



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อยที่ 7

“การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะกูดและ
น้ำมันใบมะกูด เพื่อป้องกันฟันผุ และบรรเทาอาการไอ/เจ็บคอ
ที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย”

โดย

นาง วิมล ศรีสุข และคณะ

พ.ศ. 2555

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อยที่ 7

“การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะกูดและ
น้ำมันใบมะกูด เพื่อป้องกันฟันผุ และบรรเทาอาการไอ/เจ็บคอ
ที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย”

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. นาง วิมล ศรีสุข	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. นาง วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. นาง มัลลิกา ชมนาวัง	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
4. นาง วิณา นุกุลการ	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
5. นาง สมพร ศรีเฟื่องฟู	คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
6. นางสาว เข้มทอง มิตรกุล	คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
7. นางสาว วัลลา ตั้งรักษาสัตย์	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
8. นาย จินตกร คูวัฒนสุชาติ	คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
9. นาย สมหมาย ขอบอิสระ	คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด เพื่อป้องกันฟันผุ และบรรเทาอาการไอ/เจ็บคอที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย” เป็นโครงการย่อยที่ 7 ในชุดโครงการ ของ ศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาพืชพื้นเมือง ซึ่งเกิดขึ้นในปี พ.ศ. 2552 จากความร่วมมือของ สำนักงาน กองทุนสนับสนุนการวิจัย โดย ศาสตราจารย์ ดร. สวัสดิ์ ตันตระรัตน์ ผู้อำนวยการ สกว. และ รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์จรัส เชี่ยวเดชะ ผู้อำนวยการฝ่ายเกษตร และมหาวิทยาลัยมหิดล โดย ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ปิยะสกล สกลสัตยาทร อธิการบดี และ ศาสตราจารย์ ดร. ศันสนีย์ ไซโรจน์ รองอธิการบดีฝ่ายวิจัย ที่ได้เล็งเห็นความสำคัญของงานวิจัยในส่วนที่เกี่ยวกับพืชพื้นเมือง จากแนวคิดริเริ่มของ ศาสตราจารย์ ดร. นันทวัน บุญยะประภัศร และการสนับสนุนของ รองศาสตราจารย์ ดร. จุฑามณี สุทธิสีสังข์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ ดังนั้นการดำเนินการของโครงการวิจัยนี้จึงได้เกิดขึ้นได้โดยการสนับสนุนของทุกท่าน คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้ให้เล็งเห็นความสำคัญของโครงการและให้โอกาสผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยดังกล่าวจนลุล่วง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์จรัส เชี่ยวเดชะ ศาสตราจารย์ ดร. ศันสนีย์ ไซโรจน์ ดร. สุวีรัตน์ ประจักษ์ธรรม รองศาสตราจารย์ ดร. จุฑามณี สุทธิสีสังข์ ที่ได้กรุณารับฟังการนำเสนอความก้าวหน้าของโครงการวิจัยและให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ในการปรับปรุงการดำเนินการวิจัยมาโดยตลอดระยะเวลา 2 ปีของการดำเนินการ ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิผู้ประเมินโครงการวิจัยซึ่งได้ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงรายงานและการดำเนินการวิจัยในขั้นตอนต่อไป

ในการดำเนินการวิจัย คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คณบดีคณะเภสัชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการดำเนินการวิจัย ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง รวงผึ้ง สุทเธนทร์ หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้กรุณาอนุญาตให้ใช้ เชื้อแบคทีเรียที่เหลือทิ้งจากการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ รองศาสตราจารย์ รัชพิน ศรีสังกะสิทธิ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้เอื้อเฟื้อเครื่องมือที่จำเป็นในการวิจัย ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ นพ. ภัทรชัย กิริตสิน นางสาว ไสภิดา คำรัมย์ นางสาว ศิวิมล ภูมินิยม นางสาว ศิริรัตน์ เชิญผึ่ง นายกานต์ วงสาริยะ นางสาว เพ็ญญา เจริญวิวัฒนกิจ นางสาว ณภัทร ตั้งแสงวิทย์ นาย ฐาปกรณ์ ไตรยะวิภาต นางสาว กฤตติยา ไชยนอก นางสาว ดารวี ศิริพรหม นางสาว วิไลวรรณ ทองใบน้อย นางสาว วันเพ็ญ ชินเฮง นางสาว ศิริขวัญ ทิพรรัตน์ นายจรัส นับเนื่องทรัพย์ ฯลฯ สำหรับความช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการต่างๆ และ นางสุชาดา ทัฒลาภา สำหรับความช่วยเหลือโดยทั่วไป

ทุกๆขั้นตอนตั้งแต่ก่อนเริ่มการเขียนข้อเสนอโครงการ ต่อเนื่องไปจนถึงการเริ่มดำเนินการ และในระหว่างการดำเนินการโครงการวิจัย ปัญหา อุปสรรค ที่เกิดขึ้น คำแนะนำในการดำเนินการเพิ่มเติม ที่ทำให้การดำเนินการของโครงการเป็นไปได้อย่างดี ด้วยคำแนะนำและการแก้ปัญหาของ ศาสตราจารย์ ดร. นันทวัน บุญยะประสงค์ ซึ่งหากปราศจากความช่วยเหลือและคำแนะนำดังกล่าว โครงการวิจัยจะไม่สามารถเกิดขึ้นและดำเนินไปได้อย่างดี ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

โครงการนี้เปรียบเสมือนการสานต่อฝันจากโครงการวิจัยย่อยๆหลายโครงการ ที่เริ่มดำเนินการมาด้วยเงินทุนอันจำกัด ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2542 หัวหน้าโครงการวิจัยขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่ได้กรุณาร่วมมือร่วมแรง ดำเนินการวิจัย ฝ่าฟันอุปสรรคและปัญหาที่เกิดขึ้น รวมทั้งเพิ่มเติมนงานวิจัยในส่วนที่มีการร้องขอ ในบางครั้งผู้ร่วมวิจัยเป็นผู้ริเริ่มขอดำเนินการเพิ่มเติมด้วยตนเองโดยมิได้มีการร้องขออีกด้วย ดังนั้นจากการร่วมมือร่วมแรงของทุกๆท่านในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์จริงเพื่อสุขภาพของประชาชน ผลิตภัณฑ์ที่เป็นรูปธรรมจึงได้เกิดขึ้น เห็นภาพฝันที่เป็นจริงได้ชัดเจนจากโครงการวิจัยนี้

Executive Summary

การศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์ capsule จีว และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด และน้ำมันใบมะกรูด สำหรับใช้ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ (*Streptococcus mutans* และอื่นๆ) และที่ทำให้เกิดการไอและเจ็บคอ (Gr. A streptococci และอื่นๆ)

น้ำมันหอมระเหย การวิเคราะห์โดย GC-MS พบว่า สารสำคัญหลักในน้ำมันมะกรูด คือ 1-Limonene (40.65%) รองลงมา คือ Terpinene-4-ol (13.71%) และ Alpha-Terpineol (13.20%) สำหรับ สารสำคัญหลักในน้ำมันใบมะกรูด คือ Citronellal (80.04%) น้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดแสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดีต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ

การศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ได้สูตรตำรับน้ำมันเป็น oil-based 6 สูตรตำรับ ซึ่งประกอบด้วย น้ำมันมะกรูด (5, 5, 10 %w/w) หรือ น้ำมันใบมะกรูด (5 %w/w ในทั้ง 3 สูตร), Spearmint oil, Peppermint oil, Menthol, Sunflower oil แสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดีต่อเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ สามารถนำสูตรมาบรรจุเป็นผลิตภัณฑ์ capsule จีว ในรูป soft gelatin capsule ในขนาด 80 มิลลิกรัม แต่เปลือก capsule ไม่อ่อนนุ่มเท่าผลิตภัณฑ์ capsule จีวที่มีจำหน่ายทางการค้า (Jintan) และละลายยากกว่า การศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิ 4, 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 75% Relative Humidity พบว่าปริมาณสารสำคัญลดลงมากที่สุดที่ 0, 1, 2 เดือน และลดลงไปอีกที่ 6 และ 14 เดือน การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ มีปัญหาเกิดการแยกชั้นส่วนน้ำมันและส่วนน้ำ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ แสดงฤทธิ์ที่ไม่แรงในการทดสอบใน Gr. A streptococci, *S. pneumoniae* ATCC 49619, และ *S. aureus* ATCC 29213 แต่แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อที่ดีกว่าต่อ *H. influenzae* ATCC 49247 ส่วนที่ 1, 2 เดือน พบว่า ฤทธิ์ลดลงไม่มาก ส่วนที่ระยะเวลานานกว่านั้นฤทธิ์จะลดลงอีก เมื่อทำการทดลองบรรจุ capsule จีว ครั้งที่ 2 โดยการเพิ่มปริมาณน้ำมันหอมระเหยเป็น 5 เท่า เปรียบเทียบกับขนาดความเข้มข้นเดิม และมีการทดลองทำ enteric coating โดยคาดหวังว่าจะชะเชยหรือลดการสูญเสียปริมาณสารสำคัญได้ พบว่า ไม่สามารถแก้ปัญหาได้ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวในรูป soft gelatin capsule แม้จะมีความสะดวกในการพกพา แต่คุณลักษณะของเปลือกที่ไม่อ่อนนุ่ม ไม่ละลายเร็ว รวมทั้งการสูญเสียของสารสำคัญและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ทำให้มีแนวโน้มที่ไม่ดีสำหรับการพัฒนาต่อไป

การศึกษาพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ได้สูตรตำรับทั้งหมด 6 สูตรตำรับ โดยผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะกรูด 3 สูตรตำรับ (KLO) มีปริมาณน้ำมันมะกรูดเท่ากับ 6, 10, 16 %v/v (ต่อมาได้ปรับความเข้มข้นสูงสุดลดลงเหลือ 13%v/v) ส่วนสูตรตำรับจากน้ำมันใบมะกรูด 3 สูตรตำรับ (KLLO) มีปริมาณน้ำมันใบมะกรูด 4, 8, 12 %v/v ส่วนประกอบอื่นๆ ประกอบด้วย Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil, Acesulfame-K, menthol, สารแต่งสี และสารแต่งกลิ่น ผลิตภัณฑ์แสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดีต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ และแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย และดีกว่าผลิตภัณฑ์ capsule จีว ในการศึกษาความคงตัว ที่ 4,

30 และ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 75% Relative Humidity ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4 เดือน สารสำคัญของผลิตภัณฑ์จะมีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิตู้เย็น และจะมีปริมาณสารสำคัญลดลงเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ไม่ยาวถึง 2 ปี ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ ผลิตภัณฑ์แสดงฤทธิ์ที่ดีต่อการต้านเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *S. mutans* ATCC 25175 และ *S. sobrinus* ATCC 33402 ส่วนฤทธิ์ต่อ *L. casei* ATCC 36978 ต่ำกว่า ฤทธิ์ลดต่ำลงบ้างแต่ฤทธิ์ยังค่อนข้างดี สำหรับการทดสอบในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ พบว่าผลิตภัณฑ์มีความคงตัวค่อนข้างดีตลอดระยะเวลา 4 เดือน ที่ทุกอุณหภูมิ โดยให้ผลดีที่สุด ต่อ *H. influenzae* ATCC 49247 โดยภาพรวม ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากมีความคงตัวดีกว่าผลิตภัณฑ์ capsule จีว ในกระบวนการผลิตไม่มีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้ปัจจัยที่จะมีผลต่อการสลายตัวของสารสำคัญ มีน้อยกว่า กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ capsule จีว สูตรที่น่าจะนำไปพัฒนาต่อไป คือ 10%KLO และ 12%KLLO

การประเมินผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัส การประเมินทางประสาทสัมผัสในผลิตภัณฑ์ capsule จีว และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก ไม่ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยมหิดล โดยไม่ให้มีการดำเนินการจนกว่าจะมีผลการศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันมะกรูด และน้ำมันใบมะกรูดก่อน ซึ่งการศึกษาความเป็นพิษนี้จะเป็นต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 1 ปี และใช้งบประมาณสูงมากในการดำเนินการ จึงได้ขออนุมัติขอยกเลิกการดำเนินการเฉพาะในส่วนนี้

การทดสอบสูตรต้านน้ำมันที่จะบรรจุใน capsule จีว และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก ต่อการเจริญและการสร้าง biofilms ของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ ในการศึกษาผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุแคปซูลที่เตรียมจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 พบว่าสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุแคปซูลจากน้ำมันมะกรูด มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญได้ดีกว่า สูตรจากน้ำมันใบมะกรูด ที่ความหนาแน่นของเซลล์ที่ $10^9 - 10^5$ CFU/ml ส่วนผลต่อเชื้อที่แยกได้จากอาสาสมัครค่อนข้างแปรปรวน ทั้ง 2 สูตรไม่แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แต่ M18 แสดงผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ดีกว่า N113 สำหรับการศึกษาค้นคว้าของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อมาตรฐานละเชื้อแบคทีเรียจากอาสาสมัครนั้น ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดให้ผลดีกว่า ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด

งานที่ทำเพิ่มเติมนอกเหนือจากที่เสนอไว้ในแบบเสนอโครงการ คือ การทดสอบสารมาตรฐาน 4 ชนิด คือ D-limonene, Terpinene-4-ol, α -terpineol ที่พบเป็นสารสำคัญในน้ำมันมะกรูด และ Citronellal ที่พบเป็นสารสำคัญในน้ำมันใบมะกรูด ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 359 ตัวอย่าง ได้แก่ Group A, B, C, F, G streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* (MRSA และ MSSA) สรุปได้ว่า ในน้ำมันมะกรูด Limonene ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ทั้งนี้พบว่า Terpinene-4-ol และ α -terpineol เป็นสารสำคัญออกฤทธิ์ดังกล่าว สำหรับในน้ำมันใบมะกรูด มี Citronellal เป็นสารสำคัญออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ส่วนการทดสอบ

ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นที่มีจำหน่ายทางการค้า (Kamillosan®) ถึงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ พบว่า ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด 6 สูตร สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S.mutans* ATCC 25175 และที่เป็น clinical isolates อีก 14 สายพันธุ์ ด้วยความเข้มข้นที่ต่ำกว่าหรือใกล้เคียงกับ ผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า และเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ ใน clinical isolate ของ Gr. A streptococci, standard strains 3 strains ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247) ซึ่งจะมีค่าที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับ Kamillosan®

เนื่องจาก Kamillosan® เป็นผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในช่องปาก ที่แพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านหู คอ จมูก นิยมสั่งจ่ายให้แก่ผู้ป่วยที่มีอาการเจ็บคอเบื้องต้น ซึ่งผู้ป่วยยังไม่แสดงอาการติดเชื้ออย่างชัดเจน โดยคาดหวังฤทธิ์ในการบรรเทาอาการอักเสบในคอ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วย ในปัจจุบันยังไม่มีผลิตภัณฑ์ใดที่ใช้งานได้ดีและเป็นที่นิยมเท่า Kamillosan® ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด น่าจะมีศักยภาพที่ดีในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้บรรเทาอาการเจ็บคอและไอในเบื้องต้นได้ ซึ่งจะเป็นการช่วยประหยัดเงินตราที่ต้องเสียไปในการสั่งซื้อผลิตภัณฑ์ Kamillosan® จากต่างประเทศ จะเป็นการช่วยลดดุลการค้าและส่งเสริมการปลูก การใช้ และการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรไทยได้อีกทางหนึ่ง

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1-5
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
วิธีดำเนินงานวิจัย และผลการวิจัย	6
1. การจัดซื้อน้ำมันมะกูด และน้ำมันใบมะกูด	6
2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดด้วยเทคนิค GC	6-12
2.1 น้ำมันมะกูด	6-9
2.2 น้ำมันใบมะกูด	10-12
3. การเก็บเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุจากผู้ป่วย	13
4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในน้ำมันหอมระเหย	13-18
4.1 การทดสอบน้ำมันมะกูด และน้ำมันใบมะกูด ถึงฤทธิ์ยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคฟันผุ	13-14
4.2 การทดสอบน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด ถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการเจ็บคอ/ไอ	14-18
5. การพัฒนาสูตรตำรับน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดสำหรับบรรจุใน capsule จีว	19-31
5.1 การทดลองหาชนิดของน้ำมันที่จะใช้เจือจางน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด	19-23
5.2 การทดลองแต่งกลิ่นด้วยน้ำมันที่มีกลิ่นหอม	24
5.3 การแต่งรสหวานด้วยสารให้ความหวาน	25
5.4 การแต่งรสเย็นด้วย menthol	25-26
5.5 การทดลองเติม Solubilizing agent หรือส่วนประกอบอื่น เพื่อช่วยการละลายของสารให้ความหวาน และ/หรือสารแต่งรสอื่นๆ และการทดสอบความเข้ากันได้กับน้ำมันหอมระเหย	26-27
5.6 การทดลองผสม Emulsifier กับน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด	27
5.7 การทดลองตั้งตำรับโดยมี PEG 400 อยู่ด้วย	27-28
5.8 การคำนวณปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ต้องบรรจุใน capsule จีว	28
5.9 การทดลองตั้งสูตรตำรับ KLO และ KLLO เพื่อใช้บรรจุใน capsule จีว	28-31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
6. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดเพื่อใช้ป้องกันโรคฟันผุและเพื่อใช้บรรเทาอาการเจ็บคอ/ไอ	31-37
6.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดเพื่อใช้ป้องกันโรคฟันผุและเพื่อใช้บรรเทาอาการเจ็บคอ/ไอ	31-33
6.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูดเพื่อใช้ป้องกันโรคฟันผุและเพื่อใช้บรรเทาอาการเจ็บคอ/ไอ	33-34
6.3 การหาความหนาแน่นของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากรูปแบบใสจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด	35
6.4 การทดลองเตรียมสูตรตำรับโดยใช้สารให้ความหวาน Acesulfame-K แทน Sucralose	35-37
7. การทดสอบสูตรตำรับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดที่จะใช้บรรจุ capsule จีว และสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ถึงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคฟันผุ	38-40
7.1 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสูตรตำรับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดที่จะใช้บรรจุ capsule จีว และสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย standard strains 3 strains	38-40
8. การทดลองบรรจุสูตรตำรับน้ำมันมะกรูดและสูตรตำรับน้ำมันใบมะกรูดใน capsule จีว	40-41
9. การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่ได้พัฒนาขึ้น	42-81
9.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์ที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิ สภาวะ และระยะเวลาต่างๆ	42-51
9.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ใช้เป็น marker ของน้ำมันมะกรูดหรือน้ำมันใบมะกรูดในผลิตภัณฑ์ capsule จีว และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด	51-60
9.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ ที่เป็น standard strains 3 strains	60-69

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
9.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ (Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains)	69-81
10. การทดสอบผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันไบมะกูด และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันไบมะกูดถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย	81-86
10.1 การทดสอบผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันไบมะกูด และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันไบมะกูดถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>S.mutans</i> ที่แยกได้จากผู้ป่วย	81-84
10.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย	84-86
11. การทดสอบผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากและสูตรตำรับน้ำมันสำหรับบรรจุใน capsule จีวจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันไบมะกูดต่อการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ	86-108
11.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	86
11.2 การเก็บตัวอย่างน้ำลายจากอาสาสมัครและวิธีการเคลือบน้ำลายบน 96-well polystyrene plate	87
11.3 การทดสอบผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากและสูตรตำรับน้ำมันสำหรับบรรจุใน capsule จีวจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันไบมะกูดต่อการยึดเกาะ (adherence) ของแบคทีเรียและการสร้างไบโอฟิล์ม ใน polystyrene plate ที่เคลือบน้ำลายแล้ว	87-108
12. การทดลองบรรจุ capsule จีวรอบที่ 2 เพื่อศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย	109-120
12.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ใช้เป็น marker ของน้ำมันมะกูดหรือน้ำมันไบมะกูดในผลิตภัณฑ์ capsule จีว	114-115

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
12.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ (Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains)	116-120
13. การทดสอบสารมาตรฐานถึงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ (งานที่ดำเนินการเพิ่มเติมต่างหาก จากงานที่เสนอไว้ในแบบเสนอโครงการวิจัย)	120-123
14. การทดสอบผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายในทางการค้าถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ	123-127
14.1 การทดสอบผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายในทางการค้าถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ	123-124
14.2 การทดสอบผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายในทางการค้าถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ	124-127
สรุปผลการวิจัย	128
เอกสารอ้างอิง	134
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	138-160
ภาคผนวก ข	161-170
ภาคผนวก ค	171-175
ภาคผนวก ง	176-181
ภาคผนวก จ	182-186
ภาคผนวก ฉ	187-191
ภาคผนวก ช	192-193
ภาคผนวก ซ	194-198
ภาคผนวก ฌ	199-259
ภาคผนวก ฎ	260-274
ภาคผนวก ฏ	275-283
ภาคผนวก ฐ	284
ภาคผนวก ท	285
ภาคผนวก ထ	286

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ฅ	287
ภาคผนวก ค	288-294

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	องค์ประกอบสารสำคัญในน้ำมันมะกูด 9
ตารางที่ 2	องค์ประกอบสารสำคัญในน้ำมันใบมะกูด 12
ตารางที่ 3	ฤทธิ์ของน้ำมันมะกูดต่อการเจริญของเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> (Standard strain และ Clinical isolates) 14
ตารางที่ 4	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ โดยวิธี Disk diffusion method 16
ตารางที่ 5	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Streptococcus pyogenes</i> (61 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method 138-138
ตารางที่ 6	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Streptococcus agalactiae</i> (26 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method 140
ตารางที่ 7	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group C Streptococci (5 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method 141
ตารางที่ 8	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group F Streptococci (3 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method 141
ตารางที่ 9	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group G Streptococci (11 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method 141
ตารางที่ 10	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Streptococcus pneumoniae</i> (51 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method 142-143
ตารางที่ 11	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Haemophilus influenzae</i> (52 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method 144

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางที่ 12	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA, 50 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method	146-147
ตารางที่ 13	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA, 50 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method	148-149
ตารางที่ 14	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Acinetobacter baumannii</i> (50 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method	150-151
ตารางที่ 15	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ โดยวิธี Microbroth dilution method	16
ตารางที่ 16	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Streptococcus pyogenes</i> (Group A Streptococci) (61 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method	152-153
ตารางที่ 17	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) (50 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method	154-155
ตารางที่ 18	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) (50 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method	156-157

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 19	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Acinetobacter baumannii</i> (50 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method
	158-159
ตารางที่ 20	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ <i>Streptococcus agalactiae</i> (Group B streptococci) (2 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method
	159
ตารางที่ 21	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group C Streptococci (2 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method
	159
ตารางที่ 22	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group F Streptococci (2 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method
	160
ตารางที่ 23	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group G Streptococci (2 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method
	160
ตารางที่ 24	สรุปผลการทดลองผสมน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดกับน้ำมันพืชอื่นๆ
	20
ตารางที่ 25	คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันมะกูดและน้ำมันถั่วเหลืองในอัตราส่วนต่างๆ
	161
ตารางที่ 27	คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันมะกูดและน้ำมันดอกคำฝอยในอัตราส่วนต่างๆ
	163
ตารางที่ 28	คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันมะกูดและน้ำมันทานตะวันในอัตราส่วนต่างๆ
	164

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 29	คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันรำข้าวในอัตราส่วนต่างๆ
	165
ตารางที่ 30	คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันถั่วเหลืองในอัตราส่วนต่างๆ
	166
ตารางที่ 31	คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันปาล์มในอัตราส่วนต่างๆ
	167
ตารางที่ 32	คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันดอกคำฝอยในอัตราส่วนต่างๆ
	168
ตารางที่ 33	คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันทานตะวันในอัตราส่วนต่างๆ
	169
ตารางที่ 34	คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันรำข้าวในอัตราส่วนต่างๆ
	170
ตารางที่ 35	ผลการทดลองกลบกลั่นน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดด้วยน้ำมันที่มีกลิ่นหอม
	24
ตารางที่ 36	ส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดกับ Lemon oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ
	172
ตารางที่ 37	ส่วนผสมของน้ำมันมะกรูดกับ Spearmint oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ
	174
ตารางที่ 38	ส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดกับ Spearmint oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ
	175
ตารางที่ 39	การทดสอบการผสมเข้ากันของ 70% (Sorbitol solution ในน้ำมันชนิดต่างๆ
	178
ตารางที่ 40	การทดลองแต่งรสเย็นด้วย menthol
	26
ตารางที่ 41	ผลการทดสอบ Glycerin (GR) และ Propylene glycol (PG) ในการช่วยละลายสารแต่งรส สารแต่งกลิ่น
	184
ตารางที่ 42	การทดสอบความเข้ากันได้ของ PEG 400 กับน้ำมันหอมระเหย และการช่วยละลายสารแต่งกลิ่นและสารแต่งรส
	186
ตารางที่ 43	การทดลองผสม Tween80, 20% Acesulfame-K และน้ำมันมะกรูด
	187
ตารางที่ 44	การทดลองผสม Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil (PHC), 20% Acesulfame-K และ น้ำมันมะกรูด
	188
ตารางที่ 45	การทดลองผสม Lecithin, 20% Acesulfame-K และ น้ำมันมะกรูด
	188
ตารางที่ 46	การทดลองตั้งตำรับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด โดยมีสารประกอบอื่นๆ คือ น้ำมันพืช Peppermint oil, Spearmint oil, menthol, 20% Acesulfame-K in PEG 400, PEG 400, Acesulfame-K
	193

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 47 ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ใน capsule ขนาด 80 mg ต่อเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> Clinical strain	196
ตารางที่ 48 ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ใน capsule ขนาด 100 mg ต่อเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> Clinical strain	197
ตารางที่ 49 สูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่จะนำไปบรรจุใน capsule จีว	29
ตารางที่ 50 รสชาติเบื้องต้นในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่ได้คัดเลือกมา	30
ตารางที่ 51 สูตรตำรับ KLO	199
ตารางที่ 52 สูตรตำรับ KLLO	201
ตารางที่ 53 ผลการทดสอบรสชาติ	204
ตารางที่ 54 การตั้งตำรับที่มีสารแต่งกลิ่น Peppermint oil และ Spearmint oil ร่วมกัน	205
ตารางที่ 55 การทดสอบรสชาติของตำรับ KLO และ KLLO ที่มีสารแต่งกลิ่น Peppermint oil และ Spearmint oil ร่วมกัน	207
ตารางที่ 56 การตั้งตำรับที่มี %KLO ลดลง	208
ตารางที่ 57 การทดสอบรสชาติ ตำรับที่มี %KLO ลดลง	209
ตารางที่ 58 การตั้งตำรับที่มี %KLLO ลดลง	210
ตารางที่ 59 การทดสอบรสชาติ ตำรับที่มี %KLLO ลดลง	211
ตารางที่ 60 ส่วนประกอบในสูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่มีการปรับปริมาณของ Spearmint oil และ Peppermint oil	212
ตารางที่ 61 ส่วนประกอบต่างๆของสูตรตำรับ KLO และ KLLO โดยใช้ Soybean oil แทนที่ Sunflower oil	213
ตารางที่ 62 สูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่มีการปรับเปลี่ยนใช้ Acesulfame-K เป็นสารให้ความหวานแทน Sucralose	215
ตารางที่ 63 ส่วนประกอบในสูตรตำรับ KLO และ KLLO เมื่อทดลองใช้ Acesulfame-K เปรียบเทียบกับ Sucralose และเมื่อทดลองใช้ Extra Virgin Coconut Oil เปรียบเทียบกับ Sunflower oil	217
ตารางที่ 64 สูตรตำรับที่มีการเปรียบเทียบสารให้ความหวาน (Sucralose และ Acesulfame-K) ของ KLO ที่มีลักษณะใส เมื่อเทียบกับสูตรตำรับเดิมที่เคยทดลองมาแล้ว (F-A-6 S+P, F-A-6 S+P*)	225
ตารางที่ 65 สูตรตำรับของ KLLO ที่มีลักษณะใส เมื่อเทียบกับสูตรตำรับเดิมที่เคยทดลองมาแล้ว (F-B-5 S+P, F-B-6 S+P, F-B-17 S+P)	226

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 66 รสชาติของสูตรตำรับ KLO ที่ทดลองใช้สารให้ความหวาน Acesulfame-K เปรียบเทียบกับ Sucralose โดยมีส่วนประกอบอื่นๆเพื่อช่วยปรับปรุงความใสและรสชาติ	228
ตารางที่ 67 รสชาติของสูตรตำรับ KLLO ที่ทดลองใช้สารให้ความหวาน Acesulfame-K โดยมีส่วนประกอบอื่นๆเพื่อช่วยปรับปรุงความใสและรสชาติ	229
ตารางที่ 68 รสชาติในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับ KLO และ KLLO	231
ตารางที่ 69 ส่วนประกอบสูตรตำรับ KLO ที่มีการปรับลดปริมาณ KLO	232
ตารางที่ 70 รสชาติของสูตรตำรับ KLO ที่มีการปรับลดปริมาณ KLO	233
ตารางที่ 71 รสชาติในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับ KLO ที่มีการปรับลดปริมาณ KLO	234
ตารางที่ 72 ส่วนประกอบสูตรตำรับ KLLO ที่มีการปรับลดปริมาณ KLO	235
ตารางที่ 73 รสชาติของสูตรตำรับ KLLO ที่มีการปรับลดปริมาณ KLLO	236
ตารางที่ 74 ส่วนประกอบสูตรตำรับ KLO เพื่อหาปริมาณสารให้ความหวานที่เหมาะสม	237
ตารางที่ 75 ส่วนประกอบสูตรตำรับ KLO ที่มีปริมาณ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 1-5%w/w	238
ตารางที่ 76 รสชาติของสูตรตำรับ KLO 5%w/w ที่มี 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 1-5%w/w	238
ตารางที่ 77 สูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 3 %w/w โดยมีปริมาณต่างๆ ของSunflower oil	240
ตารางที่ 78 รสชาติของสูตรตำรับที่ใส ไม่แยกชั้น ที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 3%w/w โดยมีปริมาณต่างๆ ของ Sunflower oil	241
ตารางที่ 79 รสชาติในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 3%w/w โดยมีปริมาณต่างๆ ของ Sunflower oil	242
ตารางที่ 80 สูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2.5 %w/w โดยมีปริมาณต่างๆ ของ Sunflower oil	243

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 81	รสชาติของสูตรตำรับที่ใส่ ไม่แยกชั้น ที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2.5%w/w โดยมีปริมาณต่างๆ ของ Sunflower oil
	244
ตารางที่ 82	สูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2%w/w โดยมีปริมาณต่างๆของSunflower oil
	245
ตารางที่ 83	รสชาติของสูตรตำรับที่ใส่ ไม่แยกชั้น ที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2%w/w โดยมีปริมาณต่างๆ ของ Sunflower oil
	246
ตารางที่ 84	ปริมาณ Sunflower oil ที่สามารถใช้ได้อย่างในสูตรตำรับที่มี KLO 5, 10, 15, 20 และ 30% ได้โดยยังให้ส่วนผสมที่มีความใส
	247
ตารางที่ 85	สูตรตำรับ KLO 5%w/w โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ และ ใช้ 20% Sucralose in PEG400 คงที่ที่ 3%w/w
	248
ตารางที่ 86	สูตรตำรับ KLO 5%w/wโดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ และใช้ 10% Sucralose in PEG400 คงที่ที่ 6%w/w
	249
ตารางที่ 87	สูตรตำรับ KLO โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ และใช้ 20% Sucralose in PEG400 คงที่ที่ 3%w/w (ตัด KLO ออก)
	249
ตารางที่ 88	สูตรตำรับ KLO โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ และใช้ 10% Sucralose in PEG400 คงที่ที่ 6%w/w (ตัด KLO ออก)
	250
ตารางที่ 89	สูตรตำรับ KLO 5%w/w โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ (ตัด 20% Sucralose in PEG400 ออก)
	250
ตารางที่ 90	รสชาติของสูตรตำรับ KLO 5%w/w โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณ ต่างๆ (ตัด 20% Sucralose in PEG400 ออก)
	251
ตารางที่ 91	สูตรตำรับ KLO โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ (ตัด 20% Sucralose in PEG400 และ KLO ออก)
	251
ตารางที่ 92	รสชาติของสูตรตำรับ KLO โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ (ตัด 20% Sucralose in PEG400 และ KLO ออก)
	252
ตารางที่ 93	สูตรตำรับ KLO ที่มี KLO, SPO:PPO (1:1), menthol, PEG400ใน ปริมาณต่างๆ โดยใช้ diluents คือ SUO ยกเว้นที่มีกำกับในตาราง
	253
ตารางที่ 94	รสชาติเบื้องต้นของสูตรตำรับ KLO สูตรตำรับ N112-N114, N123- N134
	254

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 95	รสชาติดั้งเดิมในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับ KLO ที่ได้คัดเลือกมา
ตารางที่ 96	สูตรตำรับ KLLO ที่มี SPO:PPO (1:1), menthol, PEG400 ในปริมาณ ต่างๆ
ตารางที่ 97	รสชาติดั้งเดิมของสูตรตำรับ KLLO สูตรตำรับ M13-M18
ตารางที่ 98	รสชาติดั้งเดิมในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับ KLLO สูตรตำรับ M16-M18
ตารางที่ 99	สูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่จะนำไปบรรจุใน capsule จีว
ตารางที่ 100	สูตรตำรับ KLO 6, 10, 16%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และสารแต่งกลิ่นรส
ตารางที่ 101	สูตรตำรับตั้งต้นของ KLO 6, 10, 16%v/v
ตารางที่ 102	สูตรตำรับ KLO 6%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการ เติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K6A1-K6A3, K6S4-K6S9)
ตารางที่ 103	สูตรตำรับ KLO 6%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการ เติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K6S10-K6S18)
ตารางที่ 104	สูตรตำรับ KLO 6%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการ เติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K6S19-K6S27)
ตารางที่ 105	สูตรตำรับ KLO 6%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการ เติมสารแต่งกลิ่นรส และสารแต่งสี (สูตรตำรับ K6S28, K6AA1- K6AA3)
ตารางที่ 106	สูตรตำรับ KLO 10%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการ เติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับเดิม และ สูตรตำรับ K10S1-K10S8)
ตารางที่ 107	สูตรตำรับ KLO 10%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการ เติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K10S9-K10S17)
ตารางที่ 108	สูตรตำรับ KLO 10%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการ เติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K10S18-K10S24, K10A1-K10A3)
ตารางที่ 109	สูตรตำรับ KLO 16%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการ เติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับเดิม สูตรตำรับ K16A1, K16S1-K16S7)
ตารางที่ 110	สูตรตำรับ KLO 16%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการ เติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K16S8-K10S10, K16A2-K16A4, K16SA1-K16SA3)

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 111 สูตรตำรับ KLO 16%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K16S11-K16S18)	270
ตารางที่ 112 ผลการแต่งกลิ่นรสในสูตรตำรับ KLO 6%v/v	271
ตารางที่ 113 ผลการแต่งกลิ่นรสในสูตรตำรับ KLO 10%v/v	272
ตารางที่ 114 ผลการแต่งกลิ่นรสในสูตรตำรับ KLO 16%v/v	272
ตารางที่ 115 สูตรตำรับ KLO 6, 10, 16%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และสารแต่งกลิ่นรส	273
ตารางที่ 116 สูตรตำรับ KLLO 4, 8, 12%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และสารแต่งกลิ่นรส	32
ตารางที่ 117 สูตรตำรับตั้งต้นของ KLLO 4, 12%v/v	275
ตารางที่ 118 สูตรตำรับ KLLO 4%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ KLL4S1-KLL4S9)	276
ตารางที่ 119 สูตรตำรับ KLLO 4%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ KLL4S10-KLL4S16)	277
ตารางที่ 120 สูตรตำรับ KLLO 8%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ KLL8S1-KLL8S5)	278
ตารางที่ 121 สูตรตำรับ KLLO 8%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ KLL8S6-KLL8S11)	279
ตารางที่ 122 สูตรตำรับ KLLO 12%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ KLL12S1-KLL12S8)	280
ตารางที่ 123 ผลการแต่งกลิ่นรสในสูตรตำรับ KLLO 4, 8, 12%v/v	282
ตารางที่ 124 สูตรตำรับ KLLO 4, 8, 12%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และสารแต่งกลิ่นรส	283
ตารางที่ 125 ความหนาแน่นเฉลี่ยของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจาก น้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด	35
ตารางที่ 126 สูตรตำรับ 6, 10, 13%KLO ที่มีการปรับเปลี่ยนใช้ Acesulfame-K เป็น สารให้ความหวานแทน Sucralose	37
ตารางที่ 127 สูตรตำรับ 4, 8, 12%KLLO ที่มีการปรับเปลี่ยนใช้ Acesulfame-K เป็น สารให้ความหวานแทน Sucralose	37

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 128	ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อมาตรฐาน 3 strains ของสูตรตำรับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดที่จะใช้บรรจุใน capsule จีว และสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด
	39
ตารางที่ 129	น้ำหนักและจำนวนของ capsule จีวที่ได้จากการบรรจุสูตรตำรับน้ำมันมะกรูดและสูตรตำรับน้ำมันใบมะกรูด
	41
ตารางที่ 130	แสดงปริมาณสารสำคัญ ใน capsule สูตรตำรับน้ำมันผิวมะกรูด (KLO) และสูตรตำรับน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) ในการทดสอบความคงตัวที่ 4, 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 6 และ 14 เดือน
	53
ตารางที่ 131	ปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูด สูตร 6% KLO, 10% KLO และ 13% KLO และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันใบมะกรูด สูตร 4% KLLO, 8% KLLO และ 12% KLLO ที่เวลา 0 เดือน
	57
ตารางที่ 132	ปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูด สูตร 10% KLO และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันใบมะกรูด สูตร 12% KLLO ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 1, 2, 3, และ 4 เดือน
	58
ตารางที่ 133	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33402, <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 36978 ที่ 0 เดือน (Finished products)
	61
ตารางที่ 134	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33402, <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 36978 ที่ 1 เดือน
	62
ตารางที่ 135	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33402, <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 36978 ที่ 2 เดือน
	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 136	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33402, <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 36978 ที่ 3 เดือน
	65
ตารางที่ 137	ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อเชื้อ <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33402, <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 36978 ที่ 4 เดือน
	67
ตารางที่ 138	ค่า MIC และ MBC ของสูตรน้ำมันที่บรรจุใน capsule จีว 6 สูตร, ผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่ 0 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method
	70
ตารางที่ 139	ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ 1 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method
	71
ตารางที่ 140	ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ 2 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method
	72
ตารางที่ 141	ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ 6 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method
	73
ตารางที่ 142	ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ 14 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method
	74
ตารางที่ 143	ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ที่ 0 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method
	76
ตารางที่ 144	ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ที่ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ 1 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method
	76
ตารางที่ 145	ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ที่ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ 2 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method
	77
ตารางที่ 146	ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ที่ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ 3 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method
	78

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 147	ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด และน้ำมันใบมะกรูด ที่ 4, 30, และ 45 องศาเซลเซียส ที่ 4 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method 79
ตารางที่ 148	สรุปผลการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจาก น้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด จำนวน 6 สูตร ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน เป็นช่วงค่า MIC และ MBC ต่อ Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains ได้แก่ <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 และ <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247 80
ตารางที่ 149	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและ น้ำมันใบมะกรูด ต่อ เชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> 14 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วย (clinical isolates) 82
ตารางที่ 150	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด และน้ำมันใบมะกรูด ต่อเชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> 14 สายพันธุ์ที่คัดแยก ได้จากผู้ป่วย (clinical isolates) 83
ตารางที่ 151	ผลการทดสอบ Liquid form (N113, M18), ผลิตภัณฑ์ capsule จีว (N113, M18) และ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO) และน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO) ถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียใน เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย 85
ตารางที่ 152	ตารางแสดงค่าอัตราการสร้างไบโอฟิล์มนาน 16 ชั่วโมงของเชื้อ แบคทีเรียมาตรฐาน <i>S. mutans</i> ATCC 25175, <i>S. sobrinus</i> ATCC 6715 และ <i>A. viscosus</i> ATCC 15987 ใน polystyrene plate ที่เคลือบน้ำตาลย แล้ว ที่ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียตั้งต้นที่ต่างกัน 89
ตารางที่ 153	ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์สูตรน้ำมันสำหรับบรรจุ capsule จีวที่ เติริมจากน้ำมันมะกรูด (N113) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์ม ของเชื้อ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml) 90

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 154	ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์สูตรน้ำมันสำหรับบรรจุ capsule จีวที่เตรียมจากน้ำมันใบมะกรูด (M18) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน (10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)
	91
ตารางที่ 155	ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน (10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)
	94
ตารางที่ 156	ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (13%KLO) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน (10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)
	95
ตารางที่ 157	ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO) (ที่ความเข้มข้นของน้ำมันมะกรูด 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>S. mutans</i> ATCC 25175 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ที่ต่างกัน (10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)
	96
ตารางที่ 158	ตารางแสดงผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุ capsule จีวที่เตรียมจากน้ำมันมะกรูด (N113) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> ที่แยกได้จากอาสาสมัคร (ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน 10^{10} , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)
	100
ตารางที่ 159	ผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุแคปซูลที่เตรียมจากน้ำมันใบมะกรูด (M18) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> ที่แยกได้จากอาสาสมัคร (ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^6 , และ 10^5 CFU/ml)
	101

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางที่ 160	ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> ที่แยกได้จากอาสาสมัคร ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)	104
ตารางที่ 161	ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> ที่แยกได้จากอาสาสมัคร ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)	105
ตารางที่ 162	น้ำหนักและจำนวนของ capsule จีว (lot 2) ที่ได้จากการบรรจุสูตรตำรับ น้ำมันมะกรูดและสูตรตำรับน้ำมันใบมะกรูด	110
ตารางที่ 163	แสดงปริมาณสารสำคัญ ใน capsule จีว (lot 2) 8 สูตร ในการทดสอบความคงตัวที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0 และ 3 เดือน	114
ตารางที่ 164	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการไอ/เจ็บคอ ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว lot 2 คือ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด 4 สูตร คือ N113(X1) (not coated), N113(X1) (enteric coated), N113(X5) (not coated), N113(X5) (enteric coated) และผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด 4 สูตร คือ M18(X1) (not coated), M18(X1) (enteric coated), M18(X5) (not coated), M18(X5) (enteric coated) ที่ 0 เดือน	116
ตารางที่ 165	ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการไอ/เจ็บคอ ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว lot 2 คือ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด 4 สูตร คือ N113(X1) (not coated), N113(X1) (enteric coated), N113(X5) (not coated), N113(X5) (enteric coated) และผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด 4 สูตร คือ M18(X1) (not coated), M18(X1) (enteric coated), M18(X5) (not coated), M18(X5) (enteric coated) ที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ 75% relative humidity ที่ 3 เดือน	117
ตารางที่ 166	ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย ของสารมาตรฐาน D-limonene, Terpinene-4-ol, α -terpineol โดยเปรียบเทียบกับน้ำมันมะกรูด	121

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 167 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย ของสารมาตรฐาน Citronellal โดยเปรียบเทียบกับน้ำมันใบมะกรูด	122
ตารางที่ 168 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย <i>S. mutans</i> ที่เป็น standard strain 1 สายพันธุ์ และที่เป็น clinical isolates อีก 14 สายพันธุ์ ของผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า คือ Kamillosan® เปรียบเทียบกับ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด	124
ตารางที่ 169 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ คือ Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains ได้แก่ <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 และ <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247 ของผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า คือ Kamillosan® เปรียบเทียบกับ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด	126

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1	โครมาโตแกรมของน้ำมันมะกรูดเมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS 8
รูปที่ 2	โครมาโตแกรมของน้ำมันใบมะกรูดเมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS 11
รูปที่ 3	ความเข้มของสีน้ำมันพืชชนิดต่างๆเทียบกับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด (จากซ้ายไปขวา-น้ำมันมะกรูด น้ำมันทานตะวัน น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันใบมะกรูด น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์ม) 19
รูปที่ 4	คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันมะกรูด:น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา 161
รูปที่ 5	คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันมะกรูด:น้ำมันปาล์ม ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา 162
รูปที่ 6	คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันมะกรูด:น้ำมันดอกคำฝอย ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา 163
รูปที่ 7	คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันมะกรูด:น้ำมันทานตะวัน ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา 164
รูปที่ 8	คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันมะกรูด:น้ำมันรำข้าว ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา 165
รูปที่ 9	คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันใบมะกรูด:น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา 166
รูปที่ 10	คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันใบมะกรูด:น้ำมันปาล์ม ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา 167
รูปที่ 11	คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันใบมะกรูด:น้ำมันดอกคำฝอย ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา 168

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 12	คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันโสมกระดูก:น้ำมันทานตะวัน ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา
	169
รูปที่ 13	คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันโสมกระดูก:น้ำมันรำข้าว ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา
	170
รูปที่ 14	สีของน้ำมันและส่วนผสมของน้ำมันในการทดลองแต่งกลิ่น จากซ้ายไปขวา Lemon oil, น้ำมันทานตะวัน, ส่วนผสมของน้ำมันทานตะวันกับ Lemon oil, น้ำมันมะกอก, ส่วนผสมของน้ำมันมะกอกกับ Lemon oil, น้ำมันโสมกระดูก, ส่วนผสมของน้ำมันโสมกระดูกกับ Lemon oil
	171
รูปที่ 15	สีของน้ำมันและส่วนผสมของน้ำมันในการทดลองแต่งกลิ่น จากซ้ายไปขวา Peppermint oil, น้ำมันทานตะวัน, ส่วนผสมของน้ำมันทานตะวันกับ Peppermint oil, น้ำมันมะกอก, ส่วนผสมของน้ำมันมะกอกกับ Peppermint oil, น้ำมันโสมกระดูก, ส่วนผสมของน้ำมันโสมกระดูกกับ Peppermint oil
	173
รูปที่ 16	การทดสอบการละลายของ Acesulfame-K จากซ้ายไปขวา Acesulfame-K ในน้ำ, ในน้ำมันมะกอก, ในน้ำมันโสมกระดูก, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว
	176
รูปที่ 17	การทดสอบการละลายของ Sorbitol powder จากซ้ายไปขวา Sorbitol ในน้ำ, ในน้ำมันมะกอก, ในน้ำมันโสมกระดูก, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว
	177
รูปที่ 18	การทดสอบการผสมเข้ากันของ 70% Sorbitol solution จากซ้ายไปขวา 70% Sorbitol solution ในน้ำ, ในน้ำมันมะกอก, ในน้ำมันโสมกระดูก, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว
	178
รูปที่ 19	การทดสอบการละลายของ Xylitol C จากซ้ายไปขวา Xylitol C ในน้ำ, ในน้ำมันมะกอก, ในน้ำมันโสมกระดูก, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว
	179
รูปที่ 20	การทดสอบการละลายของ Sucralose จากซ้ายไปขวา Sucralose ในน้ำ, ในน้ำมันมะกอก, ในน้ำมันโสมกระดูก, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว
	180

สารบัญรูป (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 21	การทดสอบการละลายของ Aspartame จากซ้ายไปขวา Aspartame ในน้ำ, ในน้ำมันมะกอก, ในน้ำมันใบมะกอก, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว	181
รูปที่ 22	การทดลองเติม Solubilizing agent เพื่อช่วยการละลายของ 70% Sorbitol solution จากซ้ายไปขวา 70% Sorbitol solution, 70% Sorbitol solution+KLO เติม PHC, เติม Tween20, เติม Tween80, เติม Glycerin, เติม Propylene glycol	182
รูปที่ 23	การทดลองเติม Solubilizing agent เพื่อช่วยการละลายของ Acesulfame-K จากซ้ายไปขวา Acesulfame-K+KLO เติม PHC, เติม Tween 20, เติม Tween 80, เติม Glycerin, เติม Propylene glycol	183
รูปที่ 24	เปรียบเทียบการละลายของสารให้ความหวานชนิดต่างๆ ใน GR และ PG 2 รูปซ้าย-วันแรก Glycerin (บน) (Glycerin+Ace, +Asp, +Suc, +Sor, +Sac) และ Propylene glycol (ล่าง) 2 รูปขวา-วันที่ 7	185
รูปที่ 25	การทดลองผสม Tween 80, 20% Acesulfame-K และ น้ำมันมะกอก จากซ้ายไปขวา หลอดที่ 1 ส่วนประกอบต่างๆในน้ำ, หลอดที่ 2-9 ส่วนประกอบต่างๆในน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้นต่างๆของ Tween 80 (0-5.66%)	189
รูปที่ 26	การทดลองผสม Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil (PHC) , 20% Acesulfame-K และ น้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้นต่างๆของ PHC (0.4-5.66%)	190
รูปที่ 27	การทดลองผสม Lecithin , 20% Acesulfame-K และ น้ำมันมะกอก จากซ้ายไปขวา หลอดที่ 1 ส่วนประกอบต่างๆในน้ำ, หลอดที่ 2-9 ส่วนประกอบต่างๆในน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้นต่างๆของ Lecithin (0-5.66%)	190
รูปที่ 28	สูตรตำรับ KLO ที่จะนำไปบรรจุใน capsule จีว คือ สูตรตำรับ KLO 5%w/w (N112, N113) และ KLO 10%w/w (N129)	30
รูปที่ 29	สูตรตำรับ KLLO ที่จะนำไปบรรจุใน capsule จีว คือ สูตรตำรับ KLLO 5%w/w (M16, M17, M18)	31
รูปที่ 30	ผลการตั้งตำรับ KLO	200
รูปที่ 31	ผลการตั้งตำรับ KLLO	202

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 32	206
รูปที่ 33	258
รูปที่ 34	259
รูปที่ 35	33
รูปที่ 36	274
รูปที่ 37	34
รูปที่ 38	283
รูปที่ 39	41
รูปที่ 40	43
รูปที่ 42	45
รูปที่ 43	46
รูปที่ 44	47

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 45	ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (KLO) และน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) ที่ 2 เดือน อุณหภูมิ 4, 30, 45 องศาเซลเซียส (13%KLO ที่ 45 องศาเซลเซียส มีการแยกชั้น)
รูปที่ 46	ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (KLO) และน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) ที่ 3 เดือน อุณหภูมิ 4, 30, 45 องศาเซลเซียส (รูปแถวที่ 3 และ 4, 6%KLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อน (ในรูปเห็นเป็นสีฟ้า) หรือสีเหลืองอ่อน, 4%KLLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อน (ในรูปเห็นเป็นสีฟ้า), 12%KLLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อนหรือสีชมพูอ่อน)
รูปที่ 47	ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (KLO) และน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) ที่ 4 เดือน อุณหภูมิ 4, 30, 45 องศาเซลเซียส (รูปแถวที่ 3, 6%KLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อน (ในรูปเห็นเป็นสีฟ้า), 4%KLLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อน (ในรูปเห็นเป็นสีฟ้า), 12%KLLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อน (ในรูปเห็นเป็นสีฟ้า)
รูปที่ 48	standard curve ของ alpha-terpineol
รูปที่ 49	standard curve ของ citronellal
รูปที่ 50	standard curve ของ alpha-terpineol
รูปที่ 51	standard curve ของ citronellal
รูปที่ 52	กราฟแสดงอัตราการสร้างไบโอฟิล์มนาน 16 ชั่วโมงของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ S. mutans ATCC 25175, S. sobrinus ATCC 6715 และ A. viscosus ATCC 15987 ใน polystyrene plate ที่เคลือบน้ำตาลแล้ว ที่ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียตั้งต้นที่ต่างกัน
รูปที่ 53	รูปแสดงความทึบแสงของของไบโอฟิล์มของเชื้อ S. mutans ATCC 25175 ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียตั้งต้นเท่ากับ 106 CFU/ml แล้วใส่ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO) หลังอบที่สภาวะเหมาะสม 24 ชั่วโมง หลังจากขัดด้วยคริสตัล ไวโอเล็ต หลังจากหลุมที่มีสีม่วงเข้มแสดงถึงความหนาที่มากกว่าของไบโอฟิล์ม ที่มากกว่า ตัวเลขเหนือแต่ละหลุมแสดงถึงความเข้มข้นของน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO)

สารบัญรูป (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 54	ผลิตภัณฑ์ capsule จีว* ที่ไม่ได้ผ่านการทำ enteric coating (รูปซ้าย) และ ที่มีการทำ enteric coating (รูปขวา) ที่ 0 เดือน	111
รูปที่ 55	ผลิตภัณฑ์ capsule จีว สูตร N113(X1) และ สูตร N113(X5) ที่ไม่ได้ผ่าน การทำ enteric coating เก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน	112
รูปที่ 56	ผลิตภัณฑ์ capsule จีว สูตร N113(X1) และ สูตร N113(X5) ที่ผ่านการ ทำ enteric coating เก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน	112
รูปที่ 57	ผลิตภัณฑ์ capsule จีว สูตร M18(X1) และ สูตร M18(X5) ที่ ไม่ได้ผ่านการทำ enteric coating เก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน	113
รูปที่ 58	ผลิตภัณฑ์ capsule จีว สูตร M18(X1) และ สูตร M18(X5) ที่ผ่านการทำ enteric coating เก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน	113
รูปที่ 59	standard curve ของ (alpha)-terpineol ที่ความเข้มข้น 5, 15, 20, 25 และ 35 ppm	286
รูปที่ 60	standard curve ของ citronellal ที่ความเข้มข้น 20, 100, 150, 200 และ 250 ppm	286

บทนำ

โรคฟันผุ (Dental caries)

โรคฟันผุเป็นปัญหาทันตสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย โรคฟันผุเป็นการเกิด demineralization ของเนื้อฟันส่วน crown หรือ root ของฟัน (Lewis, 1995) โดยทั่วไปการเกิดฟันผุจะต้องประกอบไปด้วยปัจจัยต่างๆ คือ แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุ เช่น *Streptococcus mutans* คาร์โบไฮเดรตที่สามารถถูกย่อยได้ เช่น น้ำตาล sucrose ฟัน และระยะเวลาที่เพียงพอในการทำงานของแบคทีเรีย และแบคทีเรียจะเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นสารกลูแคน (glucan) โดยอาศัยเอนไซม์ glucosyltransferase สารกลูแคนนี้ไม่ละลายน้ำ มีคุณสมบัติเหนียว ส่งเสริมการสะสมของแบคทีเรีย กลายเป็น plaque ขึ้น (Hara, 1999) มีผลทำให้มีการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็น Lactic acid โดยแบคทีเรียที่สะสมนี้ เกิด demineralization หากการ demineralization มีมากกว่า remineralization ก็จะเกิดการสูญเสียของเคลือบฟันหรือมีการย่อยสลายลึกลงไปถึงรากฟันเกิดเป็นโพรงขึ้น (Dawes, 1989; Rolla and Saxegaard, 1990; Lewis and Ismail, 1995) โรคฟันผุเกิดขึ้นได้ในทุกช่วงอายุ นับแต่มีการงอกของฟัน จะเกิดได้มากขึ้นเมื่ออายุเพิ่มขึ้น การผุจะเกิดขึ้นที่บริเวณต่างๆ กัน ในช่วงอายุต่างๆ กัน ในเด็กและหนุ่มสาวมักจะเกิดที่ฟันผิวที่ใช้กัดหรือบดเคี้ยว (Graves and Stamm, 1985; Ripa, 1990) เมื่ออายุมากขึ้น ผิวเคลือบฟันที่เรียบจะเกิดฟันผุได้ง่ายขึ้น (Lewis and Ismail, 1995) กลุ่มคนที่มีความเสี่ยงสูงในการเกิดโรคฟันผุ คือ ผู้ป่วยโรคต่างๆ เช่น Bulimia, Sjogren syndrome, Rheumatoid arthritis, Diabetes mellitus, Pernicious anemia ซึ่งมีผลเปลี่ยนแปลงอัตราเร็วและปริมาณของน้ำลาย หรืออยู่ระหว่างการรักษาด้วยเคมีบำบัด (chemotherapy) โดยการให้ยาซึ่งเป็นสาเหตุของ Xerostomia หรือได้รับการรักษาโดยการฉายรังสี (Radiation therapy) ที่บริเวณศีรษะและคอ นอกจากนี้ กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงกลุ่มอื่นๆ คือ ผู้ป่วยที่มีนิสัยการรับประทานอาหารไม่เพียงพอ ครอบฟัน หรือ สุขลักษณะไม่ดี มีปัญหาเกี่ยวกับฟันมาตั้งแต่วัยเด็ก หรือ ปัญหาเกี่ยวกับฟันอื่นๆ หรือ ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม cariogenic bacteria สูง เช่น *S. mutans* ในปริมาณสูงกว่า 750,000 CFU/มล. ของน้ำลาย (Lewis and Ismail, 1995) สำหรับสภาวะโรคฟันผุอย่างรุนแรงในเด็กเล็กเป็นสภาวะรอยโรคแบบเรื้อรังที่เกิดขึ้นมากกว่าโรคหอบหืดรุนแรง โดยมีอัตราการเกิดโรคโดยเฉลี่ยร้อยละ 0.8 ถึง 72 (Ismail and Sohn., 1999) ซึ่งยังเป็นปัญหาที่สำคัญของโลกอีกทั้งยังไม่มีแนวโน้มที่จะลดลงและเลิบบประมาณที่ต้องใช้ในการรักษาอย่างสูง ในออสเตรเลียมีอัตราความถี่การเกิดโรคตกอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 1 ถึง 12 ส่วนในทวีปเอเชีย Tsai *et al.*, 2006 รายงานว่าอัตราการเกิดรอยโรคนี้ในประเทศไต้หวันคิดเป็นร้อยละ 56

จากการสำรวจของกองทันตสาธารณสุข กรมอนามัยครั้งล่าสุด (พ. ศ. 2550) พบเด็กไทยอายุ 12 ปี ฟันผุเฉลี่ยร้อยละ 57 โดยกลุ่มอายุ 3 ขวบฟันผุร้อยละ 66 อายุ 5 ขวบฟันผุร้อยละ 87 คือผุทุก 9 ใน 10 คน โดยเด็ก 1 คน ฟันผุเฉลี่ย 6 ซี่ ในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทยมีอัตราความถี่การเกิดโรคร้อยละ 70 โรคฟันผุอย่างรุนแรงในเด็กเล็ก ก่อให้เกิดการชะลออัตราการเจริญเติบโตของทั้งร่างกาย ถ่วงระดับพัฒนาการอย่างถาวร ในไทยสภาวะโรคฟันผุอย่างรุนแรงในเด็กเล็กสามารถพบได้ตั้งแต่เด็กเล็กที่อายุต่ำกว่า 18 เดือน

สมมติฐานใหญ่ๆ สำหรับการเกิดคราบจุลินทรีย์ ได้แก่ ทฤษฎีแบบจำเพาะ (specific plaque hypothesis) ทฤษฎีแบบไม่จำเพาะ (nonspecific plaque hypothesis) และทฤษฎีระบบนิเวศ (ecological plaque) (March, 1994; Loesche, 1976; Theilade, 1986) ทฤษฎีแบบจำเพาะ เสนอว่ามีเพียงเชื้อไม่กี่ประเภทที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* แต่ทฤษฎีแบบไม่จำเพาะนั้นสรุปว่าโรคฟันผุเป็นผลลัพธ์ของเชื้อทั้งหมดที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ ส่วนทฤษฎีระบบนิเวศสรุปว่าโรคนั้นเกิดจากเชื้อบางประเภทที่จะพบมากในภาวะที่ปราศจากโรค มักพบว่ามีเพิ่มมากขึ้นในบริเวณที่ไม่มีรอยโรคในช่องปาก โรคฟันผุก็เช่นเดียวกัน คือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของภาวะที่ไม่มีโรคไปสู่มีโรค องค์ประกอบทางแบคทีเรียนั้นเปลี่ยนไปเพื่อที่จะสามารถป้องกันโรคต่อไปได้ หรือยับยั้งไม่ให้เกิดโรคนั้น จะเป็นการดีถ้าสามารถเฝ้าระวัง และเฝ้าดูการเปลี่ยนแปลงของเชื้อที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นที่มาของ Biofilms เป็นชุมชนของจุลินทรีย์ที่พึ่งพาอาศัยกันอยู่อย่างสลับซับซ้อน และเป็นต้นเหตุของโรคที่สำคัญอย่างมากสองโรคในทางทันตสุขภาพ ได้แก่ โรคปริทันต์ และโรคฟันผุ (Loesche, 1986) ในช่องปากนั้นมีเชื้ออยู่มากถึง 700 ชนิด (Socransky et al.) แต่มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่นักวิจัยสามารถเข้าใจกลไกการเกิดโรคของมันได้อย่างลึกซึ้ง สำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *mutans streptococci* กับการเกิดโรคฟันผุเกิดเนื่องจากความสามารถในการยึดเกาะ ประสิทธิภาพในการสร้างกรด และความสามารถในการทนกรด (Banas, 2004) พบว่าเด็กส่วนใหญ่ได้รับการส่งผ่านเชื้อกลุ่มนี้จากมารดา (Berkowitz et al., 1975; Li and Caufield, 1995; Lapirotanakul et al., 2008) โดยช่วงอายุระหว่าง 19 ถึง 31 เดือน ถือเป็นหน้าต่างของการติดเชื้อ (window of infectivity) คือเป็นช่วงอายุที่เด็กโดยทั่วไปมีโอกาสในการรับเชื้อ *mutans streptococci* มากที่สุด (Caufield et al., 1993) แม้การส่งผ่านเชื้อเร็วกว่าช่วงเวลาดังกล่าวจะมีการรายงานอยู่บ้าง แต่มักเป็นในประชากรกลุ่มเสี่ยง เช่น มีการบริโภคคาร์โบไฮเดรตสูง หรือมารดามีระดับเชื้อ *mutans streptococci* ในน้ำลายสูง (Florio et al., 2004; Mohan et al., 1998)

เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *mutans streptococci* เป็นเชื้อแกรมบวก รูปกลม ซึ่งเรียงตัวต่อกันเป็นสายสั้นหรือยาวปานกลาง ไม่มีการเคลื่อนที่ (non-motile) ให้ผลลบในปฏิกิริยา catalase สามารถหมักย่อยน้ำตาล mannitol และเชื้อส่วนใหญ่ในกลุ่มยังสามารถหมักย่อยน้ำตาล sorbitol ได้ด้วย (Hamada and Slade, 1980) เชื้อกลุ่ม *mutans streptococci* แบ่งออกเป็น 7 species คือ *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus Ferus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus macacae* และ *Streptococcus downei* (Kawamura et al., 1995) โดย *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* เป็นชนิดที่มีรายงานความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคฟันผุในมนุษย์ อย่างไรก็ตามยังคงมีการรายงานความแตกต่างในการก่อโรคของเชื้อสายพันธุ์ (strain) ต่างๆ ในกลุ่มดังกล่าวออกมาอย่างต่อเนื่อง (Khoo et al., 2005; Nakano et al., 2005; Napimoga et al., 2004)

สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ใช้ป้องกันฟันผุหรือชะลอการเกิดโรคฟันผุในปัจจุบัน นิยมใช้ Fluoride ทั่วไปอยู่ในรูปของน้ำดื่ม ยาเม็ด ยาสีฟัน เจลเคลือบฟัน น้ำยาบ้วนปาก โดยอาจมีผลทำให้ลดการเกิดฟันผุได้ร้อยละ 20-50 (Lewis and Ismail, 1995) นอกจากนี้ ก็มีสารอื่นๆ เช่น Chlorhexidine และ thymol ในรูปของ

antimicrobial varnish หรือน้ำยาบ้วนปาก ก็อาจจะไม่เหมาะสมกับคนบางช่วงอายุ เช่น วัยเด็ก อาจจะเนื่องจากมีรสชาติและรูปแบบไม่เป็นที่ยอมรับ ไม่สะดวกในการพกพา หากจะมีการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ป้องกันฟันผุให้ทันสมัย สะดวกในการพกพา และใช้งานง่าย ก็จะเป็นวิธีการในการป้องกันฟันผุที่สามารถใช้ได้ในทุกสถานที่ ทุกเวลา น่าจะเป็นการช่วยลดการเกิดฟันผุเพิ่มเติมจากการดูแลรักษาฟันโดยทันตแพทย์ และการดูแลรักษาฟันตามปกติ

อาการเจ็บคอ/ไอ

โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย มีวิวัฒนาการมายาวนาน และยังคงมีความสำคัญที่สุดต่อสุขภาพและอนามัยของมนุษย์ เนื่องจากอัตราการเกิดโรคสูง อาจพบได้ทั้งในกลุ่มคนที่มีสุขภาพแข็งแรงและในกลุ่มคนที่มีความบกพร่องของภูมิคุ้มกัน ตลอดจนพบได้ในคนทุกอายุ

โรคคออักเสบ (pharyngitis, sore throat) และต่อมทอนซิลอักเสบ (tonsillitis) เกิดจากการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย ทำให้มีไข้สูงและเจ็บคอ โรคคออักเสบที่เกิดจากไวรัสที่พบได้บ่อย เช่น ไข้หวัด ไข้หวัดใหญ่ พวกนี้ส่วนใหญ่ผู้ป่วยจะมีน้ำมูกใสๆ ต่อมทอนซิลไม่แดงมากและไม่มีหนอง ในรายที่เกิดจากแบคทีเรียมักพบต่อมทอนซิลบวมโต และมีหนองขาวๆ เหลืองๆ เป็นจุดๆ อยู่บนต่อมทอนซิล ส่วนที่เกิดจากแบคทีเรียนั้นพบว่า Group A streptococci เป็นสาเหตุร้อยละ 95 อีกร้อยละ 5 เป็น Group C และ G รายที่รุนแรงมากขึ้นอาจพบจุดหรือปื้นหนองคลุมบนต่อมทอนซิล อาจเรียกว่า follicular tonsillitis หรือ membranous pharyngitis พวกนี้จะเจ็บคอมาก ส่วนปื้นหนองดังกล่าวจะเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear neutrophil และเนื้อเยื่อเน่าตาย ผู้ป่วยที่ตัดต่อมทอนซิลแล้วอาการจะไม่รุนแรง

อาการแทรกซ้อนจากเชื้อ Group A streptococci

1. เชื้ออาจลุกลามไปยังบริเวณใกล้เคียงทำให้หูชั้นกลางอักเสบ (otitis media), ไซนัสอักเสบ (sinusitis), ฝีของทอนซิล (peritonsillar abscess), ปอดอักเสบ (pneumonia)
2. เชื้ออาจแพร่กระจายเข้ากระแสเลือด ทำให้เป็นข้ออักเสบเฉียบพลัน (acute arthritis), กระดูกอักเสบ (osteomyelitis), เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis)
3. โรคแทรกซ้อนที่สำคัญที่เกิดภายหลังการติดเชื้อ Group A streptococci ในลำคอ คือ ไข้รูมาติก (rheumatic fever) และหน่วยไตอักเสบเฉียบพลัน (acute glomerulonephritis) โรคไข้รูมาติกพบได้ในคนทุกเพศทุกวัยแต่พบมากในช่วงอายุ 5-15 ปี ทำให้มีการอักเสบของข้อต่างๆและส่วนใหญ่มีการอักเสบของหัวใจร่วมด้วย ผู้ป่วยไข้รูมาติก ถ้ามีอาการกำเริบซ้ำๆ ซากๆ จะทำให้หัวใจมีการอักเสบเรื้อรัง ดังนั้นถ้าไม่ได้รับการหรือปล่อยให้เรื้อรังในที่สุดจะทำให้เกิดโรคหัวใจรูมาติก (rheumatic heart disease) หรือลิ้นหัวใจพิการ คือรั่วหรือตีบได้ บางรายอาจต้องลงเอยด้วยการผ่าตัดหัวใจซึ่งทำให้สิ้นเปลืองเงินทองและเวลามาก

ปัจจุบันอาการเจ็บคอที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียในรายที่รุนแรงมักมีการให้ยาปฏิชีวนะทางปาก ส่วนรายที่อาการไม่รุนแรงไม่นิยมให้ยาปฏิชีวนะ ผลลัพธ์ที่ไ้บรรเทาอาการเจ็บคอโดยทั่วไปเป็นยาอมที่มียาปฏิชีวนะอยู่ด้วย หรือยาอมสมุนไพรชนิดต่างๆ นอกจากนี้ก็มีผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่

ประกอบด้วยสารสกัด chamomile ดังนั้นหากมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากหรือรูปแบบอื่นที่สะดวกในการพกพาที่ใช้ส่วนประกอบสำคัญที่มีในประเทศไทยและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ จะช่วยให้สามารถบรรเทาอาการเจ็บคอ/ไอ ในผู้ป่วยที่มีอาการไม่มาก หรือใช้เสริมในผู้ป่วยที่ได้รับยาปฏิชีวนะตามการรักษาทั่วไป ก็น่าจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยต่อไป

สมุนไพรและน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

สมุนไพรไทยหลายชนิดแสดงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น ตะไคร้ (นันทวัน, 2529) กระเพรา พลุ (นันทวัน, 2530) โหระพา (Navarro, 1996; Tassou, 1995; Okonogi, 1994) นอกจากนี้ จากรายงานการศึกษา น้ำมันหอมระเหยซึ่งเตรียมโดยวิธี cold press จากผิวของผลมะกรูดสด ประกอบด้วยสารสำคัญหลัก คือ beta-pinene, sabinene, limonene นอกจากนี้ก็ยังมีประกอบด้วยสารประกอบอื่นๆ เช่น alpha-pinene, camphene, myrcene, 1,8 cineol, gamma-terpinene, para-cymene, citronellal, alpha-terpineol เป็นต้น (Lawrence et al, 1971)

นอกจากนี้ จากการศึกษาเกี่ยวกับ bactericidal activity ของน้ำมันหอมระเหย 96 ชนิด และสารสำคัญ 23 ชนิดที่พบในน้ำมันหอมระเหยต่างๆ ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, และ *Salmonella enterica* ซึ่งแยกได้จากอาหารและจากการศึกษาทางคลินิก พบว่า น้ำมันหอมระเหย 27 ชนิด และสารประกอบ 12 ชนิด มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ตัวอย่างเช่น น้ำมันจากขิง กานพลู อบเชย ตะไคร้ พริกหอม ใบกระวาน เป็นต้น นอกจากนี้ ยังพบว่า สารสำคัญหลายชนิดมีผลฆ่าเชื้อแบคทีเรียเหล่านั้น สารสำคัญที่มีผลต้านเชื้อแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น estragole, citral, thymol, eugenol, geraniol, isoeugenol เป็นต้น (Friedman et al, 2002) นอกจากนี้ ในการศึกษาบางฉบับ ก็มีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของ D-limonene (Subba et al, 1967; Gnan and Rana, 1982) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มักพบอยู่ในน้ำมันหอมระเหยหลายชนิด

จากงานวิจัยเรื่อง “ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในผักสดที่เตรียมจากน้ำมันหอมระเหย และ/หรือ น้ำซึ่งมีน้ำมันหอมระเหยที่เหลือจากอุตสาหกรรมการกลั่นน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรบางชนิด” (วิมล, 2546) ทำการศึกษาน้ำมันหอมระเหย 7 ชนิด พบว่า น้ำมันหอมระเหย 3 ชนิด ที่เตรียมโดยวิธี steam distillation ได้แก่ น้ำมันตะไคร้ น้ำมันพลู และน้ำมันมะกรูด มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 4 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* จึงทำให้เกิดความคาดหวังว่าน้ำมันหอมระเหยเหล่านี้น่าจะมีแนวโน้มที่จะมีผลยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ ได้ งานวิจัยในช่วงต่อมา จึงได้มีการศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยในรูปแบบต่างๆ เพื่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ คือ *Streptococcus mutans* ผลิตภัณฑ์ที่มีการพัฒนา ได้แก่ แผ่นฟิล์มละลายเร็วที่มีน้ำมันมะกรูด ในโครงการวิจัย เรื่อง “ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อใช้ป้องกันฟันผุ และ/หรือ ระงับกลิ่นปาก จากน้ำมันหอมระเหย และ/หรือสารสกัดสมุนไพร” (วิมล, 2547) หมายฝรั่งที่มีน้ำมันมะกรูด ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากในรูปแบบ emulsion จากน้ำมันมะกรูด น้ำมันโหระพา และน้ำมันตะไคร้ และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากชนิดใสจากน้ำมันมะกรูด น้ำมันโหระพา น้ำมันตะไคร้ น้ำมันใบมะกรูด รวมทั้งการวิเคราะห์สารสำคัญเบื้องต้นในน้ำมันหอมระเหย แต่ละชนิด

จากโครงการวิจัย เรื่อง “ผลิตภัณฑ์อาหารจากน้ำมันหอมระเหย และ/หรือ สารสกัดสมุนไพร ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*” (วิมล, 2549) พบว่ารูปแบบผลิตภัณฑ์ที่มีแนวโน้มที่ดี น่าจะนำไปพัฒนาต่อไปเพื่อการใช้งานทางคลินิกและในทางอุตสาหกรรม คือ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นรูปแบบสเปรย์ อย่างไรก็ตามเนื่องจากสูตรตำรับที่ได้พัฒนาขึ้นมีการยอมรับในส่วนของสีและความใสที่ดี แต่ยังไม่ได้รับคะแนนในส่วนของการยอมรับในเรื่องของกลิ่นและรสชาติที่ไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากกลิ่นรสเฉพาะตัวของน้ำมันหอมระเหย ประกอบกับการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในการศึกษาที่ผ่านมาได้ดำเนินการทดสอบในเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* เพียงตัวอย่างเดียว จึงน่าจะยังไม่เป็นหลักฐานที่น่าเชื่อถือพอ น่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง *S. mutans* ที่เป็นเชื้อมาตรฐานและเชื้อที่เก็บตัวอย่างได้จากผู้ป่วยจริง เพื่อใช้เป็นหลักฐานที่น่าเชื่อถือเพียงพอสำหรับการดำเนินการวิจัยในขั้นการศึกษาทางคลินิกก่อนการนำไปใช้ประโยชน์ในผู้ป่วยต่อไป นอกจากนี้ การยับยั้งแบคทีเรีย *S. mutans* ในหลอดทดลองอาจมีความแตกต่างจากการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวใน biofilms จึงน่าที่จะมีการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นถึงผลต่อการสร้าง biofilms ของแบคทีเรีย เพื่อเป็นการยืนยันฤทธิ์การยับยั้ง ก่อนการนำผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากไปศึกษาทางคลินิกต่อไป ในข้อเสนอโครงการวิจัยนี้จึงได้มีแนวคิดที่จะนำน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดมาทำการศึกษาพัฒนาปรับปรุงสูตรพื้นฐานเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งานทั้งในแง่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ และการยอมรับทางประสาทสัมผัส

เมื่อผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้ง *Streptococcus mutans* ทำให้มีความคาดหวังว่า ผลิตภัณฑ์จากน้ำมันหอมระเหยน่าจะมีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Group A streptococci เช่นกัน จึงได้ดำเนินการทดสอบเบื้องต้น ถึงฤทธิ์ของน้ำมันมะกรูด น้ำมันตะไคร้ น้ำมันใบมะกรูด และน้ำมันโหระพา ในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว พบว่า น้ำมันใบมะกรูดมีแนวโน้มที่ดีมากในการแสดงฤทธิ์ยับยั้งดังกล่าว ดังนั้นจึงน่าที่จะมีการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันใบมะกรูดต่อ Group A streptococci และแบคทีเรียอื่นๆ ที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียจากผู้ป่วย ก่อนการนำไปศึกษาทางคลินิกต่อไป

รูปแบบผลิตภัณฑ์อีกชนิดที่น่าจะเหมาะกับวิถีการดำเนินชีวิตในปัจจุบัน คือ รูปแบบ capsule จีว โดยรูปแบบนี้เป็นลักษณะของ capsule ชนิด soft gelatin capsule ซึ่งสามารถบรรจุน้ำมันหอมระเหยได้โดยตรง ดังนั้น หากมีการพัฒนาสูตรน้ำมันหอมระเหยให้มีรสชาติและกลิ่นที่ดี เป็นที่ยอมรับ มีขนาดความเข้มข้นของน้ำมันที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุและชนิดที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ ก็น่าจะเป็นการเพิ่มรูปแบบของผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพอีกรูปแบบหนึ่ง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. วิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด
2. ทดสอบน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ
3. ทดสอบน้ำมันใบมะกรูดถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ
4. พัฒนาสูตรตำรับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดสำหรับบรรจุใน capsule จีว และการทดลองบรรจุน้ำมันใบมะกรูดใน capsule จีว
5. พัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดเพื่อใช้ป้องกันโรคฟันผุ
6. พัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูดเพื่อใช้บรรเทาอาการเจ็บคอ/ไอ
7. ทดสอบผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากและสูตรตำรับน้ำมันสำหรับบรรจุใน capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดถึงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ
8. ทดสอบผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากและสูตรตำรับน้ำมันสำหรับบรรจุใน capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูดถึงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ
9. ทดสอบผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากและสูตรตำรับน้ำมันสำหรับบรรจุใน capsule จีว จากน้ำมันมะกรูด และน้ำมันใบมะกรูดถึงผลต่อการสร้าง biofilms ของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ
10. ศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่ได้พัฒนาขึ้น

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การจัดซื้อน้ำมันมะกรูด และน้ำมันใบมะกรูด

ดำเนินการจัดซื้อตัวอย่างน้ำมันมะกรูด และน้ำมันใบมะกรูด ที่มีการผลิตจำหน่ายทางการค้า โดยการผลิตด้วยวิธี steam distillation

ผลการวิจัย

ได้ตัวอย่างน้ำมันมะกรูด (จากผลมะกรูด) และน้ำมันใบมะกรูด ขนาดบรรจุ 1 ลิตร จากบริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอม ไทย-จีน จำกัด เก็บรักษาตัวอย่างน้ำมันไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ด้วยเทคนิค GC

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด เพื่อเปรียบเทียบและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญดังนี้

2.1 น้ำมันมะกรูด

เตรียมน้ำมันที่ความเข้มข้น 100 ppm จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วย GC-MS โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

Column: capillary column (HP-INNOWAX) (60x0.25mmx0.25 μ m) well coated with cross linked PEG

Carrier gas: Helium 0.8 ml/min (Helium 99.9995%)

Inlet injection: temp 200°C, inlet split ratio 5:1

Liquid injecting vol: 1 μ m

Oven program temp: 70°C for 2 min, at 4°C/min program to 220°C held for 5 min and finally at 10°C/min program to 300°C held for 3 min

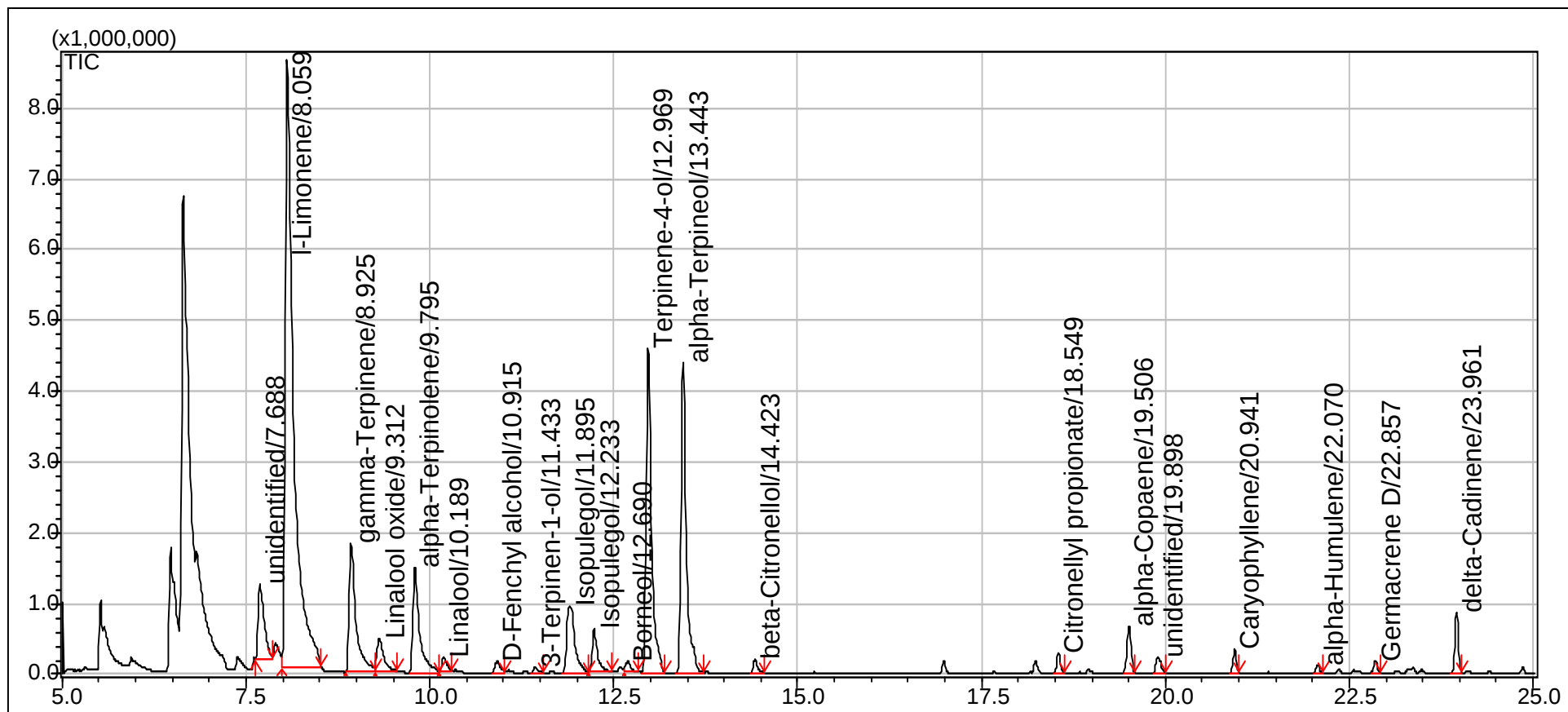
GC/MS interface (Auxs) temp: 250°C

Mass Spectrometer condition: EL source temp 250°C, Emission 34.6, Ele energy 70 Ev, Qoadrole temp 150°C Scan mode: 303450; EM Volt 1450

MS library: Wiley 275/version 6.0, NBS 45K

ผลการวิจัย

เมื่อวิเคราะห์น้ำมันมะกรูดด้วย GC-MS ได้โครมาโตแกรมดังรูปที่ 1 โดยมีปริมาณของ l-Limonene มากที่สุด คิดเป็น 40.65% รองลงมา คือ Terpinene-4-ol (13.71%) และ Alpha-Terpineol (13.20%) ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ ผลดังในตารางที่ 1



รูปที่ 1 โครมาโตแกรมของน้ำมันมะกรูดเมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS

ตารางที่ 1 องค์ประกอบสารสำคัญในน้ำมันมะกรูด

Peak number	Retention Time (RT, min)	% Area	% Height	องค์ประกอบ
1	7.69	3.47	3.88	unidentified
2	8.06	40.65	31.37	Limonene
3	8.93	7.24	6.63	Gamma-Terpinene
4	9.31	1.73	1.64	Linalool oxide
5	9.80	5.80	5.42	Alpha-terpinolene
6	10.19	0.60	0.73	Linalool
7	10.92	0.48	0.59	D-Fenchyl alcohol
8	11.43	0.20	0.28	3-Terpinen-1-ol
9	11.90	4.38	3.45	Isopulegol
10	12.23	1.95	2.27	Isopulegol
11	12.69	0.45	0.57	Borneol
12	12.97	13.71	16.73	Terpinene-4-ol
13	13.44	13.20	16.00	Alpha-Terpineol
14	14.42	0.45	0.66	Beta-Citronellol
15	18.55	0.55	1.07	Citronellyl propionate
16	19.51	1.56	2.42	Alpha-Copaene
17	19.90	0.61	0.81	Unidentified
18	20.94	0.69	1.27	Caryophyllene
19	22.07	0.22	0.41	Alpha-Humulene
20	22.86	0.36	0.66	Germacrene D
21	23.96	1.69	3.14	Delta-Cadinene

2.2 น้ำมันใบมะกรูด

เตรียมน้ำมันที่ความเข้มข้น 100 ppm จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วย GC-MS โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

Column: capillary column (HP-INNOWAX) (60x0.25mmx0.25 μ m) well coated with cross linked PEG

Carrier gas: Helium 0.8 ml/min (Helium 99.9995%)

Inlet injection: temp 200°C, inlet split ratio 5:1

Liquid injecting vol: 1 μ m

Oven program temp: 70°C for 2 min, at 4°C/min program to 220°C held for 5 min and finally at 10°C/min program to 300°C held for 3 min

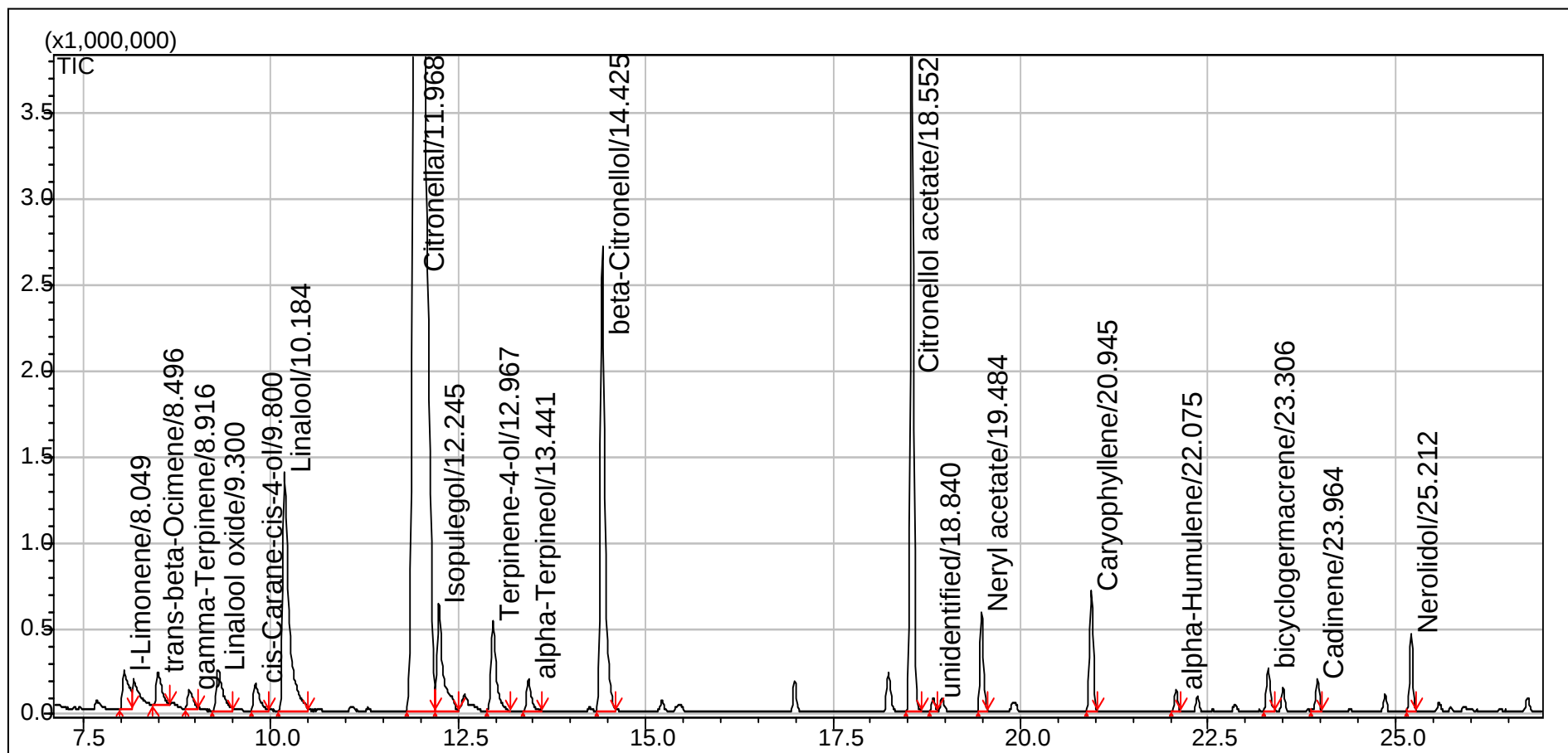
GC/MS interface (Auxs) temp: 250°C

Mass Spectrometer condition: EL source temp 250°C, Emission 34.6, Ele energy 70 Ev, Qoadrole temp 150°C Scan mode: 303450; EM Volt 1450

MS library: Wiley 275/version 6.0, NBS 45K

ผลการวิจัย

พบว่าน้ำมันจากใบมะกรูดเมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS ได้โครมาโตแกรมดังรูปที่ 2 โดยมีปริมาณของ Citronellal มากที่สุด คิดเป็น 80.04% ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ ผลดังตารางที่ 2



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมของน้ำมันใบมะกรูดเมื่อวิเคราะห์ด้วย GC-MS

ตารางที่ 2 องค์ประกอบสารสำคัญในน้ำมันใบมะกรูด

Peak number	Retention Time (RT, min)	% Area	% Height	องค์ประกอบ
1	8.05	0.52	0.40	Limonene
2	8.50	0.38	0.34	Trans-beta-Ocimene
3	8.92	0.20	0.19	Gamma-Terpinene
4	9.30	0.54	0.42	Linalool oxide
5	9.80	0.31	0.28	Cis-Carane-cis-4-ol
6	10.18	3.04	2.42	Linalool
7	11.97	80.04	76.97	Citronellal
8	12.25	1.29	1.08	Isopulegol
9	12.97	0.94	0.91	Terpinene-4-ol
10	13.44	0.29	0.32	Alpha-Terpineol
11	14.43	4.13	4.71	Beta-citronellol
12	18.55	5.46	7.83	Citronellol acetate
13	18.84	0.08	0.14	Unidentified
14	19.48	0.70	1.01	Neryl acetate
15	20.95	0.89	1.22	Caryophyllene
16	22.08	0.14	0.22	Alpha-Humulene
17	23.31	0.33	0.44	Bicyclogermacrene
18	23.96	0.23	0.33	Cadinene
19	25.21	0.49	0.78	Nerolidol

3. การเก็บเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุจากผู้ป่วย

ดำเนินการเก็บเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุจากผู้ป่วยเด็ก ที่คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยให้ผู้ป่วยเคี้ยวพาราฟิน ขณะเคี้ยว บ้วนน้ำลายใส่ขวดจนได้ปริมาณน้ำลาย 5 มล. แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA ทดสอบ และแยกเชื้อ *Streptococcus mutans* และเก็บรักษาไว้เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

ผลการวิจัย

ได้ clinical isolates จำนวน 17 ตัวอย่าง เก็บรักษาเชื้อไว้ที่ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อการทดสอบในขั้นต่อไป

4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในน้ำมันหอมระเหย

4.1 การทดสอบน้ำมันมะกรูด และน้ำมันใบมะกรูด ถึงฤทธิ์ยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคฟันผุ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ที่เป็น standard strain คือ *S. mutans* ATCC 25175 และ เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยเด็ก (clinical isolates) จำนวน 17 ตัวอย่าง โดยวิธีการดังนี้

ทำการเพาะเชื้อที่จะใช้ในการทดสอบในอาหาร BHI broth ภายใต้สภาวะไร้อากาศและมีปริมาณ CO₂ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 (10⁷ cfu/ml) เพื่อใช้ในการทดสอบ เตรียมความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2 % v/v โดยใช้ tween80 และ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ *S. mutans* โดยใช้วิธี broth microdilution method แบบ two-fold serial dilution เพื่อหาค่า MIC และ MBC

ผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* มีความไวต่อน้ำมันใบมะกรูดมากกว่าน้ำมันมะกรูด รายละเอียดดังในตารางที่ 3 ซึ่งจากการทดลองพบว่าน้ำมันใบมะกรูดให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.007 – 1 %v/v โดยพบว่าเชื้อ *S. mutans* clinical isolate สายพันธุ์ 013 มีความไวต่อน้ำมันใบมะกรูดมากที่สุด โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.007-0.031 %v/v และนอกจากนี้พบว่าน้ำมันมะกรูดมีฤทธิ์ไม่ดีเท่าที่ควรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. mutans* โดยผลจากการทดลองพบว่าค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.125 - >1% v/v โดยส่วนใหญ่พบว่าเชื้อ *S. mutans* มีความไวต่อน้ำมันผิวมะกรูดที่ความเข้มข้น 1% v/v

ตารางที่ 3ฤทธิ์ของน้ำมันมะกรูดต่อการเจริญของเชื้อ *Streptococcus mutans* (Standard strain และ Clinical isolates)

Culture	น้ำมันมะกรูด		น้ำมันไอบะกรูด	
	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)
ATCC 25775	0.125	0.125	0.0625	0.5
Clinical 006	1	>1	0.125	0.5
Clinical 201	>1	>1	0.0625	0.25
Clinical 202	1	>1	0.031	0.125
Clinical 012	1	>1	0.015	0.0625
Clinical 104	1	>1	0.0625	0.125
Clinical 113	0.5	>1	0.031	0.125
Clinical 109a	1	>1	0.031	0.125
Clinical 109b	1	>1	0.031	0.0625
Clinical 217	1	>1	0.0625	0.125
Clinical 216	1	>1	0.125	0.25
Clinical 89	0.5	>1	0.015	0.031
Clinical 021	1	>1	0.0625	0.125
Clinical 029	1	>1	0.0625	0.125
Clinical 013	1	>1	0.007	0.031
Clinical 100	>1	>1	0.125	1
Clinical 192	1	>1	0.0625	0.5
Clinical 143	1	>1	0.0625	0.5

4.2 การทดสอบน้ำมันมะกรูดและน้ำมันไอบะกรูด ถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มที่ก่อให้เกิดอาการเจ็บคอ/ไอ

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันไอบะกรูด ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ ดังนี้

วิธีที่ 1 Disk diffusion method

เตรียมให้เชื้อมีความขุ่นมาตรฐาน คือ เท่ากับความขุ่นของหลอด McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/มล. แล้วใช้ swab ป้ายเชื้อให้ทั่วบนผิวหน้าของ sheep blood agar โดยป้ายเป็น 3 ระบาย จากนั้นใช้ปากคีบไร้เชื้อ (sterile forceps) ซึ่งทำโดยคนปากคีบกับเปลวไฟแล้วปล่อยให้เย็น

คืบ disk ที่ชุบน้ำมันมะกรูดหรือน้ำมันใบมะกรูด ในปริมาณ 10 μ l วางลงบนผิวหน้าของ blood agar และหลังจากที่วาง disk แล้วต้องใช้ปากคีบไว้เชือกคเบาๆ ให้ disk แนบสนิทกับวุ้น เพื่อให้ให้น้ำมันหอมระเหยสามารถแพร่กระจายออกจาก disk ไปใน blood agar ได้โดยสม่ำเสมอทุกทิศทาง แล้วนำ blood agar ไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C. นาน 18-24 ชม. จึงนำมาอ่านผล เชื้อที่ให้ผลไวต่อน้ำมันหอมระเหยคือ มีวงใสรอบๆ disk (inhibition zone) บันทึกผลโดยวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเป็นมิลลิเมตร ถ้าทำการทดสอบเชื้อ *Haemophilus influenzae* จะใช้ chocolate agar แทนการใช้ blood agar และเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C. ในตู้อบที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ในความเข้มข้นร้อยละ 5 (CO_2 incubator)

วิธีที่ 2 Microbroth dilution method

ใน microtiter plate ชนิด 96 หลุม (well) จะเตรียมให้มี cation-adjusted Mueller Hinton broth plus Tween20 ในความเข้มข้น 0.25 โดยปริมาตร ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้จะเติมน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการทดสอบด้วยในปริมาณที่คิดเป็นความเข้มข้นร้อยละ 0.01, 0.03, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5 และ 1 μ l โดยปริมาตรตามลำดับ สำหรับหลุมที่ไม่มีน้ำมันหอมระเหยจะจัดเป็นกลุ่มควบคุม เตรียมให้เชื้อมีความขุ่นมาตรฐาน คือ เท่ากับความขุ่นของหลอด McFarland เบอร์ 0.5 ซึ่งจะมีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/มล. แล้วทำการเจือจางเป็น 1: 10 (10^7 CFU/มล.) จากนั้นเติมเชื้อลงใน microtiter plate ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^4 CFU/หลุม แล้วนำ microtiter plate ไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C. นาน 18-24 ชม. จึงนำมาอ่านผล คำนวณหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด (Minimal inhibitory concentration หรือ MIC) ได้ จากนั้นจะสามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (Minimal bactericidal concentration หรือ MBC) ได้ ทำโดยเพาะเชื้อจากหลุมต่างๆ ที่ใส่ลงบน blood agar นำไปอบเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C. นาน 18-24 ชม. จึงนำมาอ่านผลโดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่ทำให้ไม่มีเชื้อขึ้นเป็นค่า MBC

ผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อแบคทีเรียซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่โรงพยาบาลศิริราช (clinical isolates) โดยวิธีที่ 1 Disk diffusion method และ วิธีที่ 2 Microbroth dilution method โดยทำการทดสอบใน clinical isolates ของ *Streptococcus pyogenes* (group A streptococci) จำนวน 61 isolates, *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) (26 isolates), Group C Streptococci (5 isolates), Group F Streptococci (3 isolates), Group G Streptococci (11 isolates), *Streptococcus pneumoniae* (51 isolates), *Haemophilus influenzae* (52 isolates), *Staphylococcus aureus* (MRSA)(50 isolates), *Staphylococcus aureus* (MSSA)(50 isolates), *Acinetobacter baumannii* (50 isolates) พบว่าได้ผลดังในตารางที่ 4 พบว่าในวิธีที่ 1 คือ Disk diffusion method นั้นโดยส่วนใหญ่ น้ำมันใบมะกรูดจะให้ Inhibition zone ที่กว้างกว่าน้ำมันมะกรูด คือ น้ำมันใบมะกรูดแสดงผลการยับยั้งที่ดีกว่า น้ำมันมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ทำการทดสอบ คือ ต่อ *Streptococcus pyogenes* (group A streptococci), *Streptococcus agalactiae*, Group C Streptococci, Group F Streptococci, Group G Streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza* แต่ยกเว้นฤทธิ์ยับยั้งต่อ *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus* (MSSA), และ *Acinetobacter baumannii*

ซึ่งน้ำมันมะกอกให้ Inhibition zone ที่กว้างกว่าน้ำมันไบมะกอก รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 5-14 (ดูภาคผนวก ก)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกอกและน้ำมันไบมะกอกต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ โดยวิธี Disk diffusion method

Pathogens	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร) (Mean±SD)	
	น้ำมันมะกอก	น้ำมันไบมะกอก
<i>Streptococcus pyogenes</i> (Group A Streptococci)(61 isolates)	14.26±1.64	18.89±2.98
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Group B Streptococci) (26 isolates)	11.42±0.7	14.23±1.21
Group C Streptococci (5 isolates)	12±0.71	14.4±0.55
Group F Streptococci (3 isolates)	16.33±1.53	17.67±2.52
Group G Streptococci (11 isolates)	13.0±1.0	15.64±0.81
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (51 isolates)	17.08±2.04	25.0±4.84
<i>Haemophilus influenzae</i> (52 isolates)	16.02±2.3	29.73±6.07
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) (50 isolates)	23.34±1.93	12.58±1.4
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) (50 isolates)	22.66±1.61	11.84±1.09
<i>Acinetobacter baumannii</i> (50 isolates)	21.98±1.61	9.28±0.88

สำหรับการทดสอบโดยวิธีที่ 2 Microbroth dilution method พบว่าน้ำมันมะกอกและน้ำมันไบมะกอก มีค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) เป็นช่วง (range) โดยสรุปสำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ดังในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ โดยวิธี Microbroth dilution method

Pathogens	น้ำมันมะกรูด		น้ำมันใบมะกรูด	
	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)
<i>Streptococcus pyogenes</i> (Group A Streptococci) (61 isolates)	0.125-2 (MIC ₅₀ = 0.5, MIC ₉₀ = 1)	0.125-2	0.125-4 (MIC ₅₀ = 0.5, MIC ₉₀ = 2)	0.125-4
<i>Streptococcus agalactiae</i> (Group B Streptococci) (2 isolates)	(MIC ₅₀ = 0.5)	-	1-2 (MIC ₅₀ = 1)	1-2
Group C Streptococci (2 isolates)	(MIC ₅₀ = 0.5)	-	0.5-1 (MIC ₅₀ = 0.5)	0.5-1
Group F Streptococci (2 isolates)	0.125-0.5 (MIC ₅₀ = 0.125)	0.125-0.5	0.25-0.5 (MIC ₅₀ = 0.25)	0.5-1
Group G Streptococci (2 isolates)	(MIC ₅₀ = 1)	-	0.25-1 (MIC ₅₀ = 0.25)	0.25-1
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) (50 isolates)	0.125-2 (MIC ₅₀ = 0.25, MIC ₉₀ = 0.5)	0.25-2	0.25-8 (MIC ₅₀ = 1, MIC ₉₀ = 4)	1-8
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA) (50 isolates)	0.125-1 (MIC ₅₀ = 0.25, MIC ₉₀ = 0.5)	0.25-1	0.125-4 (MIC ₅₀ = 1, MIC ₉₀ = 2)	1-8
<i>Acinetobacter baumannii</i> (50 isolates)	0.125-0.5 (MIC ₅₀ = 0.125, MIC ₉₀ = 0.5)	0.125-1	0.25-2 (MIC ₅₀ = 0.5, MIC ₉₀ = 1)	0.5-8

จากผลการทดสอบโดยวิธี Microbroth dilution method พบว่า

สำหรับ *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococci) (61 isolates) แม้ว่าผลการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี Disk diffusion method (ตารางที่ 4) น้ำมันใบมะกรูดจะให้ Inhibition zone ที่กว้างกว่าน้ำมันมะกรูดเล็กน้อย แต่ในการทดสอบโดยวิธี Microbroth dilution method (ตารางที่ 15) พบว่า ค่า MIC และ MBC ของน้ำมันทั้ง 2 ชนิด มีค่าเริ่มต้นใกล้เคียงกัน แต่ช่วง range ของน้ำมันใบมะกรูดจะกว้าง

กว่า ในภาพรวม น้ำมันมะกรูดให้ผลยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้ดีกว่าน้ำมันใบมะกรูดเล็กน้อย รายละเอียดการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 16 (ดูภาคผนวก ก)

สำหรับ *Staphylococcus aureus* (MRSA) (50 isolates) จากผลการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี Disk diffusion method (ตารางที่ 4) น้ำมันมะกรูดให้ Inhibition zone (23.34 มิลลิเมตร) ที่กว้างกว่า น้ำมันใบมะกรูด (12.58 มิลลิเมตร) ประมาณ 1 เท่า และสำหรับการทดสอบโดยวิธี Microbroth dilution method (ตารางที่ 15) พบว่า ค่า MIC (range = 0.125-2 %v/v (MIC₅₀ = 0.25, MIC₉₀ = 0.5)) และ MBC (range = 0.25-1%v/v) ของน้ำมันมะกรูด มีค่าต่ำกว่าค่า MIC (range = 0.25-8%v/v, (MIC₅₀ = 1, MIC₉₀ = 4) และ MBC (range = 1-8) ของน้ำมันใบมะกรูด ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี Disk diffusion method รายละเอียดผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 17 (ดูภาคผนวก ก)

สำหรับ *Staphylococcus aureus* (MSSA) (50 isolates) จากผลการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี Disk diffusion method (ตารางที่ 4) น้ำมันมะกรูดให้ Inhibition zone (22.66 มิลลิเมตร) ที่กว้างกว่า น้ำมันใบมะกรูด (11.84 มิลลิเมตร) ประมาณ 1 เท่า และสำหรับการทดสอบโดยวิธี Microbroth dilution method (ตารางที่ 15) พบว่า ค่า MIC ของน้ำมันมะกรูด (range: 0.125-1%v/v) มีค่าเริ่มต้นใกล้เคียงกันกับค่า MIC ของน้ำมันใบมะกรูด (range: 0.125-4 %v/v) แต่ น้ำมันใบมะกรูดมีช่วงกว้างกว่า โดยรวม น้ำมันมะกรูดให้ค่า MIC (MIC₅₀ = 0.25%v/v, MIC₉₀ = 0.5%v/v) ที่ต่ำกว่า น้ำมันใบมะกรูด (MIC₅₀ = 1%v/v, MIC₉₀ = 2%v/v) ในส่วนของค่า MBC พบว่า ค่า MBC ของน้ำมันมะกรูด (range: 0.25-1%v/v) ต่ำกว่าค่า MBC ของน้ำมันใบมะกรูด (range: 1-8 %v/v) 4-8 เท่า ซึ่งผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี Disk diffusion method รายละเอียดผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 18 (ดูภาคผนวก ก)

สำหรับ *Acinetobacter baumannii* จากผลการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี Disk diffusion method (ตารางที่ 4) น้ำมันมะกรูดให้ Inhibition zone (21.98 มิลลิเมตร) ที่กว้างกว่า น้ำมันใบมะกรูด (9.28 มิลลิเมตร) ประมาณ 1 เท่า และสำหรับการทดสอบโดยวิธี Microbroth dilution method (ตารางที่ 15) พบว่า ค่า MIC ของน้ำมันมะกรูดอยู่ในช่วง range: 0.125-0.5%v/v ส่วนค่า MIC ของน้ำมันใบมะกรูดอยู่ในช่วง range: 0.25-2 %v/v โดยรวม น้ำมันมะกรูดให้ค่า MIC (MIC₅₀ = 0.125%v/v, MIC₉₀ = 0.5%v/v) ที่ต่ำกว่า น้ำมันใบมะกรูด (MIC₅₀ = 0.5%v/v, MIC₉₀ = 1%v/v) ในส่วนของค่า MBC พบว่า ค่า MBC ของน้ำมันมะกรูด (range: 0.125-1%v/v) ต่ำกว่าค่า MBC ของน้ำมันใบมะกรูด (range: 0.5-8 %v/v) 4-8 เท่า ซึ่งผลการทดสอบที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี Disk diffusion method รายละเอียดผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 19 (ดูภาคผนวก ก)

สำหรับค่า MIC และ MBC ของเชื้อแบคทีเรียที่เหลือ คือ *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) (2 isolates), Group C Streptococci (2 isolates), Group F Streptococci (2 isolates), Group G Streptococci (2 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method ให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบโดยวิธี Disk diffusion method คือ น้ำมันมะกรูดให้ผลดีกว่าน้ำมันใบมะกรูด ดังแสดงในตารางที่ 20 – 23 (ดูภาคผนวก ก)

5. การพัฒนาสูตรตำรับน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดสำหรับบรรจุใน capsule จิว

5.1 การทดลองหาชนิดของน้ำมันที่จะใช้เจือจางน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด

5.1.1 ทดลองเปรียบเทียบสีของน้ำมันชนิดต่างๆ ที่จะนำมาใช้เจือจางน้ำมันมะกูด และน้ำมันใบมะกูด น้ำมันชนิดต่างๆ ที่นำมาทดลอง 5 ชนิด ได้แก่ น้ำมันทานตะวัน น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์ม

ผลการวิจัย

เนื่องจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดมีกลิ่นรสที่รุนแรง จึงต้องหาส่วนประกอบที่จะนำมาเจือจางน้ำมันหอมระเหยก่อนนำไปบรรจุใน soft gelatin capsule นอกจากนั้นด้วยข้อจำกัดของคุณสมบัติของ soft gelatin capsule ซึ่งไม่ทนน้ำหรือสารละลายน้ำ จึงมีข้อจำกัด จำเป็นต้องหาชนิดของน้ำมันที่จะนำมาใช้เจือจางน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิดนี้

จากการเปรียบเทียบสีของน้ำมันทั้ง 5 ชนิดที่จะนำมาใช้เจือจางน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด พบว่า น้ำมันทั้ง 5 ชนิดมีสีใกล้เคียงกับน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด ทั้งนี้ น้ำมันทานตะวันมีสีอ่อนที่สุด โดยความเข้มของสีใกล้เคียงกับน้ำมันมะกูด ส่วนน้ำมันปาล์มมีสีเข้มที่สุด ความเข้มของสีเรียงลำดับจากสีอ่อนที่สุดจนถึงสีที่เข้มที่สุดดังนี้ น้ำมันทานตะวัน (SUO) = น้ำมันมะกูด (KLO) < น้ำมันดอกคำฝอย (SFO) < น้ำมันถั่วเหลือง (SBO) < น้ำมันใบมะกูด (KLLO) < น้ำมันรำข้าว (RBO) < น้ำมันปาล์ม (POO) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ความเข้มของสีน้ำมันพืชชนิดต่างๆ เทียบกับน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด (จากซ้ายไปขวา-น้ำมันมะกูด น้ำมันทานตะวัน น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันใบมะกูด น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์ม)

5.1.2 ทดลองผสมน้ำมันหอมระเหย (น้ำมันมะกูด หรือ น้ำมันใบมะกูด) กับน้ำมันพืชแต่ละชนิด ในอัตราส่วนต่างๆ คือ น้ำมันหอมระเหย:น้ำมันพืช เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1,

5:1 บันทึกคุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันที่ได้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน บันทึกคุณลักษณะของส่วนผสมอีกครั้ง

ผลการวิจัย

น้ำมันมะกรูดผสมกับน้ำมันพืชอื่นๆ

จากการทดลองผสมน้ำมันหอมระเหย คือ น้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด กับน้ำมันพืชอื่นๆ บันทึกสรุปผลการทดลองได้ดังในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 สรุปผลการทดลองผสมน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดกับน้ำมันพืชอื่นๆ

น้ำมันหอมระเหย	น้ำมันพืช	คุณลักษณะของส่วนผสม (range)				หมายเหตุ
		สี	กลิ่น	ความขม	ความซ่า	
KLO	SBO	+1	+2 ถึง+3	+1ถึง+3	+1 ถึง+4	ความซ่าลดลงที่ 1:3, 1:4, 1:5
	POO	+1 ถึง+4	+2 ถึง+3	+1 ถึง+3	+1 ถึง+4	ความซ่าลดลงที่ 1:3, 1:4, 1:5, รสเปลี่ยน
	SFO	+1	+2 ถึง+3	+1 ถึง+3	+1 ถึง+4	ความซ่าลดลงที่ 1:3, 1:4, 1:5, รสเปลี่ยนน้อยกว่า SBO และ POO
	SUO	+1	+2 ถึง+3	+2 ถึง+3	+1 ถึง+4	ความซ่าลดลงที่ 1:3, 1:4, 1:5, รสเปลี่ยนน้อยกว่า SBO และ POO
	RBO	+1 ถึง+2	+2 ถึง+3	+1 ถึง+3	+1 ถึง+4	ความซ่าลดลงที่ 1:3, 1:4, 1:5, รสเปลี่ยน
KLLO	SBO	+1 ถึง+2	+3 ถึง+4	+1ถึง+4	+1 ถึง+4	กลิ่น KLLO แรงตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 ความซ่าลดลงที่ 1:3, 1:4, 1:5
	POO	+1 ถึง+4	+3 ถึง+4	+1 ถึง+4	+1 ถึง+4	กลิ่น KLLO แรงตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 ความซ่าลดลงที่ 1:3, 1:4, 1:5
	SFO	+1 ถึง+2	+3 ถึง+4	+1 ถึง+4	+1 ถึง+4	กลิ่น KLLO แรงตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 ความซ่าลดลงที่ 1:3, 1:4, 1:5
	SUO	+1 ถึง+2	+3 ถึง+4	+2 ถึง+4	+1 ถึง+4	กลิ่น KLLO แรงตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 ความซ่าลดลงที่ 1:3, 1:4, 1:5
	RBO	+1 ถึง+3	+3 ถึง+4	+1 ถึง+4	+1 ถึง+4	กลิ่น KLLO แรงตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 ความซ่าลดลงที่ 1:3, 1:4, 1:5

น้ำมันหอมระเหย:น้ำมันพืช = 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1

สี (+1=เหลืองอ่อน ,+2=เหลือง,+3=เหลืองออกส้ม,+4=เหลืองเข้ม)

กลิ่น (+1=หอมอ่อนๆ,+2=หอมปานกลาง,+3=หอมแรง,+4=กลิ่นรุนแรง)

รสขม (+1=ขมเล็กน้อย,+2=ขมปานกลาง,+3=ขมมาก,+4=ขมรุนแรง)

รสซ่า (+1=ซ่าเล็กน้อย,+2=ซ่าปานกลาง,+3=ซ่ามาก,+4=ซ่าจนแสบลิ้น)

ส่วนผสมระหว่าง น้ำมันมะกูด (KLO) และน้ำมันถั่วเหลือง (SBO) พบว่า KLO เป็นน้ำมันสีเหลืองอ่อน ส่วน SBO จะมีสีเหลืองที่เข้มกว่าเล็กน้อย เมื่อผสมกันแล้วจะไม่ค่อยเห็นความแตกต่างของสี (รูปที่ 4 (ดูภาคผนวก ข)) สำหรับกลิ่นของ KLO จะเด่นในทุก dilution ความขมของสารละลายเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLO ที่เพิ่มขึ้น แต่ความซ่าจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงสัดส่วนของ KLO:SBO ที่ 1:3, 1:4 และ 1:5 ซึ่งรสชาติของ SBO จะค่อนข้างเด่น และให้ความรู้สึกลิ้นของ SBO รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 25 (ดูภาคผนวก ข)

หลังการเก็บส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน พบว่า คุณลักษณะของส่วนผสมในวันที่ 7 ไม่แตกต่างจากวันแรก ทั้งในส่วน ของ สี กลิ่น รสขม และรสซ่า

ส่วนผสมระหว่างน้ำมันมะกูด (KLO) และน้ำมันปาล์ม (POO) พบว่า POO เป็นน้ำมันสีเหลืองเข้ม เมื่อผสมกับ KLO ทำให้สีของสารละลายเข้มขึ้นเมื่อมีสัดส่วนของ POO ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในช่วง KLO:POO 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 (รูปที่ 5 (ดูภาคผนวก ข)) สำหรับกลิ่นของ KLO จะเด่นในทุก dilution รสขมของส่วนผสมเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLO ที่เพิ่มขึ้น แต่รสซ่าจะลดลงอย่างชัดเจนในช่วงสัดส่วนของ KLO:POO 1:3, 1:4 และ 1:5 ซึ่งรสชาติของ POO จะค่อนข้างเด่น ให้ความรู้สึกลิ้น รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 26 (ดูภาคผนวก ข)

หลังการเก็บส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน พบว่าที่อัตราส่วนของ KLO:POO ที่ 1:5 กลิ่นของสารละลายในวันที่ 7 เปลี่ยนไปเล็กน้อย คือมีกลิ่นเหม็นไหม้อ่อนๆ ส่วนคุณลักษณะอื่นๆไม่เปลี่ยนแปลง และคุณลักษณะของส่วนผสมอัตราส่วนอื่นๆ ในวันที่ 7 ไม่แตกต่างจากวันแรก ทั้งในส่วน ของ สี กลิ่น รสขม และรสซ่า

ส่วนผสมระหว่างน้ำมันมะกูด (KLO) และน้ำมันดอกคำฝอย (SFO) พบว่า SFO และ KLO เป็นน้ำมันที่มีสีเหลืองอ่อนใกล้เคียงกัน เมื่อผสมกันแล้วจะไม่เห็นความแตกต่างของสี (รูปที่ 6 (ดูภาคผนวก ข)) กลิ่นของ KLO จะเด่นในทุก dilution สำหรับรสขมของสารละลายจะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLO ที่เพิ่มขึ้น แต่รสซ่าจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงอัตราส่วนของ KLO:SFO ที่ 1:3, 1:4 และ 1:5 ซึ่งรสชาติของ SFO จะค่อนข้างเด่น แต่ความรู้สึกลิ้นจะน้อยกว่า SBO และ POO รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 27 (ดูภาคผนวก ข)

หลังการเก็บส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน พบว่า คุณลักษณะของส่วนผสม ในวันที่ 7 ไม่แตกต่างจากวันแรก ทั้งในส่วน ของ สี กลิ่น รสขม และรสซ่า

ส่วนผสมระหว่างน้ำมันมะกูด (KLO) และน้ำมันทานตะวัน (SUO) พบว่า SUO และ KLO เป็นน้ำมันที่มีสีเหลืองอ่อนใกล้เคียงกัน เมื่อผสมกันแล้วจะไม่เห็นความแตกต่างของสี (รูปที่ 7 (ดูภาคผนวก ข)) กลิ่นของ KLO จะเด่นในทุก dilution รสขมของสารละลายเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLO ที่เพิ่มขึ้น แต่รสซ่าจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงอัตราส่วนของ KLO:SUO ที่ 1:3, 1:4 และ 1:5 ซึ่งรสชาติของ SUO จะค่อนข้างเด่น แต่ความรู้สึกลิ้นจะน้อยกว่า SBO และ POO รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 28 (ดูภาคผนวก ข)

หลังการเก็บส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน พบว่าที่อัตราส่วนของ KLO:SUO ที่ 1:5 กลิ่นของสารละลายในวันที่ 7 เปลี่ยนไปเล็กน้อย คือมีกลิ่นเหม็นไหม้อ่อนๆ ส่วนคุณลักษณะอื่นๆ ไม่เปลี่ยนแปลง และคุณลักษณะของส่วนผสมอัตราส่วนอื่นๆ ในวันที่ 7 ไม่แตกต่างจากวันแรก ทั้งในส่วน of สี กลิ่น รสขม และรสซ่า

ส่วนผสมระหว่างน้ำมันมะกรูด (KLO) และน้ำมันรำข้าว (RBO) พบว่า RBO เป็นน้ำมันสีเหลืองเข้ม เมื่อผสมกับ KLO ทำให้สีของสารละลายเข้มขึ้นเมื่อมีสัดส่วนของ RBO ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในช่วง KLO:RBO ที่ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 (รูปที่ 8 (ดูภาคผนวก ข)) แต่สีจะอ่อนกว่า POO สำหรับกลิ่นของ KLO จะเด่นในทุก dilution รสขมของสารละลายเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLO ที่เพิ่มขึ้น แต่รสซ่าจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงอัตราส่วนของ KLO:RBO ที่ 1:3, 1:4 และ 1:5 ซึ่งรสชาติของ RBO จะค่อนข้างเด่น ให้ความรู้สึกเย็น รสละเอียดดังในตารางที่ 29 (ดูภาคผนวก ข)

หลังการเก็บส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน พบว่าที่อัตราส่วนของ KLO:RBO ที่ 1:5 กลิ่นของสารละลายในวันที่ 7 เปลี่ยนไปเล็กน้อย คือมีกลิ่นเหม็นไหม้อ่อนๆ ส่วนคุณลักษณะอื่นๆ ไม่เปลี่ยนแปลง และคุณลักษณะของส่วนผสมอัตราส่วนอื่นๆ ในวันที่ 7 ไม่แตกต่างจากวันแรก ทั้งในส่วน of สี กลิ่น รสขม และรสซ่า

โดยรวม เมื่อเก็บส่วนผสมของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันพืชอื่นๆ (SBO, POO, SFO, SUO และ RBO) ไว้เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าส่วนผสมทุก dilutions ยังคงผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้น โดยส่วนใหญ่ มีกลิ่น รสขม และรสซ่าเหมือนในวันแรก ทั้งนี้ในส่วน of กลิ่น รสขม และรสซ่าเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLO ที่เพิ่มขึ้น

น้ำมันใบมะกรูดผสมกับน้ำมันพืชอื่นๆ

ส่วนผสมระหว่างน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) และน้ำมันถั่วเหลือง (SBO) พบว่า KLLO เป็นน้ำมันสีส้มอ่อน ซึ่งจะมีสีเข้มกว่า SBO เล็กน้อย เมื่อผสมกันจะเห็นความแตกต่างของสีที่อัตราส่วนของ KLLO:SBO ตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 (รูปที่ 9 (ดูภาคผนวก ข)) กลิ่นของ KLLO ค่อนข้างรุนแรง โดยจะกลบกลิ่นของน้ำมันอื่นๆ ทุก dilution และรุนแรงมากที่สุดที่สัดส่วนของ KLLO:SBO ตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 ความขมของสารละลายเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLLO ที่เพิ่มขึ้น แต่ความซ่าจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงสัดส่วนของ KLLO:SBO 1:3, 1:4 และ 1:5 ซึ่งรสชาติของ SBO จะค่อนข้างเด่น และความซ่าจะรุนแรงมากในช่วงของ KLLO:SBO 4:1 และ 5:1 รายละเอียดดังในตารางที่ 30 (ดูภาคผนวก ข)

ส่วนผสมระหว่างน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) และน้ำมันปาล์ม (POO) พบว่า POO เป็นน้ำมันสีเหลืองเข้ม ซึ่งสีจะเข้มกว่า KLLO เมื่อผสมกันทำให้สีของสารละลายเป็นสีเหลืองออกส้มเข้ม เมื่อมีสัดส่วนของ POO ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในช่วง KLLO:POO ตั้งแต่ 1:1 ถึง 1:5 โดยสีของ KLLO จะเด่นขึ้นในช่วง KLO:POO ตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 โดยสีของสารละลายเป็นสีเหลืองออกส้ม (รูปที่ 10 (ดูภาคผนวก ข)) กลิ่นของ KLLO ค่อนข้างรุนแรง โดยจะกลบกลิ่นของน้ำมันอื่นๆ ทุก dilution และรุนแรงมากที่สุดที่สัดส่วนของ KLLO:POO ตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 ความขมของสารละลายเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLLO ที่เพิ่มขึ้น แต่ความซ่าจะลดลงในช่วงสัดส่วนของ KLLO:POO 1:3, 1:4 และ 1:5 ซึ่งรสชาติของ POO จะ

ค่อนข้างเด่น และความซ่าจะรุนแรงมากในช่วงของ KLLO:POO 4:1 และ 5:1 รายละเอียดดังในตารางที่ 31 (ดูภาคผนวก ข)

ส่วนผสมระหว่างน้ำมันไบมะกรูด (KLLO) และน้ำมันดอกคำฝอย (SFO) พบว่า SFO เป็นน้ำมันที่มีสีเหลืองอ่อน ซึ่ง KLLO จะมีสีเข้มกว่า เมื่อผสมกันจะเห็นความแตกต่างของสีที่อัตราส่วนของ KLLO:SFO ตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 โดยเป็นสีเหลืองออกส้ม (รูปที่ 11 (ดูภาคผนวก ข)) กลิ่นของ KLLO ค่อนข้างรุนแรง โดยจะกลบกลิ่นของน้ำมันอื่นๆ ทุก dilution และรุนแรงมากที่สุดส่วนของ KLLO:SFO ตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 ความขมของสารละลายเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLLO ที่เพิ่มขึ้น แต่ความซ่าจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงสัดส่วนของ KLLO:SFO 1:3, 1:4 และ 1:5 ซึ่งรสชาติของ SFO จะค่อนข้างเด่น และความซ่าจะรุนแรงมากในช่วงของ KLLO:SFO 4:1 และ 5:1 รายละเอียดดังในตารางที่ 32 (ดูภาคผนวก ข)

ส่วนผสมระหว่างน้ำมันไบมะกรูด (KLLO) และน้ำมันทานตะวัน (SUO) พบว่า SUO เป็นน้ำมันที่มีสีเหลืองอ่อน ซึ่ง KLLO จะมีสีเข้มกว่า เมื่อผสมกันจะเห็นความแตกต่างของสีที่สัดส่วนของ KLLO:SUO ตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 โดยเป็นสีเหลืองออกส้ม (รูปที่ 12 (ดูภาคผนวก ข)) กลิ่นของ KLLO ค่อนข้างรุนแรง โดยจะกลบกลิ่นของน้ำมันอื่นๆ ทุก dilution และรุนแรงมากที่สุดส่วนของ KLLO:SUO ตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 ความขมของสารละลายเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLLO ที่เพิ่มขึ้น แต่ความซ่าจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงสัดส่วนของ KLLO:SUO 1:3, 1:4 และ 1:5 ซึ่งรสชาติของ SUO จะค่อนข้างเด่น และความซ่าจะรุนแรงมากในช่วงของ KLLO:SUO 4:1 และ 5:1 รายละเอียดดังในตารางที่ 33 (ดูภาคผนวก ข)

ส่วนผสมระหว่างน้ำมันไบมะกรูด (KLLO) และน้ำมันรำข้าว (RBO) พบว่า RBO เป็นน้ำมันสีเหลืองเข้ม ซึ่งสีจะเข้มกว่า KLLO เมื่อผสมกันทำให้สีของสารละลายเป็นสีเหลือง เมื่อมีสัดส่วนของ RBO ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในช่วง KLO:RBO ตั้งแต่ 1:1 ถึง 1:5 โดยสีของ KLLO จะเด่นขึ้นในช่วง KLLO:RBO ตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 โดยสีของสารละลายเป็นสีเหลืองออกส้ม (รูปที่ 13 (ดูภาคผนวก ข)) กลิ่นของ KLLO ค่อนข้างรุนแรง โดยจะกลบกลิ่นของน้ำมันอื่นๆ ทุก dilution และรุนแรงมากที่สุดส่วนของ KLLO:RBO ตั้งแต่ 2:1 ถึง 5:1 ความขมของสารละลายเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLLO ที่เพิ่มขึ้น แต่ความซ่าจะลดลงในช่วงสัดส่วนของ KLLO:RBO 1:3, 1:4 และ 1:5 ซึ่งรสชาติของ RBO จะค่อนข้างเด่น และความซ่าจะรุนแรงมากในช่วงของ KLLO:RBO 4:1 และ 5:1 รายละเอียดดังในตารางที่ 34 (ดูภาคผนวก ข)

เมื่อเก็บ KLLO + diluents (SBO, POO, SFO, SUO และ RBO) ไว้เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าส่วนผสมทั้งหมดยังคงละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่แยกชั้น มีสี กลิ่น ความขม และความซ่าเหมือนเดิม โดยกลิ่น ความขม และความซ่า เพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของ KLLO ที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลิ่น และรสชาติของ KLLO ค่อนข้างรุนแรง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นในส่วนผสมต่างๆ ได้

5.2 การทดลองแต่งกลิ่นด้วยน้ำมันที่มีกลิ่นหอม

ทดลองแต่งกลิ่นน้ำมันทานตะวัน น้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดด้วย Lemon oil, Peppermint oil, Orange oil และ Spearmint oil ในปริมาณต่างๆจนได้กลิ่นของน้ำมันที่ใช้แต่งกลิ่น บันทึกกลิ่นและรสชาติของส่วนผสมที่ได้

ผลการวิจัย

จากการทดลองแต่งกลิ่นด้วยน้ำมันที่มีกลิ่นหอม 4 ชนิด พบว่าน้ำมันที่ใช้แต่งกลิ่นสามารถกลบกลิ่นน้ำมันมะกรูดได้ที่มีความเข้มข้นสูง สำหรับน้ำมันใบมะกรูด การกลบกลิ่นทำได้ยากกว่าน้ำมันมะกรูด ผลสรุปการทดลองกลบกลิ่นของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดดังในตารางที่ 35 ส่วนรายละเอียดของการกลบกลิ่นของน้ำมันทานตะวัน น้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด พร้อมรูป (รูปที่ 14 และ 15) และตาราง (ตารางที่ 36-38) ดังแสดงในภาคผนวก ค พบว่าน้ำมันที่ใช้แต่งกลิ่นที่เหมาะสมจะนำไปใช้ในการพัฒนาต่อไปคือ Spearmint oil เนื่องจากใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าน้ำมันแต่งกลิ่นชนิดอื่นโดยที่สามารถกลบกลิ่นของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดได้ดี

ตารางที่ 35 ผลการทดลองกลบกลิ่นน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดด้วยน้ำมันที่มีกลิ่นหอม

น้ำมัน หอม ระเหย	น้ำมันที่ใช้แต่งกลิ่น(%w/w)				ผลการทดลองแต่งกลิ่น
	Lemon oil	Peppermint oil	Orange oil	Spearmint oil	
น้ำมัน มะกรูด	41.20	-	-	-	กลิ่นมะนาวแรง
	-	20.00	-	-	กลิ่น mint แรง กลบกลิ่นหมด รสขม ไม่ เย็น ไม่ซ่า
	-	-	41.20	-	กลิ่นหอมส้มแรง กลบกลิ่นหมด
	-	-	-	5.88	กลิ่นหอมเย็นอ่อน
น้ำมันใบ มะกรูด	55.60	-	-	-	กลิ่นมะนาวแรง แต่กลบกลิ่นเหม็นเขียว ของน้ำมันใบมะกรูดไม่หมด
	-	55.56	-	-	กลิ่น mint หอมแรง กลบกลิ่นเหม็นเขียว ของน้ำมันใบมะกรูดไม่ค่อยหมด รสเย็น ซ่า กัดลิ้น และขมมาก สีเหลือง
	-	-	80.00	-	กลิ่นหอมส้ม กลบกลิ่นไม่ค่อยหมด
	-	-	-	13.04	กลิ่น Spearmint หอมมาก

5.3 การแต่งรสหวานด้วยสารให้ความหวาน

ทำการทดสอบการละลายหรือความเข้ากันได้ของสารให้ความหวานในน้ำมันหอมระเหยและการทดลองแต่งรสด้วยสารให้ความหวาน คือ Acesulfame-K (ในปริมาณ 0.5%w/w), Sorbitol powder (0.4-0.6 %w/w), 70% Sorbitol solution (2.53-20.63%w/w), Xylitol C (0.6%w/w), Sucralose (0.6%w/w), Aspartame (0.6%w/w)

วิธีการผสมสารให้ความหวานกับตัวทำละลายแต่ละชนิดคือ เติมสารให้ความหวานลงในตัวทำละลาย คือ น้ำ, KLO, KLLO, SBO, POO, SFO, SUO หรือ RBO แล้วผสมด้วย Vortex mixer นาน 10 วินาที ทิ้งไว้ 10 วินาที แล้วผสมด้วย Vortex mixer อีกซ้ำ เป็น 3 ครั้ง บันทึกผลการละลาย

ผลการวิจัย

การทดสอบการละลายของสารให้ความหวานในน้ำและน้ำมันพืช 7 ชนิด พบว่า

--สารให้ความหวานที่เป็นของแข็งทั้งหมดสามารถละลายได้ในน้ำ แต่ไม่ละลายในน้ำมันทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ ตกเป็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด

--สารให้ความหวานที่เป็นของเหลวชนิดเดียว คือ 70% Sorbitol solution สามารถเข้ากันได้กับน้ำเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ไม่สามารถผสมเข้ากันกับน้ำมัน แยกเป็นชั้น

รายละเอียดของการทดสอบการละลายของสารให้ความหวานดังแสดงในภาคผนวก ง พร้อมรูปที่ 16-21 และตารางที่ 39

เนื่องจากสารให้ความหวานทั้งหมดไม่ละลายหรือเข้ากันไม่ได้กับน้ำมันทุกชนิด จึงไม่สามารถทดสอบรสหวานได้ โดยสรุป การแต่งรสโดยใช้สารให้ความหวานชนิดต่างๆ โดยไม่มีตัวทำละลายอื่นช่วย มีปัญหาในส่วนของการละลาย (ตกตะกอน) หรือความเข้ากันได้ (แยกชั้น) ต้องพิจารณาแต่งรสหวานโดยอาศัยตัวทำละลายอื่นช่วยในการละลายของสารให้ความหวานก่อน

5.4 การแต่งรสเย็นด้วย menthol

เติม menthol ปริมาณดังในตารางที่ 40 ลงในน้ำมัน KLO + SUO อัตราส่วน 1 : 1 บันทึกรสชาติที่ได้

ผลการวิจัย

การเติม menthol เพื่อแต่งรสเย็น มีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยปรับปรุงรสชาติของน้ำมันหอมระเหยที่มีรสชาติแรง นอกจากนี้ยังคาดหวังผลพลอยได้จากรสเย็นที่อาจใช้กลบกลิ่นรสชาติที่แรงของน้ำมันทั้ง 2 ชนิด โดยเฉพาะน้ำมันใบมะกรูด การใช้ KLO + SUO ในอัตราส่วน 1 : 1 จะทำให้ทำการทดสอบได้ดีกว่าการใช้ KLO เดี่ยวๆ ซึ่งจะทำให้แยกความแตกต่างได้ยากเนื่องจาก KLO มีความซ่าในตัวค่อนข้างมากและทำระคายเคืองลิ้น พบว่า ที่ 5.8% Menthol ให้ความรู้สึกเย็นซ่าที่ดี (เย็นโล่ง) แต่ที่ 9.09% ให้ความรู้สึกเย็นซ่าที่รวดเร็วเกินไป (เย็นสะดุ้ง) ซึ่งน่าจะเป็นรสแรงที่อาจดึงความสนใจของผู้ใช้ไปจากรสที่ไม่ดีของน้ำมันหอมระเหยได้ แต่ด้วยปริมาณที่สูงของ menthol อาจจะก่อให้เกิดปัญหาในเรื่องการระคายเคืองได้ จากข้อมูลทั่วไป มีการใช้ menthol ในน้ำยาบ้วนปากประมาณ 1-2% ก็เกิดการระคายเคือง

ได้เฉพาะราย ส่วนข้อกำหนดทางเภสัชกรรม มีการใช้ไม่เกิน 1% ดังนั้นในปริมาณที่ทดสอบอยู่นี้ น่าจะเป็นปริมาณที่สูงเกินกว่าการใช้ตามปกติอยู่มาก นอกจากนี้จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า KLO และ KLL0 เดียวๆ 100% ก็ทำให้เกิดการระคายเคืองได้มากเช่นกัน ดังนั้นในการพัฒนาในช่วงต่อไป อาจพิจารณาปรับลดปริมาณ menthol ลงอีกในการตั้งตำรับในขั้นต่อไป

ตารางที่ 40 การทดลองแต่งรสเย็นด้วย menthol

code	KLO (g)	SUO (g)	Menthol (g)	%Menthol	ความซ่า	ความเย็น
AM-0	2.00	2.00	0.00	0.00	+	+
AM-1	2.00	2.00	0.05	1.23	++	++
AM-2	2.00	2.00	0.10	2.44	++	++
AM-3	2.00	2.00	0.15	3.61	+++	+++
AM-4	2.00	2.00	0.20	4.76	+++	+++
AM-5	2.00	2.00	0.25	5.88	++++	++++
AM-6	2.00	2.00	0.30	6.98	++++	++++
AM-7	2.00	2.00	0.35	8.05	++++	++++
AM-8	2.00	2.00	0.40	9.09	+++++	+++++

5.5 การทดลองเติม Solubilizing agent หรือส่วนประกอบอื่น เพื่อช่วยการละลายของสารให้ความหวาน และ/หรือสารแต่งรสอื่นๆ และการทดสอบความเข้ากันได้กับน้ำมันหอมระเหย

ทดลองเติม solubilizing agents/ส่วนประกอบอื่นๆ คือ Polyoxyethelene 40 hydrogenated castor oil (PHC), Tween20 (Tw20), Tween80 (Tw80), Glycerin (GR) และ Propylene glycol (PG) ในความเข้มข้นที่กำหนด เพื่อช่วยการละลายของสารให้ความหวาน คือ 70% Sorbitol solution, Acesulfame K, Aspartame, Sucralose, Sorbitol และ Saccharin ในปริมาณที่กำหนดใน KLO ผสมโดยใช้ Vortex mixer บันทึกรการละลาย หรือความเข้ากันได้

ผลการวิจัย

จากการทดลองเพื่อใช้ Solubilizing agent หรือส่วนประกอบอื่นในการช่วยการละลายของสารแต่งรส พบว่าได้ผลดังนี้

--PHC, Tween 20, Tween 80, Glycerin, Propylene glycol ไม่ช่วยการละลายหรือการเข้ากันได้ของ 70% sorbitol solution หรือ Acesulfame-K กับ KLO

--หลัง 7 วัน Glycerin ละลายเป็นเนื้อเดียวกับ Acesulfame K, Sucralose และ Sorbitol แต่ไม่ละลาย Aspartame ส่วน Saccharin ละลายได้ไม่หมด ในขณะที่ Propylene glycol ละลายเป็นเนื้อเดียวกับ Acesulfame K, Sucralose, Sorbitol และ Saccharin แต่ไม่ละลาย Aspartame

--PEG 400 สามารถละลายเข้ากับ KLO, KLLO, PHC, Tween 20, Acesulfame-K, สารแต่งสี และสารแต่งกลิ่น ได้สารละลายใส แต่เมื่อละลายใน Tween 80 จะได้สารละลายที่ขุ่นเล็กน้อย และมีข้อเสียเล็กน้อยที่มีรสขมและกลิ่นเปรี้ยว

สำหรับรายละเอียดการทดสอบในข้อ 5.5 พร้อมผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 22-24 และตารางที่ 41-42 (เดิม) ในภาคผนวก จ

5.6 การทดลองผสม Emulsifier กับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

ทำการทดลองผสม Emulsifier 3 ชนิด คือ Tween 80, Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil (PHC), และ Lecithin ร่วมกับสารให้ความหวาน Acesulfame-K (20% solution) ในความเข้มข้นที่กำหนด โดยเติมส่วนผสมอาหารสีม่วงเพิ่มเติมลงไปสำหรับการสังเกตการแยกชั้น บันทึกผลที่ได้

ผลการวิจัย

ในการทดลองนี้เป็นความพยายามในการเติม Emulsifier ลงไปในน้ำมันหอมระเหย ด้วยความคาดหวังว่าจะมีการเปลี่ยนเป็น oil-in-water emulsion ในปาก (โดยอาศัย Emulsifier ที่เติมลงไปล่วงหน้า) เมื่อมีการอม soft gelatin capsule ซึ่งบรรจุสูตรตำรับน้ำมันหอมระเหยนี้และเกิดการปลดปล่อยสูตรตำรับน้ำมันหอมระเหยออกมารวมกับน้ำลายในปาก การเติม 20% Acesulfame-K ประมาณ 0.2 กรัม เนื่องจากของเหลวที่จะบรรจุลงใน soft gelatin capsule ต้องมีน้ำหรือแอลกอฮอล์เป็นส่วนผสมไม่เกิน 5%

พบว่าส่วนผสมที่ได้มีการแยกชั้นในชุดของ Tween80 ส่วนในอีก 2 ชุด (PHC และ lecithin) มีความขุ่น ลักษณะทางกายภาพไม่ดี

จากผลการทดลอง ต้องพิจารณาปรับสัดส่วนของ PHC และ Lecithin ซึ่งเป็น emulsifier ชนิด hydrophobic โดยใช้ร่วมกับ emulsifier ชนิด hydrophilic เพื่อให้ emulsion ที่ได้มีความคงตัว แต่แนวโน้มในการเติม emulsifier ไว้ล่วงหน้าใน soft gelatin capsule น่าจะมีปัญหาในการพัฒนามากกว่าเนื่องจากข้อจำกัดในส่วนปริมาณสูงสุดของส่วนประกอบที่เป็นน้ำหรือแอลกอฮอล์ ในการศึกษาต่อไปควรพิจารณาส่วนผสมที่มีส่วนประกอบที่เป็นน้ำมันและส่วนประกอบอื่นที่สามารถผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำมันได้ เพื่อที่จะได้หลีกเลี่ยงการเตรียมในลักษณะของ emulsion ที่ไม่มีความคงตัว หรือปัญหาการแยกชั้นซึ่งจะทำให้ในทางปฏิบัติ ไม่สามารถบรรจุส่วนผสมใน soft gelatin capsule ได้

รายละเอียดการทดสอบและผลการทดสอบ พร้อมตารางที่ 43-45 และรูปที่ 25-27 ดังแสดงในภาคผนวก ฉ

5.7 การทดลองตั้งตำรับโดยมี PEG 400 อยู่ด้วย

ทดลองตั้งตำรับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด โดยมีสารประกอบอื่นๆ คือ น้ำมันพืช Peppermint oil, Spearmint oil, menthol, 20% Acesulfame-K in PEG 400, PEG 400, Acesulfame-K ในปริมาณที่กำหนด

ผลการวิจัย

จากการทดลอง พบว่าปริมาณของ Acesulfame-K ที่จะสามารถละลายเข้าไปในน้ำมัน โดยมี PEG 400 เป็นตัวช่วยได้ มีปริมาณค่อนข้างน้อย เนื่องจากเมื่อปริมาณ PEG 400 ที่เติมลงในน้ำมันมีมากขึ้น ตัว PEG 400 เองก็แยกตัวออกจากน้ำมันเช่นกัน

รายละเอียดการดำเนินการและผลการทดลองพร้อมตารางที่ 46 ดังแสดงในภาคผนวก ข

5.8 การคำนวณปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ต้องบรรจุใน capsule จีว

ทำการคำนวณ ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่จะใช้บรรจุใน capsule จีว (ขนาดบรรจุ 80, 100 mg) โดยการคำนวณจาก ค่า MIC และ MBC ของ *Streptococcus mutans* : Clinical Strains และกำหนดความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้นเป็น 20 เท่าของ ค่า MIC และ MBC ทั้งนี้โดยกำหนดระยะเวลาการแตกตัวเป็นช่วงละ 5 วินาที ตั้งแต่ 5 วินาที ถึง 60 วินาที

ผลการวิจัย

จากผลการคำนวณแสดงให้เห็นว่าตำรับที่จะนำไปพิจารณาพัฒนาต่อไป คือ กำหนดการกระจายของน้ำมันหอมระเหยในปากที่ระยะเวลา 5 วินาที ซึ่งจะได้ปริมาณความเข้มข้นของ KLO 65% และ KLLO 45% (maximum dose) ทั้งนี้จะพิจารณาเป็นหนึ่งในตัวเลือก และทำการ step down ลงอีก 3 dose เพื่อให้ได้ตำรับที่มีรสชาติดีในการพัฒนาขึ้นต่อไป

รายละเอียดการดำเนินการและผลการวิจัย พร้อมตารางที่ 47 และ 48 ดังในภาคผนวก ข

5.9 การทดลองตั้งสูตรตำรับ KLO และ KLLO เพื่อใช้บรรจุใน capsule จีว

ทำการทดลองตั้งสูตรตำรับ KLO และ KLLO โดยมี Sunflower oil เป็น diluent และมี Spearmint oil, Peppermint oil เป็นสารแต่งกลิ่นรส และ Menthhol เป็นสารแต่งรสเย็น และ Sucralose และ Acesulfame-K เป็นสารแต่งรสหวาน (โดยมี PEG 400 เป็นตัวทำละลาย) และทำการปรับลดความเข้มข้นของ KLO และ KLLO และความเข้มข้นของสารแต่งกลิ่นรสในสูตรตำรับ เพื่อให้ได้สูตรตำรับที่เหมาะสม

ผลการวิจัย

จากการทดลอง พบว่า PEG 400 ทำให้ส่วนผสมมีลักษณะขุ่น เมื่อตัด PEG 400 ออกจากสูตรตำรับ จะทำให้แก้ปัญหारेื่องความขุ่นได้

สำหรับสูตรตำรับจากน้ำมันมะกูดนั้น N112 (KLO 5%w/w, SPO:PPO (1:1) 1%w/w) และ N113 (KLO 5%w/w, SPO:PPO (1:1) 2.5%w/w) เป็นสูตรตำรับที่สมควรคัดเลือกไปบรรจุใน capsule จีว เนื่องจาก มีรสชาติที่อ่อนๆ ไม่บาดลิ้น แม้จะมีรสขมแทรกอยู่บ้าง ก็เป็นในระดับที่ยังรับได้อยู่ ทั้งนี้ cut-off จะอยู่ที่ระหว่าง N113 และ N114 คือสูตรตำรับไม่ควรมี SPO:PPO (1:1) สูงกว่า 2.5%w/w ส่วนสูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO สูงขึ้น คือ N129 (KLO 10%w/w, SPO:PPO (1:1) 1%w/w) เป็นสูตรตำรับอีกสูตรหนึ่งที่สมควรคัดเลือกไปบรรจุใน capsule จีว เนื่องจาก มีรสชาติที่อ่อนๆ ไม่บาดลิ้นเช่นกัน และแม้จะมีรสขมแทรกอยู่มากกว่าสูตรตำรับที่มี KLO 5%w/w แต่ก็ยังเป็นในระดับที่ยังรับได้อยู่ ทั้งนี้ cut-off จะอยู่ที่สูตรตำรับที่มี KLO อยู่สูงถึง 10%w/w และไม่ควรมี SPO:PPO (1:1) สูงกว่า 1%w/w เนื่องจากที่ปริมาณ

SPO:PPO (1:1) สูงกว่า 1%w/w คือ 2.5, 5%w/w สูตรตำรับให้รสขมที่แรงชัดขึ้น และรสซ่าลิ้นขึ้นมาก สูตรตำรับที่คัดเลือกมานี้ให้สารละลายที่ใสทั้งหมด ดังนั้น จึงได้คัดเลือกสูตรตำรับที่มี KLO 5%w/w คือ สูตรตำรับ N112, N113 และ สูตรตำรับที่มี KLO 10%w/w คือ สูตรตำรับ N129 ไว้เพื่อใช้บรรจุ capsule ต่อไป

ส่วนสูตรตำรับจากน้ำมันใบมะกรูดนั้น จากการทดลอง พบว่าสูตรตำรับยังคงมีกลิ่นของ KLLO ที่แรง แต่การที่มี menthol อยู่ด้วยจะช่วยลดกลิ่นที่แรงของ KLLO ได้บางส่วน ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสูตรตำรับ M16-M18 ไว้ จากการทดสอบรสชาติในลักษณะบรรยายของ สูตรตำรับ M16-M18 พบว่าแม้จะมี KLLO เพียง 5%w/w แต่ก็ให้กลิ่นที่แรง แต่การที่มี SPO, PPO, menthol อยู่ด้วยก็ทำให้สูตรตำรับมีรสชาติที่ดีขึ้น

โดยสรุป พบว่าได้สูตรตำรับที่เหมาะสมจะนำไปทดลองบรรจุ capsule จีว ดังในตารางที่ 49 โดยมีรสชาติเบื้องต้นดังในตารางที่ 50 และลักษณะของสูตรตำรับดังในรูปที่ 28 และ 29

สำหรับในชุดของ KLO สามารถใช้ KLO ได้ที่ 5, 10%w/w คือสูงสุดที่ 10%w/w โดยสามารถเติม SPO:PPO (1:1) ได้สูงสุดถึง 2.5%w/w และ ปริมาณ menthol ที่เหมาะสมคือ 0.10%w/w สำหรับในชุดของ KLLO สามารถใช้ KLLO ได้สูงสุดที่ 5%w/w เท่านั้น โดยสามารถเติม SPO:PPO (1:1) ได้สูงสุดถึง 5%w/w ซึ่งปริมาณที่สูงของ SPO และ PPO จะช่วยในการกลบกลิ่นรสของ KLLO และรสเลี่ยนของ SUO และ ปริมาณ menthol ที่เหมาะสมคือ 0.10%w/w เช่นเดียวกัน

รายละเอียดของการดำเนินการตั้งสูตรตำรับและผลการทดลองพร้อม ตารางที่ 51-95 และรูปที่ 30-34 ดังแสดงในภาคผนวก ณ

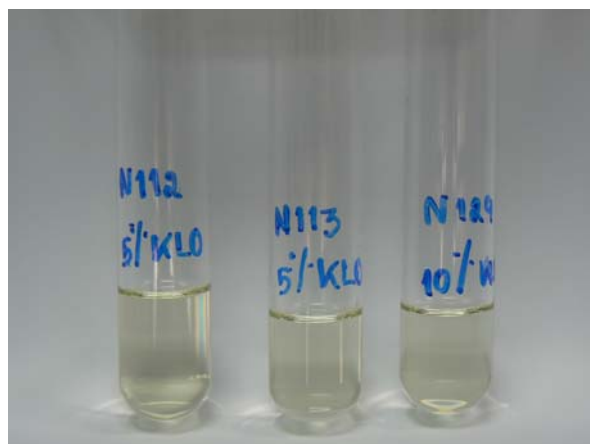
ตารางที่ 49 สูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่จะนำไปบรรจุใน capsule จีว

Code	KLLO %w/w	KLLO %w/w	SUO %w/w	SPO:PPO (1:1) %w/w	Menthol %w/w
N112	5.00	-	93.90	1.00	0.10
N113	5.00	-	92.40	2.50	0.10
N129	10.00	-	88.90	1.00	0.10
M16	-	5.00	93.90	1.00	0.10
M17	-	5.00	92.40	2.50	0.10
M18	-	5.00	89.90	5.00	0.10

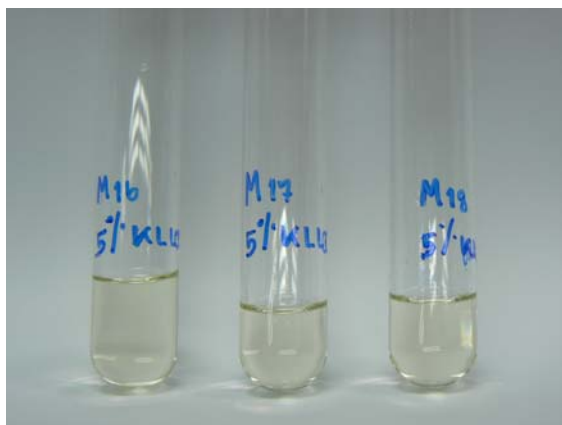
ตารางที่ 50 รสชาติเบื้องต้นในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่ได้คัดเลือกมา

Code	สี	กลิ่น	รส
N112	เหลืองอ่อนใส	กลิ่น หอม เย็น อ่อนๆ	รสเย็นอ่อนๆ ไม่บาดลิ้น รสชาติดีมาก menthol ให้รสชาติเย็นอ่อนๆดี
N113	เหลืองอ่อนใส	กลิ่น หอม เย็น อ่อนๆ	รสเย็นอ่อนๆ ไม่บาดลิ้น มีรสขมแทรกแต่ ยังรับได้อยู่ menthol ให้รสชาติเย็น อ่อนๆ ดี
N129	เหลืองอ่อนใส เมื่อเขย่าจะ เป็นฟองอากาศเล็กๆ ลอยตัวอยู่	กลิ่นหอมเย็น	คล้าย N112 แต่รสขมแทรกอยู่มากกว่า รสชาติยังรับได้อยู่
M16	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็นๆ	รสเลี่ยนๆ ของ SUO รสเหม็นเขียว รสเย็นอ่อนๆ
M17	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็นๆ	รสคล้าย M16 แต่เลี่ยนน้อยกว่า
M18	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็นๆ	รสเย็นชาน้ำ รสเหม็นเขียวลดลง รสเลี่ยนน้อยกว่า M16

N112, N113, N129 = สูตรตำรับ KLO; M16, M17, M18 = สูตรตำรับ KLLO



รูปที่ 28 สูตรตำรับ KLO ที่จะนำไปบรรจุใน capsule จีว คือ สูตรตำรับ KLO 5%w/w
(N112, N113) และ KLO 10%w/w (N129)



รูปที่ 29 สูตรตำรับ KLO ที่จะนำไปบรรจุใน capsule จีว คือ สูตรตำรับ KLO 5%w/w (M16, M17, M18)

6. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดเพื่อใช้ป้องกันโรคฟันผุ และเพื่อใช้บรรเทาอาการเจ็บคอ/ไอ

6.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดเพื่อใช้ป้องกันโรคฟันผุและเพื่อใช้บรรเทาอาการเจ็บคอ/ไอ

จากสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด ในรายงานโครงการวิจัย เรื่อง “ผลิตภัณฑ์อาหารจากน้ำมันหอมระเหย และ/หรือ สารสกัดสมุนไพร ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*” (วิมล, 2549) ซึ่งประกอบด้วย KLO (6, 10, 16%v/v), PHC (10, 13, 19%v/v), และ 95%ethanol (30, 25, 20%v/v) ตามลำดับ และทุกสูตรตำรับมีลักษณะใส ใช้เป็นสูตรตำรับตั้งต้นในการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และ สารแต่งกลิ่นรส ทดลองปรับเปลี่ยนสารให้ความหวานจากเดิม คือ Acesulfame-K เป็น Sucralose เปรียบเทียบกับ Acesulfame-K, Aspartame ทดลองเดิมสารแต่งกลิ่นรส ชนิดต่างๆ คือ สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์ กลิ่นส้ม สตรอเบอร์รี่ สับปะรด สละ ครีมนิโคตา ใบเตย มะลิ รัม บลูเบอร์รี่ และน้ำมันหอมระเหยที่ใช้แต่งกลิ่นรสชนิดต่างๆ คือ Spearmint oil, Peppermint oil, Lemon oil, Orange oil

ผลการวิจัย

จากการทดลอง พบว่าสูตรตำรับที่ใช้ Sucralose เป็นสารให้ความหวาน มีรสชาติที่ดีกว่าการใช้ Acesulfame-K และดีกว่า สูตรตำรับที่ใช้ Acesulfame-K ร่วมกับ Aspartame ด้วย ดังนั้นสำหรับสารให้ความหวาน จึงน่าจะเลือกใช้ Sucralose เนื่องจากไม่มีรสขมแฝงอยู่และให้รสหวานที่เป็นธรรมชาติใกล้เคียงรสของน้ำตาลซูโครสมากกว่า

จากการทดสอบรสชาติและความเข้ากันได้ของสารแต่งกลิ่นรส ได้คัดเลือกสารแต่งกลิ่นรสของสูตรตำรับ KLO 6, 10, 16%v/v คือ สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์ กลิ่นบลูเบอร์รี่ กลิ่นสับปะรด และกลิ่นครีมนิโคตา ตามลำดับ ซึ่งสารแต่งกลิ่นรสทั้ง 3 มีกลิ่นหอมหวาน สามารถกลบกลิ่นรสของน้ำมันมะกรูดได้นอกจากนี้กลิ่นรสของครีมนิโคตาก็ยังเข้ากันได้ดีกับรสชาตของ KLO16%v/v ด้วย

ในส่วนของการแต่งสี ในสูตรตำรับ KLO 10, 16%v/v พบว่าสารแต่งกลิ่นสังเคราะห์มีสีอยู่ในตัวแล้ว ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารแต่งสีอีก ทั้งนี้โดย สารแต่งกลิ่นสับปะรดจะให้สีเหลือง และสารแต่งกลิ่นครีมโซดาจะให้สีเขียวตามลำดับ สำหรับสูตรตำรับ KLO 6%v/v จำเป็นต้องมีการแต่งสีเพิ่มเติมโดยใช้สีสังเคราะห์สีม่วงเพื่อให้ได้สีที่สอดคล้องกับกลิ่นบลูเบอร์รี่

รายละเอียดสูตรตำรับที่ได้ปรับปรุงแล้ว ดังแสดงในตารางที่ 100 และลักษณะของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากที่ปรับปรุงได้ดังแสดงในรูปที่ 35 ส่วนรายละเอียดการดำเนินการและผลการวิจัยพร้อมตารางที่ 101-115 และรูปที่ 36 ดังแสดงในภาคผนวก ญ

ตารางที่ 100 สูตรตำรับ KLO 6, 10, 16%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวานและสารแต่งกลิ่นรส

ปริมาณ ส่วนประกอบ	สูตร KLO 6%v/v		สูตร KLO 10%		สูตร KLO 16%v/v	
	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v
Kaffir lime oil	4.20 ml	6 %v/v	7.00 ml	10 %v/v	11.20 ml	16 %v/v
PHC	7.00 ml	10 %v/v	9.10 ml	13 %v/v	13.30 ml	19 %v/v
95% Ethanol	21.00 ml	30 %v/v	17.50 ml	25 %v/v	14.00 ml	20 %v/v
Sucralose	0.49 g	0.70 %w/v	0.56 g	0.80 %w/v	0.56 g	0.80 %w/v
กลิ่นบลูเบอร์รี่ (Winner's)	28.00 ml	40 %v/v	-	-	-	-
กลิ่นสับปะรด (Winner's)	-	-	14.00 ml	20 %v/v	-	-
กลิ่นครีมโซดา (Winner's)	-	-	-	-	28.00 ml	40 %v/v
Menthol	-	-	-	-	0.07 g	0.10 %w/v
สีม่วง (Winner's)	0.30 ml	0.42 %v/v	-	-	-	-
Water	9.00 ml	12.85 %v/v	21.84 ml	31.20 %v/v	2.87 ml	4.10 %v/v
Total	70.00 ml	100	70.00 ml	100	70.00 ml	100

PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil



รูปที่ 35 ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด 6, 10, 16%v/v ที่ได้คัดเลือกไว้

6.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดเพื่อใช้ป้องกันโรคฟันผุและเพื่อใช้บรรเทาอาการเจ็บคอ/ไอ

จากสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด ในรายงานโครงการวิจัย เรื่อง “ผลิตภัณฑ์อาหารจากน้ำมันหอมระเหย และ/หรือ สารสกัดสมุนไพร ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*” (วิมล, 2549) ซึ่งประกอบด้วย KLO (4, 12%v/v), PHC (12, 17%v/v), 95%ethanol (20%v/v) มีลักษณะใส ได้นำมาใช้เป็นสูตรตำรับตั้งต้นในการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และ สารแต่งกลิ่นรส และได้กำหนดความเข้มข้นอีก 1 ระดับที่อยู่ระหว่างความเข้มข้นของสูตรตำรับตั้งต้น 2 ความเข้มข้น (4 และ 12%v/v) คือที่ 8%v/v ทดลองปรับสัดส่วนของ PHC, 95% ethanol เพื่อให้ได้สูตรตำรับที่ใส แล้วทดลองปรับเปลี่ยนสารให้ความหวานโดยใช้ Sucralose แทน Acesulfame-K ทดลองเติมสารแต่งกลิ่นต่างๆ สารแต่งรส และสารแต่งสี คัดเลือกสูตรตำรับที่ให้รสชาติเบื้องต้นที่ดี มีความเข้ากันได้ของสารแต่งกลิ่นรสกับ KLO หรือสามารถกลบกลิ่นรสของ KLO ได้

ผลการวิจัย

ในการเพิ่มเติมสูตรตำรับที่มี KLO เท่ากับ 8%v/v พบว่าจะได้สูตรตำรับที่ใสซึ่งประกอบด้วย PHC และ 95% ethanol เท่ากับ 15 และ 20 %v/v ตามลำดับ ส่วนการปรับเปลี่ยนใช้ Sucralose แทน Acesulfame-K ได้สูตรตำรับดังในตารางที่ 116 สำหรับการคัดเลือกสารแต่งกลิ่นสำหรับสูตรตำรับ KLO 4, 8, 12 %v/v คือ สารแต่งกลิ่นบลูเบอร์รี่ สารแต่งกลิ่นสับปะรด และสารแต่งกลิ่นบลูเบอร์รี่ ตามลำดับ สารแต่งกลิ่นทั้ง 3 ชนิดมีกลิ่นหอมหวาน สามารถกลบกลิ่นรสของ KLO ได้ดี ลักษณะของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด ดังแสดงในรูปที่ 37

รายละเอียดการดำเนินการและผลการวิจัย พร้อมตารางที่ 117-124 และ รูปที่ 38 ดังแสดงในภาคผนวก ก

ตารางที่ 116 สูตรตำรับ KLL 4, 8, 12%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวานและสารแต่งกลิ่นรส

ปริมาณ ส่วนประกอบ	สูตร KLL 4%v/v		สูตร KLL 8%		สูตร KLL 12%v/v	
	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v
Kaffir lime leaf oil	2.80	4	0.4	8	8.40	12
PHC	8.40	12	0.75	15	11.90	17
95% Ethanol	14.00	20	1.0	20	14.00	20
Sucralose	0.84	1.2	0.06	1.2	1.12	1.6
กลิ่นบลูเบอร์รี่ (Winner's)	28.00	40	-	-	28.00	40
กลิ่นสับปะรด (Best Odor)	-	-	2.0	40	-	-
Menthol	0.07	0.1	0.005	0.1	0.07	0.1
สีม่วง (Winner's)	0.30	0.42	-	-	0.30	0.42
Water	15.59	22.28	0.79	15.80	6.29	8.78
Total	70.00 ml	100	70.00 ml	100	70.00 ml	100

PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil



รูปที่ 37 ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด 4, 8, 12%v/v ที่ได้คัดเลือกไว้

6.3 การหาความหนาแน่นของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากรูปแบบใสจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

ทดลองหาความหนาแน่นของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด โดยการชั่งน้ำหนักของสูตรตำรับ (เป็นกรัม) ในปริมาตรเท่ากับ 1 หรือ 2 มิลลิลิตรในกระบอกตวงขนาด 5 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหาค่า ความหนาแน่นและค่าเฉลี่ย

ผลการวิจัย

จากการทดลองหาความหนาแน่นของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ได้ผลดังในตารางที่ 125

ตารางที่ 125 ความหนาแน่นเฉลี่ยของสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

ผลิตภัณฑ์	สูตรตำรับ	ความหนาแน่น (g/ml)			
		1	2	3	เฉลี่ย
สูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด	6%v/v KLO	1.2315	1.1011	0.9728	1.1018
	10%v/v KLO	1.1747	0.9458	0.9252	1.0152
	16%v/v KLO	1.1203	0.9464	0.9074	0.9914
สูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด	4%v/v KLLO	1.0594	1.1575	1.1708	1.1292
	8%v/v KLLO	1.0303	1.1810	1.1100	1.1071
	12%v/v KLLO	1.0727	1.2070	1.2007	1.1601

6.4 การทดลองเตรียมสูตรตำรับโดยใช้สารให้ความหวาน Acesulfame-K แทน Sucralose

จากสูตรตำรับที่ได้คัดเลือกไว้ 3 สูตรตำรับนี้ ซึ่งมีการใช้ Sucralose เป็นสารให้ความหวาน ในระยะเวลาต่อมาเมื่อดำเนินการเตรียมสูตรตำรับไว้สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป พบว่า สารให้ความหวาน Sucralose ซึ่งเป็นวัตถุเป็นส่วนประกอบในสูตรตำรับและเป็นวัตถุดิบนำเข้าจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพอย่างมาก มีความชื้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (ในระยะเวลา 1 เดือน) และเกิด fermentation ขึ้น เกิดกลิ่นเปรี้ยวของกรดจากผง Sucralose ซึ่งเพิ่งได้รับจากผู้

นำเข้าในระยะเวลา 1 เดือน การสั่งซื้อใน lot ใหม่ ยังคงประสบปัญหาเช่นเดิม คือ Sucralose มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ สลายตัวอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 1 เดือน คาดว่าน่าจะเป็นปัญหาในกรรมวิธีการผลิตในประเทศจีนซึ่งเป็นแหล่งผลิต จากการสอบถามถึงราคาและแหล่งผลิตอื่น เช่นจากประเทศในแถบยุโรป พบว่าราคาของ Sucralose จากแหล่งผลิตในยุโรปสูงกว่าจากประเทศจีนถึง 10 เท่า (ราคาจากประเทศในยุโรป ประมาณ 40,000 บาท/กิโลกรัม) เมื่อพิจารณาราคาดัชนี และความเสี่ยงในการเกิดปัญหาการใช้ Sucralose ในช่วงการใช้งานจริงในผู้ป่วย พบว่า การปรับเปลี่ยนมาใช้ Sucralose เป็นสารให้ความหวาน แม้จะช่วยให้สูตรตำรับมีรสชาติที่ดีใกล้เคียงกับการใช้น้ำตาล Sucrose มากขึ้น แต่ก็ก่อให้เกิดปัญหาในเรื่องความคงตัวทั้งในระยะสั้นและระยะยาว จึงน่าจะพิจารณากลับไปใช้สารให้ความหวานเดิม คือ Acesulfame-K ซึ่งมีความคงตัวดีมาก ทดแทนในสูตรตำรับซึ่งได้มีการพัฒนารสชาติด้วยสารแต่งกลิ่นรสในรอบใหม่แล้ว

ดำเนินการปรับสูตรตำรับโดยใช้ปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ดังในตารางที่ 100 และ 116 โดยใช้ Acesulfame-K ทดแทน Sucralose ในความเข้มข้นที่เหมาะสม ทั้งนี้โดยพิจารณาปรับเปลี่ยนส่วนประกอบบางชนิดเพื่อให้รสชาติเข้ากันกับ Acesulfame-K

ผลการวิจัย

จากการปรับสูตรตำรับจากตารางที่ 100 และ 116 โดยใช้ Acesulfame-K ทดแทน Sucralose ยังคงได้สูตรตำรับที่มีปริมาณสารสำคัญคงเดิม คือ 6, 10, 16%KLO และ 4, 8, 12%KLLO โดยที่มีการปรับเปลี่ยนสารแต่งกลิ่นรสในบางสูตรตำรับ นอกจากนี้พบว่าสูตรตำรับที่มีปริมาณน้ำมันมะกูด 16% มีความคงตัวไม่ดี มีการแยกชั้นได้ง่าย จึงได้ปรับลดปริมาณน้ำมันมะกูดในสูตรตำรับ 16%KLO ลงเหลือเพียง 13% ปริมาณส่วนประกอบในสูตรตำรับ 6 สูตรตำรับสุดท้ายดังแสดงใน ตารางที่ 126 และ 127 สำหรับลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ยังคงเดิมเหมือนกับสูตรตำรับที่ได้จากส่วนประกอบในตารางที่ 100 และ 116 ดังนั้นจึงควรนำสูตรตำรับที่ใช้ Acesulfame-K เป็นสารให้ความหวานแทน Sucralose

ตารางที่ 126 สูตรตำรับ 6, 10, 13%KLO ที่มีการปรับเปลี่ยนใช้ Acesulfame-K เป็นสารให้ความหวานแทน Sucralose

ส่วนประกอบ	สูตรตำรับ 6%KLO	สูตรตำรับ 10%KLO	สูตรตำรับ 13%KLO
Kaffir lime oil	6%v/v	10%v/v	13%v/v
PHC	10%v/v	13%v/v	19%v/v
95% Ethanol	30%v/v	25%v/v	20%v/v
Acesulfame-K	2.8%w/v	3.2%w/v	3.2%w/v
กลิ่นบลูเบอร์รี่ Winner's)	40%v/v	-	-
กลิ่นสับปะรด (Winner's)	-	40%v/v	-
กลิ่นครีมโซดา Winner's)	-	-	40%v/v
Menthol	-	-	0.1%w/v
สีม่วง (Winner's)	0.42%v/v	-	-
Water q.s. to	100%	100%	100%

PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 127 สูตรตำรับ 4, 8, 12%KLLO ที่มีการปรับเปลี่ยนใช้ Acesulfame-K เป็นสารให้ความหวานแทน Sucralose

ส่วนประกอบ	สูตรตำรับ 4%KLLO	สูตรตำรับ 8%KLLO	สูตรตำรับ 12%KLLO
Kaffir lime leaf oil	4%v/v	8%v/v	12%v/v
PHC	12%v/v	15%v/v	17%v/v
95% Ethanol	20%v/v	20%v/v	20%v/v
Acesulfame-K	4.8%w/v	4.8%w/v	6.4%w/v
กลิ่นบลูเบอร์รี่ (Winner's)	40%v/v	-	40%v/v
กลิ่นสับปะรด (Best Odor)	-	40%v/v	-
Menthol	0.1%w/v	0.1%w/v	0.1%w/v
สีม่วง (Winner's)	0.42%v/v	-	0.42%v/v
Water q.s. to	100%	100%	100%

PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

7. การทดสอบสูตรตำรับน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดที่จะใช้บรรจุ capsule จีว และสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด ถึงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคฟันผุ

7.1 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสูตรตำรับน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดที่จะใช้บรรจุ capsule จีว และสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย **standard strains 3 strains** คือ *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33402, *Lactobacillus casei* ATCC 36978 โดยวิธีการดังนี้

ทำการเพาะเชื้อที่จะใช้ในการทดสอบในอาหาร BHI broth ภายใต้สภาวะไร้อากาศและมีปริมาณ CO₂ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 (10⁷ cfu/ml) เพื่อใช้ในการทดสอบ เตรียมความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2 % v/v โดยใช้ tween80 และ 95% ethanol เป็นตัวทำละลาย ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของน้ำมันหอมระเหยต่อเชื้อ *S. mutans* โดยใช้วิธี broth microdilution method แบบ two-fold serial dilution เพื่อหาค่า MIC และ MBC

ผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่าได้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อมาตรฐาน 3 strains ดังในตารางที่

ตารางที่ 128 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นเชื้อมาตรฐาน 3 strains ของสูตรตำรับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดที่จะใช้บรรจุใน capsule จีว และสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

Samples	สูตรตำรับ	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175		<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33402		<i>Lactobacillus casei</i> ATCC36978	
		MIC (%v/v)	MBC (%v/v)	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)
สูตรตำรับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดที่จะใช้บรรจุ capsule จีว	KLO5%w/w (N112)	2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
	KLO5%w/w (N113)	2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
	KLO10%w/w (N129)	2.5	5	5	5	>2.5	>2.5
	KLLO5%w/w (M16)	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
	KLLO5%w/w (M17)	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
	KLLO5%w/w (M18)	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5	>2.5
สูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด	KLO6%v/v	0.093	0.37	0.187	0.375	0.75	1.5
	KLO10%v/v	0.156	0.625	0.312	0.625	1.25	2.5
	KLO16%v/v	0.25	0.5	0.5	1	2	4
	KLLO4%v/v	0.062	0.062	0.375	0.25	0.5	1
	KLLO8%v/v	0.062	0.062	0.25	0.25	0.5	1
	KLLO12%v/v	0.046	0.093	1	0.375	0.75	1.5

ทั้งนี้ สำหรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากรูปแบบสเปรย์ โดยรวม ผลิตภัณฑ์จากน้ำมันใบมะกรูดให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานทั้ง 3 strains ได้ดีกว่าผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะกรูด โดยที่ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด 3 สูตรตำรับ มี ค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) MBC (Minimum Bactericidal Concentration) ต่ำ เชื้อมาตรฐาน *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ในช่วงความเข้มข้น 0.093-0.25 และ 0.37-0.625%v/v ตามลำดับ, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33402 ในช่วงความเข้มข้น 0.187-0.5 และ 0.375-1%v/v ตามลำดับ, *Lactobacillus casei* ATCC 36978 ในช่วงความเข้มข้น 0.75-2 และ 1.5-4%v/v ส่วนผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด 3 สูตรตำรับ มีค่า

MIC และ MBC ต่อ เชื้อมาตรฐาน *S. mutans* ในช่วงความเข้มข้น 0.046-0.062 และ 0.062-0.093%v/v ตามลำดับ, *S. sobrinus* ในช่วงความเข้มข้น 0.125-0.187 และ 0.25-0.375%v/v ตามลำดับ, *L. casei* ในช่วงความเข้มข้น 0.5-0.75 และ 1-1.5%v/v ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจะพบว่าผลิตภัณฑ์จากน้ำมันหอมระเหยทั้งสองกลุ่ม มีค่า MIC และ MBC ต่อ เชื้อมาตรฐาน *S. mutans* และ *S. sobrinus* ต่ำกว่าค่าต่อ *L. casei* อย่างชัดเจน

สำหรับสูตรตำรับน้ำมันมะกรูดที่จะบรรจุใน capsule จีว 3 สูตรตำรับ มี ค่า MIC และ MBC ต่อ เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *S. mutans* ในช่วงความเข้มข้น 2.5 และ >2.5-5%v/v ตามลำดับ, *S. sobrinus* ในช่วงความเข้มข้น >2.5-5%v/v ทั้งสองค่า, *L. casei* ในความเข้มข้น >2.5%v/v ทั้งสองค่า ส่วนสูตรตำรับ น้ำมันใบมะกรูดที่จะบรรจุใน capsule จีว 3 สูตรตำรับ มี ค่า MIC และ MBC ต่อ เชื้อมาตรฐาน *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei* ในความเข้มข้น >2.5%v/v เท่ากันทุกค่า เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ชนิดคิดฟันในปากแล้ว สูตรตำรับน้ำมันหอมระเหยที่จะบรรจุใน capsule จีว แสดงฤทธิ์ที่ดีกว่า

8. การทดลองบรรจุสูตรตำรับน้ำมันมะกรูดและสูตรตำรับน้ำมันใบมะกรูดใน capsule จีว

ดำเนินการส่งสูตรตำรับน้ำมันมะกรูด จำนวน 3 สูตรตำรับ คือ N112, N113, N129 และสูตรตำรับน้ำมันใบมะกรูด จำนวน 3 สูตรตำรับ คือ M16, M17, M18 ตัวอย่างละ 2.2 กิโลกรัม ไปยังโรงงานบรรจุ soft gelatin capsule ชื่อ Mega Lifesciences ที่นิคมอุตสาหกรรมบางปู ซึ่งได้ให้ความอนุเคราะห์แพคเกจการบรรจุในระหว่างการบรรจุสินค้าทางการค้าให้ ทั้งนี้โดยทำการทดลองตั้งค่าน้ำหนักของ capsule ให้อยู่ที่ 80 มิลลิกรัมโดยใช้น้ำมันทานตะวันก่อน หลังจากนั้นจึงทำการบรรจุ สูตรตำรับเรียงลำดับจากความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยต่ำไปยังความเข้มข้นสูง และทำการบรรจุสูตรตำรับน้ำมันมะกรูดก่อนการบรรจุสูตรตำรับน้ำมันใบมะกรูด โดยเรียงลำดับดังนี้ N112, N113, N129, M16, M17, M18 ทั้งนี้ในระหว่างสูตรตำรับชุดเดียวกัน ใช้สูตรตำรับต่อไปเป็นของเหลวที่ใช้ล้างเครื่องบรรจุ ส่วนการล้างเครื่องบรรจุระหว่างชุดตัวอย่าง ใช้น้ำมันทานตะวันเป็นของเหลวล้างเครื่องบรรจุ สำหรับสูตรตำรับ N129 และ M18 มีการทดลองบรรจุในขนาด 40 มิลลิกรัมเพิ่มเติม ก่อนที่จะเปลี่ยนไปบรรจุสูตรตำรับถัดไป บันทึกน้ำหนักและจำนวน capsule จีวที่ได้จากการบรรจุ

ผลการวิจัย

ในการบรรจุ capsule จีวทุกสูตรตำรับ ไม่พบปัญหาใดๆในการบรรจุ ทั้งในขนาดบรรจุ 40 และ 80 มิลลิกรัม capsule จีวที่ได้มีลักษณะกลมคล้ายเม็ดสาเกเม็ดใหญ่ สีเหลืองอ่อนใส (รูปที่ 39) รายละเอียดของน้ำหนักและจำนวนผลผลิตที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 129



รูปที่ 39 ลักษณะของ capsule จีว ขนาด 80 มิลลิกรัม

ตารางที่ 129 น้ำหนักและจำนวนของ capsule จีวที่ได้จากการบรรจุสูตรตำรับน้ำมันมะกูดและสูตรตำรับน้ำมันใบมะกูด

Code	Batch no.	น้ำหนัก capsule จีว (กิโลกรัม)	จำนวน capsule จีว (ขนาดบรรจุ 80 มิลลิกรัม)	จำนวน capsule จีว (ขนาดบรรจุ 40 มิลลิกรัม)
N112	B. 00722A	2.5934	22,260	-
N113	B. 00722B	2.7154	23,228	-
N129	B. 00722C	0.8990	-	11,690
		1.9382	16,608	-
M16	B. 00722D	2.6034	23,320	-
M17	B. 00722E	2.7938	24,258	-
M18	B. 00722F	0.7215	-	8,180
		1.7796	15,447	-

แต่ละ batch เตรียมจากสูตรตำรับ 2.2 กิโลกรัม

9. การศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ที่ได้พัฒนาขึ้น

9.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์ที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิ สภาวะ และระยะเวลา ต่างๆ

--ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

บรรจุผลิตภัณฑ์ capsule จีว ขนาด 80 มิลลิกรัม จำนวน 6 สูตรตำรับ (ผลิตภัณฑ์ capsule จีว จาก น้ำมันมะกรูด 3 สูตรตำรับ และผลิตภัณฑ์ capsule จีว จากน้ำมันใบมะกรูด 3 สูตรตำรับ) ในตลับพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. เก็บไว้ที่ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 75% Relative Humidity และดึงตัวอย่างที่ 0, 1, 2, 3, 4 เดือน ไปทำการแยกของเหลวที่บรรจุใน capsule จีว (20 capsules ต่อ ตัวอย่าง) ออกจากส่วนเปลือกโดยใช้ปากคีบและกรรไกรปลายแหลม ทำการศึกษาความคงตัวที่อุณหภูมิ และระยะเวลาเก็บต่างๆ (เปรียบเทียบกับสูตรตำรับของน้ำมันหอมระเหยที่จะบรรจุใน capsule จีว (liquid form))

--ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

บรรจุผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด จำนวน 6 สูตรตำรับ (ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด 3 สูตรตำรับ และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมัน ใบมะกรูด 3 สูตรตำรับ) ในขวดยาฉีดขนาด 10 มิลลิลิตร ปิดสนิทด้วยเครื่องปิดขวดยาฉีด (Crimper) เก็บ ไว้ที่ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 75% Relative Humidity และดึงตัวอย่างที่ 0, 1, 2, 3, 4 เดือน ไปทำการศึกษาความคงตัวต่อไป

ผลการวิจัย

ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ในการศึกษาความคงตัว ได้ผลดังนี้

--ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

สำหรับผลิตภัณฑ์ capsule จีว เมื่อได้รับจากโรงงานบรรจุมา เปลือก capsule จะมีลักษณะที่แข็ง เมื่อใส่ในปาก จะต้องใช้แรงกัดเพื่อให้ capsule แตกออกจึงจะปลดปล่อยสูตรตำรับน้ำมันที่บรรจุอยู่ ภายในออกมาได้ กลิ่นและรสชาติของของเหลวที่บรรจุอยู่มีรสชาติที่อ่อนลงกว่าสูตรตำรับเริ่มแรก (liquid form) ก่อนที่จะนำส่งไปเพื่อทำการบรรจุ capsule ที่โรงงาน เมื่อถึงระยะเวลาก่อนการวิเคราะห์ สารสำคัญคือ

ที่ 0 เดือน ซึ่งทั้งช่วงห่างจากเมื่อได้รับผลิตภัณฑ์มาจากโรงงาน พบว่าเปลือก capsule มีลักษณะที่ อ่อนนุ่มลง เมื่อใส่ในปาก ไม่จำเป็นต้องใช้แรงกัดมากเหมือนเมื่อได้รับผลิตภัณฑ์มาจากโรงงานใหม่ๆ ทั้งนี้คาดว่าน่าจะมีการสูญเสีย หรือมีการ migrate ของสูตรตำรับน้ำมันที่บรรจุอยู่ จากภายใน capsule มายังผิวของเปลือก capsule กลิ่นและรสชาติของสูตรตำรับน้ำมันที่บรรจุอยู่ภายใน อ่อนลงมากอย่าง ชัดเจน แม้ว่าจะมีข้อดีตรงที่เปลือก capsule มีความแข็งน้อยลงและมีความนิ่มมากขึ้น ทำให้คุณสมบัติ เหมาะสมกับการเป็น capsule ที่ใช้อมในปาก มากกว่าเมื่อบรรจุเสร็จใหม่ๆ เป็นการลดปัญหาในส่วนของ ความแข็งแรงของเปลือกซึ่งเป็นข้อด้อยของ soft gelatin capsule ตามลักษณะของเทคโนโลยีของโรงงานผลิต ในประเทศไทย แต่เมื่อพิจารณาในส่วนรสชาติและกลิ่นซึ่งอ่อนลงไปมาก capsule เหล่านี้น่าจะมี

ปัญหาในเรื่องปริมาณสารสำคัญที่คงเหลืออยู่ (หากมีการสูญเสียน้ำมันหอมระเหยจริงตามที่คาดการณ์ไว้) ซึ่งจะมีผลต่อไปยังฤทธิ์การยังยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคฟันผุและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ น่าจะต้องพิจารณาผลการศึกษาในส่วนของสารสำคัญและฤทธิ์ยังยั้งแบคทีเรียเพื่อการปรับสูตรตำรับน้ำมันที่จะใช้บรรจุต่อไป

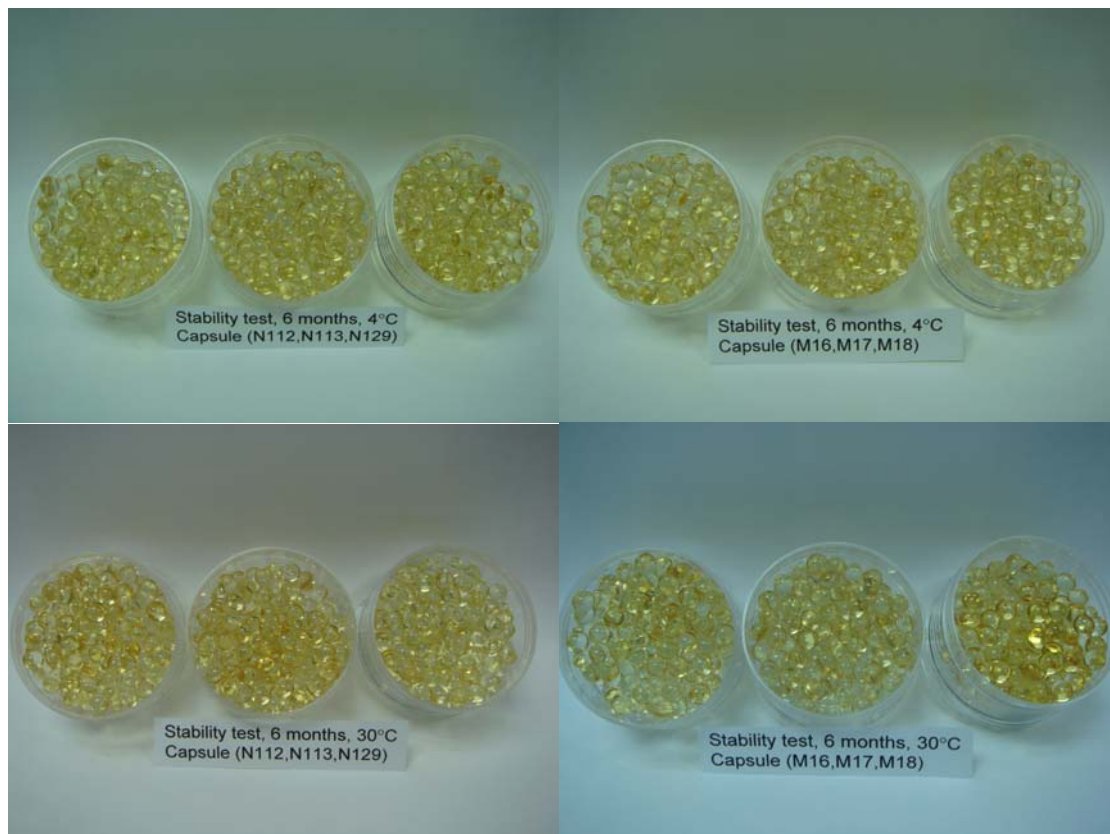
ที่ 1, 2 เดือน หลังการเก็บที่ 4, 30, 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 75% Relative Humidity พบว่า ที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส capsule มีเปลือกที่นิ่มลงและกลืนรสลดลงเล็กน้อย ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงมากนัก แต่ที่ 45 องศาเซลเซียส ที่ 1 เดือน เปลือก capsule จืด มีการหลอมละลาย ทำให้เปลือก capsule เชื่อมติดกันเป็นก้อน หรือหลอมละลายจนกลายเป็นเจลาคินที่ไม่มีลักษณะของ capsule (รูปที่ 40)



รูปที่ 40 ผลผลิต capsule จืด หลังการเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส ที่ 1 เดือน แสดงการหลอมละลายของเปลือกจนเชื่อมติดกัน (ซ้าย) และการหลอมละลายจนกลายเป็นเจลาคิน (ขวา)

ดังนั้นการศึกษาคงตัวในช่วงต่อไปของผลผลิต capsule จืด จึงจำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยน โดยตัดการเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส ออกไป แล้วใช้ระยะเวลาการเก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ให้เป็นสภาวะจริงทดแทน คือเปลี่ยนจากการเก็บที่ 3 และ 4 เดือน เป็นการเก็บที่ 6 และ 12 เดือนแทน

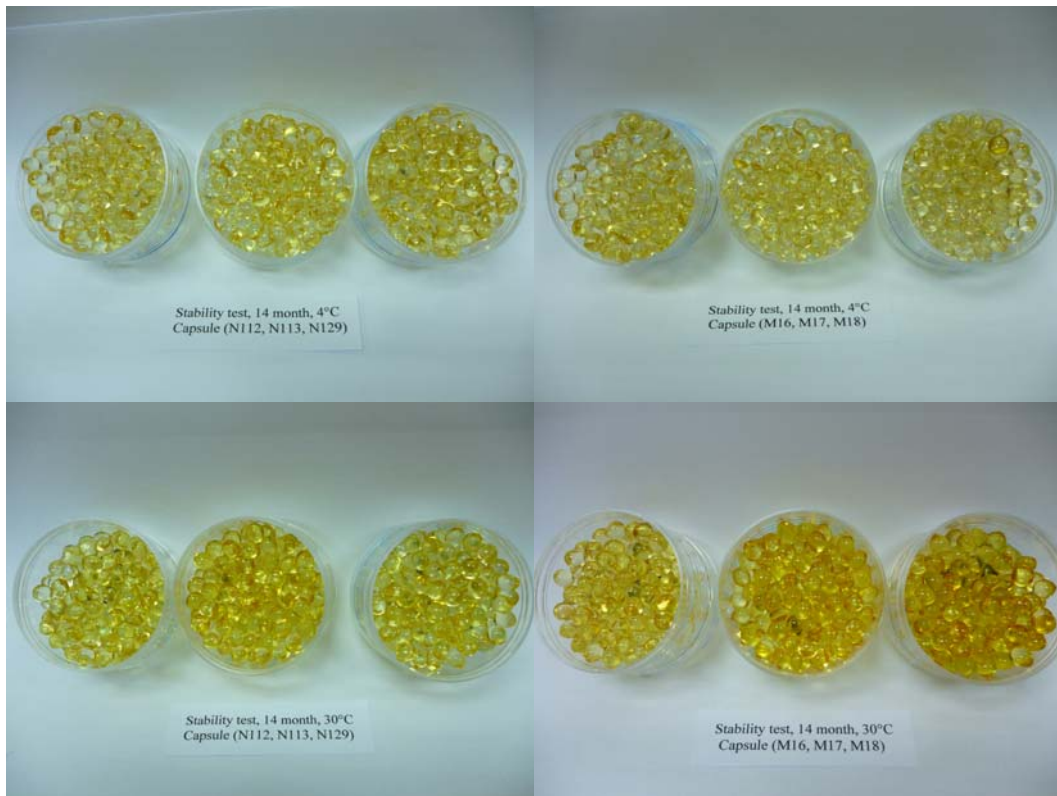
ที่ 6 เดือน หลังการเก็บที่ 4, 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 75% Relative Humidity พบว่า ที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส capsule มีเปลือกที่นิ่มลงและกลืนรสลดลงกว่าเดิมอีกเล็กน้อย ลักษณะ capsule จืดดังแสดงในรูปที่ 39 สำหรับที่ 4 องศาเซลเซียส capsule ไม่เกาะติดกัน ยังคงอยู่แยกเป็นแต่ละ capsule ได้ ในขณะที่ ที่ 30 องศาเซลเซียส เปลือก capsule จะนิ่มกว่า และเกาะติดกับ capsule ที่อยู่ใกล้กันบ้าง สูตร M18 มีสีเข้มขึ้นเล็กน้อย ลักษณะ capsule ดังแสดงในรูปที่ 41



รูปที่ 41 ผลผลิตภัณฑ์ capsule จีว สูตร N112, N113, N129 (รูปซ้าย บน-ล่าง), M16, M17, M18 (รูปขวา บน-ล่าง) หลังการเก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ 6 เดือน

ที่ 14 เดือน หลังการเก็บที่ 4, 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 75% Relative Humidity พบว่า ที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส capsule มีเปลือกที่นิ่มลง ลักษณะ capsule จีว ดังแสดงในรูปที่ 42

เปลือก capsule สำหรับที่ 4 องศาเซลเซียส เปลือก capsule จะนิ่มลงกว่าที่ 6 เดือน capsule เกาะติดกันแต่ยังสามารถเขย่าให้แยกจากกันได้ ในขณะที่ ที่ 30 องศาเซลเซียส เปลือก capsule จะนิ่มกว่า และเกาะติดกับ capsule ที่อยู่ใกล้กันเกือบทั้งหมด และเขย่าให้แยกจากกันไม่ค่อยได้ มีกลิ่นเหม็นหืนชัดเจน ทั้งก่อนและหลังการกัก capsule ทุกสูตรที่ 30 องศาเซลเซียส มีสีเข้มขึ้นกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส สูตรที่มีสีเหลืองเข้มขึ้นเล็กน้อย คือ สูตร N112, N129 และ M16 ส่วนที่มีสีเหลืองเข้มขึ้นปานกลาง คือ สูตร N113, M17 สำหรับสูตร M18 มีสีเหลืองเข้มขึ้นอย่างชัดเจน แตกต่างจากสูตรอื่นๆ ลักษณะ capsule ดังแสดงในรูปที่ 40 ทั้งนี้ ในเบื้องต้นกำหนดการเก็บตัวอย่างไว้ที่ระยะเวลา 12 เดือน แต่เนื่องจากมีความคลาดเคลื่อนบางประการ ประกอบกับปัญหาอื่นๆ ทำให้ต้องมีการเปลี่ยนแปลงการวิเคราะห์ตัวอย่างมาเป็นที่ระยะเวลา 14 เดือนแทน



รูปที่ 42 ผลผลิตภัณฑ์ capsule จีว สูตร N112, N113, N129 (รูปซ้าย บน-ล่าง), M16, M17, M18 (รูปขวา บน-ล่าง) หลังการเก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ 14 เดือน

จากลักษณะทางกายภาพของ capsule ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงไปมาก ทั้งในส่วนขงสีและรสชาติ น่าจะเป็นอุปสรรคสำคัญในการนำผลิตภัณฑ์ในรูปแบบนี้ไปพัฒนาในทางการค้าต่อไป

--ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

ที่ 0 เดือน ผลผลิตภัณฑ์ทั้ง 6 สูตรตำรับ มีความใสและสีดังในรูปที่ 43 (ได้ปรับเปลี่ยน 16%KLO เป็น 13%KLO เพื่อให้มีความคงตัวมากขึ้น)



รูปที่ 43 ผลผลิตกัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูด (KLO) (6%, 10%, 13% KLO = สีม่วง สีเหลือง และสีเขียว ตามลำดับ) และน้ำมันไบมะกูด (KLLO) (4%, 8%, 12% KLO = สีม่วง สีเหลือง และสีม่วง ตามลำดับ) ที่ 0 เดือน

ที่ 1, 2 เดือน พบว่าไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงของสีและความใส ยกเว้น 13% KLO ซึ่งเริ่มมีการแยกชั้น ตั้งแต่ 1 เดือน จึงไม่นำตัวอย่างไปทำการวิเคราะห์หรือทดสอบในขั้นต่อไป รูปผลผลิตกัณฑ์ดังแสดงในรูปที่ 44 และ 45 สำหรับ 1 และ 2 เดือน ตามลำดับ



รูปที่ 44 ผลิตกัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (KLO) และน้ำมันไบบะกรูด (KLLO) ที่ 1 เดือน อุณหภูมิ 4, 30, 45 องศาเซลเซียส (13%KLO ที่ 45 องศาเซลเซียส มีการแยกชั้น)
หมายเหตุ ที่ 30 องศาเซลเซียส 6%KLO, 4% KLLO สีของผลิตภัณฑ์จริงเป็นสีม่วง ไม่ใช่สีฟ้าน้ำเงิน ตามที่เห็นจากรูปถ่าย



รูปที่ 45 ผลผลิตกัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (KLO) และน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) ที่ 2 เดือน อุณหภูมิ 4, 30, 45 องศาเซลเซียส (13%KLO ที่ 45 องศาเซลเซียส มีการแยกชั้น)

ที่ 3, 4 เดือน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสีและความคงตัว คือ

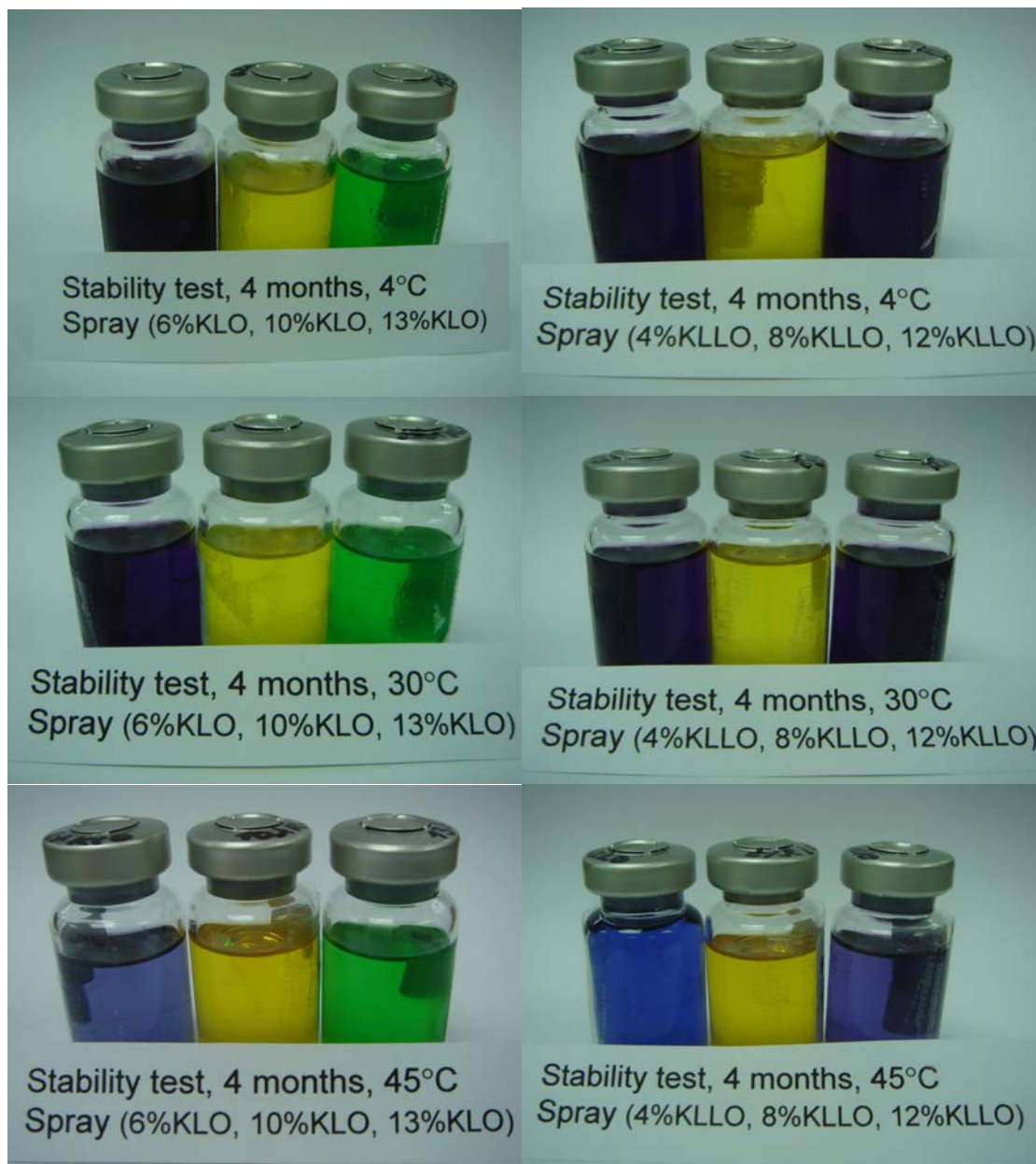
---การแยกชั้น ที่ 45 องศาเซลเซียส 13% KLO เริ่มมีการแยกชั้น ตั้งแต่ 1 เดือน จึงไม่ได้นำไปศึกษาความคงตัวในขั้นต่อไป โดยสรุป คือ สูตร 13% KLO เป็นสูตรที่อาจจะไม่คงตัว อาจจะมีปัญหาในระหว่างการเก็บเมื่อเตรียมไปใช้ในระยะเวลาหรือพัฒนาต่อไปเพื่อจำหน่ายทางการค้า น่าจะเลือกสูตรที่มีความเข้มข้นที่ต่ำลงสำหรับการพัฒนาในขั้นต่อไป อย่างไรก็ดี แม้ว่าตัวอย่างสูตร 13%KLO ที่นำมาทดสอบที่ระยะเวลา 1 เดือนจะมีการแยกชั้น แต่ก็พบว่าที่ระยะเวลาต่อไป มา คือ ที่ระยะเวลา 2, 3, 4 เดือน สูตร 13%KLO ส่วนใหญ่ก็ยังคงอยู่ในลักษณะที่เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีการแยกชั้นให้เห็นอย่างชัดเจน เหมือนตัวอย่างที่เก็บมาเพื่อทดสอบที่ระยะเวลา 1 เดือน ทำให้เกิดข้อสงสัยว่าการที่เกิดการแยกชั้น

ของสูตร 13%KLO อาจจะได้มีปัจจัยที่ระยะเวลาเพียงอย่างเดียว จากการสำรวจตำแหน่งการวางของ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่า ตำแหน่งที่วางของ ตัวอย่างที่นำมาทดสอบที่ 1 เดือนเป็นตำแหน่งที่อยู่ด้านในสุดของตู้ควบคุมอุณหภูมิซึ่งมีอุณหภูมิสูงกว่า ด้านนอกเล็กน้อย (อุณหภูมิด้านใน และด้านนอก ของตู้ควบคุมอุณหภูมิ เท่ากับ 47 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ) มีความเป็นไปได้ที่ความแตกต่างของอุณหภูมิเพียงเล็กน้อยของการวางตัวอย่างที่ ตำแหน่งต่าง ๆ กันจะมีผลทำให้เกิดความแตกต่างของความคงตัวได้ ซึ่งจะทำให้เป็นไปได้ว่า สูตร 13%KLO ซึ่งเป็นสูตรที่มีความเข้มข้นของน้ำมันมะกรูดสูงที่สุด อาจจะเป็นสูตรที่มีแนวโน้มในการ พัฒนาต่อไปในทางการค้าได้

---การเปลี่ยนแปลงของสี 6%KLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อนหรือสี เหลืองอ่อน, 4%KLLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อน, 12%KLLO มีการเปลี่ยนแปลง ของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อนหรือสีชมพูอ่อน ดังนั้นในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในขั้นต่อไป ไปหรือการ พัฒนาเพื่อจำหน่ายทางการค้า น่าที่จะมีการพิจารณาปรับเปลี่ยนสารแต่งสีจากสีม่วงเป็นสีอื่นที่มีความคง ตัวมากกว่า ส่วนสีเขียวและสีเหลืองไม่มีปัญหาในเรื่องของการเปลี่ยนแปลงสี ที่ 45 องศาเซลเซียส สูตรที่ แต่งด้วยสีเขียวและเหลือง อาจจะมี ความเข้มข้นของสีเจือจางลงเล็กน้อย แต่ไม่มากจนผิดปกติหรือเป็นที่ สังเกต ลักษณะของสีของสูตรต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (KLO) และ น้ำมันใบมะกรูด (KLLO) ที่ 3 และ 4 เดือน ดังแสดงในรูปที่ 46 และ 47 ตามลำดับ ในส่วนของการ เปลี่ยนแปลงสีก็เป็นเช่นเดียวกับการแยกชั้น น่าจะมีปัจจัยในเรื่องอื่นนอกเหนือจากเรื่องระยะเวลาเพียง อย่างเดียว คือ แม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงสีอย่างมาก ที่ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 3 เดือน คือ 6%KLO (จากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อนหรือสีเหลืองอ่อน), 4%KLLO (จากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อน), 12%KLLO (จากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อนหรือสีชมพูอ่อน) แต่เมื่อครบระยะเวลา 4 เดือน ตัวอย่างที่มีการเปลี่ยนแปลงของ สี คือสีม่วง แต่มีการเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อนเท่านั้น ไม่มีตัวอย่างใดที่มีการเปลี่ยนแปลงของสีไปจน เป็นสีเหลืองหรือสีชมพูเลย



รูปที่ 46 ผลิตกัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (KLO) และน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) ที่ 3 เดือน อุณหภูมิ 4, 30, 45 องศาเซลเซียส (รูปแถวที่ 3 และ 4, 6%KLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสี ม่วงอ่อน (ในรูปเห็นเป็นสีฟ้า) หรือสีเหลืองอ่อน, 4%KLLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วง อ่อน (ในรูปเห็นเป็นสีฟ้า), 12%KLLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อนหรือสีชมพูอ่อน)



รูปที่ 47 ผลิตกัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (KLO) และน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) ที่ 4 เดือน อุณหภูมิ 4, 30, 45 องศาเซลเซียส (รูปแถวที่ 3, 6%KLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อน (ในรูปเห็นเป็นสีฟ้า), 4%KLLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อน (ในรูปเห็นเป็นสีฟ้า), 12%KLLO มีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีม่วงอ่อน (ในรูปเห็นเป็นสีฟ้า)

9.2 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ใช้เป็น marker ของน้ำมันมะกรูดหรือน้ำมันใบมะกรูดในผลิตภัณฑ์ capsule จีว และผลิตกัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญซึ่งได้แก่ alpha-terpineol ในผลิตกัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด (N112, N113 และ N129) และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญได้แก่ citronellal ในผลิตกัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด (M16, M17 และ M18) เพื่อเปรียบเทียบและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของ

ผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและที่ 4 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 1 และ 2 เดือน โดยมีขั้นตอนการทำวิจัยดังนี้

- ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด

เตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 ppm จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วย GC-MS โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์เหมือนการวิเคราะห์ของตัวอย่างน้ำมันมะกรูด และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เทียบกับ standard curve ของ alpha-terpineol ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 3 และ 5 ppm

- ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด

เตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้น 1,000 ppm จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วย GC-MS โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์เหมือนการวิเคราะห์ของตัวอย่างน้ำมันใบมะกรูด และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เทียบกับ standard curve ของ citronellal ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 25 และ 30 ppm

ผลการวิจัย

จากการทดลอง ได้ standard curve ของ alpha-terpineol และ citronellal ดังแสดงในรูปที่ 48 และ 49 ตามลำดับ (ภาคผนวก จ)

--ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญใน capsule จีว พบว่าได้ผลการวิเคราะห์ความคงตัวของสารสำคัญใน capsule จีว ในเดือนที่ 0, 1, 2, 6, และ 14 เดือน ดังในตารางที่ 130

ตารางที่ 130 แสดงปริมาณสารสำคัญ ใน capsule สูตรรับน้ำมันผิวมะกรูด (KLO) และสูตรรับน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) ในการทดสอบความคงตัวที่ 4, 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 6, และ 14 เดือน

ตัวอย่าง	ปริมาณสารสำคัญ(ppm) *									
	ใน Liquid form	ใน capsule								
		4°C					30°C			
		0 เดือน	1 เดือน	2 เดือน	6 เดือน	14 เดือน	1 เดือน	2 เดือน	6 เดือน	14 เดือน
N112	5.18 A (100%)	0.76 C (14.67%)	0.81 BC (15.64%)	0.91 B (17.57%)	0.61 D (11.78%)	0.48 E (9.27%)	0.75 C (14.48%)	0.92 B (17.76%)	0.64 D (12.36%)	0.38 E (7.34%)
N113	5.52 A (100%)	0.88 C (15.94%)	0.76 D (13.77%)	0.94 C (17.03%)	0.62 E (11.23%)	0.42 F (7.61%)	0.76 D (13.77%)	1.05 B (19.02%)	0.62 E (11.23%)	0.31 G (5.62%)
N129	10.52 A (100%)	1.63 BC (15.49%)	1.55 C (14.73%)	1.78 BC (16.93%)	1.18 D (11.23%)	0.72 E (6.84%)	1.62 BC (15.40%)	1.85 B (17.59%)	1.21 D (11.50%)	0.67 E (6.37%)
M16	111.22 A (100%)	17.09 D (15.37%)	17.57 D (15.80%)	19.33 C (17.38%)	13.08 E (11.76%)	9.12 F (8.20%)	20.44 BC (18.38%)	21.43 B (19.27%)	7.10 G (6.38%)	5.15 H (4.63%)
M17	112.71 A (100%)	18.76 D (16.64%)	19.60 CD (17.39%)	21.41 B (19.00%)	13.72 E (12.17%)	9.37 G (8.31%)	20.56 BC (18.24%)	20.25 C (17.97%)	12.27 F (10.89%)	8.97 G (7.96%)
M18	122.38 A (100%)	17.91 D (14.63%)	19.84 C (16.21%)	21.69 B (17.72%)	13.63 E (11.14%)	8.98 F (7.34%)	21.48 BC (17.55%)	20.90 BC (17.08%)	5.96 G (4.87%)	3.01 H (2.46%)

N 112-129 ---สารสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ คือ α -Terpineol (peak ลำดับที่ 3), M 16-18 ---สารสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ คือ Citronellal (peak ลำดับที่ 1); ที่ 45 องศาเซลเซียส มีการหลอมละลายของ capsule ตั้งแต่ 1 เดือน ไม่ได้ทำการวิเคราะห์; * ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง; ในแถวเดียวกัน ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรไม่เหมือนกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาข้อมูลจากการวิเคราะห์ด้วย GC-MS คือ ค่าความเข้มข้นของสารสำคัญและรสชาติเปรียบเทียบกันระหว่าง สูตรน้ำมันสำหรับบรรจุ capsule (liquid form) กับ รูปแบบที่เป็น capsule พบว่าการบรรจุสูตรตำรับที่เป็น liquid form ให้อยู่ในรูปของ soft gelatin capsule มีผลทำให้รสชาติของสูตรน้ำมันหอมระเหยมีรสชาติอ่อนลง และมีปริมาณสารสำคัญลดลงอย่างมาก คือใน capsule จี๊วจากน้ำมันมะกรูด ปริมาณสารสำคัญ (เมื่อพิจารณาโดยรวมที่ 0, 1, 2 เดือน) ลดลงเหลือเพียง 13.77-19.02% ของสารสำคัญเมื่ออยู่ในรูปของ liquid form สำหรับใน capsule จี๊วจากน้ำมันใบมะกรูด ปริมาณสารสำคัญลดลงเหลือเพียง 14.63-19.27% ของสารสำคัญเมื่ออยู่ในรูป liquid form

เมื่อพิจารณาระยะเวลาของ การลดลงของสารสำคัญใน capsule น่าจะลดลงในระหว่างช่วงเวลา 2 ช่วง คือ

---ช่วงเวลาที่ 1 คือ ช่วงเวลาทำการบรรจุ capsule ที่โรงงาน คือในช่วงเวลาที่บรรจุเนื่องจากการให้ความร้อนในการละลาย gelatin เพื่อใช้เตรียมส่วนเปลือก capsule

---ช่วงเวลาที่ 2 คือ ช่วงเวลาที่เก็บ capsule ไว้เพื่อรอการวิเคราะห์

ทั้งนี้ปริมาณสารสำคัญใน capsule ลดลงอย่างมาก (ดูตาราง ปริมาณสารสำคัญที่ 0 เดือน) จากในรูป liquid form (การวิเคราะห์ทางสถิติโดย Analysis of Variance พบว่า ปริมาณสารสำคัญที่ 0 เดือนและใน liquid form แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ, $p < 0.05$) ส่วนปริมาณสารสำคัญที่ 0, 1, 2 เดือนไม่ค่อยแตกต่างกัน แสดงว่าการสูญเสียสูตรตำรับน้ำมันหอมระเหยน่าจะเกิดขึ้นใน 2 ช่วงเวลาดังกล่าว จนระดับปริมาณสารสำคัญคงที่และไม่มีการลดลงของสารสำคัญอีกในช่วงเวลาของการทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส สำหรับที่ 45 องศาเซลเซียส เปลือก capsule จี๊ว มีการหลอมละลาย ทำให้เปลือก capsule เชื่อมติดกันเป็นก้อน หรือหลอมละลายจนกลายเป็นเจลาคินที่ไม่มีลักษณะของ capsule

สำหรับผลิตภัณฑ์ capsule จี๊วจากน้ำมันมะกรูด แม้ว่าปริมาณสารสำคัญจะมีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 0, 1, 2 เดือน แต่สำหรับผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 6 เดือน พบว่า ที่ อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ตัวอย่าง capsule มีปริมาณสารสำคัญลดต่ำลงไปอีก (ปริมาณสารสำคัญที่ 6 เดือนแตกต่างจาก liquid form, 0, 1, 2 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ, $p < 0.05$) โดยที่ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณสารสำคัญในสูตร N112, N113, N129 ลดลงจากที่ระยะ 2 เดือน ลงไปอีก 5.79, 5.8, และ 5.7 % ตามลำดับ (เมื่อคิดว่า liquid form มีค่าเท่ากับ 100 %) และที่ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณสารสำคัญในสูตร N112, N113, N129 ลดลงจากที่ระยะ 2 เดือน ลงไปอีก 5.4, 7.79, และ 6.09 % ตามลำดับ (เมื่อคิดว่า liquid form มีค่าเท่ากับ 100 %) เป็นที่น่าสังเกตว่า ที่อุณหภูมิตู้เย็นและที่อุณหภูมิห้อง สารสำคัญในผลิตภัณฑ์ capsule จี๊วจากน้ำมันมะกรูด มีความคงตัวใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจจะเป็นคุณสมบัติที่ดีที่จะทำให้สามารถใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่อุณหภูมิทั่วไปได้ สำหรับที่ระยะเวลา 14 เดือน พบว่า ปริมาณสารสำคัญคงเหลืออยู่ไม่ถึง 10% ของ liquid form ทั้ง 3 สูตร ที่ทั้ง อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้สารสำคัญคงเหลือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมีปริมาณสูงกว่าที่ 30 องศาเซลเซียสเล็กน้อย โดย ปริมาณสารสำคัญที่ 4 องศาเซลเซียส ในสูตร N112, N113, N129 ลดลงจากที่ระยะ 6 เดือน ลงไปอีก 2.51, 3.62, และ 4.39 % ตามลำดับ (ปริมาณสารสำคัญที่ 14 เดือน และ ที่ 6 เดือน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ, $p < 0.05$) และปริมาณสารสำคัญที่ 30

องศาเซลเซียส ในสูตร N112, N113, N129 ลดลงจากที่ระยะ 6 เดือน ลงไปอีก 5.02, 5.61, และ 5.13 % ตามลำดับ (ปริมาณสารสำคัญที่ 14 เดือน และ ที่ 6 เดือน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ, $p < 0.05$) (เมื่อคิด ว่า liquid form มีค่าเท่ากับ 100 %)

ในผลิตภัณฑ์ capsule จี๊วจากน้ำมันใบมะกรูด แม้ว่าปริมาณสารสำคัญจะมีค่าใกล้เคียงกันในช่วง 0, 1, 2 เดือน แต่สำหรับผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 6 เดือน พบว่า ตัวอย่าง capsule ที่ อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณสารสำคัญลดต่ำลงไปอีก (ปริมาณสารสำคัญที่ 6 เดือน แตกต่างจาก liquid form, 0, 1, 2 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ, $p < 0.05$) สำหรับผลิตภัณฑ์ capsule จี๊วจากน้ำมันมะกรูด ที่ 4 องศาเซลเซียสปริมาณสารสำคัญที่ 6 เดือนลดลงจาก 2 เดือนอีก คือ สูตร N112, N113, N129 มีปริมาณสารสำคัญลดลงอีก เท่ากับ 5.79, 5.8, 5.7% ตามลำดับ (เมื่อคิดว่า liquid form มีค่าเท่ากับ 100 %) ส่วนที่ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณสารสำคัญจะลดลงอีก เท่ากับ 5.4, 7.79, 6.09% ตามลำดับ (เมื่อคิดว่า liquid form มีค่าเท่ากับ 100 %) สำหรับผลิตภัณฑ์ capsule จี๊วจากน้ำมันใบมะกรูด คือ ที่ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณสารสำคัญที่ 6 เดือน ในสูตร M16, M17, M18 ลดลงจากที่ระยะ 2 เดือน ลงไปอีก 5.62, 6.83 และ 6.58 % ตามลำดับ (เมื่อคิดว่า liquid form มีค่าเท่ากับ 100%) และที่ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณสารสำคัญ ในสูตร M16, M17, M18 ลดลงจากที่ระยะ 2 เดือน ลงไปอีก 12.89, 7.08 และ 12.21 % ตามลำดับ (เมื่อคิดว่า liquid form มีค่าเท่ากับ 100 %) จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ capsule จี๊วจากน้ำมันใบมะกรูดที่ 30 องศาเซลเซียส มีการสูญเสียของสารสำคัญมากที่สุดในกลุ่ม สำหรับที่ระยะเวลา 14 เดือน ที่ 4 องศาเซลเซียส สารสำคัญคงเหลืออยู่ในปริมาณที่สูงกว่าที่ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากสารสำคัญมีการสลายตัวที่ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 6 เดือน ไปมากกว่าที่ 4 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลาเดียวกัน ทั้งนี้ ปริมาณสารสำคัญที่ 4 องศาเซลเซียส ในสูตร M16, M17, M18 ลดลงจากที่ระยะ 6 เดือน (ปริมาณสารสำคัญที่ 14 เดือน และ ที่ 6 เดือน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ, $p < 0.05$) ลงไปอีก 3.56, 3.86, และ 3.80 % ตามลำดับ และปริมาณสารสำคัญที่ 30 องศาเซลเซียส ในสูตร M16, M17, M18 ลดลงจากที่ระยะ 6 เดือน (ปริมาณสารสำคัญที่ 14 เดือน และ ที่ 6 เดือน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ, $p < 0.05$) ลงไปอีก 1.75, 2.93, และ 2.41 % ตามลำดับ (เมื่อคิดว่า liquid form มีค่าเท่ากับ 100 %)

ในการทดลองบรรจุ capsule ครั้งต่อไป ได้พิจารณาเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณน้ำมันหอมระเหย เพื่อชดเชยส่วนที่จะสูญเสียไปในระหว่างช่วง 2 เวลา ดำเนินการคัดเลือกสูตรตำรับน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่ดีทั้งในแบคทีเรียที่ทำให้เกิดฟันผุและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ โดยได้คัดเลือกมา 2 สูตรตำรับเพื่อทดลองเตรียมสูตรตำรับน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สูงขึ้น คือ ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย 5 เท่า ของปริมาณน้ำมันหอมระเหยในสูตรตำรับเดิม (จากการประมาณปริมาณสารสำคัญที่ลดลง แตกต่างกันมากกว่า 6 เท่า) โดยคาดว่าจะเป็นการชดเชยปริมาณที่จะเกิดการสูญเสียโดยการระเหยระหว่างกระบวนการเตรียมส่วนเปลือก gelatin และทดลองบรรจุ capsule จี๊วดังกล่าวโดยทำการเคลือบ soft gelatin capsule ด้วย enteric coat เพื่อป้องกันการ migrate ของน้ำมันหอมระเหยจากภายในเปลือกออกสู่ภายนอก

--ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญซึ่งได้แก่ α -terpineol ในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูด สูตร 6% KLO, 10% KLO และ 13% KLO และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญซึ่งได้แก่ citronellal ในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันใบมะกรูด สูตร 4% KLLO, 8% KLO และ 12% KLO ที่ 0 เดือน และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูด สูตร 10% KLO และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันใบมะกรูด สูตร 12% KLLO เมื่อเก็บไว้ที่ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 1, 2, 3, 4 เดือน โดยมีขั้นตอนการทำงานวิจัยดังนี้

--ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูด

สกัดตัวอย่างด้วยเฮกเซนในสัดส่วน 1:4 ใน separatory funnel 5 ครั้ง นำสารละลายส่วนเฮกเซนที่ได้รวมกันและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วย GC-MS โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์เหมือนกับการวิเคราะห์น้ำมันมะกรูด และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เทียบกับ standard curve ของ α -terpineol ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 3, 5, 8 และ 10 ppm

--ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันใบมะกรูด

สกัดตัวอย่างด้วยเฮกเซนในสัดส่วน 1:4 ใน separatory funnel 5 ครั้ง นำสารละลายส่วนเฮกเซนที่ได้รวมกันและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญด้วย GC-MS โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์เหมือนกับการวิเคราะห์น้ำมันใบมะกรูด และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ เทียบกับ standard curve ของ citronellal ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 ppm

ผลการวิจัย

จากการทดลอง ได้ standard curve ของ α -terpineol และ citronellal ดังแสดงในรูปที่ 50 และ 51 ตามลำดับ (ภาคผนวก ข)

ปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ที่ 0 เดือน

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูด สูตร 6% KLO, 10% KLO และ 13% KLO ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันใบมะกรูด สูตร 4% KLLO, 8% KLLO และ 12% KLLO ที่เวลา 0 เดือน ได้ผลดังตารางที่ 131

ตารางที่ 131 ปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูด สูตร 6% KLO, 10% KLO และ 13% KLO และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันใบมะกรูด สูตร 4% KLLO, 8% KLLO และ 12% KLLO ที่เวลา 0 เดือน

ตัวอย่าง	ปริมาณสารสำคัญ* (ppm)
6% KLO	3.06
10% KLO	4.28
13% KLO	5.11
4% KLLO	53.90
8% KLLO	88.77
12% KLLO	148.32

*สูตร 6% KLO, 10% KLO และ 13% KLO ---สารสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ

คือ α -Terpineol (peak ลำดับที่ 3), สูตร 4% KLLO, 8% KLLO และ 12% KLLO

---สารสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ คือ Citronellal (peak ลำดับที่ 1)

ปริมาณสารสำคัญของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ที่อุณหภูมิ 4, 30, และ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 1, 2, 3, และ 4 เดือน

สำหรับการศึกษาความคงตัว จากการศึกษาในส่วนอื่นที่ได้ดำเนินการก่อนหน้าการศึกษาปริมาณสารสำคัญ พบว่าเนื่องจากมีข้อมูลที่ยังไม่มีแนวโน้มที่สูตรตำรับที่จะมีศักยภาพที่จะพัฒนาต่อไปในทางการค้า คือ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูด สูตร 10% KLO และ ในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันใบมะกรูด สูตร 12% KLLO จึงได้ทำการศึกษาปริมาณสารสำคัญเฉพาะใน 2 สูตรนี้ ที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 เดือน และได้ผลดังตารางที่ 132

ตารางที่ 132 ปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันมะกรูด สูตร 10% KLO และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากจากน้ำมันใบมะกรูด สูตร 12% KLLO ที่อุณหภูมิ 4, 30, และ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0, 1, 2, 3, และ 4 เดือน

ตัวอย่าง	ปริมาณสารสำคัญ* (ppm)												
		4°C				30°C				45°C			
	0 เดือน	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน
10% KLO	4.28 A (100%)	4.22 A (98.60%)	3.88 ABC (90.65%)	3.58 BCD (83.64%)	3.51 CD (82.01%)	4.13 AB (96.50%)	3.75 ABCD (87.62%)	3.56 BCD (83.18%)	3.20 D (74.77%)	2.53 E (59.11%)	2.25 EF (52.57%)	2.04 EF (47.66%)	1.75 F (40.89%)
12% KLLO	148.32 A (100%)	144.68 B (97.55%)	144.65 B (97.53%)	121.34 E (81.81%)	118.74 F (80.06%)	142.03 C (95.76%)	98.33 G (66.30%)	98.77 G (66.59%)	90.21 H (60.82%)	135.62 D (91.44%)	87.28 I (58.85%)	53.70 J (36.21%)	49.74 K (33.54%)

*สูตร 10% KLO ---สารสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ คือ α -Terpineol (peak ลำดับที่ 3)

สูตร 12% KLLO ---สารสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ คือ Citronellal (peak ลำดับที่ 1)

ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง, ในแถวเดียวกัน ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรไม่เหมือนกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 132 พบว่าที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4 เดือน

ที่อุณหภูมิการเก็บ 4 องศาเซลเซียส สูตร 10% KLO และ สูตร 12% KLLO มีปริมาณสารสำคัญที่ใช้เป็น markers ลดต่ำในอัตราเร็วที่คล้ายคลึงกัน คือ ปริมาณสารสำคัญลดลงเหลือ 82.01 และ 80.06 % ตามลำดับที่ระยะเวลา 4 เดือน (เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่ 0 เดือน) คือ ปริมาณที่สูญเสียไปมีค่าเท่ากับ 17.99 และ 19.94 % ตามลำดับ ทั้งนี้สูตรทั้งสองน่าจะมีลักษณะความคงตัวคล้ายคลึงกัน ที่อุณหภูมิต่ำ ในการวิเคราะห์ทางสถิติ โดย ANOVA พบว่า สำหรับ 10%KLO ปริมาณสารสำคัญที่ 0 และ 1 เดือน ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$), ที่ 2 เดือน ไม่แตกต่างจาก 0 และ 1 เดือน, ที่ 3 เดือน แตกต่างจาก 0, 1 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจาก 2 เดือน, และที่ 4 เดือน แตกต่างจาก 0, 1 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจาก 2, 3 เดือน ส่วน 12%KLLO ปริมาณสารสำคัญที่ 1 เดือน แตกต่างจาก 0 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), ที่ 2 เดือน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากที่ 0 เดือน ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากที่ 1 เดือน, และที่ 3 เดือน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก 0, 1, 2 เดือน ($p < 0.05$), ที่ 4 เดือน แตกต่างจาก ที่ 0, 1, 2, 3 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

สำหรับที่ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 1 เดือน ยังไม่เห็นความแตกต่างระหว่างผลิตภัณฑ์ 2 กลุ่ม แต่จะเริ่มเห็นความแตกต่างระหว่างสูตรทั้งสอง คือ สูตร 12%KLLO มีอัตราการสูญเสียของสารสำคัญที่เร็วกว่า สูตร 10%KLO ที่ระยะเวลา 2 เดือน ต่อจากนั้น ทั้ง 2 สูตรก็จะมีปริมาณสารสำคัญลดลงไปเรื่อยๆ จนถึงระยะเวลา 4 เดือน ปริมาณสารสำคัญของสูตร 10%KLO และสูตร 12% KLLO ลดลงเหลือ 74.77 % และ 60.82 % ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณสารสำคัญที่สูญเสียไปของสูตร 10% KLO และ สูตร 12% KLLO จะเป็นปริมาณที่ลดลงเท่ากับ 25.23% และ 39.18 % ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า สารสำคัญของสูตรน้ำมันใบมะกรูด (สูตร 12% KLLO) จะมีการสูญเสียไปมากกว่าสารสำคัญของสูตรน้ำมันมะกรูด (สูตร 10% KLO) ซึ่งผลการศึกษาความคงตัวในส่วนนี้ จะสอดคล้องกับผลการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ capsule จี๊วจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ซึ่งมีการสูญเสียของสารสำคัญของ capsule จากน้ำมันใบมะกรูด (ที่ 30 องศาเซลเซียส) มากกว่าสารสำคัญของ capsule จากน้ำมันมะกรูด ในการวิเคราะห์ทางสถิติ สำหรับ 10%KLO พบว่าปริมาณสารสำคัญที่ 0 และ 1 เดือน ไม่แตกต่างกัน, ที่ 2 เดือน ไม่แตกต่างจาก 0, 1 เดือน, และที่ 3 เดือนแตกต่างจากที่ 0 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจาก 1, 2 เดือน, และที่ 4 เดือน แตกต่างจาก 0, 1 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจาก 2, 3 เดือน ส่วน 12%KLLO พบว่าในทางสถิติ การเปลี่ยนแปลงที่ 0, 1, 2, 3, 4 เดือน เป็นไปในลักษณะเดียวกับที่ 4 องศาเซลเซียส แต่ปริมาณสารสำคัญลดลงต่ำลงมากกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ เห็นชัดเจนตั้งแต่ 2 เดือนเป็นต้นไป

ที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสถานะเร่ง พบว่า ที่ระยะเวลา 1 เดือน สูตร 10% KLO (ปริมาณสารสำคัญคงเหลือเท่ากับ 59.11%) มีการสูญเสียมากกว่าสูตร 12% KLLO (ปริมาณสารสำคัญคงเหลือเท่ากับ 91.44%) คือสูตรจากน้ำมันมะกรูดมีความไวต่อความร้อนมากกว่าที่อุณหภูมิอื่น ส่วนที่ระยะเวลา 2 เดือน ปริมาณสารสำคัญของสูตร 12%KLLO จะมีการสูญเสียด้วยอัตราที่เร็วกว่า 10%KLO ส่วนระยะเวลาจากที่ 2 เดือน ถึง 4 เดือน ทั้ง 2 สูตรมีอัตราการสลายตัวที่ใกล้เคียงกัน จนถึงที่ระยะเวลา 4 เดือน ปริมาณสารสำคัญลดลงไปอีกสำหรับ สูตร 10% KLO และ สูตร 12%KLLO คือเหลือปริมาณสารสำคัญ

เท่ากับ 40.89 และ 33.54 % ตามลำดับ คิดเป็นปริมาณสารสำคัญที่มีการสูญเสียเท่ากับ 59.11 และ 66.46% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ในท้ายที่สุด สารสำคัญของสูตรน้ำมันใบมะกรูด (สูตร 12%KLLO) จะมีการสูญเสียไปมากกว่าสารสำคัญของสูตรน้ำมันมะกรูด (สูตร 10%KLO) แม้ว่าความแตกต่างจะไม่ชัดเจนเท่ากับที่ 30 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ดี เมื่อสิ้นสุดการศึกษาที่ระยะเวลา 4 เดือน ผลการศึกษาในสภาวะแรงนี้ จะเป็นการคาดการณ์ถึงอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิปกติระยะเวลา 2 ปี ดังนั้น สูตรทั้งสองนี้ น่าจะมีอายุการเก็บที่ไม่เป็นที่พอใจนักที่ระยะเวลา 2 ปีดังกล่าว ในการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า สำหรับ 10%KLO ปริมาณสารสำคัญที่ 1 เดือนแตกต่างจากที่ 0 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), ที่ 2 เดือน แตกต่างจากที่ 0 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจาก 1 เดือน, และที่ 3 เดือน แตกต่างจากที่ 0 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจาก 1, 2 เดือน, และที่ 4 เดือน แตกต่างจากที่ 0, 1 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจาก ที่ 2, 3 เดือน ส่วน 12%KLLO พบว่า ปริมาณสารสำคัญ ที่ 1, 2, 3, 4 เดือน แตกต่างจาก 0 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และการลดต่ำของปริมาณสารสำคัญมากกว่าที่ 4, 30 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญที่ระยะเวลาเดียวกันด้วย

โดยสรุป ความคงตัวเมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาปริมาณสารสำคัญของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก ผลิตภัณฑ์จะมีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิตู้เย็น และจะมีปริมาณสารสำคัญลดต่ำลงเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ไม่ยาวถึง 2 ปี

9.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ ที่เป็น standard strains 3 strains

ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (MIC) ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ ที่เป็น standard strains 3 strains คือ *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33402, *Lactobacillus casei* ATCC 36978 โดยวิธี Microbroth dilution method โดยวิธีที่ใช้ในการทดสอบน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ทำการทดสอบในผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก 6 สูตรดาร์บ

ผลการวิจัย

--ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุที่เป็น standard strains 3 strains ในผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด พบว่า ไม่สามารถหาค่า MIC & MBC ของ capsule ได้ ในตัวอย่างทั้ง 6 สูตรดาร์บ คือ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด 3 สูตรดาร์บ (N112, N113, N129) และผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด 3 สูตรดาร์บ (M16, M17, M18) ตั้งแต่ที่ 0, 1, 2 เดือน (activity ต่ำมาก) นอกจากนี้ก็ยังมีปัญหาเกิดการแยกชั้นส่วนน้ำมันและส่วนน้ำในระหว่างการทดสอบ ส่วนค่าของ liquid form จะดีกว่า capsule โดยสรุป คือ น่าจะหยุดการดำเนินการทดสอบความคงตัวของ capsule ไม่ทำการทดสอบในเดือนถัดไป (6, 14 เดือน)

--ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันไบบะกรูด

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุที่เป็น standard strains 3 strains ในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด 3 สูตรตำรับ (6%KLO, 10%KLO, 13%KLO) และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันไบบะกรูด 3 สูตรตำรับ (4%KLLO, 8%KLLO, 12%KLLO) พบว่าได้ผลดังในตารางที่ 133 – 137

ตารางที่ 133 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันไบบะกรูด ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33402, *Lactobacillus casei* ATCC 36978 ที่ 0 เดือน (Finished products)

Spray	<i>S. mutans</i> ATCC 25175		<i>S. sobrinus</i> ATCC 33402		<i>L. casei</i> ATCC 36978	
	Spray	MIC	Spray	MIC	Spray	MIC
	Dilution	(%v/v)	Dilution	(%v/v)	Dilution	(%v/v)
6% KLO	1/32	3.13	1/32	3.13	1/16	6.25
10% KLO	1/64	1.56	1/64	1.56	1/32	3.13
13% KLO	1/256	0.39	1/128	0.78	1/64	1.56
4% KLLO	1/64	1.56	1/64	1.56	1/16	6.25
8% KLLO	1/128	0.78	1/64	1.56	1/32	3.13
12% KLLO	1/256	0.39	1/128	0.78	1/64	1.56

KLO = น้ำมันมะกรูด, KLLO = น้ำมันไบบะกรูด

จากตารางที่ 133 พบว่าผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากให้ผลการต้านเชื้อแบคทีเรียที่แรงขึ้นตามปริมาณของน้ำมันหอมระเหยในสูตรตำรับ สำหรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันไบบะกรูดให้ผลต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ดีกว่าผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะกรูดเมื่อเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยใกล้เคียงกัน ส่วนฤทธิ์ต่อ *S. sobrinus* ของผลิตภัณฑ์ทั้งสองกลุ่มใกล้เคียงกัน ยกเว้นผลิตภัณฑ์จากน้ำมันไบบะกรูดที่ 4, 8% ให้ผลต้านเชื้อแบคทีเรียดีกว่าผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะกรูดที่ 6, 10% ตามลำดับ สำหรับฤทธิ์ต่อ *L. casei* ผลิตภัณฑ์ทั้ง 6 สูตรตำรับให้ผลไม่ดีเท่าต่อเชื้อแบคทีเรียอีก 2 ชนิด

ตารางที่ 134 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33402, *Lactobacillus casei* ATCC 36978 ที่ 1 เดือน

Spray	<i>S. mutans</i> ATCC 25175		<i>S. sobrinus</i> ATCC 33402		<i>L. casei</i> ATCC 36978	
	Spray Dilution	MIC (%v/v)	Spray Dilution	MIC (%v/v)	Spray Dilution	MIC (%v/v)
6% KLO at 4°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/8	12.5
10% KLO at 4°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25
13% KLO at 4°C	1/256	0.39	1/256	0.39	1/16	6.25
4% KLLO at 4°C	1/64	1.56	1/64	1.56	1/8	12.5
8% KLLO at 4°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25
12% KLLO at 4°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25
6% KLO at 30°C	1/128	0.78	1/64	1.56	1/8	12.5
10% KLO at 30°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25
13% KLO at 30°C	1/256	0.39	1/256	0.39	1/16	6.25
4% KLLO at 30°C	1/64	1.56	1/32	3.13	1/8	12.5
8% KLLO at 30°C	1/128	0.78	1/64	1.56	1/16	6.25
12% KLLO at 30°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25
6% KLO at 45°C	1/64	1.56	1/64	1.56	1/8	12.5
10% KLO at 45°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/16	6.25
4% KLLO at 45°C	1/64	1.56	1/32	3.13	1/8	12.5
8% KLLO at 45°C	1/128	0.78	1/64	1.56	1/16	6.25
12% KLLO at 45°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25

KLO = น้ำมันมะกรูด, KLLO = น้ำมันใบมะกรูด, 13% KLO ที่ 45 องศาเซลเซียส เกิดการแยกชั้นของผลิตภัณฑ์ จึงไม่ได้ทำการทดสอบ

จากตารางที่ 134 ที่ 1 เดือน ผลิตภัณฑ์ยังคงแสดงฤทธิ์ที่ดีต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* โดยมีค่า MIC ใกล้เคียงกับที่ 0 เดือน ที่ทั้งสามอุณหภูมิ ส่วนฤทธิ์ต่อ *L. casei* พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ลดต่ำลง ในทั้ง 6 สูตรครับ

ตารางที่ 135 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันไบบะกรูด ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33402, *Lactobacillus casei* ATCC 36978 ที่ 2 เดือน

Spray	<i>S. mutans</i> ATCC 25175		<i>S. sobrinus</i> ATCC 33402		<i>L. casei</i> ATCC 36978	
	Spray Dilution	MIC (%v/v)	Spray Dilution	MIC (%v/v)	Spray Dilution	MIC (%v/v)
6% KLO at 4°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/8	12.5
10% KLO at 4°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25
13% KLO at 4°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/8	12.5
4% KLLO at 4°C	1/64	1.56	1/64	1.56	1/8	12.5
8% KLLO at 4°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25
12% KLLO at 4°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25
6% KLO at 30°C	1/128	0.78	1/32	3.13	1/8	12.5
10% KLO at 30°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25
13% KLO at 30°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/8	12.5
4% KLLO at 30°C	1/64	1.56	1/32	3.13	1/8	12.5
8% KLLO at 30°C	1/256	0.39	1/32	3.13	1/16	6.25
12% KLLO at 30°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25
6% KLO at 45°C	1/32	3.13	1/32	3.13	1/8	12.5
10% KLO at 45°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/16	6.25
4% KLLO at 45°C	1/32	3.13	1/32	3.13	1/8	12.5
8% KLLO at 45°C	1/128	0.78	1/32	3.13	1/16	6.25
12% KLLO at 45°C	1/256	0.39	1/128	0.78	1/16	6.25

KLO = น้ำมันมะกรูด, KLLO = น้ำมันไบบะกรูด,

13% KLO ที่ 45 องศาเซลเซียส เกิดการแยกชั้นของผลิตภัณฑ์ จึงไม่ได้ทำการทดสอบ

จากตารางที่ 135 ที่ 2 เดือน ผลิตกัณฑ์ยังคงแสดงฤทธิ์ที่ต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ทั้งนี้ MIC ของสูตร 4%KLLO ที่ 45°C มีค่าสูงขึ้น ส่วนสูตรตำรับที่เหลือมีค่าใกล้เคียงกับที่ 1 เดือนหรือลดต่ำลงบ้าง ยกเว้นสูตร 13%KLO ที่มีการแยกชั้นของผลิตกัณฑ์เกิดขึ้นตั้งแต่ 1 เดือน ที่น่าสังเกตคือ สูตร 8, 12%KLLO มีค่า MIC ที่ค่อนข้างคงที่ทั้งสามอุณหภูมิ สำหรับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. sobrinus* ให้ผลคล้ายคลึงกันกับ *S. mutans* และสำหรับ *L. casei* ค่า MIC เหมือนที่ 1 เดือน ยกเว้น 13%KLO ซึ่งมีค่า MIC สูงขึ้น

ตารางที่ 136 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33402, *Lactobacillus casei* ATCC 36978 ที่ 3 เดือน

Spray	<i>S. mutans</i> ATCC 25175		<i>S. sobrinus</i> ATCC 33402		<i>L. casei</i> ATCC 36978	
	Spray	MIC	Spray	MIC	Spray	MIC
	Dilution	(%v/v)	Dilution	(%v/v)	Dilution	(%v/v)
6% KLO at 4°C	1/32	3.125	1/128	0.78	1/8	12.5
10% KLO at 4°C	1/32	3.125	1/128	0.78	1/8	12.5
13% KLO at 4°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/8	12.5
4% KLLO at 4°C	1/32	3.125	1/64	1.56	1/8	12.5
8% KLLO at 4°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/8	12.5
12% KLLO at 4°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/8	12.5
6% KLO at 30°C	1/32	3.125	1/64	1.56	1/8	12.5
10% KLO at 30°C	1/32	3.125	1/64	1.56	1/8	12.5
13% KLO at 30°C	1/64	1.56	1/128	0.78	1/8	12.5
4% KLLO at 30°C	1/32	3.125	1/64	1.56	1/8	12.5
8% KLLO at 30°C	1/128	0.78	1/64	1.56	1/8	12.5
12% KLLO at 30°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/8	12.5
6% KLO at 45°C	1/16	6.25	1/64	1.56	1/8	12.5
10% KLO at 45°C	1/32	3.125	1/64	1.56	1/8	12.5
4% KLLO at 45°C	1/32	3.125	1/32	3.125	1/8	12.5
8% KLLO at 45°C	1/128	0.78	1/64	1.56	1/16	6.25
12% KLLO at 45°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/16	6.25

KLO = น้ำมันมะกรูด, KLLO = น้ำมันใบมะกรูด,

13%KLO ที่ 45 องศาเซลเซียส เกิดการแยกชั้นที่ระยะเวลา 1 เดือน จึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อ

จากตารางที่ 136 ที่ระยะเวลา 3 เดือน

ที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ 3 เดือน กับ ที่เวลา 2 เดือน พบว่า สำหรับฤทธิ์ต่อ *S. sobrinus* ยังคงเดิม โดยค่า MIC ที่ 3 เดือน เท่ากับ ที่ 2 เดือน ทุกสูตร โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.78%v/v ทุกสูตร ยกเว้นสูตร 4%KLLO ซึ่งมีค่า MIC สูงกว่าสูตรอื่น 1 เท่าทั้งนี้ ฤทธิ์ต่อ *S. sobrinus* นี้จะดีกว่าต่อแบคทีเรียอีก 2 ชนิด ส่วนฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อ *S. mutans* พบว่าที่ 3 เดือน ทุกสูตรมีค่า MIC สูงขึ้นกว่าที่ 2 เดือน คือ ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียลดต่ำลง ยกเว้นสูตร 13% KLO ที่มีค่า MIC คงเดิม เท่ากับที่ 2 เดือน (0.78%v/v) และเท่ากับฤทธิ์ต่อ *S. sobrinus* ส่วนสูตร 8%KLLO และ 12%KLLO แม้ว่าจะมีค่า MIC สูงขึ้น แต่ค่า MIC เท่ากับ 0.78%v/v ซึ่งเป็นค่า MIC ที่เท่ากับของสูตร 13% KLO ต่อ *S. mutans* และทุกสูตรต่อ *S. sobrinus* สำหรับฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *L. casei* ทุกสูตรยังคงให้ค่า MIC ที่สูงกว่าแบคทีเรียอีก 2 ชนิด โดยที่ระยะเวลา 3 เดือนนี้ ค่า MIC เท่ากับ 12.5%v/v ทุกสูตร ทั้งนี้ ค่า MIC นี้เป็นค่า MIC เดิม (ที่ 2 เดือน) ของสูตร 6%KLO, 13%KLO และ 4%KLLO แต่เป็น ค่า MIC ที่สูงขึ้นของสูตร 10%KLO, 8%KLLO และ 12%KLLO

ที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ 3 เดือน กับ ที่เวลา 2 เดือน พบว่า สำหรับฤทธิ์ต่อ *S. sobrinus* เฉพาะสูตร 13% KLO และ 12%KLLO ที่ให้ค่า MIC (0.78%v/v ทั้ง 2 สูตร) เท่ากับที่ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 เดือน และเท่ากับค่า MIC เดิมที่ 30 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 2 เดือนด้วย ส่วนสูตรอื่นๆ มีทั้งที่ให้ค่า MIC ที่สูงขึ้น (10%KLO) และสูตรที่ให้ค่า MIC ที่ต่ำลง (6%KLO, 4%KLLO, 8%KLLO) ส่วนฤทธิ์ต่อ *S. mutans* พบว่าทุกสูตรให้ค่า MIC ที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 2 เดือน อย่างไรก็ดี สูตร 8%KLLO และ 12%KLLO ก็ยังให้ค่า MIC ที่ไม่สูง คือ เท่ากับ 0.78%v/v สำหรับผลต่อ *L. casei* เหมือนกับผลที่ 4 องศาเซลเซียส

ที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะเร่ง (ยกเว้นผลของ 13% KLO ที่มีการแยกชั้นตั้งแต่ที่ 1 เดือน) สำหรับฤทธิ์ต่อ *S. sobrinus* มีสูตรที่ให้ค่า MIC คงเดิม คือเท่ากับที่ 2 เดือน คือ สูตร 4% KLLO (3.125%v/v) และ 12%KLLO (0.78%v/v) ส่วนสูตรอื่นๆ มีทั้งที่ให้ค่า MIC ที่สูงขึ้น (10%KLO) และสูตรที่ให้ค่า MIC ที่ต่ำลง (6%KLO, 4%KLLO, 8%KLLO) ซึ่งสูตรที่มีค่า MIC สูงขึ้นและต่ำลงนี้ เป็นไปในลักษณะเดียวกับที่ 30 องศาเซลเซียส ส่วนฤทธิ์ต่อ *S. mutans* มีสูตรที่ให้ค่า MIC เท่ากับที่ 2 เดือน คือ สูตร 4%KLLO (3.125%v/v) และ 8%KLLO (0.78%v/v) ทั้งนี้ สูตรอื่นๆ (6%KLO, 10%KLO, 12%KLLO) ให้ค่า MIC ที่สูงขึ้น สำหรับฤทธิ์ต่อ *L. casei* ทุกสูตรมีค่า MIC ที่คงเดิม ยกเว้น 10%KLO ที่มีค่า MIC สูงขึ้น

ตารางที่ 137 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus sobrinus* ATCC 33402, *Lactobacillus casei* ATCC 36978 ที่ 4 เดือน

Spray	<i>S. mutans</i>		<i>S. sobrinus</i>		<i>L. casei</i>	
	ATCC 25175		ATCC 33402		ATCC 36978	
	Spray Dilution	MIC (%v/v)	Spray Dilution	MIC (%v/v)	Spray Dilution	MIC (%v/v)
6% KLO at 4°C	1/32	3.125	1/64	1.56	1/8	12.5
10% KLO at 4°C	1/64	1.56	1/128	0.78	1/8	12.5
13% KLO at 4°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/16	6.25
4% KLLO at 4°C	1/32	3.125	1/32	3.125	1/8	12.5
8% KLLO at 4°C	1/128	0.78	1/64	1.56	1/8	12.5
12% KLLO at 4°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/16	6.25
6% KLO at 30°C	1/32	3.125	1/32	3.125	1/8	12.5
10% KLO at 30°C	1/64	1.56	1/64	1.56	1/8	12.5
13% KLO at 30°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/8	12.5
4% KLLO at 30°C	1/32	3.125	1/32	3.125	1/8	12.5
8% KLLO at 30°C	1/64	1.56	1/64	1.56	1/8	12.5
12% KLLO at 30°C	1/128	0.78	1/128	0.78	1/16	6.25
6% KLO at 45°C	1/16	6.25	1/32	3.125	1/8	12.5
10% KLO at 45°C	1/64	1.56	1/64	1.56	1/8	12.5
4% KLLO at 45°C	1/32	3.125	1/32	3.125	1/8	12.5
8% KLLO at 45°C	1/64	1.56	1/64	1.56	1/8	12.5
12% KLLO at 45°C	1/128	0.78	1/64	1.56	1/16	6.25

KLO = น้ำมันมะกรูด, KLLO = น้ำมันใบมะกรูด,

13%KLO ที่ 45 องศาเซลเซียส เกิดการแยกชั้นที่ระยะเวลา 1 เดือน จึงไม่ได้ทำการศึกษาต่อ

จากตารางที่ 137 ที่ระยะเวลา 4 เดือน

ที่ 4 องศาเซลเซียส ค่า MIC ที่ 4 เดือน กับที่ 3 เดือน สำหรับฤทธิ์ต่อ *S. sobrinus* พบว่า สูตรที่ให้ค่า MIC คงเดิม (0.78%v/v) คือ 10%KLO, 13% KLO และ 12%KLLO ส่วนสูตรที่ให้ค่า MIC ที่สูงขึ้น 1 เท่า คือ 6%KLO, 4%KLLO และ 8%KLLO สำหรับฤทธิ์ต่อ *S. mutans* สูตรที่ให้ค่า MIC คงเดิม คือ ค่า MIC เท่ากับ 0.78%v/v ได้แก่สูตร 13% KLO, 8%KLLO, 12%KLLO และค่า MIC เท่ากับ 3.125%v/v ได้แก่สูตร 6%KLO, 4%KLLO ส่วนสูตร 10%KLO มีค่า MIC ต่ำลง 1 เท่า สำหรับฤทธิ์ต่อ *L. casei* ทุกสูตรมีค่า MIC ที่คงเดิม ยกเว้น 13%KLO และ 12%KLLO ที่มีค่า MIC ต่ำลง 1 เท่า

ที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านแบคทีเรียที่ 4 เดือน กับ ที่เวลา 3 เดือน พบว่า สำหรับฤทธิ์ต่อ *S. sobrinus* สูตรที่ยังคงให้ค่า MIC คงเดิม คือ ค่า MIC เท่ากับ 0.78%v/v ได้แก่ สูตร 10%KLO, 13% KLO และสูตรที่ให้ค่า MIC สูงขึ้น 1 เท่า คือ 6%KLO, 4%KLLO, 8%KLLO สำหรับฤทธิ์ต่อ *S. mutans* สูตรที่ยังคงให้ค่า MIC คงเดิม คือ ค่า MIC เท่ากับ 0.78%v/v ได้แก่ สูตร 13% KLO, 8%KLLO, 12%KLLO และค่า MIC เท่ากับ 3.125%v/v คือ สูตร 6%KLO, ส่วนสูตร 10%KLO มีค่า MIC ต่ำลง 1 เท่า สำหรับฤทธิ์ต่อ *L. casei* ทุกสูตรมีค่า MIC ที่คงเดิม ยกเว้น 12%KLLO ที่มีค่า MIC ต่ำลง 1 เท่า

ที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะเร่ง (ยกเว้นผลของ 13% KLO ที่มีการแยกชั้นตั้งแต่ที่ 1 เดือน) เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านแบคทีเรียที่ 4 เดือน กับ ที่เวลา 3 เดือน พบว่าสำหรับฤทธิ์ต่อ *S. sobrinus* สูตรที่มีค่า MIC คงเดิม คือ 10%KLO, 4%KLLO, 8%KLLO และสูตรที่มีค่า MIC เพิ่มขึ้น 1 เท่า คือ 6%KLO, 12%KLLO สำหรับฤทธิ์ต่อ *S. mutans* สูตรที่ยังคงให้ค่า MIC คงเดิม คือ 6%KLO, 4%KLLO, 12%KLLO และมีสูตรที่ให้ค่า MIC ลดลง 1 เท่า คือ 10%KLO ส่วนสูตรที่ให้ค่า MIC เพิ่มขึ้น 1 เท่า คือ 8%KLLO สำหรับฤทธิ์ต่อ *L. casei* ทุกสูตรมีค่า MIC ที่คงเดิม ยกเว้น 8%KLLO ที่มีค่า MIC เพิ่มขึ้น 1 เท่า

สรุปผลการศึกษาความคงตัว

โดยรวมผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดแสดงฤทธิ์ด้านแบคทีเรียที่ดีต่อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* แต่ฤทธิ์ด้านแบคทีเรียต่อ *L. casei* ไม่ดีเท่าแบคทีเรียสองชนิดข้างต้น และฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ต่อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* จะลดลงตามระยะเวลาการเก็บและอุณหภูมิที่เก็บรักษาผลิตภัณฑ์

อุณหภูมิการเก็บรักษา และอายุการเก็บ พบว่า สำหรับสูตรทั้ง 6 สูตร ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวดีที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 องศาเซลเซียส) นาน 2 เดือน โดย 5 สูตรให้ ค่า MIC ต่อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* เท่ากับ 0.39-0.78%v/v และ ค่า MIC ต่อ *S. sobrinus* เท่ากับ 0.78%v/v และอีก 1 สูตร คือ สูตร 4%KLLO ให้ค่า MIC ต่อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* เท่ากับ 1.56%v/v เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลา 4 เดือน สูตรที่ให้ค่า MIC ต่อทั้ง *S. mutans* และ *S. sobrinus* เท่ากับ 0.78%v/v มี 2 สูตร คือ สูตร 13% KLO และ 12%KLLO สูตรอื่นๆให้ค่า MIC ต่อ *S. mutans* และ *S. sobrinus* เท่ากับ 0.78-3.125%v/v เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวดีที่ 2 เดือน โดยให้ ค่า MIC ต่อ *S. mutans* เท่ากับ 0.39-1.56%v/v และค่า MIC ต่อ *S. sobrinus* เท่ากับ 0.78-3.125%v/v เมื่อพิจารณาที่

ระยะเวลา 4 เดือน คงเหลือเพียง สูตรที่ให้ ค่า MIC ต่อทั้ง *S. mutans* และ *S. sobrinus* เท่ากับ 0.78%v/v เพียง 2 สูตร คือ สูตร 13% KLO และ 12%KLLO เช่นเดียวกับที่ 4 องศาเซลเซียส ส่วนสูตรอื่นๆมีค่า MIC ต่อทั้ง *S. mutans* และ *S. sobrinus* เท่ากับ 1.56-3.125%v/v ดังนั้นจากผลการศึกษสูตรที่น่าจะพิจารณาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับป้องกันฟันผุต่อไป คือ สูตร 13% KLO และ 12%KLLO อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลการศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่ง ที่ 45 องศาเซลเซียส สูตร 13% KLO เกิดการแยกชั้นตั้งแต่ระยะเวลา 1 เดือน สำหรับสูตรที่เหลือ ที่ 1 และ 2 เดือน มีค่า MIC ต่อ *S. mutans* เท่ากับ 0.39-1.56%v/v และมี ค่า MIC ต่อ *S. sobrinus* เท่ากับ 0.78-3.125%v/v และที่ระยะเวลา 3 เดือน มีค่า MIC ต่อ *S. mutans* เท่ากับ 0.78-6.25%v/v และมี ค่า MIC ต่อ *S. sobrinus* เท่ากับ 0.78-3.125%v/v ส่วนที่ระยะเวลา 4 เดือน (ซึ่งประมาณการเท่ากับอายุการเก็บที่อุณหภูมิปกติ 24 เดือน) สูตร 12%KLLO ให้ค่า MIC ต่อ *S. mutans* และ ต่อ *S. sobrinus* เท่ากับ 0.78 และ 1.56 %v/v ตามลำดับ ส่วนสูตรอื่นๆ ให้ค่า 1.56-6.25%v/v และ 1.56-3.125%v/v ตามลำดับ

ดังนั้นแนวโน้ม คือ ประมาณการว่าอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากไม่ยาวถึง 2 ปี ที่อุณหภูมิปกติ และในระยะเวลา 4 เดือน ผลิตภัณฑ์ที่ยังคงแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ 2 สายพันธุ์ คือ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ได้ดี และเป็นสูตรที่ควรพิจารณานำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากเพื่อป้องกันฟันผุ คือ 10%KLO, 13%KLO (ต้องมีการแก้ปัญหการแยกชั้นก่อน), 8%KLLO และ 12%KLLO โดยสูตรที่มีแนวโน้มที่ดี คือ 10%KLO และ 12%KLLO

9.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ (Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains)

ทำการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธี Disk Diffusion method และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธี Microbroth Dilution method ต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ คือ Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247

ผลการวิจัย

--ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

จากการทดสอบตัวอย่าง capsule จีว 6 สูตรได้รับ ทั้งในรูปแบบ capsule และในรูปแบบ liquid form ก่อนบรรจุ และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก 6 สูตรได้รับ พบว่า

--การทดสอบโดยวิธี Disk Diffusion method ที่ 0 เดือน ไม่พบ Inhibition zone ในตัวอย่างทั้งหมด

--การทดสอบโดยวิธี Microbroth Dilution method ของตัวอย่างสูตรน้ำมันที่บรรจุใน capsule จีว 6 สูตร, ผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่ 0 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 138

--การทดสอบโดยวิธี Microbroth Dilution method ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่ 1, 2, 6 และ 14 เดือน ได้ผลดังในตารางที่ 139-142 ตามลำดับ

ตารางที่ 138 ค่า MIC และ MBC ของสูตรน้ำมันที่บรรจุใน capsule จีว 6 สูตร, ผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่ 0 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method

Samples	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
N112	32	>32	32	>32	>32	>32	0.5	1
N113	32	>32	32	>32	>32	>32	1	2
N129	32	>32	32	>32	>32	>32	1	2
M16	32	>32	32	32	>32	>32	0.125	0.125
M17	32	32	8	8	>32	>32	0.25	0.25
M18	32	32	8	8	>32	>32	0.25	0.25
Capsule, N112	32	>32	32	>32	>32	>32	2	4
Capsule, N113	32	>32	32	>32	>32	>32	2	4
Capsule, N129	32	>32	32	>32	>32	>32	1	2
Capsule, M16	32	>32	32	>32	>32	>32	2	4
Capsule, M17	32	>32	32	>32	>32	>32	2	2
Capsule, M18	32	>32	8	8	>32	>32	1	2

N112= 5%KLO, N113= 5%KLO, N129= 10%KLO
M16= 5%KLLO, M17= 5%KLLO, M18= 5%KLLO
Concentration of μl of oil/ 100 μl of broth.

ตารางที่ 139 ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ 1 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method

Samples	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Capsule, N112 at 4 °C	32	>32	32	>32	>32	>32	2	2
Capsule, N113 at 4 °C	32	>32	32	>32	>32	>32	1	1
Capsule, N129 at 4 °C	32	>32	32	>32	>32	>32	1	1
Capsule, M16 at 4 °C	32	>32	32	>32	>32	>32	1	1
Capsule, M17 at 4 °C	32	>32	>32	>32	>32	>32	2	2
Capsule, M18 at 4 °C	32	>32	8	8	>32	>32	2	2
Capsule, N112 at 30°C	32	>32	>32	>32	>32	>32	2	4
Capsule, N113 at 30°C	8	>32	>32	>32	>32	>32	2	2
Capsule, N129 at 30°C	32	>32	32	>32	>32	>32	1	1
Capsule, M16 at 30°C	32	>32	32	>32	>32	>32	2	2
Capsule, M17 at 30°C	32	>32	>32	>32	>32	>32	2	2
Capsule, M18 at 30°C	16	16	16	16	>32	>32	0.5	0.5

N112= 5%KLO, N113= 5%KLO, N129= 10%KLO;

M16= 5%KLLO, M17= 5%KLLO, M18= 5%KLLO

* Concentration of µl of oil/ 100 µl of broth.

ตารางที่ 140 ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ 2 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method

Samples	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	
	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*
Capsule, N112 at 4 °C	32	32	>32	>32	>32	>32	8	8
Capsule, N113 at 4 °C	>32	>32	>32	>32	>32	>32	4	4
Capsule, N129 at 4 °C	>32	>32	>32	>32	>32	>32	8	8
Capsule, M16 at 4 °C	>32	>32	>32	>32	>32	>32	2	2
Capsule, M17 at 4 °C	>32	>32	>32	>32	>32	>32	4	4
Capsule, M18 at 4 °C	>32	>32	16	16	>32	>32	4	4
Capsule, N112 at 30°C	>32	>32	16	>32	>32	>32	8	8
Capsule, N113 at 30°C	>32	>32	16	>32	>32	>32	4	4
Capsule, N129 at 30°C	>32	>32	16	>32	>32	>32	4	4
Capsule, M16 at 30°C	>32	>32	16	16	>32	>32	4	4
Capsule, M17 at 30°C	>32	>32	16	16	>32	>32	2	4
Capsule, M18 at 30°C	>32	>32	16	16	>32	>32	2	2

N112= 5%KLO, N113= 5%KLO, N129= 10%KLO

M16= 5%KLLO, M17= 5%KLLO, M18= 5%KLLO

* Concentration of µl of oil/ 100 µl of broth.

ตารางที่ 141 ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ 6 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method

Samples	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Capsule, N112 at 4 °C	>32	>32	8	>32	>32	>32	>16	>16
Capsule, N113 at 4 °C	>32	>32	16	>32	>32	>32	>16	>16
Capsule, N129 at 4 °C	32	>32	32	>32	>32	>32	4	4
Capsule, M16 at 4 °C	>32	>32	32	>32	>32	>32	0.5	1
Capsule, M17 at 4 °C	>32	>32	32	>32	>32	>32	1	1
Capsule, M18 at 4 °C	>32	>32	8	>32	>32	>32	1	1
Capsule, N112 at 30 °C	32	>32	32	32	>32	>32	8	>16
Capsule, N113 at 30 °C	32	>32	16	>32	>32	>32	8	>16
Capsule, N129 at 30 °C	32	>32	16	>32	>32	>32	4	16
Capsule, M16 at 30 °C	32	>32	16	>32	>32	>32	4	4
Capsule, M17 at 30 °C	32	32	16	16	>32	>32	4	4
Capsule, M18 at 30 °C	32	32	8	16	>32	>32	2	4

N112= 5%KLO, N113= 5%KLO, N129= 10%KLO
M16= 5%KLLO, M17= 5%KLLO, M18= 5%KLLO

* Concentration of μl of oil/ 100 μl of broth.

ตารางที่ 142 ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว 6 สูตร ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ 14 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method

Samples	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Capsule, N112 at 4 °C	>32	>32	32	>32	>32	>32	32	32
Capsule, N113 at 4 °C	>32	>32	32	>32	>32	>32	32	32
Capsule, N129 at 4 °C	>32	>32	>32	>32	>32	>32	8	8
Capsule, M16 at 4 °C	>32	>32	>32	>32	>32	>32	8	8
Capsule, M17 at 4 °C	>32	>32	>32	>32	>32	>32	16	16
Capsule, M18 at 4 °C	>32	>32	32	>32	>32	>32	32	32
Capsule, N112 at 30 °C	>32	>32	>32	>32	>32	>32	32	32
Capsule, N113 at 30 °C	>32	>32	>32	>32	>32	>32	32	32
Capsule, N129 at 30 °C	>32	>32	>32	>32	>32	>32	32	32
Capsule, M16 at 30 °C	>32	>32	>32	>32	>32	>32	16	32
Capsule, M17 at 30 °C	>32	>32	32	>32	>32	>32	32	32
Capsule, M18 at 30 °C	>32	>32	32	>32	>32	>32	32	32

N112= 5%KLO, N113= 5%KLO, N129= 10%KLO

M16= 5%KLLO, M17= 5%KLLO, M18= 5%KLLO

* Concentration of μ l of oil/ 100 μ l of broth.

ผลิตภัณฑ์ capsule จีว ที่ 0 เดือน ผลิตภัณฑ์แสดงฤทธิ์ที่ไม่แรงในการทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียใน Gr. A streptococci (MIC = 32%v/v, MBC = >32%v/v), *S. pneumoniae* (MIC = 8-32%v/v, MBC = 8- >32%v/v), และ *S. aureus* (MIC, MBC = >32%v/v) แต่แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อที่ดีกว่าต่อ *H. influenzae* (MIC = 1-2%v/v, MBC = 2-4%v/v) โดยที่ liquid form (MIC = 0.125-1%v/v, MBC = 0.125-2%v/v) จะแสดงฤทธิ์ที่แรงกว่าในรูปcapsule ส่วนที่ 1, 2 เดือน พบว่า ฤทธิ์ลดต่ำสำหรับเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิดแรก แต่ฤทธิ์ต่อ *H. influenzae* ยังคงลดไม่มาก

เนื่องจากการหลอมละลายของเปลือก capsule จีว ที่ 45 องศาเซลเซียส จึงได้ทำการปรับเปลี่ยนการทดสอบความคงตัวของ 3 และ 4 เดือน เป็น 6 และ 12 เดือน แทน โดยยกเลิกการทดสอบความคงตัวของ 45 องศาเซลเซียสและคงไว้เฉพาะที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียสแทน

จากตารางที่ 139 พบว่า ที่ระยะเวลา 6 เดือน ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกูดยังคงให้ผลยับยั้งต่อ *H. influenzae* ATCC 49247 (MIC = 4 - >16%v/v, MBC = 4 - >16%v/v) ดีกว่าต่อ Gr. A streptococci, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ส่วนผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกูด M16,M17,M18 ยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดีต่อ *H. influenzae* ATCC 49247 ทั้งที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส โดยค่า MIC = 0.5-1%v/v & MBC = 1%v/v และ MIC = 2-4%v/v & MBC = 4%v/v ตามลำดับ

สำหรับ ที่ 12 เดือน มีการคลาดเคลื่อนในการเก็บตัวอย่าง และปัญหาอุปสรรคที่ไม่ได้คาดคิด จึงมีการชะลอการทดสอบตัวอย่างไปเป็น ที่ 14 เดือนแทน พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งต่อ *H. influenzae* ลดลงกว่าเมื่อ 6 เดือนมาก คงเหลือเพียง ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด N129 ที่ 4 องศาเซลเซียส และ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด M16, M17 ที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งยังคงให้ค่า MIC & MBC เท่ากับ 8, 8 และ 16 ตามลำดับ

ในภาพรวมโดยสรุปเมื่อพิจารณาผลการทดลองที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด คือ ผลิตภัณฑ์ capsule จีว น่าจะมีปัญหาในส่วนของความคงตัว ในช่วงกระบวนการผลิต capsule ซึ่งต้องมีการใช้ความร้อนในการหลอมละลายแผ่น gelatin ที่ใช้ในการก่อรูปเปลือก capsule และ/หรือในช่วงเวลาการอบบรรจุ เนื่องจากปริมาณสารสำคัญที่ใช้เป็น markers ใน capsule ลดต่ำลงจาก 100% ลงเหลือเพียงประมาณ 15% ของรูป liquid form ส่วนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ (ยกเว้นที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งมีการหลอมละลายของเปลือก capsule) ในระยะเวลา 2 เดือน พบว่าไม่มีผลต่อความคงตัวเนื่องจากปริมาณสารสำคัญยังคงที่ การที่ปริมาณสารสำคัญลดลงโดย คาดว่าเนื่องมาจากการสลายตัวด้วยความร้อนน่าจะเป็นสาเหตุทำให้การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Gr.A Streptococci และ standard strains 3 strains มีค่า MIC ที่สูง แสดง ถึงฤทธิ์ยับยั้งที่ต่ำสอดคล้องกับปริมาณสารสำคัญที่ลดลง ยกเว้นฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรีย *H. influenzae* ซึ่งมี ค่า MIC ที่ต่ำยอมรับได้ ยังแสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดี โดยที่ระยะเวลา 6 เดือน ก็ยังคงให้ผลที่ดี ส่วนที่ 14 เดือน โดยส่วนใหญ่ฤทธิ์ลดลง อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ capsule จีวน่าจะอยู่ที่ประมาณ 6 เดือน ทั้งที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ต้องรอการยืนยันจากการทดลองบรรจุ capsule ซ้ำใน lot ที่ 2 ต่อไป

--ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

จากการทดสอบ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก 6 สูตรได้รับ พบว่า

--การทดสอบโดยวิธี Disk Diffusion method ที่ 0 เดือน ไม่พบ Inhibition zone ในตัวอย่างทั้งหมด

--การทดสอบโดยวิธี Microbroth Dilution method ของตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก 6 สูตร ที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน ได้ผลดังในตารางที่ 143-147 ตามลำดับ

ตารางที่ 143 ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ที่ 0 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method

Samples	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
6%KLO	4	4	2	2	16	16	0.5	1
10%KLO	4	4	1	1	16	16	0.5	0.5
13%KLO	4	4	1	1	8	16	0.25	0.25
4%KLLO	8	8	4	4	8	8	0.5	0.5
8%KLLO	4	4	0.5	0.5	8	8	0.25	0.5
12%KLLO	4	4	0.25	0.25	8	8	1	0.5

Concentration of μ l of oil/ 100 μ l of broth.

ตารางที่ 144 ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ที่ 4, 30, และ 45 องศาเซลเซียส ที่ 1 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method

Samples	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
6%KLO at 4 °C	8	8	2	2	8	8	0.5	0.5
10%KLO at 4 °C	8	8	2	2	8	16	0.25	0.25
4%KLLO at 4 °C	8	8	2	2	8	32	0.125	0.5
8%KLLO at 4 °C	8	8	1	1	8	8	0.25	0.25
12%KLLO at 4 °C	8	8	1	1	8	8	0.25	0.25
6%KLO at 30 °C	8	8	2	2	8	8	0.25	0.25
10%KLO at 30 °C	8	8	1	1	8	8	0.125	0.125
13%KLO at 30 °C	8	8	2	2	8	16	0.25	0.25
4%KLLO at 30 °C	8	8	4	4	8	8	0.25	0.5
8%KLLO at 30 °C	8	8	1	1	8	8	0.125	0.5
12%KLLO at 30 °C	8	8	1	1	8	8	0.125	0.25
6%KLO at 45 °C	8	8	2	2	8	8	0.25	0.25
10%KLO at 45 °C	8	8	2	2	8	8	0.25	0.25
4%KLLO at 45 °C	8	8	4	4	8	16	0.5	0.5
8%KLLO at 45 °C	8	8	0.5	0.5	8	8	0.25	0.25

Concentration of μ l of oil/ 100 μ l of broth.

ตารางที่ 145 ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ที่ 4, 30, และ 45 องศาเซลเซียส ที่ 2 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method

Samples	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
6%KLO at 4 °C	2	8	1	1	8	16	0.25	0.25
10%KLO at 4 °C	2	2	0.5	0.5	8	16	1	1
13%KLO at 4 °C	2	16	0.25	0.5	8	32	0.25	0.5
4%KLLO at 4 °C	2	8	1	1	8	16	0.25	0.25
8%KLLO at 4 °C	2	2	1	1	8	16	1	1
12%KLLO at 4 °C	2	2	0.5	0.5	4	8	0.06	0.25
6%KLO at 30 °C	8	8	2	2	8	16	0.5	1
10%KLO at 30 °C	2	2	1	2	4	16	0.5	0.5
13%KLO at 30 °C	8	8	1	4	16	32	0.25	0.5
4%KLLO at 30 °C	2	2	1	1	8	8	0.5	1
8%KLLO at 30 °C	4	4	1	1	16	32	0.5	0.5
12%KLLO at 30 °C	2	2	1	1	4	16	0.25	0.5
6%KLO at 45 °C	8	8	1	2	16	32	1	1
10%KLO at 45 °C	2	2	0.5	1	16	16	0.5	0.5
4%KLLO at 45 °C	2	2	2	2	8	16	0.5	1
8%KLLO at 45 °C	2	2	2	2	8	8	0.5	0.5
12%KLLO at 45 °C	2	2	0.5	0.5	8	8	0.25	0.5

Concentration of µl of oil/ 100 µl of broth.

ตารางที่ 146 ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ที่ 4, 30, และ 45 องศาเซลเซียส ที่ 3 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method

Samples	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
6%KLO at 4 °C	2	4	0.5	2	8	8	0.5	0.5
10%KLO at 4 °C	2	2	0.25	0.5	4	8	0.25	0.25
13%KLO at 4 °C	2	2	0.5	1	4	32	0.25	0.25
4%KLLO at 4 °C	2	8	1	1	4	8	0.5	0.5
8%KLLO at 4 °C	2	2	0.25	0.25	4	32	0.5	0.5
12%KLLO at 4 °C	2	2	0.5	0.5	4	16	0.125	0.125
6%KLO at 30 °C	2	2	1	2	8	8	0.25	0.25
10%KLO at 30 °C	2	2	0.5	2	4	16	0.25	0.25
13%KLO at 30 °C	4	4	1	1	16	32	0.125	0.125
4%KLLO at 30 °C	2	2	0.5	1	8	8	0.25	0.25
8%KLLO at 30 °C	4	2	0.5	1	16	32	0.25	0.25
12%KLLO at 30 °C	2	2	0.5	1	4	16	0.125	0.125
6%KLO at 45 °C	8	8	0.5	0.5	16	32	0.5	1
10%KLO at 45 °C	8	4	0.5	0.5	16	16	0.5	1
4%KLLO at 45 °C	4	2	0.5	1	8	16	0.5	1
8%KLLO at 45 °C	4	2	1	0.5	8	8	0.5	0.5
12%KLLO at 45 °C	2	2	0.5	0.5	8	8	0.25	0.5

Concentration of µl of samples/ 100 µl of broth.

ตารางที่ 147 ค่า MIC และ MBC ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ที่ 4, 30, และ 45 องศาเซลเซียส ที่ 4 เดือน โดยวิธี Microbroth Dilution method

Samples	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
6%KLO at 4 °C	2	4	2	2	4	4	0.5	1
10%KLO at 4 °C	4	4	0.25	0.5	4	16	0.25	0.5
13%KLO at 4 °C	2	2	1	1	4	32	0.25	0.5
4%KLLO at 4 °C	4	4	1	1	4	8	0.5	1
8%KLLO at 4 °C	4	4	1	1	4	16	0.5	0.5
12%KLLO at 4 °C	2	2	0.25	0.25	4	4	0.25	0.25
6%KLO at 30 °C	2	2	2	4	4	4	0.5	1
10%KLO at 30 °C	2	4	0.5	0.5	4	8	0.5	0.5
13%KLO at 30 °C	4	4	0.5	1	4	32	0.25	0.25
4%KLLO at 30 °C	2	2	1	1	4	8	0.25	0.25
8%KLLO at 30 °C	4	2	0.25	0.25	4	8	0.25	0.25
12%KLLO at 30 °C	2	2	0.5	0.5	4	4	0.125	0.25
6%KLO at 45 °C	4	4	0.5	2	8	8	0.5	1
10%KLO at 45 °C	4	4	0.5	0.5	8	32	0.5	1
4%KLLO at 45 °C	4	4	1	1	16	16	0.25	0.5
8%KLLO at 45 °C	4	2	0.25	0.25	8	16	0.25	0.25
12%KLLO at 45 °C	2	2	0.25	0.25	4	8	0.25	0.25

Concentration of μ l of samples/ 100 μ l of broth.

ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก แสดงฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้แรงกว่า ผลิตภัณฑ์ capsule จีวมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ต่อเชื้อ *H. influenzae* (MIC, MBC = 0.25-1%v/v) ส่วนที่ 1, 2 เดือน พบว่ายังคงมีฤทธิ์ในช่วงที่ดีทั้งสามอุณหภูมิ (MIC, MBC = 0.125-0.5%v/v และ 0.25-1%v/v ที่ 1, 2 เดือน ตามลำดับ)

จากตารางที่ 146 และ 147 ซึ่งเป็นผลการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจาก น้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด จำนวน 6 สูตร ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส สำหรับที่ 45 องศาเซลเซียส สูตร 13%KLO มีการแยกชั้น ที่ 1 เดือนจึงไม่ได้ทำการทดสอบที่ระยะเวลา 1 และ 2 เดือน แต่ ที่ระยะเวลา 3, 4 เดือน พบว่า สูตร 13%KLO มีเพียงบางตัวอย่างเท่านั้นที่มีการแยกชั้น โดยส่วนใหญ่ ของสูตร 13%KLO ยังคงสภาพที่ดี ไม่มีการแยกชั้นเหมือนตัวอย่างที่นำไปทดสอบเมื่อครบเวลา 1 เดือน จึงได้ดำเนินการทดสอบตัวอย่าง 13%KLO ที่ระยะเวลาที่เหลือ คือ 3 และ 4 เดือน ต่อไป เมื่อพิจารณาใน ส่วนของฤทธิ์การด้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอหรือไอ พบว่าผลิตภัณฑ์ทั้ง 6 สูตร มีความคงตัวค่อนข้างดีตลอดระยะเวลา 4 เดือน ที่ทุกอุณหภูมิ โดยให้ผลดีที่สุด (ค่า MIC และ MBC ต่ำ ที่สุด) ต่อ *H. influenzae* ATCC 49247 ทั้งนี้สามารถเรียงค่า MIC และ MBC จากน้อยไปมากได้ดังนี้

H. influenzae ATCC 49247, *S. pneumoniae* ATCC 49619, Group A Streptococci, *S. aureus* ATCC 29213 อาจสรุปช่วงค่า MIC และ MBC ได้ดังในตารางที่ 148

ตารางที่ 148 สรุปผลการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันไอบะกรูด จำนวน 6 สูตร ที่อุณหภูมิ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, และ 4 เดือน เป็นช่วงค่า MIC และ MBC ต่อ Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247

Samples	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619		<i>S. aureus</i> ATCC 29213		<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Kaffir lime oil spray formulae								
6%KLO, 10%KLO, 13%KLO, 0 month	4 - 8	4 - 8	0.25 - 4	0.25 - 4	8 - 16	8 - 16	0.25 - 1	0.25 - 1
6%KLO, 10%KLO, 13%KLO, at 4 °C, 4 months	2 - 4	2 - 4	0.25 - 2	0.5 - 2	4	4 - 32	0.25 - 0.5	0.5 - 1
6%KLO, 10%KLO, 13%KLO, at 30 °C, 4 months	2 - 4	2 - 4	0.5 - 2	0.5 - 4	4	4 - 32	0.25 - 0.5	0.25 - 1
6%KLO, 10%KLO, at 45 °C, 4 months	4	4	0.5	0.5 - 2	8	8 - 32	0.5	1
Kaffir lime leaf oil spray formulae								
4%KLLO, 8%KLLO, 12%KLLO, 0 month	4 - 8	4 - 8	0.25 - 4	0.25 - 4	8	8	0.25 - 1	0.5
4%KLLO, 8%KLLO, 12%KLLO, at 4 °C, 4 months	2 - 4	2 - 4	0.25 - 1	0.25 - 1	4	4 - 16	0.25 - 0.5	0.25 - 1
4%KLLO, 8%KLLO, 12%KLLO, at 30 °C, 4 months	2 - 4	2	0.25 - 1	0.25 - 1	4	4 - 8	0.25	0.25
4%KLLO, 8%KLLO, 12%KLLO, at 45 °C, 4 months	2 - 4	2 - 4	0.25 - 1	0.25 - 1	4 - 16	8 - 16	0.25	0.25 - 0.5

Concentration of µl of samples/ 100 µl of broth.

โดยภาพรวม ผลผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้น่าจะมีแนวโน้มในการใช้งานได้ดีกว่าผลิตภัณฑ์ capsule ที่ได้ทดสอบไปแล้ว ผลผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากมีความคงตัวดีกว่าผลิตภัณฑ์ capsule จีว ในกระบวนการผลิตไม่มีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้ปัจจัยที่จะมีผลต่อการสลายตัวของสารสำคัญ มีน้อยกว่ากระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ capsule จีว แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในส่วนนี้มีปัญหาในการวิเคราะห์เนื่องจากต้องทำการทดลองสกัดสารสำคัญจากผลิตภัณฑ์ก่อนการวิเคราะห์ จึงมีความล่าช้าทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญในช่วงเวลาและที่อุณหภูมิต่างๆ เพื่อเชื่อมโยงกับผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้ มีเพียงปัญหาความคงตัวของกายภาพของสูตร 13%KLO ซึ่งมีการแยกชั้นที่ 45 องศาเซลเซียส ในบางตัวอย่าง สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ ให้ค่า MIC และ MBC ที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อ Gr.A Streptococci และ standard strains อีก 3 strains โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ต่อ *H. influenzae* ความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในส่วนของการฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียค่อนข้างดีในช่วงระยะเวลา 4 เดือน ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะเร่ง ผลผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากน่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมในการพัฒนาในทางการค้าต่อไปเมื่อพิจารณาในด้านกระบวนการผลิต ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และความคงตัว

10. การทดสอบผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย

10.1 การทดสอบผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S.mutans* ที่แยกได้จากผู้ป่วย

ทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกูด (สูตร N112, N113, N129) และน้ำมันใบมะกูด (สูตร M16, M17, M18) นวนรวม 6 สูตร โดยการเตรียมตัวอย่างของเหลวจาก capsule จีว (สูตรน้ำมันที่บรรจุใน capsule) เช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ หลังจากนั้นจึงเจือจางตัวอย่างของเหลวเป็นความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%v/v สำหรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูด (สูตร 6%KLO, 10%KLO, 13%KLO) และน้ำมันใบมะกูด (สูตร 4%KLLO, 8%KLLO, 12%KLLO) จำนวนรวม 6 สูตร โดยทำการทดสอบถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S.mutans* ที่แยกได้จากผู้ป่วย (clinical isolates) จำนวน 14 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Microbroth dilution method เช่นเดียวกับที่ใช้ทดสอบน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด

ผลการวิจัย

--ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด

จากการทดสอบผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด จำนวน 6 สูตร ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกูด สูตร N112, N113, N129 และผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกูด สูตร M16, M17, M18 ถึงฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. mutans* 14 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วย (clinical isolates) พบว่า ตัวอย่างสูตรน้ำมันที่ได้จาก capsule จีว ให้ผลการต้านแบคทีเรียที่อ่อนมาก เชื้อแบคทีเรียยังคงเจริญได้ที่ความเข้มข้นของตัวอย่างสูตรน้ำมันที่ 5-70%v/v โดยที่ส่วนใหญ่แสดงฤทธิ์

ยับยั้งแบคทีเรียที่ความเข้มข้นสูงถึง 80-90%v/v รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 149 ผลผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันไบมะกูด ที่ทำการทดสอบนี้น่าจะเกิดการสูญเสียของสารสำคัญออกฤทธิ์ในช่วงกระบวนการบรรจุ capsule ซึ่งมีการใช้ความร้อนร่วมด้วย ทำให้ไม่มีฤทธิ์แรงพอที่จะใช้ประโยชน์ ควรรอการทดสอบในผลิตภัณฑ์ที่จะทำการบรรจุใหม่ในครั้งต่อไป

ตารางที่ 149 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันไบมะกูด ต่อ เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* 14 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วย (clinical isolates)

Clinical isolates	ปริมาณความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (%v/v)					
	N112	N113	N129	M16	M17	M18
No. 6	90	90	80	90	90	90
No. 7	90	90	80	90	90	90
No. 8	90	90	80	90	90	90
No. 9	90	80	90	90	90	90
No. 10	90	90	90	80	90	90
No. 13	90	90	80	90	90	90
No. 14	90	90	80	90	90	90
No. 15	90	90	80	90	90	90
No. 16 *	90	90	80	90	90	90
No. 16 **	90	90	80	90	90	90
No. 18	90	90	90	90	90	90
No. 19	90	90	90	90	90	90
No. 20	90	90	80	90	90	90
No. 21	90	90	80	90	90	90

* = แดก, ** = หนอง

--ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันไบมะกูด

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันไบมะกูด จำนวน 6 สูตร ต่อ เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* 14 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วย (clinical isolates) ได้ผลดังในตารางที่ 150

ตารางที่ 150ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์ชนิดลิ้นฟันในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ต่อ เชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* 14 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วย (clinical isolates)

Clinical isolates	6%KLO		10%KLO		13%KLO		4%KLLO		8%KLLO		12%KLLO	
	Dilution	MIC (%v/v)	Dilution	MIC (%v/v)	Dilution	MIC (%v/v)	Dilution	MIC (%v/v)	Dilution	MIC (%v/v)	Dilution	MIC (%v/v)
No. 6	1/16	6.25	1/32	3.125	1/64	1.56	1/32	3.125	1/64	1.56	1/128	0.78
No. 7	1/16	6.25	1/16	6.25	1/32	3.125	1/32	3.125	1/32	3.125	1/64	1.56
No. 8	1/16	6.25	1/16	6.25	1/64	1.56	1/32	3.125	1/64	1.56	1/128	0.78
No. 9	1/16	6.25	1/16	6.25	1/32	3.125	1/32	3.125	1/64	1.56	1/128	0.78
No. 10	1/16	6.25	1/32	3.125	1/32	3.125	1/32	3.125	1/64	1.56	1/128	0.78
No. 13	1/16	6.25	1/32	3.125	1/32	3.125	1/32	3.125	1/64	1.56	1/128	0.78
No. 14	1/16	6.25	1/16	6.25	1/32	3.125	1/32	3.125	1/64	1.56	1/128	0.78
No. 15	1/64	1.56	1/64	1.56	1/128	0.78	1/64	1.56	1/128	0.78	1/256	0.39
No. 16 *	1/16	6.25	1/16	6.25	1/32	3.125	1/32	3.125	1/32	3.125	1/128	0.78
No.16 **	1/64	1.56	1/128	0.78	1/128	0.78	1/32	3.125	1/64	1.56	1/128	0.78
No. 18	1/32	3.125	1/32	3.125	1/32	3.125	1/32	3.125	1/64	1.56	1/128	0.78
No. 19	1/16	6.25	1/32	3.125	1/32	3.125	1/32	3.125	1/64	1.56	1/128	0.78
No. 20	1/16	6.25	1/16	6.25	1/32	3.125	1/32	3.125	1/64	1.56	1/128	0.78
No. 21	1/16	6.25	1/16	6.25	1/32	3.125	1/32	3.125	1/64	1.56	1/128	0.78

* = แดง, ** = หนอง

จากตารางที่ 150 พบว่า สูตรต่างๆมีช่วงค่า MIC เรียงลำดับจากน้อยไปมาก (ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียมากไปน้อย) ดังนี้ คือ 12%KLLO (ค่า MIC = 0.39-1.56%v/v, ส่วนใหญ่ มีค่า MIC = 0.78%v/v), 8%KLLO (ค่า MIC = 0.78-3.125%v/v, ส่วนใหญ่ มีค่า MIC = 1.56%v/v), 13%KLO (ค่า MIC = 0.78-3.125%v/v, ส่วนใหญ่ มีค่า MIC = 3.125%v/v), 4%KLLO (ค่า MIC = 1.56-3.125%v/v, ส่วนใหญ่ มีค่า MIC = 3.125%v/v), 10%KLO (ค่า MIC = 0.78-6.25%v/v), 6%KLO (ค่า MIC = 1.56-6.25%v/v, ส่วนใหญ่ มีค่า MIC = 6.25%v/v)

โดยสรุป ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *S.mutans* จากผู้ป่วย ดังนั้นจึงมีแนวโน้มที่ดีที่จะมีการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ป้องกันฟันผุต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สูตร 12%KLLO

10.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย

ทำการทดสอบ Liquid form (N113, M18), ผลิตภัณฑ์ capsule จีว (N113,M18), และ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูด (10%KLO) และน้ำมันใบมะกูด (12%KLLO) ถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยวิธีเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบใน clinical isolates ของ Gr.A Streptococci และ standard strains 3 strains คือ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 ที่ได้ดำเนินการไปในช่วงแรก

ผลการวิจัย

จากการทดสอบการทดสอบ Liquid form (N113, M18), ผลิตภัณฑ์ capsule จีว (N113,M18), และ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูด (10%KLO) และน้ำมันใบมะกูด (12%KLLO) ถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าได้ผลดังใน ตารางที่ 151

ตารางที่ 151 ผลการทดสอบ Liquid form (N113, M18), ผลิตภัณฑ์ capsule จีว (N113,M18), และ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO)และน้ำมัน
ใบมะกรูด (12%KLLO) ถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย

Group A Streptococci clinical isolates	Liquid form N113		Liquid form M18		Capsule N113		Capsule M18		10%KLO		12%KLLO	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
No.2	>32	>32	32	32	>32	>32	32	>32	1	1	0.5	0.5
No.6	32	>32	32	>32	16	16	32	>32	2	2	1	1
No.9	32	32	32	32	16	16	32	32	0.5	0.5	0.25	0.25
No.13	32	32	32	32	16	16	16	16	0.5	0.5	0.25	0.25
No.15	16	16	16	16	32	32	16	16	1	1	0.5	1

จากตารางที่ 151 จะเห็นได้ว่า ผลผลิตพันธุ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO) และ น้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO) แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอหรือไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย ที่ดีกว่า Liquid form (N113, M18), ผลผลิตพันธุ์ capsule จีว (N113,M18), โดยมีค่า MIC&MBC ของ 10%KLO และ 12%KLLO เท่ากับ 0.5-2%v/v และ 0.25-1%v/v ตามลำดับ สำหรับ Liquid form (N113, M18) และ ผลผลิตพันธุ์ capsule จีว (N113,M18) โดยรวม มีค่า MIC และ MBC ที่สูงกว่า ผลผลิตพันธุ์ ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดมาก ผลการยับยั้งใน clinical isolates จำนวน 5 ตัวอย่างนี้ ให้ผลสอดคล้องกับผลการทดสอบที่ได้ดำเนินการใน clinical isolates ของ Gr.A Streptococci ในขั้นตอนก่อนหน้านี้ รวมทั้งผลการทดสอบใน standard strains 3 strains คือ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247

โดยสรุป ผลผลิตพันธุ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด มีแนวโน้มที่ดีในการนำไปพัฒนาและศึกษาในทางคลินิก เพื่อใช้ประโยชน์จริงในผู้ป่วยต่อไป

11. การทดสอบผลผลิตพันธุ์ชนิดฉีดพ่นในปากและสูตรตำรับน้ำมันสำหรับบรรจุใน capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ

11.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้ในการวิจัย คือ *S. mutans* ATCC 25175 *S. sobrinus* ATCC 6715 และ *A. viscosus* ATCC 1587 โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นกึ่งแข็งและเหลว (Brain Heart Infusion, Difco, U.S.A.) สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อเหล่านี้ คือ ในตู้อบ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ร้อยละ 5 เพาะเลี้ยงเชื้อจากเชื้อตัวอย่างที่แช่แข็งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส โดยนำมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นกึ่งแข็ง (BHI) นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีมาประมาณ 3 ถึง 5 โคโลนี ผสม (suspend) โคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (TH, Todd-Hewitt, Difco, U.S.A.) อบในสภาวะเดิม นาน 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาสาสมัคร (clinical isolates) นั้น เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นกึ่งแข็ง MS (Mitis-Salivarius) ที่มียาปฏิชีวนะ แบซิทรากซิน (bacitracin) 0.2 U/ml และโปตัสเซียม เทลลูไรท์ (potassium tellurite) 0.001%v/v เลือกโคโลนีที่คาดว่าจะ เป็น *S. mutans* มา 10 โคโลนีจากเด็กแต่ละคน แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (BHI) อบในสภาวะเดิม นาน 48 ชั่วโมง หรือในโถสำหรับเลี้ยงเชื้อที่ไม่ชอบออกซิเจน (anaerobic jar) ต่อมาทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 280 ตัวอย่าง โดยวิธีการสกัดที่ใช้เป็นแบบพื้นฐานแบบดัดแปลงเล็กน้อยตาม Saarela, Welsch และ Mc Clelland ดังรายละเอียดคร่าวๆ ดังนี้ ล้างเซลล์และให้ความร้อนจนเดือด นาน 10 นาที โดยใช้ TE buffer (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) โดยเศษ (debris) ที่เหลือนำไปเตรียมในรูปเพลเลต (pellet) และส่วนใสนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งานต่อไป

11.2. การเก็บตัวอย่างน้ำลายจากอาสาสมัครและวิธีการเคลือบน้ำลายบน 96-well polystyrene plate

ให้อาสาสมัครจำนวน 4 ถึง 6 คน ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีโรคประจำตัวใดๆ จดเว้นการทำความสะอาดฟันนานกว่า 6 ชั่วโมง เลี้ยวพาราฟินแล้วบ้วนน้ำลายออกมา จากนั้นนำน้ำลายจากทุกคนมารวมในสัดส่วนที่เท่ากัน (pooled saliva) แล้วกรอง ต่อมาทำการเจือจาง pooled saliva ในอัตราส่วน 1:10 เสร็จแล้วใส่น้ำลายที่เจือจางแล้วในทุกหลุมของ polystyrene plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร (μl) อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเทน้ำลายออกให้หมดก็จะได้ 96-well polystyrene plate ที่เคลือบน้ำลายแล้ว

11.3. การทดสอบผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดฟันในปากและสูตรตำรับน้ำมันสำหรับบรรจุใน capsule จิวจากน้ำมันมะกุกและน้ำมันใบมะกุกต่อการยึดเกาะ (adherence) ของแบคทีเรียและการสร้างไบโอฟิล์มใน polystyrene plate ที่เคลือบน้ำลายแล้ว

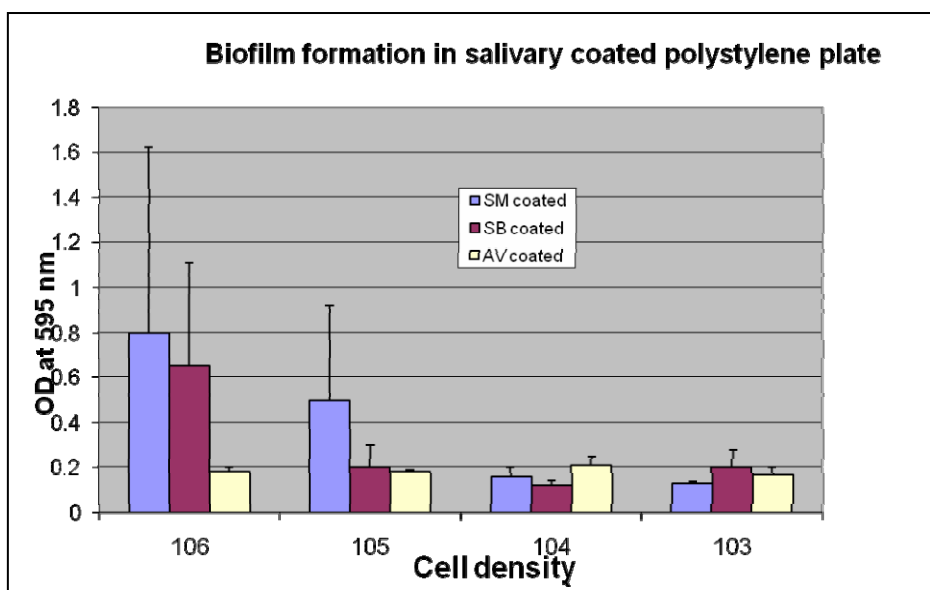
ทำตามรายละเอียดจากวิธีของ Fugushima และคณะ โดยนำเชื้อ *S. mutans* ที่อบนาน 24 ชั่วโมง ออกมาเจือจาง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (BHI) หลอดใหม่ ให้ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียที่ประมาณ 10^8 colony-forming units (CFU)/ml เมื่อได้ความหนาแน่นตามต้องการแล้ว นำไปใส่ใน polystyrene plate ที่เคลือบน้ำลายแล้ว หลุมละ 200 μl จากนั้นเติม Tween (25 μl /100 μl โดยปริมาตร) หลุมละ 5 μl แล้วจึงเติมผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ สูตรน้ำมัน (N113, M18) ในรูปของเหลว (liquid form) หรือผลิตภัณฑ์ตัวอย่างในรูปแบบชนิดฉีดฟันในปาก (10%KLO, 13%KLO, 12%KLLO) ผสมโดยใช้ไปเปิดกคขึ้นลงเบาๆ ในแต่ละความเข้มข้นของสารที่ต้องการทดสอบและแต่ละความหนาแน่นเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียโดยทำซ้ำทั้งหมด 3 หลุมเพื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นอบที่สภาวะที่เหมาะสมนาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาแล้ว นำ polystyrene plate ออกมาวัดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ด้วยเครื่องวัดความเข้มข้นด้วยแสงยูวี (micro-plate reader,) อ่านค่าความทึบแสงที่คลื่นแสง 595 นาโนเมตร บันทึกค่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย crystal violet เพื่อดูอัตราการสร้างไบโอฟิล์ม โดยใส่ 0.05%(w/v) crystal violet (CV) solution ปริมาตร 100 μl ลงในแต่ละหลุม ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นเท suspension ทั้งหมดออกล้าง plate โดยใช้ น้ำประปาจากก๊อกเบาๆ เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง วัดความหนาแน่นของไบโอฟิล์มด้วยการอ่านค่าที่ความทึบแสงเดิม ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบระหว่างค่าความทึบแสงของ control และ ของตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์

ผลการวิจัย

ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิจัย

จากการสร้างไบโอฟิล์มหลังจาก อบที่สภาวะที่เหมาะสมนาน 16 ชั่วโมงของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน 3 ชนิด (*S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* ATCC 6715, *A. viscosus* ATCC 1587) ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน พบว่ามีอัตราการสร้างไบโอฟิล์มที่ต่างกัน โดย *S. mutans* ATCC 25175

สร้างไบโอฟิล์มได้มากที่สุด (รูปที่ 52 และตารางที่ 152) จึงเลือก *S. mutans* ATCC 25175 เพื่อศึกษาขั้นต่อไป



รูปที่ 52 กราฟแสดงอัตราการสร้างไบโอฟิล์มนาน 16 ชั่วโมงของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน 3 ชนิด ได้แก่ *S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* ATCC 6715 และ *A. viscosus* ATCC 15987 ใน polystyrene plate ที่เคลือบน้ำลายแล้ว ที่ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียตั้งต้นที่ต่างกัน

ตารางที่ 152 ตารางแสดงค่าอัตราการสร้างไบโอฟิล์มนาน 16 ชั่วโมงของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* ATCC 6715 และ *A. viscosus* ATCC 15987 ใน polystyrene plate ที่เคลือบน้ำยาแล้ว ที่ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียตั้งต้นที่ต่างกัน

Cell density (CFU/ml)	Biofilm formation (OD at 595 nm*)		
	SM-coated	SB-coated	AV-coated
10^6	0.8 ± 0.82	0.65 ± 0.46	0.18 ± 0.02
10^5	0.5 ± 0.42	0.2 ± 0.1	0.18 ± 0.01
10^4	0.16 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.21 ± 0.04
10^3	0.13 ± 0.01	0.2 ± 0.08	0.17 ± 0.03

SM = *S. mutans* ATCC 25175, SB = *S. sobrinus* ATCC 6715, AV = *A. viscosus* ATCC 15987

*mean $\pm$ standard deviation (triplicate assays)

ผลของผลิตภัณฑ์สูตรน้ำมันสำหรับบรรจุ capsule จีว N113 และ M18 ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175

นำเชื้อ *S. mutans* ที่โตมา 24 ชั่วโมง ทำการปรับ (titrate) ความหนาแน่นของเซลล์โดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI หลอดใหม่จนได้ความหนาแน่นของเซลล์อยู่ระหว่างช่วง 10^{10} ถึง 10^4 CFU/ml ใส่ใน polystyrene plate ที่เคลือบน้ำยาแล้ว หลุมละ 200 μ l เติมห่วงสูตรน้ำมัน N113 และ M18 ทำการเจือจางผลิตภัณฑ์สูตรน้ำมันแบบเป็นขั้นตอน (serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5 และ 0.24 μ g/ml ตามลำดับ ผลของผลิตภัณฑ์สูตรน้ำมัน N113 และ M18 ต่อการเจริญเติบโตและการสร้างไบโอฟิล์ม เป็นดังแสดงในตารางที่ 153 และ 154

ตารางที่ 153 ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์สูตรน้ำมันสำหรับบรรจุ capsule จีวที่เตรียมจากน้ำมันมะกูด (N113) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์ม ของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)

Cell density (CFU/ml)	OD at 595 nm													
	Growth							Biofilm formation						
	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml
10^9	0.7± 0.02	0.6± 0.02*	0.6± 0.03*	0.5± 0.03*	0.46± 0.04*	0.3± 0.04*	0.2± 0.02*	0.34± 0.02	0.2± 0.03*	0.17± 0.04*	0.2± 0.015*	0.16± 0.06*	0.16± 0.02*	0.13± 0.03*
10^8	0.45± 0.015	0.6± 0.02	0.5± 0.027	0.4± 0.03*	0.3± 0.04*	0.2± 0.05*	0.1± 0.02*	0.8± 0.02	0.2± 0.03*	0.15± 0.01*	0.14± 0.02*	0.13± 0.05*	0.09± 0.06*	0.06± 0.02*
10^7	0.3± 0.065	0.04± 0.012*	0.04± 0.01*	0.04± 0.06*	0.04± 0.017*	0.04± 0.03*	0.04± 0.02*	0.2± 0.02	0.05± 0.04*	0.05± 0.03*	0.05± 0.167†	0.05± 0.05*	0.045± 0.03*	0.045± 0.02*
10^6	0.5± 0.06	0.04± 0.121*	0.04± 0.02*	0.04± 0.05*	0.04± 0.03*	0.04± 0.06*	0.05± 0.04*	0.15± 0.04	0.04± 0.06†	0.05± 0.04*	0.04± 0.04*	0.045± 0.03*	0.05± 0.02*	0.05± 0.06†
10^5	0.3± 0.07	0.04± 0.09*	0.04± 0.07*	0.04± 0.06*	0.045± 0.07*	0.045± 0.004*	0.045± 0.01*	0.7± 0.007	0.05± 0.02*	0.05± 0.01*	0.05± 0.01*	0.05± 0.02*	0.045± 0.012*	0.05± 0.07*
10^4	0.06± 0.04	0.05± 0.04†	0.05± 0.17†	0.04± 0.05†	0.04± 0.03†	0.04± 0.02†	0.04± 0.04†	0.12± 0.04	0.08± 0.07†	0.05± 0.01†	0.05± 0.05†	0.05± 0.04†	0.05± 0.03†	0.05± 0.02†

OD = mean ± standard deviation (triplicate assays), * = ขั้บข้งอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05), † = ขั้บข้งอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p > 0.05), ไม่มีสัญลักษณ์ = ไม่ขั้บข้ง

ตารางที่ 154 ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์สูตรน้ำมันสำหรับบรรจุ capsule จีวที่เตรียมจากน้ำมันใบมะกรูด (M18) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน (10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)

Cell density (CFU/ml)	OD at 595 nm													
	Growth							Biofilm formation						
	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml
10^{10}	0.53± 0.03	1.0± 0.04	0.64± 0.293	0.6± 0.03	0.55± 0.014	0.57± 0.04	0.57± 0.02	0.15± 0.03	0.32± 0.25	0.17± 0.02	0.2± 0.06	0.17± 0.04	0.35± 0.3	0.27± 0.02
10^9	0.7± 0.03	0.2± 0.03*	0.14± 0.07*	0.4± 0.15 [†]	0.5± 0.01*	0.4± 0.02*	0.3± 0.03*	0.34± 0.11	0.5± 0.04	0.32± 0.19 [†]	0.26± 0.14 [†]	0.3± 0.08 [†]	0.18± 0.07 [†]	0.16± 0.03 [†]
10^8	0.45± 0.01	0.2± 0.03*	0.2± 0.07*	0.18± 0.15 [†]	0.22± 0.01*	0.2± 0.02*	0.17± 0.02*	0.8± 0.07	0.5± 0.11*	0.53± 0.19 [†]	0.36± 0.14*	0.53± 0.08*	0.43± 0.07*	0.4± 0.06*
10^7	0.35± 0.01	0.21± 0.01*	0.23± 0.05*	0.18± 0.3 [†]	0.29± 0.09 [†]	0.35± 0.2	0.32± 0.01*	0.74± 0.07	0.5± 0.16 [†]	0.53± 0.16 [†]	0.36± 0.16*	0.64± 0.08 [†]	0.8± 0.02	0.6± 0.02 [†]
10^6	0.5± 0.001	0.07± 0.01*	0.08± 0.01*	0.78± 0.02	0.1± 0.008*	0.12± 0.01*	0.11± 0.2	0.15± 0.002	0.12± 0.06 [†]	0.19± 0.02	0.19± 0.05	0.3± 0.09	0.3± 0.005	0.3± 0.004
10^5	0.3± 0.01	0.05± 0.004*	0.06± 0.0014*	0.056± 0.004**	0.06± 0.01*	0.15± 0.05*	0.09± 0.001*	0.7± 0.007	0.07± 0.02*	0.07± 0.01*	0.07± 0.04*	0.12± 0.13*	0.23± 0.02*	0.26± 0.04*
10^4	0.06	0.05 [†]	0.045 [†]	0.05 [†]	0.045 [†]	0.06	0.07	0.123	0.06 [†]	0.063 [†]	0.07 [†]	0.05 [†]	0.125	0.17

OD = mean ± standard deviation (triplicate assays), * = ขั้บขั้บอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05), [†] = ขั้บขั้บอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p > 0.05), ไม่มีสัญลักษณ์ = ไม่ขั้บขั้บ

ผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุ capsule จีว N113 ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ATCC 25175 (ตารางที่ 153) พบว่า

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^9 CFU/ml N113 แสดงผลยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้นแบบ dose dependent

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^8 CFU/ml N113 แสดงผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$ แบบ dose dependent และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$ แบบ dose dependent

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^7 CFU/ml N113 แสดงผลยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้น (ที่ 2 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญ) แต่ไม่ขึ้นกับ dose

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^6 CFU/ml N113 แสดงผลยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้น (ที่ 4 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญ) แต่ไม่ขึ้นกับ dose

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^5 CFU/ml N113 แสดงผลยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มได้อย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้นแต่ไม่ขึ้นกับ dose

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^4 CFU/ml ml N113 แสดงผลยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อได้ทุกความเข้มข้นแต่ไม่มีนัยสำคัญและไม่ขึ้นกับ dose

ผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุ capsule จีว M18 ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ATCC 25175 (ตารางที่ 154) พบว่า

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^{10} CFU/ml M18 ไม่แสดงผลยับยั้งการเจริญหรือยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียในทุกความเข้มข้น

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^9 CFU/ml M18 ยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$ (ที่ 2 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญ) แต่ไม่ขึ้นกับ dose และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญตั้งแต่ความเข้มข้น 3 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่ขึ้นกับ dose

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^8 CFU/ml M18 ยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญที่ทุกความเข้มข้น (ที่ 2 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญ) และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น (ที่ 3 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญ) แต่ไม่ขึ้นกับ dose

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^7 CFU/ml M18 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญที่ทุกความเข้มข้น (ที่ 2 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญ) ยกเว้นที่ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะที่ความเข้มข้น 2

μg/ml สำหรับที่ความเข้มข้นที่ 4, 3, 1 μg/ml เป็นการยับยั้งอย่างไม่มีนัยสำคัญ ส่วนที่ 0.5 μg/ml ไม่แสดงผลการยับยั้ง

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^6 CFU/ml **M18** ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้น ((ที่ 0.24 μg/ml ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญ) ยกเว้นที่ 3 μg/ml และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ที่ความเข้มข้นที่ 4 μg/ml เพียงความเข้มข้นเดียว

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^5 CFU/ml **M18** ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้นแต่ไม่ขึ้นกับ dose และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญได้ทุกความเข้มข้นแบบ dose dependent

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^4 CFU/ml **M18** ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทุกความเข้มข้นอย่างไม่มีนัยสำคัญยกเว้นที่ 0.5 และ 0.24 μg/ml และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญยกเว้นที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.24 μg/ml

ผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากที่เตรียมจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO, 13%KLO, 12%KLLO) ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175

จากการนำเชื้อ *S. mutans* ที่โตมา 24 ชั่วโมง โดยทำการปรับความหนาแน่นของเซลล์โดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (BHI) หลอดใหม่จนได้ความหนาแน่นของเซลล์อยู่ระหว่างช่วง 10^{10} ถึง 10^4 CFU/ml ใส่ใน polystyrene plate ที่เคลือบน้ำยาแล้ว หลุมละ 200 μl เติมผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากที่เตรียมจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO และ 13%KLO) และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากที่เตรียมจากน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO) โดยทำการเจือจางเซลล์แบบเป็นขั้นตอนของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ทั้งหมดที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5 และ 0.24 μg/ml ผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากที่เตรียมจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO และ 13%KLO) และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากที่เตรียมจากน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์ม เป็นดังแสดงในตารางที่ 155 ถึง 157

ตารางที่ 155 ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์ชนิดผงในปากจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน (10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)

Cell density (CFU/ml)	OD at 595 nm													
	Growth							Biofilm formation						
	Control	4 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$	0.24 $\mu\text{g/ml}$	Control	4 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$	0.5 $\mu\text{g/ml}$	0.24 $\mu\text{g/ml}$
10^{10}	0.5 $\pm$ 0.11	0.9 $\pm$ 0.042	0.6 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.024	0.55 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.04	0.6 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.05	0.3 $\pm$ 0.04	0.3 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.04	0.2 $\pm$ 0.1	0.35 $\pm$ 0.04	0.3 $\pm$ 0.11
10^9	0.7 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.03*	0.5 $\pm$ 0.06*	0.5 $\pm$ 0.006*	0.5 $\pm$ 0.08*	0.7 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.05*	0.3 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.04	0.3 $\pm$ 0.03	0.3 $\pm$ 0.004	0.36 $\pm$ 0.05	0.3 $\pm$ 0.005
10^8	0.5 $\pm$ 0.08	0.07 $\pm$ 0.07*	0.1 $\pm$ 0.007*	0.09 $\pm$ 0.002*	0.12 $\pm$ 0.007*	0.4 $\pm$ 0.02 [†]	0.4 $\pm$ 0.09 [†]	0.8 $\pm$ 0.08	0.5 $\pm$ 0.008*	0.5 $\pm$ 0.08*	0.5 $\pm$ 0.08*	0.8 $\pm$ 0.007*	0.7 $\pm$ 0.04 [†]	0.7 $\pm$ 0.003 [†]
10^7	0.3 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.05*	0.06 $\pm$ 0.03*	0.1 $\pm$ 0.006*	0.11 $\pm$ 0.2 [†]	0.1 $\pm$ 0.06*	0.6 $\pm$ 0.06	0.2 $\pm$ 0.09	0.13 $\pm$ 0.007	0.23 $\pm$ 0.004	0.6 $\pm$ 0.07	0.6 $\pm$ 0.005	0.5 $\pm$ 0.07	0.5 $\pm$ 0.004
10^6	0.5 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.06*	0.06 $\pm$ 0.04*	0.1 $\pm$ 0.005*	0.05 $\pm$ 0.04*	0.05 $\pm$ 0.03*	0.05 $\pm$ 0.02*	0.15 $\pm$ 0.06	0.12 $\pm$ 0.07 [†]	0.12 $\pm$ 0.05 [†]	0.09 $\pm$ 0.004 [†]	0.05 $\pm$ 0.05 [†]	0.05 $\pm$ 0.06 [†]	0.05 $\pm$ 0.05 [†]
10^5	0.3 $\pm$ 0.09	0.05 $\pm$ 0.03*	0.05 $\pm$ 0.05*	0.05 $\pm$ 0.04*	0.05 $\pm$ 0.03*	0.05 $\pm$ 0.05*	0.05 $\pm$ 0.09*	0.7 $\pm$ 0.05	0.05 $\pm$ 0.06*	0.05 $\pm$ 0.06*	0.05 $\pm$ 0.005*	0.05 $\pm$ 0.08*	0.05 $\pm$ 0.11*	0.05 $\pm$ 0.06*
10^4	0.2 $\pm$ 0.007	0.05 $\pm$ 0.006*	0.05 $\pm$ 0.02*	0.05 $\pm$ 0.09 [†]	0.05 $\pm$ 0.05*	0.05 $\pm$ 0.04*	0.05 $\pm$ 0.04*	0.05 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.05	0.05 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.004	0.05 $\pm$ 0.04

OD=mean $\pm$ standard deviation (triplicate assays), * = ยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), [†] = ยับยั้งอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$), ไม่มีสัญลักษณ์ = ไม่ยับยั้ง

ตารางที่ 156 ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (13%KLO) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน (10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)

Cell density (CFU/ml)	OD at 595 nm													
	Growth							Biofilm						
	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml
10^{10}	0.5± 0.008	1± 0.024	0.6± 0.04	0.6± 0.08	0.6± 0.05	0.6± 0.03	0.6± 0.018	0.15± 0.018	0.4± 0.04	0.2± 0.05	0.2± 0.05	0.2± 0.02	0.2± 0.06	0.2± 0.04
10^9	0.7± 0.014	0.5± 0.05*	0.5± 0.05*	0.5± 0.02*	0.6± 0.02*	0.3± 0.02*	0.44± 0.02*	0.34± 0.02	0.5± 0.05	0.5± 0.05	0.3± 0.05 [†]	0.3± 0.03 [†]	0.3± 0.02 [†]	0.3± 0.04 [†]
10^8	0.2± 0.03	0.2± 0.03	0.3± 0.02	0.4± 0.03	0.5± 0.03	0.4± 0.04	0.4± 0.03	0.6± 0.03	0.3± 0.04*	0.6± 0.04	0.7± 0.05	0.6± 0.04	0.8± 0.03	0.4± 0.02*
10^7	0.3± 0.04	0.06± 0.04*	0.07± 0.02*	0.1± 0.04*	0.3± 0.04	0.07± 0.05*	0.15± 0.04*	0.2± 0.04	0.1± 0.02*	0.5± 0.03	0.5± 0.05	0.3± 0.054	0.2± 0.04	0.06± 0.05*
10^6	0.2± 0.03	0.06± 0.021*	0.05± 0.03*	0.06± 0.05*	0.05± 0.05*	0.05± 0.04*	0.05± 0.05*	0.4± 0.05	0.06± 0.03*	0.06± 0.04*	0.06± 0.04*	0.06± 0.03*	0.1± 0.05*	0.08± 0.04*
10^5	0.05± 0.09	0.06± 0.03	0.06± 0.04	0.05± 0.06	0.05± 0.06	0.05± 0.05	0.05± 0.05	1.0± 0.04	0.05± 0.04*	0.05± 0.02*	0.05± 0.02*	0.05± 0.04*	1.0± 0.05	0.05± 0.05*
10^4	0.04± 0.01	0.06± 0.05	0.06± 0.05	0.06± 0.04	0.06± 0.002	0.05± 0.05	0.06± 0.04	0.06± 0.05	0.05± 0.05 [†]	0.05± 0.04 [†]	0.05± 0.03 [†]	0.05± 0.05 [†]	0.06± 0.05	0.05± 0.04 [†]

OD=mean ± standard deviation (triplicate assays), * = ยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05), [†] = ยับยั้งอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p > 0.05), ไม่มีสัญลักษณ์ = ไม่ยับยั้ง

ตารางที่ 157 ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO) (ที่ความเข้มข้นของน้ำมันมะกรูด 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ที่ความหนาแน่นของเซลล์ที่ต่างกัน (10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)

Cell density (CFU/ml)	OD at 595 nm													
	Growth							Biofilm formation						
	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml
10^{10}	0.5± 0.05	1.0± 0.05	0.6± 0.03	0.6± 0.04	0.6± 0.05	0.6± 0.04	0.6± 0.04	0.15± 0.05	0.39± 0.04	0.2± 0.03	0.2± 0.05	0.2± 0.02	0.2± 0.03	0.2± 0.05
10^9	0.7± 0.04	0.6± 0.05 [†]	0.6± 0.04*	0.6± 0.04*	0.6± 0.04*	0.7± 0.03	0.7± 0.05	0.34± 0.04	0.4± 0.05	0.44± 0.012	0.3± 0.05 [†]	0.2± 0.05*	0.3± 0.02 [†]	0.2± 0.04*
10^8	0.5± 0.03	0.12± 0.03*	0.2± 0.04*	0.2± 0.04*	0.3± 0.04*	0.4± 0.018*	0.3± 0.05*	0.8± 0.03	1.25± 0.06	0.9± 0.02	0.43± 0.05*	0.5± 0.04*	0.4± 0.03*	0.5± 0.018*
10^7	0.3± 0.05	0.09± 0.04*	0.08± 0.05*	0.1± 0.05*	0.08± 0.03*	0.08± 0.02*	0.2± 0.05 [†]	0.2± 0.05	0.4± 0.05	0.08± 0.01*	0.5± 0.04	0.4± 0.05	0.06± 0.03*	0.22± 0.08
10^6	0.2± 0.04	0.06± 0.04*	0.08± 0.06*	0.06± 0.05*	0.06± 0.02*	0.06± 0.02*	0.07± 0.04*	0.4± 0.02	0.05± 0.05*	0.13± 0.03*	0.06± 0.04*	0.06± 0.05*	0.07± 0.04*	0.05± 0.02*
10^5	0.05± 0.03	0.07± 0.05	0.06± 0.05	0.07± 0.03	0.07± 0.05	0.06± 0.04	0.06± 0.03	0.09± 0.03	0.07± 0.04 [†]	0.06± 0.04 [†]	0.06± 0.03 [†]	0.06± 0.06 [†]	0.06± 0.05 [†]	0.06± 0.03 [†]
10^4	0.04± 0.019	0.07± 0.04	0.07± 0.04	0.07± 0.05	0.06± 0.04	0.06± 0.04	0.07± 0.05	0.06± 0.05	0.06± 0.05	0.06± 0.04	0.05± 0.04 [†]	0.05± 0.04 [†]	0.05± 0.04 [†]	0.06± 0.05

OD=mean ± standard deviation (triplicate assays), * = ยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05), [†] = ยับยั้งอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p > 0.05), ไม่มีสัญลักษณ์ = ไม่ยับยั้ง

ผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูด (10%KLO) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ATCC 25175 (ตารางที่ 155) พบว่า

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^{10} CFU/ml **10%KLO** ไม่ยับยั้งการเจริญและไม่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อมาตรฐานในทุกความเข้มข้น

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^9 CFU/ml **10%KLO** ยับยั้งการเจริญอย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้น ยกเว้นที่ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^8 CFU/ml **10%KLO** ยับยั้งการเจริญอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น (ที่ 0.5 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญ) และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น (ที่ 0.5 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญ) ยกเว้นที่ 1 $\mu\text{g/ml}$

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^7 CFU/ml **10%KLO** ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น (ที่ 1 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญ) ยกเว้นที่ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่ขึ้นกับ dose และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะที่ความเข้มข้น 4 $\mu\text{g/ml}$

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^6 CFU/ml **10%KLO** ยับยั้งการเจริญอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น แต่ไม่ขึ้นกับ dose และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^5 CFU/ml **10%KLO** ยับยั้งการเจริญทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในทุกความเข้มข้น แต่ไม่ขึ้นกับ dose

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^4 CFU/ml **10%KLO** มีผลยับยั้งการเจริญอย่างมีนัยสำคัญที่ทุกความเข้มข้น (ที่ 2 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญ) แต่ไม่ขึ้นกับ dose และไม่มีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มในทุกความเข้มข้น

ผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูด (13%KLO) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ATCC 25175 (ตารางที่ 156) พบว่า

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^{10} CFU/ml **13%KLO** ไม่แสดงผลยับยั้งการเจริญของเชื้อและการสร้างไบโอฟิล์มในทุกความเข้มข้น

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^9 CFU/ml **13%KLO** ยับยั้งการเจริญอย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้น ไม่ขึ้นกับ dose และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^8 CFU/ml **13%KLO** ไม่ยับยั้งการเจริญในทุกความเข้มข้น แต่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะที่ความเข้มข้นที่ 4 $\mu\text{g/ml}$

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^7 CFU/ml **13%KLO** ยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้นยกเว้นที่ 1 $\mu\text{g/ml}$ แต่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะที่ความเข้มข้น 4 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^6 CFU/ml **13%KLO** ยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญทุกความเข้มข้น แต่ไม่ขึ้นกับ dose

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^5 CFU/ml **13%KLO** ไม่มีผลยับยั้งการเจริญในทุกความเข้มข้น แต่แสดงผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้นยกเว้นที่ 0.5 $\mu\text{g/ml}$

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^4 CFU/ml **13%KLO** ไม่แสดงผลยับยั้งการเจริญของเชื้อและการสร้างไบโอฟิล์มในทุกความเข้มข้น

ผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันโสมกระดูก (12%KLLO) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ATCC 25175 (ตารางที่ 157) พบว่า

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^{10} CFU/ml **12%KLLO** ไม่แสดงผลยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียในทุกความเข้มข้น

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^9 CFU/ml **12%KLLO** ยับยั้งการเจริญอย่างมีนัยสำคัญที่ 3 ถึง 1 $\mu\text{g/ml}$ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 1 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนที่ 2 และ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งอย่างไม่มีนัยสำคัญ

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^8 CFU/ml **12%KLLO** ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้นและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 2 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ไม่ขึ้นกับ dose

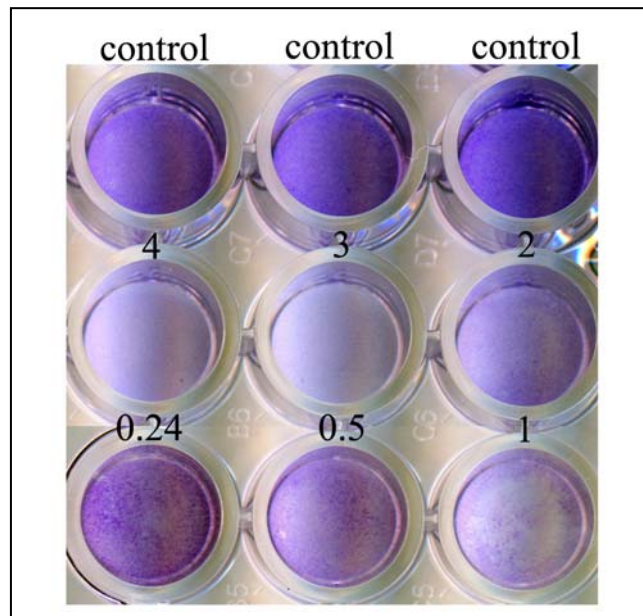
--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^7 CFU/ml **12%KLLO** ยับยั้งการเจริญอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น ((ที่ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญ) และไม่ขึ้นกับ dose และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะที่ 3 และ 0.5 $\mu\text{g/ml}$

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^6 CFU/ml **12%KLLO** ลดการเจริญอย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่ขึ้นกับ dose ในทุกความเข้มข้นและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น แต่ไม่ขึ้นกับ dose เช่นกัน

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^5 CFU/ml **12%KLLO** ไม่ลดการเจริญแต่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญแต่ไม่ขึ้นกับ dose ได้ในทุกความเข้มข้นแต่ไม่ขึ้นกับ dose

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* ATCC 25175 เท่ากับ 10^4 CFU/ml **12%KLLO** ไม่แสดงผลลดการเจริญแต่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 2 ถึง 0.5 $\mu\text{g/ml}$

ตัวอย่างรูปที่แสดงความทึบแสงของของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียตั้งต้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml ในการทดสอบผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันไบมะกรูด (12%KLLO) หลังอบที่สภาวะเหมาะสม 24 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยคริสตัล ไวโอเลต ดังแสดงในรูปที่ 53



รูปที่ 53 รูปแสดงความทึบแสงของของไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ATCC 25175 ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียตั้งต้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml แล้วใส่ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันไบมะกรูด (12%KLLO) หลังอบที่สภาวะเหมาะสม 24 ชั่วโมง หลังจากย้อมด้วยคริสตัล ไวโอเลต หลังจากหลุมที่มีสีม่วงเข้มแสดงถึงความหนาที่มากกว่าของไบโอฟิล์ม ที่มากกว่า ตัวเลขเหนือแต่ละหลุมแสดงถึงความเข้มข้นของน้ำมันไบมะกรูด (12%KLLO)

ผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุ capsule จีว N113 และ M18 ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ที่แยกได้จากอาสาสมัคร

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของตัวอย่างสูตรน้ำมัน N113 และ M18 เจือจางเซลล์แบบขั้นตอนของตัวอย่างในทั้ง 2 กลุ่มที่ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ 4, 3, 2, 1, 0.5 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ทำการปรับ (titrate) เชื้อ *S. mutans* ที่อบไว้ก่อนหน้านี้ 24 ชั่วโมงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (BHI) จนได้ความหนาแน่นของเซลล์อยู่ระหว่างช่วง 10^{10} ถึง 10^4 CFU/ml พบว่าจากการทดสอบผลของสูตรน้ำมัน N113 และ M18 ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์ม ของ *S. mutans* ที่แยกได้จากอาสาสมัคร จำนวน 4 สายพันธุ์ ให้ผลที่มีความแปรปรวนมากกว่าผลที่ได้จากการทดสอบในเชื้อมาตรฐาน ผลการทดสอบเชื้อที่แยกได้จากอาสาสมัครบางสายพันธุ์ที่สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 158 และ 159

ตารางที่ 158 ตารางแสดงผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุ capsule จีวที่เตรียมจากน้ำมันมะกูด (N113) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญ และการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ที่แยกได้จากอาสาสมัคร (ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน 10^{10} , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)

Clinical isolate	Cell density (CFU/ml)	OD at 595 nm													
		Growth							Biofilm formation						
		Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml
No. 10	10^{10}	0.35±	0.33±	0.4±	0.4±	0.2±	0.4±	0.34±	0.74±	0.7±	0.6±	0.7±	0.7±	0.6±	0.7±
		0.05	0.05 [†]	0.08	0.04	0.018	0.05	0.06 [†]	0.04	0.06 [†]	0.05 [†]	0.212 [†]	0.06 [†]	0.05 [†]	0.04 [†]
	10^5	0.05±	0.05±	0.05±	0.04±	0.05±	0.05±	0.05±	0.06±	0.08±	0.07±	0.05±	0.05±	0.045±	0.05±
		0.04	0.04	0.04	0.05 [†]	0.02	0.05	0.05	0.03	0.05	0.01	0.04 [†]	0.04 [†]	0.04 [†]	0.2 [†]
	10^4	0.05±	0.05±	0.05±	0.04±	0.05±	0.05±	0.05±	0.1±	0.05±	0.05±	0.044±	0.05±	0.05±	0.05±
		0.03	0.02	0.03	0.06 [†]	0.04	0.04	0.08	0.04	0.05 [†]	0.04 [†]	0.5 [†]	0.06 [†]	0.03 [†]	0.03 [†]

OD = mean ± standard deviation (triplicate assays), [†] = ขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p > 0.05), ไม่มีสัญลักษณ์ = ไม่ขึ้น

ตารางที่ 159 ผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุแคปซูลที่เตรียมจากน้ำมันใบมะกรูด (M18) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ที่แยกได้จากอาสาสมัคร (ที่ความหนาแน่นของเซลล์ต่างกัน 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^6 , และ 10^5 CFU/ml)

Clinical isolate	Cell density (CFU/ml)	OD at 595 nm													
		Growth							Biofilm formation						
		Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml
No. 15	10^{10}	0.5± 0.04	0.96± 0.03	0.6± 0.03	0.6± 0.04	0.6± 0.04	0.57± 0.04	0.56± 0.05	0.15± 0.06	0.3± 0.06	0.13± 0.02 [†]	0.21± 0.012	0.18± 0.01	0.35± 0.05	0.24± 0.02
	10^9	0.4± 0.05	0.19± 0.02*	0.14± 0.02*	0.4± 0.04	0.5± 0.05	0.43± 0.05	0.3± 0.05*	0.74± 0.05	0.5± 0.05*	0.32± 0.05*	0.26± 0.05*	0.3± 0.04*	0.18± 0.04*	0.16± 0.03*
	10^8	0.2± 0.04	0.2± 0.04	0.23± 0.05	0.18± 0.05 [†]	0.24± 0.054	0.24± 0.04	0.2± 0.06	0.64± 0.04	0.5± 0.05*	0.5± 0.03*	0.36± 0.06*	0.53± 0.02*	0.43± 0.03*	0.39± 0.04*
	10^6	0.12± 0.05	0.07± 0.05 [†]	0.08± 0.03 [†]	0.08± 0.04 [†]	0.13± 0.06	0.12± 0.03	0.1± 0.04 [†]	0.55± 0.06	0.12± 0.01*	0.19± 0.04*	0.19± 0.05*	0.3± 0.06*	0.3± 0.05*	0.2± 0.05*
	10^5	0.1± 0.05	0.05± 0.04 [†]	0.06± 0.04 [†]	0.06± 0.03 [†]	0.06± 0.05 [†]	0.15± 0.04	0.09± 0.08 [†]	0.45± 0.05	0.07± 0.05*	0.09± 0.08*	0.07± 0.08*	0.12± 0.06*	0.26± 0.08*	0.26± 0.04*

OD = mean + standard deviation (triplicate assays), * = ขั้บยั้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), [†] = ขั้บยั้งอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$), ไม่มีสัญลักษณ์ = ไม่ขั้บยั้ง

ผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุแคปซูล N113 ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ที่แยกได้จากอาสาสมัคร (ตารางที่ 158) พบว่า

สำหรับ clinical isolate No. 10 ได้ผลดังนี้

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 10 ที่ 10^{10} CFU/ml **N113** ยับยั้งการเจริญอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนที่ 4 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีนัยสำคัญ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญที่ 3 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนที่ 4, 2, 1, และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีนัยสำคัญ

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 10 ที่ 10^5 CFU/ml **N113** ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญเฉพาะที่ความเข้มข้น 2 $\mu\text{g/ml}$ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 2 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่ขึ้นกับ dose

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 10 ที่ 10^4 CFU/ml **N113** ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญเฉพาะที่ความเข้มข้น 2 $\mu\text{g/ml}$ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 4 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่ขึ้นกับ dose

ผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุแคปซูล M18 ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ที่แยกได้จากอาสาสมัคร (ตารางที่ 159) พบว่า

สำหรับ clinical isolate No. 15 ได้ผลดังนี้

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 15 เท่ากับ 10^{10} CFU/ml **M18** ไม่ยับยั้งการเจริญแต่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างไม่มีนัยสำคัญเฉพาะที่ความเข้มข้น 3 $\mu\text{g/ml}$

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 15 เท่ากับ 10^9 CFU/ml ผลของ **M18** ต่อการเจริญของเชื้อนั้นไม่แน่นอน ส่วนการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มนั้น ยับยั้งได้ที่ ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$ แบบ dose dependent อย่างมีนัยสำคัญ

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 15 ที่ 10^8 CFU/ml **M18** ยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ที่ 4, 3, และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มนั้น ยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$ แบบ dose dependent

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 15 ที่ 10^6 CFU/ml **M18** ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ 4, 3, 2 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญที่ทุกความเข้มข้น แบบ dose dependent

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 15 ที่ 10^5 CFU/ml **M18** ยับยั้งการเจริญทุกความเข้มข้นอย่างไม่มีนัยสำคัญยกเว้นที่ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญที่ทุกความเข้มข้น ไม่ขึ้นกับ dose

ผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูด (10%KLO, 13%KLO) และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกูด (12%KLLO) ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาสาสมัคร

จากการเจือจางเซลล์แบบขั้นตอนของตัวอย่างในทั้ง 2 กลุ่ม ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เพื่อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์ที่เหมาะสม ได้ทำการปรับเชื้อ *S. mutans* ที่อบไว้ก่อนหน้านี้นาน 24 ชั่วโมงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (BHI) จนได้ความหนาแน่นของเซลล์อยู่ระหว่างช่วง 10^{10} ถึง 10^4 CFU/ml ผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูด (10%KLO) และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกูด (12%KLLO) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มดังแสดงในตารางที่ 160 และ 161

ตารางที่ 160 ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ที่แยกได้จากอาสาสมัคร ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)

Clinical isolate	Cell density (CFU/ml)	OD at 595 nm													
		Growth							Biofilm formation						
		Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml
No. 9	10^8	0.2±0.04	0.17±0.05 [†]	0.2±0.04	0.17±0.04 [†]	0.18±0.05 [†]	0.1±0.03*	0.05±0.06*	0.64±0.05	0.07±0.03*	0.08±0.05*	0.06±0.05*	0.06±0.05*	0.05±0.04*	0.05±0.03*
	10^7	0.15±0.04	0.05±0.08 [†]	0.05±0.05 [†]	0.04±0.05*	0.05±0.05 [†]	0.05±0.04*	0.05±0.09 [†]	0.6±0.05	0.06±0.05*	0.07±0.04*	0.2±0.04*	0.06±0.05*	0.05±0.03*	0.05±0.05*
	10^6	0.12±0.05	0.05±0.06 [†]	0.05±0.04 [†]	0.05±0.6 [†]	0.05±0.4 [†]	0.04±0.05 [†]	0.05±0.07 [†]	0.55±0.06	0.07±0.02*	0.07±0.05*	0.07±0.05*	0.07±0.04*	0.6±0.04	0.05±0.05*
	10^5	0.1±0.03	0.05±0.07 [†]	0.05±0.06 [†]	0.05±0.05 [†]	0.05±0.04 [†]	0.05±0.05 [†]	0.05±0.02 [†]	0.45±0.04	0.07±0.02*	0.06±0.04*	0.05±0.065*	0.07±0.05*	0.7±0.05	0.05±0.04*
	10^4	0.05±0.04	0.05±0.05	0.06±0.04	0.05±0.04	0.05±0.05	0.05±0.05	0.05±0.03	0.35±0.03	0.07±0.04*	0.07±0.05*	0.07±0.04*	0.08±0.05*	0.7±0.02	0.05±0.4 [†]

OD = mean + standard deviation (triplicate assays), * = ยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$), [†] = ยับยั้งอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$), ไม่มีสัญญาณลักษณะ = ไม่ยับยั้ง

ตารางที่ 161 ตารางแสดงผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO) (ที่ความเข้มข้น 4, 3, 2, 1, 0.5, และ 0.24 µg/ml) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* ที่แยกได้จากอาสาสมัคร ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , และ 10^4 CFU/ml)

Clinical isolate	Cell density (CFU/ml)	OD at 595 nm													
		Growth							Biofilm formation						
		Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml	Control	4 µg/ml	3 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0.5 µg/ml	0.24 µg/ml
No.10	10^8	0.2±0.05	0.2±0.05	0.2±0.05	0.2±0.05	0.2±0.02	0.13±0.04 [†]	0.1±0.05 [†]	0.6±0.04	0.06±0.04*	0.1±0.02*	0.07±0.05*	0.05±0.05*	0.05±0.05*	0.05±0.05*
	10^7	0.15±0.04	0.18±0.02	0.17±0.05	0.13±0.04 [†]	0.11±0.04 [†]	0.05±0.02*	0.05±0.04*	0.464±0.05	0.07±0.07*	0.06±0.03*	0.07±0.004*	0.1±0.04*	0.7±0.07	0.05±0.06*
	10^6	0.15±0.05	0.05±0.03 [†]	0.053±0.06 [†]	0.05±0.05 [†]	0.05±0.05 [†]	0.05±0.03 [†]	0.05±0.05 [†]	0.55±0.06	0.07±0.054*	0.07±0.04*	0.06±0.04*	0.07±0.025*	0.7±0.04*	0.05±0.03*
	10^5	0.10±0.03	0.06±0.04 [†]	0.05±0.04 [†]	0.05±0.06 [†]	0.05±0.06 [†]	0.05±0.05 [†]	0.05±0.12 [†]	0.45±0.08	0.06±0.05*	0.06±0.04*	0.06±0.03*	0.06±0.03*	0.06±0.02*	0.05±0.08*
	10^4	0.05±0.02	0.06±0.05	0.06±0.04	0.05±0.01	0.05±0.04	0.05±0.05	0.05±0.004	0.35±0.05	0.07±0.04*	0.07±0.05*	0.07±0.05*	0.06±0.06*	0.06±0.03*	0.05±0.04*

OD = mean + standard deviation (triplicate assays), * = ยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05), [†] = ยับยั้งอย่างไม่มีนัยสำคัญ (p > 0.05), ไม่มีสัญญาณลักษณะ = ไม่ยับยั้ง

ผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO) ต่อการเจริญและการสร้าง ไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ที่แยกได้จากอาสาสมัคร (ตารางที่ 160) พบว่า

สำหรับ clinical isolate No. 9 ได้ผลดังนี้

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 9 เท่ากับ 10^{10} CFU/ml **10%KLO** ยับยั้งการเจริญอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.5 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ และอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ 4, 2, และ 1 $\mu\text{g/ml}$ แต่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 9 เท่ากับ 10^7 CFU/ml **10%KLO** ยับยั้งการเจริญอย่างมีนัยสำคัญที่ 2 และ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนความเข้มข้นอื่นไม่มีนัยสำคัญ และมีผลยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 9 เท่ากับ 10^6 CFU/ml **10%KLO** แสดงผลยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ทุกความเข้มข้นและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้นยกเว้นที่ 0.5 $\mu\text{g/ml}$

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 9 เท่ากับ 10^5 CFU/ml **10%KLO** ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญ แต่แสดงการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญยกเว้นที่ 0.5 $\mu\text{g/ml}$

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 9 เท่ากับ 10^4 CFU/ml **10%KLO** ไม่ยับยั้งการเจริญ แต่ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญยกเว้นที่ 4 ถึง 1 $\mu\text{g/ml}$ และอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ 0.24 $\mu\text{g/ml}$

ผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO) ต่อการเจริญและการสร้าง ไบโอฟิล์มของ *S. mutans* ที่แยกได้จากอาสาสมัคร (ตารางที่ 161) พบว่า

สำหรับ clinical isolate No. 10 ได้ผลดังนี้

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 10 เท่ากับ 10^8 CFU/ml **12%KLLO** ยับยั้งการเจริญอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ 0.5 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 10 เท่ากับ 10^7 CFU/ml **12%KLLO** ยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างไม่มีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 2 และ 1 $\mu\text{g/ml}$ และอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.5 และ 0.24 $\mu\text{g/ml}$ และยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ทุกความเข้มข้นยกเว้นที่ 0.5 $\mu\text{g/ml}$

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 10 เท่ากับ 10^6 CFU/ml **12%KLLO** ยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างไม่มีนัยสำคัญแต่ไม่ขึ้นกับ dose ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์ม ให้ผลยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญที่ทุกความเข้มข้น

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 10 เท่ากับ 10^5 CFU/ml **12%KLLO** ยับยั้งการเจริญของเชื้ออย่างไม่มีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น แต่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น

--ที่ความหนาแน่นของเซลล์ *S. mutans* clinical isolate No. 10 เท่ากับ 10^4 CFU/ml **12%KLLO** ไม่ยับยั้งการเจริญของเชื้อในทุกความเข้มข้น แต่สามารถยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญในทุกความเข้มข้น

จากการศึกษาผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุแคปซูลที่เตรียมจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S. mutans* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐานและที่แยกได้จากอาสาสมัคร (4 สายพันธุ์) สรุปผลได้ดังนี้ ผลของผลิตภัณฑ์นั้นจะส่งผลลดการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อมาตรฐานในลักษณะที่ค่อนข้างจะแน่นอนกว่า มีค่าความแปรปรวนของค่าที่วัดได้ (อัตราการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์ม) น้อยกว่าค่าที่ได้จากเชื้อที่แยกได้จากอาสาสมัคร น่าสังเกตว่าที่ความหนาแน่นของเซลล์ที่สูงๆ นั้น (10^{10} 10^9 และ 10^8 CFU/ml) ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ไม่สามารถที่จะลดการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มได้ เนื่องจากอาจมีความหนาแน่นของเซลล์ที่มากเกินไป อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาที่ผ่านมา เชื้อ *S. mutans* ที่แยกได้จากน้ำลายหรือแผ่นคราบจุลินทรีย์จากผู้ป่วยที่มีฟันผุนรุนแรงหรือในคนที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคฟันผุนั้น โดยมากมักมีความหนาแน่นที่สูงกว่า 10^5 CFU/ml ซึ่งในการศึกษาต่อไปนั้น ความหนาแน่นของเซลล์ที่ควรจะได้รับคว่าสนใจศึกษาเพิ่มเติมอย่างละเอียดควรจะเป็นที่ 10^5 ถึง 10^9 CFU/ml หรือควรแยกการศึกษาในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคฟันผุและกลุ่มที่มีความเสี่ยงปานกลางถึงต่ำต่อการเกิดโรคฟันผุโดยแบ่งตามความหนาแน่นของเชื้อ *S. mutans* หรือถ้าความหนาแน่นสูงเกินไปก็อาจจะไม่มีผล

จากการเปรียบเทียบผลระหว่างผลิตภัณฑ์กลุ่มเดียวกัน คือ สูตรน้ำมันสำหรับบรรจุแคปซูลจากน้ำมันมะกรูด (N113) และ น้ำมันใบมะกรูด (M18) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อมาตรฐาน พบว่า N113 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญได้ดีกว่า M18 คือตั้งแต่ความหนาแน่นของเซลล์ที่ 10^9 - 10^5 CFU/ml ส่วนผลต่อเชื้อที่แยกได้จากอาสาสมัครค่อนข้างแปรปรวน ทั้ง 2 สูตรไม่แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แต่ M18 แสดงผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ดีกว่า N113

สำหรับการเปรียบเทียบผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อมาตรฐานนั้น ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด(10%KLO (ซึ่งมีความคงตัวด้านกายภาพดีกว่า 13%KLO) 13%KLO) และจากน้ำมันใบมะกรูด(12%KLLO) จะให้ผลตามลำดับจากดี 10%KLO > 13%KLO > 12%KLLO สำหรับผลต่อเชื้อที่แยกได้จากอาสาสมัครนั้น เนื่องจากในการทดลองนี้ เชื้อที่จะทดสอบกับ 13%KLO ไม่เจริญดีพอที่จะทำการทดสอบได้ จึงทำการเปรียบเทียบผลระหว่าง 10%KLO และ 12%KLLO ก่อน พบว่า 10%KLO ให้ผลดีกว่า 12%KLLO

การสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S.mutans* บนผิวของฟัน เป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการเกิดแผ่นคราบจุลินทรีย์ (dental plaque) (Matsumoto et al, 1999) มีรายงานที่ผ่านมามากมายได้เสนอเกี่ยวกับการใช้ผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติหลายๆ ชนิดที่เพื่อกำจัดหรือยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S.mutans* ซึ่งจะนำไปสู่การยับยั้งการเกิดฟันผุ (anti-cariogenic) (Huh, 1984) ในการศึกษาที่ผลิตจากน้ำมันมะกุกและน้ำมันใบมะกุก แสดงผลลดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานในช่วงความเข้มข้นที่กว้าง คือ ตั้งแต่ 4 ถึง 0.24 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับในส่วนของการสร้างไบโอฟิล์มนั้น ผลที่ได้ยากที่จะสรุปได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้คาดว่าน่าจะมีสาเหตุมาจากความยากลำบากในการที่สารต้านแบคทีเรียจะแทรกเข้าไปออกฤทธิ์ (Yoshida and Kuramitsu, 2002) แต่ที่น่าสนใจคือ 10%KLO และ 12%KLLO สามารถที่จะแสดงฤทธิ์ยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S.mutans* สายพันธุ์ที่แยกได้จากอาสาสมัคร ที่ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU/ml ซึ่งเป็นผลการทดลองที่แตกต่างจากรายงานที่ผ่านๆ มา แต่เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาไบโอฟิล์มที่สร้างจากเชื้อเพียงชนิดเดียว (mono-species biofilm) ดังนั้นจึงไม่เหมือนสภาวะแวดล้อมในช่องปากที่มีความซับซ้อนมากกว่า อย่างไรก็ตามการเกิดฟันผุเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง เชื้อ *S.mutans* เป็นหนึ่งในกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการเกิดโรคฟันผุ เชื้อ *S.mutans* มีคุณสมบัติที่เป็นสามารถผลิตกรด (aciduric) และทนกรด (acidogenic) ได้ดีและยังสามารถสังเคราะห์กลูแคนนอกเซลล์ (extracellular glucans) โดยใช้สารตั้งต้นที่ได้มาจากการบริโภคอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตโดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลซูโครส (Bowen, 2002) โดยใช้เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferases) หรือ GTFs (Loesche, 1986; Marsh and Bradshaw, 1995; Bowen, 2002) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *S.mutans* สร้างเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส 3 ชนิด ได้แก่ *gtfB*, *gtfC*, และ *gtfD* (Loesch, 1986) กลูแคนเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นเหมือนกาวให้เชื้อแบคทีเรียและเชื้อประเภทอื่นๆ ที่อาจจะสัมพันธ์กับการเกิดโรคฟันผุมายึดเกาะและถ้ามีการเสียสมดุลของสภาวะแวดล้อมในช่องปากไปสู่สภาวะที่มีปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดโรคแล้วนั้น ก็จะเกิดโรคฟันผุในที่สุด การสร้างกลูแคนเป็นปัจจัย (virulence factor) ที่สำคัญของเชื้อ *S.mutans* ที่ในการทำให้เกิดฟันผุ (Yamashita et al, 1993) การยึดเกาะของเซลล์บนผิวฟันมี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกขึ้นกับปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างโปรตีนแอสซีชินภายนอกเซลล์กับแอกกลูตินินในน้ำลาย (cell-surface adhesin with the salivary agglutinin) (Jakubovics et al 2005) ขั้นตอนถัดมาสัมพันธ์กับการผลิตกลูแคนที่ทำให้เกิดการจับกลุ่มกันอย่างรวดเร็วของเชื้อ *S.mutans* (clumping) (Islam et al 2007; Shellis et al. 2005) ซึ่งในระหว่างระยะที่เปลี่ยนจาก (transition from) planktonic phase เป็น biofilm phase นั้นเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของยีนหลายๆ ตัว (Jakubovics et al 2005) ซึ่งในการศึกษาต่อไปควรที่จะศึกษาในทั้ง 2 ขั้นตอนในการเกิดไบโอฟิล์มและควรมุ่งเน้นศึกษาว่าการยับยั้งเกิดขึ้นที่ขั้นตอนใด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการที่มีกลูแคนเกี่ยวข้องด้วย และควรที่จะตรวจสอบโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาและแบบอิเล็กตรอนิก เพื่อดูความหนาแน่นของไบโอฟิล์มและตรวจหาผลของผลิตภัณฑ์เหล่านี้กับเอนไซม์ (GtfB Activity)

12. การทดลองบรรจุ capsule จีวรอบที่ 2 เพื่อศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย

ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้บรรจุ capsule lot 2 นี้ ได้เตรียมสูตรตำรับน้ำมัน 4 สูตร คือ สูตร N113 (สูตรความเข้มข้นเดิม คือ น้ำมันมะกรูด 5%), N113 (สูตรความเข้มข้น 5 เท่า คือ น้ำมันมะกรูด 25%), M18 (สูตรความเข้มข้นเดิม คือ น้ำมันมะกรูด 10%), M18 (สูตรความเข้มข้น 5 เท่า คือ น้ำมันมะกรูด 50%) ในปริมาณสูตรละ 3 ลิตร (liquid form) นำไปบรรจุเป็น soft gelatin capsule โดยได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงาน Mega Lifesciences ที่นิคมอุตสาหกรรมบางปู ซึ่งได้ให้ความอนุเคราะห์แพ็คเกจการบรรจุในระหว่างการบรรจุสินค้าทางการค้าให้ ทั้งนี้โดยทำการทดลองตั้งค่าน้ำหนักของ capsule ให้อยู่ที่ 80 มิลลิกรัมโดยใช้น้ำมันทานตะวันก่อน หลังจากนั้นจึงทำการบรรจุ สูตรตำรับเรียงลำดับจากความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยต่ำไปยังความเข้มข้นสูง หลังจากนั้นจึงแบ่งแต่ละสูตรเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นส่วนที่ไม่มีการทำ enteric coating และส่วนที่ 2 ดำเนินการทำ enteric coating

ทำการทดสอบตัวอย่าง capsule จีวที่ได้ทั้ง 8 สูตร เพื่อหาปริมาณสารสำคัญ และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการไอ/เจ็บคอ โดยเปรียบเทียบกับสูตรน้ำมันในรูปของ liquid form

ทำการศึกษาความคงตัวโดยเก็บตัวอย่าง capsule จีว ไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ 75% relative humidity ทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการไอ/เจ็บคอ ของตัวอย่าง capsule จีว ทั้ง 8 สูตร ที่ระยะเวลา 0 เดือน และ 3 เดือน

ผลการวิจัย

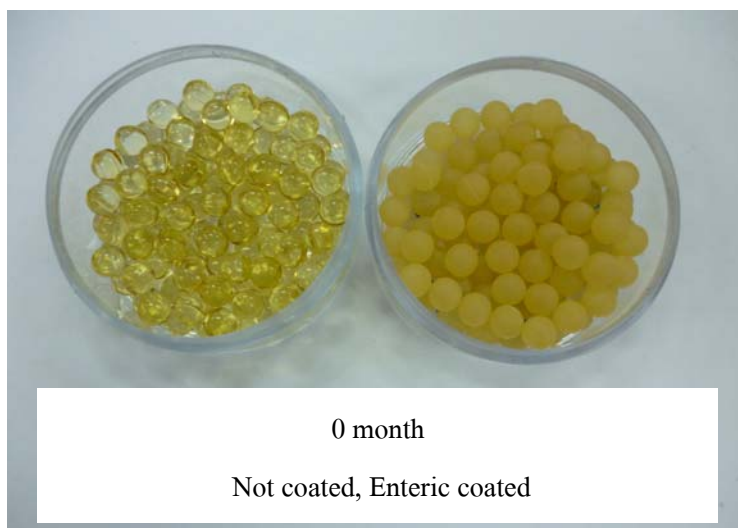
จากการทดลองบรรจุ capsule จีว ครั้งที่ 2 (lot 2) พบว่าได้ผลการบรรจุดังในตารางที่ 162

ตารางที่ 162 น้ำหนักและจำนวนของ capsule จีว (lot 2) ที่ได้จากการบรรจุสูตรตำรับน้ำมันมะกรูดและสูตรตำรับน้ำมันใบมะกรูด

Code	Batch no.	น้ำหนัก capsule จีว (กิโลกรัม)
N113 (X1), not coated	10703 I	2.0020
N113 (X1), enteric coated	10703 I	2.1453
N113 (X5), not coated	10703 J	1.1800
N113 (X5), enteric coated	10703 J	2.1200
M18 (X1), not coated	10703 G	2.2944
M18 (X1), enteric coated	10703 G	2.1261
M18 (X5), not coated	10703 H	2.0296
M18 (X5), enteric coated	10703 H	2.1097

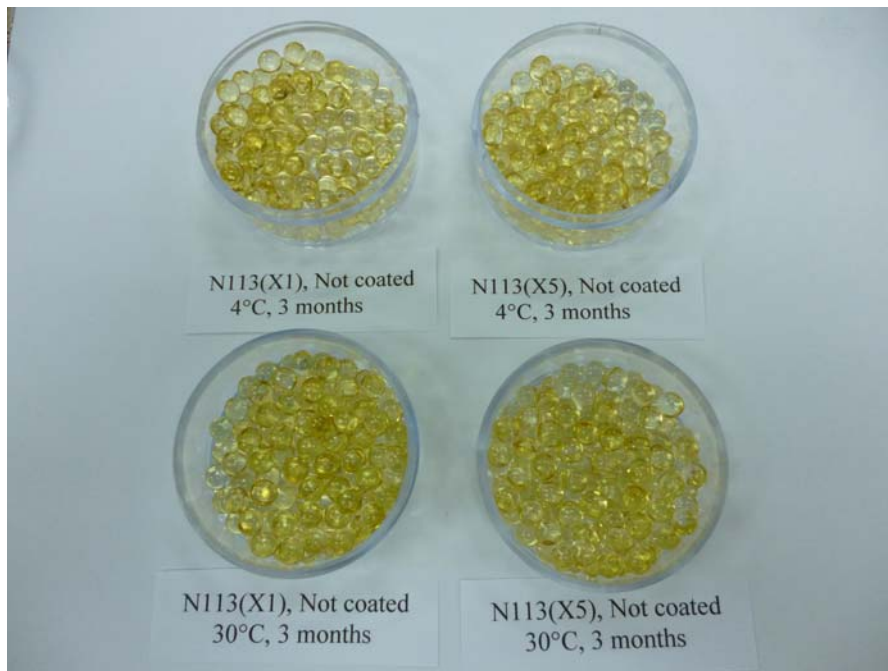
แต่ละ batch เติริมจากสูตรตำรับ 3 ลิตร, (X1) = ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเท่าสูตรของ lot 1, (X5) = ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเป็น 5 เท่าของสูตรของ lot 1

สำหรับลักษณะทางกายภาพของ capsule จีว lot 2 นี้ พบว่า capsule ที่มีการทำ enteric coating ทุกสูตร มีลักษณะเปลือกที่ด้าน ไม่มันใสเหมือนชนิดปกติ (รูปที่ 54) ความแข็งสูง กัดแตกได้ยาก ในคุณสมบัติเหล่านี้จะเป็นข้อเสียอย่างมากสำหรับการนำ capsule ไปใช้ในวัตถุประสงค์เพื่อการอมละลายในปากสำหรับป้องกันฟันผุหรือบรรเทาอาการไอ/เจ็บคอ แนวโน้มที่จะสามารถใช้ capsule ชนิด enteric coated ในการศึกษาขั้นต่อไป น่าจะมีน้อย ในขั้นต่อไปคงเป็นการเปรียบเทียบว่าการเคลือบ capsule นี้ จะสามารถรักษ ปริมาณสารสำคัญให้คงอยู่ได้ดีกว่าชนิดที่ไม่มีการ coat หรือไม่ และการเพิ่มปริมาณน้ำมันหอมระเหยขึ้นเป็น 5 เท่าของสูตรเดิมจะมีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญยังคงเหลืออยู่เพียงพอสำหรับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มหรือไม่

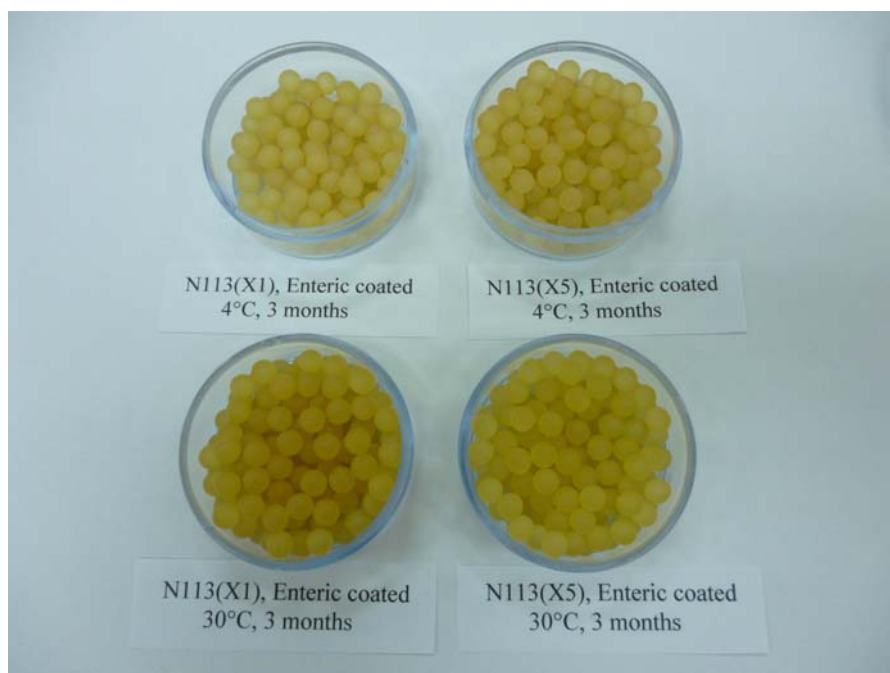


รูปที่ 54 ผลิตรักษณ์ capsule จีว ที่ไม่ได้ผ่านการทำ enteric coating (รูปซ้าย)
และที่มีการทำ enteric coating (รูปขวา) ที่ 0 เดือน

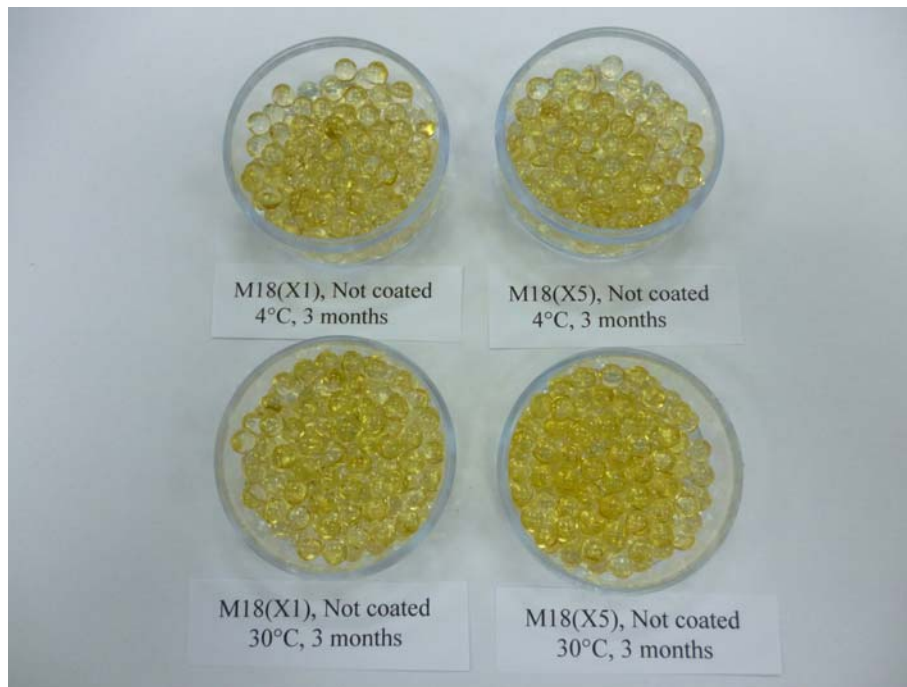
เมื่อเก็บตัวอย่างผลิตรักษณ์ capsule จีวไว้นาน 3 เดือน ที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่า capsule จีวที่ไม่ผ่านการทำ enteric coating นั้น ที่ 4 องศาเซลเซียส เปลือก capsule ไม่ติดกัน สามารถเขย่าให้แยกจากกันได้ ส่วนที่ 30 องศาเซลเซียส เปลือก capsule ติดกันกับ capsule ที่อยู่ติดกัน ไม่สามารถเขย่าให้แยกจากกันได้ เปลือกมีลักษณะนิ่มลง แต่ทุกสูตรยังคงมีสีใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่าง สำหรับ capsule จีวที่ผ่านการทำ enteric coating ทุกสูตร ทั้งสองอุณหภูมิ ยังคงร่วน ไม่ติดกัน เขย่าแยกจากกันได้ ในส่วนของสี มีเพียงสูตร N113(X1) (enteric coated) และ M18(X5) (enteric coated) ที่ 30 องศาเซลเซียสเท่านั้นที่มีสีเข้มขึ้นกว่า ที่ 4 องศาเซลเซียสเล็กน้อย สูตรที่เหลือไม่มีความแตกต่างระหว่าง 4 และ 30 องศาเซลเซียส ดังในรูปที่ 55-58



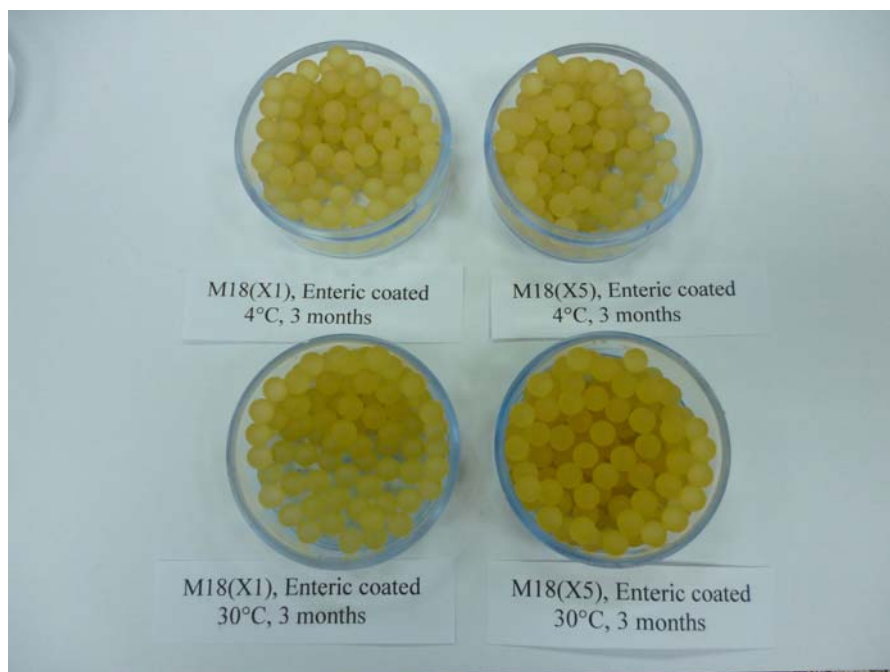
รูปที่ 55 ผลิตรัณฑ์ capsule จีว สูตร N113(X1) และ สูตร N113(X5) ที่ไม่ได้ผ่านการทำ enteric coating เก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน



รูปที่ 56 ผลิตรัณฑ์ capsule จีว สูตร N113(X1) และ สูตร N113(X5) ที่ผ่านการทำ enteric coating เก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน



รูปที่ 57 ผลิตรัณฑ์ capsule จีว สูตร M18(X1) และ สูตร M18(X5) ที่ไม่ได้ผ่านการทำ enteric coating เก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน



รูปที่ 58 ผลิตรัณฑ์ capsule จีว สูตร M18(X1) และ สูตร M18(X5) ที่ผ่านการทำ enteric coating เก็บที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน

12.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ใช้เป็น marker ของน้ำมันมะกรูดหรือน้ำมันใบมะกรูดในผลิตภัณฑ์ capsule จีว

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญซึ่งได้แก่ alpha-terpineol ในผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด 4 สูตร คือ N113(X1) (not coated), N113(X1) (enteric coated), N113(X5)(not coated), N113(X5)(enteric coated) และวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญได้แก่ citronellal ในผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด 4 สูตร คือ M18(X1) (not coated), M18 (X1) (enteric coated), M18(X5)(not coated), M18(X5)(enteric coated) เพื่อเปรียบเทียบและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญของผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บไว้ที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0 และ 3 เดือน โดยวิธีที่ได้ดำเนินการมาแล้วข้างต้น

ผลการวิจัย

จากการทดลอง ได้ standard curve ของ alpha-terpineol และ citronellal ดังแสดงในรูปที่ 59 และ 60 ตามลำดับ (ภาคผนวก ค) การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ capsule จีวจำนวน 8 สูตร ที่ 0 และ 3 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 163

ตารางที่ 163 แสดงปริมาณสารสำคัญ ใน capsule จีว (lot 2) 8 สูตร ในการทดสอบความคงตัวที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0 และ 3 เดือน

ตัวอย่าง	ปริมาณสารสำคัญใน capsule (ppm)*		
	0 เดือน	3 เดือน	
		4°C	30°C
N113(X1), not coated	8.16 A (100%)	6.79 B (83.21%)	6.54 B (80.15%)
N113(X1), enteric coated	5.09 A (100%)	4.12 B (80.94%)	3.71 B (72.89%)
N113(X5), not coated	29.30 A (100%)	22.64 B (77.27%)	20.26 C (69.15%)
N113(X5), enteric coated	31.44 A (100%)	24.53 B (78.02%)	22.89 C (72.81%)
M18(X1), not coated	31.23 A (100%)	25.62 B (82.06%)	18.12 C (58.02%)
M18(X1), enteric coated	22.56 A (100%)	17.81 B (78.95%)	15.69 B (69.55%)
M18(X5), not coated	164.10 A (100%)	124.12 B (75.64%)	94.31 C (57.47%)
M18(X5), enteric coated	124.55 A (100%)	93.54 B (75.10%)	87.84 C (70.53%)

N113---สารสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ คือ α -Terpineol

M18 ---สารสำคัญที่ใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบ คือ Citronellal

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ครั้ง; ในแถวเดียวกัน ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรไม่เหมือนกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

จากตารางที่ 163 จะเห็นได้ว่า ในสูตร N113 คือ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด ในชนิดที่ไม่มีการทำ enteric coating พบว่าการเติมน้ำมันมะกรูดเพิ่มเป็น 5 เท่า จะทำให้ปริมาณสารสำคัญใน N113(X5), not coated เพิ่มขึ้น 3.59 เท่าของ N113(X1), not coated เท่านั้น สำหรับ N113(X5), enteric

coated พบว่าปริมาณสารสำคัญในเพิ่มเป็น 6.18 เท่าของ N113(X1), enteric coated นอกจากนี้ยังพบว่า การทำ enteric coating มีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญลดลง 37.62% (N113(X1), not coated เปรียบเทียบกับ N113(X1), enteric coated) หรือไม่มีการเปลี่ยนแปลง (N113(X5), not coated เปรียบเทียบกับ N113(X5), enteric coated) การเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน มีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญลดลงเหลือประมาณ 70-83% ของสารสำคัญที่ 0 เดือน โดยที่ 30 องศาเซลเซียสจะลดลงมากกว่าเล็กน้อย ในการวิเคราะห์ทางสถิติ โดย ANOVA พบว่าสำหรับ N113(X1), not coated และ N113(X1), enteric coated ใน capsule ชนิดเดียวกัน ปริมาณสารสำคัญที่ 3 เดือน ที่ 2 อุณหภูมิ ไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณที่ 3 เดือนนี้ทั้ง 2 อุณหภูมิแตกต่างจากค่าที่ 0 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่สำหรับ N113(X5), not coated และ N113(X5), enteric coated ใน capsule ชนิดเดียวกัน ค่าเฉลี่ยที่ 0 เดือน และที่ 3 เดือน ทั้ง 2 อุณหภูมิ แตกต่างกันทุกค่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

สำหรับ M18 คือ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด การเพิ่มปริมาณน้ำมันใบมะกรูด 5 เท่า มีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญเพิ่มขึ้นในผลิตภัณฑ์ 5.25 เท่า (M18(X1), not coated เปรียบเทียบกับ M18(X5), not coated) และ 5.52 เท่า (M18(X1), enteric coated เปรียบเทียบกับ M18(X5), enteric coated) นอกจากนี้ยังพบว่าการทำ enteric coating มีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญลดลง 27.76% (M18(X1), not coated เปรียบเทียบกับ M18(X1), enteric coated) และ 24.10% (M18(X5), not coated เปรียบเทียบกับ M18(X5), enteric coated) การเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน มีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญที่ 4 องศาเซลเซียส ลดลงเหลือประมาณ 75-82% ของสารสำคัญที่ 0 เดือน ส่วนที่ 30 องศาเซลเซียสจะลดลงมากกว่าเล็กน้อย คือเหลือปริมาณสารสำคัญ 57-71% ของสารสำคัญที่ 0 เดือน นอกจากนี้ยังพบว่าในชนิดที่ไม่มีการทำ enteric coating มีการลดลงของปริมาณสารสำคัญที่ 30 องศาเซลเซียสมากกว่าชนิดที่มีการทำ enteric coating ในการวิเคราะห์ทางสถิติ โดย ANOVA พบว่าสำหรับ M18 (X1), not coated, M18(X5), not coated และ M18(X5), enteric coated ใน capsule ชนิดเดียวกัน ค่าเฉลี่ยที่ 0 เดือน และที่ 3 เดือน ทั้ง 2 อุณหภูมิ แตกต่างกันทุกค่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วน M18(X1), enteric coated ปริมาณสารสำคัญที่ 3 เดือน ที่ 2 อุณหภูมิ ไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณที่ 3 เดือนนี้ ทั้ง 2 อุณหภูมิแตกต่างจากค่าที่ 0 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

อย่างไรก็ดี วัตถุประสงค์หนึ่งในการดำเนินการเพิ่มเติมเกี่ยวกับการบรรจุ capsule จีว lot 2 คือ ต้องการศึกษาวงจรกระบวนการบรรจุ capsule จีว ซึ่งมีการใช้ความร้อนจะมีผลต่อการสูญเสียของปริมาณสารสำคัญในสูตรน้ำมันที่ใช้บรรจุหรือไม่ แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในการขอแพคเกจบรรจุ ต้องนำสูตรน้ำมันไปรอคิวบรรจุที่โรงงาน ทำให้ระยะเวลาการเตรียมสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุในรูป liquid form และการบรรจุ capsule ในครั้งนี้ห่างกันมากหลายเดือน ทำให้ไม่สามารถดำเนินการวิเคราะห์เปรียบเทียบได้ จึงยังไม่สามารถยืนยันปัญหานี้ได้ ในการทำการศึกษเพิ่มเติมนี้จึงอาจจะสรุปได้ว่า การเพิ่มปริมาณน้ำมันหอมระเหย 5 เท่า จะพบปริมาณสารสำคัญได้เป็น 5 เท่าในผลิตภัณฑ์จากน้ำมันใบมะกรูด แต่พบปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะกรูดได้ไม่ถึง 5 เท่า นอกจากนี้โดยส่วนใหญ่ การทำ enteric coating มีผลทำให้เกิดการสูญเสียของสารสำคัญมากกว่าไม่ทำ enteric coating

12.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ (Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains)

ทำการทดสอบเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์ capsule จีว lot 2 คือ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด 4 สูตร คือ N113(X1) (not coated), N113(X1) (enteric coated), N113(X5)(not coated), N113(X5)(enteric coated) และผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด 4 สูตร คือ M18(X1) (not coated), M18 (X1) (enteric coated), M18(X5)(not coated), M18(X5)(enteric coated) โดยวิธี Disk Diffusion method และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธี Microbroth Dilution method ต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ คือ Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 ที่ 0 เดือน เก็บผลิตภัณฑ์ทั้ง 8 สูตรไว้ที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ 75% relative humidity นาน 3 เดือน และทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ 3 เดือน

ผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการไอ/เจ็บคอ ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว lot 2 ที่ 0 เดือน ได้ผลดังในตารางที่ 164 และที่ 3 เดือน ได้ผลดังในตารางที่ 165

ตารางที่ 164 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการไอ/เจ็บคอ ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว lot 2 คือ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด 4 สูตร คือ N113(X1) (not coated), N113(X1) (enteric coated), N113(X5)(not coated), N113(X5)(enteric coated) และผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด 4 สูตร คือ M18(X1) (not coated), M18 (X1) (enteric coated), M18(X5)(not coated), M18(X5)(enteric coated) ที่ 0 เดือน

No.	Capsules	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619		<i>S. aureus</i> ATCC29213		<i>H. influenzae</i> ATCC49247	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	N113(X1), NC, 0 mo.	32	>32	32	>32	>32	>32	0.5	0.5
2	N113(x5), NC, 0 mo.	32	32	16	32	16	32	0.25	0.25
3	N113(X1), EC, 0 mo.	32	32	32	>32	>32	>32	0.06	0.06
4	N113(x5), EC, 0 mo.	16	32	16	32	16	32	0.03	0.03
5	M18(X1), NC, 0 mo	>32	>32	32	32	>32	>32	0.5	0.5
6	M18(x5), NC, 0 mo.	16	16	16	16	16	32	0.5	0.5
7	M18(X1), EC, 0 mo.	16	32	32	32	>32	>32	0.06	0.125
8	M18(x5), EC, 0 mo	16	16	16	16	16	16	0.06	0.06

N113= 5%KLO, M18= 5%KLLO, (X1) = original concentration of essential oil, (X5) = 5 times of the original concentration of essential oil, NC = not coated, EC = enteric coated, Concentration of µl of oil/ 100 µl of broth.

ตารางที่ 165 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการไอ/เจ็บคอ ของผลิตภัณฑ์ capsule จีว lot 2 คือ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด 4 สูตร คือ N113(X1) (not coated), N113(X1) (enteric coated), N113(X5)(not coated), N113(X5)(enteric coated) และผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด 4 สูตร คือ M18(X1) (not coated), M18 (X1) (enteric coated), M18(X5)(not coated), M18(X5)(enteric coated) ที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ 75% relative humidity ที่ 3 เดือน

No.	Capsules	Group A Streptococci		<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619		<i>S. aureus</i> ATCC29213		<i>H. influenzae</i> ATCC49247	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	N113(x1), NC, 4 °C, 3 mo.	32	>32	32	32	>32	>32	0.5	0.5
2	N113(x5), NC, 4 °C, 3 mo.	32	>32	32	>32	>32	>32	0.25	0.25
3	N113(x1), EC, 4 °C, 3 mo.	32	>32	32	>32	>32	>32	1	1
4	N113(x5), EC, 4 °C, 3 mo.	32	>32	32	>32	>32	>32	1	1
5	M18(X1), NC, 4 °C, 3 mo.	>32	>32	32	>32	>32	>32	0.5	0.5
6	M18(X5), NC, 4 °C, 3 mo.	>32	>32	16	16	>32	>32	0.5	0.5
7	M18(x1), EC, 4 °C, 3 mo.	32	>32	32	32	>32	>32	1	1
8	M18(x5), EC, 4 °C, 3 mo.	16	16	32	32	>32	>32	0.5	0.5
9	N113(x1), NC, 30 °C, 3 mo.	>32	>32	32	>32	>32	>32	1	1
10	N113(x5), NC, 30 °C, 3 mo.	32	>32	>32	>32	>32	>32	1	1
11	N113(x1), EC, 30 °C, 3 mo.	32	>32	32	>32	>32	>32	1	1
12	N113(x5), EC, 30 °C, 3 mo.	32	>32	32	>32	>32	>32	1	1
13	M18(X1) NC, 30 °C, 3 mo.	>32	>32	32	>32	>32	>32	1	1
14	M18(X5), NC, 30 °C, 3 mo.	>32	>32	16	16	>32	>32	1	1
15	M18(x1), EC, 30 °C, 3 mo.	32	>32	32	32	>32	>32	1	1
16	M18(x5), EC, 30 °C, 3 mo.	32	32	32	32	>32	>32	0.5	0.5

By disk diffusion method, all isolates show no inhibition zone.

N113= 5%KLO, M18= 5%KLLO, (X1) = original concentration of essential oil, (X5) = 5 times of the original concentration of essential oil, NC = not coated, EC = enteric coated, Concentration of µl of oil/ 100 µl of broth.

จากตารางที่ 164 ซึ่งเป็นการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของผลิตภัณฑ์ capsule จีว ต่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการไอ/เจ็บคอ ผลิตภัณฑ์ capsule จีวยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อ *H. influenzae* ดีกว่าแบคทีเรียอีก 3 ชนิด (Group A Streptococci, *S. pneumoniae*, *S. aureus*) คือให้ค่า MIC และ MBC ที่ต่ำกว่าแบคทีเรียอีก 3 ชนิดดังกล่าว

ที่ 0 เดือน เมื่อพิจารณาถึงสูตรที่ใช้ความเข้มข้นเดิมของน้ำมันหอมระเหยและความเข้มข้นสูงเป็น 5 เท่า พบว่าฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรีย 3 ชนิด (Group A Streptococci, *S. pneumoniae*, *S. aureus*) มีค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 16 - >32µl/100µl ในส่วนของสูตรน้ำมันมะกรูด (N113) ทั้งหมด มีค่า MIC และ MBC ใกล้เคียงกัน ยกเว้นค่า MIC ของ N113(x5)NC ต่อ *S. pneumoniae*, *S. aureus*, และ MIC ของ

N113(x5)EC ต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ซึ่งมีค่าต่ำกว่า 1 เท่า การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมีแนวโน้มที่จะแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ดีกว่าสูตรที่ใช้ความเข้มข้นเดิม แต่ก็ไม่ได้ให้ค่า MBC ที่แตกต่างกัน สำหรับฤทธิ์ต่อ *H. influenzae* สูตร N113 แสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดี มีค่า MIC & MBC ที่ต่ำ คือ อยู่ระหว่าง 0.03-0.5 $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ ทั้งนี้การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันมะกูด 5 เท่า มีผลทำให้ค่า MIC&MBC ต่ำลง มีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของค่าของสูตรเดิม คือ แสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดีขึ้น ในส่วนของสูตร M18 พบว่า ค่า MIC & MBC ของทุกสูตรต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด (เท่ากับ 16 $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$) มีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของสูตรที่ใช้ความเข้มข้นเดิม (เท่ากับ $\geq 32 \mu\text{l}/100\mu\text{l}$) ยกเว้นค่า MIC ของ M18 ซึ่งผ่านการทำ enteric coating ซึ่งมีค่า MIC & MB เท่ากัน คือ 16 $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ สำหรับฤทธิ์ยับยั้งต่อ *H. influenzae* พบว่า M18 สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าต่อแบคทีเรียอีก 3 ชนิด ทั้งนี้โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างสูตรความเข้มข้นเดิมหรือความเข้มข้น 5 เท่า ยกเว้น MBC ของ M18 ที่มีความเข้มข้น 5 เท่า ซึ่งมีค่าต่ำกว่า เป็นครึ่งหนึ่งของสูตรที่ใช้ความเข้มข้นเท่าเดิม โดยสรุป ที่ 0 เดือน คือ เมื่อบรรจุ capsule จีวใหม่ ๆ สูตร 113 ที่ความเข้มข้นของน้ำมันมะกูด 5 เท่า ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับสูตรความเข้มข้นเดิมต่อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ Group A Streptococci, *S. pneumoniae*, *S. aureus* ส่วนฤทธิ์ต่อ *H. influenzae* สูตร 5 เท่าแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ดีกว่าสูตรความเข้มข้นเดิม สำหรับสูตร M18 ที่ความเข้มข้นของน้ำมันใบมะกูด 5 เท่า มีแนวโน้มที่จะแสดงฤทธิ์ได้ดีกว่าที่สูตรความเข้มข้นเดิม ต่อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ Group A Streptococci, *S. pneumoniae*, *S. aureus* ส่วนฤทธิ์ต่อ *H. influenzae* แตกต่างเฉพาะสูตร 5 เท่าที่มีการทำ enteric coating

ที่ 0 เดือน เมื่อพิจารณาการทำ enteric coating ว่ามีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งอย่างไรหรือไม่ สำหรับสูตร N113 ฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ Group A Streptococci, *S. pneumoniae*, *S. aureus* ค่า MIC & MBC ใกล้เคียงกันทั้งชนิดที่มีการ coat และ ไม่ coat นอกจากนี้ พบว่าเฉพาะฤทธิ์ต่อ *H. influenzae* เท่านั้น ที่ค่า MIC & MBC ของผลิตภัณฑ์ capsule จีวที่มีการทำ enteric coating มีค่าต่ำกว่า คือแสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดีกว่าชนิดที่ไม่ผ่านการทำ enteric coating สำหรับสูตร M18 ไม่ค่อยมีความแตกต่างกันระหว่างสูตรที่มีการ coat และสูตรที่ไม่มีการ coat ในส่วนของฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรีย 3 ชนิด นอกจากนี้ พบว่าเฉพาะฤทธิ์ต่อ *H. influenzae* เท่านั้น ที่ค่า MIC & MBC ของผลิตภัณฑ์ capsule จีวที่มีการทำ enteric coating มีค่าต่ำกว่า คือแสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดีกว่าชนิดที่ไม่ผ่านการทำ enteric coating โดยสรุป คือ การทำ enteric coating มีผลลดฤทธิ์ยับยั้ง *H. influenzae* ได้ดีกว่าชนิดที่ไม่ผ่านการทำ enteric coating

ที่ 3 เดือน เมื่อพิจารณาถึงสูตรที่ใช้ความเข้มข้นเดิมของน้ำมันหอมระเหยและความเข้มข้นสูงเป็น 5 เท่า ที่เก็บไว้ที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้อุณหภูมิ 75% relative humidity พบว่าฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรีย 3 ชนิด (Group A Streptococci, *S. pneumoniae*, *S. aureus*) ของทุกสูตรและทุกอุณหภูมิ มีค่า MIC และ MBC อยู่ระหว่าง 16 - $>32\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ โดยส่วนใหญ่มีค่าเท่ากับ 32 หรือ มากกว่า มีเพียงค่า MIC และ MBC ของ M18(X5)EC4°C (คือสูตรน้ำมันใบมะกูดที่มีความเข้มข้นเป็น 5 เท่า และมีการทำ enteric coat และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส) ต่อ Group A Streptococci, M18(X5)NC4°C (คือสูตรน้ำมันใบมะกูดที่มีความเข้มข้นเป็น 5 เท่า และไม่ผ่านการทำ enteric coat และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส) ต่อ *S. pneumoniae* และ M18(X5)NC30°C (คือสูตรน้ำมันใบมะกูดที่มีความเข้มข้นเป็น 5 เท่า และไม่ผ่านการทำ enteric coat และเก็บที่ 30 องศาเซลเซียส) ต่อ *S. pneumoniae* เท่านั้นที่ยังคงค่า MIC และ MBC ที่

16 $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ โดยรวม การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยไม่ได้ช่วยเพิ่มฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของสูตรต่างๆ ต่อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้ นอกจากนี้ การทำหรือไม่ทำ enteric coating โดยส่วนใหญ่ไม่มีผลช่วยในการคงฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดนี้

ที่ 3 เดือน สำหรับฤทธิ์ต่อ *H. influenzae* ในสูตร N113(X1) NC4°C (คือสูตรน้ำมันมะกุกต์ที่มีความเข้มข้นเดิม และไม่ผ่านการทำ enteric coating และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส) และ N113(X5) NC4°C (คือสูตรน้ำมันมะกุกต์ที่มีความเข้มข้นเป็น 5 เท่า และไม่ผ่านการทำ enteric coating และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่า MIC และ MBC ที่เวลา 3 เดือน เมื่อพิจารณาสูตรที่เก็บที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่า N113(X1) NC30°C (คือสูตรน้ำมันมะกุกต์ที่มีความเข้มข้นเดิม และไม่ผ่านการทำ enteric coating และเก็บที่ 30 องศาเซลเซียส) มีค่า MIC และ MBC สูงขึ้น 1 เท่า แสดงถึงความไม่คงตัวของสารสำคัญที่มีผลด้านเชื้อแบคทีเรีย *H. influenzae* และ N113(X5) NC30°C (คือสูตรน้ำมันมะกุกต์ที่มีความเข้มข้นเป็น 5 เท่า และไม่ผ่านการทำ enteric coating และเก็บที่ 30 องศาเซลเซียส) มีค่า MIC และ MBC สูงขึ้นถึง 4 เท่า แสดงถึงความไม่คงตัวของสารสำคัญที่มีผลด้านเชื้อแบคทีเรีย *H. influenzae* เช่นกัน ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเป็น 5 เท่าแม้จะให้ค่า MIC และ MBC ที่ดีกว่าสูตรความเข้มข้นเดิมที่ 0 เดือน แต่ก็ไม่ได้ช่วยให้ฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียดีขึ้นกว่าสูตรความเข้มข้นเดิม หลังจากระยะเวลา 3 เดือน การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยขึ้น 5 เท่าจึงไม่ใช่การแก้ปัญหการสูญเสียของฤทธิ์ด้านแบคทีเรียที่คาดว่าจะมีการสูญเสียเนื่องมาจากความร้อนจากกระบวนการผลิต แคปซูล เมื่อพิจารณาสูตรที่มีการทำ enteric coating สำหรับสูตร N113(X1) EC4°C (คือสูตรที่มีความเข้มข้นเดิม และผ่านการทำ enteric coating และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส) ที่ 3 เดือน ค่า MIC และ MBC เปลี่ยนแปลง สูงขึ้นมาก จาก 0.06 เป็น 1 $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ ส่วน N113 (X1) EC30°C (คือสูตรที่มีความเข้มข้นเดิม และผ่านการทำ enteric coating และเก็บที่ 30 องศาเซลเซียส) ที่ 3 เดือน พบว่ามีค่าเช่นเดียวกับสูตรผ่านการทำ enteric coating ที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส 3 เดือน และเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรที่ไม่ผ่านการทำ enteric coating จะเห็นได้ว่าการทำ enteric coating ไม่ได้ช่วยแก้ปัญหการสูญเสียของฤทธิ์ด้านแบคทีเรียที่คาดว่าจะมีสาเหตุมาจากความร้อนจากกระบวนการผลิต แต่ยังมีผลทำให้สูตรที่มีการทำ enteric coating มีค่า MIC และ MBC ที่ 3 เดือน ที่สูงกว่าสูตรที่ไม่มีการทำ enteric coating ซึ่งหมายความว่า การเพิ่มกระบวนการทำ enteric coating ทำให้สูตรน้ำมันหอมระเหย (N113) มีการสูญเสียมากขึ้นกว่าสูตรที่ผ่านเฉพาะกระบวนการบรรจุแคปซูล สำหรับสูตร M18 มีความคงตัวดีกว่า N113 สูตร M18 ซึ่งไม่ผ่านการทำ enteric coating ที่ 3 เดือน สูตรที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่า MIC และ MBC แต่สูตรที่เก็บที่ 30 องศาเซลเซียส ค่า MIC และ MBC สูงขึ้น 1 เท่า ส่วนสูตรที่มีการทำ enteric coating แม้ว่าที่ 0 เดือน จะมีค่า MIC และ MBC ที่ต่ำ คือดีกว่าสูตรที่ไม่ผ่านการทำ enteric coating แต่ที่ 3 เดือน โดยส่วนใหญ่ กลับมีค่า MIC และ MBC สูงกว่า ที่ 0 เดือน ทั้งสูตรที่ผ่านและไม่ผ่านการทำ enteric coating คือ ให้ผลคล้ายคลึงกับสูตร N113

โดยสรุป ความพยายามในการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยลงในสูตรน้ำมันเป็น 5 เท่า และการทดลองทำ enteric coating เพื่อชะลอการสูญเสียของสารสำคัญที่คาดว่าจะมีสาเหตุมาจากกระบวนการบรรจุแคปซูล ไม่ได้ผลตามที่คาดหวังไว้ คือไม่สามารถชะลอหรือป้องกันการสูญเสียได้

เป็นการยืนยันผลการทดลองเดิมที่ได้ดำเนินการไปก่อนหน้านี้ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่ให้ผลดีชัดเจนคือ ฤทธิ์ต่อ *H. influenzae* ซึ่งแม้ว่าจะมีการสูญเสียของสารสำคัญไปซึ่งคาดว่าจะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการบรรจุแคปซูล ผลลัพธ์ก็ยังคงให้ค่า MIC และ MBC ที่ดีต่อแบคทีเรียนี้ ข้อดีของผลิตภัณฑ์ capsule จีว คือความสะดวกในการพกพา ส่วนในด้านศักยภาพโดยรวมในการพัฒนาต่อไป มีแนวโน้มที่ไม่ดีเท่าผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก

13. การทดสอบสารมาตรฐานถึงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ (งานที่ดำเนินการเพิ่มเติมต่างหาก จากงานที่เสนอไว้ในแบบเสนอโครงการวิจัย)

ทำการทดสอบสารมาตรฐาน 4 ชนิด คือ D-limonene, Terpinene-4-ol, α -terpineol ที่พบเป็นสารสำคัญในน้ำมันมะกรูด และ Citronellal ที่พบเป็นสารสำคัญในน้ำมันใบมะกรูด (สารมาตรฐานได้จาก Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยเปรียบเทียบกับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วยจากโรงพยาบาลศิริราช จำนวน 359 ตัวอย่าง ได้แก่ Group A, B, C, F, G streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* (MRSA และ MSSA)

ดำเนินการทดสอบโดยวิธี Disk diffusion โดยใช้ตัวอย่าง 10 μ L และทดสอบหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี Broth microdilution ด้วย serial dilution ในช่วง 0.015-8%v/v ใน microtiter plate ทั้งนี้โดยการเติม Tween20 ในปริมาณ 0.25%v/v ลงใน broth ด้วย ทดสอบหาค่า MBC ต่อเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยใช้ blood agar/chocolate agar ทั้งนี้โดยมี *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49247 และ *S. aureus* ATCC 25923 เป็น quality control คำนวณค่า MIC และ MBC โดยอาศัย Density ของสารมาตรฐานและของน้ำมันหอมระเหย ดังนี้ Citronellal (density = 0.857 g/ml), D-limonene (density = 0.84 g/ml), terpinene-4-ol (density = 0.933 g/ml), α -terpineol (density = 0.94 g/ml), น้ำมันมะกรูด (density = 0.857 g/ml), น้ำมันใบมะกรูด (density = 0.87 g/ml)

ผลการวิจัย

จากการทดสอบสารมาตรฐาน 4 ชนิด คือ D-limonene, Terpinene-4-ol, α -terpineol ที่พบเป็นสารสำคัญในน้ำมันมะกรูด และ Citronellal ที่พบเป็นสารสำคัญในน้ำมันใบมะกรูด โดยเปรียบเทียบกับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย พบว่าได้ผลดังในตารางที่ 166 และ 167

ตารางที่ 166 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย ของสารมาตรฐาน D-limonene, Terpinene-4-ol, α -terpineol โดยเปรียบเทียบกับน้ำมันมะกรูด

Pathogens	Limonene			Terpinene-4-ol		α -terpineol		Kaffir lime oil		
	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>H. influenzae</i>	12	67.2	67.2	0.15	0.3	0.07	0.07	17	0.3	0.3
Gr.A streptococci	6	>134.4	>134.4	1.25	2.5	0.6	0.6	14	2.2	2.2
Gr.B streptococci	7	>134.4	>134.4	0.3	0.6	0.6	0.6	11	4.4	4.4
Gr.C streptococci	6	>134.4	>134.4	0.15	0.15	0.6	0.6	12	4.4	4.4
Gr.F streptococci	6	>134.4	>134.4	1.25	2.5	1.2	1.2	15	1.1	1.1
Gr.G streptococci	6	>134.4	>134.4	0.15	0.3	1.2	1.2	13	4.4	4.4
<i>S. pneumoniae</i>	11	33.6	67.2	0.15	0.15	0.3	0.3	20	0.3	0.3
<i>S. aureus</i> (MRSA)	6	>134.4	>134.4	2.5	5	2.4	2.4	20	2.2	2.2
<i>S. aureus</i> (MSSA)	6	>134.4	>134.4	10	20	2.4	2.4	21	4.4	4.4
<i>A. baumannii</i>	6	>134.4	>134.4	5	5	0.07	0.1	22	1.1	1.1
<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	12	67.2	67.2	5	5	0.07	0.07	17	0.1	0.1
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	8	67.2	>134.4	2.5	2.5	0.6	0.6	16	0.5	0.5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	11	>134.4	>134.4	10	20	0.3	1.2	26	1.1	1.1

ตารางที่ 167 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย ของสารมาตรฐาน Citronellal โดยเปรียบเทียบกับน้ำมันใบมะกรูด

Pathogens	Citronellal			Kaffir lime leaf oil		
	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>H. influenzae</i>	20	0.5	0.5	21	0.3	0.3
Gr.A streptococci	15	0.5	1.1	16	4.3	4.3
Gr.B streptococci	10	1.1	1.1	11	4.3	4.3
Gr.C streptococci	15	0.3	0.5	15	4.3	4.3
Gr.F streptococci	17	1.1	1.1	17	2.1	8.5
Gr.G streptococci	15	1.1	1.1	16	4.3	4.3
<i>S. pneumoniae</i>	24	0.5	0.5	24	0.3	0.3
<i>S. aureus</i> (MRSA)	15	1.1	8.57	15	8.5	34
<i>S. aureus</i> (MSSA)	14	1.1	8.57	14	4.3	34
<i>A. baumannii</i>	13	1.1	4.3	10	8.5	8.5
<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	20	0.3	0.5	22	0.5	0.5
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	23	0.5	0.5	23	0.5	0.5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	22	1.1	1.1	19	1.1	1.1

จากตาราง 165 จะเห็นได้ว่า สารมาตรฐาน D-limonene ((+)-form) ในการทดสอบ (D-limonene ((+)-form เป็นสารมาตรฐานในชื่อ Limonene ที่มีจำหน่ายทางการค้า) ให้ค่า MIC และ MBC ที่สูงมาก ซึ่งแสดงว่า D-limonene ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการเจ็บคอและไอ จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วย GC-MS ในน้ำมันมะกรูดในขั้นตอนแรกๆ ของโครงการวิจัยนี้ พบว่า สารสำคัญที่มีปริมาณสูงสุด คือ Limonene ((-)-form) (Limonene (-)-form ไม่มีจำหน่ายเป็นสารมาตรฐานในทางการค้า) ซึ่งพบอยู่ในปริมาณ 40.65% หาก Limonene ในรูป (+)-form และ (-)-form ซึ่งมีสูตรทางเคมีเหมือนกัน ให้ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่คล้ายคลึงกันหรือไม่แตกต่างกัน ก็อาจสรุปได้ว่าฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่ได้มาจาก Limonene ดังนั้นจึงคาดว่าฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้น่าจะมาจากสารสำคัญอื่นที่มีอยู่ในน้ำมันมะกรูด ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของสาร

มาตรฐานอีก 2 ชนิด คือ Terpinene-4-ol, และ α -terpineol พบว่าสารมาตรฐานทั้ง 2 ชนิดนี้ให้ค่า MIC และ MBC ที่ต่ำ แสดงถึงฤทธิ์ที่ดีในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ คือ *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, Streptococci group ต่างๆ, *A. baumannii*, *S. aureus* MRSA, MSSA จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วย GC-MS ในน้ำมันมะกรูดในขั้นตอนแรกของโครงการวิจัยนี้ พบว่า สารสำคัญที่พบในปริมาณที่รองลงไปจาก Limonene คือ Terpinen-4-ol และ α -terpineol ในปริมาณเท่ากับ 13.71% และ 13.20% ตามลำดับ อาจสรุปได้ว่าน้ำมันมะกรูดแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ โดยมี Terpinen-4-ol และ α -terpineol เป็นสารสำคัญออกฤทธิ์ดังกล่าว

จากตารางที่ 166 สารมาตรฐาน Citronellal แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งหลายในกลุ่มนี้ได้ดีเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะต่อ *H. influenzae* และ *S. pneumonia* จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญด้วย GC-MS ในน้ำมันใบมะกรูดในขั้นตอนแรกของโครงการวิจัยนี้ พบว่า สารสำคัญที่พบอยู่ในปริมาณสูงสุด คือ Citronellal ซึ่งพบอยู่ในปริมาณสูงถึง 80.04% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าน้ำมันใบมะกรูดแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ โดยมี Citronellal เป็นสารสำคัญออกฤทธิ์ดังกล่าว

14. การทดสอบผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายในทางการค้าถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ (งานที่ดำเนินการเพิ่มเติมต่างหาก จากงานที่เสนอไว้ในแบบเสนอโครงการวิจัย)

14.1 การทดสอบผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายในทางการค้าถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ

ทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า คือ Kamillosan® ถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ATCC 25775 และ *Streptococcus mutans* 14 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากผู้ป่วย โดยเตรียมความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10%v/v (100 μ l/ml) และทดสอบฤทธิ์ด้านการเจริญของเชื้อ โดยวิธี two-fold serial dilution

ผลการวิจัย

การทดสอบผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า คือ Kamillosan® ได้ผลฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S.mutans* ที่เป็น standard strain 1 สายพันธุ์ และที่เป็น clinical isolates อีก 14 สายพันธุ์ ดังในตารางที่ 168 โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ Kamillosan® ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด จำนวน 6 สูตร

ตารางที่ 168ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. mutans* ที่เป็น standard strain 1 สายพันธุ์ และที่เป็น clinical isolates อีก 14 สายพันธุ์ ของผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า คือ Kamillosan® เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด

<i>S.mutans</i>		ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (%v/v)						
Clinical isolates	Standard strain	Kamillosan	6%KLO	10%KLO	13%KLO	4%KLLO	8%KLLO	12%KLLO
No. 6		10	6.25	3.125	1.56	3.125	1.56	0.78
No. 7		5	6.25	6.25	3.125	3.125	3.125	1.56
No. 8		2.5	6.25	6.25	1.56	3.125	1.56	0.78
No. 9		10	6.25	6.25	3.125	3.125	1.56	0.78
No. 10		5	6.25	3.125	3.125	3.125	1.56	0.78
No. 13		5	6.25	3.125	3.125	3.125	1.56	0.78
No. 14		5	6.25	6.25	3.125	3.125	1.56	0.78
No. 15		2.5	1.56	1.56	0.78	1.56	0.78	0.39
No. 16 *		>10	6.25	6.25	3.125	3.125	3.125	0.78
No.16 **		10	1.56	0.78	0.78	3.125	1.56	0.78
No. 18		10	3.125	3.125	3.125	3.125	1.56	0.78
No. 19		10	6.25	3.125	3.125	3.125	1.56	0.78
No. 20		5	6.25	6.25	3.125	3.125	1.56	0.78
No. 21		5	6.25	6.25	3.125	3.125	1.56	0.78
	ATCC 25175	5	3.125	1.56	0.39	1.56	0.78	0.39

* = แดง, ** = ฟ้า

จากตาราง จะเห็นได้ว่า ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด ทั้ง 6 สูตร สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S.mutans* ที่เป็น standard strain 1 สายพันธุ์ ด้วยความเข้มข้นที่ต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า คือ Kamillosan® และ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S.mutans* ที่เป็น clinical isolates อีก 14 สายพันธุ์ ด้วยความเข้มข้นที่ต่ำกว่า (คือ สูตร 12%KLLO, 8%KLLO, 13%KLO) หรือใกล้เคียงกับ ผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า คือ Kamillosan® ดังนั้นการที่ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดที่ได้พัฒนาขึ้นแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า น่าจะเป็นแนวโน้มที่ดีในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

14.2 การทดสอบผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายในทางการค้าถึงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ

ทำการทดสอบผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า คือ Kamillosan® ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธี Microbroth Dilution method ต่อเชื้อ

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ คือ Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247

ผลการวิจัย

การทดสอบผลิตภัณฑ์ชนิดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า คือ Kamillosan® โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) โดยวิธี Microbroth Dilution method ต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ คือ Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 ดังในตารางที่ 169 โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ Kamillosan® ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ชนิดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด จำนวน 6 สูตร

ตารางที่ 169 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ คือ Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 ของผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า คือ Kamillosan® เปรียบเทียบกับ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด

Cultures	Kamillosan®		6%KLO		10%KLO		13%KLO		4%KLLO		8%KLLO		12%KLLO	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Group A streptococci	8	8	4	4	4	4	4	4	8	8	4	4	4	4
<i>S. pneumoniae</i> 49619	8	8	2	2	1	1	1	1	4	4	0.5	0.5	0.25	0.25
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	4	16	16	16	16	16	8	16	8	8	8	8	8	8
<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	8	8	0.5	1	0.5	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5	1	0.5

MIC, MBC (%v/v)

จากตารางที่ 169 จะเห็นได้ว่า ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ทั้ง 6 สูตร แสดงฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ ดังนี้

สำหรับ Gr. A streptococci ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด 5 สูตร (6%KLO,10%KLO,13%KLO,8%KLLO,12%KLLO) มีค่า MIC และ MBC (4%v/v) ต่ำกว่า ค่า MIC และ MBC ของ Kamillosan® (8%v/v) 1 เท่า ส่วนอีก 1 สูตรคือ 4%KLLO มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ Kamillosan®

สำหรับ *S. pneumoniae* 49619 ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ทั้ง 6 สูตร มีค่า MIC และ MBC ต่ำกว่า ของ Kamillosan® ทั้งหมด ทั้งนี้ ค่า MIC และ MBC ของสูตรต่างๆ เรียงลำดับจากน้อยไปมาก ดังนี้ 12%KLLO (0.25%v/v), 8%KLLO (0.5%v/v), 10%KLO, 13%KLO (1%v/v), 10%KLO (2%v/v), 4%KLLO (4%v/v), Kamillosan (8%v/v)

สำหรับ *S. aureus* ATCC 29213 Kamillosan® มีค่า MIC (4%v/v) ต่ำกว่า ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ทั้ง 6 สูตร (MIC = 8-16%v/v) แต่ค่า MBC (16%v/v) สูงกว่าหรือเท่ากับ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ทั้ง 6 สูตร

สำหรับ *H. influenzae* ATCC 49247 ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด มีค่า MIC และ MBC (0.25-1%v/v) ต่ำกว่าค่า MIC และ MBC (8%v/v) ของ Kamillosan® มาก

โดยสรุป เนื่องจาก Kamillosan® เป็นผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในช่องปาก ที่แพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านหู คอ จมูก นิยมสั่งจ่ายให้แก่ผู้ป่วยที่มีอาการเจ็บคอเบื้องต้น ซึ่งผู้ป่วยยังไม่แสดงอาการติดเชื้ออย่างชัดเจน โดยคาดหวังฤทธิ์ในการบรรเทาอาการอักเสบในคอ และฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียด้วย ในปัจจุบันยังไม่มีผลิตภัณฑ์ใดที่ใช้งานได้ดีและเป็นที่ยอมรับเท่า Kamillosan® จากการศึกษาเปรียบเทียบนี้ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ทั้ง 6 สูตร แสดงฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอได้ดีกว่า Kamillosan® ในกลุ่มของ Gr. A streptococci และ standard strains 2 strains ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 และ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 และให้ผลยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียงกับ Kamillosan® ในกลุ่มของ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด น่าจะมีศักยภาพที่ดีในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้บรรเทาอาการเจ็บคอและไอ ในเบื้องต้นได้ ซึ่งจะเป็นการช่วยประหยัดเงินตราที่ต้องเสียไปในการสั่งซื้อผลิตภัณฑ์ Kamillosan® จากต่างประเทศ จะเป็นการช่วยลดดุลการค้าและส่งเสริมการปลูก การใช้ และการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรไทยได้อีกทางหนึ่ง

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์ capsule จีว และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด และน้ำมันใบมะกรูด สำหรับใช้ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ (*Streptococcus mutans* และอื่นๆ) และที่ทำให้เกิดอาการไอและเจ็บคอ (Gr. A streptococci และอื่นๆ)

น้ำมันหอมระเหย การวิเคราะห์โดย GC-MS พบว่า สารสำคัญหลักในน้ำมันมะกรูด คือ l-Limonene (40.65%) รองลงมา คือ Terpinene-4-ol (13.71%) และ Alpha-Terpineol (13.20%) สำหรับ สารสำคัญหลักในน้ำมันใบมะกรูด คือ Citronellal (80.04%) ผลการยับยั้ง *S. mutans* ATCC 25175 และ clinical isolates พบว่าน้ำมันใบมะกรูดแสดงฤทธิ์ยับยั้งที่แรงกว่าน้ำมันมะกรูด โดยน้ำมันใบมะกรูด มีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.007 – 1 %v/v ส่วนน้ำมันมะกรูดมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.125 - >1% v/v โดยส่วนใหญ่พบว่าเชื้อ *S. mutans* มีความไวต่อน้ำมันมะกรูดที่ความเข้มข้น 1% v/v สำหรับใน clinical isolates ของเชื้อที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ โดยวิธี Disk diffusion method พบว่าโดยส่วนใหญ่ น้ำมันใบมะกรูดจะให้ Inhibition zone ที่กว้างกว่าน้ำมันใบมะกรูดเล็กน้อย ส่วนผลการทดสอบ โดย Microbroth dilution method พบว่า น้ำมันมะกรูด (MIC = 0.125-2%v/v, MBC = 0.125-2%v/v)) ให้ผลยับยั้ง ดีกว่าน้ำมันใบมะกรูด (MIC = 0.125-8%v/v, MBC = 0.125-8%v/v)) ใน *S. pyogenes* (group A streptococci) (61 isolates), *S. aureus* (MRSA) (50 isolates), *S. aureus* (MSSA) (50 isolates), *Acinetobacter baumannii* (50 isolates) และในแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ

การศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด --

--**สูตรตำรับน้ำมัน**เป็น oil-based ได้สูตรตำรับ 6 ตำรับ คือ N112, N113, N129 ประกอบด้วย น้ำมันมะกรูด (5, 5, 10 %w/w), Spearmint oil, Peppermint oil, Menthol, Sunflower oil ส่วนสูตร M16, M17, M18 ประกอบด้วย น้ำมันใบมะกรูด (5 %w/w ในทั้ง 3 สูตร) และส่วนประกอบอื่น มี ค่า MIC และ MBC ต่อ เชื้อมาตรฐาน *S. mutans* ATCC25175 ในช่วงความเข้มข้น 2.5 และ >2.5-5%v/v ตามลำดับ, *S. sobrinus* ATCC 33402 ในช่วงความเข้มข้น >2.5-5%v/v ทั้งสองค่า, *L. casei* ATCC 36978 ในความเข้มข้น >2.5%v/v ทั้งสองค่า ส่วนสูตรตำรับน้ำมันใบมะกรูดที่จะบรรจุใน capsule จีว 3 สูตรตำรับ มีค่า MIC และ MBC ต่อ เชื้อมาตรฐาน *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. casei* ในความเข้มข้น >2.5%v/v เท่ากันทุกค่า

--**ผลิตภัณฑ์ capsule จีว** การทดลองบรรจุในรูปแบบ soft gelatin capsule รวม 6 สูตรตำรับ สามารถบรรจุในขนาด 80 มิลลิกรัม (6 สูตร) และ 40 มิลลิกรัม (2 สูตร) ลักษณะกลมคล้ายเม็ดสาเก สีเหลืองอ่อนในใส เปลือก capsule ไม่อ่อนนุ่มเท่าผลิตภัณฑ์ capsule จีวที่มีจำหน่ายทางการค้า (Jintan) และละลายยากกว่า การศึกษา

ความคงตัวของผลิตภัณฑ์ capsule จีว ขนาด 80 มิลลิกรัม จำนวน 6 สูตรตำรับ ที่อุณหภูมิ 4, 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 75% Relative Humidity และเก็บตัวอย่างที่ 0, 1, 2, 6, 14 เดือน

-----การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญที่ใช้เป็น markers ของน้ำมันมะกรูด (α -terpineol) หรือน้ำมันใบมะกรูด (citronellal) โดยใช้ GC-MS พบว่ามีปริมาณสารสำคัญลดลงอย่างมากใน capsule จีว (ที่ 0, 1, 2 เดือน) โดยลดลงเหลือเพียง 13.77-19.02% และ 14.63-19.27% ของสารสำคัญของรูป liquid form สำหรับที่ 6 และ 14 เดือน ปริมาณสารสำคัญของ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด 3 สูตรจะลดลงอีกจนเหลือเพียง 6.84-9.27% และ 5.62-7.34% หลังระยะเวลา 14 เดือนที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด 3 สูตร ลดลงจากที่ระยะ 2 เดือน ลงเหลือเพียง 7.34-8.31% และ 3.01-8.97% หลังระยะเวลา 14 เดือน ที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

-----การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ การทดสอบใน standard strains 3 strains โดยวิธี Microbroth dilution method พบว่า ไม่สามารถหาค่า MIC & MBC ของ capsule ได้ สำหรับการทดสอบ clinical isolates ของ *S. mutans* 14 สายพันธุ์ พบว่าแสดงฤทธิ์ที่อ่อนมาก นอกจากนี้ก็ยังมีปัญหาเกิดการแยกชั้นส่วนน้ำมันและส่วนน้ำในระหว่างการทดสอบ

-----การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ ผลิตภัณฑ์ capsule จีว ที่ 0 เดือน แสดงฤทธิ์ที่ไม่แรงในการทดสอบใน Gr. A streptococci, *S. pneumoniae* ATCC 49619, และ *S. aureus* ATCC 29213 แต่แสดงฤทธิ์การต้านเชื้อที่ดีกว่าต่อ *H. influenzae* (MIC = 1-2%v/v, MBC = 2-4%v/v) โดยที่ liquid form (MIC = 0.125-1%v/v, MBC = 0.125-2%v/v) จะแสดงฤทธิ์ที่แรงกว่าในรูป capsule ส่วนที่ 1, 2 เดือน พบว่า ฤทธิ์ลดต่ำสำหรับเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิดแรก แต่ฤทธิ์ต่อ *H. influenzae* ยังคงลดไม่มาก ที่ระยะเวลา 6 เดือน ผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันมะกรูด N112, N113, N129 ยังคงให้ผลยับยั้งต่อ *H. influenzae* ATCC 49247 (MIC = 4 - >16%v/v, MBC = 4 - >16%v/v) ดีกว่าต่อเชื้อแบคทีเรียอีก 3 ชนิด ส่วนผลิตภัณฑ์ capsule จีวจากน้ำมันใบมะกรูด M16, M17, M18 ยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดีต่อ *H. influenzae* ATCC 49247 ทั้งที่ 4 และ 30 องศาเซลเซียส โดยค่า MIC = 0.5-1%v/v & MBC = 1%v/v และ MIC = 2-4%v/v & MBC = 4%v/v ตามลำดับ ที่ 14 เดือน พบว่า ฤทธิ์ยับยั้งต่อ *H. influenzae* ลดลงกว่าเมื่อ 6 เดือนมาก คงเหลือเพียง N129 ที่ 4 องศาเซลเซียส และ M16, M17 ที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งยังคงให้ค่า MIC & MBC เท่ากับ 8, 8, และ 16%v/v ตามลำดับ

-----การทดลองบรรจุ capsule จีว ครั้งที่ 2 โดยการเพิ่มปริมาณน้ำมันหอมระเหยเป็น 5 เท่า เปรียบเทียบกับขนาดความเข้มข้นเดิม และมีการทดลองทำ enteric coating โดยคาดหวังว่าจะชะงักหรือลดการสูญเสียปริมาณสารสำคัญได้ พบว่า capsule ที่มีการทำ enteric coating ทุกสูตร มีลักษณะเปลือกที่ด้าน ไม่มันใสเหมือนชนิดปกติ ความแข็งสูง กัดแตกได้ยาก ซึ่งจะเป็นข้อเสีย สำหรับการเพิ่มปริมาณน้ำมัน 5 เท่า มีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญเพิ่มขึ้นในผลิตภัณฑ์มากกว่า 5 เท่า (สำหรับสูตรน้ำมันใบมะกรูด) หรือน้อยกว่า (สำหรับสูตรน้ำมันมะกรูด) นอกจากนี้ยังพบว่าการทำ enteric coating มีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญลดลงหรือไม่เปลี่ยนแปลง การเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 เดือน มีผลทำให้ปริมาณสารสำคัญลดลง การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของ

อาการไอ/เจ็บคอ ยังคงแสดงฤทธิ์ยับยั้งต่อ *H. influenzae* ดีกว่า แบคทีเรียอีก 3 ชนิด แม้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเป็น 5 เท่า จะให้ค่า MIC และ MBC ที่ดีกว่าสูตรความเข้มข้นเดิมที่ 0 เดือน แต่หลังจากระยะเวลา 3 เดือน ก็ไม่ได้ช่วยให้ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียดีขึ้นกว่าสูตรความเข้มข้นเดิม นอกจากนี้พบว่า การทำ enteric coating กลับมีผลทำให้มีค่า MIC และ MBC ที่ 3 เดือน ที่สูงกว่า คือฤทธิ์อ่อนกว่า สูตรที่ไม่มีการทำ enteric coating ข้อดีของผลิตภัณฑ์ capsule จีว คือความสะดวกในการพกพา ส่วนในด้านศักยภาพโดยรวมในการพัฒนาต่อไป มีแนวโน้มที่ไม่ดีเท่าผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก

การศึกษาพัฒนาสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด
ได้สูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากทั้งหมด 6 สูตรตำรับ โดยผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะกรูด 3 สูตรตำรับ (KLO) มีปริมาณน้ำมันมะกรูดเท่ากับ 6, 10, 16 %v/v (ต่อมาได้ปรับความเข้มข้นสูงสุดลดลงเหลือ 13%v/v) ส่วนสูตรตำรับจากน้ำมันใบมะกรูด 3 สูตรตำรับ (KLLO) มีปริมาณน้ำมันใบมะกรูด 4, 8, 12 %v/v ส่วนประกอบอื่นๆ ประกอบด้วย Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil, Acesulfame-K, menthol, สารแต่งสี และสารแต่งกลิ่น

--การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ ที่แยกได้จากผู้ป่วย (clinical isolates ของ *S. mutans* 14 สายพันธุ์) พบว่า ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก จำนวน 6 สูตร มีช่วงค่า MIC ในภาพรวมเท่ากับ 0.39-6.25%v/v

--การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย (Gr. A streptococci clinical isolates 5 ตัวอย่าง) พบว่า ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด (10%KLO, MIC&MBC = 0.5-2%v/v) และน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO, MIC&MBC = 0.25-1%v/v) แสดงฤทธิ์ยับยั้งที่ดีกว่า Liquid form (N113, M18), ผลิตภัณฑ์ capsule จีว (N113, M18)

--การศึกษาคงตัวของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก จำนวน 6 สูตรตำรับ คือ 6, 10, 13% KLO (จากน้ำมันมะกรูด) และ 4, 8, 12%KLLO (จากน้ำมันใบมะกรูด) ที่ 4, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 75% Relative Humidity ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4 เดือน

-----การศึกษาปริมาณสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก จำนวน 2 สูตรตำรับ คือ 10% KLO (จากน้ำมันมะกรูด) และ 12%KLLO (จากน้ำมันใบมะกรูด) ซึ่งมีแนวโน้มที่จะนำไปพัฒนาต่อไปได้ พบว่าที่อุณหภูมิการเก็บ 4 องศาเซลเซียส สูตร 10% KLO และ สูตร 12% KLLO มีปริมาณสารสำคัญที่ใช้เป็น markers ลดต่ำในอัตราเร็วที่คล้ายคลึงกัน คือ ปริมาณสารสำคัญลดลงเหลือ 82.01 และ 80.06 % ตามลำดับที่ระยะเวลา 4 เดือน (เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่ 0 เดือน) ทั้งนี้สูตรทั้งสองน่าจะมีลักษณะความคงตัวคล้ายคลึงกันที่อุณหภูมิต่ำ สำหรับที่ 30 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 1 เดือน ยังไม่เห็นความแตกต่างระหว่างผลิตภัณฑ์ 2 กลุ่ม แต่จะเริ่มเห็นความแตกต่างระหว่างสูตรทั้งสอง คือ สูตร 12%KLLO มีอัตราการสูญเสียของสารสำคัญที่เร็วกว่า สูตร 10%KLO ที่ระยะเวลา 2 เดือน ต่อจากนั้น ทั้ง 2 สูตรก็จะมีปริมาณสารสำคัญลดลงไปเรื่อยๆ จนถึงระยะเวลา 4 เดือน ปริมาณสารสำคัญของสูตร 10%KLO และ

สูตร 12% KLLO ลดลงเหลือ 74.77 % และ 60.82 % ตามลำดับ สารสำคัญของสูตรน้ำมันใบมะกรูด (สูตร 12% KLLO) จะมีการสูญเสียไปมากกว่าสารสำคัญของสูตรน้ำมันมะกรูด (สูตร 10% KLO) ซึ่งผลการศึกษาคงตัวในส่วนนี้ จะสอดคล้องกับผลการศึกษาคงตัวของผลิตภัณฑ์ capsule จีวสำหรับที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะเร่ง ซึ่งในท้ายที่สุด สารสำคัญของสูตรน้ำมันใบมะกรูด (สูตร 12% KLLO) จะมีการสูญเสียไปมากกว่าสารสำคัญของสูตรน้ำมันมะกรูด (สูตร 10% KLO) แม้จะความแตกต่างจะไม่ชัดเจนเท่ากับที่ 30 องศาเซลเซียส โดยสรุปความคงตัวเมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาระยะเวลา สารสำคัญของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก ผลิตภัณฑ์จะมีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิห้อง และจะมีปริมาณสารสำคัญลดลงเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ไม่ยาวถึง 2 ปี

-----การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ สำหรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก 6 สูตรได้รับ พบว่าที่ 0 เดือน ผลิตภัณฑ์แสดงฤทธิ์ที่ดีต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* (MIC = 0.39-3.13%v/v) และ *S. sobrinus* (MIC = 0.78-3.13%v/v) ส่วนฤทธิ์ต่อ *L. casei* ต่ำกว่า (MIC = 1.56-6.25%v/v) ส่วนที่ 1 เดือน ผลิตภัณฑ์ยังคงแสดงฤทธิ์ที่ดีต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และ *S. sobrinus* ที่ทั้งสามอุณหภูมิ ส่วนฤทธิ์ต่อ *L. casei* พบว่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ลดลง สำหรับที่ 2 เดือน ผลิตภัณฑ์ยังคงแสดงฤทธิ์ที่ดีต่อการต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. mutans* และ *S. sobrinus* ที่น่าสนใจคือ สูตรที่มีน้ำมันใบมะกรูด 8, 12%KLLO มีค่า MIC ที่ค่อนข้างคงที่ทั้งสามอุณหภูมิ สำหรับที่ 3, 4 เดือน โดยรวม ผลิตภัณฑ์แสดงฤทธิ์ที่ดีต่อการต้านเชื้อแบคทีเรียในทั้ง 3 อุณหภูมิ โดยมีค่า MIC ที่ 4 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 4 เดือนดังนี้ คือ *S. mutans* (MIC = 0.78-3.125%v/v) และ *S. sobrinus* (MIC = 0.78-3.125%v/v) ส่วนฤทธิ์ต่อ *L. casei* ต่ำกว่า (MIC = 6.25-12.5%v/v) ดังนั้นแนวโน้ม คือ ประเมินการว่าอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากไม่ยาวถึง 2 ปี ที่อุณหภูมิปกติ และในระยะเวลา 4 เดือน ผลิตภัณฑ์ที่ ยังคงแสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ 2 สายพันธุ์ คือ *S. mutans* และ *S. sobrinus* ได้ดี และเป็นสูตรที่ควรพิจารณานำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากเพื่อป้องกันฟันผุ คือ 10%KLO, 13%KLO (ต้องมีการแก้ปัญหาคาการแยกชั้นก่อน), 8%KLLO และ 12%KLLO โดยสูตรที่มีแนวโน้มที่ดี คือ 10%KLO และ 12%KLLO

-----การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Gr. A streptococci และ standard strains 3 strains คือ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 โดยวิธี Microbroth Dilution method ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย คือ Gr. A streptococci (MIC, MBC = 4-8%v/v), *S. pneumoniae* (MIC, MBC = 0.25-4%v/v), และ *S. aureus* (MIC, MBC = 8-16%v/v) ได้ดีกว่า ผลิตภัณฑ์ capsule จีวมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ต่อเชื้อ *H. influenzae* (MIC, MBC = 0.25-1%v/v) ส่วนที่ 1, 2 เดือนพบว่าความแรงลดต่ำลงบ้างแต่ยังคงมีฤทธิ์ในช่วงที่ดีทั้งสามอุณหภูมิ (MIC, MBC = 0.125-0.5%v/v และ 0.25-1%v/v ที่ 1, 2 เดือน ตามลำดับ) พบว่าผลิตภัณฑ์ทั้ง 6 สูตร มีความคงตัวค่อนข้างดีตลอดระยะเวลา 4 เดือน ที่ทุกอุณหภูมิ โดยให้ผลดี

ที่สุด (ค่า MIC และ MBC ต่ำที่สุด) ต่อ *H. influenzae* ATCC 49247 ทั้งนี้สามารถเรียงค่า MIC และ MBC จากน้อยไปมากของผลิตภัณฑ์จากน้ำมันมะกุกและน้ำมันไบมะกุกที่ระยะเวลา 4 เดือนได้ดังนี้ *H. influenzae* ATCC 49247 (น้ำมันทั้งสองชนิด, MIC = 0.25-0.5%v/v, MBC = 0.25-1%v/v) , *S. pneumoniae* ATCC 49619 (จากน้ำมันมะกุก, MIC = 0.25-2%v/v, MBC = 0.5-4%v/v, จากน้ำมันไบมะกุก, MIC = 0.25-1%v/v, MBC = 0.25-1%v/v) , Group A Streptococci (น้ำมันทั้งสองชนิด, MIC, MBC = 2-4%v/v), *S. aureus* ATCC 29213 (จากน้ำมันมะกุก, MIC = 4-8%v/v, MBC = 4-32%v/v, จากน้ำมันไบมะกุก, MIC, MBC = 4-16%v/v)

โดยภาพรวม ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากมีความคงตัวดีกว่าผลิตภัณฑ์ capsule จีว ในกระบวนการผลิตไม่มีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้ปัจจัยที่จะมีผลต่อการสลายตัวของสารสำคัญ มีน้อยกว่ากระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ capsule จีว สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ ให้ค่า MIC และ MBC ที่ดีในการทดสอบฤทธิ์ต่อ Gr.A Streptococci และ standard strains อีก 3 strains โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ต่อ *H. influenzae* ความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในส่วนของการยับยั้งแบคทีเรียค่อนข้างดีในช่วงระยะเวลา 4 เดือน ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะเร่ง ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากน่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมในการพัฒนาในทางการค้าต่อไปเมื่อพิจารณาในด้านกระบวนการผลิต ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และความคงตัว สูตรที่น่าจะนำไปพัฒนาต่อไป คือ 10%KLO และ 12%KLLO

การประเมินผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัส การประเมินทางประสาทสัมผัสในผลิตภัณฑ์ capsule จีว และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก ไม่ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยมหิดล โดยไม่ให้มีการดำเนินการจนกว่าจะมีผลการศึกษาความเป็นพิษของน้ำมันมะกุกและน้ำมันไบมะกุกก่อน ซึ่งการศึกษาความเป็นพิษนี้จะเป็นต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 1 ปี และใช้งบประมาณสูงมากในการดำเนินการ จึงได้ขออนุมัติขอยกเลิกการดำเนินการเฉพาะในส่วนนี้

การทดสอบสูตรตำรับน้ำมันที่จะบรรจุใน capsule จีว และผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก ต่อการสร้าง biofilms ของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ

--การศึกษาผลของสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุแคปซูลที่เตรียมจากน้ำมันมะกุกและน้ำมันไบมะกุก ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *S.mutans* ทั้งสายพันธุ์มาตรฐานและที่แยกได้จากอาสาสมัคร พบว่าจากการเปรียบเทียบสูตรน้ำมันสำหรับบรรจุแคปซูลจากน้ำมันมะกุก (N113) และ น้ำมันไบมะกุก (M18) ต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อมาตรฐาน พบว่า N113 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญได้ดีกว่า M18 คือตั้งแต่ความหนาแน่นของเซลล์ที่ 10^9 - 10^5 CFU/ml ส่วนผลต่อเชื้อที่แยกได้จากอาสาสมัครค่อนข้างแปรปรวน ทั้ง 2 สูตร ไม่แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ แต่ M18 แสดงผลการยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มที่ดีกว่า N113

--การศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากต่อการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อมาตรฐาน นั้น ผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกุก (10%KLO) (ซึ่งมีความคงตัว

ด้านกายภาพดีกว่า 13%KLO), 13%KLO) และจากน้ำมันใบมะกรูด (12%KLLO) จะให้ผลตามลำดับ จากดี 10%KLO > 13%KLO > 12%KLLO สำหรับผลต่อเชื้อที่แยกได้จากอาสาสมัครนั้น พบว่า 10%KLO ให้ผลดีกว่า 12%KLLO

งานที่ทำเพิ่มเติมนอกเหนือจากที่เสนอไว้ในแบบเสนอโครงการ

การทดสอบสารมาตรฐาน 4 ชนิด คือ D-limonene, Terpinene-4-ol, α -terpineol ที่พบเป็น สารสำคัญในน้ำมันมะกรูด และ Citronellal ที่พบเป็นสารสำคัญในน้ำมันใบมะกรูด ทำการทดสอบฤทธิ์ ยับยั้งในเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ ที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 359 ตัวอย่าง ได้แก่ Group A, B, C, F, G streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* (MRSA และ MSSA) สรุปได้ว่า ในน้ำมันมะกรูด Limonene (MIC&MBC=33.6->134.4mg/ml) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ทั้งนี้พบว่า Terpinene-4-ol (MIC&MBC=0.15-20mg/ml) และ α -terpineol (MIC&MBC=0.07-2.4mg/ml) เป็น สารสำคัญออกฤทธิ์ดังกล่าว สำหรับในน้ำมันใบมะกรูด มี Citronellal (MIC&MBC=0.5-8.57mg/ml) เป็น สารสำคัญออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้

การทดสอบผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า (Kamillosan®)

--การทดสอบผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นที่มีจำหน่ายทางการค้า (Kamillosan®) ถึงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของฟันผุ พบว่า ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก จากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด 6 สูตร (MIC = 0.39-6.25%v/v) สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S.mutans* ที่เป็น standard strain 1 strain (*S.mutans* ATCC 25775) และ ที่เป็น clinical isolates อีก 14 สายพันธุ์ด้วยความเข้มข้นที่ต่ำกว่าหรือใกล้เคียงกับ ผลิตภัณฑ์ฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า (MIC = 2.5->10%v/v)

--การทดสอบผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากที่มีจำหน่ายทางการค้า (Kamillosan®) ถึงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอ clinical isolate ของ Gr. A streptococci, standard strains 3 strains ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247) จากการศึกษเปรียบเทียบ ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด 3 สูตร (6%KLO, 10%KLO, 13%KLO) และน้ำมันใบมะกรูด 3 สูตร (4%KLLO, 8%KLLO, 12%KLLO) แสดงฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอและไอได้ดีกว่า Kamillosan® ในกลุ่มของ Gr. A streptococci และ standard strains 2 strains ได้แก่ *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 และ *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 และ ให้ผลยับยั้งและฆ่าเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียงกับ Kamillosan® ในกลุ่มของ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ทั้งนี้ค่า MIC&MBC ของผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด ทั้ง 6

สูตร เท่ากับ 0.25-16%v/v ซึ่งจะมีค่าที่ดีกว่าหรือใกล้เคียงกับ Kamillosan® ซึ่งมีค่า MIC&MBC เท่ากับ 4-16%v/v

เนื่องจาก Kamillosan® เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดพ่นในช่องปาก ที่แพทย์ผู้เชี่ยวชาญด้านหู คอ จมูก นิยมสั่งจ่ายให้แก่ผู้ป่วยที่มีอาการเจ็บคอเบื้องต้น ซึ่งผู้ป่วยยังไม่แสดงอาการติดเชื้ออย่างชัดเจน โดยคาดหวังฤทธิ์ในการบรรเทาอาการอักเสบในคอ และฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียด้วย ในปัจจุบันยังไม่มีผลิตภัณฑ์ใดที่ใช้งานได้ดีและเป็นที่ยอมรับเท่า Kamillosan® ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ชนิดพ่นในปากจากน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูด น่าจะมีศักยภาพที่ดีในการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้บรรเทาอาการเจ็บคอและไอในเบื้องต้นได้ ซึ่งจะเป็นการช่วยประหยัดเงินตราที่ต้องเสียไปในการสั่งซื้อผลิตภัณฑ์ Kamillosan® จากต่างประเทศ จะเป็นการช่วยลดดุลการค้าและส่งเสริมการปลูก การใช้ และการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรไทยได้อีกทางหนึ่ง

เอกสารอ้างอิง

- Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. Front Biosci 2004;9:1267-77.
- Berkowitz RJ, Jordan HV, White G. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. Arch Oral Biol 1975;20(3):171-4.
- Bowen WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? Crit Rev Oral Biol Med 2002;13(2):126-31.
- Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. J Dent Res 1993;72(1):37-45.
- Dawes C. Fluorides: mechanisms of action and recommendations for use. J Can Dent Assoc 1989;55:721-3.
- Florio FM, Klein MI, Pereira AC, Goncalves BR. Time of initial acquisition of mutans streptococci by human infants. J Clin Pediatr Dent 2004; 28: 303–308.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enteric*. J Food Prot 2002;65(10):1545–60.
- Gnan SO, Rana MS. Antimicrobial activity of limonene. Libyan journal of agriculture 1982;11(11): 99-102.
- Graves RC, Stamm JW. Decline of dental caries. What occurred and will it continue? J Can Dent Assoc 1985;51:693-9.

- Hamada S, Slade HD. Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 1980;44:331-84.
- Hara Y. Actions of tea polyphenols in oral hygiene. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T, eds. Antioxidant food supplements in human health. San Diego: Academic Press, 1999:429-43.
- Huh, J. (Original author; Huh, Joon, written in Chinese, 1613), 1984. Translation Committee of Dongeui Bogam. Encyclopedia of Oriental Medicine. Namsan-dang, Seoul.
- Islam B, Khan SN, Khan AU. Dental caries: from infection to prevention. Med Sci Monit 2007;13(11):RA196-203.
- Ismail AI and Sohn W. A systematic review of clinical diagnostic criteria of early childhood caries. J Public Health Dent 1999;59(3):171-91.
- Jakubovics NS, Strömberg N, van Dolleweerd CJ, Kelly CG, Jenkinson HF. Differential binding specificities of oral streptococcal antigen I/II family adhesins for human or bacterial ligands. Mol Microbiol 2005;55(5):1591-605.
- Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Liu S, Yamamoto H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. Int J Syst Bacteriol 1995;45: 406-8.
- Khoo G, Zhan L, Hoover C, Featherstone JD. Cariogenic virulence characteristics of mutans streptococci isolated from caries-active and caries-free adults. J Calif Dent Assoc. 2005 Dec;33(12):973-80.
- Lapidrattanakul J, Nakano K, Nomura R, Hamada S, Nakagawa I, Ooshima T. Demonstration of mother-to-child transmission of *Streptococcus mutans* using multilocus sequence typing. Caries Res 2008;42(6):466-74.
- Lawrence BW, Hogg JW, Terhune SJ, Podimuang V. Constituents of the leaf and peel oils of *Citrus hystrix*, D.C. Phytochemistry 1971;10:1401-5.
- Lewis DW, Ismail AI. Periodic health examination, 1995 update 2: 2 Prevention of dental caries. The Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. CMAJ 1995;152(6):836-46.
- Li Y, Caufield PW. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. J Dent Res. 1995 Feb;74(2):681-5. (Abs)
- Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sciences Reviews 1976;9:65-107.

- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 1986;50(4):353-80.
- Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. J Ind Microbiol 1995;15:169-75.
- Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Advances in Dental Research 1994;8(2):263-271.
- Matsumoto M, Minami T, Sasaki H, Sobue S, Hamada S, Ooshima T. Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of mutans streptococci. Caries Res 1999;33(6):441-5.
- Mohan A, Morse DE, O'Sullivan DM, Tinanoff N. The relationship between bottle usage/content, age, and number of teeth with mutans streptococci colonization in 6–24-month-old children. Community Dent Oral Epidemiol 1998; 26: 12–20.
- Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Role of glucose side chains with serotype-specific polysaccharide in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Caries Res 2005;39(4):262-8.
- Napimoga MH, Kamiya RU, Rosa RT, Rosa EA, Höfling JF, Mattos-Graner RO, Gonçalves RB. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol 2004;53:697-703.
- Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Lozoya X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. J Ethnopharmacol 1996;53:143-147.
- Okonogi S, Sekine T, Fujii Y, Pongpaibul Y, Murakoshi I. Antimicrobial activities of some medicinal plants family Labiatea. Proceedings of 15th Asian congress of pharmaceutical sciences, Bangkok, 15-19 November, 1994.
- Ripa LW. Has the decline in caries prevalence reduced the need for fissure sealants in the UK? A review. [review] J Paediatr Dent 1990;6:79-84.
- Rolla G, Saxegaard E. Critical evaluation of the composition and use of topical fluorides, with emphasis on the role of calcium fluoride in caries inhibition. J Dent Res 1990;69(special issue): 780-5.
- Shellis RP, Addy M, Rees GD. In vitro studies on the effect of sodium tripolyphosphate on the interactions of stain and salivary protein with hydroxyapatite. Journal of Dentistry (2005) 33, 313–24.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998;25:134-144.

- Subba MS, Soumithri TC, Suryanarayana Rao R. Antimicrobial action of citrus oils. J Food Sci 1967. 32:225-7.
- Tassou CC, Nychas GJE. The inhibitory effect of the essential oils from basil (*Ocimum basilicum*) and sage (*Salvia officinalis*) in broth and in model food system. Dev Food Sci 1995;37B:1925-35.
- Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. Journal of Clinical Periodontology 1986;13(10):905-11.
- Tsai AI, Chen C-Y, Li L-A, Hsiang C-L, Hsu K-H. Risk indicators for early childhood caries in Taiwan. Community Dent Oral Epidemiol 2006; 34: 437-45.
- Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK. Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. Infect Immun 1993;61: 3811-7.
- Yoshida A, Kuramitsu HK. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2002;68:6283-91.
- นันทวัน บุญยะประกฤษ, บรรณาธิการ. ก้าวไปกับสมุนไพร. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2529.
- นันทวัน บุญยะประกฤษ, บรรณาธิการ. ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 3. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2530.
- วิมล ศรีสุข และคณะ รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง ผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียในผักสดที่เตรียมจากน้ำมันหอมระเหยที่เหลือจากอุตสาหกรรมการกลั่นน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรบางชนิด; 2546.
- วิมล ศรีสุข และคณะ รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อใช้ป้องกันฟันผุ และ/หรือระงับกลิ่นปากจากน้ำมันหอมระเหย และ/หรือ สารสกัดสมุนไพร; 2547.
- วิมล ศรีสุข และคณะ รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่อง ผลิตภัณฑ์อาหารจากน้ำมันหอมระเหย และ/หรือ สารสกัดสมุนไพรซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*; 2549.

ภาคผนวก ก

ผลการวิจัยในรายละเอียด เพิ่มเติม

ในหัวข้อ 4. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียในน้ำมันหอมระเหย

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Streptococcus pyogenes* (61 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
1	14	18
2	14	19
3	14	23
4	15	18
5	14	18
6	16	19
7	16	20
8	14	18
9	16	19
10	23	32
11	11	16
12	13	17
13	14	17
14	14	18
15	13	19
16	15	17
17	14	19
18	14	21
19	15	18
20	13	19
21	13	17
22	13	18
23	14	19
24	15	18
25	14	18
26	15	20
27	14	19
28	15	19
29	13	17
30	12	15
31	14	17
32	13	16
33	14	19
34	15	19
35	14	16
36	13	16
37	14	19

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Streptococcus pyogenes* (61 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method (ต่อ)

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
38	15	20
39	14	20
40	15	19
41	13	17
42	14	17
43	14	19
44	13	17
45	15	18
46	14	19
47	13	18
48	14	29
49	17	29
50	14	17
51	15	19
52	13	17
53	14	18
54	16	20
55	13	18
56	15	20
57	17	21
58	12	15
59	16	21
60	12	17
61	15	20
Mean±SD	14.26±1.64	18.89±2.98

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Streptococcus agalactiae* (26 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
1	11	12
2	11	14
3	12	14
4	11	15
5	12	14
6	12	14
7	10	13
8	12	17
9	11	14
10	12	14
11	10	12
12	11	14
13	11	14
14	12	14
15	13	17
16	11	13
17	12	14
18	11	15
19	12	15
20	12	14
21	12	15
22	11	14
23	11	13
24	11	16
25	12	14
26	11	15
Mean±SD	11.42±0.7	14.23±1.21

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group C Streptococci (5 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
1	12	15
2	13	15
3	12	14
4	11	14
5	12	14
Mean±SD	12±0.71	14.4±0.55

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group F Streptococci (3 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
1	15	18
2	18	15
3	16	20
Mean±SD	16.33±1.53	17.67±2.52

ตารางที่ 9 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group G Streptococci (11 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
1	13	16
2	13	15
3	14	16
4	13	16
5	12	15
6	12	16
7	14	16
8	15	16
9	13	17
10	12	15
11	12	14
Mean±SD	13.0±1.0	15.64±0.81

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Streptococcus pneumoniae* (51 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method

Lab No.	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
1	20	28
2	17	25
3	18	23
4	12	15
5	17	22
6	19	29
7	20	26
8	16	20
9	17	27
10	20	27
11	17	25
12	17	26
13	22	38
14	15	19
15	14	20
16	16	20
17	15	26
18	19	23
19	19	35
20	19	21
21	20	27
22	18	22
23	19	30
24	15	25
25	18	21
26	17	27
27	17	35
28	17	25
29	16	33
30	19	23
31	19	25
32	20	27
33	16	25
34	16	33
35	14	22
36	16	23
37	18	22
38	19	35
39	18	22
40	16	23
41	18	30
42	15	18
43	16	30

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Streptococcus pneumoniae* (51 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method (ต่อ)

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
45	16	22
46	16	22
47	13	22
48	18	23
49	16	26
50	14	19
51	17	22
Mean±SD	17.08±2.04	25.0±4.84

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Haemophilus influenzae* (52 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method

Lab No.	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
1	17	29
2	16	27
3	16	27
4	19	30
5	16	28
6	18	30
7	14	25
8	17	35
9	15	30
10	20	46
11	16	37
12	17	34
13	23	35
14	22	32
15	18	46
16	13	22
17	17	25
18	15	23
19	16	37
20	16	20
21	12	22
22	14	28
23	15	22
24	16	29
25	14	21
26	14	34
27	14	34
28	16	30
29	16	25
30	12	29
31	14	22
32	15	28
33	18	24
34	17	38
35	13	23
36	16	39
37	14	25
38	16	25
39	20	38
40	16	33
41	14	32
42	13	33
43	20	30

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Haemophilus influenzae* (52 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method (ต่อ)

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
45	15	32
46	17	20
47	17	28
48	17	28
49	17	27
50	15	27
51	14	33
52	14	21
Mean±SD	16.02±2.3	29.73±6.07

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Staphylococcus aureus* (MRSA, 50 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
1	20	11
2	20	11
3	20	10
4	25	12
5	23	12
6	26	13
7	25	12
8	25	11
9	25	11
10	26	13
11	22	10
12	25	10
13	24	13
14	25	13
15	19	12
16	24	12
17	25	14
18	25	15
19	22	13
20	25	14
21	22	14
22	23	16
23	24	13
24	25	12
25	24	12
26	21	13
27	25	13
28	22	15
29	23	15
30	25	13
31	19	12
32	22	12
33	25	12
34	21	10
35	23	12
36	23	12
37	26	13
38	20	11
39	21	11
40	25	13
41	25	13
42	23	13
43	24	12

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Staphylococcus aureus* (MRSA, 50 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method (ต่อ)

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
45	24	13
46	22	14
47	23	14
48	25	13
49	25	15
50	24	14
Mean±SD	23.34±1.93	12.58±1.4

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Staphylococcus aureus* (MSSA, 50 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method

Lab No.	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
1	21	14
2	22	12
3	23	12
4	22	13
5	23	11
6	22	11
7	24	12
8	22	10
9	22	10
10	22	12
11	21	10
12	23	11
13	22	13
14	23	11
15	23	12
16	21	13
17	25	11
18	23	10
19	24	11
20	25	12
21	24	12
22	22	12
23	18	12
24	22	13
25	24	13
26	25	12
27	21	11
28	21	13
29	25	12
30	23	11
31	25	14
32	21	10
33	21	12
34	22	10
35	22	11
36	20	11
37	23	12
38	23	11
39	24	12
40	26	13
41	24	13

42	23	12
43	21	13
44	23	11

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Staphylococcus aureus* (MSSA, 50 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method (ต่อ)

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
45	24	12
46	25	13
47	23	12
48	23	14
49	23	13
50	19	11
Mean±SD	22.66±1.61	11.84±1.09

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Acinetobacter baumannii* (50 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
1	22	9
2	20	9
3	21	10
4	22	10
5	20	9
6	21	9
7	22	9
8	20	10
9	20	10
10	22	11
11	21	9
12	24	10
13	20	9
14	21	12
15	20	8
16	22	9
17	20	9
18	22	10
19	24	9
20	23	11
21	22	11
22	21	9
23	22	10
24	20	9
25	21	10
26	22	8
27	25	10
28	23	9
29	24	10
30	22	9
31	20	8
32	22	9
33	23	9
34	23	9
35	24	8
36	22	8
37	25	9
38	25	9
39	21	9
40	20	9
41	25	9

42	20	8
43	22	9
44	25	11

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Acinetobacter baumannii* (50 isolates) โดยวิธี Disk diffusion method (ต่อ)

Lab No.	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Inhibition zone (มิลลิเมตร)	
	น้ำมันมะกรูด	น้ำมันใบมะกรูด
45	20	8
46	23	9
47	24	9
48	21	9
49	23	9
50	22	9
Mean±SD	21.98±1.61	9.28±0.88

ตารางที่ 16 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกุกและน้ำมันใบมะกุกต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไธ *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococci) (61 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method

Lab No.	น้ำมันมะกุก		น้ำมันใบมะกุก	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
1	1	1	2	2
2	0.5	0.5	1	1
3	0.5	0.5	0.5	1
4	0.25	0.25	0.5	1
5	0.5	0.5	2	2
6	0.25	0.25	0.5	0.5
7	0.5	0.5	0.5	0.5
8	0.5	0.5	1	1
9	1	1	2	2
10	1	1	2	2
11	0.5	0.5	0.5	0.5
12	1	1	1	1
13	0.5	0.5	1	1
14	0.5	0.5	0.5	0.5
15	0.25	0.25	0.5	0.5
16	0.5	0.5	0.5	1
17	0.25	0.25	0.25	0.25
18	0.25	0.25	0.5	0.5
19	0.5	0.5	1	2
20	0.5	0.5	1	1
21	0.125	0.125	0.125	0.125
22	1	1	1	1
23	0.5	0.5	0.5	0.5
24	0.25	0.25	0.25	0.25
25	0.5	0.5	0.5	0.5
26	0.5	0.5	0.5	0.5
27	1	1	1	1
28	0.5	0.5	0.5	0.5
29	1	1	4	4
30	2	2	1	2
31	0.5	1	1	2
32	0.25	0.25	0.25	0.25
33	1	1	1	1
34	1	1	2	2
35	0.5	0.5	1	1
36	0.5	0.5	2	2
37	1	1	1	1
38	2	2	2	2
39	1	2	2	2
40	1	2	2	2

41	1	2	2	2
42	1	1	2	2
43	0.5	0.5	0.5	0.5

ตารางที่ 16 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกุกและน้ำมันใบมะกุกต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococci) (61 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method (ต่อ)

Lab No.	น้ำมันมะกุก		น้ำมันใบมะกุก	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
44	0.125	0.125	0.125	0.125
45	0.5	0.5	0.5	0.5
46	0.5	0.5	0.5	0.5
47	0.25	0.25	0.25	0.25
48	0.25	0.25	0.25	0.25
49	0.5	0.5	0.5	0.5
50	1	1	4	4
51	0.5	0.5	0.5	0.5
52	0.5	0.5	0.5	0.5
53	0.25	0.25	0.5	0.5
54	0.125	0.125	0.5	0.5
55	1	1	2	2
56	0.25	0.25	0.5	1
57	1	1	2	2
58	0.25	0.25	0.25	0.25
59	0.25	0.25	2	2
60	0.125	0.125	0.25	0.25
61	0.25	0.25	0.25	0.25

น้ำมันมะกุก--MIC range: 0.125-2 µl/100 µl of broth, MIC₅₀ = 0.5, MIC₉₀ = 1,

MBC range: 0.125-2 µl/100 µl of broth

น้ำมันใบมะกุก--MIC range: 0.125-4 µl/100 µl of broth, MIC₅₀ = 0.5, MIC₉₀ = 2,

MBC range: 0.125-4 µl/100 µl of broth

ตารางที่ 17 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกุกและน้ำมันใบมะกุกต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Staphylococcus aureus* (MRSA) (50 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method

Lab No.	น้ำมันมะกุก		น้ำมันใบมะกุก	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
1	0.25	0.5	1	4
2	0.5	1	1	4
3	0.5	0.5	2	4
4	0.5	0.5	1	4
5	2	1	2	4
6	1	1	2	4
7	0.5	1	2	4
8	0.5	0.5	1	8
9	0.25	1	8	8
10	0.25	0.5	0.5	4
11	0.5	1	2	8
12	0.5	1	1	2
13	0.25	0.5	1	4
14	0.25	1	0.5	4
15	0.25	0.25	0.5	4
16	0.25	0.5	0.5	4
17	0.25	1	1	4
18	0.25	1	0.5	4
19	0.25	1	1	4
20	0.25	0.5	0.5	2
21	0.25	0.25	4	8
22	0.25	1	1	4
23	0.25	0.5	1	4
24	0.25	0.5	0.5	2
25	0.25	1	1	4
26	0.25	0.5	1	4
27	0.25	0.5	1	2
28	0.5	0.5	1	2
29	0.25	0.25	0.5	1
30	0.25	0.5	0.25	2
31	0.25	0.5	0.5	4
32	0.25	1	1	1
33	0.5	0.5	1	1
34	0.25	0.25	2	4
35	0.25	0.25	2	2
36	0.25	0.5	1	1
37	0.25	0.25	4	4
38	0.5	0.5	4	4
39	0.25	0.5	8	8
40	0.25	0.5	4	4
41	0.125	0.25	0.25	4

42	0.125	0.5	2	4
----	-------	-----	---	---

ตารางที่ 17 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกุกและน้ำมันใบมะกุกต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Staphylococcus aureus* (MRSA) (50 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method

Lab No.	น้ำมันมะกุก		น้ำมันใบมะกุก	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
43	0.125	2	1	8
44	0.25	0.5	0.5	2
45	0.25	0.5	0.25	8
46	0.25	0.25	0.5	1
47	0.5	0.5	4	4
48	0.25	0.25	0.5	2
49	0.25	0.25	1	1
50	0.25	0.25	0.5	1

น้ำมันมะกุก-MIC range: 0.125-2 μ l/100 μ l of broth, MIC₅₀ = 0.25, MIC₉₀ = 0.5,

MBC range: 0.25-2 μ l/100 μ l of broth

น้ำมันใบมะกุก--MIC range: 0.25-8 μ l/100 μ l of broth, MIC₅₀ = 1, MIC₉₀ = 4,

MBC range: 1-8 μ l/100 μ l of broth

ตารางที่ 18 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกุกและน้ำมันใบมะกุกต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Staphylococcus aureus* (MSSA) (50 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method

Lab No.	น้ำมันมะกุก		น้ำมันใบมะกุก	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
1	0.25	0.5	0.5	4
2	1	1	4	8
3	0.5	0.5	1	4
4	0.25	0.5	1	4
5	0.5	0.5	1	4
6	1	1	2	4
7	0.25	0.5	1	4
8	0.25	0.5	1	4
9	0.5	0.5	2	2
10	0.25	0.5	0.5	2
11	0.25	0.25	1	2
12	0.125	0.25	1	1
13	0.25	0.25	0.25	2
14	0.125	0.25	2	2
15	0.5	1	0.5	4
16	0.25	0.5	0.25	4
17	0.25	0.5	0.5	4
18	0.25	0.25	0.5	4
19	0.125	0.25	0.25	2
20	0.25	0.5	0.5	2
21	0.25	0.5	1	4
22	0.5	0.5	1	4
23	0.25	1	2	4
24	0.25	0.5	1	4
25	0.25	0.5	0.5	2
26	0.25	0.5	2	8
27	0.5	1	2	4
28	0.25	0.5	1	1
29	0.5	1	1	4
30	0.5	1	2	2
31	0.25	0.25	2	4
32	0.125	0.25	2	4
33	0.125	0.25	1	1
34	0.25	0.5	2	2
35	0.25	0.25	4	8
36	0.25	0.5	4	4
37	0.125	0.5	2	4
38	0.25	0.5	2	4
39	0.5	1	0.25	4
40	0.25	0.5	0.125	2

41	0.125	0.5	0.5	8
42	0.25	0.5	0.25	2
43	0.25	1	0.5	4

ตารางที่ 18 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Staphylococcus aureus* (MSSA) (50 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method (ต่อ)

Lab No.	น้ำมันมะกรูด		น้ำมันใบมะกรูด	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
44	0.25	0.5	1	4
45	0.125	0.5	1	4
46	0.125	0.5	1	2
47	0.25	0.5	0.5	4
48	0.125	0.5	0.5	4
49	0.25	0.5	0.5	4
50	0.25	0.5	1	4

น้ำมันมะกรูด--MIC range: 0.125-1 μ l/100 μ l of broth, MIC₅₀ = 0.25, MIC₉₀ = 0.5,

MBC range: 0.25-1 μ l/100 μ l of broth

น้ำมันใบมะกรูด--MIC range: 0.125-4 μ l/100 μ l of broth, MIC₅₀ = 1, MIC₉₀ = 2,

MBC range: 1-8 μ l/100 μ l of broth

ตารางที่ 19 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Acinetobacter baumannii* (50 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method

Lab No.	น้ำมันมะกรูด		น้ำมันใบมะกรูด	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
1	0.125	0.125	1	1
2	0.5	0.5	0.5	1
3	0.25	0.25	0.25	1
4	0.5	0.5	0.5	0.5
5	0.125	0.125	0.5	0.5
6	0.125	0.125	0.5	0.5
7	0.125	0.125	1	1
8	0.125	0.5	0.5	0.5
9	0.125	0.125	2	4
10	0.125	0.5	0.25	4
11	0.125	0.25	1	2
12	0.125	0.25	1	2
13	0.125	0.25	2	2
14	0.125	0.5	2	2
15	0.125	0.125	0.5	1
16	0.125	0.25	1	2
17	0.125	0.5	1	4
18	0.125	0.25	0.5	2
19	0.125	0.25	1	4
20	0.125	0.5	0.5	4
21	0.125	0.25	0.5	1
22	0.125	0.5	1	4
23	0.125	0.5	1	8
24	0.125	0.125	0.5	2
25	0.125	0.125	0.5	1
26	0.5	0.5	0.5	1
27	0.125	0.5	0.25	2
28	0.125	0.25	0.5	4
29	0.125	0.5	0.25	1
30	0.125	1	0.5	2
31	0.125	0.25	0.5	4
32	0.125	0.5	0.5	2
33	0.25	0.5	0.5	2
34	0.25	0.25	0.5	1
35	0.125	0.5	1	2
36	0.125	0.5	1	4
37	0.125	1	0.5	2
38	0.5	0.5	1	2
39	0.25	0.5	1	4
40	0.25	0.5	0.5	1

41	0.125	1	1	2
42	0.25	0.25	1	1
43	0.125	0.25	1	4

ตารางที่ 19 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกุกและน้ำมันใบมะกุกต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Acinetobacter baumannii* (50 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method (ต่อ)

Lab No.	น้ำมันมะกุก		น้ำมันใบมะกุก	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
44	0.5	0.5	0.5	2
45	0.5	0.5	2	1
46	0.125	0.125	1	2
47	0.125	0.25	2	4
48	0.125	0.5	1	4
49	0.125	1	1	2
50	0.125	0.5	1	2

น้ำมันมะกุก--MIC range: 0.125-0.5 µl/100 µl of broth, MIC₅₀ = 0.125, MIC₉₀ = 0.5,
MBC: 0.125-1µl/100 µl of broth

น้ำมันใบมะกุก--MIC range: 0.25-2 µl/100 µl of broth, MIC₅₀ = 0.5, MIC₉₀ = 1,
MBC range: 0.5-8 µl/100 µl of broth

ตารางที่ 20 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกุกและน้ำมันใบมะกุกต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ *Streptococcus agalactiae* (Group B streptococci) (2 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method

Lab No.	น้ำมันมะกุก		น้ำมันใบมะกุก	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
1	0.5	0.5	2	2
2	0.5	0.5	1	1

น้ำมันมะกุก--MIC₅₀ = 0.5

น้ำมันใบมะกุก--MIC range: 1-2 µl/100 µl of broth, MIC₅₀ = 1,
MBC = range: 1-2 µl/100 µl of broth

ตารางที่ 21 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกุกและน้ำมันใบมะกุกต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group C Streptococci (2 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method

Lab No.	น้ำมันมะกุก		น้ำมันใบมะกุก	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
1	0.5	0.5	0.5	0.5
2	0.5	0.5	1	1

น้ำมันมะกุก--MIC₅₀ = 0.5

น้ำมันใบมะกุก--MIC range: 0.5-1 µl/100 µl of broth, MIC₅₀ = 0.5
MBC range: 0.5-1 µl/100 µl of broth

ตารางที่ 22 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกุกและน้ำมันไบมะกุกต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group F Streptococci (2 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method

Lab No.	น้ำมันมะกุก		น้ำมันไบมะกุก	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
1	0.125	0.125	0.25	1
2	0.5	0.5	0.5	0.5

น้ำมันมะกุก--MIC range: 0.125-0.5 µl/100 µl of broth, MIC₅₀ = 0.125

MBC range: 0.125-0.5 µl/100 µl of broth

น้ำมันไบมะกุก--MIC range: 0.25-0.5 µl/100 µl of broth, MIC₅₀ = 0.25

MBC range: 0.5-1µl/100 µl of broth

ตารางที่ 23 ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันมะกุกและน้ำมันไบมะกุกต่อเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการเจ็บคอ/ไอ Group G Streptococci (2 isolates) โดยวิธี Microbroth dilution method

Lab No.	น้ำมันมะกุก		น้ำมันไบมะกุก	
	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)	MIC(%v/v)	MBC(%v/v)
1	1	1	0.25	0.25
2	1	1	1	1

น้ำมันมะกุก--MIC₅₀ = 1

น้ำมันไบมะกุก--MIC range: 0.25-1 µl/100 µl of broth, MIC₅₀ = 0.25,

MBC range: 0.25-1 µl/100 µl of broth

ภาคผนวก ข

ผลการวิจัยในรายละเอียด เพิ่มเติม

ในหัวข้อ 5. การพัฒนาสูตรตำรับน้ำมันมะกูดและน้ำมันใบมะกูดสำหรับบรรจุใน capsule จิว



รูปที่ 4 คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันมะกูด:น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 25 คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันมะกูดและน้ำมันถั่วเหลืองในอัตราส่วนต่างๆ

Code: A1 KLO:SBO

series No.	KLO:SBO	สี	กลิ่น	ระดับความขม	ระดับความซ่า	Remark
A1/0	1:0	+	+++	+++	++++	-
A1/1	1:1	+	+++	++	++	-
A1/2	1:2	+	++	+	++	-
A1/3	1:3	+	++	+	+	รสSBOเด่นมากขึ้น
A1/4	1:4	+	++	+	+	
A1/5	1:5	+	++	+	+	
A1/6	2:1	+	+++	++	++	-
A1/7	3:1	+	+++	++	++	-
A1/8	4:1	+	+++	+++	++	-
A1/9	5:1	+	+++	+++	+++	-

สี (+=เหลืองอ่อน, ++=เหลือง, +++=เหลืองออกส้ม, ++++=เหลืองเข้ม)

กลิ่น (+=หอมอ่อนๆ, ++=หอมปานกลาง, +++=หอมแรง, ++++=กลิ่นรุนแรง)

รสขม (+=ขมเล็กน้อย, ++=ขมปานกลาง, +++=ขมมาก, ++++=ขมรุนแรง)

รสซ่า (+=ซ่าเล็กน้อย, +=ซ่าปานกลาง, +++=ซ่ามาก, ++++=ซ่าจนแสบลิ้น)



รูปที่ 5 คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันมะกรูด:น้ำมันปาล์ม ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 26 คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันปาล์มในอัตราส่วนต่างๆ

Code: A2 KLO:POO

series No.	KLO:POO	สี	กลิ่น	ระดับความขม	ระดับความซ่า	Remark
A2/0	1:0	+	+++	+++	++++	
A2/1	1:1	++	+++	+++	++	
A2/2	1:2	+++	++	++	++	
A2/3	1:3	+++	++	++	++	} รสPOOเด่นมากขึ้น
A2/4	1:4	++++	++	++	++	
A2/5	1:5	++++	++	+	+	
A2/6	2:1	+	+++	+++	++	
A2/7	3:1	+	+++	+++	++	
A2/8	4:1	+	+++	+++	+++	
A2/9	5:1	+	+++	+++	+++	

สี (+=เหลืองอ่อน, +=เหลือง, +++=เหลืองออกส้ม, ++++=เหลืองเข้ม)

กลิ่น (+=หอมอ่อนๆ, +=หอมปานกลาง, +++=หอมแรง, ++++=กลิ่นรุนแรง)

รสขม (+=ขมเล็กน้อย, +=ขมปานกลาง, +++=ขมมาก, ++++=ขมรุนแรง)

รสซ่า (+=ซ่าเล็กน้อย, +=ซ่าปานกลาง, +++=ซ่ามาก, ++++=ซ่าจนแสบลิ้น)



รูปที่ 6 คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันมะกรูด:น้ำมันดอกคำฝอย ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 27 คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันมะกรูดและน้ำมันดอกคำฝอยในอัตราส่วนต่างๆ

Code: A3 KLO:SFO

series No.	KLO:SFO	สี	กลิ่น	ระดับความขม	ระดับความซ่า	Remark
A3/0	1:0	+	+++	+++	++++	
A3/1	1:1	+	+++	+++	++	
A3/2	1:2	+	++	++	+	
A3/3	1:3	+	++	++	+	} รสของSFOเด่น
A3/4	1:4	+	++	++	+	
A3/5	1:5	+	++	+	+	
A3/6	2:1	+	+++	+++	++	
A3/7	3:1	+	+++	+++	++	
A3/8	4:1	+	+++	+++	+++	
A3/9	5:1	+	+++	+++	+++	

สี (+=เหลืองอ่อน, +=เหลือง, +++=เหลืองออกส้ม, ++++=เหลืองเข้ม)

กลิ่น (+=หอมอ่อนๆ, +=หอมปานกลาง, +++=หอมแรง, ++++=กลิ่นรุนแรง)

รสขม (+=ขมเล็กน้อย, +=ขมปานกลาง, +++=ขมมาก, ++++=ขมรุนแรง)

รสซ่า (+=ซ่าเล็กน้อย, +=ซ่าปานกลาง, +++=ซ่ามาก, ++++=ซ่าจนแสบลิ้น)



รูปที่ 7 คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันมะกูด:น้ำมันทานตะวัน ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 28 คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันมะกูดและน้ำมันทานตะวันในอัตราส่วนต่างๆ

Code: A4 KLO:SUO

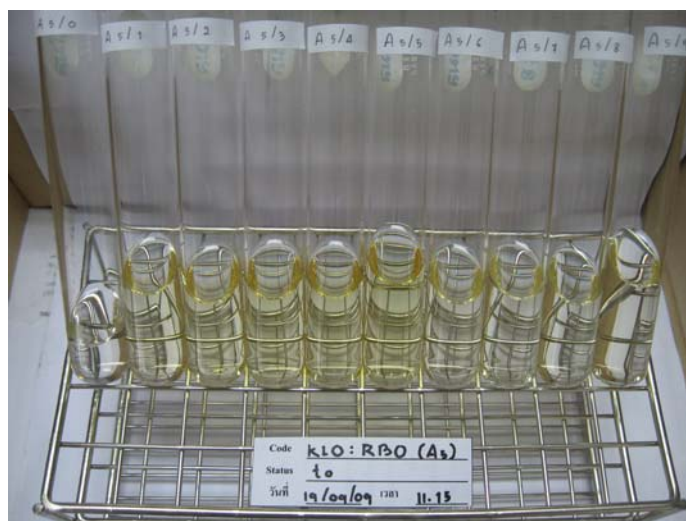
series No.	KLO:SUO	สี	กลิ่น	ระดับความขม	ระดับความซ่า	Remark
A4/0	1:0	+	+++	+++	++++	
A4/1	1:1	+	+++	+++	++	
A4/2	1:2	+	++	++	+	
A4/3	1:3	+	++	++	+	} รสของSUOเด่น
A4/4	1:4	+	++	++	+	
A4/5	1:5	+	++	++	+	
A4/6	2:1	+	+++	+++	++	
A4/7	3:1	+	+++	+++	++	
A4/8	4:1	+	+++	+++	+++	
A4/9	5:1	+	+++	+++	+++	

สี (+=เหลืองอ่อน, +=เหลือง, +++=เหลืองออกส้ม, ++++=เหลืองเข้ม)

กลิ่น (+=หอมอ่อนๆ, +=หอมปานกลาง, +++=หอมแรง, ++++=กลิ่นรุนแรง)

รสขม (+=ขมเล็กน้อย, +=ขมปานกลาง, +++=ขมมาก, ++++=ขมรุนแรง)

รสซ่า (+=ซ่าเล็กน้อย, +=ซ่าปานกลาง, +++=ซ่ามาก, ++++=ซ่าจนแสบลิ้น)



รูปที่ 8 คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันมะกูด:น้ำมันรำข้าว ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 29 คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันมะกูดและน้ำมันรำข้าวในอัตราส่วนต่างๆ

Code: A5 KLO:RBO

series No.	KLO:RBO	สี	กลิ่น	ระดับความขม	ระดับความซ่า	Remark
A5/0	1:0	+	+++	+++	++++	
A5/1	1:1	++	+++	+++	++	
A5/2	1:2	++	++	++	+	
A5/3	1:3	++	++	++	+	} รสของRBOเด่น
A5/4	1:4	++	++	++	+	
A5/5	1:5	++	++	+	+	
A5/6	2:1	+	+++	+++	++	
A5/7	3:1	+	+++	+++	++	
A5/8	4:1	+	+++	+++	+++	
A5/9	5:1	+	+++	+++	++++	

สี (+=เหลืองอ่อน, ++=เหลือง, +++=เหลืองออกส้ม, ++++=เหลืองเข้ม)

กลิ่น (+=หอมอ่อนๆ, ++=หอมปานกลาง, +++=หอมแรง, ++++=กลิ่นรุนแรง)

รสขม (+=ขมเล็กน้อย, ++=ขมปานกลาง, +++=ขมมาก, ++++=ขมรุนแรง)

รสซ่า (+=ซ่าเล็กน้อย, ++=ซ่าปานกลาง, +++=ซ่ามาก, ++++=ซ่าจนแสบลิ้น)



รูปที่ 9 คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันใบมะกรูด:น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 30 คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันถั่วเหลืองในอัตราส่วนต่างๆ

Code: B1 KLLO:SBO

series No.	KLLO:SBO	สี	กลิ่น	ระดับความขม	ระดับความซ่า	Remark
B1/0	1:0	+	++++	++++	++++	
B1/1	1:1	+	+++	+++	+++	
B1/2	1:2	+	+++	++	++	
B1/3	1:3	+	+++	++	+	} รสSBOเด่นมากขึ้น
B1/4	1:4	+	+++	+	+	
B1/5	1:5	+	+++	+	+	
B1/6	2:1	++	++++	+++	++	} กลิ่นKLLO รุนแรง
B1/7	3:1	++	++++	+++	++	
B1/8	4:1	++	++++	++++	++++	
B1/9	5:1	++	++++	++++	++++	

สี (+=เหลืองอ่อน, ++=เหลือง, +++=เหลืองออกส้ม, ++++=เหลืองเข้ม)

กลิ่น (+=หอมอ่อนๆ, ++=หอมปานกลาง, +++=หอมแรง, ++++=กลิ่นรุนแรง)

รสขม (+=ขมเล็กน้อย, ++=ขมปานกลาง, +++=ขมมาก, ++++=ขมรุนแรง)

รสซ่า (+=ซ่าเล็กน้อย, ++=ซ่าปานกลาง, +++=ซ่ามาก, ++++=ซ่าจนแสบลิ้น)



รูปที่ 10 คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันใบมะกรูด:น้ำมันปาล์ม ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 31 คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันปาล์มในอัตราส่วนต่างๆ

Code: B2 KLLO:POO

series No.	KLLO:POO	สี	กลิ่น	ระดับความขม	ระดับความซ่า	Remark
B2/0	1:0	+	++++	++++	++++	
B2/1	1:1	++++	+++	+++	+++	
B2/2	1:2	++++	+++	++	++	
B2/3	1:3	++++	+++	++	+	รสPOOเด่นมากขึ้น
B2/4	1:4	++++	+++	+	+	
B2/5	1:5	++++	+++	+	+	
B2/6	2:1	+++	++++	+++	++	กลิ่นKLLO รุนแรง
B2/7	3:1	+++	++++	+++	++	
B2/8	4:1	+++	++++	++++	++++	
B2/9	5:1	+++	++++	++++	++++	

สี (+=เหลืองอ่อน, +=เหลือง, +=เหลืองออกส้ม, +=เหลืองเข้ม)

กลิ่น (+=หอมอ่อนๆ, +=หอมปานกลาง, +=หอมแรง, +=กลิ่นรุนแรง)

รสขม (+=ขมเล็กน้อย, +=ขมปานกลาง, +=ขมมาก, +=ขมรุนแรง)

รสซ่า (+=ซ่าเล็กน้อย, +=ซ่าปานกลาง, +=ซ่ามาก, +=ซ่าจนแสบลิ้น)



รูปที่ 11 คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันใบมะกรูด:น้ำมันดอกคำฝอย ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 32 คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันดอกคำฝอยในอัตราส่วนต่างๆ

Code: B3 KLLO:SFO

series No.	KLLO:SFO	สี	กลิ่น	ระดับความขม	ระดับความซ่า	Remark
B3/0	1:0	+	++++	++++	++++	
B3/1	1:1	+	+++	+++	+++	
B3/2	1:2	+	+++	++	++	
B3/3	1:3	+	+++	++	+	} รสของSFOเด่น
B3/4	1:4	+	+++	+	+	
B3/5	1:5	+	+++	+	+	
B3/6	2:1	++	++++	+++	+++	} กลิ่นKLLO รุนแรง
B3/7	3:1	++	++++	+++	+++	
B3/8	4:1	++	++++	++++	++++	
B3/9	5:1	++	++++	++++	++++	

สี (+=เหลืองอ่อน, ++=เหลือง, +++=เหลืองออกส้ม, ++++=เหลืองเข้ม)

กลิ่น (+=หอมอ่อนๆ, ++=หอมปานกลาง, +++=หอมแรง, ++++=กลิ่นรุนแรง)

รสขม (+=ขมเล็กน้อย, ++=ขมปานกลาง, +++=ขมมาก, ++++=ขมรุนแรง)

รสซ่า (+=ซ่าเล็กน้อย, ++=ซ่าปานกลาง, +++=ซ่ามาก, ++++=ซ่าจนแสบลิ้น)



รูปที่ 12 คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันใบมะกรูด:น้ำมันทานตะวัน ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 33 คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันทานตะวันในอัตราส่วนต่างๆ

Code: B4 KLLO:SUO

series No.	KLLO:SUO	สี	กลิ่น	ระดับความขม	ระดับความซ่า	Remark
B4/0	1:0	+	++++	++++	++++	
B4/1	1:1	+	+++	+++	+++	
B4/2	1:2	+	+++	++	++	
B4/3	1:3	+	+++	++	+	รสของSUOเด่น
B4/4	1:4	+	+++	++	+	
B4/5	1:5	+	+++	++	+	
B4/6	2:1	++	++++	+++	+++	กลิ่นKLLO รุนแรง
B4/7	3:1	++	++++	+++	+++	
B4/8	4:1	++	++++	++++	++++	
B4/9	5:1	++	++++	++++	++++	

สี (+=เหลืองอ่อน, ++=เหลือง, +++=เหลืองออกส้ม, ++++=เหลืองเข้ม)

กลิ่น (+=หอมอ่อนๆ, ++=หอมปานกลาง, +++=หอมแรง, ++++=กลิ่นรุนแรง)

รสขม (+=ขมเล็กน้อย, ++=ขมปานกลาง, +++=ขมมาก, ++++=ขมรุนแรง)

รสซ่า (+=ซ่าเล็กน้อย, ++=ซ่าปานกลาง, +++=ซ่ามาก, ++++=ซ่าจนแสบลิ้น)



รูปที่ 13 คุณลักษณะของส่วนผสมของ น้ำมันใบมะกรูด:น้ำมันรำข้าว ในอัตราส่วน เท่ากับ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา

ตารางที่ 34 คุณลักษณะของส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดและน้ำมันรำข้าวในอัตราส่วนต่างๆ

Code: B5 KLLO:RBO

series No.	KLLO:RBO	สี	กลิ่น	ระดับความขม	ระดับความซ่า	Remark
B5/0	1:0	+	++++	++++	++++	
B5/1	1:1	++	+++	+++	+++	
B5/2	1:2	++	+++	++	++	
B5/3	1:3	++	+++	++	+	} รสของRBOเด่น
B5/4	1:4	++	+++	++	+	
B5/5	1:5	++	+++	+	+	
B5/6	2:1	+++	++++	+++	+++	} กลิ่นKLLO รุนแรง
B5/7	3:1	+++	++++	+++	+++	
B5/8	4:1	+++	++++	++++	++++	
B5/9	5:1	+++	++++	++++	++++	

สี (+=เหลืองอ่อน, ++=เหลือง, +++=เหลืองออกส้ม, ++++=เหลืองเข้ม)

กลิ่น (+=หอมอ่อนๆ, ++=หอมปานกลาง, +++=หอมแรง, ++++=กลิ่นรุนแรง)

รสขม (+=ขมเล็กน้อย, ++=ขมปานกลาง, +++=ขมมาก, ++++=ขมรุนแรง)

รสซ่า (+=ซ่าเล็กน้อย, ++=ซ่าปานกลาง, +++=ซ่ามาก, ++++=ซ่าจนแสบลิ้น)

ภาคผนวก ก

5.2 การทดลองแต่งกลิ่นด้วยน้ำมันที่มีกลิ่นหอม

5.2.1 การทดลองแต่งกลิ่นด้วย Lemon oil

ทดลองแต่งกลิ่นน้ำมันทานตะวัน น้ำมันมะกรูดและน้ำมันโสมมะกรูดด้วย Lemon oil ในปริมาณต่างๆจนได้กลิ่นของ Lemon oil บันทึกกลิ่นและรสของส่วนผสมที่ได้

ผลการวิจัย

ในการแต่งกลิ่นน้ำมันทานตะวัน (SUO) 2 กรัม ด้วย Lemon oil (LO) 0.04 กรัม คือ ความเข้มข้นของ Lemon oil 1.96%w/w พบว่า Lemon oil มีสีเหลืองเข้มออกส้ม มีกลิ่นคล้ายมะนาวดอง ทำให้ส่วนผสมนี้ (SUO-LO/1) มีกลิ่นมะนาวดองแรง (++++). ไม่มีกลิ่นของน้ำมันทานตะวัน รสขม ไม่เย็น ซ่าเล็กน้อย การผสมเข้ากันของ SUO และ Lemon oil ไม่ค่อยดี สังเกตเห็นหยดน้ำมันสีส้มขนาดเล็กของ Lemon oil เกาะข้างหลอดแก้ว (ดูรูปที่ 14-หลอดที่ 3 จากซ้าย)



รูปที่ 14 สีของน้ำมันและส่วนผสมของน้ำมันในการทดลองแต่งกลิ่น จากซ้ายไปขวา Lemon oil, น้ำมันทานตะวัน, ส่วนผสมของน้ำมันทานตะวันกับ Lemon oil, น้ำมันมะกรูด, ส่วนผสมของน้ำมันมะกรูดกับ Lemon oil, น้ำมันโสมมะกรูด, ส่วนผสมของน้ำมันโสมมะกรูดกับ Lemon oil

ในการแต่งกลิ่นน้ำมันมะกรูด (KLO) 2 กรัม ด้วย Lemon oil (LO) 0.10 กรัม คิดเป็นความเข้มข้นของ Lemon oil 4.76%w/w พบว่า KLO และ Lemon oil มีกลิ่นที่กลมกลืนกันมาก (ความแรงของน้ำมันทั้งสองเท่ากัน คือ +++) ทำให้แยกกลิ่นได้ยาก สีของส่วนผสม (A-LO/1-1) เข้มขึ้น (ดูรูปที่ 14-หลอดที่ 5 จากซ้าย) และมีรสขมมากขึ้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก Lemon oil ที่ใช้ผสมในช่วงการทดลองก่อนหน้านี้ มีกลิ่นที่ค่อนข้างผิดเพี้ยนจาก Lemon oil ปกติ จึงได้ทดสอบกับ Lemon oil จาก lot ใหม่ซึ่งมีความหอมมากกว่า พบว่าเมื่อผสม Lemon oil กับ KLO ที่ ความเข้มข้น 28.6%w/w ส่วนผสมมีกลิ่นหอมมะนาวที่ 41.2%w/w ขึ้นไป ส่วนผสมมีกลิ่นหอมมะนาวแรงมากขึ้น (KLO : Lemon oil = 1.0 : 0.7 กลบกลิ่นได้หมด)

ในการแต่งกลิ่นน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) 2 กรัม ด้วย Lemon oil (LO) ในความเข้มข้นของ Lemon oil ต่างๆกัน พบว่ากลิ่นของ KLLO ค่อนข้างแรง เริ่มได้กลิ่นของ Lemon oil ที่ 20%w/w รายละเอียดดังในตารางที่ 36 โดยที่ส่วนผสมจะมีสีเข้มข้น(ดูรูปที่ 14-หลอดขาวสุด) รสชาติเย็นซ่า กัดลิ้น และมีรสขมมากขึ้น อย่างไรก็ตามก็ดีเนื่องจาก Lemon oil ที่ใช้ผสมในช่วงการทดลองก่อนหน้านี้ มีกลิ่นที่ค่อนข้างผิดเพี้ยนจาก Lemon oil ปกติ จึงได้ทดสอบกับ Lemon oil จาก lot ใหม่ซึ่งมีความหอมมากกว่า เมื่อผสม Lemon oil ที่ความเข้มข้น 45.9%w/w ส่วนผสมเริ่มมีกลิ่นมะนาว และที่ความเข้มข้น 55.6%w/w ขึ้นไป ส่วนผสมมีกลิ่นหอมมะนาวมากขึ้น (KLLO : Lemon oil = 1.0 : 1.25 แต่ยังกลบกลิ่นไม่ค่อยหมด เนื่องจาก KLLO มีกลิ่นเหม็นเขียวที่ค่อนข้างแรง)

ตารางที่ 36 ส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดกับ Lemon oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Code.	KLLO 100% (g)	Lemon oil		ระดับความแรงของกลิ่น	
		(g)	(%w/w)	KLLO	Lemon oil
B-LO/1-1	2.00	0.10	4.76	++++	+
B-LO/1-2	2.00	0.20	9.09	++++	+
B-LO/1-3	2.00	0.30	13.04	++++	+
B-LO/1-4	2.00	0.40	16.67	++++	+
B-LO/1-5	2.00	0.50	20.00	++++	+++
B-LO/1-6	2.00	0.60	23.08	+++	++++

5.2.2 การทดลองแต่งกลิ่นด้วย Peppermint oil

ทดลองแต่งกลิ่นน้ำมันทานตะวัน น้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดด้วย Peppermint oil ในปริมาณต่างๆจนได้กลิ่นของ Peppermint oil บันทึกกลิ่นและรสของส่วนผสมที่ได้

ผลการวิจัย

ในการแต่งกลิ่นน้ำมันทานตะวัน (SUO) 2 กรัม ด้วย Peppermint oil 0.10 กรัม คือ ความเข้มข้นของ Peppermint oil 4.76%w/w พบว่า Peppermint oil มีสีเหลือง กลิ่นหอมเย็น ในขณะที่ SUO มีสีเหลืองอ่อนจาง ส่วนผสมที่ได้ (SUO-PM/1) มีสีเหลืองอ่อน(ดูรูปที่ 15-หลอดที่ 3 จากซ้าย) มีกลิ่นฉุนที่แรง (++++) รสขม รสไม่เย็น ไม่ซ่า



รูปที่ 15 สีของน้ำมันและส่วนผสมของน้ำมันในการทดลองแต่งกลิ่น จากซ้ายไปขวา Peppermint oil, น้ำมันทานตะวัน, ส่วนผสมของน้ำมันทานตะวันกับ Peppermint oil, น้ำมันมะกรูด, ส่วนผสมของน้ำมันมะกรูดกับ Peppermint oil, น้ำมันใบมะกรูด, ส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดกับ Peppermint oil

ในการแต่งกลิ่นน้ำมันมะกรูด (KLO) เมื่อผสม Peppermint oil ที่ความเข้มข้น 13.04%w/w ส่วนผสมที่ได้มีกลิ่นหอมมันที่ซึ่งรู้สึกได้ ส่วนที่ความเข้มข้น 17.01 และ 20.00%w/w ส่วนผสมมีกลิ่นหอมมันที่ที่แรงขึ้นมาก (KLO : Peppermint oil = 1.0 : 0.25 กลบกลิ่นหมด) ในส่วนของสี KLO มีสีเหลืองอ่อนจาง เมื่อผสมกับ Peppermint oil ส่วนผสม (A-PM/1-5) มีสีเหลืองอ่อน คือ สีเข้มขึ้นเล็กน้อย สีใกล้เคียงกับส่วนผสมของน้ำมันทานตะวันกับ Peppermint oil (ดูรูปที่ 15-หลอดที่ 5 จากซ้าย) มีกลิ่นมันที่แรง (++++) ส่วนกลิ่นของ KLO อ่อนกว่ามาก (+) รสขม เข้มข้น อาจไม่ต้องให้สารแต่งรสเย็น

ในการแต่งกลิ่นน้ำมันใบมะกรูด (KLLO) 2 กรัม ด้วย Peppermint oil ในความเข้มข้นของ Peppermint oil ต่างๆกัน พบว่า KLLO มีสีเหลืองออกส้ม ในขณะที่ Peppermint oil มีสีเหลือง และ KLLO มีกลิ่นแรงมาก ที่ความเข้มข้นของ Peppermint oil ที่ 42.86%w/w จึงจะเริ่มได้กลิ่นหอมของมันที่ และที่ 55.56%w/w (KLLO : Peppermint oil = 1.0 : 1.25 กลบกลิ่นไม่ค่อยหมด เนื่องจาก KLLO มีกลิ่นเหม็นเขียวที่ค่อนข้างแรง) ส่วนผสมจึงจะกลิ่นหอมมันที่มากขึ้น (+++) และกลิ่นแรงกว่ากลิ่นของ KLLO (++) เล็กน้อย ทดสอบรสชาติของส่วนผสม B-PM/1-14 พบว่ามีรสเย็นซ่า กัดลิ้น และขมมาก สีของส่วนผสมเป็นสีเหลือง (ดูรูปที่ 15-หลอดขวาสุด)

โดยสรุป Lemon oil มีกลิ่นที่กลมกลืนไปกับ KLO โดยที่ KLO มีกลิ่นหอมกว่า Lemon oil จึงไม่น่าใช้ในการกลบกลิ่น KLO ส่วน Peppermint oil มีกลิ่นที่แตกต่าง หอมกลิ่นมันที่เย็น ช่วยกลบกลิ่น KLO ได้ จึงน่าที่จะใช้กลิ่นของ Peppermint oil ในการแต่งกลิ่น KLO มากกว่า สำหรับ KLLO มีกลิ่น

แรงมาก ออกเหม็นเขียว ต้องใช้ Lemon oil และ Peppermint oil ในปริมาณสูงมากในการกลบกลิ่น ซึ่งยังต้องพัฒนาต่อไป

5.2.3 การทดลองแต่งกลิ่นด้วย Orange oil

ทดลองแต่งกลิ่น น้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดด้วย Orange oil ในปริมาณต่างๆจนได้กลิ่นของ Orange oil บันทึกลงและรสชาติของส่วนผสมที่ได้

ผลการวิจัย

สำหรับ KLO เมื่อเติม Orange oil ที่ความเข้มข้น 28.6%w/w ส่วนผสมมีกลิ่นหอมส้ม ส่วนที่ความเข้มข้น 41.2%w/w ขึ้นไป ส่วนผสมมีกลิ่นหอมส้มแรงมากขึ้น (KLO : Orange oil = 1.0 : 0.8 กลบกลิ่นหมด) สำหรับ KLLO เมื่อเติม Orange oil ที่ความเข้มข้น 71.4%w/w ส่วนผสมเริ่มมีกลิ่นส้ม ส่วนที่ 80.0%w/w ขึ้นไป สารละลายมีกลิ่นหอมส้มมากขึ้น (KLLO : Orange oil = 1.0 : 4.0 กลบกลิ่นไม่ค่อยหมด เนื่องจาก KLLO มีกลิ่นเหม็นเขียวที่ค่อนข้างแรง)

5.2.4 การทดลองแต่งกลิ่นด้วย Spearmint oil

ทดลองแต่งกลิ่น น้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูดด้วย Spearmint oil ในปริมาณต่างๆจนได้กลิ่นของ Spearmint oil บันทึกลงและรสชาติของส่วนผสมที่ได้

ผลการวิจัย

ในการแต่งกลิ่นน้ำมันมะกรูดด้วย Spearmint oil พบว่า ที่ความเข้มข้นของ Spearmint oil ที่ 1.48%w/w เริ่มมีกลิ่นหอมเย็นอ่อน และกลิ่นหอมเย็นมากที่ความเข้มข้น 4.76 และ 5.88%w/w รายละเอียดดังในตารางที่ 37 คาดว่าปริมาณของ Spearmint oil ที่เหมาะสมในการแต่งกลิ่น KLO อยู่ที่ประมาณ 5%w/w

ตารางที่ 37 ส่วนผสมของน้ำมันมะกรูดกับ Spearmint oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ

KLO (g)	Spearmint oil (g)	% Spearmint oil	ความหอม	ระดับความหอม
4.00	0.00	0.00	-	-
4.00	0.06	1.48	เริ่มหอมเย็น	+
4.00	0.10	2.44	หอมเย็น	++
4.00	0.15	3.61	หอมมากขึ้น	+++
4.00	0.20	4.76	หอมมากขึ้น	++++
4.00	0.25	5.88	หอมมากๆ	+++++

ในการแต่งกลิ่นน้ำมันใบมะกรูดด้วย Spearmint oil พบว่า ที่ความเข้มข้นของ Spearmint oil ที่ 3.61%w/w เริ่มมีกลิ่นหอมอ่อนๆของ Spearmint oil และที่ความเข้มข้น 12.09 และ 13.04%w/w กลิ่น Spearmint oil หอมมาก รายละเอียดดังในตารางที่ 38 คาดว่าปริมาณของ Spearmint oil ที่เหมาะสมในการแต่งกลิ่น KLLO จะอยู่ที่ประมาณ 12%w/w

ตารางที่ 38 ส่วนผสมของน้ำมันใบมะกรูดกับ Spearmint oil ที่ความเข้มข้นต่างๆ

KLLO (g)	Spearmint oil (g)	% Spearmint oil	ความหอม	ระดับความหอม
4.00	0.00	0.00	-	-
4.00	0.06	1.48	-	-
4.00	0.10	2.44	-	-
4.00	0.15	3.61	เริ่มหอม อ่อนๆ	+
4.00	0.20	4.76	หอมขึ้น	+
4.00	0.25	5.88	หอมขึ้น	+
4.00	0.30	6.98	หอมขึ้น	+
4.00	0.35	8.05	หอมขึ้น	+
4.00	0.40	9.09	หอมขึ้น	+
4.00	0.45	10.11	หอมมากขึ้น	++
4.00	0.50	11.11	หอมมาก	+++
4.00	0.55	12.09	หอมมาก	++++
4.00	0.60	13.04	หอมมากๆ	+++++

โดยสรุป Spearmint oil น่าจะเหมาะสำหรับแต่งกลิ่นของ KLO และ KLLO หากเปรียบเทียบผลกับการใช้ Peppermint oil จะเห็นว่า Spearmint oil ให้กลิ่นหอมสดชื่นที่แรงกว่า โดยสามารถใช้ในปริมาณที่น้อยกว่า และกลบกลิ่นได้ดีกว่า

ภาคผนวก ง

รายละเอียดการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัยในข้อ 5.3 การแต่งรสหวานด้วยสารให้ความหวาน

5.3.1 การทดลองแต่งรสหวานด้วย Acesulfame-K

เติม Acesulfame-K ในน้ำมันปริมาณประมาณ 0.5%w/w บันทึกการละลาย และรสหวาน
ผลการวิจัย

พบว่า Acesulfame K ซึ่งมีลักษณะเป็นเกล็ดสีขาว ละลายในน้ำ แต่ไม่ละลายในน้ำมันที่ใช้ทดสอบ (KLO, KLLO, SBO, POO, SFO, SUO หรือ RBO) ตกเป็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ดังในรูปที่ 16

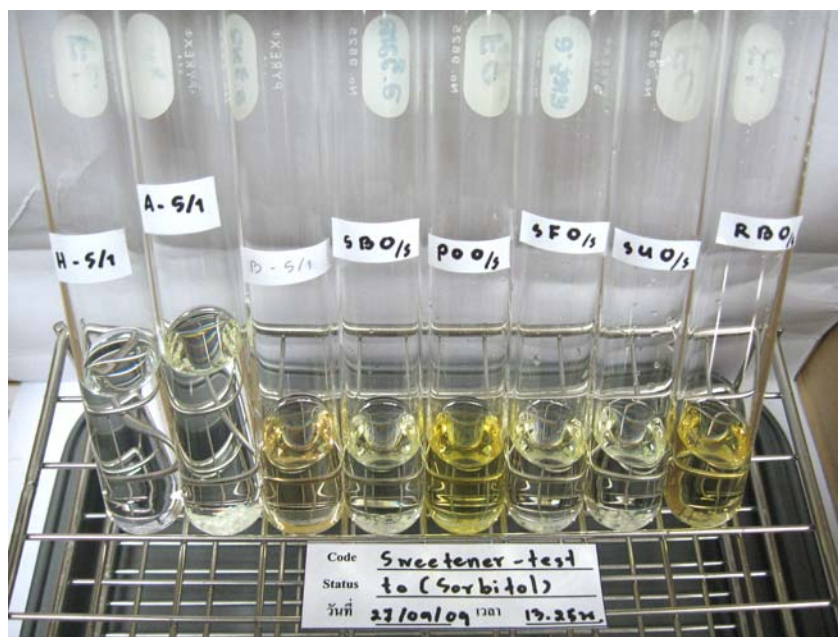


รูปที่ 16 การทดสอบการละลายของ Acesulfame-K จากซ้ายไปขวา Acesulfame-K ในน้ำ, ในน้ำมันมะกรูด, ในน้ำมันใบมะกรูด, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว

5.3.2 การทดลองแต่งรสหวานด้วย Sorbitol powder

เติม Sorbitol powder ในน้ำมันปริมาณประมาณ 0.4-0.6 %w/w บันทึกการละลาย และรสหวาน
ผลการวิจัย

พบว่า Sorbitol powder มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ สีขาว ละลายในน้ำ แต่ไม่ละลายในน้ำมันที่ใช้ทดสอบ (KLO, KLLO, SBO, POO, SFO, SUO หรือ RBO) ตกเป็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด ดังในรูปที่ 17



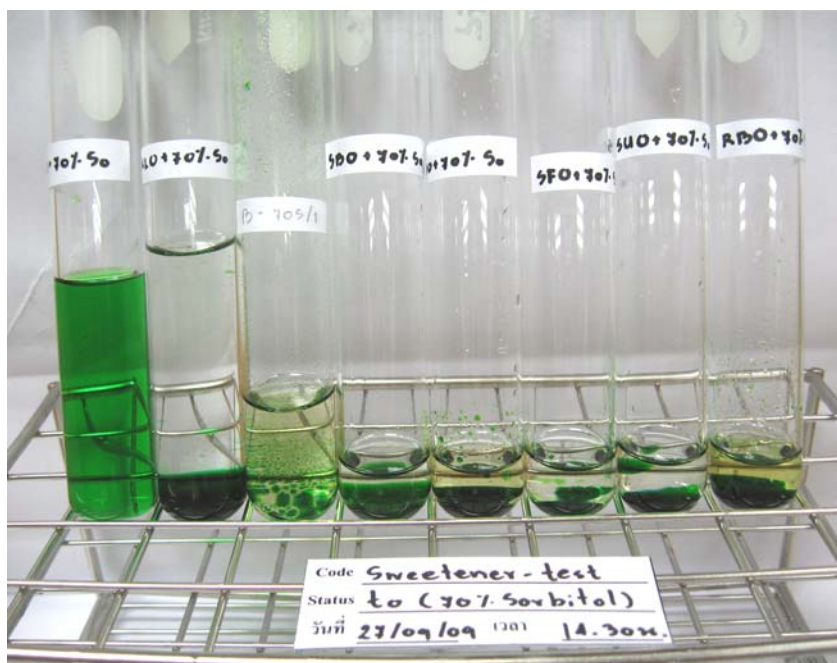
รูปที่ 17 การทดสอบการละลายของ Sorbitol powder จากซ้ายไปขวา Sorbitol ในน้ำ, ในน้ำมันมะกูด, ในน้ำมันใบมะกูด, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว

5.3.3 การทดลองแต่งรสหวานด้วย 70% Sorbitol solution

เติม 70% Sorbitol solution ในน้ำมันปริมาณต่างๆ บันทึกความเข้ากันได้ และรสหวาน

ผลการทดลอง

พบว่า 70% Sorbitol solution เป็นสารละลายใส ผสมเข้ากันได้กับน้ำเป็นเนื้อเดียวกัน แต่ไม่ผสมรวมกับน้ำมันที่ใช้ทดสอบ (KLO, KLLO, SBO, POO, SFO, SUO หรือ RBO) แยกเป็นชั้นต่างหาก และเนื่องจาก 70% Sorbitol solution เป็นสารละลายใสทำให้สังเกตความเข้ากันได้ได้ยากในน้ำมันที่มีสีอ่อน จึงได้เติมสีผสมอาหารสีเขียวลงไป เพื่อให้เห็นผลความไม่เข้ากันได้ มีการแยกชั้นชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 18 รายละเอียดดังในตารางที่ 37



รูปที่ 18 การทดสอบการผสมเข้ากันของ 70% Sorbitol solution จากซ้ายไปขวา 70% Sorbitol solution ในน้ำ, ในน้ำมันมะกูด, ในน้ำมันใบมะกูด, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว

ตารางที่ 39 การทดสอบการผสมเข้ากันของ 70% Sorbitol solution ในน้ำมันชนิดต่างๆ

Code.	Solvent (g)		70% Sorbitol solution (g)	%w/w sweetener	Result
H2O+70%So	H ₂ O	10.00	2.05	17.01	miscible
KLO+70%So	KLO 100%	10.00	1.01	9.17	immiscible
B/70S/1	KLLO 100%	5.00	0.13	2.53	immiscible
SBO+70%So	SBO	2.00	0.51	20.32	immiscible
POO+70%So	POO	2.00	0.52	20.63	immiscible
SFO+70%So	SFO	2.00	0.5	20.00	immiscible
SUO+70%So	SUO	2.00	0.5	20.00	immiscible
RBO+70%So	RBO	2.00	0.52	20.63	immiscible

5.3.4 การทดลองแต่งรสหวานด้วย Xylitol

เติม Xylitol C ในน้ำมันในปริมาณประมาณ 0.6%w/w บันทึกการละลาย และรสหวาน

ผลการวิจัย

พบว่า Xylitol C มีลักษณะเป็นเกล็ดใสเหมือนน้ำตาลทราย ละลายในน้ำ แต่ไม่ละลายในน้ำมันที่ใช้ทดสอบ (KLO, KLLO, SBO, POO, SFO, SUO หรือ RBO) เห็นเป็นตะกอนตกอยู่ที่ก้นหลอด ดังรูปที่ 19



รูปที่ 19 การทดสอบการละลายของ Xylitol C จากซ้ายไปขวา Xylitol C ในน้ำ, ในน้ำมันมะกุก, ในน้ำมันใบมะกุก, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว

5.3.5 การทดลองแต่งรสหวานด้วย Sucralose

เติม Sucralose ในน้ำมันในปริมาณ 0.6%w/w บันทึกการละลาย และรสหวาน

ผลการวิจัย

พบว่า Sucralose มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวครีมอ่อนๆ ละลายในน้ำ แต่ไม่ละลายในน้ำมันที่ใช้ทดสอบ (KLO, KLLO, SBO, POO, SFO, SUO หรือ RBO) เห็นเป็นตะกอนตกอยู่ที่ก้นหลอด ดังในรูปที่ 20



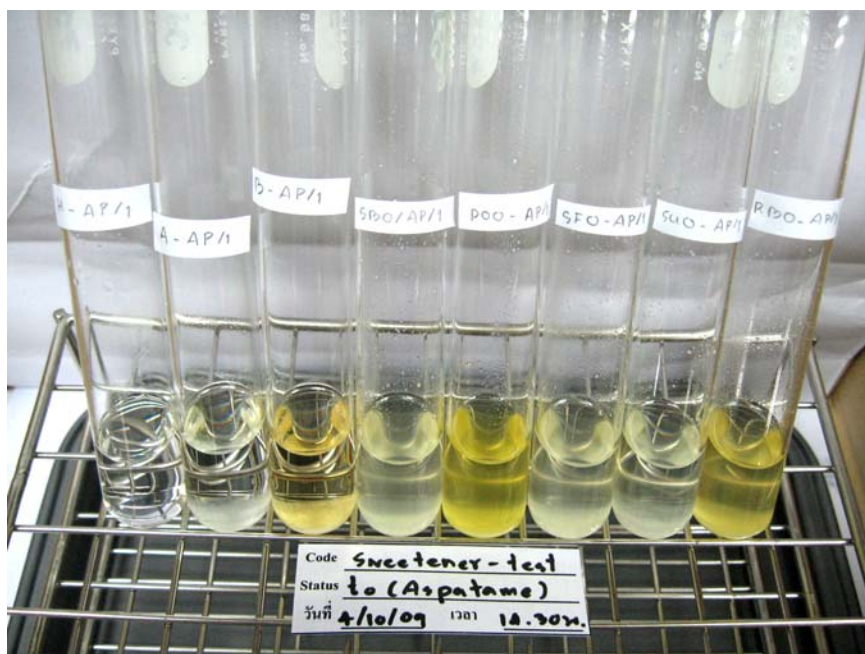
รูปที่ 20 การทดสอบการละลายของ Sucralose จากซ้ายไปขวา Sucralose ในน้ำ, ในน้ำมันมะกูด, ในน้ำมันใบมะกูด, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว

5.3.6 การทดลองแต่งรสหวานด้วย Aspartame

เติม Aspartame ในน้ำมันในปริมาณ 0.6%w/w บันทึกการละลาย และรสหวาน

ผลการวิจัย

พบว่า Aspartame มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวครีมอ่อนๆ ละลายในน้ำ แต่ไม่ละลายในน้ำมันที่ใช้ทดสอบ (KLO, KLLO, SBO, POO, SFO, SUO หรือ RBO) ฟุ้งกระจายหรือเห็นเป็นตะกอนตกอยู่ที่ก้นหลอด ดังในรูปที่ 21



รูปที่ 21 การทดสอบการละลายของ Aspartame จากซ้ายไปขวา Aspartame ในน้ำ, ในน้ำมันมะกรูด, ในน้ำมันใบมะกรูด, ในน้ำมันถั่วเหลือง, ในน้ำมันปาล์ม, ในน้ำมันดอกคำฝอย, ในน้ำมันทานตะวัน, ในน้ำมันรำข้าว

ภาคผนวก จ

รายละเอียดการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัยในข้อ 5.5 การทดลองเติม Solubilizing agent หรือส่วนประกอบอื่น เพื่อช่วยการละลายของสารให้ความหวาน และ/หรือสารแต่งรสอื่นๆ และการทดสอบความเข้ากันได้กับน้ำมันหอมระเหย

5.5.1 การทดลองเติม Solubilizing agent เพื่อช่วยการละลายของ 70% Sorbitol solution

ทดลองเติม solubilizing agents คือ Polyoxyethelene 40 hydrogenated castor oil (PHC), Tween20 (Tw20), Tween80 (Tw80), Glycerin (GR) และ Propylene glycol (PG) ใช้แบบเดี่ยว ในปริมาณ 1%w/w โดยผสมลงใน KLO ที่มี 70% Sorbitol solution อยู่ 2%w/w (70% Sorbitol 0.1 กรัม + KLO 4.9 กรัม) และเพิ่มปริมาณของ solubilizing agents จาก 0.9% - 5.6% ผสมโดยใช้ vortex mixer เติมสีผสมอาหารสีเขียวเพื่อให้สังเกตได้ง่าย

ผลการวิจัย

พบว่า solubilizing agents ทุกตัว ไม่สามารถทำให้ 70% Sorbitol solution เข้ากับ KLO ได้ ผลดังรูปที่ 22 ยังคงมีการแยกชั้น



รูปที่ 22 การทดลองเติม Solubilizing agent เพื่อช่วยการละลายของ 70% Sorbitol solution จากซ้ายไปขวา 70% Sorbitol solution, 70% Sorbitol solution+KLO เติม PHC, เติม Tween20, เติม Tween80, เติม Glycerin, เติม Propylene glycol

5.5.2 การทดลองเติม Solubilizing agent เพื่อช่วยการละลายของ Acesulfame-K

ทดลองเติม solubilizing agents เช่นเดียวกับที่ใช้ใน 70% Sorbitol solution โดยผสมลงใน KLO ที่มี Acesulfame K อยู่ 1%w/w (Acesulfame K 0.05 กรัม + KLO 4.95 กรัม) และเพิ่มปริมาณของ solubilizing agents จาก 0.9% - 5.6% ผสมโดยใช้ vortex mixer

ผลการวิจัย

พบว่า solubilizing agents ทุกตัว ไม่สามารถทำให้ Acesulfame-K ละลายเข้ากับ KLO ได้ ผลดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 การทดลองเติม Solubilizing agent เพื่อช่วยการละลายของ Acesulfame-K จากซ้ายไปขวา Acesulfame-K+KLO เติม PHC, เติม Tween 20, เติม Tween 80, เติม Glycerin, เติม Propylene glycol

5.5.3 การทดลองใช้ Glycerin และ Propylene glycol เป็นตัวทำละลายสำหรับสารแต่งรส และสารแต่งกลิ่น

ทดลองใช้ Glycerin (GR) และ Propylene glycol (PG) ผสมกับสารให้ความหวานต่างๆ ในปริมาณ 1% เช่น Acesulfame K, Aspartame, Sucralose, Sorbitol และ Saccharin

ผลการทดลอง

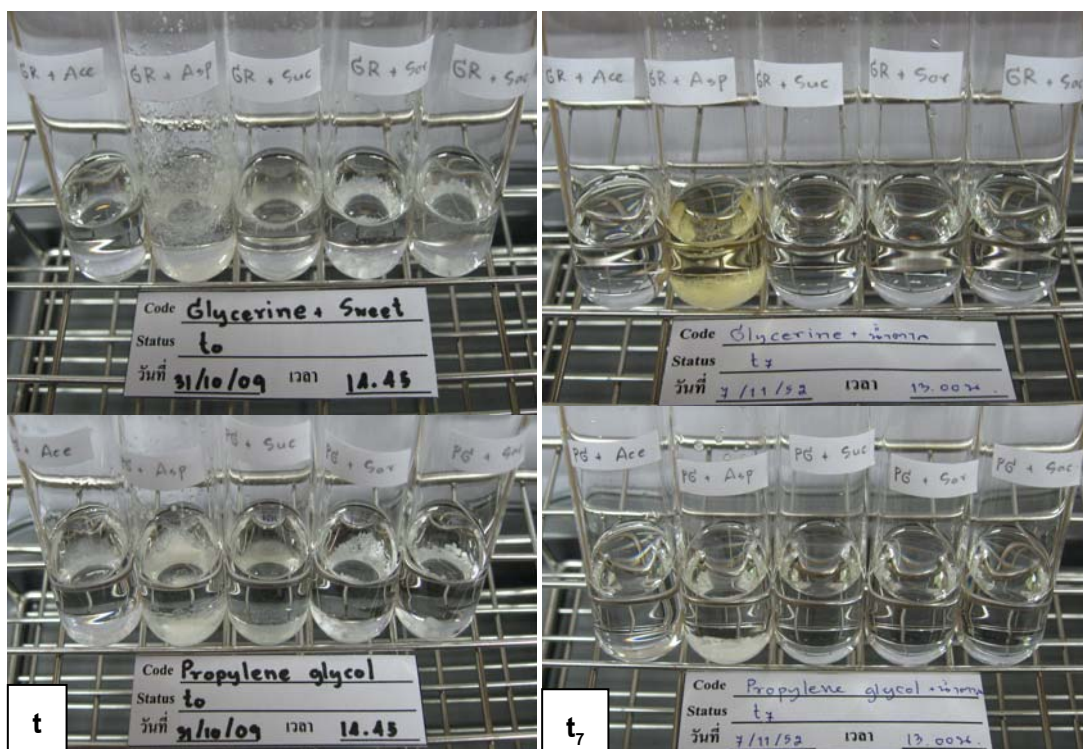
พบว่า หลังการผสม ทั้ง GR และ PG ไม่ช่วยการละลาย

หลัง 7 วัน ชุดของ GR ละลายเป็นเนื้อเดียวกับ Acesulfame K, Sucralose และ Sorbitol แต่ไม่ละลาย Aspartame ส่วน Saccharin ละลายได้ไม่หมด ส่วนชุดของ PG ละลายเป็นเนื้อเดียวกับ Acesulfame K, Sucralose, Sorbitol และ Saccharin แต่ไม่ละลาย Aspartame ผลดังในตารางที่ 39 และรูปที่ 24

สรุปผลการทดลอง Glycerin ละลายเป็นเนื้อเดียวกับ Acesulfame K, Sucralose และ Sorbitol แต่ไม่ละลาย Aspartame ส่วน Saccharin ละลายได้ไม่หมด ในขณะที่ Propylene glycol ละลายเป็นเนื้อเดียวกับ Acesulfame K, Sucralose, Sorbitol และ Saccharin แต่ไม่ละลาย Aspartame

ตารางที่ 41 ผลการทดสอบ Glycerin (GR) และ Propylene glycol (PG) ในการช่วยละลายสารแต่งรส
สารแต่งกลิ่น

Glycerin + สารให้ความหวาน (1%w/w)		
Code	Day-0	Day-7
GR + Ace	Acesulfame-K ไม่ละลาย นอนกั้น – GR ใส	สารละลายใส
GR + Asp	Aspartame ไม่ละลาย นอนกั้น – GR ใส	Aspartame ไม่ละลาย นอนกั้น - GR มีสีเหลือง
GR + Suc	Sucralose ไม่ละลาย นอนกั้น – GR ใส	สารละลายใส
GR + Sor	Sorbitol ไม่ละลาย นอนกั้น – GR ใส	สารละลายใส
GR + Sac	Saccharin ไม่ละลาย นอนกั้น – GR ใส	Saccharin ละลายไม่หมด เหลือนอนกั้น - GR ใส
Propylene glycol + สารให้ความหวาน (1%w/w)		
Code	Day-0	Day-7
PG + Ace	Acesulfame-K ไม่ละลาย นอนกั้น – GR ใส	สารละลายใส
PG + Asp	Aspartame ไม่ละลาย นอนกั้น – GR ใส	Aspartame ไม่ละลาย นอนกั้น - GR มีสีเหลืองอ่อนๆ
PG + Suc	Sucralose ไม่ละลาย นอนกั้น – GR ใส	สารละลายใส
PG + Sor	Sorbitol ไม่ละลาย นอนกั้น – GR ใส	สารละลายใส
PG + Sac	Saccharin ไม่ละลาย นอนกั้น – GR ใส	สารละลายใส



รูปที่ 24 เปรียบเทียบการละลายของสารให้ความหวานชนิดต่างๆ ใน GR และ PG 2 รูปซ้าย-วันแรก
Glycerin (บน) (Glycerin+Ace, +Asp, +Suc, +Sor, +Sac) และ Propylene glycol (ล่าง)
2 รูปขวา-วันที่ 7

5.5.4 การทดลองใช้ PEG 400 เพื่อช่วยการละลายสารแต่งรสและสารแต่งกลิ่น และทดสอบความเข้ากันได้กับน้ำมันหอมระเหย

ทดสอบความเข้ากันได้กับน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด และทดสอบการละลายของ PEG 400 กับสารต่างๆ ตามปริมาณในตารางที่ 42 และทดสอบการช่วยการละลาย Acesulfame-K (ปริมาณ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20%w/w)

ผลการทดลอง

PEG 400 สามารถละลายเข้ากับ KLO, KLLO, PHC, Tween 20, Acesulfame-K, สารแต่งสี และสารแต่งกลิ่นได้สารละลายใส แต่เมื่อละลายใน Tween 80 จะได้สารละลายที่ขุ่นเล็กน้อย และมีข้อเสียเล็กน้อยที่มีรสขมและกลิ่นเปรี้ยว รายละเอียดดังในตารางที่ 42

PEG 400 สามารถละลาย Acesulfame-K ได้สารละลายใสในวันที่ 2 (วันแรก ไม่ละลาย) สูงถึง 20% (คาดว่าอาจได้มากกว่านี้) แต่ต้องใช้เวลาคนก่อนข้างนาน ควรพิจารณาเพิ่มความเร็วในการละลายโดยใช้เครื่อง sonicate หรือเครื่องปั่น เพื่อให้สะดวกในการใช้ 20% Acesulfame K เป็นสารแต่งรสหวานในคำรับต่อไป

ตารางที่ 42 การทดสอบความเข้ากันได้ของ PEG 400 กับน้ำมันหอมระเหย และการช่วยละลายสาร
แต่งกลิ่นและสารแต่งรส

Code	PEG 400 + KLO		PEG 400 + KLLO		PEG 400+ Ace-K		PEG 400 + Color		PEG 400 + PHC		PEG 400
weight (g)	0.05	0.95	0.05	0.95	1.95	0.05	2.01	0.04	1.95	0.05	1.96
App.	ใส	เหลือง อ่อน	ใส	เหลือง	ใส	ใส	ใส	ม่วง เข้ม	ใส	ใส	ใส
Day 0	Sol ⁿ เหลืองอ่อน ใส		Sol ⁿ เหลือง ใส		Sol ⁿ เหลืองอ่อน ใส		Sol ⁿ สีม่วงใส		Sol ⁿ ใส		Sol ⁿ
Day 1	Sol ⁿ เหลืองอ่อน ใส		Sol ⁿ เหลือง ใส		Sol ⁿ เหลืองอ่อน ใส		Sol ⁿ สีม่วงใส		Sol ⁿ ใส		Sol ⁿ ขุ่น เล็กน้อย
Day 7	Sol ⁿ เหลืองอ่อน ใส		Sol ⁿ เหลืองใส		Sol ⁿ เหลืองอ่อน ใส		Sol ⁿ สีม่วงใส		Sol ⁿ ใส		Sol ⁿ ขุ่น
% Solution	5% PEG 400		5% PEG 400		5% PEG 400		1.95% color in PEG 400		2.5% PHC in PEG 400		2.97% T in PEG 400

ภาคผนวก จ

รายละเอียดการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัยในข้อ 5.6 การทดลองผสม Emulsifier กับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด

ทำการทดลองผสม Emulsifier 3 ชนิด คือ Tween 80, Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil (PHC), และ Lecithin ร่วมกับสารให้ความหวาน Acesulfame-K (20% solution) ในปริมาณรวมกันไม่เกิน 5% ในน้ำในมะกรูด รายละเอียดดังในตารางที่ 43-45

สารละลาย 20% Acesulfame-K มีสีม่วงเข้ม เตรียมโดยละลาย Acesulfame-K 2.5 กรัม ลงในน้ำ 7.5 กรัม แล้วเตรียมส่วนผสมอาหารสีม่วงลงไปเพื่อให้เห็นสีได้ชัดเจนขึ้น

ตารางที่ 43 การทดลองผสม Tween 80, 20% Acesulfame-K และ น้ำมันมะกรูด

code	KLO (g)	20%Acesulfame-K (g)	Tween 80 (g)	%Tween 80
20%Ace	4.80	0.20	0.00	0.00
A-Ace-T0	4.80	0.20	0.00	0.00
A-Ace-T1	4.80	0.20	0.02	0.40
A-Ace-T2	4.81	0.20	0.04	0.79
A-Ace-T3	4.80	0.20	0.06	1.19
A-Ace-T4	4.80	0.20	0.08	1.57
A-Ace-T5	4.80	0.21	0.10	1.96
A-Ace-T6	4.80	0.20	0.15	2.91
A-Ace-T7	4.80	0.21	0.20	3.84
A-Ace-T8	4.80	0.20	0.30	5.66

ตารางที่ 44 การทดลองผสม Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil (PHC),
20% Acesulfame-K และ น้ำมันมะกูด

code	KLO (g)	20%Ace (g)	PHC (g)	%PHC
A-Ace-PHC1	4.80	0.20	0.02	0.40
A-Ace-PHC2	4.80	0.21	0.05	0.99
A-Ace-PHC3	4.80	0.21	0.09	1.76
A-Ace-PHC4	4.80	0.20	0.10	1.96
A-Ace-PHC5	4.80	0.20	0.12	2.34
A-Ace-PHC6	4.80	0.20	0.16	3.10
A-Ace-PHC7	4.80	0.20	0.18	3.47
A-Ace-PHC8	4.80	0.20	0.22	4.21
A-Ace-PHC9	4.80	0.20	0.25	4.76
A-Ace-PHC10	4.80	0.20	0.30	5.66

ตารางที่ 45 การทดลองผสม Lecithin, 20% Acesulfame-K และ น้ำมันมะกูด

code	KLO (g)	20%Ace (g)	Lecithin (g)	%Lecithin
A-20%Ace	4.80	0.20	0.00	0.00
A-Ace-Lec1	4.80	0.22	0.02	0.40
A-Ace-Lec2	4.80	0.21	0.05	0.99
A-Ace-Lec3	4.80	0.21	0.08	1.57
A-Ace-Lec4	4.80	0.21	0.10	1.96
A-Ace-Lec5	4.80	0.20	0.12	2.34
A-Ace-Lec6	4.80	0.21	0.15	2.91
A-Ace-Lec7	4.80	0.21	0.19	3.65
A-Ace-Lec8	4.80	0.20	0.20	3.85
A-Ace-Lec9	4.80	0.22	0.25	4.74
A-Ace-Lec10	4.80	0.20	0.30	5.66

ผลการวิจัย

ในการทดลองนี้เป็นความพยายามในการเติม Emulsifier ลงไปในน้ำมันหอมระเหย ด้วยความคาดหวังว่าจะมีการเปลี่ยนเป็น oil-in-water emulsion ในปาก (โดยอาศัย Emulsifier ที่เติมลงไปล่วงหน้า) เมื่อมีการอม soft gelatin capsule ซึ่งบรรจุสูตรตำรับน้ำมันหอมระเหยนี้และเกิดการปลดปล่อยสูตรตำรับน้ำมันหอมระเหยออกมารวมกับน้ำลายในปาก การเติม 20% Acesulfame-K ประมาณ 0.2 กรัม เนื่องจากของเหลวที่จะบรรจุลงใน soft gelatin capsule ต้องมีน้ำหรือแอลกอฮอล์เป็นส่วนผสมไม่เกิน 5%

พบว่าส่วนผสมที่ได้มีการแยกชั้นในชุดของ Tween80 ส่วนในอีก 2 ชุด มีความขุ่นลักษณะทางกายภาพไม่ดี (รูปที่ 25-27)

ชุดของ Tween 80 จากการทดลองพบว่าหลังเตรียมเสร็จ สารที่ได้มีลักษณะสีฟ้าขุ่นจางๆ และเมื่อทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที สารที่ได้แยกชั้นออกจากกันชัดเจน นอกจากนี้ สีสผสมอาหารที่ใช้ยังทำปฏิกิริยากับ KLO ทำให้ได้ชั้นสีฟ้า-สีน้ำเงิน (รูปที่ 25)



รูปที่ 25 การทดลองผสม Tween 80, 20% Acesulfame-K และ น้ำมันมะกรูด จากซ้ายไปขวา หลอดที่ 1 ส่วนประกอบต่างๆในน้ำ, หลอดที่ 2-9 ส่วนประกอบต่างๆในน้ำมันมะกรูด ที่ความเข้มข้นต่างๆของ Tween 80 (0-5.66%)

ชุดของ Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil (PHC) หลังจากเตรียม ได้ส่วนผสมสีม่วงอ่อน เมื่อตั้งทิ้งไว้จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าขุ่น แขนงตะกอนอยู่ได้ค่อนข้างนาน แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ทุกหลอดเริ่มมีชั้นสีฟ้าเข้มนอนก้นอยู่ แต่เมื่อเขย่าจะหายไป ส่วนผสมจะคงตัวมากขึ้นเมื่อปริมาณของ PHC เพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นที่ใช้ส่วนผสมที่ได้ยังไม่คงตัวดี (รูปที่ 26)



รูปที่ 26 การทดลองผสม Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil (PHC) , 20% Acesulfame-K และ น้ำมันมะกูด ที่ความเข้มข้นต่างๆของ PHC (0.4-5.66%)

ชุดของ Lecithin หลังการเตรียม ส่วนผสมมีลักษณะสีฟ้าอมส้ม (Lecithin มีสีส้มเข้มและหนืด) เมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเปลี่ยนเป็นสีฟ้าขุ่น เมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ทุกหลอดเริ่มมีชั้นสีฟ้าเข้มนอนก้นอยู่ แต่เมื่อเขย่าจะหายไป ส่วนผสมจะคงตัวมากขึ้นเมื่อปริมาณของ Lecithin เพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นที่ใช้สารที่ได้ยังไม่คงตัว (รูปที่ 27)



รูปที่ 27 การทดลองผสม Lecithin , 20% Acesulfame-K และ น้ำมันมะกูด จากซ้ายไปขวา หลอดที่ 1 ส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำ, หลอดที่ 2-9 ส่วนประกอบต่างๆในน้ำมันมะกูด ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของ Lecithin (0-5.66%)

จากผลการทดลอง ต้องพิจารณาปรับสัดส่วนของ PHC และ Lecithin ซึ่งเป็น emulsifier ชนิด hydrophobic โดยใช้ร่วมกับ emulsifier ชนิด hydrophilic เพื่อให้ emulsion ที่ได้มีความคงตัว

แต่แนวโน้มในการเติม emulsifier ไว้ล่วงหน้าใน soft gelatin capsule น่าจะมีปัญหาในการพัฒนา
มากกว่า เนื่องจากข้อจำกัดในส่วนปริมาณสูงสุดของส่วนประกอบที่เป็นน้ำหรือแอลกอฮอล์ ใน
การศึกษาต่อไป ควรพิจารณาส่วนผสมที่มีส่วนประกอบที่เป็นน้ำมันและส่วนประกอบอื่นที่
สามารถผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำมันได้ เพื่อที่จะได้หลีกเลี่ยงการเตรียมในลักษณะของ
emulsion ที่ไม่มีความคงตัว หรือปัญหาการแยกชั้นซึ่งจะทำให้ในทางปฏิบัติ ไม่สามารถบรรจุ
ส่วนผสมใน soft gelatin capsule ได้

ภาคผนวก ข

รายละเอียดการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัยในข้อ 5.7 การทดลองตั้งตำรับโดยมี PEG 400 อยู่ด้วย

ทดลองตั้งตำรับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด โดยมีสารประกอบอื่นๆ คือ น้ำมันพีช Peppermint oil, Spearmint oil, menthol, 20% Acesulfame-K in PEG 400, PEG 400, Acesulfame-K ดังในตารางที่ 46

ผลการวิจัย

ตำรับ FM-1/1* สารละลายที่ได้มีลักษณะขุ่นเล็กน้อย เมื่อตั้งทิ้งไว้จะแยกชั้นกัน ทดลองเติม Tween80 ลงไป 0.02 g ยังไม่สามารถทำให้สารละลายคงตัวได้ และมีแนวโน้มที่จะแยกชั้นมากขึ้น PEG 400 นอนกั้น

ตำรับ FM-1/2** สารละลายที่ได้มีลักษณะขุ่นเล็กน้อย เมื่อตั้งทิ้งไว้จะแยกชั้นกัน ทดลองเติม PHC 0.1 g + Tween80 0.03 g + Tween20 0.06 g ยังไม่สามารถทำให้สารละลายคงตัวได้ และมีแนวโน้มที่จะแยกชั้นมากขึ้น PEG 400 นอนกั้น

ตำรับ FM-1/3*** ลองแยกเติม Acesulfame-K แยกกับ PEG 400 และเขย่าอย่างแรง สารละลายที่ได้ไม่คงตัว PEG 400 นอนกั้น

ตำรับ FM-1/4**** เพิ่ม scale ในการผสม เนื่องจากต้องการทราบปริมาณของ 20%Acesulfame-K in PEG 400 ที่จะสามารถใส่ลงในน้ำมันได้ ทดลองโดยใช้น้ำมันเมล็ดทานตะวัน (SUO) พบว่าต้องค่อยๆ เติม 20%Acesulfame-K in PEG 400 ลงในสารละลายที่ละ 0.1 g และคนจนเข้ากัน ก่อนเติมเพิ่มลงไป ที่ปริมาณของ 20%Acesulfame-K in PEG 400 เป็น 0.77w/w สารเริ่มแยกชั้น จึงเพิ่มประสิทธิภาพการละลายโดยให้เครื่องปั่น พบว่าทำให้ได้สารละลายที่ใสขึ้น ขณะนี้กำลังตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อดูความคงตัวของสารละลายที่ได้ (คิดเป็น 0.15%w/w Acesulfame-K)

โดยสรุป ปริมาณของ Acesulfame-K ที่จะสามารถละลายเข้าไปในน้ำมัน โดยมี PEG 400 เป็นตัวช่วยได้ มีปริมาณค่อนข้างน้อย เนื่องจากเมื่อปริมาณ PEG 400 ที่เติมลงในน้ำมันมีมากขึ้น ตัว PEG 400 เองก็แยกตัวออกจากน้ำมันเช่นกัน

ภาคผนวก ข

รายละเอียดการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัยในข้อ 5.8 การคำนวณปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ต้องบรรจุใน capsule จีว

จากค่า MIC และ MBC ของ *Streptococcus mutans* : Clinical Strains

1. ค่า MIC และ MBC ของ KLO อยู่ในช่วง 0.125 - >1 %v/v ดังนั้นเพื่อให้ครอบคลุมทั้งค่า MIC และ MBC ควรตั้งตำรับที่มีค่าดังกล่าวในช่วง 1 - 1.5%v/v
2. ค่า MIC และ MBC ของ KLLO อยู่ในช่วง 0.007 - 1 %v/v ดังนั้นเพื่อให้ครอบคลุมทั้งค่า MIC และ MBC ควรตั้งตำรับที่มีค่าดังกล่าวในช่วง 0.5 - 1%v/v

จากข้อมูลเดิม

- ความหนาแน่นของน้ำลาย = 0.9823 g/ml
- ความหนาแน่นของ KLO = 0.843 g/ml
- ความหนาแน่นของ KLLO = 0.854 g/ml

1. KLO/*Streptococcus mutans* Clinical strain: MIC/MBC 1%v/v

ดังนั้น 20 เท่า = 20 %v/v นั่นคือในน้ำลายทั้งหมด 100 ml ต้องมี KLO อย่างน้อย 20 ml

จากค่าความหนาแน่นของน้ำลาย

$$\text{น้ำลาย 100 ml จะมีน้ำหนัก } 100 \times 0.9823 = 98.23 \text{ g}$$

จากค่าความหนาแน่นของ KLO

$$\text{KLO 20 ml จะมีน้ำหนัก } 20 \times 0.843 = 16.86 \text{ g}$$

** ดังนั้นในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLO อย่างน้อย 16.86 g

2. KLO/*Streptococcus mutans* Clinical strain: MIC/MBC 1.5%v/v

ดังนั้น 20 เท่า = 30 %v/v นั่นคือในน้ำลายทั้งหมด 100 ml ต้องมี KLO อย่างน้อย 30 ml

จากค่าความหนาแน่นของน้ำลาย

$$\text{น้ำลาย 100 ml จะมีน้ำหนัก } 100 \times 0.9823 = 98.23 \text{ g}$$

จากค่าความหนาแน่นของ KLO

$$\text{KLO 30 ml จะมีน้ำหนัก } 30 \times 0.843 = 25.29 \text{ g}$$

** ดังนั้นในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLO อย่างน้อย 25.29 g

3. KLLO/*Streptococcus mutans* Clinical strain: MIC/MBC 0.5%v/v

ดังนั้น 20 เท่า = 10 %v/v นั่นคือในน้ำลายทั้งหมด 100 ml ต้องมี KLLO อย่างน้อย 10 ml

จากค่าความหนาแน่นของน้ำลาย

$$\text{น้ำลาย 100 ml จะมีน้ำหนัก } 100 \times 0.9823 = 98.23 \text{ g}$$

จากค่าความหนาแน่นของ KLLO

$$\text{KLLO 1.2 ml จะมีน้ำหนัก } 10 \times 0.854 = 8.54 \text{ g}$$

** ดังนั้นในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLLO อย่างน้อย 8.54 g

4. **KLLO**/*Streptococcus mutans* Clinical strain: MIC/MBC 1%v/v

ดังนั้น 20 เท่า = 20 %v/v นั่นคือในน้ำลายทั้งหมด 100 ml ต้องมี KLLO อย่างน้อย 20 ml

จากค่าความหนาแน่นของน้ำลาย

น้ำลาย 100 ml จะมีน้ำหนัก $100 \times 0.9823 = 98.23 \text{ g}$

จากค่าความหนาแน่นของ KLLO

KLLO 1.2 ml จะมีน้ำหนัก $20 \times 0.854 = 17.08 \text{ g}$

** ดังนั้นในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLLO อย่างน้อย 17.08 g

ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ต่อ *Streptococcus mutans* Clinical strain

ขนาดบรรจุของ capsule จีว คือ soft gelatin capsule ขนาดที่ทางโรงงานภาคเอกชน
สามารถทำการบรรจุให้ได้ คือ 80-100 mg

--ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ใน capsule ขนาด 80_mg แสดงดังตารางที่ 47

--ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ใน capsule ขนาด 100_mg แสดงดังตารางที่ 48

ตารางที่ 47 ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ใน capsule ขนาด 80_mg ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* Clinical strain

t (วินาที)	wt. น้ำลาย (g)	wt. cap. (g)	wt. total (g)	KLO				KLLO			
				for 1%v/v	% contg.	for 1.5%v/v	% contg.	for 0.5%v/v	% contg.	for 1%v/v	% contg.
5	0.1217	0.08	0.2017	0.0346	43.27	0.0519	64.90	0.0175	21.92	0.0351	43.83
10	0.2434	0.08	0.3234	0.0555	69.37	0.0832	104.06	0.0281	35.14	0.0562	70.28
15	0.3650	0.08	0.4450	0.0764	95.48	0.1146	143.22	0.0387	48.36	0.0774	96.72
20	0.4867	0.08	0.5667	0.0973	121.58	0.1459	182.38	0.0493	61.59	0.0985	123.17
30	0.7301	0.08	0.8101	0.1390	173.79	0.2086	260.69	0.0704	88.03	0.1408	176.06
45	1.0951	0.08	1.1751	0.2017	252.11	0.3025	378.16	0.1022	127.70	0.2043	255.40
60	1.4601	0.08	1.5401	0.2643	330.42	0.3965	495.64	0.1339	167.37	0.2678	334.74

ตัวอย่างการคำนวณ %containing ของ KLO ใน capsule ขนาด 80_mg ที่เวลา 20 sec: MIC = 1%v/v

ที่เวลา 20 sec ปริมาณของน้ำลาย = 0.4867 g ∴ น้ำหนักรวม 0.08 + 0.4867 = 0.5667 g (20 sec = ปริมาณน้ำลายจากรายงานที่ทดลองจริง, เวลาอื่น--จากการคำนวณ)

จากการคำนวณข้างต้นของ KLO ในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLO อย่างน้อย 16.86 g

∴ หากน้ำหนักรวม = 0.5667 g ต้องมี KLO อย่างน้อย (0.5667 x 16.86)/98.23 = 0.0973 g

เมื่อคำนวณเป็น %contg. ในเม็ด capsule ขนาด 80 mg จะเท่ากับ 121.58% ซึ่งไม่สามารถทำได้ ดังนั้นวิธีที่จะสามารถทำได้คือ

- 1) กำหนดให้กัด capsule ให้แตกภายใน 10 วินาที เนื่องจากสามารถตั้งตำรับที่มี %KLO ≤ 70% ได้ หรือ
- 2) จากการคำนวณซึ่งเป็นการใช้ค่า 20 เท่าของ MIC และ MBC ดังนั้นยังสามารถลดปริมาณของ KLO ลงได้อีก 3 step (15 เท่า - 10 เท่า - 5 เท่า) แล้วจึงนำตำรับที่ได้ไปทดสอบ MIC และ MBC ต่อเชือดังกล่าวใหม่

ตารางที่ 48 ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ใน capsule ขนาด 100_mg ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* Clinical strain

t (วินาที)	wt. น้ำลาย (g)	wt. cap. (g)	wt. total (g)	KLO				KLLO			
				for 1%v/v	% contg.	for 1.5%v/v	% contg.	for 0.5%v/v	% contg.	for 1%v/v	% contg.
5	0.1217	0.1	0.2217	0.0380	38.05	0.0571	57.07	0.0193	19.27	0.0385	38.54
10	0.2434	0.1	0.3434	0.0589	58.93	0.0884	88.40	0.0299	29.85	0.0597	59.70
15	0.3650	0.1	0.4650	0.0798	79.82	0.1197	119.72	0.0404	40.43	0.0809	80.86
20	0.4867	0.1	0.5867	0.1007	100.70	0.1511	151.05	0.0510	51.01	0.1020	102.01
30	0.7301	0.1	0.8301	0.1425	142.47	0.2137	213.70	0.0722	72.16	0.1443	144.33
45	1.0951	0.1	1.1951	0.2051	205.12	0.3077	307.68	0.1039	103.90	0.2078	207.80
60	1.4601	0.1	1.5601	0.2678	267.77	0.4017	401.66	0.1356	135.63	0.2713	271.27

ตัวอย่างการคำนวณ %containing ของ KLO ใน capsule ขนาด 100_mg ที่เวลา 20 sec: MIC = 1%v/v

ที่เวลา 20 sec ปริมาณของน้ำลาย = 0.4867 g ∴ น้ำหนักรวม 0.1 + 0.4867 = 0.5867 g

จากการคำนวณข้างต้นของ KLO ในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLO อย่างน้อย 16.86 g

∴ หากน้ำหนักรวม = 0.5867 g ต้องมี KLO อย่างน้อย (0.5867 x 16.86)/98.23 = 0.1007 g

เมื่อคำนวณเป็น %contg. ในเม็ด capsule ขนาด 100 mg จะเท่ากับ 100.70% ซึ่งไม่สามารถทำได้ ดังนั้นวิธีที่จะสามารถทำได้คือ

- 1) กำหนดให้กัด capsule ให้แตกภายใน 15 วินาที เนื่องจากสามารถตั้งตำรับที่มี %KLO ≤ 70% ได้ หรือ
- 2) จากการคำนวณซึ่งเป็นการใช้ค่า 20 เท่าของ MIC และ MBC ดังนั้นยังสามารถลดปริมาณของ KLO ลงได้อีก 3 step (15 เท่า - 10 เท่า - 5 เท่า) แล้วจึงนำตำรับที่ได้ไปทดสอบ MIC และ MBC ต่อเชื้อมีดังกล่าวใหม่

สรุปผลการคำนวณ

จากผลการคำนวณแสดงให้เห็นว่าตำรับที่มี KLO 65% และ KLLO 45% (maximum dose) ต้องเก็บไว้พิจารณาเป็นหนึ่งในตัวเลือก และทำการ step down ลงอีก 3 dose เพื่อให้ได้ตำรับที่มีรสชาติดีต่อไป

ตารางที่ 46 การทดลองตั้งตำรับน้ำมันมะกรูดและน้ำมันใบมะกรูด โดยมีสารประกอบอื่นๆ คือ น้ำมันพืช
Peppermint oil, Spearmint oil, menthol, 20% Acesulfame-K in PEG 400, PEG 400, Acesulfame-K

Code	KLO	KLLO	Veg. oil	Peppermint	Spearmint	Menthol	20%Ace K in PEG 400	PEG 400	Ace K	หมายเหตุ
FM-1/1	4.30	0.00	0.00	0.00	0.24	0.20	0.26	0.46	0.00	*
%	78.75	0.00	0.00	0.00	4.40	3.66	4.76	8.42	0.00	
FM-1/2	4.30	0.00	0.00	0.00	0.25	0.20	0.25	0.46	0.00	**
%	78.75	0.00	0.00	0.00	4.58	3.66	4.58	8.42	0.00	
FM-1/3	4.00	0.00	0.00	0.00	0.25	0.20	0.00	0.50	0.05	***
%	80.00	0.00	0.00	0.00	5.00	4.00	0.00	10.00	1.00	
FM-1/4	0.00	0.00	90.95	0.00	5.00	4.00	0.78	0.00	0.00	****
%	0.00	0.00	90.29	0.00	4.96	3.97	0.77 ^a	0.00	0.00	

ภาคผนวก ข

รายละเอียดการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัยในข้อ 5.8 การคำนวณปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ต้องบรรจุใน capsule จีว

จากค่า MIC และ MBC ของ *Streptococcus mutans* : Clinical Strains

1. ค่า MIC และ MBC ของ KLO อยู่ในช่วง 0.125 - >1 %v/v ดังนั้นเพื่อให้ครอบคลุมทั้งค่า MIC และ MBC ควรตั้งตำรับที่มีค่าดังกล่าวในช่วง 1 - 1.5%v/v
2. ค่า MIC และ MBC ของ KLLO อยู่ในช่วง 0.007 - 1 %v/v ดังนั้นเพื่อให้ครอบคลุมทั้งค่า MIC และ MBC ควรตั้งตำรับที่มีค่าดังกล่าวในช่วง 0.5 - 1%v/v

จากข้อมูลเดิม

- ความหนาแน่นของน้ำลาย = 0.9823 g/ml
- ความหนาแน่นของ KLO = 0.843 g/ml
- ความหนาแน่นของ KLLO = 0.854 g/ml

1. KLO/*Streptococcus mutans* Clinical strain: MIC/MBC 1%v/v

ดังนั้น 20 เท่า = 20 %v/v นั่นคือในน้ำลายทั้งหมด 100 ml ต้องมี KLO อย่างน้อย 20 ml

จากค่าความหนาแน่นของน้ำลาย

$$\text{น้ำลาย 100 ml จะมีน้ำหนัก } 100 \times 0.9823 = 98.23 \text{ g}$$

จากค่าความหนาแน่นของ KLO

$$\text{KLO 20 ml จะมีน้ำหนัก } 20 \times 0.843 = 16.86 \text{ g}$$

** ดังนั้นในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLO อย่างน้อย 16.86 g

2. KLO/*Streptococcus mutans* Clinical strain: MIC/MBC 1.5%v/v

ดังนั้น 20 เท่า = 30 %v/v นั่นคือในน้ำลายทั้งหมด 100 ml ต้องมี KLO อย่างน้อย 30 ml

จากค่าความหนาแน่นของน้ำลาย

$$\text{น้ำลาย 100 ml จะมีน้ำหนัก } 100 \times 0.9823 = 98.23 \text{ g}$$

จากค่าความหนาแน่นของ KLO

$$\text{KLO 30 ml จะมีน้ำหนัก } 30 \times 0.843 = 25.29 \text{ g}$$

** ดังนั้นในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLO อย่างน้อย 25.29 g

3. KLLO/*Streptococcus mutans* Clinical strain: MIC/MBC 0.5%v/v

ดังนั้น 20 เท่า = 10 %v/v นั่นคือในน้ำลายทั้งหมด 100 ml ต้องมี KLLO อย่างน้อย 10 ml

จากค่าความหนาแน่นของน้ำลาย

$$\text{น้ำลาย 100 ml จะมีน้ำหนัก } 100 \times 0.9823 = 98.23 \text{ g}$$

จากค่าความหนาแน่นของ KLLO

$$\text{KLLO 1.2 ml จะมีน้ำหนัก } 10 \times 0.854 = 8.54 \text{ g}$$

** ดังนั้นในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLLO อย่างน้อย 8.54 g

4. **KLLO**/*Streptococcus mutans* Clinical strain: MIC/MBC 1%v/v

ดังนั้น 20 เท่า = 20 %v/v นั่นคือในน้ำลายทั้งหมด 100 ml ต้องมี KLLO อย่างน้อย 20 ml

จากค่าความหนาแน่นของน้ำลาย

น้ำลาย 100 ml จะมีน้ำหนัก $100 \times 0.9823 = 98.23 \text{ g}$

จากค่าความหนาแน่นของ KLLO

KLLO 1.2 ml จะมีน้ำหนัก $20 \times 0.854 = 17.08 \text{ g}$

** ดังนั้นในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLLO อย่างน้อย 17.08 g

ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ต่อ *Streptococcus mutans* Clinical strain

ขนาดบรรจุของ capsule จีว คือ soft gelatin capsule ขนาดที่ทางโรงงานภาคเอกชน
สามารถทำการบรรจุให้ได้ คือ 80-100 mg

--ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ใน capsule ขนาด 80_mg แสดงดังตารางที่ 47

--ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ใน capsule ขนาด 100_mg แสดงดังตารางที่ 48

ตารางที่ 47 ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ใน capsule ขนาด 80_mg ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* Clinical strain

t (วินาที)	wt. น้ำลาย (g)	wt. cap. (g)	wt. total (g)	KLO				KLLO			
				for 1%v/v	% contg.	for 1.5%v/v	% contg.	for 0.5%v/v	% contg.	for 1%v/v	% contg.
5	0.1217	0.08	0.2017	0.0346	43.27	0.0519	64.90	0.0175	21.92	0.0351	43.83
10	0.2434	0.08	0.3234	0.0555	69.37	0.0832	104.06	0.0281	35.14	0.0562	70.28
15	0.3650	0.08	0.4450	0.0764	95.48	0.1146	143.22	0.0387	48.36	0.0774	96.72
20	0.4867	0.08	0.5667	0.0973	121.58	0.1459	182.38	0.0493	61.59	0.0985	123.17
30	0.7301	0.08	0.8101	0.1390	173.79	0.2086	260.69	0.0704	88.03	0.1408	176.06
45	1.0951	0.08	1.1751	0.2017	252.11	0.3025	378.16	0.1022	127.70	0.2043	255.40
60	1.4601	0.08	1.5401	0.2643	330.42	0.3965	495.64	0.1339	167.37	0.2678	334.74

ตัวอย่างการคำนวณ %containing ของ KLO ใน capsule ขนาด 80_mg ที่เวลา 20 sec: MIC = 1%v/v

ที่เวลา 20 sec ปริมาณของน้ำลาย = 0.4867 g ∴ น้ำหนักรวม 0.08 + 0.4867 = 0.5667 g (20 sec = ปริมาณน้ำลายจากรายงานที่ทดลองจริง, เวลาอื่น--จากการคำนวณ)

จากการคำนวณข้างต้นของ KLO ในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLO อย่างน้อย 16.86 g

∴ หากน้ำหนักรวม = 0.5667 g ต้องมี KLO อย่างน้อย (0.5667 x 16.86)/98.23 = 0.0973 g

เมื่อคำนวณเป็น %contg. ในเม็ด capsule ขนาด 80 mg จะเท่ากับ 121.58% ซึ่งไม่สามารถทำได้ ดังนั้นวิธีที่จะสามารถทำได้คือ

- 1) กำหนดให้กัด capsule ให้แตกภายใน 10 วินาที เนื่องจากสามารถตั้งตำรับที่มี %KLO ≤ 70% ได้ หรือ
- 2) จากการคำนวณซึ่งเป็นการใช้ค่า 20 เท่าของ MIC และ MBC ดังนั้นยังสามารถลดปริมาณของ KLO ลงได้อีก 3 step (15 เท่า - 10 เท่า - 5 เท่า) แล้วจึงนำตำรับที่ได้ไปทดสอบ MIC และ MBC ต่อเชื้อมีค่าใหม่

ตารางที่ 48 ผลการคำนวณปริมาณของ KLO และ KLLO ใน capsule ขนาด 100_mg ต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* Clinical strain

t (วินาที)	wt. น้ำลาย (g)	wt. cap. (g)	wt. total (g)	KLO				KLLO			
				for 1%v/v	% contg.	for 1.5%v/v	% contg.	for 0.5%v/v	% contg.	for 1%v/v	% contg.
5	0.1217	0.1	0.2217	0.0380	38.05	0.0571	57.07	0.0193	19.27	0.0385	38.54
10	0.2434	0.1	0.3434	0.0589	58.93	0.0884	88.40	0.0299	29.85	0.0597	59.70
15	0.3650	0.1	0.4650	0.0798	79.82	0.1197	119.72	0.0404	40.43	0.0809	80.86
20	0.4867	0.1	0.5867	0.1007	100.70	0.1511	151.05	0.0510	51.01	0.1020	102.01
30	0.7301	0.1	0.8301	0.1425	142.47	0.2137	213.70	0.0722	72.16	0.1443	144.33
45	1.0951	0.1	1.1951	0.2051	205.12	0.3077	307.68	0.1039	103.90	0.2078	207.80
60	1.4601	0.1	1.5601	0.2678	267.77	0.4017	401.66	0.1356	135.63	0.2713	271.27

ตัวอย่างการคำนวณ %containing ของ KLO ใน capsule ขนาด 100_mg ที่เวลา 20 sec: MIC = 1%v/v

ที่เวลา 20 sec ปริมาณของน้ำลาย = 0.4867 g ∴ น้ำหนักรวม 0.1 + 0.4867 = 0.5867 g

จากการคำนวณข้างต้นของ KLO ในน้ำลาย 98.23 g ต้องมี KLO อย่างน้อย 16.86 g

∴ หากน้ำหนักรวม = 0.5867 g ต้องมี KLO อย่างน้อย (0.5867 x 16.86)/98.23 = 0.1007 g

เมื่อคำนวณเป็น %contg. ในเม็ด capsule ขนาด 100 mg จะเท่ากับ 100.70% ซึ่งไม่สามารถทำได้ ดังนั้นวิธีที่จะสามารถทำได้คือ

- 1) กำหนดให้กัด capsule ให้แตกภายใน 15 วินาที เนื่องจากสามารถตั้งตำรับที่มี %KLO ≤ 70% ได้ หรือ
- 2) จากการคำนวณซึ่งเป็นการใช้ค่า 20 เท่าของ MIC และ MBC ดังนั้นยังสามารถลดปริมาณของ KLO ลงได้อีก 3 step (15 เท่า - 10 เท่า - 5 เท่า) แล้วจึงนำตำรับที่ได้ไปทดสอบ MIC และ MBC ต่อเชื้อมีค่าใหม่

สรุปผลการคำนวณ

จากผลการคำนวณแสดงให้เห็นว่าตำรับที่มี KLO 65% และ KLLO 45% (maximum dose) ต้องเก็บไว้พิจารณาเป็นหนึ่งในตัวเลือก และทำการ step down ลงอีก 3 dose เพื่อให้ได้ตำรับที่มีรสชาติดีต่อไป

ภาคผนวก ณ

5.9 การทดลองตั้งสูตรตำรับ KLO และ KLLO

5.9.1 การทดลองตั้งสูตรตำรับ KLO และ KLLO ในความเข้มข้นที่คำนวณได้

จาก การคำนวณเพื่อหาปริมาณของน้ำมัน KLO และ KLLO ในการตั้งตำรับ แสดงให้เห็นว่าการตั้งสูตร KLO ควรมี $KLO \geq 65\%w/w$ จึงได้ทดลองตั้งสูตรที่มีส่วนประกอบดังตารางที่ 47

ผลการวิจัย ดังแสดงในตารางที่ 51 และดังรูปที่ 30

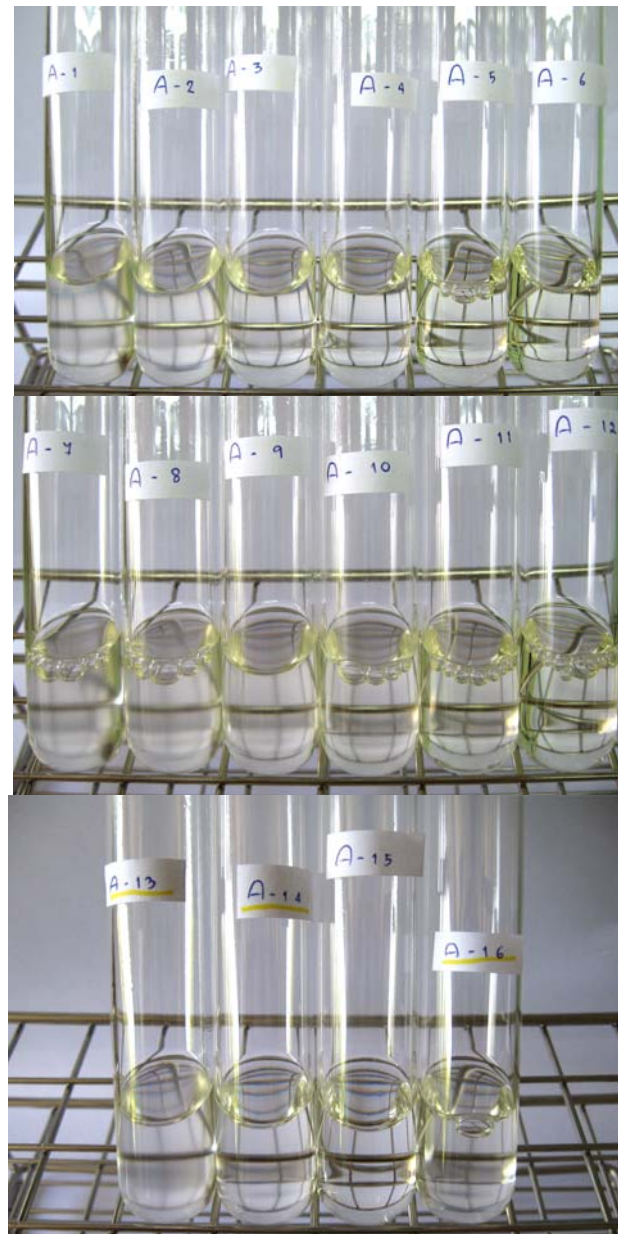
ตารางที่ 51 สูตรตำรับ KLO

Code	Oil	Diluent	Flavor		Cooling	Sweetener (5% in PEG400)	
	KLO (%)	Sunflower oil (%)	Spearmint oil (%)	Peppermint oil (%)	Menthol (%)	Sucralose (%)	Acesulfame K (%)
A-1	65	27	5	0	1	2	0
A-2	65	22	10	0	1	2	0
A-3	65	23	5	0	5	2	0
A-4	65	18	10	0	5	2	0
A-5	65	12	0	20	1	2	0
A-6	65	8	0	20	5	2	0
A-7	65	27	5	0	1	0	2
A-8	65	22	10	0	1	0	2
A-9	65	23	5	0	5	0	2
A-10	65	18	10	0	5	0	2
A-11	65	12	0	20	1	0	2
A-12	65	8	0	20	5	0	2
A-13	65	12	0	20	1	0	2
A-14	65	12	20	0	1	2	0
A-15	65	8	20	0	5	2	0
A-16	65	8	20	0	5	0	2

☐ สีขาว = ภายหลังการผสมได้สารละลายที่ขุ่นเล็กน้อย เมื่อตั้งทิ้งไว้มีหยดของ Sweetener นอนก้น

☐ สีเทา = ภายหลังการผสมได้สารละลายที่ขุ่นเล็กน้อย เมื่อตั้งทิ้งไว้จะใส แต่เมื่อเขย่าจะมีหยดของ Sweetener นอนก้นเล็กน้อย และเมื่อนำไปผ่าน sonicator จะได้สารละลายใส

☐ สีฟ้า = ภายหลังการผสมได้สารละลายใส



รูปที่ 30 ผลการตั้งค้ำรับ KLO

สำหรับ KLLO ควรมี $KLLO \geq 45\%w/w$ โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 52

ผลการวิจัย

ดังในตารางที่ 52 และรูปที่ 31

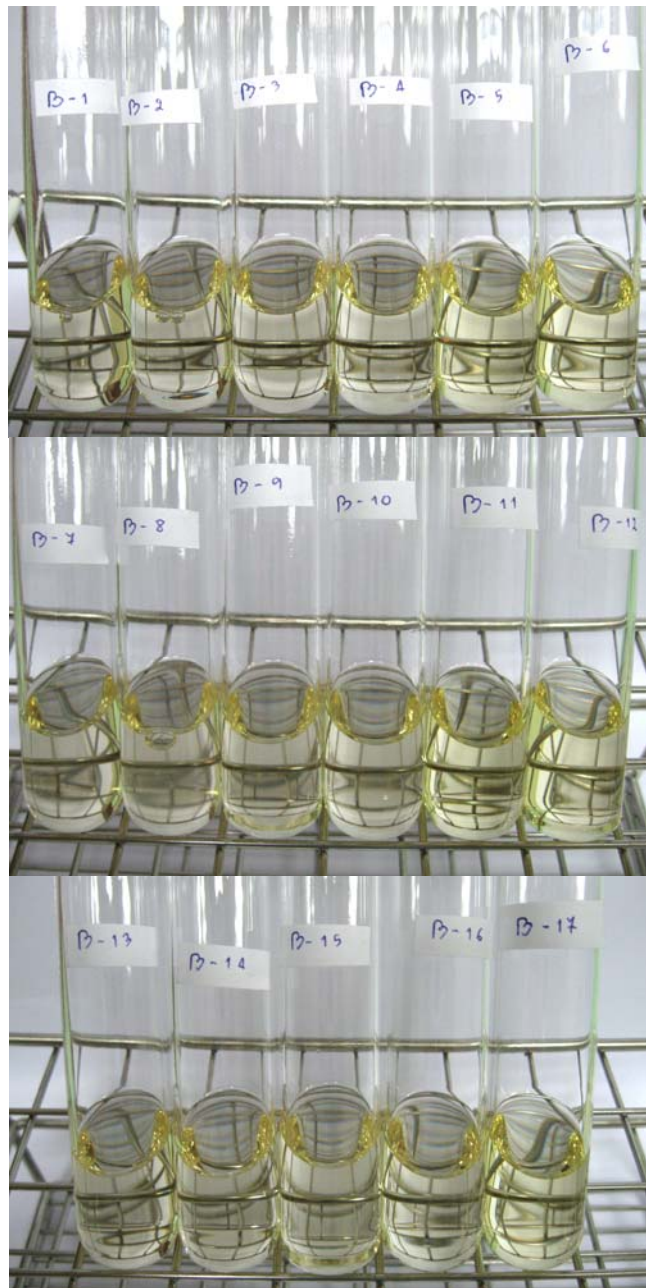
ตารางที่ 52 สูตรตำรับ KLLO

Code	Oil	Diluent	Flavor		Cooling	Sweetener (5% in PEG400)	
	KLLO (%)	Sunflower oil (%)	Spearmint oil (%)	Peppermint oil (%)	Menthol (%)	Sucralose (%)	Acesulfame K (%)
B-1	45	37	15	0	1	2	0
B-2	45	32	20	0	1	2	0
B-3	45	33	15	0	5	2	0
B-4	45	28	20	0	5	2	0
B-5	45	12	0	40	1	2	0
B-6	45	8	0	40	5	2	0
B-7	45	37	15	0	1	0	2
B-8	45	32	20	0	1	0	2
B-9	45	33	15	0	5	0	2
B-10	45	28	20	0	5	0	2
B-11	45	12	0	40	1	0	2
B-12	45	8	0	40	5	0	2
B-13	45	12	40	0	1	2	0
B-14	45	8	40	0	5	2	0
B-15	45	12	40	0	1	0	2
B-16	45	8	40	0	5	0	2
B-17	45	7	0	45	1	2	0

☐ สีขาว = ภายหลังการผสมได้สารละลายที่ขุ่นเล็กน้อย เมื่อตั้งทิ้งไว้มีหยดของ Sweetener นอนก้น

☐ สีเทา = ภายหลังการผสมได้สารละลายที่ขุ่นเล็กน้อย เมื่อตั้งทิ้งไว้จะใส แต่เมื่อเขย่าจะมีหยดของ Sweetener นอนก้นเล็กน้อย

☐ สีฟ้า = ภายหลังการผสมได้สารละลายใส



รูปที่ 31 ผลการตั้งตำรับ KLLO

จากการทดลองตั้งสูตรตำรับของ KLO และ KLLO ได้ใช้ Sunflower oil เป็น Diluent ซึ่งหากต้องการลดต้นทุนอาจเปลี่ยนเป็น Soybean oil, Palm olein oil หรือ Rice bran oil ได้ แต่ Palm olein oil และ Rice bran oil จะทำให้สารละลายมีสีเข้ม ส่วน Safflower oil มีราคาค่อนข้างแพง ใช้ Spearmint oil และ Peppermint oil เป็นสารแต่งกลิ่นเนื่องจากสามารถกลบกลิ่นของ KLO และ KLLO ได้ดี และให้ความรู้สึกเย็นสดชื่น ใช้ Menthol เป็นสารแต่งรสเย็น และใช้ 5% Sucralose in PEG400 และ 5% Acesulfame K in PEG400 เป็นสารให้ความหวาน และจากสูตรดังกล่าวได้เลือกสูตรของ KLO และ KLLO ที่ติดแถบสีเทาและสีฟ้ามาทดสอบรสชาติ

--KLO—แถบฟ้า—A-5, 6, 15

---แถบเทา---A-4, 12

--KLLO—แถบฟ้า—B-5, 6, 11, 12, 13, 14

---แถบเทา---B-1, 16, 17

ผลการทดสอบรสชาติ ดังในตารางที่ 53

ตารางที่ 53 ผลการทดสอบรสชาติ

Code	ระดับความขม	ระดับความซ่า	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
A-4	++++	+++	++++	+++	+++++	อร่อย*
A-5	++	++++	+++++	++++	++	อร่อยมาก**
A-6	+	++++	++++	++++	++++	อร่อยมาก**
A-12	++++	+++++	++++	++	+++	ขมมากเกินไป
A-15	+	++++	+++	++++	+++++	มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย
B-1	++++	+++	+	0	++	ซ่ากัดลิ้นและไม่หวาน
B-4	++	++++	+++	+++	++	กลิ่น KLLO ก่อนข้างแรง
B-5	++	++++	+++++	++++	+++	อร่อยมาก**
B-6	++	+++++	+++++	++++	+++++	อร่อยมาก**
B-11	+++	+++++	+++++	++	+++++	รสชาติค่อนข้างดีแต่ขมไปหน่อยและไม่ค่อนข้างหวาน
B-12	++	+++++	+++++	+++	+++++	รสชาติคล้ายB-11 แต่หวานกว่า
B-13	+++	++	++	++++	++	หวานแหลมและไม่ค่อยเย็นซ่า
B-14	++	+++	+++	+++	+++	ซ่ากัดลิ้นเล็กน้อย
B-16	+++	+++	+++	++	++	รสชาติคล้ายB-14 แต่ซ่ากัดลิ้นมากกว่าเล็กน้อย
B-17	++	++++	++++	+++	+++	อร่อย*

จากผลการทดลองพบว่าสูตรที่มีเนวโน้มสามารถนำไปพัฒนาเพื่อบรรจุ soft gelatin capsule ได้คือ KLO สูตร A-4, A-5 และ A-6 และ KLLO สูตร B-5, B-6 และ B-17 โดยทั้งหมดเป็นสูตรที่มีปริมาณ KLO และ KLLO สูงกว่า 20 เท่าของ MBC เมื่อใช้เวลาอม capsule ในปากไม่เกิน 20 วินาที

ในลำดับต่อไปอาจพิจารณาพัฒนาสูตรตำรับที่มี KLO 70% ซึ่งเป็นขนาดที่สูงกว่า MBC 21.54 เท่า และ KLLO 60% ซึ่งเป็นขนาดที่สูงกว่า MBC 26.67 เท่า โดยเป็นขนาดที่มีปริมาณของ KLO และ KLLO สูง แต่ยังสามารถทนรสชาติได้ (KLO ทนได้ที่ 80% และ KLLO ทนได้ที่ 67%) หรือพิจารณาปรับลดปริมาณน้ำมันหอมระเหยเพื่อให้สูตรตำรับมีรสชาติที่ดีขึ้น

5.9.2 การตั้งตำรับที่มีสารแต่งกลิ่น Peppermint oil และ Spearmint oil ร่วมกัน

ทดลองปรับจากสูตร A-4, A-5, A-6 (KLO) และ B-5, B-6, B-17 (KLLO) โดยปรับปริมาณของ Spearmint oil และ Peppermint oil เพื่อเพิ่มความหอมของตำรับ สัดส่วนของสารต่างๆ แสดงดังตารางที่ 54

ตารางที่ 54 การตั้งตำรับที่มีสารแต่งกลิ่น Peppermint oil และ Spearmint oil ร่วมกัน

Code	KLO or KLLO (%)	Sunflower oil (%)	Spearmint oil (%)	Peppermint oil (%)	Menthol (%)	5% Sucralose (%)
A-4	65	18	10	0	5	2
F-A-4 S+P	65	18	5	5	5	2
A-5	65	12	0	20	1	2
F-A-5 S+P	65	12	10	10	1	2
A-6	65	8	0	20	5	2
F-A-6 S+P	65	8	10	10	5	2
B-5	45	12	0	40	1	2
F-B-5 S+P	45	12	10	30	1	2
B-6	45	8	0	40	5	2
F-B-6 S+P	45	8	10	30	5	2
B-17	45	7	0	45	1	2
F-B-17 S+P	45	7	15	30	1	2

ผลการวิจัย

หลังการเตรียม พบว่าสูตร F-A-4 S+P, F-A-5 S+P และ F-A-6 S+P ซึ่งปรับสัดส่วนมาจากสูตร A-4, A-5 และ A-6 ตามลำดับ มีลักษณะเป็นส่วนผสมใส สีเหลืองอ่อน ในขณะที่สูตร F-B-5 S+P, F-B-6 S+P และ F-B-17 S+P ซึ่งปรับสัดส่วนมาจากสูตร B-5, B-6 และ B-17 ตามลำดับ มีลักษณะเป็นส่วนผสมใส สีเหลือง แสดงผลดังรูปที่ 32 ผลการทดสอบรสชาติแสดงดังตารางที่ 55 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ Spearmint oil และ Peppermint oil ร่วมกัน ช่วยให้ได้ตำรับที่มีรสชาติดีขึ้น

สรุปการทดลอง จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ Peppermint oil เป็นสารแต่งกลิ่น เนื่องจาก Peppermint oil มีส่วนช่วยเพิ่มการละลายของ 5% Sucralose in PEG400 ในตำรับ แต่ประสิทธิภาพในการกลบกลิ่นของ Peppermint oil จะน้อยกว่า Spearmint oil ดังนั้นการเพิ่มสัดส่วนของ Spearmint oil จะทำให้ได้ตำรับมีกลิ่นดีขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นจากผลการทดลองข้างต้นว่าการใช้ Spearmint oil และ Peppermint oil ร่วมกัน ช่วยให้ได้ตำรับที่มีรสชาติและกลิ่นที่ดีขึ้น



รูปที่ 32 ตำรับ KLO และ KLLO ที่มีสารแต่งกลิ่น Peppermint oil และ Spearmint oil ร่วมกัน

ตารางที่ 55 การทดสอบรสชาติของตำรับ KLO และ KLLO ที่มีสารแต่งกลิ่น Peppermint oil และ Spearmint oil ร่วมกัน

CODE	ระดับความขม	ระดับความซ่า	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
A-4	++++	+++	++++	+++	++++	อร่อยมาก
F-A-4 S+P						มีการแยกชั้นของ PEG400
A-5	++	++++	+++++	++++	++++	อร่อยมาก
F-A-5 S+P	+++	++++	++++	++++	+++++	อร่อยมาก
A-6	+	++++	++++	++++	++++	อร่อยมาก
F-A-6 S+P	+	++++	++++	+++++	+++++	อร่อยมาก
B-5	++	++++	+++++	++++	++++	อร่อยมาก
F-B-5 S+P	+	+++++	+++++	++++	+++++	อร่อยมาก
B-6	++	+++++	+++++	++++	++++	อร่อยมาก
F-B-6 S+P	+	+++++	+++++	++++	+++++	อร่อยมาก
B-17	++	++++	++++	+++	+++++	อร่อยมาก
F-B-17 S+P	+	++++	++++	+++++	+++++	อร่อยมาก

5.9.3 การตั้งตำรับที่มีปริมาณ KLO และ KLLO ลดลง

5.9.3.1 ตำรับ KLO

ทดลองปรับจากสูตร A-4, A-5 และ A-6 โดยลด %KLO จาก 65% เป็น 50, 30 และ 10% โดยปรับเพิ่มปริมาณของ Sunflower oil แทนในส่วนของ KLO ที่ลดลง ดังตารางที่ 56

ตารางที่ 56 การตั้งตำรับที่มี %KLO ลดลง

Code	KLO (%)	Sunflower oil (%)	Spearmint oil (%)	Peppermint oil (%)	Menthol (%)	5% Sucralose (%)
A-4	65	18	10	0	5	2
A-Sd1/1	50	33	10	0	5	2
A-Sd2/1	30	53	10	0	5	2
A-Sd3/1	10	73	10	0	5	2
A-5	65	12	0	20	1	2
A-Sd1/2	50	27	0	20	1	2
A-Sd2/2	30	47	0	20	1	2
A-Sd3/2	10	67	0	20	1	2
A-6	65	8	0	20	5	2
A-Sd1/3	50	23	0	20	5	2
A-Sd2/3	30	43	0	20	5	2
A-Sd3/3	10	63	0	20	5	2

ผลการวิจัย

หลังการเตรียม พบว่าส่วนผสมที่ได้มีสีเหลืองอ่อน ขุ่นเล็กน้อย แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ 1 คืน ทุกสูตรใสเท่ากัน ยกเว้นสูตร A-Sd1/1, A-Sd2/2 และ A-Sd3/2 ซึ่งมี 5% Sucralose in PEG400 แยกตัวนอนก้น ผลการทดสอบรสชาติแสดงดังตารางที่ 57 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าการปรับเพิ่มปริมาณของ Sunflower oil แทนในส่วนของ KLO มีผลลดการละลายของ 5% Sucralose in PEG400 ในตำรับ ดังนั้นต้องพิจารณาปรับลด Sunflower oil โดยเพิ่มสัดส่วนของ Peppermint oil และ Spearmint oil ซึ่งน่าจะช่วยเพิ่มการละลายของ 5% Sucralose in PEG400 ด้วย และพบว่าการใช้ Sunflower oil มากขึ้น จะทำให้เพิ่มความเลี่ยน ไม่อร่อย

ตารางที่ 57 การทดสอบรสชาติ ตำรับที่มี %KLO ลดลง

CODE	ระดับความขม	ระดับความซ่า	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
A-4	++++	+++	++++	+++	++++	อร่อย
A-Sd1/1						มีการแยกชั้นของ PEG400
A-Sd2/1	++++	+	+	+	+++	รสเลี่ยน + ไม่หวาน
A-Sd3/1	++++	++	++	+	+++++	รสเลี่ยน + ไม่หวาน
A-5	++	++++	+++++	++++	++++	อร่อยมาก
A-Sd1/2	+++	+++	+++	+	+++	รสเลี่ยน + ไม่หวาน
A-Sd2/2						มีการแยกชั้นของ PEG400
A-Sd3/2						มีการแยกชั้นของ PEG400
A-6	+	++++	++++	++++	++++	อร่อยมาก
A-Sd1/3	+	++++	++++	+++	+++	รสเลี่ยน + ไม่หวาน
A-Sd2/3	++	++++	++++	+	++	รสเลี่ยน + ไม่หวาน
A-Sd3/3	+	++++	++++	+	+++++	รสเลี่ยน + ไม่หวาน

5.9.3.2 ตำรับ KLLO

ทดลองปรับจากสูตร B-5, B-6 และ B-17 โดยลด %KLO จาก 45% เป็น 30, 15 และ 5% โดยปรับเพิ่มปริมาณของ Sunflower oil แทนในส่วนของ KLO ที่ลดลง ดังตารางที่ 58

ตารางที่ 58 การตั้งตำรับที่มี %KLLO ลดลง

Code	KLLO (%)	Sunflower oil (%)	Peppermint oil (%)	Menthol (%)	5% Sucralose (%)
B-5	45	12	40	1	2
B-Sd1/1	30	26	40	1	2
B-Sd2/1	15	41	40	1	2
B-Sd3/1	5	51	40	1	2
B-6	45	8	40	5	2
B-Sd1/2	30	23	40	5	2
B-Sd2/2	15	38	40	5	2
B-Sd3/2	5	48	40	5	2
B-17	45	7	45	1	2
B-Sd1/3	30	22	45	1	2
B-Sd2/3	15	37	45	1	2
B-Sd3/3	5	47	45	1	2

ผลการวิจัย

หลังการเตรียม พบว่าส่วนผสมที่ได้มีสีเหลือง ขุ่นเล็กน้อย แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ 1 คืน ทุกสูตรใสเท่ากัน ยกเว้นสูตร B-Sd2/3 ซึ่งมี 5% Sucralose in PEG400 แยกตัวนอนก้น ผลการทดสอบรสชาติแสดงดังตารางที่ 59 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าการปรับเพิ่มปริมาณของ Sunflower oil แทนในส่วนของ KLLO ไม่ค่อยมีผลต่อการละลายของ 5% Sucralose in PEG400 ในตำรับ แต่การปรับลด Sunflower oil และเพิ่มสัดส่วนของ Peppermint oil และ Spearmint oil น่าจะทำให้รสชาติและกลิ่นของตำรับดีขึ้น

ตารางที่ 59 การทดสอบรสชาติ ตำรับที่มี %KLLO ลดลง

CODE	ระดับความขม	ระดับความซ่า	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
B-5	++	++++	+++++	++++	++++	อร่อยมาก
B-Sd1/1	++	++++	+++++	++++	++	อร่อย
B-Sd2/1	+	++++	+++++	++++	+++	อร่อย
B-Sd3/1	++	++++	+++++	+	+++	อร่อย
B-6	++	+++++	+++++	++++	++++	อร่อยมาก
B-Sd1/2	+	+++++	+++++	++++	+++	อร่อย
B-Sd2/2	+	+++++	+++++	++++	+++	อร่อย
B-Sd3/2	+	+++++	+++++	++++	+++	อร่อย
B-17	++	++++	++++	+++	+++++	อร่อย
B-Sd1/3	+	++++	++++	++++	++	อร่อย
B-Sd2/3						มีการแยกชั้นของ PEG400
B-Sd3/3	+	++++	++++	++++	+++	อร่อย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายังต้องปรับสัดส่วนของ Diluent และ สารแต่งกลิ่นทั้ง 2 ชนิด ในตำรับของ KLO เพื่อให้ได้ตำรับที่มี KLO ลดลงแต่มีรสชาติดีขึ้น ในขณะที่ตำรับของ KLLO อาจพิจารณาปรับลดสัดส่วนของ Diluent เล็กน้อยและเพิ่มสัดส่วนของสารแต่งกลิ่นทั้ง 2 ชนิด เพื่อให้กลิ่นและรสชาติของตำรับดีขึ้น

5.9.4 การปรับสูตรตำรับโดยปรับปริมาณ Spearmint oil และ Peppermint oil

ทดลองปรับสูตรตำรับ KLO และ KLLO โดยปรับจากสูตรตำรับ A-4, A-5, A-6 (KLO) และ B-5, B-6, B-17 (KLLO) โดยปรับปริมาณของ Spearmint oil และ Peppermint oil เพื่อเพิ่มความหอมของสูตรตำรับ ดังส่วนประกอบในตารางที่ 60

ตารางที่ 60 ส่วนประกอบในสูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่มีการปรับปริมาณของ Spearmint oil และ Peppermint oil

Code	KLO (%)	Sunflower oil (%)	Spearmint oil (%)	Peppermint oil (%)	Menthol (%)	5% Sucralose (%)
A-4	65	18	10	0	5	2
F-A-4 S+P	65	18	5	5	5	2
A-5	65	12	0	20	1	2
F-A-5 S+P	65	12	10	10	1	2
A-6	65	8	0	20	5	2
F-A-6 S+P	65	8	10	10	5	2
B-5	45	12	0	40	1	2
F-B-5 S+P	45	12	10	30	1	2
B-6	45	8	0	40	5	2
F-B-6 S+P	45	8	10	30	5	2
B-17	45	7	0	45	1	2
F-B-17 S+P	45	7	15	30	1	2

ผลการวิจัย

หลังการเตรียม พบว่าสูตร F-A-4 S+P, F-A-5 S+P และ F-A-6 S+P ซึ่งปรับสัดส่วนมาจาก สูตร A-4, A-5 และ A-6 ตามลำดับ มีลักษณะเป็นสารละลายใส สีเหลืองอ่อน สำหรับสูตรตำรับ F-A-4 S+P พบว่าต่อมาเกิดการแยกชั้นของ PEG400 ในขณะที่สูตร F-B-5 S+P, F-B-6 S+P และ F-

B-17 S+P ซึ่งปรับสัดส่วนมาจากสูตร B-5, B-6 และ B-17 ตามลำดับ มีลักษณะเป็นสารละลายใส สีเหลือง จากการประเมินรสชาติเบื้องต้นในสูตรตำรับ รสชาติดี

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ Peppermint oil เป็นสารแต่งกลิ่น เนื่องจาก Peppermint oil มีส่วนช่วยเพิ่มการละลายของ 5% Sucralose in PEG400 ในสูตรตำรับ แต่ความสามารถในการกลบกลิ่นน้ำมันหอมระเหยของ Peppermint oil จะน้อยกว่า Spearmint oil ดังนั้นการเพิ่มสัดส่วนของ Spearmint oil ทำให้สูตรตำรับมีกลิ่นดีขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นจากการทดลองว่าการใช้ Spearmint oil และ Peppermint oil ร่วมกัน ช่วยให้สูตรตำรับที่มีรสชาติและกลิ่นที่ดีขึ้น

5.9.5 การทดลองเปลี่ยนชนิดของ Diluents จาก Sunflower oil เป็น Soybean oil

ทำการทดลองปรับจากสูตร A-4, A-5, A-6 (KLO) และ B-5, B-6, B-17 (KLLO) โดยการใช้ Soybean oil แทนที่ Sunflower oil ด้วยวัตถุประสงค์ในการลดต้นทุน โดยมีส่วนประกอบต่างๆ ดังในตารางที่ 61

ตารางที่ 61 ส่วนประกอบต่างๆของสูตรตำรับ KLO และ KLLO โดยใช้ Soybean oil แทนที่ Sunflower oil

Code	KLO (%w/w)	Sunflower oil (%w/w)	Soybean oil (%w/w)	Spearmint oil (%w/w)	Peppermint oil (%w/w)	Menthol (%w/w)	5% Sucralose in PEG400 (%w/w)
A-4	65	18	-	10	0	5	2
A-SBO-1	65	-	18	10	0	5	2
A-5	65	12	-	0	20	1	2
A-SBO-2	65	-	12	0	20	1	2
A-6	65	8	-	0	20	5	2
A-SBO-3	65	-	8	0	20	5	2
B-5	45	12	-	0	40	1	2
B-SBO-1	45	-	12	0	40	1	2
B-6	45	8	-	0	40	5	2
B-SBO-2	45	-	8	0	40	5	2
B-17	45	7	-	0	45	1	2
B-SBO-3	45	-	7	0	45	1	2

ผลการวิจัย

จากการทดลองใช้ Soybean oil เพื่อแทนที่ Sunflower oil ในสูตรตำรับ พบว่าสูตร A-SBO-1, A-SBO-2 และ A-SBO-3 ซึ่งปรับสัดส่วนมาจากสูตร A-4, A-5 และ A-6 ตามลำดับ มีลักษณะเป็นสารละลายใส สีเหลืองอ่อน ในขณะที่สูตร B-SBO-1, B-SBO-2 และ B-SBO-3 ซึ่งปรับสัดส่วนมาจากสูตร B-5, B-6 และ B-17 ตามลำดับ มีลักษณะเป็นสารละลายใส สีเหลือง จากการทดลอง พบว่าการใช้ Soybean oil แทน Sunflower oil ไม่มีผลต่อการละลายของส่วนประกอบในสูตรตำรับ แต่มีผลกับกลิ่นของสูตรตำรับคือมีกลิ่นหืนเล็กน้อย ในขณะที่การใช้ Sunflower oil จะไม่มีกลิ่นดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก Soybean oil มีกลิ่นแรงกว่า Sunflower oil นอกจากนี้ Sunflower oil มีวิตามินอี อยู่ด้วย ซึ่งน่าจะมีส่วนช่วยในการป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ในส่วนของ Soybean oil เองก็มักจะมีการเติมสารกันหืนสังเคราะห์ลงไปด้วยอยู่แล้ว แต่อาจใส่ลงในปริมาณที่เพียงพอสำหรับการป้องกันการหืนในระยะเวลาสั้น ดังนั้นหากต้องการใช้ Soybean oil แทนที่ Sunflower oil ในสูตรตำรับ อาจพิจารณาป้องกันหรือแก้ไขกลิ่นดังกล่าวด้วยการเติมสารกันหืนที่ใช้กับน้ำมันหรือเติมวิตามินอีเพิ่มเติมลงในสูตรตำรับ หรือการปรับให้มีการเติม Spearmint oil ร่วมกับ Peppermint oil ด้วยดังเช่นในการทดลองก่อนหน้านี้เพื่อช่วยให้กลิ่นของสูตรตำรับดีขึ้น

5.9.6 การประเมินคุณลักษณะของสูตรตำรับ KLO และ KLLO ในข้อ 5.13.3 และ 5.13.4 หลังการเก็บไว้ 14 วัน

ทำการประเมินคุณลักษณะในส่วนของคุณภาพ กลิ่น และรสชาติ หลังจากเก็บสูตรตำรับ KLO และ KLLO ในข้อ 5.13.3 และ 5.13.4 ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 14 วัน

ผลการวิจัย

สูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่มีการปรับปริมาณ Spearmint oil และ Peppermint oil เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 14 วัน พบว่าสูตรตำรับที่มีลักษณะใส คือสูตรตำรับที่ A-6, B-5, B-6, B-17, F-A-6 S+P, F-B-5 S+P, F-B-6 S+P, F-B-17 S+P, B-Sd 1/1, B-Sd 1/2, B-Sd 2/2, B-Sd 2/3 เมื่อทำการประเมินรสชาติเบื้องต้น พบว่า สูตรตำรับที่ได้มีรสชาติดี

สำหรับสูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่มีการใช้ Soybean oil แทนที่ Sunflower oil เมื่อเก็บสูตรตำรับไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 14 วัน พบว่าสูตรตำรับที่มีลักษณะใสคือสูตรตำรับที่ A-SBO-3, B-SBO-1, B-SBO-2, B-SBO-3 และเมื่อประเมินรสชาติเบื้องต้น พบว่าการใช้ Soybean oil จะมีกลิ่นหืนปนอยู่

5.9.7 การทดลองปรับสูตรตำรับ KLO และ KLLO โดยใช้ Acesulfame-K เป็นสารให้ความหวานแทน Sucralose

นำสูตรตำรับ F-A-6 S+P, F-B-5 S+P, F-B-6 S+P และ F-B-17 S+P มาพัฒนาต่อ โดยเปลี่ยนสารให้ความหวานจาก Sucralose เป็น Acesulfame K เพื่อเป็นสูตรตำรับสำรองในกรณีที่

หากมีปัญหาเรื่องความคงตัวของ Sucralose ในช่วงการศึกษาความคงตัวในขั้นต่อไป
ส่วนประกอบต่างๆดังในตารางที่ 62

ตารางที่ 62 สูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่มีการปรับเปลี่ยนใช้ Acesulfame-K เป็นสารให้ความ
หวานแทน Sucralose

Code	KLO (%w/w)	KLLO (%w/w)	SUO (%w/w)	SPO (%w/w)	PPO (%w/w)	Menthol (%w/w)	10% SU (%w/w)	10% AK (%w/w)
F-A-6 S+P-AK-I	65.00	-	-	10.00	10.00	5.00	-	10.00
F-A-6 S+P*	64.10	-	7.89	9.86	9.86	4.93	3.35	-
F-A-6 S+P	65.00	-	8.00	10.00	10.00	5.00	2.00	-
F-A-6 S+P-AK	65.00	-	8.00	10.00	10.00	5.00	-	2.00
F-B-5 S+P-AK	-	45.00	12.00	10.00	30.00	1.00	-	2.00
F-B-6 S+P-AK	-	45.00	8.00	10.00	30.00	5.00	-	2.00
F-B-17 S+P-AK	-	45.00	7.00	15.00	30.00	1.00	-	2.00

SUO = sunflower oil, SPO = spearmint oil, PPO = peppermint oil, SU = sucralose, AK = acesulfame-K

ผลการวิจัย

จากการนำสูตรตำรับ F-A-6 S+P, F-B-5 S+P, F-B-6 S+P และ F-B-17 S+P มาพัฒนาต่อ
โดยเปลี่ยนสารให้ความหวานจาก Sucralose เป็น Acesulfame K เพื่อเป็นสูตรตำรับสำรอง พบว่า
ยังไม่สามารถทำให้ได้สารละลายใส สำหรับสูตร F-A-6 S+P-AK-I และ สูตร F-A-6 S+P-AK มี
การแยกชั้น พบว่าการใช้ 10% Acesulfame-K in PEG400 ยังให้ความหวานที่ค่อนข้างน้อย ไม่
เพียงพอในการกลบรสขมของ KLO และ KLLO เมื่อเทียบกับการใช้ 5% Sucralose in PEG400 และ
ในสูตรของ KLO การใช้ 10% Acesulfame-K in PEG400 เป็นสารให้ความหวาน ยังไม่สามารถทำ
ให้ได้สารละลายใส ต้องพัฒนาปรับสัดส่วนของน้ำมันต่างๆ ในสูตรให้เหมาะสมต่อไป และต้อง
เพิ่ม % ของ Acesulfame-K in PEG400 เพื่อให้ได้ความหวานที่ทำให้สามารถกลบรสขมของ KLO
และ KLLO ได้

5.9.8 การทดลองปรับสูตรโดยใช้ PEG400 เป็นตัวทำละลาย และ PHC เป็นสารช่วยละลาย

จากสูตรตำรับที่พัฒนาได้ ซึ่งมีปริมาณ KLO 65% และ KLLO 45% ทดลองปรับเปลี่ยน
สูตรโดยใช้ Acesulfame-K เป็นสารให้ความหวานเปรียบเทียบกับ Sucralose โดยใช้ PEG 400 เป็น
ตัวทำละลาย และ PHC, Tween 80 เป็นสารช่วยละลาย มีการทดลองใช้ menthol ช่วยในการแต่ง

รสเย็น และได้ทดลองนำ Extra Virgin Coconut oil มาทดลองเปรียบเทียบกับ Sunflower oil
รายละเอียดส่วนประกอบต่างๆดังในตารางที่ 63

ตารางที่ 63 ส่วนประกอบในสูตรตำรับ KLO และ KLLO เมื่อทดลองใช้ Acesulfame-K เปรียบเทียบกับ Sucralose และเมื่อทดลองใช้ Extra Virgin Coconut Oil เปรียบเทียบกับ Sunflower oil

No.	Code	KLO %w/w	KLLO %w/w	Oil		SPO %w/w	PPO %w/w	Menthol %w/w	Sweetener* %w/w	PEG400 %w/w	PHC %w/w	Tween 80 %w/w	Remark*
				%w/w	type								
1	T1	64.87	0.00	7.98	SUO	10.18	9.98	4.99	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
2	T1_mo	58.98	0.00	7.26	SUO	9.26	9.07	4.54	1.81	9.07	0.00	0.00	20%Acesulfame K
3	T2	64.87	0.00	3.99	SUO	9.98	13.97	4.99	2.20	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
4	T2+PHC	64.23	0.00	3.95	SUO	9.88	13.83	4.94	2.17	0.99	0.00	0.00	20%Acesulfame K
5	T2_mo	61.79	0.00	3.80	SUO	9.51	13.31	4.75	2.09	3.80	0.95	0.00	20%Acesulfame K
6	T3	0.00	42.61	11.36	SUO	9.66	29.73	4.73	1.89	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
7	T4	59.88	0.00	7.98	SUO	12.18	12.97	4.99	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
8	T4+PEG400	56.39	0.00	7.52	SUO	11.47	12.22	4.70	1.88	5.83	0.00	0.00	20%Acesulfame K
9	T4_mo	55.45	0.00	7.39	SUO	11.28	12.01	4.62	1.85	7.39	0.00	0.00	20%Acesulfame K
10	T5	65.00	0.00	8.00	SUO	12.00	12.00	1.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
11	T5+Tw80	64.74	0.00	7.97	SUO	11.95	11.95	1.00	1.99	0.40	0.00	0.00	10%Acesulfame K
12	T5_mo	61.09	0.00	7.52	SUO	11.28	11.28	0.94	1.88	5.64	0.00	0.38	10%Acesulfame K
13	T6	65.00	0.00	4.00	SUO	10.00	14.00	5.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
14	T6_mo	60.52	0.00	3.72	SUO	9.31	13.04	4.66	1.86	6.89	0.00	0.00	10%Acesulfame K

No.	Code	KLO %w/w	KLLO %w/w	Oil		SPO %w/w	PPO %w/w	Menthol %w/w	Sweetener* %w/w	PEG400 %w/w	PHC %w/w	Tween 80 %w/w	Remark
				%w/w	type								
15	T7	64.87	0.00	3.99	SUO	9.98	13.97	4.99	2.20	0.00	0.00	0.00	5%Acesulfame K
16	T8	64.87	0.00	7.98	VO	9.98	9.98	4.99	2.20	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
17	T8_mo	63.60	0.00	7.83	VO	9.78	9.78	4.89	2.15	1.96	0.00	0.00	10%Acesulfame K
18	T9	0.00	44.82	11.95	SUO	9.96	29.88	1.00	2.39	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
19	T10	0.00	45.00	8.00	SUO	10.00	30.00	5.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
20	T11	0.00	44.93	6.96	SUO	14.91	30.22	0.99	1.99	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
21	T12	0.00	44.91	11.98	VO	9.98	29.94	1.00	2.20	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
22	T13	0.00	45.00	7.00	VO	15.00	30.00	1.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
23	T14	0.00	44.91	8.18	VO	9.98	29.94	4.99	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
24	T15	60.00	5.00	8.00	SUO	10.00	10.00	5.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
25	T15_mo	58.82	4.90	7.84	SUO	9.80	9.80	4.90	1.96	1.96	0.00	0.00	10%Acesulfame K
26	T16	60.00	0.00	12.00	VO	10.00	11.00	5.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
27	T17	59.96	0.00	11.95	SUO	9.96	11.16	4.98	1.99	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
28	T17_mo	58.22	0.00	11.61	SUO	9.67	10.83	4.84	1.93	2.90	0.00	0.00	10%Acesulfame K
29	T18	0.00	46.39	8.25	SUO	10.31	30.93	2.06	2.06	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K

No.	Code	KLO %w/w	KLLO %w/w	Oil		SPO %w/w	PPO %w/w	Menthol %w/w	Sweetener* %w/w	PEG400 %w/w	PHC %w/w	Tween 80 %w/w	Remark*
				%w/w	type								
30	T19	0.00	43.60	7.75	SUO	9.69	29.07	4.84	2.13	2.91	0.00	0.00	20%Acesulfame K
31	T20	65.00	0.00	4.00	SUO	10.00	14.00	5.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
32	T20+PEG400/PH C	61.32	0.00	3.77	SUO	9.43	13.21	4.72	1.89	4.72	0.94	0.00	20%Acesulfame K
33	T21	63.67	0.00	3.91	SUO	9.77	13.67	4.88	1.95	1.17	0.98	0.00	20%Acesulfame K
34	T22	65.00	0.00	4.00	SUO	10.00	14.00	5.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
35	T22+PEG400/PH C	63.73	0.00	3.92	SUO	9.80	13.73	4.90	1.96	0.98	0.98	0.00	10%Acesulfame K
36	T23	64.00	0.00	2.00	SUO	10.00	20.00	2.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
37	T23+PEG400/PH C	63.37	0.00	1.98	SUO	9.90	19.80	1.98	1.98	0.40	0.59	0.00	20%Acesulfame K
38	T24	64.00	0.00	0.00	0	10.00	20.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
39	T24+PEG400	63.75	0.00	0.00	0	9.96	19.92	3.98	1.99	0.40	0.00	0.00	20%Acesulfame K
40	T25	60.00	10.00	4.00	SUO	10.00	10.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
41	T25+PEG400	59.76	9.96	3.98	SUO	9.96	9.96	3.98	1.99	0.40	0.00	0.00	20%Acesulfame K
42	T25_up PPO	58.82	9.80	3.92	SUO	9.80	11.76	3.92	1.96	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
43	T26	60.00	10.00	4.00	SUO	10.00	10.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
44	T26+PEG400	59.76	9.96	3.98	SUO	9.96	9.96	3.98	1.99	0.40	0.00	0.00	10%Acesulfame K
45	T27	62.75	6.97	3.98	SUO	9.96	10.96	2.99	1.99	0.40	0.00	0.00	10%Acesulfame K

No.	Code	KLO %	KLLO %	Oil		SPO %	PPO %	Menthol %	Sweetener* %	PEG400 %	PHC %	Tween 80 %	Remark*
				%	type								
46	T28	64.00	6.00	4.00	SUO	10.00	10.00	3.00	2.00	1.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
47	T29	60.00	0.00	4.00	SUO	14.00	16.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
48	T30	60.00	0.00	0.00	-	16.00	18.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
49	T31	60.00	0.00	0.00	-	16.00	18.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
50	T32	60.00	0.00	0.00	-	16.00	18.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Sucralose
51	T33	45.95	0.00	0.00	-	21.62	24.32	5.41	2.70	0.00	0.00	0.00	10%Sucralose
52	T34	42.86	0.00	0.00	-	22.86	25.71	5.71	2.86	0.00	0.00	0.00	10%Sucralose
53	T35	37.50	0.00	0.00	-	25.00	28.13	6.25	3.13	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
54	T36	25.93	0.00	0.00	-	29.63	33.33	7.41	3.70	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
55	T37	65.00	0.00	0.00	-	13.00	16.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
56	T38	45.00	0.00	20.00	SUO	14.00	15.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
57	T39	30.00	0.00	20.00	SUO	20.00	24.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
58	T39/extd.	37.50	0.00	0.00	-	25.00	30.00	5.00	2.50	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
59	T40	20.00	0.00	20.00	SUO	24.00	30.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
60	T40/extd.	25.00	0.00	0.00	-	30.00	37.50	5.00	2.50	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose

No.	Code	KLO %w/w	KLLO %w/w	Oil		SPO %w/w	PPO %w/w	Menthol %w/w	Sweetener* %w/w	PEG400 %w/w	PHC %w/w	Tween 80 %w/w	Remark*
				%w/w	type								
61	T41	9.98	0.00	23.95	SUO	29.94	29.94	3.99	2.20	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
62	T41/extd.	13.12	0.00	0.00	0	39.37	39.37	5.25	2.89	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
63	T42	9.88	0.00	23.72	SUO	30.43	29.84	3.95	2.17	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
64	T42/extd.	12.95	0.00	0.00	0	39.90	39.12	5.18	2.85	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
65	T43	44.91	0.00	0.00	0	23.95	24.95	3.99	2.20	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
66	T44	29.88	0.00	0.00	0	29.88	34.06	3.98	2.19	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
67	T45	19.96	0.00	0.00	0	34.13	39.92	3.99	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
68	T45/1	10.00	0.00	0.00	0	42.00	42.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
69	T46	1.00	0.00	0.00	0	45.91	47.11	3.99	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Sucralose
70	T47	44.82	0.00	0.00	0	23.90	25.10	3.98	2.19	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
71	T48	30.00	0.00	0.00	0	30.00	34.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
72	T49	19.96	0.00	0.00	0	33.93	39.92	3.99	2.20	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
73	T49/1	10.00	0.00	0.00	0	42.00	42.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
74	T50	1.00	0.00	0.00	0	45.91	46.91	3.99	2.20	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
75	T51	44.91	0.00	0.00	0	24.15	24.95	3.99	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
76	T52	30.00	0.00	0.00	0	30.00	34.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
77	T53	19.96	0.00	0.00	0	33.93	39.92	3.99	2.20	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
78	T53/1	10.00	0.00	0.00	0	42.00	42.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K

No.	Code	KLO %w/w	KLLO %w/w	Oil		SPO %w/w	PPO %w/w	Menthol %w/w	Sweetener* %w/w	PEG400 %w/w	PHC %w/w	Tween 80 %w/w	Remark*
				%w/w	type								
79	T54	1.00	0.00	0.00	0	45.91	46.91	3.99	2.20	0.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
80	T38+PEG400	44.38	0.00	19.72	SUO	13.81	14.79	3.94	1.97	1.38	0.00	0.00	20%Sucralose
81	T47+PEG400	44.38	0.00	0.00	0	23.67	24.85	3.94	2.17	0.99	0.00	0.00	10%Acesulfame K
82	T51+PEG400	44.20	0.00	0.00	0	23.77	24.56	3.93	1.96	1.57	0.00	0.00	20%Acesulfame K
83	T52+PEG400	27.27	0.00	0.00	0	27.27	30.91	3.64	1.82	9.09	0.00	0.00	20%Acesulfame K
84	T53+PEG400	19.76	0.00	0.00	0	33.60	39.53	3.95	2.17	0.99	0.00	0.00	20%Acesulfame K
85	T53/1+PEG400	9.80	0.00	0.00	0	41.18	41.18	3.92	1.96	1.96	0.00	0.00	20%Acesulfame K
86	T54+PEG400	0.96	0.00	0.00	0	43.98	44.93	3.82	2.10	4.21	0.00	0.00	20%Acesulfame K
87	T61	65.00	0.00	0.00	0	10.00	16.00	4.00	2.00	3.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
88	T62	45.00	0.00	10.00	SUO	9.00	30.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
89	T63	30.00	0.00	10.00	SUO	20.00	35.00	3.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
90	T64	20.00	0.00	10.00	SUO	24.00	41.00	3.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
91	T65	10.00	0.00	10.00	SUO	24.00	51.00	3.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
92	T66	65.00	0.00	0.00	0	10.00	19.00	4.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
93	T67	45.00	0.00	10.00	SUO	8.00	32.00	3.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K

No.	Code	KLO %w/w	KLLO %w/w	Oil		SPO %w/w	PPO %w/w	Menthol %w/w	Sweetener* %w/w	PEG400 %w/w	PHC %w/w	Tween 80 %w/w	Remark*
				%w/w	type								
94	T63/extd.	33.33	0.00	0.00	0	22.22	38.89	3.33	2.22	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
95	T64/extd.	22.22	0.00	0.00	0	26.67	45.56	3.33	2.22	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
96	T65/extd.	11.11	0.00	0.00	0	26.67	56.67	3.33	2.22	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
97	T68	65.00	0.00	0.00	0	8.00	23.00	2.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
98	T69	44.55	0.00	3.96	SUO	17.82	29.70	1.98	1.98	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
99	T70	30.00	0.00	4.00	SUO	22.00	40.00	2.00	2.00	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
100	T69/extd.	46.39	0.00	0.00	0	18.56	30.93	2.06	2.06	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
101	T70/extd.	31.25	0.00	0.00	0	22.92	41.67	2.08	2.08	0.00	0.00	0.00	10%Acesulfame K
102	T55	0.00	30.00	11.00	SUO	20.00	30.00	4.00	2.00	3.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
103	T56	0.00	15.00	10.00	SUO	20.00	46.00	4.00	2.00	3.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
104	T57	0.00	10.00	10.00	SUO	20.00	51.00	4.00	2.00	3.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
105	T58	0.00	5.00	10.00	SUO	20.00	56.00	4.00	2.00	3.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
106	T59	0.00	45.00	6.00	SUO	10.00	30.00	4.00	2.00	3.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K
107	T60	0.00	30.00	10.00	SUO	20.00	31.00	4.00	2.00	3.00	0.00	0.00	20%Acesulfame K

KLO = Kaffir lime oil, KLLO= Kaffir lime leaf oil, SUO = sunflower oil, VO = Extra virgin coconut oil, SPO = spearmint oil, PPO = peppermint oil, PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil, Tw80 = Tween 80, PEG400 = Polyethylene Glycol 400

ผลการวิจัย

จากการทดลองใช้ Extra Virgin Coconut Oil ทดแทน Sunflower oil ในสูตรตำรับของ KLO (No. 16, 17, 26 ในตารางที่ 63) และสูตรตำรับของ KLLO (No. 21, 22, 23 ในตารางที่ 63) โดยใช้ปริมาณของ Extra Virgin Coconut Oil ในช่วงประมาณ 7-12%w/w ในการทดลองส่วนนี้มีความคาดหวังว่า Extra Virgin Coconut oil ซึ่งมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว (กลิ่นคล้ายน้ำกะทิในขนมหวานไทย คือ สลิม) และมีความใสมาก อาจจะสามารถนำมาใช้ทดแทน Sunflower oil ซึ่งแม้จะมีกลิ่นรสที่ดีที่สุดในกลุ่มน้ำมันพืชที่ได้นำมาทดสอบก่อนหน้านี้ แต่ Sunflower oil ก็ยังมีกลิ่นรสที่ออกเลี่ยนๆ เล็กน้อย หาก Extra Virgin Coconut Oil มีกลิ่นรสที่เข้ากันได้ ในสูตรตำรับก็น่าจะช่วยให้คุณลักษณะในเรื่องรสและกลิ่นของสูตรตำรับดีขึ้น พบว่า Extra Virgin Coconut Oil ให้กลิ่นหอมแต่เมื่อเติมลงในสูตรตำรับแล้วทำให้คุณลักษณะด้านความใสไม่ดี คือ สูตรตำรับมีความขุ่นและไม่เข้ากัน ดังนั้นจึงไม่นำ Extra Virgin Coconut Oil มาพัฒนาในขั้นต่อไป

จากการปรับสูตรตำรับของ KLO และ KLLO ที่ทดลองทั้งหมดจำนวน 107 สูตรตำรับ ในตารางที่ 63 พบว่า

---สูตรตำรับของ KLO ที่ให้สารละลายใสและมีรสชาติดหวานมีทั้งหมด 29 สูตรตำรับ ดังแสดงใน ตารางที่ 64 โดยเปรียบเทียบความใสกับสูตรตำรับเดิมที่ได้ทดลองมาแล้ว 2 สูตรตำรับ คือ F-A-6 S+P และ F-A-6 S+P* จากผลการทดลองพบว่าสูตรตำรับของ KLO ที่ใช้ Sucralose เป็นสารให้ความหวาน ให้รสชาติดที่ดีกว่าสูตรตำรับที่ใช้ Acesulfame-K และสามารถให้สารให้ความหวานที่ความเข้มข้นสูงกว่าคือ สามารถใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในสูตรตำรับได้ ในขณะที่การใช้ Acesulfame K จะใช้ได้เพียง 10% Acesulfame-K in PEG400 และปริมาณสูงสุดของ KLO ที่ใช้ได้ ในสูตรตำรับ คือ 37.50 %w/w (code T35)

---สูตรตำรับของ KLLO ที่ให้สารละลายใสและมีรสชาติดหวานมีทั้งหมด 7 สูตรตำรับ โดยเปรียบเทียบความใสกับสูตรตำรับเดิมที่ได้ทดลองมาแล้ว 3 สูตรตำรับ คือ F-B-5 S+P, F-B-6 S+P และ F-B-17 S+P ดังแสดงใน ตารางที่ 65 จากผลการทดลองพบว่าสูตรตำรับของ KLLO สามารถให้สารให้ความหวาน คือ Acesulfame-K ที่มีความเข้มข้นสูงกว่าในสูตรตำรับ KLO คือสามารถใช้ 20% Acesulfame-K in PEG400 เป็นสารให้ความหวานในสูตรตำรับได้ แต่หากเปรียบเทียบรสชาติดกับสูตรตำรับเดิมก่อนหน้า คือสูตรตำรับที่ใช้ Sucralose พบว่ารสหวานที่ได้ จะไม่ดีเท่าสูตรตำรับที่ใช้ Sucralose

ตารางที่ 64 สูตรตำรับที่มีการเปรียบเทียบสารให้ความหวาน (Sucralose และ Acesulfame-K) ของ KLO ที่มีลักษณะใส เมื่อเทียบกับสูตรตำรับเดิมที่เคยทดลองมาแล้ว (F-A-6 S+P, F-A-6 S+P*)

No.	Code	KLO %w/w	SUO %w/w	SPO %w/w	PPO %w/w	Menthol %w/w	Sweetener* %w/w	PEG400 %w/w	Remark*
	F-A-6 S+P	65.00	8.00	10.00	10.00	5.00	2.00	0.00	10%Sucralose
	F-A-6 S+P*	64.10	7.89	9.86	9.86	4.93	3.35	0.00	10%Sucralose
49	T31	60.00	0.00	16.00	18.00	4.00	2.00	0.00	20%Sucralose
50	T32	60.00	0.00	16.00	18.00	4.00	2.00	0.00	10%Sucralose
53	T35	37.50	0.00	25.00	28.13	6.25	3.13	0.00	10%Acesulfame K
54	T36	25.93	0.00	29.63	33.33	7.41	3.70	0.00	10%Acesulfame K
55	T37	65.00	0.00	13.00	16.00	4.00	2.00	0.00	20%Sucralose
57	T39	30.00	20.00	20.00	24.00	4.00	2.00	0.00	20%Sucralose
58	T39/extd.	37.50	0.00	25.00	30.00	5.00	2.50	0.00	20%Sucralose
59	T40	20.00	20.00	24.00	30.00	4.00	2.00	0.00	20%Sucralose
60	T40/extd.	25.00	0.00	30.00	37.50	5.00	2.50	0.00	20%Sucralose
61	T41	9.98	23.95	29.94	29.94	3.99	2.20	0.00	20%Sucralose
62	T41/extd.	13.12	0.00	39.37	39.37	5.25	2.89	0.00	20%Sucralose
64	T42/extd.	12.95	0.00	39.90	39.12	5.18	2.85	0.00	20%Sucralose
65	T43	44.91	0.00	23.95	24.95	3.99	2.20	0.00	20%Sucralose
66	T44	29.88	0.00	29.88	34.06	3.98	2.19	0.00	20%Sucralose
67	T45	19.96	0.00	34.13	39.92	3.99	2.00	0.00	20%Sucralose
68	T45/1	10.00	0.00	42.00	42.00	4.00	2.00	0.00	20%Sucralose
69	T46	1.00	0.00	45.91	47.11	3.99	2.00	0.00	20%Sucralose
71	T48	30.00	0.00	30.00	34.00	4.00	2.00	0.00	10%Acesulfame K
72	T49	19.96	0.00	33.93	39.92	3.99	2.20	0.00	10%Acesulfame K
73	T49/1	10.00	0.00	42.00	42.00	4.00	2.00	0.00	10%Acesulfame K
74	T50	1.00	0.00	45.91	46.91	3.99	2.20	0.00	10%Acesulfame K
86	T54+PEG400	0.96	0.00	43.98	44.93	3.82	2.10	4.21	20%Acesulfame K
90	T64	20.00	10.00	24.00	41.00	3.00	2.00	0.00	10%Acesulfame K
91	T65	10.00	10.00	24.00	51.00	3.00	2.00	0.00	10%Acesulfame K

ตารางที่ 64 (ต่อ)

No.	Code	KLO %w/w	SUO %w/w	SPO %w/w	PPO %w/w	Menthol %w/w	Sweetener* %w/w	PEG400 %w/w	Remark*
27	T63/extd.	33.33	0.00	22.22	38.89	3.33	2.22	0.00	10%Acesulfame K
28	T64/extd.	22.22	0.00	26.67	45.56	3.33	2.22	0.00	10%Acesulfame K
29	T65/extd.	11.11	0.00	26.67	56.67	3.33	2.22	0.00	10%Acesulfame K
30	T70	30.00	4.00	22.00	40.00	2.00	2.00	0.00	10%Acesulfame K
31	T70/extd.	31.25	0.00	22.92	41.67	2.08	2.08	0.00	10%Acesulfame K

KLO = Kaffir lime oil, SUO = sunflower oil, VO = Extra virgin coconut oil, SPO = spearmint oil, PPO = peppermint oil,
PEG400 = Polyethylene Glycol 400

ตารางที่ 65 สูตรตำรับของ KLLO ที่มีลักษณะใส เมื่อเทียบกับสูตรตำรับเดิมที่เคยทดลองมาแล้ว
(F-B-5 S+P, F-B-6 S+P, F-B-17 S+P)

No.	Code	KLLO %w/w	SUO %w/w	SPO %w/w	PPO %w/w	Menthol %w/w	Sweetener* %w/w	PEG400 %w/w	Remark*
	F-B-5 S+P	45.00	12.00	10.00	30.00	1.00	2.00	0.00	10%Acesulfame K
	F-B-6 S+P	45.00	8.00	10.00	30.00	5.00	2.00	0.00	10%Acesulfame K
	F-B-17 S+P	45.00	7.00	15.00	30.00	1.00	2.00	0.00	10%Acesulfame K
30	T19	43.69	7.77	9.71	29.13	4.85	1.94	2.91	20%Acesulfame K
102	T55	30.00	11.00	20.00	30.00	4.00	2.00	3.00	20%Acesulfame K
103	T56	15.00	10.00	20.00	46.00	4.00	2.00	3.00	20%Acesulfame K
104	T57	10.00	10.00	20.00	51.00	4.00	2.00	3.00	20%Acesulfame K
105	T58	5.00	10.00	20.00	56.00	4.00	2.00	3.00	20%Acesulfame K
106	T59	45.00	6.00	10.00	30.00	4.00	2.00	3.00	20%Acesulfame K
107	T60	30.00	10.00	20.00	31.00	4.00	2.00	3.00	20%Acesulfame K

KLLO= Kaffir lime leaf oil, SUO = sunflower oil, SPO = spearmint oil, PPO = peppermint oil, PEG400 = Polyethylene
Glycol 400

โดยสรุป สำหรับสูตรตำรับของ KLO และ KLLO ทั้งหมด 107 สูตรตำรับที่ทดลองใช้สารให้ความหวาน Acesulfame-K เปรียบเทียบกับ Sucralose และได้สูตรตำรับที่ใสและมีรสหวาน สำหรับสูตรตำรับ KLO จำนวน 29 สูตรตำรับ และ สูตรตำรับ KLLO จำนวน 7 สูตรตำรับ ดังในตารางที่ 64 และ 65 การใช้ PHC และ Tween 80 ไม่ได้มีส่วนช่วยในการละลายของสารให้ความหวาน ส่วนการเติม PEG400 มีเพียงบางสูตรตำรับเท่านั้นที่มีส่วนช่วยในการละลาย สำหรับการทดลองใช้ Acesulfame-K เป็นสารให้ความหวานแทน Sucralose ในขั้นตอนนี้นั้นได้ทดลองศึกษาเตรียมการไว้สำรองในกรณีที่สูตรตำรับที่ใช้ Sucralose มีปัญหาด้านความคงตัวเมื่อทำการศึกษาในขั้นต่อไป หากการใช้ Sucralose ไม่ก่อให้เกิดปัญหาในด้านความคงตัวของสูตรตำรับ ก็ยังคงน่าจะต้องเลือกสูตรตำรับที่มี Sucralose เพื่อใช้ในการบรรจุ capsule จีว จะได้รับรสชาติที่ดีกว่า

สำหรับสูตรตำรับ KLO เมื่อทำการประเมินรสชาติในเบื้องต้น พบว่าได้ผลดังในตารางที่ 66 และสำหรับสูตรตำรับ KLLO พบว่าได้ผลดังในตารางที่ 67

ตารางที่ 66 รสชาติของสูตรตำรับ KLO ที่ทดลองใช้สารให้ความหวาน Acesulfame-K เปรียบเทียบกับ Sucralose โดยมีส่วนประกอบอื่นๆเพื่อช่วยปรับปรุงความใสและรสชาติ

Sweetener	Code	ระดับ ความขม	ระดับ ความซ่า	ระดับ ความเย็น	ระดับ ความ หวาน	ระดับ ความ หอม	รสชาติ ทั่วไป
10% Sucralose in PEG400	F-A-6 S+P	++	++++	++++	++++	+++++	อร่อยมาก
	F-A-6 S+P*	+	+++	+++	+++++	++++	อร่อยมาก
	T32	++	++++	++++	+++	++++	อร่อย
20% Sucralose in PEG400	T31	+	++++	++++	+++++	++++	อร่อย
	T37	+	+++	+++	+++++	++++	
	T39	+	++++	++++	+++++	++++	
	T40	0	++++	++++	+++++	++++	
	T41	+	++++	++++	+++++	++++	
	T43	0	++++	++++	+++++	++++	อร่อยมาก
	T44	0	++++	++++	+++++	++++	
	T45	0	++++	++++	+++++	++++	
	T45/1	0	++++	++++	+++++	++++	
	T46	0	++++	++++	+++++	++++	
10% Acesulfame- K in PEG400	T35	รสชาติยอมรับไม่ได้					
	T36						
	T48						
	T49	++	++++	++++	+	++++	หวานไม่ เพียงพอ
	T49/1	+++	+++	+++	+	+++	
	T50	++	+++	++++	++	+++	
	T64	++	++++	+++	0	+++	
	T65	+	+++	+++	+	++++	
T70	+	+++	+++	0	++++		
20% Acesulfame- K in PEG400	T54+PEG400	++	+++	++++	++	++++	หวานไม่ เพียงพอ

ตารางที่ 67 รสชาติของสูตรตำรับ KLL0 ที่ทดลองใช้สารให้ความหวาน Acesulfame-K โดยมี ส่วนประกอบอื่นๆเพื่อช่วยปรับปรุงความใสและรสชาติ

Sweetener	Code	รสขม	รสซ่า	รสเย็น	รสหวาน	กลิ่นหอม	รสชาติ ทั่วไป
10% Acesulfame- K in PEG400	F-B-5 S+P	++	++++	++++	++++	++++	หวานน้อย
	F-B-6 S+P	++	++++	++++	++++	++++	
	F-B-17 S+P	++	++++	++++	++++	++++	
20% Acesulfame- K in PEG400	T19	+	++++	++++	+++	+++	หวานแต่มี กลิ่นเหม็น เขียว
	T55	+	+++++	++++	++++	+++	
	T56	+	++++	++++	++++	+++	
	T57	+	++++	++++	++++	++++	อร่อยมาก
	T58	0	++++	++++	++++	++++	
	T59	+	++++	++++	++++	++++	หวานแต่ ไม่ค่อย อร่อย
	T60	+	++++	++++	++	+++	หวานแต่มี กลิ่นเหม็น เขียว

จากตารางที่ 66 ซึ่งเป็นผลการทดสอบรสชาติของสูตรตำรับ KLO พบว่า Acesulfame-K มี ปัญหาในการละลายในสูตรตำรับเหล่านี้ สามารถใช้ Acesulfame-K ได้ในปริมาณจำกัด ทำให้ไม่สามารถให้ความหวานเพียงพอที่จะกลบรสขมได้ ดังนั้นจึงทำให้สูตรตำรับ KLO ที่ใช้ Acesulfame-K เป็นสารให้ความหวาน มีรสชาติที่ไม่ดีเหมือนสูตรตำรับที่ใช้ Sucralose เป็นสารให้ ความหวาน บางสูตรตำรับรสชาติไม่ดีมากจนถึงขั้นที่ยอมรับไม่ได้ โดยสรุป หากไม่มีปัญหาเรื่อง ความคงตัวของ Sucralose ในการศึกษาขั้นต่อไป ก็น่าที่จะเลือกใช้ Sucralose เป็นทางเลือกแรก หากเมื่อมีปัญหาในเรื่องความคงตัวของ Sucralose จึงอาจจำเป็นต้องกลับมาเลือกใช้ Acesulfame-K ซึ่งจะทำให้ได้สูตรตำรับที่รสชาติไม่ดีเท่าสูตรตำรับที่ใช้ Sucralose

จากตารางที่ 67 ซึ่งเป็นผลการทดสอบรสชาติของสูตรตำรับ KLL0 พบว่าสามารถใช้ Acesulfame-K เป็นสารให้ความหวานในสูตรตำรับได้ ทั้ง 10% Acesulfame-K in PEG400 และ 20% Acesulfame-K in PEG400 แต่รสชาติที่ได้จะออกหวานแหลมกว่าสูตรตำรับที่ใช้ Sucralose

นอกจากนี้ในบางสูตรตำรับยังคงมีกลิ่นเหม็นเขียวของ KLLO อยู่ โดยสรุป ในสูตรตำรับของ KLLO หากในการศึกษาขั้นต่อไปไม่มีปัญหาเรื่องความคงตัวของ Sucralose สารให้ความหวาน Sucralose ก็ยังเป็นทางเลือกที่ดีกว่าเนื่องจากรสหวานนุ่มนวลกว่า แต่หาก Sucralose มีปัญหาเรื่องความคงตัว ก็สามารถเลือก Acesulfame-K เป็นสารให้ความหวานทางเลือกที่ 2 ได้โดยที่ยังได้รสชาติที่ยอมรับได้

5.9.9 การประเมินรสชาติเบื้องต้นในสูตรที่ 5.13.5

ทำการประเมินในลักษณะบรรยายในรายละเอียดในสูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่ใช้ Sucralose เป็นสารให้ความหวาน และมีลักษณะที่ใส เฉพาะสูตรตำรับที่ใช้ Spearmint oil, Peppermint oil และ Sunflower oil โดยผู้วิจัย

ผลการวิจัย

จากการศึกษาที่ผ่านมา สูตรตำรับที่ได้พัฒนาขึ้น ได้ตั้งเป้าหมายไว้ว่าจะพยายามให้ได้ความเข้มข้นของสูตรตำรับในการใช้งานให้มีความแรงเป็น 20 เท่าของค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และให้ความสำคัญในส่วนของการกลบรสของ KLO และ KLLO เป็นหลักใหญ่ ทั้งนี้โดยให้ยังคงความใสของสูตรตำรับไว้ได้

จากการประเมินในขั้นตอนนี้ พบว่ารสชาติของสูตรตำรับ มีรสชาติด่อนข้างแรง โดยทั่วไปมักมีรสขม ช้ำ เย็น และในสูตรตำรับของ KLLO จะมีรสชาติดอกเหม็นเขียวเล็กน้อย รายละเอียดดังในตารางที่ 68 คาดว่ารสชาติที่แรงนี้น่าจะมาจากปริมาณของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดในสูตรตำรับ คือ KLO และ KLLO ดังนั้นอาจจำเป็นต้องลดเป้าหมายจากเดิมซึ่งพยายามให้ได้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเป็น 20 เท่าของ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) ให้ลงเหลือเพียงได้ค่าเท่ากับค่าความเข้มข้นที่สูงกว่าค่า MIC แต่ไม่สูงถึง 20 เท่า

ตารางที่ 68 รสชาติในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับ KLO และ KLLO จากตารางที่ 46

Code	KLO (%w/w)	KLLO (%w/w)	สี	กลิ่น	รสชาติ
A-6	65	-	เกือบใส	หอมเย็น	อโรย เย็น ไม่ขม
B-5	-	45	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นออกเหม็นเขียว เล็กน้อย กลิ่นเย็น	เหม็นเขียว ขมๆ ซ้ำๆ เย็นๆ
B-6	-	45	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นออกเหม็นเขียว เล็กน้อย กลิ่นเย็น	เหม็นเขียว ขมๆ ซ้ำๆ เย็นๆ ซ่าลิ้น
B-17	-	45	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นออกเหม็นเขียว เล็กน้อย กลิ่นเย็น	เหม็นเขียว ขมๆ ซ้ำๆ เย็นๆ ซ่าลิ้น
F-A-6 S+P	65	-	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น	เย็น ซ่าน้อย อมขมเล็กน้อย
F-B-5 S+P	-	45	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น ออกเหม็นเขียวเล็กน้อย	ขมขึ้น ซ้ำมาก กลิ่นออกจมูก รสออกเหม็นเขียว
F-B-6 S+P	-	45	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น ออกเหม็นเขียวเล็กน้อย	ขมขึ้น ซ้ำมาก กลิ่นออกจมูก รสออกเหม็นเขียว
F-B-17 S+P	-	45	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น ออกเหม็นเขียวเล็กน้อย	ขมขึ้น ซ้ำมาก กลิ่นออกจมูก รสออกเหม็นเขียว
B-Sd1/1	-	30	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น ออกเหม็นเขียวเล็กน้อย	ขม ขึ้น ซ้ำมาก แรง รสออกเหม็นเขียวเล็กน้อย
B-Sd1/2	-	30	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น ออกเหม็นเขียวเล็กน้อย	ขม ขึ้น ซ้ำมาก แรง รสออกเหม็นเขียวเล็กน้อย
B-Sd2/2	-	15	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น ออกเหม็นเขียวเล็กน้อย	เย็น ซ้ำมาก รสออกเหม็นเขียวเล็กน้อย
B-Sd1/3	-	30	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น ออกเหม็นเขียวเล็กน้อย	ขม ขึ้น ซ้ำมาก กลิ่นออกจมูก รสออกเหม็นเขียวเล็กน้อย

5.9.10 การปรับสูตรตำรับที่ลดปริมาณ KLO และ KLLO เพื่อให้มีรสชาติที่แรงน้อยลง

5.9.10.1 การปรับสูตรตำรับที่ลดปริมาณ KLO

ดำเนินการปรับสูตรตำรับโดยการลดปริมาณ KLO ลงเหลือ 30, 20, 15, 10, และ 5%w/w

ส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 69

ตารางที่ 69 ส่วนประกอบสูตรตำรับ KLO ที่มีการปรับลดปริมาณ KLO

Code	KLO	SUO	SPO	PPO	Menthol	20%Sucralose in PEG400
	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w
N1	30.00	2.00	25.00	40.00	1.00	2.00
N2	20.00	12.00	25.00	40.00	1.00	2.00
N3	15.00	17.00	25.00	40.00	1.00	2.00
N4	10.00	22.00	25.00	40.00	1.00	2.00
N5	5.00	27.00	25.00	40.00	1.00	2.00
N6	30.00	6.00	25.00	35.00	2.00	2.00
N7	20.00	16.00	25.00	35.00	2.00	2.00
N8	15.00	21.00	25.00	35.00	2.00	2.00
N9	10.00	26.00	25.00	35.00	2.00	2.00
N10	5.00	31.00	25.00	35.00	2.00	2.00
N11	10.00	21.00	25.00	40.00	2.00	2.00
N12	5.00	26.00	25.00	40.00	2.00	2.00

KLO = kaffir lime oil, SUO = sunflower oil, SPO = spearmint oil, PPO = peppermint oil

ผลการวิจัย

จากความเข้มข้นของ KLO ในสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก มีการใช้ KLO ที่ 4, 6, 10, 12 และ 16%v/v และจากการคำนวณค่า MIC ทำให้พอสรุปได้ว่าควรเตรียมสูตรที่มี KLO 30, 20, 15, 10 และ 5% เพื่อให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 1 - 6 เท่าของค่า MIC จากการทดลอง พบว่าสูตร N4, N9, N10 มีการแยกตัวของหยดของเหลวที่ส่วนล่างของหลอดทดลอง และการทดสอบรสชาติดังในตารางที่ 70 และ 71

ตารางที่ 70 รสชาติของสูตรตำรับ KLO ที่มีการปรับลดปริมาณ KLO

CODE	ระดับ ความขม	ระดับ ความซ่า	ระดับ ความเย็น	ระดับ ความหวาน	ระดับ ความหอม	หมายเหตุ
N1	+	++++	++++	+++++	+++++	
N2	0	++++	++++	+++++	+++++	
N3	0	++++	++++	+++++	+++++	
N4						มีหยดของเหลวแยกตัวอยู่ที่ ส่วนล่างของหลอดทดลอง
N5	0	++++	++++	+++++	+++++	
N6	0	+++++	+++++	+++++	+++++	
N7	0	+++++	+++++	+++++	+++++	
N8	0	+++++	+++++	+++++	+++++	
N9						มีหยดของเหลวแยกตัวอยู่ที่ ส่วนล่างของหลอดทดลอง
N10						มีหยดของเหลวแยกตัวอยู่ที่ ส่วนล่างของหลอดทดลอง
N11	0	+++++	+++++	+++++	+++++	
N12	0	+++++	+++++	+++++	+++++	

ตารางที่ 71 รสชาติในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับ KLO ที่มีการปรับลดปริมาณ KLO

Code	สี	กลิ่น	รส
N1	เหลืองอ่อนใส	หอม Spearmint oil & Peppermint oil เย็นๆ	รสน้ำมันมะกรูดขม จูน เฝื่อนขึ้นจมูก
N2	เหลืองอ่อนใส	หอม Spearmint oil & Peppermint oil เย็นๆ	รสน้ำมันมะกรูดขม จูน เฝื่อนขึ้นจมูก
N3	เหลืองอ่อนใส	หอม Spearmint oil & Peppermint oil เย็นๆ	รสเย็น กัดลิ้น ขึ้นจมูก
N4	มีการแยกตัว ไม่ได้ทดสอบ		
N5	เหลืองอ่อนใส	หอม Spearmint oil & Peppermint oil เย็นๆ	รสเย็น กัดลิ้น ขึ้นจมูก
N6	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นน้ำมันมะกรูดแรงเสียบๆ จมูก	รสขมมาก กลิ่นน้ำมันมะกรูด เสียบ ลิ้น เฝื่อน ซ้ำ
N7	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นน้ำมันมะกรูดปนกลิ่นมินท์	รสขมมากน้ำ เฝื่อน ซ้ำ
N8	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นน้ำมันมะกรูด กลบกลิ่นมินท์	กลิ่นน้ำมันมะกรูดน้ำ ออกขม เฝื่อน ซ้ำ ขึ้นจมูก ร้อนท้อง
N9	มีการแยกตัว ไม่ได้ทดสอบ		
N10	มีการแยกตัว ไม่ได้ทดสอบ		
N11	เหลืองอ่อนใส	หอม Spearmint oil & Peppermint oil	เฝื่อนลิ้น ซ้ำ ขึ้นจมูก เย็นซ่า
N12	เหลืองอ่อนใส	หอม Spearmint oil & Peppermint oil	เย็นซ่า เฝื่อนขึ้นจมูก ปร่า

สำหรับ N1-N5 ที่มีปริมาณ menthol 1%w/w ทุกสูตรตำรับมีรสหวาน และรสชาติดีขึ้น มีความรุนแรงของการกัดปากลดลง เฉพาะสูตรตำรับ N4 มีหยดของเหลวแยกตัวอยู่ที่ส่วนล่างของหลอดทดลอง

ส่วนสูตรตำรับ N6-N10 ที่มีปริมาณ menthol 2%w/w และปริมาณ Peppermint oil ลดลง ทุกสูตรตำรับมีรสชาติดีขึ้นและมีความเย็นมากขึ้น แต่สูตร N9 และ N10 ไม่คงตัวหลังเตรียม มีหยดของเหลวแยกตัวอยู่ที่ส่วนล่างของหลอดทดลอง จึงทำการปรับลดปริมาณ Sunflower oil และเพิ่ม

ปริมาณ Peppermint oil เป็นสูตรตำรับที่ N11, N12 ตามลำดับ สูตรตำรับ N11 และ N12 มีรสชาติดี และคงตัวหลังเตรียม

โดยสรุป สำหรับสูตรตำรับ KLO พบว่า สูตรตำรับที่ไม่มีปัญหาการแยกตัว สามารถนำไปพัฒนาต่อไปได้ คือ N1 - N3, N5 - N8, N11 และ N12 โดยที่ สูตร N6 - N8, N11 และ N12 จะมีความเย็นมากกว่า N1 - N3 และ N5 อย่างไรก็ดี พบว่าในการทดสอบโดยผู้วิจัย ในลักษณะบรรยาย สูตรตำรับส่วนใหญ่ยังคงมีรสแรง ช้ำ ขึ้นจมูก น่าจะได้พิจารณาปรับลดปริมาณ menthol และเพิ่มปริมาณสารให้ความหวาน คือ Sucralose ในขั้นต่อไป

5.9.10.2 การปรับสูตรตำรับที่ลดปริมาณ KLLO

ดำเนินการปรับสูตรตำรับโดยการลดปริมาณ KLLO ลงเหลือ 30, 25, 20, 15, 10, และ 5%w/w ส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 72

ตารางที่ 72 ส่วนประกอบสูตรตำรับ KLLO ที่มีการปรับลดปริมาณ KLO

Code	KLLO	SUO	SPO	PPO	Menthol	20%Sucralose in PEG400
	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w
M1	30.00	6.00	30.00	30.00	2.00	2.00
M2	25.00	11.00	30.00	30.00	2.00	2.00
M3	20.00	16.00	30.00	30.00	2.00	2.00
M4	15.00	16.00	30.00	35.00	2.00	2.00
M5	10.00	21.00	30.00	35.00	2.00	2.00
M6	5.00	26.00	30.00	35.00	2.00	2.00
M7	30.00	5.00	26.00	35.00	2.00	2.00
M8	25.00	10.00	30.00	31.00	2.00	2.00
M9	20.00	10.00	31.00	35.00	2.00	2.00
M10	15.00	10.00	31.00	40.00	2.00	2.00
M11	10.00	15.00	31.00	40.00	2.00	2.00
M12	5.00	15.00	36.00	40.00	2.00	2.00

KLLO = kaffir lime leaf oil, SUO = sunflower oil, SPO = spearmint oil, PPO = peppermint oil

ผลการวิจัย

จากรายงานเดิม ในสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปาก มีการใช้ KLLO ที่ 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16%v/v ซึ่งความเข้มข้น 4% และ 12%v/v เป็นความเข้มข้นที่นำมาพัฒนาต่อ และจากการคำนวณค่า MIC ของรายงานฉบับก่อนหน้า ทำให้พอสรุปได้ว่าควรเตรียมสูตรที่มี KLLO 30, 25, 20, 15, 10 และ 5% เพื่อให้ครอบคลุมค่า MIC ประมาณ 1 - 10 เท่า ปริมาณดังแสดงในตารางที่ 72 ผลการทดลอง ได้สูตรตำรับสี่เหลืองอ่อนใส และการทดสอบรสชาติดังแสดงในตารางที่ 73

ตารางที่ 73 รสชาติของสูตรตำรับ KLLO ที่มีการปรับลดปริมาณ KLLO

Code	ระดับความขม	ระดับความซ่า	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
M1	+	+++++	+++++	+++++	+++++	มีรสกัดเล็กน้อย (++)
M2	0	+++++	+++++	+++++	+++++	มีรสกัดเล็กน้อย (++)
M3	0	+++++	+++++	+++++	+++++	มีรสกัดเล็กน้อย (+)
M4	0	++++	+++++	+++++	+++++	มีรสกัดเล็กน้อย (+)
M5	0	++++	++++	+++++	+++++	ไม่มีรสกัด
M6	0	++++	++++	+++++	+++++	ไม่มีรสกัด
M7	+	+++++	+++++	+++++	+++++	มีรสกัดเล็กน้อย (++)
M8	0	+++++	+++++	+++++	+++++	มีรสกัดเล็กน้อย (++)
M9	0	+++++	+++++	+++++	+++++	มีรสกัดเล็กน้อย (+)
M10	0	+++++	+++++	+++++	+++++	มีรสกัดเล็กน้อย (+)
M11	0	+++++	+++++	+++++	+++++	ไม่มีรสกัด
M12	0	+++++	+++++	+++++	+++++	ไม่มีรสกัด

จากการทดลอง พบว่าสูตรตำรับ M1-M6 มีรสหวาน และรสชาติดีขึ้น มีความรุนแรงของรสที่ก่อกวนลดลงจากการพัฒนาในขั้นตอนก่อนหน้า สูตรตำรับ M1 ให้รสขม จากนั้นในสูตรตำรับ M7-M12 ได้ทดลองเพิ่มสัดส่วนของ peppermint oil และ spearmint oil และลดสัดส่วนของ sunflower oil เพื่อให้ตำรับมีรสชาติดีขึ้น สูตรตำรับ M7 – M12 มีรสชาติคล้ายกับสูตร M1 – M6 แต่ให้ความรู้สึกที่ดีกว่าเล็กน้อย สูตร M7 ให้รสขม โดยสูตรตำรับ M7 – M12 ให้ความรู้สึกที่ดีกว่าสูตรตำรับ M1-M6 อย่างไรก็ดี เนื่องจากสูตรตำรับส่วนใหญ่ยังมีรสที่แรงในส่วนของความซ่า ความเย็น จึงน่าที่จะมีการปรับปริมาณ menthol ลง และเพิ่มปริมาณสารให้ความหวาน คือ Sucralose เช่นเดียวกับการปรับสูตรตำรับของ KLO ในขั้นต่อไป

5.9.10.3 การปรับสูตรตำรับ KLO โดยใช้ปริมาณ KLO 5%w/w เป็นหลัก

ดำเนินการปรับสูตรตำรับ KLO โดยใช้ปริมาณ KLO 5%w/w เป็นหลัก เพื่อหาปริมาณสารให้ความหวานที่เหมาะสมกับสูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO ดังกล่าว โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 3, 4 และ 5%w/w และมีการใช้ Spearmint oil, Peppermint oil และ menthol (ปรับลดปริมาณลงเป็น 0, 0.25, 0.5%) เป็นสารแต่งรส ส่วนประกอบของสูตรตำรับที่ทดลองดังแสดงในตารางที่ 74

ตารางที่ 74 ส่วนประกอบสูตรตำรับ KLO เพื่อหาปริมาณสารให้ความหวานที่เหมาะสม

Code	KLO	SUO	SPO	PPO	Menthol	20%Sucralose in PEG400
	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w
NN6	5.00	25.00	25.00	40.00	0.00	5.00
NN7	5.00	25.00	30.00	34.50	0.50	5.00
NN8	5.00	25.00	30.25	34.50	0.25	5.00
NN9	5.00	25.00	26.00	40.00	0.00	4.00
NN10	5.00	25.00	31.00	34.50	0.50	4.00
NN11	5.00	25.00	31.25	34.50	0.25	4.00
NN12	5.00	25.00	27.00	40.00	0.00	3.00
NN13	5.00	25.00	32.00	34.50	0.50	3.00
NN14	5.00	25.00	32.25	34.50	0.25	3.00

ผลการวิจัย

พบว่า การทดลองโดยใช้สูตรตำรับที่ลดปริมาณ KLO ลงเหลือเพียง 5%w/w และพยายามเพิ่มความหวานจากการใช้ 20% Sucralose in PEG400 จาก 2%w/w เป็น 3, 4 และ 5%w/w จะได้ส่วนผสมที่ขึ้นและมีการแยกชั้นเกิดขึ้นในทุกสูตรตำรับ แต่เนื่องจากในสูตรตำรับมีการปรับเปลี่ยนปริมาณ menthol ไปด้วย ทำให้มีปัญหาในการปรับ จึงควรจะได้คัดส่วนประกอบบางตัวออกก่อนเพื่อทำการปรับในส่วนของความหวานเพียงอย่างเดียวก่อน

5.9.10.4 การทดลองหาปริมาณสารให้ความหวานที่เหมาะสมกับสูตรตำรับที่มีปริมาณ

KLO 5%w/w

5.9.10.4.1 ทดลองหาปริมาณสารให้ความหวานที่เหมาะสมกับสูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 1, 2, 3, 4 และ 5%w/w โดยคัดส่วนประกอบ Sunflower oil และ menthol ออกไปก่อน ส่วนประกอบดังในตารางที่ 75

ตารางที่ 75 ส่วนประกอบสูตรตำรับ KLO ที่มีปริมาณ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 1-5%w/w

Code	KLO	SUO	SPO	PPO	Menthol	20%Sucralose in PEG400
	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w
Lv.1	5.00	0.00	44.00	50.00	0.00	1.00
Lv.2	5.00	0.00	43.00	50.00	0.00	2.00
Lv.3	5.00	0.00	37.00	55.00	0.00	3.00
Lv.4	5.00	0.00	36.00	55.00	0.00	4.00
Lv.5	5.00	0.00	35.00	55.00	0.00	5.00

ผลการวิจัย

จากการทดลอง พบว่าสูตรตำรับทั้ง 5 สูตรตำรับในตารางที่ 75 ได้สูตรตำรับสีเหลืองอ่อนใส และการทดสอบรสในลักษณะบรรยายดังแสดงในตารางที่ 76

ตารางที่ 76 รสชาติของสูตรตำรับ KLO 5%w/w ที่มี 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 1-5%w/w

Code	สี	กลิ่น	รส
Lv.1	เหลืองอ่อนใส	หอมเย็น	รสเย็น ช่ำลิ้น หวานเล็กน้อย รสขมซ่อนอยู่ รสชาติรับได้ แต่เมื่ออมนานแล้วจะเริ่มแสบลิ้น
Lv.2	เหลืองอ่อนใส	หอมเย็น	รสหวาน คล้าย Lv.1 ขึ้นจมูกเล็กน้อย ช่ำลิ้น
Lv.3	เหลืองอ่อนใส	หอมเย็น	ช่ำมาก
Lv.4	เหลืองอ่อนใส	หอมเย็น	ช่ำมาก
Lv.5	เหลืองอ่อนใส	หอมเย็น	ช่ำมาก

ในการทดลองนี้ได้ตัดส่วนประกอบที่ให้รสเย็น คือ menthol ออกเพื่อดูระดับความเย็นของตำรับ พบว่า SPO และ PPO ยังให้ความเย็นแก่ตำรับได้ดี มีกลิ่นหอม ในขั้นตอนต่อไปอาจไม่ต้องเติม menthol อย่างไรก็ดีพบว่าในสูตรตำรับ Lv.3-Lv.5 มีรสช่ำมาก คาดว่าน่าจะมาจากปริมาณ Peppermint oil ที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าสูตรตำรับ Lv.1 และ Lv.2 ในส่วนของรสหวาน ความหวานที่เหมาะสมน่าจะอยู่ในช่วง 2-3%w/w ของ 20% Sucralose in PEG400

5.9.10.4.2 ทดลองหาปริมาณสารให้ความหวานที่เหมาะสมกับสูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 3, 2.5 และ 2%w/w โดยมีปริมาณต่างๆของ Sunflower oil

ผลการวิจัย

สูตรตำรับ KLO ที่มี 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 3%w/w

จากการทดลอง ตารางที่ 77 เป็นสูตรตำรับที่มี 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 3%w/w โดยสูตรตำรับ N15-N34 มีปริมาณ KLO ตั้งแต่ 5-30%w/w โดยมีปริมาณ SUO ตั้งแต่ 0-20%w/w พบว่าสูตรตำรับส่วนใหญ่จะแยกชั้นเมื่อมีปริมาณ SUO เพิ่มขึ้น (N17, N18, N21, N22, N24, N25, N26, N28, N29, N32, N33, N34) คือ ทำให้สัดส่วนของ Spearmint oil และ Peppermint oil ลดลง จึงมีผลต่อความเป็นเนื้อเดียวกันของส่วนผสมระหว่างน้ำมันและ PEG400

จากผลดังกล่าวจึงทดลองใช้ปริมาณ SUO ที่ 5%w/w คือ สูตรตำรับ N35-N39 เป็นสูตรตำรับที่มี KLO 5, 10, 15, 20, 30%w/w โดยมีปริมาณ SUO ที่ปรับลดลงเหลือ 5%w/w พบว่าการปรับลด SUO ช่วยให้ส่วนผสมเข้ากันได้ดีขึ้น แต่สูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO สูง คือ N38 มีลักษณะก้ำกึ่งใส และสูตรตำรับ N39 มีการแยกชั้น

สำหรับผลการทดสอบรสชาติของสูตรตำรับดังแสดงในตารางที่ 78 และ 79

ตารางที่ 77 สูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 3 %w/w โดยมีปริมาณต่างๆของSunflower oil

Code	KLO	SUO	SPO	PPO	Menthol	20%Sucralose in PEG400	Result
	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	%w/w	
N15	5.00	0.00	43.00	49.00	0.00	3.00	Soln ไส
N16	5.00	10.00	40.00	42.00	0.00	3.00	Soln ไส
N17	5.00	15.00	37.00	40.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N18	5.00	20.00	35.00	37.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N19	10.00	0.00	43.00	44.00	0.00	3.00	Soln ไส
N20	10.00	10.00	37.00	40.00	0.00	3.00	Soln ไส
N21	10.00	15.00	35.00	37.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N22	10.00	20.00	32.00	35.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N23	15.00	0.00	40.00	42.00	0.00	3.00	Soln ไส
N24	15.00	10.00	35.00	37.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N25	15.00	15.00	30.00	37.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N26	15.00	20.00	30.00	32.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N27	20.00	0.00	37.00	40.00	0.00	3.00	Soln ไส
N28	20.00	10.00	32.00	35.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N29	20.00	15.00	30.00	32.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N31	30.00	0.00	32.00	35.00	0.00	3.00	Soln ไส
N32	30.00	10.00	27.00	30.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N33	30.00	15.00	25.00	27.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N34	30.00	20.00	20.00	27.00	0.00	3.00	แยกชั้น
N35	5.00	5.00	40.00	47.00	0.00	3.00	Soln ไส
N36	10.00	5.00	37.00	45.00	0.00	3.00	Soln ไส
N37	15.00	5.00	35.00	42.00	0.00	3.00	Soln ไส
N38	20.00	5.00	32.00	40.00	0.00	3.00	ก้ำกึ่งใส
N39	30.00	5.00	27.00	35.00	0.00	3.00	แยกชั้น

KLO = kaffir lime oil, SUO = sunflower oil, SPO = spearmint oil, PPO = peppermint oil,
PEG 400 = Polyethylene Glycol 400

ตารางที่ 78 รสชาติของสูตรตำรับที่ใส่ ไม่แยกชั้น ที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20%
 Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 3%w/w โดยมีปริมาณต่างๆของSunflower oil

Code	ระดับความขม	ระดับความซ่า/กัด	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
N15	0	++	++++	+++++	+++++	-
N16	0	+	++++	+++++	+++++	-
N19	0	++	++++	+++++	+++++	-
N20	0	+	++++	+++++	+++++	-
N23	0	++	++++	+++++	+++++	-
N27	+	+++	++++	+++++	+++++	-
N31	+	+++	++++	+++++	+++++	-
N35	0	++	++++	+++++	+++++	-
N36	0	++	++++	+++++	+++++	-
N37	0	++	++++	+++++	+++++	-
N38	+	+++	++++	+++++	+++++	-

ตารางที่ 79 รสชาติในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 3%w/w โดยมีปริมาณต่างๆของSunflower oil

Code	สี	กลิ่น	รส
N15	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น	รสชา เย็น ขม รับประทานได้ รสหวานเล็กน้อยแทรกอยู่
N16	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น กลิ่นอ่อนกว่า N15	รสคล้าย N15
N19	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น	ซ่ากัดลิ้น เย็น ขม (รับได้น้อยกว่า N15)
N20	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น	ซ่าน้อยกว่า N19 แต่ก็ซ่ากว่า N15 เย็น ขม (รับได้น้อยกว่า N15)
N23	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอม ชุน เย็น ยังพอรับได้	ซ่า
N27	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นอ่อนกว่า N23	ซ่าแสบลิ้น ขม
N31	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นชุนขึ้นจมูก	ขม ซ่า แสบลิ้นมาก
N35	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น	เย็น ขม ไม่ซ่ามาก
N36	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นแรงกว่า N35	ขมเด่น ซาลิ้น เย็น
N37	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นแรงกว่า N35 กลิ่นมะกรูดแรง	ขม ขึ้นจมูก ซาลิ้น เย็น
N38	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นแรงกว่า N35 กลิ่นมะกรูดแรงแต่ไม่หอม	ขม ขึ้นจมูก ซาลิ้น เผ็ดมาก

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ 20% Sucralose in PEG400 ขนาด 3%w/w ของสูตรตำรับ จะทำให้ใช้ SUO เป็นสารเพิ่มปริมาณได้ค่อนข้างน้อย ดังนี้

- ใช้ SUO ได้ → 0 - 10%w/w สำหรับตำรับที่มี KLO 5%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - 10%w/w สำหรับตำรับที่มี KLO 10%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - <10%w/w สำหรับตำรับที่มี KLO 15%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - <10%w/w สำหรับตำรับที่มี KLO 20%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - <10%w/w สำหรับตำรับที่มี KLO 30%w/w

โดยรวม รสชาติของสูตรตำรับยังมีความแรง ทั้งนี้สูตรตำรับที่มี KLO 5, 10%w/w เป็นปริมาณที่ยังพอรับกลิ่นรสได้ แต่ในปริมาณ KLO ที่สูงกว่านี้ พบว่ากลิ่นรสแรงมาก ทำให้มีความกังวลว่าเมื่อให้ในขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดที่จะใช้บรรจุใน capsule จีว (80 -100 มิลลิกรัม) จะมีรสชาติที่ยังแรงมากขึ้นไปอีกหรือไม่ น่าที่จะได้มีการทดสอบรสชาติในขนาดที่ใกล้เคียงกับขนาดบรรจุใน capsule จีว ในขั้นตอนต่อไป

สูตรตำรับ KLO ที่มี 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2.5%w/w

จากการทดลอง เตรียมสูตรตำรับ KLO ที่มี 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2.5%w/w โดยให้มีปริมาณ KLO 5-30%w/w โดยมีปริมาณ SUO ตั้งแต่ 0-15%w/w

พบว่าในตารางที่ 80 สูตรตำรับ KLO ที่มีปริมาณ SUO ไม่สูงมาก จะมีส่วนผสมที่มีลักษณะใส แต่ที่ปริมาณ SUO ที่สูงขึ้น จะเกิดการแยกชั้น

การทดสอบรสชาติได้ผลดังแสดงในตารางที่ 81

ตารางที่ 80 สูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2.5 %w/w โดยมีปริมาณต่างๆของSunflower oil

Code	KLO %w/w	SUO %w/w	SPO %w/w	PPO %w/w	Menthol %w/w	20%Sucralose in PEG400 %w/w	Result
N44	5.00	0.00	43.00	49.50	0.00	2.50	Soln ใส
N45	5.00	10.00	40.00	42.50	0.00	2.50	Soln ใส
N46	5.00	15.00	37.00	40.50	0.00	2.50	Soln ใส
N47	5.00	20.00	35.00	37.50	0.00	2.50	แยกชั้น
N48	10.00	0.00	43.00	44.50	0.00	2.50	Soln ใส
N49	10.00	10.00	37.00	40.50	0.00	2.50	Soln ใส
N50	10.00	15.00	35.00	37.50	0.00	2.50	แยกชั้น
N51	10.00	20.00	32.00	35.50	0.00	2.50	แยกชั้น
N52	15.00	0.00	40.00	42.50	0.00	2.50	Soln ใส
N53	15.00	10.00	35.00	37.50	0.00	2.50	Soln ใส
N54	15.00	15.00	30.00	37.50	0.00	2.50	แยกชั้น
N55	15.00	20.00	30.00	32.50	0.00	2.50	แยกชั้น
N40	20.00	5.00	32.00	40.50	0.00	2.50	Soln ใส
N41	30.00	5.00	27.00	35.50	0.00	2.50	Soln ใส
N42	20.00	10.00	30.00	37.50	0.00	2.50	แยกชั้น
N43	30.00	10.00	25.00	32.50	0.00	2.50	แยกชั้น

ตารางที่ 81 รสชาติของสูตรตำรับที่ใส่ ไม่แยกชั้น ที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2.5%w/w โดยมีปริมาณต่างๆ ของSunflower oil

Code	ระดับความขม	ระดับความซ่า	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
N44	0	++	++++	+++++	+++++	-
N45	0	++	++++	+++++	+++++	-
N46	0	+	++++	+++++	+++++	-
N48	0	+++	++++	+++++	+++++	-
N49	0	++	++++	+++++	+++++	-
N52	0	+++	++++	+++++	+++++	-
N53	0	++	++++	+++++	+++++	-
N40	1/2+	+++	++++	+++++	+++++	-
N41	1/2+	+++	++++	+++++	+++++	-

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ 20% Sucralose in PEG400 ขนาด 2.5%w/w ของสูตรตำรับ จะทำให้ใช้ SUO เป็นสารเพิ่มปริมาณได้มากขึ้น ดังนี้

- ใช้ SUO ได้ → 0 - 15%w/w สำหรับสูตรตำรับที่มี KLO 5%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - 10%w/w สำหรับสูตรตำรับที่มี KLO 10%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - 10%w/w สำหรับสูตรตำรับที่มี KLO 15%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - 5%w/w สำหรับสูตรตำรับที่มี KLO 20%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - 5%w/w สำหรับสูตรตำรับที่มี KLO 30%w/w

โดยรวม แม้สูตรตำรับจะสามารถใช้ SUO ได้มากขึ้น แต่สูตรตำรับก็ยังคงมีรสชาติที่แรง
สูตรตำรับ KLO ที่มี 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2%w/w

จากการทดลอง เตรียมสูตรตำรับ KLO ที่มี 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2%w/w โดยให้มีปริมาณ KLO 5-30%w/w โดยมีปริมาณ SUO ตั้งแต่ 0-20%w/w

เนื่องจากมีสารให้ความหวานในปริมาณน้อย พบว่าในตารางที่ 82 สูตรตำรับ KLO ส่วนใหญ่จะได้ส่วนผสมที่มีลักษณะใส การทดสอบรสชาติได้ผลดังแสดงในตารางที่ 83

ตารางที่ 82 สูตรตำรับที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2%w/w โดยมีปริมาณต่างๆของSunflower oil

Code	KLO %w/w	SUO %w/w	SPO %w/w	PPO %w/w	Menthol %w/w	20%Sucralose in PEG400 %w/w	Result
N56	5.00	0.00	44.00	49.00	0.00	2.00	Soln ใส
N57	5.00	10.00	40.00	43.00	0.00	2.00	Soln ใส
N58	5.00	15.00	38.00	40.00	0.00	2.00	Soln ใส
N59	5.00	20.00	35.00	38.00	0.00	2.00	Soln ใส
N60	10.00	0.00	43.00	45.00	0.00	2.00	Soln ใส
N61	10.00	10.00	38.00	40.00	0.00	2.00	Soln ใส
N62	10.00	15.00	35.00	38.00	0.00	2.00	Soln ใส
N63	10.00	20.00	32.00	36.00	0.00	2.00	ก้ำกึ่งใส
N64	15.00	0.00	40.00	43.00	0.00	2.00	Soln ใส
N65	15.00	10.00	35.00	38.00	0.00	2.00	Soln ใส
N66	15.00	15.00	31.00	37.00	0.00	2.00	Soln ใส
N67	15.00	20.00	30.00	33.00	0.00	2.00	ก้ำกึ่งใส
N68	20.00	0.00	38.00	40.00	0.00	2.00	Soln ใส
N69	20.00	10.00	32.00	36.00	0.00	2.00	Soln ใส
N70	20.00	15.00	30.00	33.00	0.00	2.00	ก้ำกึ่งใส
N71	20.00	20.00	28.00	30.00	0.00	2.00	แยกชั้น
N72	30.00	0.00	32.00	36.00	0.00	2.00	Soln ใส
N73	30.00	10.00	27.00	31.00	0.00	2.00	ก้ำกึ่งใส
N74	30.00	15.00	25.00	28.00	0.00	2.00	ก้ำกึ่งใส
N75	30.00	20.00	21.00	27.00	0.00	2.00	แยกชั้น

ตารางที่ 83 รสชาติของสูตรตำรับที่ใส ไม่แยกชั้น ที่มีปริมาณ KLO 5%w/w โดยใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2%w/w โดยมีปริมาณต่างๆ ของSunflower oil

Code	ระดับความขม	ระดับความซ่า	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
N56	0	++	++++	++++	++++	
N57	0	+	++++	++++	++++	
N58	0	+	++++	++++	++++	
N59	0	1/2+	++++	++++	++++	
N60	0	++	++++	++++	++++	
N61	0	+	++++	++++	++++	
N62	0	+	++++	++++	++++	
N63	0	1/2+	++++	++++	++++	
N64	0	++	++++	++++	++++	
N65	0	+	++++	++++	++++	
N66	0	1/2+	++++	++++	++++	
N67	-	-	-	-	-	ไม่คงตัว แยกชั้น
N68	+	+++	++++	++++	++++	
N69	-	-	-	-	-	ไม่คงตัว แยกชั้น
N70	-	-	-	-	-	ไม่คงตัว แยกชั้น
N72	+	+++	++++	++++	++++	
N73	-	-	-	-	-	ไม่คงตัว แยกชั้น
N74	-	-	-	-	-	ไม่คงตัว แยกชั้น

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ 20% Sucralose in PEG400 ขนาด 2%w/w ของสูตรตำรับ จะทำให้ใช้ SUO เป็นสารเพิ่มปริมาณได้มากขึ้น ดังนี้

- ใช้ SUO ได้ → 0 - 20%w/w สำหรับสูตรตำรับที่มี KLO 5%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - 20%w/w สำหรับสูตรตำรับที่มี KLO 10%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - 20%w/w สำหรับสูตรตำรับที่มี KLO 15%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - 15%w/w สำหรับสูตรตำรับที่มี KLO 20%w/w
- ใช้ SUO ได้ → 0 - 15%w/w สำหรับสูตรตำรับที่มี KLO 30%w/w

โดยรวม แม้สูตรตำรับจะสามารถใช้ SUO ได้มากขึ้น แต่สูตรตำรับก็ยังคงมีรสชาติที่แรง

จากผลการทดลองที่ได้จากการทดลองใช้ 20% Sucralose in PEG400 ในปริมาณ 2, 2.5, 3%w/w พบว่า ปริมาณ SUO ที่สามารถใช้ในการเจือจางในสูตรตำรับที่มี KLO 5, 10, 15, 20 และ 30% ได้โดยยังให้ส่วนผสมที่มีความใส ปริมาณดังแสดงในตารางที่ 84

ตารางที่ 84 ปริมาณ Sunflower oil ที่สามารถใช้ในการเจือจางในสูตรตำรับที่มี KLO 5, 10, 15, 20 และ 30% ได้โดยยังให้ส่วนผสมที่มีความใส

KLO	ปริมาณ SUO ที่สามารถใช้ในการเจือจาง (%w/w)		
%w/w	ชุดที่มีสารให้ความหวาน 2%w/w	ชุดที่มีสารให้ความหวาน 2.5%w/w	ชุดที่มีสารให้ความหวาน 3%w/w
5	0-20	0-15	0-10
10	0-20	0-10	0-10
15	0-15	0-10	0-5
20	0-5	0-5	0-5
30	0-5	0-5	0

อนึ่ง การทดสอบรสชาติเบื้องต้นที่ผ่านมาทั้งหมดทั้งในระดับความแรงและในลักษณะบรรยาย ได้ดำเนินการโดยหดยสูตรตำรับต่างๆเพียง 1 หยดจากแท่งแก้วลงบนปลายนิ้วและทดสอบรสชาติ เนื่องจากรสชาติของสูตรตำรับส่วนใหญ่เป็นไปในทำนองเดียวกัน คือ มีรสชาติที่ค่อนข้างแรงแม้จะเป็นเพียงปริมาณ 1 หยด จึงทำให้มีข้อสงสัยว่าหากเมื่อเพิ่มขนาดการทดสอบขึ้นเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณที่จะใช้บรรจุจริงใน capsule จีว คือ ในขนาด 80-100 มิลลิกรัม จะยังทำให้รสชาติขม ซ้ำ เย็น มีความรุนแรงขึ้นกว่านี้มากหรือไม่ จึงนำที่จะทำการทดสอบรสชาติของสูตรตำรับในขนาดที่ใกล้เคียงกับที่จะใช้บรรจุก่อนการสรุปเลือกสูตรตำรับเพื่อเก็บไว้สำหรับการบรรจุใน capsule จีว เพื่อการประเมินทางประสาทสัมผัสในผู้ประเมินกลุ่มใหญ่ต่อไป

5.9.10.5 การประเมินรสชาติของสูตรตำรับในปริมาณใกล้เคียงกับขนาดบรรจุใน capsule จีว^{*}

ซึ่งสูตรตำรับ N15 (KLO 5%w/w), N19 (KLO 10%w/w) โดยดูดส่วนผสมให้เข้าไปใน dropper ด้วยลูกยาง ให้มีน้ำหนักของส่วนผสมแต่ละสูตรตำรับเท่ากับประมาณ 80 มิลลิกรัม และบิบบหยอดส่วนผสมแต่ละสูตรตำรับเข้าในปากเพื่อทดสอบรสชาติ

ผลการวิจัย

ปริมาณส่วนผสมในขนาด 80 มิลลิกรัม เป็นขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดว่าจะบรรจุใน capsule จีว จากการทดสอบรสชาติ พบว่า N15 (KLO 5%w/w) มีรสชาติที่ยังคงยอมรับได้ ไม่รุนแรงจนต้องบ้วนทิ้ง และไม่ขมคอ ส่วน N19 (KLO 10%w/w) มีรสขาล้นมาก ต้องบ้วนปากทิ้งทันที หลังจากการทดสอบรสชาติผ่านไป 2-3 ชั่วโมง พบว่ามีอาการร้อนท้องตามมา ซึ่งทำให้รู้สึกไม่สบายท้อง เมื่อพิจารณาการใช้งานจริงในรูปของ capsule จีว ซึ่งมีขนาดบรรจุประมาณ 80-100 มิลลิกรัม ต่อ 1 capsule และจะต้องมีการใช้รับประทานหรืออมช้าประมาณ 3-4 ครั้งต่อวัน (ขนาดรับประทาน เป็นขนาดประมาณการณ) อาการร้อนท้องที่เกิดขึ้น จะต้องเกิดขึ้นจากการใช้ช้าทุกครั้ง หลายครั้งต่อวัน ซึ่งยอมรับไม่ได้ที่จะนำไปใช้กับอาสาสมัครหรือผู้ป่วย ดังนั้นจึงต้องพิจารณากำหนดปริมาณส่วนผสมประกอบใหม่ทั้งหมด

5.9.10.6 การปรับสูตรตำรับ KLO โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ

ทดลองปรับสูตรตำรับ KLO โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ และใช้ 20% Sucralose in PEG400 คงที่ที่ 3%w/w โดยให้ปริมาณส่วนผสมส่วนใหญ่ที่เหลือเป็น Sunflower oil ปริมาณส่วนผสมดังในตารางที่ 85

ตารางที่ 85 สูตรตำรับ KLO 5%w/w โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ และใช้ 20% Sucralose in PEG400 คงที่ที่ 3%w/w

Code	KLO %w/w	SUO %w/w	SPO:PPO (1:1) %w/w	20%Sucralose in PEG400 %w/w
N76	5.00	91.00	1.00	3.00
N77	5.00	89.50	2.50	3.00
N78	5.00	87.00	5.00	3.00
N79	5.00	82.00	10.00	3.00
N80	5.00	77.00	15.00	3.00
N81	5.00	72.00	20.00	3.00

KLO = kaffir lime oil, SUO = sunflower oil, SPO = spearmint oil, PPO = peppermint oil,
PEG 400 = Polyethylene Glycol 400

หลังจากเตรียม พบว่าทุกสูตรตำรับที่ได้ ไม่ใส มีลักษณะขุ่น และเมื่อตั้งทิ้งไว้จะแยกชั้น จึงทดลองใช้ 10% Sucralose in PEG400 แทน โดยคำนวณปริมาณของสารให้ความหวานให้ได้เท่ากับการใส่ 20% Sucralose in PEG400 ในสูตร 3%w/w ส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 86

ตารางที่ 86 สูตรตำรับ KLO 5%w/w โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ และใช้ 10% Sucralose in PEG400 คงที่ที่ 6%w/w

Code	KLO %w/w	SUO %w/w	SPO:PPO (1:1) %w/w	10%Sucralose in PEG400 %w/w
N82	5.00	88.00	1.00	6.00
N83	5.00	86.50	2.50	6.00
N84	5.00	84.00	5.00	6.00
N85	5.00	79.00	10.00	6.00
N86	5.00	74.00	15.00	6.00
N87	5.00	69.00	20.00	6.00

หลังจากเตรียม พบว่าทุกสูตรตำรับที่ได้ ไมโส มีลักษณะขุ่น และเมื่อตั้งทิ้งไว้จะแยกชั้นเช่นกัน ซึ่งคาดว่ามาจากปริมาณที่สูงขึ้นของ SUO จึงได้เตรียมสูตรตำรับที่ไม่มี KLO เป็นส่วนประกอบเพื่อเปรียบเทียบ (ตารางที่ 87 และ 88) ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ ส่วนผสมไมโส มีลักษณะขุ่น และเมื่อตั้งทิ้งไว้จะแยกชั้นเช่นกัน

ตารางที่ 87 สูตรตำรับ KLO โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ และใช้ 20% Sucralose in PEG400 คงที่ที่ 3%w/w (ตัด KLO ออก)

Code	KLO %w/w	SUO %w/w	SPO:PPO (1:1) %w/w	20%Sucralose in PEG400 %w/w
N88	0.00	96.00	1.00	3.00
N89	0.00	94.50	2.50	3.00
N90	0.00	92.00	5.00	3.00
N91	0.00	87.00	10.00	3.00
N92	0.00	82.00	15.00	3.00
N93	0.00	77.00	20.00	3.00

ตารางที่ 88 สูตรตำรับ KLO โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ และใช้ 10% Sucralose in PEG400 คงที่ที่ 6%w/w (ตัด KLO ออก)

Code	KLO %w/w	SUO %w/w	SPO:PPO (1:1) %w/w	10%Sucralose in PEG400 %w/w
N94	0.00	93.00	1.00	6.00
N95	0.00	91.50	2.50	6.00
N96	0.00	89.00	5.00	6.00
N97	0.00	84.00	10.00	6.00
N98	0.00	79.00	15.00	6.00
N99	0.00	74.00	20.00	6.00

เมื่อพบว่า ส่วนผสมทั้งหมดที่มีการแต่งรสหวานในการทดลองในขั้นตอนนี้ที่ผ่านมา ไม่สามารถให้ส่วนผสมที่ใส่ได้ จึงได้ทดลองคัดส่วนประกอบที่ให้ความหวานออก และทดลองตามตารางที่ 89 และทดสอบรสชาติเบื้องต้นได้ผลดังในตารางที่ 90

ตารางที่ 89 สูตรตำรับ KLO 5%w/w โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ (ตัด 20% Sucralose in PEG400 ออก)

Code	KLO %w/w	SUO %w/w	SPO:PPO (1:1) %w/w
N100	5.00	94.00	1.00
N101	5.00	92.50	2.50
N102	5.00	90.00	5.00
N103	5.00	85.00	10.00
N104	5.00	80.00	15.00
N105	5.00	75.00	20.00

ตารางที่ 90 รสชาติของสูตรตำรับ KLO 5%w/w โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ (ตัด 20% Sucralose in PEG400 ออก)

Code	ระดับความขม	ระดับความซ่า	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
N100	+	+	+	0	+	
N101	+	+	+	0	+	
N102	+	+	+	0	+	
N103	++	+	+	0	+	
N104	++++	++	++	0	++	
N105	+++++	++	++	0	+++	

พบว่า การตัดสารให้ความหวาน Sucralose ที่ละลายใน PEG400 ออกไป ทำให้ปัญหาเรื่องความขุ่นหมดไปด้วย คาดว่าการที่มี Sucralose และ PEG400 อยู่ด้วยในสูตรตำรับ จำเป็นต้องอาศัย Peppermint oil และ Spearmint oil เพื่อช่วยให้ส่วนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แต่จากการที่สูตรตำรับ N104 และ N105 ยังคงมีรสขมอยู่สูง จึงคาดว่ารสขมดังกล่าวอาจจะมาจาก Peppermint oil และ Spearmint oil มากกว่าที่จะมาจาก KLO ซึ่งมีปริมาณคงที่ในทุกสูตรตำรับ หลังจากนั้นจึงได้ทดลองตัด KLO ออกจากสูตรตามตารางที่ 91 เพื่อตรวจสอบดูว่า KLO หรือ Spearmint oil และ Peppermint oil ที่เป็นสาเหตุของรสชาติที่แรง และดำเนินการทดสอบรสชาติเบื้องต้น ได้ผลดังในตารางที่ 92

ตารางที่ 91 สูตรตำรับ KLO โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ (ตัด 20% Sucralose in PEG400 และ KLO ออก)

Code	KLO	SUO	SPO:PPO (1:1)
	%w/w	%w/w	%w/w
N106	0.00	99.00	1.00
N107	0.00	97.50	2.50
N108	0.00	95.00	5.00
N109	0.00	90.00	10.00
N110	0.00	85.00	15.00
N111	0.00	80.00	20.00

ตารางที่ 92 รสชาติของสูตรตำรับ KLO โดยใช้ SPO:PPO (1:1) ในปริมาณต่างๆ
(ตัด 20% Sucralose in PEG400 และ KLO ออก)

Code	ระดับความขม	ระดับความซ่า	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
N106	0	0	0	0	0	
N107	0	0	0	0	0	
N108	+	+	+	0	+	
N109	+	+	+	0	++	
N110	+++	++	++	0	++	
N111	+++++	++	++	0	+++	

จากการทดสอบเบื้องต้น พบว่ายอมรับรสชาติได้จนถึงระหว่างสูตรตำรับ N108 และ N109 หลังจากนั้นสูตรตำรับต่อไปจะเริ่มมีรสชาติไม่ดี โดย N110 และ N111 มีรสขมซ่าชัดเจน และเนื่องจากสูตรตำรับชุดนี้ (N106 - N111) ไม่มี KLO อยู่ด้วย ดังนั้นรสขมซ่าในสูตรตำรับหลังๆจึงน่าจะมาจาก Peppermint oil และ Spearmint oil ซึ่งปริมาณสูงขึ้นตามลำดับในสูตรตำรับท้ายๆ

โดยสรุป ในช่วงนี้ ส่วนผสมทั้งหมดทุกสูตรตำรับที่มี Sucralose in PEG400 อยู่ด้วย ไม่สามารถได้ส่วนผสมที่ใสได้ นอกจากนั้นการทดสอบรสชาติเบื้องต้น พบว่า รสชาติที่ยอมรับได้อยู่ที่ระหว่าง N78 และ N79 คือสามารถยอมรับรสชาติได้ที่ SPO:PPO (1:1) ที่ปริมาณไม่เกิน 5%w/w ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้จะเริ่มมีรสขม ซ่า ร้อนแรงขึ้นเรื่อยๆ ในการทดลองในช่วงหลังพบว่าการตัดสารให้ความหวานออก จะช่วยให้ได้ส่วนผสมที่ใส ไม่มีการแยกตัวของ PEG400 นอกจากนี้ ปริมาณ Peppermint oil และ Spearmint oil ที่สูงเกินไปทำให้เกิดรสขมซ่า ดังนั้นการกำหนดสูตรตำรับในช่วงต่อไปจึงควรตัดสารให้ความหวานออก และกำหนดให้มีปริมาณ SPO:PPO (1:1) ที่ปริมาณไม่เกิน 5%w/w และควรใช้ข้อกำหนดนี้ทดลองกับสูตรตำรับของ KLLO ด้วย

หลังจากนี้จึงได้ดำเนินการเตรียมสูตรตำรับ KLO ที่มี SPO:PPO (1:1) 1, 2.5, 5%w/w และ menthol 0.10%w/w ทั้งนี้การเติม menthol เพิ่มเติมลงไปด้วยความคาดหวังที่จะชดเชยรสเย็นที่อาจจะลดต่ำลงไปเนื่องจากการลดปริมาณของ Spearmint oil และ Peppermint oil และได้ทดลองเติม PEG400 ลงในบางสูตรตำรับเพื่อยืนยันให้แน่ชัดว่ามีความจำเป็นต้องตัด PEG400 ออกจากสูตรตำรับจริงๆ นอกจากนี้ดำเนินการเปลี่ยน diluent จาก SUO เป็น Coconut oil, Palm olein oil, Safflower oil, Rice bran oil เพื่อตรวจสอบควา่น้ำมันต่างๆนี้จะสามารถช่วยทำให้การเข้ากันได้ของ PEG400 หรือไม่ รายละเอียดสูตรตำรับดังแสดงในตารางที่ 93 ส่วนการทดสอบรสชาติเบื้องต้นดังแสดงในตารางที่ 94

ตารางที่ 93 สูตรตำรับ KLO ที่มี KLO, SPO:PPO (1:1), menthol, PEG400 ในปริมาณต่างๆ โดยใช้ diluents คือ SUO ยกเว้นที่มีกำกับในตาราง

Code	KLO %w/w	SUO %w/w	SPO:PPO (1:1) %w/w	PEG400 %w/w	Menthol %w/w	Result
N112	5.00	93.90	1.00	0.00	0.10	สารละลายใส
N113	5.00	92.40	2.50	0.00	0.10	สารละลายใส
N114	5.00	89.90	5.00	0.00	0.10	สารละลายใส
N115	5.00	91.00	1.00	3.00	0.00	ขุ่นหลังเตรียม
N116	5.00	89.50	2.50	3.00	0.00	ขุ่นหลังเตรียม
N117	5.00	87.00	5.00	3.00	0.00	ขุ่นหลังเตรียม
N118	5.00	(SBO)87.00	5.00	3.00	0.00	ขุ่นหลังเตรียม
N119	5.00	(CNO)87.00	5.00	3.00	0.00	ขุ่นหลังเตรียม
N120	5.00	(POO)87.00	5.00	3.00	0.00	ขุ่นหลังเตรียม
N121	5.00	(SFO)87.00	5.00	3.00	0.00	ขุ่นหลังเตรียม
N122	5.00	(RBO)87.00	5.00	3.00	0.00	ขุ่นหลังเตรียม
N123	10.00	89.00	1.00	0.00	0.00	สารละลายใส
N124	10.00	87.50	2.50	0.00	0.00	สารละลายใส
N125	10.00	85.00	5.00	0.00	0.00	สารละลายใส
N126	15.00	84.00	1.00	0.00	0.00	สารละลายใส
N127	15.00	82.50	2.50	0.00	0.00	สารละลายใส
N128	15.00	80.00	5.00	0.00	0.00	สารละลายใส
N129	10.00	88.90	1.00	0.00	0.10	สารละลายใส
N130	10.00	87.40	2.50	0.00	0.10	สารละลายใส
N131	10.00	84.90	5.00	0.00	0.10	สารละลายใส
N132	15.00	83.90	1.00	0.00	0.10	สารละลายใส
N133	15.00	82.40	2.50	0.00	0.10	สารละลายใส
N134	15.00	79.90	5.00	0.00	0.10	สารละลายใส

SBO = Soybean oil, CNO = Coconut oil, POO = Palm olein oil, SFO = Safflower oil, RBO = Rice bran oil

ตารางที่ 94 รสชาติเบื้องต้นของสูตรตำรับ KLO สูตรตำรับ N112-N114, N123-N134

Code	ระดับความขม	ระดับความซ่า	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
N112	0	+1/2	+1/2	0	+	
N113	+	+1/2	+	0	+	
N114	+	+1/2	+	0	+	
N123	+	0	0	0	+	
N124	+	+1/2	+1/2	0	++	
N125	+	+	+	0	++	
N126	+1 1/2	+1/2	+1/2	0	+	
N127	+1 1/2	+	+	0	++	
N128	+1 1/2	+	+	0	++	
N129	+	+1/2	+1/2	0	+	
N130	+	+	+	0	++	
N131	+	+1 1/2	+1 1/2	0	++	
N132	+1 1/2	+	+	0	+	เริ่มมีรสกัดปาก
N133	+1 1/2	+1 1/2	+1 1/2	0	++	เริ่มมีรสกัดปาก
N134	+1 1/2	+1 1/2	+1 1/2	0	++	เริ่มมีรสกัดปาก

ในสูตรตำรับที่ N112-N113 เป็นสูตรตำรับที่มี KLO 5%w/w, SPO:PPO (1:1) 1, 2.5, 5%w/w และมี menthol 0.10%w/w พบว่าได้ส่วนผสมที่ใส มีรสชาติเบื้องต้นดังแสดงในตารางที่ 94

ในสูตรตำรับที่ N115-N117 เป็นสูตรตำรับที่มี KLO 5%w/w, SPO:PPO (1:1) 1, 2.5, 5%w/w และมี PEG400 3%w/w พบว่า ส่วนผสมมีลักษณะขุ่น เมื่อตั้งทิ้งไว้เกิดการแยกชั้น มีการแยกตัวออกของ PEG400 ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันอีกครั้งว่า PEG400 เป็นสาเหตุของความขุ่น ดังนั้นการคาดหวังว่าจะใช้ PEG400 ในการเป็นตัวทำละลายสำหรับสารให้ความหวานน่าจะมีปัญหาจริง

ในสูตรตำรับที่ N118-N122 เป็นสูตรตำรับที่มีการใช้น้ำมันชนิดอื่นๆ มาแทน SUO ในสูตรตำรับด้วยความคาดหวังว่าน้ำมันนั้นๆ จะสามารถช่วยส่งเสริมความเข้ากันได้กับ PEG400 พบว่าส่วนผสมทุกสูตรตำรับมีลักษณะขุ่น ดังนั้นน้ำมันทั้ง 5 ชนิด คือ Soybean oil, Coconut oil, Palm olein oil, Safflower oil, Rice bran oil ไม่สามารถช่วยส่งเสริมความเข้ากันได้กับ PEG400

ในสูตรตำรับที่ N123-N134 เป็นสูตรตำรับที่มี KLO 10, 15%w/w, SPO:PPO (1:1) 1, 2.5, 5%w/w และมีหรือไม่มี menthol 0.10%w/w พบว่าทุกสูตรตำรับได้ส่วนผสมที่ใส่ โดยจะมีรสชาติที่แรงเมื่อมีปริมาณ SPO:PPO (1:1) ที่ 5%w/w ทั้งนี้เนื่องจากในสูตรตำรับชุดนี้มีปริมาณ KLO อยู่สูงแล้ว คือ 10, 15%w/w

ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงได้คัดเลือกสูตรตำรับที่น่าจะอยู่ในข่ายที่จะนำไปบรรจุ capsule จีวได้ โดยนำมาทำการประเมินรสชาติเบื้องต้นในลักษณะบรรยาย ได้ผลดังในตารางที่ 95

ตารางที่ 95 รสชาติเบื้องต้นในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับ KLO ที่ได้คัดเลือกมา

Code	สี	กลิ่น	รส
N112	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็นอ่อนๆ	รสเย็นอ่อนๆ ไม่บาดลิ้น รสชาติดีมาก menthol ให้รสชาติเย็นอ่อนๆดี
N113	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็นอ่อนๆ	รสเย็นอ่อนๆ ไม่บาดลิ้น มีรสขมแทรกแต่ยังรับได้อยู่ menthol ให้รสชาติเย็นอ่อนๆดี
N114	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็น แรงกว่า N112, N113	เหมือน N113 แต่รสขมแรงขึ้น ติดลิ้น
N129	เหลืองอ่อนใส เมื่อเขย่าจะเป็น ฟองอากาศเล็กๆ ลอยตัวอยู่	กลิ่นหอมเย็น	คล้าย N112 แต่รสขมแทรกอยู่มากกว่า รสชาติยังรับได้อยู่
N130	เหมือน N129	กลิ่นหอมเย็น	รสขาลิ้นขึ้นกว่า N129 รสขมเริ่มชัดขึ้นกว่า N129 พอรับได้แต่ไม่เท่า N129
N131	เหมือน N129	กลิ่นหอมเย็น	รสขมเริ่มชัดขึ้นกว่า N130 อีก รสขมเริ่มนำแล้ว

ในชุดของ N112-N114 มี KLO 5%w/w, SPO:PPO (1:1) 1, 2.5, 5%w/w และมี menthol 0.10%w/w พบว่า N112 (KLO 5%w/w, SPO:PPO (1:1) 1%w/w) และ N113 (KLO 5%w/w, SPO:PPO (1:1) 2.5%w/w) เป็นสูตรตำรับที่สมควรคัดเลือกไปบรรจุใน capsule จีว เนื่องจาก มีรสชาติที่อ่อนๆ ไม่บาดลิ้น แม้จะมีรสขมแทรกอยู่บ้าง ก็เป็นในระดับที่ยังรับได้อยู่ ทั้งนี้ cut-off จะอยู่ที่ระหว่าง N113 และ N114 คือสูตรตำรับไม่ควรมี SPO:PPO (1:1) สูงกว่า 2.5%w/w

ในชุดของ N129-N131 มี KLO 10%w/w, SPO:PPO (1:1) 1, 2.5, 5%w/w และมี menthol 0.10%w/w พบว่า N129 (KLO 10%w/w, SPO:PPO (1:1) 1%w/w) เป็นสูตรตำรับที่สมควรคัดเลือกไปบรรจุใน capsule จีว เนื่องจาก มีรสชาติที่อ่อนๆ ไม่บาดลิ้น แม้จะมีรสขมแทรก

อยู่มากกว่าสูตรตำรับที่มี KLO 5%w/w แต่ก็เป็นในระดับที่ยังรับได้อยู่ ทั้งนี้ cut-off จะอยู่ที่ระหว่าง N129 และ N130 คือสูตรตำรับที่มี KLO อยู่สูงถึง 10%w/w ไม่ควรมี SPO:PPO (1:1) สูงกว่า 1%w/w เนื่องจากที่ปริมาณ SPO:PPO (1:1) สูงกว่า 1%w/w คือ 2.5, 5%w/w สูตรตำรับให้รสขมที่แรงชัดขึ้น และรสชาติขึ้นมาก

ดังนั้น จึงได้คัดเลือกสูตรตำรับที่มี KLO 5%w/w คือ สูตรตำรับ N112, N113 และ สูตรตำรับที่มี KLO 10%w/w คือ สูตรตำรับ N129 ไว้เพื่อใช้บรรจุ capsule จีวต่อไป

5.13.9.7 การปรับสูตรตำรับ KLLO

ทดลองสูตรตำรับ KLLO 5%w/w โดยกำหนดปริมาณ SPO:PPO (1:1) 1, 2.5, 5%w/w และไม่มีหรือมี menthol 0.10%w/w และทดลองเติม PEG400 เพื่อทดสอบความเข้ากันได้ รายละเอียดส่วนประกอบต่างๆดังในตารางที่ 96

ตารางที่ 96 สูตรตำรับ KLLO ที่มี SPO:PPO (1:1), menthol, PEG400 ในปริมาณต่างๆ

Code	KLLO %w/w	SUO %w/w	SPO:PPO (1:1) %w/w	PEG400 %w/w	Menthol %w/w	Result
M13	5.00	94.00	1.00	0.00	0.00	สารละลายใส
M14	5.00	92.50	2.50	0.00	0.00	สารละลายใส
M15	5.00	90.00	5.00	0.00	0.00	สารละลายใส
M16	5.00	93.90	1.00	0.00	0.10	สารละลายใส
M17	5.00	92.40	2.50	0.00	0.10	สารละลายใส
M18	5.00	89.90	5.00	0.00	0.10	สารละลายใส
M19	5.00	91.00	1.00	3.00	0.00	ขุ่นหลังเตรียม
M20	5.00	89.50	2.50	3.00	0.00	ขุ่นหลังเตรียม
M21	5.00	87.00	5.00	3.00	0.00	ขุ่นหลังเตรียม

ผลการวิจัย

จากการทดลอง พบว่าชุดของ M13-M18 ซึ่งเป็นสูตรตำรับที่ไม่มีและมี menthol ได้ส่วนผสมที่ใส ได้ผลการทดสอบรสชาติเบื้องต้นดังในตารางที่ 97 พบว่าสูตรตำรับยังคงมีกลิ่นของ KLLO ที่แรง แต่การที่มี menthol อยู่ด้วยจะช่วยลดกลิ่นที่แรงของ KLLO ได้บางส่วน ดังนั้นจึงได้คัดเลือกสูตรตำรับ M16-M18 ไว้เพื่อทดสอบรสชาติในลักษณะบรรยายดังในตารางที่ 98

สำหรับสูตรตำรับในชุดของ M19-M21 ส่วนผสมมีลักษณะขุ่น มีการแยกชั้น เกิดการแยกตัวของ PEG400 เช่นเดียวกับในสูตรตำรับ KLO

ตารางที่ 97 รสชาติเบื้องต้นของสูตรตำรับ KLLO สูตรตำรับ M13-M18

Code	ระดับความขม	ระดับความซ่า	ระดับความเย็น	ระดับความหวาน	ระดับความหอม	หมายเหตุ
M13	0	0	0	0	+	กลิ่น KLLO แรง
M14	+	+1/2	+1/2	0	+	กลิ่น KLLO แรง
M15	+	+	+	0	+	กลิ่น KLLO แรง
M16	+1/2	+1/2	+1/2	0	+	กลิ่น KLLO แรง
M17	+1 1/2	+	+	0	+	กลิ่น KLLO แรง
M18	+1 1/2	+1 1/2	+1 1/2	0	+	กลิ่น KLLO แรง

ตารางที่ 98 รสชาติเบื้องต้นในลักษณะบรรยายของสูตรตำรับ KLLO สูตรตำรับ M16-M18

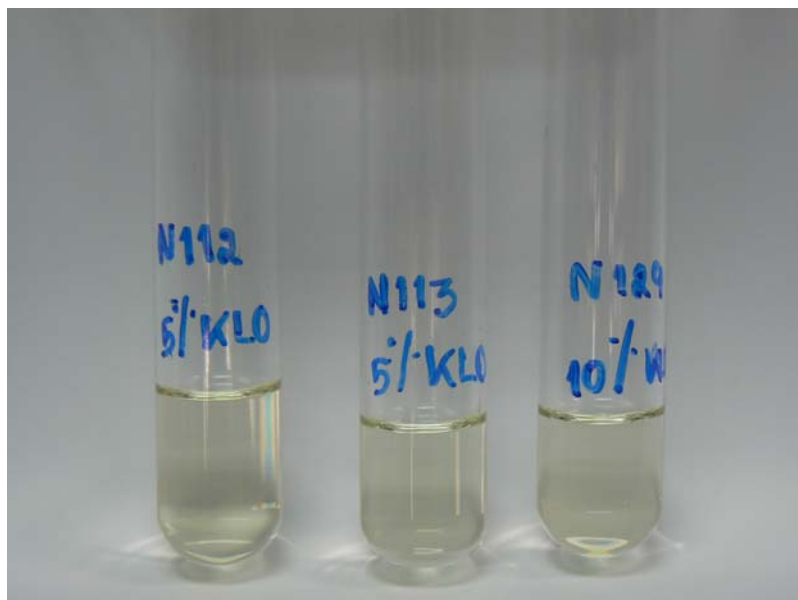
Code	สี	กลิ่น	รส
M16	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็นๆ	รสเลี่ยนๆของ SUO รสเหม็นเขียว รสเย็นอ่อนๆ
M17	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็นๆ	รสคล้าย M16 แต่เลี่ยนน้อยกว่า
M18	เหลืองอ่อนใส	กลิ่นหอมเย็นๆ	รสเย็นซ่า รสเหม็นเขียวลดลง รสเลี่ยนน้อยกว่า M16

จากการทดสอบรสชาติในลักษณะบรรยายของ สูตรตำรับ M16-M18 พบว่าแม้จะมี KLLO เพียง 5%w/w แต่ก็ให้กลิ่นที่แรง แต่การที่มี SPO, PPO, menthol อยู่ด้วยก็ทำให้สูตรตำรับมีรสชาติที่ดีขึ้น จึงได้คัดเลือกสูตรตำรับ M16-M18 ไว้เพื่อบรรจุ capsule จีวต่อไป

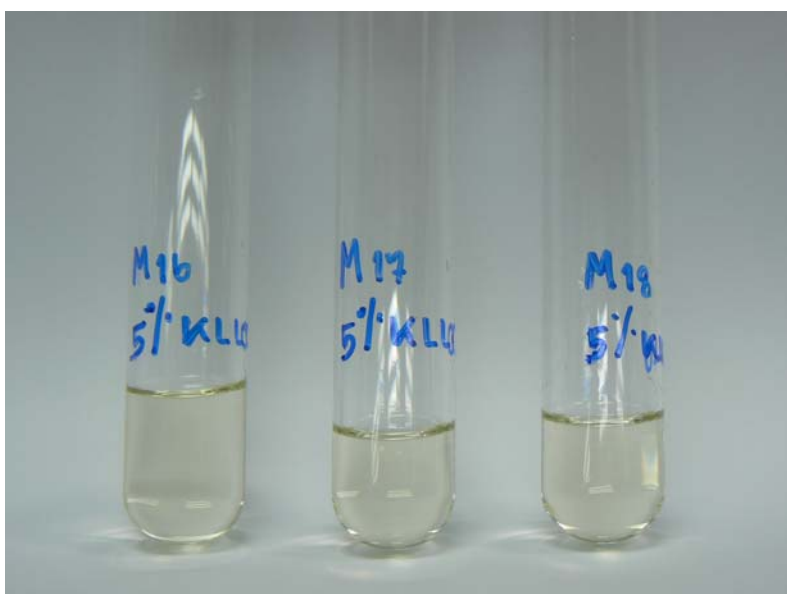
โดยสรุป สูตรตำรับที่จะนำไปบรรจุใน capsule จีวต่อไป มีส่วนประกอบดังในตารางที่ 99 และรูปสูตรตำรับดังในรูปที่ 32 และ 33 สำหรับในชุดของ KLO สามารถใช้ KLO ได้ที่ 5, 10%w/w คือสูงสุดที่ 10%w/w โดยสามารถเติม SPO:PPO (1:1) ได้สูงสุดถึง 2.5%w/w และ ปริมาณ menthol ที่เหมาะสมคือ 0.10%w/w สำหรับในชุดของ KLLO สามารถใช้ KLLO ได้ สูงสุดที่ 5%w/w เท่านั้น โดยสามารถเติม SPO:PPO (1:1) ได้สูงสุดถึง 5%w/w ซึ่งปริมาณที่สูงของ SPO และ PPO จะช่วยในการกลบกลิ่นรสของ KLLO และรสเลี่ยนของ SUO และ ปริมาณ menthol ที่เหมาะสมคือ 0.10%w/w เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 99 สูตรตำรับ KLO และ KLLO ที่จะนำไปบรรจุใน capsule จีว

Code	KLO %w/w	KLLO %w/w	SUO %w/w	SPO:PPO (1:1) %w/w	Menthol %w/w
N112	5.00	-	93.90	1.00	0.10
N113	5.00	-	92.40	2.50	0.10
N129	10.00	-	88.90	1.00	0.10
M16	-	5.00	93.90	1.00	0.10
M17	-	5.00	92.40	2.50	0.10
M18	-	5.00	89.90	5.00	0.10



รูปที่ 33 สูตรตำรับ KLO ที่จะนำไปบรรจุใน capsule จีว คือ สูตรตำรับ KLO 5%w/w (N112, N113) และ KLO 10%w/w (N129)



รูปที่ 34 สูตรตำรับ KLLO ที่จะนำไปบรรจุใน capsule จีว คือ สูตรตำรับ KLLO 5%w/w (M16, M17, M18)

ภาคผนวก ญ

รายละเอียดการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัยในข้อ 6.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูดเพื่อใช้ป้องกันโรคฟันผุและเพื่อใช้บรรเทาอาการเจ็บคอ/ไอ

จากสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด ในรายงานโครงการวิจัย เรื่อง “ผลิตภัณฑ์อาหารจากน้ำมันหอมระเหย และ/หรือ สารสกัดสมุนไพร ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*” (วิมล, 2549) ซึ่งประกอบด้วย KLO 6, 10, 16%v/v มีลักษณะใส ประกอบด้วยส่วนประกอบหลักๆดังในตารางที่ 101 เพื่อใช้เป็นสูตรตำรับตั้งต้นในการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวานและ สารแต่งกลิ่นรสต่อไป

ตารางที่ 101 สูตรตำรับตั้งต้นของ KLO 6, 10, 16%v/v

ส่วนประกอบ	ปริมาณส่วนประกอบในสูตรตำรับ (%v/v)		
	สูตร KLO 6%v/v	สูตร KLO 10%v/v	สูตร KLO 16%v/v
Kaffir lime oil	6	10	16
PHC	10	13	19
95% Ethanol	30	25	20

PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

6.1.1 การปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส

ทดลองปรับเปลี่ยนสารให้ความหวานจากเดิม คือ Acesulfame-K เป็น Sucralose เปรียบเทียบกับ Acesulfame-K, Aspartame ทดลองเติมสารแต่งกลิ่นรสชนิดต่างๆ คือ สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์ กลิ่นส้ม สตรอเบอร์รี่ สับปะรด สละ ครีมน้ำตาล ใบเตย มะลิ รัม บลูเบอร์รี่ และน้ำมันหอมระเหยที่ใช้แต่งกลิ่นรสชนิดต่างๆ คือ Spearmint oil, Peppermint oil, Lemon oil, Orange oil ทั้งนี้โดยดูความน่าจะเป็นที่จะเข้ากันได้ของกลิ่นรสในความแรงของสูตรตำรับต่างๆในสูตรตำรับตั้งต้น รายละเอียดของส่วนประกอบในแต่ละสูตรตำรับดังแสดงในตารางที่ 102 - 111

ตารางที่ 102 สูตรตำรับ KLO 6%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K6A1-K6A3, K6S4-K6S9)

ส่วนประกอบ	สูตร K6A1		สูตร K6A2		สูตร K6A3		สูตร K6S4		สูตร K6S5		สูตร K6S6		สูตร K6S7		สูตร K6S8		สูตร K6S9	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime oil (ml)	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00
PHC (ml)	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00
95% Ethanol (ml)	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00
Acesulfame-K (g)	0.125	2.50	0.125	2.50	0.125	2.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucralose (g)	-	-	-	-	-	-	0.06	1.20	0.07	1.40	0.08	1.60	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20
กลิ่นส้ม (ml)	1.0	20.00	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	1.5	30.00	2.0	40.00	-	-
กลิ่นสตอเบอรี่ (ml)	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00
กลิ่นสับปะรด(ml)	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-
น้ำ q.s. to 5 ml	1.58	31.50	1.58	31.50	1.58	31.50	1.64	32.80	1.63	32.60	1.62	32.40	1.14	22.80	0.64	12.80	1.64	32.80
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์ (Winner's), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 103 สูตรตำรับ KLO 6%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K6S10-K6S18)

ส่วนประกอบ	สูตร K6S10		สูตร K6S11		สูตร K6S12		สูตร K6S13		สูตร K6S14		สูตร K6S15		สูตร K6S16		สูตร K6S17		สูตร K6S18	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime oil (ml)	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00
PHC (ml)	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00
95% Ethanol (ml)	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00
Sucralose (g)	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.03	0.60	0.04	0.80	0.05	1.00
กลิ่นสับปะรด (ml)	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสละ (ml)	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นครีมโชดา(ml)	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นใบเตย (ml)	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นมะลิ (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นรัม (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสตอเบอรี่ (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00
น้ำ q.s. to 5 ml	1.64	32.80	1.64	32.80	1.64	32.80	1.64	32.80	1.64	32.80	1.64	32.80	1.67	33.30	16.7	33.30	16.7	33.30
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์ (Winner's), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 104 สูตรตำรับ KLO 6%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K6S19-K6S27)

ส่วนประกอบ	สูตร K6S19		สูตร K6S20		สูตร K6S21		สูตร K6S22		สูตร K6S23		สูตร K6S24		สูตร K6S25		สูตร K6S26		สูตร K6S27	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime oil (ml)	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00
PHC (ml)	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00
95% Ethanol (ml)	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00
Sucralose (g)	0.035	0.70	0.035	0.70	0.035	0.70	0.035	0.70	0.035	0.70	0.035	0.70	0.035	0.70	0.035	0.70	0.035	0.70
กลิ่นส้ม (ml)	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสตอเบอรี่ (ml)	1.0	20.00	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสับปะรด (ml)	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสละ (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นครีมชาดา(ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-
กลิ่นใบเตย (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-
กลิ่นมะลิ (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-
กลิ่นรัม (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00
Menthol (g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.005	-	-	-	-	-	-	-
น้ำ q.s. to 5 ml	1.67	33.33	1.67	33.33	1.67	33.33	1.67	33.30	1.67	33.30	1.67	33.30	1.67	33.30	1.67	33.30	1.67	33.30
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์ (Winner's), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 105 สูตรตำรับ KLO 6%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส และสารแต่งสี (สูตรตำรับ K6S28, K6AA1-K6AA3)

ส่วนประกอบ	สูตร K6S28		สูตร K6AA1		สูตร K6AA2		สูตร K6AA3	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime oil (ml)	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00	0.3	6.00
PHC (ml)	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00
95% Ethanol (ml)	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00	1.5	30.00
Sucralose (g)	0.035	0.70	-	-	-	-	-	-
Acesulfame-K (ml)	-	-	0.02	0.40	0.02	0.40	0.02	0.40
Aspartame (ml)	-	-	0.02	0.40	0.04	0.80	0.06	1.20
กลิ่นบลูเบอร์รี่ (ml)	2	40.00	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสตอเบอรี่ (ml)	-	-	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00
สีม่วง (ml)	0.03	0.60	-	-	-	-	-	-
น้ำ q.s. to 5 ml	0.635	12.70	1.66	33.20	1.64	32.80	1.62	32.40
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์และสารแต่งสี (Winner's),

PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 106 สูตรตำรับ KLO 10%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับเดิม และ สูตรตำรับ K10S1-K10S8)

ส่วนประกอบ	สูตร Original		สูตร K10S1		สูตร K10S2		สูตร K10S3		สูตร K10S4		สูตร K10S5		สูตร K10S6		สูตร K10S7		สูตร K10S8	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime oil (ml)	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00
PHC (ml)	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00
95% Ethanol (ml)	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00
Acesulfame-K (g)	0.075	1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucralose (g)	-	-	0.05	1.00	0.05	1.00	0.07	1.40	0.07	1.40	0.09	1.80	0.09	1.80	0.09	1.80	0.09	1.80
กลิ่นสตอเบอรี่ (ml)	-	-	-	-	-	-	0.83	16.60	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00
กลิ่นสับปะรด (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.83	16.60	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นส้ม (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-
Peppermint oil (ml)	-	-	0.1	2.00	0.03	0.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spearmint oil (ml)	-	-	0.1	2.00	0.16	3.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lemon oil (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	10.00	-	-	-	-	-	-
Orange oil (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	10.00	-	-	-	-
Menthol (g)	0.025	0.50	0.025	0.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
น้ำ q.s. to 5 ml	2.5	50.00	2.33	46.50	2.36	47.20	1.70	34.00	1.70	34.00	2.01	40.20	2.01	50.20	1.51	30.20	1.51	30.20
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์ (Winner's), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 107 สูตรตำรับ KLO 10%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K10S9-K10S17)

ส่วนประกอบ	สูตร K10S9		สูตร K10S10		สูตร K10S11		สูตร K10S12		สูตร K10S13		สูตร K10S14		สูตร K10S15		สูตร K10S16		สูตร K10S17	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime oil (ml)	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00
PHC (ml)	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00
95% Ethanol (ml)	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00
Sucralose (g)	0.09	1.80	0.07	1.40	0.06	1.20	0.05	1.00	0.04	0.80	0.035	0.70	0.04	0.80	0.04	0.80	0.04	0.80
กลิ่นสตอเบอรี่ (ml)	-	-	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	-	-	1.0	20.00
กลิ่นสับปะรด (ml)	1.0	20.00	-	-	-	-												
กลิ่นส้ม (ml)													-	-	1.0	20.00	-	-
น้ำ q.s. to 5 ml	1.51	30.2	1.53	30.60	1.54	30.80	1.55	31.00	1.56	31.20	1.51	30.20	1.56	31.20	1.56	31.20	1.56	31.20
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์ (Winner's), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 108 สูตรตำรับ KLO 10%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K10S18-K10S24, K10A1-K10A3)

ส่วนประกอบ	สูตร K10S18		สูตร K10S19		สูตร K10S20		สูตร K10S21		สูตร K10S22		สูตร K10S23		สูตร K10S24		สูตร K10A1		สูตร K10A2		สูตร K10A3	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime oil (ml)	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00	0.5	10.00
PHC (ml)	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00	0.65	13.00
95% Ethanol (ml)	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00	1.25	25.00
Acesulfame-K (g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.125	25.00	0.125	25.00	0.125	25.00
Sucralose (g)	0.04	0.80	0.04	0.80	0.04	0.80	0.04	0.80	0.04	0.80	0.05	0.80	0.04	0.80	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสับปะรด (ml)	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00
กลิ่นสละ (ml)	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นครีมโซดา (ml)	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นใบเตย (ml)	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นมะลิ (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นรัม (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นส้ม (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-
กลิ่นสตอเบอรี่ (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-
กลิ่นบลูเบอรี่ (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0	40.00	-	-	-	-	-	-
สีม่วง (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03	0.60	-	-	-	-	-	-
น้ำ q.s. to 5 ml	1.56	31.20	1.56	31.20	1.56	31.20	1.56	31.20	1.56	31.20	1.56	31.20	0.53	10.60	1.48	29.50	1.48	29.50	1.48	29.50
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์และสารแต่งสี (Winner's), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 109 สูตรตำรับ KLO 16%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับเดิม สูตรตำรับ K16A1, K16S1-K16S7)

ส่วนประกอบ	สูตร Original		สูตร K16A1		สูตร K16S1		สูตร K16S2		สูตร K16S3		สูตร K16S4		สูตร K16S5		สูตร K16S6		สูตร K16S7	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime oil (ml)	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.025	0.50	0.05	1.00	0.05	1.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00
PHC (ml)	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	2.15	43.00	2.10	42.00	2.15	43.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00
95% Ethanol (ml)	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	0.025	0.50	0.05	1.00	0.05	1.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00
Acesulfame-K (g)	0.075	1.50	0.1	2.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucralose (g)	-	-	-	-	0.05	1.00	0.05	1.00	0.05	1.00	0.05	1.00	0.09	1.80	0.07	1.40	0.05	1.00
กลิ่นส้ม (ml)	-	-	-	-	-	-	0.83	16.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสตอเบอรี่ (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.83	16.60	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสับปะรด (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.83	16.60	-	-	-	-	-	-
Peppermint oil (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16	3.20	0.33	6.60	-	-
Spearmint oil (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16	3.20	-	-	0.33	6.60
Menthol (g)	0.025	0.50	0.05	1.00	0.05	1.00	0.05	1.00	0.025	0.50	0.025	0.50	0.05	1.00	0.025	0.50	0.025	0.50
น้ำ q.s. to 5 ml	2.15	43.00	2.10	42.00	2.15	43.00	1.32	26.40	1.35	26.90	1.35	1.35	1.79	35.80	1.83	36.50	1.85	36.90
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์ (Winners), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 110 สูตรตำรับ KLO 16%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K16S8-K16S10, K16A2-K16A4, K16SA1-K16SA3)

ส่วนประกอบ	สูตร K16S8		สูตร K16S9		สูตร K16S10		สูตร K16A2		สูตร K16A3		สูตร K16A4		สูตร K16SA1		สูตร K16SA2		สูตร K16SA3	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime oil (ml)	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00
PHC (ml)	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00
95% Ethanol (ml)	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00
Acesulfame-K (g)	-	-	-	-	-	-	0.125	2.50	0.125	2.50	0.125	2.50	0.02	0.40	0.02	0.40	0.02	0.40
Sucralose (g)	0.09	1.80	0.09	1.80	0.09	1.80	-	-	-	-	-	-	0.02	0.40	0.04	0.80	0.06	1.20
กลิ่นส้ม (ml)	1.0	20.00	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-
กลิ่นสตอเบอรี่ (ml)	-	-	1.0	-	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-
กลิ่นสับปะรด (ml)	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	1.0	20.00
น้ำ q.s. to 5 ml	1.16	23.20	1.16	23.20	1.16	23.20	1.13	22.50	1.13	22.50	1.13	22.50	1.21	24.20	1.19	23.80	1.17	23.40
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์ (Winner's), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 111 สูตรตำรับ KLO 16%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ K16S11-K16S18)

ส่วนประกอบ	สูตร K16S11		สูตร K16S12		สูตร K16S13		สูตร K16S14		สูตร K16S15		สูตร K16S16		สูตร K16S17		สูตร K16S18	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime oil (ml)	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00	0.8	16.00
PHC (ml)	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00	0.95	19.00
95% Ethanol (ml)	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00
Sucralose (g)	0.06	1.20	0.07	1.40	0.08	1.60	0.05	1.00	0.04	0.80	0.03	0.60	0.06	1.20	0.04	0.80
กลิ่นสละ (ml)	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นครีมโชดา (ml)	-	-	1.0	20.00	-	-	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	-	-	2.0	40.00
กลิ่นใบเตย (ml)	-	-	-	-	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นบลูเบอร์รี่ (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0	40.00	-	-
Menthol (g)	-	-	-	-	-	-	0.005	0.10	0.005	0.10	0.005	0.10	0.005	0.10	0.005	0.10
สีม่วง (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0	40.00	-	-
น้ำ q.s. to 5 ml	1.19	23.80	1.18	23.60	1.17	23.40	1.19	23.90	1.21	24.20	1.22	24.30	2.0	40.00	-	-
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์และสารแต่งสี (Winner's), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ผลการวิจัย

จากการทดลอง พบว่าสูตรตำรับที่ใช้ Sucralose เป็นสารให้ความหวาน มีรสชาติที่ดีกว่าการใช้ Acesulfame-K และดีกว่า สูตรตำรับที่ใช้ Acesulfame-K ร่วมกับ Aspartame ด้วย ดังนั้นสำหรับสารให้ความหวาน จึงน่าที่จะเลือกใช้ Sucralose เนื่องจากไม่มีรสขมแฝงอยู่และให้รสหวานที่เป็นธรรมชาติใกล้เคียงรสของน้ำตาลซูโครสมากกว่า

สำหรับการทดลองแต่งกลิ่นรสของสูตรตำรับ KLO 6, 10, 16%v/v เมื่อทดสอบรสชาติเบื้องต้นพบว่าได้ผลดังในตารางที่ 112 - 114 สารแต่งกลิ่นที่เข้ากันได้กับสูตรตำรับ คือ ตัวอักษรสีเข้มในแต่ละตาราง

ตารางที่ 112 ผลการแต่งกลิ่นรสในสูตรตำรับ KLO 6%v/v

สารแต่งกลิ่น	คุณลักษณะ
ส้ม	กลิ่นส้มกลบกลิ่นมะกรูดไม่ติดนักและมีรสขาลิ้นมากขึ้น
สตอเบอรี่	กลิ่นสตอเบอรี่หอมหวานกลบกลิ่นมะกรูดได้ แต่รสของสูตรตำรับไม่เข้ากันกับกลิ่นเนื่องจากมีรสขามาก
สับปะรด	กลิ่นสับปะรดหอมหวานกลบกลิ่นมะกรูดได้
สละ	กลิ่นสละไม่เด่นชัด
ครีมโชดา	กลิ่นครีมโชดาหอมหวานกลบกลิ่นมะกรูดได้ และรสชาของสูตรตำรับเข้ากันได้ดีกับกลิ่นครีมโชดา
ใบเตย	กลิ่นใบเตยไม่เด่นชัด
มะลิ	กลิ่นมะลิไม่เด่นชัด
รัม	กลิ่นรัมไม่เข้ากับสูตรตำรับ
บลูเบอรี่	กลิ่นบลูเบอรี่หอมหวานกลบกลิ่นมะกรูดได้

ตารางที่ 113 ผลการแต่งกลิ่นรสในสูตรตำรับ KLO 10%v/v

สารแต่งกลิ่น	คุณลักษณะ
ส้ม	กลิ่นส้มกลบกลิ่นมะกรูดไม่ตื๊นๆและมีรสชาลิ้นมากขึ้น
สตอเบอรี่	กลิ่นสตอเบอรี่หอมหวานกลบกลิ่นมะกรูดได้ แต่รสของสูตรตำรับไม่เข้ากันกับกลิ่นเนื่องจากมีรสชา่มาก
สับปะรด	กลิ่นสับปะรดหอมหวานกลบกลิ่นมะกรูดได้
สละ	กลิ่นสละไม่เด่นชัด
ครีมโซดา	กลิ่นครีมโซดาหอมหวานกลบกลิ่นมะกรูดได้ และรสชาของสูตรตำรับเข้ากันได้กับกลิ่นครีมโซดา
ใบเตย	กลิ่นใบเตยไม่เด่นชัด
มะลิ	กลิ่นมะลิไม่เด่นชัด
รัม	กลิ่นรัมไม่เข้ากับตำรับ
บลูเบอรี่	กลิ่นบลูเบอรี่ไม่แรงพอที่จะกลบกลิ่นมะกรูด
Peppermint oil	ตำรับมีความชุ่ม
Spearmint oil	ตำรับมีความชุ่ม
Lemon oil	ตำรับมีความชุ่ม
Orange oil	ตำรับมีความชุ่ม

ตารางที่ 114 ผลการแต่งกลิ่นรสในสูตรตำรับ KLO 16%v/v

สารแต่งกลิ่น	คุณลักษณะ
ส้ม	กลิ่นส้มกลบกลิ่นมะกรูดไม่ตื๊นๆและมีรสชาลิ้นมากขึ้น
สตอเบอรี่	กลิ่นสตอเบอรี่หอมหวานกลบกลิ่นมะกรูดได้ แต่รสของสูตรตำรับไม่เข้ากันกับกลิ่นเนื่องจากมีรสชา่มาก
สับปะรด	กลิ่นสับปะรดหอมหวานกลบกลิ่นมะกรูดได้ แต่รสของสูตรตำรับไม่เข้ากันกับกลิ่นเนื่องจากมีรสชา่มาก
สละ	กลิ่นสละไม่เด่นชัด
ครีมโซดา	กลิ่นครีมโซดาหอมหวานกลบกลิ่นมะกรูดได้ และรสชาของสูตรตำรับเข้ากันได้กับกลิ่นครีมโซดา
ใบเตย	กลิ่นใบเตยไม่เด่นชัด
บลูเบอรี่	กลิ่นบลูเบอรี่ไม่แรงพอที่จะกลบกลิ่นมะกรูด
Peppermint oil	สูตรตำรับมีความชุ่ม
Spearmint oil	สูตรตำรับมีความชุ่ม

จากการทดสอบรสชาติและความเข้ากันได้ของสารแต่งกลิ่นรส จึงได้คัดเลือกสารแต่งกลิ่นรสของสูตรตำรับ KLO 6, 10, 16%v/v คือ สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์ กลิ่นบลูเบอร์รี่ กลิ่นสับปะรด และกลิ่นครีมโซดา ตามลำดับ

6.1.4 การทดลองเตรียมสูตรตำรับโดยใช้สารให้ความหวานและสารแต่งกลิ่นรสที่ได้คัดเลือกไว้

ทดลองเตรียมสูตรตำรับโดยใช้สารให้ความหวานและสารแต่งกลิ่นรสที่ได้คัดเลือกไว้และปรับความเข้มข้นในขั้นสุดท้ายเพื่อให้ได้รสชาติและกลิ่นที่เหมาะสม

ผลการวิจัย

ได้สูตรตำรับดังส่วนประกอบที่แสดงในตารางที่ 115

ตารางที่ 115 สูตรตำรับ KLO 6, 10, 16%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวานและสารแต่งกลิ่นรส

ปริมาณ ส่วนประกอบ	สูตร KLO 6%v/v		สูตร KLO 10%		สูตร KLO 16%v/v	
	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v
Kaffir lime oil	4.20 ml	6 %v/v	7.00 ml	10 %v/v	11.20 ml	16 %v/v
PHC	7.00 ml	10 %v/v	9.10 ml	13 %v/v	13.30 ml	19 %v/v
95% Ethanol	21.00 ml	30 %v/v	17.50 ml	25 %v/v	14.00 ml	20 %v/v
Sucralose	0.49 g	0.70 %w/v	0.56 g	0.80 %w/v	0.56 g	0.80 %w/v
กลิ่นบลูเบอร์รี่ (Winner's)	28.00 ml	40 %v/v	-	-	-	-
กลิ่นสับปะรด (Winner's)	-	-	14.00 ml	20 %v/v	-	-
กลิ่นครีมโซดา (Winner's)	-	-	-	-	28.00 ml	40 %v/v
Menthol	-	-	-	-	0.07 g	0.10 %w/v
สีม่วง (Winner's)	0.30 ml	0.42 %v/v	-	-	-	-
Water	9.00 ml	12.85 %v/v	21.84 ml	31.20 %v/v	2.87 ml	4.10 %v/v
Total	70.00 ml	100	70.00 ml	100	70.00 ml	100

PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

จากตารางที่ 115 ในสูตรตำรับ KLO 10, 16%v/v พบว่าสารแต่งกลิ่นสังเคราะห์มีสีอยู่ในตัวแล้ว ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารแต่งสีอีก ทั้งนี้โดย สารแต่งกลิ่นสับปะรดจะให้สีเหลือง และ สารแต่งกลิ่นครีมโซดาจะให้สีเขียวตามลำดับ สำหรับสูตรตำรับ KLO 6%v/v จำเป็นต้องมีการแต่งสีเพิ่มเติมโดยใช้สีสังเคราะห์สีม่วงเพื่อให้ได้สีที่สอดคล้องกับกลิ่นบลูเบอร์รี่ ลักษณะของผลิตภัณฑ์ดังแสดงในรูปที่ 36



รูปที่ 36 ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันมะกรูด 6, 10, 16%v/v ที่ได้คัดเลือกไว้

ภาคผนวก ก

รายละเอียดการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัยในข้อ 6.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูดเพื่อใช้ป้องกันโรคฟันผุและเพื่อใช้บรรเทาอาการเจ็บคอ/ไอ

จากสูตรตำรับผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด ในรายงานโครงการวิจัยเรื่อง “ผลิตภัณฑ์อาหารจากน้ำมันหอมระเหย และ/หรือ สารสกัดสมุนไพร ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus mutans*” (วิมล, 2549) ซึ่งประกอบด้วย KLLO 4, 12%v/v มีลักษณะสีประกอบด้วยส่วนประกอบหลักๆดังในตารางที่ 117 เพื่อใช้เป็นสูตรตำรับตั้งต้นในการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และ สารแต่งกลิ่นรสต่อไป

ตารางที่ 117 สูตรตำรับตั้งต้นของ KLLO 4, 12%v/v

ส่วนประกอบ	ปริมาณส่วนประกอบในสูตรตำรับ (%v/v)	
	สูตร KLLO 4%v/v	สูตร KLLO 12%v/v
Kaffir lime leaf oil	4	12
PHC	12	17
95% Ethanol	20	20

PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

เนื่องจากสูตรตำรับตั้งต้น 2 สูตรตำรับมีความเข้มข้นของ KLLO ห่างกันพอสมควร จึงได้กำหนดความเข้มข้นอีก 1 ระดับที่อยู่ระหว่างความเข้มข้นของสูตรตำรับตั้งต้น 2 ความเข้มข้น (4 และ 12%v/v) คือที่ 8%v/v ทดลองปรับสัดส่วนของ PHC, 95% ethanol เพื่อให้ได้สูตรตำรับที่ใส

ทดลองปรับเปลี่ยนสารให้ความหวานโดยใช้ Sucralose แทน Acesulfame-K ทดลองเติมสารแต่งกลิ่นต่างๆ สารแต่งรส และสารแต่งสี คัดเลือกสูตรตำรับที่ให้รสชาติเบื้องต้นที่ดี มีความเข้ากันได้ของสารแต่งกลิ่นรสกับ KLLO หรือสามารถกลบกลิ่นรสของ KLLO ได้ รายละเอียดส่วนประกอบต่างๆดังในตารางที่ 118- 122

ตารางที่ 118 สูตรตำรับ KLL0 4%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ KLL4S1-KLL4S9)

ส่วนประกอบ	สูตร KLL4S1		สูตร KLL4S2		สูตร KLL4S3		สูตร KLL4S4		สูตร KLL4S5		สูตร KLL4S6		สูตร KLL4S7		สูตร KLL4S8		สูตร KLL4S9	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime leaf oil (ml)	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00
PHC (ml)	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00
95% Ethanol (ml)	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1	20.00	1.0	20.00
Sucralose (g)	0.04	0.80	0.05	1.00	0.06	1.20	0.04	0.80	0.05	1.00	0.06	1.20	0.04	0.80	0.05	1.00	0.06	1.20
กลิ่นครีมโชดา (ml)	1.5	30.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นองุ่น (ml)	-	-	1.0	20.00	1.5	30.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นบลูเบอร์รี่ (ml)	-	-	-	-	-	-	1.0	40.00	1.5	30.00	2.0	40.00	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสับปะรด (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	1.5	30.00	2.0	40.00
Menthol (g)	0.005	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
สีม่วง (ml)	-	-	-	-	-	-	0.03	0.60	0.03	0.60	0.03	0.60	-	-	-	-	-	-
น้ำ q.s. to 5 ml	1.66	33.20	2.15	43.00	1.64	32.80	2.13	42.60	1.62	32.40	1.11	22.20	2.16	43.20	1.65	33.00	1.14	22.80
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์และสารแต่งสี (Winner's), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 119 สูตรตำรับ KLL0 4%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ KLL4S10-KLL4S16)

ส่วนประกอบ	สูตร KLL4S10		สูตร KLL4S11		สูตร KLL4S12		สูตร KLL4S13		สูตร KLL4S14		สูตร KLL4S15		สูตร KLL4S16	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime leaf oil (ml)	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00	0.2	4.00
PHC (ml)	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00
95% Ethanol (ml)	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00
Sucralose (g)	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20
กลิ่นอบเชย (ml)	0.5	10.00	1.0	20.00	1.0	20.00	-	-	-	-	-	-	2.0	40.00
กลิ่นสับปะรด (ml)	-	-	-	-	-	-	0.5	10.00	1.0	20.00	1.0	20.00	-	-
Menthol (g)	0.05	1.00	0.005	0.10	0.005	0.10	0.05	1.00	0.005	0.10	0.005	0.10	0.005	0.10
สีม่วง (ml)	0.03	0.60	0.03	0.60	0.03	0.60	-	-	-	-	-	-	0.03	0.60
น้ำ q.s. to 5 ml	2.56	51.20	2.11	42.10	2.11	42.10	2.59	51.80	2.14	42.70	2.14	42.70	1.105	22.10
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์และสารแต่งสี (Winner's), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 120 สูตรตำรับ KLL0 8%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ KLL8S1-KLL8S5)

ส่วนประกอบ	สูตร KLL8S1		สูตร KLL8S2		สูตร KLL8S3		สูตร KLL8S4		สูตร KLL8S5	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime leaf oil (ml)	0.4	8.00	0.4	8.00	0.4	8.00	0.4	8.00	0.4	8.00
PHC (ml)	0.6	12.00	0.7	14.00	0.8	16.00	0.65	13.00	0.75	15.00
95% Ethanol (ml)	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00
Sucralose (g)	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20
กลิ่นบลูเบอร์รี่ (ml)	2.0	40.00	2.0	40.00	2.0	40.00	2.0	40.00	2.0	40.00
สีม่วง (ml)	0.03	0.60	0.03	0.60	0.03	0.60	0.03	0.60	0.03	0.60
น้ำ q.s. to 5 ml	0.91	18.20	0.81	16.20	0.71	14.20	0.86	17.20	0.76	15.20
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์และสารแต่งสี (Winner's),

PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 121 สูตรตำรับ KLLO 8%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ KLL8S6-KLL8S11)

ส่วนประกอบ	สูตร KLL8S6		สูตร KLL8S7		สูตร KLL8S8		สูตร KLL8S9		สูตร KLL8S10		สูตร KLL8S11	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime leaf oil (ml)	0.4	8.00	0.4	8.00	0.4	8.00	0.4	8.00	0.4	8.00	0.4	8.00
PHC (ml)	0.75	15.00	0.75	15.00	0.75	15.00	0.75	15.00	0.75	15.00	0.75	15.00
95% Ethanol (ml)	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00
Sucralose (g)	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20	0.06	1.20
กลิ่นรสเบอร์รี่ (McCormick) (ml)	2.0	40.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสตอเบอร์รี่ (McCormick) (ml)	-	-	2.0	40.00	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นเชอร์รี่ (McCormick) (ml)	-	-	-	-	2.0	40.00	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสับปะรด (Best Odor) (ml)	-	-	-	-	-	-	2.0	40.00	2.0	40.00	-	-
กลิ่นบลูเบอร์รี่ (Winner's) (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00
กลิ่นสตอเบอร์รี่ (Winner's) (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00
Menthol (g)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.005	0.1	-	-
น้ำ q.s. to 5 ml	0.79	15.80	0.79	15.80	0.79	15.80	0.79	15.80	0.79	15.80	0.79	15.80
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ตารางที่ 122 สูตรตำรับ KLLO 12%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวาน และการเติมสารแต่งกลิ่นรส (สูตรตำรับ KLL12S1-KLL12S8)

ส่วนประกอบ	สูตร KL12S1		สูตร KL12S2		สูตร KL12S3		สูตร KL12S4		สูตร KL12S5		สูตร KL12S6		สูตร KL12S7		สูตร KL12S8	
	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%	AM	%
Kaffir lime leaf oil (ml)	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00	0.6	12.00
PHC (ml)	0.85	17.00	0.85	17.00	0.85	17.00	0.85	17.00	0.85	17.00	0.85	17.00	0.85	17.00	0.85	17.00
95% Ethanol (ml)	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00	1.0	20.00
Sucralose (g)	0.06	1.20	0.07	1.40	0.08	1.60	0.09	1.80	0.06	1.20	0.07	1.20	0.08	1.60	0.09	1.80
กลิ่นอบเชย (ml)	1.0	20.00	1.5	30.00	2.0	40.00	2.45	49.10	-	-	-	-	-	-	-	-
กลิ่นสับปะรด (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	20.00	1.5	30.00	2.0	40.00	2.45	49.10
Menthol (g)	0.005	0.10	0.005	0.10	0.005	0.10	0.005	0.10	0.005	0.10	0.005	0.10	0.005	0.10	0.005	0.10
สีม่วง (ml)	1.0	20.00	1.5	30.00	2.0	40.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
น้ำ q.s. to 5 ml	1.46	29.20	0.95	19.00	0.435	8.80	-	-	1.485	29.70	0.975	19.50	0.465	9.30	-	-
Total	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00	5.0	100.00

AM = ml หรือ g, % = %v/v หรือ %w/v, สารแต่งกลิ่นสังเคราะห์และสารแต่งสี (Winner's), PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil

ผลการวิจัย

พบว่าสำหรับสูตรตำรับ KLLO 8%v/v ส่วนประกอบหลักที่ให้ผลิตภัณฑ์ที่ใส คือสูตรตำรับที่ประกอบด้วย KLLO 8%v/v, PHC 15%v/v, 95% ethanol 20 %v/v เมื่อทำการทดสอบรสชาติเบื้องต้น พบว่า --สารแต่งกลิ่นที่เข้ากันได้กับสูตรตำรับ KLLO 4%v/v มีถึง 3 ชนิด คือ สารแต่งกลิ่นสับปะรด สารแต่งกลิ่นบลูเบอร์รี่ และสารแต่งกลิ่นครีมโซดา

--สารแต่งกลิ่นที่เข้ากันได้กับสูตรตำรับ KLLO 8%v/v มี 2 ชนิด คือ สารแต่งกลิ่นบลูเบอร์รี่ และ สารแต่งกลิ่นสับปะรด

--สารแต่งกลิ่นที่เข้ากันได้กับสูตรตำรับ KLLO 12%v/v มี 2 ชนิด คือ สารแต่งกลิ่นบลูเบอร์รี่ และ สารแต่งกลิ่นสับปะรด

ส่วนสารแต่งกลิ่นอื่น มีกลิ่นที่อ่อนเกินไป ไม่สามารถกลบกลิ่นเหม็นเขียวของใบมะกรูดได้ รายละเอียดการทดสอบกลิ่นดังในตารางที่ 123

ในการคัดเลือกสารแต่งกลิ่นสำหรับสูตรตำรับ KLLO 4, 8, 12 %v/v คือ สารแต่งกลิ่นบลูเบอร์รี่ สารแต่งกลิ่นสับปะรด และสารแต่งกลิ่นบลูเบอร์รี่ ตามลำดับ

ตารางที่ 123 ผลการแต่งกลิ่นรสในสูตรตำรับ KLLO 4, 8, 12%v/v

KLLO	สารแต่งกลิ่น	คุณลักษณะ
4%v/v	องุ่น (Winner's)	กลิ่นองุ่นไม่เด่นชัด
	สับปะรด (Winner's)	กลิ่นสับปะรดหอมหวานกลบกลิ่นใบมะกรูดได้
	บลูเบอร์รี่ (Winner's)	กลิ่นบลูเบอร์รี่หอมหวานกลบกลิ่นใบมะกรูดได้
	ครีมโซดา (Winner's)	กลิ่นครีมโซดาหอมหวานกลบกลิ่นใบมะกรูดได้
8%v/v	ราสเบอร์รี่ (McCormick)	กลิ่นราสเบอร์รี่ไม่เด่นชัด
	เชอร์รี่ (McCormick)	กลิ่นเชอร์รี่ไม่เด่นชัด
	สตอเบอร์รี่ (McCormick)	กลิ่นสตอเบอร์รี่ไม่เด่นชัด
	บลูเบอร์รี่ (Winner's)	กลิ่นบลูเบอร์รี่หอมหวานกลบกลิ่นใบมะกรูดได้
	สับปะรด (Best odor)	กลิ่นสับปะรดหอมหวานกลบกลิ่นใบมะกรูดได้
12%v/v	สับปะรด	กลิ่นสับปะรดหอมหวานกลบกลิ่นใบมะกรูดได้
	บลูเบอร์รี่	กลิ่นบลูเบอร์รี่หอมหวานกลบกลิ่นใบมะกรูดได้

เมื่อทดลองเตรียมสูตรตำรับโดยใช้สารให้ความหวานและสารแต่งกลิ่นรสที่ได้คัดเลือกไว้และปรับ

ความเข้มข้นในขั้นสุดท้ายเพื่อให้ได้รสชาติและกลิ่นที่เหมาะสม

ได้สูตรตำรับดังส่วนประกอบที่แสดงในตารางที่ 124 และลักษณะดังแสดงในรูปที่ 38

ตารางที่ 124 สูตรตำรับ KLLO 4, 8, 12%v/v ที่มีการปรับเปลี่ยนสารให้ความหวานและสารแต่งกลิ่นรส

ปริมาณ ส่วนประกอบ	สูตร KLLO 4%v/v		สูตร KLLO 8%		สูตร KLLO 12%v/v	
	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v	ml หรือ g	%v/v หรือ %w/v
Kaffir lime leaf oil	2.80	4	0.4	8	8.40	12
PHC	8.40	12	0.75	15	11.90	17
95% Ethanol	14.00	20	1.0	20	14.00	20
Sucralose	0.84	1.2	0.06	1.2	1.12	1.6
กลิ่นบลูเบอร์รี่ (Winner's)	28.00	40	-	-	28.00	40
กลิ่นสับปะรด (Best Odor)	-	-	2.0	40	-	-
Menthol	0.07	0.1	0.005	0.1	0.07	0.1
สีม่วง (Winner's)	0.30	0.42	-	-	0.30	0.42
Water	15.59	22.28	0.79	15.80	6.29	8.78
Total	70.00 ml	100	70.00 ml	100	70.00 ml	100

PHC = Polyoxyethylene 40 hydrogenated castor oil



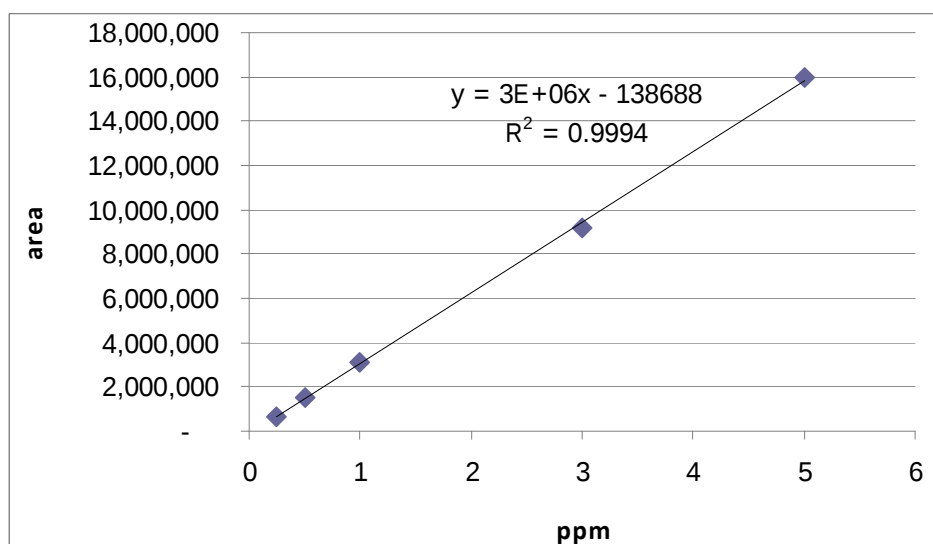
รูปที่ 38 ผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นในปากจากน้ำมันใบมะกรูด 4, 8, 12%v/v ที่ได้คัดเลือกไว้

ภาคผนวก จ

ผลการวิจัย

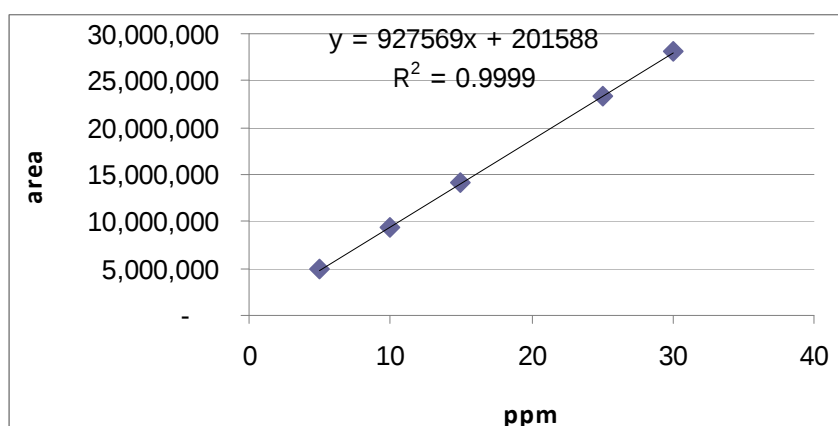
-Standard curve

standard curve ของ alpha-terpineol ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1, 3 และ 5 ppm ได้ผลดังรูปที่ 48 มีค่า r^2 เท่ากับ 0.994



รูปที่ 48 standard curve ของ alpha-terpineol

standard curve ของ citronellal ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 25 และ 30 ppm ได้ผลดังรูปที่ 49 มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9999



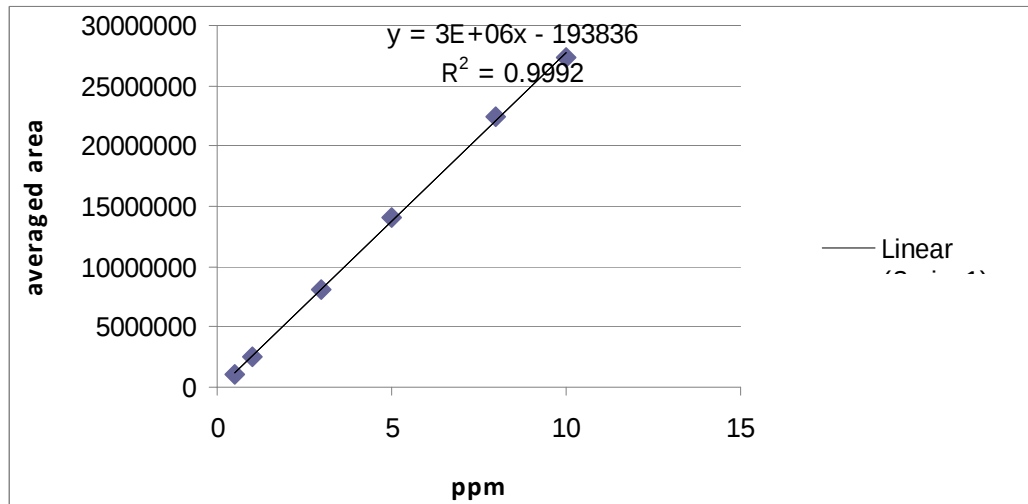
รูปที่ 49 standard curve ของ citronellal

ภาคผนวก ๓

ผลการวิจัย

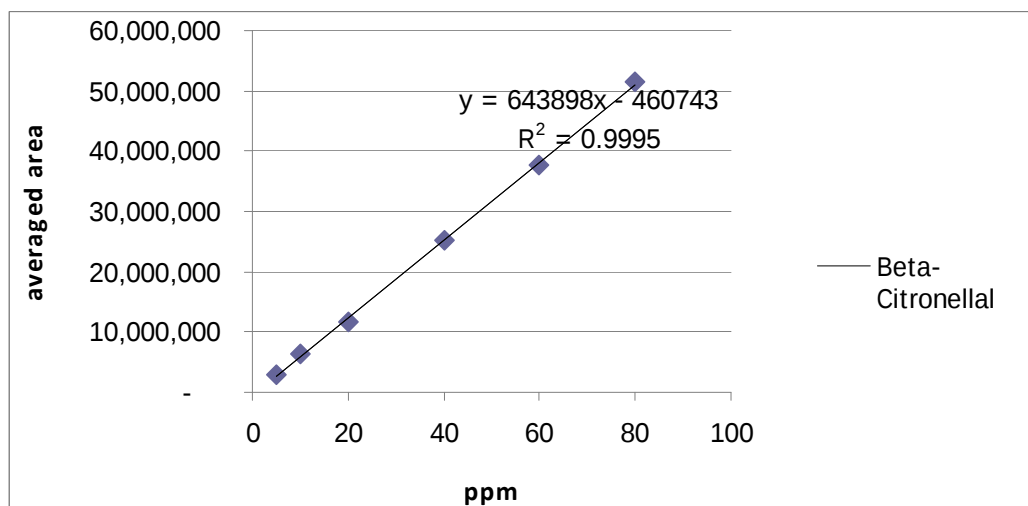
Standard curve ของสารสำคัญ

standard curve ของ α -terpineol ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 3, 5, 8 และ 10 ppm ได้ผลดังรูปที่ 50 มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9992



รูปที่ 50 standard curve ของ alpha-terpineol

standard curve ของ citronellal ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40, 60 และ 80 ppm ได้ผลดังรูปที่ 51 มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9995



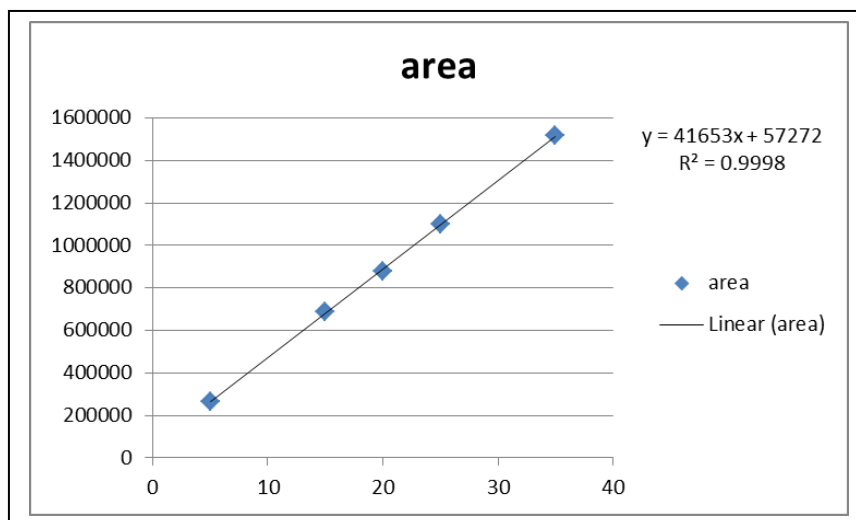
รูปที่ 51 standard curve ของ citronellal

ภาคผนวก ข

ผลการวิจัย

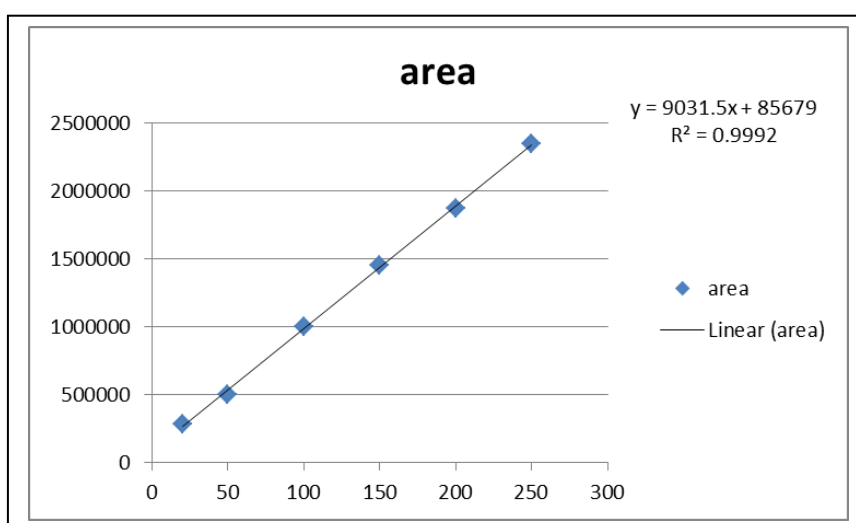
Standard curve ของสารสำคัญ

standard curve ของ α -terpineol ที่ความเข้มข้น 5, 15, 20, 25 และ 35 ppm ได้ผลดังรูป ที่ 59 โดยมีค่า r^2 เท่ากับ 0.9998



รูปที่ 59 standard curve ของ α -terpineol ที่ความเข้มข้น 5, 15, 20, 25 และ 35 ppm

standard curve ของ citronellal ที่ความเข้มข้น 20, 100, 150, 200 และ 250 ppm ได้ผลดังรูปที่ 60 มีค่า r^2 เท่ากับ 0.9992



รูปที่ 60 standard curve ของ citronellal ที่ความเข้มข้น 20, 100, 150, 200 และ 250 ppm

ภาคผนวก ฅ

บทคัดย่อผลงานทางวิชาการ

การประชุมวิชาการร่วมคณะแพทยศาสตร์ 3 สถาบัน

“ Joint Conference in Medical Sciences 2011 ” (JCMS 2011)

ระหว่าง วันที่ 15-18 มิถุนายน 2554 ณ อิมแพ็ค เมืองทองธานี จังหวัดนนทบุรี

Antibacterial effect of essential oils from Thai plants on respiratory tract pathogens

Somporn Srifuengfung¹, Vimol Srisukh², Nuntavan Bunyapraphatsara³, Chanwit Tribuddharat¹, Siwimol Phoomniyom¹, Sirirat Chuanphung¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital; ²Department of Food Chemistry, ³Department of Pharmacognosy; Faculty of Pharmacy; Mahidol University

Background Essential oils and their constituents from a wide variety of plants have potential in medicine. Many components in essential oils can kill bacteria e.g., thymol, citral. Our study will be of interest to medical personnels as well as those who are conscious of the benefit of health food and natural products.

Materials and Methods From January 2009 to April 2011, four types of essential oils (kaffir lime leaf, kaffir lime, lemongrass, and sweet basil oils) were studied as antibacterial agents by disk diffusion method. Minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal bactericidal concentrations were determined by standard microbroth dilution according to CLSI guideline. Reference control bacteria were *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Clinical isolates (359) from different patients with respiratory infection were group A, B, C, F, G streptococci, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Acinetobacter baumannii*, MRSA and MSSA.

Results Kaffir lime leaf and kaffir lime oils were the two most effective bactericidal agents. MIC ranged 0.006-6.8 and 0.006-1.74 µg/ml for kaffir lime leaf and kaffir lime oils, respectively. Citronellal, the major component in kaffir lime leaf oil (80.04%) was found to be an active agent. In contrast, kaffir lime oil consisted of many components (Limonene 40.65%, terpinene-4-ol 13.71%, alpha-terpineol 13.20%). Limonene was ineffective, whereas alpha-terpineol was an active agent.

Conclusion Antibacterial activity from oils of kaffir lime may lead to usage of Thai plants and product development for providing an alternative choice for treatment and control drug resistant bacteria.

ภาคผนวก ค

Antibacterial activity of essential oils from *Citrus hystrix* (makrut lime) against respiratory tract pathogens

Vimol Srisukh^a, Chanwit Tribuddharat^b, Veena Nukoolkarn^c, Nuntavan Bunyapraphatsara^c, Kulkanya Chokephaibulkit^d, Siwimol Phoomniyom^b, Sirirat Chuanphung^b, Somporn Srfuengfung^{b,*}

^a Department of Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Phayathai Road, Bangkok 10400 Thailand

^b Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Prannok Road, Bangkok 10700 Thailand

^c Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Phayathai Road, Bangkok 10400 Thailand

^d Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Prannok Road, Bangkok 10700 Thailand

*Corresponding author, e-mail: sissf@mahidol.ac.th

Received 24 Nov 2011

Accepted 27 Apr 2012

ABSTRACT: Many essential oils have antibacterial activity with a potential use in medicine. *Citrus hystrix* DC, or makrut lime, contains two essential oils, makrut leaf oil and makrut (fruit peel) oil, of which we determined the inhibitory effect against respiratory pathogens and evaluated their active components. Gas chromatography-mass spectrometry was used to analyse the chemical composition of the essential oils. The antibacterial activities were tested by disc-diffusion and broth microdilution methods against 411 isolates of groups A, B, C, F, G streptococci, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant and -sensitive *S. aureus*) and *Acinetobacter baumannii*, obtained from patients with respiratory tract infections. Makrut leaf oil and makrut oil were both effective against all the pathogens with minimal inhibitory concentration (MIC) ranges of 0.06–68 mg/ml and 0.03–17.40 mg/ml, respectively. Citronellal was found to be the major component (80.04%) in makrut leaf oil and had the lowest MIC. In contrast, makrut oil consisted of several components (limonene 40.65%, terpinene-4-ol 13.71%, α -terpineol 13.20%), and the most active component was α -terpineol, followed by terpinene-4-ol, and limonene. These results suggest that makrut leaf oil, makrut oil, and their components (citronellal, α -terpineol, terpinene-4-ol) may be alternative natural source medicine to prevent and treat many bacterial diseases.

KEYWORDS: kaffir lime, α -terpineol

INTRODUCTION

Respiratory tract infection is a public health concern in global scale. Controlling the number and growth of pathogens by effective natural products have been the prime targets of research. Essential oils and extracts from a wide variety of plants have long been used for medicinal purposes. They are potential sources of novel drugs especially against bacterial pathogens^{1–3}. *Citrus hystrix* DC, commonly known as makrut lime, is a common tropical herb in the family Rutaceae found everywhere in Southeast Asia⁴. Makrut lime is a thorny bush with aromatic leaves and dark green fruits with irregular bumpy surface (Fig. 1). The valued parts of makrut lime are the leaves and fruit peel. Makrut lime is a key ingredient in many Thai, Cambodian, Indonesian, Laotian, Malaysian,

and Philippine cuisines. There are two essential oils that can be extracted from makrut lime, the makrut lime leaf oil and makrut lime fruit peel oil (in short, makrut oil). The essential oils have been used as flavour and fragrance agents, as well as in perfumery and medicinal preparation⁴.

Essential oils extracted from plants may have antibacterial properties⁵ with synergistic interactions among them⁶. Essential oils usually consist of a large number of components and it is likely that their mode of action involves many targets in bacterial cells. A number of essential oil components have been identified as antibacterials such as carvacrol^{6–8}, citral⁷, eugenol^{6,7}, geraniol⁷, perillaldehyde^{6,7}, and thymol⁸. In addition, essential oils have antioxidant², repellent, insecticidal⁹, antifungal¹⁰, antiviral¹¹, and antiparasitic activities¹². Makrut lime oil was reported



Fig. 1 Fruits and leaves of makrut lime (*Citrus hystrix*).

to be effective against 20 serotypes of *Salmonella* and 5 species of other enterobacteria¹³. This study aimed to evaluate the inhibitory effect of makrut lime essential oils against bacterial respiratory pathogens and to determine the active components responsible for the inhibitory activity.

MATERIALS AND METHODS

The makrut leaf oil (batch no. 5209234-1/1009; density = 0.86 g/ml) and makrut oil (batch no. 5209234/1009; density = 0.87 g/ml), were obtained from Thai-China Flavours and Fragrances Co., Ltd. The products were prepared by steam distillation. The components of the essential oils were analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Samples of makrut leaf oil and makrut oil were diluted to 100 ppm prior to the analysis. The diluted oils were then analysed by GC-MS¹⁴, using a Hewlett-Packard HP 6890 Series GC System and Hewlett-Packard HP 5973 Mass selective detector. Samples were injected on a capillary column (HP-INNOWAX; 60 m × 0.25 mm × 0.25 µm) well coated with cross

linked PEG. The carrier gas was Helium (99.99%), at the flow rate of 0.80 ml/min. The inlet injection temperature was 200 °C with the inlet split ratio of 5:1. The GC oven temperature was kept at 70 °C for 2 min and programmed to 220 °C at a rate of 4 °C/min, held for 5 min and finally at 10 °C/min and programmed to 300 °C, held for 3 min. The GC/MS interface (Auxs) temperature was set at 250 °C. The Mass Spectrometer condition was as follows: EL Source temperature 250 °C, Emission 34.6, Ele energy 70 eV, Quadrole temperature 150 °C, Scan mode: 303450; EM Volt 1450. The MS library was Wiley 275/version 6.0, NBS 45 K. The pure compounds in analytical grade of citronellal (density = 0.86 g/ml), limonene (density = 0.84 g/ml), terpinene-4-ol (density = 0.93 g/ml), α-terpineol (density = 0.94 g/ml) used in the testings were purchased from Sigma Chemical Co., USA.

A total of 411 clinical isolates used in the inhibitory testing were *Acinetobacter baumannii* (50 isolates), Groups A (61 isolates), B (27 isolates), C (4 isolates), F (3 isolates), G streptococci (11 isolates), *Haemophilus influenzae* (52 isolates), *Moraxella catarrhalis* (52 isolates), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA; 50 isolates), methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA; 50 isolates) and *Streptococcus pneumoniae* (51 isolates). These isolates were from respiratory tract specimens (throat swab, pus in tonsils and adenoid tissues, sputum, bronchial wash, bronchoalveolar lavage) or blood collected from patients who had respiratory symptoms at Siriraj Hospital, a tertiary care centre in Bangkok, during January 2008–December 2010. Sputum was considered acceptable for culture if it contained more than 25 polymorphonuclear cells and less than 25 epithelial cells per low-powered field. Bacterial identification, disc-diffusion, and broth microdilution methods were performed by standard microbiological techniques^{15,16}. Identification of the Lancefield groups of β-haemolytic streptococci was done by using a rapid latex agglutination test kit, Remel streptex (Remel Co., USA) according to the manufacturer's guideline.

The antibacterial activity of the essential oils was tested by disc-diffusion and broth microdilution methods. In the disc-diffusion method, a sterile Whatman disc (6 mm) saturated with 10 µl of essential oil¹⁷ was put on a lawn of a bacterial inoculum which has a turbidity in 1% (w/v) tryptone water equated to a McFarland No 0.5 standard (approximately 10⁸ CFU/ml). All values of inhibition zones were expressed as mean ± standard deviation. *S. pneumoniae* ATCC 49619, *H. influenzae* ATCC 49247, and *S. aureus* ATCC 25923 were used as quality controls. For broth

Table 1 Minimal inhibitory concentrations (MIC) and Minimal bactericidal concentrations (MBC).

Pathogens	Makrut lime leaf oil (mg/ml)				Makrut lime oil (mg/ml)			
	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MBC range	MIC range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MBC range
<i>A. baumannii</i>	2.10–17	4.30	8.50	4.30–68	1.10–4.40	1.10	4.40	1.10–8.70
Group A strep	0.30–8.50	1.10	4.30	0.30–8.50	0.30–4.40	2.20	2.20	0.30–4.40
Group B strep	0.30–8.50	0.50	1.10	0.30–8.50	0.30–8.70	1.10	2.20	0.30–17.40
Group C strep	0.30–4.30	0.50	4.30	0.30–4.30	0.30–4.40	0.50	4.40	0.30–4.40
Group F strep	0.30–4.30	2.10	4.30	0.30–4.30	0.50–4.40	1.10	4.40	0.50–4.40
Group G strep	0.30–4.30	0.30	2.10	0.30–4.30	0.30–4.40	1.10	4.40	0.50–4.40
<i>H. influenzae</i>	0.06–0.50	0.30	0.30	0.06–1.10	0.06–0.50	0.10	0.30	0.06–1.10
<i>M. catarrhalis</i>	0.03–0.25	0.03	0.03	0.03–0.50	0.03–0.25	0.03	0.03	0.03–0.50
MSSA	1.10–34	8.50	17	8.50–68	1.10–8.70	2.20	4.40	1.10–8.70
MRSA	2.10–68	8.50	34	8.50–68	1.1–17.40	2.20	4.40	2.20–17.40
<i>S. pneumoniae</i>	0.30–4.30	0.50	2.10	0.30–8.50	0.30–4.40	0.50	1.10	0.30–4.40

MIC₅₀ and MIC₉₀ are the minimal inhibitory concentrations required to inhibit the growth of 50% and 90% of bacteria, respectively.

microdilution method, the broth was supplemented with 0.25% (v/v) tween-20 (Sigma Chemical Co., USA). Two-fold serial dilutions of essential oils were prepared in a microtitre plate. The minimal inhibitory concentration (MIC) was lowest concentration of essential oil inhibiting visible bacterial growth after incubation for 20–24 h at 35 °C. Cell suspensions (1 loop) from the wells showing no growth were subcultured on sheep blood agar (or chocolate agar in case of *H. influenzae*) to determine if the inhibition was reversible or permanent. Minimal bactericidal concentration (MBC) was determined as the highest dilution (i.e., lowest concentration) at which no growth occurred on the agar plates.

RESULTS

The results of gas chromatography analysis found that the most predominate component in makrut leaf oil was citronellal (80.04%) whereas in makrut oil were limonene (40.65%), terpinene-4-ol (13.71%) and α -terpineol (13.20%). Other components were presence in trace.

Both makrut leaf oil and makrut oil exhibited antibacterial properties for all bacteria tested by the disc-diffusion method, especially against *M. catarrhalis* (Fig. 2). The MIC and MBC of makrut leaf oil and makrut oil were lowest against *M. catarrhalis* and *H. influenzae* (indicating best activity), followed by *S. pneumoniae*, *Streptococcus* spp., *A. baumannii*, MSSA, and MRSA, respectively (Table 1). Taken together, the MIC of makrut leaf oil was in the range of 0.06–68 mg/ml and that for makrut oil was 0.03–17.40 mg/ml. Although the MIC and MBC varied among tested bacteria, the MIC in most cases was

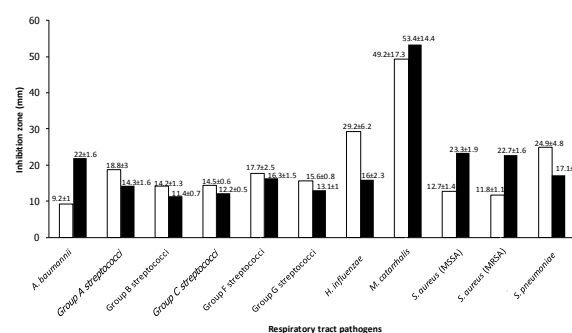


Fig. 2 Inhibition zones of makrut lime leaf oil (□) and makrut lime oil (■) by disc-diffusion method. Values were means ± standard deviation.

equivalent to MBC indicating a bactericidal action of oil.

In the active component testing citronellal, the major component in makrut leaf oil, was found to be more active than the whole makrut leaf oil against *A. baumannii*, *Streptococcus* spp., MSSA, and MRSA (Table 2). Likewise, α -terpineol, followed by terpinene-4-ol, were more active against *A. baumannii*, *Streptococcus* spp., and *H. influenzae* ATCC 49766 than makrut lime oil (Table 3). However, limonene, the most predominate component of makrut oil, had a much less antibacterial activity.

The antibacterial activity of makrut leaf oil and makrut lime oil was found to be stable upon storage at room temperature up to 4 months. The MIC and MBC values at 4 months were not different from those at 1, 2, and 3 months of storage.

Table 2 Effect of citronellal in makrut lime leaf oil on pathogens.

Pathogens	Makrut lime leaf oil			Major component Citronellal		
	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	Inhibition zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>A. baumannii</i>	10	8.5	8.5	13	1.1	4.3
Group A streptococci	16	4.3	4.3	15	0.5	1.1
Group B streptococci	11	4.3	4.3	10	1.1	1.1
Group C streptococci	15	4.3	4.3	15	0.3	0.3
Group F streptococci	17	2.1	8.5	17	1.1	1.1
Group G streptococci	16	4.3	4.3	15	1.1	1.1
<i>H. influenzae</i>	21	0.3	0.3	20	0.5	0.5
<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	22	0.5	0.5	20	0.3	0.5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	19	1.1	1.1	22	1.1	1.1
<i>S. aureus</i> (MSSA)	14	4.3	34	14	1.1	8.6
<i>S. aureus</i> (MRSA)	15	8.5	34	15	1.1	8.6
<i>S. pneumoniae</i>	24	0.3	0.3	24	0.5	0.5
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	23	0.5	0.5	23	0.5	0.5

MIC = Minimal inhibitory concentration; MBC = Minimal bactericidal concentration.

Table 3 Effect of limonene, terpinen-4-ol, and α -terpineol in makrut lime oil on pathogens.

Pathogens	Makrut lime oil			Various components						
				Limonene			Terpinene-4-ol		α-terpineol	
	Inh. zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	Inh. zone (mm)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>A. baumannii</i>	22	1.10	1.10	6	> 134	> 134	5	5	0.07	0.10
Group A streptococci	14	2.20	2.20	6	> 134	> 134	1.25	2.50	0.60	0.60
Group B streptococci	11	4.40	4.40	7	> 134	> 134	0.30	0.60	0.60	0.60
Group C streptococci	12	4.40	4.40	6	> 134	> 134	0.15	0.15	0.60	0.60
Group F streptococci	15	1.10	1.10	6	> 134	> 134	1.25	2.50	1.20	1.20
Group G streptococci	13	4.40	4.40	6	> 134	> 134	0.15	0.30	1.20	1.20
<i>H. influenzae</i>	17	0.30	0.30	12	67	67	0.15	0.30	0.70	0.70
<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	17	0.10	0.10	12	67	67	5	5	0.07	0.07
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	26	1.10	1.10	11	> 134	> 134	10	20	0.30	1.20
<i>S. aureus</i> (MRSA)	20	2.20	2.20	6	> 134	> 134	2.50	5	2.40	2.40
<i>S. aureus</i> (MSSA)	21	4.40	4.40	6	> 134	> 134	10	20	2.40	2.40
<i>S. pneumoniae</i>	20	0.30	0.30	11	33	67	0.15	0.15	0.30	0.30
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	16	0.50	0.50	8	67	> 134	2.50	2.50	0.60	0.60

MIC = Minimal inhibitory concentration; MBC = Minimal bactericidal concentration.

DISCUSSION

Our study revealed the antibacterial effect of makrut leaf oil and makrut oil against respiratory bacterial pathogens. A preliminary study of antibacterial activities on medicinal herbs of Thai food ingredients against food-borne pathogens such as *Bacillus cereus*, *S. aureus*, and *Salmonella* Typhi was reported¹⁸. Our results are in agreement with a previous study that found makrut oil and ethanol extract of makrut fruit peels had a greater antibacterial effect than the extracts

of makrut leaves¹³. The hydrophobicity of essential oils might enable them to partition in the lipid component of bacterial cell membrane, rendering them permeable and leading to leakage of bacterial cell contents⁶.

This study showed excellent activity of makrut leaf oil and makrut oil against many respiratory bacteria at the various activity levels. The results of disc diffusion were not highly correlated with MIC and MBC. Disc diffusion is a screening method usually used as a preliminary check for antibacterial

activity prior to the more detailed study in liquid medium to determine MIC and MBC. There are many factors that may affect the results of disc-diffusion test, e.g., volume of essential oil placed on paper discs, thickness of agar, diffusion ability of oil in agar, and variation of essential oil concentration. Therefore, disc-diffusion method is not suitable for comparison the efficacy of essential oil. The broth microdilution method measures the strength of antibacterial activity and better be used for comparison.

The increasing incidence of multi-drug resistant *A. baumannii* and MRSA underscored the urgent need for effective alternative drug. The extraction of essential oil from plant is a crucial step for biosynthesis and may lead to the discovery of new drug for infectious diseases. This study revealed that all the multi-drug resistant bacteria were highly sensitive to makrut oil and makrut leaf oil. More than 80% of *A. baumannii* used in our study were resistant to all drugs tested in our routine clinical laboratory such as aminoglycosides, ampicillin, cephalosporins, carbapenem, fluoroquinolones; and only sensitive to colistin which is a drug with high nephro- and neurotoxic potential. All MRSA in our study were hospital-acquired and resistant to most drugs available.

The pure major lipid components of the essential oils, citronellal, α -terpineol, terpinene-4-ol, and limonene, were chosen to test for the active components responsible for the antibacterial effect. In a previous study the pure lipid compounds in essential oils of *Cinnamosma fragrans*, linalool and 1,8-cineole, were reported to be the active antimicrobial components¹⁹. To our knowledge, this is the first report of activity of the active components of makrut essential oils. The most interesting result was that α -terpineol was the most active component. Although this component is present only 13.20% in makrut oil, bioengineering of its synthesis in plant would be possible to provide greater yield. Our results were in agreement with previous studies that α -terpineol^{6,20} and terpinene-4-ol²⁰ had antibacterial properties against foodborne pathogens, but limonene was not⁷.

The results from this study could be applied to clinical use. For example, we found group A streptococci, the most common pathogenic bacteria causing sore throat in human, was very sensitive to makrut lime essential oils. Development of these essential oils throat spray may lead to the prevention or treatment of streptococcal pharyngotonsillitis. Likewise, an essential oil throat spray may be able to prevent nosocomial acquired pneumonia from resistant bacteria in hospitalized patients with respiratory conditions.

Further studies are needed and may lead to clinical use of alternative medicine from natural sources.

In conclusion, makrut lime leaf oil and makrut lime oil had excellent antibacterial activities against various respiratory pathogens including the multi-resistant bacteria. These essential oils may be important for drug development for prevention and treatment of many bacterial diseases.

Acknowledgements: This work was supported by the Co-ordinating Centre for Research and Development to Increase the Value of the Plants Indigenous to Thailand, Mahidol University and The Thailand Research Fund, the Vejdusit Foundation, and by Faculty of Medicine Siriraj Hospital (Graduate research fund).

REFERENCES

1. Khan AV, Ahmed QU, Shukla I, Khan AA (2010) Antibacterial efficacy of *Bacopa monnieri* leaf extracts against pathogenic bacteria. *Asian Biomed* **4**, 651–5.
2. Imelouane B, Tahri M, Ankit M, Khidid K, Amhamdi H, Dubois J, ElBachiri A (2010) The essential oil of Eastern Moroccan *Rosmarinus officinalis*: chemical composition, in vitro antimicrobial and antioxidant activities. *Rev Microbiol Ind San et Environ* **4**, 120–41.
3. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P (2008) The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int J Food Microbiol* **124**, 91–7.
4. Doreen SH, Rose LC, Suhaimi H, Mohamad H, Rozaini MZH, Tai M (2011) Preliminary evaluation on the antibacterial activities of *Citrus hystrix* oil emulsions stabilized by tween 80 and span 80. *Int J Pharm Pharm Sci* **3** (Suppl 2), 209–11.
5. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S (2006) In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Compl Alternative Med* **6**, 39–47.
6. Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food—a review. *Int J Food Microbiol* **94**, 223–53.
7. Kim J, Marshall MR, Wei CI (1995) Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J Agr Food Chem* **43**, 2839–45.
8. Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* **91**, 453–62.
9. Karpouhtsis I, Pardali E, Feggou E, Kokkini S, Scouras ZG, Mavragani-Tsipidou P (1998) Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J Agr Food Chem* **46**, 1111–5.
10. Fontenelle RO, Morais SM, Brito EH, Brilhante RS, Cordeiro RA, Nascimento NR, Kerntopf MR, Sidrim JJ, et al (2008) Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian *Caatinga* biome. *J Appl Microbiol* **104**, 1383–90.

11. Khan MT, Ather A, Thompson KD, Gambari R (2005) Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antivir Res* **67**, 107–19.
12. Pessoa LM, Morais SM, Bevilaqua CML, Luciano JHS (2002) Antihelminthic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* **109**, 59–63.
13. Nanasombat S, Lohasupthawee P (2005) Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonellae and other enterobacteria. *KMITL Sci Tech J* **5**, 527–38.
14. Chanthaphon S, Chanthachum S, Hongpattarakere T (2008) Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against food-related microorganisms. *Songklanakarin J Sci Tech* **30** (Suppl 1), 125–31.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (2010) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement*. CLSI document M100-S20. CLSI, Wayne, PA.
16. Jorgensen JH, Turnidge JD (2007) Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 9th edn, ASM Press, Washington DC, pp 1152–72.
17. Sabulal B, Dan M, Pradeep NS, Valsamma RK, George V (2006) Composition and antimicrobial activity of essential oil from *Amomum cannicarpum*. *Acta Pharm* **56**, 473–80.
18. Chaisawadi S, Thongbute D, Methawiriyaslip W, Pitakworarat N, Chaisawadi A, Jaturonrasamee K, Khemkhaw J, Tanuthumchareon W (2005) Preliminary study of antimicrobial activities on medicinal herbs of Thai food ingredients. *Acta Hort* **675**, 111–4.
19. Randrianarivelo R, Sarter S, Odoux E, Brat P, Lebrun M, Romestand B, Menut C, Andrianoelisoa HS, et al (2009) Composition and antibacterial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chem* **114**, 680–4.
20. Carson CF, Riley TV (1995) Antibacterial activity of the major components of the essential oils of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Bacteriol* **78**, 264–9.