

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)

การพัฒนาผลิตภัณฑ์จุ่มหัวนมแม่วัวจากน้ำมันหอมระเหยที่ฆ่าเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบ

Development of teat dip using antibacterial essential oils against mastitis pathogens

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาววัชรีย์ คุณกิตติ

ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Watcharee Khunkitti

คุณวุฒิ Doctor of Philosophy (Pharmaceutical Microbiology)

ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

หน่วยงาน ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย

ขอนแก่น

ที่อยู่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

โทรศัพท์/โทรสาร 0-4336-2092 E-mail watkhu@kku.ac.th

3. ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

ปัญหาเต้านมอักเสบเป็นปัญหาสำคัญที่มีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมโคนม กล่าวคือมีผลต่อการลดลงของปริมาณการผลิตน้ำนม และคุณภาพน้ำนมของโคนม อีกทั้งต้องมีการคัดแม่โคทิ้งก่อนเวลาและค่ารักษาโรคเต้านมอักเสบซึ่งทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจแก่อุตสาหกรรมการผลิตน้ำนมเป็นอย่างมาก ประเมินความเสียหายโดยรวมจากโรคเต้านมอักเสบสูงถึง 1,500-2,000 ล้านบาท/ปี (วิไลพรและคณะ, 2547) เต้านมอักเสบในโค (bovine mastitis) เกิดขึ้นจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ไมโครพลาสมาและยีสต์ เป็นต้น ส่วนใหญ่เชื้อที่ก่อให้เกิดปัญหาคือเชื้อแบคทีเรียเช่น *Staphylococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Bacillus spp.* และ *Pseudomonas spp.* ซึ่งพบในสิ่งแวดล้อมทั่วไป และมักทำให้เกิดอาการเจ็บปวดและแบบแสดงอาการ (clinical mastitis) สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการอักเสบของเต้านมชนิดเรื้อรังและไม่แสดงอาการ (subclinical mastitis) เชื้อที่เป็นสาเหตุหลักคือ *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* โดยเชื้อทั้งสองเป็นเชื้อที่สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อระหว่างเต้านมของโคและสามารถติดต่อไปยังแม่โคตัวอื่นได้โดยผ่านเครื่องรีดนม ซึ่งเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการทำให้ผลผลิตและคุณภาพของน้ำนมที่รีดได้ลดลง (กิตติศักดิ์, 2547) การรักษาโรคเต้านมอักเสบจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้ยาปฏิชีวนะและยาต้านการอักเสบ ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันและรักษาเต้านมอักเสบนั้นอาจก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนยาปฏิชีวนะในน้ำนม ทำให้เกิดผลเสียต่อผู้บริโภคได้อีกทั้งยังโหม้มนำการเกิดการดื้อยาในสัตว์ได้ (ชัยเดช และคณะ 2547) การป้องกันโรคเต้านมอักเสบด้วยการจุ่มหัวนมด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อหัวนม จะช่วยลดอัตราการติดเชื้อครั้งใหม่ลงได้ถึงร้อยละ 50 และลดอุบัติการณ์การเกิดโรคเต้านมอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ (NMC, 1995) ปัจจุบันเวชภัณฑ์ที่นำมาใช้ ส่วนใหญ่ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งทำให้ขาดดุลการค้าและเพิ่มต้นทุนในการผลิตน้ำนมเวชภัณฑ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการป้องกันและรักษาเต้านมอักเสบในโคนม ชนิดน้ำยาจุ่มหัวนม ส่วนใหญ่เป็นสารละลายที่มีสารเคมีออกฤทธิ์กลุ่ม antiseptic และ disinfectant เช่น 0.05%-1% iodine หรือ 0.5% chlorhexidine digluconate เป็นต้น (กิตติศักดิ์, 2547) โดยเฉพาะ 0.5% chlorhexidine digluconate มีรายงานว่าทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังได้ (Sears et al., 1992) มีรายงานการใช้สมุนไพรมาใช้เป็นน้ำยาจุ่มเต้านมเพื่อป้องกันและรักษาเต้านมอักเสบ เช่น ผักกระด้างหัวหวาน (วิไลพร และคณะ, 2547) เปลือกทุเรียน (รักษธรรมและคณะ, 2548) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม มีรายงานการใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรในการต้านเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบน้อยมาก รายงานส่วนใหญ่เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อโรคที่มีผลต่อการเน่าเสียของอาหารและเครื่องสำอางเป็นหลัก นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ด้านการออกซิเดชัน และด้านการอักเสบ การใช้ น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรที่ปลูกง่าย สามารถผลิตได้เองในประเทศ จะช่วยให้เกษตรกรมีรายได้จากการปลูกและอุตสาหกรรมน้ำมันหอมระเหยสามารถผลิตวัตถุดิบ ที่สำคัญคือสามารถลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสเตียรอยด์ซึ่ง

นิยมใช้เพื่อป้องกันและรักษาอาการติดเชื้อและการอักเสบของเต้านมวัวลงได้ โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหยที่เลือกใช้ เป็นพืชที่ใช้เป็นอาหารที่มีรายงานการฆ่าเชื้อก่อโรค ลดการอักเสบ หรือการเกิดออกซิเดชัน ได้แก่ โพล ขมิ้นชัน ใบพลู ตะไคร้แกง มะกรูด กระเพรา และโหระพา Lertstitthanakorn et al. (2005) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นจาก ต้นตะไคร้หอม มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการฆ่าเชื้อที่เป็นสาเหตุของการอักเสบของผิว (*Propionibacterium acnes*), antioxidant และ anti-inflammatory โดยการยับยั้งเอนไซม์ 5-lipoxygenase ป้องกันไม่ให้ arachidonic acid เปลี่ยนเป็น leukotrienes ซึ่งเป็น proinflammatory mediator ก่อให้เกิดอาการอักเสบและอาการแพ้ที่ผิวหนัง ข้อต่อ ปอด และ หัวใจ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยน้ำมันตะไคร้หอม ใบกระเพรา และโพล มีประสิทธิภาพในการ ด้านการเกิดออกซิเดชันได้ดีกว่า ascorbic acid และ น้ำมันหอมระเหยน้ำมันตะไคร้หอม ใบกระเพรา และผลมะกรูดมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ดี Baylac and Racine (2003) รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจากมะนาว ส้มจีน ขมิ้นชัน มีฤทธิ์ ด้านการอักเสบโดยยับยั้งเอนไซม์ 5-lipoxygenase Inouye et al. (2001) พบว่า น้ำมัน cinnamon bark oil, lemongrass oil สามารถฆ่าเชื้อ *H. influenzae*, *S. pyrogenes*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีมาก Hammer et al (1999) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม ตะไคร้แกง และใบโหระพา มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *A. baumannii*, *A. sobria*, *C. albicans*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*. Sachetti et al. (2005) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจาก ขมิ้นชัน ตะไคร้แกง มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *C. albicans*, *R. glutinis*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Y. lipolytica* และพบว่ามีฤทธิ์ ต้านออกซิเดชัน ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเปรียบเทียบถึงสารออกฤทธิ์ของน้ำมันหอม ระเหยของสมุนไพร โพล (Plai: *Zingiber cassumunar* Roxb.) ขมิ้นชัน (Turmeric: *Curcuma longa* L.) ใบพลู (Betle leaf vine ; *Piper betle* L.) ตะไคร้แกง (Lemongrass: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) ตะไคร้หอม (Citronella grass: *Cymbopogon nardus* L.) Rendle) มะกรูด (Leech lime : *Citrus hystrix* DC.) กระเพรา (Holy basil : *Ocimum sanctum* L.) และโหระพา (Sweet basil: *Ocimum basilicum* L.) ต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุของเต้านมอักเสบ และทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีศักยภาพในการ ด้านเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบ และด้านการอักเสบมาพัฒนาเป็นน้ำยาจุ่มหัวนมแมว

4. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพัฒนาน้ำยาจุ่มหัวนมวัว (Teat dip) จากน้ำมันหอมระเหย ที่มีศักยภาพในการฆ่าเชื้อที่เป็น สาเหตุเต้านมอักเสบที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระ

5. แนวทาง/ขั้นตอนการดำเนินงาน

5.1 สมมุติฐานการวิจัย

น้ำมันหอมระเหยที่มีรายงานเรื่องการฆ่าเชื้อก่อโรคทั่วไป น่าจะมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อที่เป็นสาเหตุหลักในการก่อโรค เต้านมอักเสบ และหากน้ำมันหอมระเหยนั้นสามารถลดอาการอักเสบของเต้านมวัวร่วมด้วยจะทำให้การเต้านมอักเสบดีขึ้น และหากนำมาเตรียมเป็นน้ำยาจุ่มหัวนมวัวนอกจากจะช่วยป้องกันการติดเชื้อเต้านมอักเสบแล้วยังช่วยลดอาการอักเสบจากการรีดนมวัวได้ ส่งผลให้แม่วัวมีสุขภาพดี นำนมที่รีดได้มีคุณภาพดี ที่สำคัญช่วยลดอาการดื้อยาฆ่าเชื้อจากสารเคมีและลดการใช้ยาสดเต้านมวัว ซึ่งจะนำไปสู่การลดการตกค้างของ ยาปฏิชีวนะและยาสเตียรอยด์และทำให้ได้น้ำนมวัวที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

5.2 ขอบเขตในการวิจัย

ระยะแรก เป็นการนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำจากบริษัทเครื่องหอมไทยจีนมาทำการควบคุมคุณภาพทางเคมี แล้วนำมาหาประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบในแม่วัว ฤทธิ์ด้านการเกิดออกซิเดชันและฤทธิ์ต้านการอักเสบแบบการป้องกันและการรักษา

ระยะที่สอง เลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีศักยภาพมาศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตั้งตำรับโดยศึกษาเปรียบเทียบกับ 0.5% chlorhexidine solution ตั้งตำรับน้ำยาจุ่มหัวนมวัว ศึกษาประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อและความคงตัวทางกายภาพและทางเคมี

6. วิธีการดำเนินงานวิจัย

6.1 วัสดุและอุปกรณ์:

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่นำมาศึกษา ได้แก่ ไพล ขมิ้นชัน ใบพลู ตะไคร้หอม ตะไคร้
แกง มะกรูด กระเพราและโหระพา ซื้อจากบริษัทเครื่องหอมไทยจีน จำกัด 95% Ethanol (กรรมสรรพสามิต)
absolute alcohol ของ Analar (UK). สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ เป็น AR grade และ HPLC grade ได้แก่
Disodium hydrogen phosphate และ Potassium dihydrogen orthophosphate, จาก Ajax Finechem
(Australia). 2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ascorbic acid (vitamin C), butylated hydroxyl
toluene (BHT) and alpha-tocopherol (vitamin E) จาก Sigma Chemicals (USA) สารเคมีที่ใช้พัฒนาตำรับ
จากบริษัท วิทยาศาสตร์ จำกัด

6.2 การตรวจองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโดย GC/MS

6.2.1 การศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด โดยใช้เครื่องมือ GC/MS

สภาวะที่ใช้ในการศึกษาองค์ประกอบ

GC (TraceGC ultra, Model K05200B20000070, Italy) / MS (DSQ, Model TRACE DSQ-MASS
SPECTROMETRY, USA)

Software: Xcalibur 1.4

Library: NIST MS Search

Column: Tr-5 (5%phenyl-95%dimethylpolysiloxane), 30 m, 0.2 mm, 0.25 mm ID

GC/MS condition

Injection volume: 1 µl

Split injection, Split Ratio (1:100), Split flow 100 ml/min

Injector temperature: 250 °C

Oven temperature program:

70 °C (hold 1 min), to 280 °C at 6 °C/min (hold 3 min)

Run time: 39.00 min

Carrier gas flow rate (Helium): 1 ml/min

Transfer line temperature (Interface temp.): 250 °C

Ion source: 220 °C

Scan mode: full scan 35 - 550 m/z

Scan rate: 1000 amu/s

Solvent delay time: 2 min

เปรียบเทียบองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยโดยเปรียบเทียบกับ ค่า Linear retention indices ที่สัมพันธ์กับ
C₁₁- C₁₇ alkanes

6.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แกง

สภาวะที่ใช้ในการหาปริมาณองค์ประกอบ

Column: HP-5 (30m x0.32 mm id. X0.25 micro film thickness)

Inlet temperature: 250 °C

FID detector temperature: 280 °C

Split ration: 10 per 1

N₂ Flow: 2 ml/min

Oven: start 100 °C, hold 1 min, ramp 10 °C/min to 220 °C, hold 1 min (14 min/injection)

6.3 การแยกเชื้อก่อโรคเต้านมวัวอักเสบและการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อหาชนิดของเชื้อที่แยกได้

6.3.1 การแยกเชื้อก่อโรคเต้านมวัวอักเสบ

1. นำน้ำนมมา mix ด้วย vortex
2. ต่บน้ำนมมา 1 loop แล้ว streak ลง blood agar plate และ MacConkey agar plate
3. นำไปบ่มเพาะเชื้อ ที่ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชือบนอาหาร
4. นำเชื้อ colony เดียว จากข้อ 3.3 ไปทำการย้อมสีแกรม (Gram's staining) เพื่อแยกแกรมของเชื้อดังนี้

4.1 สเมียร์เชื้อ ลงบนน้ำเกลือบนแผ่นสไลด์ให้อยู่ห่างกันพอประมาณ ทิ้งให้แห้งใน

อากาศ

4.2 นำไปตรึงด้วยเปลวไฟ เป็นการตรึงเชื้อแบคทีเรียด้วยความร้อน (heat fix) โดยใช้ด้านล่างของแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง โดยปล่อยให้ร้อนพอที่จะแตะฝ่ามือได้

4.3 หยดสี Crystal violet solution ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีทิ้ง แล้วล้างออกด้วยน้ำประปาผ่านเบาๆ

4.4 หยดสี Gram iodine solution ปล่อยให้แห้ง 1 นาที เทสีทิ้ง และล้างออกด้วยน้ำประปาอีกครั้ง

4.5 ใช้ 95% alcohol ฟอกสี โดยหยดให้ไหลไปข้างๆ ตามสไลด์จนดูไม่มีสีหลุดออกมา (ประมาณ 5-10 วินาที) ล้างด้วยน้ำอีกครั้ง

4.6 ย้อมทับด้วย Safanin solution ทิ้งไว้นาน 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาผ่านเบาๆ ซับด้วยกระดาษให้แห้ง

4.7 นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า เพื่อดูการติดสีและรูปร่างของเชื้อ

5. นำเชื้อที่ติดสีม่วงหรือแกรมบวก รูปร่างกลม (*Streptococcus* spp. และ *Staphylococcus* spp.)

ไปทำการทดสอบ Catalase เพื่อนำไปแยกกลุ่มการทดสอบทางชีวเคมีสำหรับแยกชนิดต่อไป

วิธีการทดสอบ ต่โคโลนีของเชื้อที่ต้องการลงบนสไลด์แก้ว หยดสารละลาย 3% Hydrogen peroxide ลงบนกระจากจากนั้นจึงแตะเชื้อวางบนน้ำยา แล้วอ่านผล

การแปลผล + หมายถึง มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

- หมายถึง ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

6. นำเชื้อที่ติดสีแดงหรือแกรมลบ รูปร่างแท่ง (*Escherichia* spp. และ *Pseudomonas* spp.)

ไปทำการทดสอบ Oxidase เพื่อนำไปแยกกลุ่มการทดสอบทางชีวเคมีสำหรับแยกชนิดต่อไป

วิธีการทดสอบ ป้ายเชื้อลงบนกระดาษที่ชุบน้ำยาที่มี dimethyl-*p*-phenylene-diamine dihydrochloride

การแปลผล + หมายถึง มีสีน้ำเงินเข้มเกิดขึ้นภายใน 5-10 วินาที

- หมายถึง ไม่เกิดสี

6. 3. 2 การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อหาชนิดของเชื้อที่แยกได้

1. *Streptococcus agalactiae*

การทดสอบทางชีวเคมี	วิธีทดสอบ	การแปลผล
Hemolysis	แตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ streak ลงใน blood agar เก็บบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมงแล้วสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ	β - hemolysis หมายถึง โคโลนีเล็กใส มี zone ใส 1 วง
PR -Mannitol	แตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ stab ลงในอาหาร เก็บบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยด FeCl_2 ลงไป แล้วอ่านผล	+ หมายถึง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง - หมายถึง อาหารเป็นสีส้ม เช่นเดิม
Esculin hydrolysis	แตะเชื้อจากโคโลนี steak บนผิว agar เก็บบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	+ หมายถึง มีสีดำ ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ - หมายถึง ไม่มีการ เปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ
CAMP test	ใช้ sheep blood agar plate แตะเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ลากผ่านกึ่งกลาง plate แล้วแตะเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> ลากตั้งฉากกับรอย streak ของ <i>S. aureus</i> โดยให้ห่างประมาณ 0.3-0.5 ซม. นำเข้าตู้เพาะบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	ที่ปลายของรอย streak เชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> จะมีรูปร่างเป็นหัวลูกศร (arrow-head)

2. *Bacillus cereus*

การทดสอบทางชีวเคมี	วิธีทดสอบ	การแปลผล
Hemolysis	แตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ streak ลงใน blood agar เก็บบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมงแล้วสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ	α - hemolysis หมายถึง โคโลนีใหญ่ มี zone เทาเขียว
Motility test	แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่าให้ถึงก้นหลอด เก็บบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	+ หมายถึง เชื้อเจริญออกรอยแทงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น - หมายถึง เชื้อเจริญรอย stab เท่านั้น เห็นรอย stab ชัดเจนอาหารใส
Esculin hydrolysis	แตะเชื้อจากโคโลนี steak บนผิว agar เก็บบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	+ หมายถึง มีสีดำ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ - หมายถึง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. *Staphylococcus aureus*

การทดสอบทางชีวเคมี	วิธีทดสอบ	การแปลผล
Hemolysis	แตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ streak ลงใน blood agar เก็บปัมที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมงแล้วสังเกตลักษณะโคโลนีของเชื้อ	β - hemolysis หมายถึง โคโลนีขุ่นขาว เหลือง มี zone สี 2 วง
Catalase test	แตะโคโลนีของเชื้อที่ต้องการลงบนสไลด์แก้ว หยดสารละลาย 3% Hydrogen peroxide ลงบนกระจกจากนั้นจึงแตะเชื้อวางบนน้ำยา แล้วอ่านผล	+ หมายถึง มีฟองก๊าซเกิดขึ้น - หมายถึง ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น
PR -Mannitol	แตะเชื้อที่ต้องการทดสอบ stab ลงในอาหาร เก็บปัมที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยด $FeCl_2$ ลงไป แล้วอ่านผล	+ หมายถึง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง - หมายถึง อาหารเป็นสีส้ม เช่นเดิม
Coagulase test	Incubate เชื้อลงในหลอดที่มีพลาสมาอยู่ เก็บปัมที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล ถ้าเชื้อสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ จะทำให้พลาสมาแข็งตัว	+ หมายถึง พลาสมาแข็งตัวดี หลอดทดลอง - หมายถึง พลาสมาไม่แข็งตัว
1% Maltose ใน purple agar base	แตะเชื้อจากโคโลนี steak บนผิว agar เก็บปัมที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	+g หมายถึง ให้สีเหลืองของโคโลนีและ agar ได้โคโลนี +i หมายถึง ให้โคโลนีออกเขียว และโคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง - หมายถึง โคโลนีสีขาว agar ได้โคโลนีไม่เปลี่ยนแปลง

4. *Esherichia coli*

การทดสอบทางชีวเคมี	วิธีทดสอบ	การแปลผล
Motility test	แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่าให้ถึงก้นหลอด เก็บบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	+ หมายถึง เชื้อเจริญออกรอยแทงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น - หมายถึง เชื้อเจริญรอย stab เท่านั้น เห็นรอย stab ชัดเจนอาหารใส
TSI	ใช้ straight wire แตะเชื้อจาก โคโลนี streak เป็นเส้นตรงบน slant แล้ว stab ลงไปถึงก้นหลอด จากนั้น streak บน slant ให้เชื้อกระจายตัว	K/A หมายถึง มีการหมักย่อย glucose ไม่มีการหมักย่อย sucrose และ lactose K/Ag หมายถึง มีการหมักย่อย glucose และได้ก๊าซ ไม่มีการหมัก ย่อย sucrose และ lactose K/A ⁺ หมายถึง มีการหมักย่อย glucose และได้ H ₂ S ไม่มีการหมัก ย่อย sucrose และ lactose K/Ag ⁺ หมายถึง มีการหมักย่อย glucose และได้ ก๊าซและ H ₂ S ไม่มีการหมักย่อย sucrose และ lactose A/A หมายถึง มีการหมักย่อย glucose, lactose และ/หรือ sucrose A/Ag หมายถึง มีการหมักย่อย glucose, lactose และ/หรือ sucrose และได้ก๊าซ A/A ⁺ หมายถึง มีการหมักย่อย glucose, lactose และ/หรือ sucrose และได้ H ₂ S A/Ag ⁺ หมายถึง มีการหมักย่อย glucose, lactose และ/หรือ sucrose และได้ก๊าซและ H ₂ S K/K, K/N หมายถึง ไม่มีการหมักย่อย glucose, lactose และ sucrose
Indole test	แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MI medium (motility – indole test medium) เก็บบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยดน้ำยา Kovac ลงไป แล้วอ่านผล	+ หมายถึง เกิดสีแดงในชั้นของน้ำยา Kovac - หมายถึง ไม่เกิดสีแดง ของน้ำยา Kovac
Lysine decarboxylase test	แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LD medium (Lysine decarboxylase และ lysine deaminase test medium) เก็บในตู้เพาะบ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	+ หมายถึง สีของอาหารเลี้ยง เชื้อเป็นสีม่วง - หมายถึง สีของอาหารเลี้ยง เชื้อเป็นสีเหลือง
EMB agar	แตะเชื้อจาก colony แล้ว streak ง่ายๆ บนผิวของอาหาร เก็บในตู้เพาะบ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	+ หมายถึง โคโลนีเกิดสีเขียววาว (metallic sheen) - หมายถึง ไม่เกิด metallic sheen
Citrate test	แตะเชื้อจาก colony แล้ว streak เก็บในตู้เพาะบ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	+ หมายถึง อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน - หมายถึง ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ อาหารเลี้ยงเชื้อ

5. *Pseudomona aeruginosa*

การทดสอบทางชีวเคมี	วิธีทดสอบ	การแปลผล
Motility test	เหมือนการทดสอบเชื้อ <i>E. coli</i>	เหมือนการทดสอบเชื้อ <i>E. coli</i>
TSI	เหมือนการทดสอบเชื้อ <i>E. coli</i>	เหมือนการทดสอบเชื้อ <i>E. coli</i>
OF-Glucose	แตะเชื้อ stab ลงใน OF-glucose media จำนวน 2 หลอด ปิดผิวหน้าอาหารของหลอดหนึ่งด้วย liquid paraffin หลอดนั้นจะอยู่ในสภาพ anaerobic แบคทีเรียต้องใช้เข็มแทงด้วย ขบวนการหมัก (fermentation) เท่านั้น ส่วนอีกหลอดหนึ่งที่ไม่มี liquid paraffin ปิด จะอยู่ในสภาพ aerobic เก็บบ่มใน incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	Fermentation หมายถึงมีสีเหลือง ทั้งสองหลอด Oxidation หมายถึงมีสีเหลือง เฉพาะหลอดที่ไม่มี liquid Paraffin Non-oxidizer หรือ Nonsaccharolytic หรือ Non-reaction หมายถึง ทั้งสองหลอดยังคงมีสีแดง หรือเป็นสีน้ำเงิน
Nitrate reduction test	แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ motile-nitrate medium อย่าให้ถึงกัน หลอด เก็บบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	+ กรณีที่ 1 หมายถึง มีสีแดงเกิดขึ้น กรณีที่ 2 หมายถึง ไม่มีสีแดงเกิดขึ้น และเมื่อหยดผง - หมายถึง ไม่เกิด metallic sheen
OF-Maltose	แตะเชื้อ stab ลงใน OF-maltose media จำนวน 2 หลอด ปิดผิวหน้าอาหารของหลอดหนึ่งด้วย liquid paraffin หลอดนั้นจะอยู่ในสภาพ anaerobic แบคทีเรียต้องใช้เข็มแทงด้วย ขบวนการหมัก (fermentation) เท่านั้น ส่วนอีกหลอดหนึ่งที่ไม่มี liquid paraffin ปิด จะอยู่ในสภาพ aerobic เก็บบ่มใน incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	Fermentation หมายถึงมีสีเหลืองทั้งสองหลอด Oxidation หมายถึงมีสีเหลือง เฉพาะหลอดที่ไม่มี liquid Paraffin Non-oxidizer หรือ Nonsaccharolytic หรือ Non-reaction หมายถึง ทั้งสองหลอด ยังคงมีสีแดง หรือเป็นสีน้ำเงิน
Urease test	แตะเชื้อจาก colony แล้ว streak เก็บในตู้เพาะบ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล	+ หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพู – แดง - หมายถึง อาหารไม่เปลี่ยนแปลง
Gelatin liquefaction	แตะเชื้อจากโคโลนี stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้อาหารอีกหนึ่งหลอดที่ไม่ต้องใส่เชื้อเป็นหลอดควบคุม เก็บทั้งสองหลอดอยู่ในตู้เพาะบ่ม ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสประมาณ 10 นาที	+ หมายถึง อาหารในหลอดที่ใส่เชื้อเหลว - หมายถึง อาหารในหลอดที่ใส่เชื้อแข็งตัว เหมือนหลอดควบคุม

6.4 การหาความไวของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อก่อโรคโดยวิธี Disc diffusion method

เกลี่ยเชื้อจุลินทรีย์ ประมาณ 10^6 cfu /ml ที่เลี้ยงไว้ 1 คืน ลงในวุ้นเลี้ยงเชื้อปล่อยให้เชื้อดูดซับบนผิววุ้น ปิเปตน้ำมันหอมระเหยที่ละลายใน 95% Ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง 5-50% จำนวน 45 μ l ลงบน 9 มม disc แล้วนำไปวางบน plate ที่เตรียมไว้ ใช้ disc ที่มี ethanol อย่างเดียวเป็นกลุ่มควบคุม นำไปอบที่ 37 °C นาน 24 ชม. นำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

6.5 การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และค่า Minimum bactericidal concentration (MBC)

ละลายน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้น 2% ใน Muller Hilton Broth มี Tween 80 2% ช่วยละลายน้ำมัน หรือ DMSO 0.5% ทำการเจือจางแบบ two fold dilution ใน broth โดยเติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ จำนวน 50 µl ลงใน broth 50 µl ใน 96- well plate เติมนight culture จำนวน 50 µl ลงในแต่ละหลุม ให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^6 cfu/ml โดยมีหลุมที่มีเฉพาะเชื้อใน broth เป็น positive control และหลุมที่ไม่มีเชื้อเป็น negative control นำ plate ไป อบที่ 37°C นาน 24-48 ชม. อ่านค่า MIC ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขึ้น ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อนำหลุมที่ไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มาเพาะเชื้อบน Muller Hilton Agar ความเข้มข้นต่ำสุดของหลุมที่ใส และตรวจไม่พบว่ามี การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คือค่า MBC

6.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH test

นำน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 2% ใน ethanol มาเจือจางแบบ two fold dilution ใน ethanol ให้มีปริมาตร จำนวน 50 µl แล้วเติม 0.0004 M DPPH ethanolic solution จำนวน 50 µl ทุกหลุม ลงใน 96- well plate นำไปเก็บในที่มืดนาน 30 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm โดยเปรียบเทียบกับ Vitamin C, BHT และ Vitamin E acetate ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิด oxidation ของ DPPH แสดงเป็นค่าที่ตัวอย่างสามารถยับยั้งการเกิด oxidation ได้ 50% (IC_{50})

$$\% \text{ Inhibition} = [(A-B)/A] \times 100$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm ของ DPPH ใน Ethanol

B = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 nm ของตัวอย่างที่เติม DPPH

6.7 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย

การทดลองนี้ทดสอบฤทธิ์ลดบวมแดงหูหนูขาวที่ถูกกระคายด้วย 20 µl 16% v/v น้ำมันโครตอนใน acetone ที่เคยรายงานมาก่อนในห้องปฏิบัติการนี้ว่าใช้เวลาก่อบวมแดง 9 ชั่วโมง และอยู่นาน 24 ชั่วโมง การทดลองนี้มีจุดประสงค์แรกคือ ดูผลว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ลดบวมแดง หูหนูขาว เพราะ ตะไคร้แกง โหระพา ขมิ้นชัน ตะไคร้หอม ไพล พลู ก่อให้ระคายเคืองและช่วยลดการบวมได้หรือไม่ โดยการทาเพียงครั้งเดียว 20 µl ในรูปน้ำมัน 100%, 25%, 12.5% v/v ใน acetone

การทดลองแบ่งเป็น 3 ตอนด้วยกัน ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ในความเข้มข้น 100% v/v เทียบกับ 0.1 gm Kenalog (triamcinolone acetonide 0.1% in orabase), 0.1 gm Voltaren (diclofenac 1% emulgel) และ acetone (control) ทำจนครบ 6 ชุด หนูขาวชุดละ 11 ตัว จากนั้นจึงทำการศึกษาน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 25% v/v และเมื่อครบ 6 ชุด จะศึกษาที่ความเข้มข้น 12.5% v/v เปรียบเทียบความหนาหู (ear thickness, mm) ของทั้ง 11 กลุ่ม และผลต่อหูด้านตรงข้าม ที่เวลาต่างๆ ตั้งแต่บวมก่อนให้ยา คือ 9 ชั่วโมง เมื่อได้สัมผัสยาที่หูขวา 2 ชั่วโมงแล้ว วัดการบวมของหู ที่ 12, 15, 18, 21, 24 ชั่วโมงหลังได้น้ำมันโครตอนต่อไป เพื่อนำไปสร้างกราฟการบวมหูและเพื่อคำนวณหาพื้นที่ภายใต้กราฟ จากนั้นแปรข้อมูลทั้งสามการศึกษาให้เป็น % control edema โดยเทียบกับการบวมของกลุ่ม control ที่เวลาต่างๆ เพื่อนำไปสร้างกราฟและคำนวณหาพื้นที่ภายใต้กราฟ (AUC %control edema) และนำมาสร้างกราฟของสารใน 3 ความเข้มข้นและพื้นที่ภายใต้กราฟ (dose response curve)

น้ำมันหอมระเหยบางชนิดที่ 100% เสริมการแดงของหูเห็นได้ชัดในขณะทดลอง แม้การบวมที่เพิ่มจะไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้กระทั่งผลของ triamcinolone ซึ่งในการทดลองให้ก่อนการบวมเห็นผลลดได้ 30-50% แต่การลดบวมที่เกิดขึ้นแล้วและการทาเพียงครั้งเดียว เห็นผลไม่ชัดเจน ขณะทดลองเห็นหูแดงเหมือนหนูกลุ่มควบคุม ไม่เหมือนที่เคยรายงานว่าการให้ก่อนการสัมผัสน้ำมันโครตอน จะเห็นหูคั่งสีชมพูขาวซีดเหมือนปกติ ส่วน Voltaren แม้จะบวมน้อยกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่เห็นชัด ใน dose response curve น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต่ำกว่า Voltaren เข้าใกล้ Kenolog จะเป็นสัญญาณบ่งความเป็นไปได้ในการลดบวม ลดอักเสบ เพื่อศึกษาต่อให้เห็นชัดถึงการทา regimen ในการให้ซ้ำที่จะลดบวมได้

การทดลอง

ฤทธิ์ลดบวมของน้ำมันหอมระเหย

หนูขาวเพศผู้กลุ่มละ 6 ตัว น้ำหนัก 250-300 gm จากหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นและจากสำนักงานสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถูกนำมาเลี้ยงในห้องทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ (23 °C, 30% humidity, 12 D/L cycle) การเหนี่ยวนำให้หูบวมเริ่มเวลา 21.00 น. ด้วย น้ำมันโครตอน 16% ใน acetone ด้านในหูตรงขอบบนของหู ข้างละ 20 μ l กักหนูอยู่ในเครื่องตรึง 2 ชั่วโมง เพื่อมิให้มีการเกาหู จากนั้นปล่อยเข้ากรงเดี่ยวให้ได้รับอาหารและเคลื่อนไหวนิสระโดยไม่ได้น้ำ จนถึง 6 โมงเช้า จากนั้นวัดความหนาหู (9 ชั่วโมงหลังได้รับ น้ำมันโครตอน) ก่อนนำหนูเข้าเครื่องตรึงอีกครั้ง ทาน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด หนึ่งในชนิดต่อหนูขาวหนึ่งตัว มะกรูด กะเพรา ตะไคร้แกง โหระพา ขมิ้นชัน ตะไคร้หอม ไพล พลุ ที่หูข้างขวาด้านนอก 20 μ l ของ 3 ความเข้มข้น 100% ก่อนในชุดแรกจนครบ 6 ชุด ชุดละ 11 หนูทดลอง และยา 11 ชนิด น้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด acetone (control), 0.1 gm diclofenac 1% (Voltaren emulgel, Novartis) และ 0.1 gm triamcinolone acetonide 0.1% in orabase (Kenalog, Bristol-Myers squibb) จากนั้นจึงศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 25% v/v ใน acetone ต่อจนครบ 6 ชุด และ ศึกษาที่ความเข้มข้น 12.5% ใน acetone อีก 6 ชุด แต่ละชุดทดสอบยา 11 ชนิด ข้อมูลการบวมของหูเทียบกับของกลุ่ม control ในแต่ละเวลา $\times 100$ เป็น % control edema = ขนาดหูข้างขวาของกลุ่มทดลอง $\times 100$ / ขนาดหูข้างขวาของกลุ่ม control ที่ทดสอบในชุดเดียวกัน (A treated ear) เปรียบเทียบหูข้างขวาของแต่ละกลุ่มยา (B untreated ear) เปรียบเทียบหูข้างซ้ายของแต่ละกลุ่มยา เพื่อศึกษาอิทธิพลของยาที่ทาบนหูข้างขวา แสดงค่าเฉลี่ย + SE ของหนูกลุ่มละ 6 ตัว พื้นที่ภายใต้กราฟซึ่งมีหน่วย % control edema.hr

วิธีปฏิบัติที่ต้องระวัง

การทดลองแต่ละชุดประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด ยาลดอักเสบมาตรฐาน 2 ชนิดและหนูกลุ่มควบคุม (control) ได้ acetone การทา น้ำมันโครตอน เตรียมแล้วใช้ทันที ทาเฉพาะบริเวณขอบด้านบนซ้าย และเป่าแห้ง มิให้มีการสลัด ยาที่ทาจะให้สัมผัส 2 ชั่วโมงที่หู ที่เป็นน้ำมันหอมระเหยไม่เช็ดออก แต่ที่เป็นครีมทาจะเช็ดออกด้วยกระดาษแห้ง การวัดหูบวม วัดด้วย grain guage, Kett Ltd, Japan ที่ขอบใบหู ส่วนบน สามจุดและวัดซ้ำรวมเป็น 6 ค่า และหาค่าเฉลี่ย (วัด 3 ตำแหน่งทำสองซ้ำ เพื่อให้แน่ใจ)

ระยะที่ 2 การพัฒนาสูตรยาจุ่มหัวนมแม่วัว

6.8 พัฒนารูปแบบยาจุ่มหัวนมจากน้ำมันหอมระเหย

6.8.1 การหาระบบ *microemulsion* ในการนำส่งน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แกง

- เตรียมสารละลายที่มีส่วนผสมของ Tween 80 และ Span 80 ให้มีน้ำหนักรวม 1 gm ให้มีค่า HLB ระหว่าง 5-14 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของ Tween 80 (HLB 15.0) และ Span 80 (HLB 4.3) (1 gm) ที่มีค่า HLB ระหว่าง 5-14

HLB	Span 80 (gm)	Tween 80 (gm)
5	0.93	0.07
7	0.75	0.25
8	0.65	0.35
9	0.56	0.44
10	0.47	0.53
11	0.37	0.63
12	0.28	0.72
14	0.09	0.91

- เติม น้ำมันตะไคร้แกงในสัดส่วน 2.5 gm : surfactant 1 gm ตามตารางที่ 1 ผสมให้เข้ากัน
- ไทเทรตด้วย 10%w/v propylene glycol จนได้สารละลายขุ่น บันทึกปริมาณ 10% w/v propylene glycol ที่ใช้ หาความสัมพันธ์ระหว่างค่า HLB system กับ solubilization (water to oil volume ratio)

6.8.2 ผลของส่วนประกอบในตำรับต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แกง

ศึกษาผลของ ชนิด surfactants เกลือ และ กรดต่อประสิทธิภาพของตำรับ และความคงตัวทางกายภาพ โดยแต่ละตำรับมีส่วนประกอบดังตารางที่ 2

ก) ผลของชนิด surfactant

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบในตำรับ 2.1-2.4

	2.1	2.2	2.3	2.4
Lemongrass oil	20	20	20	20
BHT	0.2	0.2	0.2	0.2
Mineral oil	5	5	5	5
Stearyl alcohol	1	1	1	1
Cetyl alcohol	1	1	1	1
Span 80	2	-	-	-
Cetomacrogol 1000	-	5	3	-
Sodium lauryl sulfate	-	-	2	5
Tween 80	3	-	-	-
Propylene glycol	20	20	20	20
Sodium benzoate	0.2	0.2	0.2	0.2
EDTA	0.1	0.1	0.1	0.1
DI water to	100	100	100	100

ข) ผลของ pH ต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แกง

- เตรียมสารละลายตำรับ 3.7 โดยปรับ pH ด้วย citric citrate buffer ให้มี pH 3, 5, 7, 8 โดยมี ส่วนประกอบดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบในตำรับที่ 3.1-3.4 เพื่อศึกษาผลของ pH

	3.1	3.2	3.3	3.4
Lemongrass oil	20	20	20	20
BHT	0.2	0.2	0.2	0.2
Mineral oil	20	20	20	20
Cetomacrogol 1000	15	15	15	15
Sodium lauryl sulfate (SLS)	10	10	10	10
Sodium benzoate	0.2	0.2	0.2	0.2
EDTA	0.1	0.1	0.1	0.1
Sodium chloride	4	4	4	4
Citric acid	1.67	1.0	0.37	0.058
K ₂ HPO ₄	1.47	3.7	5.9	6.97
DI water to	100	100	100	100
Final pH	4.16	6.48	7.04	7.53

วิธีเตรียม

- ผสมสารที่ละลายในวัตภาคน้ำมัน ได้แก่ light mineral oil, BHT, Cetromacrogol 1000 แล้วนำไป หลอมบนอ่างอังไอน้ำจนมีอุณหภูมิ 70°C
 - ผสมสารที่ละลายในวัตภาคน้ำ ได้แก่ SLS, sodium benzoate, EDTA Sodium chloride, citric acid, K₂HPO₄ และ น้ำ แล้วนำไปหลอมบนอ่างอังไอน้ำจนมีอุณหภูมิ 75°C
 - เทวัตภาคน้ำลงในน้ำมันจนอย่างต่อเนืองรอจนส่วนผสมมีอุณหภูมิ 45 °C จึงเติม lemongrass oil ลงไปจนจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- นำตำรับที่เตรียมไปทดสอบประสิทธิภาพโดยวิธี Agar diffusion method เปรียบเทียบ inhibition zone ที่เกิดขึ้น
 - ตั้งตำรับที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชม. สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

ค) ผลของเกลือและกรดต่อประสิทธิภาพของตำรับ

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบในตำรับที่ 4.1-4.7 เพื่อศึกษาผลของส่วนประกอบต่อประสิทธิภาพของตำรับ

	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7
Lemongrass oil	20	20	20	20	20	20	20
BHT	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Mineral oil	5	5	5	5	5	-	20
Stearyl alcohol	1	1	1	1	1	-	-
Cetyl alcohol	1	1	1	1	1	-	-
Span 80	-	-	4	4	-	-	-
Cetomacrogol 1000	5	5	-	-	15	15	15
Sodium lauryl sulfate (SLS)	5	5	5	5	5	10	10
Tween 80	-	-	6	6	-	-	-
Propylene glycol	20	20	20	20	-	-	-
Sodium benzoate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	-	0.2
EDTA	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-	0.1
Sodium chloride	2	-	2	-	4	4	4
Citric acid	0.5	0.5	0.5	0.5	2	2	2
DI water to	100	100	100	100	100	100	100

1. วิธีเตรียม

- ผสมสารที่ละลายในวัตกาศน้ำมัน ได้แก่ light mineral oil, BHT, stearyl alcohol, cetyl alcohol, Span 80 Cetromacrogol 1000 แล้วนำไปหลอมบนอ่างอังไอน้ำจนมีอุณหภูมิ 70°C
 - ผสมสารที่ละลายในวัตกาศน้ำ ได้แก่ SLS, Tween 80, propylene glycol, sodium benzoate, EDTA Sodium chloride, citric acid และ น้ำ แล้วนำไปหลอมบนอ่างอังไอน้ำจนมีอุณหภูมิ 75°C
 - เทวัตกาศน้ำลงในน้ำมันจนอย่างต่อเนืองรจนส่วนผสมมีอุณหภูมิ 45 °C จึงเติม lemongrass oil ลง ไปจนจนเป็นเนื้อเดียวกัน
- นำตำรับที่เตรียมไปทดสอบประสิทธิภาพโดยวิธี Agar diffusion method เปรียบเทียบ inhibition zone เกิดขึ้น
 - ตั้งตำรับที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชม. สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

6.9 ประสิทธิภาพของตำรับต่อการฆ่าเชื้อก่อโรคเด้านมอักษ (D value)

- นำตำรับ 3.7 มาเจือจางด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกงระหว่าง 0.3, 0.5, 1, 2, 3 % v/v
- นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้นาน 24 ชม 100 µl เติมลงในสารละลายที่เจือจาง 900 µl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามต้องการ ผสมด้วย Vortex
- ปิเปตส่วนผสมในข้อ 2 มา 100 µl ลงใน normal saline 10 ml ที่เวลา 20, 30 60 และ 120 วินาที ตามลำดับ
- เขย่าเชื้อที่สุ่มขึ้นมาที่เวลาต่างๆ เพื่อล้างเอาตัวยาลอก แล้วนำไป Centrifuge ที่ 4500 rpm นาน 5 นาที นำ pellet ที่ได้มา resuspended ใน normal saline 1 ml นำไปนับจำนวนเชื้อที่เหลือโดยวิธี pour plate

5. หาคความสัมพันธ์ระหว่าง log survivors ต่อ เวลาที่ความเข้มข้นต่างๆ
6. คำนวณหา D value หาระยะเวลาที่ทำให้เชื้อลดลง 90 % จากกราฟ

6.10 ความคงตัวของจุลชีววิทยาและทางกายภาพของน้ำยาล้างมือจากน้ำมันตะไคร้

ประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์ทางกายภาพและทางจุลชีววิทยาเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่ 40 °C และ เก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (6 °C) ทุกเดือนนาน 6 เดือน ดังนี้

1. เตรียมตัวอย่าง 300 มล. แล้วแบ่งใส่ขวดพลาสติก จำนวน 3 ขวด ขวดแก้วสีชาจำนวน 3 ขวด นำตัวอย่างที่บรรจุในขวดพลาสติกขาวและขวดแก้วสีชาไปเก็บไว้ที่ตู้เย็น อุณหภูมิห้อง และที่ 40 °C 75%RH
2. ณ วันที่ 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 ทำการประเมินลักษณะทางกายภาพ pH ของสารละลาย 10%
3. ประเมินประสิทธิภาพทางจุลชีววิทยาโดยวิธี agar diffusion method เทียบกับ 0.5%w/v Chlorhexidine digluconate (CHX) โดย พล็อตกราฟระหว่าง inhibition zone (mm) กับความเข้มข้นของตัวอย่างหาคความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง แล้วนำมาเปรียบเทียบกับ inhibition zone ของ 0.5%w/v CHX ว่า inhibition zone ของตัวอย่างที่ความเข้มข้นเท่าใดเทียบเท่ากับ inhibition zone ของ 0.5%w/v CHX

7. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

7.1 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยโดย GC/MS

จากตารางที่ 1-8 พบว่าน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิดโดยน้ำมันแต่ละชนิดมีองค์ประกอบหลักดังนี้ น้ำมันกระเพรา ได้แก่ methyleugenol (37.69%), น้ำมันโหระพา ได้แก่ Methyl chavicol (78.22%) น้ำมันมะกรูด ได้แก่ dl-Limonene (24.8%) น้ำมันพลู ได้แก่ eugenol (28.04%) และ eugenol acetate (23.68%) น้ำมันขมิ้นชัน ได้แก่ tumerone (11.57%) น้ำมันไพล ได้แก่ α -Phellandrene (34.24%) และ l-4-Terpineol (26.17%), น้ำมันตะไคร้แดง ได้แก่ α -citral (40.56%) และ β -citral (33.71%) น้ำมันตะไคร้หอม ได้แก่ citronella (30.96%) ลักษณะของ GC/MS chromatograms ของน้ำมันแต่ละชนิดแสดงในรูปที่ 1-8 ผลการตรวจสอบองค์ประกอบพบว่าน้ำมันแต่ละชนิดมีปริมาณของสารสำคัญที่ต่างจากที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ เช่น ไพล มีองค์ประกอบหลักคือ sabinene 27.03% และ terpinen-4-oil 41.74 % (www.essentialoils.org) Inouye et al. (2001) รายงานว่าองค์ประกอบหลักของน้ำมันตะไคร้แดงคือ neral 33.2% และ geranial 37.8% Nakahara et al. (2003) พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอม ที่เก็บบริเวณกรุงเทพมหานคร มีองค์ประกอบหลักคือ geraniol 35.7%, cis-citral 14.2% , geranyl acetate 9.7%, citronellal 5.8% และ citronellol 4.6% Raina et al. (2002) ตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำมันขมิ้นชันที่ผลิตได้ในอิตาลีพบ 1, 8-cineole 11.2%, α -tumerone 11.1%, b-caryophyllene 9.8%, tumerone 7.3% และ b-sesquihellandrene 7.1%. Viyoch et al. (2006) ทำการตรวจสอบองค์ประกอบของน้ำมันกระเพราพบสารประกอบหลักซึ่งแตกต่างจากการศึกษาได้แก่ eugenol 41.5%, caryophyllene 23.7 % และ methyl eugenol 11.8% ส่วนน้ำมันโหระพา ได้แก่ methyl chavicol 93% อย่างไรก็ตามปริมาณที่ตรวจพบจะแตกต่างจากที่เคยมีรายงานมาก่อน (Sheen et al., 1991) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความแตกต่างกันในแหล่งที่ปลูก สภาพดิน ฟ้า อากาศ ซึ่งส่งผลให้ปริมาณสารประกอบแต่ละชนิดแตกต่างกันไป

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมมะยกระเพรา (Holy basil)

Component	RT	LRI	%Area
Borneol	8.31	1173	0.92
Eugenol	12.41	1365	15.87
à-Cubebene	12.82	1384	0.85
à-(E)-bisabolene	13.14	1300	6.67
Methyl eugenol	13.39	1410	37.69
Caryophyllene	13.79	1426	26.11
à-Humulene	14.47	1454	1.54
Germacrene D	15.02	1477	2.28
á-Elemene	15.52	1498	0.89
Others			7.18

ตารางที่ 6 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมมะยโหระพา (Sweet basil)

Name	RT	LRI	%Area
1,8-Cineole	5.56	1036	1.69
(+)-trans-1-(1-Methylethenyl)-2-(2-methyl-1 - propenyl)-cyclopropane	5.78	1047	2.87
Camphor	7.89	1153	0.98
Methyl chavicol	9.01	1206	78.22
á-Elemene	13.12	1399	1.3
Benzene, 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)-	13.33	1407	1.43
trans-Caryophyllene	13.76	1425	1.5
Trans-à-bergamotene	14.01	1435	2.97
à-Cubebene	15.02	1477	1.12
à-Cadinol	18.1	1652	1.24
Others			6.68

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมมะยมะกรูด (Kaffir lime)

Component	RT	LRI	%Area
Sabinene	3.93		3.04
Sabinene	4.62		15.21
α-Myrcene	4.75		1.49
l-Phellandrene	5.05	1009	0.92
α-Terpinene	5.26	1020	5.58
dl-Limonene	5.5	1033	24.8
terpinoline	6.05	1062	6.25
Linalool oxide (2)	6.32	1076	1.62
terpinoline	6.64	1093	5.15
Isopulegol	7.86	1151	2.52
Geranyl 2-methyl butyrate	8.09	1162	1.77
l-4-Terpineol	8.55	1184	9.5
Linalyl propionate	8.82	1197	10.75
3-(4-Methoxyphenyl)pent-4-en-2-ol	8.96	1203	0.86
α-cadinene	15.81	1515	1.63
Others			8.91

ตารางที่ 8 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมมะยมะพลู (Betel vine)

Component	RT	LRI	%Area
1,8-Cineole	5.57	1036	0.9
Chavicol	10.08	1256	1.73
Chavicol acetate	12.11	1351	5.44
Eugenol	12.71	1379	28.04
Caryophyllene	13.77	1426	3.27
α-Humulene	14.46	1454	0.81
α-Amorphene	14.89	1472	3.5
α-Cubebene	15.02	1477	3.6
Dihydrocarvyl acetate	15.33	1490	2.8
Eugenol acetate (Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-, acetate)(CAS)	15.9	1521	23.68
4-Allyl-1,2-diacetoxybenzene	18.14	1655	17.83
Others			8.4

ตารางที่ 9 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยมินตัน (Tumeric)

Component	RT	LRI	%Area
l-Phellandrene	5.03	1008	4.43
l-Phellandrene	5.39	1027	0.79
1,8-Cineole	5.54	1035	2.98
terpinoline	6.63	1092	6.25
trans-Caryophyllene	13.77	1426	1.93
(-)-ar-curcumene	14.96	1474	3.06
Zingiberene	15.22	1485	6.98
α-Bisabolene	15.48	1496	1.17
α-Sesquiphellandrene (CAS)	15.8	1514	6.91
Benzene, 1,1'-(1,1,2,2-tetramethyl-1,2-ethanediyl)bis- (CAS)	17.37	1613	1.79
α-Turmerone	19.21	1713	11.59
Others			52.12

ตารางที่ 10 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยไพล (Plai)

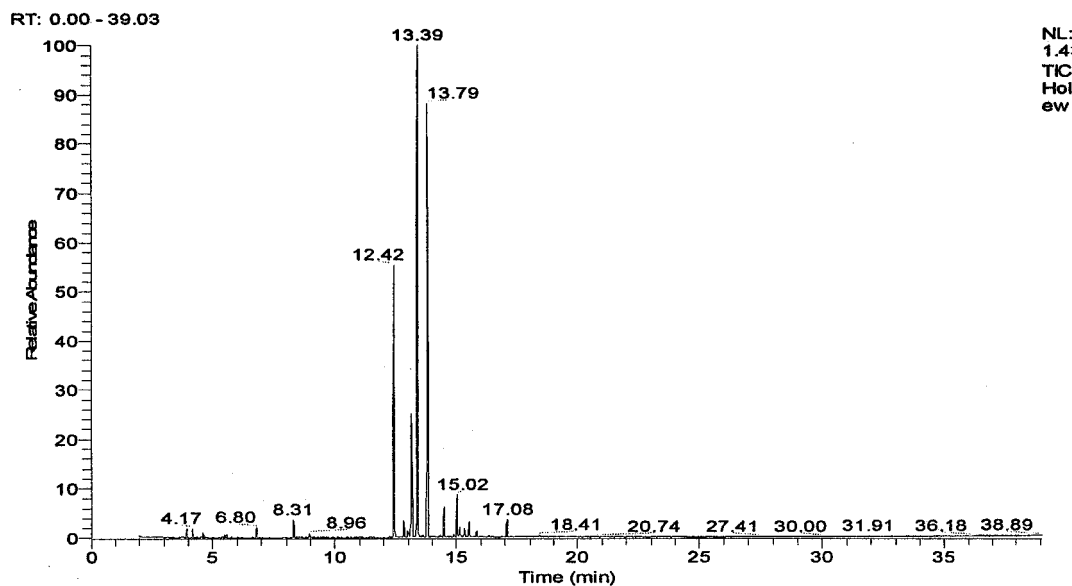
Component	RT	LRI	%Area
Cyclofenchene	3.93		1.6
α-Phellandrene	4.54		34.24
2,4-Dinitrophenyl crotonate	4.75		1.57
terpinoline	5.26	1020	3.86
p-Methylcumyl Alcohol	5.41	1028	2.59
terpinoline	6.05	1062	7.68
terpinoline	6.64	1093	1.51
l-4-Terpineol	8.56	1184	26.17
α-Sesquiphellandrene (CAS)	15.78	1513	2.45
2-Allyl-1,4-dimethoxy-6-methylbenzene	17.12	1599	1.18
(E and Z)-1-(3,4-Dimethoxyphenyl)butadiene	17.85	1639	9.67
4-Methoxy-2-methyl-1-((2-methylphenyl)thio)buta-1,3-diene	21.19	1826	0.87
Others			6.61

ตารางที่ 11 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยตะไคร้แกง (Lemongrass)

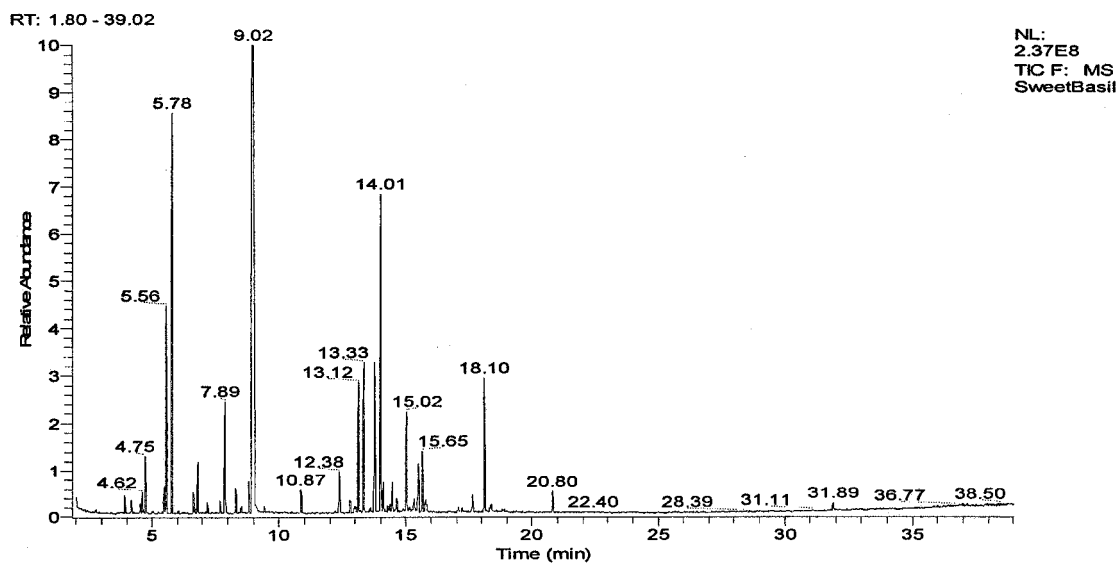
Component	RT	LRI	%Area
α-Myrcene	4.76		10.27
6-Hydroxy-6-isopropyltricyclo[3.3.0.0(3,7)]octan-2-one	8.56	1184	1.58
β-citral	9.90		33.71
Lavandulyl acetate	10.12	1257	4.64
α-citral	10.54	1277	40.56
Geranyl acetate	12.85	1386	2.16
b-caryophyllene	13.76		0.18
Others			6.9

ตารางที่ 12 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยตะไคร้หอม (Citronella)

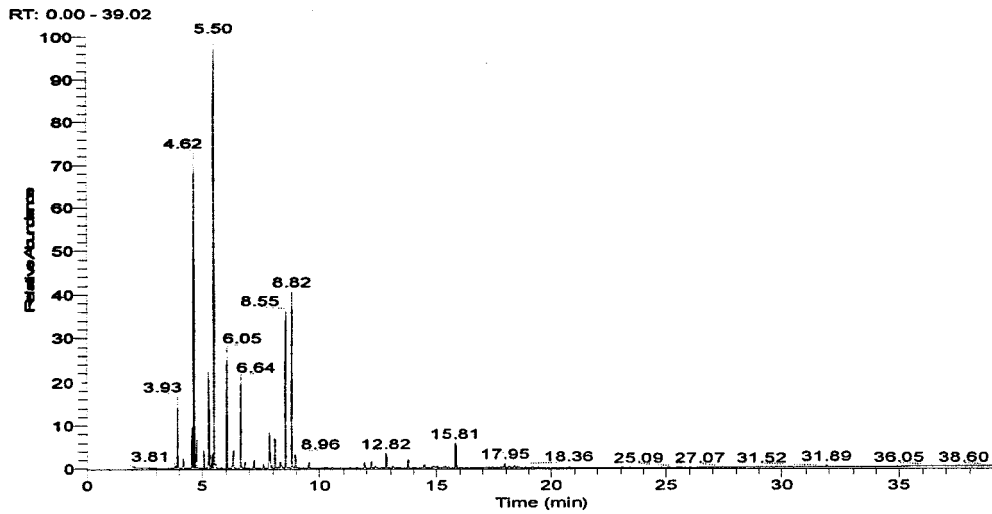
Component	RT	LRI	%Area
Citronella	7.97	1156	30.96
α-Citronellol	9.54	1230	12.15
Geraniol	10.14	1258	19.54
Citronellyl propionate	12.19	1316	4.03
Eugenol	12.39	1364	1.24
Geranyl acetate	12.85	1386	4.3
α-Elemene	13.13	1399	2.91
α-Murolene	15.36	1495	0.96
α-Amorphene	15.65	1505	0.74
α-cadinene	15.82	1515	3.21
hedycaryol	16.32	1548	3.72
t-Cadinol	18.12	1606	0.81
γ-Gurjunene	18.37	1667	1.44
Other			13.99



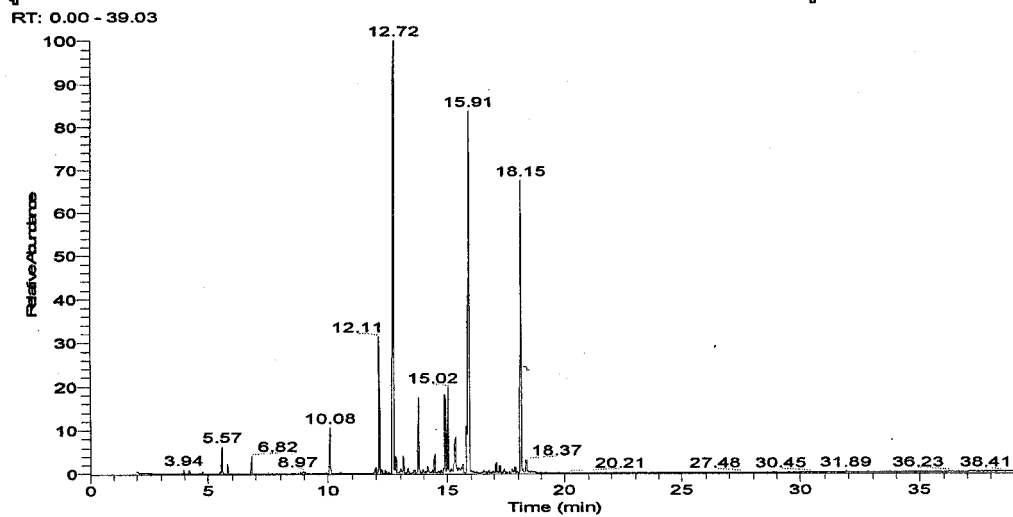
รูปที่ 1 GC/MS Chromatogram องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยกระเพรา



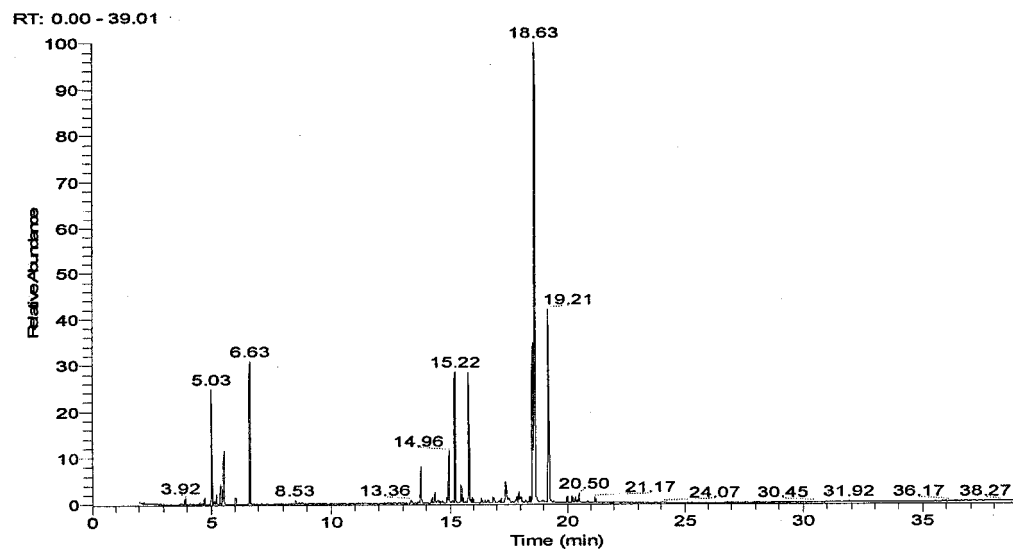
รูปที่ 2 GC/MS Chromatogram องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยโหระพา



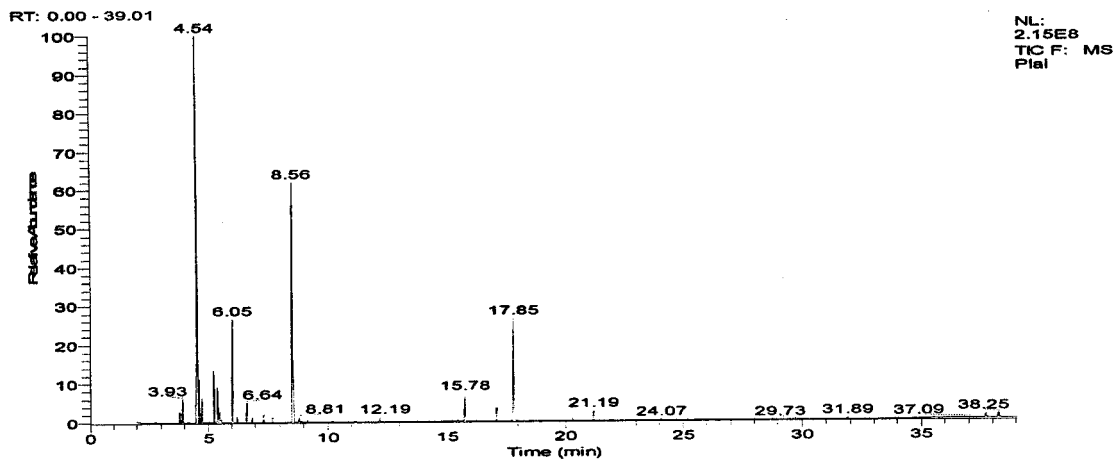
รูปที่ 3 GC/MS Chromatogram องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยมะกรูด



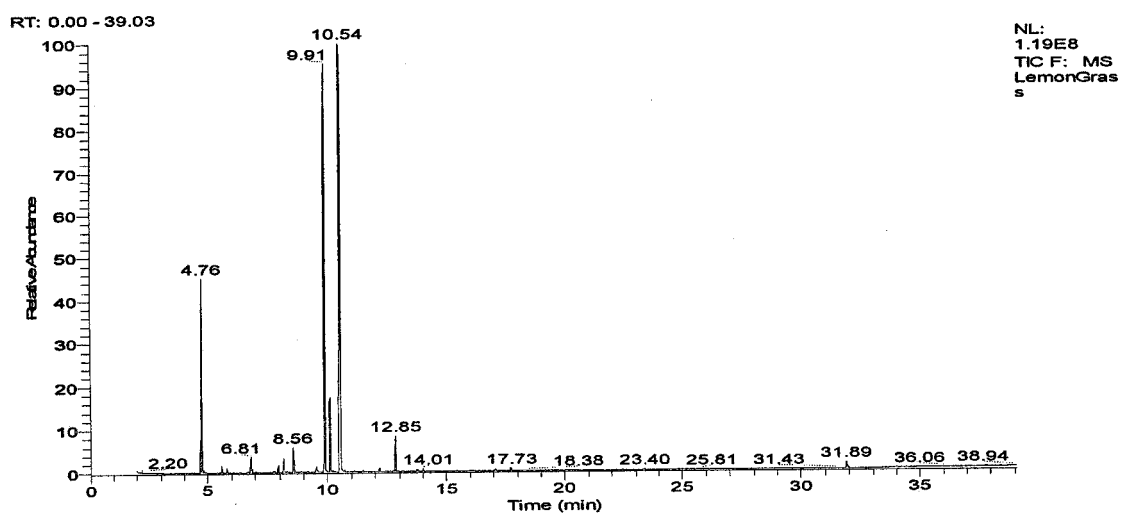
รูปที่ 4 GC/MS Chromatogram องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยใบพลู



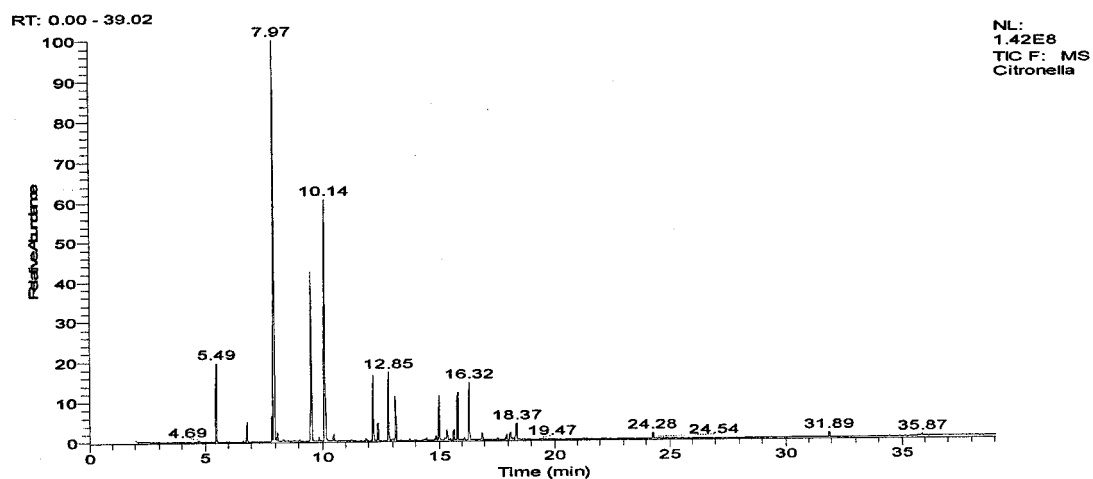
รูปที่ 5 GC/MS Chromatogram องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยขมิ้นชัน



รูปที่ 6 GC/MS Chromatogram องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยไพล



รูปที่ 7 GC/MS Chromatogram องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยตะไคร้แกง



รูปที่ 8 GC/MS Chromatogram องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยตะไคร้หอม

7.2 การแยกเชื้อก่อโรคเต้านมวัวอักเสบและการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อหาชนิดของเชื้อที่แยกได้

จากผลทดสอบทางชีวเคมีเพื่อแยกเชื้อจากนมโคที่รีดใหม่ๆ พบเชื้อก่อโรคเต้านมวัวอักเสบ 5 ชนิด ได้แก่ *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* เชื้อที่พบในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ รุ่งเจริญและคณะ (2529) ที่ทำการเพาะเชื้อหาสาเหตุของเชื้อที่ทำให้ก่อโรคเต้านมวัวอักเสบจากตัวอย่างนมทั้งหมด 19 ตัวอย่างพบว่า เชื้อที่ตรวจพบจากมากไปน้อยเป็นดังนี้ *Streptococcus* spp. , *E. coli* , *S. aureus* , *B. cereus*, *Ps. aeruginosa*, *Corynebacterium pyrogene* และที่เหลือเป็นเชื้อผสม ลักษณะของเชื้อแต่ละชนิดเป็นดังนี้ *Strep. agalactiae* จัดอยู่ใน Group B streptococci มีลักษณะเป็น แกรมบวก cocci ต่อกันเป็นสายโซ่ สามารถเกิด Beta-hemolytic บน Blood agar *S. aureus* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก เชลยอยู่กันเป็นกลุ่ม มีขนาดเซลล์ประมาณ 1 μ m สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic bacteria) และไม่มีอากาศ (anaerobic bacteria) ให้โคโลนีสีขาวหรือทองบน blood agar catalase positive, coagulase positive *B. cereus* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก ขนาดใหญ่ แบบแท่ง เคลื่อนที่ได้ และไม่มีแคปซูลหุ้ม เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศ สามารถเกิด hemolytic บน Blood agar ไม่สามารถใช้แมนิทอล *E. coli* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ แท่ง อาจมีหรือไม่มีแคปซูล สามารถเจริญทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (Facultative anaerobe bacteria) สามารถหมักแลคโตสได้ และ *Ps. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ แท่ง เคลื่อนที่ได้โดย polar flagella เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศ สามารถผลิตเม็ดสีฟ้า เขียวของ pyocyanin และ เม็ดสีเหลืองเขียวของ pyoverdin (Mims et al, 2004)

1. ผลการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดแบคทีเรีย	การเจริญของเชื้อ	
	Blood agar	MacConkey agar
<i>Streptococcus</i> spp.	√	×
<i>Staphylococcus</i> spp.	√	×
<i>Escherichia</i> spp.	√	√
<i>Bacillus</i> spp.	√	×
<i>Pseudomonas</i> spp.	√	√

√ หมายถึง เชื้อเจริญ × หมายถึง เชื้อไม่เจริญ

2. ผลการย้อมสีแกรม

ชนิดแบคทีเรีย	การย้อมติดสี	ลักษณะรูปร่างเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์	แกรม
<i>Streptococcus</i> spp.	ม่วง	กลม	บวก
<i>Staphylococcus</i> spp.	ม่วง	กลม	บวก
<i>Escherichia</i> spp.	แดง	แท่ง	ลบ
<i>Bacillus</i> spp.	ม่วง	แท่ง	บวก
<i>Pseudomonas</i> spp.	แดง	แท่ง	ลบ

3. ผลการทดสอบ Catalase

ชนิดแบคทีเรีย	ผลการทดสอบ Catalase
<i>Streptococcus</i> spp.	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	+

4. ผลการทดสอบ Oxidase

ชนิดแบคทีเรีย	ผลการทดสอบ Catalase
<i>Escherichia</i> spp.	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	+

5. การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อหาชนิดของเชื้อที่แยกได้

การทดสอบทางชีวเคมี	ชนิดแบคทีเรีย				
	<i>Strep. agalactiae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
Hemolysis	β -hemolysis	β -hemolysis	α -hemolysis	X	X
Catalase test	-	+	X	X	X
Oxidase test	X	X	X	-	+
PR -Mannitol	-	+	X	X	X
CAMP test	+	X	X	X	X
Coagulase test	X	+	X	X	X
1% Maltose ใน purple agar base	X	+	X	X	X
Motility test	X	X	+	+ หรือ -	-
Esculin hydrolysis	-	X	-	X	X
TSI	X	X	X	A/A หรือ K/AG A/AG K/A	K/N
Indole test	X	X	X	+	X
Lysine decarboxylase test	X	X	X	+, -	X
EMB agar	X	X	X	+	X
Citrate test	X	X	X	-	X
OF-Glucose	X	X	X	X	Oxidation
Nitrate reduction test	X	X	X	X	+, -
OF-Maltose	X	X	X	X	Nonreactive
Urease test	X	X	X	X	+, -
Gelatin liquefaction	X	X	X	X	+, -
Nitrate reduction test	X	X	X	X	+

X หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

7.3 การหาความไวของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อก่อโรคโดยวิธี Disc diffusion method

ตารางที่ 13 ความไวของน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10% V/V ต่อเชื้อก่อโรคโดยวิธี Disc diffusion method

น้ำมันหอมระเหย	Inhibition zone (mm.)				
	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Strep. agalactiae</i>	<i>B. cereus</i>
กระเพรา	-	10	11	15	14
โหระพา	-	10	9	13	10
ตะไคร้หอม	-	10	10 (5%)	24 (5%)	12 (3%)
ตะไคร้แกง	-	10	18 (5%)	36 (5%)	34 (3%)
พลู	-	12	10	12	15
ไพล	-	9	9	10	11
ขมิ้นชัน	-	-	-	-	9
มะกรูด	-	11	9	11	15

-; No inhibition zone

Disc diameter 8 mm.

จากตารางที่ 13 น้ำมันตะไคร้แกง และน้ำมันตะไคร้หอมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *Strep. agalactiae*, *B. cereus*, *E. coli* ได้ดีกว่า น้ำมันกระเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันพลู น้ำมันขมิ้นชัน และน้ำมันมะกรูด และน้ำมันทุกชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Ps. aeruginosa* เมื่อเปรียบเทียบระหว่างน้ำมันตะไคร้หอมและน้ำมันตะไคร้แกงพบว่าน้ำมันตะไคร้แกงสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้มากกว่าน้ำมันตะไคร้หอม โดยสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ *Strep. agalactiae*, *S. aureus* และ *E. coli* ตามลำดับ

7.3 การหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) และการหาค่า Minimum bactericidal concentration (MBC)

ตารางที่ 14 ค่า MIC (μ l/ml) และ MBC (μ l/ml) ของน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิดต่อเชื้อก่อโรคโดยวิธี Broth microdilution method

microdilution method																
เชื้อ	ค่า MIC และ MBC (μl/ml)															
	Tumeric		Citronella		Lemongrass		Kaffirlime		Plai		Sweet basil		Holy basil		Bette vine	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Sa.	-	2.5	1.25	1.25	0.625	1.25	-	2.5	-	2.5	-	2.5	-	2.5	0.625	0.625
Sg	1.25	1.25	0.625	0.625	0.625	0.625	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5	1.25	1.25	0.312	0.625
Bc	-	2.5	0.312	0.312	0.156	0.156	0.625	0.625	-	2.5	-	2.5	-	2.5	0.625	0.625
Ec*	-	-	-	2.5	1.25	1.25	-	2.5	-	2.5	-	2.5	-	2.5	1.25	1.25
Ps*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ละลายน้ำมันหอมระเหยใน DMSO ;

MIC ของ DMSO เท่ากับ 2.5 μ l/ml

MBC ของ DMSO เท่ากับ 5.0 μ l/ml



ตารางที่ 15 ผลของสารประกอบหลักในน้ำมันตะไคร้แกงต่อเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบ

Compound	Inhibition zone (mm) of 11.25 µl of lemongrass oil				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
Citral	30	64.3	60.3	25	NA
Geraniol	13	15	15	20.7	NA
Linalool	12	11	26.7	17.7	NA
Myrcene	NA	NA	NA	11	NA
nerol	10.3	17	17	15	NA

NA: not active

ตารางที่ 16 สรุปค่า MIC และ MBC ของ lemon grass และ key components ต่อ Mastitis pathogens

เชื้อ	ค่า MIC และ MBC (µl/ml)													
	Lemongrass		citral		citronella		linalool		geraniol		Geranyl acetate		nerol	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Sa.	0.625	1.25	0.625	0.625	1.25	1.25	1.25	1.25	0.625	0.625	-	2.5	0.625	0.625
Sg	0.625	0.625	0.312	0.312	0.625	0.625	0.625	0.625	0.312	0.312	0.625	0.625	0.312	0.312
Bc	0.156	0.156	0.156	0.156	0.312	0.312	1.25	1.25	0.312	0.312	1.25	1.25	0.312	0.312
Ec*	1.25	1.25	1.25	1.25	-	2.5	1.25	1.25	0.625	0.625	-	2.5	1.25	1.25
Ps*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: ละลายน้ำมันหอมระเหยใน DMSO ;

MIC ของ DMSO เท่ากับ 2.5 µl/ml

MBC ของ DMSO เท่ากับ 5.0 µl/ml

จากตาราง 14 แสดงให้เห็นว่าต่อเชื้อ *S. aureus* น้ำมันพลูสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ดีที่สุดคือที่ความเข้มข้น 0.625 µl/ml ซึ่งให้น้ำมันพลูออกฤทธิ์โดยการฆ่าเชื้อ *S. aureus* รองลงมาคือน้ำมันตะไคร้แกง สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อที่ความเข้มข้น 0.625 และ 1.25 µl/ml ตามลำดับ แสดงว่าการออกฤทธิ์ของน้ำมันตะไคร้แกงเป็นแบบยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. aureus* โดยขึ้นกับขนาดของน้ำมันที่ใช้ ส่วนเชื้อ *Strep. agalactiae* น้ำมันพลูออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อดีที่สุดที่ความเข้มข้น 0.312 µl/ml ขณะที่น้ำมันตะไคร้แกง น้ำมันตะไคร้หอม และน้ำมันพลูออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อดีที่สุดที่ความเข้มข้น 0.625 µl/ml ส่วนเชื้อ *B. cereus* พบว่าน้ำมันตะไคร้แกงออกฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1.25 µl/ml แสดงว่าน้ำมันตะไคร้แกงออกฤทธิ์โดยการฆ่าเชื้อ *B. cereus* ขณะที่น้ำมันตะไคร้แกงและน้ำมันพลูสามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1.25 µl/ml และในความเข้มข้นสูงสุดของน้ำมันที่สามารถเตรียมได้ไม่มีน้ำมันชนิดใดที่สามารถฆ่าเชื้อ *Ps. aeruginosa* ได้ ผลการศึกษานี้ต่างจากการศึกษาโดย agar diffusion technique (ตารางที่ 13) กล่าวคือเมื่อเปรียบเทียบ inhibition zone ระหว่างน้ำมันตะไคร้แกงและน้ำมันพลู พบว่าน้ำมันตะไคร้แกงสามารถให้ inhibition zone ยับยั้งเชื้อทุกชนิด ยกเว้น *Ps. aeruginosa* ได้กว้างกว่าน้ำมันพลูในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าน้ำมันพลู และพบว่าหากใช้ Tween 80 เป็นสารช่วยละลายน้ำมัน น้ำมันพลูจะไม่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อทุกชนิดในความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ทั้งนี้เกิดจากสารสำคัญในใบพลูเกิดความไม่เข้ากันกับ Tween 80 ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ เนื่องจากส่วนประกอบหลักของน้ำมันพลูคือ eugenol ซึ่งเป็น phenolic compound ซึ่งเป็นสารประกอบที่จับกับ polyoxyethylene group เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ จากผลการศึกษานี้ของน้ำมันหอมระเหยพบว่าฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของน้ำมันตะไคร้แกง น้ำมันตะไคร้หอม น้ำมันโหระพาสอดคล้องกับ

การศึกษาของ Hammer et al. (1999) ที่พบว่าน้ำมันตะไคร้แดงสามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถฆ่าเชื้อ *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* อีกด้วย ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันตะไคร้แดงเพื่อทำการพัฒนาน้ำมันยาจุ่มหัวนมแม่ไว้ต่อไป สารประกอบหลักในน้ำมันตะไคร้แดงที่นำมาศึกษาคือ α -citral (geranial) 40.56% β -citral (neral) 33.71% myrcene 10.27% Inouye et al. (2001) พบว่า citral สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *H. influenzae*, *S. pyrogenes*, *S. pneumoniae* นอกจากนี้ Dorman and Dean (2000) ก็พบว่า ทั้ง α -และ β -citral สามารถฆ่าเชื้อ ได้ถึง 24 ชนิด

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพขององค์ประกอบในน้ำมันตะไคร้แดงต่อการฆ่าเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบ พบว่า citral เป็นสารที่สามารถฆ่าเชื้อ *S. aureus* *Strep. agalactiae* *B. cereus* และ *E. coli* ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับองค์ประกอบอื่น รองลงมาได้แก่ geraniol และ linalool ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *Ps. aeruginosa* จะทนต่อสารที่นำมาทดสอบทุกชนิด (ตารางที่ 15) และ จากตารางที่ 16 เมื่อพิจารณาค่า MIC และ MBC ขององค์ประกอบพบว่า citral ออกฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อ *S. aureus* และ *S. agalactiae* ได้เทียบเท่ากับ geraniol และ nerol และ citral มีประสิทธิภาพดีที่สุดต่อเชื้อ *B. cereus* ส่วนเชื้อ *E. coli* พบว่า geraniol ออกฤทธิ์ต้านเชื้อได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบหลักของน้ำมันตะไคร้แดงพบ β -linalool 9.82% 2-decylene-1-ol 1.47%, citronellal 2.17%, β -citral 31.95%, cis-geraniol 4.37% , α -citral 43.25%, geranyl acetate 1.23% โดยสารที่มีปริมาณมากที่สุดคือ citral รองลงมาคือ linalool และ geraniol ตามลำดับ ดังนั้น ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของน้ำมันตะไคร้แดงน่าจะเป็นผลจาก citral เป็นหลัก Duarte et al (2007) ที่พบว่าเชื้อ *E. coli* ETEC 5041-1 และ *E. coli* EPEC 0031-2 จะไวต่อ geraniol มากที่สุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 20 และ 8 μ g/ml ตามลำดับ และไวต่อ geranyl acetate เพียงเล็กน้อยคือมีค่า MIC เท่ากับ 500 และ 400 μ g/ml ตามลำดับซึ่งสอดคล้องกับผลของ geraniol ต่อ *E. coli* ในการศึกษาตัวอย่างนี้ อย่างไรก็ตาม Dorman and Dean (2000) พบว่า inhibition zone ของ citral ต่อเชื้อ *S. aureus* > *E. coli* > *Ps. aeruginosa* ขณะที่ inhibition zone ของ geraniol ต่อเชื้อ *S. aureus* > *Ps. aeruginosa* > *E. coli* ตามลำดับ ขณะที่การศึกษานี้พบว่าน้ำมันตะไคร้แดงและ citral ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *Ps. aeruginosa* ได้

7.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH test

ตารางที่ 17 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิด โดยวิธี DPPH test

ตัวอย่าง	IC ₅₀ (mg/ml)
กระเพรา	0.30±0.06
โหระพา	1.87±0.31
ตะไคร้หอม	0.43±0.10
ตะไคร้แดง	3.33±1.46
พลู	0.04±0.02
ไพล	2.31±0.97
ขมิ้นชัน	4.70±0.65
มะกรูด	14.01±4.27
Vit E acetate	10.83±1.61
Ascorbic acid (μ g/ml)	0.27± 0.16
Butylated Hydroxy Toluene (BHT) (μ g/ml)	1.16±0.06

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาศัยหลักการคือสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะให้ hydrogen ที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระของ DPPH ส่งผลให้ปริมาณ DPPH ลดลง จากค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้ง อนุมูลอิสระของ DPPH ได้ 50% (IC_{50}) (ตารางที่ 17) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจาก มากที่สุดไปน้อยที่สุดตามลำดับดังนี้ พลู (0.04 ± 0.02), กระเพรา (0.30 ± 0.06), ตะไคร้หอม (0.43 ± 0.10), โหระพา (1.87 ± 0.31), โพล (2.31 ± 0.97), ตะไคร้แกง (3.33 ± 1.46), ขมิ้นชัน (4.70 ± 0.65), มะกรูด (14.01 ± 4.27) เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ($0.27 \pm 0.16 \mu\text{g/m}$), BHT ($1.16 \pm 0.06 \mu\text{g/m}$) และ vitamin E acetate ($10.83 \pm 1.61\text{mg/ml}$) พบว่าน้ำมันหอมระเหยทุกชนิด ยกเว้นน้ำมันหอม ระเหยจากผลมะกรูด มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า vitamin E acetate แต่น้อยกว่า ascorbic acid และ BHT เมื่อพิจารณาองค์ประกอบหลักที่ตรวจพบในน้ำมันหอมระเหยพบว่า ส่วนใหญ่แล้วประกอบไปด้วย alcoholic, aldehydic, phenolic compounds สารประกอบเหล่านี้มีคุณสมบัติในการให้ hydrogen แก่อนุมูล อิสระ ส่งผลให้สามารถหยุดปฏิกิริยาห่วงโซ่ในการเกิดออกซิเดชันของไขมันในขั้นตอนแรก (King 1984; Roberts and Caserio, 1965; Shahidi and Wanasundara, 1992)

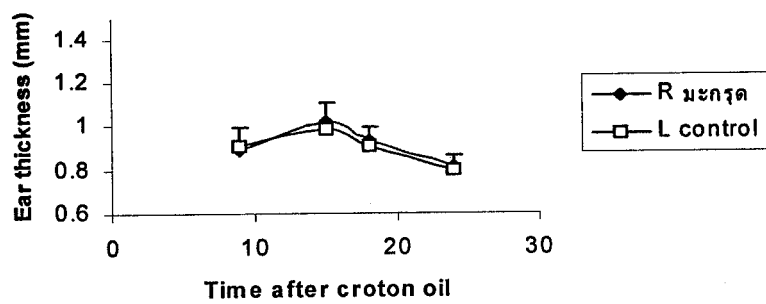
7.6 การทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของน้ำมันหอมระเหย

7.6.1 ผลของน้ำมันหอมระเหย 100% ในการลดบวมหูหนูขาว

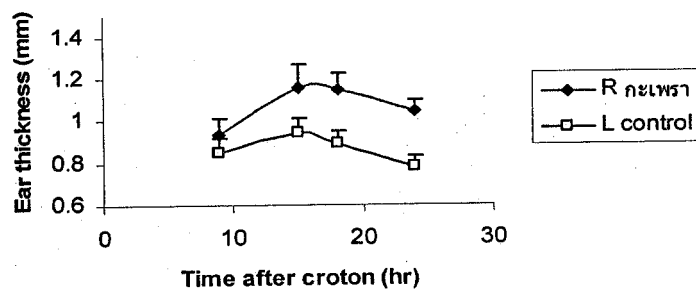
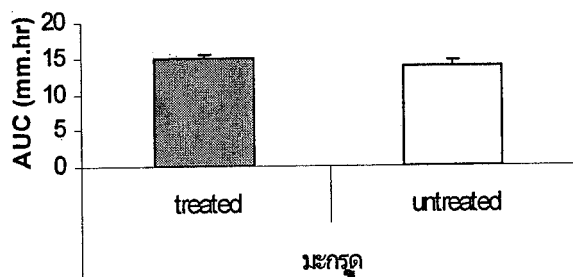
จากรูปที่ 9 เป็นการเปรียบเทียบหูช้างขาวที่ทำน้ำมันหอมระเหยและข้างซ้ายที่ไม่ได้ทำ ที่เวลา 9 ชั่วโมงหลังได้รับน้ำมันโครตอน หูหนูขาวจะเริ่มบวมขึ้นจากค่าปกติ 0.6 มิลลิเมตร มาเป็นระดับ 0.8-0.9 มิลลิเมตร การให้น้ำมันหอมระเหยที่หูช้างขาวก่อการบวมแดงและหุบวมน้อยกว่าข้างซ้าย เช่น หูหนูที่ทำ น้ำมันมะกรูด โหระพา ตะไคร้แกง พลู ขมิ้นชัน กระเพรา การบวมของหูเกิดเต็มที่ในระดับ 1-1.2 มิลลิเมตร ที่ 15-18 ชั่วโมงหลังได้รับ น้ำมันโครตอน กระเพราและขมิ้นชัน เห็นผลเสริมบวมเด่นจากการทาเพียงครั้งเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระเพราก่อความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อนำไปคำนวณหาพื้นที่ภายใต้ กราฟ ค่าบวมปกติจากเวลา 9-24 ชั่วโมง มีค่า 15 ± 1.26 (SE) มม.ชั่วโมง กระเพราก่อการระคายเคืองทำให้ได้ พื้นที่ภายใต้กราฟ 16.37 ± 1.09 มม.ชั่วโมง

หากใช้ระดับความบวมสูงสุด 1 มม. และค่าพื้นที่ภายใต้กราฟ 15 มม.ชั่วโมง เป็นเกณฑ์การบวม ปกติ ซึ่งพบในกลุ่ม control จะเห็นว่ากลุ่มที่ได้รับ โพล และกลุ่มที่ได้รับ Kenalog (triamcinolone acetate, สารสเตียรอยด์มาตรฐานลดบวม) ระดับการบวมอยู่ที่ 0.91 ± 0.07 และ 13 ± 0.9 มม.ชั่วโมง ซึ่งบวมน้อยกว่า กลุ่มควบคุม แต่เมื่อเปรียบเทียบหูซ้าย-ขวาภายในหนูตัวเดียวกัน ถ้าเอาหูด้านที่ไม่ทายาเป็นหูควบคุมพบว่า หูขวาและซ้ายแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

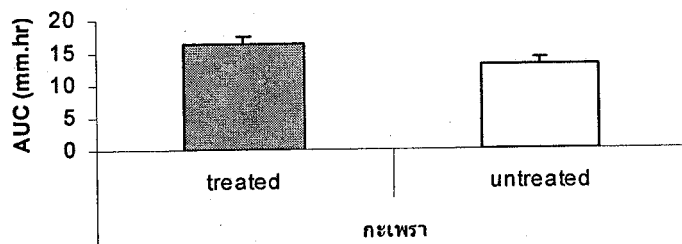
การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม (รูปที่ 9) ค่าพื้นที่ภายใต้กราฟของ kenalog (13.05 ± 0.98) และ โพล (12.62 ± 0.66) มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม control (15.29 ± 1.26) มากที่สุด แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำข้อมูลของ แต่ละชุดให้เป็น %control edema แล้วนำมาคำนวณหาพื้นที่ AUC%control edema ได้ผลเช่นเดียวกัน หูช้าง ที่ทายา โพล (1274 ± 79 %control.hr) และ kenalog (1298 ± 77 %control.hr) มีแนวโน้มก่อการลดบวม ส่วน หูช้างซ้ายที่ไม่ได้ทาสารทดสอบนั้นมิได้มีความหนาเสมอกันระหว่างกลุ่ม

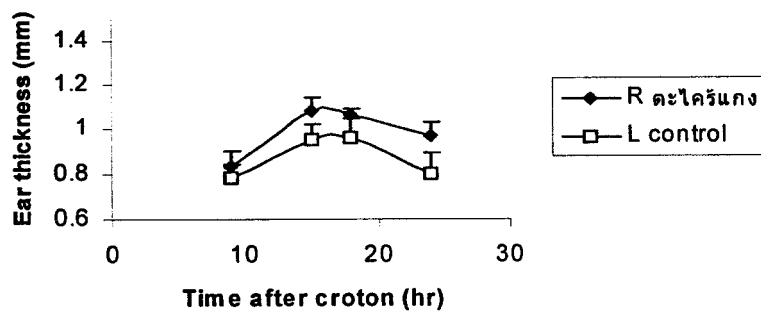


Area under the ear edema curve

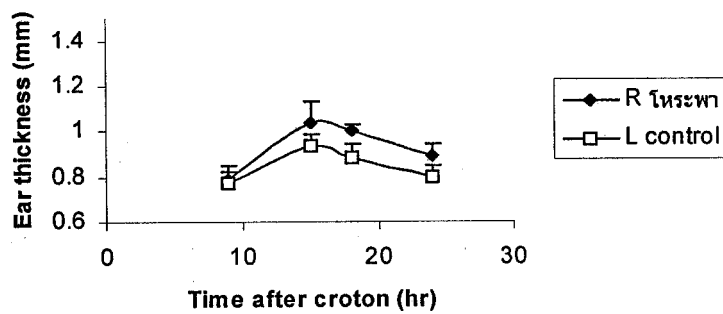
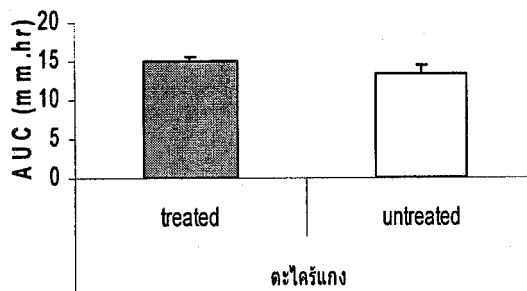


Area under the ear edema curve

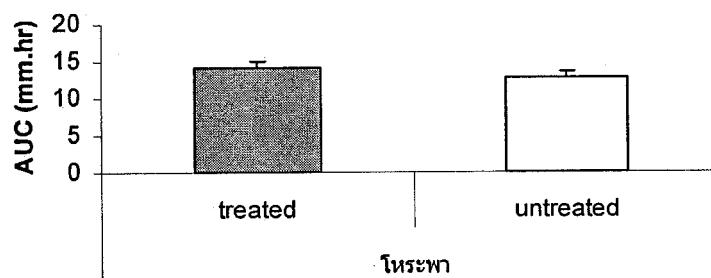


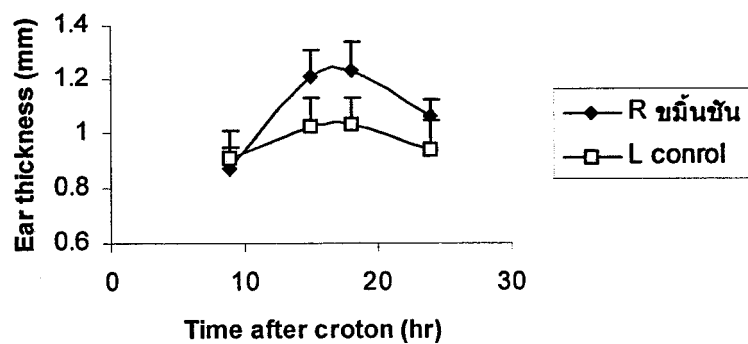


Area under the ear edema curve

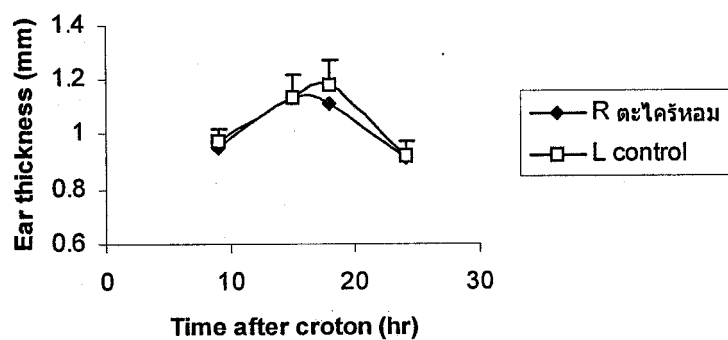
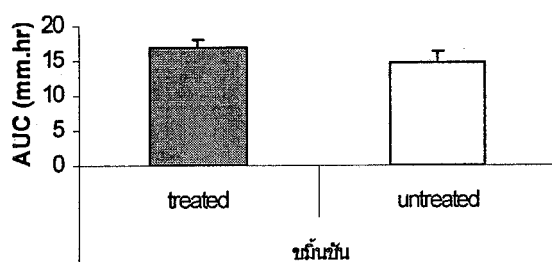


Area under the ear edema curve

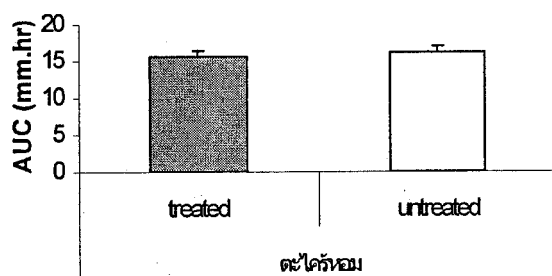


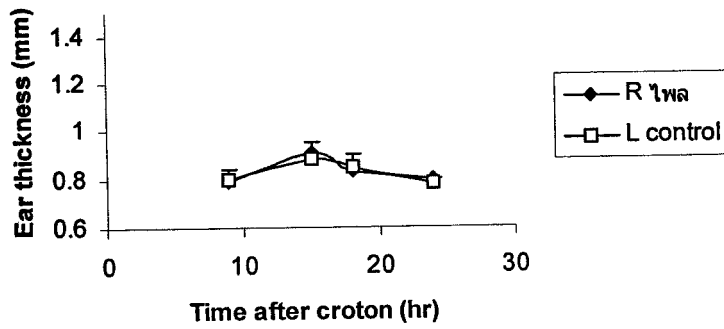


area under the ear edema curve

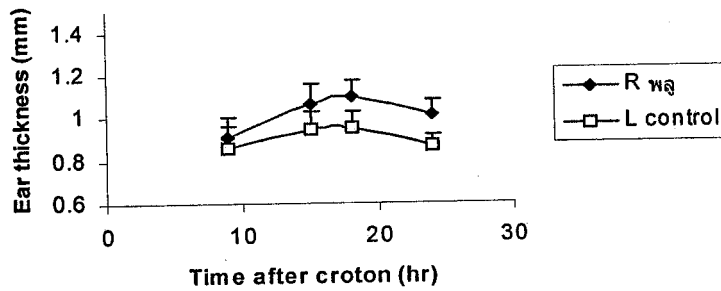
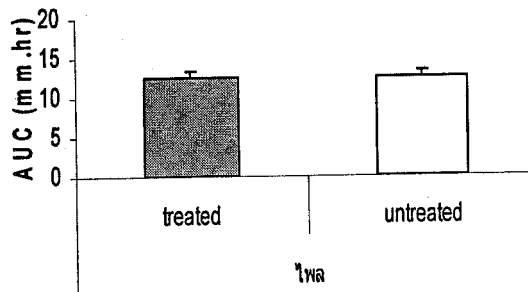


Area under the ear edema curve

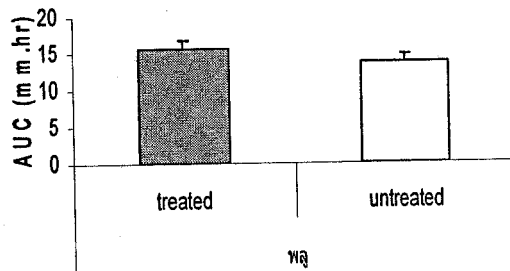


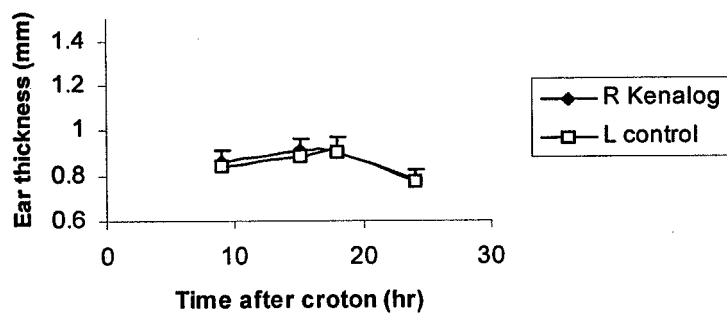


Area under the ear edema curve

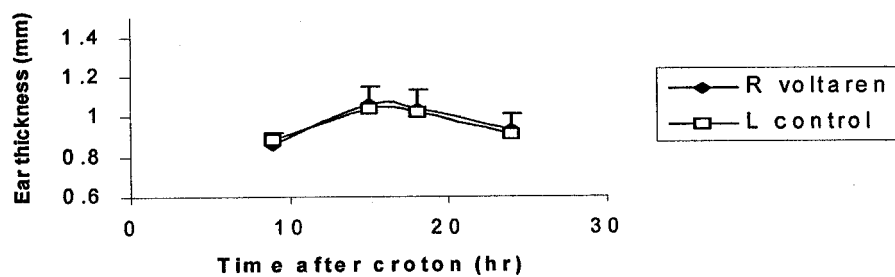
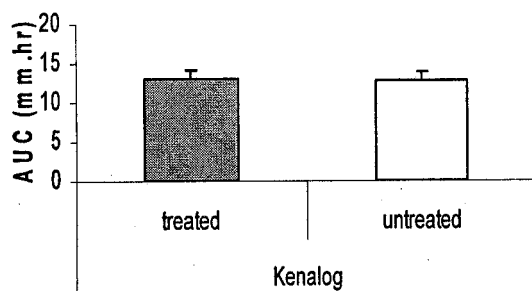


Area under the ear edema curve

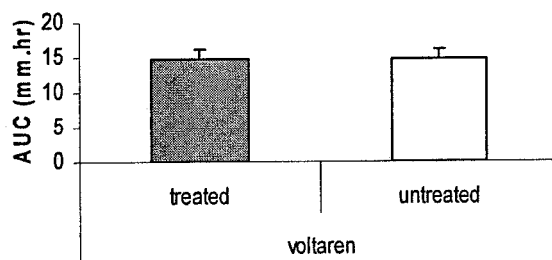


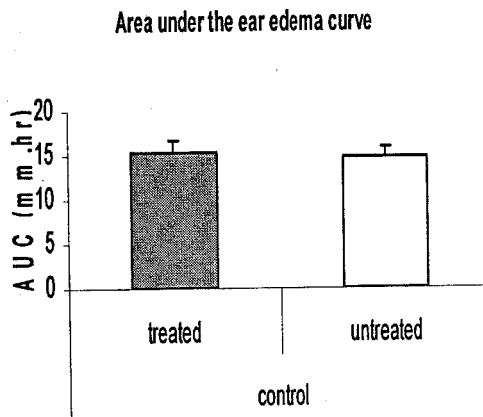
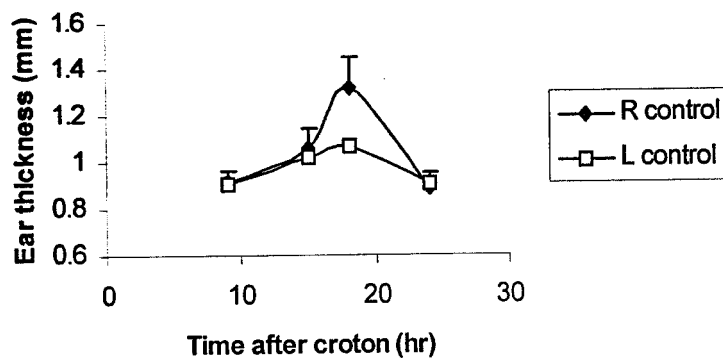


Area under the ear edema curve

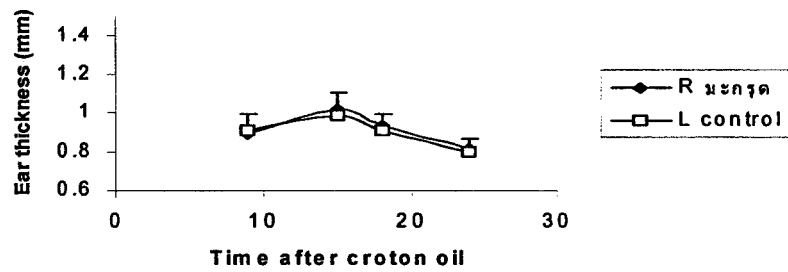


Area under the ear edema curve

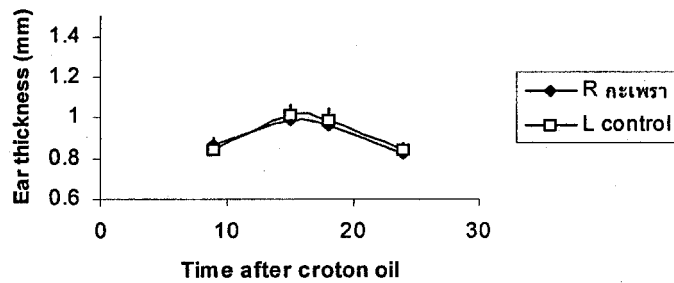
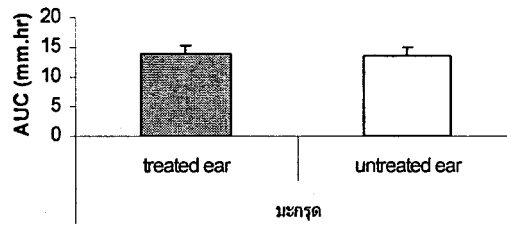




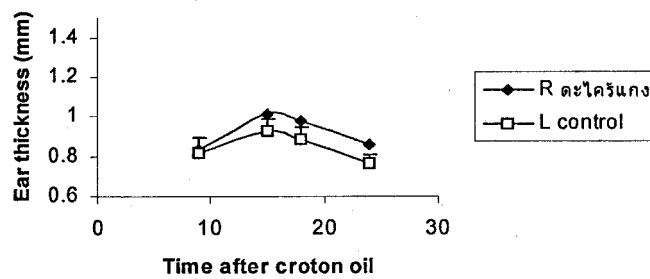
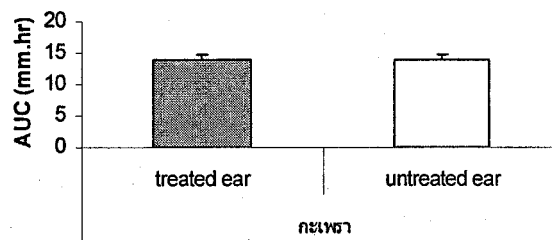
รูปที่ 9 ผลของน้ำมันหอมระเหย 100 % ทั้ง 8 ชนิด ต่อการบวมหูหนูด้วยน้ำมันโครตอน ความหนาหู (ear thickness, mm) ข้างขวา (R) และซ้าย (L) ที่บวมด้วยน้ำมัน โครตอน โดยข้างขวาทาน้ำมันหอมระเหยที่ 9 ชั่วโมง หลังสัมผัสน้ำมันโครตอน ติดตามการบวมที่ 15, 18, 24 ชั่วโมง และคำนวณพื้นที่ภายใต้กราฟ (area under the ear edema curve, mm.hr) เปรียบเทียบหูขวาและซ้ายของหนู ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของหนู ขาว 6 ตัว +SE



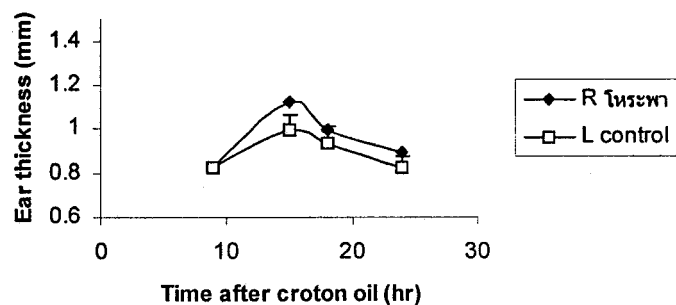
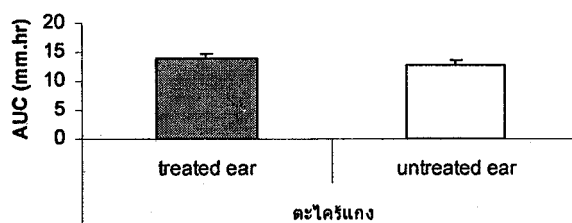
Area under the ear edema curve



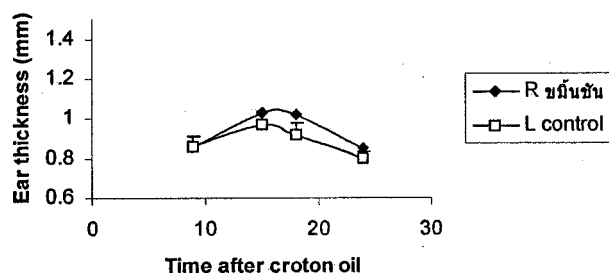
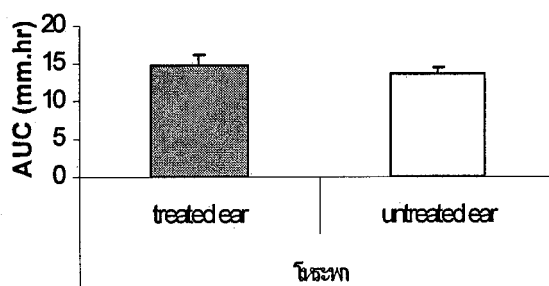
Area under the ear edema curve



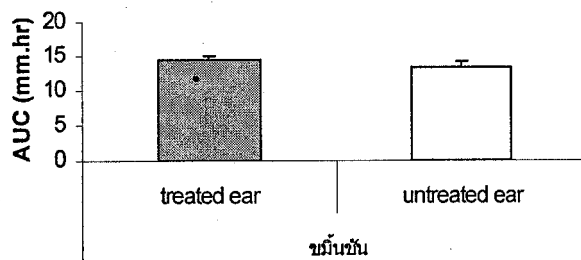
Area under the ear edema curve

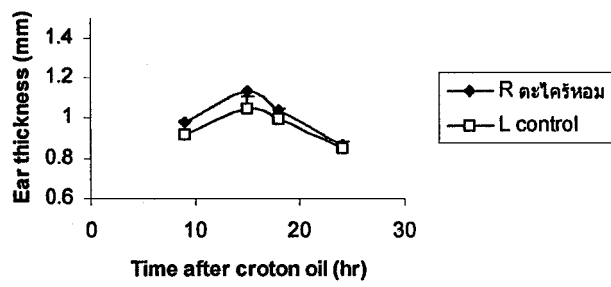


Area under the ear edema curve

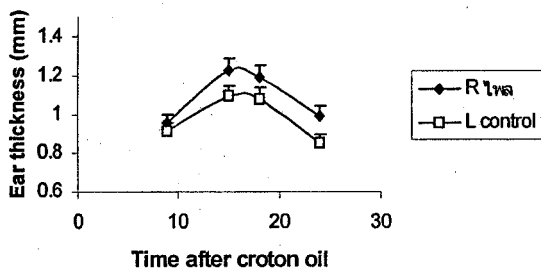
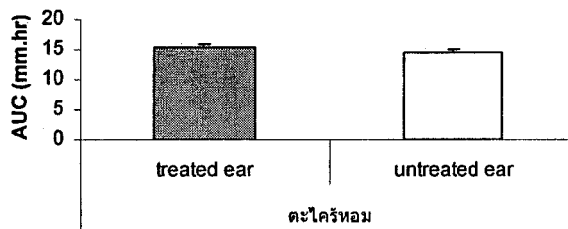


Area under the ear edema curve

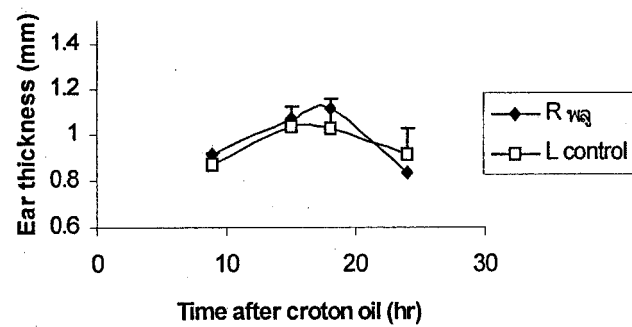
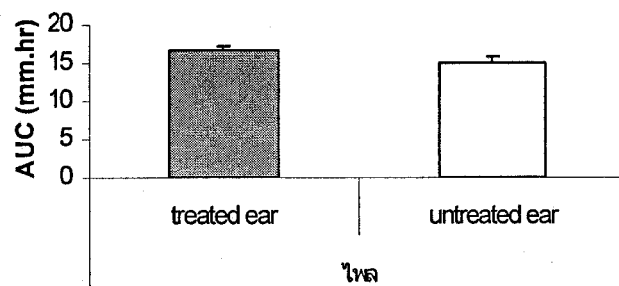




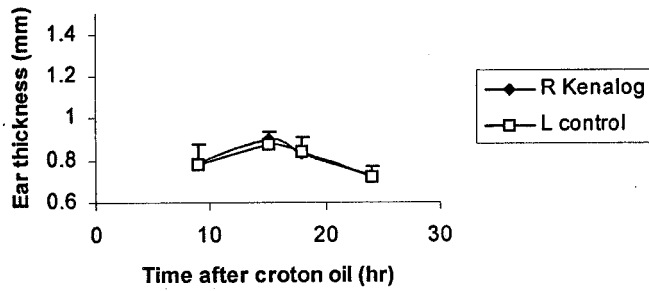
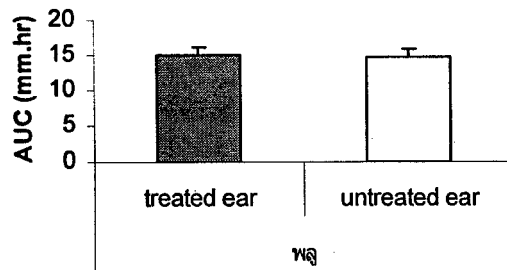
Area under the ear edema curve



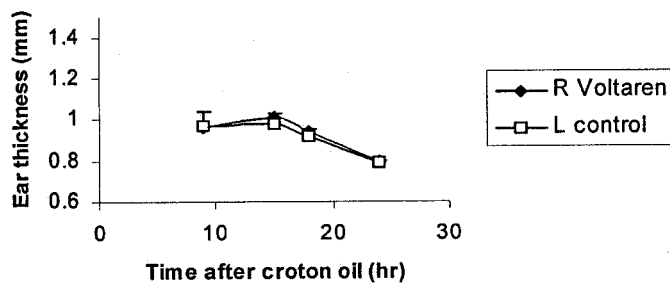
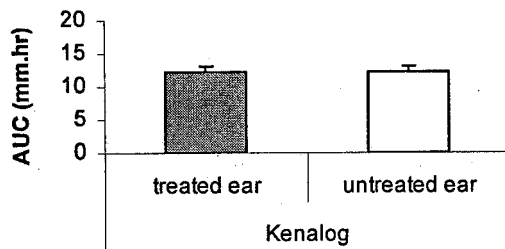
Area under the ear edema curve



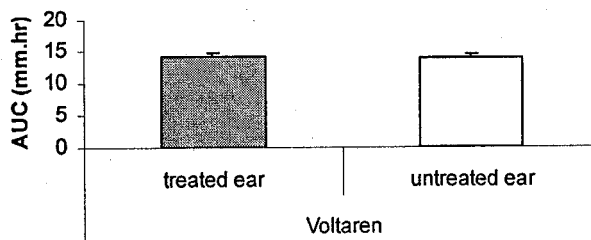
Area under the ear edema curve

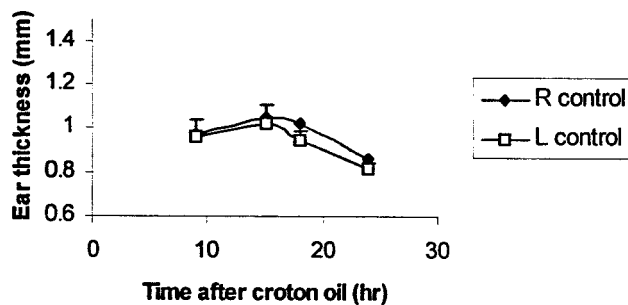


Area under the ear edema curve

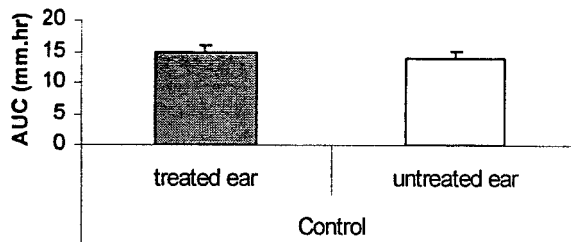


Area under the ear edema curve





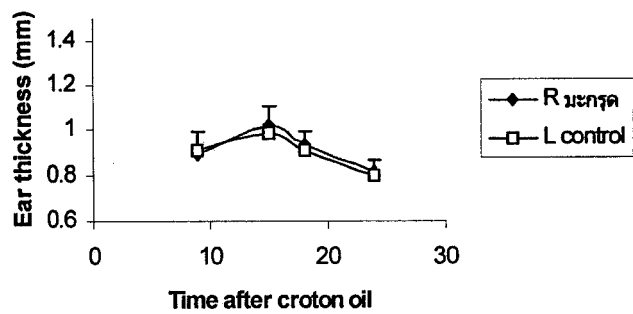
Area under the ear edema curve



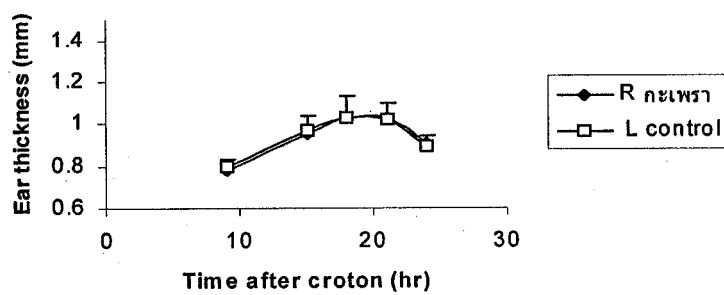
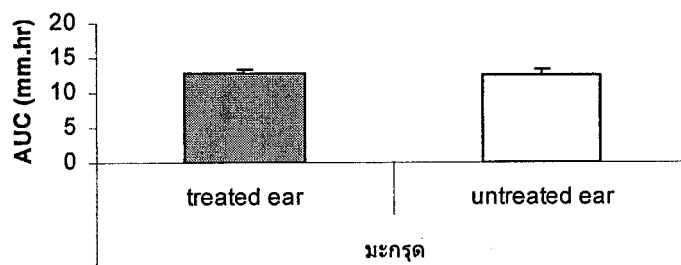
รูปที่ 10 ผลของน้ำมันหอมระเหย 25% ทั้ง 8 ชนิด ต่อการบวมหูหนูด้วยน้ำมันโครตอน ความหนาหู (ear thickness, mm) ข้างขวา (R) และซ้าย (L) ที่บวมด้วยน้ำมันโครตอน โดยข้างขวาทาน้ำมันหอมระเหย ที่ 9 ชั่วโมง หลังสัมผัสน้ำมันโครตอน ติดตามการบวมที่ 15, 18, 24 ชั่วโมง และคำนวณพื้นที่ภายใต้กราฟ (area under the ear edema curve, mm.hr) เปรียบเทียบหูขวาและซ้ายของหนู ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ หนูขวา 6 ตัว +SE

7.6.2 ผลของน้ำมันหอมระเหย 25% ในการลดบวมหูหนูขวา

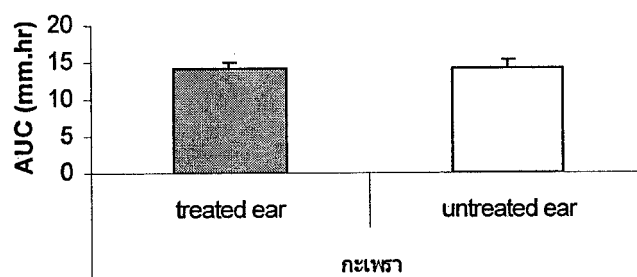
เปรียบเทียบหูข้างขวาที่ทาน้ำมันหอมระเหยและข้างซ้ายที่ไม่ได้ทา (รูปที่ 10) ที่เวลา 9 ชั่วโมงหลังได้รับ น้ำมันโครตอน หูหนูขวาจะเริ่มบวมขึ้นจากค่าปกติ 0.6 มิลลิเมตร มาเป็นระดับ 0.8-0.9 มิลลิเมตร การให้ น้ำมันหอมระเหยที่หูข้างขวาก่อนการบวมมากกว่าข้างซ้ายเล็กน้อยหรือเกือบไม่แตกต่าง การบวมของหูเกิด เต็มที่ในระดับ 1-1.2 มิลลิเมตร ที่ 15-18 ชั่วโมงหลังได้รับน้ำมันโครตอน พื้นที่ภายใต้กราฟการบวมกลุ่ม control จากเวลา 9-24 ชั่วโมง มีค่า 14.78 ± 1.26 (SE) มม.ชั่วโมง หากใช้ระดับความบวมสูงสุด 1 มม และค่า พื้นที่ภายใต้กราฟ 15 มม.ชั่วโมง เป็นเกณฑ์การบวมปกติ ซึ่งพบในกลุ่ม control จะเห็นว่ากลุ่มที่ได้รับ Kenalog (triamcinolone acetonide, สารสเตียรอยด์มาตรฐานลดบวม) มีค่าการบวมที่ต่ำกว่ามาตรฐาน และการบวมที่หูขวาและซ้ายไม่แตกต่างกัน ระดับการบวมอยู่ที่ 0.9 ± 0.08 และ 12.34 ± 0.69 มม.ชั่วโมง ตามลำดับ การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม (รูปที่ 10) ค่าพื้นที่ภายใต้กราฟ ของ Kenalog (12.34 ± 0.69) มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม control (14.78 ± 1.26) มากที่สุด แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อทำข้อมูลของแต่ละชุดให้เป็น %control edema แล้วนำมาคำนวณหาพื้นที่ AUC% control edema ได้ผลเช่นเดียวกัน หูข้างที่ทา Kenalog (1288 ± 104 % control.hr) มีแนวโน้มลดบวม ส่วนหูข้างซ้ายที่ไม่ได้ทาสารทดสอบนั้นไม่ได้มีความหนาเสมอกันระหว่างกลุ่ม

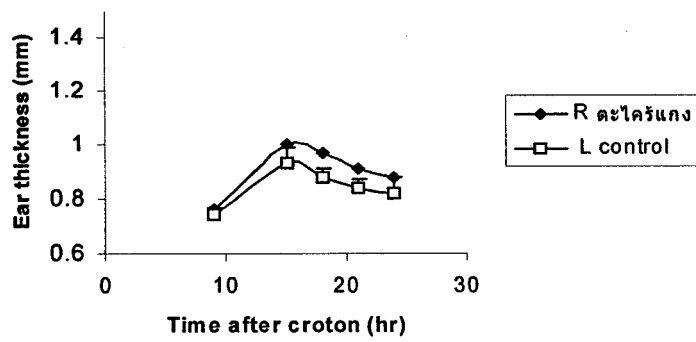


Area under the ear edema curve

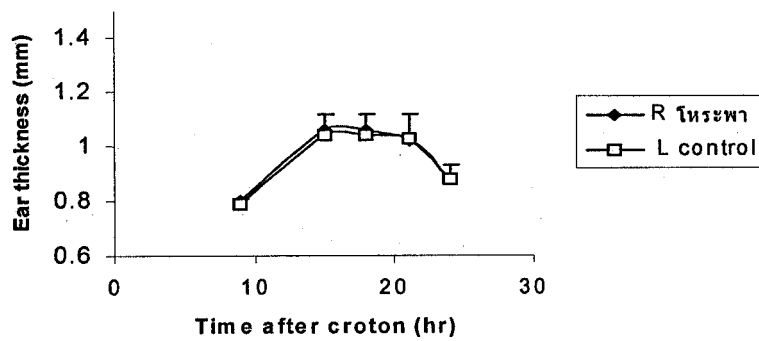
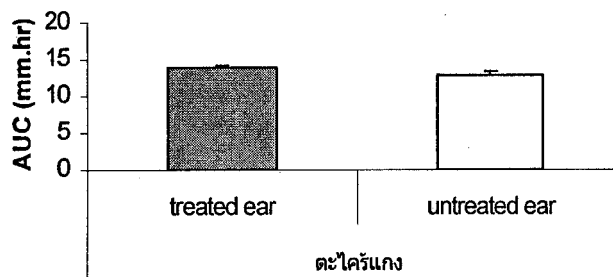


Area under the ear edema curve

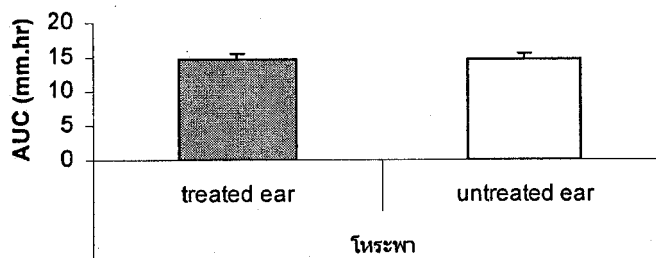


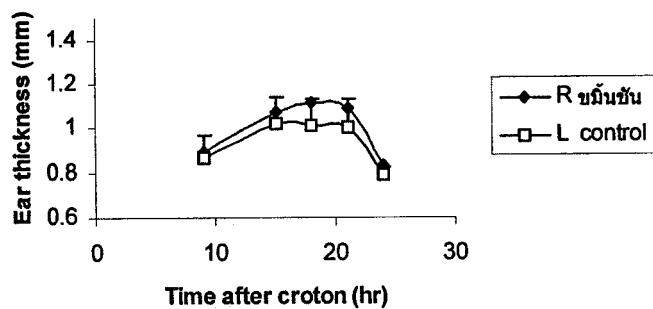


Area under the ear edema curve

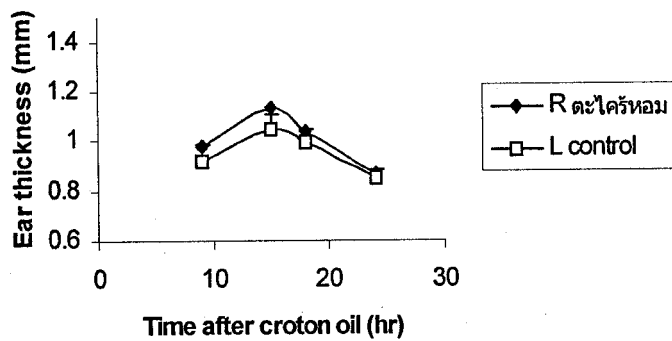
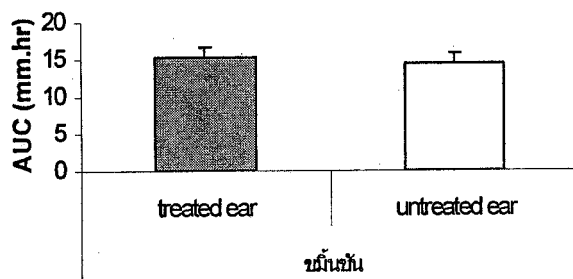


Area under the ear edema curve

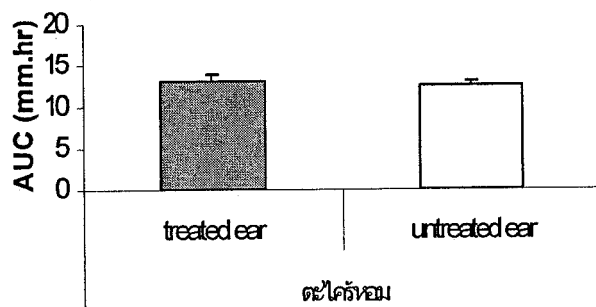


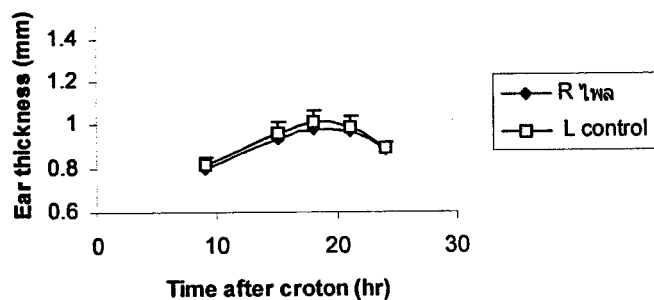


Area under the ear edema curve

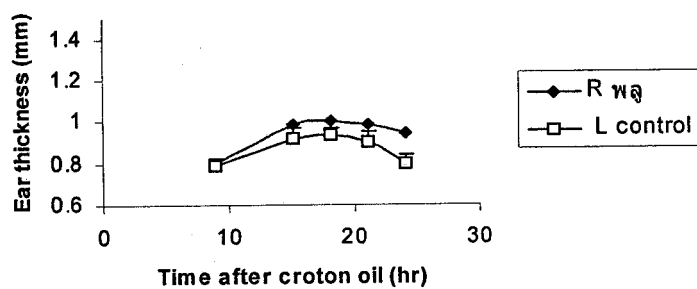
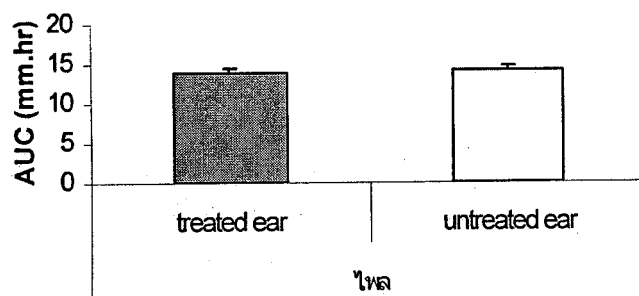


Area under the ear edema curve

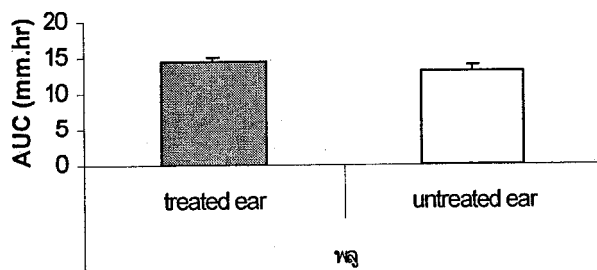


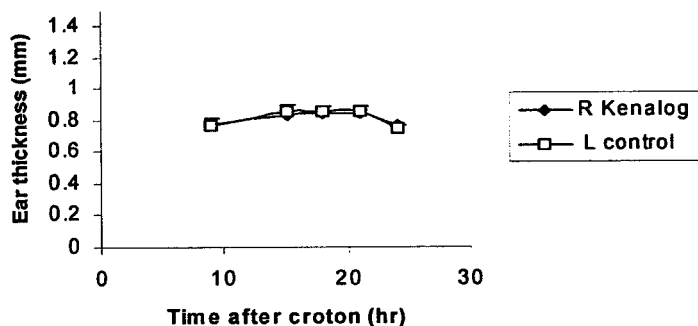


Area under the ear edema curve

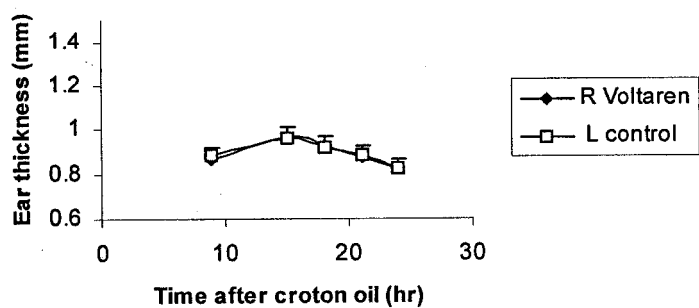
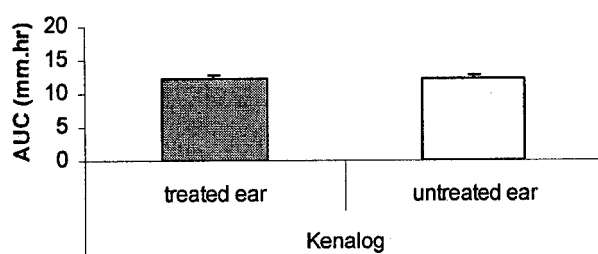


Area under the ear edema curve

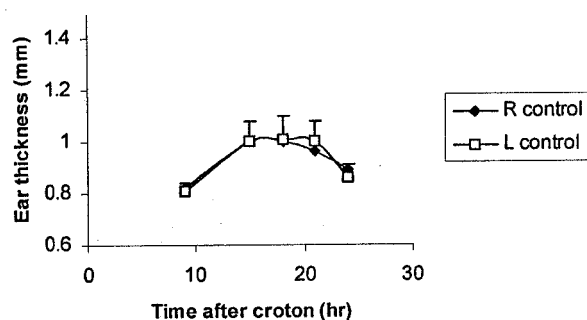
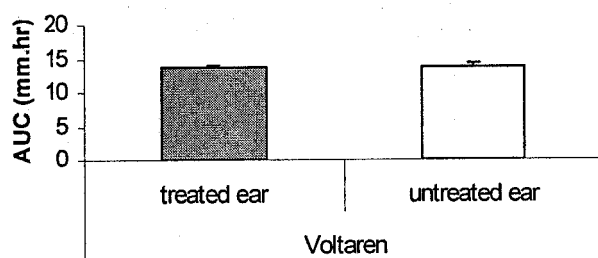


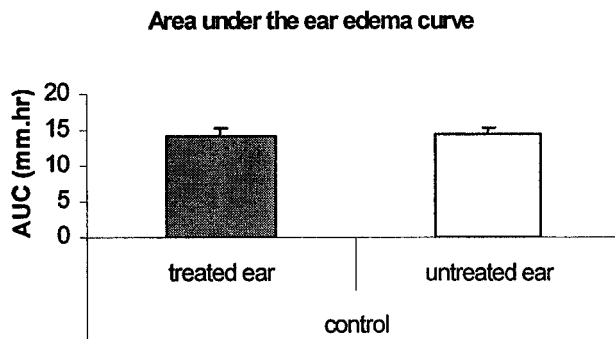


Area under the ear edema curve



Area under the ear edema curve





รูปที่ 11 ผลของน้ำมันหอมระเหย 12.5% ทั้ง 8 ชนิด ต่อการบวมหูหนูด้วยน้ำมันโครตอน ความหนาหู (ear thickness, mm) ข้างขวา (R) และซ้ายซ้าย (L) ที่บวมด้วยน้ำมันโครตอน โดยข้างขวาทาน้ำมันหอมระเหย ที่ 9 ชั่วโมง หลังสัมผัสน้ำมันโครตอน ติดตามการบวมที่ 15, 18, 24 ชั่วโมง และคำนวณพื้นที่ภายใต้กราฟ (area under the ear edema curve, mm.hr) เปรียบเทียบหูขวาและซ้ายของหนู ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ หนูขาว 6 ตัว + SE

7.6.3 ผลของน้ำมันหอมระเหย 12.5% ในการลดบวมหูหนูขาว

เปรียบเทียบหูข้างขวาที่ทาน้ำมันหอมระเหยและข้างซ้ายที่ไม่ได้ทา (รูปที่ 11) ที่เวลา 9 ชั่วโมงหลังได้รับน้ำมันโครตอน หูหนูขาวจะเริ่มบวมขึ้นจากค่าปกติ 0.6 มิลลิเมตร มาเป็นระดับ 0.8-0.9 มิลลิเมตร การให้น้ำมันหอมระเหยที่หูข้างขวาก่อนการบวมแดงและบวมมากกว่าข้างซ้าย เช่น ตะไคร้แกง พลู ขมิ้นชัน ตะไคร้หอม การบวมของหูเกิดเต็มที่ในระดับ 1-1.2 มิลลิเมตร ที่ 15-18 ชั่วโมงหลังได้รับน้ำมันโครตอน พื้นที่ภายใต้กราฟ ค่าบวมกลุ่ม control จากเวลา 9-24 ชั่วโมง มีค่า 14.2 ± 1.14 (SE) มม. ชั่วโมง

กลุ่มที่ได้รับ Kenalog (triamcinolone acetonide, สารสเตียรอยด์มาตรฐานลดบวม) มีค่าการบวมที่ต่ำกว่ามาตรฐานและขาดความแตกต่างของการบวมที่หูขวาและซ้าย ระดับการบวมอยู่ที่ 0.84 ± 0.03 มม, 12.3 ± 0.4 มม. ชั่วโมง มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม control (14.2 ± 1.14)

การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ค่าพื้นที่ภายใต้กราฟ ของ Kenalog (12.3 ± 0.4) มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม control (14.2 ± 1.14) มากที่สุด เมื่อทำข้อมูลของแต่ละชุดให้เป็น %control edema แล้วนำมาคำนวณหาพื้นที่ AUC% control edema ได้ผลเช่นเดียวกัน หูข้างที่ทา Kenalog (1373 ± 112 %control.hr) มีการบวมน้อยที่สุด ส่วนหูข้างซ้ายที่ไม่ได้ทาสารทดสอบนั้นไม่ได้มีความหนาเสมอกันระหว่างกลุ่ม

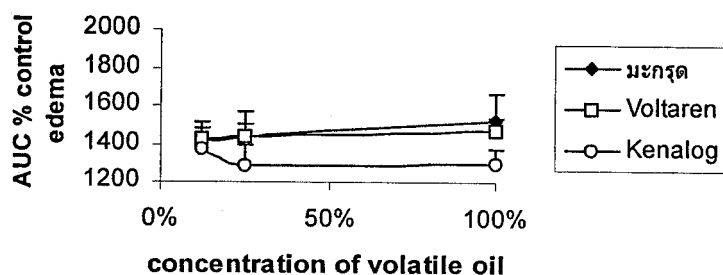
จากสามการทดลอง รูปที่ 12 จะเห็นว่า Voltaren ให้ผลระดับกลุ่ม control หรือไม่แสดงผลลดบวม ส่วน Kenalog มีผลลดในทั้งสามการทดลอง จึงใช้ระดับของยาทั้งสองเป็นมาตรฐานในการวิเคราะห์ผลของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิด แม้ฤทธิ์ลดบวมจะไม่แตกต่างจากกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ความสม่ำเสมอของผลในสามการทดลองที่แสดงว่ากลุ่ม Kenalog บวมน้อยกว่ากลุ่มอื่น นำใช้เป็นเกณฑ์พิจารณาความเป็นไปได้ของน้ำมันหอมระเหยที่ทดสอบว่าเสริมหรือลดอักเสบลดบวมได้

พื้นที่ภายใต้กราฟ [AUC %control edema] ที่ความเข้มข้นทั้งสามของน้ำมันหอมระเหย รูปที่ 12. dose response curve หากตกอยู่ระหว่าง Voltaren และ Kenalog และแสดงความสัมพันธ์กับขนาดที่ใช้ (concentration dependent) จะถือว่ามีฤทธิ์ลดบวม และหากสูงกว่า Voltaren แสดงว่าเสริมการบวม ผลในรูปที่ 12 ชี้น้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิดไม่มีฤทธิ์ลดการบวมจากการทาเพียงครั้งเดียว ขมิ้นชัน ตะไคร้หอม และพลูเสริมการบวม ส่วนโพลที่ความเข้มข้น 100% แม้จะลดการบวมได้ในระดับ Kenalog แต่ขาดคุณสมบัติ dose dependent จึงทำให้ไม่มีข้อมูลหนักแน่นที่บ่งชี้

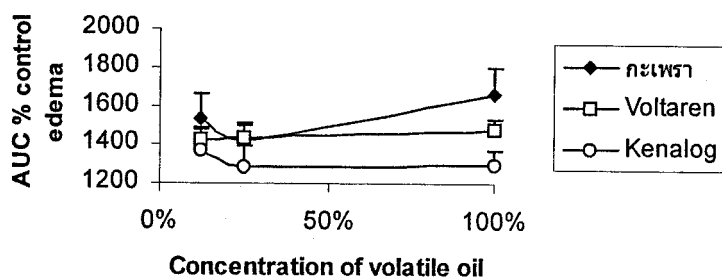
ผลของ Kenalog ในการทดลองนี้ ไม่ชัดเจนเท่ากับที่มีในรายงาน ของ มุกดา จิตต์เจริญธรรม 2546, อนุฎิยา พงศ์ผาสุก 2546 เห็นผลลดบวมได้มากถึง 30-50% เป็นการทายาครั้งเดียวก่อนเหนียวนาให้บวม ส่วนการทดลองนี้ทา Kenalog ครั้งเดียวภายหลังการบวมเกิดขึ้นแล้ว 9 ชั่วโมง ผลลดบวมเกิดน้อย 10%(จาก 1 มม มาเป็น 0.9 มม) ดังนั้นจึงใช้ dose response curve เป็นเกณฑ์การเปรียบเทียบแทนการเปรียบเทียบ ความแตกต่างของ mean ทางสถิติ

น้ำมันโครตอนเป็นสารกระตุ้นการอักเสบโดยการเพิ่มสิทธิภาพของ PLA 2 ส่งผลให้เซลล์หลั่ง arachidonic acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสร้าง leukotriene และ prostaglandins โดยผ่าน lipoxigenase pathway ส่วน metabolites ของ arachidonic acid จะก่อให้เกิดการอักเสบผ่าน cyclooxygenase (COX) และ lipoxigenase (LOX) pathways (Paula et al., 2003) จากรายงานของ Lertstitthanakorn et al. (2006) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ออกฤทธิ์โดยการยับยั้ง 5-lipoxygenase ตามลำดับความแรงจากมากไปน้อย ได้แก่ กระเพรา มะกรูด ตะไคร้หอม ส่วน โหระพา ไพล ขิง แม้ว่าจะมีฤทธิ์ ยับยั้ง 5-LOX แต่ในความเข้มข้นที่สูงกว่ามาก อย่างไรก็ตาม Jenapongsa et al. (2003) พบว่า Dimethoxyphenyl butadiene (DMPBD) ที่สกัดได้จากน้ำมันไพลสามารถยับยั้งการอักเสบของหนูที่กระตุ้นด้วย TPA ได้มากกว่า oxyphenyl butazone และ Diclofenac โดยมีกลไกการยับยั้งทั้ง LOX และ COX การศึกษานี้ตรวจพบ DMPBD ในน้ำมันไพล 9.67% ส่วนของของการยับยั้งการอักเสบของน้ำมันมะกรูด สอดคล้องกับการศึกษาของ Penna et al. (2002) ซึ่งพบว่า Linalool และ linalyl acetate ในน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูที่เหนียวนาการบวมโดย caragenin โดย Linalool จะยับยั้งได้มากกว่า เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของน้ำมัน มะกรูดพบว่ามี linalool 1.62% และ linalyl propionate 10.75% ทั้งนี้การยับยั้งการอักเสบยังอาจเกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมากเกินไปในเซลล์ทำให้ macromolecules และ กระบวนการ lipid peroxidation ที่ผนังเซลล์ถูกทำลาย ส่งผลให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บได้ (Perez-Garcia et al., 1996)

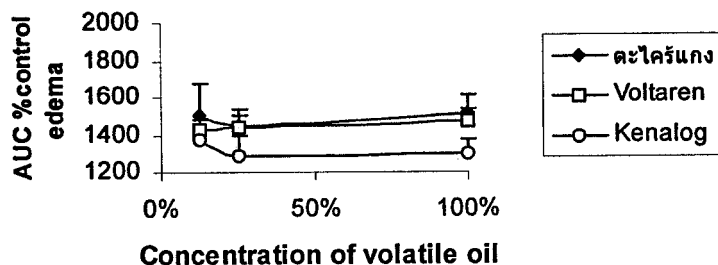
Dose response of volatile oil



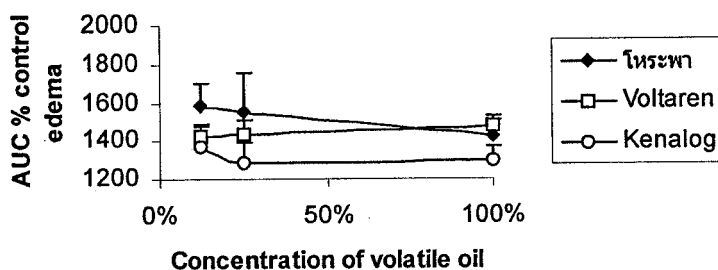
Dose response of volatile oil



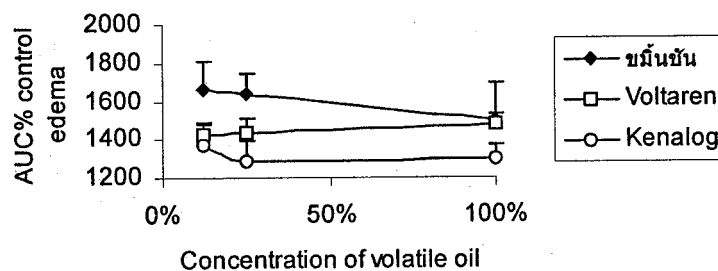
Dose response of volatile oil



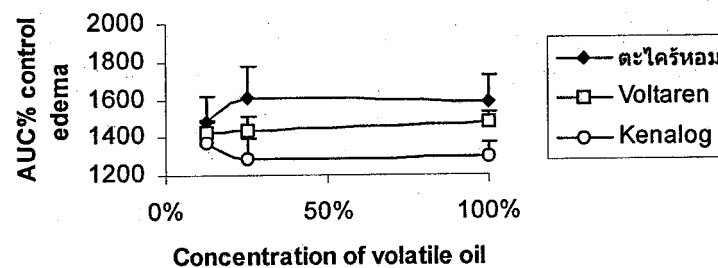
Dose response of volatile oil



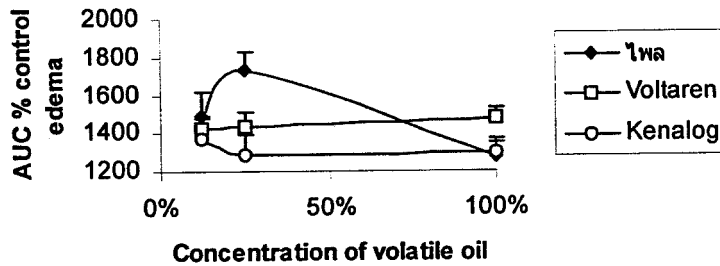
Dose response of volatile oil



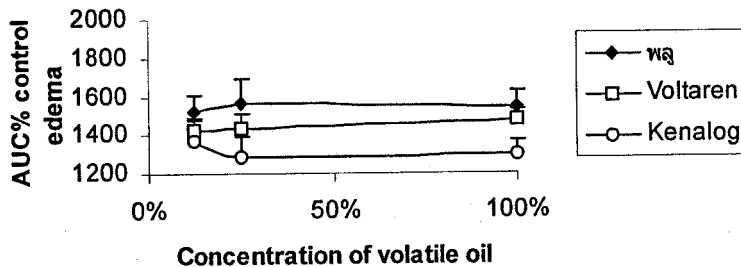
Dose response of volatile oil



Dose response of volatile oil



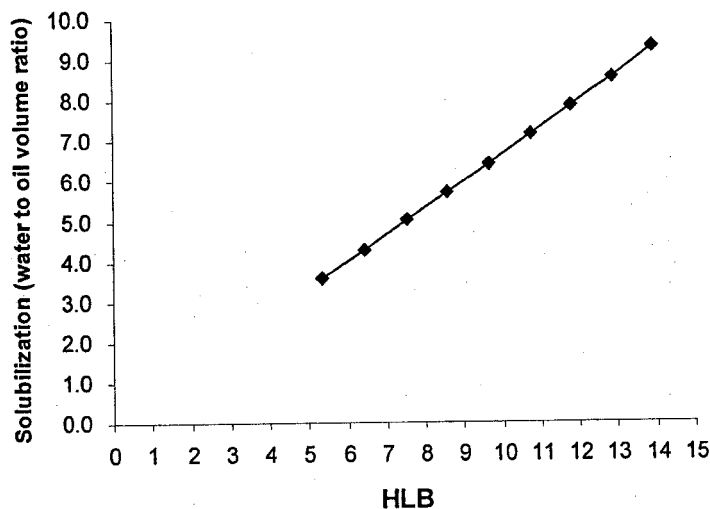
Dose response of volatile oil



รูปที่ 12 ผลลดบวมของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้น 100%, 25%, 12.5% (Dose response curve) แต่ ละค่าแทนค่าเฉลี่ยพื้นที่ภายใต้กราฟหุบววมของหนู 6 ตัว เปรียบเทียบ dose response curve ของน้ำมันหอมระเหย แต่ละชนิด กับยาลดบวมมาตรฐาน โดยที่ voltaren มีค่าใกล้เคียงกลุ่ม control ส่วน kenalog ลดการบวมได้ดีที่สุด

8. การพัฒนาตำรับน้ำยาจุ่มหัวนมจากน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แกง

8.1 การหาระบบ microemulsion ในการนำส่งน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แกง



รูปที่ 13 ผลของ HLB system ต่อความสามารถในการละลายของน้ำมันตะไคร้แกง

จากรูปที่ 13 พบว่าค่า HLB ของระบบที่เพิ่มขึ้นทำให้สัดส่วนของน้ำต่อน้ำมันเพิ่มขึ้น หรือ solubilization เพิ่มขึ้นเมื่อ HLB ของระบบลดลงดังนั้นระบบที่ใช้ในการละลายน้ำมันควรมีค่า HLB สูง ๆ

8.2 ผลของส่วนประกอบในตำรับต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้

8.2.1 ผลของชนิด surfactant

น้ำมันตะไคร้แห้งที่นำมาทดสอบเป็นน้ำมัน lot ใหม่ ในขนาด 1 กิโลกรัม ที่มีส่วนประกอบดังนี้ β -linalool 9.82% 2-decyne-1-ol 1.47%, citronella 2.17%, β -citral 31.95%, cis-geraniol 4.37% , α -citral 43.25%, geranyl acetate 1.23% จากองค์ประกอบของน้ำมันตะไคร้แห้งสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มสารประกอบอัลกอฮอล์ คือ linalool, cis-geraniol, 2-decyne-1-ol กลุ่มสารประกอบอัลดีไฮด์ ได้แก่ citronella, citral และกลุ่มสารประกอบเอสเทอร์ ได้แก่ geranyl acetate การพัฒนาเริ่มจากการประมาณสัดส่วนของสารช่วยละลายมาทำการทดสอบ อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาพัฒนาเป็นตำรับที่มี น้ำมัน ตะไคร้แห้ง 20% ethanol 20% Tween 80 20% และ 10% propylene glycol จนมีปริมาตรครบ 100 % ได้ สารละลายขุ่น ขึ้นเหนียวมาก และเมื่อตั้งไว้ 24 ชม. มีน้ำมันหอมระเหยแยกชั้นออกมา จึงแก้ปัญหาโดยการ เปลี่ยนรูปแบบตำรับจากสารละลายใส เป็นรูปแบบอิมัลชันเข้มข้นต้องเจือจางก่อนนำไปใช้ โดยทำการศึกษา ตำรับเบื้องต้น 4 ตำรับ โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 18 เพื่อศึกษาความคงตัวทางกายภาพและฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อก่อโรคได้น้ำมันอีกเสบ

ตารางที่ 18 ส่วนประกอบของตำรับอิมัลชันเข้มข้น

ส่วนประกอบ	2.1	2.2	2.3	2.4	หน้าที่
Lemongrass oil	20	20	20	20	สารสำคัญ
Butylated Hydroxy Toluene (BHT)	0.2	0.2	0.2	0.2	antioxidant
Light mineral oil	5	5	5	5	Emollient
Stearyl alcohol	1	1	1	1	Film stabilizer
Cetyl alcohol	1	1	1	1	Film stabilizer
Span 80	2	-	-	-	Non-ionic emulsifier
Cetomacrogol 1000	-	5	3	-	Non-ionic emulsifier
Sodium lauryl sulfate (SLS)	-	-	2	5	Penetration enhancer and solubilizer
Tween 80	3	-	-	-	Non-ionic emulsifier
Propylene glycol	20	20	20	20	Humectant
Sodium benzoate	0.2	0.2	0.2	0.2	Preservative
EDTA disodium	0.1	0.1	0.1	0.1	Chelating agent
Deionized water to	100	100	100	100	vehicle
Physical stability after 24 hr	unstable	unstable	unstable	unstable	

ตารางที่ 19 Inhibition zone (มิลลิเมตร) ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบของตำรับที่ 2.1

ความเข้มข้น (% V/V)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Base	-	-	-
5%	13.0	8.0	-
10%	18.5	8.0	-
15%	20.3	9.0	-
20%	27.3	9.5	-
0.5% CHX	15.0	14.0	15.0

ตารางที่ 20 Inhibition zone (มิลลิเมตร) ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบของตำรับที่ 2.2

ความเข้มข้น (% V/V)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Base	-	-	-
5%	11.0	10.0	10.0
10%	20.0	10.0	10.0
15%	20.0	10.0	10.0
20%	22.0	9.0	10.0
0.5% CHX	15	14.0	16.0

ตารางที่ 21 Inhibition zone (มิลลิเมตร) ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบของตำรับที่ 2.3

ความเข้มข้น (% V/V)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Base	9	-	-
5%	15.3	10.0	7.0
10%	18.7	10.0	8.0
15%	22.0	10.0	9.0
20%	24.0	9.0	9.0
0.5% CHX	15	14.0	15.3

ตารางที่ 22 Inhibition zone (มิลลิเมตร) ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบของตำรับที่ 2.4

ความเข้มข้น (% V/V)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Base	12.3	-	-
5%	15.3	-	-
10%	18.7	-	-
15%	28.7	-	-
20%	28.0	-	-
0.5% CHX	15.0	14.0	14.0

ตารางที่ 23 Inhibition zone (มิลลิเมตร) ในการยับยั้ง *S. aureus* ของตำรับต่าง ๆ

ความเข้มข้น (% V/V)	ตำรับ			
	2.1	2.2	2.3	2.4
Base	-	-	9	12.3
5	13	11	15.3	15.3
10	18.5	20	18.7	18.7
15	20.3	20	22	28.7
20	27.3	22	24	28
0.5% CHX	15	15	15	15

ตารางที่ 24 ความเข้มข้นของตำรับต่าง ๆ ในการยับยั้ง *S. aureus* ที่เทียบเท่ากับ 0.5% Chlorhexidine digluconate และลักษณะความคงตัวของกายภาพของตำรับ

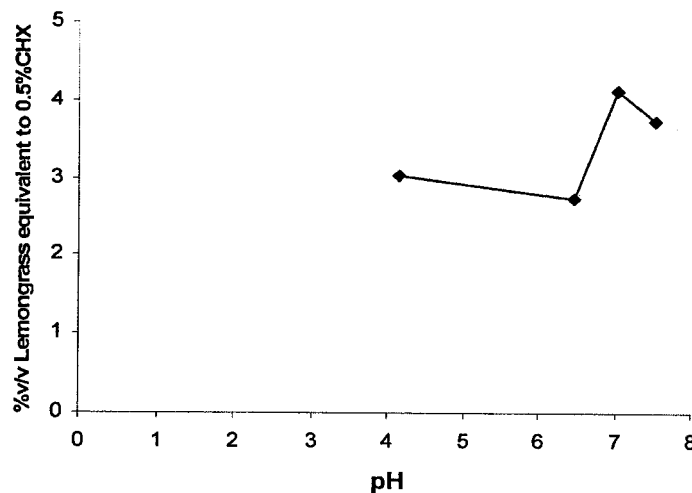
ตำรับ	ลักษณะทางกายภาพ	% v/v น้ำมันตะไคร้แดงในตำรับ ที่เทียบเท่ากับ 0.5% CHX
2.1	ขาวนวลเข้าเป็นเนื้อเดียวกับ แยกชั้นเมื่อตั้งไว้ 24 ชม.	6.64
2.2	แยกชั้น	7.25
2.3	ขาวขุ่นเข้าเป็นเนื้อเดียวกับแยกชั้นเมื่อตั้งไว้ 24 ชม.	5.01
2.4	แยกชั้น	5.28

หมายเหตุ เพื่อศึกษาผลของของสารก่อกวนการยับยั้งเชื้อจึงทำการทดสอบเมื่อเตรียมเสร็จใหม่ ๆ จากตารางที่ 19-24 เมื่อนำค่าที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่าง log concentration และเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้น ตำรับที่ 2.3 และ 2.4 ยาพื้นเปล่าของทั้ง 2 ตำรับสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ โดยตำรับยาพื้นเปล่าของตำรับ 2.4 ให้ inhibition zone กว้างกว่าตำรับยาพื้นเปล่าของตำรับ 2.3 และเมื่อพิจารณาตำรับยาพื้นเปล่าของตำรับทั้งหมดพบว่า ตำรับมีส่วนผสมของ SLS แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ ในขณะที่ตำรับที่ไม่มี ส่วนผสมของ SLS ไม่แสดงผลในการยับยั้งเชื้อ แสดงว่า SLS น่าจะมีผลในการยับยั้งเชื้อได้ และเมื่อเปรียบเทียบตำรับที่มี lemongrass oil 5% โดยการแทนที่สมการเส้นตรงด้วยค่า inhibition zone ของ 0.5% CHX พบว่าตำรับ 2.3 และ 2.4 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้มากกว่าตำรับ 2.1 และ 2.2 และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของตำรับ 2.3 ที่มีส่วนผสมของ Cetomacrogol 1000 และ SLS จะดีกว่าตำรับ 2.4 ซึ่งมีเพียง SLS เป็นสารก่อกวนการยับยั้งเชื้อเล็กน้อย ถ้าพิจารณาค่า inhibition zone ของตำรับ 2.4 พบว่าที่ความเข้มข้นของตะไคร้แดง 15 และ 20 %V/V จะสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าตำรับที่ 2.3 แต่ในความเข้มข้นที่ 5 และ 10 % V/V ประสิทธิภาพในการยับยั้งไม่ต่างกันทำให้เมื่อนำมาเทียบกับ inhibition zone ของ 0.5% CHX ค่าความชันของกราฟตำรับที่ 2.4 จะสูงกว่า ตำรับที่ 2.3 ส่งผลให้ % น้ำมันตะไคร้แดงเมื่อเทียบกับ 0.5% CHX ของตำรับ 2.4 มีค่าสูงกว่าตำรับ 2.3 เพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพพบว่าเมื่อตั้งทิ้งไว้ 24 ชม. ทุกตำรับไม่คงตัว (ตารางที่ 24)

8.2.2 ผลของ pH ต่อประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แดง

และเมื่อศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวและประสิทธิภาพของตำรับในตารางที่ 4 จากรูปที่ 14 พบว่าน้ำยาจุ่มหัวนมแมวจากน้ำมันตะไคร้แดงตำรับที่ 3.1-3.4 ที่มี pH 4.16, 6.48 7.04 และ 7.53 จะมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ CHX ที่ความเข้มข้น 2.73, 4.13 และ 3.74 % ตามลำดับ อย่างไรก็ตามตำรับทั้ง 3 ไม่คงตัวมีการแยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ 24 ชม ในขณะที่ตำรับที่ 3.1 มี pH 4.16 มีความคงตัวดีมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ

CHX ที่ความเข้มข้น 3.03% w/v แสดงว่า pH ที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำยาจุ่มหัวนมจากน้ำมันตะไคร้แก่กรรมมีสถานะเป็นกรด และเมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการจุ่มหัวนมแม่ไว้เพื่อยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของตำรับที่ 2.1 - 2.4 พบว่าค่าที่ได้ยังค่อนข้างสูง ประกอบกับประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ แกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *Ps. aeruginosa* ค่อนข้างต่ำ และประสิทธิภาพและความคงตัวของตำรับยังขึ้นอยู่กับ pH ของตำรับ ดังนั้น จึงเลือกตำรับที่ 2.3 มาพัฒนาต่อให้มีความคงตัวทางกายภาพมากขึ้น โดยเพิ่มความเข้มข้นของสารก่ออิมัลชันเป็น 10% และทำการปรับส่วนผสมของตำรับโดยการเพิ่มความเข้มข้นของ SLS และเติมเกลือ sodium chloride และ citric acid เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ ส่วนประกอบในตำรับดังแสดงในตารางที่ 25



รูปที่ 14 ผลของ pH ต่อฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *S. aureus*

8.2.3 ผลของเกลือและกรดต่อประสิทธิภาพของตำรับ

ตารางที่ 25 ส่วนประกอบของตำรับอิมัลชันเข้มข้นที่พัฒนาต่อในลำดับที่ 3

ส่วนประกอบ	4.1	4.2	4.3	4.4
Lemongrass oil	20	20	20	20
Butylated Hydroxy Toluene (BHT)	0.2	0.2	0.2	0.2
Light mineral oil	5	5	5	5
Stearyl alcohol	1	1	1	1
Cetyl alcohol	1	1	1	1
Span 80	-	-	4	4
Cetomacrogol 1000	5	5	-	-
Sodium lauryl sulfate (SLS)	5	5	5	5
Tween 80	-	-	6	6
Propylene glycol	20	20	20	20
Sodium benzoate	0.2	0.2	0.2	0.2
EDTA disodium	0.1	0.1	0.1	0.1
Sodium chloride	2	-	2	-
Citric acid	0.5	0.5	0.5	0.5
Deionized water to	100	100	100	100

ตารางที่ 26 Inhibition zone (มิลลิเมตร)ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบของตำรับที่ 3.1

ความเข้มข้น (% V/V)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Base	10	-	-
1%	13	8	-
3%	16	10	8
5%	18	12	10
10%	24	19	11
0.5% CHX	16	15	15

ตารางที่ 27 Inhibition zone (มิลลิเมตร) ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบของตำรับที่ 3.2

ความเข้มข้น (% V/V)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Base	11	8	-
1%	10	-	-
3%	12	-	-
5%	15	12	-
10%	20	15	-
0.5% CHX	17	13	15

ตารางที่ 28 Inhibition zone(มิลลิเมตร)ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบของตำรับที่ 3.3

ความเข้มข้น (% V/V)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Base	9	-	-
1%	9	-	-
3%	9	-	-
5%	10	-	-
10%	19	-	-
0.5% CHX	18	14	14

ตารางที่ 29 Inhibition zone(มิลลิเมตร)ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบของตำรับที่ 3.4

ความเข้มข้น (% V/V)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Base	8	9	7
1%	9	-	10
3%	10	-	10
5%	13	16	11
10%	16	20	14
0.5% CHX	17	13	15

ตารางที่ 30 Inhibition zone (มิลลิเมตร) ในการยับยั้ง *S. aureus* ของตำรับต่าง ๆ

ความเข้มข้น (% V/V)	ตำรับ			
	3.1	3.2	3.3	3.4
Base	10	11	9	8
1	13	10	9	9
3	16	12	9	10
5	18	15	10	13
10	24	20	19	16
0.5% CHX	16	17	18	17

ตารางที่ 31 ความเข้มข้นของตำรับต่าง ๆ ในการยับยั้ง *S. aureus* ที่เทียบเท่ากับ 0.5% CHX และลักษณะความคงตัวของกายภาพของตำรับ

ตำรับ	ลักษณะทางกายภาพ	% v/v น้ำมันตะไคร้แดงใน ตำรับที่เทียบเท่ากับ 0.5% CHX
4.1	ขุ่นขาวหนืด แยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ 1 ชม.	2.12
4.2	ขุ่นขาวหนืด แยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ 1 ชม.	4.33
4.3	เหลือง หนืด แยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ 24 ชม.	7.51
4.4	เหลือง หนืด แยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ 1 ชม.	7.96

จากตารางที่ 31 พบว่าทุกตำรับไม่มีความคงตัวของกายภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* จากตารางที่ 26-30 พบว่า ตำรับที่ 4.1 มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยที่ความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แดง 2.12 %v/v จะเทียบเท่า 0.5% CHX รองลงมาคือตำรับ 4.2 ทั้งนี้ ตำรับที่ 4.1 มีส่วนประกอบที่เหมือนกันตำรับที่ 4.2 โดยตำรับที่ 4.1 มีส่วนผสมที่เพิ่มขึ้นคือมี sodium chloride 2% และ citric acid 0.5% ส่วนตำรับที่ 4.2 มีเพียง citric acid 0.5% ในขณะที่ตำรับที่ 4.3 และ 4.4 มีประสิทธิภาพด้อยกว่าตำรับอื่น ๆ เมื่อพิจารณาส่วนประกอบในตำรับพบว่าสารก่อกวนเซลล์ในตำรับที่ 4.3 และ 4.4 คือ Span 80 และ Tween 80 โดยตำรับที่ 4.3 มีส่วนผสมที่เพิ่มขึ้นคือมี sodium chloride 2% และ citric acid 0.5% ส่วนตำรับที่ 4.4 มีเพียง citric acid 0.5% แสดงว่าการเติม sodium chloride 2% และ citric acid 0.5% ในตำรับที่มี Span 80 และ Tween 80 จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ลดลง ในขณะที่ในตำรับ 4.2 ที่มี Cetomacrogol 1000 และ SLS เป็นสารก่อกวนเซลล์ citric acid 0.5% สามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้เล็กน้อย และเมื่อใช้ร่วมกับ sodium chloride 2% ในตำรับที่ 4.1 แม้ว่าเชื้อ *S. aureus* ไม่ถูกยับยั้งการเจริญเติบโตโดย sodium chloride ในความเข้มข้นสูงก็ตาม (วัชรวิ, 2542) นอกจากนี้การมีเกลือในตำรับยังช่วยให้อัตราการระเหยของสารละลายลดลง (Dickenson et al, 1991, US patent 5047234) และยังสามารถเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่เดียวกันยังช่วยเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *Ps. aeruginosa* ได้มากขึ้น โดยตำรับที่ 4.1 ที่ความเข้มข้น 6.33% มีประสิทธิภาพเทียบในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* เท่ากับ 0.5% CHX ขณะที่ ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Ps. aeruginosa* มีน้อยมาก ที่ความเข้มข้นถึง 47.65% มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ 0.5% CHX ทั้งนี้ยาพื้นเปล่าที่นำมาทดสอบได้เติม sodium chloride 2% และ citric acid 0.5% ยังออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ *Ps. aeruginosa* ได้เล็กน้อย เนื่องจากส่วนประกอบในตำรับนอกจากจะมีน้ำมันตะไคร้แดงที่จะต้องเติมที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45°C แล้วยังต้องเติม sodium chloride ซึ่งเป็น strong electrolyte และ

เติม citric acid ในความเข้มข้นที่สูงเพื่อให้ตัวรับมีความเป็นกรดที่ต่ำกว่า 3 ปัญหาที่พบคือ เกลลี่จะส่งผลให้เกิดการแยกน้ำที่จำเป็นสำหรับการละลายน้ำของส่วนที่ชอบน้ำของสารก่อกอิมัลชัน เพื่อให้กอิมัลชันไม่คงตัวส่งผลให้การพัฒนาคำรับค่อนข้างยุ่งยาก ประกอบกับในตัวรับมีการเติม propylene glycol 20% เพื่อเป็น humectant ในตัวรับ ปริมาณที่ใช้ก็ค่อนข้างสูง และเป็นตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (semipolar solvent) เพื่อหวังผลให้น้ำมันละลายในตัวรับได้ดี ซึ่งอาจไปเพิ่มการ dehydrate สารก่อกอิมัลชัน ส่วนสารในกลุ่ม fatty alcohol ได้แก่ stearyl alcohol และ cetyl alcohol มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับฟิล์มของสารก่อกอิมัลชันที่ผิวประจัน แต่ไม่สามารถทำให้อิมัลชันคงตัวได้ ดังจะเห็นว่าทุกตัวรับที่เตรียมขึ้นเมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดการแยกของชั้นน้ำมันออกจากน้ำ จึงตัด propylene glycol และ fatty alcohol ออกจากตัวรับ จากการศึกษาผลของค่า HLB value ต่อการละลายของน้ำมันพบว่าที่สารที่จะช่วยละลายน้ำมัน ตะไคร้แกงได้ต้องมีค่า HLB value สูง (รูปที่ 13) และเพื่อลดอัตราการระเหยของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แกงในตัวรับและ เพื่อให้มี emollient effect ต่อผิวด้านม้วน และช่วยเพิ่มปริมาณวิตามินภายในของอิมัลชัน ดังนั้น จึงควรมี light mineral oil ในตัวรับ จากเหตุผลดังกล่าว ปัจจัยที่น่าจะส่งผลต่อความคงตัวของอิมัลชันคือ ความเข้มข้นของสารก่อกอิมัลชันและสารเพิ่มความหนืดให้กับวุ้นคากายนอก แต่เนื่องจากตัวรับที่เตรียมขึ้นนี้ใช้สำหรับจุ่มหัวนมแม่วัว ดังนั้นตัวรับที่เตรียมไม่ควรมีความหนืดมากเพราะจะทำให้สารสำคัญไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปในหัวนมเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค ดังนั้นจึงทำการปรับปริมาณสารก่อกอิมัลชันเพื่อศึกษาในเชิง การเพิ่มปริมาณสารก่อกอิมัลชันเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังได้เพิ่มปริมาณเกลียวและ citric acid เพื่อการเจือจางก่อนใช้ให้มีปริมาณสูงพอ และพบว่าเมื่อเพิ่ม light mineral oil 20% , SLS 10%, Cetomacrogol 1000 15% ในตัวรับเมื่อเติมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แกงลงในปริมาณ 20% ของตัวรับที่ละน้อย จะได้น้ำยาจุ่มหัวนมแม่วัวที่มีลักษณะใสสีเหลืองอ่อน มีความหนืดเล็กน้อย สารละลายมี pH เป็น 2.37 ส่วนประกอบในตัวรับแสดงในตาราง 32

ตารางที่ 32 ส่วนประกอบในตัวรับน้ำยาจุ่มหัวนมแม่วัว

ส่วนประกอบ	% w/v
Lemongrass oil	20
Butylated Hydroxy Toluene (BHT)	0.2
Light mineral oil	20
Cetomacrogol 1000	15
Sodium lauryl sulfate (SLS)	10
Sodium benzoate	0.2
EDTA disodium	0.1
Sodium chloride	4
Citric acid	2
Deionized water to	100

9. การศึกษาระสิทธิภาพของน้ำยาจุ่มหัวนมจากน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แกง

ตารางที่ 33 Inhibition zone ของน้ำยาจุ่มหัวนมแม่วัวเมื่อเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

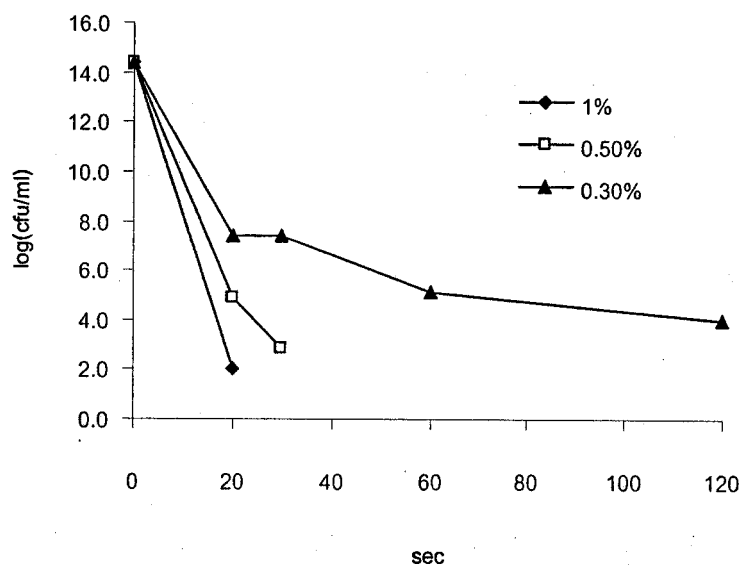
ความเข้มข้น (% V/V)	Inhibition zone (mm)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>B. cereus</i>
15	ND	23	8.5	ND	ND
10	22	17	8	ND	ND
5	16	16	-	ND	ND
3	10	15	-	21	19
2	ND	ND	ND	19	15
1	9	ND	ND	17	10
0.5	ND	ND	ND	14	8
Base	10	16	-	21	9
0.5% CHX	16	16	14	19	20

จากตารางที่ 33 พบว่าเชื้อในกลุ่มแกรมบวกได้แก่ *S. aureus*, *S. agalactiae* และ *B. cereus* จะไวต่อน้ำยามากกว่าเชื้อแกรมลบโดยที่ความเข้มข้นของน้ำยาเมื่อเจือจางเป็น 3% สามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ได้ดีกว่า *B. cereus* และ *S. aureus* ในกลุ่มเชื้อที่เป็นแกรมลบพบว่าเชื้อจะทนต่อน้ำยาได้ดีกว่าแกรมบวก และ *E. coli* จะถูกยับยั้งได้ดีกว่า *Ps. aeruginosa* ทั้งนี้เนื่องมาจากเชื้อแกรมลบจะมีคุณสมบัติชอบน้ำมากกว่าเชื้อแกรมบวกทำให้สารออกฤทธิ์ซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำมันมากกว่าน้ำ ซึมผ่านเข้าไปในผนังเซลล์ได้ยากกว่าเป็นที่น่าสังเกตว่า *E. coli* ยาพื้นที่ยังไม่มีการเติมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้แกง และเมื่อเติมน้ำมันพบว่า inhibition zone ของ *E. coli* มี inhibition zone ไม่แตกต่างจากยาพื้น แสดงว่า ฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. coli* น่าจะมาจากยาพื้น เมื่อพิจารณาส่วนประกอบในยาพื้นพบว่า มี sodium lauryl sulphate (SLS) เป็นสารช่วยละลาย SLS จัดเป็น anionic surfactant ที่ความเข้มข้น 2% สามารถละลายผนังเซลล์ของ *E. coli* เหนียวนาให้ส่วนประกอบภายในเซลล์รั่วออกมา นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการย่อยสลายของ protoplast และยังทำให้ cell protein ถูก denatured ได้ และในตำรับยังมี sodium benzoate ซึ่งนอกจากจะเป็นสารกันเสียในตำรับแล้วยังสามารถเชื้อโดยยับยั้งการนำ amino และ oxo acids ใน *E. coli* และ *B. subtilis* (Russell and Chopra , 1990) อย่างไรก็ตามน้ำยาจุ่มหัวนมวัวนี้ทำลายเชื้อ *Ps. aeruginosa* ได้น้อยมาก ทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อชนิดนี้จะดื้อยาฆ่าเชื้อหลายชนิดมากกว่าเชื้อแกรมลบอื่น ๆ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีส่วนประกอบของ Lipopolysaccharides ที่ผนังเซลล์ต่างจากเชื้อแกรมลบอื่นทำให้น้ำยาฆ่าเชื้อไม่สามารถแพร่ผ่าน porins ของ *Ps. aeruginosa* (Russell and Chopra , 1990)

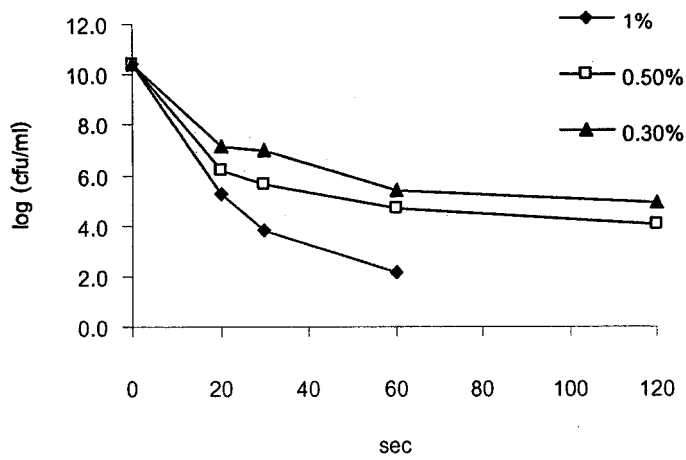
8.4 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของตำรับที่เวลาต่าง ๆ

เมื่อทำการศึกษาโดยการทำหายน้ำยาจุ่มหัวนมแม่วัวหลังเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเพื่อศึกษาอัตราการลดลงของเชื้อเมื่อสัมผัสกับตำรับที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยแสดงค่าเป็น D value ซึ่งหมายถึงระยะเวลาที่เชื้อที่เติมลงไปในตัวอย่างลดลง 90% ของจำนวนเชื้อตั้งต้น หรือ 1-log reduction ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 34 พบว่าน้ำยาจุ่มหัวนมเมื่อเจือจางให้มีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกง 1% เมื่อทำหายน

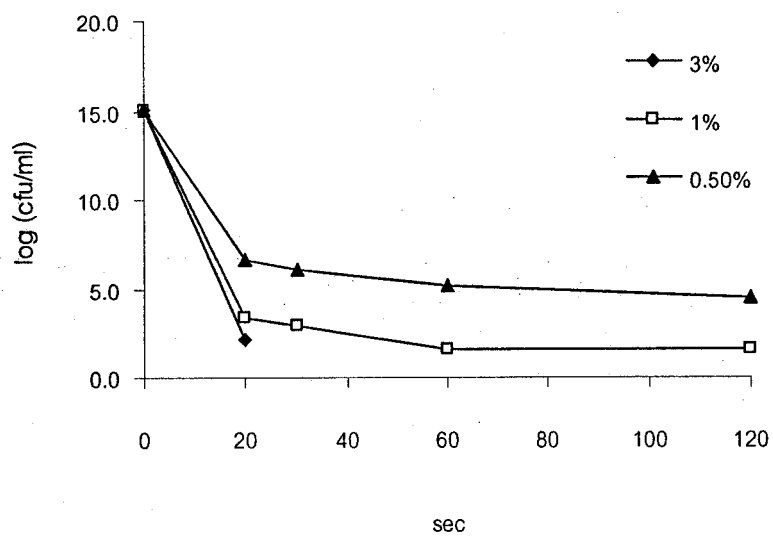
ด้วยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 18 ชม พบว่าในเชื้อกลุ่มที่เป็นแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* , *S. agalactiae* และ *B. cereus* เชื้อ *S. aureus* จะลดลง 90% เร็วที่สุดคือภายในเวลาเพียง 1.62 วินาที ขณะที่ *B. cereus* จะลดลงช้าที่สุดคือใช้เวลา 9.94 วินาทีแม้ว่าปริมาณของเชื้อตั้งต้นของ *B. cereus* (1.07×10^5 cfu/ml) จะน้อยกว่าทั้ง *S. aureus* (2.3×10^{14} cfu/ml) และ *S. agalactiae* (2.1×10^{15} cfu/ml) ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะเชื้อ *B. cereus* เป็นเชื้อแกรมบวก แท่ง ที่มีขนาดใหญ่ ที่สามารถสร้างสปอร์ป้องกันตัวไม่ให้สารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเข้าไปสัมผัสได้ง่าย ในขณะที่ *S. aureus* เป็นเชื้อแกรมบวกขนาดเล็ก ทำให้สารที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อเข้าไปสัมผัสได้ง่ายกว่า ขณะที่กลุ่มแกรมลบพบว่าเชื้อ *Ps. aeruginosa* จะลดลงเร็วกว่า *E. coli* แม้ว่าจะมีปริมาณเชื้อตั้งต้นของ *Ps. aeruginosa* (1.1×10^{15} cfu/ml) จะมากกว่า *E. coli* (2.7×10^{10} cfu/ml) ซึ่งผลที่ได้จะตรงข้ามกับการศึกษาโดยการหา inhibition zone ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อโดยการเติมเชื้อลงในน้ำยาจุ่มหัวนมที่เจออาจในความเข้มข้นที่ต่างกัน เชื้อจะสัมผัสกับน้ำยาโดยตรง ขณะที่การศึกษา inhibition zone เป็นการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยน้ำยาจะแพร่ผ่านวันก่อนที่เชื้อจะเจริญซึ่งเป็นกลไกในการป้องกันการเจริญของเชื้อ ซึ่งต้องมีสารยับยั้งในปริมาณที่สูงพอจึงจะเห็น inhibition zone ขณะที่การทำลายด้วยเชื้อเป็นการฆ่าเชื้อจากการสัมผัสโดยตรง (Lethal effect) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อโดยตรงขึ้นกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เดิม ความเข้มข้นของน้ำยาที่ใช้ ระยะเวลาที่เชื้อสัมผัสกับน้ำยา ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 5% เชื้อทุกชนิดไม่สามารถรอดชีวิตได้ในระยะเวลา 20 วินาที



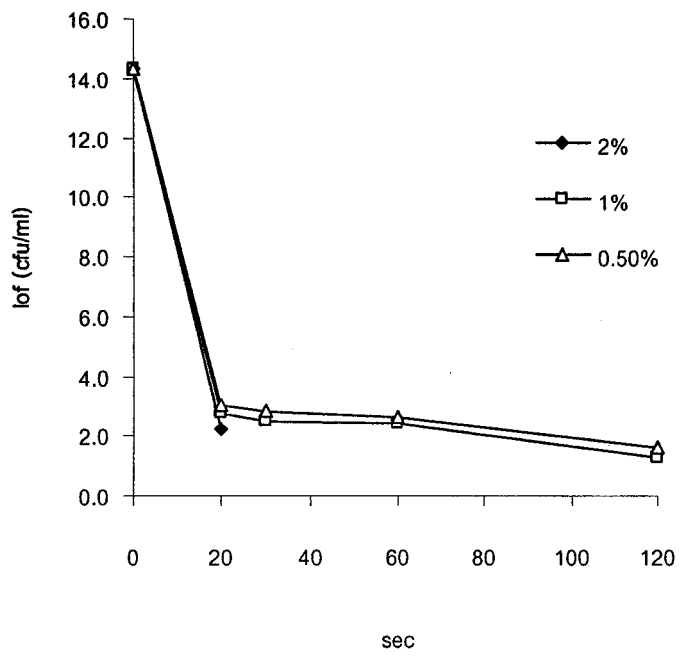
รูปที่ 15 ประสิทธิภาพของดาร์บในการฆ่าเชื้อ *S. aureus*



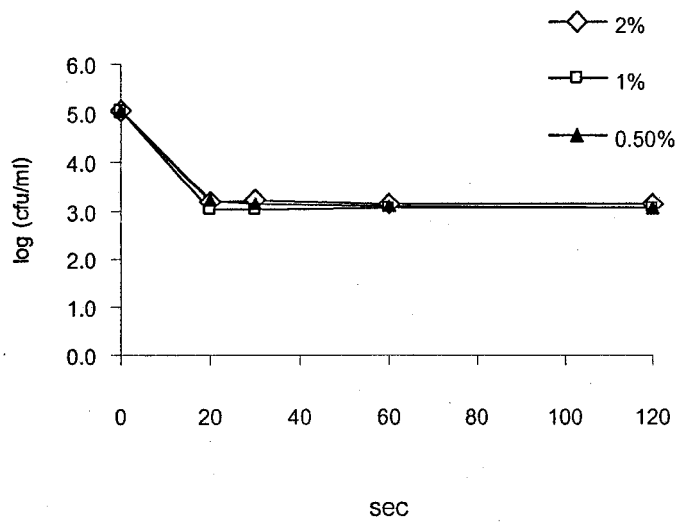
รูปที่ 16 ประสิทธิภาพของตำรับในการฆ่าเชื้อ *E. coli*



รูปที่ 17 ประสิทธิภาพของตำรับในการฆ่าเชื้อ *Ps. aeruginosa*



รูปที่ 18 ประสิทธิภาพของตัวรับในการฆ่าเชื้อ *Strep. agalactiae*



รูปที่ 19 ประสิทธิภาพของตัวรับในการฆ่าเชื้อ *B. cereus*

ตารางที่ 34 ค่า D value ของน้ำยาจุ่มหัวนมแม่วัวที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (% V/V)	D value (sec)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>B. cereus</i>
3	ND	ND	1.54	ND	ND
2	ND	ND	ND	1.65	1.08
1	1.62	3.83	1.71	1.73	9.94
0.5	2.10	4.69	2.38	1.76	11.16
0.3	2.89	6.12	ND	ND	ND

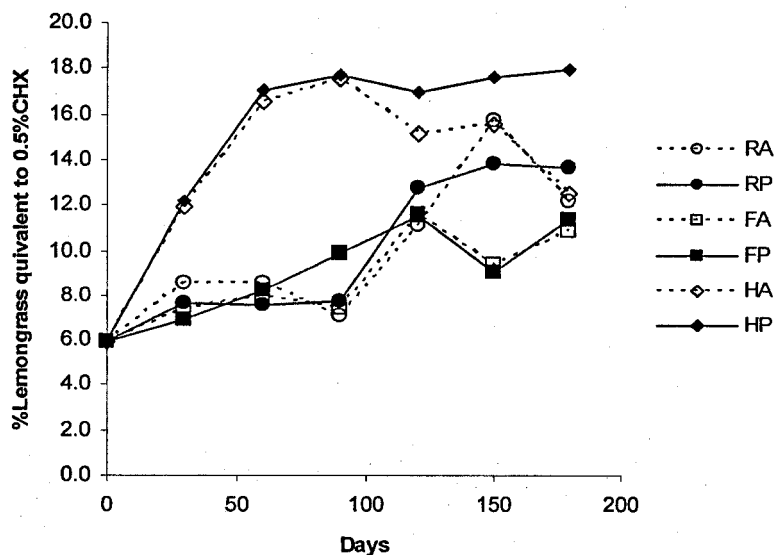
ND : ไม่ได้ทดสอบ

D value คือเวลาที่ใช้ในการทำให้เชื้อลดลง 90% จากปริมาณเชื้อตั้งต้นหรือ 1-log reduction

8.5 การศึกษาความคงตัวของน้ำยาจุ่มหัวนมแม่วัวโดยวิธี Agar diffusion method

เนื่องจากเชื้อที่ไวต่อดำรับเป็นเชื้อแกรมบวกทั้งหมด และการศึกษาเน้นประสิทธิภาพทางจุลชีววิทยาเป็นหลัก ดังนั้นจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของดำรับ โดยเปรียบเทียบ Inhibition zone ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำมาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นเทียบกับ inhibition zone ของ 0.5% CHX จากรูปที่ 20 แสดงให้เห็นว่าการเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นให้ผลในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* แตกต่างกันเล็กน้อย กล่าวคือตัวอย่างที่เก็บในสภาวะดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพลดลงเล็กน้อย ณ. อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างที่เก็บในขวดแก้วสีชา มีประสิทธิภาพลดลง 1.18 % ในขวดพลาสติกลดลง 1.80 % เมื่อเก็บในตู้เย็นตัวอย่างที่เก็บในขวดแก้วสีชา มีประสิทธิภาพลดลง 1.5% ในขวดพลาสติกลดลง 4% นาน 3 เดือน หลังจากนั้นประสิทธิภาพจะลดลงมากกว่าเดิมในเดือนที่ 4 ถึงเดือนที่ 6 ณ. อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างที่เก็บในขวดแก้วสีชา มีประสิทธิภาพลดลง 6.31 % ในขวดพลาสติกลดลง 7.8 % เมื่อเก็บในตู้เย็นตัวอย่างที่เก็บในขวดแก้วสีชา มีประสิทธิภาพลดลง 5.0% ในขวดพลาสติกลดลง 5.49% และ ณ. อุณหภูมิ 40°C จะส่งผลให้ประสิทธิภาพของตัวอย่างลดลงอย่างรวดเร็ว ในช่วง 2 เดือนแรกตัวอย่างที่เก็บในขวดแก้วสีชา มีประสิทธิภาพลดลง 8.33 % ในขวดพลาสติกลดลง 8.7 % และจะค่อนข้างคงที่ในเดือนที่ 3 ถึง 6 ตัวอย่างที่เก็บในขวดแก้วสีชา มีประสิทธิภาพลดลง 9.28 % ในขวดพลาสติกลดลง 11.62 % รูปที่ 21 ประสิทธิภาพของตัวอย่างต่อเชื้อ *Strep. agalactiae* พบว่าตัวอย่างทุกสภาวะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บไว้นาน 2 เดือน และ มีประสิทธิภาพลดลงหลังจากนั้น เป็นที่น่าสังเกตว่าที่ 40 °C ประสิทธิภาพจะเพิ่มขึ้นจาก 2.08% ไปเป็น 0.90 % สำหรับตัวอย่างในขวดแก้วสีชาและ 0.84% สำหรับตัวอย่างในขวดพลาสติกในเดือนที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ *Strep. agalactiae* ได้ดีที่สุดแล้วจึงเริ่มมีประสิทธิผลลดลงในเดือนที่ 3 ก่อนที่จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าความเข้มข้นเริ่มต้นจนถึงเดือนที่ 6 คือตัวอย่างในขวดแก้วสีชาลดลง 0.89 % ตัวอย่างในขวดพลาสติกลดลง 1.45% เมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง ตัวอย่างในขวดแก้วสีชา มีประสิทธิภาพดีที่สุดในเดือนที่ 2 และตัวอย่างจะมีประสิทธิภาพลดลงต่ำกว่าช่วงเริ่มต้นในเดือนที่ 4 ถึง 6 โดยในเดือนที่ 6 ประสิทธิภาพลดลงเทียบกับเริ่มต้นคิดเป็น 0.72% สำหรับตัวอย่างในขวดพลาสติกจะมีประสิทธิภาพดีที่สุดในเดือนที่ 1 และตัวอย่างจะมีประสิทธิภาพลดลงต่ำกว่าช่วงเริ่มต้นในเดือนที่ 4 ถึง 6 โดยในเดือนที่ 6 ประสิทธิภาพลดลงเทียบกับเริ่มต้นคิดเป็น 0.93% เมื่อเก็บตัวอย่างในตู้เย็นพบว่าตัวอย่างในขวดแก้วสีชาจะมีประสิทธิภาพดีที่สุดในเดือนที่ 1 และประสิทธิภาพจะลดลงมากกว่าวันเริ่มต้นในเดือนที่ 4 ถึง 6 โดยในเดือนที่ 6 ประสิทธิภาพลดลงเทียบกับเริ่มต้นคิดเป็น 0.41 % เช่นเดียวกับตัวอย่างในขวดพลาสติก และประสิทธิภาพจะลดลงมากกว่าวันเริ่มต้นในเดือนที่ 3 ถึง 6 โดยในเดือนที่ 6 ประสิทธิภาพลดลงเทียบกับ

เริ่มต้น คิดเป็น 0.51 % รูปที่ 22 เมื่อนำตัวอย่างไปทดสอบกับเชื้อ *B. cereus* โดยภาพรวมพบว่าเมื่อเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เย็นและอุณหภูมิห้องประสิทธิภาพจะแกว่งโดยมีค่าต่ำสุดที่ 2.29 และสูงสุดที่ 4.48 % ในระยะเวลา 0-6 เดือน ในขณะที่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 40 °C พบว่าตัวอย่างที่บรรจุในภาชนะบรรจุที่เป็นขวดแก้วสีชาจะมีประสิทธิภาพดีกว่าขวดพลาสติก โดยประสิทธิภาพของน้ำยาต่อเชื้อจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทั้งนี้ประสิทธิภาพโดยเฉลี่ยระหว่างเดือนที่ 3 ถึงเดือนที่ 6 ของตัวอย่างในขวดแก้วสีชาลดลง 2.95% และ ของตัวอย่างในขวดพลาสติกลดลง 4.67% จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นว่าถ้าหากกำหนดให้เจือจางน้ำยาให้มีความเข้มข้นของน้ำมันตะไคร้แกง 5% น้ำยาที่เตรียมขึ้นสามารถฆ่าเชื้อ *Strep. agalactiae* และเก็บได้นานอย่างน้อย 6 เดือน แม้ในที่ๆ มีอุณหภูมิสูงถึง 40 °C และเมื่อเก็บในตู้เย็น หรือที่อุณหภูมิห้อง สามารถฆ่าเชื้อ *B. cereus* ได้นานอย่างน้อย 6 เดือน แต่ถ้าหากเก็บที่ อุณหภูมิสูงถึง 40 °C ประสิทธิภาพของน้ำยาจะลดต่ำลง อย่างไรก็ตามน้ำยาจุ่มหัวนมที่เตรียมจากน้ำมันตะไคร้แกงจะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ได้ลดลงและจะเสื่อมสลายอย่างรวดเร็วแม้เก็บไว้ในตู้เย็น โดยเฉพาะในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ๆ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *S. aureus* สามารถปรับตัวและดื้อต่อน้ำมันตะไคร้แกงได้ ทั้งนี้ต้องทำการศึกษาต่อไป อีกสาเหตุหนึ่งซึ่งอาจเป็นไปได้คือ การสลายตัวของน้ำมันตะไคร้แกงโดยกระบวนการ hydrolysis และ oxidation ดังที่แสดงในตารางที่ 39 ทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลงจากการศึกษาที่สรุปได้ว่าอุณหภูมิ ภาชนะบรรจุ มีผลต่อประสิทธิภาพของน้ำยาจุ่มหัวนมโดยพบว่าตัวอย่างที่บรรจุในขวดพลาสติกจะมีประสิทธิภาพลดลงมากกว่าที่บรรจุในขวดแก้วสีชาและจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีได้อย่างชัดเจนในเดือนที่ 6 กล่าวคือตัวอย่างในขวดพลาสติกจะมีสีเข้มกว่าตัวอย่างที่บรรจุในขวดแก้วสีชา และพบว่าที่ 40 °C ตัวอย่างที่บรรจุในภาชนะจะเริ่มแยกชั้นในเดือนที่ 2 ในขณะที่ตัวอย่างที่เก็บในตู้เย็น และที่อุณหภูมิห้องไม่มีการแยกชั้น แต่สีของตัวอย่างจะเข้มข้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น ตารางที่ 38 แสดงการเปลี่ยนแปลง pH ของตัวอย่าง ซึ่งพบว่าตัวอย่างมีแนวโน้มที่จะมีความเป็นกรดมากขึ้นเมื่อเก็บไว้นานขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 °C อย่างไรก็ตามมีการเปลี่ยนแปลงที่น้อยมากโดยตัวอย่างที่บรรจุในขวดแก้วสีชา มี pH ลดลงเพียง 0.29 และ ตัวอย่างที่บรรจุในขวดพลาสติกลดลงเพียง 0.26 หน่วย สำหรับอุณหภูมิห้องที่เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 5 เท่ากับ 26.7 ± 2.6 °C

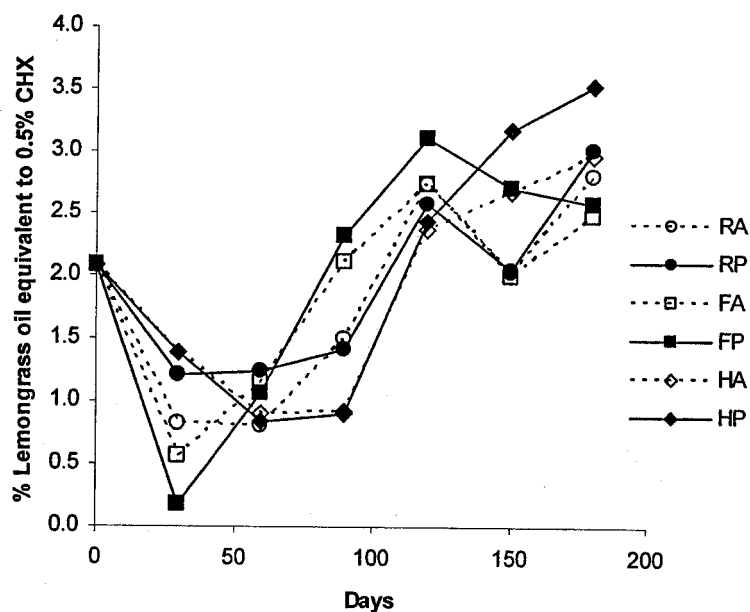


รูปที่ 20 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *S. aureus* ของตัวอย่างที่สภาวะต่างๆ;

RA: ขวดแก้วสีชาเก็บที่อุณหภูมิห้อง; RP: ขวดพลาสติกทึบแสงเก็บที่อุณหภูมิห้อง; FA: ขวดแก้วสีชาเก็บในตู้เย็น; FP: ขวดพลาสติกทึบแสงเก็บในตู้เย็น; HA: ขวดแก้วสีชาเก็บที่อุณหภูมิ 40 °C; HP: ขวดพลาสติกทึบแสงเก็บที่อุณหภูมิ 40 °C

ตารางที่ 35 %v/v ของน้ำมันตะไคร้ในตำรับที่เก็บในภาชนะต่างๆ เมื่อเทียบกับ 0.5% CHX เมื่อทดสอบการฆ่าเชื้อ *S. aureus*

วัน	อุณหภูมิห้อง		ตู้เย็น		40 °C	
	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก
0	5.90	5.90	5.90	5.90	5.90	5.90
30	8.54	7.66	7.39	6.93	11.92	12.19
60	8.58	7.58	7.97	8.20	16.54	17.00
90	7.08	7.70	7.40	9.90	17.55	17.66
120	11.14	12.78	11.58	11.49	15.12	16.92
150	15.73	13.83	9.42	9.08	15.53	17.57
180	12.21	13.70	10.90	11.39	12.53	17.92

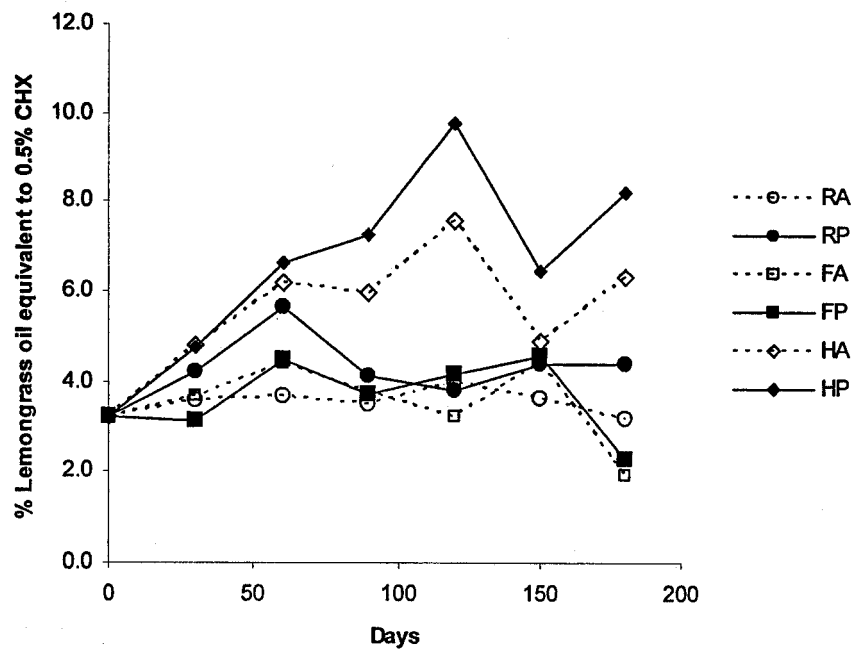


รูปที่ 21 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *Strep. agalactiae* ของตัวอย่างที่สภาวะต่างๆ;

RA: ขวดแก้วสีชาเก็บที่อุณหภูมิห้อง; RP: ขวดพลาสติกทึบแสงเก็บที่อุณหภูมิห้อง; FA: ขวดแก้วสีชาเก็บในตู้เย็น; FP: ขวดพลาสติกทึบแสงเก็บในตู้เย็น; HA: ขวดแก้วสีชาเก็บที่อุณหภูมิ 40 °C; HP: ขวดพลาสติกทึบแสงเก็บที่อุณหภูมิ 40 °C

ตารางที่ 36 %v/v ของน้ำมันตะไคร้ในตำรับที่เก็บในภาชนะต่างๆ เมื่อเทียบกับ 0.5% CHX เมื่อทดสอบการฆ่าเชื้อ *Strep. agalactiae*

วัน	อุณหภูมิห้อง		ตู้เย็น		40 °C	
	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก
0	2.08	2.08	2.08	2.08	2.08	2.08
30	0.83	1.21	0.56	0.18	1.39	1.39
60	0.81	1.24	1.14	1.07	0.90	0.84
90	1.50	1.42	2.12	2.32	0.92	0.91
120	2.74	2.58	2.75	3.11	2.36	2.43
150	2.03	2.04	2.01	2.72	2.68	3.18
180	2.80	3.01	2.49	2.59	2.97	3.53



รูปที่ 22 ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *B. cereus* ของตัวอย่างที่สภาวะต่างๆ;

RA: ขวดแก้วสีชาเก็บที่อุณหภูมิห้อง; RP: ขวดพลาสติกทึบแสงเก็บที่อุณหภูมิห้อง; FA: ขวดแก้วสีชาเก็บในตู้เย็น; FP: ขวดพลาสติกทึบแสงเก็บในตู้เย็น; HA: ขวดแก้วสีชาเก็บที่อุณหภูมิ 40 °C; HP: ขวดพลาสติกทึบแสงเก็บที่อุณหภูมิ 40 °C

ตารางที่ 37 %v/v ของน้ำมันตะไคร้ในตำรับที่เก็บในภาชนะต่างๆ เมื่อเทียบกับ 0.5% CHX เมื่อทดสอบการฆ่าเชื้อ *B. cereus*

วัน	อุณหภูมิห้อง		ตู้เย็น		40 °C	
	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก
0	3.23	3.23	3.23	3.23	3.23	3.23
30	3.57	4.21	3.66	3.13	4.78	4.74
60	3.66	5.63	4.38	4.48	6.20	6.63
90	3.49	4.14	3.74	3.71	5.95	7.24
120	4.00	3.79	3.24	4.17	7.56	9.75
150	3.61	4.40	4.42	4.58	4.88	6.43
180	3.17	4.41	2.45	2.29	6.32	8.20

ตารางที่ 38 การเปลี่ยนแปลง pH ของตัวอย่างต่อเวลา

วัน	อุณหภูมิห้อง		ตู้เย็น		40 °C	
	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก	ขวดสีชา	ขวดพลาสติก
0	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
30	3.02	2.92	2.94	3.00	2.93	2.95
60	3.06	3.01	3.02	3.05	3.09	3.02
90	2.93	2.95	2.84	2.91	2.93	2.82
120	3.00	2.98	2.84	3.00	2.98	2.85
150	2.94	2.98	2.78	2.94	2.98	2.79
180	2.96	3.00	2.72	2.93	2.94	2.74

8.6 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของน้ำมันตะไคร้แกง

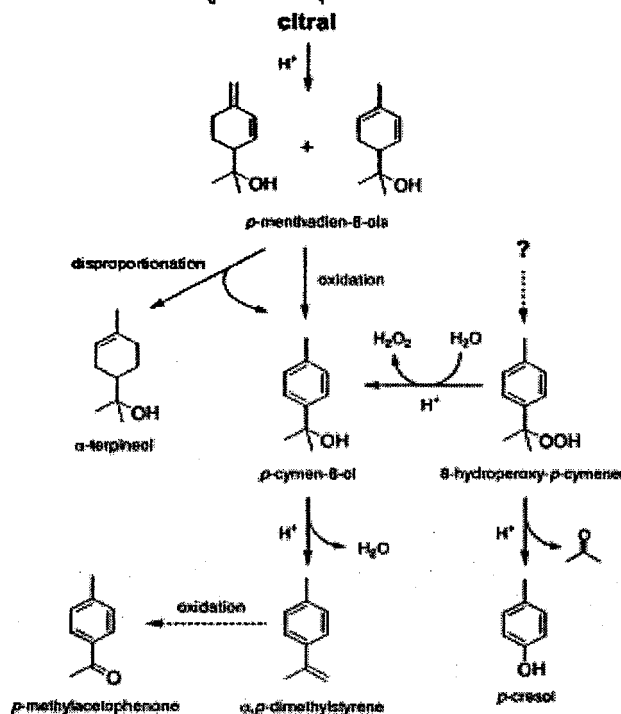
จากการศึกษาลักษณะของ GC chromatogram ของน้ำมันตะไคร้แกงพบว่ามี citral เป็นองค์ประกอบหลักและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีที่สุด (ตารางที่ 15) เมื่อนำไปอบที่ 40 °C พบว่าปริมาณขององค์ประกอบในน้ำมันตะไคร้แกงลดต่ำลงค่อนข้างมาก (ตารางที่ 39) ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจาก citral เป็นสารที่ไม่คงตัวเสื่อมสลายได้ง่ายโดยกระบวนการ cyclization และ oxidation โดยเฉพาะในสภาวะที่เป็นกรด (Braines, 1970; Slater and Walkins, 1964; Clark, 1977; Clark and Chamblee, 1992 cited in US patent 6,638,555 B2) ซึ่งตำรับที่พัฒนาขึ้นมี citric acid เป็นสาร chelating agent และปรับ pH เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ ทำให้อัตราการเกิด cyclization เป็นไปอย่างรวดเร็วในสภาวะเป็นกรด และอุณหภูมิสูง ๆ นอกจากนี้ในตำรับจะมี BHT เป็นสารต้านออกซิเดชันก็ตาม Kimura et al (1983) รายงานว่าสารต้านออกซิเดชันในกลุ่มที่ออกฤทธิ์โดย เป็น free radical terminators หรือ true antioxidants ทุกตัวไม่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของ citral ได้ อย่างไรก็ตาม Peacock and Kuneman (1985) รายงานว่าการเติม isoascorbic acid ซึ่งเป็น oxygen scavenger สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ แต่สลายตัวได้ง่ายในน้ำ ดังนั้นตำรับที่พัฒนาขึ้นควรปรับเปลี่ยนส่วนประกอบในตำรับโดยเอา citric acid ออก และอาจเปลี่ยนเป็นสารต้านออกซิเดชันกลุ่มอื่น เช่น โดยเปลี่ยน BHT เป็น oxygen scavenger อื่น เช่น sodium sulfite, sodium metabisulfite, sodium bisulfite แทน จากข้อมูลสิทธิบัตร US patent 6, 638,555 B2 พบว่าสารที่สามารถทำให้ citral คงตัวได้ดี โดยการป้องกันการเกิดสารที่ทำให้กลิ่นตะไคร้แกงเปลี่ยน หรือ p-methylacetophenone ด้วยสารสกัดจากสมุนไพรที่มี caffeic acid derivative เช่น rosmarinic acid ดังนั้นการเติมสารสกัดที่ละลายน้ำและมีส่วนประกอบเป็น rosmarinic acid อาจช่วยทำให้ตำรับมีความคงตัวมากขึ้นในสภาวะที่เป็นกรด pH 2.8 ทั้งนี้ต้องทำการทดสอบต่อไป เกี่ยวกับภาชนะบรรจุพบว่าภาชนะบรรจุที่เป็นพลาสติกมีแนวโน้มในการทำให้ประสิทธิภาพของตำรับลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากออกซิเจนสามารถซึมผ่านพลาสติกที่ใช้ ทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดออกซิเดชันได้มากขึ้น

ตารางที่ 39 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันตะไคร้แกง

Retention time (min)	Key components	% Composition of key component in 5 µl/ml of lemongrass oil		
		Day 0	Day 30	Day 60
2.59	Myrcene	1.26	0.68	1.72
3.44	Citronellal	1.14	0.99	0.32
4.04	Linalool	1.42	1.37	1.13
4.87	b-citral	32.52	23.20	28.27
4.98	Geraniol	4.13	3.49	2.01
5.18	a-citral	44.46	32.96	21.31
6.44	Geranyl acetate	1.28	-	1.65

จากตารางที่ 39 พบว่าเมื่อเก็บน้ำมันตะไคร้แกงที่ 40°C ปริมาณองค์ประกอบของสารสำคัญมีการเปลี่ยนแปลง โดยสารทุกตัวมีปริมาณลดลงเมื่อเก็บไว้นาน 30 วัน และเมื่อเก็บนาน 60 วันพบว่ามี myrcene และ b-citral มีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วนสารที่เหลือมีปริมาณลดลง ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจาก citral เป็นสารที่ไม่คงตัว เสื่อมสลายได้ง่ายโดยกระบวนการ cyclization และ oxidation โดยเฉพาะในสภาวะที่เป็นกรด (Braines, 1970; Slater and Walkins, 1964; Clark, 1977; Clark and Chamblee, 1992 cited in US patent 6,638,555 B2) ทำให้สารในกลุ่ม aldehydes เปลี่ยนไปเป็นสารในกลุ่ม alcohols หรือสารในกลุ่มอื่นดังแสดงในกระบวนการสลายตัวของ citral ในสภาวะที่เป็นกรด (รูปที่ 23) นอกจากนี้ citral ยังถูก hydrolyzed ที่ pH

4 (half-life time: Neral:9.5 วัน geranial :9.81 วัน) ที่ pH 9 (half-life time: Neral:30.1 วัน geranial :22.8 วัน) และสลายตัวอย่างช้า ๆ โดยถูก hydrolyzed ที่ pH 7(half-life time: Neral: 230 วัน geranial :106 วัน) (OECD SID :citra) ซึ่งควรมีการศึกษาถึงผลของสารต้านออกซิเดชันต่อความคงตัวของ citral ต่อไป นอกจากนี้อาจต้องเปลี่ยนรูปแบบยาจุ่มเต้านมเป็นชนิดผงละลายน้ำก่อนใช้เพื่อลดปัญหา hydrolysis



รูปที่ 23 กระบวนการการเกิด p-Cresol และ p-Methylacetophenone และสาร Oxidation products ที่ได้จาก citral ในสภาวะที่เป็นกรด (Ueno et al, 2004)

สรุปผล

จากการศึกษาฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบที่แยกจากน้ำนมสดจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *Strep. agalactiae*, *B. cereus*, *E. coli* และ *Ps. aeruginosa* ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ น้ำมันกระเพรา น้ำมันโหระพา น้ำมันมะกรูด น้ำมันพลู น้ำมันขมิ้นชัน น้ำมันไพล น้ำมันตะไคร้แกง และ น้ำมันตะไคร้หอม พบว่า น้ำมันที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือน้ำมันตะไคร้แกง โดยน้ำมันทุกชนิดไม่สามารถฆ่าเชื้อ *Ps. aeruginosa* ได้ องค์ประกอบในน้ำมันตะไคร้แกงที่สามารถฆ่าเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบได้ดีคือ citral องค์ประกอบอื่น รองลงมาได้แก่ geraniol และ linalool ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ *Ps. aeruginosa* จะทนต่อสารที่นำมาทดสอบทุกชนิด เมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าน้ำมันใบพลูมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแรงที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันกระเพรา และน้ำมันตะไคร้หอม ส่วนน้ำมันตะไคร้แกงออกฤทธิ์ได้ดีในอันดับที่ 6 โดยน้ำมันจากผลมะกรูดมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่ำที่สุด เมื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบในหนูทดลองโดยใช้ ear edema model พบว่า ตะไคร้หอม กระเพรา และพลูเสริมการบวม น้ำมันไพลจะให้ผลดีเมื่อใช้ในความเข้มข้นที่สูง ขมิ้นชัน โหระพา ลดบวมเล็กน้อยที่ความเข้มข้นสูง ส่วนมะกรูด ตะไคร้แกง ไม่มีฤทธิ์ในการลดบวมและไม่เสริมการบวมเมื่อทาครั้งเดียว เมื่อนำน้ำมันตะไคร้แกงมาพัฒนาตำรับพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อขึ้นกับชนิดของเชื้อ pH ของตำรับ ปริมาณอิเล็กโทรไลต์ ชนิดของสารก่ออิมัลชัน ภาชนะบรรจุ โดยพบว่าตำรับที่มีความคงตัวทางกายภาพดีจะมี pH เป็นกรด และออกฤทธิ์ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเติมเกลือลงในตำรับ ทั้งนี้สารที่สามารถทำให้สารละลายมีลักษณะใสคือสารลดแรงตึงผิว sodium lauryl sulfate และ cetomacrogol 1000 และภาชนะบรรจุที่สามารถป้องกันการสลายตัวของน้ำมันด้วยแสงคือขวด

แก้วสีชา โดยเมื่อนำไปทดสอบหาประสิทธิภาพในการทำให้จำนวนเชื้อลดลง 90% พบว่าตำรับที่เตรียมขึ้นสามารถฆ่าเชื้อทุกชนิดได้ในความเข้มข้นที่ต่ำและระยะเวลาอันสั้น อย่างไรก็ตามเมื่อนำตำรับมาทดสอบความคงตัวทางจุลชีววิทยาพบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นตำรับจะมีประสิทธิภาพลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า citral ในตำรับมีการสลายตัวทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลง และนอกจากนี้องค์ประกอบอื่นในน้ำมันตะไคร้ก็ยังมีการเปลี่ยนแปลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอีกด้วย

โดยสรุปน้ำยาจุ่มหัวนมแมวว์ที่เตรียมขึ้นยังมีปัญหาในด้านความคงตัวทางชีวภาพและเคมี ทำให้เก็บน้ำยาได้ไม่นานแม้ว่าจะเก็บในที่เย็นก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากจากการสลายตัวของ citral ซึ่งเป็นสารในกลุ่มอัลดีไฮด์ ด้วยปฏิกิริยา oxidation และ hydrolysis ดังนั้นอาจจำเป็นต้องศึกษาหา antioxidants ที่เหมาะสมมาช่วยทำให้น้ำมันมีความคงตัวมากขึ้น และหลีกเลี่ยงการใช้น้ำในตำรับโดยเตรียมเป็นรูปผงแห้งที่ละลายน้ำก่อนนำไปใช้เพื่อลดปัญหา hydrolysis ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- มุกดา จิตต์เจริญธรรม (2546) วิธีการทดสอบฤทธิ์ยาแก้อักเสบ (Screening method for anti-inflammatory drugs) เรื่องวิธีเหนี่ยวนำหูหนวกด้วยน้ำมันโครตอน (Croton oil induced ear edema in rats) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ณัฐจิยา พงศ์ผาสุก (2546) วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชภัณฑ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เรื่องการพัฒนาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบเพื่อใช้เป็นยาทาภายนอก
- ศีลธรรม วราอศวปติ, กิตติกรณ เจนไพบูลย์, จารัส ภักดี (2540) การศึกษาการแก้ไข้ปัญหาโรคเต้านมอักเสบชนิดไม่แสดงอาการในโคนมจังหวัดขอนแก่น วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 7(1):16-23.
- รุ่งเจริญ กาญจนมัย, กิติ ศรีสุภาพ, สมุท สิริเวชพันธุ์, ประจิตต์ บุญยมณี, มาลินี ลิ้มโกคา , สุวิชัย โจนเสถียร, ศิริชัย วงษ์นาคเพชร (2529). "มาตรการการป้องกันและกำจัดโรคเต้านมอักเสบในโคนม." วารสารสัตวแพทย์ 7 (1): 1-12.
- Bank VR, Bailey DT, van Leersum JT - **US Patent 6,638,555**, 2003
- Dickenson LD, Ferguson JA, Cashman D US patent 5047234, 1991.
- Dorman HJD and Dean SG. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils, Journal of Applied Microbiology, 88:308-316.
- Duarte MCT, Leme EE, Delarmelina C, Soares AA, Figueir GM and Sartoratto A (2007) Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*, Journal of Ethanopharmacology, 111:197-201.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, Journal of Applied Microbiology 86:985-990.
- Inouye S, Takizawa T. Yamaguchi H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. Journal Of Antimicrobial Chemotherapy 47 565-574
- Jayaprakasha G K, Jena B S , Negi P S, Sakariah K K 2002. Evaluation of Antioxidant Activities and Antimutagenicity of Turmeric Oil: A Byproduct from Curcumin Production. Z. Naturforsch. 57:828-835.
- Jeenapongsa R, Yoovathaworn K, Sriwatanakul KM, Pongprayoon U, Sriwatanakul K. 2003. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. Journal of Ethanopharmacology 87:143-148.

- King RE (1984). Dispensing of medication. Pennsylvania, Mack Publishing Company.
- Mim C, Dockrell HM, Goering, RV, Roitt I, Wakelin D, Zuckerman M. (2004) Medical microbiology 3rd edition, Edinburgh:Elsevier Mosby.
- OECD SID :Citral UNEP publication not dated.
- Paula ACB, Hayashi, LSS, Freitas, JC. 2003. Anti-inflammatory and antispasmodic activity of *Ipomea imperati* Zvahl) Griseb (Convolvulaceae). Brazilian Journal of Medical and Biological Research 36:105-112.
- Perez-Garcia F, Martin E, Canigueral S, Adzet T 1996. Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis*: Involvement of an antioxidant mechanism. Life Sciences 59:2033-2040.
- Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, Serra G, Pippia SP, Moretti MDL. 2002 Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. Phytomedicine 9:721-726.
- Raina K, Srivastava S. K. , Jain N, Ahmad A, Syamasundar K. V. , Aggarwal K. K. 2002. Essential oil composition of *Curcuma longa* L. cv. Roma from the plains of northern India. Flavour and Fragrance Journal 17:99-102.
- Roberts JD, Caserio MC. (1965). Basic principles of organic chemistry. New York: , WA Benjamin Inc.
- Russell AD and Chopra I. (1990) Understanding antibacterial action and resistance. New York: Eliis Horwood.
- Nakahara K. , Alzoreky N. S. Yoshihashi T. Nguyen H. T. T. Trakoontivakorn G 2003. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). Japan Agricultural Research Quarterly 37:249-252.
- Shahidi F, Wanasundara PKJPD. (1992). "Phenolic antioxidants." Critical Reviews Food Science and Nutrition 32: 67-103.
- Sheen LY, Ou YHT , Tsai SJ (1991). "Flavor characteristic compounds found in the essential oil of *Ocimum basilicum* L. with sensory evaluation and statistical analysis." Journal of Agricultural and Food Chemistry 39: 939-943.
- Ueno T, Masuda H, Ho, C. (2004) Formation mechanism of p-Methylacetophenone from citral via a tert-Alkoxy radical intermediate. Journal Agricultural Food Chemistry 52:5677-84.
- Viyoch, J., Pisutthanan, N.; Faikreua, A.; Nupangta, K.; Wangtorpol, K.; Ngokkuen, J. (2006). "Evaluation of in vitro antimicrobial activity of Thai basil oils and their micro-emulsion formulas against *Propionibacterium acnes* " International Journal of Cosmetic Science 28(2): 125-133.