

ผลของตัวทำอิมัลชันผสมต่อเสถียรภาพและประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของ
อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

นางสาวภัทรวรรณ หมกทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF MIXED EMULSIFIERS ON STABILITY AND ANTI-BACTERIAL EFFICIENCY
OF CLOVE OIL IN WATER EMULSION

Miss Pattarawan Moksong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของตัวทำอิมัลชันผสมต่อเสถียรภาพแลประสิทธิภาพในการด้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ
โดย	นางสาวภัทรวรรณ หมกทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พาสวดี ประทีปะเสน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พาสวดี ประทีปะเสน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

..... กรรมการ (ภายนอกมหาวิทยาลัย)
(ดร. วัลลภ ชนะศัตรู)

ภัทรวรรณ หมกทอง : ผลของตัวทำอิมัลชันผสมต่อเสถียรภาพและประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ. (EFFECTS OF MIXED EMULSIFIERS ON STABILITY AND ANTI-BACTERIAL EFFICIENCY OF CLOVE OIL IN WATER EMULSION)

อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. พาสวดี ประทีปะเสน, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. สุเมธ ตันตระเรียร และ ผศ. สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์, 132 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์สำหรับล้างผิวสัมผัสอาหารของเครื่องมือแปรรูปแบบ ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร ซึ่งสารออกฤทธิ์คือน้ำมันกานพลู โดยศึกษาผลของปริมาณน้ำมันกานพลูและตัวทำอิมัลชันคือ Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20 ซึ่งมีค่า hydrophilic-lipophilic balance หรือ HLB = 16.7) ต่อการเกิดและความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและอัตราการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 1^\circ\text{C}$) และประสิทธิภาพการต้านฤทธิ์แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร (ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708 และ *Bacillus cereus* ATCC 6228) โดยทำการลดขนาดอนุภาคน้ำมันด้วยคลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 400 Watt amplitude 80 μm และความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้ยังศึกษาผลของการใช้ตัวทำอิมัลชันผสมระหว่าง Tween 20 กับ Span 3 ชนิด คือ sorbitan monolaurate (Span 20 มีค่า HLB = 8.6) sorbitan monostearate (Span 60 มีค่า HLB = 4.7) หรือ sorbitan tristearate (Span 65 มีค่า HLB = 2.1) โดยแปรค่า HLB ในช่วง 10-15 ต่อ % oil off (ที่ได้หลังการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000g เป็นเวลา 10 นาที) ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย อัตราการเปลี่ยนแปลงของ % oil off อัตราการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย และประสิทธิภาพการต้านฤทธิ์แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากผลการวิจัยเลือกอิมัลชันที่ประกอบด้วยน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก และตัวทำอิมัลชันผสมคือ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 15 ที่ปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก ตัวทำอิมัลชันผสมนี้ให้ค่าแรงตึงระหว่างผิวประจันระหว่างน้ำกับน้ำมันกานพลูต่ำสุดคือ 0.316 mN/m เป็นผลทำให้ความเสถียรของอิมัลชันสูงสุด โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและ % oil off ตลอดระยะเวลาที่ศึกษา (35 วัน) อิมัลชันนี้มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและ % oil off ที่วิเคราะห์หลังการเตรียม 1 วันเท่ากับ $0.602 \pm 0.013 \mu\text{m}$ และ 1.080 ± 0.097 ตามลำดับ อิมัลชันนี้ให้ค่า minimum bactericidal concentration (MBC) เท่ากับ 0.23 mg ของน้ำมันกานพลู/ml สำหรับแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดที่ศึกษา ซึ่งต่ำกว่าเมื่อใช้น้ำมันกานพลูที่มี dimethylsulfoxide (DMSO) หรือ สารละลาย Tween 20 ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลาย ถึง 7.13 เท่า อิมัลชันนี้มีความคงตัวนานกว่า 210 วัน และสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อไก่สดบดที่อยู่บนพื้นเชิงพลาสติกได้หมดที่เวลา 60 นาที

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา:.....2552..... ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....
ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5072411523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: clove oil/ emulsion/ mixed emulsifier/ Tween/ Span/ anti-bacteria

PATTARAWAN MOKTONG: EFFECTS OF MIXED EMULSIFIERS ON STABILITY AND ANTI-BACTERIAL EFFICIENCY OF CLOVE OIL IN WATER EMULSION.

THESIS ADVISOR: ASST. PROF. PASAWADEE PRADIPASENA, THESIS Co-ADVISIR:

ASSOC. PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph.D., ASST. PROF. SUTTISAK SUKNAISILP, 132 pp.

This research aimed to develop the prototype antimicrobial product (in the form of oil-in-water emulsion) using clove oil as an active ingredient. The product would be used for sanitizing surface of food processing equipment. To develop this prototype product, the research included effects of clove oil concentration, and emulsifier type and concentration on emulsion formation and stability, average size of oil particles and its growing rate during storage at 28 ± 1 °C, % oil off (after centrifugation at 2,000g for 10 min) and its increasing rate, and anti-bacterial efficiency. Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20 with HLB of 16.7) and the mixtures of Tween 20 and Span [sorbitan monolaurate (Span 20 with HLB of 8.6) or sorbitan monostearate (Span 60 with HLB of 4.7) or sorbitan tristearate (Span 65 with HLB of 2.1)] were used as emulsifiers. The foodborne pathogens used were *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708 and *Bacillus cereus* ATCC 6228. Emulsions were prepared by ultrasonication at 400 Watt, 80 μ m and 24 kHz for 30 min. The results showed that emulsion consisting of 37.75 wt % clove oil and 15.00 wt % mixture of Span 20 and Tween 20 having HLB value of 15 gave the highest stability and anti-bacterial efficiency. Therefore, it was selected to be the prototype product. The average particle size and % oil off of this prototype product remained constant (at 0.602 ± 0.013 μ m and 1.080 ± 0.097 , respectively) over 35 day storage at 28 ± 1 °C. The minimum bactericidal concentration (MBC) of this product for these four foodborne pathogens was determined to be 0.23 mg of clove oil/ml, which was 7.13 times lower than that of solution of clove oil in dimethylsulfoxide (DMSO) or suspension of clove oil in aqueous solution of 0.5 % wt Tween 20. No phase separation was observed during 210 day storage. The product killed all bacteria from minced fresh chicken on cutting board in 60 min. The interfacial tension between water and clove oil was also determined and was 0.316 mN/m when the mixture of Span 20 and Tween 20 having HLB value of 15 was used as emulsifier.

Field of Study : Biotechnology Student's Signature

Academic Year : 2009 Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญาโทมหาบัณฑิตและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พาสวดี ประทีปะเสน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเถียรและ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ และความช่วยเหลือ จนกระทั่งลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. วัลลภ ชนะศัตร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ช่วยชี้แนะแนวทางการปรับปรุงจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บริษัทเบทเทอร์ ซายน์ อินสทรูเมนต์จำกัด และคุณยอดชาย ประกายศักดิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวัด interfacial tension ภาควิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณรามณี เนตรวิเชียร เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่อง Particle Size Analyzer

ขอขอบพระคุณอาจารย์และพี่ ๆ ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ Food Microbiology Food Chemistry และ Food Process ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ อำนวยความสะดวกตลอดการทำงานและให้กำลังใจตลอดการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณเป็นบางส่วนจาก สกว (ฝ่ายเกษตร) สัญญาเลขที่ RDG 5020047 และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์บัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ครั้งที่ 3/2552

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษา และประสานงานด้านต่างๆ

ขอขอบคุณและขอใจพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ที่ให้คำปรึกษาและให้กำลังใจมาโดยตลอดตลอดจนทุกท่านที่ได้มีส่วนช่วยเหลือแต่มิได้กล่าวนาม ขอได้รับความและขอบคุณจากผู้วิจัยไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

สุดท้ายนี้ต้องขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว ญาติทุกคนที่ช่วยสนับสนุนและช่วยเหลือทุกเรื่องตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ท
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 กานพลู.....	4
2.2 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันกานพลู.....	5
2.3 อิมัลชัน (Emulsion).....	7
2.4 ประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียของอิมัลชัน.....	15
บทที่ 3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย.....	20
3.1 การศึกษาผลของปริมาณน้ำมันกานพลู ปริมาณ Tween 20 และระยะเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียง ต่อการเกิดอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค.....	21
3.2 การศึกษาผลของตัวทำละลายและระยะเวลาการเก็บต่อค่า minimal bactericidal concentration (MBC) ของน้ำมันกานพลูสำหรับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ.....	23
3.3 การศึกษาผลของปริมาณ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก.....	24

	หน้า
3.4 การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ..	24
3.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อระยะเวลาในการเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูในน้ำ.....	27
3.6 การวิเคราะห์สมบัติด้านกายภาพของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ.....	27
3.7 การวิเคราะห์ลักษณะของผนังเซลล์แบคทีเรียหลังสัมผัสผลิตภัณฑ์อิมัลชัน น้ำมันกานพลูในน้ำด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope).....	27
3.8 การศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ.....	28
3.9 การทดสอบทางประสาทสัมผัสเพื่อหากลิ่นน้ำมันกานพลูที่ติดกับอาหาร..	30
3.10 วิธีวิเคราะห์.....	30
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	34
4.1 ผลของปริมาณน้ำมันกานพลู ปริมาณ Tween 20 และระยะเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียง ต่อการเกิดอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค..	33
4.2 ผลของปริมาณ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก เมื่อเตรียมด้วยคลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 400 Watt amplitude 80 μm และ ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที.....	47

4.3	ผลของชนิดตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ต่อความเสถียรของอิมัลชันในสภาวะปกติ และสภาวะเร่ง ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย และประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่ปริมาณน้ำมันกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวมคงที่ที่ร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อใช้คลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 400 watt amplitude 80 μm ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที.....	60
4.4	ผลของเวลาที่เก็บผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่อุณหภูมิ 10 45 และ 55 $^{\circ}\text{C}$ ต่อความเสถียรในสภาวะเร่ง ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย และค่า MBC.....	91
4.5	ผลของประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ.....	96
4.6	การทดสอบทางประสาทสัมผัสเพื่อหากลิ่นน้ำมันกานพลูที่ติดกับอาหาร..	99
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....		100
รายการอ้างอิง.....		102
ภาคผนวก.....		108
ภาคผนวก ก	การวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด โดยวิธี Total viable count เทคนิคการ spread plate ตามวิธีของ AOAC (2000).....	109
ภาคผนวก ข	การวิเคราะห์ความแตกต่างโดยรวมด้วยวิธี Triangle test.....	111
ภาคผนวก ค	การคำนวณหาปริมาณน้ำมันกานพลู.....	114
ภาคผนวก ง	การวัดแรงตึงระหว่างผิวประจันด้วยวิธี pendent drop.....	116
ภาคผนวก จ	รูปแบบการกระจายของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ.....	118
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....		132

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	หน้าที่ของสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ต่างๆ.....	9
2.2	อันดับการระบาดของแบคทีเรียหลักที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร ใน 4 ประเทศ.....	17
3.1	องค์ประกอบของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ (ร้อยละโดยน้ำหนัก) เมื่อใช้ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน.....	22
3.2	องค์ประกอบของอิมัลชันน้ำมันการพลูในน้ำที่ค่า HLB ผสม ต่างๆ เมื่อใช้ตัวทำอิมัลชันผสมระหว่างสารละลาย Tween 20 ในน้ำ และสารละลาย Span ชนิดต่างๆ ในน้ำมันกานพลู.....	26
4.1	ผลของปริมาณน้ำมันกานพลู ปริมาณ Tween 20 และเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 400 Watt amplitude 100 μm และ ความถี่ 24 kHz ต่อการเกิดอิมัลชัน เวลาที่อิมัลชันแยกชั้นแยกชั้น และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย.....	36
4.2	ผลของปริมาณน้ำมันกานพลู ปริมาณ Tween 20 และเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียง 400 Watt amplitude 100 μm และ ความถี่ 24 kHz ต่อการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมันในอิมัลชันหลังการเตรียม 7 วัน.....	37
4.3	ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำต่อขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมัน สำหรับอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลู Tween 20 และน้ำ ร้อยละ 37.50 3.75 และ 58.75 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 400 watt amplitude 100 μm ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที.....	40
4.4	ผลของปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 16.67 และ 37.50 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 3.75 โดยน้ำหนัก เวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 400 Watt amplitude 100 μm และ ความถี่ 24 kHz ต่อฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ.....	42
4.5	ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ (14 วัน และ 167 วัน) ต่อค่า MIC ซึ่งมีสัดส่วนโดยน้ำหนักของน้ำมันกานพลู Tween 20 และน้ำ เท่ากับร้อยละ 37.50 3.75 และ 58.75 โดยน้ำหนักตามลำดับ เมื่อเตรียมอิมัลชันด้วยคลื่นเหนือเสียงที่ 400 Watt amplitude 100 μm และ ความถี่ 24 kHz นาน 30 นาที.....	42

ตารางที่	หน้า	
4.6	ผลของตัวทำละลายได้แก่ น้ำ สารละลาย DMSO และ Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร และระยะเวลาที่เก็บ ต่อค่า MBC (mg/ml).....	46
4.7	ผลของปริมาณ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก.....	48
4.8	ผลของ amplitude ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมันที่วิเคราะห์หลังการเตรียม 7 วัน สำหรับอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลู และ Tween 20 ร้อยละ 37.50 และ 3.75 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ใช้คลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 400 watt ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที.....	50
4.9	ผลของปริมาณ Tween 20 ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก ที่ระยะเวลาที่เก็บอิมัลชัน 1-30 วัน.....	50
4.10	ผลของปริมาณ Tween 20 อายุการเก็บอิมัลชันต่อค่า MBC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก.....	57
4.11	ผลของตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน (M) และค่า HLB ต่อระยะเวลาที่ทำให้อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำเกิดการแยกชั้น ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ.....	61
4.12	ผลของชนิดตัวทำอิมัลชันและค่า HLB ต่อความชันของความสัมพันธ์ระหว่าง % oil off หลังการปั่นเหวี่ยงที่ 2000g เป็นเวลา 10 นาที กับเวลาที่เก็บอิมัลชัน สำหรับอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ.....	65
4.13	ผลของชนิดของ Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ต่อแรงตึงระหว่างผิวประจันระหว่างน้ำมันกานพลูกับน้ำ.....	69
4.14	ความหนาแน่นของวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน เมื่อใช้ Tween 20 และ Span 20 หรือ Span 60 หรือ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15.....	73

ตารางที่	หน้า
4.15 รูปแบบการกระจายของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มี Tween 20 หรือ Tween 20 ร่วมกับ Span 65 เป็นตัวทำอิมัลชัน.....	78
4.16 ผลของ Span 20 ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ.....	82
4.17 ผลของ Span 60 ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ.....	84
4.18 ผลของ Span 65 ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ.....	86
4.19 ผลของ Span 20 ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำหลังปั่นเหวี่ยงอิมัลชัน ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ.....	87
4.20 ผลของ Span 60 ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำหลังปั่นเหวี่ยงอิมัลชัน ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ.....	88
4.21 ผลของ Span 65 ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำหลังปั่นเหวี่ยงอิมัลชัน ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ.....	89
4.22 ผลคุณสมบัติและระยะเวลาการเก็บต่างๆ ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวม ร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 15.....	93

ตาราง	หน้า
<p>4.23 ผลคุณสมบัติ ระยะเวลาการเก็บต่างๆ และการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000g นาน 10 นาที ต่อค่า MBC ของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 15.....</p>	94

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะของช่อดอกกานพลู.....	4
2.2	สูตรโครงสร้างของ eugenol.....	5
2.3	อิมัลชันชนิดต่างๆ แบ่งตามชนิดของของเหลวที่เป็นวัฏภาคกระจายและ วัฏภาค ต่อเนื่อง.....	8
2.4	โครงสร้างของตัวทำอิมัลชัน Tween 20 Span 20 Span 60 และ Span 65	11
2.5	Phase diagram ของระบบน้ำมันกานพลู Tween 20 และน้ำ.....	14
2.6	Phase diagram ของอิมัลชัน.....	14
4.1	ลักษณะปรากฏของอิมัลชันที่เจือจางในน้ำมันถั่วเหลืองและอิมัลชันที่เจือจางใน น้ำ.....	35
4.2	ตำแหน่งของอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 16.67 และ 37.50 โดย น้ำหนัก และที่มีปริมาณ Tween 20 คงที่ร้อยละ 3.75 โดยน้ำหนัก ใน phase diagram.....	40
4.3	ตำแหน่งของอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูคงที่ร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก และที่มีปริมาณ Tween 20 ที่ร้อยละ 3.75 10.00 15.00 และ 20.00 โดยน้ำหนัก ใน phase diagram.....	48
4.4	ผลของเวลาที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) และปริมาณ Tween 20 ต่อขนาด อนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก เมื่อเตรียมอิมัลชันด้วยคลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 400 Watt amplitude 80 μ m และ ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที.....	51
4.5	แบบจำลองของปริมาณตัวทำอิมัลชันต่อการปิดล้อมของตัวทำอิมัลชันที่ผิวของ อนุภาคน้ำมันและขนาดอนุภาคน้ำมัน ในกรณีที่มีปริมาณ (ปริมาตร) ของน้ำมันซึ่ง เป็นวัฏภาคกระจายคงที่.....	53
4.6	ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเก็บสารละลายน้ำมันกานพลูและอิมัลชัน น้ำมันกานพลูในน้ำ กับค่า MBC.....	59
4.7	ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยกับค่า MBC.....	59

ภาพที่	หน้า
4.8 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อ % oil off สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7) เป็นตัวทำอิมัลชัน.....	63
4.9 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อ % oil off สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 60 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7) เป็นตัวทำอิมัลชัน.....	63
4.10 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อ % oil off สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7) เป็นตัวทำอิมัลชัน	64
4.11 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7) เป็นตัวทำอิมัลชัน.....	66
4.12 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 60 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7) เป็นตัวทำอิมัลชัน.....	66
4.13 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7) เป็นตัวทำอิมัลชัน.....	67
4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างแรงตึงระหว่างผิวประจันกับขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่เวลาที่เก็บอิมัลชัน 1 7 14 21 28 และ 35 วัน.....	70
4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างแรงตึงระหว่างผิวประจันกับ % oil off ที่เวลาที่เก็บอิมัลชัน 1 7 14 21 28 และ 35 วัน.....	71
4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยกับ % oil off ที่เวลาที่เก็บอิมัลชัน 1 7 14 21 28 และ 35 วัน.....	71
4.17 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงอนุภาคน้ำมันกานพลูของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ สำหรับอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 หรือ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า.....	79

ภาพที่	หน้า	
4.18	ภาพ SEM กำลังขยาย 15,000 เท่า ของลักษณะผนังเซลล์แบคทีเรีย ก่อนสัมผัส อิมัลชัน และหลังสัมผัสอิมัลชัน ที่ค่า MBC เท่ากับ 0.23 mg/ml โดยใช้อิมัลชันที่ มีปริมาณน้ำมันกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวม (Span 20 ร่วมกับ Tween 20) ที่ HLB 15 เท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ..	90
4.19	ผลของเวลาที่เก็บผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่อุณหภูมิ 10 28 45 และ 55 °C ต่อ % oil off หลังการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000g เป็นเวลา 10 นาที ใน หน่วยของร้อยละโดยปริมาตร (% oil off).....	92
4.20	ผลของเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในเนื้อไก่ต่อร้อยละจำนวนแบคทีเรียที่ ลดลง สำหรับผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ โดย OA คือเวลาที่ยังไม่ได้ สัมผัสอิมัลชัน และ OB คือเวลาที่สัมผัสอิมัลชันทันที.....	96
4.21	ผลของเวลาที่ใช้ในการแช่แข็งต่อร้อยละจำนวนจุลินทรีย์ที่ลดลงสำหรับ ผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ.....	97
4.22	การอยู่รอดของแบคทีเรียในเนื้อไก่สดและและแบคทีเรียบนพื้นผิวเชิงพลาสติก ที่สัมผัสไก่สดเมื่อสัมผัสผลิตภัณฑ์อิมัลชัน.....	98

บทที่ 1

บทนำ

การทำความสะอาดผิวสัมผัสของอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร มีความสำคัญเป็นอย่างมากสำหรับสุขลักษณะที่ดีและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหาร อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตนั้นถึงแม้พื้นผิวที่สัมผัสกับอาหารทำจากวัสดุที่ไม่ทำปฏิกิริยากับอาหาร และทำความสะอาดง่าย แต่ก็ยังมีการสะสมของคราบสกปรก และเป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีและสะสมบนผิวนั้น ส่งผลให้มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ลงในอาหารในระหว่างกระบวนการผลิตซึ่งนอกจากส่งผลต่อคุณภาพและทำให้อาหารเสียแล้ว ในกรณีที่เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ยังทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย เป็นต้น เมื่อผู้บริโภคได้บริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเข้าไป จึงจำเป็นต้องมีการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อผิวสัมผัสอาหาร

ในปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสนใจเรื่องสุขภาพมากขึ้น และต้องการหลีกเลี่ยงการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของสารเคมีสังเคราะห์ ดังนั้น จึงมีการใช้สารที่มาจากธรรมชาติมาทำหน้าที่ที่ต้องการแทนมากขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงพัฒนาผลิตภัณฑ์ล้างผิวอุปกรณ์สัมผัสอาหารซึ่งใช้น้ำมันกานพลูเป็นสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดี โดยเฉพาะแบคทีเรีย (Hammer *et al.*, 1999) น้ำมันกานพลูเป็นน้ำมันหอมระเหยที่ไม่มีสีหรือสีเหลืองซีด แต่สีเข้มและข้นเหนียวขึ้นเมื่อเก็บไว้นานๆ หรือเมื่อถูกกับอากาศ มีกลิ่นรสเหมือนกานพลู ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในเอทานอลและ dimethylsulfoxide (DMSO) ได้ดี สารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในน้ำมันกานพลูคือ eugenol ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟีนอลมีอยู่ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 85 โดยปริมาตร (สนั่น ศุภธีรสกุล, 2540) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย (minimum inhibition concentration หรือ MIC) ของน้ำมันกานพลูในสารละลายน้ำของ polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (polysorbate 20 หรือ Tween 20) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* *Escherichia coli* *Salmonella Typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 0.2 0.4-2.5 >20 และ 0.4-2.5 µl/ml ตามลำดับ (Burt, 2004) ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ล้างผิวสัมผัสอาหารมีน้ำเป็นส่วนผสมหลัก ซึ่งทำให้ง่ายต่อการชะล้างออกและลดการปนเปื้อนขององค์ประกอบต่างๆในผลิตภัณฑ์ลงในอาหาร

ปัญหาสำคัญสำหรับการใช้น้ำมันกานพลูเป็นสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์นี้คือไม่ละลายในน้ำ ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์แยกชั้นได้ง่าย นอกจากนี้ยังอาจลดประสิทธิภาพการต้านการเจริญของ

แบบที่เรียกอีกด้วย (Gupta and Moulik, 2007) ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันการพลู มักละลายน้ำมันการพลูใน DMSO ก่อนละลายและ/หรือเจือจางน้ำมันการพลูในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก (Trakulsomboon *et al.*, 2006) แต่อันตรายของการใช้ DMSO ในผลิตภัณฑ์คือ DMSO ทำให้เกิดอาการลมพิษเมื่อสัมผัสถูก ดังนั้น จึงนิยมใช้สารลดแรงตึงผิวหรือตัวทำอิมัลชันเพื่อกระจายอนุภาคน้ำมันการพลูในน้ำ (Gupta and Moulik, 2007) โดยตัวทำอิมัลชันจะอยู่ที่ผิวของอนุภาคน้ำมันทำให้แรงตึงระหว่างผิวประจันของน้ำมันกับน้ำลดลง ทำให้เกิดเป็น จุลอิมัลชัน (microemulsion) หรือเมื่อใช้ปริมาณตัวทำอิมัลชันที่สูงพอก็ทำให้เกิดเป็น สารละลายไมเซลล์ (micelle solution) ได้ โดยน้ำมันถูกหุ้มไว้ภายในไมเซลล์ของตัวทำอิมัลชัน (Leroux *et al.*, 2002; Gupta and Moulik, 2007) ตัวทำอิมัลชันที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้แก่กลุ่มของ Tween และ Span (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1974; Bassole *et al.*, 2002) Gupta และ Moulik (2007) รายงานว่าเมื่อใช้ Tween 20 ซึ่งมีค่า hydrophilic-lipophilic balance (HLB) = 16.7 เป็นตัวทำอิมัลชันสำหรับระบบน้ำมันการพลูกับน้ำ ที่ความเข้มข้นของน้ำมันการพลู Tween 20 และน้ำร้อยละ 5 30 และ 65 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ให้อิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำที่ใส อนุภาคของน้ำมันการพลูมีขนาดอยู่ในช่วง 10-20 nm และอิมัลชันมีความเสถียรถึง 1 ปี เมื่อเก็บที่ 4-40 °C ค่า HLB ของตัวทำอิมัลชันมีความสำคัญมากต่อการเกิดอิมัลชัน ที่มีอนุภาคของวัฏภาคกระจายขนาดเล็กที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ ซึ่งเป็นผลทำให้อิมัลชันเสถียรที่สุด (Sagitani *et al.*, 1981; Liu *et al.*, 2006) สำหรับอิมัลชันของน้ำมันการพลูในน้ำพบว่าค่า HLB ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 10-15 (Walter *et al.*, 1997) เพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคที่เล็กที่สุดเท่าที่เป็นไปได้จึงมีการศึกษาการใช้ตัวทำอิมัลชัน 2 ตัว ร่วมกัน เพื่อแปรค่า HLB (Gupta and Moulik, 2007) และทำให้ผนังของตัวทำอิมัลชันที่ล้อมรอบอนุภาคน้ำมันหนาแน่นและแข็งแรง ด้านการหลอมรวมตัวของอนุภาคน้ำมัน (Porras *et al.*, 2004) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของการใช้ตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span (sorbitan esters) ซึ่งมีค่า HLB ต่ำ ที่มีโครงสร้างต่างกัน ได้แก่ sorbitan monolaurate (Span 20) sorbitan monostearate (Span 60) หรือ sorbitan tristearate (Span 65) ร่วมกับ Tween 20 ต่อความเสถียรและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสำหรับอิมัลชันน้ำมันการพลูในน้ำ เพื่อการกำหนดสูตรสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ต้านแบคทีเรียที่ใช้ล้างผิวที่สัมผัสอาหารได้ โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ

1. ศึกษาผลของปริมาณน้ำมันการพลู ปริมาณ Tween 20 และระยะเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงต่อการเกิดอิมัลชันน้ำมันการพลูในน้ำ ความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค

2. ศึกษาผลของปริมาณ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ
3. ศึกษาผลของชนิดและปริมาณของตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ
4. ศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กานพลู

กานพลู (*Eugenia caryophyllus*) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง อาจพบสูงถึง 10 เมตร มีเปลือกสีน้ำตาลอ่อน เรียบ ทุกส่วนเกลี้ยง ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว มั่นเป็นเงา ออกตรงข้ามกัน ปลายเรียวแหลม กว้าง 3-5 cm ยาว 7-12 cm ดอกมีลักษณะเป็นช่อ มักออกที่ปลายยอดหรือตามง่ามใบใกล้ๆ ปลายยอด ดอกกลีบรองกลีบดอกมีสีเขียวยอมเหลือง มีสีแดงกระจาย ผล สด รูปไข่กลับแกมรูปรี ยาว 2-2.5 cm สีแดงเข้ม เป็นพืชพื้นเมืองของหมู่เกาะมะละกา (Molucca) และนำไปปลูกทั่วไปในมาเลเซีย สุมาตรา อัฟริกา อเมริกาใต้ และไทย (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540)



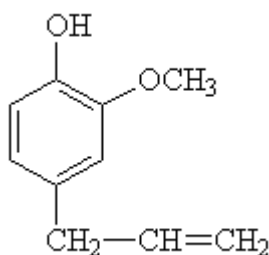
รูปที่ 2.1 ลักษณะของช่อดอกกานพลู

ที่มา: กรุงเทพมหานครคริสเตียนวิทยาลัย, 2006: ออนไลน์

ตามตำรายาไทยใช้ดอกตูมแห้งแก้อาการปวดฟัน โดยใช้สำลีชุบเหล้าที่มีดอกกานพลูแช่อยู่มาอุดรูฟัน ใช้ดอกตูมประมาณ 6-8 ดอก ชงในน้ำเดือดแล้วดื่มเป็นยาแก้ท้องเสีย ขับลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ นอกจากนี้ยังใช้ผสมในน้ำสำหรับบ้วนปากเพื่อดับกลิ่นปาก ในน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นจากดอกมีสาร eugenol ซึ่งมีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่จึงใช้แก้ปวดฟันได้ มีฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้จึงลดอาการปวดท้อง ช่วยขับน้ำดีจึงลดอาการจุกเสียดที่เกิดจากการย่อยอาหารไม่สมบูรณ์ สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดเช่นเชื้อโรคไทฟอยด์ บิดชนิดไม่มีตัว เชื้อหนองเป็นต้น นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้มีการหลั่งเมือกและลดกรดในกระเพาะอาหารด้วย (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540)

น้ำมันกานพลูเป็นน้ำมันซึ่งได้จากการนำดอกกานพลูแห้งมากลั่นด้วยไอน้ำ เมื่อกลิ้นใหม่ๆ ไม่มีสีหรือเป็นสีนวล กลิ่นหอมและรสเผ็ด ถ้าทิ้งไว้สีเข้มขึ้นน้ำมันกานพลูประกอบด้วยสารประกอบพวกฟีนอล ซึ่งส่วนใหญ่เป็น eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl)-phenol) สารนี้นอกจากมีฤทธิ์

ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แล้วยังมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ด้วย นอกจากนั้นยังประกอบด้วย eugenol acetate และ caryophyllene รวมกันเป็นร้อยละ 99 ในบรรดาสารทั้ง 3 ชนิด มี eugenol อยู่ถึงร้อยละ 85 สารที่พบปริมาณน้อยในน้ำมันกานพลูคือสาร คีโตน ได้แก่ methyl-n-amyl ซึ่งทำให้น้ำมันกานพลูมีกลิ่นเฉพาะ จึงนำมาใช้ในการแต่งกลิ่นอาหาร จำพวกเนื้อ เช่น หมูแฮม ฯลฯ (พยอม ตันติวัฒน์, 2527)



รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ eugenol
ที่มา: Burt (2004)

น้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยไม่มี phototoxic effect (Ouattara et al., 1997) โดย eugenol ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในน้ำมันกานพลู สามารถยับยั้ง *Escherichia coli* *Enterobacter sakazakii* *Klebsiella pneumoniae* ได้มากกว่ายาปฏิชีวนะ เช่น ampicillin erythromycin และ sulphamethizole (Suresh, 1992)

จากผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดสมุนไพรต่างๆ ได้แก่ กระเทียม หอมหัวใหญ่ อบเชย กานพลู มัสตาร์ด พริกไทย น้ำมันสะระแหน่ เป็นต้น พบว่าน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทั้งที่ก่อโรคในอาหาร และที่ก่อการเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์ทั้งแกรมบวก (ได้แก่ *Brochothrix thermosphact* *Carnobacterium piscicola* *Lactobacillus* spp. *Listeria monocytogenes* *Staphylococcus aureus*) และแกรมลบ (ได้แก่ *Pseudomonas fluoresce* *Serratia liquefaciens* *E. coli* *Salmonella* spp.) รวมทั้งรา และยีสต์ได้ดีที่สุด (Snyder, 1997; Ouattara et al., 1997; Smith-Palmer et al., 1998; Prasad and Seenayya, 2000) โดยน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อเน่าเสียคือ *B. thermosphact* ซึ่งแยกได้จากเนื้อวัวสด ที่เก็บที่ 4°C และ *S. Liquefaciens* ซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์ไบโโคโนบรจุสสุญญากาศ ที่ระดับการเจือจางของน้ำมันกานพลู 1:100 โดยมีปริมาณ eugenol เท่ากับร้อยละ 19.81 โดยน้ำหนัก (Ouattara et al., 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ต้าน *C. Jejuni* *E. coli*

Salmonella Enteritidis *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ที่ระดับการเจือจางร้อยละ 0.05 0.04 0.04 0.03 และ 0.04 โดยปริมาตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูร้อยละ 0.10 โดยปริมาตร สามารถยับยั้งการเจริญของ red cocci ที่ทนเค็มซึ่งแยกได้จากปลาเค็มและเกลือทะเลได้แก่ *Salinococcus roseus* 12 สายพันธุ์ *Halococcus turkmenicus* 5 สายพันธุ์ และ *Halococcus morrhuae* 1 สายพันธุ์ (Prasad and Seenayya, 2000) เมื่อนำน้ำมันกานพลูมาใช้เป็นสารกันเสียในเนยแข็งทั้งชนิดไขมันต่ำและสูง เพื่อดำเนินการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *Salmonella enteritidis* ที่อุณหภูมิ 4 และ 10°C เป็นเวลา 14 วัน พบว่าน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.10 โดยปริมาตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* และ *Salmonella enteritidis* ได้ โดยมีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตน้อยกว่า 10 cfu/ml (Smith-Palmer *et al.*, 1998) สำหรับอาหารพร้อมรับประทาน (ready-to-eat หรือ RTE) เช่น ไส้กรอกไก่อรมควัน นั้น *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่สำคัญ เนื่องจากเจริญได้ดีที่อุณหภูมิแช่เย็น (5-15°C) ซึ่งเก็บอาหารประเภทนี้ พบว่าน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร สามารถลดจำนวนเชื้อนี้ได้ตั้งแต่สามวันแรกและไม่พบการเจริญของเชื้อนี้ภายหลังสองสัปดาห์ (Mytle *et al.*, 2006) เมื่อวิเคราะห์ค่า MIC และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย (minimum bactericidal concentration หรือ MBC) ของน้ำมันกานพลู สำหรับ *E. coli* O157:H7 สายพันธุ์ต่างๆ เมื่อต้มไว้ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 0.25 และ 0.30 โดยน้ำหนักตามลำดับ

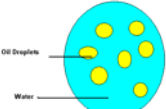
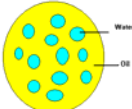
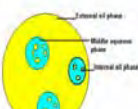
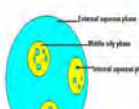
การที่น้ำมันหอมระเหยหรือน้ำมันกานพลูสามารถต้านหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เนื่องจากน้ำมันและส่วนที่มีสมบัติเป็น hydrophobic ของสารประกอบฟีนอลในน้ำมันสามารถแทรกเข้าไปในส่วนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์และไม่โตคอนเดรียของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียสูญเสียความสามารถในการซึมผ่านของสารและนำไปสู่การรั่วของ intercellular membrane ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก หรือเนื่องจากน้ำมันหอมระเหยทำความเสียหายต่อระบบเอนไซม์ของแบคทีเรีย โดยพบว่า eugenol สามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์ amylase และ protease ของ *B. cereus* นอกจากนี้ OH group ของ eugenol สามารถจับกับโปรตีน จึงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ใน *Enterobacter aerogene* (Burt, 2004)

จากผลการศึกษายังคงยืนยันว่าน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร และมีการทดลองนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่ามีพิษน้อยกว่า

สารสังเคราะห์ มีความปลอดภัยในการบริโภค และได้รับการรับรองว่า generally regarded as safe (GRAS) ให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ (Jobling, 2001: ออนไลน์)

2.3 อิมัลชัน (Emulsion)

อิมัลชันคือของผสมที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด ที่ไม่ผสมหรือละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทั้งนี้เนื่องจากของเหลวทั้ง 2 ชนิดนี้มีสมบัติที่แตกต่างกันคือชนิดหนึ่งมีความเป็น hydrophilic สูง ขณะที่อีกชนิดหนึ่งมีความเป็น hydrophobic สูง ทำให้แรงดึงระหว่างผิวประจันระหว่างของเหลวทั้ง 2 ชนิดนี้สูงมาก ตัวอย่างของของเหลว 2 ชนิดที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันนี้ ได้แก่ น้ำกับน้ำมัน ดังนั้น เพื่อทำให้เกิดเป็นอิมัลชันที่มีลักษณะปรากฏเป็นเนื้อเดียวกันนั้นต้องใช้พลังงานตีให้ของเหลวหนึ่งเกิดเป็นอนุภาคเล็กๆนั้นกระจายแขวนลอยอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง โดยต้องมีตัวทำอิมัลชัน (emulsifier) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิว (surface active agent หรือ surfactant) เป็นองค์ประกอบด้วย โดยปริมาณตัวทำอิมัลชันที่ใช้ต้องเพียงพอที่ลดแรงตึงระหว่างผิวประจันระหว่างของเหลวทั้ง 2 ชนิดนั้นให้อนุภาคของของเหลวที่เป็นวัฏภาคภายในหรือวัฏภาคกระจาย (internal or dispersed phase) กระจายตัวแขวนลอยอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ที่เป็นวัฏภาคภายนอกหรือวัฏภาคต่อเนื่อง (external or continuous phase) อยู่ได้เมื่อหยุดให้พลังงานตี ถ้าไม่มีตัวทำอิมัลชัน หรือปริมาณอิมัลชันไม่เพียงพอ หรือชนิดของตัวทำอิมัลชันที่ใช้ไม่เหมาะสม เมื่อหยุดการตีก็เกิดการเกาะกันของอนุภาคที่เป็นวัฏภาคกระจายเป็นกลุ่มแล้วหลอมรวมกันเป็นขนาดใหญ่ แล้วในที่สุดก็แยกออกเป็นสองวัฏภาค เรียกว่าเกิดการแยกชั้น (Becher, 1965, Shaw, 1970; Hiemens, 1977) อิมัลชันที่มีวัฏภาคกระจายเป็นน้ำมันและวัฏภาคต่อเนื่องเป็นน้ำเรียกว่าอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsion หรือ O/W) ซึ่งให้ลักษณะสัมผัสเหนอะหนะน้อย และใช้น้ำล้างออกได้ง่าย ขณะที่อิมัลชันที่มีวัฏภาคกระจายเป็นน้ำและวัฏภาคต่อเนื่องเป็นน้ำมันเรียกว่าอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion หรือ W/O) ซึ่งให้ลักษณะสัมผัสเหนอะหนะ และล้างออกด้วยน้ำยาก อิมัลชันทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นอิมัลชันเดี่ยว นอกจากนี้ยังมีพหุอิมัลชัน (multiple emulsion) ที่วัฏภาคกระจายเป็นอิมัลชันเดี่ยวได้แก่ อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำในน้ำมัน (oil-in-water-in oil emulsion หรือ O/W/O) ซึ่งมีวัฏภาคกระจายเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำและวัฏภาคต่อเนื่องเป็นน้ำมัน และอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ (water-in-oil-in-water emulsion หรือ W/O/W) ซึ่งมีวัฏภาคกระจายเป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและวัฏภาคต่อเนื่องเป็นน้ำ (รูปที่ 2.3)

อิมัลชันเดี่ยว		พหุอิมัลชัน	
O/W	W/O	O/W/O	W/O/W
			

รูปที่ 2.3 อิมัลชันชนิดต่างๆ แบ่งตามชนิดของของเหลวที่เป็นวัฏภาคกระจายและวัฏภาคต่อเนื่อง

ที่มา: Ali และคณะ, 2008: ออนไลน์

อิมัลชันจัดได้ว่าเป็นระบบคอลลอยด์ เนื่องจากคำจำกัดความของคอลลอยด์ที่หมายถึงอนุภาคที่มีขนาดเชิงเส้นที่อยู่ในช่วง $0.001-1 \mu\text{m}$ และอนุภาคของวัฏภาคกระจายของอิมัลชันส่วนใหญ่มีขนาดอยู่ในช่วง $0.1-10 \mu\text{m}$ (Shaw, 1970; Hiemens, 1977) ขนาดอนุภาคของวัฏภาคกระจายมีผลต่อลักษณะปรากฏและความเสถียรของอิมัลชัน กล่าวคืออิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคของวัฏภาคกระจายอยู่ในช่วง $0.25-10 \mu\text{m}$ โดยอนุภาคส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่กว่า $1 \mu\text{m}$ เรียกอิมัลชันชนิดนี้ว่ามหิมัลชัน (macroemulsion) นั้น เนื่องจากอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ทำให้ค่าดัชนีการหักเหแสงของสองวัฏภาคแตกต่างกัน ทำให้มีลักษณะขุ่นขาว มีความเสถียรต่ำ และเป็นความเสถียรแบบจลน์ (kinetically stable) ขณะที่อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคของวัฏภาคกระจายอยู่ในช่วงเล็กกว่า $1 \mu\text{m}$ จึงไม่หักเหหรือกระจายแสง ทำให้มีลักษณะปรากฏเป็นของเหลวใสหรือโปร่งใสเช่นสารละลาย มีความเสถียรสูงแบบอุณหพลศาสตร์ (thermodynamically stable) เรียกว่าจุลอิมัลชัน (microemulsion) หรือบางที่เรียกว่า transparent emulsion เนื่องจากลักษณะที่โปร่งใส

การทำให้อิมัลชันเป็นวัฏภาคกระจายแตกเป็นหยดเล็กๆ ต้องใช้พลังงาน พลังงานที่ใช้นี้อาจใช้ในรูปของความร้อน (heat) การคนหรือเขย่า (mechanical agitation) การสั่นสะเทือนโดยใช้คลื่นเหนือเสียง (ultrasonic vibration) หรือไฟฟ้า (electricity) เป็นต้น (Jafari *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006) สำหรับงานวิจัยนี้ใช้คลื่นเหนือเสียง คลื่นเหนือเสียงเป็นคลื่นเชิงกลและเป็นคลื่นตามยาว นอกจากนี้ยังเป็นคลื่นความดันอีกด้วย มีความถี่สูงกว่า $20,000 \text{ Hz}$ กลไกการลดขนาดอนุภาคของคลื่นเหนือเสียงคือทำให้เกิดคลื่นระหว่างผิวประจันของอนุภาคน้ำกับน้ำมัน ให้แรงเฉือนที่มีอัตราเฉือนสูง เป็นผลทำให้วัฏภาคกระจายแตกออกเป็นอนุภาคขนาดเล็กกระจายตัวในวัฏภาคต่อเนื่อง และการเคลื่อนที่ของคลื่นเหนือเสียงในของเหลวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ

ความดันในของเหลว นั้น เป็นผลทำให้เกิดฟองก๊าซเล็กๆในของเหลว นั้น ซึ่งฟองก๊าซนี้ขยายขนาดในช่วงขยายของคลื่น และลดขนาดในช่วงอัดของคลื่น แต่ผลรวมพบว่าขนาดของฟองใหญ่ขึ้นเมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้น ในที่สุดฟองก๊าซแตก เกิดเป็นคลื่นกระแทก (shock wave) ที่รุนแรง ให้แรงเฉือนสูง แรงเฉือนนี้เป็นแรงที่กระทำต่ออนุภาคและลดขนาดอนุภาคให้มีขนาดเล็กอยู่ในระดับ sub micron (Li and Fogler, 1978)

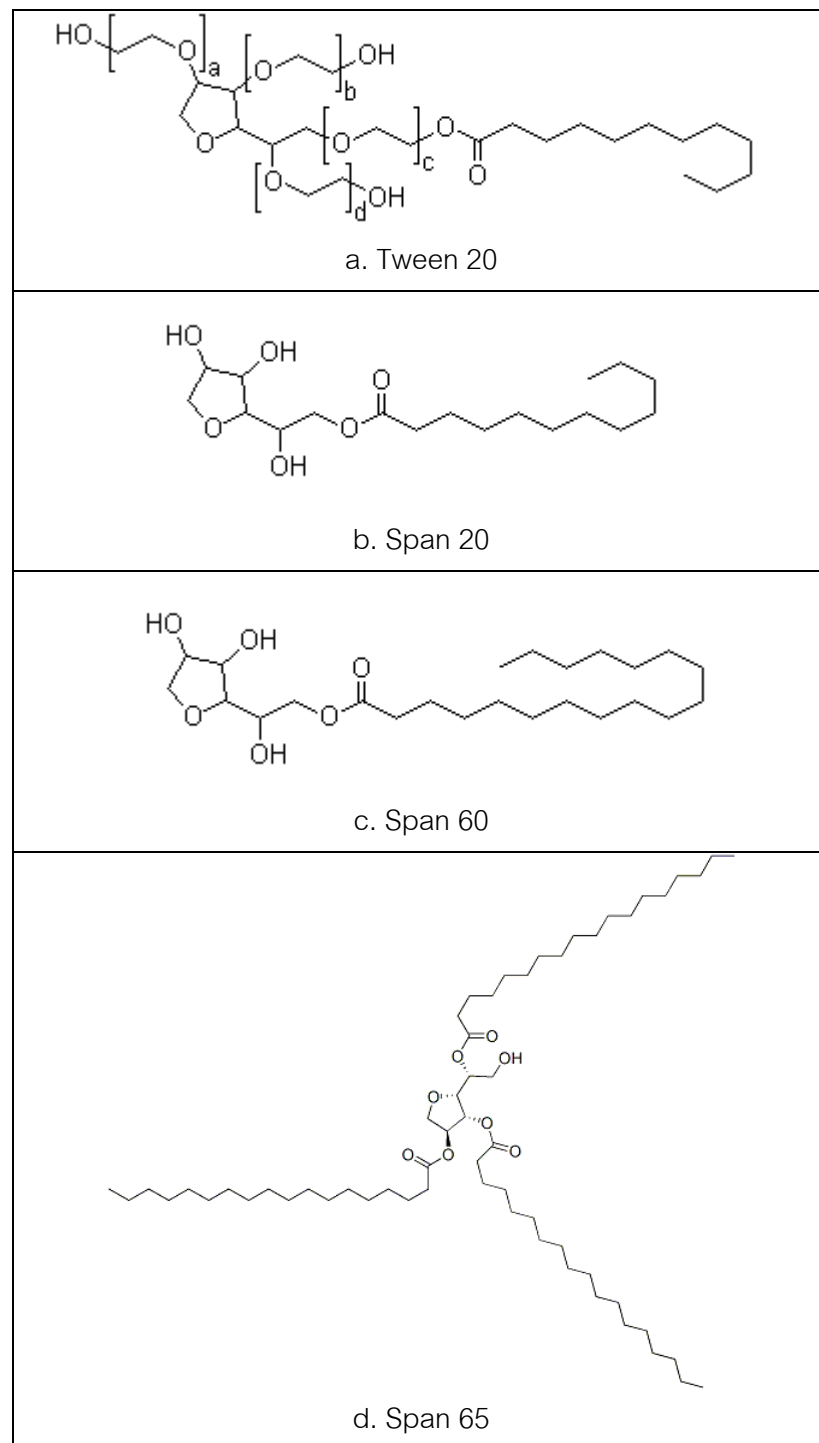
ตัวทำอิมัลชันเป็นสารที่ประกอบด้วยส่วน hydrophilic ซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำ และส่วน hydrophobic ซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำมัน ทำให้สามารถจับได้ทั้งน้ำและน้ำมัน จากลักษณะโครงสร้างตัวทำอิมัลชันจึงชอบอยู่ที่ผิวประจัน ทำให้แรงดึงระหว่างผิวประจันลดลง เป็นผลทำให้อนุภาคน้ำมันสามารถกระจายแขวนลอยอยู่ในน้ำได้ (หรือกลับกัน) จึงทำให้อิมัลชันเสถียรขึ้น นอกจากนี้การที่อิมัลชันอยู่ที่ผิวประจันจึงเป็นฟิล์มรอบอนุภาคของวัสดุกระจาย (strong protective layer) ป้องกันการรวมตัวของอนุภาคของวัสดุกระจาย ในกรณีที่อิมัลชันเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ การใช้ตัวทำอิมัลชันที่มีประจุจะทำให้เกิดแรงผลักทางไฟฟ้าและศักย์ไฟฟ้าที่พื้นผิวของอนุภาคน้ำมัน ป้องกันการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคน้ำมัน ทำให้อิมัลชันเสถียรขึ้น (Rikenvitamin, 2002) สมบัติสำคัญของสารลดแรงดึงผิวคือค่า HLB ซึ่งเป็นผลของสัดส่วนระหว่างส่วน hydrophilic ต่อส่วน hydrophobic ในโมเลกุลของสารนี้ ค่านี้ใช้บ่งความสามารถในการละลายน้ำของสารลดแรงดึงผิว สารลดแรงดึงผิวที่มีค่า HLB ต่ำ มีการละลายน้ำต่ำ แต่การละลายในน้ำมันสูง นอกจากนี้ค่า HLB ยังเป็นค่าที่ใช้บ่งลักษณะการนำตัวทำใช้งานของสารลดแรงดึงผิวด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.1 (Dickinson and McClements, 1995; กองควบคุมยา, 2544)

ตารางที่ 2.1 หน้าทีของสารลดแรงดึงผิวที่มีค่า HLB ต่างๆ

ค่า HLB	หน้าที่ของสารลดแรงดึงผิว
3-6	ทำให้เกิดอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ
6-9	ทำให้เปียก
8-18	ทำให้เกิดอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน
13-15	ทำความสะอาด
15-18	เพิ่มขีดการละลายน้ำ

ดัดแปลงจาก: กองควบคุมยา (2544)

ตัวทำอิมัลชันที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือตัวทำอิมัลชันชนิดไม่มีประจุ (nonionic emulsifier) ในกลุ่มของ Tween และ Span ที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1974; Bassole *et al.*, 2002) ตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Tween ที่ใช้คือ Tween 20 มีสูตรทางเคมีคือ $C_{58}H_{114}O_{26}$ (รูปที่ 2.4 a) น้ำหนักโมเลกุล 1228 ละลายน้ำได้ดีและมีค่า HLB = 16.7 ส่วนตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span เป็นตัวทำอิมัลชันที่ละลายในน้ำมันและตัวทำละลายอินทรีย์ ในงานวิจัยนี้ใช้อิมัลชัน 3 ชนิดในกลุ่มนี้ ชนิดแรกคือ Span 20 มีสูตรทางเคมีคือ $C_{18}H_{34}O_6$ (รูปที่ 2.4 b) น้ำหนักโมเลกุล 346.6 และมีค่า HLB = 8.6 ชนิดที่สองคือ Span 60 ซึ่งเป็นเอสเทอร์ของ sorbitol และ stearic acid มีสูตรทางเคมี $C_{24}H_{46}O_6$ (รูปที่ 2.4 c) น้ำหนักโมเลกุล 430.62 และมีค่า HLB ประมาณ 4.7 ส่วนชนิดที่สามคือ Span 65 มีสูตรทางเคมี $C_{64}H_{114}O_8$ (รูปที่ 2.4 d) น้ำหนักโมเลกุล 430.62 และมีค่า HLB ประมาณ 2.1



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของตัวทำอิมัลชัน Tween 20 Span 20 Span 60 และ Span 65
ที่มา: Chemicalbook, 2008: ออนไลน์

ความเสถียรหรือความไม่เสถียรของอิมัลชันเป็นปัจจัยสำคัญต่อการใช้งานของอิมัลชัน ความไม่เสถียรของอิมัลชันนั้นเกิดขึ้นได้หลายอย่าง ได้แก่การนอนก้นและการเกิดครีม (sedimentation and creaming) การจับกลุ่ม (flocculation) การหลอมรวมตัว (coalescence) Ostwald ripening และการกลับวัฏภาค (phase inversion) มีรายละเอียดดังนี้ (Dickinson, 1992; Friberg *et al.*, 2004; Mclemants, 2007)

การนอนก้นและการเกิดครีม เกิดเนื่องจากความแตกต่างของความหนาแน่นระหว่างวัฏภาคต่อเนื่องและวัฏภาคกระจาย ทำให้อนุภาคของวัฏภาคกระจายเข้ามาอยู่ใกล้กันอย่างหนาแน่น เกิดความแตกต่างของความเข้มข้น (concentration gradient) ของอนุภาคในวัฏภาคกระจาย โดยเมื่อวัฏภาคกระจายมีความหนาแน่นมากกว่าวัฏภาคต่อเนื่อง จะเคลื่อนที่ภายใต้แรงโน้มถ่วงโลก ตกลงสู่ด้านล่างของอิมัลชันเกิดเป็นการนอนก้น (sedimentation) ในทางกลับกันเมื่อวัฏภาคกระจายมีความหนาแน่นน้อยกว่าวัฏภาคต่อเนื่อง อนุภาคของวัฏภาคกระจายเคลื่อนที่ขึ้นมาอยู่รวมกันอย่างหนาแน่นที่บริเวณส่วนบนของอิมัลชัน เกิดเป็นปรากฏการณ์เกิดครีม (creaming)

การจับกลุ่ม คือการที่อนุภาคของวัฏภาคกระจายเคลื่อนที่มาพบกันแล้วจับหรือเกาะกันเป็นกลุ่ม เนื่องจากมีแรงดึงดูดระหว่างอนุภาคเหล่านั้น โดยแต่ละอนุภาคยังคงมีฟิล์มของตัวทำอิมัลชันอยู่ล้อมที่ผิว ยังไม่มีการหลอมรวมกันของอนุภาคเหล่านั้น

การหลอมรวมตัว คือการที่อนุภาคของวัฏภาคกระจายที่อยู่ประชิดกันหลอมรวมเป็นอนุภาคเดียวกัน ให้ขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นแต่จำนวนอนุภาคลดลง ผลคือขนาดเฉลี่ยและการกระจายขนาดของอนุภาคของวัฏภาคกระจายเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม หากเกิดการหลอมรวมตัวกันมากขึ้นเรื่อยๆ ในที่สุดอิมัลชันก็แยกชั้น การหลอมรวมตัวอาจเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดต่อเนื่องจากการจับกลุ่มหรือการนอนก้นหรือการเกิดครีม

Ostwald ripening เกิดเนื่องจากอนุภาคของวัฏภาคกระจายมีขนาดแตกต่างกันและของเหลวที่เป็นวัฏภาคกระจาย สามารถละลายในวัฏภาคต่อเนื่องได้เล็กน้อย ถึงแม้ว่าจะเป็นของเหลวชนิดเดียวกัน แต่การละลายที่สภาวะสมดุล (equilibrium solubility) ของของเหลวในอนุภาคขนาดเล็ก สูงกว่าในอนุภาคขนาดใหญ่ จึงมีการแพร่ของของเหลวนี้จากอนุภาคขนาดเล็กไปสู่อนุภาคขนาดใหญ่ เป็นผลทำให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของวัฏภาคกระจายใหญ่ขึ้น

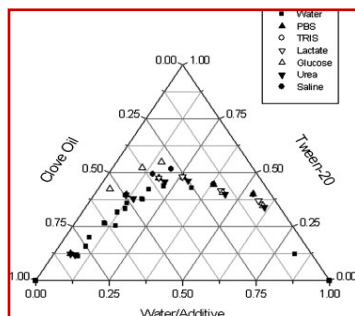
การกลับวัฏภาค คือการที่อิมัลชันเดิมที่เป็นชนิดน้ำในน้ำมันเปลี่ยนไปเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (หรือกลับกัน) การกลับวัฏภาคเกิดขึ้นได้ เมื่อสัดส่วนของวัฏภาคกระจายในอิมัลชันสูงขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือความเข้มข้นของวัฏภาคหนึ่ง หรือเติมสารอื่นลงในอิมัลชัน

ความไม่เสถียรของอิมัลชันอาจเกิดจากหลายปรากฏการณ์ร่วมกันโดยอาจเกิดขึ้นไปพร้อมๆ กัน หรือเป็นลำดับขั้นต่อนก็ได้ ยกเว้นการหลอมรวมตัวของอนุภาคกระจายไม่สามารถเกิดก่อนการจับกลุ่ม และ/หรือ การนอนกันหรือการเกิดครีมี

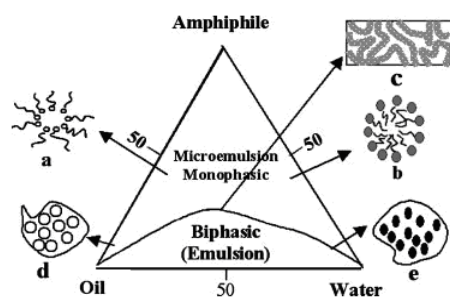
ขนาดอนุภาคของวิฏภาคกระจายเป็นปัจจัยสำคัญต่อความเสถียรของอิมัลชัน อิมัลชันที่อนุภาคของวิฏภาคกระจายมีขนาดเล็กมีความเสถียรต่อการจับกลุ่ม การหลอมรวมตัวและ Ostward ripening ซึ่งเป็นผลทำให้มีความเสถียรต่อการแยกชั้น (phase separation) อิมัลชันที่อนุภาคของวิฏภาคกระจายมีขนาดเล็ก < 1000 nm ($1 \mu\text{m}$) หรืออยู่ในช่วง 100-500 nm (0.1-0.5 μm) และมีการกระจายขนาดอนุภาคอยู่ในช่วงแคบ (monodisperse) เรียกว่า miniemulsion หรือ nanoemulsion ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของอนุภาคนั้น และในกรณีที่อิมัลชันนั้นมีความเสถียรตามหลักอุณหพลศาสตร์ (Wasan and Niikolov, 2001; Wennerstrom *et al.*, 2001) เรียกว่าจุลอิมัลชัน (microemulsion) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ทันทีเมื่อองค์ประกอบ (น้ำหรือสารละลายน้ำ น้ำมัน และตัวทำอิมัลชัน) เหมาะสมโดยมีการผสมเล็กน้อยไม่ต้องใช้พลังงานสูง โดยองค์ประกอบเป็นตัวกำหนดว่าอิมัลชันเป็นแบบน้ำมันในน้ำหรือน้ำในน้ำมัน (Leser *et al.*, 2006; Spermath and Aserin, 2006)

การเพิ่มความเสถียรของอิมัลชันทำได้โดย ลดความแตกต่างของความหนาแน่นระหว่างวิฏภาคต่อเนื้อและวิฏภาคกระจาย เพื่อลดการนอนกันหรือการเกิดครีมี การเพิ่มความหนืดให้กับวิฏภาคต่อเนื้อ ทำให้อนุภาคของวิฏภาคกระจายเคลื่อนที่ได้ช้าลง ชะลอการจับกลุ่มและการหลอมรวมตัว ในกรณีที่อิมัลชันเป็นแบบน้ำมันในน้ำ การใช้ตัวทำอิมัลชันที่มีประจุ ซึ่งทำให้เกิดแรงผลักรันที่ผิวของอนุภาคน้ำมันก็เป็นการชะลอการจับกลุ่มและการหลอมรวมตัวของอนุภาคน้ำมันด้วย (Dederidis *et al.*, 2009)

Gupta และ Moulik (2007) รายงานว่าเมื่อใช้ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชันสำหรับระบบน้ำมันกานพลูกับน้ำ พบว่าอิมัลชันที่ประกอบด้วยน้ำมันกานพลู Tween 20 และน้ำ เท่ากับร้อยละ 6 30 และ 65 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เป็นจุลอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำที่ใส อนุภาคของน้ำมันกานพลูมีขนาดอยู่ในช่วง 10-20 nm และอิมัลชันมีความเสถียรถึง 1 ปี เมื่อเก็บที่ 4-40 °C จาก phase diagrams ของระบบน้ำมันกานพลู Tween 20 และน้ำ (รูปที่ 2.5) พบว่าจุลอิมัลชันแบบน้ำมันกานพลูในน้ำที่เป็นวิฏภาคเดี่ยว (microemulsion monophasic) ดังแสดงในรูปที่ 2.6 เกิดได้เมื่อมีปริมาณกานพลูในระบบได้มากถึงร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก ถ้าใช้ Tween 20 ประมาณร้อยละ 45 โดยน้ำหนัก



รูปที่ 2.5 Phase diagram ของระบบน้ำมันกานพลู Tween 20 และน้ำ
ที่มา: Gupta และ Moulik (2007)



รูปที่ 2.6 Phase diagram ของอิมัลชัน

- a: water-in-oil microemulsion (monophasic)
- b: oil-in-water microemulsion (monophasic)
- c: bicontinuous region
- d: water-in-oil macroemulsion (biphasic)
- e: oil-in-water macroemulsion (biphasic)

ที่มา: Gupta และ Moulik (2007)

ค่า HLB ของตัวทำอิมัลชันมีความสำคัญมากต่อการเกิดอิมัลชันที่มีอนุภาคของวัฏภาคกระจายขนาดเล็กที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ ซึ่งเป็นผลทำให้อิมัลชันเสถียรที่สุด (Sagitani *et al.*, 1981; Liu *et al.*, 2006) สำหรับอิมัลชันของน้ำมันกานพลูในน้ำพบว่าค่า HLB ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 10-15 (Walter *et al.*, 1997) แต่เพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคที่เล็กที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้นั้น จึงมีการศึกษาการใช้ตัวทำอิมัลชัน 2 ตัว ร่วมกันเพื่อแปรค่า HLB (Gupta and Moulik, 2007) การใช้

ตัวทำอิมัลชัน 2 ตัว ร่วมกันทำให้เกิดการเรียงตัวสลับกันของโมเลกุลตัวทำอิมัลชัน 2 ชนิดที่ใช้กัน ที่ผิวอนุภาคของวัฏภาคกระจายได้ชิดกันได้มากกว่าเมื่อใช้ตัวทำอิมัลชันเพียงตัวเดียว ทำให้ผนังฟิล์มของตัวทำอิมัลชันล้อมรอบอนุภาคของวัฏภาคกระจายหนาแน่นและแข็งแรง (Porras *et al.*, 2004) การใช้ตัวทำอิมัลชันผสมมีหลักดังนี้คือ ตัวทำอิมัลชันตัวหนึ่ง (H) มีค่า HLB สูงกว่าค่า HLB ที่ต้องการ ส่วนอีกตัว (L) ต้องมีค่า HLB ต่ำกว่าค่า HLB ที่ต้องการ คำนวณสัดส่วนโดยน้ำหนักของตัวทำอิมัลชันทั้งสองนี้เพื่อให้ได้ค่า HLB ที่ต้องการ ได้จากสมการที่ 1 (Porras *et al.*, 2004)

$$HLB_m = HLB_H(\%H) + HLB_L(\%L) \quad [1]$$

เมื่อ

HLB_m = ค่า HLB ของตัวทำอิมัลชันผสม

HLB_H = ค่า HLB ของตัวทำอิมัลชัน H

HLB_L = ค่า HLB ของตัวทำอิมัลชัน L

$\%H$ = ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำอิมัลชัน H

$\%L$ = ร้อยละโดยน้ำหนักของตัวทำอิมัลชัน L

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการใช้ polyoxyethylene (80) sorbitan monooleate หรือ Tween 80 ร่วมกับ sorbitan monooleate หรือ Span 80 เพื่อการผลิตนาโนอิมัลชันของพาราฟิน ในน้ำพบว่าค่า HLB ที่เหมาะสมคือ 10.3 และความเข้มข้นรวมของตัวทำอิมัลชันที่ทำให้นาโนอิมัลชันของพาราฟินในน้ำเสถียรที่สุดเท่ากับร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก (Liu *et al.*, 2006) แต่ไม่พบรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการใช้ตัวทำอิมัลชันผสมสำหรับอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของการใช้ตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ซึ่งมีค่า HLB ต่ำ ร่วมกับ Tween 20 ต่อความเสถียรและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสำหรับอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ เพื่อการกำหนดสูตรสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ด้านแบคทีเรียที่ใช้ล้างผิวที่สัมผัสอาหาร

2.4 ประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียของอิมัลชัน

ในปัจจุบันการใช้อิมัลชันเพื่อต้านแบคทีเรียได้รับความสนใจกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอิมัลชันในระบบน้ำมันในน้ำ โดยมีสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียคือส่วนที่เป็นน้ำมัน (Hamouda *et al.*, 2000; Adham *et al.*, 2002; Daniels, 2006; Teixeira *et al.*, 2007) จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้ง *S. aureus* ของ glycerol monolaurate (GML) เปรียบเทียบกับอิมัลชัน GLM ในน้ำ ที่ใช้อิมัลชันคือ ethoxylated sorbitan ester และใช้ co-surfactant เป็น

alcohols พบว่า GML สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ร้อยละ 63.52 แต่เมื่ออยู่ในรูปอิมัลชัน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ได้เป็นร้อยละ 95.30 (Zhang *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายไมเซลล์ของ eugenol ที่ปริมาตรมากกว่าร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก โดยใช้ตัวทำอิมัลชันชนิดไม่มีประจุคือ Surfynol 485W ให้ค่า MIC ต่อบактерที่เรียที่ทดสอบคือ *L. monocytogenes* และ *E. coli* ที่ pH 5 6 และ 7 เท่ากับร้อยละ 0.2 0.5 และ 0.5 โดยปริมาตรตามลำดับ (Gaysinsky *et al.*, 2004) สำหรับอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองในน้ำที่ใช้ Triton X-100 เป็นตัวทำอิมัลชันสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *B. cereus* *B. subtilis* *Haemophilus influenzae* *Neisseria gonorrhoeae* *Streptococcus pneumoniae* และ *Vibrio cholerae* ได้ โดยสามารถลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกลงได้มากกว่า 5 log ภายใน 15 นาที แต่พบว่าไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ ซึ่งเป็นผลมาจากแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่เรียกว่า lipopolysaccharide (LPS) และมี negative surface charge ส่วนอิมัลชันมีประจุลบทำให้เกิดแรงผลักกันของอิมัลชัน อิมัลชันไม่สามารถไปเกาะที่ผนังเซลล์แบคทีเรียได้ (Hamouda *et al.*, 2000) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของอิมัลชัน ethyl oleate ที่ใช้ Tween 80 เป็นตัวทำอิมัลชัน พบว่าอิมัลชันมีขนาดอนุภาคเล็กกว่าอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลือง (ขนาดอนุภาคเฉลี่ยระดับนาโนเมตร) สามารถทำลายได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *P. aeruginosa* *L. monocytogenes* *S. aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* และ *Salmonella* spp ได้ (Teixeira *et al.*, 2007)

การที่อิมัลชันมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี เนื่องจากสารออกฤทธิ์ที่ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ เมื่ออยู่ในรูปอิมัลชันทำให้มีการกระจายตัวได้เพิ่มขึ้น (Zhang *et al.*, 2007) และอิมัลชันขนาดอนุภาคเล็กมีการทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ดี เนื่องจากอนุภาคขนาดเล็กจะมีการเคลื่อนที่แบบ thermodynamically ไปรวมอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียได้มาก ตัวทำอิมัลชันช่วยให้สารมีการสัมผัสกับเซลล์แบคทีเรียได้มากขึ้น ทำให้มีปริมาณสารออกฤทธิ์ต่อเซลล์แบคทีเรียปริมาณมากขึ้น ส่งผลให้ผนังเซลล์แบคทีเรียโดนทำลายและตายในที่สุด (Gaysinsky *et al.*, 2004; Daniels, 2006)

2.4.1 แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ และความสะอาดของอุปกรณ์ที่สัมผัส

อาหาร

ปัญหาท้องร่วงเป็นปัญหาเนื่องจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร ซึ่งยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของไทย จากรายงานการระบาดวิทยาปี 2553 พบว่าตั้งแต่ 1 มกราคม ถึง 26 เมษายน พ.ศ. 2553 มีผู้ป่วยอุจจาระร่วงทั้งสิ้น 397,320 ราย จาก 77 จังหวัด คิดเป็นอัตราการป่วยและตาย 630.28 และ 0.06 ต่อประชากรแสนคนตามลำดับ (สำนักงานระบาดวิทยา, 2553) และจากการสำรวจการระบาดของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร ในประเทศสหรัฐอเมริกา เนเธอร์แลนด์ แคนาดา และยูโกสลาเวีย พบสาเหตุหลักของโรคท้องร่วงเกิดจากอาหารที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้แก่

S. aureus *E. coli* และ *Salmonella* spp. และแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ ได้แก่ *Cl. Botulinum* *Cl. Perfringens* และ *B. cereus* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 อันดับการระบาดของแบคทีเรียหลักที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร ใน 4 ประเทศ

อันดับการระบาด	ประเทศ (ปี)				
	สหรัฐอเมริกา (1970s)	สหรัฐอเมริกา (1983-1987)	เนเธอร์แลนด์ (1979-1982)	แคนาดา (1975-1984)	ยูโกสลาเวีย (1986-1992)
1	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.
2	<i>S. aureus</i>	<i>Cl. Botulinum</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>S. aureus</i>	<i>Cl. Perfringens</i>
3	<i>Cl. Botulinum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Cl. Perfringens</i>	
4	<i>Cl. Perfringens</i>	<i>Shigella</i> spp.		<i>B. cereus</i>	

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ray และ Bhunia (2007)

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ขนาดประมาณ 0.5–1.5 μm ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ การจัดเรียงตัวของเซลล์อาจเป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ เป็นสายสั้นๆ ไม่เกิน 4 เซลล์ หรืออาจอยู่กันเป็นกลุ่มก้อนคล้ายพวงองุ่น (cluster-forming coccus) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 35–37 °C ส่วน pH ที่เหมาะสมคือ 6.0–7.0 สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 20 (Jay et al., 2005) ปริมาณของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้มากกว่าคือ 10^5 เซลล์ต่อกรัมของอาหาร และความเข้มข้นของเอนโทโรทอกซินเพียง 1 ng ต่อกรัมของอาหารที่ปนเปื้อนสามารถทำให้เกิด

โรคได้เช่นกัน (Jablonski and Bonach, 1997) การปนเปื้อนจาก *S. aureus* ในอาหารเกิดขึ้นได้ทั้งในระหว่างการผลิตและหลังจากการผลิต แหล่งของแบคทีเรียชนิดนี้มาจากมือของผู้ประกอบอาหาร อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ที่สัมผัสอาหาร เช่น มีด เขียง และเครื่องบดเนื้อ เป็นต้น (Jablonski and Bonach, 1997)

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน (rod) ขนาดประมาณ 0.5-1.0x1-6 μm (Pual and Diana, 1988) อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น ด้วยเหตุนี้จึงใช้แบคทีเรียนี้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร (index of faecal contamination) นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1971 เป็นต้นมา *E. coli* ได้รับการจัดไว้ในประเภทจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ สืบเนื่องจากการระบาดที่มาจากเนยแข็งนำเข้าในประเทศสหรัฐฯ ทำให้ผู้บริโภคเกือบ 400 คนใน 14 มลรัฐป่วย (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) ผลิตภัณฑ์อาหารที่มักพบเชื้อนี้ได้แก่ นม ผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัว ผักกาดหอม แครอท มะเขือยาว และในสลัด เป็นต้น (Burt, 2004) นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของ *E. coli* ในเชิงพลาสติกและเชิงไม้ ซึ่งหากมีการทำความสะอาดที่ไม่ดีพอ เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้มากกว่าร้อยละ 90 ภายใน 2 ชั่วโมง (Abrihami et al., 1994)

Salmonellae spp เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้ flagella มีขนาดประมาณ 0.5x1.0 μm (Pual and Diana, 1988) เจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 35–43 °C ส่วน pH ที่เหมาะสมคือ 7.0–7.5 แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษรุนแรงและเป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) โดยจำนวนเชื้อที่สามารถก่อโรคได้ (infection dose) อยู่ที่ 10^5 - 10^8 เซลล์ เชื้อนี้อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ได้ เช่น สัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงคชาน และในมนุษย์ ซึ่งบางครั้งอาจพบบริเวณร่างกายของมนุษย์และสัตว์ปีกได้ โดยแบคทีเรียที่จะออกมากับอุจจาระ โดยอาศัยแมลงสัตว์และน้ำแพร่กระจายเชื้อเข้าสู่สิ่งแวดล้อม ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มักพบเชื้อนี้ได้แก่ เนื้อ นม ไข่ และผักเป็นส่วนประกอบ ซึ่งสัตว์ปีกเป็นแหล่งที่มีการปนเปื้อนเชื้อที่สำคัญ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) นอกจากนี้ยังพบในปลาที่แล่เป็นเส้นๆ (Burt, 2004) นอกจากนี้ *Salmonellae spp.* เมื่อมีการปนเปื้อนลงบนพื้นผิวที่เป็นโลหะ แก้ว ยาง และพลาสติก สามารถเกาะติดพื้นผิวและเกิดเป็นไบโอฟิล์มขึ้นทำให้พื้นผิวที่มีการปนเปื้อนทำความสะอาดยากขึ้น (Stepanovic et al., 2004)

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนขนาดประมาณ 1.0–1.2 μm สร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ในช่วง pH 4.3–9.3 และ a_w มากกว่า 0.92 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28–37 °C (van Netten et al., 1990) B.

cereus ชนิดก่อให้เกิดอาการท้องร่วง (diarrhea type) ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากการสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ชนิดไม่ทนความร้อน (heat-labile toxins) พบได้ในทางเดินอาหารและอาหารที่เป็นพาหะ ทำให้เกิดอาการท้องร่วงรุนแรง เวียนศีรษะและปวดท้อง อาการของโรคคล้ายกับการติดเชื้อเนื่องจาก *Clostridium perfringens* ส่วน *B. cereus* ชนิดก่อให้เกิดอาการอาเจียน (emetic type) ทำให้เกิดโรคโดยการสร้างสารพิษชนิดทนร้อน (heat-stable toxins) ในอาหาร เมื่อได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อชนิดนี้เพียงไม่เกิน 5 ชั่วโมงจะเกิดอาการอาเจียนรุนแรง เวียนศีรษะ อาจมีอาการท้องเสียร่วมด้วย คล้ายกับอาการติดเชื้อจาก *S. aureus* นอกจากการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในอาหารแล้ว เซลล์ *B. cereus* ยังสามารถเกาะติดบนพื้นผิวต่างๆ เช่น สแตนเลสสตีล ซึ่งเป็นวัสดุหลักของอุปกรณ์และเครื่องมือในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้ (Peng et al., 2001) เมื่อเซลล์นั้นเกิดการเกาะติดบนพื้นผิวในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เซลล์เหล่านั้นอาจพัฒนาเป็นฟิล์มชีวภาพได้ ซึ่งการเกิดฟิล์มชีวภาพของ *B. cereus* มีผลทำให้เซลล์ของ *B. cereus* ภายในฟิล์มชีวภาพนั้นต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้มากกว่าเซลล์แขวนลอย (planktonic cells) และเซลล์เกาะติด (attached cells) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกาะติดของเซลล์และสปอร์ พบว่า สปอร์สามารถเกาะติดบนพื้นผิวได้ดีกว่าเซลล์หลายเท่าเนื่องจากมีความเป็น hydrophobic (Peng et al., 2001)

เห็นได้ว่าปัจจัยที่ก่อให้เกิดการระบาดของเชื้อนอกจากคน สัตว์ อาหาร และน้ำแล้วยังมีสิ่งอื่นที่แบคทีเรียเหล่านี้สามารถปนเปื้อนอยู่ เช่น ภาชนะและอุปกรณ์ที่ใช้ประกอบอาหาร ซึ่งเมื่อมีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย โอกาสที่เชื้อเหล่านี้เข้าสู่ร่างกายย่อมมีมากขึ้น (Ray and Bhunia, 2007) จึงต้องมีการทำความสะอาดภาชนะอุปกรณ์อย่างถูกต้องลักษณะ โดยขั้นตอนการล้างทำความสะอาดมี 5 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนการทำความสะอาด 3 ขั้นตอน และขั้นตอนการฆ่าเชื้ออีก 2 ขั้นตอน (McLamborough, 2003) ดังนี้

- กำจัดสิ่งสกปรก (soil or dirt) ขนาดใหญ่ด้วยวิธีกล เช่นปัด กวาด ขัด ถู หรือชะด้วยน้ำสะอาดเป็นต้น
- กำจัดสิ่งสกปรกที่เหลือด้วยสารชะล้าง (detergent)
- ล้างด้วยน้ำสะอาด (rinsing) เพื่อล้างสารชะล้างและสิ่งสกปรก
- ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนหรือสารฆ่าเชื้อ
- ล้าง (rinsing) สารฆ่าเชื้อออกจากพื้นผิวอุปกรณ์

ปัญหาในการทำความสะอาดอุปกรณ์คือ สารที่ใช้ในการฆ่าเชื้อเป็นพวกสารเคมี เมื่อมีการตกค้างในอุปกรณ์การผลิตอาหาร อาจมีการปนเปื้อนลงสู่อาหารและทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ หรือแบคทีเรียอาจมีการต้านทานสารฆ่าเชื้อได้มากขึ้น (Teixeira *et al.*, 2007) งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาสารจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อที่ผิวอุปกรณ์สัมผัสอาหาร ซึ่งใช้น้ำมันกานพลูเป็นสารออกฤทธิ์ โดยทำให้อยู่ในรูปอิมัลชันเพื่อเพิ่มการกระจายตัวของน้ำมันในน้ำได้ดีขึ้น

บทที่ 3 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

แบคทีเรียที่ศึกษาเป็นแบคทีเรียแกรมบวกก่อโรคในอาหารได้แก่ *Staphylococcus aureus* 25923 และ *Bacillus cereus* ATCC 6228 แบคทีเรียแกรมลบก่อโรคในอาหารได้แก่ *Escherichia coli* 25922 และ *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข การดำเนินการวิจัยประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

3.1 การศึกษาผลของปริมาณน้ำมันกานพลู ปริมาณ Tween 20 และระยะเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียง ต่อการเกิดอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ความเสถียรของอิมัลชันขนาดอนุภาคน้ำมันเจลลี่และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค

3.1.2 การเตรียมอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ โดยใช้ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน

3.1.2.1 การเตรียมสารละลาย Tween 20 ในน้ำ (วัฏภาคน้ำ)

ละลาย Tween 20 (analytical grade, Merck, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Germany) ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยแปรปริมาณของ Tween 20 ดังแสดงในตารางที่ 3.1 เขย่าเบาๆ ให้ Tween 20 ละลายอย่างช้าๆ จน Tween 20 ละลายหมดที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) ระวังไม่ให้อิมัลชันเกิดฟอง

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ (ร้อยละโดยน้ำหนัก) เมื่อใช้ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน

องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		
น้ำมันกานพลู	Tween 20	น้ำ
16.67	0.62	82.71
	1.25	82.08
	3.75	79.58
37.50	0.62	61.88
	1.25	61.25
	3.75	58.75
50.00	0.62	49.38
	1.25	48.75
	3.75	46.25

3.1.2.2 การเตรียมอิมัลชัน

ซึ่งน้ำมันกานพลู (บริษัทศรีจันทร์สหโอสถจำกัด, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย) เพื่อผสมกับสารละลาย Tween 20 ในน้ำ (ที่เตรียมใน 3.1.2.1) โดยแปรปริมาณน้ำมันกานพลูและปริมาณ Tween 20 ตามตารางที่ 3.1 แล้วเติมน้ำมันกานพลูลงในสารละลาย Tween 20 ในน้ำ พร้อมกวนให้หยดน้ำมันกานพลูแขวนลอยในสารละลาย Tween 20 ในน้ำ แล้วนำไปทำให้หยดน้ำมันมีขนาดเล็กและกระจายในสารละลาย Tween 20 ในน้ำได้ดีขึ้นโดยใช้คลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 400 Watt amplitude 100 μm และ 24 kHz (Hielscher UP400S ultrasonic processor, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany) ใช้ probe Horn H22 เส้นผ่านศูนย์กลาง 22 mm โดยแปรระยะเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียง 5 10 และ 30 นาที (ให้คลื่นเหนือเสียง 5 นาที แล้วปิด 5 นาที สลับกันจนครบเวลาให้คลื่นเหนือเสียงตามที่กำหนด) โดยหล่อภาชนะที่ใช้ด้วยน้ำผสมน้ำแข็งตลอดเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงเพื่อถ่ายเทความร้อน จากนั้นเก็บอิมัลชันที่เตรียมได้ในขวดแก้วสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) เพื่อนำไปวิเคราะห์

- ความเสถียรในสภาวะปกติทุกวัน ตามรายละเอียดในข้อ

3.10.1.1

- ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยโดยปริมาตร (mean volume diameter, $d_{4,3}$) ตามรายละเอียดในข้อ 3.10.2 ซึ่งต่อไปเรียกว่าขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ที่ระยะเวลาการเก็บอิมัลชันหลังการเตรียม 7 วัน สำหรับอิมัลชันที่ไม่แยกชั้นหลังการเตรียม 7 วัน และที่ระยะเวลาการเก็บอิมัลชันหลังการเตรียม 167 วัน เฉพาะอิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 และน้ำมันกานพลู ร้อยละ 3.75 และ 37.50 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และใช้คลื่นเหนือเสียง 30 นาที ซึ่งเป็นอิมัลชันที่ให้ค่า MIC สูงสุด (จากผลในข้อ 4.1) โดยนำส่วนที่ยังคงมีลักษณะของอิมัลชันไปวิเคราะห์ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ในกรณีที่มีอิมัลชันแยกชั้นในวันที่วิเคราะห์
- ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 ที่ระยะเวลาการเก็บอิมัลชันหลังการเตรียม 14 วัน โดยวิเคราะห์เฉพาะอิมัลชันเฉพาะที่ไม่แยกชั้น ตามรายละเอียดในข้อ 3.10.6.1

3.2 การศึกษาผลของตัวทำละลายและระยะเวลาการเก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูสำหรับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

เจือจางน้ำมันกานพลู โดยดูดน้ำมันกานพลู 100 μ l ใส่หลอด eppendorf (PLASTICBRAND, Wertheim, Germany) ขนาด 1.5 ml จากนั้นเติมตัวทำละลาย 900 μ l ลงไป โดยแปรชนิดตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ DMSO (Fisher Scientific UK Limited, Leicestershire, UK) Tween 20 ร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันกานพลูเท่ากับ 104.7 mg/ml (น้ำมันกานพลูปริมาตร 1000 μ lหนัก 1047 mg) แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง vortex mixer (Maxi Mix II, Thermolyne, Ontario, Canada) เก็บไว้ในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) แล้วนำมาวิเคราะห์ค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 *E. coli* ATCC 25922 *S. Choleraesuis* ATCC 10708 และ *B. cereus* ATCC 6228 หลังการเตรียม 1 7 30 60 และ 90 วัน ตามรายละเอียดในข้อ 3.10.6.2

3.3 การศึกษาผลของปริมาณ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก

เตรียมอิมัลชันตามวิธีการในข้อ 3.1.2 แต่ใช้ปริมาณน้ำมันกานพลูคงที่ ที่ร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นปริมาณน้ำมันกานพลูที่คัดเลือกแล้วจากผลการทดลองข้อที่ 4.1 ใช้คลื่นเหนือเสียงที่ระดับ amplitude 80 μm เป็นเวลา 30 นาที และแปรปริมาณ Tween 20 เท่ากับร้อยละ 10.00 15.00 และ 20.00 โดยน้ำหนัก เก็บอิมัลชันที่เตรียมได้ในขวดแก้วสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) แล้วนำไปวิเคราะห์

- ความเสถียรในสภาวะปกติและขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่ระยะเวลาการเก็บ 1 7 และ 30 วัน หลังการเตรียมอิมัลชันตามรายละเอียดในข้อ 3.10.1.1 และข้อ 3.10.2 ตามลำดับ
- ค่า MBC ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 *E. coli* ATCC 25922 *S. Choleraesuis* ATCC 10708 และ *B. cereus* ATCC 6228 ที่ระยะเวลาการเก็บ 1 7 และ 30 วัน หลังการเตรียมอิมัลชัน ตามรายละเอียดในข้อ 3.10.6.2

3.4 การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

เตรียมอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีตัวทำอิมัลชันผสมระหว่างตัวทำอิมัลชันที่ละลายในน้ำคือ Tween 20 และตัวทำอิมัลชันที่ละลายในน้ำมัน ซึ่งเป็นตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span โดยความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและน้ำคงที่ ที่ร้อยละ 37.50 และ 47.50 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (ค่าความเข้มข้นนี้ได้จากการคัดเลือกปริมาณน้ำมันกานพลูสูงสุดที่สามารถเกิดเป็นอิมัลชันได้จากผลการทดลองข้อ 4.1) ความเข้มข้นรวมของตัวทำอิมัลชันผสมคงที่ ที่ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก (ซึ่งค่าความเข้มข้นที่เลือกเท่ากับค่าความเข้มข้นของ Tween 20 ที่ให้ความเสถียรสูงสุดจากผลการทดลองข้อ 4.3) แปรชนิดของ Span 3 ชนิด ได้แก่ Span 20 (Fluka, Madrid, Spain) ซึ่งมีค่า HLB = 8.6 Span 60 (Fluka, Madrid, Spain) ซึ่งมีค่า HLB = 4.7 หรือ Span 65 (Fluka, Madrid, Spain) ซึ่งมีค่า HLB = 2.1 เพื่อศึกษาผลของโครงสร้างของ Span และแปรความเข้มข้นของ Tween 20 และ Span ทั้ง 3 ชนิด เพื่อศึกษาผลของค่า HLB ผสม คือ 10 11 13 และ 15 ต่อความเสถียรและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูโดยความเข้มข้นของ Tween 20 และ Span ที่ใช้แสดงในตารางที่ 3.2 ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ 1 (Porras *et al.*, 2004) การเตรียมอิมัลชัน 100 g มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

เตรียมวฏภาคน้ำโดยสารละลาย Tween 20 ในน้ำ ตามวิธีการในข้อ 3.1.2.1 โดยมีปริมาณน้ำคงที่ที่ 47.50 g และแปรปริมาณของ Tween 20 ดังแสดงในตารางที่ 3.2

เตรียมวฏภาคน้ำมันโดยละลายตัวทำอิมัลชันที่ละลายในน้ำมันได้แก่ Span 20 หรือ Span 60 หรือ Span 65 ในน้ำมันกานพลูที่ปริมาณคงที่ 37.50 g แปรปริมาณของ Span ชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.2 กวนด้วยแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) จน Span ละลายหมด

วัดค่าแรงตึงระหว่างผิวประจัน (interfacial tension) ของวฏภาคน้ำและวฏภาคน้ำมันต่างๆ ที่เตรียมได้ ตามรายละเอียดในข้อ 3.10.5

ผสมวฏภาคน้ำกับวฏภาคน้ำมันเข้าด้วยกันให้มอดั้ประกอบตามตารางที่ 3.2 กวนให้หยदन้ำมันกานพลูแขวนลอยในสารละลายน้ำ แล้วนำไปทำให้หยदन้ำมันแตกมีขนาดเล็กลงและกระจายในสารละลายน้ำได้ดีขึ้นโดยใช้คลื่นเหนือเสียง ตามวิธีการในข้อ 3.3 จากนั้นเก็บอิมัลชันที่เตรียมได้ในขวดแก้วสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) แล้วนำไปวิเคราะห์

- ความเสถียรในสภาวะปกติ ความเสถียรในสภาวะเร่ง และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่ระยะเวลาการเก็บ 1 7 14 21 และ 35 วัน หลังการเตรียมอิมัลชัน ตามรายละเอียดในข้อ 3.10.1.1, 3.10.1.2 และข้อ 3.10.2 ตามลำดับ
- ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ที่ระยะเวลาการเก็บ 1 7 14 21 28 และ 35 วัน หลังการเตรียมอิมัลชัน ตามรายละเอียดในข้อ 3.10.6.2

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของอิมัลชันน้ำมันการพลูในน้ำที่ค่า HLB ผสม ต่างๆ เมื่อใช้ตัวทำอิมัลชันผสมระหว่างสารละลาย Tween 20 ในน้ำ และสารละลาย Span ชนิดต่างๆ ในน้ำมันการพลู

ค่า HLB ผสม	องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)					
	น้ำ	น้ำมันการพลู	ตัวทำอิมัลชัน			
			ชนิดที่ละลายในน้ำ		ชนิดที่ละลายในน้ำมัน	
			Tween 20	Span 20	Span 60	Span 65
10	47.50	37.50	2.55	12.45	-	-
	47.50	37.50	6.60	-	8.40	-
	47.50	37.50	8.10	-	-	6.90
11	47.50	37.50	4.50	10.50	-	-
	47.50	37.50	7.83	-	7.13	-
	47.50	37.50	9.00	-	-	6.00
13	47.50	37.50	8.10	6.90	-	-
	47.50	37.50	10.50	-	4.50	-
	47.50	37.50	11.25	-	-	3.75
15	47.50	37.50	12.00	3.00	-	-
	47.50	37.50	12.88	-	2.12	-
	47.50	37.50	13.20	-	-	1.80

คัดเลือกอิมัลชันน้ำมันการพลูที่มีความเสถียรและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดีที่สุดเป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่พื้นผิวสัมผัสอาหาร และนำมาศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออายุการเก็บสมบัติด้านกายภาพของผลิตภัณฑ์ ลักษณะของผนังเซลล์แบคทีเรียหลังสัมผัสผลิตภัณฑ์ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และกลั่นน้ำมันการพลูที่ติดกับอาหารทางประสาทสัมผัสต่อไป

3.5 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อระยะเวลาในการเก็บผลิตภัณฑ์น้ำมันกานพลูในน้ำ เติร์ยมอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำซึ่งมีองค์ประกอบของน้ำมันกานพลู ตัวทำอิมัลชันผสม (Tween 20 ร่วมกับ Span 20) ที่มีค่า HLB เท่ากับ 15 และ น้ำ เท่ากับร้อยละ 37.50 15.00 และ 47.50 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (ซึ่งเป็นองค์ประกอบของอิมัลชันที่ให้ความเสถียรและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงสุดจากผลการทดลองข้อ 4.4) ตามวิธีการในข้อ 3.4 แบ่งอิมัลชันใส่ขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 45 และ 55 °C แล้วนำมาวิเคราะห์

- ความเสถียรในสภาวะปกติ ความเสถียรในสภาวะเร่ง และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่ระยะเวลาการเก็บ 1 7 14 21 และ 35 วัน หลังการเตรียมอิมัลชัน ตามรายละเอียดในข้อ 3.10.1.1, 3.10.1.2 และข้อ 3.10.2 ตามลำดับ
- ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ที่ระยะเวลาการเก็บ 1 7 14 21 28 และ 35 วัน หลังการเตรียมอิมัลชัน ตามรายละเอียดในข้อ 3.10.6.2

3.6 การวิเคราะห์สมบัติด้านกายภาพของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

- วัดความหนืดและความหนาแน่นของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูด้วย capillary viscometer แบบ Cannon-Fenske (Cannon Instrument Company, PA, USA) ขนาด 50 ที่อุณหภูมิ 29 °C ในน้ำตามรายละเอียดในข้อ 3.10.3
- วัดสีของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำตามรายละเอียดในข้อ 3.10.4

3.7 การวิเคราะห์ลักษณะของผนังเซลล์แบคทีเรียหลังสัมผัสผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

เตรียมสารละลายอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่ปริมาณความเข้มข้นเท่ากับค่า MBC ที่ได้จากการทดลองข้อ 4.3 ปริมาตร 1 ml ใส่ในหลอด eppendorf จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้อ 3.10.6 ปริมาตร 50 μ l ลงไป นำไปบ่มที่ 37°C ในสภาวะที่มีออกซิเจน 18 \pm 2 ชั่วโมง แล้วนำไปส่องดูลักษณะของผนังเซลล์แบคทีเรียหลังสัมผัสอิมัลชัน เปรียบเทียบกับผนังเซลล์แบคทีเรียก่อนสัมผัสอิมัลชัน ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM: JEOL รุ่น JSM-5410LV, Tokyo, Japan)

3.8 การศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

3.8.1 ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อไก่บด

เตรียมแบคทีเรียจากเนื้อไก่บด โดยซั้งไก่บดจากตลาดสดสามย่าน กรุงเทพฯ น้ำหนัก 25 g ใส่ในถุง stomacher แล้วเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร 225 ml ตีตัวอย่างให้กระจายทั่วด้วยเครื่องตีตัวอย่าง (stomacher) เป็นเวลา 2 นาที ได้เป็นสารแขวนลอยแบคทีเรียจากเนื้อไก่

นำสารแขวนลอยส่วนใสที่ได้จากข้างต้นไปวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ด้วยวิธี Total viable count โดยการ spread plate บนอาหาร plate count agar (PCA, Himedia, Mumbai, India) ตามวิธีของ AOAC (2000) แสดงในภาคผนวก ก เพื่อให้หาจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น

ทดสอบประสิทธิภาพของอิมัลชันน้ำมันกานพลู โดยนำสารละลายอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ MBC ใส่ในหลอดปลอดเชื้อ ปริมาตร 9 ml จากนั้นเปิดสารแขวนลอยแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้างต้น 1 ml ใส่ลงในหลอดแล้วปั่นด้วย vortex mixer จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นลดลง 10 เท่า จากนั้นทำการเปิดตัวอย่างสารละลายผสมดังกล่าวมา 1 ml ที่เวลา 0 1 15 30 และ 60 นาที นำไปตรวจนับแบคทีเรียที่รอดชีวิตด้วยการ spread plate บนอาหาร PCA ตามวิธีของ AOAC (2000) คำนวณและรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลลิเมตร (cfu/ml) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.8.2 ประสิทธิภาพการทำลายแบคทีเรียบนพื้นผิวเชิงพลาสติกที่สัมผัสอาหารของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

3.8.2.1 การเตรียมพื้นผิวเชิงพลาสติก

พื้นผิวเชิงพลาสติกที่ใช้ในการทดลอง คือ เชิงพลาสติก no. M28 (บริษัทศรีไทยซูเปอร์แวร์จำกัด, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย) โดยตัดพื้นผิวให้มีขนาด 6x4 cm และนำมาทำความสะอาดครั้งหนึ่ง โดยการแช่ด้วยสารละลายน้ำยาล้างจาน (ซินไลต์, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ซึ่งมี linear alkyl benzene sulfonate เป็น active ingredient อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และแช่ด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร เป็นเวลา 2 นาที และทิ้งไว้ให้แห้ง (ดัดแปลงจาก Somers and Wong, 2004)

จากนั้นใช้ช้อนที่ปราศจากเชื้อเกลี่ยเนื้อไก่บดน้ำหนัก 20 g บนเขียงพลาสติกให้มีพื้นที่ 5x4 cm ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) เป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลานำเนื้อไก่บดออกจากเขียงพลาสติกโดยวิธีปราศจากเชื้อ จากนั้นตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดบนพื้นผิวด้วยวิธี swab โดยใช้ sterile cotton swab เปียกกวาดเชื้อบนเขียงพลาสติกด้านที่สัมผัสเนื้อไก่บดพื้นที่ขนาด 5x2 cm นำ cotton swab จุ่มในหลอดทดลองบรรจุสารละลายเปปโตเนอความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร ปริมาณ 10 ml บั่นด้วย vortex mixer แล้วทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียด้วยการ spread plate ตามวิธีของ AOAC (2000) คำนวณและรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อพื้นผิว 1 ตารางเซนติเมตร (cfu/cm^2) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

นำเขียงพลาสติกที่เตรียมได้จากวิธีการข้างต้น ไปล้างทำความสะอาดสะอาดครั้งที่สอง โดยล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 300 ml เพื่อกำจัดเศษเนื้อไก่ที่ติดอยู่ที่เขียงพลาสติก ล้างด้วยสารละลายน้ำยาล้างจานความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ปริมาตร 300 ml ที่อุณหภูมิ 40°C พร้อมกับการขัด ถู ด้วยแปรงล้างหลอดทดลอง ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 300 ml อีกรอบ

ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียบนพื้นผิวเขียงพลาสติกหลังการทำความสะอาด ด้วยวิธี swab เขียงพลาสติกด้านที่สัมผัสเนื้อไก่บดพื้นที่ขนาด 5x2 cm ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียด้วยการ spread plate ตามวิธีของ AOAC (2000) คำนวณและรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อพื้นผิว 1 ตารางเซนติเมตร (cfu/cm^2) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.8.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพการทำลายแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์อิมัลชันบนพื้นผิวเขียงพลาสติก

นำเขียงพลาสติกใหม่ที่เตรียมได้จากวิธีการข้อ 3.8.2.1 หลังทำความสะอาดครั้งที่สอง มาทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของผลิตภัณฑ์ โดยเตรียมสารละลายอิมัลชันที่ความเข้มข้นเท่ากับ MBC ที่เลือกได้จากผลการทดลองข้อ 4.4 ปริมาตร 200 ml แช่เขียงพลาสติกในอิมัลชันตามเวลาที่กำหนด คือ 0 1 15 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลาใช้ปากคีบปลอดเชื้อคีบเขียงพลาสติกขึ้นมาล้างโดยการจุ่มเขียงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 300 ml แล้วทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิตบนพื้นผิวด้วยวิธี swab โดยใช้ sterile cotton swab เปียกกวาดเชื้อบนเขียงพลาสติกด้านที่สัมผัสเนื้อไก่บดพื้นที่ขนาด 5x2 cm บริเวณที่ไม่ซ้ำกับข้อ 3.8.2.1 ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียด้วย เทคนิคการ spread plate ตามวิธีของ

AOAC (2000) คำนวณและรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อพื้นผิว 1 cfu/cm^2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.9 การทดสอบทางประสาทสัมผัสเพื่อหากลิ่นน้ำมันกานพลูที่ติดกับอาหาร

นำแข็งพลาสติกขนาด $15 \times 12.5 \text{ cm}$ แช่น้ำหรือในสารละลายอิมัลชันที่ความเข้มข้นเท่ากับค่า MBC ปริมาตร 1000 ml และเวลาที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้จากผลการทดลองข้อ 4.3 เมื่อครบเวลาแล้วนำแข็งพลาสติกมาล้างน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นนำเนื้อสันไก่สดจากตลาดสามย่าน กรุงเทพฯ ขึ้นขนาดประมาณ $5 \times 15 \times 2 \text{ cm}$ มาหั่นบนแข็งพลาสติกให้มีขนาด $2 \times 1 \times 1 \text{ cm}$ นำไก่ที่หั่นไปทำให้สุกโดยเข้าไมโครเวฟ (R-246 Sharp, Bangkok, Thailand) ที่กำลังระดับสูงสุด (800 วัตต์) เป็นเวลา 5 นาที นำเนื้อไก่สุกมาทดสอบความแตกต่างทางด้านกลิ่นของเนื้อไก่ที่หั่นบนแข็งที่แช่น้ำ (ตัวอย่างควบคุม) และเนื้อไก่ที่หั่นบนแข็งที่แช่อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ด้วยวิธี Triangle test (Meilgaard *et al.*, 1997) โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 20 คน แบบทดสอบแสดงในภาคผนวก ข

3.10 วิธีวิเคราะห์

3.10.1 ความเสถียรของอิมัลชัน

3.10.1.1 ศึกษาการแยกชั้นของอิมัลชันในสภาวะปกติ

โดยเก็บอิมัลชันที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์นี้ในขวดแก้วใส เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 cm สูง 10 cm ใส่อิมัลชันปริมาณ 10 ml (สูง 4 cm) และเก็บไว้ในที่มีดที่อุณหภูมิห้อง และนำออกมาตรวจสอบทุกวันในสัปดาห์แรก จากนั้นนำออกมาตรวจสอบเดือนละครั้งจนกว่าจะมีการแยกชั้น (Badolato *et al.*, 2006) ในกรณีที่มีการแยกชั้นวัดขนาดความสูงของอิมัลชันชั้นบนด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์

3.10.1.2 ศึกษาการแยกชั้นของอิมัลชันในสภาวะเร่งโดยการปั่นเหวี่ยงอิมัลชัน

ใส่อิมัลชันปริมาณ 1 ml ในหลอด eppendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich Zentrifugen Mikro 22R, Germany) ที่แรง 2,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 1^\circ \text{C}$) แล้ววัดขนาดความสูงของน้ำมันกานพลูเมื่อมีการแยกชั้นด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ (ดัดแปลงจาก Persand *et al.*, 2000) และนำความสูงไปคำนวณหาปริมาณน้ำมันตามภาคผนวก ค

3.10.2 ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและลักษณะของอนุภาคน้ำมัน

วิเคราะห์ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยแบบค่าเฉลี่ยโดยปริมาตร (mean volume diameter, $d_{4,3}$) ของอิมัลชันด้วยเครื่อง Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK) ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้ deionize water เป็น liquid dispersant (Goloub *et al.*, 2005) และวัดค่า refractive index ของน้ำมันกานพลูด้วย refractometer แบบ Abbe (ATAGO 1T, ATAGO Co., Ltd., Tokyo, Japan) ซึ่งได้ค่าเท่ากับ 1.531 และศึกษาลักษณะของอนุภาคน้ำมันด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยนำอิมัลชันไปเจือจางด้วยน้ำหมึก parker สีน้ำเงิน (Sanford brands, France) ในอัตราส่วนโดยปริมาตรของอิมัลชัน:น้ำหมึก เท่ากับ 1:1 แล้วนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ (trinocular phase contrast microscope, Olympus BX51, Tokyo, Japan) ที่กำลังขยาย 40 เท่า และบันทึกภาพโปรแกรม PCTV usb2 vision

3.10.3 ความหนืดและความหนาแน่นของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

วัดความหนืดของผลิตภัณฑ์โดยนำอิมัลชันปริมาตร 10 ml ใส่ใน capillary viscometer แบบ Cannon-Fenske (Cannon Instrument Company, PA, USA) ขนาด 50 นำไปแช่ใน viscometer bath ที่อุณหภูมิ 29 °C 30 นาที แล้วปล่อยให้อิมัลชันไหลอย่างอิสระภายใต้แรงดึงดูดของโลกผ่านหลอดแก้วเล็กๆ เริ่มจับเวลาเมื่อส่วนบน (head level) ของน้ำมันตัวอย่างไหลถึงจุดจับเวลาจุดแรก (start mark) และหยุดเมื่อถึงจุดจับเวลาจุดที่สอง (stop mark) พร้อมหาความหนาแน่นของผลิตภัณฑ์ด้วย Pycnometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นสารเทียบ ความหนืดและความหนาแน่นของน้ำที่ 29 °C เท่ากับ 0.815 mPa·s และ 0.996 g/ml ตามลำดับ (Batty and Folkman, 1983) นอกจากนี้ยังใช้วิธีนี้วัดความหนาแน่นของสารละลาย Tween 20 ในน้ำ และสารละลาย Span ในน้ำมันกานพลูอีกด้วย

3.10.4 วัดสีของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

ค่าที่วัดคือ ค่า L เป็นค่าความสว่างของสี (L, lightness), a^* เป็นค่าความเป็นสีแดงถึงเขียว (a^* , redness- greenness) และ b^* ค่าความเป็นสีเหลือง (b^* , yellowness-blueness) ของอิมัลชันตามระบบ CIE ด้วยเครื่อง Konica Minolta CR-300 Chroma Meter (Osaka, Japan) แหล่งกำเนิดแสง D_{65} หัววัด CR-A71 ก่อนทำการวัดปรับมาตรฐานเครื่องด้วยแผ่นมาตรฐานสีขาว (L_0^* : 93.2; a_0^* : 0.3133; b_0^* : 0.3192) แล้วจึงวัดค่าสีของผลิตภัณฑ์ (Koffi *et al.*, 2005)

3.10.5 การวัดแรงตึงระหว่างผิว (interfacial tension) ระหว่างสารละลาย Tween 20 ในน้ำ (วัฏภาคน้ำมัน) และสารละลาย Span ชนิดต่างๆ ในน้ำมันกานพลู (วัฏภาคน้ำ)

นำสารละลาย Tween 20 ในน้ำและสารละลาย Span ชนิดต่างๆ ในน้ำมันกานพลูที่เตรียมได้จากข้อ 3.4 มาทำการวัดแรงตึงระหว่างผิว ด้วยวิธี pendent drop method (Drop master, Kyowa Interface Science Co, Ltd. Tokyo, Japan) ดังแสดงในภาคผนวก ง

3.10.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

เตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923 *E. coli* ATCC 25922 *S. Choleraesuis* ATCC 10708 และ *B. cereus* ATCC 6228 โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียจากอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA, Himedia, Mumbai, India) 1 loop ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Nutrient Broth (NB, Himedia, Mumbai, India) ปริมาตร 5 ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะมีความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ 10^7 - 10^8 cfu/ml จากการยืนยันโดยการนับจำนวนโคโลนี ของเชื้อที่ spread ในอาหารวุ้นแข็ง NA แล้วนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมง (Badolato *et al.*, 2006)

3.10.6.1 ค่า MIC ของอิมัลชันกานพลูต่อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำอิมัลชันที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 มาหาค่า MIC โดยใช้วิธีการทดสอบแบบ disc agar diffusion assay ตามวิธีของ Wannissorn และคณะ (1996) โดย spread คัลเจอร์ของแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 แต่ละเชื้อบนอาหาร Nutrient Agar จากนั้นจุ่ม paper disc (ขนาด 0.6 cm) ลงในสารละลายที่ต้องการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่เจือจางโดยใช้เทคนิค broth dilution (NCCLS, 1995) และวางลงบนอาหารที่ spread แบคทีเรียไว้แล้ว ป่มที่ 37 °C นาน 18 ± 2 ชั่วโมง ในสภาพมีอากาศ ตรวจฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยการวัดขนาด clear zone ที่เกิดขึ้นรอบ paper disc โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (cm) ที่มีขนาด clear zone มากกว่า 0.8 cm ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ ค่า MIC ที่ได้คิดเป็นปริมาณอิมัลชัน (ร้อยละโดยปริมาตร)

3.10.6.2 ค่า MBC ของสารละลายน้ำมันกานพลูและอิมัลชันกานพลูต่อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำสารละลายน้ำมันกานพลูที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 และอิมัลชันที่เตรียมได้จากข้อ 3.3 3.4 และ 3.5 มาหาค่า MBC ใช้วิธีการทดสอบแบบ broth

microdilution assay ตามวิธีของ Bassole และคณะ (2002) โดยนำสารที่เตรียมได้ในข้อ 3.2.1 มาเจือจางกับอาหารเหลว Nutrient Broth (NB, Himedia, Mumbai, India) ด้วยเทคนิค serial doubling dilution 8 ระดับ ในช่วงความเข้มข้น 3.98–500 $\mu\text{l/ml}$ เจือจางใน 96-well microtiter plate โดยใส่ NB ปริมาตร 100 μl ลงในทุกหลุมก่อน และหลุมสุดท้ายให้ดูดสารทิ้งไป 100 μl ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 100 μl จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้อ 3.10.6 ปริมาตร 5 μl ลงในอาหารแต่ละหลุม นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 18±2 ชั่วโมง ในสภาพมีอากาศ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ผสมเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ไม่ผสมเชื้อเป็นตัวควบคุมบวก จากนั้นตรวจหาค่า MBC โดยถ่ายเชื้อด้วยการ streak ลงบนอาหารแข็ง NA นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 18±2 ชั่วโมง ในสภาพมีอากาศ ประเมินได้จากการสังเกตความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง NA ถือว่าความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC โดยคิดเป็นปริมาณน้ำมันกานพลูในหน่วย mg/ml ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

บทที่ 4

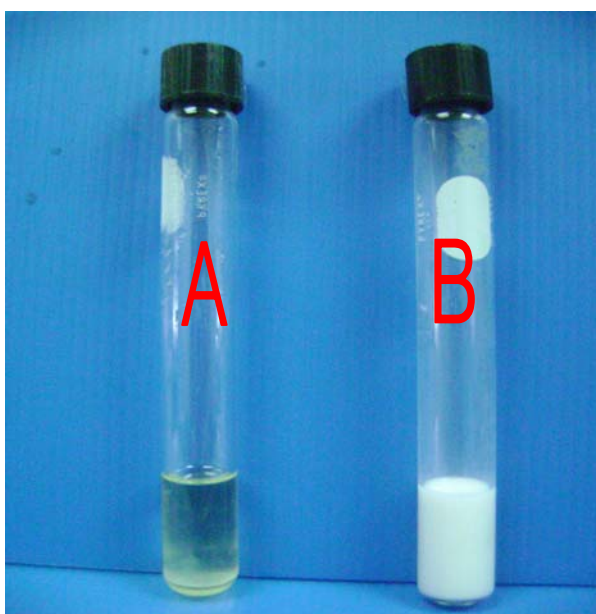
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของปริมาณน้ำมันกานพลู ปริมาณ Tween 20 และระยะเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียง ต่อการเกิดอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค

จากการทดสอบชนิดของอิมัลชันระบบน้ำมันกานพลู น้ำ และ Tween 20 (ซึ่งเป็นตัวทำอิมัลชันในวัฏภาคน้ำ) ที่เกิดขึ้นด้วยการเจือจางอิมัลชันในน้ำและน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าอิมัลชันผสมเข้ากับน้ำได้ดีและไม่สามารถผสมเข้ากับน้ำมันถั่วเหลืองได้ (ดังแสดงในรูปที่ 4.1) ซึ่งบ่งว่าอิมัลชันที่เกิดทุกตัวอย่างเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันกานพลูในน้ำ ผลการทดลองพบว่าปริมาณน้ำมันกานพลู ปริมาณ Tween 20 และเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียง มีผลต่อการเกิดอิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชัน (ตารางที่ 4.1) อิมัลชันเกิดยากขึ้นเมื่อปริมาณน้ำมันกานพลูเพิ่มขึ้น อิมัลชันไม่เกิดเมื่อมีปริมาณน้ำมันกานพลูสูงถึงร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก การเกิดอิมัลชันและความเสถียรของอิมัลชันดีขึ้นเมื่อปริมาณ Tween 20 และเวลาใช้คลื่นเหนือเสียงเพิ่มขึ้น โดยที่อิมัลชันสามารถเกิดได้ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูสูงถึงร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก เมื่อมีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 1.25 และ 3.75 โดยน้ำหนัก อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บอิมัลชันที่อุณหภูมิห้อง อิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 16.67 และ 37.50 โดยน้ำหนัก แยกชั้นหลังการเตรียม 3 วัน เมื่อใช้ปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนัก ขณะที่เมื่อใช้ปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 3.75 โดยน้ำหนัก อิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 16.67 และ 37.50 โดยน้ำหนัก เกิดการแยกชั้นหลังการเตรียมนานกว่า 70 วัน ขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงในการเตรียม กล่าวคือการใช้คลื่นเหนือเสียง 5 นาที อิมัลชันแยกชั้นหลังการเตรียม 74 วัน เมื่อใช้นาน 10 และ 30 นาที ทำให้เวลาที่อิมัลชันแยกชั้นนานมากกว่าเท่าตัว คือแยกชั้นหลังการเตรียม 167 วัน ลักษณะของตัวอย่างที่แยกชั้นพบว่าตัวอย่างแยกออกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนยังคงลักษณะของอิมัลชันคือมีสีขาวขุ่น ชั้นล่างมีลักษณะใสเป็นชั้นของน้ำมันกานพลูเนื่องจากน้ำมันกานพลูมีความหนาแน่นสูงกว่าน้ำ ความสูงของชั้นล่างประมาณร้อยละ 7 ของความสูงทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ขนาดอนุภาคน้ำมันในอิมัลชันที่ไม่แยกชั้นหลังการเตรียม 7 วัน ซึ่งเป็นอิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 คงที่ที่ร้อยละ 3.75 โดยน้ำหนัก และการประเมินทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.1 และ 4.2) พบว่าเมื่อใช้คลื่นเหนือเสียง 5 นาที ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อปริมาณน้ำมันกานพลูเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 16.67 เป็น 37.50 โดยน้ำหนัก และที่ปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 16.67 โดยน้ำหนัก เวลาที่ใช้คลื่นเหนือ

เสียงในช่วง 5-30 นาที ไม่มีผลต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ขณะที่ปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก การเพิ่มเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงจาก 5 เป็น 10 นาที ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยลดลง แต่การเพิ่มเวลาจาก 10 เป็น 30 นาที ไม่สามารถลดขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยลงได้อีก ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและขนาดอนุภาคน้ำมันที่มีปริมาณ โดยปริมาตรมากที่สุดของอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 16.67 และ 37.50 โดยน้ำหนัก และใช้คลื่นเหนือเสียง 10 และ 30 นาที ก็ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญด้วย ซึ่งอาจเป็นผลทำให้เวลาการแยกชั้นของอิมัลชันทั้ง 4 ตัวอย่างนี้ไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 4.1 ลักษณะปรากฏของอิมัลชันที่เจือจางในน้ำมันถั่วเหลือง (A) และ อิมัลชันที่เจือจางในน้ำ (B)

ตารางที่ 4.1 ผลของปริมาณน้ำมันกานพลู ปริมาณ Tween 20 และเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 400 Watt amplitude 100 μm และ ความถี่ 24 kHz ต่อการเกิดอิมัลชัน เวลาที่อิมัลชันแยกชั้นแยกชั้น และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย

ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		เวลาที่ใช้ คลื่นเหนือเสียง (นาที)	การเกิด อิมัลชัน*	เวลาที่แยกชั้นหลัง การเตรียม	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ยที่วิเคราะห์ หลังการเตรียม 7 วัน (μm)
น้ำมันกานพลู	Tween 20				
16.67	0.67	5	-	ทันที	-
		10	-	ทันที	-
		30	-	ทันที	-
	1.25	5	+	3 วัน	-
		10	+	3 วัน	-
		30	+	3 วัน	-
	3.75	5	+	74 วัน	0.253 \pm 0.024 ^a
		10	+	167 วัน	0.239 \pm 0.001 ^a
		30	+	167 วัน	0.243 \pm 0.001 ^a
37.50	0.67	5	-	ทันที	-
		10	-	ทันที	-
		30	-	ทันที	-
	1.25	5	+	3 วัน	-
		10	+	3 วัน	-
		30	+	3 วัน	-
	3.75	5	+	74 วัน	3.577 \pm 1.597 ^b
		10	+	167 วัน	0.621 \pm 0.125 ^a
		30	+	167 วัน	0.762 \pm 0.084 ^a
50.00	0.67	5	-	ทันที	-
		10	-	ทันที	-
		30	-	ทันที	-
	1.25	5	-	ทันที	-
		10	-	ทันที	-
		30	-	ทันที	-
	3.75	5	-	ทันที	-
		10	-	ทันที	-
		30	-	ทันที	-

* - หมายถึงไม่เกิดอิมัลชัน และ + หมายถึงเกิดอิมัลชัน

ตัวอักษร a, b, ..หมายถึงค่าที่แสดงมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.2 ผลของปริมาณน้ำมันกานพลู ปริมาณ Tween 20 และเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียง 400 Watt amplitude 100 μm และ ความถี่ 24 kHz ต่อการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมันในอิมัลชันหลังการเตรียม 7 วัน

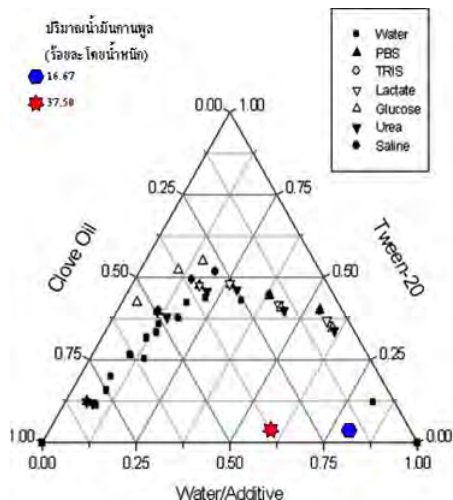
ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		เวลาที่ใช้ คลื่นเหนือ เสียง (นาทีก)	เวลาที่เก็บ (วัน)	ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมัน				
น้ำมัน กานพลู	Tween 20			รูปแบบ	ช่วงขนาด (μm)	ปริมาณที่อยู่ใน แต่ละช่วงขนาด (ร้อยละโดย ปริมาตร)	ขนาดเฉลี่ย (μm)	ขนาด ที่มีปริมาณมาก ที่สุด (μm)
16.67	3.75	5	7	Unimodal	0.035-7.586	100	0.253 \pm 0.024 ^a	0.156 ^a
		10	7	Unimodal	0.035-2.186	100	0.239 \pm 0.001 ^a	0.160 ^a
		30	7	Unimodal	0.035-2.186	100	0.243 \pm 0.001 ^a	0.156 ^a
37.50	3.75	5	7	Trimodal	0.040-0.479, 0.832-7.586, 19.953- 25.123	19.15, 79.54, 1.31	3.577 \pm 1.597 ^b	2.501 ^b
		10	7	Bimodal	0.052-0.479, 0.724-6.607	78.25, 21.75	0.621 \pm 0.125 ^a	0.160 ^a
		30	7	Bimodal	0.046-0.550, 0.550-5.754	68.00, 32.00	0.762 \pm 0.084 ^a	0.152 ^a

ตัวอักษร a, b, ..หมายถึงค่าที่อยู่ในแถวเดียวกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบการกระจายขนาดอนุภาคน้ำมันเปลี่ยนแปลงจาก unimodal เป็น multimodal เมื่อปริมาณน้ำมันการพลูเพิ่มจากร้อยละ 16.67 เป็น 37.50 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.2) โดยอนุภาคขนาดเล็กสุดที่วิเคราะห์ได้มีขนาดเล็กกว่า $0.1 \mu\text{m}$ ทุกตัวอย่าง ในอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันการพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก การเพิ่มเวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงจาก 5 เป็น 10 และ 30 นาที ทำให้อนุภาคน้ำมันที่มีขนาดใหญ่ที่อยู่ในช่วงสูงกว่าประมาณ $20 \mu\text{m}$ แต่ทำให้อนุภาคน้ำมันการพลูในอิมัลชันทั้งหมดมีขนาดเล็กกว่า $10 \mu\text{m}$ ทำให้ช่วงขนาดของอนุภาคน้ำมันไม่แตกต่างจากอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันการพลูร้อยละ 16.67 โดยน้ำหนัก แต่การกระจายขนาดเป็นแบบ bimodal ซึ่งไม่มีผลต่อเวลาที่เกิดการแยกชั้นของอิมัลชัน ลักษณะของอนุภาคน้ำมันที่มีร่วมกันสำหรับอิมัลชันที่มีเวลาแยกชั้นช้าสุด (167 วัน) คือมีขนาดอนุภาคใหญ่สุดเล็กกว่า $10 \mu\text{m}$ ขนาดอนุภาคเฉลี่ยเล็กกว่า $1 \mu\text{m}$ และขนาดอนุภาคที่มีมากที่สุดประมาณ $0.16 \mu\text{m}$ ขณะที่อิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันการพลูและ Tween 20 ร้อยละ 37.50 และ 3.75 โดยน้ำหนัก ตามลำดับที่ใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 5 นาที ซึ่งมีอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดใหญ่ $\geq 20 \mu\text{m}$ ที่สามารถเกิดการรวมและหลอมรวมกันแยกตกลงมาได้เร็วกว่าที่ 74 วัน หลังการเตรียม แต่อิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันการพลูและ Tween 20 ร้อยละ 16.67 และ 3.75 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ที่ใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 5 นาที ก็เกิดการแยกชั้นที่ 74 วัน หลังการเตรียมเช่นกันทั้งที่มีลักษณะของอนุภาคน้ำมันเหมือนกับอิมัลชันที่ยังคงไม่แยกชั้นจนถึง 167 วัน หลังการเตรียม

จากการสุ่มตัวอย่างที่แยกชั้น คืออิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันการพลูและ Tween 20 ร้อยละ 37.50 และ 3.75 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ใช้คลื่นเหนือเสียง 30 นาที (เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่ให้ฤทธิ์ด้านแบคทีเรียสูงสุดจากการผลการวิเคราะห์ค่า MIC) และเก็บไว้ 167 วัน (ซึ่งเป็นวันแรกที่พบชั้นของน้ำมันการพลูซึ่งสูงร้อยละ 6.67 ของความสูงทั้งหมด โดยมีชั้นน้ำมันอยู่ด้านล่างโดยไม่พบการเกิด creaming ก่อน) มาวิเคราะห์ขนาดอนุภาคน้ำมันและการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมันในชั้นที่ยังคงมีลักษณะเป็นอิมัลชัน และเปรียบเทียบกับของอิมัลชันเดิมที่วิเคราะห์ไว้หลังการเตรียม 7 วัน (ตารางที่ 4.3) พบว่าหลังจากการแยกชั้นส่วนที่ยังคงมีลักษณะเป็นอิมัลชันมีอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย $5.102 \mu\text{m}$ โดยมีอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดสูงกว่า $6 \mu\text{m}$ ซึ่งไม่มีอยู่ในอิมัลชันเดิม มีรูปแบบการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมันเปลี่ยนจากแบบ bimodal เป็นแบบ trimodal โดยยอด (peak) ที่เกิดใหม่เป็นยอดของอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า $10 \mu\text{m}$ ที่คิดเป็นร้อยละ 10 โดยปริมาตรของอนุภาคน้ำมันทั้งหมด ขณะที่ยอดของอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดช่วงขนาดเล็กที่สุดที่ $<6 \mu\text{m}$ ลดลงร้อยละ 18

จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่า อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีความเสถียรต่อการแยกชั้นมากกว่า 70 วัน สามารถเตรียมได้โดยใช้ Tween 20 ในปริมาณร้อยละ 3.75 โดยน้ำหนัก โดยมีปริมาณน้ำมันกานพลูสูงถึงร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก และเมื่อใช้คลื่นเหนือเสียง 10-30 นาที ในการเตรียม ให้อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยต่ำกว่า $1 \mu\text{m}$ และให้ความเสถียรสูงสุดคือแยกชั้นหลังการเตรียม 167 วัน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) จากการศึกษาระบบน้ำมันกานพลูกับน้ำ ที่มี Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชันโดย Gupta และ Moulik (2007) พบว่าที่ปริมาณน้ำมันกานพลู Tween 20 และน้ำ ร้อยละ 5 30 และ 65 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ให้อิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำที่ใส และอนุภาคน้ำมันกานพลูมีขนาดอยู่ในช่วง 10-20 nm ทำให้อิมัลชันมีความเสถียรถึง 1 ปี เมื่อเก็บที่ $4-40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ และจาก phase diagrams ของอิมัลชันระบบนี้ (รูปที่ 2.9) พบว่าปริมาณกานพลูสูงสุดที่ยังเกิดเป็นวัฏภาคเดียวของจุลอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (oil-in-water microemulsion monophasic) ได้คือประมาณร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก เมื่อมีปริมาณ Tween 20 ประมาณร้อยละ 45 โดยน้ำหนัก ส่วนอิมัลชันที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ที่แสดงเป็นจุดสีน้ำเงิน (●) และสีแดง (★) ใน phase diagram ของ Gupta และ Moulik (2007) ดังแสดงในรูปที่ 4.2 สำหรับอิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 คงที่ที่ร้อยละ 3.75 โดยน้ำหนัก และมีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 16.67 และ 37.50 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ นี้อยู่ในส่วนที่เป็น biphasic หรือ coarse emulsion จึงไม่มีความเสถียรแบบอุณหพลศาสตร์ (thermodynamically stable) การที่อิมัลชันดังกล่าวมีความเสถียรชั่วคราว ซึ่งเป็นความเสถียรแบบจลน์ (kinetically stable) จึงมีการเปลี่ยนแปลงของขนาดอนุภาคและ/หรือการกระจายขนาดอนุภาค โดยขนาดของอนุภาคน้ำมันใหญ่ขึ้น อันเนื่องมาจากอนุภาคน้ำมันมาเกาะกลุ่มกันแล้วหลอมรวมกันและในที่สุดเกิดการแยกชั้น ทั้งนี้เพื่อลด surface free energy ของระบบโดยรวม (McClements, 2004) จากตารางที่ 4.3 บ่งว่ามีการเปลี่ยนแปลงการกระจายของขนาดอนุภาคน้ำมันระหว่างการเก็บ โดยอิมัลชันหลังการเตรียม 7 วัน มีรูปแบบการกระจายขนาดเป็นแบบ bimodal เมื่ออิมัลชันแยกชั้นโดยมีชั้นน้ำมันกานพลูอยู่ด้านล่าง ส่วนด้านบนที่ยังคงลักษณะชุนมีรูปแบบการกระจายของขนาดอนุภาคน้ำมันเป็นแบบ trimodal โดยยอดใหม่เป็นยอดของอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดใหญ่ (ในช่วงประมาณ 13-120 μm) กว่าที่พบในอิมัลชันหลังการเตรียม 7 วัน ซึ่งอาจบ่งว่าระหว่างการเก็บอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำมีการหลอมรวมกัน (coalescence) ของอนุภาคน้ำมันกานพลูทำให้อนุภาคน้ำมันใหญ่ขึ้นและเกิดการแยกชั้นในที่สุด มากกว่าการเกิด Ostwald ripening ซึ่งการกระจายของขนาดอนุภาคน้ำมันไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลา จึงไม่มียอดใหม่เกิดขึ้น เพียงแต่ยอดทั้งยอดเลื่อนไปทางขนาดอนุภาคใหญ่ขึ้นและเล็กลง (McClements, 2007)



รูปที่ 4.2 ตำแหน่งของอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 16.67 (●) และ 37.50 (★) โดยน้ำหนัก และที่ปริมาณ Tween 20 คงที่ที่ร้อยละ 3.75 โดยน้ำหนัก ใน phase diagram
ดัดแปลงจาก Gupta และ Moulik (2007)

ตารางที่ 4.3 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำต่อขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมัน สำหรับอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลู Tween 20 และน้ำ ร้อยละ 37.50 3.75 และ 58.75 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 400 Watt amplitude 100 μm ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที

เวลาที่เก็บ (วัน)	ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมัน				
	รูปแบบ	ช่วงขนาด (μm)	ปริมาณที่อยู่ในแต่ละช่วงขนาด (ร้อยละโดยปริมาตร)	ขนาดเฉลี่ย (μm)	ขนาดที่มีปริมาณมากที่สุด (μm)
7	Bimodal	0.046 - 0.550	68.00	0.762	0.152
		0.550 - 5.754	32.00		
167	Trimodal	0.040 - 0.631	55.90	5.102	0.165
		0.631 - 10.000	34.82		
		13.183 - 120.226	9.28		

นอกจากความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำแล้ว เพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ด้านฤทธิ์แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารเพื่อใช้กับผิวสัมผัสอาหารนั้น งานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านแบคทีเรียของอิมัลชันดังกล่าวด้วย โดยนำอิมัลชันน้ำมันกานพลูมาศึกษาค่า MIC ด้วยวิธี paper disc diffusion method แสดงตามตารางที่ 4.4 (รายงานผลเป็นปริมาณอิมัลชันต่อสารละลายทั้งหมดในหน่วย $\mu\text{l/ml}$) พบว่าอิมัลชันของน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ใช้ Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 3.75 โดยน้ำหนักและมีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 16.67 และ 37.50 โดยน้ำหนัก มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิดที่นำมาทดสอบ คือ *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 อิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 16.67 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ที่ระดับความเจือจาง 125-250 $\mu\text{l/ml}$ ส่วนอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดี ที่ระดับความเจือจาง 30-125 $\mu\text{l/ml}$ โดยอิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 และ น้ำมันกานพลูเท่ากับ ร้อยละ 3.75 และ 37.50 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุดที่ระดับความเจือจาง 30-60 $\mu\text{l/ml}$

สรุปได้ว่า อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีปริมาณน้ำมันและปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 37.50 และ 3.75 โดยน้ำหนัก และใช้คลื่นเหนือเสียงนาน 30 นาที มีความเสถียรและฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดีที่สุด เมื่อนำอิมัลชันที่เก็บไว้ที่ 167 วัน พบว่าอิมัลชันเกิดการแยกชั้น โดยนำส่วนที่ยังคงลักษณะเป็นอิมัลชันมาศึกษาฤทธิ์ด้าน *E. coli* และ *S. aureus* แต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.5 อิมัลชันของน้ำมันกานพลูที่มีอายุการเก็บ 14 วัน สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีมีค่า MIC เท่ากับ 30 และ 60 $\mu\text{l/ml}$ ตามลำดับ ส่วนอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่เก็บไว้ 167 วัน จะมีฤทธิ์ด้านแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบลดลง 4.17 เท่า คือมีค่า MIC เท่ากับ 60 และ 125 $\mu\text{l/ml}$ ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้เพราะอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำมีความเสถียรลดลงตามระยะเวลาที่เก็บอิมัลชัน เมื่ออนุภาคน้ำมันกานพลูมีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้การประสิทธิภาพการละลายของน้ำมันกานพลูในน้ำลดลง ส่งผลให้ฤทธิ์ด้านแบคทีเรียลดลงด้วย (Spernath and Aserin, 2006)

ตารางที่ 4.4 ผลของปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 16.67 และ 37.50 โดยน้ำหนัก ที่ปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 3.75 โดยน้ำหนัก เวลาที่ใช้คลื่นเหนือเสียงที่ 400 Watt amplitude 100 μm และ ความถี่ 24 kHz ต่อฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ

ปริมาณน้ำมันกานพลูใน อิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	เวลาที่ใช้ คลื่นเหนือ เสียง (นาที)	MIC ($\mu\text{l/ml}$)	
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
16.67	5	125	250
	10	125	250
	30	125	125
37.50	5	125	60
	10	60	125
	30	30	60

ตารางที่ 4.5 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ (14 วัน และ 167 วัน) ต่อค่า MIC ซึ่งมีสัดส่วนโดยน้ำหนักของน้ำมันกานพลู Tween 20 และน้ำ เท่ากับ ร้อยละ 37.50 3.75 และ 58.75 โดยน้ำหนักตามลำดับ เมื่อเตรียมอิมัลชันด้วยคลื่นเหนือเสียงที่ 400 Watt amplitude 100 μm และ ความถี่ 24 kHz นาน 30 นาที

เวลาที่เก็บ (วัน)	MIC ($\mu\text{l/ml}$)	
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
14	30	60
167	60	125

จากผลสรุปดังกล่าวข้างต้น จึงทำการศึกษาต่อ โดยศึกษาผลของผลของตัวทำละลายและระยะเวลาการเก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูสำหรับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และเนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลู ด้วยวิธี paper disc diffusion method อาจมีข้อจำกัดในเรื่องการซึมผ่านของสารลงสู่อาหารที่มีเชื้อ คือสารอาจมีการแพร่ได้ไม่เท่ากัน ทำให้การออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยประสิทธิภาพ ผลการทดลองที่ได้ไม่ค่อยแน่นอนและอ่านผลยาก ดังนั้นจึงทำการหาค่า MBC ด้วยวิธี broth dilution method แทน ซึ่งวิธีนี้สารแขวนลอยแบคทีเรียสามารถสัมผัสกับสารทดสอบซึ่งละลายและแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อได้โดยไม่ต้องพึ่งความสามารถในการแพร่ผ่านของสาร

ค่า MBC ของน้ำมันกานพลู ต่อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด คือ *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 *S. Choleraesuis* ATCC 10708 และ *B. cereus* ATCC 6228 แสดงตามตารางที่ 4.6 (รายงานผลเป็นปริมาณน้ำมันกานพลูต่อสารละลายทั้งหมด คือ mg/ml) พบว่าน้ำมันกานพลูในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ DMSO สารละลาย Tween 20 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร และน้ำ มีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียลดลงตามระยะเวลาในการเก็บที่เพิ่มขึ้น โดยเมื่อละลายน้ำมันกานพลูในน้ำ เกิดเป็นสารแขวนลอยน้ำมันกานพลูทำให้มีการแยกชั้นระหว่างน้ำมันกานพลูและน้ำทันที ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียน้อยที่สุด โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 26.2-52.4 mg/ml ที่อายุการเก็บ 1-60 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเก็บสารแขวนลอยน้ำมันกานพลูในน้ำเป็นระยะเวลา 90 วันทำให้ประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของน้ำมันกานพลูลดลง โดยให้ค่า MBC มากกว่า 52.4 mg/ml จากงานวิจัยของ Si และคณะ (2005) ได้หาค่า MBC ของน้ำมันกานพลูต่อเชื้อ *E. coli* และ *S. Typhimurium* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเป็นตัวทำละลายน้ำมันกานพลูพบว่าได้ค่า MBC เท่ากับ 0.30 mg/ml และ 0.40 mg/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียทั้งสองพบว่าประสิทธิภาพในการต้าน *S. Typhimurium* ต่ำกว่า *E. coli* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลู โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายที่อายุการเก็บ 1-7 วัน พบว่าสารมีประสิทธิภาพในการต้าน *S. Choleraesuis* ต่ำกว่า *E. coli* เช่นกัน

เมื่อละลายน้ำมันกานพลูใน DMSO เกิดเป็นสารละลายน้ำมันกานพลู และละลายน้ำมันกานพลูในสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เกิดเป็นสารแขวนลอยน้ำมันกานพลู ทำให้ประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบดีขึ้น โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 0.82-1.64 mg/ml ที่อายุการเก็บ 1-60 วัน ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียดีกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายถึง 31.95 เท่า และเมื่อเก็บน้ำมันกานพลูที่ละลายใน

DMSO และสารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เป็นเวลา 90 วันพบว่า ประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียลดลง โดยให้ค่า MBC เพิ่มขึ้นเป็น 1.64-3.28 mg/ml จากงานวิจัยของ ศวรรณี เหลืองสุนทรชัยและวลัยรัตน์ จันทรปานนท์ (2007) ได้ทำการหาค่า MBC ของน้ำมันกานพลูต่อเชื้อ *E. coli* โดยใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายน้ำมันกานพลูพบว่าให้ค่า MBC เท่ากับ 1.87 mg/ml ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้ เห็นได้ว่าการใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายน้ำมันกานพลู ทำให้ประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียดีกว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายน้ำมันกานพลู เนื่องจาก DMSO จะช่วยเพิ่มการกระจายตัวของน้ำมันกานพลูได้ดีกว่าน้ำ ทำให้น้ำมันกานพลูสามารถสัมผัสและออกฤทธิ์กับแบคทีเรียได้มากขึ้น แต่การเก็บน้ำมันกานพลูไว้ในสารละลาย DMSO ทำให้ประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของสารละลายน้ำมันกานพลูลดลง จากงานวิจัยของ Kozikowski และคณะ (2003) ได้ทดลองเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของสารประกอบที่เก็บใน DMSO พบว่าการเก็บสารประกอบในรูปของสารละลายใน DMSO ที่อุณหภูมิห้องมีผลทำให้ความคงตัวของสารประกอบลดลงตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อความแรงในการออกฤทธิ์ของสารด้วย และจากงานวิจัยของ Prabuseenivasan และคณะ (2006) ได้ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี agar dilution method โดยใช้สารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรเป็นตัวทำละลาย พบว่าน้ำมันกานพลูให้ค่า MIC ต่อเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากับ 6.40 และ 1.60 mg/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ต่ำกว่า *E. coli* ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อนี้ซึ่งมีค่า MBC ต่อ *S. aureus* และ *E. coli* ที่อายุการเก็บ 1-60 วัน เท่ากับ 1.64 และ 0.82 mg/ml ตามลำดับ เนื่องจาก Tween 20 มีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวทำให้แรงตึงผิวระหว่างน้ำและน้ำมันกานพลูลดลง น้ำมันกานพลูจึงสามารถกระจายตัวในน้ำได้ดีขึ้น ส่งผลให้มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดีกว่าน้ำมันกานพลูที่ละลายในน้ำ 31.95 เท่า คือมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเท่ากับน้ำมันกานพลูที่ละลายใน DMSO แต่การใช้ Tween 20 ปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร เมื่อตั้งทิ้งไว้จะเกิดการแยกชั้นซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เสถียร จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของน้ำมันกานพลูลดลง ด้วยเหตุนี้จึงสนใจที่จะทำน้ำมันกานพลูให้มีความเสถียรมากขึ้น โดยทำให้อยู่ในรูปของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ โดยการปรับเพิ่มปริมาณ Tween 20 และศึกษาผลของปริมาณ Tween 20 ต่อความเสถียรและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียต่อไป

สารที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันกานพลูคือ eugenol ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟีนอล (phenolic compound) เป็นองค์ประกอบหลัก (Mytle *et al.*, 2006) จากรายงานของ Brut (2004)

พบว่าความเป็น hydrophobic ของน้ำมันหอมระเหยและส่วนประกอบฟีนอลในน้ำมันมีความสามารถที่จะแทรกเข้าไปภายในส่วนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์และไมโทคอนเดรียของจุลินทรีย์ ซึ่งจะมีความสามารถในการซึมผ่านและนำไปสู่การรื้อของ intercellular membrane ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก หรือทำให้เกิดความเสียหายต่อระบบเอนไซม์ของจุลินทรีย์ ซึ่งมีการศึกษาพบว่า eugenol ในน้ำมันกานพลูมีฤทธิ์ยับยั้งการผลิตเอนไซม์ amylase และ protease ของ *B. cereus* และ OH group ของ eugenol มีความสามารถในการจับกับโปรตีนป้องกันการทำงานของเอนไซม์ใน *E. aerogene* ได้ ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกนี้ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญ (bacteriostatic) หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) ได้ โดยขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่ใช้ด้วย (Shan *et al.*, 2007)

ตารางที่ 4.6 ผลของตัวทำละลายได้แก่ น้ำ DMSO และ สารละลาย Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร และระยะเวลาที่เก็บ ต่อค่า MBC (mg/ml)

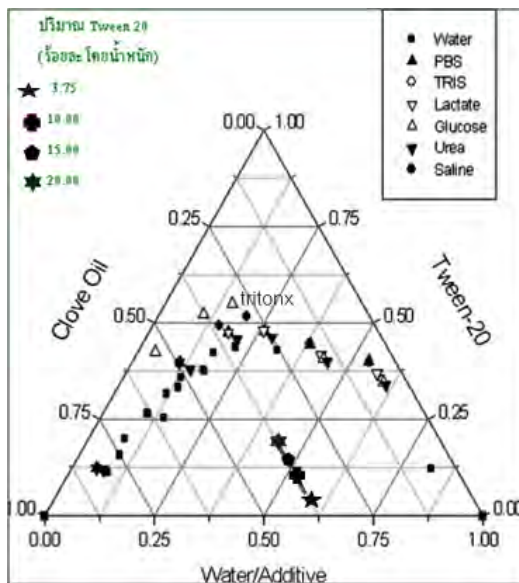
เวลาที่เก็บ (วัน)	ปริมาณน้ำมันกานพลูที่ค่า MBC (mg/ml)											
	น้ำมันกานพลูละลายในน้ำ				น้ำมันกานพลูละลายใน DMSO				น้ำมันกานพลูละลายใน Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
1	26.20	26.20	52.40	26.20	1.64	0.82	0.82	1.64	1.64	0.82	0.82	1.64
7	26.20	26.20	52.40	26.20	1.64	0.82	0.82	1.64	1.64	0.82	0.82	1.64
30	26.20	52.40	52.40	52.40	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	0.82	0.82	1.64
60	52.40	52.40	52.40	52.40	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64	1.64
90	52.40	>52.40	>52.40	52.40	3.28	1.64	1.64	3.28	1.64	1.64	1.64	3.28

4.2 ผลของปริมาณ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย และประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก เมื่อเตรียมด้วยคลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 400 Watt amplitude 80 μm และ ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที

4.2.1 ผลของปริมาณ Tween 20 ต่อความเสถียรและขนาดอนุภาค

น้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 1^\circ\text{C}$)

จากผลในข้อ 4.1 อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีปริมาณน้ำมันกานพลู และ Tween ร้อยละ 37.50 และ 3.75 โดยน้ำหนัก ที่เตรียมอิมัลชันด้วยคลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 400 Watt amplitude 100 μm และ ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร แต่เกิดการแยกชั้นหลังเก็บไว้ 167 วัน ดังนั้น เพื่อศึกษาปริมาณ Tween 20 ที่ทำให้อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก มีความเสถียรต่อการแยกชั้นสูงขึ้น แต่ในการศึกษานี้ใช้คลื่นเสียงที่กำลัง 400 Watt amplitude 80 μm และ ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที กล่าวคือลด amplitude ของคลื่นเหนือเสียงที่ใช้ เพื่อลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับอุปกรณ์ (ultrasonicator) ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ amplitude 80 μm อิมัลชันที่มีองค์ประกอบข้างต้นแยกชั้นเร็วขึ้นคือแยกชั้นหลังการเตรียม 90 วัน โดยความสูงของชั้นบน (ซึ่งยังคงลักษณะขุ่นของอิมัลชัน) เท่ากับร้อยละ 83.00 ± 0.90 เมื่อเพิ่มปริมาณ Tween 20 ในช่วงร้อยละ 3.75-20.00 โดยน้ำหนัก ซึ่งทำให้องค์ประกอบของอิมัลชันมีตำแหน่งใน phase diagram ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ Tween 20 จากร้อยละ 3.75 เป็น 10.00 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ทำให้อิมัลชันคงตัวโดยไม่แยกชั้นนานถึง 150 วัน และร้อยละ ความสูงของชั้นบนสูงขึ้น บ่งว่าอิมัลชันเสถียรต่อการแยกชั้นเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.7) ถึงแม้อิมัลชันที่มี Tween 20 ในปริมาณร้อยละ 10.00 และ 15.00 โดยน้ำหนัก แยกชั้นหลังการเตรียม 240 วัน แต่ร้อยละความสูงของชั้นบนของอิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก มากกว่าของอิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 10.00 โดยน้ำหนัก บ่งว่าอิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก เสถียรกว่า แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ Tween 20 เป็นร้อยละ 20.00 โดยน้ำหนัก ทำให้อิมัลชันน้อยลงและยังน้อยกว่าเมื่อมี Tween 20 ร้อยละ 3.75 โดยน้ำหนักอีกด้วย กล่าวคืออิมัลชันแยกชั้นเร็วที่สุดคือหลังการเตรียม 60 วัน และร้อยละความสูงของชั้นบนต่ำที่สุด



รูปที่ 4.3 ตำแหน่งของอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูคงที่ที่ร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก และที่ปริมาณ Tween 20 ที่ร้อยละ 3.75 (★) 10.00 (■) 15.00 (◆) และ 20.00 (★) โดยน้ำหนัก ใน phase diagram ดัดแปลงจาก Gupta และ Moulik (2007)

ตารางที่ 4.7 ผลของปริมาณ Tween 20 ต่อความเสถียรของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก

องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)			เวลาที่แยกชั้น หลังการเตรียม (วัน)	ร้อยละความสูงของอิมัลชันชั้นบนหลังอิมัลชันแยกชั้น
น้ำมันกานพลู	Tween 20	น้ำ		
37.50	3.75	58.75	90	83.00 ^b ± 0.90
37.50	10.00	52.50	240	84.08 ^b ± 1.01
37.50	15.00	47.50	240	85.75 ^c ± 0.66
37.50	20.00	42.50	60	78.00 ^a ± 0.90

ตัวอักษร a, b, ..หมายถึงค่าที่แสดงมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและการกระจายของอนุภาคน้ำมันที่วิเคราะห์หลังการเตรียม 7 วัน สำหรับอิมัลชันที่มีองค์ประกอบเหมือนกันคือมีปริมาณน้ำมันกานพลูและ Tween 20 ร้อยละ 37.50 และ 3.75 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ และใช้คลื่นเหนือเสียงที่กำลัง ความถี่และเวลาเท่ากันคือ 400 watt 24 kHz และ 30 นาที ตามลำดับ ต่างกันที่ amplitude ของคลื่นเหนือเสียงพบว่าเมื่อเพิ่ม amplitude จาก 80 เป็น 100 μm ทำให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของน้ำมันลดลงจาก 3.674 ± 0.202 เป็น 0.762 ± 0.084 μm โดยอิมัลชันที่ใช้คลื่นเหนือเสียงที่ amplitude 80 μm พบอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดในช่วง 10-208 μm ด้วย ขณะที่การใช้คลื่นเหนือเสียงที่ amplitude 100 μm ทำให้อนุภาคน้ำมันที่มีขนาดในช่วงนี้แตกลงเหลือแต่ที่มีขนาดต่ำกว่า 10 μm การที่มีอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดในช่วง 10-208 μm เป็นสาเหตุสำคัญทำให้อิมัลชันที่ใช้คลื่นเหนือเสียงที่ amplitude 80 μm แยกชั้นเร็วกว่า

สำหรับอิมัลชันที่เตรียมด้วยคลื่นเหนือเสียงที่กำลัง amplitude ความถี่และเวลาเท่ากันคือ 400 watt amplitude 80 μm 24 kHz และ 30 นาที ตามลำดับ พบว่าขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยลดลงเมื่อปริมาณ Tween 20 เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 3.75 ถึง 15.00 โดยน้ำหนัก แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ Tween 20 เป็นร้อยละ 20.00 โดยน้ำหนัก พบว่าขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยใหญ่กว่าเมื่อปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก (ตารางที่ 4.9) จากการวิเคราะห์อนุภาคน้ำมันเฉลี่ยหลังการเตรียมอิมัลชัน 1 วัน พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ Tween 20 จากร้อยละ 3.75 เป็น 10.00 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่การเพิ่มปริมาณ Tween 20 จากร้อยละ 15.00 เป็น 20.00 โดยน้ำหนัก ไม่ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ที่ปริมาณ Tween 20 คงที่ เมื่อเก็บอิมัลชันไว้ 7 วัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บอิมัลชันไว้ 30 วัน ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่ทุกปริมาณ Tween 20 มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยอิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 20.00 โดยน้ำหนัก มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยใหญ่ที่สุด (20.031 ± 9.666 μm) ในขณะที่เมื่อใช้ Tween 20 ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก มีขนาดอนุภาคน้ำมันเล็กสุด (5.997 ± 3.183 μm) จากเส้นแนวโน้มการเพิ่มของขนาดอนุภาคเฉลี่ยตามเวลาที่เก็บเป็นไปตามสมการเส้นตรง (รูปที่ 4.4) แล้วประมาณค่าอัตราการเพิ่มของขนาดอนุภาคเฉลี่ยจากความชันของเส้นแนวโน้ม พบว่าอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 ร้อยละ 20.00 โดยน้ำหนัก มีอัตราการเพิ่มขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเร็วที่สุดคือ 0.554 $\mu\text{m}/\text{day}$ จึงทำให้อิมัลชันเกิดการแยกชั้นเร็ว (ตามตารางที่ 4.7) ขณะที่อิมัลชันที่ใช้ Tween 20 ร้อยละ 10.00 และ 15.00 โดยน้ำหนัก นั้นมีการแยกชั้นพร้อม

กันเมื่อเก็บอิมัลชันไว้ 240 วัน แต่จากจากเส้นแนวโน้มพบว่าอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก มีการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยช้าสุดเพียง 0.135 $\mu\text{m}/\text{day}$

ตารางที่ 4.8 ผลของ amplitude ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมันที่วิเคราะห์หลังการเตรียม 7 วัน สำหรับอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลู และ Tween 20 ร้อยละ 37.50 และ 3.75 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ใช้คลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 400 watt ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที

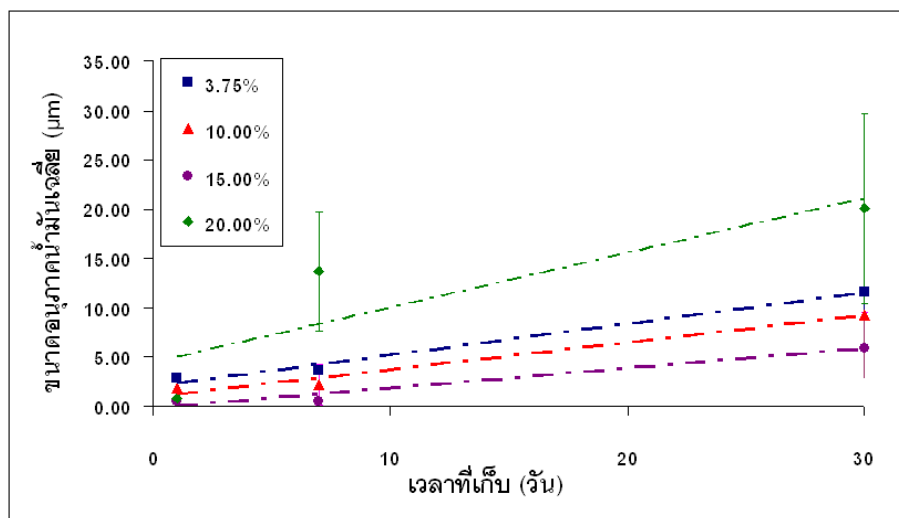
Amplitude (μm)	ขนาดและการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมัน				
	รูปแบบ	ช่วงขนาด (μm)	ปริมาณที่อยู่ใน แต่ละช่วงขนาด (ร้อยละโดยปริมาตร)	ขนาดเฉลี่ย (μm)	ขนาด ที่มีปริมาณ มากที่สุด (μm)
80	Bimodal	0.052-0.550, 0.955-208.93	66.63, 33.37	3.674 \pm 0.202	0.165
100	Bimodal	0.046-0.550, 0.550-5.754	68.00, 32.00	0.762 \pm 0.084	0.152

ตารางที่ 4.9 ผลของปริมาณ Tween 20 ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก ที่ระยะเวลาที่เก็บอิมัลชัน 1-30 วัน

ปริมาณ Tween 20 ในอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm) ที่เวลาที่เก็บอิมัลชัน (วัน)		
	1	7	30
3.75	2.779 ^{ca} \pm 0.206	3.674 ^{aA} \pm 0.202	11.641 ^{abB} \pm 4.815
10.00	1.772 ^{ba} \pm 1.188	2.189 ^{aA} \pm 2.055	9.287 ^{abB} \pm 0.304
15.00	0.502 ^{aA} \pm 0.049	0.547 ^{aA} \pm 0.089	5.997 ^{aB} \pm 3.183
20.00	0.835 ^{aA} \pm 0.132	13.722 ^{baB} \pm 6.045	20.031 ^{bB} \pm 9.666

ตัวอักษร a, b, ..หมายถึง ค่าที่อยู่ในแถวเดียวกันตามแนวตั้งมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษร A, B, ..หมายถึง ค่าที่อยู่ในแถวเดียวกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

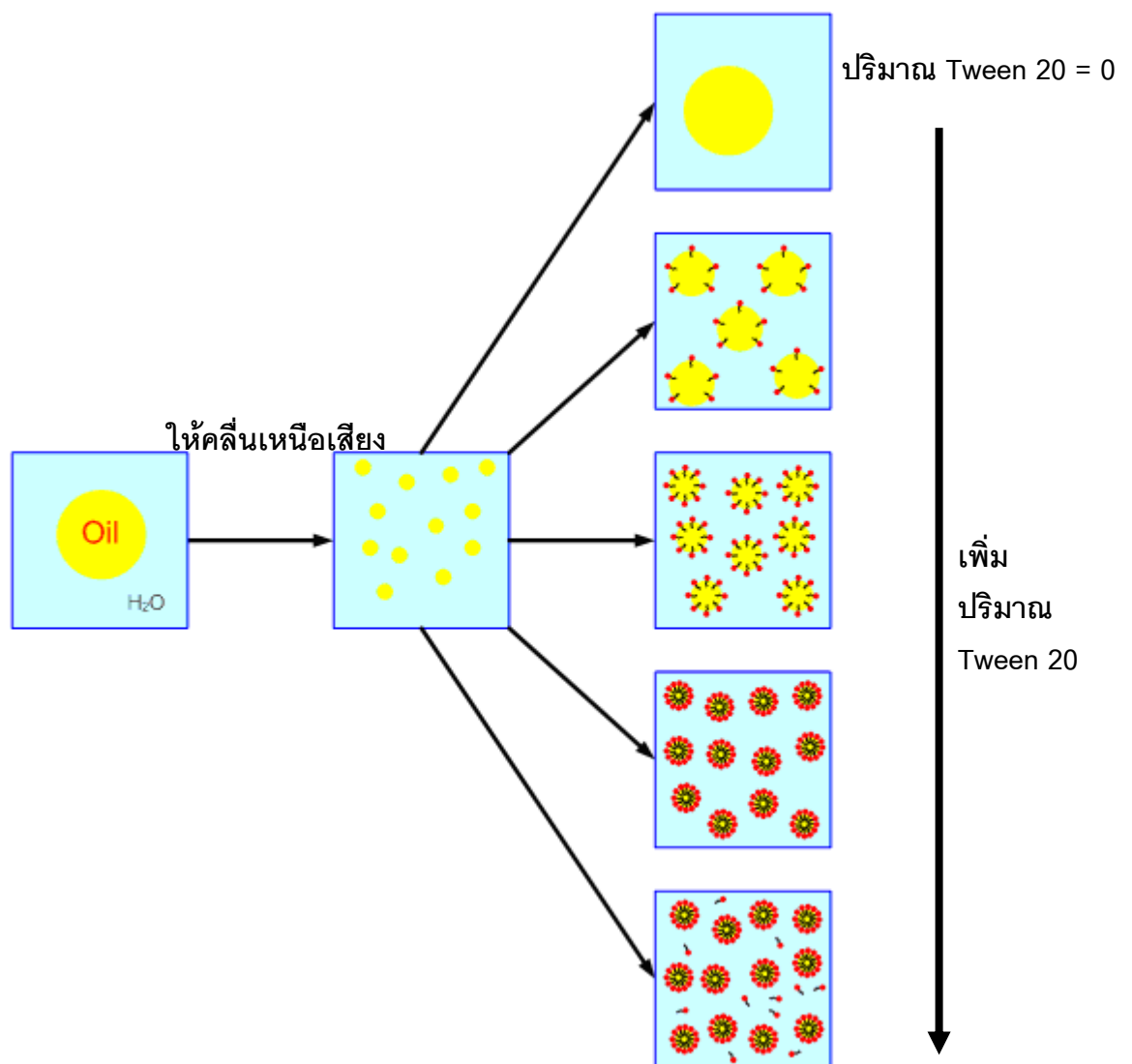


รูปที่ 4.4 ผลของเวลาที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) และปริมาณ Tween 20 ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก เมื่อเตรียมอิมัลชันด้วยคลื่นเหนือเสียงที่ กำลัง 400 Watt amplitude 80 μm และ ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที

การที่ตัวทำอิมัลชันสามารถทำให้อิมัลชันเสถียร ได้คือไปลดแรงดึงระหว่างผิวประจัน (interfacial tension) ระหว่างผิวอนุภาคน้ำมันกับน้ำที่ล้อมรอบ โดยการดูดซับของตัวทำอิมัลชันที่ผิวของอนุภาคน้ำมัน การเกิดอนุภาคน้ำมันที่ยังคงแขวนลอยอยู่ในวัฏภาคน้ำได้นั้นแรงดึงระหว่างผิวประจันต้องต่ำพอซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของตัวทำอิมัลชัน ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชันที่ผิวประจัน (emulsifier surface concentration) หรือจำนวนของตัวทำอิมัลชันที่ดูดซับบนผิวประจันต่อพื้นที่ผิวประจันและปริมาณของตัวทำอิมัลชันที่มีผลโดยตรงต่อแรงดึงระหว่างผิวประจันและความเสถียรของอิมัลชัน แรงดึงระหว่างผิวประจันมีค่าต่ำสุดเมื่อพื้นที่ผิวทั้งหมดของอนุภาคน้ำมันถูกล้อมรอบด้วยตัวทำอิมัลชัน ในกรณีอิมัลชันที่มีปริมาณ (ปริมาตร) ของน้ำมัน (วัฏภาคกระจาย) คงที่ อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเล็กกว่าและจำนวนอนุภาคมากกว่า ต้องการปริมาณตัวทำอิมัลชันสูงกว่าเพื่อให้ได้จำนวนของตัวทำอิมัลชันที่ดูดซับบนผิวประจันต่อพื้นที่ผิวประจันที่เท่ากัน หรือจำนวนตัวทำอิมัลชันที่ล้อมปิดผิวอนุภาคน้ำมัน (full surface coverage) เนื่องจากมีพื้นที่ผิวประจันรวมมากกว่าอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยใหญ่กว่าและจำนวนอนุภาคน้อยกว่า ในกรณีที่ใช้กำลังคงที่ในการตีอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันคงที่ น่าจะให้ได้ขนาด

อนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและการกระจายขนาดอนุภาคน้ำมันที่เกือบคงที่ โดยมีตัวทำอิมัลชันดูดซับที่ผิวของอนุภาคน้ำมัน หลังจากหยุดการตีแล้วการเปลี่ยนแปลงของอนุภาคน้ำมันเริ่มขึ้นเกิดขึ้น ที่ปริมาณตัวทำอิมัลชันต่ำ ตัวทำอิมัลชันอาจไม่สามารถล้อมปิดผิวอนุภาคน้ำมัน เมื่อเพิ่มปริมาณตัวทำอิมัลชันเป็นการเพิ่มจำนวนตัวทำอิมัลชันที่ล้อมผิวมากขึ้น จึงทำให้ทำให้อิมัลชันเสถียรขึ้น และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่วิเคราะห์ที่เวลาหลังการตีที่เท่ากันลดลง (รูปที่ 4.5) ในกรณีที่ตัวทำอิมัลชันเป็นตัวทำอิมัลชันที่ละลายน้ำเช่น Tween 20 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ การเพิ่มปริมาณตัวทำอิมัลชันหลังจากที่ปริมาณตัวทำอิมัลชันพอเพียงสำหรับการล้อมปิดผิวอนุภาคน้ำมันแล้ว ตัวทำอิมัลชันที่เพิ่มขึ้นจะไม่ดูดซับที่ผิวประจันแต่อยู่ในวัฏภาคน้ำ ดังนั้น สำหรับระบบอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มี Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก นั้นปริมาณ Tween 20 ที่ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก อาจมีจำนวน Tween 20 พอสำหรับการล้อมปิดอนุภาคน้ำมัน จึงทำให้อิมัลชันเสถียรและขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเล็กเล็กที่สุด เมื่อเพิ่มปริมาณ Tween 20 เป็นร้อยละ 20.00 โดยน้ำหนัก จำนวน Tween 20 ที่เพิ่มขึ้นไม่ดูดซับที่ผิวประจันจึงไม่มีผลต่อการลดแรงตึงระหว่างผิวประจัน แต่ไปอยู่ในวัฏภาคน้ำ การที่ใช้ปริมาณตัวทำอิมัลชันที่ไม่มีประจุเช่น Tween 20 มากเกินไปจนมีโมเลกุลของตัวทำอิมัลชันที่ไม่ดูดซับอยู่ตรงผิวประจันแต่อยู่ในวัฏภาคต่อเนื่อง และเป็นผลทำให้ความเสถียรของอิมัลชันลดลงนั้นไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจนแต่อาจเป็นผลเนื่องมาจาก เมื่อมีตัวทำอิมัลชันในวัฏภาคต่อเนื่องแล้วอนุภาคน้ำมันที่มีตัวทำอิมัลชันล้อมรอบเข้าใกล้กัน ทำให้เกิดการอิมัลชันตัวอย่างชั่วคราวตรงพื้นที่ระหว่างอนุภาคนั้น ทำให้เกิดเป็นไมเซลล์ในวัฏภาคต่อเนื่องซึ่งเป็นน้ำ เป็นผลทำให้ความต้านทานการหลอมรวมตัวระหว่างอนุภาคน้ำมันลดลงนั้น ทำให้ความเสถียรของอิมัลชันลดลงและขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยใหญ่ขึ้น (Friberg and Mandell, 1970; Rahate and Nagarkar, 2007) สำหรับการใช้ตัวทำอิมัลชันที่มีประจุก็พบปรากฏการณ์เดียวกันนี้ แต่กลไกความไม่เสถียรแตกต่างกัน จากรายงานการวิจัยเกี่ยวกับระบบอิมัลชันน้ำมันถั่วเหลืองในน้ำที่ใช้ sodium caseinate เป็นตัวทำอิมัลชันที่ปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 30.00 โดยน้ำหนัก นั้นปริมาณ sodium caseinate ร้อยละ 1.00 โดยน้ำหนัก มีจำนวน sodium caseinate พอสำหรับการล้อมปิดอนุภาคน้ำมัน จึงทำให้อิมัลชันเสถียรกว่าและให้กลุ่มของอนุภาคน้ำมันขนาดเล็กกว่าที่ปริมาณ sodium caseinate ร้อยละ 3.00 โดยน้ำหนัก ซึ่งมีโมเลกุลของ sodium caseinate ที่ไม่ดูดซับที่ผิวอนุภาคน้ำมันและอยู่ในวัฏภาคน้ำ (Hemar *et al.*, 2001) แต่ในกรณีนี้ sodium caseinate เป็นตัวทำอิมัลชันที่มีประจุนั้น ความไม่เสถียรของอิมัลชันเกิดเนื่องจากการจับกลุ่มของอนุภาคแบบ depletion (Furusawa *et al.*, 1999) ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างของความเข้มข้นของ sodium caseinate ที่อยู่บนผิวของ

อนุภาคน้ำมันกับที่อยู่ในวัฏภาคต่อเนื่อง จึงเกิดแรงดัน osmotic ทำให้อนุภาคน้ำมันเข้าใกล้กัน ทำให้มวลรวม ของกลุ่มอนุภาคน้ำมันสูงขึ้น เป็นผลทำให้เกิดการแยกชั้น (Hemar *et al.*, 2001) นอกจากนี้ การใช้ sodium caseinate เป็นตัวทำอิมัลชันนั้น sodium caseinate ที่อยู่ในวัฏภาค ต่อเนื่อง(น้ำ) สามารถจับโยงระหว่างอนุภาคน้ำมัน (bridging) ได้ และเป็นผลทำให้เกิดการแยก ชั้น (Furusawa *et al.*, 1999)



รูปที่ 4.5 แบบจำลองของปริมาณตัวทำอิมัลชันต่อการปิดล้อมของตัวทำอิมัลชันที่ผิวของอนุภาคน้ำมันและขนาดอนุภาคน้ำมัน ในกรณีที่มีปริมาณ (ปริมาตร) ของน้ำมันซึ่งเป็นวัฏภาคกระจายคงที่

4.2.2 ผลของปริมาณ Tween 20 ต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลู

ค่า MBC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำต่อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 4 ชนิด แสดงตามตารางที่ 4.10 พบว่าการเพิ่มปริมาณ Tween 20 ในอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ จากร้อยละ 3.75 เป็นร้อยละ 10.00 15.00 และ 20.00 โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อค่า MBC ของแบคทีเรีย โดยเมื่อเก็บอิมัลชันที่ 7 วัน ยังมีค่า MBC เท่ากับ 0.47 mg/ml และพบว่าอิมัลชันมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ทดสอบคือ *E. coli* และ *S. Choleraesuis* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ทดสอบคือ *S. aureus* และ *B. cereus* โดยที่ระยะเวลาที่เก็บอิมัลชัน 7 วัน อิมัลชันให้ค่า MBC ต่อ *E. coli* และ *S. Choleraesuis* เท่ากับ 0.23 mg/ml และให้ค่า MBC ต่อ *S. aureus* และ *B. cereus* เท่ากับ 0.47 mg/ml

อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 3.75 โดยน้ำหนัก พบว่าฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันลดลงตามอายุการเก็บ คือเมื่อเก็บอิมัลชันไว้นานขึ้นที่ 1 30 60 และ 90 วัน (อิมัลชันเกิดการแยกชั้น) มีค่า MBC ต่อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ทดสอบเป็น 0.47 0.47 0.94 mg/ml และ 1.88 mg/ml ตามลำดับ และพบว่าอิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 20.00 โดยน้ำหนัก มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียลดลงตามอายุการเก็บเช่นกันและเร็วกว่า คือเมื่อเก็บอิมัลชันไว้นานขึ้นที่ 1 30 และ 60 วัน (อิมัลชันเกิดการแยกชั้น) มีค่า MBC เป็น 0.47 0.94 และ 1.88 mg/ml ตามลำดับ สำหรับอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 10.00 โดยน้ำหนัก มีค่า MBC เท่ากับ 0.47 mg/ml และเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บอิมัลชันไว้นาน 60 วัน โดยมีค่า MBC เพิ่มขึ้นเป็น 0.94 mg/ml คงที่ตลอดระยะเวลา 240 วัน (อิมัลชันเกิดการแยกชั้น) เมื่อใช้ Tween 20 ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก เป็นตัวทำอิมัลชัน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่า MBC ชั่วที่สุด โดยมีค่า MBC เท่ากับ 0.47 mg/ml และให้ค่า MBC เพิ่มขึ้นเป็น 0.94 mg/ml เมื่อเก็บอิมัลชันไว้นาน 90 วัน และคงที่จนกระทั่งอิมัลชันแยกชั้นตลอดระยะเวลา 240 วัน

อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 3.75 และ 20.00 โดยน้ำหนัก มีค่า MBC ลดลง เมื่อเก็บอิมัลชันไว้นาน 60 วัน โดยประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *B. cereus* น้อยที่สุด มีค่า MBC 0.94 และ 1.88 mg/ml ตามลำดับ สำหรับอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 10.00 โดยน้ำหนัก เมื่อเก็บไว้ที่ระยะเวลา 1 30 วัน ทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. coli* ต่ำลง คือมีค่า MBC เพิ่มขึ้นจาก 0.23 mg/ml เป็น 0.47 mg/ml และประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *B. cereus* ต่ำลง คือมีค่า MBC เพิ่มขึ้นจาก 0.47 เป็น 0.94 mg/ml แต่ไม่มีผลต่อค่า MBC ของ *S. aureus* และ *S. Choleraesuis* ส่วนอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก ทั้งนี้เนื่องจาก *B. cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ได้ จึงทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ต้านทานต่อการทำลายด้วยอิมัลชันได้ (Hamouda, 1999) เมื่อเก็บไว้ที่ระยะเวลา 60 วัน ทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. coli* ต่ำลง คือมีค่า MBC เพิ่มขึ้นจาก

0.23 เป็น 0.47mg/ml เช่นกัน แต่ไม่มีผลต่อค่า MBC ของ *S. aureus* *S. Choleraesuis* และ *B. cereus* เมื่อเก็บอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 10.00 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ไว้เป็นระยะเวลา 240 วัน ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียยังไม่แตกต่างกัน คือมีค่า MBC ต่อเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ เท่ากับ 0.94 mg/ml

เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูที่ละลายใน DMSO หรือ Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ในตารางที่ 4.6 พบว่า ตลอดระยะเวลาการเก็บสารละลายน้ำมันกานพลู 60 วัน มีค่า MBC เท่ากับ 1.64 mg/ml และสารละลายน้ำมันกานพลูด้วยประสิทธิภาพพลงเมื่อเก็บไว้นาน 90 วัน จากรูปที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลของเวลาที่เก็บสารละลายน้ำมันกานพลูที่ใช้ DMSO หรือ Tween 20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยปริมาตร ต่อค่า MBC เปรียบเทียบกับการใช้อิมัลชันน้ำมันกานพลู (ที่ความเข้มข้นของ Tween 20 เท่ากับร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก) พบว่าตลอดระยะเวลาการเก็บอิมัลชันน้ำมันกานพลูนาน 60 วัน มีค่า MBC เท่ากับ 0.47 mg/ml เห็นได้ว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ดีกว่าสารละลายน้ำมันกานพลู (รูปที่ 4.6) โดยทำให้ใช้ปริมาณน้ำมันกานพลูลดลงถึง 3.49 เท่า และมีอายุการเก็บนานถึง 150 วัน อิมัลชันน้ำมันกานพลูจึงมีประสิทธิภาพด้อยลง แต่ยังคงมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียสูงกว่าสารละลายน้ำมันกานพลู และจากงานวิจัยของ Kawabata และคณะ (1993) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของสารลดแรงตึงผิวต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus sobrinus* พบว่า Tween 20 ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้ แต่เมื่อใช้ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน ในระบบอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ จะช่วยให้น้ำมันกานพลูซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่มีความไวต่อการเสื่อมสลายและสูญเสียฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อม เมื่อถูกล้อมรอบด้วย Tween 20 จะช่วยป้องกันทำให้สารออกฤทธิ์ได้นานขึ้น

เมื่อเก็บอิมัลชันไว้ที่ระยะเวลานานขึ้น อิมัลชันเกิดความไม่เสถียรจากเส้นแวนโน้มการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ (รูปที่ 4.4) พบว่าขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บ โดยอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 ร้อยละ 20.00 โดยน้ำหนัก มีอัตราการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเร็วที่สุด ทำให้เกิดการแยกชั้นเร็วที่สุดคือแยกชั้นภายในเวลา 60 วัน และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียลดลงเร็วที่สุด เนื่องจากเมื่ออิมัลชันแยกชั้นทำให้ปริมาณน้ำมันกานพลูในอิมัลชันมีปริมาณทร่น้อยลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียลดลงด้วย ในทางกลับกันอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก มีอัตราการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยช้าที่สุด ทำให้มีการแยกชั้นช้าคือแยกชั้นภายในเวลา 240 วัน และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียลดลงช้าที่สุดด้วย จากความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยต่อค่า MBC (รูปที่ 4.7) พบว่าอิมัลชันน้ำที่มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเล็กกว่า 10 μm มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดีที่สุด โดยให้ค่า MBC เท่ากับ 0.47 mg/m แต่เมื่ออิมัลชันมีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยใหญ่กว่า 10 μm ฤทธิ์ในการ

ด้านแบคทีเรียลดลง ทั้งนี้เนื่องจากจะอิมัลชันไปรวมอยู่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคเล็กสามารถเข้าไปรวมอยู่บริเวณผนังเซลล์แบคทีเรียได้มากกว่าอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ และตัวทำอิมัลชันจะหันส่วนที่ละลายน้ำได้คือส่วนหัวออกด้านนอกซึ่งช่วยให้น้ำมันกานพลูกระจายตัวในน้ำได้มากขึ้น เมื่ออิมัลชันสัมผัสกับเซลล์แบคทีเรียส่วนหางของตัวทำอิมัลชันที่อยู่ในน้ำมันจะช่วยให้น้ำมันละลายในเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียซึ่งมีโครงสร้างเป็นชั้นไขมันได้ดี (Gaysinsky *et al.*, 2004) ทำให้มีสารออกฤทธิ์คือน้ำมันกานพลูปริมาณมากประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียจึงดีกว่าอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคขนาดใหญ่ (Daniels, 2008)

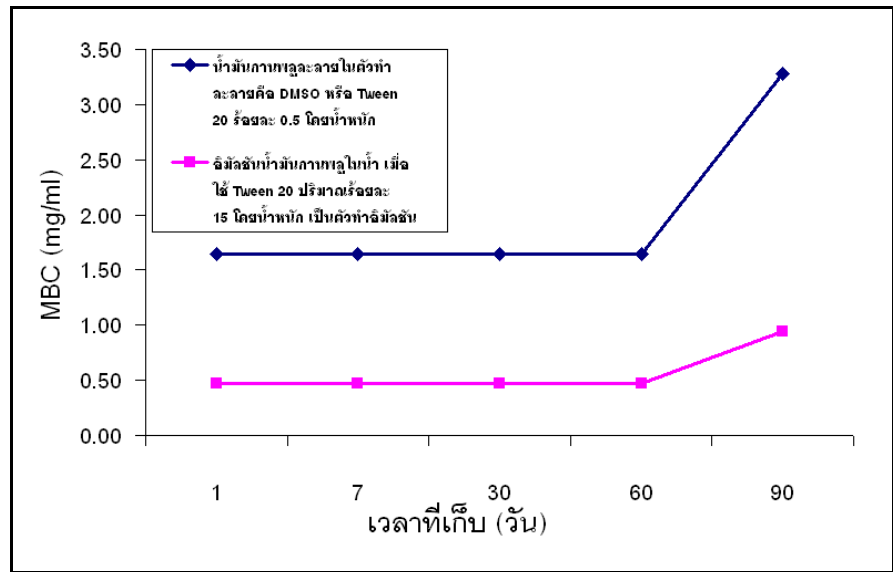
สรุปได้ว่าปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก เป็นปริมาณ Tween 20 ที่เหมาะสมต่อน้ำมันกานพลูปริมาณร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก ให้อิมัลชันมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ศึกษาดีที่สุดและไม่เปลี่ยนแปลงตลอดอายุการเก็บ 240 วัน ที่มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยต่ำสุด $0.502 \pm 0.049 \mu\text{m}$ และมีอัตราการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยต่ำที่สุด ($0.135 \mu\text{m/day}$) ทำให้ความเสถียรสูงสุด จึงเลือกปริมาณตัวทำอิมัลชันที่ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก มาทำการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.10 ผลของปริมาณ Tween 20 อายุการเก็บอิมัลชันต่อค่า MBC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดย
น้ำหนัก

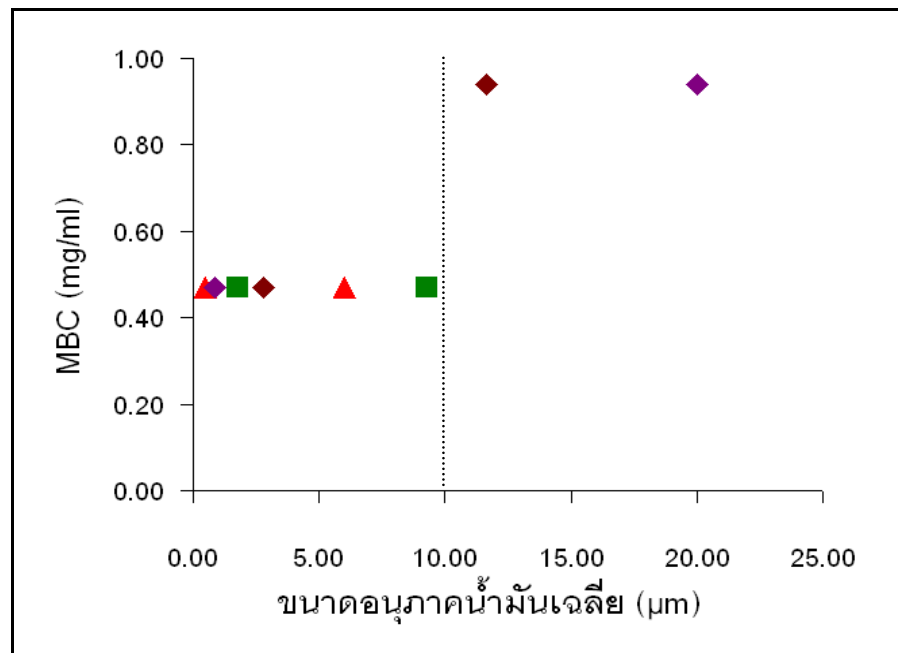
องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)			ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)				ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)			
น้ำมัน กานพลู	Tween 20	น้ำ		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
37.50	3.75	58.75	1	0.47	0.23	0.47	0.47	7	0.47	0.23	0.47	0.47
37.50	10.00	52.50		0.47	0.23	0.23	0.47		0.47	0.23	0.23	0.47
37.50	15.00	47.50		0.47	0.23	0.47	0.47		0.47	0.23	0.23	0.47
37.50	20.00	42.10		0.47	0.23	0.23	0.47		0.47	0.23	0.23	0.47
37.50	3.75	58.75	30	0.47	0.23	0.47	0.94	60	0.47	0.47	0.47	0.94
37.50	10.00	52.50		0.23	0.23	0.23	0.47		0.47	0.47	0.23	0.94
37.50	15.00	47.50		0.47	0.23	0.23	0.47		0.47	0.47	0.23	0.47
37.50	20.00	42.10		0.47	0.23	0.23	0.94		0.47	0.47	0.47	1.88

ตารางที่ 4.10 (ต่อ)

องค์ประกอบของอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)			ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)				ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)			
น้ำมัน กานพลู	Tween 20	น้ำ		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
37.50	3.75	52.50	90	0.94	0.94	0.47	1.88	120	-	-	-	-
37.50	10.00	47.50		0.47	0.47	0.23	0.94		0.47	0.47	0.23	0.94
37.50	15.00	52.50		0.94	0.47	0.23	0.47		0.47	0.47	0.23	0.47
37.50	20.00	47.50		-	-	-	-		-	-	-	-
37.50	10.00	52.50	150	0.47	0.23	0.23	0.94	180	0.47	0.47	0.47	0.94
37.50	15.00	47.50		0.47	0.23	0.23	0.94		0.47	0.23	0.23	0.94
37.50	10.00	52.50	210	0.47	0.47	0.47	0.94	240	0.47	0.47	0.47	0.94
37.50	15.00	47.50		0.47	0.47	0.23	0.94		0.47	0.47	0.47	0.94



รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาการเก็บสารละลายน้ำมันกานพลูและอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำกับค่า MBC



รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยกับค่า MBC

4.3 ผลของชนิดตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ต่อความเสถียรของอิมัลชันในสภาวะปกติ และสภาวะเร่ง ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย และประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวมคงที่ที่ร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อใช้คลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 400 Watt amplitude 80 μm ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที

4.3.1 ผลของชนิดตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ต่อความเสถียรของอิมัลชันในสภาวะปกติ และสภาวะเร่ง และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C)

จากผลในข้อ 4.2 พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก เสถียรสูงสุดและมีอัตราการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคช้าที่สุดที่ปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลการใช้ตัวทำอิมัลชันผสมระหว่างตัวทำอิมัลชันที่ละลายในน้ำคือ Tween 20 ร่วมกับตัวทำอิมัลชันที่ละลายในน้ำมันในกลุ่ม Span โดยศึกษาผลของ Span ที่มีโครงสร้างต่างกัน 3 ชนิดคือ Span 20 Span 60 และ Span 65 (รูปที่ 2.4) และค่า HLB ต่อความเสถียรของอิมัลชันและขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยพร้อมการกระจายขนาดอนุภาคน้ำมันของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูและปริมาณรวมของตัวทำอิมัลชันคงที่ที่ร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ผลการทดลองในตารางที่ 4.11 แสดงว่าเมื่อเก็บอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) อิมัลชันที่ใช้ Span 20 หรือ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 ที่ทุกค่า HLB ในช่วง 10-15 ยังไม่เกิดการแยกชั้นหลังการเตรียมจนถึงปัจจุบันรวมมากกว่า 210 วัน (โดยอิมัลชันที่ใช้ Span ร่วมกับ Tween 20 ทุกตัวอย่างเตรียมหลังอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20) แต่อิมัลชันที่ใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 แยกชั้นหลังการเตรียมเร็วกว่าและร้อยละความสูงของชั้นบนน้อยกว่าอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 เพียงตัวเดียว 240 วัน และประมาณร้อยละ 9 ตามลำดับ ซึ่งบ่งว่าเมื่อใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ทำให้อิมัลชันเสถียรน้อยกว่าเมื่อใช้เฉพาะ Tween 20 นอกจากนี้ยังพบว่าค่า HLB ไม่มีผลต่อร้อยละความสูงของชั้นบนอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับร้อยละ 95 และเวลาที่เกิดการแยกชั้นสำหรับอิมัลชันที่ใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20

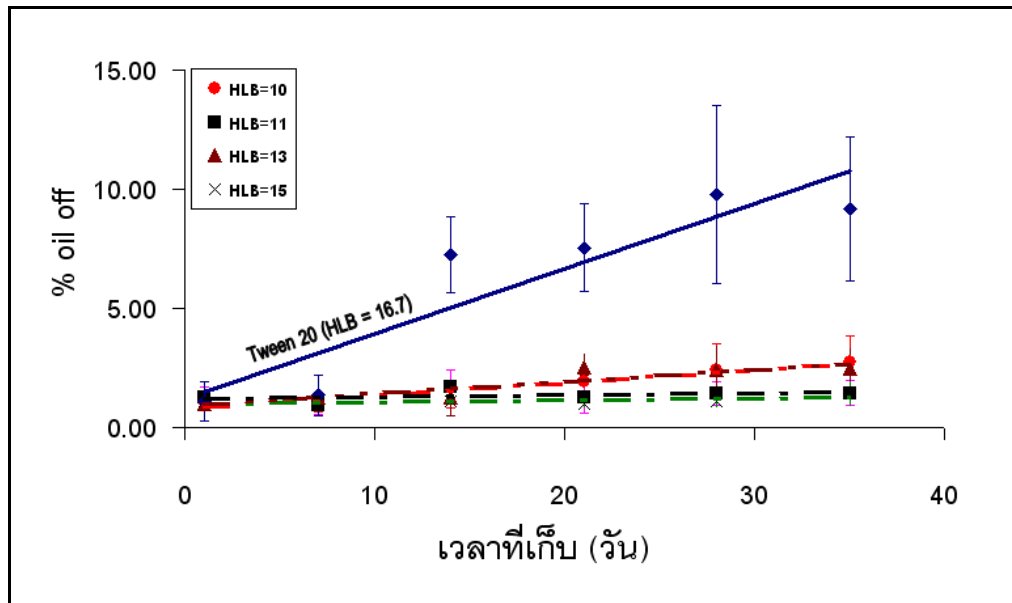
ตารางที่ 4.11 ผลของตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน (M) และค่า HLB ต่อระยะเวลาที่ทำให้อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำเกิดการแยกชั้น ที่ปริมาณน้ำมันกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	ความเข้มข้นของตัวทำอิมัลชัน (M)			เวลาที่แยกชั้นหลังการเตรียม (วัน)	ร้อยละความสูงของอิมัลชันชั้นบนหลังอิมัลชันแยกชั้น
		Tween 20	Span	รวม		
Tween 20	16.7	0.122	-	0.122	240	85.75 ^b ± 0.66
Span 20 ร่วมกับ Tween 20	10	0.021	0.359	0.380	>210*	-
	11	0.037	0.303	0.340	>210*	-
	13	0.066	0.199	0.265	>210*	-
	15	0.098	0.087	0.185	>210*	-
Span 60 ร่วมกับ Tween 20	10	0.054	0.195	0.249	>210*	-
	11	0.064	0.166	0.230	>210*	-
	13	0.086	0.105	0.191	>210*	-
	15	0.105	0.049	0.154	>210*	-
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	10	0.066	0.072	0.138	30	75.25 ^a ± 2.41
	11	0.073	0.062	0.135	30	77.00 ^a ± 1.52
	13	0.092	0.039	0.131	30	77.58 ^a ± 1.70
	15	0.108	0.019	0.127	30	77.08 ^a ± 1.44

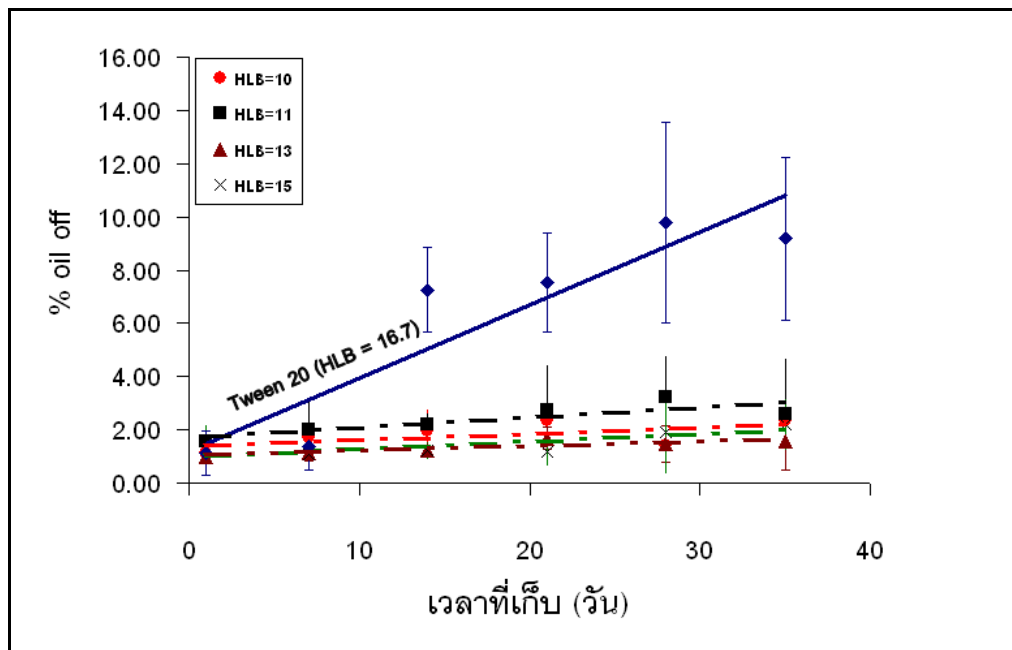
* รายงานผลถึงวันที่ 14 พฤษภาคม พ.ศ. 2553

ตัวอักษร a, b,... หมายถึงค่าที่แสดงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

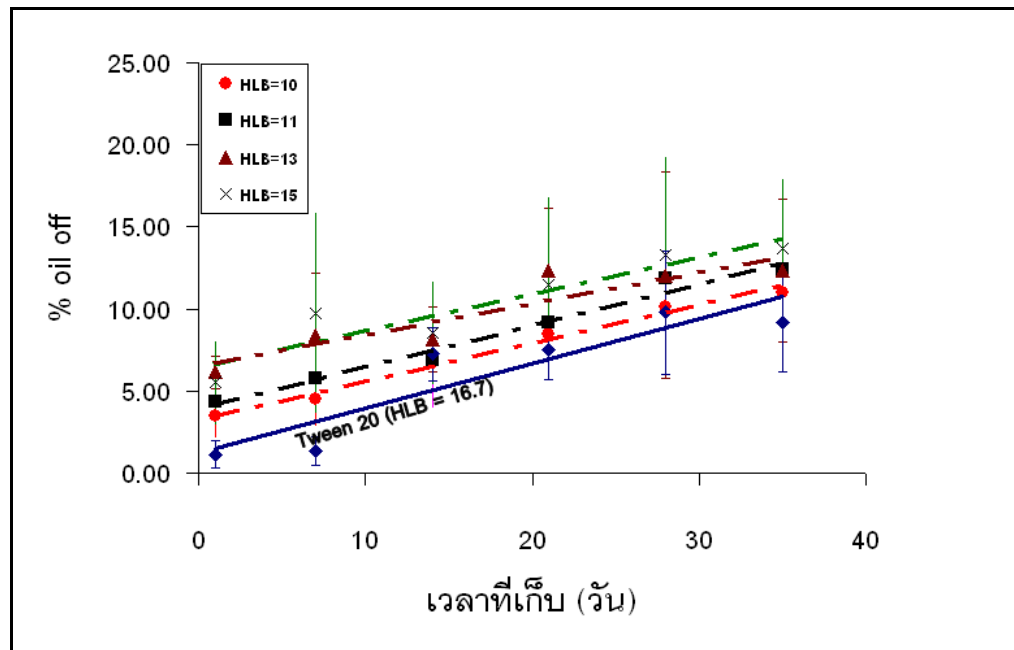
จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่แยกออกจากอิมัลชันในสภาวะเร่ง (หลังการปั่นเหวี่ยง ที่ 2,000g เป็นเวลา 10 นาที ในหน่วยของร้อยละโดยปริมาตร หรือ % oil off) ที่เวลาหลังการเตรียมต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ (4.8 4.9 และ 4.10) และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่เวลาหลังการเตรียมต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ (4.11 4.12 และ 4.13) สำหรับอิมัลชันที่ใช้ Span 20 Span 60 หรือ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ตามลำดับ แล้วนำมาวิเคราะห์ทางสถิติ (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบ % oil off ระหว่างอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 เพียงตัวเดียวกับอิมัลชันที่ใช้ Span ร่วมกับ Tween 20 นั้น % oil off ของอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 เพียงตัวเดียว สูงกว่าของอิมัลชันที่ใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 และ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 แต่ต่ำกว่าของอิมัลชันที่ใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ที่ทุกเวลาหลังการเตรียมอิมัลชันและทุกค่า HLB สำหรับขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยพบว่าขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยในอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 เพียงตัวเดียว ไม่แตกต่างกับในอิมัลชันที่ใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 หรือ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 สำหรับอิมัลชันที่วิเคราะห์หลังการเตรียม 1 และ 7 วัน แต่หลังการเตรียมในช่วง 15-35 วัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยในอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 เพียงตัวเดียว ใหญ่กว่าในอิมัลชันที่ใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 หรือ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 ขณะที่พบว่าขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยในอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 เพียงตัวเดียว เล็กกว่าในอิมัลชันที่ใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ตั้งแต่ 7 วัน หลังการเตรียมอิมัลชัน อัตราการเปลี่ยนแปลง % oil off และอัตราการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 เพียงตัวเดียว เร็วกว่าของอิมัลชันที่ใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 หรือ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 (กล่าวคือ เมื่อใช้ Span 20 หรือ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ % oil off และอัตราการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยตามเวลาที่เก็บ) แต่ช้ากว่าของอิมัลชันที่ใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 สำหรับอิมัลชันที่ใช้ Span ร่วมกับ Tween 20 พบว่าเมื่อใช้ Span ชนิดเดียวกัน ค่า HLB ในช่วง 10-15 ไม่มีผลต่อ % oil off และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ที่วิเคราะห์ในแต่ละเวลาการเก็บ และยังไม่มีส่วนต่ออัตราการเปลี่ยนแปลง % oil off และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (หรือความชันของเส้นแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่าง % oil of หรือขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย กับเวลาที่เก็บอิมัลชัน) ในช่วง 1-35 วัน หลังการเตรียมอิมัลชัน (ตารางที่ 4.12) นอกจากนั้นยังพบว่า % oil off และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่วิเคราะห์ในแต่ละเวลาการเก็บ เมื่อใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ไม่แตกต่างกันกับเมื่อใช้ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 แต่เมื่อใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 พบว่าทั้ง % oil off และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ที่วิเคราะห์ในแต่ละเวลาการเก็บ สูงกว่าเมื่อใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 หรือ Span 60 ร่วมกับ Tween 20



รูปที่ 4.8 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อ % oil off สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7)



รูปที่ 4.9 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อ % oil off สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 60 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7)

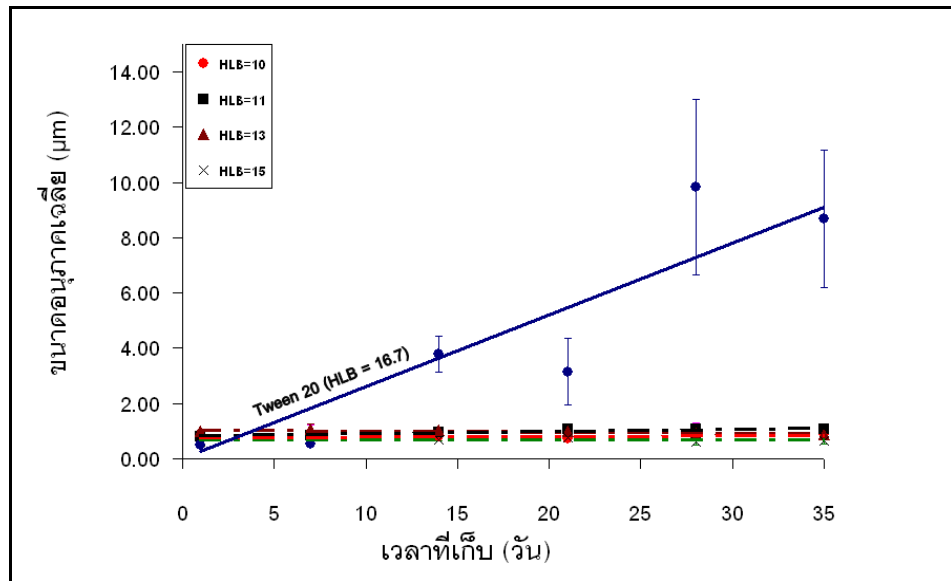


รูปที่ 4.10 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อ % oil off สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7)

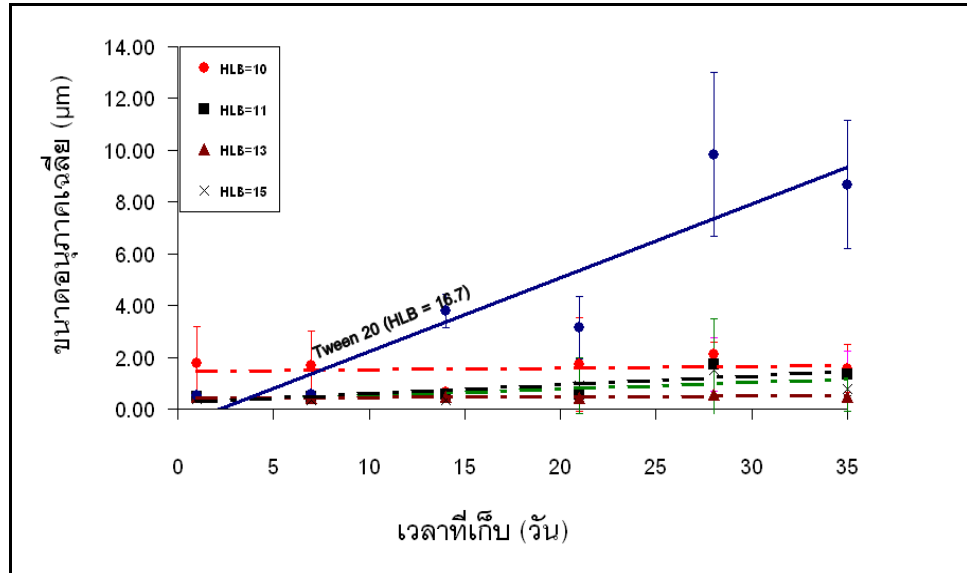
ตารางที่ 4.12 ผลของชนิดตัวทำอิมัลชันและค่า HLB ต่อความชันของความสัมพันธ์ระหว่าง % oil off หลังการปั่นเหวี่ยงที่ 2000g เป็นเวลา 10 นาที กับเวลาที่เก็บอิมัลชัน สำหรับอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ตัวทำอิมัลชัน	ค่า HLB	ความชันของเส้นแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่าง % oil off กับเวลาที่เก็บ (ต่อวัน)
Tween 20	16.7	0.27 ^b ± 0.07
Span 20 ร่วมกับ Tween 20	10	0.05 ^a ± 0.01
	11	0.01 ^a ± 0.01
	13	0.05 ^a ± 0.01
	15	0.01 ^a ± 0.01
Span 60 ร่วมกับ Tween 20	10	0.02 ^a ± 0.01
	11	0.03 ^a ± 0.04
	13	0.02 ^a ± 0.01
	15	0.03 ^a ± 0.03
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	10	0.23 ^b ± 0.08
	11	0.26 ^b ± 0.03
	13	0.19 ^b ± 0.07
	15	0.23 ^b ± 0.04

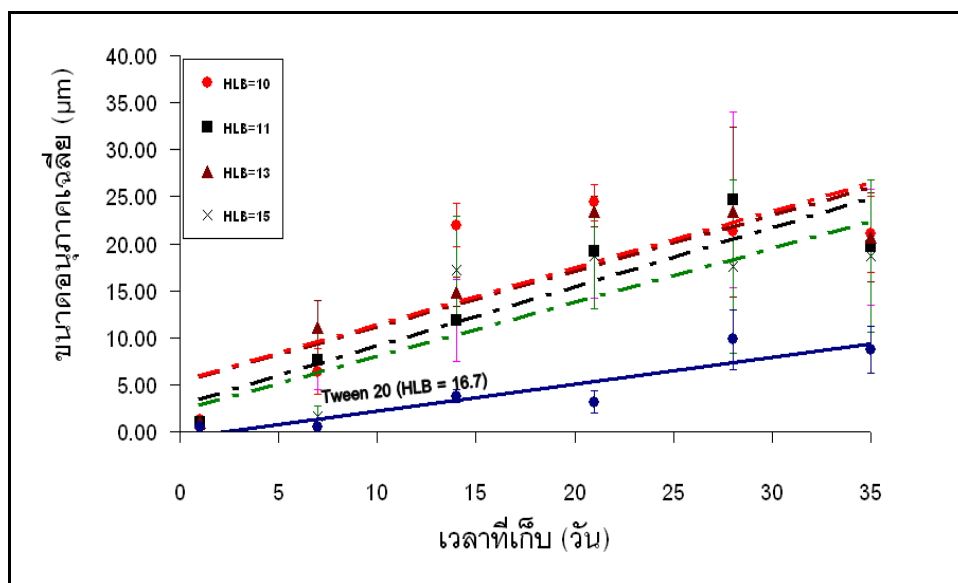
ตัวอักษร a, b,... หมายถึงค่าที่แสดงมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.11 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7)



รูปที่ 4.12 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 60 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7)



รูปที่ 4.13 ผลของเวลาที่เก็บอิมัลชันต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย สำหรับอิมัลชันที่ใช้ตัวทำอิมัลชัน Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 เปรียบเทียบกับอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB = 16.7)

จากตารางที่ 4.13 แสดงว่าแรงตึงระหว่างผิวประจันระหว่างน้ำมันกานพลูกับน้ำเท่ากับ 0.999 ± 0.047 mN/m เมื่อใช้เฉพาะ Tween 20 (HLB=16.7) เป็นตัวทำอิมัลชัน เมื่อใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 หรือ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 ทำให้มีค่าแรงตึงผิวต่ำลง โดยแรงตึงระหว่างผิวประจันต่ำลงเมื่อค่า HLB เพิ่มขึ้นและที่ค่า HLB คงที่ แรงตึงระหว่างผิวประจันเมื่อใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ต่ำกว่าเมื่อใช้ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 แต่เมื่อใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 แรงนี้สูงกว่าเมื่อใช้เฉพาะ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน โดยที่ค่า HLB เท่ากับ 13 ให้ค่าแรงตึงระหว่างผิวประจันสูงสุด แต่ที่ค่า HLB เท่ากับ 10 11 และ 15 ให้ค่าแรงนี้ไม่แตกต่างกัน อิมัลชันที่ใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 หรือ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 (ซึ่งไม่มีการเพิ่มของ % oil off และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยตามเวลาที่เก็บ) จึงเสถียรกว่าอิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 (ซึ่งมีการเพิ่มของ % oil off และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยตามเวลาที่เก็บ) เนื่องจากมีแรงตึงระหว่างผิวประจันต่ำกว่า ซึ่งกลับกันในกรณีที่ใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากโครงสร้างของตัวทำอิมัลชัน กล่าวคือ Span 65 มีโครงสร้างโมเลกุลที่เกาะกะ โดยมีส่วนหางหรือส่วน hydrophobic 3 สาย ทำให้การเรียงตัวของโมเลกุล Span 65 กับโมเลกุล Tween 20 ที่ล้อมปิดอนุภาคน้ำมันจึงหลวมกว่าการเรียงตัวของโมเลกุล Tween 20 ซึ่งทำให้ค่าแรงตึงระหว่างผิวประจันสูงกว่าและความแข็งแรงของชั้นที่ล้อมปิดของตัวทำอิมัลชันต่ำกว่า อิมัลชันที่ได้จึงมีความเสถียร

น้อยกว่า ขณะที่โครงสร้างของ Span 20 นั้น มีความยาวส่วนหางเท่ากับของ Tween 20 แต่ส่วนหัวที่เป็น hydrophilic มีขนาดเล็กกว่าของ Tween 20 จึงอาจทำให้มีการเรียงตัวของโมเลกุลของ Tween 20 และ Span 20 ล้อมปิดอนุภาคน้ำมันได้แน่นกว่าการเรียงตัวของโมเลกุล Tween 20 อย่างเดียว ซึ่งอาจเป็นผลทำให้แรงตึงระหว่างผิวประจันต่ำกว่า และฟิล์มของตัวทำอิมัลชันที่ล้อมอนุภาคน้ำมันแข็งแรงกว่า เมื่อใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ส่วนโครงสร้างของ Span 60 มีส่วนหัวเท่ากับ Span 20 แต่ส่วนหางยาวกว่า Span 20 ซึ่งอาจทำให้มีการเรียงตัวของโมเลกุลของ Tween 20 กับ Span 60 ใกล้เคียงกับของ Tween 20 กับ Span 20 เป็นผลให้อิมัลชันที่ใช้ Span 20 หรือ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 มีค่า % oil off ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและอัตราการเพิ่มของ % oil off และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ภายในระยะเวลาที่ทำการศึกษา อย่างไรก็ตามจากค่าแรงตึงระหว่างผิวประจันระหว่างน้ำมันกานพลูและน้ำต่ำสุดเมื่อใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ที่ HLB 15 ซึ่งอาจส่งผลให้อิมัลชันเสถียรที่สุดในระยะยาวจึงเลือกนำมาศึกษาต่อไป

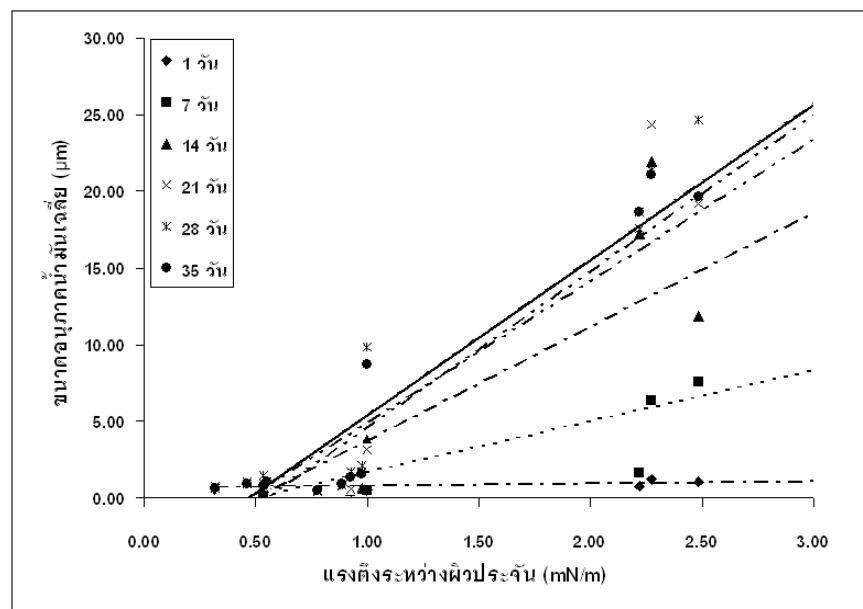
ตารางที่ 4.13 ผลของชนิดของ Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ต่อแรงตึงระหว่างผิวประจันระหว่างน้ำมันกานพลูกับน้ำ

ตัวทำอิมัลชัน	ค่า HLB	แรงตึงระหว่างผิวประจัน (mN/m)
Tween 20	16.7	0.999 ± 0.047
Span 20 ร่วมกับ Tween 20	10	0.887 ^{dA} ± 0.012
	11	0.547 ^{cA} ± 0.005
	13	0.458 ^{bA} ± 0.003
	15	0.316 ^{aA} ± 0.001
Span 60 ร่วมกับ Tween 20	10	0.973 ^{dAB} ± 0.003
	11	0.928 ^{cAB} ± 0.016
	13	0.777 ^{bA} ± 0.003
	15	0.536 ^{aA} ± 0.010
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	10	2.275 ^{aA} ± 0.034
	11	2.484 ^{aA} ± 0.128
	13	3.167 ^{bB} ± 0.247
	15	2.220 ^{aA} ± 0.058

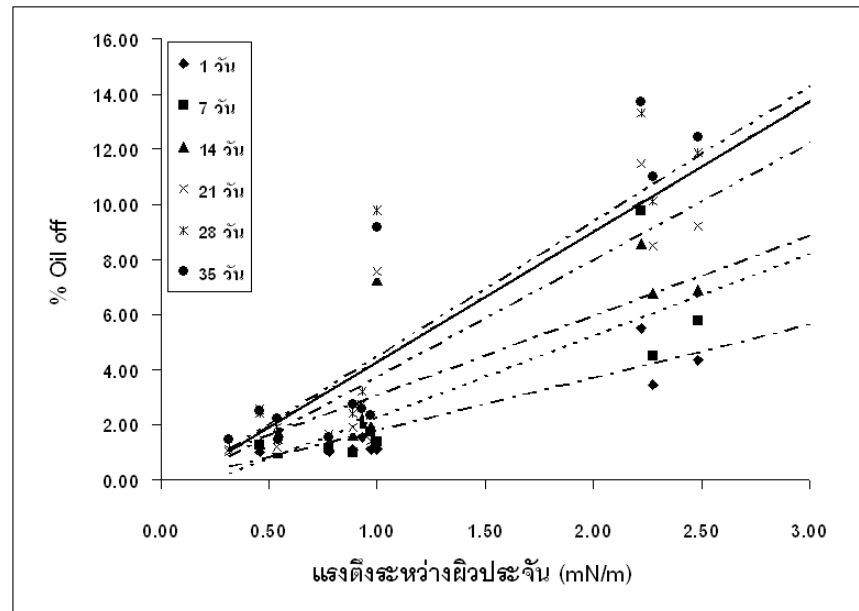
ตัวอักษร a, b, c, .. หมายถึงแรงตึงระหว่างผิวประจันที่ค่า HLB เดียวกัน มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมรั้อยละ 95

ตัวอักษร A, B, C, .. หมายถึงแรงตึงระหว่างผิวประจันที่ใช้ Span ชนิดเดียวกัน มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมรั้อยละ 95

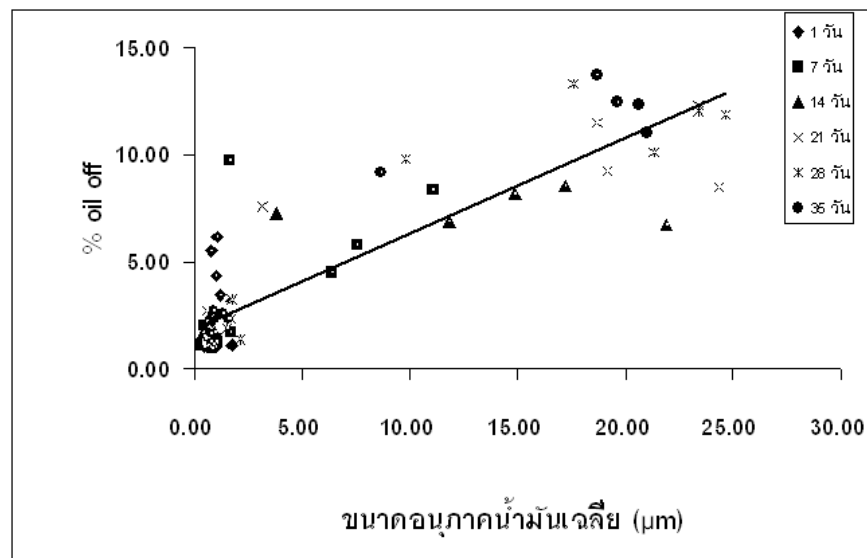
จากรูปที่ 4.14 พบว่าแรงดึงระหว่างผิวประจันไม่มีผลต่อขนาดอนุภาคน้ำมันกานพลูเฉลี่ย เฉพาะหลังการเตรียมอิมัลชัน 1 วันเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากแรงจากคลื่นเหนือเสียงสูงกว่าแรงดึงระหว่างผิวประจันมาก จึงสามารถลดขนาดอนุภาคน้ำมันกานพลูให้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันได้ แต่เมื่อเก็บอิมัลชันไว้นานขึ้น แรงดึงระหว่างผิวประจันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคน้ำมันกานพลูเฉลี่ยและพบว่าวันที่เก็บอิมัลชันวันเดียวกันตั้งแต่ 7 วันขึ้นไปความสัมพันธ์ระหว่างแรงดึงระหว่างผิวประจันกับอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเป็นเส้นตรง นอกจากนี้ยังพบว่าวันที่เก็บอิมัลชันวันเดียวกัน ความสัมพันธ์ระหว่างแรงดึงระหว่างผิวประจันกับ % oil off เป็นเส้นตรง (รูปที่ 4.15) แสดงว่าแรงดึงระหว่างผิวประจันมีผลต่อความเสถียรของอิมัลชัน โดยเมื่อแรงดึงระหว่างผิวประจันต่ำทำให้ได้อนุภาคน้ำมันกานพลูที่มีขนาดเล็กกว่า และ % oil off ต่ำกว่าเมื่อแรงดึงระหว่างผิวประจันสูง จึงทำให้อิมัลชันที่มีแรงดึงระหว่างผิวประจันต่ำมีความเสถียรสูงกว่า นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคน้ำมันกานพลูเฉลี่ยกับ % oil off เป็นเส้นตรง (รูปที่ 4.16) บ่งว่าขนาดอนุภาคน้ำมันกานพลูมีผลต่อความเสถียรของอิมัลชันโดยตรงตลอดเวลาที่เก็บอิมัลชันที่สามารถคงขนาดเฉลี่ยของอนุภาคน้ำมันกานพลูที่เล็กได้ นั้นเป็นผลเนื่องมาจากแรงดึงระหว่างผิวประจันระหว่าง 2 ภูมิภาคในอิมัลชันนั้น มีผลทำให้อิมัลชันเสถียรกว่าคือให้ % oil off ต่ำ (Mclemants, 2007)



รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างแรงดึงระหว่างผิวประจันกับขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย ที่เวลาที่เก็บอิมัลชัน 1 7 14 21 28 และ 35 วัน



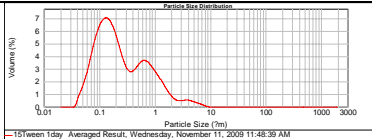
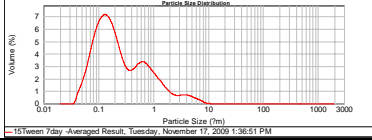
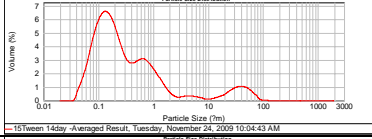
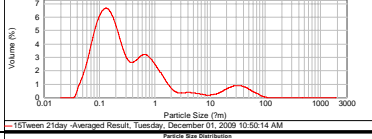
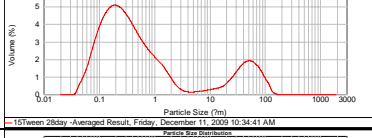
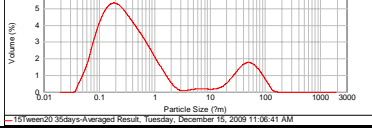
รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างแรงตึงระหว่างผิวประจันกับ % oil off ที่เวลาที่เก็บ อิมัลชัน 1 7 14 21 28 และ 35 วัน



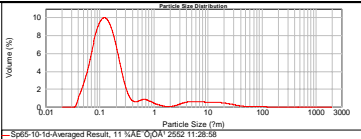
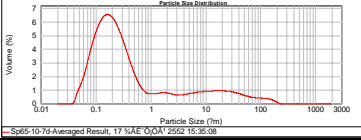
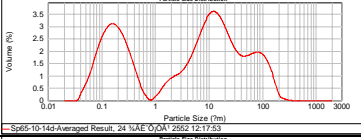
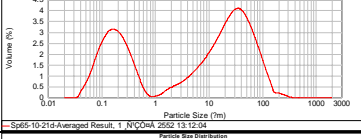
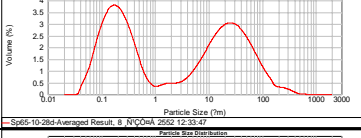
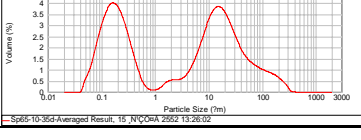
รูปที่ 4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยกับ % oil off ที่เวลาที่เก็บ อิมัลชัน 1 7 14 21 28 และ 35 วัน

จากผลการทดลองพบว่าอิมัลชันที่มีการเพิ่มของขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยตามเวลา คือ อิมัลชันที่ใช้เฉพาะ Tween 20 และที่ใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 เมื่อพิจารณารูปแบบการกระจายขนาดอนุภาคน้ำมัน (ตารางที่ 4.14) พบว่าไม่เป็นแบบ unimodal และมีการเปลี่ยนแปลงการกระจายขนาดอนุภาคน้ำมันตามเวลาที่เก็บทุกตัวอย่างดังกล่าวข้างต้น และจากการหาความสัมพันธ์ระหว่าง (ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย)³ กับเวลาที่เก็บ ตามทฤษฎีของ Liftshitz-Slyozov Wagner (LSW) พบว่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation of coefficient, R^2) ของความสัมพันธ์นี้ สำหรับอิมัลชันเหล่านี้มีค่าอยู่ในช่วง 0.50-0.75 จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าการเพิ่มของขนาดอนุภาคน้ำมัน เนื่องมาจาก Ostwald ripening และจากค่า R^2 ของความสัมพันธ์ระหว่าง $[1/(\text{ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย})^2]$ กับเวลาที่เก็บของอิมัลชันเหล่านี้อยู่ในช่วง 0.41-0.76 จึงไม่อาจกล่าวได้ว่าการเพิ่มของขนาดอนุภาคน้ำมันนั้น เนื่องมาจากการหลอมรวมตัวเช่นกัน (McClements, 2007) แต่จากรูปที่ 4.17 บันทึกจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่ามีการจับกลุ่มของอนุภาคน้ำมันและมีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่ใหญ่ขึ้นตามเวลาที่เก็บ ในอิมัลชันที่ใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ทุกค่า HLB และที่ใช้ Tween 20 เพียงตัวเดียว ดังนั้น เป็นไปได้ว่าความไม่เสถียรของอิมัลชันที่ใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ทุกค่า HLB และที่ใช้ Tween 20 เพียงตัวเดียวอาจเกิดจากปรากฏการณ์หลายอย่างไม่ใช่อะไรอย่างใดอย่างหนึ่ง แต่จากค่าความแตกต่างของความหนาแน่นระหว่างวัฏภาคน้ำและน้ำมันกานพลูในอิมัลชันที่ศึกษา ซึ่งมีค่าสูงสุด 0.012 g/ml (ตารางที่ 4.15) ดังนั้น ที่สภาวะปกติการนอนกันจึงไม่ใช่ปรากฏการณ์หลักสำหรับความไม่เสถียรของอิมัลชันที่ศึกษา

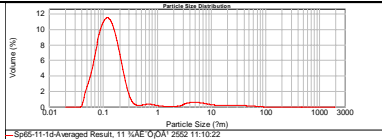
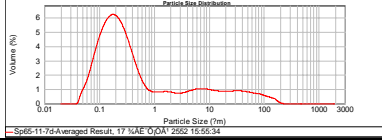
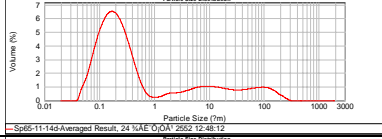
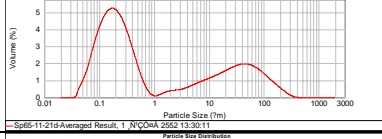
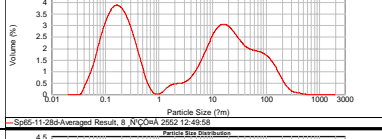
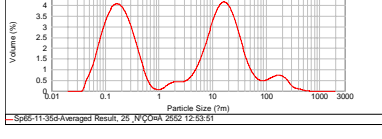
ตารางที่ 4.14 รูปแบบการกระจายของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มี Tween 20 หรือ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจายขนาด	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Tween 20	16.7	1		5.423	0.502 ± 0.049	0.6268	0.7114
		7		6.039	0.547 ± 0.089		
		14		18.374	3.779 ± 0.652		
		21		13.597	3.150 ± 1.210		
		28		126.091	9.830 ± 3.169		
		35		124.177	8.675 ± 2483		

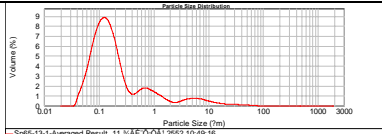
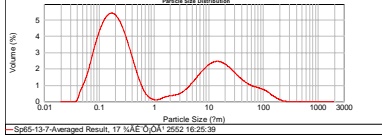
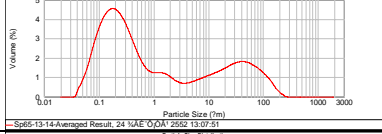
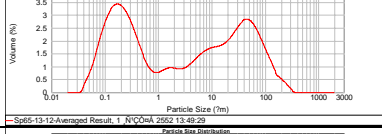
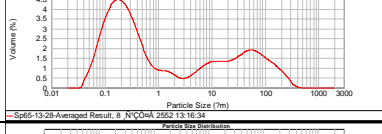
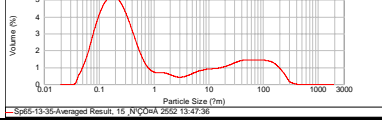
ตารางที่ 4.14 (ต่อ)

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	10	1		5.250	1.226 ± 0.445	0.5019	0.4277
		7		67.298	6.376 ± 2.412		
		14		10.066	21.942 ± 0.074		
		21		5.824	24.365 ± 1.917		
		28		15.262	21.356 ± 3.155		
		35		8.280	21.038 ± 4.059		

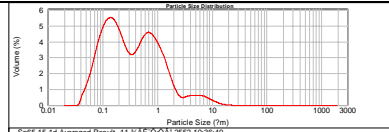
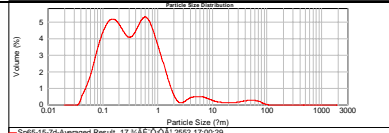
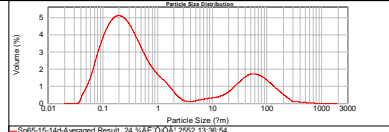
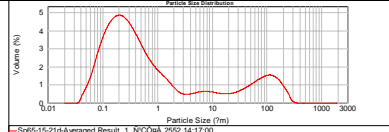
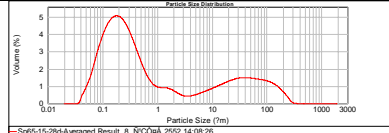
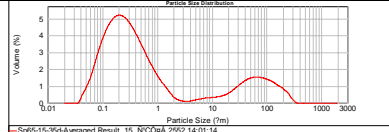
ตารางที่ 4.14 (ต่อ)

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	11	1		1.770	1.017 ± 0.429	0.6493	0.4173
		7		77.102	7.568 ± 3.127		
		14		142.207	11.847 ± 4.393		
		21		196.408	19.194 ± 5.021		
		28		13.079	24.672 ± 9.390		
		35		7.592	19.649 ± 6.141		

ตารางที่ 4.14 (ต่อ)

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	13	1		8.596	1.035 ± 0.401	0.6722	0.4101
		7		98.984	11.092 ± 2.806		
		14		117.130	14.878 ± 1.575		
		21		22.242	23.420 ± 1.598		
		28		163.771	23.405 ± 9.023		
		35		230.168	20.672 ± 4.718		

ตารางที่ 4.14 (ต่อ)

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	15	1		4.737	0.788 ± 0.101	0.7503	0.5588
		7		3.776	1.614 ± 1.134		
		14		181.706	17.226 ± 5.690		
		21		204.208	18.698 ± 5.651		
		28		178.129	17.574 ± 9.233		
		35		209.772	18.694 ± 8.068		

ตารางที่ 4.15 ความหนาแน่นของวัฏภาคน้ำและวัฏภาคน้ำมัน เมื่อใช้ Tween 20 และ Span 20 หรือ Span 60 หรือ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	ความหนาแน่น (g/ml)	
		วัฏภาคน้ำ	วัฏภาคน้ำมัน
Tween 20	16.7	1.008	1.012
Span 20 ร่วมกับ Tween 20	10	1.002	1.009
	11	0.996	1.003
	13	1.010	1.019
	15	1.001	1.008
Span 60 ร่วมกับ Tween 20	10	0.994	0.999
	11	0.990	0.996
	13	0.972	0.981
	15	1.009	1.017
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	10	0.978	0.987
	11	1.003	1.013
	13	0.988	0.998
	15	1.003	1.015

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	เวลาที่เก็บ (วัน)					
		1	7	14	21	28	35
Tween 20	16.7						
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	10						
	11						
	13						
	15						

รูปที่ 4.17 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงอนุภาคน้ำมันกานพลูของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ สำหรับอิมัลชันที่ใช้ Tween 20 หรือ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน ที่ค่า HLB 10 11 13 และ 15 ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

4.3.2 ผลของชนิดตัวทำอิมัลชันในกลุ่ม Span ที่ใช้ร่วมกับ Tween 20 ต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลู

เมื่อนำอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่ใช้ตัวทำอิมัลชันชนิดผสมมาหาค่า MBC ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.15–4.17 พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่ใช้ตัวทำอิมัลชันผสม มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 4 ชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียของสารละลายน้ำมันกานพลูและการใช้ตัวทำอิมัลชัน คือ Tween 20 เพียงตัวเดียว โดยเมื่อใช้ Span 20 เป็นตัวทำอิมัลชันรวม มีค่า MBC 0.23 mg/ml ที่ทุกค่า HLB และมีค่า MBC คงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บอิมัลชัน 180 วัน (ตารางที่ 4.16) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า MBC ของสารละลายน้ำมันกานพลู (ตารางที่ 4.6) ซึ่งมีค่า MBC 0.16 mg/ml พบว่าการใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดีขึ้น 7.13 เท่า และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับค่า MBC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มี Tween 20 เพียงตัวเดียวเป็นตัวทำอิมัลชัน (ตารางที่ 4.10) ซึ่งมีค่า MBC 0.47 mg/ml และค่า MBC เพิ่มขึ้นเป็น 0.94 mg/ml เมื่อเวลาที่เก็บอิมัลชันเป็น 150 วัน แสดงว่าการใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ทำให้ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดีขึ้น 2–4 เท่า โดยเป็นการเพิ่มฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. aureus* และ *B. cereus* และเมื่อนำอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่ใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 มาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อทำให้เกิดความไม่เสถียรแบบแรง โดยอิมัลชันเกิดการแยกชั้นมีน้ำมันกานพลูแยกออกมาที่ชั้นล่างของอิมัลชัน และเมื่อนำส่วนที่ยังคงเป็นอิมัลชัน(ชั้นบน) มาหาค่า MBC พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง คือให้ค่า MBC 0.23 mg/ml (ตารางที่ 4.19) เป็นเพราะตัวทำอิมัลชันชนิดรวมที่ห่อหุ้มรอบอนุภาคน้ำมันกานพลู มีความหนาแน่นพอจึงทำให้ปริมาตรน้ำมันกานพลูแยกชั้นออกมาน้อย (รูปที่ 4.8) ไม่ส่งผลกระทบต่อฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียของอิมัลชัน เมื่อใช้ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชันที่ทุกค่า HLB พบว่าให้ค่า MBC 0.23 mg/ml ตลอดระยะเวลาในการเก็บอิมัลชัน 180 วัน (ตารางที่ 4.17) โดยให้ผลและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียเช่นเดียวกับการใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 แต่เมื่อใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชันที่ทุกค่า HLB พบว่าค่า MBC ที่ระยะเวลาการเก็บอิมัลชัน 1–7 วันมีค่า 0.23 mg/ml (ตารางที่ 4.18) เมื่อเก็บอิมัลชันไว้เป็นระยะเวลา 14–35 วัน พบว่าค่า MBC เพิ่มขึ้นเป็น 0.47 mg/ml และพบว่าฤทธิ์ในการต้าน *S. aureus* และ *B. cereus* ด้อยลง เมื่อหาค่า MBC ของอิมัลชันหลังการปั่นเหวี่ยงที่ระยะเวลาการเก็บอิมัลชัน 14–35 วัน พบว่ามีค่า MBC 0.47 mg/ml เช่นกัน (ตารางที่ 4.21) แต่มีฤทธิ์ในการต้าน *E. coli* และ *S. Choleraesuis* ด้อยลง เนื่องจากโครงสร้างของ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ที่ล้อมรอบอนุภาคน้ำมันกานพลูไม่หนาแน่นพอทำให้อนุภาคมีการรวมตัวกันและมีขนาดใหญ่ขึ้นเกิน 10 μm ที่ระยะเวลาการเก็บอิมัลชันมากกว่า 14 วัน (รูปที่ 4.13) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรีย

ของอิมัลชันลดลงเนื่องจากอิมัลชันที่ขนาดอนุภาคเฉลี่ยใหญ่ จะไปล้อมรอบผนังเซลล์แบคทีเรียได้จำนวนน้อยกว่าอิมัลชันที่มีขนาดเล็ก ทำให้ปริมาณสารออกฤทธิ์ต่อเซลล์แบคทีเรียมีปริมาณน้อย ส่งผลให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียลดลง

จากกลไกการทำลายเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันกานพลู คือสาร eugenol แทรกเข้าไปในส่วนของไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์และไมโทคอนเดรียของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียสูญเสียความสามารถในการซึมผ่านของสารและนำไปสู่การรั่วของ intercellular membrane ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์ไหล (รั่ว) ออกสู่ภายนอก (Burt, 2004) จากโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของ peptidoglycan หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ จึงทำให้ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกของอิมัลชันซึ่งออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์มีประสิทธิภาพดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แต่เมื่อใช้ตัวทำอิมัลชันผสมเป็นตัวทำอิมัลชัน ส่งผลให้ฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกดีขึ้น เนื่องจากการใช้ตัวทำอิมัลชันร่วมมีตัวทำอิมัลชันที่สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและในน้ำมัน ตัวทำอิมัลชันที่สามารถละลายได้ทั้งในน้ำมันสามารถเพิ่มการกระจายตัวของน้ำมันที่บริเวณผนังเซลล์ได้ดีขึ้น ทำให้น้ำมันกานพลูสามารถเข้าไปออกฤทธิ์ได้โดยตรงกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีผลทำให้การทำงานของผนังเซลล์ถูกรบกวนได้มากขึ้นเกิด โดยทำให้ผนังเซลล์เป็นเกิดเป็นรู ดังแสดงในรูปที่ 4.18 ทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด

สรุปได้ว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่คัดเลือกมาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับล้างผิวสัมผัสอาหารของเครื่องมือแปรรูป คืออิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูและตัวทำอิมัลชันผสม (Span 20 ร่วมกับ Tween 20) HLB 15 ร้อยละ 3.75 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ มีความเสถียรและฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียดีที่สุด โดยยังไม่มีอาการแยกชั้นที่ระยะเวลาที่เก็บอิมัลชัน 210 วัน และเมื่อศึกษาความเสถียรในสภาวะเร่งพบว่าอัตราการเพิ่ม % oil off เท่ากับ 0.008 ± 0.002 ต่อวัน และมีอัตราการโตของขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย 0.002 ± 0.002 $\mu\text{m}/\text{day}$ และมีค่า MBC ต่อแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 4 ชนิด เท่ากับ 0.230 mg/ml

ตารางที่ 4.16 ผลของ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และ ปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ค่า HLB	ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)				ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
		10	1	0.23	0.23		0.23	0.23	21	0.23
11	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
13	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
15	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
10	7	0.23	0.23	0.23	0.23	28	0.23	0.23	0.23	0.23
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
10	14	0.23	0.23	0.23	0.23	35	0.23	0.23	0.23	0.23
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23

ตารางที่ 4.16 (ต่อ)

ค่า HLB	ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)				ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
		10	60	0.23	0.23		0.23	0.23	150	0.23
11	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
13	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
15	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
10	90	0.23	0.23	0.23	0.23	180	0.23	0.23	0.23	0.23
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
10	120	0.23	0.23	0.23	0.23					
11		0.23	0.23	0.23	0.23					
13		0.23	0.23	0.23	0.23					
15		0.23	0.23	0.23	0.23					

ตารางที่ 4.17 ผลของ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และ ปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ค่า HLB	ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)				ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
		10	1	0.23	0.23		0.23	0.23	21	0.23
11	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
13	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
15	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
10	7	0.23	0.23	0.23	0.23	28	0.23	0.23	0.23	0.23
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
10	14	0.23	0.23	0.23	0.23	35	0.23	0.23	0.23	0.23
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23

ตารางที่ 4.17 (ต่อ)

ค่า HLB	ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)				ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)			
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>B. cereus</i>
		ATCC 25923	ATCC 25922	ATCC 10708	ATCC 6228		ATCC 25923	ATCC 25922	ATCC 10708	ATCC 6228
10	60	0.23	0.23	0.23	0.23	150	0.23	0.23	0.23	0.23
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
10	90	0.23	0.23	0.23	0.23	180	0.23	0.23	0.23	0.23
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
10	120	0.23	0.23	0.23	0.23					
11		0.23	0.23	0.23	0.23					
13		0.23	0.23	0.23	0.23					
15		0.23	0.23	0.23	0.23					

ตารางที่ 4.18 ผลของ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ค่า HLB	ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)				ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
		10	1	0.23	0.23		0.23	0.23	21	0.47
11	0.23	0.23		0.23	0.23	0.47	0.47	0.47		0.47
13	0.23	0.23		0.23	0.23	0.47	0.47	0.47		0.47
15	0.23	0.23		0.23	0.23	0.47	0.47	0.47		0.47
10	7	0.23	0.23	0.23	0.23	28	0.47	0.47	0.47	0.47
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.47	0.47	0.47	0.47
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.47	0.47	0.47	0.47
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.47	0.47	0.47	0.47
10	14	0.47	0.47	0.47	0.47	35	0.47	0.47	0.47	0.47
11		0.23	0.47	0.47	0.47		0.47	0.47	0.47	0.47
13		0.47	0.23	0.23	0.47		0.47	0.47	0.47	0.47
15		0.47	0.23	0.23	0.47		0.47	0.47	0.47	0.47

ตารางที่ 4.19 ผลของ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำหลังปั่นเหวี่ยงอิมัลชัน ที่แรง 2,000g นาน 10 นาที ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

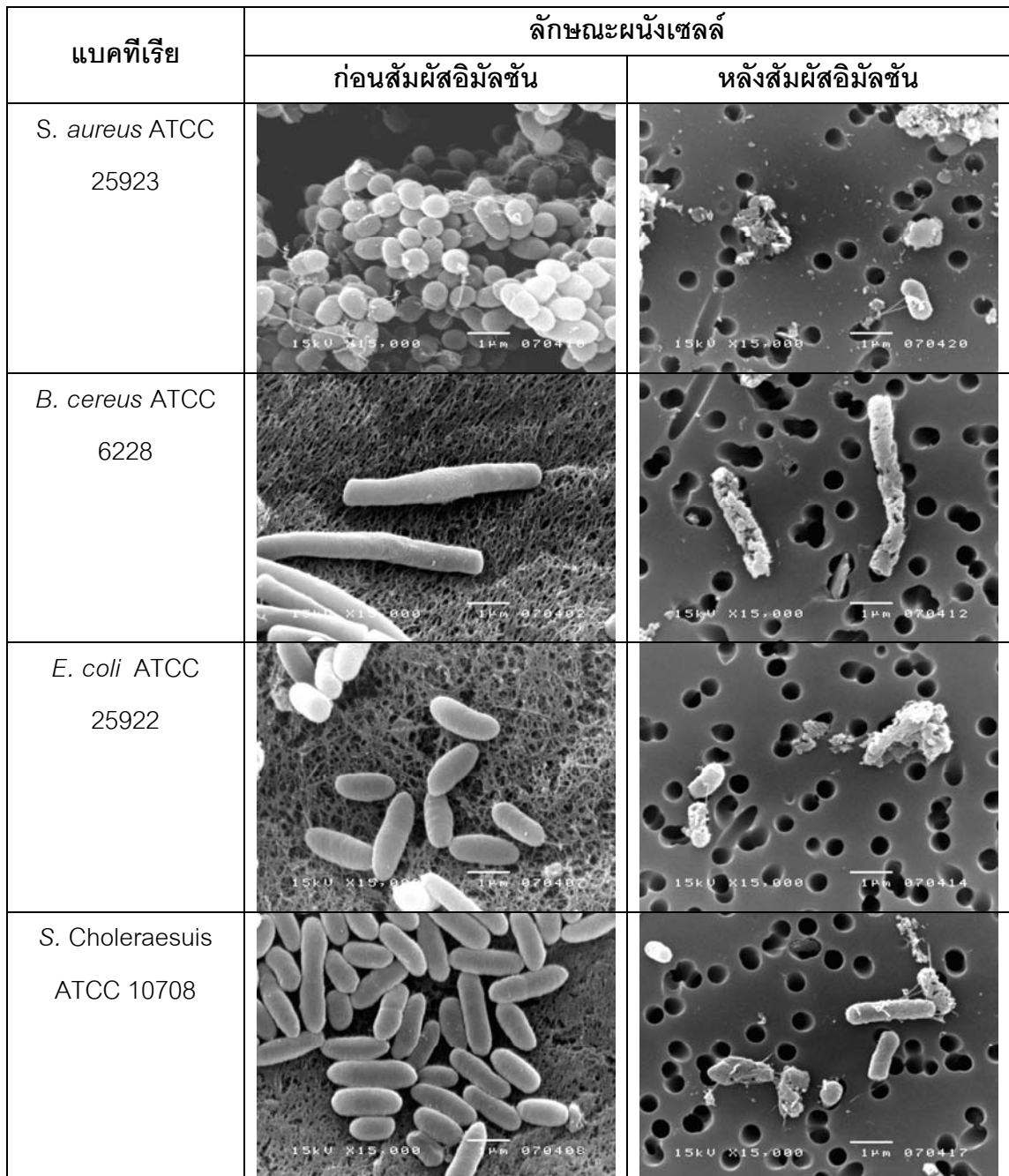
ค่า HLB	ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)				ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
		10	1	0.23	0.23		0.23	0.23	21	0.23
11	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
13	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
15	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
10	7	0.23	0.23	0.23	0.23	28	0.23	0.23	0.23	0.23
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
10	14	0.23	0.23	0.23	0.23	35	0.23	0.23	0.23	0.23
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23

ตารางที่ 4.20 ผลของ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำหลังปั่นเหวี่ยงอิมัลชัน ที่แรง 2,000g นาน 10 นาที ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ค่า HLB	ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)				ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
		10	1	0.23	0.23		0.23	0.23	21	0.23
11	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
13	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
15	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23	0.23		0.23
10	7	0.23	0.23	0.23	0.23	28	0.23	0.23	0.23	0.23
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
10	14	0.23	0.23	0.23	0.23	35	0.23	0.23	0.23	0.23
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.23	0.23	0.23	0.23

ตารางที่ 4.21 ผลของ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 และค่า HLB ระยะเวลาที่เก็บต่อค่า MBC ของน้ำมันกานพลูในน้ำหลังปั่นเหวี่ยงอิมัลชัน ที่แรง 2,000g นาน 10 นาที ที่ปริมาณน้ำมันกานพลู และปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมเท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

ค่า HLB	ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)				ระยะเวลา ที่เก็บ	MBC (mg/ml)			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
		10	1	0.23	0.23		0.23	0.23	21	0.47
11	0.23	0.23		0.23	0.23	0.47	0.47	0.47		0.47
13	0.23	0.23		0.23	0.23	0.47	0.47	0.47		0.47
15	0.23	0.23		0.23	0.23	0.47	0.47	0.47		0.47
10	7	0.23	0.23	0.23	0.23	28	0.47	0.47	0.47	0.47
11		0.23	0.23	0.23	0.23		0.47	0.47	0.47	0.47
13		0.23	0.23	0.23	0.23		0.47	0.47	0.47	0.47
15		0.23	0.23	0.23	0.23		0.47	0.47	0.47	0.47
10	14	0.47	0.47	0.47	0.47	35	0.47	0.47	0.47	0.47
11		0.47	0.47	0.47	0.47		0.47	0.47	0.47	0.47
13		0.47	0.47	0.23	0.47		0.47	0.47	0.47	0.47
15		0.47	0.47	0.47	0.47		0.47	0.47	0.47	0.47



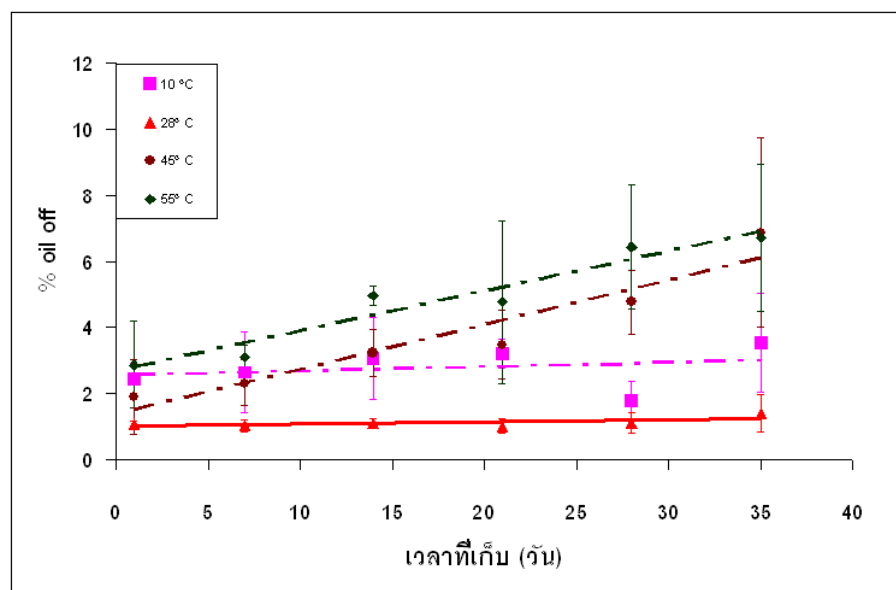
รูปที่ 4.18 ภาพ SEM กำลังขยาย 15,000 เท่า ของลักษณะผนังเซลล์แบคทีเรีย ก่อนสัมผัสอิมัลชัน และหลังสัมผัสอิมัลชัน ที่ค่า MBC เท่ากับ 0.23 mg/ml โดยใช้อิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวม (Span 20 ร่วมกับ Tween 20) ที่ HLB 15 เท่ากับร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ

4.4 ผลของเวลาที่เก็บผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่อุณหภูมิ 10 45 และ 55 °C ต่อ ความเสถียรในสภาวะเร่ง ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและค่า MBC

อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่เลือกเป็นผลิตภัณฑ์ล้างผิวสัมผัสอาหารของเครื่องมือแปรรูป ประกอบด้วย น้ำมันกานพลู ร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก ตัวทำอิมัลชันคือ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ที่ HLB 15 ในปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก อิมัลชันนี้มีลักษณะขุ่น สีขาวอมเหลือง [ค่าความสว่าง (L^*) 81.48 ± 0.37 ความเป็นสีแดง (a^*) 0.22 ± 0.01 และความเป็นสีเหลือง (b^*) 5.03 ± 0.50] ความหนาแน่น 1.048 ± 0.004 g/ml ความหนืด 10.727 ± 0.075 mPa·s

เมื่อเก็บอิมัลชันที่อุณหภูมิ 10 28 45 และ 55 °C แล้วนำมาหา % oil off ที่ได้หลังการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากเก็บอิมัลชันไว้ 1 7 14 21 28 และ 35 วัน พบว่าการเก็บอิมัลชันที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) ให้ % oil off ต่ำกว่าการเก็บอิมัลชันที่อุณหภูมิอื่นทุกเวลาที่เก็บ และ % oil off ไม่เปลี่ยนแปลงตามเวลาที่เก็บ เมื่อเก็บที่ 10 และ 28 °C แต่การเก็บที่ 45 และ 55 °C ทำให้ % oil off เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.19) พบว่าเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 °C % oil off มีการเปลี่ยนแปลงจนถึงระยะเวลาการเก็บอิมัลชัน 35 วันน้อยมาก และ % oil off ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) โดยมีอัตราการเพิ่ม % oil off เท่ากับร้อยละ 0.013 ± 0.041 ต่อวัน และเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 45 และ 55 °C พบว่า % oil off มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บอิมัลชัน 35 วัน มีอัตราการเพิ่ม % oil off แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเปรียบเทียบกับเก็บอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) โดยมีอัตราการเพิ่ม % oil off เท่ากับ 0.135 ± 0.07 และ 0.122 ± 0.05 ต่อวัน ตามลำดับ มีอัตราเร็วเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า 10 °C และอุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) และจากผลขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของผลิตภัณฑ์ที่เก็บที่อุณหภูมิต่างๆ (ตารางที่ 4.22) พบว่าเมื่อเก็บอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการเตรียมอิมัลชัน 1 วัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน และเมื่อเก็บอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิ 10 45 และ 55 °C อนุภาคน้ำมันเฉลี่ยมีขนาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ที่ระยะเวลาการเก็บ 35 วัน แต่เมื่อเก็บอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บ 35 วัน ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 °C มีอัตราการเพิ่มขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเพียง 0.014 $\mu\text{m}/\text{day}$ ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการเพิ่มขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C) คือมีอัตรา 0.016 $\mu\text{m}/\text{day}$ แต่เมื่อเก็บอิมัลชันไว้ที่อุณหภูมิ 45 และ 55 °C มีอัตราการเพิ่มขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 0.026 และ 0.039 $\mu\text{m}/\text{day}$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิสูงขึ้นทำให้

อัตราการเพิ่ม % oil off มากขึ้น และมีอัตราการเพิ่มขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยสูงขึ้น เนื่องจากวัฏภาคต่อเนื้อมีความหนืดลดลง ทำให้วัฏภาคกระจายมีการเคลื่อนที่มารวมกันได้เร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.23) พบว่าค่า MBC ของผลิตภัณฑ์ยังคงเท่าเดิม คือ 0.23 mg/ml เนื่องจากผลิตภัณฑ์ยังคงมีความเสถียร โดยยังไม่เกิดการแยกชั้นของอิมัลชันทำให้ยังมีประมาณสารที่ออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียเท่ากับการเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 °C)



รูปที่ 4.19 ผลของเวลาที่เก็บผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่อุณหภูมิ 10 28 45 และ 55°C ต่อ % oil off หลังการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000g เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 4.22 ผลคุณสมบัติและระยะเวลาการเก็บต่างๆ ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 15

อุณหภูมิ (°C)	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (µm) ที่ระยะเวลาการเก็บ (วัน)					
	1	7	14	21	28	35
10	0.613 ^{bABC} ±0.013	0.587 ^{aA} ±0.069	0.651 ^{bC} ±0.055	0.648 ^{aBC} ±0.053	0.600 ^{aAB} ±0.143	0.67 ^{aD} ±0.092
28	0.602 ^{bA} ±0.030	0.699 ^{bB} ±0.028	0.694 ^{bAB} ±0.064	0.76 ^{aB} ±0.046	0.630 ^{abA} ±0.020	0.636 ^{aA} ±0.032
45	0.634 ^{bB} ±0.032	0.564 ^{aA} ±0.024	0.576 ^{aA} ±0.056	0.624 ^{aB} ±0.024	0.705 ^{abC} ±0.028	0.659 ^{aB} ±0.022
55	0.530 ^{bA} ±0.052	0.534 ^{aA} ±0.032	0.574 ^{aAB} ±0.018	0.602 ^{aB} ±0.040	0.644 ^{bB} ±0.023	0.645 ^{aC} ±0.042

ตัวอักษร a, b, ..หมายถึงค่าที่อยู่ในแถวเดียวกันตามแนวดิ่งมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษร A, B, ..หมายถึงค่าที่อยู่ในแถวเดียวกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.23 ผลอุณหภูมิ ระยะเวลาการเก็บต่างๆ และการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000g นาน 10 นาที ต่อค่า MBC ของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ปริมาณกานพลูและตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 37.50 และ 15.00 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เมื่อใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 ที่ค่า HLB 15

วันที่ทำการทดสอบ	อุณหภูมิ (°C)	MBC ของอิมัลชันก่อนทำการปั่นเหวี่ยง (mg/ml)				MBC ของอิมัลชันหลังทำการปั่นเหวี่ยง (mg/ml)			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
		1	10	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	45	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	55	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
7	10	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	45	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	55	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
14	10	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	45	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	55	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23

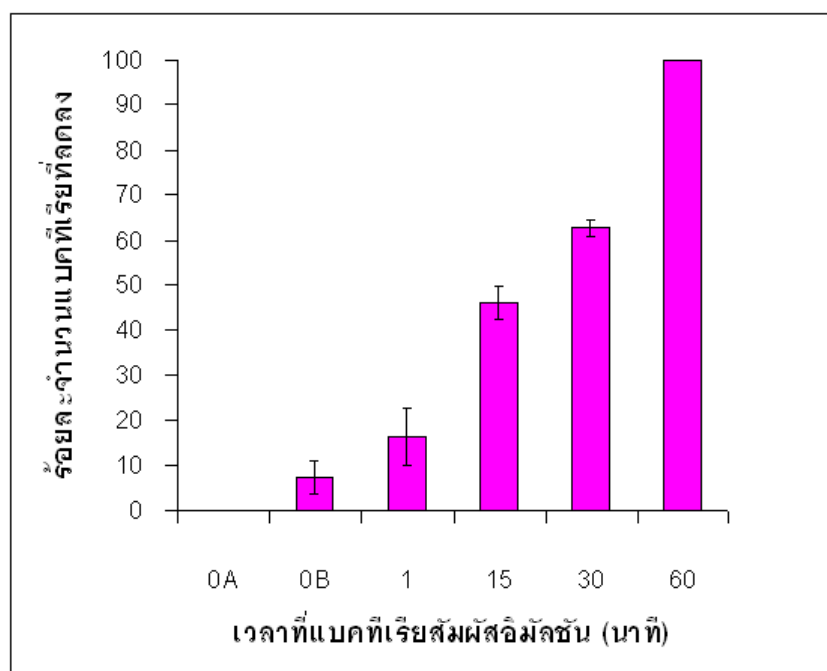
ตารางที่ 4.23 (ต่อ)

วันที่ทำการ ทดสอบ	อุณหภูมิ (°C)	MBC ของอิมัลชันก่อนทำการปั่นเหวี่ยง (mg/ml)				MBC ของอิมัลชันหลังทำการปั่นเหวี่ยง (mg/ml)			
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S.</i> <i>Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S.</i> <i>Choleraesuis</i> ATCC 10708	<i>B. cereus</i> ATCC 6228
		21	10	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	45	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	55	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
28	10	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	45	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	55	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
35	10	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	45	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	55	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23

4.5 ผลของประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

4.5.1 ประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อไก่บด

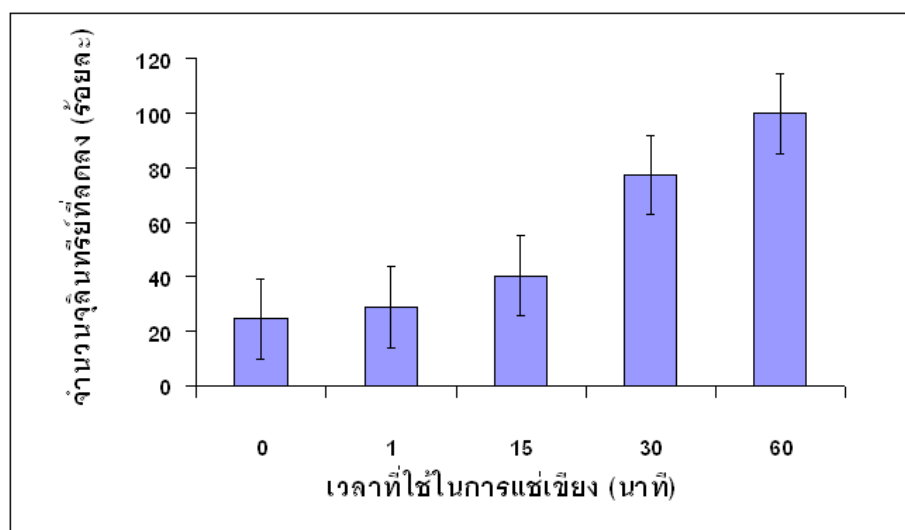
จากการศึกษาค่า MBC ของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ในข้อ 4.3.2 พบว่ามีค่า MBC เท่ากับ 0.23 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเท่ากับระดับการเจือจางอิมัลชันที่ความเข้มข้น 31.25 $\mu\text{l/ml}$ เมื่อนำผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำมาหาประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียในเนื้อไก่บดซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นที่ 7.8-8.2 log cfu/g พบว่าผลิตภัณฑ์สามารถทำลายแบคทีเรียได้เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่แบคทีเรียสัมผัสอิมัลชัน (รูปที่ 4.20) โดยเมื่อแบคทีเรียสัมผัสอิมัลชันทันที (ประมาณ 10 วินาที) มีปริมาณแบคทีเรียที่ถูกทำลายเพียงร้อยละ 7.5 ของแบคทีเรียเริ่มต้น และเมื่อเพิ่มเวลาที่ใช้แบคทีเรียสัมผัสผลิตภัณฑ์อิมัลชันเป็น 15 และ 30 นาที มีปริมาณแบคทีเรียถูกทำลายเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 16.32 46.05 และ 62.61 ตามลำดับ และผลิตภัณฑ์สามารถทำลายแบคทีเรียในไก่บดได้หมด (ปริมาณแบคทีเรียน้อยกว่า 10 โคโลนี/g) ที่เวลา 60 นาที



รูปที่ 4.20 ผลของเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียในเนื้อไก่ต่อร้อยละจำนวนแบคทีเรียที่ลดลง สำหรับผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ โดย OA คือเวลาที่ยังไม่ได้สัมผัสอิมัลชัน และ OB คือเวลาที่สัมผัสอิมัลชันทันที

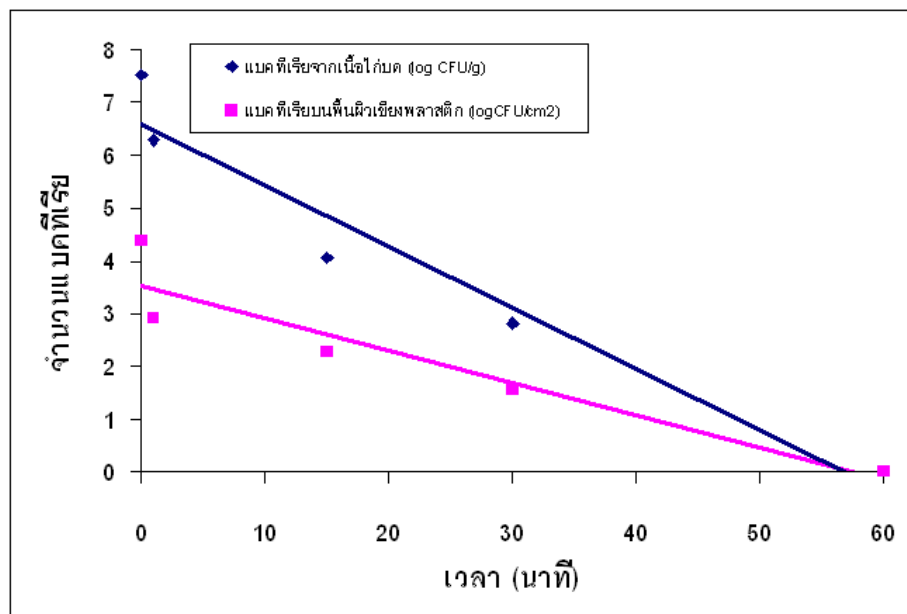
4.5.2 ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อบนพื้นผิวแข็งพลาสติกที่สัมผัสอาหาร ของผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

เมื่อนำผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่ MBC เท่ากับ 0.23 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งเท่ากับระดับการเจือจางอิมัลชันที่ความเข้มข้น 31.25 $\mu\text{l/ml}$ มาทดสอบประสิทธิภาพการทำลายเชื้อบนพื้นผิวแข็งพลาสติกที่สัมผัสอาหาร ผลประสิทธิภาพของอิมัลชันน้ำมันกานพลู ต่อแบคทีเรียที่อยู่บนแข็งพลาสติก ซึ่งมีเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ 3.4-3.9 $\log \text{cfu/cm}^2$ พบว่าผลิตภัณฑ์สามารถทำลายแบคทีเรียบนพื้นผิวแข็งพลาสติกได้เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการแช่แข็งจากการทดสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียหลังล้างแข็งพลาสติกด้วยน้ำยาล้างจานโดยไม่แช่แข็งในอิมัลชันพบว่า ปริมาณแบคทีเรียลดลง ร้อยละ 24.72 ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณจุลินทรีย์เมื่อแช่แข็งด้วยผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่ 1 นาที มีปริมาณแบคทีเรียลดลงร้อยละ 28.71 และเมื่อเพิ่มเวลาในการแช่แข็งเป็น 15 และ 30 นาที ทำให้ปริมาณแบคทีเรียถูกทำลายเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 40.31 และ 77.5 ตามลำดับ และผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำนี้สามารถทำลายแบคทีเรียบนพื้นผิวแข็งพลาสติกได้หมด (ปริมาณแบคทีเรีน้อยกว่า 10 โคโลนี/ cm^2) ที่เวลา 60 นาที



รูปที่ 4.21 ผลของเวลาที่ใช้ในการแช่แข็งต่อร้อยละจำนวนจุลินทรีย์ที่ลดลง สำหรับผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

เมื่อให้เซลล์แบคทีเรียจากเนื้อไก่บดซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $7.8-8.2 \log \text{ cfu/g}$ และแบคทีเรียบนพื้นผิวเชิงพลาสติกที่สัมผัสไก่บดซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $3.4-3.9 \log \text{ cfu/cm}^2$ สัมผัสกับสารละลายอิมัลชันที่ระดับความเข้มข้น $31.25 \mu\text{l/ml}$ (มีปริมาณน้ำมันกานพลู 0.23 mg/ml) เป็นเวลา 0-60 นาที เปรียบเทียบความสามารถในการต้านทานอิมัลชัน จากการเขียนกราฟการรอดชีวิตของแบคทีเรียและการคำนวณหาค่า D-value โดยคำนวณจากความชันของสมการเส้นตรงของกราฟรอดชีวิต (รูปที่ 4.22) พบว่าค่า D ของแบคทีเรียจากเนื้อไก่บดมีค่าเท่ากับ 8.65 นาที นั่นคือ อิมัลชันสามารถลดจำนวนแบคทีเรียลงร้อยละ 90 หรือ 1 log cycle ได้ที่เวลา 8.65 นาที และค่า D ของแบคทีเรียบนพื้นผิวเชิงพลาสติกที่สัมผัสไก่บดมีค่าเท่ากับ 16.34 นาที เห็นได้ว่าความสามารถในการต้านการทำลายแบคทีเรียของผลิตภัณฑ์อิมัลชัน ของแบคทีเรียบนพื้นผิวเชิงพลาสติกที่สัมผัสไก่บดสูงกว่าแบคทีเรียจากเนื้อไก่บด อาจเป็นผลมาจากการเกิดไบโอฟิล์มเป็นบริเวณพื้นผิวเชิงพลาสติก เนื่องจากมีรายงานว่า แบคทีเรียที่เกาะติดกับพื้นผิวของเชิงพลาสติกสามารถเจริญและสร้างไบโอฟิล์มขึ้นได้ (Rayner *et al.*, 2004) ส่งผลให้อิมัลชันเข้าไปทำลายเซลล์แบคทีเรียยากขึ้น เนื่องจากไม่สามารถแทรกผ่านไบโอฟิล์มซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide matrix) ห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียให้อยู่ภายในฟิล์มไปทำลายแบคทีเรียได้ (Jessen and Lammert, 2003) อีกทั้งกลุ่มแบคทีเรียในไบโอฟิล์มจะมีความสามารถในการต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อได้มากกว่าเซลล์เดี่ยวๆ ซึ่งจะทำลายได้ดีด้วยสารฆ่าเชื้อในปริมาณและความเข้มข้นที่สูงขึ้น (Oh and Marshall, 1995)



รูปที่ 4.22 การอยู่รอดของแบคทีเรียในเนื้อไก่บดและแบคทีเรียบนพื้นผิวเชิงพลาสติกที่สัมผัสไก่บดเมื่อสัมผัสผลิตภัณฑ์อิมัลชัน

4.6 การทดสอบทางประสาทสัมผัสเพื่อหากลิ่นน้ำมันกานพลูที่ติดกับอาหาร

จากผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางด้านกลิ่นระหว่างไก่หั่นบนแข็งพลาสติกที่ล้างด้วยน้ำเปล่ากับไก่หั่นบนแข็งพลาสติกที่ล้างด้วยผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ โดยแช่แข็งในอิมัลชันเจือจางเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ด้วยวิธี Triangle test พบว่าผู้ทดสอบจำนวน 20 คน ตอบถูก 7 แสดงว่าผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีองค์ประกอบ น้ำมันกานพลู ตัวทำอิมัลชันผสม (Tween 20 ร่วมกับ Span 20) ที่ค่า HLB เท่ากับ 15 และ น้ำ เท่ากับร้อยละ 37.50 15.00 และ 47.50 โดยน้ำหนัก ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างไก่หั่นบนแข็งพลาสติกที่ล้างด้วยน้ำเปล่ากับไก่หั่นบนแข็งพลาสติกที่ล้างด้วยผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำได้ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (จำนวนผู้ทดสอบขั้นต่ำที่ต้องตอบถูกเพื่อให้เกิดนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 One-tailed คือ 11 คน) นั่นคือเมื่อหั่นไก่บนแข็งที่ล้างด้วยผลิตภัณฑ์อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำและผ่านการชะล้างอิมัลชันออกด้วยน้ำเปล่าผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสไม่สามารถตรวจพบกลิ่นน้ำมันกานพลูที่เนื้อไก่

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ปริมาณน้ำมันกานพลูในอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ซึ่งมี Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน ที่มีให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร 4 ชนิด (*S. aureus* ATCC 25923 *E. coli* ATCC 25922 *S. Choleraesuis* ATCC 10708 และ *B. cereus* ATCC 6228) คือร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก อิมัลชันระบบนี้เสถียรที่สุดเมื่อใช้ปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก และใช้คลื่นเหนือเสียงที่กำลัง 400 Watt amplitude 80 μm และ ความถี่ 24 kHz เป็นเวลา 30 นาที อิมัลชันนี้มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยที่วิเคราะห์หลังการเตรียม 1 วัน เท่ากับ $0.502 \pm 0.049 \mu\text{m}$ และแยกชั้นหลังการเตรียม 240 วัน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) มีค่า MBC สำหรับแบคทีเรียที่ศึกษา โดยคิดเป็นปริมาณน้ำมันกานพลูเท่ากับเท่ากับ 0.46 mg/ml

ที่ปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมคงที่ ที่ร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก การใช้ Span 20 หรือ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 ที่มีค่า HLB ในช่วง 10-15 ทำให้ % oil off (ที่ได้หลังการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000g เป็นเวลา 10 นาที) และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันต่ำกว่าเมื่อใช้เฉพาะ Tween 20 เนื่องจากตัวทำอิมัลชันผสมคือ Span 20 หรือ Span 60 ร่วมกับ Tween 20 ให้แรงดึงระหว่างผิวประจันระหว่างน้ำมันกานพลูกับน้ำต่ำกว่า Tween 20 แต่การใช้ Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ที่มีค่า HLB ในช่วง 10-15 ทำให้ % oil off และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชัน กับอัตราการเพิ่มของ % oil off และขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยสูงกว่าเมื่อใช้เฉพาะ Tween 20 เนื่องจากตัวทำอิมัลชันผสมระหว่าง Span 65 ร่วมกับ Tween 20 ให้แรงดึงระหว่างผิวประจันระหว่างน้ำมันกานพลูกับน้ำสูงกว่า Tween 20

อิมัลชันที่เลือกเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์ล้างผิวสัมผัสอาหารของเครื่องมือแปรรูปประกอบด้วยน้ำมันกานพลู ร้อยละ 37.50 โดยน้ำหนัก ตัวทำอิมัลชันคือ Tween 20 ร่วมกับ Span 20 ที่ HLB 15 ในปริมาณตัวทำอิมัลชันรวมร้อยละ 15.00 โดยน้ำหนัก อิมัลชันนี้มีลักษณะขุ่น สีขาวอมเหลือง [ค่าความสว่าง (L^*) 81.48 ± 0.37 ความเป็นสีแดง (a^*) 0.22 ± 0.01 และความเป็นสีเหลือง (b^*) 5.03 ± 0.50] ความหนาแน่น $1.048 \pm 0.004 \text{ g/ml}$ ความหนืด $10.727 \pm 0.075 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ มีค่า MBC สำหรับแบคทีเรียที่ศึกษาโดยคิดเป็นปริมาณน้ำมันกานพลูเท่ากับ 0.23 mg/ml และจากการทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของอิมัลชันนี้บนพื้นผิวเชิงพลาสติกที่สัมผัสกับเนื้อไก่สดพบว่ามีค่า MBC ผลิตภัณฑ์นี้สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียในเนื้อไก่สดที่อยู่บนพื้นผิวพลาสติกได้หมดที่เวลา 60 นาที

5.2 ข้อเสนอนแนะ

ศึกษาการเพิ่มความเสถียรของอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำของระบบน้ำมันกานพลูในน้ำ โดยใช้ hydrocolloid เป็น stabilizer หรือใช้ตัวทำอิมัลชันชนิดที่มีประจุ โดยศึกษาผลของชนิดและปริมาณ hydrocolloid และตัวทำอิมัลชันที่มีประจุ ต่อความเสถียรและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชัน นอกจากนี้ยังนำศึกษาวิธีการลดขนาดวิธีอื่น ที่เหมาะสมต่อการผลิตในปริมาณมาก เช่น high pressure homogenizer ต่อความเสถียรและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชันด้วย

เอกสารอ้างอิง

- เกสร จันทศิริ. 2549. อิมัลชันทางเภสัชกรรม. กรุงเทพฯ: ศิลปาคร คณะเภสัชศาสตร์.
กรุงเทพคริสเตียนวิทยาลัย. สมุนไพรที่ควรรู้จัก. [ออนไลน์]. 2548. แหล่งที่มา
http://www.bcc.ac.th/web2006/department/giftes_m6/herb/old.html [2553, มีนาคม 26]
พยอม ตันติวัฒน์. 2527. เครื่องเทศ. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ โรงเรียนพิจิตรพิทยาคม
มหาวิทยาลัย.
พร้อมจิต ศรีลัมภ์ วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล และสมภพ ประธานธรรักษ์. 2543. สารานุกรมสมุนไพรสวนสิริ
รุกขชาติ เล่มที่: 1 230.
วุฒิ วุฒิธรรมเวช. 2540. รวมหลักเภสัชกรรมไทย. สารานุกรมพืชสมุนไพร เล่มที่: 1 618.
ศวรรณี เหลืองสุนทรชัย และวัลย์รัตน์ จันทรปานนท์. 2550. ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ
Escherichia coli ของน้ำมันกานพลูทางการค้า. ในการประชุมทางวิชาการของ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45, 719-725. สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์
สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
สำนักงานข้อมูลสมุนไพร. 2538. สมุนไพรที่ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน. กรุงเทพฯ: คณะเภสัช
ศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
สำนักงานระบาดวิทยา. สถานการณ์โรคอุจจาระร่วงเฉียบพลันและอหิวาตกโรค ประเทศไทย พ.ศ.
2553. [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: http://epid.moph.go.th/news/Cholera_Sit_May2010.pdf
[2553, พฤษภาคม 8]
สนั่น ศุภธีรสกุล. 2540. สมุนไพรจากผลิตภัณฑ์ของพืช. สงขลา: คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
Abrishami, S. H., Tall, B. D., Bruursema, T., Epstein, P., and Shah, D. 1994. Bacterial
adherence and viability on cutting board surfaces. Journal of Food Safety. 14: 153-172.
Ali, J., Baboota, S. and Ahuja, A. 2008. Emulsion [Online]. Available from:
<http://www.pharmpedia.com/Emulsion>. [2010, March 21]
AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official methods of analysis of
The Association of Official Agricultural Chemistry International. 17th ed. Gaithersburg:
AOAC International.

- Badolato, G. G., Aguilar, F., Schuchmann, H. P., Sobisch, T. and Lerche, D. 2008. Evaluation of long term stability of model emulsions by multisample analytical centrifugation. Progress in Colloid and Polymer Science. 134: 66-73.
- Bassole, I. H. N., Ouattara, A. S., Nebie, R., Ouattara, C. A. T., Kabore, Z. I. and Traore, S. A. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. Phytochemistry. 62: 209-212.
- Becher, P. 1965. Emulsions, Theory and Practice. 2nd ed. New York: Reinhold.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food. International Journal of Food Microbiology. 94: 223-253.
- Chemicalbook. 2008. product [online]. Available from:
http://www.chemicalbook.com/ProductIndex_EN.aspx. [2009, December 18]
- Dickinson, E. 1992. An Introduction to Food Colloids. Oxford: Oxford Science Publishers.
- Dickinson, E. and McClements, D. J. 1995. Advances in food colloids. Blackie Academic and professional. Glasgow: Chapman and hall.
- Friberg, S., Larsson, K., and Sjoblom J. 2004. Food Emulsions. New York: Marcel Dekker.
- Goloub, T. P. and Pugh, R. J. 2005. The role of the surfactant head group in the emulsion process: Binary (nonionic-ionic) surfactant mixtures. Journal of Colloids and Interface Science. 291: 256-262.
- Gowda, N., Malathi, V., and Suganthi, R. 2004. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. Animal Feed Science and Technology. 116: 281-291.
- Gupta, S. and Moulik, S. P. 2007. Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. Journal of Pharmaceutical Science. 97: 22-45.
- Hamouda, T. and others. 1999. A novel surfactant nanoemulsion with broad-spectrum sporicidal activity against *Bacillus species*. The Journal of Infectious Diseases. 180: 1939-1949.
- Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P. A. and Singh, H. 2001. Influence of xanthan gum on the formation and stability of sodium caseinate oil-in-water emulsions. Foodhydrocolloids. 15: 513-515.

- Hiemens, P. C. 1977. Principles of Colloid and Surface Chemistry. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Jablonski, L. M. and Bohach, G. A. 1997. Food Microbiology: fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press.
- Jafari, S. M., Yinghe, H. Y. and Bhandari, B. 2006. Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization-A Comparison. International Journal of Food Properties. 9: 475–485.
- Jay, J. M., Loessner, M. J. and Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology. 17th ed. New York: Springer Science Business Media, Inc.
- Jobling, J. 2001. Essential oils: A new idea for postharvest disease control [online]. Available from: <http://www.postharvest.com.au>. [2009, December 18]
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 1974. Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. WHO Food Additives Series No. 5. World Health Organization.
- Kawabata, S., Torii, M., Minami, T., Fujiwara, T. and Hamadat, S. 1993. Effects of selected surfactants on purified glucosyltransferases from mutans streptococci and cellular adherence to smooth surfaces. Journal of Medical Microbiology. 38: 54-60.
- Kozikowski, B. A., and others. 2003. The Effect of Room-Temperature Storage on the Stability of Compounds in DMSO. Journal of Biomolecular Screening. 8: 205-209.
- Leser, M. E., Sagalowicz, L., Michel, M. and Watzke, H. J. 2006. Self-assembly of polar food lipids. Advances in Colloid and Interface Science. 123: 125-136.
- Li, M. K. and Fogler, H. S. 1978. The instability of the oil-water interface to form the initial droplets. Journal of Fluid Mechanics. 88: 499–511.
- Liu, W., Sun, D., Caifu, Li, C., Liu, Q. and Xu, J., 2006. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. Journal of Colloids and Interface Science. 303: 557-563.
- McClement, D. J. 2007. Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. Food Science and Nutrition. 47: 611-649.

- McLandsborough, L. 2003. Food Microbiology Laboratory. CRC Series in contemporary food science. Washington, D.C: CRC Press.
- Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T. 1999. Sensory Evaluation Techniques. 3rd ed., New York: CRC Press.
- Meldrum, R. J., Smith, R. M. M., Ellis, P. and Garside, J. 2006. Microbiological quality of randomly selected ready-to-eat foods sampled between 2003 and 2005 in Wales, UK. International Journal of Food Microbiology. 108: 397-400.
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., Valle, C. E. and Roura, S. I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. Food Science and Technology. 38: 565-570.
- Mulley, B. A. 1974. Medicinal Emulsion. In: Emulsions and Emulsion Technology Vol.6 part1. New York: Marcel Dekker.
- Mytle, V., Anderson, G. L., Doyle, M. P. and Smith, M. A. 2006. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. Food Control. 17: 102-107.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P. and Begin, A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. International Journal of Food Microbiology. 37: 155-162.
- Peng, J. S., Tasi, W. C. and Chou, C. C. 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. International Journal of Food Microbiology. 65: 105–111.
- Persaud, D. R., Dalgleish, D. G., Nadeau, L. and Gauthier, S. 2000. Isolation and purification of serum and interfacial peptides of a trypsinolyzed β -lactoglobulin oil-in-water emulsion. Journal of Chromatography. 744: 389–397.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine. 6: 39.
- Prasad, M. M. and Seenayya, G. 2000. Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt. Food Research International. 33: 793-798.

- Ponce, A., Fritz, R., Del Valle, C. and Roura, S. 2004. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittele-Wissenschaftund-Technologie. 36: 679–684.
- Porras, M., Solans, C., Gonzalez, C., Martinez, A., Guinart, A. and Gutierrez, J. M. 2004. Studies of formation of W/O nano-emulsions. Colloids and Surfaces A. 249: 115-118.
- Sagitani, H., Kanagawa-ku and Takashimadai, 1981. Making homogeneous and fine droplet O/W emulsions using nonionic surfactants. Journal of the American Oil Chemists' Society. 58: 738-743.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D. and Corke, H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spices and medicinal herbs extracts. International Journal of Food Microbiology. 117: 112-119.
- Shaw, D. J. 1970. Introduction to Colloid and Surface Chemistry. London: Butterworths.
- Shiv, M. 2009. Microemulsion as solid dosage [Online]. Available from: <http://www.pharmainfo.net/majumdarshiv/microemulsion-solid-dosage-form>. [2009, January 21]
- Si, W., and others. 2005. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. Journal of Applied Microbiology. ISSN 1364-5072.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against important food-borne pathogen. Letter in Applied Microbiology. 26: 118-122.
- Snyder, P. O. 1997. Antimicrobial effects of spices and herb [online]. Available from: <http://www.hi-tm.com / Documents/Spices.html>. [2009, December 18]
- Spernath, A. and Aserin, A. 2006. Microemulsion as carriers for drugs and nutraceuticals. Advances in Colloid and Interface Science. 128-130: 47-64.
- Stecchini, M. L., Sarais, I. and Giavedoni, P. 1993. Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture and in cooked pork. Journal of Food protein. 56: 406-409.
- Stepanovic, S., Irkovic, I. C., Ranin, L., and Svabic-Vlahovic, M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology. 38: 428-432.

- Suresh, P., Ingle, V. K. and Vijayalakshma, V. 1992. Antibacterial activity of eugenol in comparison with other antibiotics. Journal of Food Science and Technology. 29: 254-256.
- Valero, D., Valverde, J. M., Martínez-Rome, D., Guillén, F., Castillo, S. and Serrano, M. 2006. The combination of modified atmosphere packaging with eugenol or thymol to maintain quality, safety and functional properties of table grapes. Postharvest Biology and Technology. 41: 317-327.
- van Netten, P., van De Moosdijk, A., van Hoensel, P., Mossel D. A. and Perale, I. 1990. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. The Journal of applied bacteriology. 69: 73-79.
- Walter, J. F., Locke, J. C. and Normoyle, M. C. 1997. Clove oil as a plant fungicide. United States Patent No. 5679351.
- Wasan, D. T. and Nikolov, A. D. 2001. Structure and stability of Emulsion. Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology. Sjoblom, J. (ed.): 59-69.
- Wennerström, H., Söderman, O., Olsson, U. and Lindman, B. 2001. Macroemulsions from the perspective of microemulsion. Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology. Sjoblom, J. (ed.): 95-107.
- Wijnands, L. M., Dufrenne, J. B., Rombouts, F. M. and van Leusden, F. M. 2006. Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in The Netherlands. Journal of food protection. 69: 2587-2594.
- Yano, Y., Satomi, M. and Oikawa, H. 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. International Journal of Food Microbiology. 11:6-11.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด โดยวิธี Total viable count เทคนิคการ
spread plate ตามวิธีของ AOAC (2000)

ภาคผนวก ก: การวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด โดยวิธี Total viable count เทคนิคการ spread plate ตามวิธีของ AOAC (2000)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate count agar (PCA)
2. เปปโตน (peptone water) ร้อยละ 0.1 ในหลอดทดลองปริมาตร 9 ml และในขวดฝาเกลียว ปริมาตร 225 ml

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 g ใส่ในถุงพลาสติกทนร้อน เติมเปปโตนร้อยละ 0.1 จากขวดฝาเกลียว ปริมาตร 225 ml เขย่าให้เข้ากัน ตัวอย่างอาหารที่ได้จะมีระดับ ความเจือจาง 10^{-1}
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางเป็น 10^{-2} - 10^{-4} โดยใช้เปปโตนร้อยละ 0.1
3. ปิเปตตัวอย่างอาหาร 0.1 ml จากแต่ละระดับความเจือจางลงในจานเพาะเชื้อที่อาหาร PCA อยู่
4. ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวน้ำอาหาร
5. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในลักษณะคว่ำจานเพาะเชื้อ เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง
6. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี และรายงานผลเป็นจำนวน colony forming unit (cfu) ต่อกกรัมตัวอย่าง หรือต่อพื้นที่ผิว 1 ตารางเซนติเมตร

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ความแตกต่างโดยรวมด้วยวิธี Triangle test

ภาคผนวก ข: การวิเคราะห์ความแตกต่างโดยรวมด้วยวิธี Triangle test (Meilgaard *et al.*, 1997)

เตรียมจัดเสนอตัวอย่างที่มีรหัสกำกับของ A และ B ตามตารางสุ่ม ซึ่งมีทั้ง A = odd sample และ B = odd sample แก่ผู้ทดสอบพร้อมแบบทดสอบ โดย A คือ เนื้อไก่ที่หั่นบนเขียงที่แช่น้ำ (ตัวอย่างควบคุม) และ B คือ เนื้อไก่ที่หั่นบนเขียงที่แช่ด้วยอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ให้ผู้ทดสอบ ทั้ง 20 คนรับตัวอย่างตามลำดับดังตารางที่ ก.1

ตารางที่ ก.1 ตารางสุ่มสำหรับลำดับการเสนอในการทดสอบ Triangle test

Subject	Serving order
1	ABB
2	BAB
3	BBA
4	AAB
5	BBA
6	ABB
7	BAA
8	ABA
9	AAB
10	BAA
11	ABA
12	BAB
13	AAB
14	BBA
15	BAA
16	ABB
17	ABA
18	BAB
19	ABA
20	AAB

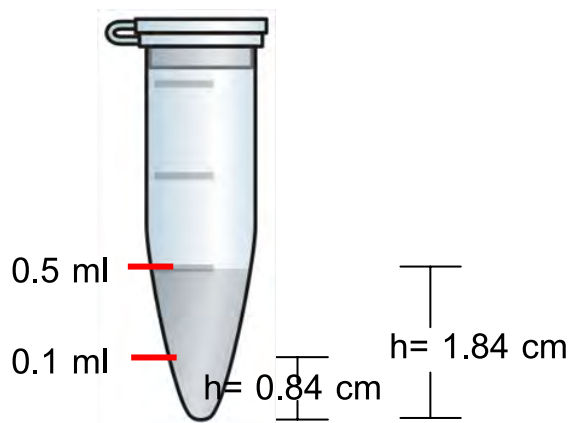
นับจำนวนผู้ทดสอบที่ตอบถูกจากผู้ทดสอบทั้งหมด เปรียบเทียบจำนวนผู้ทดสอบที่ตอบถูกกับค่าจากตารางสถิติ Triangle test เลขในตารางแสดงจำนวนต่ำสุดเพื่อแสดงว่าผู้ทดสอบส่วนใหญ่รับรู้ได้ว่าผลิตภัณฑ์ A และ B แตกต่างกัน โดยที่ความน่าจะเป็น $p = 0.05$ แบบ one-tailed, binomial test, $df = 1$, จำนวนผู้ทดสอบ 20 คน พบว่าจำนวนต่ำสุดเพื่อแสดงว่าผู้ทดสอบส่วนใหญ่รับรู้ได้ว่าผลิตภัณฑ์ A และ B แตกต่างกัน คือ 11 คน

แบบทดสอบ Triangle Test		
รหัสการทดสอบ	วันที่	
ชนิดตัวอย่าง กระทงทอง	ชื่อผู้ทดสอบ.....	
<p style="text-align: center;">กรุณาใส่เครื่องหมาย <input type="checkbox"/> ที่ <input type="checkbox"/> ตัวอย่างคือหรือตัวอย่างที่ท่านรู้สึกได้ว่าแตกต่างไปจากกลุ่ม</p> <p style="text-align: center;"><input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;">(รหัส) (รหัส) (รหัส)</p>		
<p>สิ่งที่แตกต่างกันของตัวอย่าง คือ.....</p> <p>ชอบตัวอย่างที่เหมือนหรือต่าง เพราะ.....</p>		

รูปผนวกที่ ๑1 ตัวอย่างแบบทดสอบ Triangle Test

ภาคผนวก ค
การคำนวณหาปริมาณน้ำมันกานพลู

ภาคผนวก ค: การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันกานพลู(ml) จากความสูง(cm) ของ eppendorf



รูปผนวกที่ ค1 ปริมาณน้ำมันกานพลูและความสูงของ eppendorf

h คือ ขนาดความสูงของน้ำมันกานพลู (cm)

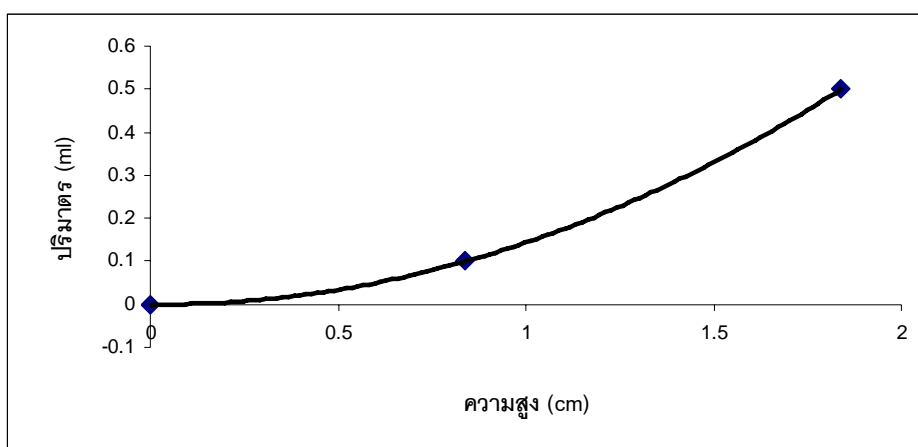
คำนวณปริมาณน้ำมันจากความสูงที่วัดได้จาก eppendorf

โดย $h = 1.84$ cm มีปริมาตร 0.5 ml

$h = 0.84$ cm มีปริมาตร 0.1 ml

นำความสูง (x) ของ eppendorf มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับปริมาตร (y) น้ำมันกานพลู

ได้เป็น สมการ $y = 0.1527x^2 - 0.0092x$



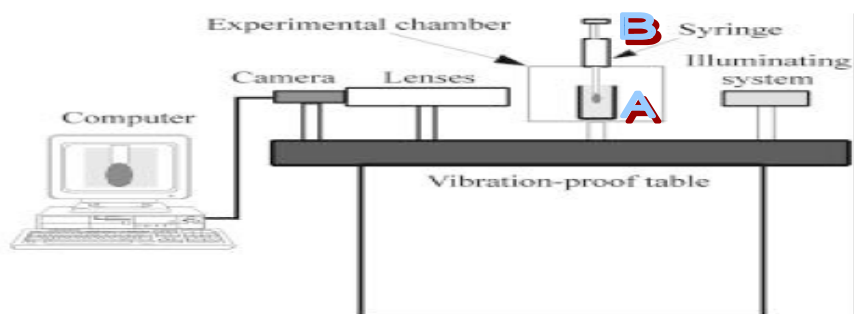
รูปผนวกที่ ค2 ความสัมพันธ์ของความสูงของ eppendorf และปริมาณน้ำมันกานพลู

ภาคผนวก ง

การวัดแรงตึงระหว่างผิวประจันด้วยวิธี pendent drop

ภาคผนวก ง: การวัดแรงตึงระหว่างผิวประจันด้วยวิธี pendent drop

ใส่วัฏภาคน้ำปริมาณ 10 ml ในกล่องพลาสติกใส (A) และใส่วัฏภาคน้ำมันใน syringe (B) จากนั้นกด syringe เพื่อให้น้ำมันหยดลงในวัฏภาคน้ำ วิเคราะห์แรงตึงระหว่างผิวประจันด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Arashiro and Demarquette, 1998)

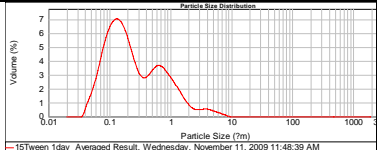
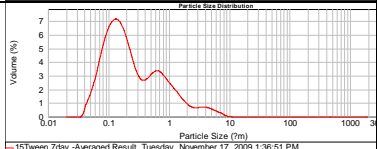
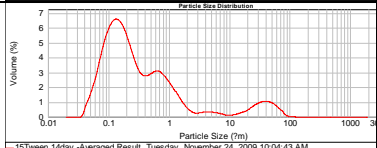
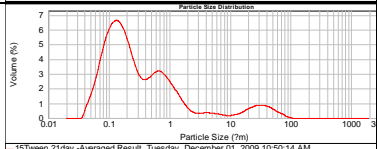
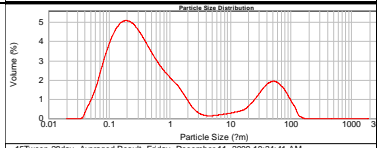
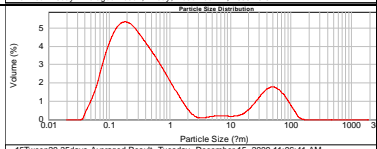


รูปผนวกที่ 1 อุปกรณ์การวัดแรงตึงระหว่างผิวประจันด้วยวิธี pendent drop
ที่มา : Arashiro และ Demarquette (1998)

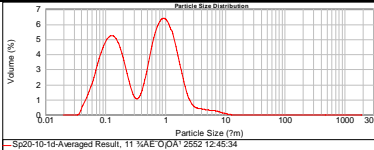
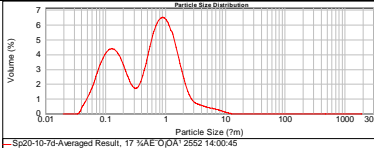
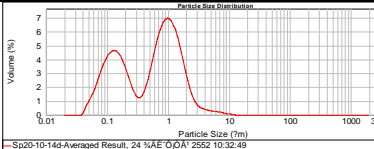
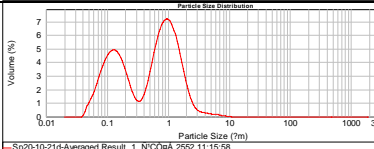
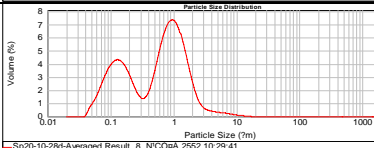
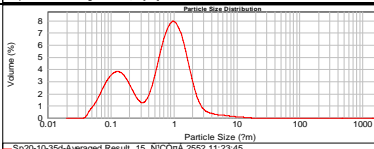
ภาคผนวก จ

รูปแบบการกระจายของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

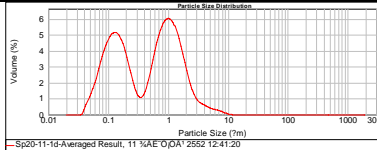
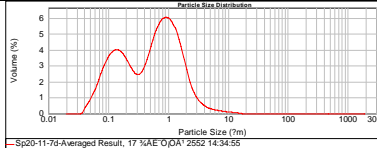
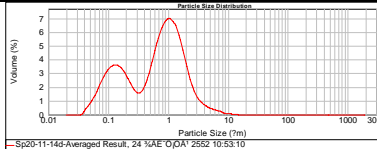
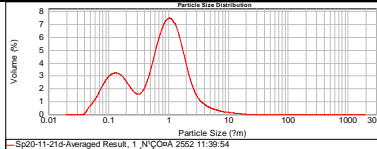
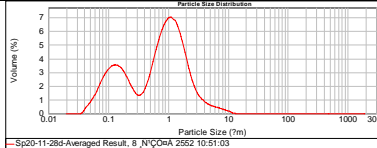
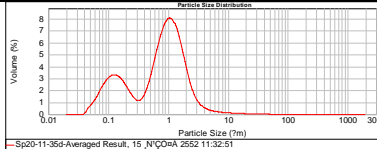
ตารางที่ ๑.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีตัวทำอิมัลชันต่างกัน

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจายขนาด	ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (µm)	ค่า R ² สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่เก็บ (วัน) กับ	
						D ³	1/D ²
Tween 20	16.7	1		5.423	0.502 ± 0.049	0.6268	0.7114
		7		6.039	0.547 ± 0.089		
		14		18.374	3.779 ± 0.652		
		21		13.597	3.150 ± 1.210		
		28		126.091	9.830 ± 3.169		
		35		124.177	8.675 ± 2.483		

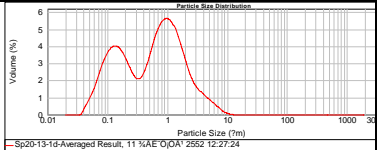
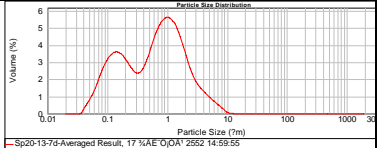
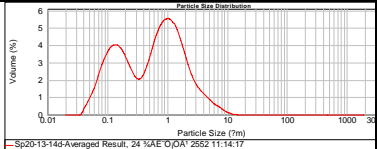
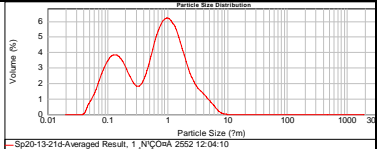
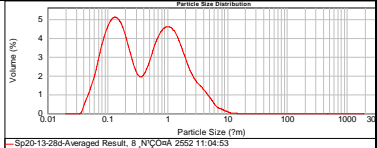
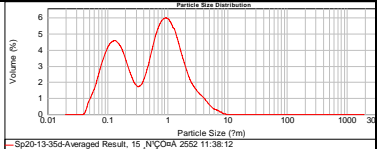
ตารางที่ ๑. (ต่อ)

ตัวทำ อิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 20 ร่วมกับ Tween 20	10	1		2.919	0.756 ± 0.074	0.3817	0.3095
		7		2.807	0.832 ± 0.038		
		14		2.583	0.814 ± 0.044		
		21		2.489	0.744 ± 0.083		
		28		2.442	0.840 ± 0.125		
		35		2.721	0.756 ± 0.018		

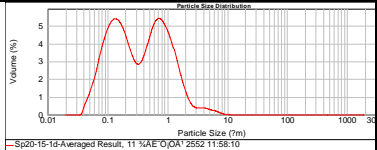
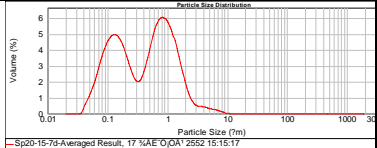
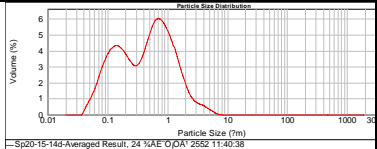
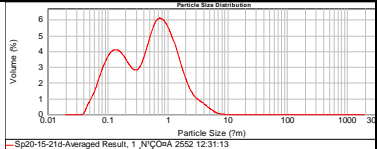
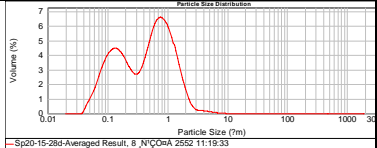
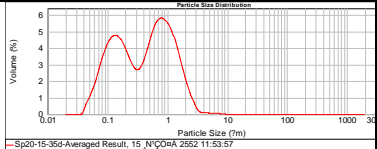
ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

ตัวทำ อิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 20 ร่วมกับ Tween 20	11	1		3.150	0.817 ± 0.062	0.8735	0.8506
		7		2.015	0.846 ± 0.366		
		14		2.602	0.960 ± 0.076		
		21		2.500	1.060 ± 0.179		
		28		2.648	1.060 ± 0.249		
		35		2.295	1.062 ± 0.153		

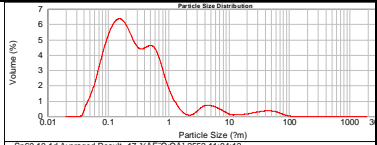
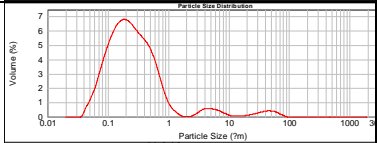
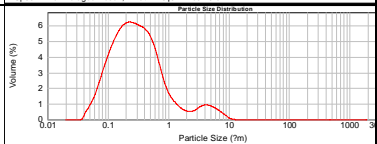
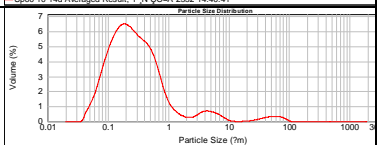
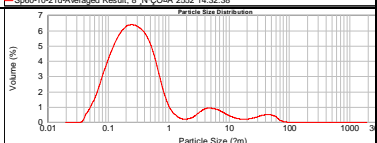
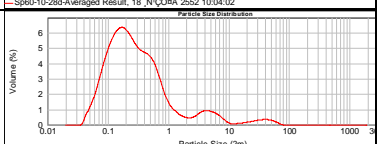
ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

ตัวทำ อิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 20 ร่วมกับ Tween 20	13	1		3.486	0.992 ± 0.060	0.6194	0.6599
		7		3.479	1.059 ± 0.219		
		14		3.536	1.025 ± 0.081		
		21		3.122	1.008 ± 0.172		
		28		4.884	0.908 ± 0.174		
		35		3.205	0.885 ± 0.212		

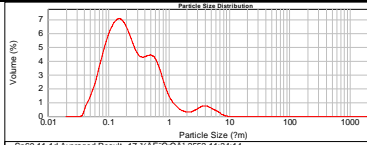
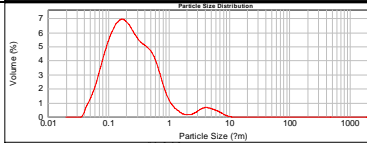
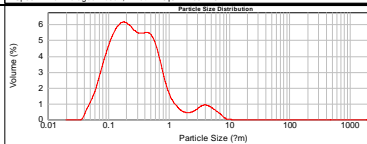
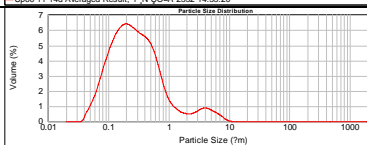
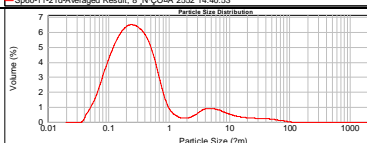
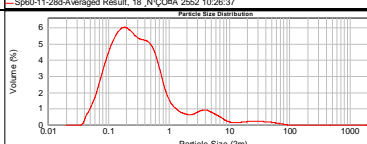
ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

ตัวทำ อิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 20 ร่วมกับ Tween 20	15	1		3.738	0.602 ± 0.013	0.0007	0.001
		7		3.069	0.699 ± 0.069		
		14		3.043	0.694 ± 0.055		
		21		3.039	0.761 ± 0.053		
		28		2.657	0.630 ± 0.143		
		35		3.137	0.636 ± 0.092		

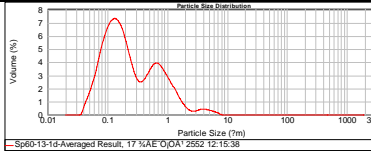
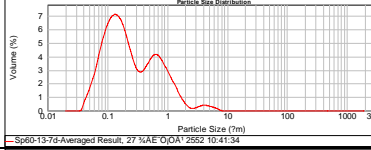
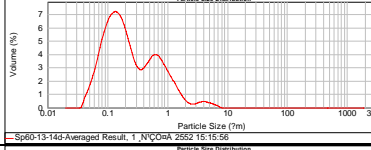
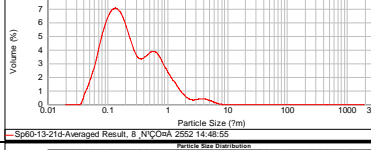
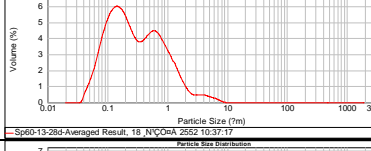
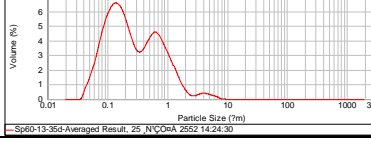
ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

ตัวทำ อิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 60 ร่วมกับ Tween 20	10	1		4.306	1.758 ± 1.415	0.0405	0.0186
		7		3.161	1.684 ± 1.314		
		14		3.774	0.655 ± 0.074		
		21		3.667	1.716 ± 1.798		
		28		11.144	2.110 ± 0.473		
		35		6.479	1.566 ± 0.916		

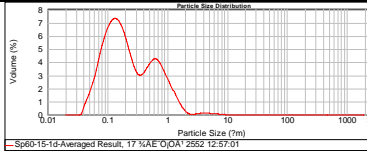
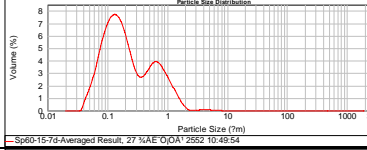
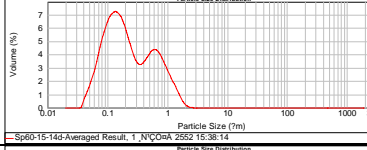
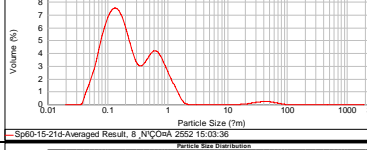
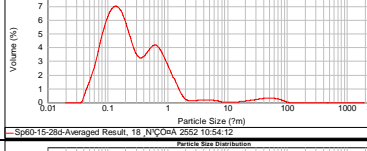
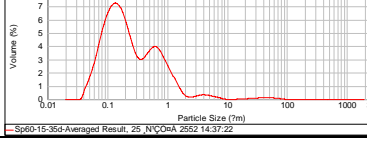

ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

ตัวทำ อิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 60 ร่วมกับ Tween 20	11	1		3.634	0.479 ± 0.022	0.4800	0.8825
		7		3.053	0.476 ± 0.044		
		14		3.397	0.574 ± 0.032		
		21		3.467	0.581 ± 0.071		
		28		10.568	1.729 ± 1.033		
		35		5.824	1.340 ± 0.904		

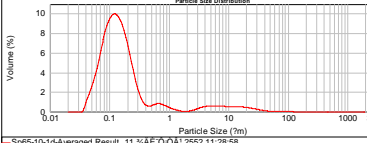
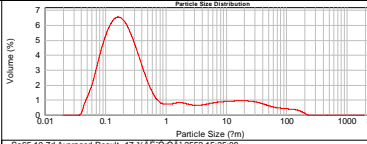
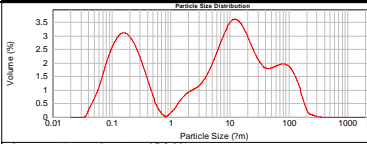
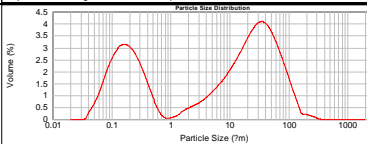
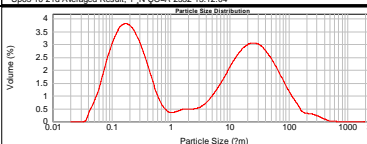
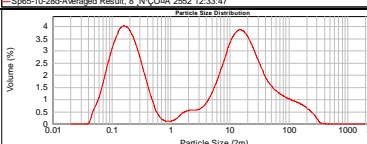
ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

ตัวทำ อิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 60 ร่วมกับ Tween 20	13	1		5.122	0.455 ± 0.034	0.31066	0.3184
		7		4.698	0.447 ± 0.004		
		14		4.816	0.453 ± 0.022		
		21		4.518	0.433 ± 0.042		
		28		4.391	0.539 ± 0.025		
		35		4.426	0.483 ± 0.038		

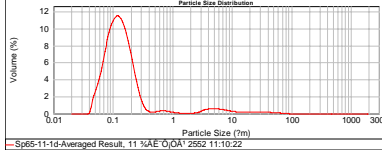
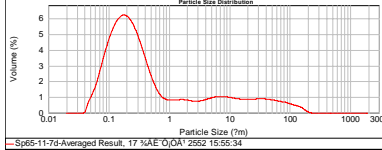
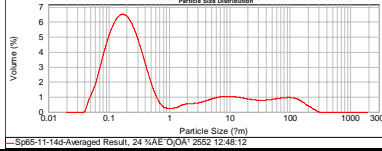
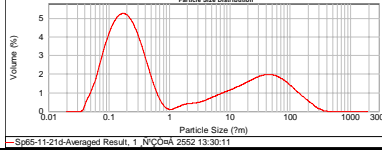
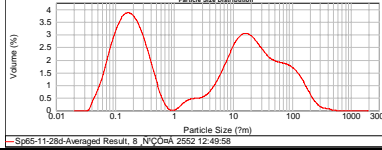
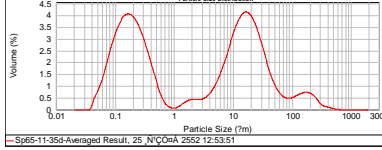
ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

ตัวทำ อิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution 	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 60 ร่วมกับ Tween 20	15	1		4.229	0.371 ± 0.082	0.2704	0.6982
		7		4.422	0.344 ± 0.047		
		14		4.029	0.349 ± 0.074		
		21		4.184	0.921 ± 1.072		
		28		4.506	1.506 ± 2.000		
		35		4.560	0.779 ± 0.885		

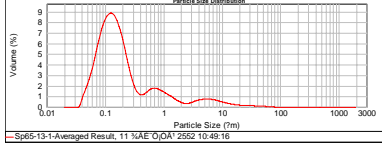
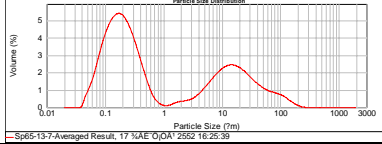
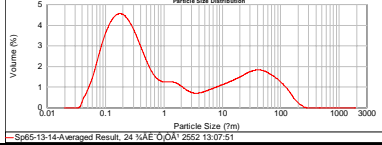
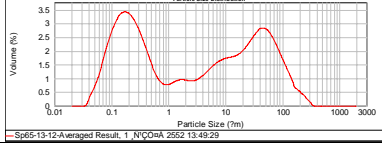
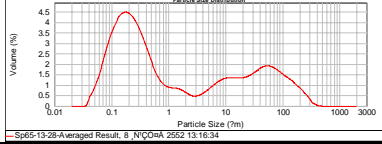
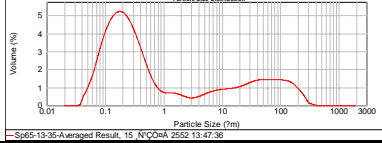
ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	10	1		5.250	1.226 ± 0.445	0.5019	0.4277
		7		67.298	6.376 ± 2.412		
		14		10.066	21.942 ± 0.074		
		21		5.824	24.365 ± 1.917		
		28		15.262	21.356 ± 3.155		
		35		8.280	21.038 ± 4.059		

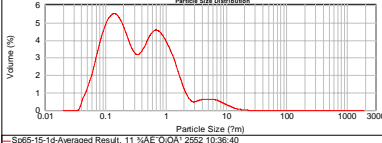
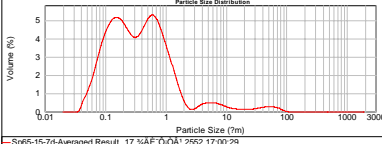
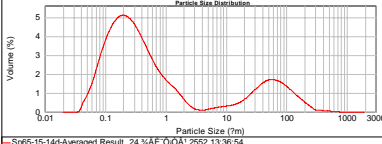
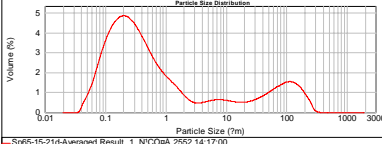
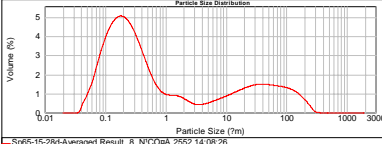
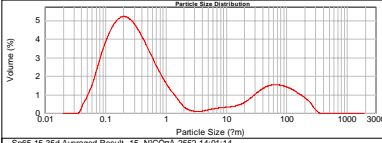
ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	11	1		1.770	1.017 ± 0.429	0.6493	0.4173
		7		77.102	7.568 ± 3.127		
		14		142.207	11.847 ± 4.393		
		21		196.408	19.194 ± 5.021		
		28		13.079	24.672 ± 9.390		
		35		7.592	19.649 ± 6.141		

ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	13	1		8.596	1.035 ± 0.401	0.6722	0.4101
		7		98.984	11.092 ± 2.806		
		14		117.130	14.878 ± 1.575		
		21		22.242	23.420 ± 1.598		
		28		163.771	23.405 ± 9.023		
		35		230.168	20.672 ± 4.718		

ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

ตัวทำอิมัลชัน	HLB	อายุการเก็บ (วัน)	Particle size distribution	ค่าการกระจาย ขนาด	ขนาดอนุภาค น้ำมันเฉลี่ย (μm)	ค่า R^2 สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ เก็บ (วัน) กับ	
						D^3	$1/D^2$
Span 65 ร่วมกับ Tween 20	15	1		4.737	0.788 ± 0.101	0.7503	0.5588
		7		3.776	1.614 ± 1.134		
		14		181.706	17.226 ± 5.690		
		21		204.208	18.698 ± 5.651		
		28		178.129	17.574 ± 9.233		
		35		209.772	18.694 ± 8.068		

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวภัทรววรรณ หมกทอง เกิดวันที่ 12 มกราคม 2525 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา เมื่อปีการศึกษา 2547 และเข้าศึกษาต่อวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550

เสนอผลงานภาคโปสเตอร์ในงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 ระหว่างวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2553. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ.