



โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

น้ำมันหอมระเหยในสมุนไพรไทยกับฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* สำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอก

Thai herbal volatile oils with antimicrobial activity on *S. aureus* and *C. albicans* for development to topical product

โดย

- | | | |
|------------------|------------|--------------------|
| 1. นสภ.ธัญญา | ห่อไพบูลย์ | รหัสนิสิต 58210131 |
| 2. นสภ.ชวัลรัตน์ | เวชภัณฑ์ | รหัสนิสิต 58210162 |
| 3. นสภ.วิภาวี | เกษมรัตน์ | รหัสนิสิต 58210205 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2562

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

เรื่อง

น้ำมันหอมระเหยในสมุนไพรไทยกับฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans*
สำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอก

Thai herbal volatile oils with antimicrobial activity on *S. aureus* and *C. albicans*
for development to topical product

โดย

- | | | |
|------------------|------------|--------------------|
| 1. นสภ.ธัญญา | ห่อไพบูลย์ | รหัสนิสิต 58210131 |
| 2. นสภ.ชวัลรัตน์ | เวชภัณฑ์ | รหัสนิสิต 58210162 |
| 3. นสภ.วิภาวี | เกษมรัตน์ | รหัสนิสิต 58210205 |

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาบัณฑิต ปีการศึกษา 2562
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

คำนำ

จากสถานการณ์ปัจจุบันการใช้ยาอย่างไม่สมเหตุผลทำให้เกิดปัญหาตามมามากมาย อาทิเช่น ปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลชีพ ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี แนวทางการแสวงหาทางรักษาโดยใช้สมุนไพรมีบทบาทมากขึ้น ดังนั้นการนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นยาต้านจุลชีพทดแทนยาปฏิชีวนะจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้แก้ปัญหานี้ได้ และยังสามารถลดผลข้างเคียงและสารตกค้างในร่างกายที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะ รวมถึงช่วยลดต้นทุนการนำเข้ายาปฏิชีวนะจากต่างประเทศอีกด้วย การศึกษาวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการนำสมุนไพรในประเทศมาใช้ประโยชน์สำหรับเป็นทางเลือกในการรักษา จึงทำการเลือกสมุนไพรกลุ่มที่มีน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลชีพมาพัฒนาเป็นยาทาภายนอกสำหรับรักษาโรคทางผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อจุลชีพ โดยได้คัดเลือกสมุนไพรจำนวน 9 ชนิดจากพืช 4 วงศ์ ประกอบด้วยวงศ์ Myrtaceae ได้แก่ ดอกตูมกานพลู (*Syzygium aromaticum*) วงศ์ Zingiberaceae ได้แก่ เหง้าขิง (*Zingiber officinale*), เหง้าข่า (*Alpinia galanga*), เหง้าไพล (*Zingiber cassumunar*) วงศ์ Rutaceae ได้แก่ เปลือกส้มโอ (*Citrus maxima*), เปลือกมะนาว (*Citrus aurantifolia*), เปลือกมะกรูด (*Citrus hystrix*), ใบสองฟ้า (*Clausena harmandiana*) และ วงศ์ Myristicaceae ได้แก่ เมล็ดแห้งลูกจันทน์ (*Myristica fragrans*) มาทำการกลั่นน้ำมัน และทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ซึ่งจากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยของกานพลู และขิง มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพได้ดีและสามารถนำมาตั้งตำรับเป็นยาทาภายนอกได้ โดยคณะผู้จัดทำหวังว่างานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นประโยชน์และสามารถนำไปต่อยอดงานด้านอื่นต่อไปได้ในอนาคตได้

คณะผู้จัดทำ

นสภ.ธัญญา	ห่อไพบูลย์	รหัสสถิติ 58210131
นสภ.ชวัลรัตน์	เวชภรณ์	รหัสสถิติ 58210162
นสภ.วิภาวี	เกษมรัตน์	รหัสสถิติ 58210205

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ปีการศึกษา 2562

เรื่อง น้ำมันหอมระเหยในสมุนไพรไทยกับฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *C. albican* สำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอก

ผู้จัดทำโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. นสภ.ธัญญา ห่อไพบูลย์ รหัสนิสิต 58210131
2. นสภ.ชวัลรัตน์ เวชภักดิ์ รหัสนิสิต 58210162
3. นสภ.วิภาวี เกษมรัตน์ รหัสนิสิต 58210205

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์

1. อ.ดร.ณิชนันต์ ภิระคำ
2. ภก.อ.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรในประเทศไทยจำนวน 9 ชนิด จากพืช 4 วงศ์ ประกอบด้วยวงศ์ Myrtaceae ได้แก่ ดอกตูม กานพลู (*Syzygium aromaticum*) วงศ์ Zingiberaceae ได้แก่ เหง้าขิง (*Zingiber officinale*), เหง้าข่า (*Alpinia galanga*), เหง้าไพล (*Zingiber cassumunar*) วงศ์ Rutaceae ได้แก่ เปลือกส้มโอ (*Citrus maxima*), เปลือกมะนาว (*Citrus aurantifolia*), เปลือกมะกรูด (*Citrus hystrix*), ใบส้มป่อย (*Clausena harmandiana*) และ วงศ์ Myristicaceae ได้แก่ เมล็ดแห้งลูกจันทร์ (*Myristica fragrans*) จากนั้นทำการคัดเลือกและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาทาภายนอกสำหรับรักษาโรคทางผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* โดยวิธี Broth Microdilution test ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น คือ 1000, 500, 250, 125, และ 62.5 µg/ml พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรสามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 500 µg/ml และน้ำมันหอมระเหยยังสามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1000 µg/ml ส่วนน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น ไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดได้ แม้จะใช้ความเข้มข้นสูงสุดคือ 1000 µg/ml จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรซึ่งมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยาทาภายนอกในรูปแบบอิมัลชันเจล และนาโนเจล โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเป็น 10 เท่า, 25 เท่า, และ 50 เท่า ของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (MIC) แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อีกครั้ง พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ 50 เท่าสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ เมื่อทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน และวิธี heating cooling cycle ครบ 6 รอบ พบว่าตำรับดังกล่าวมีความคงตัวดี ไม่มีการแยกชั้น

อาจารย์ที่ปรึกษา อ.ดร.ณิชนันต์ ภิระคำ

Senior Project Academic Year 2019

: Thai herbal volatile oils with antimicrobial activity on *S. aureus* and *C. albicans* for development to topical product

By

- | | |
|-----------------------------|-------------|
| 1. Miss Thanya Horphaibul | ID 58210131 |
| 2. Miss Chavanrat Wetchapan | ID 58210162 |
| 3. Miss Wipavee Kaseamrat | ID 58210205 |

Advisor :

1. Dr. Nichakan Peerakam
2. Dr. Watcharaphong Chaemsawang

ABSTRACT

The objective of this study is aimed to examine the antimicrobial activity of essential oils from 9 Thai medicinal plants from 4 families of plants including Clove (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae), Ginger (*Zingiber officinale*, Zingiberaceae), Siamese ginger (*Alpinia galanga*, Zingiberaceae), Plai (*Zingiber cassumunar*, Zingiberaceae), Pomelo (*Citrus maxima*, Rutaceae), Lime (*Citrus aurantifolia*, Rutaceae), Kaffir lime (*Citrus hystrix*, Rutaceae), Feather fern (*Clausena harmandiana*, Rutaceae) and Nutmeg (*Myristica fragrans*, Myristicaceae). Then, the essential oil from these plants were selected develop as topical antimicrobial product for skin infection treatment which caused by *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Nine essential oils were tested antimicrobial activity by Broth Macrodilution method with 5 concentrations: 1000, 500, 250, 125, and 62.5 µg/ml respectively. Among all essential oil, the results found that clove oil inhibited both of microorganisms at concentration of 500 µg/ml while ginger oil exhibited ability to against *C. albicans* at concentrations of 1000 µg/ml whereas other essential oil showed in-active with microorganisms even at the highest concentration of 1000 µg/ml. Therefore, clove oil and ginger oil were selected to develop as topical antimicrobial through emulgels and nanogels products starting from 10, 25, and 50 times of MIC. As a result, clove oil and ginger oil have an effective of antimicrobial activities. Stability tests were collected both at room temperature of 25 degrees Celsius for 7 days and the 6-cycles for accelerated condition via heating and cooling methods. Either placebo, emulgels, or nanogels of clove oil and ginger oil were stable, without cracking or creaming.

Major Advisor Dr. Nichakan Peerakam

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก อ.ดร.ณิชนันต์ ภีระคำ และ ภก.อ.วัชรพงษ์ แจ่มสว่าง เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ที่คอยให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดระยะเวลาการทำโครงการวิจัยครั้งนี้จึงขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูง

ผู้จัดทำโครงการวิจัยขอขอบพระคุณคณะเภสัชศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัย และเชื้อเพื่อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำโครงการวิจัย และขอขอบพระคุณพี่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ได้ช่วยเหลืออำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการทำวิจัยจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

นสภ.ธัญญา ห่อไพบูลย์ รหัสนิสิต 58210131

นสภ.ชวัลรัตน์ เวชภักดิ์ รหัสนิสิต 58210162

นสภ.วิภาวี เกษมรัตน์ รหัสนิสิต 58210205

8 พฤศจิกายน พ.ศ.2562

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
คำนำ	๗
บทคัดย่อ	๘
ABSTRACT	๙
กิตติกรรมประกาศ	๑๑
สารบัญ	๑๓
สารบัญตาราง	๑๔
สารบัญรูปภาพ	๑๕
บทที่ 1	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
กรอบแนวคิด	3
บทที่ 2	4
พืชสมุนไพรที่มีการนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยสำหรับยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์	4
โครมาโทกราฟี (Chromatography)	7
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผสม โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)	8
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ eugenol	9
การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ 6-gingerol และ 6-shogaol ในน้ำมันหอมระเหยขิง	9
การติดฉลากทางผิวหนัง	10

เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อทางผิวหนัง	12
ปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะในประเทศไทย	14
รูปแบบเภสัชภัณฑ์	14
บทที่ 3	16
พืช	16
น้ำมันหอมระเหย	16
เชื้อจุลินทรีย์	16
วัสดุอุปกรณ์	17
สารเคมี	18
ขั้นตอนการดำเนินงาน	18
บทที่ 4	23
1. การกลั่นน้ำมันหอมระเหย	23
2. การทดสอบผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย	24
3. การทดสอบเอกลักษณ์ของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC	27
4. การเตรียมตำรับอิมัลเจลและนาโนเจล	32
5. การทดสอบผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของตำรับอิมัลเจล และนาโนเจล	33
6. รูปผลการทดลองการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> และ <i>C. albicans</i> ของตำรับที่ผสมน้ำมันหอมระเหย	34
6.1 ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC	34
6.2 ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC	38
6.3 ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC	41
7. การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของตำรับอิมัลเจลและนาโนเจล	45

7.1 ลักษณะตำรับที่ได้หลังเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	45
7.2 ลักษณะตำรับที่ได้หลังทำ heating cooling 6 cycle	45
บทที่ 5.....	47
บรรณานุกรม.....	49
ภาคผนวก.....	56

สารบัญตาราง

หัวข้อ	หน้า
ตารางที่ 1 ภาพรวมของความแตกต่างการติดเชื้อที่ผิวหนัง.....	10
ตารางที่ 2 ร้อยละผลผลิตของการกลั่นน้ำมันหอมระเหย.....	23
ตารางที่ 3 ผลการทดสอบผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย.....	24
ตารางที่ 4 ผลการทดสอบผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด	25
ตารางที่ 5 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ eugenol น้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC ด้วย mobile phase toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 7 : 3 : 0.2.....	27
ตารางที่ 6 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ 6-gingerol น้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC ด้วย mobile phase hexane : acetone ในอัตราส่วน 8 : 2	29
ตารางที่ 7 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ 6-shogaol น้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC ด้วย mobile phase คือ hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 8 : 2.....	31
ตารางที่ 8 สูตรตำรับการเตรียมอิมัลเจลและนาโนเจล	32
ตารางที่ 9 ลักษณะทางกายภาพของตำรับ.....	33
ตารางที่ 10 ผลการทดลองการทดสอบเชื้อของตำรับอิมัลเจล และนาโนเจล	33
ตารางที่ 11 ผลการเปรียบเทียบตำรับก่อนและหลังทดสอบความคงตัวของตำรับด้วยวิธี Heating cooling 6 cycle.....	46

สารบัญรูปภาพ

หัวข้อ	หน้า
รูปที่ 1 กรอบแนวคิดของงานวิจัย.....	3
รูปที่ 2 ภาพแสดงผล TLC Fingerprint ของสารสกัดจากใบคนที่เขมา (<i>Vitex negundo</i>) ในตัวทำละลาย toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 7 : 3 : 0.2 ที่ UV 254 nm (1: สารสกัดจากใบคนที่เขมา; 2: สารมาตรฐาน eugenol).....	9
รูปที่ 3 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ eugenol ในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC โดยใช้ mobile phase toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 7 : 3 : 0.2 ตรวจสอบด้วย UV 254 nm (1.กานพลู, 2.ขิง, 3.ข่า, 4.ไพล, 5.ส้มโอ, 6.มะนาว, 7.มะกรูด, 8.สอ่งฟ้า, 9.ลูกจันทน์, 10.อบเชย, 11.limonene).....	28
รูปที่ 4 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ 6-gingerol ในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC โดยใช้ mobile phase hexane : acetone ในอัตราส่วน 8 : 2 ตรวจสอบด้วย a) UV 254 nm b) สเปกตรัมด้วย 10% sulfuric acid และตรวจสอบด้วย UV 366 nm (1.กานพลู, 2.ขิง, 3.ข่า, 4.ไพล, 5.ส้มโอ, 6.มะนาว, 7.มะกรูด, 8.สอ่งฟ้า, 9.ลูกจันทน์, 10.อบเชย, 11.limonene).....	30
รูปที่ 5 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ 6-shogaol ในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC โดยใช้ mobile phase คือ hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 8 : 2 ตรวจสอบด้วย UV 254 nm (1.กานพลู, 2.ขิง, 3.ข่า, 4.ไพล, 5.ส้มโอ, 6.มะนาว, 7.มะกรูด, 8.สอ่งฟ้า, 9.ลูกจันทน์, 10.อบเชย, 11.limonene).....	31
รูปที่ 6 ลักษณะตำรับที่ได้หลังเตรียม โดยขวดที่ 1 อิมัลเจล placebo, ขวดที่ 2 นาโนเจล placebo, ขวดที่ 3 อิมัลเจลกานพลู, ขวดที่ 4 นาโนเจลกานพลู, ขวดที่ 5 อิมัลเจลขิง, ขวดที่ 6 นาโนเจลขิง.....	32
รูปที่ 7 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลู ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : <i>S. aureus</i> positive, หลอดที่ 2 : Negative, หลอดที่ 3 : <i>S. aureus</i> Placebo อิมัลเจล, หลอดที่ 4 : <i>S. aureus</i> Placebo นาโนเจล, หลอดที่ 5 : <i>S. aureus</i> อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 6 : <i>S. aureus</i> นาโนเจลกานพลู.....	34
รูปที่ 8 ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>S. aureus</i> ของอิมัลเจลและนาโนเจล Placebo.....	35

รูปที่ 9 ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>S. aureus</i> ของอิมัลเจลและนาโนเจลกานพลู ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC	35
รูปที่ 10 ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>S. aureus</i> ของอิมัลเจลและนาโนเจลขิง ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC	36
รูปที่ 11 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูและขิง ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : <i>C. albicans</i> positive, หลอดที่ 2 : Negative, หลอดที่ 3 : <i>C. albicans</i> Placebo อิมัลเจล, หลอดที่ 4 : <i>C. albicans</i> Placebo นาโนเจล, หลอดที่ 5 : <i>C. albicans</i> อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 6 : <i>C. albicans</i> นาโนเจล กานพลู, หลอดที่ 7 : <i>C. albicans</i> อิมัลเจลขิง, หลอดที่ 8 : <i>C. albicans</i> นาโนเจลขิง.....	36
รูปที่ 12 ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>C. albicans</i> ของอิมัลเจลและนาโนเจล Placebo	37
รูปที่ 13 ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>C. albicans</i> ของอิมัลเจลและนาโนเจลกานพลู ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC.....	37
รูปที่ 14 ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>C. albicans</i> ของอิมัลเจลและนาโนเจลขิง ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC	38
รูปที่ 15 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : <i>S. aureus</i> positive, หลอดที่ 2 : Negative, หลอดที่ 3 : <i>S. aureus</i> อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 4 : <i>S. aureus</i> นาโนเจล กานพลู.....	38
รูปที่ 16 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลู และอิมัลเจลขิงที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : <i>C. albicans</i> positive, หลอดที่ 2 : <i>C. albicans</i> อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 3 : <i>C. albicans</i> นาโนเจล กานพลู, หลอดที่ 4 : <i>C. albicans</i> อิมัลเจลขิง..	39
รูปที่ 17 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ของอิมัลเจล และนาโนเจลขิงที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : <i>C. albicans</i> อิมัลเจลขิง, หลอดที่ 2 : <i>C. albicans</i> นาโนเจลขิง.....	39
รูปที่ 18 ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>C. albicans</i> และ <i>S. aureus</i> โดย Petri dish A : ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>C. albicans</i> ของอิมัลเจลขิง ที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC, Petri dish B : ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>C. albicans</i> ของอิมัลเจลและนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ	

MIC, Petri dish C : ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>S. aureus</i> ของอิมัลเจลและนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC	40
รูปที่ 19 ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>C. albicans</i> ของ a) อิมัลเจลและนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC และ b) อิมัลเจลและนาโนเจลซึ่งที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC	40
รูปที่ 20 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : <i>S. aureus</i> positive, หลอดที่ 2 : Negative, หลอดที่ 3 : <i>S. aureus</i> Placebo อิมัลเจล, หลอดที่ 4 : <i>S. aureus</i> Placebo นาโนเจล, หลอดที่ 5 : <i>S. aureus</i> อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 6 : <i>S. aureus</i> นาโนเจลกานพลู	41
รูปที่ 21 ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>S. aureus</i> ของอิมัลเจลและนาโนเจลกานพลู ที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC	41
รูปที่ 22 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> โดยการ streak อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตำรับอิมัลเจลและนาโนเจลที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC ลง Petri dish โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง	42
รูปที่ 23 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : <i>C. albicans</i> positive, หลอดที่ 2 : <i>C. albicans</i> Placebo อิมัลเจล, หลอดที่ 3 : <i>C. albicans</i> Placebo นาโนเจล, หลอดที่ 4 : <i>C. albicans</i> อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 5 : <i>C. albicans</i> นาโนเจลกานพลู	42
รูปที่ 24 ผลการทำ Clear zone เชื้อ <i>C. albicans</i> ของ a) อิมัลเจลและนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC และ b) อิมัลเจลและนาโนเจลซึ่งที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC	43
รูปที่ 25 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> โดยการ streak ลง Petri dish ของ a) อิมัลเจลเจลกานพลูที่ 50 เท่าของ MIC, b) นาโนเจลกานพลูที่ 50 เท่าของ MIC และ c) อิมัลเจลซึ่งที่ 25 เท่าของ MIC	43
รูปที่ 26 ผลการยับยั้งเชื้อ <i>C. albicans</i> ของอิมัลเจล และนาโนเจลซึ่งที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : <i>C. albicans</i> positive, หลอดที่ 2 : Negative, หลอดที่ 3 : <i>C. albicans</i> Placebo อิมัลเจล, หลอดที่ 4 : <i>C. albicans</i> Placebo นาโนเจล, หลอดที่ 5 : <i>C. albicans</i> อิมัลเจลซึ่ง, หลอดที่ 6 : <i>C. albicans</i> นาโนเจลซึ่ง	44

- รูปที่ 27** ผลการทำ Clear zone เชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจลและนาโนเจลซึ่งที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC..... 44
- รูปที่ 28** ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* โดยการ streak เชื้อลง Petri dish โดยที่ a) อิมัลเจลซึ่งที่ 50 เท่าของ MIC, b) นาโนเจลซึ่งที่ 50 เท่าของ MIC)..... 45

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

มนุษย์มีการใช้พืชสมุนไพรมาตั้งแต่โบราณ และประเทศไทยก็มีการใช้พืชสมุนไพรโดย หมอภูมิปัญญาพื้นบ้านในการรักษาโรคภัยไข้เจ็บทั้งภายในและภายนอกร่างกาย แต่หลังจากที่ ความรู้ด้านวิทยาศาสตร์มีการพัฒนาเจริญก้าวหน้ามากขึ้น ได้มีการสังเคราะห์และผลิตยาจาก สารเคมีในรูปแบบที่ใช้ประโยชน์ได้ง่าย สร้างความสะดวกสบายในการรักษามากกว่าการใช้ สมุนไพร ทำให้ความนิยมในการใช้ยาสมุนไพรลดลงอย่างมาก เป็นเหตุให้ความรู้วิทยาการด้าน สมุนไพรขาดการพัฒนาไม่เจริญก้าวหน้าเท่าที่ควร แต่การใช้ยาที่ผลิตจากสารเคมีนั้นมีต้นทุนที่สูง มีราคาแพง และยังมีผลข้างเคียงจากการใช้หรือเกิดอาการดื้อยาได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันทั่วโลกได้ยอมรับแล้วว่าสารสกัดจากสมุนไพรให้คุณประโยชน์ที่ดีในการป้องกันและรักษาโรคได้ สามารถนำมาพัฒนาประยุกต์ใช้ทางยาได้และบางครั้งยังพบว่ามีความปลอดภัยมากกว่าการใช้ยา สังเคราะห์ ดังนั้นสมุนไพรจึงเป็นที่สนใจของผู้คนจำนวนมากในปัจจุบัน นอกจากนี้ประเทศไทย เองยังเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ มีพืชที่ใช้เป็นสมุนไพรมากมาย สามารถนำมา ต่อยอดเพื่อพัฒนาและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจได้

โดยในปัจจุบันได้มีการใช้ยาปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งยาต้านเชื้อจุลชีพบางตัวอาจมี ราคาที่สูง ทำให้ประชากรบางกลุ่มเข้าถึงการรักษาได้ไม่มาก พืชสมุนไพรจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่ จะช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายในการใช้ยาปฏิชีวนะให้กับผู้บริโภค เนื่องจากสารสำคัญโดยเฉพาะสาร กลุ่มน้ำมันหอมระเหยที่เป็นองค์ประกอบในพืชสมุนไพรมีข้อมูลรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุล ชีพได้ ประกอบกับปัญหาทางการแพทย์ในปัจจุบันที่มีการดื้อยาของเชื้อจุลชีพจำนวนมากอัน เนื่องมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่สมเหตุผล และปัญหานี้มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปี ดังนั้น การนำพืชสมุนไพรที่มีอยู่ในประเทศไทยมาใช้เป็นยาต้านจุลชีพทดแทนยาปฏิชีวนะจึงเป็น ทางเลือกที่สามารถนำมาใช้แก้ปัญหาดังกล่าวได้⁽¹⁾

จากการรวบรวมข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าน้ำมันหอมระเหยของพืชมีศักยภาพที่ สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพได้ ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงเลือกพืชสมุนไพรที่สามารถหาได้ทั่วไปในประเทศไทย และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพจำนวน 9 ชนิดจากพืช 4 วงศ์ ประกอบด้วยวงศ์ Myrtaceae ได้แก่ ดอกตูมกานพลู (*Syzygium aromaticum*) วงศ์ Zingiberaceae ได้แก่ เหน้าขิง (*Zingiber officinale*), เหน้าข่า (*Alpinia galanga*), เหน้าไพล (*Zingiber cassumunar*) วงศ์ Rutaceae ได้แก่

เปลือกส้มโอ (*Citrus maxima*), เปลือกมะนาว (*Citrus aurantifolia*), เปลือกมะกรูด (*Citrus hystrix*), ใบสอ่งฟ้า (*Clausena harmandiana*) และ วงศ์ Myristicaceae ได้แก่ เมล็ดแห้งลูกจันทน์ (*Myristica fragrans*) มาทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยและศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อนำมาผลิตเป็นยาทาภายนอกสำหรับรักษาโรคทางผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์

อย่างไรก็ตามการศึกษาพืชสมุนไพรในประเทศไทยที่พบในปัจจุบันนั้นส่วนใหญ่เป็นการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดสารจากพืชเพื่อทดสอบฤทธิ์ หรือสกัดเพื่อนำมาพัฒนาทำเจลล้างมือฆ่าเชื้อ แต่ในด้านการรักษาโรคนั้น การนำน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยมาทำเป็นยาทาฆ่าเชื้อ สำหรับใช้ภายนอกเพื่อรักษาโรคผิวหนังยังไม่ได้ได้รับความนิยมมากนัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญที่จะพัฒนาตำรับยาโดยการประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยสำหรับเป็นยาใช้ภายนอก ด้วยระบบนำส่งยาแบบอิมัลเจลและนาโนเจล ซึ่งระบบนี้มีข้อดีที่สำคัญคือช่วยเพิ่มการดูดซึมยาเข้าสู่ผิวหนัง ส่งผลให้ได้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อทางผิวหนังที่ดีขึ้น นอกจากนี้การใช้สมุนไพรทดแทนยาปฏิชีวนะยังสามารถลดอุบัติการณ์การเกิดเชื้อดื้อยา ลดผลข้างเคียงและสารตกค้างในร่างกายที่เกิดจากการใช้ยา ช่วยลดต้นทุนการนำเข้ายาปฏิชีวนะจากต่างประเทศ และยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรท้องถิ่นของไทยให้เกิดประโยชน์สูงสุด

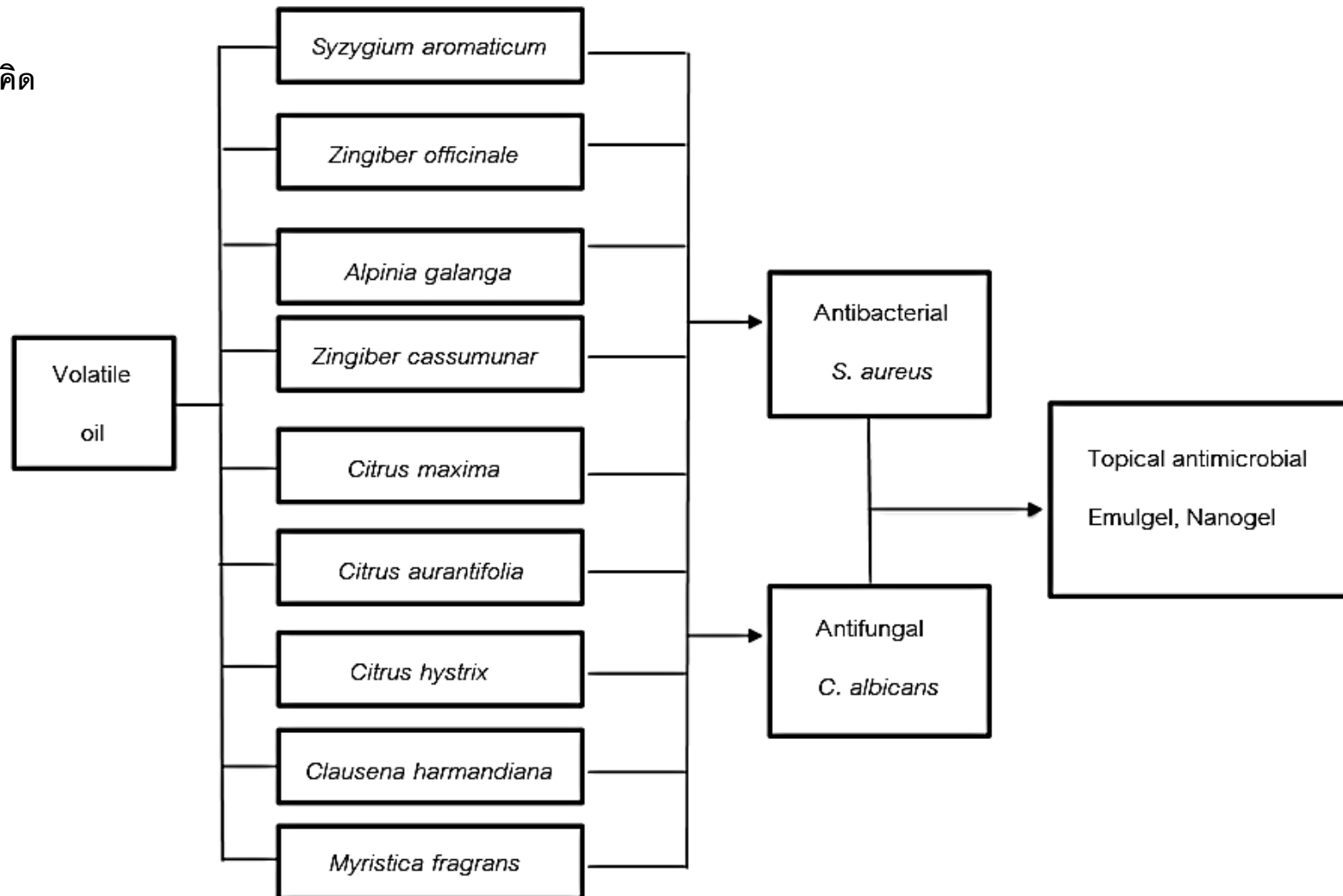
วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) และ *Candida albicans* (*C. albicans*) ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์ Myrtaceae, Zingiberaceae, Rutaceae และ Myristicaceae
2. เพื่อพัฒนาสูตรตำรับยาทาภายนอกสำหรับรักษาโรคทางผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยระบบนำส่งยาแบบอิมัลเจลและนาโนเจล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชวงศ์ Myrtaceae, Zingiberaceae, Rutaceae และ Myristicaceae
2. ได้องค์ความรู้เพิ่มเติมในการเตรียมตำรับยาทาภายนอกด้วยระบบนำส่งยาแบบอิมัลเจลและนาโนเจล
3. สามารถเพิ่มมูลค่าของสมุนไพรให้เกิดประโยชน์สูงสุด

กรอบแนวคิด



รูปที่ 1 กรอบแนวคิดของงานวิจัย

บทที่ 2

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

พืชสมุนไพรที่มีการนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยสำหรับยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ในปัจจุบันมีการค้นพบว่ามีพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยจะเน้นในการศึกษาการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* เป็นหลักเนื่องจากค้นพบว่าเชื้อสองตัวดังกล่าวเป็นสาเหตุของการติดเชื้อบริเวณผิวหนังที่พบบ่อยมากที่สุด⁽²⁾ มีหลายงานวิจัยที่มีการนำส่วนประกอบของพืชมาใช้สำหรับรักษาอาการติดเชื้อในหลายประเทศทั่วโลก⁽³⁾ พืชที่นำมาสกัดสารเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์นั้นมีด้วยกันหลากหลายวงศ์ โดยที่ในต่างประเทศพืชวงศ์ Myrtaceae มีการนำดอกตูมแห้งของกานพลูมาสกัดและทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งในประเทศบราซิลผลที่ได้ค้นพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้ค่อนข้างดี⁽⁴⁾ และมีงานวิจัยลักษณะเดียวกันในประเทศอียิปต์แสดงให้เห็นว่าสารสำคัญที่พบมากที่สุดคือน้ำมันหอมระเหยของกานพลู คือ eugenol (87%), caryophyllene (3.56%), eugenyl acetate (8.01%) และ α -humulene (0.40%) เป็นสารองค์ประกอบหลัก⁽⁵⁾ และมีงานวิจัยรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยของกานพลูสามารถทำลายเซลล์เมมเบรนของเชื้อแบคทีเรียและสามารถทำให้เชื้อตายได้ในที่สุด⁽⁶⁾ eugenol เป็นสารในกลุ่ม Monoterpenes มีกลไกการออกฤทธิ์คือ eugenol จะรบกวนการผ่านของสารเข้าออกเซลล์ได้แก่ โปรตอน โพแทสเซียม โซเดียม แคลเซียม โดยมีรายงานการใช้ค่าไปทดสอบในการประเมินประสิทธิภาพของเซลล์เมมเบรนที่ถูกทำลาย⁽⁷⁾ และทำให้โครงสร้างของเซลล์เสียหาย⁽⁸⁾ นอกจากนี้งานวิจัยในศรีลังกายังพบว่าสารสกัดน้ำมันหอมระเหยของดอกตูมจากกานพลูสามารถทำลายเมมเบรนของ cytoplasmic ทำให้ฆ่าเชื้อ *C. albicans* ได้อีกด้วย⁽⁹⁾ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* เท่ากับ 2.4 mg/ml และ 0.067 mg/ml ตามลำดับ⁽¹⁰⁾

ในขณะที่พืชวงศ์ Rutaceae เช่น มะกรูด ส้มโอ และมะนาวได้ถูกนำไปศึกษาในหลายประเทศทั้งประเทศจีน บราซิล อิตาลี กรีซ และเม็กซิโก และพบว่าเมื่อนำชิ้นส่วนของพืชไปสกัดแล้วนำน้ำมันหอมระเหยมาทดสอบ ผลการศึกษาที่ได้คือน้ำมันหอมระเหยเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ดี^(11, 12) โดยสารสำคัญที่พบได้มากที่สุดคือในพืชวงศ์ Rutaceae คือ limonene^(13, 14)

ในส่วนของส้มโอนั้นมีการนำเปลือกส้มโอมาสกัดเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* พบว่าสารสกัดจากเปลือกส้มโอสามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ ซึ่ง

พบว่าน้ำมันหอมระเหยส้มโอมี limonene (46.36%) ในปริมาณมากแต่สารสำคัญที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้จริงคือ linalool (1%)⁽¹⁵⁾ ซึ่งเป็น strong antimicrobial โดยมีกลไกไปทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้เกิดการรั่วของสารจากการขนส่งสารเข้าออกภายในเซลล์และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทำให้กระบวนการ translation ของยีนหยุดการทำงาน⁽¹⁶⁾

นอกจากนี้ยังมี geraniol (1.1%) และ borneol (0.6%) ซึ่งเป็นสารกลุ่ม alcoholic monoterpenes ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย⁽¹⁷⁾ ในน้ำมันหอมระเหยของมะกรูดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ โดยสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากผลมะกรูดมี geraniol และ borneol ซึ่งเป็นสารกลุ่ม alcoholic monoterpenes ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์⁽¹⁷⁾ นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยของมะกรูดยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. albicans* ได้อีกด้วย โดยที่สาร geraniol และ β -Pinene (10.9%) จะไปขัดขวางการสร้าง biofilm ของเชื้อและยังส่งผลต่อ phagocytosis ของ *C. albicans* อีกด้วย^(18, 19) และยังมีการศึกษาสารสกัดจากใบแห้งของต้นสอ่งฟ้าแดงพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้โดยมีสารสำคัญที่ได้จากการสกัดคือ carbazoles alkaloids ซึ่งจะไปทำลายดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียโดยการไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase และ protein kinase C ทำให้มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้

จากการศึกษาส่วนประกอบหลักน้ำมันหอมระเหยของมะนาวพบว่าประกอบด้วยสารจำพวก monoterpenes โดยมี limonene พบมากที่สุด (77.90%) ซึ่งน้ำมันหอมระเหยนี้มีฤทธิ์ที่สามารถต้านเชื้อ *S. aureus* ได้⁽²⁰⁾ โดยกลไกการออกฤทธิ์ของ limonene เกิดขึ้นที่ tricarboxylic acid cycle โดยเพิ่มการสร้าง hydroxyl radical ทำให้เกิด oxidative DNA damage เหมือนกลไกการออกฤทธิ์ของยา bactericidal⁽²¹⁾ รวมทั้งยังทำลายผนังเซลล์ของเชื้อ *C. albicans* โดยการ overexpressing genes และเกิด oxidative stress ทำให้เกิด DNA damage และ cell apoptosis ได้อีกด้วย⁽²²⁾ แต่อย่างไรก็ตาม มีอีกงานวิจัยหนึ่งได้ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Broth microdilution พบว่า limonene ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 4000 g/ml ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*⁽²³⁾

ในอดีตได้มีการนำเมล็ดของลูกจันทร์ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Myristicaceae มาศึกษาโดยการนำเมล็ดแห้งมาบดแล้วสกัด พบว่าสามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้โดยพบสารสกัดสำคัญที่ออกฤทธิ์คือ α -pinene และ β -pinene ที่จะไปทำลายเซลล์เมมเบรนของเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมีสารสำคัญอีกตัวหนึ่งคือ carvacrol ที่สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ด้วยวิธี intracellular และทำลายเซลล์จากภายใน ซึ่งผลการวิเคราะห์จาก GC-MS พบว่าปริมาณของสารในน้ำมันลูกจันทร์มีดังนี้ β -pinene (10.26%), *p*-cymene (1.81%), carvacrol (1.54%) และ β -caryophyllene (0.82%)

ซึ่งเมื่อออกฤทธิ์ร่วมกันจะส่งผลต่อการทำลายเชื้อได้ดียิ่งขึ้น⁽²⁴⁾ ในขณะที่อีกการศึกษาหนึ่งพบว่า สารสำคัญจากเมล็ดของลูกจันทน์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีคือ trimyristin, myristic acid, และ myristicin ตามลำดับ⁽²⁵⁾ โดยในประเทศศรีลังกาได้มีการนำเมล็ดแห้งของลูกจันทน์มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ทั้งหมด 3 สายพันธุ์พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ได้นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *C. albicans* ได้ดีเช่นกัน⁽⁹⁾

ประเทศมาเลเซียและสหรัฐอเมริกา มีการนำพืชหลายชนิดจากวงศ์ Zingiberaceae ไม่ว่าจะเป็นขิง ข่า และไพล มาทดสอบและพบว่าใบและเหง้าของขิงมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้โดยสารสำคัญที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากส่วนใบคือ caryophyllene และส่วนเหง้านั้นจะพบ camphene, geranial และ geranyl acetate⁽²⁶⁾ ซึ่งมีสารสำคัญในกลุ่ม phenolic ได้แก่ gingerol (25%) และ shogaol (18%) กลุ่ม monoterpene ได้แก่ α -curcumene (14%) และกลุ่ม sesquiterpene ได้แก่ zingiberene (9%), β -bisabolene (4%), α -farnesene (11%), และ β -sesquiphellandrene (9%) มีงานวิจัยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากขิงสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ มีกลไกการออกฤทธิ์คือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดความไม่คงตัวและเสียหาย ยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้แรงในการเคลื่อนที่ของโปรตอนในเซลล์ลดลง และทำให้ส่วนประกอบของไซโทพลาซึม รวมถึงสารเมแทบอลิต์ไอออนเกิดการรั่วไหลออกนอกเซลล์ ซึ่งสาเหตุเหล่านี้ทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บและตายลงในที่สุด⁽²⁷⁾

ในขณะที่สารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากข่าและไพลนั้นสามารถยับยั้งได้ทั้ง *S. aureus* และ *C. albicans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ^(26, 28, 29) ซึ่งการศึกษาในประเทศเนเธอร์แลนด์ พบว่าสารสำคัญในเหง้าของข่าที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีทั้ง *S. aureus* และ *C. albicans* คือ terpinen-4-ol, α -terpineol และ limonene ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีสารสำคัญบางชนิดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้เฉพาะ *S. aureus* คือ α -pinene, β -pinene และ 1,8-cineole⁽³⁰⁾ ในขณะที่อีกงานวิจัยหนึ่งพบว่าองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากข่า คือ D,L-10-acetoxychavicol acetate ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงค่า pH ของสารในเซลล์ ส่งผลให้เกิดสลายตัวของโปรตีน ทำให้เยื่อหุ้มไซโทพลาสซึมแตกตัว และฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ จากการวิจัยพบว่ามีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 0.325 mg/ml และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* เท่ากับ 1.3 mg/ml⁽³¹⁾ และมีการศึกษาสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากข่าที่พบว่าน้ำมันหอมระเหยของข่านั้นสามารถยับยั้งได้ทั้ง *S. aureus* และ *C. albicans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีการศึกษาในประเทศเนเธอร์แลนด์ พบว่าสารสำคัญในเหง้าของข่าที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้ดีทั้ง *S.*

aureus และ *C. albicans* คือ terpinen-4-ol (2.9%), α -terpineol (2.1%) และ limonene ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีสารสำคัญบางชนิดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้เฉพาะ *S. aureus* คือ α -pinene (1.1%), β -pinene (1.5%) และ 1,8-cineole (53.4%)⁽³⁰⁾

สำหรับในประเทศไทยมีการศึกษาพืชวงศ์ Zingiberaceae พบว่าชาจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่าขิงสองเท่าโดยจะไปทำลายเซลล์เมมเบรนและผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีความเป็น hydrophobicity จึงไปรบกวนโครงสร้างไขมันในเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรียส่งผลให้การซึมผ่านของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป และยังส่งผลต่อการรั่วของไอออนภายในเซลล์อีกด้วย โดยสารสำคัญในชาคือ acetoxychavicol acetate (ACA) ซึ่งสกัดได้จากส่วนเหง้าของชา⁽³¹⁾ ในส่วนเหง้าขิงนั้นพบว่าฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย มาจากการที่น้ำมันหอมระเหยของขิงที่มี gingerol และ shogaol เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังมี zingiberene และ zingiberol รวมไปถึงชัน (Oleo-resin) อีกด้วย⁽³²⁾

ในส่วนของไพลที่ได้จากประเทศไทย เมื่อนำเหง้าไพลมากลั่นด้วยไอน้ำ จะได้น้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วย สารกลุ่ม monoterpenes⁽³³⁾ ได้แก่ sabinene, terpinen-4-ol, และ (E)-1(3, 4-dimethylphenyl) butadiene (DMPBD) เป็นหลัก⁽³⁴⁾ โดยมีงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า sabinene มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Campylobacter jejuni* และ *Escherichia coli* (MIC >50%) ได้ปานกลาง และไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *C. albicans*⁽³⁵⁾ และน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยไอน้ำจากไพลที่มาเลเซีย (%yield เท่ากับ 0.30% w/w) จะมีส่วนประกอบหลัก คือ 2,6,9,9-tetramethyl-2,6,10-cycloundecatrien-1-one (60.77%) และ α -caryophyllene (23.92%) โดยน้ำมันหอมระเหยนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อที่ต่ำมาก โดยไม่สามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Bacillus cereus* และแกรมลบ *E. coli*, รวมถึง *C. albicans* และ *Cryptococcus neoformans*⁽³⁴⁾

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งการติดเชื้อจุลินทรีย์ทางผิวหนังได้ ดังนั้นพืชสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาต่อยอดสำหรับพัฒนารักษาแผลติดเชื้อที่ผิวหนังซึ่งเกิดจากเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ได้

โครมาโทกราฟี (Chromatography)

เป็นวิธีการแยกของผสมให้บริสุทธิ์และใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ขององค์ประกอบในสารผสม

โครมาโทกราฟีสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท⁽³⁶⁾ คือ

1. โครมาโทกราฟีที่ใช้หลักการแบบดูดซับ ได้แก่ Thin Layer chromatography (TLC), Preparative TLC และ Column chromatography โดยเฟสนิ่ง (stationary phase) จะเป็นอะลูมินา (alumina, Al_2O_3) หรือซิลิกาเจล (silica gel, SiO_2) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ส่วนเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นก๊าซหรือของเหลว
2. โครมาโทกราฟีที่ใช้หลักการกระจายตัว ได้แก่ Paper chromatography โดยเฟสนิ่ง (stationary phase) จะเป็นของแข็ง ส่วนเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นก๊าซหรือของเหลว

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผสม โดยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

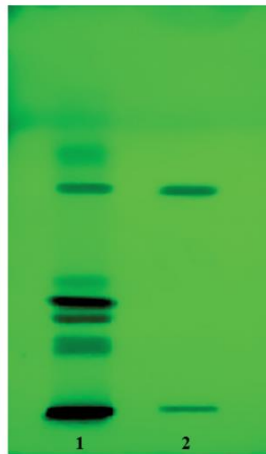
เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารและวิเคราะห์สารในเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของสารด้วยตัวทำละลายหรือตัวพา (mobile phase) กับ การถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ (adsorbent หรือ stationary phase) ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างบนตัวดูดซับขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารตัวอย่างกับตัวทำละลายและความสามารถในการดูดซับของตัวดูดซับที่มีต่อสารตัวอย่างในแต่ละชนิด สารตัวอย่างที่แตกต่างกันจะถูกละลายและถูกดูดซับได้ไม่เท่ากัน โดยสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ดีและถูกดูดซับน้อยจะเคลื่อนที่เร็ว ค่า R_f เข้าใกล้ 1.0 (R_f = ระยะทางที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่/ ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่) ส่วนสารที่ละลายในตัวทำละลายได้น้อยและถูกดูดซับได้ดีจะเคลื่อนที่ช้า ค่า R_f จะเข้าใกล้ 0 ซึ่งตัวดูดซับที่นิยมใช้คือ ซิลิกาเจลและตัวทำละลายหรือตัวพาที่นำมาใช้ในการแยกสารมีหลายชนิด ทั้งนี้ อาจมีการใช้ตัวทำละลายเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันเพื่อให้เกิดการแยกที่ดีที่สุด ตัวอย่างของตัวทำละลาย เช่น น้ำ เอทานอล เมทานอล เอทิลอะซิเตต กรดฟอร์มิก คลอโรฟอร์ม สารตัวอย่างบางชนิดสามารถแยกโดยใช้ TLC แล้วสามารถมองเห็นสีได้ด้วยตาเปล่า ได้แก่ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ชาลโคน (chalcone) และออโรน (ourone) แต่บางชนิดต้องนำแผ่น TLC ไปทำปฏิกิริยากับไอของแอมโมเนีย หรือส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) หรือฉีดพ่นด้วยสารต่าง ๆ เช่น สารละลายฟอสฟอรัส สารละลายวานิลลินในกรดซัลฟูริก สารละลายวานิลลินในกรดไฮโดรคลอริก สารละลายโพแทสเซียมไอโอเดต สารละลายกิบบส์ (Gibbs reagent) และสารละลาย DPPH

ข้อดีของวิธีนี้คือ ใช้สารตัวอย่างในปริมาณน้อย วิเคราะห์สารหลายชนิดได้พร้อมกัน ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น ขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน ใช้ต้นทุนต่ำในการวิเคราะห์ตัวอย่าง สามารถแยกองค์ประกอบในสารตัวอย่างได้ทั้งที่มีสีและไม่มีสี แต่มีข้อเสียคือ มีความไวและความแม่นยำ

ต่ำ และในกรณีที่องค์ประกอบในตัวอยางมีค่า R_f ใกล้เคียงกันมากจะไม่สามารถแยกองค์ประกอบต่าง ๆ เหล่านั้นออกจากกันได้หรือแยกได้แต่ไม่บริสุทธิ์⁽³⁷⁾

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ eugenol

จากงานวิจัยของ Hemendra Y. และคณะได้ทำการทดสอบการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดจากใบคนที่เขมา (*Vitex negundo*) โดยเทียบกับสารมาตรฐานซึ่งเป็น eugenol ใช้ตัวดูดซับ (stationary phase) เป็นซิลิกาเจล ส่วนตัวทำละลาย (mobile phase) เป็น toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 7 : 3 : 0.2 ตรวจสอบภายใต้แสง UV 254 nm คำนวนค่า R_f ของ eugenol ได้ 0.65⁽³⁸⁾



รูปที่ 2 ภาพแสดงผล TLC Fingerprint ของสารสกัดจากใบคนที่เขมา (*Vitex negundo*) ในตัวทำละลาย toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 7 : 3 : 0.2 ที่ UV 254 nm (1: สารสกัดจากใบคนที่เขมา; 2: สารมาตรฐาน eugenol)⁽³⁸⁾

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ 6-gingerol และ 6-shogaol ในน้ำมันหอมระเหยขิง

งานวิจัยของ Usama IA. และคณะได้ทำการทดสอบการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ 6-gingerol ในน้ำมันหอมระเหยจากขิง โดยวิธี TLC ใช้ตัวดูดซับ (stationary phase) เป็นซิลิกาเจล ส่วนตัวทำละลาย (mobile phase) เป็น hexane : acetone ในอัตราส่วน 8 : 2 จากนั้นฉีดพ่นสเปรย์ด้วย 10% sulfuric acid นำไปให้ความร้อนด้วย Hot plate คำนวนค่า R_f ของ 6-gingerol ได้ 0.15⁽³⁹⁾

จากงานวิจัยของ Uppuluri VM. และ Reba P. ได้กล่าวถึงการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ 6-shogaol ที่เป็น biomarker ของขิง โดยวิธี TLC ใช้ตัวดูดซับ (stationary phase) เป็นซิลิกาเจล ส่วนตัวทำละลาย (mobile phase) เป็น hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 80 : 20 ตรวจสอบภายใต้แสง UV 254 nm คำนวนค่า R_f ของ 6-shogaol ได้ 0.46⁽⁴⁰⁾

การติดเชื้อทางผิวหนัง

ผิวหนังเป็นเนื้อเยื่อส่วนนอกสุดของร่างกายที่ห่อหุ้มโครงสร้างและอวัยวะทุกอย่างไว้เพื่อปกป้องอวัยวะภายในไม่ให้ได้รับอันตราย รักษาระดับอุณหภูมิภายในร่างกาย ขับของเสียออกทางต่อมเหงื่อ รับรู้การสัมผัสและความรู้สึก รวมถึงมีการป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย โดยปกติแล้วผิวหนังมีเชื้อประจำถิ่นอาศัยอยู่ แต่หากมีการเปลี่ยนแปลงสภาพผิวหนังไปจากเดิม เช่น มีบาดแผล เป็นโรคทางผิวหนัง หรือภูมิคุ้มกันอ่อนแอลงอาจทำให้มีการติดเชื้อเหล่านี้ที่ผิวหนังได้ ซึ่งการติดเชื้อที่ผิวหนังสามารถเกิดได้จากทั้งเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา หรือปรสิต

Skin and Skin Structure Infection (SSSI) คือการติดเชื้อที่ผิวหนัง หรือการติดเชื้อที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันใต้ชั้นผิวหนัง โดยปกติแล้ว SSSI สามารถแบ่งเป็นการติดเชื้อแบบมีหนองและไม่มีหนอง หรือจะแบ่งได้ตามระดับความลึกของการติดเชื้อในชั้นผิวหนัง การติดเชื้อแบบมีหนอง ได้แก่ folliculitis, furuncle, carbuncle, abscess, inflamed epidermoid cyst และการติดเชื้อแบบไม่มีหนอง ได้แก่ impetigo, ecthyma, erysipelas, cellulitis, necrotizing fasciitis (ตารางที่ 1)⁽⁴¹⁾

ตารางที่ 1 ภาพรวมของความแตกต่างการติดเชื้อที่ผิวหนัง

การติดเชื้อ		โครงสร้างชั้นผิวหนังที่มีการติดเชื้อ	เชื้อก่อโรค	การรักษา
การติดเชื้อแบบมีหนอง	folliculitis	hair follicle	<i>S. aureus</i>	topical antimicrobial
	furuncle	hair follicle, dermis and subcutaneous tissue	<i>S. aureus</i>	incision and drainage (systemic antimicrobial)
		multiple hair follicle, dermis and subcutaneous tissue		incision and drainage (systemic antimicrobial)
	carbuncle	multiple hair follicle, dermis and subcutaneous tissue	<i>S. aureus</i>	incision and drainage (systemic antimicrobial)
	abscess	any layer of the skin	<i>S. aureus</i>	incision and drainage (systemic antimicrobial)
	inflamed epidermoid cyst	epidermoid cyst	normal skin flora	incision and drainage (systemic antimicrobial)

การติดเชื้อ		โครงสร้างชั้นผิวหนังที่มีการติดเชื้อ	เชื้อก่อโรค	การรักษา
การติดเชื้อแบบไม่เฉพาะเจาะจง	impetigo	superficial epidermis	<i>S. aureus</i> and streptococci	topical or oral antimicrobial
	ecthyma	deeper epidermis	<i>S. aureus</i> and streptococci	systemic (oral) antimicrobial
	erysipelas	superficial dermis	streptococci	systemic antimicrobial
	cellulitis	deeper dermis and subcutaneous tissue s	streptococci	systemic antimicrobial
	necrotizing fasciitis	fascia between subcutaneous tissue and muscle	usually polymicrobial	surgical debridement and systemic antimicrobial

แผลติดเชื้อ คือ บาดแผลที่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่มากขึ้นจนทำให้เกิดการขัดขวางกระบวนการสมานแผลและทำลายเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล สามารถลุกลามไปทำลายเนื้อเยื่อบริเวณข้างเคียง หรือเป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ เชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อบริเวณผิวหนังที่พบบ่อยมากที่สุด คือ *S. aureus* ซึ่งพบมากถึงร้อยละ 20 โดยหลักการสำคัญในการรักษาแผลติดเชื้อ คือการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียบริเวณแผลและควรพิจารณาใช้ยาต้านจุลชีพอย่างเหมาะสมเพื่อป้องกันการเกิดเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น⁽²⁾

ลักษณะอาการการติดเชื้อทางผิวหนัง แบ่งออกได้เป็น 5 ระดับ

1. Contamination คือ ระยะที่มีเชื้อปนเปื้อนบนผิวหนังแต่ยังไม่ก่อโรค ไม่มีอาการแสดง
2. Colonization คือ ระยะแบ่งตัวของเชื้อโดยมีเชื้อประจำถิ่นที่อยู่บนผิวหนังหรือเนื้อเยื่อของร่างกาย แต่ไม่ทำให้เกิดอาการ และไม่พบว่าร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ
3. Local infection คือ ระยะที่มีการติดเชื้อที่ผิวหนัง มีการรุกรานของเชื้อของสู่บาดแผลหรือเนื้อเยื่อผิวหนัง มีอาการเจ็บ บวม แดง รักษาโดยการใชยาปฏิชีวนะแบบทา ร่วมกับการตกแต่งแผล

4. Spreading infection คือ ระยะที่มีการรุกรานเข้าสู่อวัยวะภายในร่างกาย มีอาการเจ็บ บวม แดง ร้อน มีขนาดบาดแผลใหญ่มากกว่า 2 เซนติเมตร รักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะ แบบรับประทานหรือแบบฉีด
5. Systemic infection คือ ระยะที่มีการติดเชื้อเข้าสู่กระแสเลือด มีอาการไข้ หนาวสั่น มีการ เพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาว มีระดับน้ำตาลในเลือดผิดปกติ และอาจนำไปสู่อวัยวะล้มเหลว หรือการตายได้รักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะแบบรับประทานหรือแบบฉีด⁽⁴²⁻⁴⁶⁾

เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อทางผิวหนัง

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกในวงศ์ Micrococcaceae ที่สามารถ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน มีโคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ หนูน เรียงตัว เป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งน เชื้อชนิดนี้ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ สามารถเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิ 7-46 °C และค่า pH ที่อยู่ในช่วง 4-10⁽⁴⁷⁾ การติดเชื้อนี้สามารถเกิดขึ้นได้ทั่วไป ทั้งจากการติดเชื้อ ในชุมชนรวมถึงการติดเชื้อจากโรงพยาบาล ซึ่งการรักษาในปัจจุบันมีความยากมากขึ้น เนื่องจากมี เชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยาหลายตัวเกิดขึ้น เช่น Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ซึ่งเป็นการติดเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา⁽⁴⁸⁾ *S. aureus* สามารถพบได้ทั่วไปใน สิ่งแวดล้อม และยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของมนุษย์บนผิวหนังและเยื่อเมือกโดยส่วนใหญ่มักพบ บริเวณจมูกของบุคคลที่มีสุขภาพดี ปกติแล้ว *S. aureus* ไม่เป็นเชื้อที่ก่อโรคทางผิวหนัง แต่อย่างไร ก็ตามจากงานวิจัยพบว่า *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อที่พบมากที่สุด และเป็น สาเหตุของการติดเชื้อหลายชนิดในมนุษย์ หากเชื้อนี้เข้าสู่กระแสเลือดหรือเนื้อเยื่อภายใน อาจทำ ให้เกิดการติดเชื้อที่รุนแรงหลายรูปแบบ ซึ่งโดยทั่วไปสามารถติดต่อได้จากการสัมผัสโดยตรง⁽⁴⁹⁾ และทำให้เกิดโรคติดเชื้อทางผิวหนัง โดยมีอาการ คือ เป็นฝีหนอง มีการอักเสบ ปวดบวมแดงร้อน และมักจะรุนแรงมากขึ้นเมื่อเป็นเชื้อภายในโรงพยาบาลที่ก่อโรคในลักษณะเชื้อฉวยโอกาสในผู้ที่มี ร่างกายอ่อนแอ มีแผลถลอก หรือแผลจากการผ่าตัด⁽⁵⁰⁾

S. aureus ประกอบด้วยยีนประมาณ 2,600 ยีน และมีดีเอ็นเอทั้งหมดในโครโมโซม 2.8 ล้านคู่เบส แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ *S. aureus* และ *S. aureus anaerobius* โดยที่ *S. aureus* สามารถสร้างสารหรือโครงสร้างที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน ได้แก่

1. แคปซูล (Capsule) เป็นโครงสร้างที่ห่อหุ้มอยู่ชั้นนอกสุดของเซลล์ การสร้างแคปซูลจะ พบในสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค ซึ่ง *S. aureus* สามารถสร้าง แคปซูลเมื่ออยู่ในสิ่งมีชีวิต และอาจสูญเสียการสร้างไปเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยง

เชื้อ สายพันธุ์ที่สร้างแคปซูลได้นั้นไม่สามารถใช้วิธีการจัดจำแนกด้วย phage (phage typable) และไม่สามารถสร้างเอนไซม์ Coagulase ชนิดติดกับเซลล์ (Clumping Factor)

2. กรดไทโคอิก (Teichoic acid) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่มีฟอสเฟตชนิดจำเพาะกับสายพันธุ์ (species – specific carbohydrate antigens) ซึ่งเชื้อชนิดที่สร้างแอนติเจนนี้ได้แก่ *S. aureus* ที่มี polysaccharide A และ *Staphylococcus epidermidis* ที่มี polysaccharide B
3. โปรตีนเอ (Protein A) เป็นโปรตีนที่ผนังเซลล์โดยเชื่อมติดกับผนังเซลล์ชั้น peptidoglycan
4. เอนไซม์ Coagulase ชนิดติดกับเซลล์ อาจเรียกว่า Clumping Factor สร้างโดย *S. aureus* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างแคปซูล โดยจะเกาะกันเมื่ออยู่ใน plasma ที่มีสาร fibrinogen อยู่ด้วย เอนไซม์ Coagulase ชนิดติดกับเซลล์นี้เป็นส่วนของผิวเซลล์ซึ่งทำปฏิกิริยากับ α และ β chain ของ fibrinogen ทำให้เกิด cross-linked⁽⁵¹⁾

Candida albicans เป็นเชื้อราประเภทยีสต์ที่มักทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนัง ซึ่ง *Candida* spp. หลายสายพันธุ์สามารถเป็นเชื้อก่อโรคได้ แต่สายพันธุ์ที่พบได้บ่อยที่สุดคือ *C. albicans* สายพันธุ์นี้เป็นเชื้อราชนิดยีสต์ แกรมบวกที่มีเซลล์เดี่ยว ขยายพันธุ์โดยการ budding และเป็น dimorphic ซึ่งมีสองรูปแบบ คือ เป็น blastospores รูปไข่ (หรือ blastoconidia) หรือ pseudohyphae ซึ่งการ budding เกิดขึ้นจาก blastospores⁽⁵²⁾ *C. albicans* เป็นเชื้อยีสต์ที่พบอยู่ตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายในคนปกติ เช่น ในช่องปาก ช่องคลอด เชื้อจะอยู่ปะปนกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นชนิดอื่น ซึ่งเชื้อตัวนี้มีความสามารถในการยึดเกาะกับเนื้อเยื่อ สร้างเอนไซม์ secretory aspartyl proteases และ phospholipase ได้

C. albicans สามารถก่อโรคได้ในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและแบ่งจำนวนมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณผิวหนังที่อับชื้น ได้แก่ ซอกพับและเย็บของผิวหนัง และสามารถติดเชื้อในกระแสเลือดได้ โดยเฉพาะในเด็ก ผู้สูงอายุ ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือผู้ป่วยที่มีภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ⁽⁵²⁾ หากมีการติดเชื้อที่ผิวหนังจะมีอาการผื่นแดง คัน ลามออกเป็นวงเล็ก ๆ บางครั้งอาจพบรูขุมขนอักเสบและตุ่มหนองร่วมด้วย สำหรับการติดเชื้อที่ช่องปากจะมีฝ้าขาวที่ลิ้นหรือกระพุ้งแก้ม ถ้าติดเชื้อบริเวณช่องคลอดจะมีอาการตกขาวร่วมกับอาการคันหรือแสบ และหากติดเชื้อที่อวัยวะเพศชายจะมีผื่นสีขาวหรือตุ่มหนองที่ปลายของอวัยวะเพศ⁽⁵³⁾

ยาที่ใช้ในการรักษาเมื่อมีการติดเชื้อราที่ผิวหนัง คือ ยาทาในกลุ่ม polyene และ azole ซึ่งยาทาในกลุ่ม polyene พบว่ายา nystatin มีการใช้มากที่สุดโดยเฉพาะการติดเชื้อราในช่องปาก ส่วนยาทาในกลุ่ม azole นิยมใช้ clotrimazole หรือ miconazole โดยยาข้างต้นนี้จะใช้เป็นยาทาภายนอกในรูปแบบ pastilles, creams, suspensions หรือ lozenges ซึ่งการเลือกใช้ยาในแต่ละสูตรตำรับจะขึ้นอยู่กับยาแต่ละตัวและจุดประสงค์ในการรักษาเพื่อให้สามารถใช้ยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ และลดปัญหาที่เกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะได้อีกด้วย

ปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะในประเทศไทย

ในหลายปีที่ผ่านมาอัตราการเข้าโรงพยาบาลจากการติดเชื้อทางผิวหนังได้เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 30 โดยโรคที่พบมากที่สุดของผู้ป่วยที่เข้าโรงพยาบาล คือ Superficial infection ที่ส่วนมากเป็นผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 65 ปี⁽⁵⁴⁾ จากการสำรวจโดยองค์การอนามัยโลกพบว่ามากกว่าร้อยละ 50 ของการใช้ยาเป็นไปอย่างสูญเปล่าไม่สมเหตุผล และส่งผลต่อผู้ป่วยทั้งในด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการรักษา ปัญหาการใช้ยาอย่างไม่สมเหตุผลจำนวนมากเกิดขึ้นทั้งในสถานพยาบาลและในชุมชน ซึ่งเป็นปัญหาของประเทศไทยมาอย่างยาวนานหลายทศวรรษ งานวิจัยหลายชิ้นชี้ชัดว่าประเทศไทยมีการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่สมเหตุผลทั้งในกลุ่มประชาชน บุคลากรทางการแพทย์ โดยปัจจัยที่ทำให้เกิดการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่สมเหตุผลมีหลายสาเหตุ เช่น มีการใช้ยาปฏิชีวนะที่เกินความจำเป็นไม่เหมาะสมกับโรค ประชาชนสามารถเข้าถึงยาปฏิชีวนะได้ง่ายเกินไป สามารถซื้อยาปฏิชีวนะมารับประทานได้เองโดยไม่ต้องผ่านบุคลากรทางการแพทย์ การใช้ยาปฏิชีวนะอย่างพร่ำเพรื่อโดยไม่จำเป็นทำให้ปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้มูลค่าการผลิตและนำเข้ากลุ่มยาฆ่าเชื้อรวมถึงยาปฏิชีวนะสูงสุดเป็นอันดับ 1 ของประเทศอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปีพ.ศ. 2543 เป็นต้นมา ในปีพ.ศ. 2552 ยากลุ่มนี้มีมูลค่ารวมประมาณ 22,913.52 ล้านบาท หรือคิดเป็นประมาณร้อยละ 20.09 ของมูลค่ายาทั้งหมดของประเทศ⁽⁵⁵⁾

รูปแบบเภสัชภัณฑ์

อิมัลชัน (Emulsion) เป็นตำรับที่ประกอบด้วย 2 วัฏภาคที่ไม่เข้ากัน โดยมีตัวยาสำคัญกักเก็บอยู่ในวัฏภาคภายใน และกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคภายนอก พร้อมกับมีการใช้สารก่ออิมัลชัน (Emulsifying agent) เพื่อให้สูตรตำรับมีความคงตัว มีข้อดีที่สำคัญ คือ สามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา⁽⁵⁶⁾

เจล (Gel) เป็นสารกึ่งแข็ง ที่มีลักษณะโปร่งใสหรือโปร่งแสง เกิดจากสารก่อเจล (Gelling agent) ซึ่งอาจเป็นสารโมเลกุลเล็กหรือใหญ่กระจายตัวอยู่ในตัวกลาง โดยที่โมเลกุลของสารเกิดปฏิกิริยา cross-linked ทำให้ของเหลวตัวกลางไม่สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ ซึ่งข้อดีของเจล คือ เป็นตำรับที่ไม่มีความมัน มีความคงตัวดี และสามารถควบคุมการปลดปล่อยยาได้ เช่นเดียวกับอิมัลชัน^(57, 58)

อิมัลเจล (Emulgel) เป็นการนำประโยชน์ของทั้งอิมัลชันและเจลมารวมกัน ซึ่งเพิ่มประสิทธิภาพของการควบคุมการปลดปล่อยยาเป็นแบบทวีคูณ โดยอิมัลเจลเกิดจากการที่อิมัลชันถูกทำให้เป็นเจลโดยการรวมเข้าด้วยกันกับตัวกลางที่เป็นเจล ซึ่งในอิมัลชัน อนุภาคของยานั้นได้รวมกันอยู่ในวัฏภาคภายใน ซึ่งทำหน้าที่เป็นที่กักเก็บยาไว้ และทำการส่งผ่านยาออกมาผ่านวัฏภาคภายนอก ทำให้ยาถูกส่งออกไปสู่ผิวหนัง และถูกดูดซึมได้ อิมัลเจลจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับยาที่เป็น class II ตามการจำแนกประเภทของ Biopharmaceutics Classification System (BCS) ที่มีความสามารถในการละลายต่ำแต่ซึมผ่านได้สูง ซึ่งอิมัลเจลมีความสามารถสูงในการซึมผ่านผิวหนัง และมีคุณสมบัติที่ดีหลายอย่าง เช่น มีการไหลแบบ thixotropic ซึ่งเป็นการไหลที่มีค่าความหนืดลดลง ในขณะที่ให้ค่าอัตราเฉือนคงที่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น⁽⁵⁹⁾ ซึ่งอิมัลเจลจะมีความใส มีความมันต่ำ สามารถกระจายตัวและละลายน้ำได้ดี ล้างออกง่าย ทำให้ผิวหนังชุ่มชื้น ไม่เป็นคราบ และไม่เหนอะหนะ สามารถเพิ่มความร่วมมือในการใช้ยาของผู้ป่วยได้ นอกจากนี้ยังมีการเก็บรักษาที่นาน และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้อิมัลเจลนิยมใช้เป็นยาทาภายนอกสำหรับด้านการอักเสบและรักษาโรคทางผิวหนังที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อรา

นาโนเจล (Nanogel) มีลักษณะโปร่งใส หรือโปร่งแสง เป็นตำรับยาใช้ภายนอกที่มีความสามารถในการควบคุมการปลดปล่อยยาแบบทวีคูณเช่นเดียวกับอิมัลเจล โดยมีขนาดของอนุภาคเป็นระดับนาโน ทำให้สามารถแทรกซึมเข้าสู่ชั้นผิวหนังไปได้ลึกและเร็วขึ้นกว่าเดิม สารก่อเจล (Gelling agent) เป็นสารที่ทำให้ความคงตัวของนาโนเจลดีขึ้น โดยการลดพื้นที่ผิว และแรงตึงผิว พร้อมทั้งยังช่วยเพิ่มความหนืดของวัฏภาคน้ำสำหรับการบริหารยาทางผิวหนัง โดยยาที่ส่งผ่านนาโนเจลจะมีการยึดเกาะบนผิวหนังได้ดีกว่า และมีความสามารถในการละลายสูง ทำให้นำส่งยาเข้าสู่ผิวหนังได้ในความเข้มข้นที่มากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยลดความถี่ในการให้ยาได้อีกด้วย⁽⁶⁰⁾

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

พืช น้ำมันหอมระเหย เชื้อจุลินทรีย์ วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

พืช

1. ส้มโอ (*Citrus maxima*) คัดเลือกผลส้มโอขาว จากร้านขายผลไม้ ถนนมิตรสัมพันธ์ ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี
2. มะนาว (*Citrus aurantifolia*) จากตลาดหนองมน ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี
3. เมล็ดแห้งลูกจันทร์ (*Myristica fragrans*) จากห้างหุ้นส่วนจำกัดศรีทองโฮสเทล ที่อยู่ 765 ถนนเจตน์จำนงค์ ตำบลมะขามหย่ง อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี
4. ขิง (*Zingiber officinale*) จากห้างแม็คโคร ชลบุรี ถนนสุขุมวิท ตำบลเสม็ด อำเภอเมืองชลบุรี ชลบุรี และจากตลาดสด ในกรุงเทพมหานคร
5. ข่า (*Alpinia galanga*) จากสวนผัก ในจังหวัดนครปฐม

น้ำมันหอมระเหย

1. มะกรูด (*Citrus hystrix*) ได้มาจากการกลั่นจากห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
2. ส้มอ๊อด (*Clausena harmandiana*) ได้มาจากการกลั่นจากห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
3. ขิง (*Zingiber cassumunar*) ได้มาจากการกลั่นจากห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
4. กานพลู (*Syzygium aromaticum*) ได้มาจากการกลั่นจากห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เชื้อจุลินทรีย์

1. *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ TBRC4930 ชื่อจาก National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (Biotec)
2. *Candida albicans* สายพันธุ์ TBRC209 ชื่อจาก National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (Biotec)

วัสดุอุปกรณ์

1. Heating mantle
2. Round bottom flask 5 Litre
3. Adaptor
4. Separating funnel
5. Condenser
6. Clevenger (Heavy/Light)
7. Clamp
8. Strand
9. สายยาง
10. Aluminium foil
11. TLC-Silica gel 60 GF₂₅₄ Aluminium sheets 10 x 10 cm
12. Autoclave HIRAYAMA รุ่น HVA-85/110
13. Hot air oven Memmert รุ่น UNE
14. Cooling liquid circulating pump
15. Vortex mixer II รุ่น G5560E
16. Biological Safety Cabinet Class 2 ESCO รุ่น AC2-651
17. Agar plate
18. Beaker 25, 50, 100, 250, 600, 1000 ml
19. Test tube 10 ml
20. Micropipette 1000 µl
21. Cylinder 10, 25, 50, 100, 500 ml
22. Syringe
23. Stirring rod
24. Alcohol burner
25. Inoculating loop
26. High Intensity Ultrasonic Processer with Temperature Controller
27. Parafilm
28. Digital balance Mettler Toledo รุ่น MS 3002S

29. Analytical Balance Mettler Toledo รุ่น MS 204

30. Fume hood Easy lab รุ่น FSH45

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Tryptic soy broth สำหรับ *S. aureus* และ Sabouraud dextrose broth สำหรับ *C. albicans*)
2. Sodium alginate
3. Polysorbate 80 (Tween 80)
4. 70% Ethanol
5. Sodium sulfate anhydrous
6. Glycerin
7. Purified water
8. Toluene
9. Ethyl acetate
10. Hexane
11. Formic acid
12. Acetone
13. Diethyl ether
14. Sulfuric acid
15. Anisaldehyde
16. Methanol

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. ศึกษาค้นคว้าข้อมูลเกี่ยวกับน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์จากพืชวงศ์ต่าง ๆ การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ การหาค่า MIC, MBC, FIC, การนำน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดมาผสมกันเพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์กัน งานวิจัยก่อนหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสกัดน้ำมันหอมระเหยเพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ และศึกษาข้อมูลจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาตำรับอิมัลเจลและนาโนเจล รวมถึงสารช่วยที่ใช้ในตำรับ และความคงตัวของตำรับ

2. การแยกสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร โดยที่การศึกษานี้ใช้การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช 9 ชนิดจาก 4 วงศ์ ประกอบด้วย วงศ์ Myrtaceae ได้แก่ ดอกตูมกานพลู (*Syzygium aromaticum*) วงศ์ Zingiberaceae ได้แก่ เหง้าขิง (*Zingiber officinale*), เหง้าข่า (*Alpinia galanga*), เหง้าไพล (*Zingiber cassumunar*) วงศ์ Rutaceae ได้แก่ เปลือกส้มโอ (*Citrus maxima*), เปลือกมะนาว (*Citrus aurantifolia*), เปลือกมะกรูด (*Citrus hystrix*), ใบสะอ้งฟ้า (*Clausena harmandiana*) และ วงศ์ Myristicaceae ได้แก่ เมล็ดแห้งลูกจันทร์ (*Myristica fragrans*) โดยซื้อจากตลาดในจังหวัดชลบุรี แล้วนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (Water distillation) และการกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation)
3. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะเป็นการเพาะเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ TBRC4930 บนอาหาร Tryptic soy broth และ *C. albicans* สายพันธุ์ TBRC209 บนอาหาร Sabouraud dextrose broth จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง
4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยการหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี Broth macrodilution test โดยนำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ไปเจือจางในสารละลาย 1% DMSO ที่ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปเจือจางอีกครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยในแต่ละหลอดทดลอง ดังนี้ 1,000, 500, 250, 125 และ $62.5\ \mu\text{g/mL}$ จากนั้นผสมเชื้อจุลินทรีย์ลงไปในแต่ละหลอดทดลองแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะมีหลอดทดลองที่เป็น control (อาหารเลี้ยงเชื้อ และใส่เชื้อจุลินทรีย์) และ test sample (น้ำมันหอมระเหยผสมกับ 1% DMSO และอาหาร) เป็นตัวเปรียบเทียบ อ่านค่า MIC ที่ได้โดยการสังเกตความขุ่นในแต่ละหลอดทดลองด้วยตาเปล่า ความเข้มข้นต่ำที่สุดจากหลอดทดลองที่ไม่ขุ่นจะถูกนำมาเป็นค่า MIC การทดสอบหาค่า MBC จะนำหลอดทดลองที่ไม่ขุ่นทั้งหมดที่ได้จากการหาค่า MIC มาบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตความขุ่นด้วยตาเปล่าอีกครั้ง แล้วนำหลอดที่ไม่ขุ่นมา streak ลงบน agar plate แล้วนำไปบ่ม 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ ผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับ control และ test sample ซึ่งความเข้มข้นที่ได้ค่า MBC จะต้องไม่มีเชื้อขึ้นบน agar plate เลย
5. การเสริมฤทธิ์กันของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยนำน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดที่ทดสอบแล้วได้ฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ดีและมี % yield ในการสกัดที่สูงเพื่อสามารถนำมาพัฒนาต่อยอดสู่เชิงอุตสาหกรรมได้ง่าย โดย

นำมาผสมกันในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ดังนี้ 0:5, 1:1, 1:5, 5:1 และ 5:0 โดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆด้วยสารละลาย 1% DMSO เพื่อทดสอบการเสริมฤทธิ์กันด้วยการนำไปทดสอบหาค่า MIC และ MBC จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า FIC โดยใช้สูตรดังนี้

$$FIC_1 = \frac{MIC \text{ น้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1 และ 2 ผสมกัน}}{MIC \text{ น้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1}}$$

$$FIC_2 = \frac{MIC \text{ น้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1 และ 2 ผสมกัน}}{MIC \text{ น้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 2}}$$

$$FIC \text{ Index (FICI) } = FIC_1 + FIC_2$$

โดยที่ค่า $FICI \leq 0.5$ หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic effect)

ค่า $0.5 < FICI \leq 4$ หมายถึงไม่แตกต่างกัน (Indifferent effect)

และถ้า $FICI > 4$ หมายถึงเป็นปฏิปักษ์กัน (Antagonist effect)

- การวิเคราะห์สารประกอบของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) เพื่อดู TLC fingerprint ของน้ำมันหอมระเหยที่สนใจ โดยนำน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิดจากข้อ 5 คือน้ำมันหอมระเหยของกานพลูและน้ำมันหอมระเหยของขิงมาเจือจางด้วยตัวทำละลาย methanol แล้วนำไป spot ลงบนแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC ที่ได้ไปใส่ใน tank chromatography ซึ่งบรรจุ mobile phase เอาไว้ และปล่อยให้ mobile phase พาสารที่ spot ไว้ผ่านไปบนแผ่น TLC จนถึงระดับ solvent front แล้วนำออกจาก tank โดยใช้ mobile phase 3 conditions ดังนี้ toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 7 : 3 : 0.2 เพื่อใช้ตรวจสอบหา eugenol⁽³⁸⁾, hexane : acetone ในอัตราส่วน 8 : 2 จากนั้นฉีดพ่นสเปรย์ด้วย 10% sulfuric acid แล้วนำไปให้ความร้อนด้วย Hot plate เพื่อใช้ตรวจสอบหา 6-gingerol⁽³⁹⁾, hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 8 : 2 เพื่อใช้ตรวจสอบหา 6-shogaol⁽⁴⁰⁾ โดยตรวจสอบภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm และคำนวณหาค่า R_f (Retention factor)

7. การพัฒนาตำรับยาทาภายนอกจากสมุนไพรเพื่อใช้ในการต้านเชื้อจุลชีพ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะพัฒนาตำรับอิมัลเจลและนาโนเจลโดยใช้ sodium alginate เป็นสารก่อเจลโดยเลือกใช้จากน้ำมันหอมระเหย 2 ตัวที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลชีพที่ได้จากการทดลองมาเตรียมตำรับ
 - 7.1. การพัฒนาตำรับอิมัลเจลทำการเตรียมโดยวิธี Conventional โดยผสมน้ำมันหอมระเหยและใช้ sodium alginate เป็นสารก่อเจล, polysorbate 80 (Tween 80) เป็นสารลดแรงตึงผิว, purified water เป็นตัวทำละลายของวัฏภาคน้ำ⁽⁶¹⁾ และทำเป็นสูตรตำรับอิมัลเจลชนิดวัฏภาคน้ำมันในน้ำ เตรียมโดยการผสมส่วนที่เป็นวัฏภาคน้ำมันเข้าด้วยกัน จากนั้นผสมส่วนที่เป็นวัฏภาคน้ำเข้าด้วยกัน ซึ่งประกอบด้วย น้ำและสารลดแรงตึงผิว แล้วจึงเทส่วนวัฏภาคน้ำมันลงในส่วนวัฏภาคน้ำ ทำการคนให้เข้ากัน
 - 7.2. การพัฒนาตำรับนาโนเจล จะทำการเตรียมโดยผสมน้ำมันหอมระเหย, Tween 80 และ glycerin เข้าด้วยกัน จากนั้นแบ่งน้ำมาส่วนหนึ่ง แล้วใช้ probe sonication ในการลดขนาดของอิมัลชันให้เป็นระดับนาโน และนำไปผสมกับสารก่อเจล sodium alginate และทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำ จากนั้นคนให้เข้ากัน
 - 7.3. แบ่งตำรับมาส่วนหนึ่ง ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของตำรับอิมัลเจลและตำรับนาโนเจลที่เตรียมได้โดยใช้วิธี Broth macrodilution test โดยใส่ตำรับที่เตรียมได้ปริมาณ 0.1 g และอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ml ลงในหลอดทดลอง ใช้ vortex mixture เขย่าทำให้ตำรับและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หากหลอดทดลองที่ได้ยังใสอยู่ นำความเข้มข้นของตำรับนั้นไป streak ลง agar plate ต่อเพื่อตรวจสอบยืนยันว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้จริง
 - 7.4. แบ่งตำรับมาส่วนหนึ่ง ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของตำรับอิมัลเจลและตำรับนาโนเจลที่เตรียมได้โดยใช้วิธีการสังเกต Clear zone โดยการนำเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบเกลี่ยให้สม่ำเสมอบนฐานอาหารในจาน Petri dish จากนั้นหยดตำรับลงในตำแหน่งที่กำหนดไว้แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 ± 0.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง⁽⁶²⁾
 - 7.5. นำตำรับที่เหลือ บรรจุลงในขวดเพื่อประเมินผลความคงตัวของตัวอย่างหลังการเตรียม 24 ชั่วโมงโดยทำการตรวจดูการแยกชั้นออกจากกัน (creaming) และการแยกชั้นของน้ำ

ออกจากร้ำมัน (cracking)⁽⁶³⁾ จากนั้นตรวจดูอีกครั้งหลังจากเก็บเป็นเวลา 1 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 25 °C และบันทึกผลการทดลอง

- 7.6. ทดสอบความคงสภาพแบบเร่ง โดยเก็บผ่าน Heating cooling cycle ซึ่งทำโดยการเก็บอิมัลชันในตู้เย็น 4 °C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 45 °C อีก 48 ชั่วโมง นับเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบรวมทั้งสิ้น 6 รอบแล้วนำมาประเมินผล โดยพิจารณาความคงตัวจากลักษณะทางกายภาพ เช่น สี กลิ่น การแยกชั้นหรือตกตะกอน และ pH ของสูตรตำรับ⁽⁶³⁾

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การกลั่นน้ำมันหอมระเหย

การแยกสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร โดยที่การศึกษานี้ใช้การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช 9 ชนิดจาก 4 วงศ์ ประกอบด้วย Rutaceae ได้แก่ เปลือกส้มโอ (*Citrus maxima*), เปลือกมะนาว (*Citrus aurantifolia*), เปลือกมะกรูด (*Citrus hystrix*), ใบสองฟ้า (*Clausena harmandiana*) วงศ์ Myristicaceae ได้แก่ เมล็ดแห้งลูกจันทร์ (*Myristica fragrans*) วงศ์ Zingiberaceae ได้แก่ เหง้าขิง (*Zingiber officinale*), เหง้าข่า (*Alpinia galanga*), เหง้าไพล (*Zingiber cassumunar*) และ วงศ์ Myrtaceae ได้แก่ ดอกตูมกานพลู (*Syzygium aromaticum*) โดยซื้อจากตลาดในจังหวัดชลบุรี แล้วนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ (Water distillation) คือ เหง้าขิง, เหง้าข่า, เหง้าไพล, เมล็ดแห้งลูกจันทร์ ส่วนการกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation) คือ เปลือกส้มโอ, เปลือกมะนาว, เปลือกมะกรูด, ใบสองฟ้า

การกลั่นน้ำมันหอมระเหยของขิงได้สารสกัดเป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน มีปริมาณ 5.40 ml คิดเป็น % yield เท่ากับ 0.10% การกลั่นน้ำมันหอมระเหยของข่าได้สารสกัดเป็นน้ำมันใส ไม่มีสี มีปริมาณ 3.60 ml คิดเป็น % yield เท่ากับ 0.09% การกลั่นน้ำมันหอมระเหยของส้มโอได้สารสกัดเป็นน้ำมันใส ไม่มีสี มีปริมาณ 2.20 ml คิดเป็น % yield เท่ากับ 0.51% การกลั่นน้ำมันหอมระเหยของมะนาวได้สารสกัดเป็นน้ำมันใส ไม่มีสี มีปริมาณ 3.10 ml คิดเป็น % yield เท่ากับ 1.16% การกลั่นน้ำมันหอมระเหยของลูกจันทร์ได้สารสกัดเป็นน้ำมันใส ไม่มีสี มีปริมาณ 12.00 ml คิดเป็น % yield เท่ากับ 1.21%

ตารางที่ 2 ร้อยละผลผลิตของการกลั่นน้ำมันหอมระเหย

ชื่อพืช	วิธีการสกัด	น้ำหนักของพืช (g)	ปริมาณน้ำมัน หอมระเหย (ml)	% yield
ขิง	Water distillation	4604.78	3.30	0.07
ข่า	Water distillation	3971.30	3.60	0.09
ส้มโอ	Steam distillation	431.46	2.20	0.51
มะนาว	Steam distillation	267.54	3.10	1.16
ลูกจันทร์	Water distillation	993.47	12.00	1.21

หมายเหตุ : น้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ไพล มะกรูด และสองฟ้า ได้มาจากการกลั่นจากห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2. การทดสอบผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

พืช	<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
กานพลู	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml
ขิง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	1000 µg/ml	1000 µg/ml
ข่า	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
ไพล	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
ส้มโอ	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
มะนาว	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
มะกรูด	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
สองฟ้า	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	1000 µg/ml	ไม่ยับยั้ง
ลูกจันทน์	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง

หมายเหตุ : การทดลองนี้ทำซ้ำ 3 ครั้ง (n = 3)

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยการหาค่า MIC และ MBC พบว่า น้ำมันหอมระเหยกานพลูมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* เท่ากับ 500 µg/ml และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* เท่ากับ 500 µg/ml เช่นกัน น้ำมันหอมระเหยขิงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 1000 µg/ml และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 1000 µg/ml เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำมันหอมระเหยสองฟ้ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *C. albicans* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans*

เท่ากับ 1000 µg/ml แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *C. albicans* ได้ ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากพืชอื่นๆ ประกอบด้วย ข่า, ไพล, ส้มโอ, มะนาว, มะกรูด และลูกจันทน์นั้นไม่ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* หรือ *C. albicans*

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกกานพลูและขิงมาทำการทดสอบการเสริมฤทธิ์กันของน้ำมันหอมระเหยสองชนิด เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยของกานพลูและขิงที่อัตราส่วนเข้มข้นต่าง ๆ มาผสมกันเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์พบว่า น้ำมันหอมระเหยกานพลู : น้ำมันหอมระเหยขิงในอัตราส่วน 1 : 5 และอัตราส่วน 1 : 1 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ ส่วนน้ำมันหอมระเหยกานพลู : น้ำมันหอมระเหยขิงในอัตราส่วน 5 : 1 สามารถยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ได้ โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 1000 µg/ml และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อ *C. albicans* เท่ากับ 1000 µg/ml ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยของกานพลูและขิงร่วมกันนั้น ความสามารถในการยับยั้งเชื้อของน้ำมันหอมระเหยลดลงเมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันหอมระเหยเพียงชนิดเดียว

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด

พืช	<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
กานพลู : ขิง 1 : 5	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
กานพลู : ขิง 1 : 1	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
กานพลู : ขิง 5 : 1	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	1000 µg/ml	1000 µg/ml

หมายเหตุ : การทดลองนี้ทำซ้ำ 3 ครั้ง (n = 3)

การคำนวณค่า FIC

เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยของขิงไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ ดังนั้นการคำนวณค่า FIC จึงคำนวณจากการทดสอบกับเชื้อ *C. albicans* เท่านั้น โดยคำนวณจากน้ำมันหอมระเหยของกานพลู : น้ำมันหอมระเหยขิงในอัตราส่วน 5 : 1 ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans*

เมื่อน้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1 คือ กานพลู และน้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 2 คือ ขิง

$$FIC_1 = \frac{\text{MIC น้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1 และ 2 ผสมกัน}}{\text{MIC น้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1}}$$

$$FIC_1 = \frac{1000}{500}$$

$$FIC_1 = 2$$

$$FIC_2 = \frac{\text{MIC น้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1 และ 2 ผสมกัน}}{\text{MIC น้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 2}}$$

$$FIC_2 = \frac{1000}{1000}$$

$$FIC_2 = 1$$

$$FIC \text{ Index (FICI)} = FIC_1 + FIC_2$$

$$FIC \text{ Index (FICI)} = 2 + 1$$

$$FIC \text{ Index (FICI)} = 3$$

ค่าอยู่ในช่วง 0.5 - 4 หมายถึงไม่แตกต่างกัน (Indifferent effect)

น้ำมันหอมระเหยกานพลู : น้ำมันหอมระเหยขิงในอัตราส่วน 5 : 1 ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* มีค่า FIC เท่ากับ 3 แสดงว่าผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ไม่แตกต่างกับการใช้น้ำมันหอมระเหยกานพลูหรือขิงตัวเดียวในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans*

จากการศึกษาของ Imael HN. และ Juliani HR. พบว่าสารกลุ่ม phenol มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด โดยที่การเสริมฤทธิ์กันของน้ำมันหอมระเหยมาจากการทำปฏิกิริยาของสารกลุ่ม phenol และ alcohol ซึ่งน้ำมันหอมระเหยของกานพลูมี eugenol ซึ่งเป็นสารกลุ่ม phenol อยู่ถึง 87% ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยของขิงมี gingerol และ shogaol รวมกันอยู่เพียง 30% ส่วนการต้านฤทธิ์กันของน้ำมันหอมระเหยเกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารกลุ่ม terpene hydrocarbon ที่มี oxygen และกลุ่มที่ไม่มี oxygen เป็นองค์ประกอบ⁽⁶⁴⁾

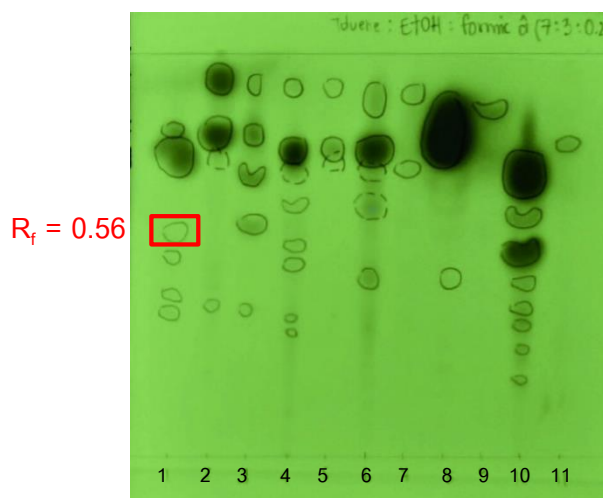
3. การทดสอบเอกลักษณ์ของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี Thin Layer chromatography (TLC)

เมื่อพบว่าน้ำมันกานพลูและขิงสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ จึงทำการทดสอบเอกลักษณ์ด้วยวิธี TLC เป็นจำนวน 3 คอนดิชัน

คอนดิชันที่ 1 ใช้ตัวดูดซับ (stationary phase) เป็น TLC-Silica gel 60 GF₂₅₄ ส่วนตัวทำละลาย (mobile phase) เป็น toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 7 : 3 : 0.2 แล้วตรวจสอบด้วย UV 254 nm พบว่า น้ำมันกานพลูได้ 6 จุด น้ำมันขิงได้ 4 จุด น้ำมันข่าได้ 5 จุด น้ำมันไพลได้ 9 จุด น้ำมันส้มโอได้ 2 จุด น้ำมันมะนาวได้ 7 จุด น้ำมันมะกรูดได้ 2 จุด น้ำมันสัฟฟรอนได้ 3 จุด น้ำมันลูกจันทน์ได้ 5 จุด น้ำมันอบเชยได้ 5 จุด และ limonene ได้ 4 จุด ซึ่งในการทดลองนี้ได้นำน้ำมันอบเชยมาทดสอบด้วยวิธี TLC เพื่อยืนยันว่าในน้ำมันกานพลู และ น้ำมันอบเชยมี eugenol เหมือนกัน สรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยกานพลูได้ค่า R_f เท่ากับ 0.56 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Hemendra Y. และคณะ⁽⁴⁴⁾ ที่มีค่า R_f ของ eugenol เท่ากับ 0.56 แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยกานพลูมี eugenol เป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ eugenol น้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC ด้วย mobile phase toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 7 : 3 : 0.2

พืช	toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 7 : 3 : 0.2		
	R_f Sample	R_f Reference	สารสำคัญ
	254 nm	254 nm	
กานพลู	0.36	-	unknown
	0.41	-	unknown
	0.50	-	unknown
	0.56	0.56	eugenol
	0.75	-	unknown
	0.83	-	unknown
ขิง	0.25	-	unknown
	0.75	-	unknown
	0.81	-	unknown
	0.94	-	unknown

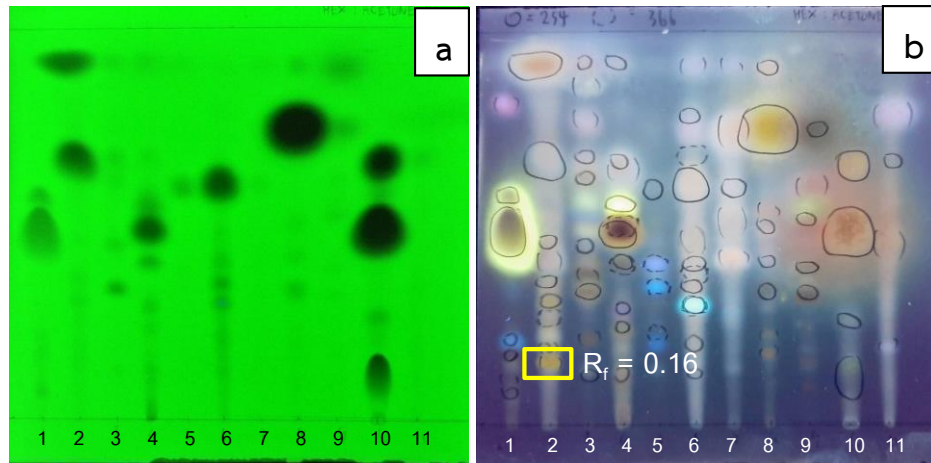


รูปที่ 3 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ eugenol ในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC โดยใช้ mobile phase toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 7 : 3 : 0.2 ตรวจสอบด้วย UV 254 nm (1.กานพลู, 2.ขิง, 3.ข่า, 4.ไพล, 5.ส้มโอ, 6.มะนาว, 7.มะกรูด, 8.สอ่งฟ้า, 9.ลูกจันทน์, 10.อบเชย, 11.limonene)

คอนดิชันที่ 2 ใช้ตัวดูดซับ (stationary phase) เป็น TLC-Silica gel 60 GF₂₅₄ ส่วนตัวทำละลาย (mobile phase) เป็น hexane : acetone ในอัตราส่วน 8 : 2 ตรวจสอบด้วย UV 254 nm พบว่า น้ำมันกานพลูได้ 5 จุด น้ำมันขิงได้ 5 จุด น้ำมันข่าได้ 5 จุด น้ำมันไพลได้ 6 จุด น้ำมันส้มโอได้ 1 จุด น้ำมันมะนาวได้ 7 จุด น้ำมันมะกรูดได้ 1 จุด น้ำมันสอ่งฟ้าได้ 5 จุด น้ำมันลูกจันทน์ได้ 4 จุด น้ำมันอบเชยได้ 4 จุด และ limonene ได้ 1 จุด จากนั้นฉีดพ่นสเปรย์ด้วย 10% sulfuric acid และตรวจสอบด้วย UV 366 nm พบจุดเรืองแสงในน้ำมันหอมระเหยของกานพลู 4 จุด และในน้ำมันหอมระเหยขิง 3 จุด โดยพบจุดเรืองแสงสีเหลืองของขิงที่ R_f เท่ากับ 0.16 ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Usama IA. และคณะ⁽³⁹⁾ ที่มีค่า R_f ของ 6-gingerol เท่ากับ 0.15 แสดงว่าขิงมี 6-gingerol เป็นองค์ประกอบ โดย 10% sulfuric acid เป็น Reagent ที่ใช้สำหรับตรวจสอบสารกลุ่ม Hydrocarbon ที่มีพันธะคู่ หรือวงเบนซีน เมื่อนำไปตรวจสอบด้วย UV 366 nm จะพบจุดเรืองแสง

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ 6-gingerol น้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC ด้วย mobile phase hexane : acetone ในอัตราส่วน 8 : 2

hexane : acetone ในอัตราส่วน 8 : 2					
พืช	R _f Sample		R _f Reference		สารสำคัญ
	254 nm	10% Sulfuric acid	254 nm	10% Sulfuric acid	
กานพลู	0.09	-	-	-	unknown
		0.13	-	-	unknown
	0.19	-	-	-	unknown
	0.22	-	-	-	unknown
	0.50	-	-	-	unknown
	0.59	-	-	-	unknown
	-	0.82	-	-	unknown
ขิง	-	0.16	-	0.15	6-gingerol
	0.32	-	-	-	unknown
	0.38	-	-	-	unknown
	-	0.42	-	-	unknown
	0.47	-	-	-	unknown
	0.68	-	-	-	unknown
	0.93	-	-	-	unknown

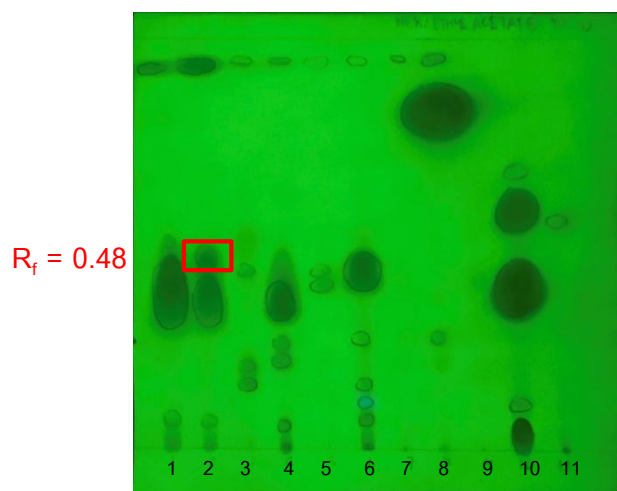


รูปที่ 4 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ 6-gingerol ในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC โดยใช้ mobile phase hexane : acetone ในอัตราส่วน 8 : 2 ตรวจสอบด้วย a) UV 254 nm b) สเปรย์ด้วย 10% sulfuric acid และตรวจสอบด้วย UV 366 nm (1.กานพลู, 2.ขิง, 3.ข่า, 4.ไพล, 5.ส้มโอ, 6.มะนาว, 7.มะกรูด, 8.ส่่องฟ้า, 9.ลูกจันทน์, 10.อบเชย, 11.limonene)

คอนดิชันที่ 3 ใช้ตัวดูดซับ (stationary phase) เป็น TLC-Silica gel 60 GF₂₅₄ ส่วนตัวทำละลาย (mobile phase) เป็น hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 8 : 2 ตรวจสอบภายใต้แสง UV 254 nm พบว่า น้ำมันกานพลูได้ 4 จุด น้ำมันขิงได้ 4 จุด น้ำมันข่าได้ 4 จุด น้ำมันไพลได้ 5 จุด น้ำมันส้มโอได้ 3 จุด น้ำมันมะนาวได้ 6 จุด น้ำมันมะกรูดได้ 1 จุด น้ำมันส่่องฟ้าได้ 3 จุด น้ำมันลูกจันทน์ได้ 1 จุด น้ำมันอบเชยได้ 4 จุด และ limonene ได้ 1 จุด โดยขิงได้ค่า R_f เท่ากับ 0.48 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Uppuluri VM. และ Reba P⁽⁴⁶⁾ ที่มีค่า R_f ของ 6-shogaol เท่ากับ 0.46 แสดงว่าขิงมี 6-shogaol เป็นองค์ประกอบ

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ 6-shogaol ในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC ด้วย mobile phase คือ hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 8 : 2

พืช	hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 8 : 2		
	R _f Sample	R _f Reference	สารสำคัญ
	254 nm	254 nm	
กานพลู	0.08	-	unknown
	0.38	-	unknown
	0.52	-	unknown
	0.94	-	unknown
ขิง	0.07	-	unknown
	0.37	-	unknown
	0.48	0.46	6-shogaol
	0.95	-	unknown



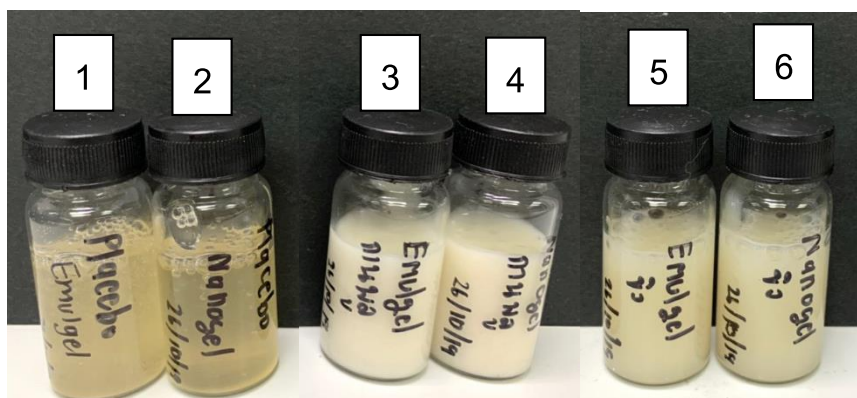
รูปที่ 5 ผลการทดสอบเอกลักษณ์ของ 6-shogaol ในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี TLC โดยใช้ mobile phase คือ hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 8 : 2 ตรวจสอบด้วย UV 254 nm (1.กานพลู, 2. ขิง, 3. ข่า, 4. ไพล, 5. ส้มโอ, 6. มะนาว, 7. มะกรูด, 8. ส้มป่อย, 9. ลูกจันทน์, 10. อบเชย, 11. limonene)

4. การเตรียมตำรับอิมัลเจลและนาโนเจล

ตารางที่ 8 สูตรตำรับการเตรียมอิมัลเจลและนาโนเจล

Rx	Master formula	Working formula	Function
Essential oil	q.s.	q.s.	Antimicrobial
Tween 80	6 g	1.2 g	Emulsifier
Glycerin	5 g	1 g	Humectant
Sodium alginate	50 g	10 g	Gelling agent
Water q.s. to	100 g	20 g	Solvent

ลักษณะตำรับที่ได้หลังเตรียม



รูปที่ 6 ลักษณะตำรับที่ได้หลังเตรียม โดยขวดที่ 1 อิมัลเจล placebo, ขวดที่ 2 นาโนเจล placebo, ขวดที่ 3 อิมัลเจลกานพลู, ขวดที่ 4 นาโนเจลกานพลู, ขวดที่ 5 อิมัลเจลขิง, ขวดที่ 6 นาโนเจลขิง

ในการเตรียมตำรับอิมัลเจลและนาโนเจล โดยใช้สารก่อเจลเป็น sodium alginate, Emulsifier เป็น Tween 80, Humectant เป็น glycerin พบว่าตำรับนาโนเจลจะมีลักษณะที่ใสกว่าอิมัลเจล แต่เมื่อใส่น้ำมันกานพลูในตำรับทั้งอิมัลเจลและนาโนเจลจะทำให้ตำรับมีเนื้อผลิตภัณฑ์สีขาวอมเหลือง ส่วนน้ำมันขิงเมื่อใส่ในตำรับทั้งอิมัลเจลและนาโนเจลจะทำให้ตำรับมีเนื้อผลิตภัณฑ์สีเหลืองอ่อน และตำรับทั้งสองรูปแบบกระจายบนผิวได้ดี ไม่เหนอะหนะ เกาะติดบนผิวได้ดี แต่ไม่สามารถกัมน้ำได้ และล้างออกได้ง่าย

ตารางที่ 9 ลักษณะทางกายภาพของตำรับ

ขวดที่	ตำรับ	ลักษณะทางกายภาพ
1	อิมัลเจล placebo	เจลใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น
2	นาโนเจล placebo	เจลใสกว่าอิมัลเจล
3	อิมัลเจลกานพลู	เจลสีเหลืองขุ่น ทึบแสง มีกลิ่นหอมน้ำมันหอมระเหย กานพลู
4	นาโนเจลกานพลู	เจลสีเหลืองขุ่น ทึบแสง มีกลิ่นหอมน้ำมันหอมระเหย กานพลู
5	อิมัลเจลขิง	เจลสีเหลืองใส มีกลิ่นหอมซ่าของน้ำมันหอมระเหยขิง
6	นาโนเจลขิง	เจลสีเหลืองใส มีกลิ่นหอมซ่าของน้ำมันหอมระเหยขิง

5. การทดสอบผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของตำรับอิมัลเจล และนาโนเจล

ตารางที่ 10 ผลการทดลองการทดสอบเชื้อของตำรับอิมัลเจล และนาโนเจล

พืช	ความเข้มข้นของ น้ำมันหอม ระเหย	อิมัลเจล		นาโนเจล	
		<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
กานพลู	10 เท่า ของ MIC	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
	25 เท่า ของ MIC	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
	50 เท่า ของ MIC	ยับยั้ง	ยับยั้ง	ยับยั้ง	ยับยั้ง
ขิง	10 เท่า ของ MIC	-	ไม่ยับยั้ง	-	ไม่ยับยั้ง
	25 เท่า ของ MIC	-	ไม่ยับยั้ง	-	ไม่ยับยั้ง
	50 เท่า ของ MIC	-	ยับยั้ง	-	ยับยั้ง

หมายเหตุ : (-) หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ เนื่องจากขิงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้แค่ *C. albicans*

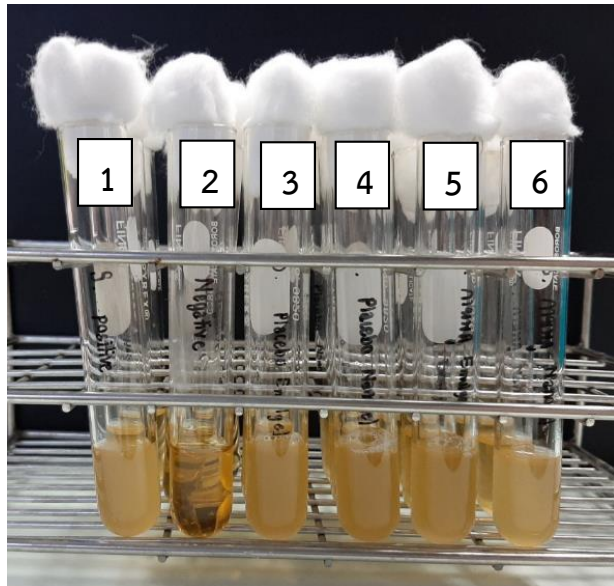
จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ของตำรับอิมัลเจลและนาโนเจล ที่ผสมน้ำมันหอมระเหยของกานพลูพบว่า ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 เท่าของ MIC ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ แต่ที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC พบว่าทั้งตำรับอิมัลเจลและนาโนเจลของน้ำมันหอมระเหยของกานพลูสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ ส่วนของน้ำมันหอมระเหยของขิงพบว่า มีเพียงความเข้มข้นที่ 50 เท่าของ MIC เท่านั้นที่สามารถยับยั้ง

C. albicans ได้ และเมื่อเปรียบเทียบความขุ่นระหว่างตำรับอิมัลเจลและนาโนเจลที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC พบว่าตำรับนาโนเจลมีความขุ่นน้อยกว่าอิมัลเจล ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Suwimon A. ที่กล่าวว่า นาโนเจลมีคุณสมบัติป้องกันน้ำได้ดีและปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีเนื่องจากมีพื้นที่ผิวรอบอนุภาคน้ำมันที่มาก⁽⁶⁵⁾

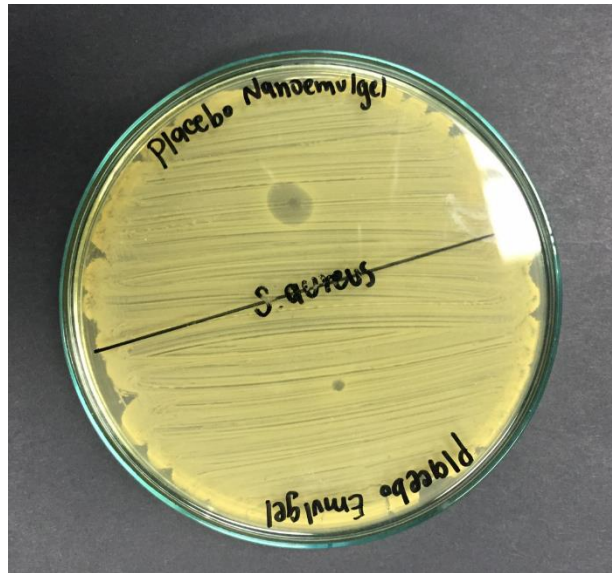
6. รูปผลการทดลองการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ของตำรับที่ผสมน้ำมันหอมระเหย

6.1 ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC

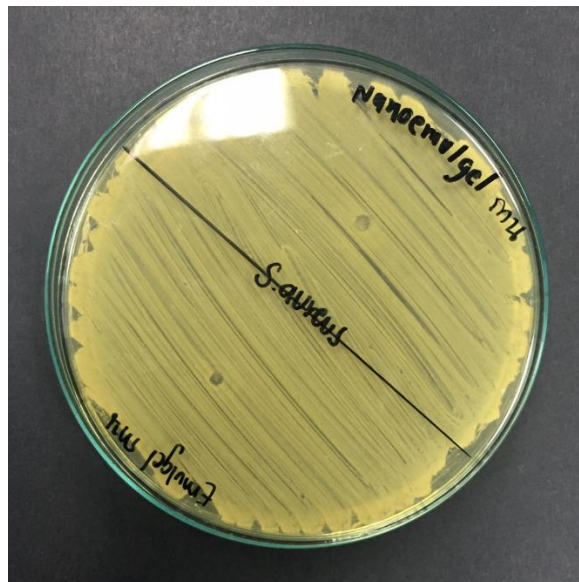
- รูปผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลู ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC



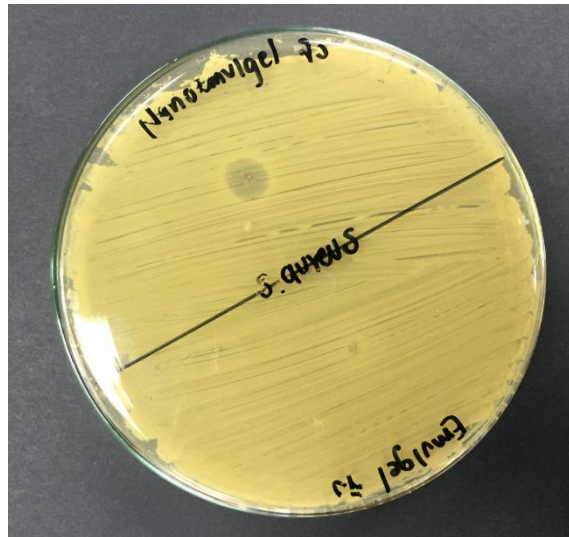
รูปที่ 7 ผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลู ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : *S. aureus* positive, หลอดที่ 2 : Negative, หลอดที่ 3 : *S. aureus* Placebo อิมัลเจล, หลอดที่ 4 : *S. aureus* Placebo นาโนเจล, หลอดที่ 5 : *S. aureus* อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 6 : *S. aureus* นาโนเจลกานพลู



รูปที่ 8 ผลการทำ Clear zone เชื้อ *S. aureus* ของอิมัลเจลและนาโนเจล Placebo

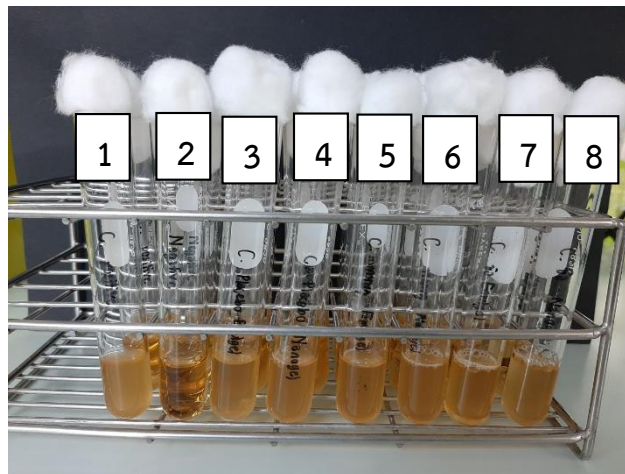


รูปที่ 9 ผลการทำ Clear zone เชื้อ *S. aureus* ของอิมัลเจลและนาโนเจลกานพลู ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC

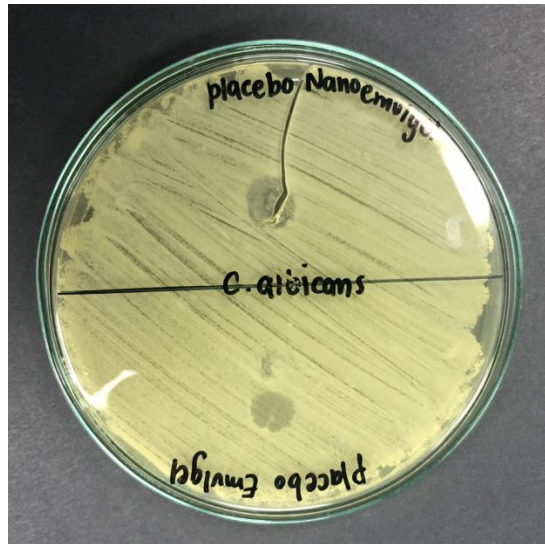


รูปที่ 10 ผลการทำ Clear zone เชื้อ *S. aureus* ของอิมัลเจลและนาโนเจลซิง ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC

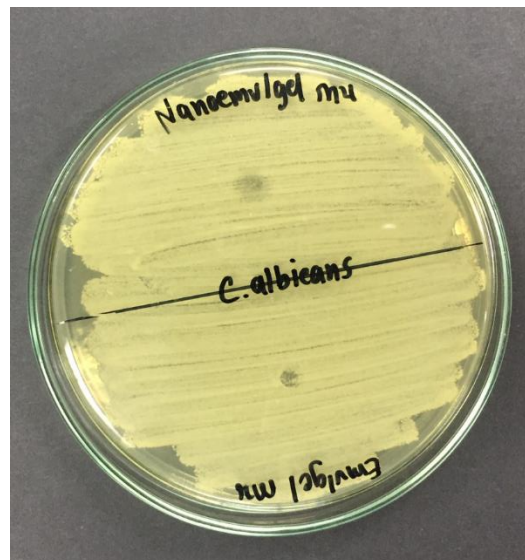
- รูปผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูและซิง ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC



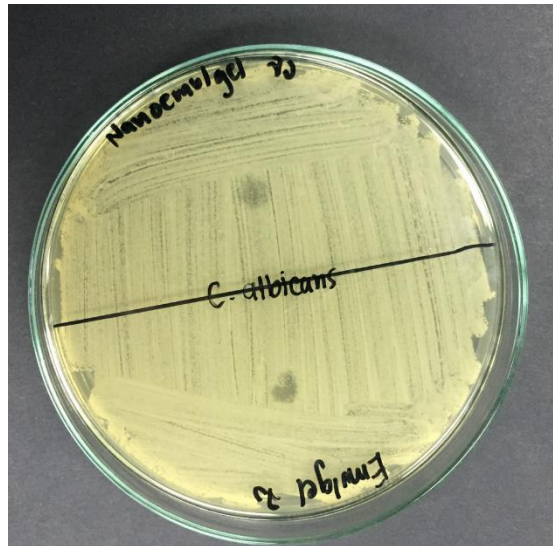
รูปที่ 11 ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูและซิง ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : *C. albicans* positive, หลอดที่ 2 : Negative, หลอดที่ 3 : *C. albicans* Placebo อิมัลเจล, หลอดที่ 4 : *C. albicans* Placebo นาโนเจล, หลอดที่ 5 : *C. albicans* อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 6 : *C. albicans* นาโนเจล กานพลู, หลอดที่ 7 : *C. albicans* อิมัลเจลซิง, หลอดที่ 8 : *C. albicans* นาโนเจลซิง



รูปที่ 12 ผลการทำ Clear zone เชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจลและนาโนเจล Placebo



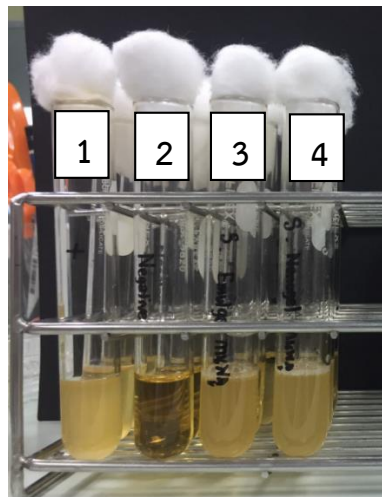
รูปที่ 13 ผลการทำ Clear zone เชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจลและนาโนเจลกานพลู ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC



รูปที่ 14 ผลการทำ Clear zone เชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจลและนาโนเจลซิง ที่ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC

6.2 ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC

- รูปผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC

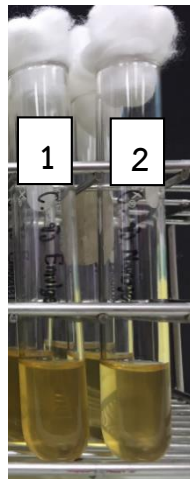


รูปที่ 15 ผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : *S. aureus* positive, หลอดที่ 2 : Negative, หลอดที่ 3 : *S. aureus* อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 4 : *S. aureus* นาโนเจล กานพลู

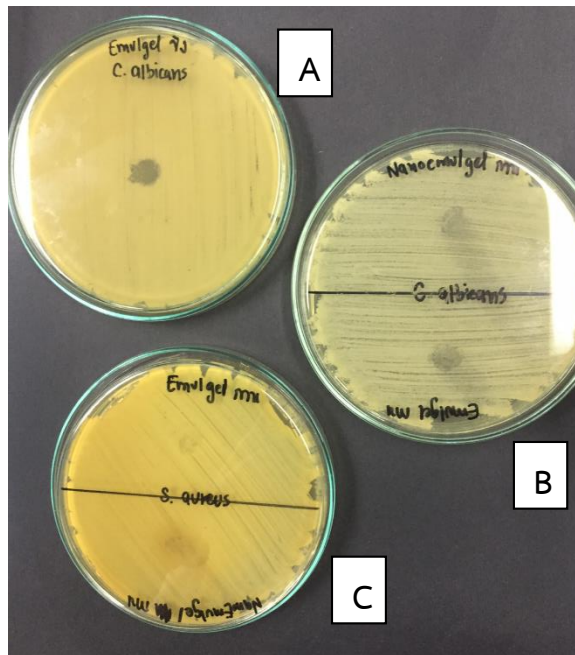
- รูปผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลู และอิมัลเจลซึ่งที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC



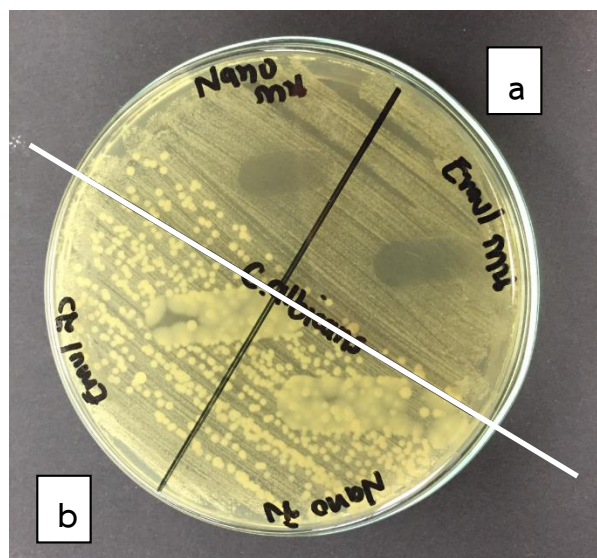
รูปที่ 16 ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลู และอิมัลเจลซึ่งที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : *C. albicans* positive, หลอดที่ 2 : *C. albicans* อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 3 : *C. albicans* นาโนเจล กานพลู, หลอดที่ 4 : *C. albicans* อิมัลเจลซึ่ง



รูปที่ 17 ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจล และนาโนเจลซึ่งที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : *C. albicans* อิมัลเจลซึ่ง, หลอดที่ 2 : *C. albicans* นาโนเจลซึ่ง



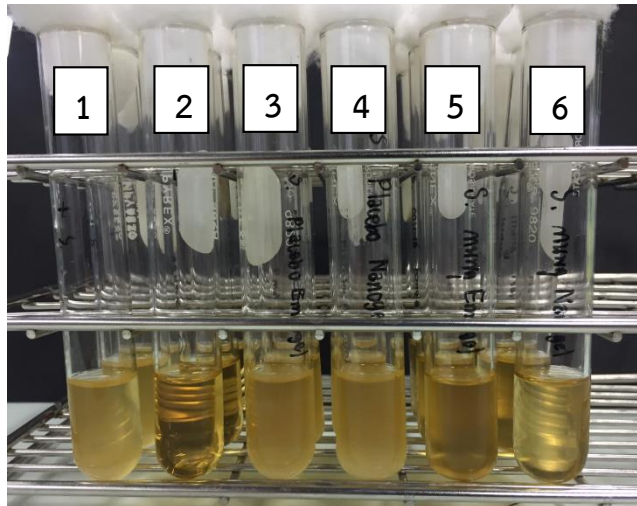
รูปที่ 18 ผลการทำ Clear zone เชื้อ *C. albicans* และ *S. aureus* โดย Petri dish A : ผลการทำ Clear zone เชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจลซึ่ง ที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC, Petri dish B : ผลการทำ Clear zone เชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจลและนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC, Petri dish C : ผลการทำ Clear zone เชื้อ *S. aureus* ของอิมัลเจลและนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC



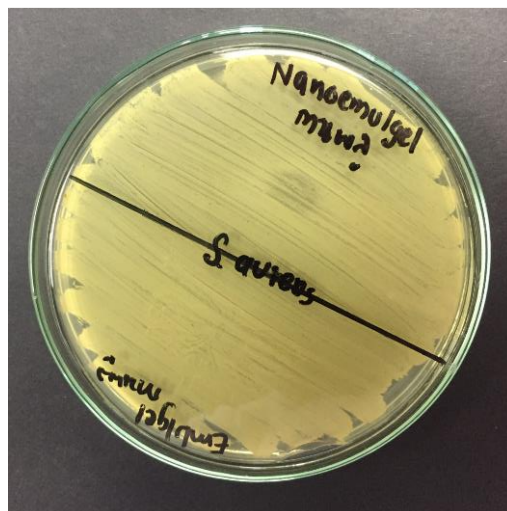
รูปที่ 19 ผลการทำ Clear zone เชื้อ *C. albicans* ของ a) อิมัลเจลและนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC และ b) อิมัลเจลและนาโนเจลซึ่งที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC

6.3 ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC

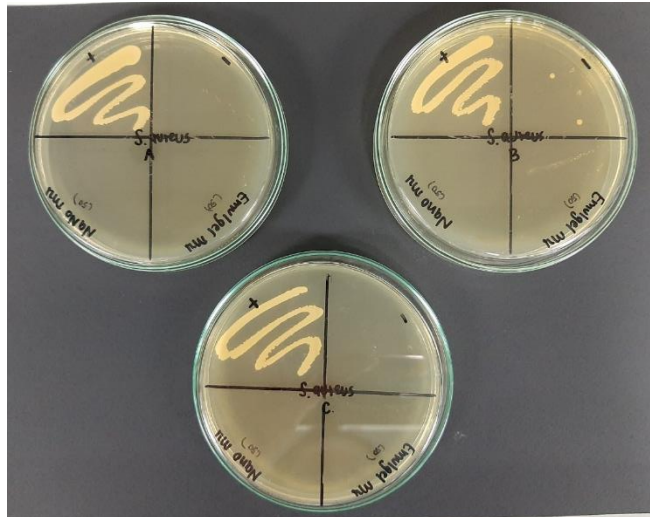
- รูปผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC



รูปที่ 20 ผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : *S. aureus* positive, หลอดที่ 2 : Negative, หลอดที่ 3 : *S. aureus* Placebo อิมัลเจล, หลอดที่ 4 : *S. aureus* Placebo นาโนเจล, หลอดที่ 5 : *S. aureus* อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 6 : *S. aureus* นาโนเจลกานพลู

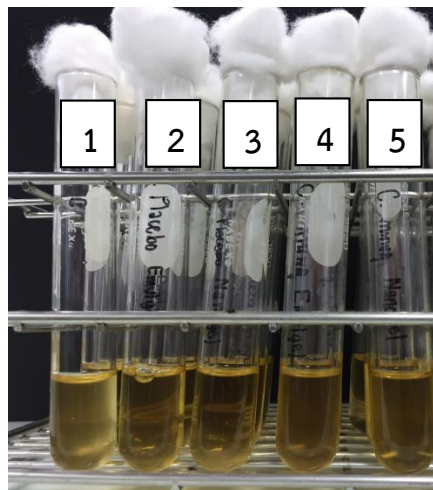


รูปที่ 21 ผลการทำ Clear zone เชื้อ *S. aureus* ของอิมัลเจลและนาโนเจลกานพลู ที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC

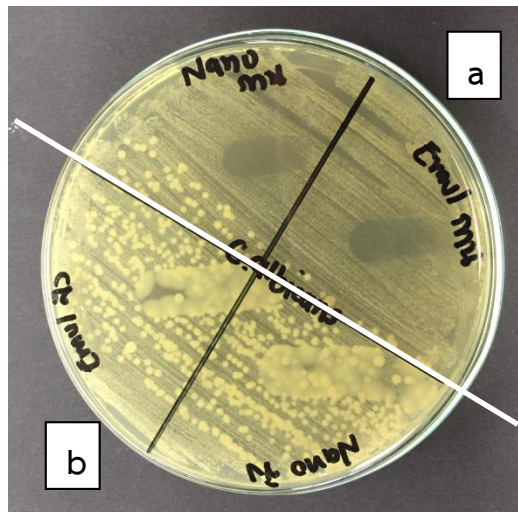


รูปที่ 22 ผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยการ streak อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตำรับอิมัลเจลและนาโนเจลที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC ลง Petri dish โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง

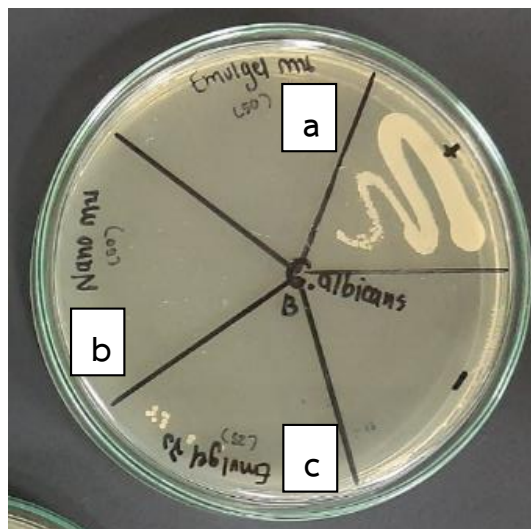
- รูปผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC



รูปที่ 23 ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจล และนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : *C. albicans* positive, หลอดที่ 2 : *C. albicans* Placebo อิมัลเจล, หลอดที่ 3 : *C. albicans* Placebo นาโนเจล, หลอดที่ 4 : *C. albicans* อิมัลเจลกานพลู, หลอดที่ 5 : *C. albicans* นาโนเจลกานพลู

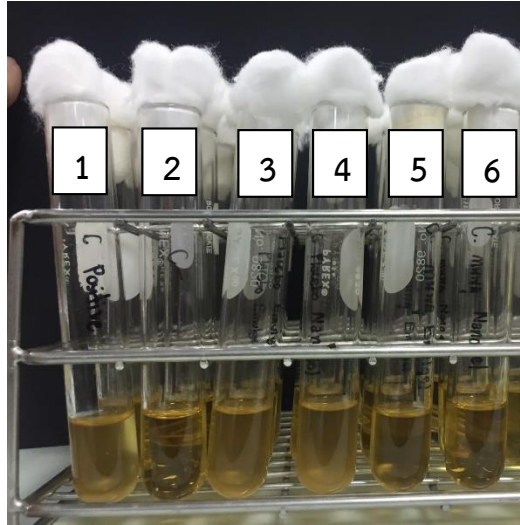


รูปที่ 24 ผลการทำ Clear zone เชื้อ *C. albicans* ของ a) อิมัลเจลและนาโนเจลกานพลูที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC และ b) อิมัลเจลและนาโนเจลขิงที่ความเข้มข้น 25 เท่าของ MIC



รูปที่ 25 ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* โดยการ streak ลง Petri dish ของ a) อิมัลเจลเจลกานพลูที่ 50 เท่าของ MIC, b) นาโนเจลกานพลูที่ 50 เท่าของ MIC และ c) อิมัลเจลขิงที่ 25 เท่าของ MIC

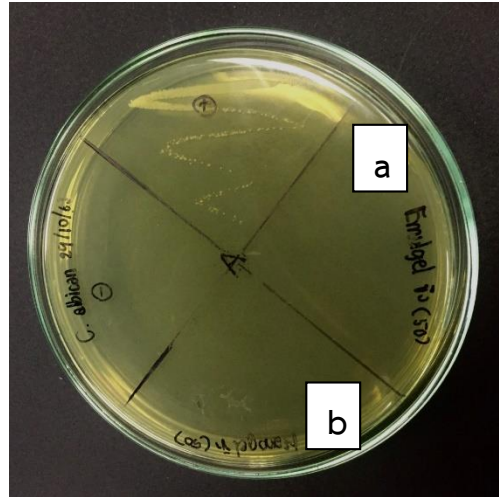
- รูปผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจล และนาโนเจลซึ่งที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC



รูปที่ 26 ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจล และนาโนเจลซึ่งที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC โดยหลอดที่ 1 : *C. albicans* positive, หลอดที่ 2 : Negative, หลอดที่ 3 : *C. albicans* Placebo อิมัลเจล, หลอดที่ 4 : *C. albicans* Placebo นาโนเจล, หลอดที่ 5 : *C. albicans* อิมัลเจลซึ่ง, หลอดที่ 6 : *C. albicans* นาโนเจลซึ่ง



รูปที่ 27 ผลการทำ Clear zone เชื้อ *C. albicans* ของอิมัลเจลและนาโนเจลซึ่งที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC



รูปที่ 28 ผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* โดยการ streak เชื้อลง Petri dish โดยที่ a) อิมัลเจลซึ่งที่ 50 เท่าของ MIC, b) นาโนเจลซึ่งที่ 50 เท่าของ MIC)

7. การทดสอบความคงตัวทางกายภาพของตำรับอิมัลเจลและนาโนเจล

7.1 ลักษณะตำรับที่ได้หลังเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 7 วัน

ตำรับอิมัลเจลและนาโนเจลของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและซึ่งมีความคงตัวดี ไม่มีการแยกชั้นของเนื้อเจล ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีและลักษณะของตำรับ

7.2 ลักษณะตำรับที่ได้หลังทำ heating cooling 6 cycle

ตำรับอิมัลเจลและนาโนเจลของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและซึ่งมีความคงตัวดี เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนและหลังทำ heating cooling 6 cycle ตำรับอิมัลเจลและนาโนเจลทั้งของน้ำมันหอมระเหยกานพลูและซึ่งมีความคงตัวดี ไม่มีการแยกชั้นของเนื้อเจล เมื่อวัด pH ของทุกตำรับพบว่าค่า pH เท่ากับ 5.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่เหมาะสมกับสมดุลของความเป็นกรดและด่างในการป้องกันโรคทางผิวหนัง⁽⁶⁶⁾

ตารางที่ 11 ผลการเปรียบเทียบตำรับก่อนและหลังทดสอบความคงตัวของตำรับด้วยวิธี Heating cooling 6 cycle

ตำรับ	Before Heating cooling cycle			After Heating cooling cycle		
	Creaming	Cracking	pH	Creaming	Cracking	pH
Placebo อิมัลเจล	-	-	5.5	-	-	5.5
Placebo นาโนเจล	-	-	5.5	-	-	5.5
อิมัลเจลกานพลู	-	-	5.5	-	-	5.5
อิมัลเจลกานพลู	-	-	5.5	-	-	5.5
อิมัลเจลขิง	-	-	5.5	-	-	5.5
นาโนเจลขิง	-	-	5.5	-	-	5.5

หมายเหตุ : (-) หมายถึง ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

จากการกลั่นน้ำมันหอมระเหยของพืชทั้ง 9 ชนิดจาก 4 วงศ์ประกอบด้วยวงศ์ Rutaceae ได้แก่ ส้มโอ (*Citrus maxima*), มะนาว (*Citrus aurantifolia*), มะกรูด (*Citrus hystrix*), ส้มฟ้า (*Clausena harmandiana*) วงศ์ Myristicaceae ได้แก่ เมล็ดแห้งลูกจันทร์ (*Myristica fragrans*) วงศ์ Zingiberaceae ได้แก่ ขิง (*Zingiber officinale*), ข่า (*Alpinia galanga*), ไพล (*Zingiber cassumunar*) และวงศ์ Myrtaceae ได้แก่ กานพลู (*Syzygium aromaticum*) แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* โดยการหาค่า MIC และ MBC พบว่า น้ำมันหอมระเหยของกานพลูสามารถฆ่าเชื้อได้ทั้ง *S. aureus* และ *C. albicans* มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 500 µg/ml ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยของขิงสามารถฆ่าได้เพียง *C. albicans* มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1000 µg/ml ส่วนน้ำมันหอมระเหยของพืชชนิดอื่นนั้น ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ได้

เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยของกานพลูและขิงมาผสมกันเพื่อทดสอบความสามารถในการเสริมฤทธิ์กันในการฆ่าเชื้อในอัตราส่วนกานพลู : น้ำมันหอมระเหยขิง 5 : 1, 1 : 5 และ 1 : 1 พบว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยเพียงชนิดเดียวสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ดีกว่าใช้น้ำมันหอมระเหยของกานพลูและขิงร่วมกัน และเมื่อคำนวณหาค่า FIC index ของน้ำมันหอมระเหยของกานพลู : น้ำมันหอมระเหยขิงในอัตราส่วน 5 : 1 ในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ได้เท่ากับ 3 ซึ่งอยู่ในช่วง 0.5 - 4.0 (Indifferent) แสดงว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยของกานพลูและขิงผสมกันนั้นพบว่าผลการยับยั้งเชื้อ *C. albicans* ไม่แตกต่างกับการใช้น้ำมันหอมระเหยกานพลูหรือขิงตัวเดียวในการยับยั้งเชื้อ *C. albicans*

เมื่อพบว่าน้ำมันกานพลูและขิงสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ จึงทำการทดสอบเอกลักษณ์ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) เป็นจำนวน 3 คอนดิชัน คอนดิชันที่ 1 ใช้ตัวดูดซับ (stationary phase) เป็น TLC-Silica gel 60 GF₂₅₄ ส่วนตัวทำละลาย (mobile phase) เป็น toluene : ethyl acetate : formic acid ในอัตราส่วน 7 : 3 : 0.2 แล้วตรวจสอบด้วย UV 254 nm พบว่า กานพลูได้ค่า R_f 0.56 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hemendra Y. และคณะ⁽³⁸⁾ ที่มีค่า R_f ของ eugenol เท่ากับ 0.56 แสดงว่ากานพลูมี eugenol เป็นองค์ประกอบ คอนดิชันที่ 2 ใช้ตัวดูดซับ (stationary phase) เป็น TLC-Silica gel 60 GF₂₅₄ ส่วนตัวทำละลาย (mobile phase) เป็น hexane : acetone ในอัตราส่วน 8 : 2 จากนั้นฉีดพ่นสเปรย์ด้วย 10% sulfuric acid และตรวจสอบ

ด้วย UV 366 nm พบว่าชิงมีจุดเรืองแสงสีเหลืองที่ค่า R_f 0.16 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Usama IA. และคณะ⁽³⁹⁾ ที่มีค่า R_f ของ 6-gingerol เท่ากับ 0.15 แสดงว่าชิงมี 6-gingerol เป็นองค์ประกอบ คอนดิชันที่ 3 ใช้ตัวดูดซับ (stationary phase) เป็น TLC-Silica gel 60 GF₂₅₄ ส่วนตัวทำละลาย (mobile phase) เป็น hexane : ethyl acetate ในอัตราส่วน 8 : 2 ตรวจสอบภายใต้แสง UV 254 nm พบว่าชิงได้ค่า R_f 0.48 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Uppuluri VM. และ Reba P⁽⁴⁰⁾ ที่มีค่า R_f ของ 6-shogaol เท่ากับ 0.46 แสดงว่าชิงมี 6-shogaol เป็นองค์ประกอบ

จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยของกานพลูและชิงมาเตรียมเป็นตำรับอิมัลเจลและนาโนเจล แล้วทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* พบว่า ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 เท่าของ MIC ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทั้งสองชนิดได้ แต่ที่ความเข้มข้น 50 เท่าของ MIC พบว่าทั้งตำรับอิมัลเจลและนาโนเจลของน้ำมันหอมระเหยกานพลูสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* ได้ ในขณะที่ตำรับอิมัลเจลและนาโนเจลที่ผสมน้ำมันหอมระเหยของชิงนั้นพบว่ามีความเข้มข้นที่ 50 เท่าของ MIC เท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *C. albicans* ได้

น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากกานพลูและชิงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เมื่อนำมาเตรียมเป็นตำรับยาทาภายนอกในรูปแบบอิมัลเจลและนาโนเจลพบว่ายังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 50 เท่าของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (MIC) และตำรับทั้งสองรูปแบบมีความคงตัวดี ไม่แยกชั้นกัน จากผลการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำเอาน้ำมันหอมระเหยกานพลูและชิงไปพัฒนาสูตรตำรับเป็นยาทาภายนอกสำหรับรักษาโรคทางผิวหนังที่เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยระบบนำส่งยาแบบอิมัลเจลและนาโนเจลได้ และสามารถนำไปศึกษาฤทธิ์ คุณสมบัติอื่น ๆ และต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์ยาทาฆ่าเชื้อรูปแบบอื่นต่อไปได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทดสอบการระคายเคืองของผิวหนัง รวมถึงความพึงพอใจของอาสาสมัครจากการใช้ผลิตภัณฑ์
2. ควรมี Reference standard ของสารสำคัญในการทำ TLC เช่น eugenol, 6-gingerol, 6-shogaol เป็นต้น
3. ควรมีการทดสอบเอกลักษณ์ของสารด้วยเครื่องมือที่มีความแม่นยำสูงกว่านี้ เช่น Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

บรรณานุกรม

1. ประสาทพร บริสุทธิ์เพชร, พิชัย กาญจนตร, สาธิต พรตระกูลพิพัฒน์. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ. ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มข ครั้งที่ 9; 11-12 มิถุนายน 2551; คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2551. p. 91-101.
2. Institute IWI. Principles of best practice London: International Wound Infection Institute; 2016 [Cargo works].
3. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. . Braz J Microbiol. 2000;31(4):247-56.
4. El-Maatia MFA, Mahgoub SA, Salah M. Labiba AM, Al-Gabya A, Ramadan MF. Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. European Journal of Integrative Medicine. 2016;8(4):494-504.
5. Amelia B, Saepudin E, Cahyana AH, Rahayu DU, Sulistyoningrum AS, Haib J. GC-MS Analysis of Clove (*Syzygium aromaticum*) Bud Essential Oil from Java and Manado American Institute of Physics. 2017.
6. Radünz M, Trindade MLMd, Camargo TM, Radünz AL, Borges CD, Gandra EA, et al. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. Food chemistry. 2019;276:180-6.
7. Filgueiras CT, Vanetti MCD. Effect of eugenol on growth and listeriolysin o production by *Listeria monocytogenes*. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2006;49(3):405-9.
8. Cox SD, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J Appl Microbiol. 2000;88(1):170-5.
9. Thillepa T, Thevanesam V, Chelvendran S. Anticandidal activity of essential oils of *Myristica fragrans* and *Syzygium aromaticum*. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2018;5:35-8.

10. Ayoola GA, Lawore FM, Adelowotan T, Aibinu I. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzigium aromaticum* (clove). *African journal of microbiology research*. 2007;2(13):162-6.
11. Guo J-j, Gao Z-p, Xia J-l, Ritenour MA, Li G-y, Shan Y. Comparative analysis of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of citrus essential oils from the main cultivated varieties in China. *LWT - Food Science and Technology*. 2018;97:825–39.
12. Mishra BB, Kishore N, Tiwari VK, Singh DD, Tripathi V. A novel antifungal anthraquinone from seeds of *Aegle marmelos* Correa (family Rutaceae). *Fitoterapia*. 2010;81(2):104-7.
13. Mitropoulou G, Fitsiou E, Spyridopoulou K, Tiptiri-Kourpeti A, Bardouki H, Vamvakias M, et al. Citrus medica essential oil exhibits significant antimicrobial and antiproliferative activity. *LWT - Food Science and Technology*. 2017;84:344-52.
14. Gabriele M, Frassinetti S, Caltavuturo L, Montero L, Dinelli G, Longo V, et al. Citrus bergamia powder: antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. *Journal of functional foods*. 2017;31:255-65.
15. นภาพรณัฏฐา พงษ์. น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกผลและดอกของส้มโอ นครปฐม: มหาวิทยาลัยศิลปากร; 2549.
16. Zhou Y, et al. Oxidized amylose with high carboxyl content: A promising solubilizer and carrier of linalool for antimicrobial activity. *Carbohydr Polym*. 2016;10(154):13-9.
17. ปทุม อรุณวัชรินทร์. การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45; 30ม.ค.-2 ก.พ. 2550; มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ; 2550.
18. 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.

19. Leite MCA, Bezerra APdB, Sousa JPd, Lima EdO. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. *Medical Mycology*. 2015;53(3):275-84.
20. Quintero A, Alfredo U, Rojas LB. Constituents and biological activity of *Citrus aurantium amara* L. essential oil. *Acta horticulturae* 2004.
21. Pathirana HNKS, Wimalasena SHMP, Silva BCJD, Hossain S, Heo G-J. Antibacterial activity of lime (*Citrus aurantifolia*) essential oil and limonene against fish pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *FISHERIES & AQUATIC LIFE*. 2018;26:131-9.
22. Zore G, Kodgire S, Kazi R, Patil R. Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. *Medical Mycology*. 2017;0:1-14.
23. ขญาดา โกวิทวงศ์, สราวัณน์ จันทบุรณันท์.ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของลิโมนีนนาโนอิมัลชัน. 2555.
24. Gupta AD, KumarBansal V, Babu V, Maithil N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt). *Journal of Genetic engineering and Biotechnology*. 2013;11(1):25-31.
25. Narasimhan B, Dhake AS. Antibacterial principles from *Myristica fragrans* seeds. . *Journal of medicinal food*. 2006;9(3):395-9.
26. Sivasothy Y, Chong WK, Hamid A, Eldeen IM, Sulaiman SF, Awang K. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. *Food Chemistry*. 2011;124(2):514-7.
27. Hasan HA, Raauf AMR, Razik BMA, Hassan BAR. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Crude Extracts Isolated from *Zingiber Officinale* by Different Solvents. *Pharmaceutica Analytica Acta*. 2012;3(9).
28. Aziz AN, Ibrahim H, Syamsir DR, Mohtar M, Vejayan J, Awang K. Antimicrobial compounds from *Alpinia conchigera*. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;145(3):798-802.

29. Tang X, Xu C, Yagiz Y, Simonne A, Marshall MR. Phytochemical profiles, and antimicrobial and antioxidant activities of greater galangal [*Alpinia galanga* (Linn.) Swartz.] flowers. . 2018;255:300-8.
30. Janssen AM, Scheffer JJC. Acetoxychavicol acetate, an antifungal component of *Alpinia galanga*1. *Planta medica*. 1985;51(6):507-11.
31. Oonmetta-aree J, Suzuki T, Gasaluck P, Eumkeb G. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Science and Technology*. 2006;39(10):1214-20.
32. พีรพัฒน์ สุพรรณพันธุ์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, สุภัตติ นิมรัตน์. ประสิทธิภาพของสารสกัดสมุนไพรที่ผลิตเป็นการค้าและสารสมุนไพรสกัดสดบางชนิดในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*. *Thai J Toxicology* 2010;25(1):15-28.
33. นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. น้ำมันไพลทอดต่างจากน้ำมันไพลกลั่นอย่างไร? ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2012
[Available from:
<https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/109/%E0%B8%99%E0%B9%89%E0%B8%B3%E0%B8%A1%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B9%84%E0%B8%9E%E0%B8%A5%E0%B8%97%E0%B8%AD%E0%B8%94%E0%B8%95%E0%B9%88%E0%B8%B2%E0%B8%87%E0%B8%88%E0%B8%B2%E0%B8%81%E0%B8%99%E0%B9%89%E0%B8%B3%E0%B8%A1%E0%B8%B1%E0%B8%99%E0%B9%84%E0%B8%9E%E0%B8%A5%E0%B8%81%E0%B8%A5%E0%B8%B1%E0%B9%88%E0%B8%99%E0%B8%AD%E0%B8%A2%E0%B9%88%E0%B8%B2%E0%B8%87%E0%B9%84%E0%B8%A3/>.
34. Kamazeri TSAT, Samah OA, Taher M, Susanti D, Qaralleh H. Antimicrobial activity and essential oils of *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga*, and *Zingiber cassumunar* from Malaysia. . *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2012;5(3):202-9.
35. Sela F, Karapandzova M, Stefkov G, Cvetkovikj I, Kulevanova S. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Juniperus excelsa* Bieb. (Cupressaceae) grown in R. Macedonia. *Pharmacognosy Research*. 2015;7(1).

36. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม. การทดลอง การวิเคราะห์หาองค์ประกอบและพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารผสมโดยวิธีทางโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (TLC). 2018.
37. Phansawan B. Free radicals, Antioxidants and Antioxidant Activity Determination วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2013;21(3).
38. Yadav H, Mungara P, Jivrajani M, Nivsarkar M, Anandjiwala S. TLC-DENSITOMETRIC QUANTIFICATION OF NEGUNDOSIDE, URSOLIC ACID, EUGENOL, LUPEOL, AND β -SITOSTEROL USING HPTLC FROM VITEX NEGUNDO LEAVES. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2012;32(11):1565-84.
39. Aly UI, Abbas MS, Taha HS, Gaber E-SI. Characterization of 6-Gingerol for In Vivo and In Vitro Ginger (*Zingiber officinale*) Using High Performance Liquid Chromatography Global Journal of Botanical Science. 2013;1:9-17.
40. Mallavadhani UV, Panigraha R. UPLC-Q-TOF-MS based studies to evaluate the effect of extraction methodology on the yield of 6-shogaol, a biomarker of *Z. officinale*. Industrial Crops and Products. 2013;50:821-7.
41. Jääskeläinen I. Population-based studied on complicated skin and skin structure infection: Helsinki University Hospital; 2017.
42. Carpenter S, et al. Expert recommendations for optimizing outcomes in the management of biofilm to promote healing of chronic wounds. Ostomy Wound Management. 2016.
43. Lindholm C, Keast D. Ensuring that the correct antimicrobial dressing is selected. Wounds International. 2012;3:22-8.
44. Woo K, Ayello E, Sibbald G. Increased bacterial burden and Infection: NERDS and STONES. Wounds International. 2007;3(2):25-46.
45. Vermeulen H, Hattem JMv, Storm-Versloot MN, Ubbink DT, Westerbos SJ. Topical silver for treating infected wounds. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2006.
46. Woo K, Sibbald RG. A cross-sectional validation study using NERDS and STONES to assess bacterial burden. Ostomy Wound Management. 2009;55(8):40-8.
47. Roberts TA, Baird-Parker AC, Tompkin RB. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie Academic and Professional. 1996:299-333.

48. นิติพงษ์ ศิริวงศ์. การดื้อยาปฏิชีวนะของ *Staphylococcus aureus* และแนวทางการควบคุม. สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. 2552;27(4):347-58.
49. Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus Aureus* 2 0 1 9 [Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722898>.
50. Bhattacharya M, Wozniak DJ, Stoodley P, HallStoodley L. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. 2015;13(12):1499-516.
51. สำนักหอสมุดกำแพงแสน. เชื้อ *Staphylococcus aureus*. 2553:3-12.
52. Dowd FJ. *Candida Albicans* Infection. Reference Module in Biomedical Sciences. 2014.
53. Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. ISRN Microbiology. 2012:15.
54. Esposito S, Noviello S, Leone S. Epidemiology and microbiology of skin and soft tissue infections. PubMed. 2016;29(2):109-15.
55. พัชรพรณ กิจพันธ์. ความคิดเห็นของเภสัชกรชุมชนในกรุงเทพมหานครต่อช่องทางและเงื่อนไขในการจ่ายยาปฏิชีวนะสำหรับใช้ภายนอก. . วารสารเภสัชกรรมไทย 2560;9(2).
56. วรนนท์ รังสิมาวงศ์, ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์. นาโนอิมัลชันในระบบนำส่งยาทางผิวหนัง. นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร 2014.
57. อร เศรษฐจินดาเลิศ, ธวัชชัย แพชมัด. เจลก่อตัวด้วยการแลกเปลี่ยนสารทำละลาย. ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2555;7(3):137-42.
58. Nabi SAAu, Sheraz MA, Ahmed S, Mustaan N, Ahmad I. Pharmaceutical Gels: A Review. RADS-JPPS 2016;4(1):40-8.
59. นิสภา ศีตะบันย์. การวิเคราะห์อาหารด้วยเทคโนโลยีรีโอโลยี (ตอนที่1). ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ MTEC. 2546:24-8.
60. Paliwal S, Kaur G, Arya RK. Formulation and characterization of topical nano emulgel of terbinafine. Universal Journal of Pharmaceutical Research. 2018;3(6):28-37.
61. Pakhare AV, Deshmane SV, Deshmane SS, Biyani KR. Development of emulgel containing diclofenac potassium. Asian Journal of Pharmaceutics. 2017;11(4):712.

62. อภิสิทธิ์ โฆษิตชัยยงค์ และคณะ. สมบัติของวัสดุและความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของพอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูงที่ผสมไตรโคซาน. วารสารวิจัยและนวัตกรรมเพื่ออุตสาหกรรมไทย. 2553;1(3).
63. เสาวนีย์ กระสานตีสุข, หทัยชนก รุณรงค์. การพัฒนาตำรับโลชั่นบำรุงผิว: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ; 2549.
64. Bassolé IHN, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*. 2012;17(4):3989-4006.
65. Ariyaprakai S. Nanoemulsion Production by Simple and Low Energy Method. *Food and Applied Bioscience Journal*. 2017;5(3):155-64.
66. Schmid-Wendtner M-H, Korting HC. The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function *Skin Pharmacology and Physiology* 2006;19:296-302.

ภาคผนวก

รายงานสรุปการเงิน
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ

น้ำมันหอมระเหยในสมุนไพรไทยกับฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *C. albicans* สำหรับพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใช้ภายนอก

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน อ.ดร.ณิชากรณต์ ภิระคำ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 21 ธันวาคม 2561 ถึง 18 พฤศจิกายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 11 เดือน ตั้งแต่วันที่ 21 ธันวาคม 2561 ถึง 18 พฤศจิกายน 2562

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ (100%) 9,000 บาท เมื่อวันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2562

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าพืชสมุนไพร 9 ชนิด	4,000 บาท	2,368 บาท	เหลือ 1,632 บาท
2. ค่าอุปกรณ์สำหรับปฏิบัติการ	1,100 บาท	1,593 บาท	เกิน 493 บาท
4. ค่าโปสเตอร์	500 บาท	500 บาท	0 บาท
5. ค่าพิมพ์เอกสาร	500 บาท	312 บาท	เหลือ 188 บาท
6. ค่าวิทยานิพนธ์	2,400 บาท	600 บาท	เหลือ 1,800 บาท
7. ค่าเดินทาง	500 บาท	500 บาท	0 บาท
รวม	9,000 บาท	5,873 บาท	3,127 บาท

(.....)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย