

ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์ของตำรับสเปรย์พ่นคอ จากน้ำผึ้งชันโรงผสมสารสกัดสมุนไพร

Antibacterial Effect and Cytotoxicity of the Throat Spray Recipe from Stingless Bee Honey and Herbal Extraction

ฟิรดาว เฮ็งตา, อุมนียะห์ กูนา, ยมม พิตักปะวาสุตติ, สุกาญจนา กำลึงมาก*

หลักสูตรการแพทย์แผนไทย คณะวิทยาการสุขภาพและการกีฬา มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขต 93210

Firdao Hengta, Umniyah Kuna, Yamon Pitakpawasutthi, Sukanjana Kamlungmak*

Bachelor of Thai Traditional Medicine, Faculty of Health and Sports Science,

Thaksin University, Phatthalung 93210

Received 5 March 2024; Received in revised 26 June 2024; Accepted 8 July 2024

บทคัดย่อ

พื้นที่ภาคใต้มีการปลูกพืชสมุนไพรกันอย่างแพร่หลายในทุกครัวเรือน จึงเหมาะแก่การนำสมุนไพรเหล่านี้มาเป็นวัตถุดิบหลักในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย โดยงานวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย ใบมะกรูด ต้นตะไคร้ และเปลือกมะนาว (2) พัฒนารสพ่นคอ และศึกษาลักษณะทางกายภาพ (3) ทดสอบความคงตัว และทดสอบความเป็นพิษ ผลการศึกษาพบว่า สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus aureus* *Streptococcus pyogenes* และ *Streptococcus pneumonia* ได้ โดยน้ำผึ้งชันโรงมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 1.56-3.13 %v/v และน้ำมันหอมระเหยที่ผสมกันทั้ง 3 ชนิด มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 0.10 %v/v การพัฒนารสพบว่า สูตร S4 เป็นสูตรที่ดีที่สุด ซึ่งประกอบด้วย น้ำผึ้งชันโรง น้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด และส่วนประกอบอื่น ๆ ในอัตราส่วนร้อยละ 20 : 2 : 78 มีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลว สีเหลืองน้ำตาล กลิ่นหอมเฉพาะรสขมหวานเล็กน้อย มีค่า pH = 6.73 ผลการทดสอบความคงตัวทั้งระยะสั้นและระยะยาว พบว่าสี รส และสิ่งแปลกปลอมไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิม pH มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอย่างไม่นัยสำคัญ นอกจากนี้ พบว่าความเข้มข้นของตำรับ S4 ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังชนิด Human Dermal Fibroblasts < 6.25 mg/mL และค่า IC₅₀ = 14.97 mg/mL ดังนั้นสูตรและกรรมวิธีการผลิตตำรับ S4 สามารถถ่ายทอดสู่ผู้ประกอบการได้ในอนาคต

คำสำคัญ: สเปรย์; น้ำผึ้งชันโรง; สารสกัดน้ำมันหอมระเหย; ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Abstract

In the southern region, medicinal plants are widely grown in almost every household, making them suitable as primary raw materials for distilling essential oils. This study aimed to: 1) evaluate the antibacterial effect of essential oils from kaffir lime, lemongrass, and lime (mixed essential oils). 2) develop a throat spray formulation and study its physical characteristics, and 3) conduct stability and toxicity tests. The findings indicated that the essential oils could inhibit *S. aureus*, *S. pyrogens*, and *S. pneumonia*. Stingless bee honey showed minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values ranging from 1.56% to 3.13 % v/v, while the mixed essential oils had MIC and MBC values of 0.10 %v/v. Formula S4, which includes stingless bee honey, mixed essential oils, and other ingredients in a ratio of 20:2:78, was identified as the optimal formulation. It exhibited the following physical characteristics: a liquid form, yellow-brown color, distinct scent, slightly sweet and bitter taste, and a pH of 6.73. Stability tests, both short-term and long-term, revealed that the color, taste, presence of precipitates, and signs of adulteration were unchanged, with only a slight (non-significant) pH variation. Additionally, the S4 formula was found to be non-toxic to human dermal fibroblasts at concentrations below 6.25 mg/mL, with an IC_{50} value of 14.97 mg/mL. Therefore, the S4 formulation and manufacturing process have the potential to be transferred to entrepreneurs for future commercial use.

Keywords: Spray; Stingless bee honey; Extraction of essential oils; Antibacterial effect

1. บทนำ

พื้นที่ภาคใต้เป็นพื้นที่ที่อุดมสมบูรณ์และหลากหลายในแง่พืชพันธุ์สมุนไพร มีการปลูกพืชสมุนไพร มะกรูด (*Citrus hystrix*) ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf.) และมะนาว (*Citrus auratigolia* Swing.) กันอย่างแพร่หลายและมีทุกครัวเรือน จึงเหมาะแก่การนำสมุนไพรเหล่านี้มาเป็นวัตถุดิบหลักในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย การกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากใบมะกรูด ต้นตะไคร้ และเปลือกมะนาว ที่นิยมใช้กันจะเป็นการกลั่นด้วยน้ำ และการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ เป็นวิธีการกลั่นที่นิยมอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ซึ่งระบบการกลั่นมีความซับซ้อนที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการกลั่นด้วยวิธีอื่น ๆ [1] ปัจจุบันมีแนวโน้มการนำสมุนไพรมาใช้รักษามากขึ้นในประเทศไทย ซึ่งสมุนไพรบางชนิดมีน้ำมันหอมระเหยเป็นองค์ประกอบ ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อผิวหนัง ฤทธิ์ต้านจุลชีพต่าง ๆ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยชนิดนั้นได้ [2] น้ำมันหอมระเหยเป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้นมักมีกลิ่นหอมและระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิห้องสามารถสกัดได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ผล ดอก ใบ เปลือก และเมล็ด เป็นต้น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและมีสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด มีงานวิจัยหลายเรื่องที่แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ [3] และยังสามารถใช้ในการถนอมอาหารได้อีกด้วย นอกจากนี้มีรายงานว่า การเติมน้ำมันหอมระเหยจากพืชลงในอาหารจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือต้านจุลินทรีย์ได้ [4] จากข้อมูลงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า ใบมะกรูด มีสรรพคุณแก้อาการไอ ขับเสมหะ โดยน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Streptococcus aureus* [5] ต้นตะไคร้ มีการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอมในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* *Staphylococcus agalactiae* และ *Escherichia coli* ซึ่งพบว่าน้ำมัน

หอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอมสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ได้ดี [6] และยังพบสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ Citronella, Geraniol และ Citronello สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* [7] และสามารถยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม Dermatophytes อาทิเช่น เชื้อ *Microsporum canis* และ *Trichophyton mentagrophytes* [8] และมะนาวเป็นไม้ผลมีรสเปรี้ยวจัด มีสรรพคุณแก้อาการเจ็บคอ ไอ รวมทั้งเป็นยาบำรุงผิวจัดอยู่ในไม้ผลตระกูลส้ม (*Citrus*) ผลสีเขียวจากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าพืชในตระกูล *Citrus* ได้แก่ มะนาว มะกรูด มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกให้ดี โดยเฉพาะ *S. aureus* และบางงานวิจัยยังพบว่า ยับยั้ง Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ซึ่งเป็น *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา Methicillin จัดเป็นยาในกลุ่ม B-lactam antibiotics [9] และน้ำผึ้งชันโรง (Stingless Bee Honey) สายพันธุ์ *Heterotrigona itama* เป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก ซึ่งน้ำผึ้งชันโรงจัดเป็นผลผลิตมาจากจำพวกผึ้งชันโรงขนาดเล็ก แต่ไม่มีเหล็กในเหมือนผึ้งและมีวิวัฒนาการสูงกว่าผึ้งป่าและผึ้ง sting นอกจากนี้ผึ้งชันโรงจะช่วยผสมเกสรพืชได้หลายชนิดแล้ว น้ำผึ้งและเกสรของผึ้งชันโรงยังมีราคาแพงกว่าน้ำผึ้งทั่วไป เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูงกว่า แหล่งในการเก็บน้ำผึ้งชันโรงหายากและมีปริมาณน้ำผึ้งน้อย น้ำผึ้งชันโรงประกอบด้วยสารสำคัญหลากหลายชนิด ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน วิตามิน และเกลือแร่ และยังมีส่วนประกอบของสารฟลักซ์เคมี เช่น สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ เป็นต้น [10] ซึ่งสารฟลักซ์เคมีเหล่านี้มีส่วนช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโทษต่อระบบทางเดินหายใจ เพื่อสมานแผลไฟไหม้ มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ [11] ช่วยชะลอความเสื่อมของเซลล์ รักษาแผลในระบบทางเดินหายใจ และยังพบวิตามินที่มีประโยชน์มากมายหลายชนิด ช่วยให้ผิวพรรณชุ่มชื้น ยับยั้งการเจริญเติบโตที่ผิดปกติในร่างกาย น้ำผึ้งชันโรงมีสรรพคุณทางยาสูงกว่าน้ำผึ้งทั่วไปถึง 2 เท่า ซึ่งในปัจจุบัน

มีการนำน้ำผึ้งชันโรงมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ [12]

ในปัจจุบันสมุนไพรได้นำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ยาอม ยาต้ม ยาหม่อง แผ่นเจล และสเปรย์ เป็นต้น สเปรย์พ่นคอ (Throat spray) จัดเป็นยาเตรียมประเภทของเหลวซึ่งเป็นยาที่มีลักษณะเป็นน้ำหรือของเหลวในรูปแบบต่าง ๆ เป็นผลิตภัณฑ์ที่น่าสนใจอีกรูปแบบหนึ่งที่ไว้ใช้บรรเทาอาการต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับส่วนผสมในสเปรย์กับการใช้สารสกัดจากธรรมชาติหรือสมุนไพรต่าง ๆ [13] นอกจากนี้ข้อดีของสเปรย์ คือ มีบรรจุภัณฑ์รูปทรงแบบขวดสเปรย์ที่มีขนาดเล็กกะทัดรัด พกพาได้สะดวก ทำให้หยิบจับใช้ฉีดพ่นในช่องปาก ลำคอได้ง่าย และเมื่อพ่นตัวยาจะกระจายไปทั่วบริเวณที่มีอาการ

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาตำรับ ศึกษาลักษณะทางกายภาพ ทดสอบความคงตัว ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* *S. pyrogens* และ *S. pneumonia* และทดสอบความเป็นพิษของตำรับ เพื่อนำมาพัฒนาตำรับและผลิตภัณฑ์ชนิดฉีดพ่นคอในเชิงพาณิชย์ โดยใช้สารสกัดจากสมุนไพรจากธรรมชาติให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการศึกษาต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 วัตถุดิบหรือสารสำคัญ

น้ำผึ้งชันโรงได้จากผึ้งชันโรงสายพันธุ์ *Heterotrigona itama* เป็นผึ้งเฉพาะถิ่น จากสวนผึ้ง ปันแต อำเภอกวนขนุน จังหวัดพัทลุง ซึ่งเป็นน้ำผึ้งชันโรงที่มีการเลี้ยงแบบควบคุมสายพันธุ์และมีรอบของการเก็บน้ำผึ้งที่ได้รับการควบคุม สมุนไพร 3 ชนิด คือ เปลือกมะนาว ใบมะกรูด ต้นตะไคร้ ได้จากกลุ่มแม่บ้านในชุมชนนาโหนด อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง และน้ำต้มสุก

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหยจาก J.S.D. MACHINERY LIMITED PARTNERSHIP ถึงตมขนาด 25 ลิตร ตะแกรงใส่วัตถุดิบ ปีกเกอร์ขนาด 250 mL

(Beaker 250 mL) หลอดทดลองขนาดเล็ก (Test tube) หลอดหยด (Medicine dropper) ปิเปต (Pipette) เม็ดลูกแก้ว (Glass bead) ที่เก็บน้ำมันระเหย (Glass vial) หลอดน้ำแก๊ส มีด เขียง ขวดเก็บสารตัวอย่าง จุกยางสีดำ สองรู และหนึ่งรู ขวดกั้นแบนขนาด 500 mL ขวดกั้นแบนขนาด 250 mL กระบอกตวง เตาให้ความร้อน เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ขวดโหล ถาดรองสมุนไพร พาราฟิล์ม

2.3 วิธีการการสกัดน้ำมันหอมระเหย ทั้ง 3 ชนิด

การสกัดน้ำมันหอมระเหยสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด คือ เปลือกมะนาว ใบมะกรูด และต้นตะไคร้ จะสกัดด้วยวิธีเดียวกัน สกัดแยกแต่ละชนิด โดยใช้เครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหย ดังนี้ 1) ล้างทำความสะอาดสมุนไพร แล้วล้างให้แห้ง หั่นสมุนไพรเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปบด ชั่งน้ำหนัก แล้วจัดบันทึกไว้ 2) เติมน้ำสะอาดลงในเครื่องกลั่นสูงกว่าส่วนของก้นหม้อประมาณ 1 นิ้ว หรือปริมาณก้นตะแกรง จากนั้นนำวัตถุดิบใส่ในตะแกรง พร้อมปิดฝาให้เรียบร้อย 3) เปิดสวิตช์ทำความร้อน ให้ได้อุณหภูมิ 90-100 °C แล้วเปิดสวิตช์ปั้มน้ำหล่อเย็นเพื่อเอาน้ำเย็นเข้าไปเลี้ยงคอนเดนเซอร์ให้เย็น จะมีน้ำและน้ำมันหอมระเหยออกมาพร้อมกัน รอให้เกิดการแยกชั้นของน้ำมันกับน้ำ และทยอยเปิดเอาน้ำมันออกจากหลอดแก้ว เมื่อน้ำในหลอดแก้วมีปริมาณมาก สามารถเปิดวาล์วเพื่อให้น้ำไหลลงถังกลั่น เพื่อจะไม่ให้น้ำแห้ง 4) เมื่อกลั่นหมดแล้ว ให้ปิดสวิตช์ทั้ง 2 อัน (สวิตช์ทำความร้อน และสวิตช์น้ำหล่อเย็น) และปิดวาล์วน้ำเย็นเข้าคอนเดนเซอร์ และเปิดวาล์ว 1/2 ด้านบน-ลงให้หมด เพื่อเอาน้ำที่อยู่ในคอนเดนเซอร์ออกให้หมด แล้วเปิดฝาเพื่อเอาวัตถุดิบที่กลั่นหมดแล้วออก เมื่อคำนวณ % yield ของใบมะกรูด ต้นตะไคร้ และเปลือกมะนาว เท่ากับ 0.37 0.23 0.32 ตามลำดับ 5) เก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ในภาชนะที่บดแสงหรือเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยเสร็จ นำสารสกัดน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด มาผสมกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน คือ 1:1:1

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้งชันโรง และน้ำมันหอมระเหย

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อและฆ่าเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC25923 *S. pneumoniae* ATCC44164 และ *S. pyogenes clinical isolate* ของน้ำผึ้งชันโรง และน้ำมันหอมระเหย โดยใช้วิธี Broth dilution method เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อ (Minimum inhibitory concentration; MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อ (Minimum bactericidal concentration; MBC) โดยเจือจางความเข้มข้นของสารกับ Mueller-Hinton broth (MHB) ด้วยวิธี Two fold dilution ในช่วงความเข้มข้น 0.10-50 %v/v ดังแสดง

ใน Table 1 ปรับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 (ประมาณ 10^8 CFU/mL) ใส่ในภาชนะเลี้ยงโดยใช้ microtiter plate ขนาด 96 หลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วทำการอ่านผล โดยค่า MIC สังเกตได้จากแถวสุดท้ายที่ไม่มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหรืออาหารเลี้ยงเชื้อไม่ขุ่น จากนั้นนำไปหาค่า MBC โดยนำความเข้มข้นที่ได้จากค่า MIC มาเกลี่ยลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการแบ่งช่องสำหรับแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ) และบันทึกผลค่า MBC [14]

Table 1 Two-fold dilution and concentration of essential oils

Well number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ratio	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1,024
%v/v	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	0.10

2.5 การพัฒนาตำรับสเปรย์พ่นคอ

การพัฒนาตำรับด้วยวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย 5 ตำรับ มีส่วนประกอบ น้ำผึ้งชันโรง น้ำมันหอม

ระเหย (เปลือกมะนาว ใบมะกรูด ต้นตะไคร้) 95% Ethyl alcohol Menthol Sodium Benzoate Poloxamer 407 และน้ำต้มสุก %v/v ดังแสดงใน Table 2

Table 2 Components of the throat spray recipe

Ingredients	Formulations					Uses in the formulation
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
Stingless bee honey (mL)	4	4	4	4	4	Active Ingredient
Essential oils 3 types (mL)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	Active Ingredient
95% Ethyl alcohol (mL)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	Co-solvent
Menthol (g)	0.08	0.1	0.12	0.08	0.08	Flavoring Agent
Sodium benzoate (g)	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	Preservative
Poloxamer 407 (g)	-	-	-	0.02	0.03	Solubilizer
Boiled water qs to (mL)	20	20	20	20	20	Vehicle

เมื่อพัฒนาทั้ง 5 ตำรับ จะนำมาทดสอบว่าเป็นของเหลวเนื้อเดียวกัน ไม่มีสิ่งแปลกปลอม มีสีดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ และไม่มีกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นอับ กลิ่นหืน กลิ่นบูด การทดสอบทำได้โดยการตรวจพินิจและดม โดยคัดเลือกตำรับที่ดีที่สุด 1 ตำรับ มาทำการทดลองถัดไป

2.6 การศึกษาลักษณะทางกายภาพ เรื่อง สี กลิ่น รส สิ่งแปลกปลอม

ศึกษาลักษณะทางกายภาพ โดย สังเกต สี กลิ่น รส สิ่งแปลกปลอมของตำรับสเปรย์พ่นคอ และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นการทดสอบเบื้องต้น

2.7 การทดสอบความคงตัว

การทดสอบความคงตัวของสเปรย์พ่นคอ มีความสำคัญเนื่องจากการเป็นการทดสอบคุณสมบัติ ให้คงคุณภาพตลอดอายุการใช้งาน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ เช่น สี รส สิ่งแปลกปลอม และวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตำรับสเปรย์พ่นคอ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่คุณภาพ และปลอดภัยสูงสุด

2.7.1 ประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์วิธีที่ 1 (ระยะสั้น)

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ไม่เคยเปิดฝาภาชนะบรรจุมาก่อนที่อุณหภูมิ $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำเช่นนี้สลับกันจนครบ 4 ครั้ง นำมาวางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบลักษณะทั่วไป เปรียบเทียบกับสภาพเดิมของผลิตภัณฑ์และวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 5.5-8.0 [14] โดยคัดเลือกสูตรที่ดีที่สุด คือ สูตร S4 มา 15 mL ใส่ในขวดแก้ว ทั้ง 3 ขวดปิดฝาให้สนิท พันด้วยพาราฟิล์มพร้อมห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นนำไปตั้งในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำไปตั้งในตู้อบอุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 1 วัน นับเป็น 1 Cycle ทำจนครบ 4 Cycles เมื่อครบแต่ละ Cycles

สังเกตสี รส การตกตะกอน สิ่งแปลกปลอมและวัดค่า pH [15]

2.7.2 ประเมินความคงตัวของผลิตภัณฑ์วิธีที่ 2 (การศึกษาความคงตัวระยะยาวเบื้องต้น)

ดูความคงสภาพของสี กลิ่น รส ความชื้นเหลว และการจับตัวเป็นก้อนต้องอยู่ในสภาพที่ดี ไม่แปรสภาพระยะเวลาทดสอบ 4 เดือน เปรียบเทียบกับสภาพเดิมของผลิตภัณฑ์และวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 5.5-8.0 [15,16] โดยมีการเก็บผลิตภัณฑ์เพื่อศึกษา 1) ผลของแสงต่อผลิตภัณฑ์ โดยเก็บไว้ใต้แสงและในขวดทึบห่อฟอยล์มิดชิด ที่อุณหภูมิห้อง 2) ผลของอุณหภูมิต่อผลิตภัณฑ์ โดยเก็บไว้ในขวดทึบแสง อุณหภูมิ 4°C และที่อุณหภูมิห้อง 3) ผลของสภาวะเร่งต่อผลิตภัณฑ์ โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45°C

2.8 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังชนิด Human Dermal Fibroblasts (HDF) โดยวิธี MTT assay โดยประยุกต์ใช้ ตามมาตรฐาน ISO 10993-5 [17] ซึ่งได้ดำเนินการทดลองดังนี้ บ่มเซลล์ HDF ปริมาณ 10,000 cells/well ลงใน 96 well/plate ด้วยอาหาร DMEM ที่มี 1% FBS และ 1% Penicillin/Streptomycin ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในตู้ CO_2 incubator ที่มี 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 37°C

เตรียมสารสกัดตำรับ S4 ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยเจือจางลงในอาหาร DMEM และเติมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น 100 μL ลงในแต่ละหลุม จากนั้นทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงเติมสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL หลุมละ 100 μL บ่มในที่มืด 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูด Supernatant ทิ้ง และละลายตะกอนสีที่เกิดขึ้นด้วย DMSO 100 μL

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm
คำนวณหา % Cell viability จากสูตรสมการที่ 1

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{Absorbance of treated cell} \times 100}{\text{Absorbance of control cell}} \quad (1)$$

การทดสอบค่าทางสถิติเชิงเปรียบเทียบโดยใช้
สถิติ T-test ที่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ
($p < 0.05$, $**p < 0.01$ และ $***p < 0.001$)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้ง ชันโรงและน้ำมันหอมระเหย

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้ง
ชันโรงและน้ำมันหอมระเหย พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ
แบคทีเรียเชื้อ *S. aureus* *S. pyrogens* และ *S.*
pneumonia ได้ พบว่าน้ำผึ้งชันโรงมีค่า MIC และค่า
MBC ต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* *S. pyrogens* และ *S.*
pneumonia มีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.56-3.13
%v/v และน้ำมันหอมระเหยที่ผสมกันทั้ง 3 ชนิดพบว่ามี
ค่าความเข้มข้น 0.10 %v/v ดังแสดงใน Table 3

Table 3 Antimicrobial activity (MIC/MBC) of pure essential oil

Sample	Bacteria					
	<i>S. aureus</i>		<i>S. pyrogens</i>		<i>S. pneumonia</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Stingless bee honey	3.13	3.13	1.56	1.56	1.56	3.13
Essential oils 3 types (% v/v)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Vancomycin (µg/mL)	0.50	0.50	1	4	1	1

จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า มะกรูด
(*Citrus hystrix*) ทั้งผลและใบมีกลิ่นหอม มีสรรพคุณ แก่
อาการไอ ขับเสมหะ โดยน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด
มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* และยัง
สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* [5] ตะไคร้
(*Cymbopogon citratus* Stapf.) ที่มีกลิ่นหอม มีการ
ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ใน
การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีการรายงานค่า MIC
เท่ากับ 3.13 µg/mL และ MBC เท่ากับ 6.25 µg/mL
และเชื้อ *S. agalactiae* *E. coli* พบว่าน้ำมันหอมระเหย
จากตะไคร้สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *S. aureus*
ได้ดี ซึ่งผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อและยับยั้งเชื้อ
แบคทีเรียของผู้วิจัยพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้
สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีค่า MIC เท่ากับ 0.10
และ MBC เท่ากับ 0.10 %v/v ได้ดีกว่า [6] และมะนาว

(*Citrus auratigolia* Swing.) มะนาวเป็นไม้ผลมีรส
เปรี้ยวจัด มีสรรพคุณแก้อาการเจ็บคอ ไอ รวมทั้งเป็นยา
บำรุงผิว จากงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าพืชในตระกูล Citrus
ได้แก่ มะนาว มะกรูด มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก
ได้ดี โดยเฉพาะ *S. aureus* และบางงานวิจัยยังพบว่า
ยับยั้ง Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ซึ่ง
เป็น *S. aureus* ที่ดื้อต่อยา Methicillin จัดเป็นยาใน
กลุ่ม B-lactam antibiotics [9] มีรายงานถึง
ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสาร
สกัดจากเปลือกและเมล็ดของพืชตระกูลส้ม [18] พบว่า
ในน้ำมันหอมระเหยของมะนาว ส้มเขียวหวาน และ
มะกรูด มีสารประกอบของ Linalool และ Citral ซึ่งสาร
ดังกล่าวมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus*
cereus และ *S. aureus* เป็นต้น นอกจากนี้ น้ำมันหอม
ระเหยยังได้รับการพิจารณาจากองค์การอาหารและยา

(FDA) ว่าสามารถใช้เติมลงไปในการอาหารได้อย่างปลอดภัย Generally recognized as safe; (GRAS) [19] และพบว่า น้ำมันหอมระเหยที่ผสมกันทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* *S. pyrogens* และ *S. pneumonia* ได้ดีเช่นกัน

3.2 ผลการพัฒนาตำรับสเปรย์พ่นคอ

การพัฒนาตำรับสเปรย์พ่นคอ ด้วยวิธีการสกัด 5 ตำรับ ผลการพัฒนาตำรับสเปรย์พ่นคอสำหรับยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 สูตรตำรับ พบว่า สเปรย์พ่นคอที่มีคุณภาพดีที่สุด คือสูตร S4 ซึ่งประกอบด้วย น้ำผึ้งชันโรง 4 mL น้ำมันหอมระเหย (เปลือกมะนาว ใบมะกรูด ต้นตะไคร้) 0.4 mL 95% Ethyl alcohol 0.4 mL Menthol 0.08 g Sodium benzoate 0.004 g Poloxamer 407 0.02 g และน้ำต้มสุก qs to 20 mL อาจเนื่องจากมี Poloxamer เป็นส่วนประกอบในตำรับ ซึ่งองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้เสนอให้ Poloxamer เป็น Inactive ingredient ในการตั้งตำรับเภสัชภัณฑ์ ยังช่วยเพิ่มค่าการละลายตัวและเพิ่มความคงตัว เมื่อได้สูตรตำรับที่ดีที่สุดแล้วนำไปศึกษาลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ สี รส และสิ่งแปลกปลอม เป็นต้น โดยนำสูตร S4 ไปทดสอบความคงตัวของสูตรตำรับและทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ต่อไป [20]

3.3 ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพ

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพ พบว่าสูตรตำรับ S4 มีสีเหลืองน้ำตาล กลิ่นหอมเฉพาะ รสขมหวานเล็กน้อยและจะหายไปอย่างรวดเร็วเหลือแค่ความสดชื่น ไม่มีสิ่งแปลกปลอม อาจเนื่องจากในสูตรตำรับ S4 มีส่วนประกอบของ Poloxamer ที่องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้เสนอให้ Poloxamer เป็น Inactive ingredient ในการตั้งตำรับเภสัชภัณฑ์ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มค่าการละลายตัวและเพิ่มความคงตัว ซึ่งเป็นผลการทดสอบเบื้องต้น ดังนั้น สูตรตำรับ S4 มีการละลายตัวเพิ่มความคงสภาพ และเกิดการแยกชั้นกันได้ยากขึ้น [20]

3.4 การทดสอบความคงตัวของตำรับสเปรย์พ่นคอ

3.4.1 ผลการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์วิธีที่ 1 (ระยะสั้น)

การทดสอบความคงตัวของสเปรย์พ่นคอ ด้วยการนำสูตรตำรับ S4 ใส่ในขวดแก้วทั้ง 3 ขวด มาทดสอบในสภาวะเร่งทั้งหมด 4 Cycles พบว่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย สี รส และสิ่งแปลกปลอมไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ดังแสดงใน Table 4 และ Figure 1

Table 4 Short-term stability study

Stability Test	pH measure (Mean $\pm$ SD)	Color	Flavor	Adulteration
Before the test	6.74 $\pm$ 0.02	Yellow brown	Slightly sweet and bitter	×
Cycles 1	6.26 $\pm$ 0.04	Yellow	Slightly sweet and bitter	×
Cycles 2	6.24 $\pm$ 0.03	Yellow	Slightly sweet and bitter	×
Cycles 3	5.99 $\pm$ 0.04	Yellow	Slightly sweet and bitter	×
Cycles 4	6.21 $\pm$ 0.02	Yellow	Slightly sweet and bitter	×

Adulteration ✓ = Yes

× = No

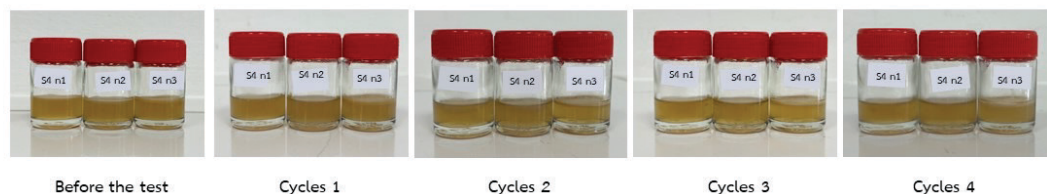


Figure 1 Short-term stability study

จากการทดสอบความคงตัวของตำรับสเปรย์พ่นคอในสภาวะเร่งแบบระยะสั้นของสูตรตำรับ S4 ซึ่งมีการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ในสภาวะควบคุมที่สามารถเร่งการเสื่อมสภาพของผลิตภัณฑ์ได้ เช่น อยู่ในอุณหภูมิสูงกว่าปกติ หรืออุณหภูมิต่ำกว่าปกติ ทำสลับกันจนครบ 4 รอบ 24 ชั่วโมง โดยพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านสี รส สิ่งแปลกปลอม แต่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เล็กน้อยอย่างไม่เป็นนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} > 0.05$)

3.4.2 ผลการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์วิธีที่ 2 (การศึกษาความคงตัวระยะยาวเบื้องต้น)

จากการทดสอบความคงตัวของสเปรย์พ่นคอระยะยาว โดยวัดค่า pH สี รส และสิ่งแปลกปลอม ระยะ

เวลาทดสอบ 4 เดือน เปรียบเทียบกับสภาพเดิมของผลิตภัณฑ์และวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 5.5-8.0 [15] ได้นำสูตรตำรับที่ดีที่สุดนำมาทดสอบผลของแสงต่อผลิตภัณฑ์ ได้แก่ 1) เก็บยาไว้ได้แสง อุณหภูมิห้อง และเก็บยาไว้พ้นแสงในขวดทึบห่อฟอยล์มิดชิดอุณหภูมิห้อง พบว่ามีค่า pH เท่ากับ 5.23 และ 5.91 ตามลำดับ มีสีน้ำตาลเหลือง รสขมหวานสดชื่น และไม่มีสิ่งแปลกปลอม 2) ผลต่อผลิตภัณฑ์ต่ออุณหภูมิ เก็บยาในขวดทึบแสง อุณหภูมิ 4 °C และเก็บยาในขวดทึบแสงที่อุณหภูมิห้อง พบว่า สูตรตำรับ S4 มีค่า pH เท่ากับ 5.40 และ 5.89 ตามลำดับ มีสีน้ำตาลเหลือง รสขมหวานสดชื่น ไม่มีการตะกอนและสิ่งแปลกปลอม ดังแสดงใน Table 5 และ Figure 2 แต่จำเป็นต้องมีการศึกษาความคงตัวอีกในระยะต่อไปตามเกณฑ์ Asean stability guideline on drug product

Table 5 Long-term stability study

Accelerated Stability Test	pH	Color	Flavor	Adulteration
1) Effect of light on the product				
Keep the medicine under light at room temperature	5.23	Yellow brown	Slightly sweet and bitter	×
Keep away from light in light resistant bottle, wrapped in foil, at room temperature	5.91	Yellow brown	Slightly sweet and bitter	×
2) Effect of temperature on the product				
Store in an opaque bottle at 4 °C	5.40	Yellow brown	Slightly sweet and bitter	×
Store in an opaque bottle at room temperature	5.89	Yellow brown	Slightly sweet and bitter	×

Adulteration ✓ = Yes

×

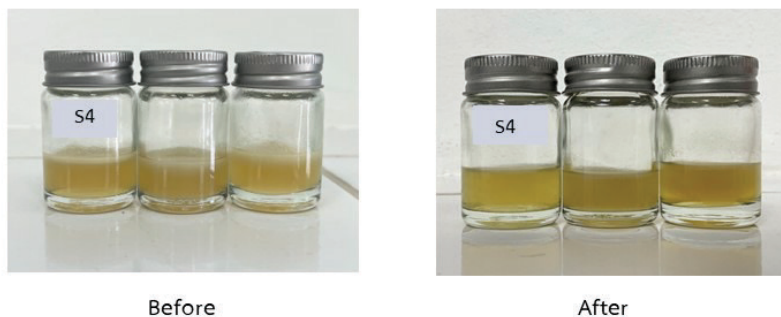


Figure 2 Long-term stability study

3.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังชนิด HDF ของสูตรตำรับ S4 โดยวิธี MTT assay ที่ความเข้มข้น 0.39 - 100 mg/mL พบว่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ คือ < 6.25 mg/mL และค่า $IC_{50} = 14.97$ mg/mL เมื่อเปรียบเทียบกับชุดตัวอย่างควบคุม (Control) พบว่า การทดสอบความเป็นพิษของสูตรตำรับ S4 ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง

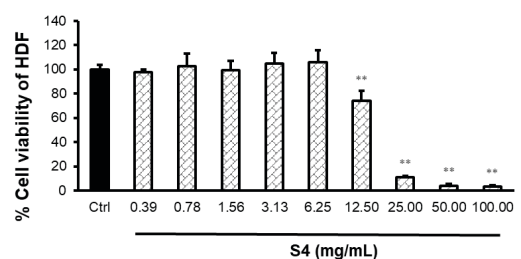


Figure 3 Cytotoxicity test of S4, at significant value (**p < 0.01)

4. สรุป

จากผลการวิจัย พบว่าการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำผึ้งชันโรงและน้ำมันหอมระเหย สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเชื้อ *S. aureus* *S. pyrogens* และ *S. pneumonia* ได้ พบว่าน้ำผึ้งชันโรงมีค่า MIC และ MBC มีค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1.56-3.13 %v/v และน้ำมันหอมระเหยที่ผสมกันทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีค่าความ

เข้มข้น 0.10 %v/v การพัฒนาตำรับสเปรย์พ่นคอที่มีคุณภาพดีที่สุด คือสูตร S4 ซึ่งประกอบด้วย น้ำผึ้งชันโรง น้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด และส่วนประกอบอื่น ๆ ในอัตราส่วนร้อยละ 20 : 2 : 78 มีลักษณะทางกายภาพเป็นของเหลว สีเหลืองน้ำตาล กลิ่นหอมเฉพาะ รสขมหวานเล็กน้อย ผลจากการทดสอบความคงตัวในระยะสั้นโดยนำสูตรตำรับ S4 ใส่ในขวดแก้วทั้ง 3 ขวด เมื่อนำมาประเมินความคงสภาพในสภาวะเร่ง 4 Cycles และในระยะเวลา 3 เดือน พบว่าสูตรตำรับ S4 มีความคงสภาพทั้งสี รส การตกตะกอน และสิ่งแปลกปลอม แต่ pH มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอย่างไม่เป็นสำคัญ นอกจากนี้ ผลจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังชนิด HDF ของสูตรตำรับ S4 โดยวิธี MTT assay พบว่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ คือ < 6.25 mg/mL และค่า $IC_{50} = 14.97$ mg/mL การทดสอบครั้งนี้เป็นการทดสอบเซลล์ผิวหนังชนิด HDF ยังมีความจำเป็นต้องศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อช่องปากและลำคอ ซึ่งสามารถนำผลการวิจัยครั้งนี้ไปใช้เป็นข้อมูลในการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ สามารถนำสูตรและกรรมวิธีการผลิตตำรับที่ผ่านการทดสอบทางคลินิกถ่ายทอดให้กับผู้ประกอบการได้ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาการสุขภาพและการกีฬามหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุงที่สนับสนุนทุนการทำวิจัยและอำนวยความสะดวก และเอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการต่าง ๆ และขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำจนกระทั่งงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

6. References

- [1] Aziz, Z. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M.A. and Ashraf, G. M. 2018. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. *Curr. Drug Metab.* 19(13): 1100-1110.
- [2] Suwanpugdee, A., Saisornthip, R. and Sutthimusik, S., 2012, The inhibitory efficiency of the essential oil from lemon grass and citronella grass on the growth of bovine mastitis pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*, *Khon Kaen Agr. J.* 40(1): 230- 235. (in Thai)
- [3] Chouhan, S., Kanika, S. and Sanjay, G., 2017, Review: Antimicrobial Activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines.* 4(3): 1-21.
- [4] Maurya, A., Prasad, J., Das, S. and Dwivedy, A., 2021, Essential oil and their application in food safety, *SUSTAIN FOOD S.* 5(5): 1-25.
- [5] Maiman, K., Phuengthat, S., Sakulsaowaphakkul, N., Maiman, K., Nateesinsap, K. and Bunrerk. P., 2021, Comparison of efficiency in inhibiting the growth of Bacteria *Staphylococcus aureus* of Kaffir lime leaf Essential oil Gotu kola and Lemongrass, *Suan Sunandha Meeting 10th National & International Conference* (p 43-52) Suan Sunandha University. (in Thai)
- [6] Ekpenyong, C. E., Akpan, E., and Nyoh, A., 2015 Ethno-pharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts, *Chin J Nat Med.* 13(5): 0321-37.
- [7] Oliveira, W. A. D., Pereira, F. D. O., Luna, G. C. D. G. D., Lima, I. O., Wanderley, P. A., Lima, R. B. D., and Lima, E. D. O., 2011, Antifungal Activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor Against *Candida albicans*. *Brazilian Journal of Microbiology.* 42(2): 433-441.
- [8] Capoci, I. R. G., Cunha, M. M. D., Bonfim-Mendonca, P. D. S., Ghiraldi-Lopes, L. D., Baeza, L. C., Kioshima, E. S., and Svidzinski, T. I. E., 2015, Antifungal activity of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (citronella) against *Microsporum canis* from animals and home environment, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 57(6): 509-11.

- [9] Monatrakul S.P., 2021, Antibacterial activities of essential oils from plants in Citrus spp. Against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Research Report, Rangsit University, Pathum Thani, 75 p. (in Thai)
- [10] Maringgal, B., Hashim, N., Tawakkal, I. S. M. A., Mohamed, M. T. M., and Shukor, N. I. A., 2019, Phytochemical compositions and antioxidant activities of Malaysian stingless bee honey, *Pertanika J. Sci. & Technol.* 27(S1): 15-28.
- [11] Psrikoon, P., 2020, Determination of pharmacological activity of honey from stingless bees, Research Reports, Burapha University, Pathum Thani, 59 p. (in Thai)
- [12] Bamrungwet. N., 2019, Stingless bee honey, a little bee, Miracle of Millions It is beneficial to farmers. Helps with pollination and fruiting very well, Available Source: https://www.technologychaoban.com/bullet-news-today/article_92314. (in Thai)
- [13] Haamor, 2015, Pharmaceutical Dosage Forms, Available Source: <https://haamor.com/%E0%B8%A3%E0%B8%B9%E0%B8%B9%E0%B9%81%E0%B8%9A%E0%B8%9A%E0%B8%A2%E0%B8%B2%E0%B9%80%E0%B8%95%E0%B8%A3%E0%B8%B>, June 23, 2024. (in Thai)
- [14] The Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI, 2012, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [15] Thai Industrial Standards Institute, 2017, Herbal Breath Freshener, Available Source: <https://www.tisi.go.th/service/en>, February 27, 2024. (in Thai)
- [16] Chittarattha, S., 2018, Drug stability, Center for Continuing Pharmacy Education, Pharmacy Council, Faculty of Pharmacy Siam University. (in Thai)
- [17] ISO 10993-5: 2009, Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity; German version EN ISO 10993-5:2009.
- [18] Fisher, K. and C. Phillips., 2006, The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of campylobacter jejuni, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J. Appl. Microbiol.* 101(6): 1232-1240.
- [19] Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y., and Zeng, B., 2008, *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new *Citrus* cultivar and its main flavonoids. *Food. Sci. Technol. Int.* 41(4): 597-603.
- [20] Chaemsawang, W., 2020, Development nano-carrier containing furazolidone for delivery to cancer cells, Research Report, Burapha University, Chon Buri, 55 p. (in Thai)