมัลชัน โดยการเก็บตัวอย่างในสภาวะที่แตกต่างกัน คือ ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส จนครบการทดลอง 28 วัน เพื่อวัดปริมาณ citronellal ที่เหลืออยู่ในตำรับนาโนอิมัลชัน โดยแสดงผลเป็น %Assay โดยตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันที มี %Assay ของ citronellal equivalent เฉลี่ยเท่ากับ 97.48 ± 0.80 เมื่อเก็บตัวอย่างจนครบตามระยะเวลาที่กำหนดพบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส มีร้อยละปริมาณคงเหลือลดลงอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละปริมาณคงเหลือหลังเตรียมเสร็จทันที โดยลดลงจากเริ่มต้นประมาณร้อยละ 76.86 และ 80.12 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีร้อยละปริมาณคงเหลือไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละปริมาณคงเหลือหลังเตรียมเสร็จทันที ดังแสดงตามตาราง 13 และภาพประกอบ 18 จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่าแนวโน้มของอุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลต่อความคงสภาพทางเคมี และการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงของร้อยละปริมาณคงเหลือของ citronellal equivalent ในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ซึ่งสอดคล้องกับความคงสภาพทางกายภาพในด้านขนาดอนุภาคที่เมื่อเก็บ

ตัวอย่างนาโนอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิสูงจะส่งผลให้ขนาดเล็กลง ทั้งนี้อาจเกิดจากการระเหยของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดในตำรับนาโนอิมัลชัน

ดังนั้นจากผลการศึกษานี้สนับสนุนชัดเจนว่าควรเก็บรักษาตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทำให้ตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีความคงสภาพทางเคมีมากที่สุด

ตาราง 13 แสดงปริมาณคงเหลือของ citronellal equivalent ในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดหลังเตรียมเสร็จทันที และหลังเก็บไว้ในแต่ละช่วงเวลา

ตำรับ	อุณหภูมิ	ร้อยละคงเหลือ
หลังเตรียมเสร็จทันที	30 °C	97.48 ± 0.80
	4 °C	96.10 ± 2.89
หลังเก็บไว้ 7 วัน	30 °C	76.35 ± 3.19
	45 °C	37.53 ± 7.52
หลังเก็บไว้ 14 วัน	4 °C	96.89 ± 3.62
	30 °C	51.70 ± 7.39
	45 °C	21.64 ± 3.30
หลังเก็บไว้ 21 วัน	4 °C	95.04 ± 2.97
	30 °C	35.09 ± 7.64
	45 °C	19.22 ± 3.47
หลังเก็บไว้ 28 วัน	4 °C	92.67 ± 3.03
	30 °C	22.55 ± 6.77
	45 °C	19.38 ± 2.45



ภาพประกอบ 18 ความคงสภาพทางเคมีและปริมาณคงเหลือของ citronellal ในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

**** $p < 0.0001$ เปรียบเทียบกับหลังเตรียมเสร็จทันที

8. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธี agar well diffusion

จากการทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ของตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ketoconazole และ clotrimazole พบว่าตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดเกิดโซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* กว้างกว่าสารละลายมาตรฐาน ketoconazole แต่เกิดโซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* แคบกว่าสารละลายมาตรฐาน clotrimazole โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อ *T. mentagrophytes* เท่ากับ 1.91 ± 0.40 cm สำหรับตำรับไมโครอิมัลชันเปล่าไม่เกิดโซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* ดังแสดงตามตาราง 14 ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ในระดับปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน โดยอาจเป็นเพราะตำรับนาโนอิมัลชันสามารถบรรจุปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดได้น้อยกว่าตำรับไมโครอิมัลชัน โดยตำรับนาโนอิมัลชันมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดในตำรับเท่ากับ 1%v/v ส่วนตำรับไมโครอิมัลชันมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดในตำรับเท่ากับ 5%v/v

ตาราง 14 เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes*

plate No.	Inhibition zone (cm)			นาโนอิมัลชัน ของน้ำมันหอม ระเหยจากใบ มะกรูด
	นาโนอิมัลชัน เปล่า	ketoconazole (200 µg/ml)	clotrimazole (10 mg/ml)	
1	0.00	0.84	4.80	2.37
2	0.00	0.81	3.80	1.62
3	0.00	0.77	3.75	1.74
mean ± SD	0.00	0.81 ± 0.03	4.12 ± 0.59	1.91 ± 0.40

บทที่ 5

สรุปผลวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบประสิทธิภาพการต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ด้วยวิธี broth macrodilution สารสกัดใบคูน เนื้อในฝักคูน เมล็ดคูน และน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีประสิทธิภาพการต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ดีที่สุด เหมาะสมสำหรับนำมาพัฒนาเป็นตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันมะกรูด สำหรับไมโครอิมัลชันเป็นระบบที่สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เมื่อองค์ประกอบภายในระบบ ได้แก่ น้ำมัน น้ำ สารลดแรงตึงผิว และสารลดแรงตึงผิวร่วม มีอัตราส่วนที่เหมาะสม สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้ Tween® 80 เป็นสารลดแรงตึงผิวหลัก และ propylene glycol เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม โดยปรับอัตราส่วน สารลดแรงตึงผิวหลักต่อสารลดแรงตึงผิวร่วม 1:0, 1:1, 2:1 และ 3:1 ตามลำดับ ร่วมกับน้ำ ปราศจากไอออน และน้ำมัน เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดระบบไมโครอิมัลชันจากการ วาดอัตราส่วนขององค์ประกอบต่าง ๆ ลงบนแผนภาพวัฏภาคไตรภาคเทียม พบว่าอัตราส่วนสาร ลดแรงตึงผิวหลักต่อสารลดแรงตึงผิวร่วม (3:1) มีบริเวณการเกิดไมโครอิมัลชันกว้างที่สุด โดย เหมาะสมสำหรับที่จะนำมาศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมี โดยความคงสภาพทาง กายภาพศึกษาจากการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้า เมื่อเก็บ ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่าง ๆ จนครบ 28 วัน พบว่าขนาด อนุภาคเฉลี่ยและการกระจายของขนาดอนุภาคไม่แตกต่างกับขนาดอนุภาคและการกระจายของ ขนาดอนุภาคหลังเตรียมเสร็จทันที ค่าศักย์ซีต้าจากตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจาก ใบมะกรูดมีประจุเป็นลบ เมื่อเก็บไว้จนครบระยะเวลาทดสอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ผิวประจุมีค่าศักย์ซีต้าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สำหรับการศึกษาความคงสภาพทางเคมีตลอดระยะเวลา ทดสอบพบว่าร้อยละปริมาณคงเหลือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีร้อยละปริมาณคงเหลือ มากกว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงควรเก็บรักษาตำรับไมโครอิมัลชันของ น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทำให้ตำรับ ไมโครอิมัลชันมีความคงสภาพทางเคมี

สำหรับนาโนอิมัลชันอิมัลชันเป็นระบบของเหลวกระจายตัว ประกอบด้วยน้ำมัน น้ำ และ สารลดแรงตึงผิว โดยทั่วไปมักใช้สารลดแรงตึงผิวร้อยละ 3 – 10 ของตำรับ สำหรับงานวิจัยนี้ เลือกใช้ Tween® 80 เป็นสารลดแรงตึงผิวเดียวเพื่อหาตำรับที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาลักษณะ ทางกายภาพของตำรับนาโนอิมัลชัน จากการทดลองพบว่าขนาดของอนุภาคและการกระจาย

อนุภาคอยู่ในช่วงเกินเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เมื่อเติม hyaluronic acid ที่เป็นสารเพิ่มความหนืดเข้าไปในตำรับ จากการทดลองพบว่าการกระจายอนุภาคลดลงแต่ขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้น แต่เมื่อเติม P-188 ที่เป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมเข้าไปในสูตรตำรับส่งผลให้ตำรับมีขนาดอนุภาคและการกระจายอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 131.47 ± 7.74 nm และ 0.266 ± 0.007 ตามลำดับ โดยอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้เหมาะสำหรับที่จะนำมาศึกษาความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมี สำหรับความคงสภาพทางกายภาพศึกษาจากการวัดขนาดอนุภาค การกระจายของขนาดอนุภาค และค่าศักย์ซีต้า เมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาต่าง ๆ จนครบ 28 วัน พบว่าขนาดอนุภาคเฉลี่ยและการกระจายของขนาดอนุภาคแตกต่างกับขนาดอนุภาคและการกระจายของขนาดอนุภาคหลังเตรียมเสร็จทันที ส่วนค่าศักย์ซีต้าไม่แตกต่างกับค่าศักย์ซีต้าหลังเตรียมเสร็จทันที สำหรับการศึกษาความคงสภาพทางเคมีตลอดระยะเวลาทดสอบพบว่าร้อยละปริมาณคงเหลือ citronellal equivalent ในตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีร้อยละปริมาณคงเหลือมากกว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงควรเก็บรักษาตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทำให้ตำรับนาโนอิมัลชันมีความคงสภาพทางเคมี

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ของตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดด้วยวิธี agar well diffusion โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน ketoconazole และ clotrimazole พบว่าตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดเกิดโซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* กว้างกว่าสารละลายมาตรฐาน แสดงให้ทราบว่าตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ได้ ส่วนตำรับนาโนอิมัลชันมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ในระดับปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานโดยเกิดโซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* กว้างกว่าสารละลายมาตรฐาน ketoconazole แต่เกิดโซนยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* แคบกว่าสารละลายมาตรฐาน clotrimazole เนื่องจากตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดสามารถบรรจุปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดได้มากกว่าตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดประมาณ 5 เท่า ส่งผลให้ตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูดมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* เหนือกว่าตำรับนาโนอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าระบบไมโครอิมัลชันมีความคงสภาพทางกายภาพและทางเคมีมากกว่าระบบนาโนอิมัลชัน และระบบไมโครอิมัลชันมีฤทธิ์ด้านเชื้อรา *T. mentagrophytes* ดีกว่าระบบนาโนอิมัลชันเนื่องจากในระบบสามารถบรรจุปริมาณสารสำคัญได้มากกว่า

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิจัยนี้มีประโยชน์สำหรับการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* จากธรรมชาติ ที่มีต้นทุนต่ำและมีขั้นตอนการผลิตที่ไม่ซับซ้อนเพื่อใช้ทดแทนยาแผนปัจจุบัน แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัยในมนุษย์ต่อไป



บรรณานุกรม

1. พรรณกร อิมวิทยา. เชื้อราก่อโรคในคน. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์สามัคคีสาร (ดอกหญ้า) จำกัด (มหาชน); 2538.
2. Baran R, Hay RJ, Garduno JI. Review of antifungal therapy, part II: treatment rationale, including specific patient populations. *Journal of Dermatological Treatment*. 2008;19(3):168-75.
3. Luplertlop N, Suwanmanee S. Dermatophytosis: from bench to bedside. *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology*. 2013;36(2):75-87.
4. Dave H, Ledwani L. A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications. 2012.
5. Waikedre J, Dugay A, Barrachina I, Herrenknecht C, Cabalion P, Fournet A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from New Caledonian *Citrus macroptera* and *Citrus hystrix*. *Chemistry & Biodiversity*. 2010;7(4):871-7.
6. Soffian MS, Mohamad I, Mohamed Z, Salim R. Antifungal Effect of Kaffir Lime Leaf Extract on Selected Fungal Species of Pathogenic Otomycosis in in vitro Culture Medium. *Journal of Young Pharmacists*. 2017;9(4):468-74.
7. วรางคณา วาริสน้อยเจริญ. การประยุกต์ใช้นาโนเทคโนโลยีในโภชนเภสัชภัณฑ์. *วารสารคลินิกอาหารและโภชนาการ (วคอก)*. 2535;4(2):77-88.
8. Zhou L, Zhang P, Chen Z, Cai S, Jing T, Fan H, et al. Preparation, characterization, and evaluation of amphotericin B-loaded MPEG-PCL-g-PEI micelles for local treatment of oral *Candida albicans*. *International journal of nanomedicine*. 2017;12:4269-83.
9. Che Marzuki NH, Wahab RA, Abdul Hamid M. An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2019;33(1):779-97.
10. Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft matter*. 2016;12(11):2826-41.
11. Pal SL, Jana U, Manna PK, Mohanta GP, Manavalan R. Nanoparticle: An overview

of preparation and characterization. Journal of applied pharmaceutical science. 2011;1(6):228-34.

12. Muzaffar F, Singh U, Chauhan L. Review on microemulsion as futuristic drug delivery. Int J Pharm Pharm Sci. 2013;5(3):39-53.

13. Pumirat P, Tunyong W, Luplertlop N. Medical Mycology. Journal of Medicine and Health Sciences. 2013;20(2):31-44.

14. ปรียา กุลละวณิช และประวิตร พิศาลบุตร. ตำราโรคผิวหนังในเวชปฏิบัติปัจจุบัน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บริษัท โฮลิสติก แพบลิชชิง จำกัด; 2540.

15. กุล เจริช. การ ศึกษา ถึง ความ ชุก และ การ กระจาย ของ เชื้อรา ที่ เป็น สาเหตุ ของ โรค กลาก ที่ เฝ้า ใน คลินิก ผู้ ป่วย นอก โรง พยาบาล จุฬาลงกรณ์: จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.

16. Suwanmanee S, Luplertlop N. Epidemiological trends in pathogens from the 2012 Thai flooding disaster. African Journal of Microbiology Research. 2014;8(21):2124-30.

17. นิจศิริ เรืองรังษี. ตำราวิชาการสูคนธำบัต. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก; 2550.

18. Thai Herbal Pharmacopoeia. Bangkok: The agricultural cooperative federation of thailand; 2017.

19. Nor OM. Volatile aroma compounds in *Citrus hystrix* oil. Journal of Tropical Agriculture and Food Science 1999;27:225-9.

20. Warsito W, Palungan MH, Utomo EP. Profiling study of the major and minor components of kaffir lime oil (*Citrus hystrix* DC.) in the fractional distillation process. The Pan African medical journal. 2017;27.

21. Hovijitra RS, Choonharuangdej S, Srithavaj T. Effect of essential oils prepared from Thai culinary herbs on sessile *Candida albicans* cultures. Journal of oral science. 2016;58(3):365-71.

22. สุदारัตน์ หอมหวล. ฐานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2555 [Available from: <http://www.phargarden.com/main.php?action=viewpage&pid=216>.

23. Nayan RB, Shukla VJ, Acharya RN, Rajani DP. Antimicrobial screening of seed extracts of *Cassia fistula* linn. International Journal of Advances in Pharmacy and Nanotechnology. 2011;3:1-8.

24. Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Antibacterial and antifungal activity of *Cassia*

fistula L.: An ethnomedicinal plant. Journal of ethnopharmacology. 2007;112(3):590-4.

25. Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Antibacterial activities of phenolic benzaldehydes and benzoic acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. Journal of food protection. 2003;66(10):1811-21.

26. Chewchinda S, Wuthi-Udomlert M, Gritsanapan W. HPLC quantitative analysis of rhein and antidermatophytic activity of *Cassia fistula* pod pulp extracts of various storage conditions. BioMed research international. 2013;2013.

27. Bhalodia N, Nariya P, Acharya R, Shukla V. In vitro antibacterial and antifungal activities of *Cassia fistula* Linn. fruit pulp extracts. Ayu. 2012;33(1):123.

28. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ. นาโนเทคโนโลยีการนำส่งทางผิวหนัง. กรุงเทพมหานคร: บริษัทประชาชน จำกัด; 2555.

29. Lv X, Liu T, Ma H, Tian Y, Li L, Li Z, et al. Preparation of essential oil-based microemulsions for improving the solubility, pH stability, photostability, and skin permeation of quercetin. American Association of Pharmaceutical Scientists. 2017;18(8):3097-104.

30. Singhan A, Indranupakorn R. Microemulsion Development for Enhancing the Stability of Green Tea (*Camellia sinesis*) Extract. Isan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015;11(4):40-56.

31. Badawi A, Sakran W, Ramadan M, El-Mancy S. Improvement of the microbiological activity of topical ketoconazole using microemulsion systems. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2012;22(6):473-8.

32. Okonogi S, Chaiyana W. Enhancement of anti-cholinesterase activity of *Zingiber cassumunar* essential oil using a microemulsion technique. Drug discoveries & therapeutics. 2012;6(5):249-55.

33. Boonme P, Boonthongchuay C, Wongpoowarak W, Amnuaikit T. Evaluation of nicotinamide microemulsion on the skin penetration enhancement. Pharmaceutical development and technology. 2016;21(1):116-20.

34. Zhong F, Yu M, Luo C, Shoemaker CF, Li Y, Xia S, et al. Formation and characterisation of mint oil/S and CS/water microemulsions. Food chemistry. 2009;115(2):539-44.

35. Chaiana W, Anuchapreeda S, Leelapornpisid P, Phongpradist R, Viernstein H, Mueller M. Development of microemulsion delivery system of essential oil from *Zingiber cassumunar* Roxb. rhizome for improvement of stability and anti-inflammatory activity. *AAPS PharmSciTech*. 2017;18(4):1332-42.
36. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in colloid and interface science*. 2004;108:303-18.
37. Cinar K. A review on nanoemulsions: preparation methods and stability. *trakya university journal of engineering sciences*. 2017;18:73-83.
38. Solans C, Solé I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. *Current opinion in colloid & interface science*. 2012;17(5):246-54.
39. Danielli LJ, dos Reis M, Bianchini M, Camargo GS, Bordignon SA, Guerreiro IK, et al. Antidermatophytic activity of volatile oil and nanoemulsion of *Stenachaenium megapotamicum* (Spreng.) Baker. *Industrial crops and products*. 2013;50:23-8.
40. Wulandari W, Darmadji P, Kurniawati L, editors. Antioxidant Properties of Kaffir Lime Oil as Affected by Hydrodistillation Process. *PROCEEDING ICTESS (Internasional Conference on Technology, Education and Social Sciences)*; 2017.
41. Md Othman S, Hassan M, Nahar L, Basar N, Jamil S, Sarker S. Essential oils from the Malaysian Citrus (Rutaceae) medicinal plants. *Medicines*. 2016;3(2):13.
42. Pereira FdO, Mendes JM, Lima IO, Mota KSdL, Oliveira WAd, Lima EdO. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharmaceutical biology*. 2015;53(2):228-34.
43. Ariviani S, Anggrahini S, Naruki S, Raharjo S. Characterization and chemical stability evaluation of β -carotene microemulsions prepared by spontaneous emulsification method using VCO and palm oil as oil phase. *International Food Research Journal*. 2015;22(6).
44. Cheong AM, Tan CP, Nyam KL. Physicochemical, oxidative and anti-oxidant stabilities of kenaf seed oil-in-water nanoemulsions under different storage temperatures. *Industrial crops and products*. 2017;95:374-82.
45. Rangsimawong W, Ngawhirunpat T. การศึกษาคุณสมบัติของไลโปโซมสำหรับระบบนำส่ง

ยาผ่านทางผิวหนัง CHARACTERIZATION OF LIPOSOMES FOR TRANSDERMAL DRUG DELIVERY SYSTEM. Thai Bulletin of Pharmaceutical Sciences. 2015;10(1):61-74.

46. Sabale V, Vora S. Formulation and evaluation of microemulsion-based hydrogel for topical delivery. International journal of pharmaceutical investigation. 2012;2(3):140.

47. Jakab E, Blazsó M, Barta-Rajnai E, Babinszki B, Sebestyén Z, Czégény Z, et al. Thermo-oxidative decomposition of lime, bergamot and cardamom essential oils. Journal of analytical and applied pyrolysis. 2018;134:552-61.

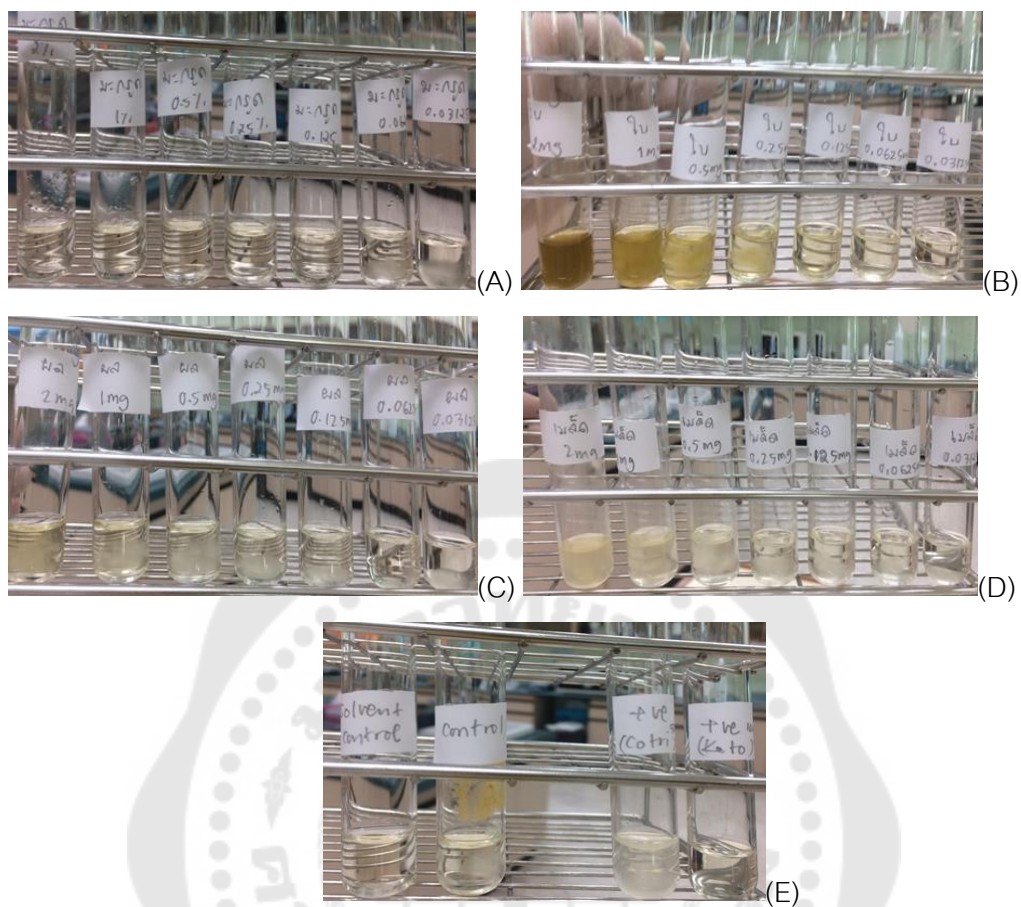
48. Sadique A, Khalid SH, Asghar S, Irfan M, Khan IU, Rasul A, et al. Miconazole Nitrate Microemulsion: Preparation, Characterization and Evaluation for Enhancement of Antifungal Activity. Latin American Journal of Pharmacy. 2018;37(8):1578-86.

49. Jacobus Berlitz S, De Villa D, Maschmann Inácio LA, Davies S, Zatta KC, Guterres SS, et al. Azelaic acid-loaded nanoemulsion with hyaluronic acid—a new strategy to treat hyperpigmentary skin disorders. Drug development and industrial pharmacy. 2019;45(4):642-50.

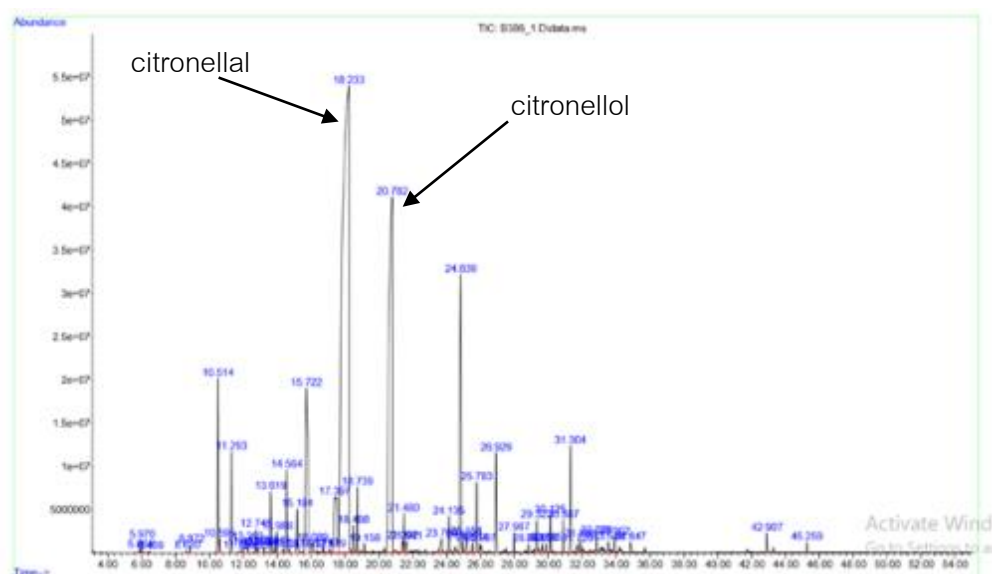
50. Surassmo S, Srinuanchai W, Yostawonkul J, Ruktanonchai U. Formulation Development of Plai Nanoemulsion Based on the Influence of Surfactant Combinations. CHIANG MAI JOURNAL OF SCIENCE. 2013;40(6):994-9.

ภาคผนวก

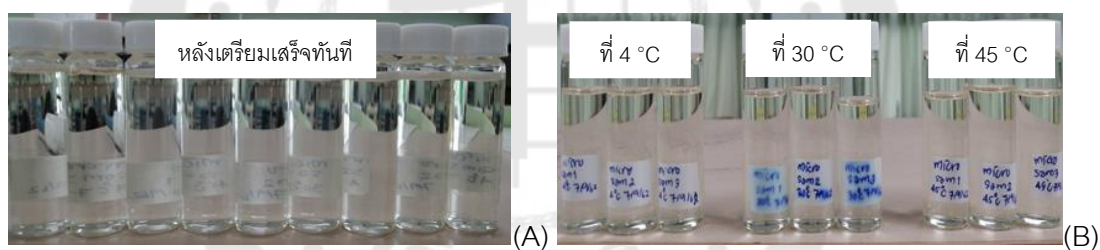




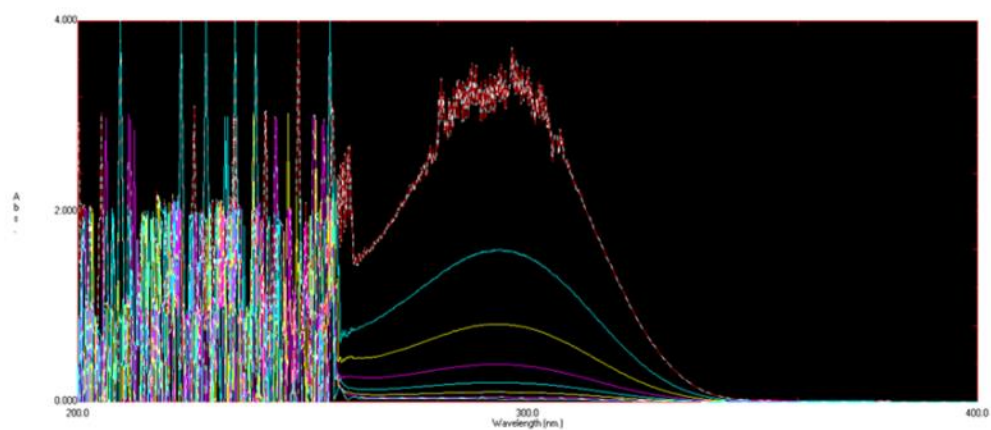
ภาพประกอบ 1 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *T. mentagrophytes* ของ (A) น้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (B) สารสกัดใบคูน (C) สารสกัดเนื้ในผักคูน และ (D) สารสกัดเมล็ดคูน และ (E) สารละลายควบคุม กลุ่มควบคุมแบบลบ และ กลุ่มควบคุมแบบบวก



ภาพประกอบ 2 แสดงโครมาโทแกรม (Chromatogram) ของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ที่วิเคราะห์ด้วย GC-MS



ภาพประกอบ 3 ตำรับไมโครอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด (A) หลังเตรียมเสร็จทันที (B) หลังเก็บไว้จนครบกำหนดเวลา 28 วัน



ภาพประกอบ 4 UV spectrum ของ citronellal ที่ 292.4 nm



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ปิยะพงษ์ ภูมิवाल
วัน เดือน ปี เกิด	14 ตุลาคม 2529
สถานที่เกิด	ปราจีนบุรี
วุฒิการศึกษา	เภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 15 หมู่ 3 ต.ประจันตคาม อ.ประจันตคาม จ.ปราจีนบุรี 25130

