

การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการละลายไทมอลเพื่อใช้ในทางทันตกรรม A study of suitable solvents for thymol for dental usages

ศรุต ไทรรัตน์², ธนัทธ วุฒติหสา^{1*}, พีรพงษ์ ต้วงาม¹ และ สุภาวิดา ขุนลึก¹
Sarut Thairat², Thanattha Wuttihasa^{1*}, Peerapong Tua-Ngam¹ and Supawida Kunlug¹

บทคัดย่อ

ไทมอลมีฤทธิ์ต้านจุลชีพอย่างกว้างขวาง จากคุณสมบัติทางชีวภาพดังกล่าว คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จึงนำมาเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ไทมอลความเข้มข้น 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างฟันสำหรับงานวิจัย เนื่องจากไทมอลละลายน้ำได้ค่อนข้างน้อย การเตรียมผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจึงใช้เวลานาน ทำให้เกิดความขาดแคลนผลิตภัณฑ์ในบางช่วงเวลา งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะลดระยะเวลาสำหรับการเตรียมผลิตภัณฑ์ โดยยังคงคุณสมบัติและตัวยาสำคัญ รวมถึงค้นหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวทำละลายสำหรับไทมอล และความเข้มข้นของไทมอลภายหลังการละลาย

การศึกษานี้วิเคราะห์ระยะเวลาสำหรับเตรียมสารละลาย 0.1% ไทมอล และปริมาณที่น้อยที่สุดของ EtOH (55%, 75%, 95% และ absolute) ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับไทมอล และใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อหาปริมาณของสารประกอบสำคัญของสารละลายไทมอลปริมาณน้อยที่สุดสำหรับ EtOH ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ละลายไทมอลได้อย่างสมบูรณ์ คือ 3 มล. (ต่อปริมาตรรวม 100 มล.) นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วย HPLC แสดงให้เห็นว่า ปริมาณไทมอลในสารละลายที่เตรียมไว้ คือ 0.079%, 0.089%, 0.087%, 0.087% และ 0.086% ของ DIW, 55%, 75%, 95% และ Absolute alcohol ตามลำดับ

สรุปผลงานวิจัย คือ สารละลาย 0.1% ไทมอลที่เตรียมจาก EtOH ความเข้มข้นต่าง ๆ มีปริมาณของไทมอลสูงกว่าแบบที่เตรียมจาก DIW สูตรเตรียมสารละลายไทมอลนี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอด เพื่อนำไปใช้ในอนาคตได้

คำสำคัญ : ไทมอล; การละลาย; การใช้ในทางทันตกรรม

^{1*} งานประยุกต์ผลงานวิจัย สำนักการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

² งานบริการเพื่อการวิจัย สำนักการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

^{1*} Research Applied Section, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Thailand

² Research Service Section, Faculty of Dentistry, Mahidol University, Thailand

* Corresponding author: Thanattha.wut@mahidol.ac.th

Abstract

Thymol possesses a broad spectrum antimicrobial effect. According to its biological properties, Mahidol University Faculty of Dentistry has prepared a 0.1 % (weight/volume) thymol product for preserving the tooth specimens for dental research. Since thymol is slightly dissolved in water, its time-consuming preparations result in an occasional shortage of the product. By using the ethanol (EtOH), this research then aimed to reduce the product's preparation time, the properties and the active ingredients of which are still retained. In addition, the thymol solvent's appropriate concentration and the post-dissolved thymol's amount were investigated.

The preparation time for 0.1% w/v thymol solution and the minimum volumes of EtOH (55%, 75%, 95%, and absolute) used as the thymol solvents were analyzed. Active compounds of the thymol solution were determined by using a high-performance liquid chromatography (HPLC). The minimum volume of all EtOH to completely dissolve the thymol in this study was 3 mL (per 100 mL of the total volume). Furthermore, the HPLC analyses have shown 0.079%, 0.089%, 0.087%, 0.087%, and 0.086% (w/v) thymol in the prepared solutions of DIW, 55% EtOH, 75% EtOH, 95% EtOH, and absolute alcohol, respectively.

In conclusion, the 0.1% thymol solutions prepared by EtOH with various concentrations provided a higher amount of thymol than that prepared by DIW. This formula could be further improved for future usages.

Keywords : Thymol; dissolution; dental usages

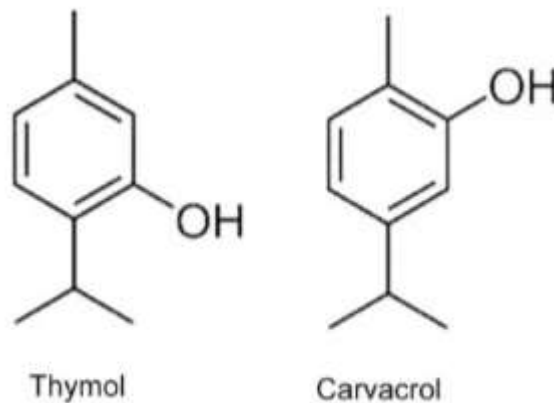
หลักการและเหตุผล

ไทมอล (Thymol) มีชื่อตาม IUPAC คือ 5-Methyl-2-(propan-2-yl)phenol เป็นสารอนุพันธ์ในกลุ่ม monoterpene phenol และเป็นไอโซเมอร์กับ Carvacrol สามารถสกัดได้จากต้นไทม์ (*Thymus vulgaris*) ซึ่งเป็นพืชกลุ่มไม้พุ่มขนาดเล็กในวงศ์ *Lamiaceae* มีลักษณะลำต้นเตี้ย แตกกิ่งก้านมาก ทอดเลื้อยตามผิวดินได้ และมีอายุหลายปี ซึ่งไทมอลที่สกัดได้จะมีลักษณะเป็นผลึกสีขาวและมีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว Hajimehdipoor et al. (2010) ได้รายงานเกี่ยวกับไทมอลว่า มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{10}H_{14}O$ และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1 (ซ้าย) และคุณสมบัติทางเคมีของไทมอล คือ ละลายต่ำในน้ำที่ pH ที่เป็นกลาง แต่

ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์ สารละลายอัลคาไลน์ และตัวทำละลายอื่น ๆ ที่เป็นสารอินทรีย์ Escobar et al. (2020) พบว่าไทมอลมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (anti-microbial) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) ต้านเชื้อรา (antifungal) ต้านปรสิต (antiparasitic) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ระวังอาการปวด (analgesic) และใช้เป็นสารกันบูดตามธรรมชาติเพื่อปกป้องอาหารจากจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cosentino et al. (1999) และ Lambert et al. (2001) ที่พบว่าไทมอลสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*,

Staphylococcus aureus, *Salmonella enterica* และ *Shigella sonnei* รวมทั้งยังสอดคล้องกับการศึกษาของ วิพรพรรณ ศรีสุธรรม และคณะ (2561) ที่พบว่าความสามารถของไทมอลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ

Escherichia coli O157:H7 ที่ 37°C จะสูงกว่าที่อุณหภูมิ 20°C และความเข้มข้นต่ำสุดของไทมอลที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว คือ 1.25 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 1 : โครงสร้างของ Thymol และ Carvacrol

ด้วยเหตุที่ผิวฟันและผิวของรากเทียม (implants) เป็นแหล่งที่ *S. aureus* สามารถไปยึดเกาะได้ดี ดังปรากฏในผลการศึกษาของ Merghni et al. (2016) ไทมอลจึงถูกนำมาใช้งานในทางทันตกรรม โดยมุ่งเน้นฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสาเหตุของฟันผุและโรคเหงือกอักเสบ โดย Miladi et al. (2017) ได้รายงานว่ไทมอลสามารถยับยั้งการก่อตัวเป็นชั้นไบโอฟิล์ม (Biofilm) ของแบคทีเรียผิวของฟันและรากเทียม นอกจากนี้ น้ำยาบ้วนปากบางยี่ห้อได้ใส่น้ำมันหอมระเหยของ *Eucalyptus spp* (ความเข้มข้น 0.0092%), *Gaultheria spp.*, *Mentha piperita* และ *Thymus vulgaris* (ความเข้มข้น 0.064%) เพื่อป้องกันและยับยั้งการก่อตัวของคราบจุลินทรีย์ (bacterial plaque) และผลิตภัณฑ์บางยี่ห้อสำหรับการทำความสะอาดช่องปาก ตามรายงานของ Kokoska et al. (2019) ที่ได้ระบุว่า มีส่วนผสมของ ethanol (ความเข้มข้น 90%), vinylacetate copolymer, acrylate copolymer (ความเข้มข้น 8%), chlorhexidine

(ความเข้มข้น 1%) และ thymol (ความเข้มข้น 1%) เพื่อป้องกันและยับยั้งการเกิดเชื้อโรคภายในช่องปาก

ผลิตภัณฑ์สารละลายไทมอลสำหรับแช่ตัวอย่างฟันเพื่อใช้ในการทดสอบและงานวิจัย ซึ่งผลิตและพัฒนาโดยคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นั้น ได้ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีราคาไม่สูง มีประสิทธิภาพในป้องกันการเกิดเชื้อราและการเน่าเสียที่เกิดจากแบคทีเรียในช่องปาก จากฟัน และจากสภาพแวดล้อม (หลังการถอนฟันจากช่องปากของผู้ป่วย) รวมทั้งสามารถคงสภาพความสมบูรณ์ของฟันและผิวฟันก่อนนำไปใช้ ซึ่งความเข้มข้น (น้ำหนักต่อปริมาตร; w/v) ของสารละลายไทมอลนี้ นิยมใช้ในช่วงความเข้มข้น 0.01 – 1% ตามรายงานของ Boutsoukis et al. (2014); Ferrer-Luque et al. (2014); Peters et al. (2014) ทั้งนี้ สารละลายไทมอลซึ่งพัฒนาโดยคณะ ฯ มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1% w/v

ความต้องการสารละลาย 0.1% ไทมอล ในกลุ่มบุคลากรและนักศึกษาของคณะ ฯ ณ ร้าน M-Dent ซึ่งสำรวจโดยงานประยุกต์ผลงานวิจัย พบว่า มีแนวโน้ม

เพิ่มขึ้นทุกปี โดยปีงบประมาณ 2563, 2564 และ 2565 มียอดจำหน่าย 491, 717 และ 1,184 ขวดตามลำดับ แต่เนื่องจากความสามารถที่ต่ำของไทมอลในการละลายน้ำ การเตรียมสารละลาย 0.1% ไทมอล ซึ่งการละลายไทมอลอย่างสมบูรณ์ในแต่ละครั้ง จึงใช้เวลานานถึง 3 วัน อาจไม่เพียงพอต่อความต้องการของกลุ่มลูกค้า และยังถือว่าการสิ้นเปลืองเวลา พื้นที่การทำงานสำหรับกระบวนการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ และแรงงานบุคลากรโดยไม่ก่อให้เกิดมูลค่าเพิ่มแก่ผลิตภัณฑ์ รวมถึงสร้างความไม่ปลอดภัยจากการเปิดอุปกรณ์ไฟฟ้าข้ามคืนโดยปราศจากผู้ดูแล

จากปัญหาในกระบวนการผลิตดังกล่าวนี้ จึงเป็นที่มาของการศึกษาหาแนวทางที่รวดเร็วและลดระยะเวลาสำหรับการผลิตสารละลาย 0.1% ไทมอล แต่ยังคงไว้ซึ่งประสิทธิภาพและสารออกฤทธิ์ที่ต้องการ โดยใช้ EtOH ซึ่งหาได้ง่ายและมีความปลอดภัย เป็นตัวทำละลาย

วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ EtOH ในการใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับไทมอล
2. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของไทมอลภายหลังการละลายด้วย EtOH ที่มีความเข้มข้นต่างกัน

วิธีการศึกษา

สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- 1) 99% Thymol crystals (Chem-Supply, Port Adelaide, SA, Australia)
- 2) 95% Ethyl alcohol (EtOH; องค์การสุรา กรมสรรพสามิต)
- 3) Absolute alcohol (Carlo erba reagents, Germany)
- 4) Acetonitrile (Macron Fine Chemicals™, USA)
- 5) น้ำปราศจากไอออน (Deionized water, DIW; คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล)

6) เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

7) คอลัมน์ Shim-pack GIST C18 (150 mm. x 4.6 mm I.D., 5 μ m) (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

8) เครื่องกวนสาร (Hotplate stirrer, Arc; VELP Scientific, Deer Park, NY, USA)

9) เครื่องชั่งไฟฟ้า (Analytical balance, MS204TS; Mettler Toledo, Allendale, MI, USA)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

นำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณความเข้มข้นของสารละลาย 0.1% ไทมอล กับตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ผ่านการทดสอบของครัสคัลและวอลลิส (The Kruskal Wallis Test) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยรายคู่ ด้วยวิธีการเปรียบเทียบของ Bonferroni (Bonferroni Test)

ขั้นตอนการศึกษา

บดผลึกไทมอลให้ละเอียด รวมถึงเตรียมตัวทำละลายที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ DIW, 55% EtOH, 75% EtOH, 95% EtOH และ Absolute alcohol

1. การทดสอบความสามารถในการละลายของไทมอลในตัวทำละลายต่าง ๆ

ซึ่งผงไทมอลปริมาณ 0.1 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่ 1 จากนั้นเติม DIW 100 มิลลิลิตร (มล.) ลงไปทำการละลายผงไทมอลด้วยเครื่องกวนสาร (ความเร็วรอบ 500 rpm, 25°C) บันทึกเวลา (นาท) ที่ใช้ในการละลายผงไทมอลจนหมด โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และหาค่าเฉลี่ย

ซึ่งผงไทมอลปริมาณ 1 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่ 2-5 จากนั้นเติม 55% EtOH, 75% EtOH, 95% EtOH และ Absolute alcohol 100 มล.ตามลำดับ และดำเนินการทดสอบวิธีการเช่นเดียวกันกับบีกเกอร์ที่ 1

2. การหาปริมาณที่น้อยที่สุดของ EtOH ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งใช้เตรียมสารละลาย 0.1% ไทมอลได้

ซึ่งไทมอลปริมาณ 0.1 กรัม ลงในบีกเกอร์ทั้งหมด จำนวน 16 บีกเกอร์ จากนั้นเปิด 55% EtOH ปริมาตรเท่ากับ 1, 3, 5 และ 7 มล. ลงในบีกเกอร์ที่ 1-4 ตามลำดับ เมื่อไทมอลละลายจนหมดแล้ว จึงใส่ DIW ลงไปเพื่อปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ทำการละลายสารให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนสาร (ความเร็วรอบ 500 rpm, 10 นาที) และบันทึกลักษณะของสารละลายที่ปรากฏ

เปิด 75% EtOH, 95% EtOH และ Absolute alcohol ปริมาตรเท่ากับ 1, 3, 5 และ 7 มล. ลงในบีกเกอร์ที่ 5-8, 9-12 และ 13-16 ตามลำดับ และดำเนินการทดสอบวิธีการเช่นเดียวกันกับบีกเกอร์ที่ 1-4

3. การทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นของไทมอลในสารละลาย 0.1% ไทมอล

เตรียมสารละลาย 0.1% ไทมอล ด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ (DIW, 55% EtOH, 75% EtOH, 95% EtOH และ Absolute alcohol) โดยการชั่งไทมอล 0.1 กรัม ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเติมตัวทำละลายลงไป (1 ตัวทำละลาย/บีกเกอร์) ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วย DIW ทำการละลายสารให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนสาร (ความเร็วรอบ 500 rpm, 10 นาที) และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง/ตัวทำละลาย

ตารางที่ 1 แสดงระยะเวลา (นาที) ของตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการละลายไทมอล

ตัวทำละลายไทมอล	เวลาที่ใช้ในการทำละลาย (นาที)
55% Ethanol	1.06 ± 0.03
75% Ethanol	0.77 ± 0.03
95% Ethanol	0.38 ± 0.02
Absolute alcohol	0.53 ± 0.01
Deionized water (DIW)	854.80 ± 63.91*

*ผลการทดลองการละลายไทมอล 0.1 กรัม ใน DIW 100 มิลลิลิตร (เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำของไทมอลที่ได้รับไว้ในเอกสารข้อมูลความปลอดภัยสารเคมี (MSDS) คือ ไทมอล 1 กรัม ละลายได้ในน้ำปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 °C ดังนั้นในการทดสอบนี้จึงต้องการควบคุมปริมาตรให้เท่ากันทั้งหมด คือ 100 มิลลิลิตร จึงได้ทดสอบการละลายของไทมอล 0.1 กรัม ในตัวทำละลาย 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 °C แทน)

การหาปริมาณด้วยสำคัญของสารละลาย 0.1% ไทมอล ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ ACN:H₂O (50:50) เป็น mobile phase (flow rate 1 มล./นาที; injection volume 10 ไมโครลิตร; column temperature 40°C; wavelength 274 นาโนเมตร) โดยเริ่มจากการเตรียมสารละลายมาตรฐาน (Standard solution) ของไทมอล ความเข้มข้น 1 %โดยมวล/ปริมาตร เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ด้วย EtOH จากนั้นนำมาเจือจางเป็นความเข้มข้น เท่ากับ 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 % โดยมวล/ปริมาตร ตามลำดับ และปรับปริมาตรด้วย 80% ACN:H₂O กรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 ไมครอนลงใน vial

ผลการดำเนินการวิจัย

1. ความสามารถในการละลายของไทมอลในตัวทำละลายต่าง ๆ (ตารางที่ 1)

พบว่าไทมอลสามารถละลายใน EtOH ได้ดีกว่าใน DIW ซึ่งเมื่อเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ EtOH ลดลง ระยะเวลาที่ใช้ในการละลายไทมอลจะเพิ่มขึ้น ทั้งนี้พบว่า DIW ใช้เวลาในการละลายนานที่สุด โดยใช้เวลาประมาณ 855 นาที ในขณะที่ EtOH (ความเข้มข้นต่าง ๆ) ใช้เวลาเพียง 0.38 – 1.06 นาที

2. ปริมาณที่น้อยที่สุดของ EtOH ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ
ซึ่งใช้เตรียมสารละลาย 0.1% ไทมอลได้ (ตารางที่ 2)

พบว่าปริมาณที่น้อยที่สุดสำหรับ EtOH ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งใช้เตรียมสารละลาย 0.1% ไทมอลได้ คือ 3 มล. โดยจะได้สารละลายลักษณะใส ไม่มีสี และปราศจากตะกอน (รูปที่ 2) ในขณะที่ปริมาตร 1 มล. ของ EtOH ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ จะสามารถละลายผง

ไทมอลได้หมด แต่หลังจากเติม DIW เพื่อปรับปริมาตรแล้ว พบตะกอนสีขาวในบีกเกอร์ที่มี 55% EtOH, 75% EtOH และ 95% EtOH เป็นตัวทำละลาย รวมทั้งพบหยดของเหลวใส (คล้ายน้ำมัน) ไม่มีสี ลอยอยู่บนผิวของสารละลาย (รูปที่ 3) ในบีกเกอร์ที่มี 75% EtOH และ Absolute alcohol เป็นตัวทำละลาย

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะของสารละลายไทมอล 0.1% ที่เตรียมด้วยเอทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ

ตัวทำละลาย	ปริมาตรเอทกอฮอล์ (มล.)	ปริมาตรน้ำ (มล.)	ลักษณะกายภาพของสารละลายที่ได้
55% EtOH	1	99	สารละลายที่มีตะกอนสีขาว
	3	97	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน
	5	95	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน
	7	93	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน
75% EtOH	1	99	สารละลายที่มีตะกอนสีขาว และหยดขนาดเล็กของของเหลว (คล้ายน้ำมัน) บนผิว
	3	97	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน
	5	95	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน
	7	93	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน
95% EtOH	1	99	สารละลายที่มีตะกอนสีขาว
	3	97	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน
	5	95	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน
	7	95	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน
Absolute alcohol	1	99	สารละลายที่มีตะกอนสีขาว และหยดขนาดเล็กของของเหลว (คล้ายน้ำมัน) บนผิว
	3	97	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน
	5	95	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน
	7	93	สารละลายใส ไม่มีสี ปราศจากตะกอน



รูปที่ 2 ลักษณะสารละลายใส ไม่มีสีปราศจากตะกอน



รูปที่ 3 ลักษณะสารละลายใส ที่มีหยดของเหลวบนผิว

3. การทดสอบหาปริมาณความเข้มข้นของไทมอล ในสารละลาย 0.1% ไทมอล (ตารางที่ 3)

จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าสารละลาย 0.1% ไทมอล ที่ใช้วิธีการเตรียมแบบเดิม (ใช้ DIW เท่านั้น) มีความเข้มข้นของไทมอล 0.079 ± 0.001 %w/v เปรียบเทียบกับวิธีเตรียมแบบใหม่ในการศึกษา (ใช้ EtOH ละลายก่อนแล้วตามด้วย DIW) มีความเข้มข้นของไทมอลใกล้เคียงกันที่ $0.086 - 0.089$ %w/v และการใช้ 55% EtOH เป็นตัวทำละลาย (ก่อนปรับปริมาตรด้วย DIW) จะทำให้ได้ค่าความ

เข้มข้นของไทมอลสูงที่สุด 0.089 ± 0.001 %w/v ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของไทมอลนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ใช้วิธีการเตรียมแบบเดิม (ใช้ DIW เท่านั้น) ที่ $P\text{-value} = 0.015$ ในขณะที่การเตรียมสารละลาย 0.1% ไทมอล ด้วย EtOH ความเข้มข้นอื่น ๆ (75%, 95% และ Absolute alcohol) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ใช้วิธีการเตรียมแบบเดิม (ใช้ DIW เท่านั้น) และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณความเข้มข้นไทมอลในกลุ่มที่เตรียมด้วย EtOH ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ($P > 0.05$)

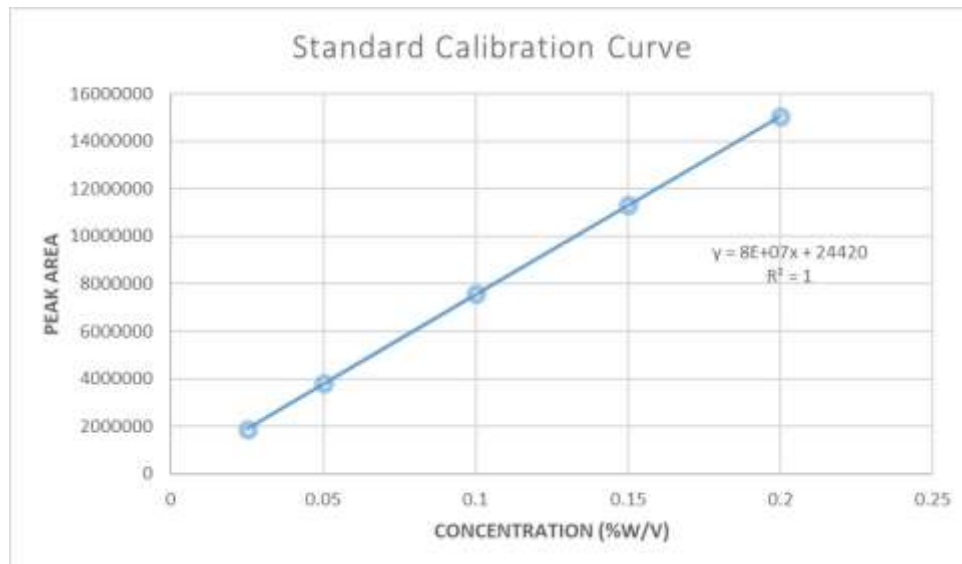
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณร้อยละความเข้มข้นของไทมอล (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลาย 0.1% ไทมอลที่ใช้ตัวทำละลายต่าง ๆ ในการละลาย

ตัวอย่าง	ปริมาณความเข้มข้นของไทมอล (% w/v)				
	Deionized water	55% Ethanol	75% Ethanol	95% Ethanol	Absolute alcohol
1	0.079	0.089	0.087	0.087	0.089
2	0.078	0.088	0.088	0.086	0.083
3	0.080	0.089	0.087	0.087	0.085
Mean±SD	0.079 ± 0.001	$0.089 \pm 0.001^*$	0.087 ± 0.001	0.087 ± 0.001	0.086 ± 0.003
%RSD	1.266	0.651	0.661	0.666	3.566

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใช้วิธีการเตรียมแบบเดิม (ใช้ DIW เท่านั้น)

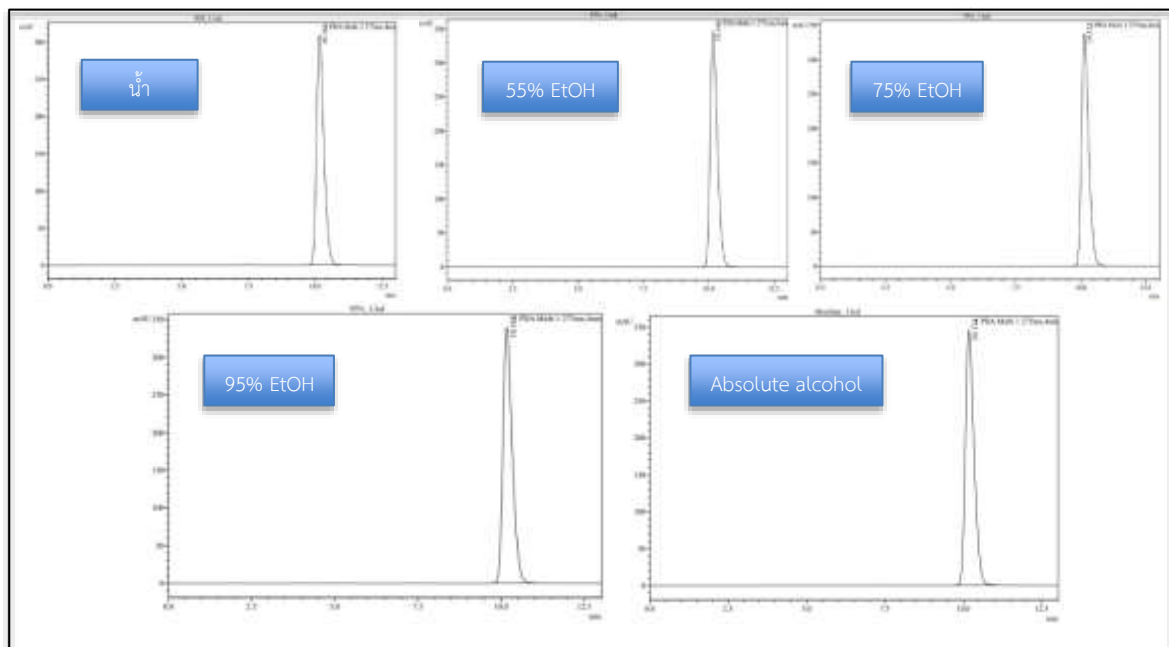
ผลการฉีดสารละลายมาตรฐานไทมอลที่ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.05, 0.1, 0.15 และ 0.2 % โดยมวล /ปริมาตร นั้น พบว่า พื้นที่ใต้ยอด (peak area) มีความสัมพันธ์กันโดยตรงกับความเข้มข้น และเมื่อคำนวณพื้นที่ใต้ยอดกับความเข้มข้น จะได้ลักษณะของกราฟเส้นตรง ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)

เท่ากับ 1 ตามแสดงในรูปที่ 4 และพื้นที่ใต้ยอดของไทมอลที่ถูกตรวจพบในสารละลายตัวอย่างต่าง ๆ นั้น ถูกตรวจพบที่ retention time เฉลี่ย เท่ากับ 10.2 โดยมีลักษณะเป็นยอดเดี่ยว มีเส้นฐาน (Base line; รูปที่ 5) ที่นิ่งและคงที่ รวมทั้งปราศจากยอดที่ไม่ต้องการ (ghost peak)



รูปที่ 4 แสดงกราฟมาตรฐานโทมอล ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นตรง

ความเข้มข้นของโทมอล (ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร) แสดงในแกนนอน และพื้นที่ใต้ยอด (peal area) แสดงในแกนตั้ง



รูปที่ 5 แสดงโครมาโทแกรมของโทมอลในสารละลายตัวอย่างต่าง ๆ

เวลา (นาทื) แสดงในแกนนอน และค่าการดูดกลืนแสง (absorbance; mAU) แสดงในแกนตั้ง

การอภิปรายผลการวิจัย

เนื่องจากไทมอลเป็นสารประกอบประเภทฟีนอล ทำให้ไม่สามารถละลายใน DIW ในระยะเวลาอันสั้นได้ การละลายไทมอล 1 กรัมในน้ำ 1,000 มล. ที่ 25 °C นั้น จึงต้องใช้เวลานานมาก ส่งผลกระทบต่อการผลิตในปริมาณมากที่ต้องการความเร่งด่วน เมื่อทดสอบโดยใช้ไทมอล 1 กรัมละลายในสารละลายต่าง ๆ ปริมาตร 100 มล. ซึ่งมีความเข้มข้นที่สูงกว่าความสามารถในการละลายในน้ำของไทมอล ทำให้การละลายเกิดได้ยากขึ้น ดังนั้น เมื่อเกิดการอิมัลชันไม่สามารถละลายต่อไปได้ จึงได้เปลี่ยนมาทดสอบที่อัตราความเข้มข้นที่เหมาะสมแทน เพื่อให้สามารถคำนวณระยะเวลาที่ใช้ในการทำละลายด้วย DIW ได้ และพบว่าเมื่อเปลี่ยนมาใช้ EtOH ในอัตราส่วนความเข้มข้นเช่นเดียวกับ DIW จะไม่สามารถบันทึกเวลาที่ใช้ในการละลายได้ เนื่องจากไทมอลมีปริมาณน้อยมาก และผลึกไทมอลจะละลายได้หมดในเวลาไม่ถึง 1 นาที ทั้งนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการละลายผลึกไทมอลค่อนข้างแปรผันตามกับขนาดผลึกของไทมอลในทุก ๆ ตัวทำละลาย โดยผลึกที่มีขนาดเล็กและละเอียดจะใช้เวลาในการละลายน้อยกว่าผลึกที่มีขนาดใหญ่ แม้ว่าผลึกไทมอลในการทดสอบนี้ได้ถูกบดจนละเอียดแล้วก็ตาม แต่ขนาดของผลึกที่ได้ทั้งหมดก็มิได้ถูกควบคุมให้มีมาตรฐานเดียวกัน จึงอาจส่งผลบางส่วนกับระยะเวลาที่ใช้ในการละลายโดยตัวทำละลาย

ในการหาปริมาณที่น้อยที่สุดของ EtOH ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่สามารถใช้เตรียมสารละลาย 0.1% ไทมอล ได้นั้น แม้ว่าจะต้องการใช้แอลกอฮอล์ให้น้อยที่สุด (0.5–1.0 มล.) เพื่อไม่ให้กระทบต่อคุณลักษณะของสารละลาย 0.1% ไทมอล ซึ่งก็พบว่าสามารถละลายผลึกไทมอลได้ทั้งหมด ต่อมาเมื่อใส่ DIW เพื่อปรับปริมาตร กลับพบว่า สารละลายเกิดการอิมัลชันพร้อมกับมีผลึกที่มีลักษณะเป็นตะกอนสีขาวของไทมอลขึ้นมาใหม่ จึงจำเป็นต้องหาปริมาณน้อยที่สุดของ EtOH อีกครั้งหนึ่ง เพื่อแก้ไขปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้น จึงได้เป็นผลการทดลองที่พบว่า ปริมาณที่น้อยที่สุดและเหมาะสมสำหรับเตรียมสารละลาย 0.1% ไทมอลได้

คือ 3 มล. นั้นเอง ซึ่งคำนวณความเข้มข้นของ EtOH ในสารละลาย 0.1% ไทมอล ได้เท่ากับ 1.65 – 3 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งจัดได้ว่ากรณีนี้มี EtOH ในปริมาณน้อยมาก หากนำไปเทียบกับความเข้มข้นของ EtOH ในสารละลายสำหรับเก็บรักษาฟันในงานวิจัยของ Goodis et al. (1993) ที่ได้ทดสอบเปรียบเทียบสารละลายที่ใช้เก็บรักษาสภาพฟันแต่ละชนิด ได้แก่ 70% ethanol, 10% formalin, น้ำกลั่น, 0.02% ไทมอล และน้ำเกลือบัฟเฟอร์ฟอสเฟตกับ 0.02% ไทมอล เป็นระยะเวลา 8 วัน 15 วัน และ 6 เดือน ซึ่งพบการซึมที่เพิ่มขึ้นผ่านเนื้อฟันโดยแปรผันตามชนิดของสารละลาย และระยะเวลาในการเก็บรักษาฟัน แต่ไม่พบความแตกต่างด้านความแข็งแรงของโครงสร้างและความแข็งแรงยึดเหนี่ยว (shear bond strength) ของเนื้อฟันระหว่างชนิดของสารละลาย (ยกเว้นน้ำเกลือ) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลในส่วนนี้ต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยัน

วิธีการหาปริมาณไทมอล (Thymol) ที่เตรียมจากตัวทำละลายความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธี HPLC นี้ ได้ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Hajimehdipoor et al. (2010) ที่ได้ตรวจสอบความถูกต้องเพื่อวิเคราะห์ไทมอลและคาร์วาโครล (cavacrol) ในน้ำมันหอมระเหย *Thymus vulgaris* L. ด้วยวิธี HPLC ชนิดคอลัมน์ โดยใช้ C18 ขนาด 4.6 × 150 มม., 5 ไมครอน (แทน ACE C18 ขนาด 4.6 × 250 มม., 5 ไมครอน) เป็นคอลัมน์ในการวิเคราะห์ ใช้ Working standard (แทน Reference standard) เพื่อเตรียมสารละลายมาตรฐานไทมอล ใช้ DIW (แทน 80% Acetonitrile) เพื่อปรับปริมาตรสารละลายตัวอย่าง รวมทั้งเตรียมตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และฉีดในลักษณะ 1 injection/ตัวอย่าง โดยพบว่าสามารถแยกสารไทมอลภายใต้สภาวะเงื่อนไขนี้ได้ โดยมีค่า retention time เฉลี่ยอยู่ที่ 10.2 นาที ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Dedić. et al. (2018) ที่ได้ศึกษาวิธีการของ HPLC สำหรับการระบุและหาปริมาณของ Carvacrol และไทมอล ใน Thyme tincture ซึ่งได้ค่า retention time ของ Carvacrol และไทมอล ที่ประมาณ 12.0 และ 12.7 นาที

ตามลำดับ ความแตกต่างด้านระยะเวลาของ retention time นี้ น่าจะเกิดจากความแตกต่างด้านความยาวของ คอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์และด้านขนาดของเรซินที่บรรจุใน คอลัมน์ การวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นโทมอลใน สารละลาย 0.1% โทมอลนี้ พบว่าตัวอย่างทั้งหมด ค่อนข้างได้ผลใกล้เคียงกัน ทั้งจากการเตรียมด้วย DIW และ EtOH แต่การใช้ EtOH ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่า ในการเป็นตัวทำละลายโทมอล ทำให้สามารถลด ระยะเวลาสำหรับการผลิตได้ อย่างไรก็ตาม การหาค่า ความแม่นยำ (Precision) ของวิธีวิเคราะห์โดยการ ทำซ้ำ (Repeatability) เพื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าส่วน เบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และค่า %RSD นั้น พบว่าค่าที่ ยอมรับได้ของ %RSD คือ $\pm 2\%$ Shabir (2004) ใน การศึกษานี้ พบว่าตัวอย่างที่ใช้ absolute alcohol เป็นตัวทำละลายนั้น มีค่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, %RSD) เท่ากับ 3.566 ซึ่งสูงกว่า 2% ทำให้ผลจาก absolute alcohol นี้ขาด ความน่าเชื่อถือ แต่การศึกษานี้ยังไม่สามารถระบุได้ ชัดเจนถึงความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นว่า มีสาเหตุจาก การเตรียมตัวอย่างหรือจากเครื่องมือตอนฉีดตัวอย่าง ณ เวลานั้น เนื่องจาก EtOH ระเหยได้รวดเร็ว และอาจ ทำให้ระยะเวลาที่ทดสอบส่งผลต่อปริมาณของโทมอล ได้ ซึ่งต้องศึกษาวิจัยต่อไป

สรุปผลการวิจัยและประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย

สรุปได้ว่าวิธีการเตรียมสารละลายโทมอล 0.1% โดยใช้แอลกอฮอล์เข้ามาเป็นตัวช่วยทำละลาย นั้น สามารถละลายได้ดีและใช้เวลาน้อยกว่าการละลาย ด้วยน้ำ และเมื่อนำไปทดสอบหาปริมาณความเข้มข้น ด้วยวิธี HPLC จากการศึกษาพบว่าสารละลายโทมอล 0.1% ที่เตรียมโดยใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ ให้ ปริมาณความเข้มข้นของโทมอลดีกว่าแบบที่เตรียมด้วย น้ำ แต่ไม่ได้มีความแตกต่างกันแบบมีนัยสำคัญ ซึ่ง วิธีการเตรียมดังกล่าวนี้ช่วยให้ระยะเวลาการผลิตมี ความรวดเร็วขึ้น ลดการสูญเสียทรัพยากรต่าง ๆ อย่างไรก็ตามผลการวิจัยนี้เป็นการวิจัยเริ่มต้นเพื่อนำผล

ที่ได้และสูตรการเตรียมวิธีนี้ไปพัฒนาต่อยอด รวมถึง การศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต เพื่อให้ได้สูตรการเตรียม สารละลาย 0.1% โทมอล ที่มีประสิทธิภาพ มีความ ปลอดภัย และมั่นใจได้ว่าไม่ส่งผลกระทบต่อผู้ใช้งาน ตลอดจนผู้วิจัยมุ่งหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะเป็นประโยชน์ ต่อนักศึกษา อาจารย์ทันตแพทย์ ตลอดจนผู้วิจัยที่ ทำการศึกษาฟันที่เก็บจากผู้ป่วย โดยจะช่วยลดขั้นตอน และระยะเวลาในการเตรียมสารละลายสำหรับเก็บ รักษาชิ้นฟัน ตลอดจนจะสามารถนำไปใช้พัฒนาการ เตรียมผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่มีโทมอลเป็นส่วนประกอบได้

ข้อเสนอแนะจากการวิจัย

1. ควรควบคุมขนาดผงโทมอลที่บดแล้วให้มี มาตรฐานเดียวกัน (โดยใช้ตะแกรงร่อน มาตรฐาน ขนาด 425 ไมครอน ที่ทำจาก เหล็กกล้าไร้สนิม) ลดความคลาดเคลื่อนด้าน เวลาที่ใช้สำหรับทดสอบความสามารถในการ ละลาย
2. ควรใช้โทมอลที่เป็น reference standard (แทนการใช้ working standard) ในการ ทดสอบ HPLC เนื่องจากมีความแน่นอนด้าน บริสุทธิ์และความเข้มข้น ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ เปรียบเทียบกับสารที่ต้องการตรวจสอบเพื่อ หาปริมาณตัวยาสำคัญ (active ingredient)
3. ควรทดสอบการคงตัว (Stability) และการ สลายตัวในระยะเวลายาว ของโทมอลใน สารละลายที่เตรียมในงานวิจัยนี้ โดย เปรียบเทียบกับสารละลายโทมอลที่เตรียม ด้วยกระบวนการแบบเดิม
4. เพื่อให้ผู้ไข่มั่นใจได้ว่า ตัวอย่างฟันที่เก็บรักษา ในสารละลายโทมอลของงานวิจัยนี้ซึ่งมี EtOH กับที่เก็บรักษาในสารละลายโทมอลซึ่ง เตรียมด้วยกระบวนการแบบเดิม จึงควร ทดสอบเพิ่มเติม ด้านผลกระทบของ สารละลายโทมอลนี้ต่อคุณสมบัติต่าง ๆ ของ

ตัวอย่างฟันที่เก็บรักษา เช่น Microhardness
(คุณลักษณะกายภาพ) และฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ
จุลินทรีย์ (คุณลักษณะทางชีวภาพ)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ทพ.พิศลย์
เสนาวงษ์ รองคณบดีฝ่ายวิจัย กายภาพและสิ่งแวดล้อม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทพญ.นิศาภรณ์ เรืองสวัสดิ์
ผู้ช่วยรองคณบดีฝ่ายวิจัย กายภาพและสิ่งแวดล้อม และ
นางสาวรัตติพร กายเพชร นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ-
พิเศษ หัวหน้างานประยุกต์ผลงานวิจัย ที่ได้ให้โอกาส
และคำแนะนำสำหรับการศึกษาค้นคว้าในงานวิจัยนี้ อีกทั้ง
ทั้งขอขอบคุณงานบริการเพื่อการวิจัย ที่ช่วยอำนวยความสะดวก
ความสะดวกเอื้อเพื่อเครื่องมืออุปกรณ์ในการทำวิจัย
ครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- วิพรพรรณ ศรีสุธรรม, ศศิพิมพ์ คำสระ, ปาริชาติ พุ่มขจร
และ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. (2561).
อิทธิพลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการ
ยับยั้งและกลไกการยับยั้ง *Escherichia coli*
O157:H7 โดยไมมอล. *วารสารวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*,
20(1), 36-43.
- Angélica Escobar, Miriam Pérez, Gustavo
Romanelli, Guillermo Blustein. (2020).
Thymol bioactivity: A review focusing
on practical applications. *Arabian
Journal of Chemistry*, 13(12), 9243-
9269.
- Boutsioukis, C., Psimma, Z., & Kastrinakis, E.
(2014). The effect of flow rate and
agitation technique on irrigant
extrusion ex vivo. *International*

- endodontic journal*, 47(5), 487-496.
<https://doi.org/10.1111/iej.12176>
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B.,
Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., &
Palmas, F. (1999). In-vitro
antimicrobial activity and chemical
composition of Sardinian Thymus
essential oils. *Letters in applied
microbiology*, 29(2), 130-135.
<https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1999.00605.x>
- Dedić, M., Bečić, E., Imamović, B., Žiga, N.,
Medanhodžić-Vuk, S., Šober, M.
(2018). HPLC method for
determination the content of thymol
and carvacrol in Thyme tincture.
*Bulletin of the Chemists and
Technologists of Bosnia and
Herzegovina*, 50, 1-6.
- Ferrer-Luque, C. M., Bejarano, I., Ruiz-Linares,
M., & Baca, P. (2014). Reduction in
Enterococcus faecalis counts - a
comparison between rotary and
reciprocating systems. *International
endodontic journal*, 47(4), 380-386.
<https://doi.org/10.1111/iej.12158>
- Goodis, H. E., Marshall, G. W., Jr, White, J. M.,
Gee, L., Hornberger, B., & Marshall, S.
J. (1993). Storage effects on dentin
permeability and shear bond
strengths. *Dental materials: official
publication of the Academy of Dental
Materials*, 9(2), 79-84.
[https://doi.org/10.1016/0109-5641\(93\)90079-6](https://doi.org/10.1016/0109-5641(93)90079-6)

- Hajimehdipoor, H., Shekarchi, M., Khanavi, M., Adib, N., & Amri, M. (2010). A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacognosy magazine*, 6(23), 154–158. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.66927>
- Kokoska, L., Kloucek, P., Leuner, O., & Novy, P. (2019). Plant-Derived Products as Antibacterial and Antifungal Agents in Human Health Care. *Current medicinal chemistry*, 26(29), 5501–5541. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180831144344>
- Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Al Qurashi, Y., Bakhrouf, A., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., & Chaieb, K. (2017). Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. *Microbial pathogenesis*, 112, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.057>
- Merghni, A., Ben Nejma, M., Dallel, I., Tobji, S., Ben Amor, A., Janel, S., Lafont, F., Aouni, M., & Mastouri, M. (2016). High potential of adhesion to biotic and abiotic surfaces by opportunistic *Staphylococcus aureus* strains isolated from orthodontic appliances. *Microbial pathogenesis*, 91, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.11.009>
- Peters, O. A., Morgental, R. D., Schulze, K. A., Paqué, F., Kopper, P. M., & Vier-Pelisser, F. V. (2014). Determining cutting efficiency of nickel-titanium coronal flaring instruments used in lateral action. *International endodontic journal*, 47(6), 505–513. <https://doi.org/10.1111/iej.12177>
- Shabir, G. (2004). Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. *Journal of validation technology*, 10, 314–324.