

# ผลของปริมาณ polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate ต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชัน น้ำมันกานพลู

Effect of polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate on antibacterial of clove oil emulsion

ไพลิน สุขวงศ์<sup>1</sup> พาสวดี ประทีปะเสน<sup>1</sup> และสุเมธ ตันตระเรียว<sup>1</sup>

Pailin Sukwong<sup>1</sup> Pasawadee Pradipasean<sup>1</sup> and SumateTantratian<sup>1</sup>

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของปริมาณ polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) ในอิมัลชันน้ำมันกานพลู ต่อฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* โดยใช้วิธี agar diffusion ปริมาณ Tween 20 ที่ศึกษา คือ ร้อยละ 20, 40 และ 60 โดยน้ำหนัก และปริมาณน้ำมันกานพลูร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ทำการลดขนาดอนุภาคน้ำมันด้วยเครื่องโฮโมจีไนซ์และคลื่นเหนือเสียง ผลการทดลอง พบว่าการเพิ่มปริมาณ Tween 20 ทำให้ความหนืดของอิมัลชันสูง ขนาดอนุภาคน้ำมันลดลง และอิมัลชันเสถียรขึ้น แต่พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียลดลง จากการคำนวณพบว่าการเพิ่มปริมาณ Tween 20 ทำให้จำนวนโมล Tween 20 ต่ออนุภาคลดลง ส่งผลให้ hydrophilic ของอนุภาคของน้ำมันในอิมัลชันลดลง นอกจากนี้ความหนืดของอิมัลชันก็ยิ่งสูงขึ้นเป็นผลทำให้โอกาสที่อนุภาคน้ำมันสัมผัสกับผนังเซลล์แบคทีเรียที่มีประจุลบลดลง ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียลดลง

## ABSTRACT

This work aims to investigate the effect of polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) on antimicrobial of clove oil-in-water emulsion. The determination of such antimicrobial activity against five bacteria, namely *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* was done by using agar diffusion assay. Emulsions were prepared to obtain different concentration of Tween 20 in 20, 40 and 60% by weight at constant clove oil concentration of 20% by weight. Homogenization and ultrasonication were used to disperse oil droplets. Increasing Tween 20 concentration increased viscosity but decreased size of oil droplets. As a result, stability of emulsion increased while antibacterial activity against these five bacteria decreased as Tween 20 concentration increased. From calculation, moles of Tween 20 per oil droplet decreased as Tween 20 concentration increased resulting in decreasing hydrophilic group of oil droplet surface. With decreasing hydrophilic group of oil droplet surface and increasing viscosity, chance for oil droplets to contact bacterial cell surface, which has negative charges, decreased. Therefore, antibacterial activity decreased.

Key Words: antimicrobial activity, Tween 20, particle size, viscosity, clove oil emulsion

e-mail address: nomadtai@gmail.com

<sup>1</sup>ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phaya Thai Road, Pathumwan, Bangkok 10330.

## ค่านำ

กานพลู เป็นพืชในวงศ์ MYRTACEAE มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Eugenia caryophyllata* Thumb. หรือ *Eugenia aromaticum* (Linn.) Merr. Et Perry เป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในภูมิภาคที่มีอากาศร้อนชื้น หรือในที่ที่มีความชุ่มชื้น กานพลูสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายทาง เช่น ด้านการแพทย์ น้ำมันกานพลูสามารถฆ่าเชื้อโรคได้หลายชนิด เช่น เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ โรคบิดชนิดไม่มีตัว และยับยั้งเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกลาก และตกขาว เป็นต้น และยังสามารถใช้ในการแต่งกลิ่นเครื่องสำอาง ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก สบู่ และอาหารได้อีกด้วย (สุพจน์, 2543) กานพลูประกอบด้วยสารในกลุ่ม phenolic โดยเฉพาะ eugenol ที่พบมากในน้ำมันหอมระเหย กานพลู ซึ่งมีสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี เนื่องจากสามารถทำลายโปรตีน และเอนไซม์ภายในเซลล์ได้ ทำให้เซลล์เกิดการเสียหายและถูกทำลายไปในที่สุด นอกจากนี้ยังแทรกซึมเข้าไปในส่วนไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลให้ osmotic barrier ลดลง (Frazier, 1967; Rose, 1968; Wang et al., 2011) Wang et al. (2011) พบว่าการผสมน้ำมันหอมระเหยกานพลูที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ผสมในฟิล์มไคโตแซนสามารถยับยั้ง *Aspergillus oryzae* ได้ดีที่สุดรองลงมา คือ *Penicillium digitatum*, *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ตามลำดับ ดังนั้น จึงใช้น้ำมันกานพลูเป็นสารออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรค โดยเฉพาะกับอุปกรณ์ที่นำไปสัมผัสกับอาหาร ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และที่เกิดไบโอฟิล์ม (biofilm) ที่ผิวสัมผัสอาหารของอุปกรณ์ที่ใช้ในการประกอบอาหาร

แบคทีเรียก่อโรคที่มีอยู่ในวัตถุดิบที่นำมาประกอบอาหาร ทำให้โรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของโรคท้องร่วง คือ *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นท่อนสั้น พบได้ในไข่ สัตว์ปีก เนื้อสัตว์ อาหารทะเล อาหารประเภทนม เป็นต้น และก่อให้เกิดโรค Salmonellosis ซึ่งมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย อาเจียน เป็นไข้ ส่วน *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นท่อนพบได้ในไข่ สัตว์ปีก เนื้อสัตว์ อาหารทะเล อาหารประเภทนม และยังสามารถพบอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลื้อยคลาน จึงใช้แบคทีเรียนี้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร โดย *E. coli* O157:H7 สามารถทำให้เกิดโรค Hemorrhagic colitis ซึ่งมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย อาเจียน เป็นไข้ นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน พบได้ตามพื้นดินและน้ำ สามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนได้ที่อยู่ในอาหาร ทำให้อาหารเน่าเสียได้และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถสร้าง extracellular proteases และ lipases ดังนั้น สามารถย่อยอาหารประเภทโปรตีน (proteolytic) และไขมัน (lipolytic) ได้ และยังสามารถสร้างไบโอฟิล์มไว้สำหรับยึดติดพื้นผิววัสดุต่างๆ ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง สามารถพบในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช ส่วน *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม พบการปนเปื้อนจากมือของผู้ประกอบอาหาร อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ที่สัมผัสอาหาร เช่น มีดเขียงและเครื่องบดเนื้อ เป็นต้น (Suo et al., 2010; Velusamy et al., 2010) ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ต่างๆ มักใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เพื่อลดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อน้ำมันกานพลูผสมพร้อมด้วยน้ำจะเกิดแยกชั้นขึ้น เนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างผิวประจัน (interfacial force) ระหว่างน้ำและน้ำมันสูงมาก ดังนั้นจึงต้องใช้ตัวทำอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ เป็นสารลดแรงดึงดูดระหว่างผิวประจัน และใช้พลังงานตีให้น้ำมันเกิดเป็นอนุภาคเล็ก ๆ และกระจายตัวอยู่ในน้ำ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะปรากฏเป็นเนื้อเดียวกัน เรียกว่า อิมัลชัน ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชันที่ไม่มีประจุ มีหมู่พอลิออกซิเจนขนาดใหญ่ จึงละลายน้ำได้ดี ในปัจจุบันมีการศึกษาผลของอิมัลชันต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ พบว่ายังมีผลที่ขัดแย้งกันอยู่ Gome et al. (2011) ศึกษาอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ ที่เตรียมจาก poly (DL-lactide-co-

glycolide) มีขนาดเล็กระดับนาโน ผสมกับ eugenol และ *trans*-cinnamaldehyde โดยใช้ poly (vinyl alcohol) เป็นตัวทำอิมัลชัน พบว่าอิมัลชันในช่วงความเข้มข้นของ eugenol 10-20 mg/mL สามารถยับยั้ง *Salmonella* spp. และ *Listeria* spp. ได้ดี ส่วน Buranasuksombat *et al.* (2011) ศึกษาอิมัลชันน้ำมัน lemon myrtle และน้ำมันถั่วเหลือง พบว่า อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคระดับไมโครและนาโน มีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ไม่แตกต่าง ซึ่งสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดและฤทธิ์ของน้ำมันที่ใช้ มากกว่าขนาดของอนุภาคน้ำมัน แต่งานวิจัยของ Terjung *et al.* (2012) ศึกษาอิมัลชันของ carvacrol โดยการใช้แรงกลต่างๆ ในการลดอนุภาคโดยใช้ปริมาณตัวทำอิมัลชันคงที่ พบว่า อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคระดับไมโคร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria innocua* ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ขนาดอนุภาคระดับนาโน สามารถชะลอการเจริญของ *L. innocua* เท่านั้น จากงานวิจัยข้างต้น งานวิจัยนี้จึงเกิดแนวความคิดศึกษาผลของปริมาณตัวทำอิมัลชันต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย ด้วยการแปรปริมาณตัวทำอิมัลชันที่มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยคงที่ ทั้งนี้ เนื่องจากปริมาณตัวทำอิมัลชันมีผลต่อขนาดอนุภาคของน้ำมันหอมระเหย ความเสถียรของอิมัลชัน การกระจายและการแพร่ของอนุภาคน้ำมันหอมระเหย และการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีผลต่อฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเตรียมอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำโดยใช้ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน

#### 1.1 การเตรียมสารละลาย Tween 20 ในน้ำ

ละลาย Tween 20 (Ajax Finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand) ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยแปรปริมาณของ Tween 20 เป็นร้อยละ 20, 40 และ 60 โดยน้ำหนัก เขย่าเบาๆ ให้ Tween 20 ละลายอย่างช้าๆ จน Tween 20 ละลายหมดที่อุณหภูมิห้อง ( $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ) ระวังไม่ให้อิมัลชันเกิดฟอง

#### 1.2 การเตรียมอิมัลชัน

ซึ่งและผสมน้ำมันกานพลู (บริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีนจำกัด ถนนพหลโยธิน กรุงเทพมหานคร) ลงในสารละลาย Tween 20 ในน้ำ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูในอิมัลชันคงที่ ที่ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และแปรความเข้มข้นของ Tween 20 ในอิมัลชันเป็นร้อยละ 20, 40 และ 60 โดยน้ำหนัก พร้อมกวนให้หยดย่น้ำมันกานพลูแขวนลอยในสารละลาย Tween 20 ในน้ำ จากนั้นทำให้หยดย่น้ำมันมีขนาดเล็กกลงโดยใช้เครื่องโฮโมจีไนซ์ (Ystral GmbH SERIES W10/25, Ballrechten-Dottingen, Germany) ที่ 22000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (เปิดเครื่อง 5 นาที สลับกับปิดเครื่อง 5 นาที จนครบตามเวลาที่กำหนด) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องคลื่นเหนือเสียง (Hielscher UP400S ultrasonic processor, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany) ที่กำลัง 400 Watt, amplitude 80%, cycle = 0.8 โดยใช้ probe Horn H22 เส้นผ่านศูนย์กลาง 22 mm เป็นเวลา 5 นาที โดยหล่อภาชนะที่ใช้ด้วยน้ำผสมน้ำแข็งตลอดเวลาที่ใช้เครื่องโฮโมจีไนซ์และคลื่นเหนือเสียงเพื่อถ่ายเทความร้อน

### 2. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของอิมัลชัน

#### 2.1 การเตรียมแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 และ *S. aureus* ATCC 25923 โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียจาก stock culture ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) 1 loop ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Nutrient

Broth (NB) ปริมาตร 10 mL ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะมีความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ  $10^7$ - $10^8$  cfu/mL

## 2.2 ความสามารถในการต้านแบคทีเรียของอิมัลชันกานพลู

ใช้วิธีการทดสอบแบบ disc agar diffusion assay โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ramos *et al.* (2012) โดย spread คัลเจอร์ของแบคทีเรียจากข้อ 2.1 บนอาหาร NA จากนั้นเจือจางอิมัลชันที่เตรียมได้จากข้อ 1.2 โดยใช้ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และปิเปตอิมัลชันที่ความเข้มข้นอิมัลชันต่อสารละลายทั้งหมด ในช่วง 3.9-500 µg /mL บน paper disc (ขนาด 0.6 cm) ปริมาตร 15 µL ที่วางบนอาหาร NA บ่มที่ 37°C นาน  $18 \pm 2$  ชั่วโมงในสภาพมีอากาศตรวจฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง(cm) ของ clear zone ที่เกิดขึ้นรอบ paper disc ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิเปอร์ โดยรายงานความสามารถในการต้านแบคทีเรียเป็นปริมาณอิมัลชัน (ร้อยละโดยมวล) ในความเข้มข้นของอิมัลชันที่ทำให้เกิด clear zone รอบ paper disc มากกว่า 0.6 cm

## 3. การวิเคราะห์ขนาด การกระจายตัว และลักษณะของอนุภาคน้ำมัน

นำอิมัลชันที่ได้จากข้อ 1.2 มาวิเคราะห์ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยแบบค่าเฉลี่ยโดยปริมาตร (mean volume diameter, D [4,3]) และการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมัน ด้วยเครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK) โดยใช้ deionize water เป็น liquid dispersant (Goloub and Pugh, 2005) เพื่อถ่ายภาพอนุภาคน้ำมันในอิมัลชันต่างๆ ที่ได้จากข้อ 1.2 นำอิมัลชันไปเจือจางด้วยน้ำหมักสีน้ำเงินที่ละลายในน้ำ จากนั้นนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ (trinocular phase contrast microscope, Olympus BX51, Tokyo, Japan) และบันทึกภาพด้วยโปรแกรม Vcapture (SmungMug, Inc., Mountain View, California, USA)

## 4. การวัดค่าความหนืด

นำอิมัลชันจากข้อ 1.2 มาวัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง Rotational Viscometer (ALPHA SERIES, Fungilab, S.A., Barcelona, Spain) ที่ความเร็วในการหมุน 100 รอบต่อนาที โดยใช้หัววัด L2

## ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่แสดงใน Table 1 พบว่า ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูลดลงเมื่อปริมาณ Tween 20 เพิ่มขึ้น และเมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูบริสุทธิ์ พบว่า *B. subtilis* ถูกยับยั้งได้ที่ความเข้มข้นของอิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก เท่ากับของน้ำมันกานพลูบริสุทธิ์ ขณะที่อิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 40 และ 60 โดยน้ำหนัก ต้องใช้ความเข้มข้นของอิมัลชันสูงกว่า ในการยับยั้ง *E. coli* อิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 20 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าน้ำมันกานพลูบริสุทธิ์ แต่เมื่อใช้ปริมาณ Tween 20 เพิ่มขึ้น พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นของอิมัลชันน้ำมันกานพลูเพิ่มเป็นสองเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกรใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ส่วน *S. Typhimurium* พบว่าอิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าน้ำมันกานพลูบริสุทธิ์ แต่อิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับน้ำมันกานพลูบริสุทธิ์ กรณีของ *P. aeruginosa* พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียน้อยกว่าน้ำมันกานพลูบริสุทธิ์ สำหรับ *S. aureus* พบว่าอิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 20 มี

ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าน้ำมันกานพลูบริสุทธิ์ แต่เมื่อปริมาณ Tween 20 เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 40 และ 60 โดยน้ำหนัก ต้องใช้ความเข้มข้นของอิมัลชันน้ำมันกานพลูเพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 4 เท่า เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูบริสุทธิ์ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลที่ขัดแย้งกับงานวิจัยของ Wang *et al.* (2011)

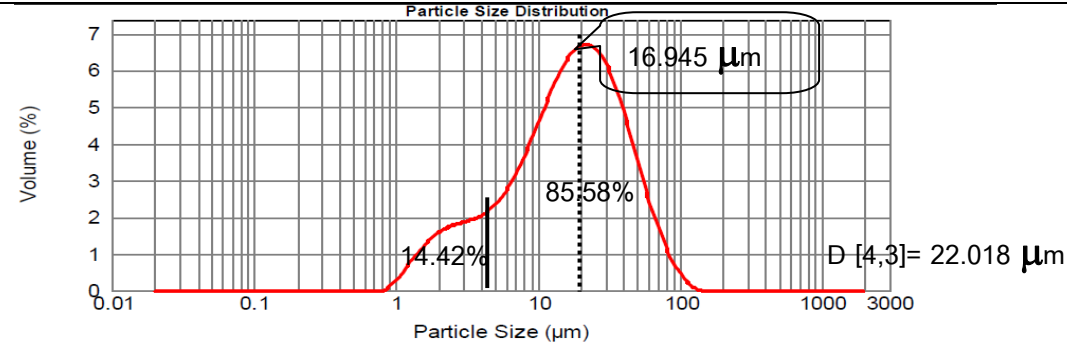
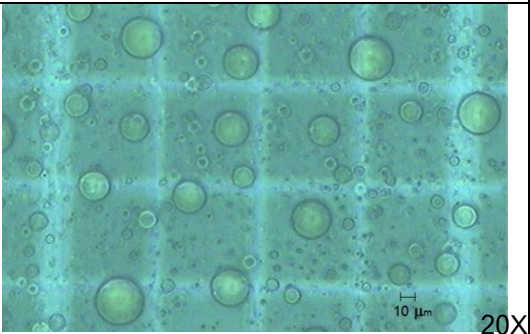
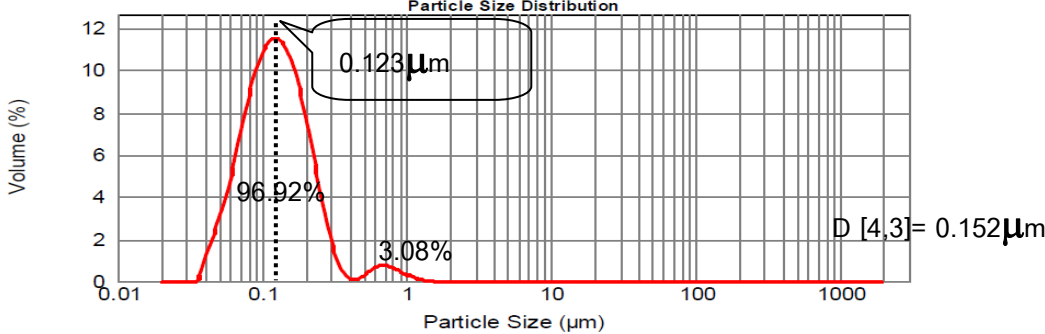
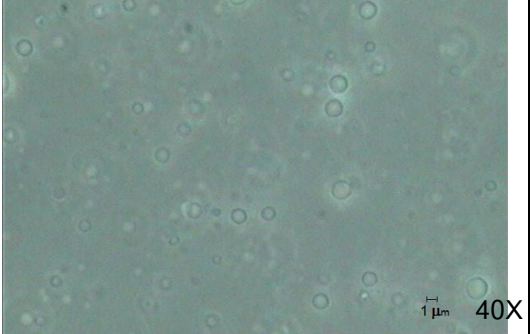
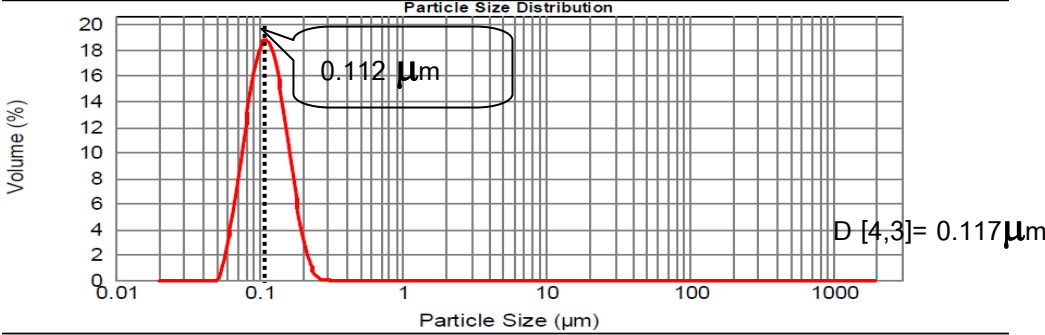
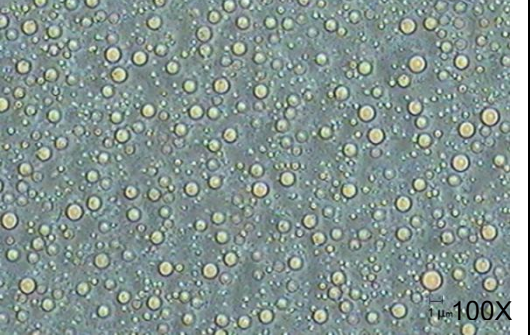
Table 2 แสดงว่าการเพิ่มปริมาณ Tween 20 ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและรูปแบบการกระจายขนาดเปลี่ยน โดยเมื่อปริมาณ Tween 20 เพิ่มจากร้อยละ 20 เป็น 40 โดยน้ำหนัก ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยลดลง ร้อยละ 99.31 การเพิ่มปริมาณ Tween 20 จากร้อยละ 40 เป็น 60 ไม่มีผลต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ย แต่เปลี่ยนรูปแบบการกระจายขนาดคือไม่มีอนุภาคน้ำมันที่มีขนาดใหญ่กว่า  $0.3\ \mu\text{m}$  ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณ Tween 20 พอไปล้อมรอบผิวทั้งหมดของอนุภาคน้ำมันซึ่งมีขนาดในช่วง  $0.056\text{--}0.283\ \mu\text{m}$  จาก phase diagram ของ Gupta and Moulik (2007) พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก เป็นอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ ที่เป็น biphasic หรือ coarse emulsion ที่ขนาดอนุภาคน้ำมันใหญ่กว่า  $10\ \mu\text{m}$  มีความเสถียรแบบจลน์ (kinetically stable) และความเสถียรต่ำกว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ  $\geq 40$  โดยน้ำหนัก ซึ่งให้อนุภาคน้ำมันที่มีขนาดเล็กกว่า  $1\ \mu\text{m}$  (Hiemans, 1977) จาก D[4,3] ที่ได้นำไปคำนวณหาจำนวนโมล Tween 20 ต่ออนุภาค โดยสมมุติว่าตัวทำอิมัลชันทั้งหมดอยู่ที่ผิวประจันระหว่างน้ำกับน้ำมัน พบว่าจำนวนโมล Tween 20 ต่ออนุภาค มี  $4.38 \times 10^{-9}$ ,  $2.88 \times 10^{-15}$  และ  $1.97 \times 10^{-15}$  เมื่อใช้ปริมาณ Tween 20 สูงขึ้นจากร้อยละ 20, 40 และ 60 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เนื่องจาก Tween 20 เรียงตัวรอบอนุภาคน้ำมันโดยส่วนหัวซึ่งมีความเป็น hydrophilic หันออกเข้าหาน้ำ ดังนั้น จากผลของจำนวนโมล Tween 20 ต่ออนุภาค ที่ลดลงบ่งว่าผิวของอนุภาคน้ำมันมีความเป็น hydrophilic ต่ำลงเมื่อปริมาณ Tween 20 เพิ่มขึ้น ทำให้ลดความสามารถที่อนุภาคน้ำมันจะจับกับผิวแบคทีเรียซึ่งมีประจุลบ นอกจากนี้ การเพิ่มปริมาณ Tween 20 ยังทำให้ความหนืดของอิมัลชันสูงขึ้น โดยความหนืดของอิมัลชันที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 20, 40 และ 60 มีค่าเท่ากับ 9.3, 80.9 และ 169.4 mPas ตามลำดับ ทำให้อนุภาคน้ำมันเคลื่อนที่ช้าลง ดังนั้น การที่ผิวของอนุภาคน้ำมันมีความเป็น hydrophilic ลดลงพร้อมกับความหนืดของอิมัลชันเพิ่มขึ้นเป็นผลทำให้โอกาสที่อนุภาคน้ำมันกานพลูสัมผัสกับผิวแบคทีเรียแล้วปลดปล่อยน้ำมันกานพลูออกเพื่อดำเนินฤทธิ์ลดลงเมื่อปริมาณ Tween 20 เพิ่มขึ้น (Li *et al.*, 2001)

Table 1 Effect of Tween 20 concentrations on antimicrobial efficiency ( $\mu\text{g/mL}$ ) of tested microorganisms.

Percentage by weight		Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )				
Clove oil	Tween 20	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S.</i> Typhimurium	<i>S. aureus</i>	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>
-	100	NC <sup>a</sup>	NC <sup>a</sup>	NC <sup>a</sup>	NC <sup>a</sup>	NC <sup>a</sup>
100	-	7.8125	15.625	15.625	31.25	7.8125
20	20	7.8125	7.8125	7.8125	15.625	15.625
20	40	15.625	15.625	7.8125	62.5	15.625
20	60	15.625	15.625	15.625	125	62.5

<sup>a</sup> no clear zone

Table 2 Effect of Tween 20 concentrations on particle, size distribution of clove oil emulsion droplets (oil in water).

Percentage by weight		Particle size distribution of oil droplets	Oil droplet
Clove oil	Tween 20		
20	20		
20	40		
20	60		

## สรุป

การทำอิมัลชันช่วยทำให้น้ำมันสามารถกระจายในน้ำที่เข้มข้น และมีความเสถียรที่เข้มข้น ผลการวิจัยนี้บ่งชี้ว่าปริมาณ Tween 20 มีผลต่อความเป็น hydrophilic ของผิวอนุภาคน้ำมันกานพลู ความหนืดของอิมัลชัน และขนาดอนุภาคน้ำมัน โดยความเป็น hydrophilic ของผิวอนุภาคน้ำมันกานพลู และความหนืดของอิมัลชันมีผลต่อฤทธิ์ต้านแบคทีเรียมากกว่าขนาดอนุภาคน้ำมัน และความเป็น hydrophilic ของผิวอนุภาคน้ำมันกานพลูที่สูงกว่าให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้มากกว่าผิวอนุภาคน้ำมันที่มีความเป็น hydrophilic ต่ำ

## เอกสารอ้างอิง

- สุพจน์ คิลานเภสัช. 2543. **สมุนไพร เครื่องเทศ และพืชปรุงแต่งกลิ่นรส**. สำนักพิมพ์ประพันธ์สาส์น, กรุงเทพฯ.
- Buranasuksombat, U., Y.J. Kwon, M. Turner and B. Bhandari. 2011. Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties. **Food Sci. Biotechnol.** 20: 793-800.
- Frazier, W.C. 1967. **Food Microbiology**. McGraw-Hill book Company, Philadelphia.
- Goloub, T. P., and Pugh, R. J. 2005. The role of the surfactant head group in the emulsion process: Binary (nonionic-ionic) surfactant mixtures. **J. Colloid Interface Sci.** 291, 256-262.
- Gomes, C., R.G. Moreira and E. Castell-Perez. 2011. Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. **J. Food Sci.** 76 (2): 16-24.
- Gupta, S.and S.P. Moulik. 2007. Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. **J. Pharm. Sci.** 97(1): 22-45.
- Hiemens, P. C. 1977. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**. Marcel Dekker, New York.
- Li, J., D.J. McClements and L.A. Mclelland. 2001. Interaction between Emulsion Droplets and *Escherichia coli* Cells. **J. Food Sci.** 66 (4): 570-657.
- Ramos, L.Ó., S.I. Silva, J.C. Soares, J.C. Fernandes, M.F. Poças, M.E. Pintado and X. Malcata. 2012. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. **Food Research International** 45 (1): 351-361.
- Rose, A.H. 1968. **Chemical Microbiology**. Butterworth, London.
- Suo, B., Y. He, G. Paoli, A. Gehring, S.I. Tu and X. Shi. 2010. Development of an oligonucleotide-based micro array to detect multiple foodborne pathogens. **Mol. Cell. Probes.** 24: 77-86.
- Terjung, N., M. Löffler, M. Gibis and J. Hinrichs. 2012. Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. **Food Funct.** 3 (3): 290-301.
- Velusamy, V., K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa and C. Adley. 2010. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnol. Adv.** 28: 232-254.



Wang, L., F. Liu, Y. Jiang, Z. Chai, P. Li, Y. Cheng, H. Jing and X. Leng. 2011. Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. **J. Agric. Food Chem.** 59 (23): 12411-12419.