ฤทธิ์กันเสียของฝาง(*Caesalpinia sappan* L.)ใน ผลิตภัณฑ์อาหารประเภทน้ำพริก

นางสาว นฤพร สุทธิสวัสดิ์
นางสาว ศุทธินี ธไนศวรรยางกูร

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2549

Antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan L.* as preservative in Chilli-paste

MISS NARUEPORN SUTTHISAWAD
MISS SUTHINEE THANISAWANYANGKURA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFLIMENT
OF THE REQUIREMENT FOR
THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY
FACULTY OF PHARMACY
MAHIDOL UNIVERSITY

โตรงการพิเศษ

เรื่อง ฤทธิ์กันเสียของฝาง(*Caesalpinia sappan* L.)ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทน้ำพริก

.....

(นางสาว นฤพร สุทธิสวัสดิ์)

.....

(นางสาว ศุทธินี ธไนศวรรยางกูร)

.....

(รศ.ดร.มล. สุมาลย์ สาระยา)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....

(รศ. รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ปีการศึกษา 2549 **โครงการที่ 1**

ฤทธิ์กันเสียของฝาง(*Caesalpinia sappan* L.)ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทน้ำพริก

นฤพร สุทธิสวัสดิ์, ศุทธินี ธไนศวรรยางกูร

อาจารย์ที่ปรึกษา : สุมาลย์ สาระยา* , รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล**

* ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

** ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ : ฝาง, Brazilin, Haematoxylin

อุตสาหกรรมผลิตอาหารกึ่งสำเร็จรูปในปัจจุบันมีการใช้สารกันเสียประเภทสารเคมีเพื่อชะลอการบูดเสียของผลิตภัณฑ์มากขึ้น ซึ่งสารเคมีดังกล่าวอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค หากได้รับเกินปริมาณที่กำหนดและในระยะเวลาต่อเนื่องกัน จึงได้มีการค้นคว้าเพื่อหาสารที่ปลอดภัยมาใช้ทดแทน จากการศึกษาวิจัยพบว่าฝางเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค พบว่ามีสารสำคัญอยู่ 2 ชนิดคือ Brazilin และ Haematoxylin การศึกษานี้เป็นการประเมินผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพชนิดต่างๆของสารสกัดของฝาง โดยทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต (MIC) ของ *Caesalpinia sappan* L., Brazilin และ Haematoxylin ต่อเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ *S.aureus* ATCC 6538 , *E.coli* ATCC 2592, *S.typhimurium* ATCC 13311 ซึ่งได้ค่า MIC ดังนี้ 125, 250, 250 และ 250, 500, 1000 และ 62.5, 125, 250 ตามลำดับ สำหรับ *C.albicans* ATCC 10231 ไม่สามารถสังเกตผลได้ และได้นำผลการทดลองไปประยุกต์ใช้กันเสียในน้ำพริกโดยใช้สารสกัดของฝางในปริมาณที่แตกต่างกันและตรวจสอบฤทธิ์กันเสียด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาทุก 1 เดือนเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าสารสกัดของฝางสามารถลดปริมาณของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ การวิเคราะห์ส่วนประกอบและปริมาณของสารสำคัญของสารสกัดของฝางโดยวิธี Thin Layer Chormatography (TLC) และ spectrophotometry พบสาร Brazilin แต่ไม่สามารถตรวจพบ Haematoxylin ได้เนื่องมาจากอาจมีปริมาณที่ต่ำเกินไป

ผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่า ฝางสามารถใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารกึ่งสำเร็จรูปได้อย่างมีประสิทธิภาพ และควรมีการศึกษาเรื่องส่วนประกอบและปริมาณของสารสำคัญในการออกฤทธิ์โดยวิธีทางเคมีอย่างละเอียดต่อไป

Academic year 2006 project 1

Antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan L.* as preservative in Chilli-paste

Narueporn Sutthisawad, Suthinee Thanaisawanyangkura

Project advisor: Sumarn Saraya*, Rungravee Temsiriruekkul**

* Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

**Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword: *Caesalpinia sappan* L., Brazilin , Haematoxylin

In food industry, chemical agents have been used to preserve food from spoilage caused by microorganisms. These agents may cause danger to the consumers after taking for a long period or overamount use. To avoid the risk, the natural agents have been used instead of these chemicals. In this project, the antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* L. which composed of two major components, Brazilin and Haematoxylin was studied. The minimum inhibitory concentration (MIC) of *Caesalpinia sappan* L., Brazilin and Haematoxylin against *S.aureus* ATCC 6538 ,*E.coli* ATCC 25922, *S.typhimurium* ATCC 13311 were 125, 250, 250 and 250, 500, 500 and 62.5, 125, 250, respectively. For *C.albicans* ATCC 10231 could not be observed. The results were then applied to use *Caesalpinia sappan* L. as preservatives in chilli-paste products. The results showed that *Caesalpinia sappan* L. efficiently reduced the amount of bacteria and fungi during three month study period. By Thin Layer Chromatography (TLC) and spectrophotometric method, the quantity of brazilin was detected but not with Haematoxylin, it may be due to the very small amount of the latter.

In conclusion, *Caesalpinia sappan* L. is effectively for use as preservative agent in food products. Further project should be the study of components and quantity of active ingredients, thoroughly.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้ สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากท่านอาจารย์ที่ปรึกษา คือ รศ.ดร.มล.สุมาลย์ สาระยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ รศ.ดร.รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ ในการค้นคว้าข้อมูล และการวิจัยตั้งแต่ต้นจนสำเร็จตามความมุ่งหมาย

นอกจากนี้ยังได้รับความช่วยเหลือจาก ภก.จักรพันธุ์ พันธุ์ศรีรัตน์ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ คุณชุติมา มะนะมุติ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในการทำการวิจัย ผู้จัดทำจึงขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้

ผู้จัดทำ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สัญลักษณ์คำย่อ	ช
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	2
วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย	16
ผลการวิจัย	30
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	38
เอกสารอ้างอิง	41

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตารางการแปลผล MPN test ในการทดสอบเชื้อ coliform และ *E.coli*	25
2	ตัวทำละลายในการทดสอบการละลายของสารสกัดฝาง	27
3	ชนิดและอัตราส่วนของสารที่ใช้เป็น solvent system	27
4	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อตัวอย่าง *S. aureus* ATCC 6538, *E.coli* ATCC25922, *S. typhimurium* ATCC13311 และ *C.albicans* ATCC10231	31
5	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (x 10^2 cfu/กรัม) ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก	32
6	จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (cfu/กรัม) ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก	32
7	MPNs *Coliforms* ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก	33
8	จำนวน *E.coli* ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก	33
9	จำนวน *S. aureus* ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก	34
10	จำนวน *B. cereus*, จำนวน *Salmonella* และ จำนวน *C. perfringen* ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก	34
11	ชนิดและอัตราส่วนของสารที่ใช้เป็น solvent system	35
12	ค่าการดูดกลืนรังสี UV ที่ 505 nm และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Brazilin	36
13	ผลการวัดค่าดูดกลืนรังสี UV ที่ 505 nm ของสารสกัดฝาง และปริมาณ Brazilin ในสารสกัดฝาง1 มิลลิกรัม(ไมโครกรัม/มิลลิกรัม)	37

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ฝางและแก่นฝาง	4
2	สารสำคัญในฝาง	4
3	แสดงการทดลองหาค่า MIC โดยวิธี 96-well plate method	19
4	ลักษณะของน้ำพริกตัวอย่างหลังบรรจุเสร็จ (กลุ่มควบคุม, ฝาง 4 เท่า, ฝาง 8 เท่า, ฝาง 16 เท่า)	21
5	แสดงแถบสารที่ได้จากการสกัดแยกโดยวิธี Thin-Layer Chromatography (TLC) ใน solvent system Ethyl acetate ใต้รังสีอัลตราไวโอเลต ที่ 254 นาโนเมตร	35
6	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนรังสี UV โดยตรง ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร และ ความเข้มข้นของ Brazilin	37

สัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	percentage
CH_3OH	=	Methyl alcohol
CH_2Cl_2	=	Dichlorometane
Conc.	=	concentrated
g	=	gram
HCl	=	Hydrochloric acid
M	=	Molar
mL	=	millilitre
MeOH	=	Methyl alcohol
mg/mL	=	milligram per millilitre
N	=	Normal
NaOH	=	Sodium Hydroxide
NH_4OH	=	Ammonium Hydroxide
nm	=	nanometer
UV	=	ultraviolet-visible
µg	=	microgram
µg/mL	=	microgram per millilitre
µL/mL	=	microlitre per millilitre
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume
λ	=	wave length
λ max	=	maximum wave length

บทนำ

การขยายตัวของอุตสาหกรรมผลิตอาหารกึ่งสำเร็จรูปในปัจจุบัน ก่อให้เกิดการแข่งขันกันทางธุรกิจ มีการนำสารกันเสียประเภทสารเคมีหลายชนิดมาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์โดยพิจารณาตามความเหมาะสม เช่น กรดเบนโซเอต เกลือเบนโซเอต พาราเบน กรดโพรพิโอนิก เกลือโพรพิโอเนต กรดซอร์บิก เกลือซอร์เบต เป็นต้น เพื่อชะลอการบูดเสีย และยืดอายุในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารเคมีดังกล่าวอาจสะสมในร่างกาย ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคหากได้รับเกินปริมาณที่กำหนดและในระยะเวลาต่อเนื่องกัน จึงมีการค้นคว้าเพื่อหาสารที่ปลอดภัยมาใช้ทดแทน จากการศึกษาวิจัยพบว่าสมุนไพรและเครื่องเทศหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งป้องกัน หรือทำลายจุลินทรีย์บางชนิดได้ เช่น อบเชย กานพลู เป็นต้น

ฝางเป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองของประเทศไทยที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ เป็นส่วนผสมในยาแผนโบราณในตำรับยาบำรุงโลหิต ยาฝาดสมาน ยาแก้ท้องเสีย ได้มีผู้ศึกษาใช้สารสกัดสมุนไพรได้แก่ สะทอน พะยอม คูน และฝาง เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทน้ำพริก พบว่าสารสกัดฝางมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลชีพได้ดี ในความเข้มข้นที่เหมาะสมและไม่ทำให้กลิ่น และรสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม จากการศึกษาพบว่าฝางมีสารสำคัญอยู่หลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ Brazilin, Haematoxylin สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นต้น ซึ่งมีการศึกษาว่ามีฤทธิ์ในการต้าน *Beauveria bassiana* สารกลุ่มแนพโทควิโนนมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Lactobacillus casei* และ *Clostridium perfringens* จึงได้นำสารสกัดฝางมาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ จุลชีพเปรียบเทียบกับ Brazilin และ Haematoxylin และนำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารสำคัญในสารสกัดฝาง ด้วยวิธีThin Layer Chromatography (TLC) และวิธี spectrophotometry ซึ่ง TLC เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของสาร สำหรับ spectrophotometry เป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ แต่นิยมใช้วิเคราะห์เชิงปริมาณมากกว่า อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีกำหนดวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์สมุนไพรแต่ละชนิด เนื่องจากสมุนไพรแต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลายและมีความแตกต่างกันสูง รวมทั้งมีสารอื่นที่เจือปนในธรรมชาติ อันอาจมีผลต่อการวิเคราะห์ได้

หากการใช้ฝางเป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารมีประสิทธิภาพ จะก่อให้เกิดประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ลดการใช้สารกันเสียประเภทสารเคมีเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ซึ่งจะช่วยเพิ่มความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภค อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าและส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทยให้แพร่หลายมากขึ้น

ทบทวนวรรณกรรม

ฝาง

ชื่ออื่น ฝางส้ม(กาญจนบุรี), ง้าย(กาญจนบุรี), ฝางเสน (กลาง), หนามโค้ง(แพร่), โซบั๊ก (จีน)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Caesalpinia sappan Linn*

ชื่อสามัญ sappan tree

วงศ์ Leguminosae

ส่วนที่ใช้เป็นยาเนื้อไม้และแก่น

แก่นฝาง (Sappan wood) มีสารสีชมพูส้มถึงแดง (ขึ้นกับปริมาณ) ชื่อ Brazilin แก่นฝางมีรสขื่นขม ฝาด ใช้ต้มน้ำกินเป็นยาบำรุงโลหิตสตรี แก้ปอดพิการ ขับหนอง ขับเสมหะ ทำโลหิตให้เย็น แก้โรคหืด แพทย์ชนบทใช้ต้มน้ำกินแก้อาการท้องร่วง ธาตุพิการ ร้อนใน แก้โลหิตออกทางทวารหนักและทวารเบา

เนื้อไม้ ใช้แก้ท้องเสีย แก้บิด ทำให้ประจำเดือนมาเป็นปกติ แก้ไข้ รักษาโรคทั่วไป นอกจากนี้ส่วนเปลือก ลำต้นและเนื้อไม้สามารถใช้ต้มรับประทานรักษาวัณโรค ท้องเสียและอาการอักเสบในลำไส้เป็นยาฝาดสมานและรักษาแผล

จากข้อมูลรายงานการทดลองต่าง ๆ ที่มีอยู่ไม่พบข้อมูลการยับยั้งเชื้อ MRSA(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) ของฝาง ทราบแต่เพียงว่าสาร Brazilin ในแก่นฝางที่กล่าวถึงข้างต้นนั้น เมื่อผ่านการต้ม สาร Brazilin จะเปลี่ยนเป็นสาร Brazilein ซึ่งมีสีแดงซึ่งสมัยก่อนใช้ในการย้อมผ้าหรือแต่งสีขนมและทำน้ำยาอุทัย

คุณสมบัติทางยาของเนื้อไม้และเปลือกไม้ฝางเกิดจากกลุ่มของสาร phenol ที่มีชื่อเรียกว่า homoisoflavonoids ลำต้นและใบมีสาร alkaloid และ phytosterol อยู่ในปริมาณมาก

ปัจจุบันมีรายงานการทดลองของสารทั้ง Brazilin และ Brazilein ดังนี้

- แก้อักเสบ: สาร Brazilin ที่สกัดได้จากแก่นฝางมีฤทธิ์ระงับการอักเสบได้ดี การที่ฝางเสนมีสารระงับการอักเสบนี้อยู่จึงทำให้มีผลระงับอาการหอบหืดได้ด้วย
- ระงับเชื้อโรค: การนำพืชที่มีสาร Brazilin (รวมทั้งฝางเสน) มาแช่ในแอลกอฮอล์จะทำให้ได้น้ำยาสกัดแอลกอฮอล์ที่มีสาร Brazilin ละลายอยู่ น้ำยานี้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดไข้สูง โรคท้องร่วงระบาด เชื้อ Staphylococcus ได้ นอกจากนี้ในแก่นฝางยังพบว่ามีสารอีกชนิดหนึ่งที่ระงับเชื้อโรคได้เช่นกันคือสารSappanin
- แก้ท้องเสีย: แก่นและเปลือกฝางเสนมีสาร Tannin อยู่มากโดยเฉพาะส่วนเปลือกฝางจึง

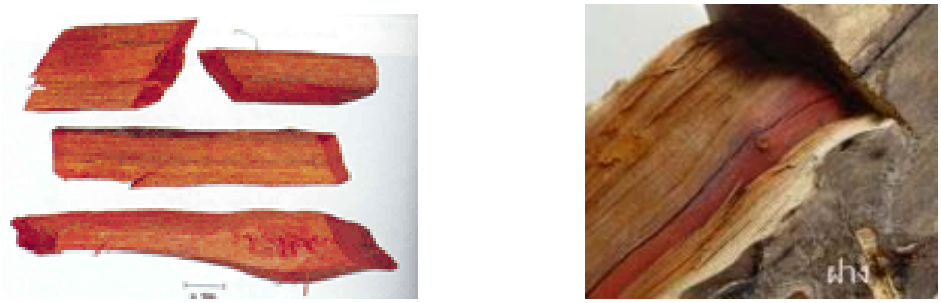
ใช้ต้มกินแก้ท้องเสียหรือบิดอย่างอ่อนได้

- ป้องกันหืด: สาร Brazilein สามารถยับยั้งไม่ให้ร่างกายสร้างสารHistamine ได้ จึงน่าจะช่วยป้องกันโรคหืดได้

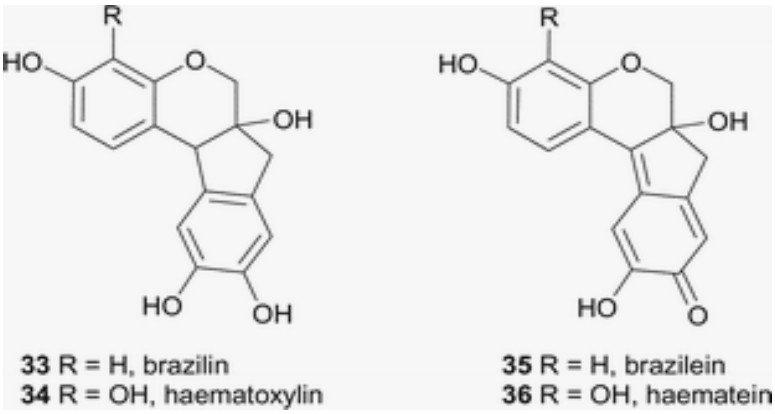
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของฝางนอกจากต้านเชื้อแบคทีเรียแล้ว ยังสามารถต้านเชื้อรา ไวรัส ยีสต์ ลดการอักเสบ ยับยั้งเนื้องอก กระตุ้นภูมิคุ้มกันและยับยั้งการแพ้ได้ด้วย

การใช้ประโยชน์ทางด้านอื่น ๆ

ทำสีย้อม ซึ่งฝางแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ ชนิดหนึ่งแก่นสีแดงเข้ม เรียกว่า ฝางเสน อีกชนิดหนึ่งแก่นสีเหลือง เรียกว่า ฝางส้ม นำมาต้มสกัดสาร Haematoxylin ใช้ย้อมสี Nuclei ของเซลล์ หรือต้มให้สีแดงที่ เรียกว่า sappanin ซึ่งเป็นสารให้สีประเภท Brazilin ใช้ทำน้ำยางอุทัยผสมน้ำดื่ม สีผสมอาหารและชาวบ้านนิยมนำมาย้อมสีผ้าไหม ผ้าฝ้ายและผ้าขนสัตว์



<u>รูปที่ 1</u> ฝางและแก่นฝาง



<u>รูปที่ 2</u> สารสำคัญในฝาง

เชื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดลอง

1. *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะ colony บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้น คือ กลม ขอบเรียบ ทึบแสงมีสีเหลือง เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 10-40 °C แต่อุณหภูมิที่พอเหมาะคือ 37°C เจริญในสภาวะที่มี หรือไม่มีออกซิเจนก็ได้สามารถย่อยสลายโปรตีน ไขมันมีชีวิตอยู่ในสภาวะที่ pH เป็นกรดหรือด่าง ความชื้นต่ำๆได้ สามารถอยู่ในอากาศที่แห้งแล้งได้นานเป็นเดือน สามารถเจริญเติบโตในน้ำมูก บนผิวหนัง และอาหารหลาย ๆ ชนิด การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C ใน

เวลา 60 นาที สามารถทำลายเชื้อ *S. aureus* ได้ เชื้อนี้ยังทนต่อยาฆ่าเชื้อ และดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด

S. aureus สร้างเอนไซม์และสารพิษหลายชนิด ได้แก่

- Coagulase เป็นเอนไซม์ที่ทำให้พลาสมาแข็งตัว
- Hyarulonidase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยกรด hyaluronidic เป็นสารที่เชื่อมเซลล์ต่อเซลล์
- Phytokinase เป็นเอนไซม์ที่ทำลายเลือดที่แข็งตัว
- Nuclease (Dnase) เป็นเอนไซม์ที่ทำลาย DNA
- Lipase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยไขมัน ช่วยให้เชื้อเจริญบนผิวหนังที่มีไขมันได้ดี
- Penicillinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยเพนนิซิลิน ทำให้เชื้อดื้อต่อยาเพนนิซิลิน
- Hemolysin เป็นสารพิษที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตกสลาย
- Leukocidin เป็นสารพิษที่ทำให้เม็ดเลือดขาว neutrophil และmacrophage แตก
- Exfoliative toxin ทำให้ผิวหนังหลุดลอกออกเป็นแผ่นๆ
- Enterotoxin เป็นสารพิษที่ทนความร้อน

โรคอาหารเป็นพิษ *S. aureus* บางสายพันธุ์สร้างสารพิษที่เรียกว่า enterotoxin ขึ้น สารนี้มีคุณสมบัติทนความร้อน การสลายสารพิษต้องใช้อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลานานอย่างน้อยครึ่งชั่วโมง *S. aureus* ที่ติดอยู่กับมือของผู้ประกอบอาหาร เป็นตัวการที่ทำให้เกิดโรค โดยปนเปื้อนไปในอาหาร พบว่า ในเวลาเพียง 3 – 5 ชั่วโมง *S. aureus* ก็สามารถสร้างสารพิษขึ้นมามาก พอที่จะทำให้เกิดอาการได้ อาหารหลายชนิดที่สัมผัสกับมือโดยตรง เช่น ข้าวขาหมู ขนมปังสังขยา อาจเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษได้ หลังจากได้รับสารพิษเข้าไป ประมาณ 6 – 8 ชั่วโมง จะมีอาการเฉียบพลัน คลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระร่วง ผู้ป่วยมักจะหายเองได้ ในเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

2. *Escherichia coli*

เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนขนาดประมาณ 0.5 – 3.0 μm โดยปกติมักอาศัยอยู่ในลำไส้คนและสัตว์เลือดอุ่น ในการตรวจอุจจาระอาจตรวจพบเชื้อนี้จำนวนมาก โดยไม่ทำให้ก่อโรคแต่ฉวยโอกาสก่อโรคได้ในกรณีที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง *E.coli* สามารถปรับตัวได้ง่ายตามถิ่นที่อยู่อาศัย เจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสอย่างเดียว และเปลี่ยนกลูโคสให้กลายเป็นองค์ประกอบที่ใช้ในการสร้างเซลล์ สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนและไม่

มีออกซิเจน ปัจจุบันมี *E.coli* ที่ก่อโรคมากกว่า 700 ชนิด โดยแยกออกเป็น O,H และ K แอนติเจน โรคที่เกิดจาก *E. coli* มีหลายโรค ได้แก่

1. โรคอุจจาระร่วง จะพบในกลุ่มคน 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นเด็กเล็ก เรียกโรคที่เกิดขึ้นว่า infantile diarrhea ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ Enteropathogenic เด็กได้รับเชื้อปนมากับน้ำ นม อาหาร อีกกลุ่มหนึ่งเป็นโรคอุจจาระร่วงจาก *E. coli* คือ ผู้ใหญ่ที่เดินทางไปต่างถิ่น เรียกโรคนี้ว่า traveler's diarrhea เกิดจากเชื้อ Enteropathogenic *E. coli* ระยะฟักตัว 5 - 15 วัน อาการ ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ มีไข้ต่ำ ๆ คลื่นไส้ อาเจียน

2. โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ มักมีสาเหตุมาจากเชื้อที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของผู้ป่วยเอง การติดเชื้อพบบ่อยในผู้หญิง เนื่องจากท่อปัสสาวะค่อนข้างจะสั้นและตรง เข้าสู่กระเพาะปัสสาวะ จึงทำให้เกิดโรคการติดเชื้อที่ กระเพาะปัสสาวะ เกิดกระเพาะปัสสาวะอักเสบ ซึ่งอาจจะลุกลามไปยังไตได้ด้วย

3. โรคติดเชื้ออื่น ๆ ที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* เช่น เยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กเกิดใหม่ ปอดบวม แผลติดเชื้อ และโลหิตเป็นพิษ มักเกิดเนื่องจากการผ่าตัด การใช้เครื่องช่วยหายใจ การใช้สายสวนท่อปัสสาวะ

3. *Bacillus*

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีอยู่มากมายทั่วไปทุกหนทุกแห่งในโลก ส่วนมากดำรงชีวิตแบบอิสระ ไม่ต้องพึ่งพาอาศัยสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ต้องการใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่สารอาหารมีความต้องการแตกต่างกันไปในแต่ละเชื้อสาย ถิ่นที่อยู่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติ คือในดิน สปอร์ถูกสร้างขึ้นในดินมักไปปนกับฝุ่นละออง และฟุ้งกระจายอยู่ทั่วไป ติดตามร่างกายคนและสัตว์หรือปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ มีเพียง 2 เชื้อที่ทำให้เกิดโรค คือ *B. anthracis* ทำให้เกิดโรคแอนแทรกซ์และ *B. creus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

Bacillus anthracis เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน ปลายตัดตรง สปอร์อยู่ตรงกลางเซลล์ แต่เมื่ออยู่ในร่างกายคนและสัตว์ไม่เคลื่อนที่เนื่องจากไม่มีแฟลกเจลลา ไม่สร้างสปอร์เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ไม่สลายในเม็ดเลือดแดง colony มีสีขาว ขนาดค่อนข้างโต

โรคที่ทำให้เกิดคือ แอนแทรกซ์ เป็นโรคระบาดในสัตว์พวกแพะ แกะ ม้า วัว ควาย ในคนพบไม่บ่อยนัก

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียที่มักมีการปนเปื้อนลงไปในอาหารที่ปรุงสุกแล้ว โดยสปอร์ปนไปกับฝุ่นละออง อากาศ เชื้อจะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในอาหารที่วางทิ้งไว้ใน

ตู้กับข้าว แล้วสร้างสารพิษ (enterotoxin) ออกมา สารพิษมีฤทธิ์ทำให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ คือ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อุจจาระร่วง อาการมักดีขึ้น และหายได้เองใน 24 ชั่วโมง เมื่อสารพิษนั้น ๆ หมดฤทธิ์ไป

4. *Clostridium spp.*

เชื้อในสกุลนี้มีประมาณเกือบ 100 เชื้อสาย พบอยู่ตามดิน กองขยะ มูลสัตว์ พืชผัก ในลำไส้คนและสัตว์ *Clostridium* มีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ได้ สปอร์มีรูปร่างและตำแหน่งแตกต่างกันไปตามเชื้อสาย การทำให้เกิดโรคเนื่องจากสารพิษ โรคที่เกิดจาก *Clostridium* แบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ

1. โรคติดเชื้อที่ผิวหนัง ได้แก่ โรคแผลเน่ามีแก๊ส โรคติดเชื้อในลำไส้ซึ่งเป็นผลมาจากการได้รับยาปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นเวลานาน
2. โรคอาหารเป็นพิษ จากการได้รับสารพิษของเชื้อ
3. โรคอาหารเป็นพิษ โรคอาหารเป็นพิษจาก *Clostridium* แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

ก. Perfringens food poisoning เกิดจากเชื้อ *C. perfringens* สปอร์ของเชื้อปะปนลงไปในอาหาร สปอร์งอกเป็นเซลล์ปกติ แบ่งเซลล์ แล้วสร้างสารพิษ (enterotoxin) ทำให้เกิดอาการปวดท้อง อุจจาระร่วง คลื่นไส้ ระยะฟักตัวของโรคประมาณ 8 –24 ชั่วโมง

ข. Botulinum food poisoning หรือ botulism เกิดจากการบริโภคอาหารกระป๋อง หรืออาหารอื่นใดที่มีสารพิษของเชื้อ *C. botulinum* เชื้อนี้พบอยู่ทั่วไปในดิน น้ำ และลำไส้ใหญ่ของสัตว์ สปอร์ของเชื้อปะปนลงไปในอาหาร

5. *Salmonella spp.*

เป็น noncoliforms ที่ทำให้เกิดโรค มีหลายเชื้อสาย รูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมลบ เจริญได้โดยที่มีและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์มีแฟลกเจลลารอบตัว เคลื่อนที่ได้ มีชีวิตอยู่นอกโฮสต์ได้นานพอสมควร

เชื้อสายที่สำคัญที่สุดของ Salmonella คือ *S. typhi* ทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) ส่วนที่เหลือคือ

- *S. cholerae- suis* เป็นโรคติดต่อจากหมู (zoonosis of swine)
- *S. enteritidis* จำแนกย่อยได้อีกประมาณ 17,000 serotypes โดยจำแนกตามแอนติเจน

ไข้ไทฟอยด์ ระยะฟักตัว 2 สัปดาห์ เชื้อเข้าสู่ร่างกายโดยการกินเข้าไปพร้อมกับอาหารหรือน้ำ *S. typhi* มีความสามารถในการก่อโรค คือ สามารถมีชีวิตในเม็ดเลือดขาวและเพิ่มจำนวนมากขึ้นในเซลล์ ที่ผนังเซลล์ของเชื้อก็มี endotoxin ซึ่งทำให้เกิดอาการต่างๆ

อาการ เริ่มแรกเป็นไข้สูง ปวดศีรษะ สัปดาห์ที่ 2 หรือ 3 จะมีอาการอุจจาระร่วง และไข้เริ่มลดลง ในรายที่อาการรุนแรง แผลที่ลำไส้อาจทะลุหรือเป็นฝีที่ทางเดินปัสสาวะและตับ

6. Candida albicans

เป็นเชื้อราเซลล์เดี่ยวที่เป็นสาเหตุของโรค Candidosis (Candidiasis) และโรคอื่นๆ เช่น oral thrush, vulvovaginal candidiasis ซึ่งเชื้อ *Candida albicans* สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding) เจริญเติบโตได้ดีใน Sabouraud medium หรือ bacteriological media เช่น blood agar ที่อุณหภูมิ 25 – 37 องศาเซลเซียส และ incubate เป็นเวลา 1-2 วัน ลักษณะของเชื้อจะมีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือรูปไข่ สีครีมคล้ายนม และนูน

Candida albicans พบเป็น normal flora ที่พบได้40-80% ในมนุษย์ซึ่งมักในบริเวณเยื่อบุปาก, ทางเดินอาหาร และช่องคลอด โดยอยู่ในรูปของ yeast form เมื่อมีปัจจัยส่งเสริมที่เหมาะสม จึงจะทำให้เกิดโรคขึ้น โดยตัวเชื้อจะเปลี่ยน form เกิดมีทั้ง yeast, hyphae และ pseudohyphae ก่อโรคโดยผลิต endotoxin ไปทำลาย mucous membrane และรุกล้ำเข้าไปยังกระแสเลือด แต่โดยปกติจะไม่ก่อโรค ยกเว้นในผู้ที่มีปัจจัยเสี่ยง เช่น ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ได้รับยา corticosteroid เป็นเวลานาน เป็นต้น

การวิเคราะห์สมุนไพรโดยวิธี Thin-Layer Chromatography

โครมาโทกราฟี เป็นขบวนการแยกและทำสารให้บริสุทธิ์โดยอาศัยความแตกต่างของการกระจายตัวของสารระหว่างเฟส 2 เฟสที่ไม่ผสมกัน คือ เฟสอยู่กับที่(stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่(mobile phase) โดยเฟสเคลื่อนที่จะเป็นตัวพาสารให้เคลื่อนที่ไปอยู่บนเฟสอยู่กับที่

Thin-Layer Chromatography เป็นโครมาโทกราฟีที่ใช้แยกสารที่มีปริมาณน้อย ๆ เป็นไมโครลิตร โดยการหยดสารลงบนเฟสอยู่กับที่ ที่เป็นแผ่นบางอยู่กับแผ่นรองรับ(supporter) จากนั้นถูกนำโดยเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งเคลื่อนที่ด้วยแรงดึงดูดแคพิลาร์ทำให้เกิดการแยกสารประกอบต่าง ๆ ออกจากกันโดยหลักการแยกส่วน(partition) และดูดซับ(adsorption)

ข้อดีของ Thin-Layer Chromatography คือ ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ใช้สารปริมาณน้อย (ประมาณ 20 ng) ค่าใช้จ่ายค่อนข้างต่ำ สามารถแยกและพิสูจน์ ทั้งในรูปสารเดี่ยว สารผสม ในยาสำเร็จรูป และสารจากธรรมชาติ

การวิเคราะห์สารสำคัญในสมุนไพรด้วย TLC อาจทำโดยการตรวจหาสารกลุ่มใหญ่ ๆ ที่พบในพืช เช่น กลุ่มแอลคาลอยด์(alkaloid) ฟลาโวนอยด์(flavonoid)

องค์ประกอบของ TLC

1. เฟสอยู่กับที่ (stationary phase)

ประกอบด้วยสารดูดซับ(adsorbtion) เคลือบเป็นแผ่นบางบนแผ่นรองรับ (supporter) ที่เป็นแก้ว พลาสติก หรือโลหะ โดยทั่วไปแล้วแผ่นรองรับมักมีขนาดมาตรฐาน คือ 20x20 หรือ 20x10 cm และมีความหนาของสารดูดซับประมาณ 0.1-0.3 mm โดยสารดูดซับหลายชนิดมีการใช้ที่แตกต่างกันขึ้นกับคุณสมบัติของสารที่ต้องการแยกและเฟสเคลื่อนที่ สารดูดซับที่นิยมมากได้แก่ Silica gel ซึ่งขะมีขนิดต่าง ๆ เช่น Silica gel GF_{254}หมายถึง silica gel ที่มี gypsum เป็น binder และเรื่องแสงที่ 254 nm

2. เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

อาจเป็นตัวทำละลายตัวเดียว หรือเป็นสารผสมขึ้นกับสารที่จะทำการแยกโดยสิ่งสำคัญของการเลือกเฟสเคลื่อนที่ คือ ราคาถูก บริสุทธิ์ มีความคงตัว สามารถนำออกจากแผ่นเคลือบได้ง่าย ไม่เป็นพิษ และไม่เกิดปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยก

3. สารมาตรฐาน

เป็นสารที่ใช้เปรียบเทียบ เพื่อพิจารณาว่ามีสารนี้เป็นองค์ประกอบหนึ่งในสารที่ต้องการแยกด้วย TLC หรือไม่ โดยต้องเตรียมสารมาตรฐานให้มีความเข้มข้นพอเหมาะ

วิธีการวิเคราะห์สารประกอบเคมีในสมุนไพรโดยวิธี TLC

นำแผ่น TLC ที่ spot สารสกัดและสารเปรียบเทียบซึ่งมีความเข้มข้นเหมาะสมประมาณ 0.1-1% และควรทำให้ spot มีค่าเท่ากัน คือมีจุดศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.5 mm จากนั้น จุ่มแผ่น TLC ที่ spotสารสกัดแล้วลงไปในระบบเฟสเคลื่อนที่ ที่อิ่มตัวเพียงพอใน chamber แล้ว โดยให้เฟสเคลื่อนที่ เคลื่อนที่เป็นระยะทาง 8-12 cm เมื่อขจัดเฟสเคลื่อนที่บนแผ่น TLC ด้วยลมร้อนแล้วจึงนำแผ่น TLC ไปตรวจสอบด้วยแสง ultraviolet หรือพ่น reagent ที่เหมาะสม

การตรวจหาสารเคมีบน TLC

1. การตรวจสอบคุณสมบัติในการดูดกลืนแสง UV แบ่งเป็น 2 ช่วง

– ช่วงคลื่นสั้น (254 nm) สารจะดูดกลืนแสงทำให้เกิดจุดมืด (dark zone) บนแผ่นเรืองแสงสีเขียว โดยสารกลุ่มนี้จะมี double bond จำนวน 2 หรือมากกว่า

– ช่วงคลื่นยาว (365 nm) โดยสารที่มี conjugated double bond จำนวนมาก เช่น quamarin, flavonoid, alkaloid บางชนิดจะเกิดการเรืองแสง

2. ปฏิกิริยาการเกิดสี

โดยการพ่นน้ำยาที่เหมาะสมลงบนแผ่น TLC สีอาจเกิดขึ้นทันทีหรือหลังจากให้ความร้อน เช่น Iodine vapour ให้สีน้ำตาลกับสารที่มี conjugated double bond 50% H_2SO_4 in MeOH มักให้สีกับสารพวก terpene, lignan, steroid

Dragendoff reagent ให้สีส้มกับ alkaloid

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ

Rf values เป็นค่าที่ใช้ในการเปรียบเทียบสารต่าง ๆ กับสารมาตรฐานเพื่อระบุชนิดของสารนั้น ๆ

Rf = ระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น / ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้น

Rf values มีค่าตั้งแต่ 0.0-1.0 โดยเราอาจแสดงด้วยค่า hRf ซึ่งเท่ากับ Rf x 100 แทน

ระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร จะวัดจากจุดกึ่งกลางของ spot แต่ถ้า chromatogram ที่ได้เป็นทางยาว จะวัดจากจุดกึ่งกลางของตำแหน่งที่มีความเข้มมากที่สุด

การสกัดด้วยตัวทำลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) เป็นกระบวนการส่งผ่านสารจากตัวทำละลายหนึ่งไปยังตัวทำละลายอีกตัวหนึ่งที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน โดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพทางเคมีของสารที่จะวิเคราะห์รวมถึงความแตกต่างในการละลายของสารในตัวทำละลายทั้งสอง เมื่อนำมาสัมผัสกันจนกระทั่งเกิดสมดุตามหลักอุณหพลศาสตร์(thermodynamics) ซึ่งเมื่อพิจารณาในแต่ละตัวทำละลายจะพบว่าสารจะเกิดการกระจายตัว (partition หรือ distribution) หรือละลายอยู่ในตัวทำละลายทั้งสอง และมีอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารในตัวทำละลายทั้งสองคงที่

<u>หลักการเลือกตัวทำละลายที่จะใช้ทำการสกัด</u>

1. สารที่จะวิเคราะห์ ควรละลายได้ดีในตัวทำละลายที่จะใช้ทำการสกัด (ตามหลัก like dissolve like) มากกว่าตัวทะลายที่ใช้ละลายสาร

2. ตัวทำละลายที่ใช้สกัด ควรจะไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร(โดยทั่วไปมักใช้น้ำ) พิจารณาได้จากค่าการละลาย(solubility)

3. มีความหนาแน่น(density) ที่แตกต่างจากน้ำ ซึ่งจะทำให้เห็นการแยกชั้นอย่างชัดเจน (clean cut phase boundary) จึงง่ายต่อการไขแยกชั้นออกจากกัน

4. มีความหนืด (viscosity)น้อย ซึ่งจะทำให้ตัวทำละลายเกิดการสัมผัสกันได้ดีระหว่างการเขย่า(shaking) และเกิดการแยกชั้นอย่างรวดเร็วเมื่อตั้งทิ้งไว้

5. จุดเดือด (boiling point) ที่พอเหมาะ ง่ายต่อการขจัดออก และค่าการระเหยเป็นไอ(volatility) ไม่ต่ำจนเกินไป เพราะเป็นอันตรายต่อสุขภาพเมื่อสูดดม

6. ไม่เกิด stable emulsion กับน้ำ

7. ความสามารถของตัวทำละลายในการดูดกลืนแสง UV โดยพิจารณาได้จากค่า UV cutoff เนื่องจากถ้านำสารไปวิเคราะห์ต่อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ตัวทำละลายจะไปบดบังการดูดกลืนแสงของสารที่เราวิเคราะห์ได้

8. ตัวทำละลายควรจะสามารถที่จะนำกลับมาใช้ได้อีก

9. ไม่เป็นพิษหรือติดไฟ มีความบริสุทธิ์ และราคาไม่แพง

การสกัดสารเพื่อศึกษาโครมาโทกราฟี

วิธีการสกัดจะขึ้นกับคุณสมบัติของสารในการละลาย และ form ของสารที่มีในพืช เช่น

- กลุ่มสารที่มี polarity สูง เช่น saponin, tannin มักใช้ alcohol หรือalcohol ร่วมกับน้ำและความร้อนในการสกัด
- กลุ่มสารที่มี polarity รองลงมา เช่น anthraquinone, flavoniod จะใช้ alcohol และความร้อนในการสกัด ส่วน glycoside และ ether หรือ chloroform ในการสกัดในรูป aglycone
- กลุ่ม cardiac glycoside จะตกตะกอน tannin ด้วย 10% lead acetate หรือ dichloromethane
- Alkaloid จะถูกทำให้เป็นเบสก่อนถูกสกัดด้วย ether หรือ chloroform
- กลุ่มที่มี polarity ต่ำ เช่น diterpene, triterpene, quamarin สามารถสกัดด้วย organic solvent เช่น ether , hexane , dichloromethane

Spectrophotometry

การวิเคราะห์สารเคมีต่าง ๆ

สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ตามผลของการวิเคราะห์ คือ

1. **คุณภาพวิเคราะห์** (qualitative analysis) เป็นการวิเคราะห์โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อต้องการตรวจสอบว่ามี สารชนิดนั้น ๆ อยู่ในตัวอย่างที่ส่งตรวจหรือไม่ผลการวิเคราะห์จึงมักรายงานเป็น ผลบวก หรือผลลบแต่บางครั้งอาจมีการจัดลำดับขั้นของผลบวกออกเป็นช่องกว้าง ๆ ตามปริมาณของสารที่มีอยู่ในสารตัวอย่างคือ 1^+, 2^+ , 3^+ และ 4^+

วิธีวิเคราะห์ให้ได้ผลประเภทนี้มีใช้อยู่ไม่มากนัก แต่ก็มีประโยชน์มากในการตรวจสอบเบื้องต้น (screening test) จึงเป็นที่นิยมใช้กันทั่วไป เนื่องจากวิธีวิเคราะห์ประเภทนี้มักทำได้ง่ายรวดเร็ว และประหยัด

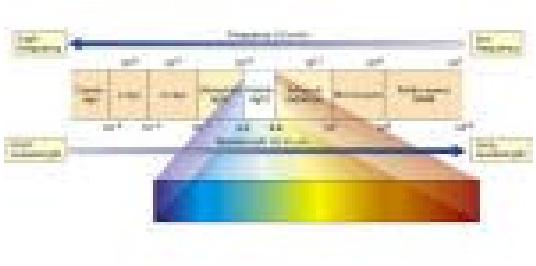
2. **ปริมาณวิเคราะห์** (quantitative analysis) เป็นวิธีที่ใช้กันมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการวิเคราะห์สารเคมี โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี เนื่องจากการวิเคราะห์ประเภทนี้ให้ผลเป็นปริมาณของสารนั้น ๆ ดังนั้นวิธีวิเคราะห์จึงต้องใช้เครื่องมือเป็นเครื่องช่วยในการวิเคราะห์เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ

เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่นำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์สารเคมีในร่างกายนั้น มีอยู่มากมายหลายชนิด และมีหลักการวิเคราะห์ที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตาม หลักการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้มากก็คือ สเปกโทรโฟโตเมตรีของการดูดกลืนแสง (absorption spectrophotometry) และสเปกโทรเมตรีของการคายคลื่นแสง (emission spectrophotomety)

สเปกโทรโฟโตเมตรีของการดูดกลืนแสงเป็นการเปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างส่งตรวจกับสีของน้ำยามาตรฐาน สีที่เปรียบเทียบนี้อาจเป็นสีของตัวอย่างส่งตรวจเอง หรือสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาทางเคมีก็ได้ โดยความเข้มของสีที่เกิดขึ้นนั้น จะเป็นปฏิภาคกับปริมาณของสารนั้น ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างส่งตรวจ

การเปรียบเทียบตามความเข้มของสีนั้น อาศัยหลักของการดูดกลืนแสง (absorbtion) ในช่วงคลื่นบางขนาด อาทิเช่น การที่เราเห็นสารละลายบางชนิดมีสีน้ำเงินก็เพราะสารละลายนั้นดูดกลืนเอาแสงที่มีความยาวคลื่นในช่วยของแสงสีเหลือง ส้ม แดง ไปและยอมให้แสงที่มีสีน้ำเงินลอดผ่านไปได้เราจึงเห็นสารละลายนั้นมีสีน้ำเงิน ยิ่งสารละลายนั้นดูดกลืนแสงสีเหลืองและแดงไปมากเท่าใด เราก็จะเห็นสารละลายนั้นมีสีน้ำเงินเข้มยิ่งขึ้น ปริมาณการดูดกลืนแสงดังกล่าวนี้จึง

ขึ้นกับความเข้มของสีที่ปรากฏในสารละลายนั้นๆ กล่าวคือ ยิ่งมีสารที่มีสีมาก ก็จะดูดกลืนแสงในบางช่วงคลื่นได้มากด้วย



Complementary Color

Wavelength (nm)	Color Absorbed	Color Observed
400	violet	yellow - green
435	blue	yellow
495	green	purple
560	yellow	blue
650	orange	greenish blue
800	red	bluish green

ดังนั้น เมื่อให้ลำแสงผ่านเข้าไปในสารละลายที่มีสี จำนวนแสงที่ถูกดูดกลืนไปจะแสดงถึงปริมาณของสารที่มีสีในสารละลายนั้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อใช้ลำแสงที่มีความยาวคลื่นแสงในช่วงที่สารมีสีนั้นดูดกลืนได้มากที่สุด

เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่อาศัยหลักการเปรียบเทียบสีโดยอาศัยการดูดกลืนแสงที่ใช้บ่อยในการวิเคราะห์สารเคมีในร่างกาย คือ โฟโตมิเตอร์ที่ใช้กระจกกรองแสง (filter photometer) สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) และฟลูออโรมิเตอร์ (fluorometer)

นอกจากเครื่องมือที่กล่าวมานี้ ยังมีเครื่องมืออื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์สารเคมีในร่างกายอีกมากมายหลายชนิด แต่ละชนิดมีหลักการวิเคราะห์แตกต่างกันมากมายจนไม่อาจกล่าวได้หมด เช่น อะตอมมิกแอบซอร์พชันสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (atomic absorption spectrophotometer) อินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (IR spectrophotometer) เนฟีโลมิเตอร์ (nephelometer) โครมาโตกราฟี (chromatography) อิเล็กโทรโฟรีซีส (electrophoresis) ฯลฯ

ความรู้เบื้องต้นเรื่อง เทคนิคทาง Spectrophotometer

เป็นการศึกษาด้านการกระทำร่วม (Interaction) ระหว่างคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า หรือคลื่นแสงกับสสาร เช่น อะตอม (atom) หรือโมเลกุลของสาร (molecule)

Interaction **ระหว่างคลื่นแสงกับสสาร**

1. การดูดกลืนคลื่นแสง (Absorbtion) สสารสามารถดูดกลืนคลื่นแสงในช่วงคลื่นเฉพาะ
2. การคายคลื่นแสง (emission) การที่ส่วนหนึ่งของพลังงานภายในของสสารถูกเปลี่ยนเป็นพลังงานแสง
3. การกระจาย (Scatter) หรือการสะท้อนกลับ (Reflection)

กฎของเบียร์ และแลมเบิร์ต (Beer and Lambert's Law)

กฎของเบียร์ และแลมเบิร์ต เกี่ยวกับการดูดกลืน ของแสงกับความหนาของเหลวที่มีสี กล่าวว่าที่แต่ละชั้นของความหนาที่เท่ากันจะดูดกลืนแสงที่ผ่านในเศษส่วนที่เท่ากัน นั่นคือ เมื่อลำแสงของแสงโมโนโครมาติก (Monocromatic Light) ฉายผ่านตัวกลางที่ดูดกลืน (Absorb medium) ซึ่งก็คือสารละลายที่มีสี ความเข้มข้นของแสงจะลดลงในรูปของฟังค์ชั่นเอกซโพแนนเชียล ในขณะที่ความยาวของตัวกลางมากขึ้น

"อัตราของแสงที่ถูกดูดกลืนไว้ จะผันแปรเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้น และระยะทางที่แสงนั้นส่องผ่าน"

เมื่อใดที่สารละลายที่มีสีเป็นไปตามกฎนี้ ก็ถือว่าเป็นไปตามกฎของแลมเบิร์ต มีข้อควรสังเกต คือ สารละลายที่ใช้กฎข้อนี้ได้ ต้องเป็นสารละลายที่มีเนื้อเดียวกันตลอด

ความรู้นี้มีประโยชน์มากในการใช้ปรับความหนาของชั้นที่ดูดกลืนแสง หรือความหนาแน่นของตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในหลอดแก้วใส เรียกว่า เซลล์ (cell) หรือ คิวเวตต์ (cuvette) เพื่อลดสีให้ถึงระดับในช่วงที่สามารถใช้เตรียมอนุกรมของสารละลายมาตรฐาน เพื่อใช้ทำโค้งมาตรฐาน (standard curve) หรือเพื่อที่จะใช้กับสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ได้

หลักการของ Spectrophotometer

เครื่องชนิดนี้มี photoelectric cell เป็น sensing element กระแสที่เกิดโดย photoelectric cell จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเปอร์เซนต์ทรานสมิชชั่น หรือค่าแอบสอบแบนซ์ โดยเครื่องกัลวานอมิเตอร์ (Galvanometer) แหล่งกำเนิดแสงเป็นหลอดไฟธรรมดา คือหลอดทังสเตน (tungsten lamp) และแสงโมโนโครมาติก (Monocromatic Light) ที่ได้จากการ ให้ลำแสงส่องผ่านแก้วปริซึม หรือดิฟแฟรกชั่นเกรตติง (Diffraction grating) อย่างใดอย่างหนึ่งเพื่อให้ได้ แสงโมโนโครมาติก (Monocromatic Light) ที่มีความยาวคลื่นในช่วงแสงที่มองเห็นได้ นอกจากนี้

เครื่องมือชนิดนี้ยังสามารถให้แสงในช่วงอัลตราไวโอเลต(Ultraviolet) และช่วงใกล้อินฟาเรด(near infrared) ได้ และในการขั้นตอนการวิเคราะห์สามารถประยุกต์ใช้วิธีทางเคมีได้เพื่อให้เหมาะสมกับสารนั้น ๆ ได้ เช่น วิธีวัดความเข้มข้นของธาตุหรือสารประกอบ เช่น cation anion รวมทั้งธาตุอาหารพืช โดยการเติมชุดของสารเคมีลงในสารละลายสกัด เพื่อทำให้เกิดสีที่เฉพาะ ถ้าสีเข้มมากแสดงว่า ความเข้มข้นของสารมาก

ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วย Spectrophotometer

- เตรียมสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน
- เลือกความยาวคลื่นที่ต้องการ
- วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน และสารละลายตัวอย่าง
- สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน
- อ่านค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างจาก กราฟมาตรฐาน

วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงาน แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การทดลองทางจุลชีววิทยา และการทดลองทางเคมีวิเคราะห์

การทดลองทางจุลชีววิทยา

อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย

1. Incubator 37 °C
2. Autoclave
3. Micropipette ขนาด 10-50 µL, 50-100 µL, 100-1000 µL
4. Micropipette tip
5. 96-well plate Culture Cruster Round bottom with lid (Coster®)
6. Aluminium foil
7. Erlenmeyer flask ขนาด 250 และ 500 mL
8. Beaker ขนาด 50 และ 100 mL
9. pipette ขนาด 10 mL
10. Petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm
11. Aluminium loop
12. Forcep
13. Automatic pipette
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์
15. ไม้จิ้มฟัน
16. ภาชนะบรรจุแก้ว และพลาสติก
17. สำลีและผ้าก๊อซ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Muller Hinton Broth (MHB) : Lot 1110003, Exp 06/2009, Difco®,France
2. Tryptic Soy Agar (TSA) : Lot 5285367, Exp 12/2008, Difco®,France

3. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) : Lot 405201, Exp 05/2008, Lab scan Asia Co.Ltd,Thailand
4. Sabouraud Dextrose Broth (SDB) : Lot 4335990, Exp 06/2008

สารเคมี

1. Haematoxylin : Lot & filling code 446086/1 30704291 Fluka Chemie, Switzerland.
2. Brazilin : CI 75280 Catalog # 860, Anatech LTD. Lot 2956
3. McFarland No. 0.5
4. Sterile water
5. 70% ethyl alcohol

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (media)

1.1 วิธีการเตรียม Tryptic Soy Agar (TSA)

การเตรียม เตรียมตามวิธีที่ระบุบนฉลากดังนี้ ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อหนัก 40 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดเหลือประมาณ 45 องศาเซลเซียส นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเทลง plate ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที ให้มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละ plate ประมาณ 15-20 มิลลิลิตร โดยเทภายในตู้ Laminar air flow เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

1.2 วิธีการเตรียม Muller Hilton Broth (MHB)

การเตรียม เตรียมตามวิธีที่ระบุบนฉลากดังนี้ ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อหนัก 40 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร เขย่าจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส จากนั้นตวงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ใส่หลอดที่มีฝาจุกเกลียวหลอดละ 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที

1.3 วิธีการเตรียม Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

การเตรียม เตรียมตามวิธีที่ระบุบนฉลากดังนี้ ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อหนัก 65 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดเหลือประมาณ

45 องศาเซลเซียส นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปเทลง plate ที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที ให้มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละ plate ประมาณ 15-20 มิลลิลิตร โดยเทภายในตู้ Laminar air flow เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

1.4 วิธีการเตรียม Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

การเตรียม เตรียมตามวิธีที่ระบุบนฉลากดังนี้ ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อหนัก 30 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร เขย่าจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส จากนั้นตวงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ใส่หลอดที่มีฝาจุกเกลียวหลอดละ 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที

1.5 วิธีการเตรียม McFarLand No. 0.5

เตรียมโดยการผสม 0.048 M ของ $BaCl_2$ (1.75 % w/v ของ $BaSo_4.H_2O$) 0.5 มิลลิลิตร กับ 0.36 N H_2SO_4 1% v/v ปริมาณ 99.5 มิลลิลิตร

2. การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

Bacteria : *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 13311 เตรียมโดย subculture เชื้อลงใน TSA ที่เตรียมไว้ โดยแยก 1 plate : เชื้อ 1 ชนิด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ loop ที่ sterile เขี่ยเชื้อจาก plate มาใส่ใน MHB ที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ stock solution ของเชื้อทั้ง 3 ชนิด

Fungi : *C. albicans* ATCC 10231 เตรียมโดย subculture *C. albicans* ลงใน SDA ที่เตรียมไว้นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ loop ที่ sterile เขี่ยเชื้อจาก plate มาใส่ใน SDB ที่เตรียมไว้จากข้อ 1.4 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ stock solution ของ *C. albicans*

3. การหาค่า Minimal Inhibitory Concentration ของสารสกัดสมุนไพร:ฝาง

โดยวิธี Microdilution broth method

3.1 เพาะเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922 *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ลงบน TSA และ *Candida albicans* ATCC 10231 บน SDA เพื่อให้ได้ colony เดี่ยว

3.2 นำเชื้อที่ได้มาปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 Mcfarland โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.08-0.1

3.3 นำเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นแล้วมาเจือจาง 1:1000

3.4 เตรียม 2-fold serial dilution ของสารสกัดสมุนไพรฝาง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB และ SDB ใน 96 well plate

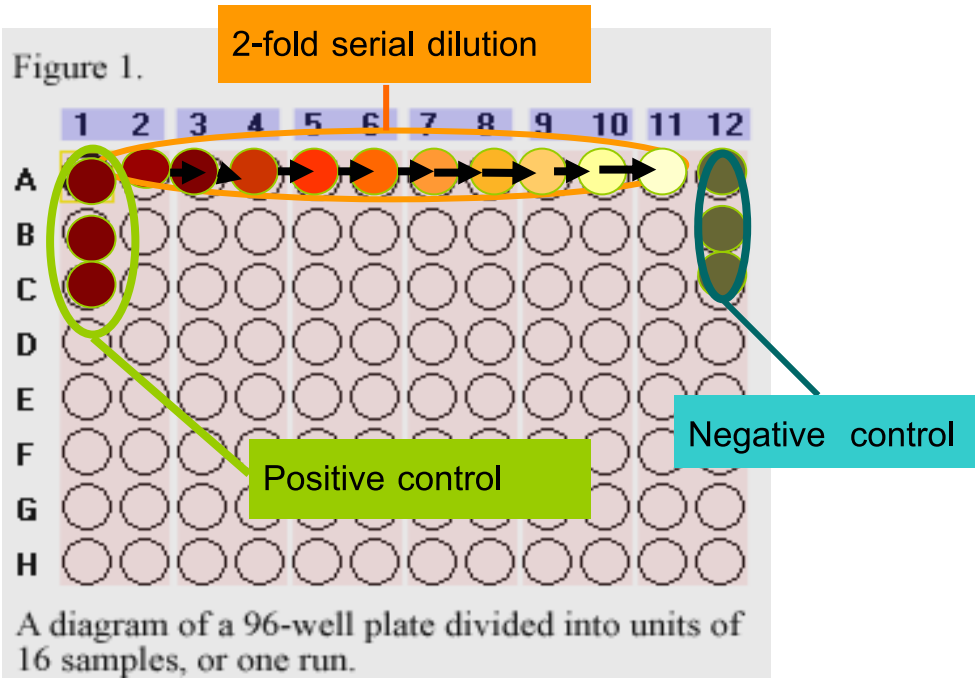
3.5 เติมเชื้อที่ปรับความขุ่นแล้ว ลงใน 96 well plate ที่เตรียมไว้ โดยแบคทีเรียเติมลงไป 10 ไมโครลิตร และยีสต์ 100 ไมโครลิตร

3.6 สำหรับแบคทีเรียบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ส่วนยีสต์บ่มนาน 48 ชั่วโมง

3.7 อ่านผลที่ได้โดยดูจากตะกอนของเชื้อที่อยู่ก้นหลุมของ 96 well plate ถ้ามีเชื้ออยู่แสดงว่าที่ความเข้มข้นนั้นไม่ยับยั้งเชื้อ อ่านค่า MIC จากหลุมที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ

3.8 ทดลองหาค่า MBC ต่อ โดยแตะจากหลุมที่ใสมาลงบนอาหาร TSAสำหรับแบคทีเรียและบน SDA สำหรับยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ส่วนยีสต์บ่มนาน 48 ชั่วโมง

3.9 อ่านค่า MBC จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ



<u>รูปที่ 3</u> แสดงการทดลองหาค่า MIC โดยวิธี 96-well plate method

4. การทดสอบฤทธิ์กันเสียของสารสกัดฝางในน้ำพริก เป็นการทดลองเพื่อประเมินฤทธิ์กันเสียของฝาง

4.1 เตรียมตัวอย่างของน้ำพริก

4.1.1 กลุ่มควบคุม น้ำพริก 2 กิโลกรัม เติมน้ำสะอาด 50 มิลลิลิลิตร

4.1.2 ฝาง 4 เท่าค่า MIC น้ำพริกเปียก 2 กิโลกรัม เติมฝาง 2 กรัม ที่ละลายในน้ำสะอาด 50 มิลลิลิตร

4.1.3 ฝาง 8 เท่าค่า MIC น้ำพริกเปียก 2 กิโลกรัม เติมฝาง 4 กรัม ที่ละลายในน้ำสะอาด 50 มิลลิลิตร

4.1.4 ฝาง 16 เท่าค่า MIC น้ำพริกเปียก 2 กิโลกรัม เติมฝาง 8 กรัม ที่ละลายในน้ำสะอาด 50 มิลลิลิตร

(<u>หมายเหตุ</u> ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่ใช้คำนวณ คือค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้)

4.2 แบ่งบรรจุในภาชนะ 2 ชนิด คือ แก้วและพลาสติก โดยภาชนะที่เป็นแก้วลวกขวดและฝา ด้วยน้ำเดือดก่อน คว่ำขวดจนแห้งและเป่าด้วยลมร้อน สำหรับภาชนะพลาสติกเป่าด้วยลมร้อนก่อนบรรจุ รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมดมี 8 ตัวอย่าง ดังนี้

กลุ่มควบคุมบรรจุภาชนะแก้ว (cp)

กลุ่มควบคุมบรรจุภาชนะพลาสติก (cg)

ฝาง 4 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (4p)

ฝาง 4 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (4g)

ฝาง 8 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (8p)

ฝาง 8 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (8g)

ฝาง 16 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (16p)

ฝาง 16 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (16g)

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณฝาง

ค่า MIC ของสารสกัดฝางต่อเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่สูงสุด (ไม่รวมค่า MIC ของ *C. albicans* เนื่องจากไม่สามารถอ่านค่าได้) คือ 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งคิดเทียบเท่าเป็น 250 ไมโครกรัม/กรัม หมายความว่า น้ำพริก 1 กรัม ต้องใส่สารสกัดฝาง 250 ไมโครกรัม จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้

ดังนั้น 4 เท่าของค่า MIC จะเท่ากับ 4 x 250 = 1000 ไมโครกรัม ถ้าใส่ในน้ำพริก 2000 มิลลิกรัม ต้องใช้สารสกัดฝางปริมาณ 2000 x 1000 = 2000000 ไมโครกรัม หรือเท่ากับ 2 กรัม

น้ำพริกหลังบรรจุเสร็จ

กลุ่มควบคุม

ฝาง 4 เท่า

ฝาง 8 เท่า

ฝาง 16 เท่า

<u>รูปที่ 4</u> ลักษณะของน้ำพริกตัวอย่างหลังบรรจุเสร็จ กลุ่มควบคุม ฝาง 4 เท่า ฝาง 8 เท่า และ ฝาง 16 เท่า

5. การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยา

มาตรฐาน (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

1.	Total Aerobic Count	< 10^6 CFU/กรัม
2.	MPN Coliforms	< 500 MPN/กรัม
3.	MPN *E.coli*	< 3 MPN/กรัม
4.	*Staphylococus aureus*	< 100 CFU/กรัม
5.	*Bacillus cereus*	< 100 CFU/กรัม
6.	*Salmonella*	ห้ามพบ /25 กรัม
7.	*Clostridium perfringen*	ห้ามพบ / 0.01 กรัม

วิธีการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยา

1. Aerobic Plate Count

1.1 ชั่งน้ำพริก 10 กรัมลงใน Butterfield's phosphate-buffered dilution water (BPW) 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี

1.2 นำมา 1 มิลลิลิตรลงใน BPW 9 มิลลิลิตร (ทำ dilution ตั้งแต่ 10^{-2} ถึง 10^{-6})

1.3 จากความเจือจางต่าง ๆ นำมา 1 มิลลิลิตร pour plate กับอาหาร TSA (ทำ 2 ซ้ำ)

1.4 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

1.5 นับโคโลนี โดยเลือกนับในเพลทที่มีโคโลนี 25 – 250 โคโลนี บันทึกผลและคิดค่า CFU/กรัม

CFU/กรัม = จำนวนโคโลนี / (ปริมาตร × ความเจือจาง)

ToTal Fungi count ทำการทดลองเช่นเดียวกับ Aerobic Plate Count แต่ใช้อาหาร SDA แทน และบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน

2. MPN coliforms and *E. coli*

2.1 ใช้ตัวอย่างที่ทำ dilution จากการทดลองที่ 1 ตั้งแต่ 10^{-1} -10^{-3}

2.2 นำมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร LST 10 มิลลิลิตร ที่มีหลอดดักก๊าซอยู่ โดยทำความเจือจางละ 3 หลอด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.3 ดูผลการเกิดก๊าซ สำหรับหลอดที่ไม่เกิดก๊าซให้บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง

การยืนยันผล coliforms and *E. coli*

- จากหลอดที่เกิดก๊าซ นำมา 1 loop ลงใน EC broth (ที่มีหลอดดักก๊าซ)
- บ่ม 45.5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- ดูผลการเกิดก๊าซ ถ้ามีแสดงว่าเป็น Coliforms นับจำนวนหลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซ (ถ้าไม่เกิดก๊าซบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง) แล้วเทียบค่ากับตารางที่ 1
- จาก EC broth ที่เกิดก๊าซ นำมา streak บน L-EMB agar เพื่อดูว่ามี *E.coli* หรือไม่
- บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
- เลือกโคโลนีที่สงสัยมาทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันต่อไป

3. *Staphylococcus aureus* Plate count

3.1 ใช้ตัวอย่างที่ทำ dilution จากการทดลองที่ 1 ตั้งแต่ 10^{-1} -10^{-6}

3.2 นำมา 0.1 มิลลิลิตร spread ลงบนอาหาร Baird-parker agar (ทำ 2 ซ้ำ)

3.3 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45-48 ชั่วโมง

3.4 เลือกนับเพลทที่มีโคโลนีทั้งหมด 20-200 โคโลนี

3.5 นับเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะเป็น *S. aureus* คือ สีดำ กลม เรียบ นูน ชื้น

3.6 เลือกมา มากกว่า 1 โคโลนี ทดสอบ coagulase ต่อ ถ้าเกิดการ clot แสดงว่าเป็น *S. aureus*

3.6.1 ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB กับ plasma ในอัตราส่วน 1:1 หรือใช้ plasma อย่างเดียว จากนั้นเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบ 1 loop ลงไป

3.6.2 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 12-18 ชั่วโมง

3.7 บันทึกผลและคิดค่า CFU/กรัม

4. *Bacillus cereus* Plate count

4.1 ใช้ตัวอย่างที่ทำ dilution จากการทดลองที่ 1 ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-6}

4.2 นำมา 0.1 มิลลิลิตร spread ลงบนอาหาร Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar (ทำ 2 ซ้ำ)

4.3 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45-48 ชั่วโมง

4.4 เลือกนับเพลทที่มีโคโลนีทั้งหมด 15-150 โคโลนี

4.5 นับเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะ แห้ง ขรุขระ และมีการตกตะกอนของไข่รอบ ๆ โคโลนี แล้วอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4.6 เลือกโคโลนี และลงบน NA slant และนำมาทดสอบทางชีวเคมีต่อไป

5. การตรวจหา *Salmonella*

5.1 ตัวอย่างน้ำพริก 10 กรัมลงใน Buffer peptone water 225 มิลลิลิตร

5.2 นำมา 1 มิลลิลิตร ลงใน Selenite cystine (SC) broth และ Tetrathionate (TT) broth 10 มิลลิลิตร

5.3 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

5.4 จาก SC และ TT broth นำมา Streak ลงบนอาหาร Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar, Bismuth sulfite (BS) agar และ SS agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

5.5 เลือกโคโลนีที่สงสัยมาทดสอบทางชีวเคมี

6. *Clostridium perfringens*

6.1 ใช้ตัวอย่างที่ทำ dilution จากการทดลองที่ 1 ที่ความเจือจาง 10^{-1}

6.2 นำมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร RCM และอีก 10 มิลลิลิตรนำไปให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และจึงนำมาใส่ลงในอาหาร RCM 90 มิลลิลิตร เททับด้วย paraffin บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

6.3 นำมาเพาะเชื้อลงบนอาหาร Columbia agar ที่ผสม gentamycin และบ่มใน anaerobic jar ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

6.4 ถ้าพบเชื้อขึ้นให้นำมาเพาะเชื้อต่อบนอาหาร Columbia agar และแยกบ่มทั้งแบบ aerobicและบ่มใน anaerobic jar ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

6.5 ถ้าพบเชื้อขึ้นในสภาวะ anaerobe ให้นำมาย้อมแกรมดูรูปร่าง และทดสอบ catalase ถ้าให้ผลแกรมบวกและมีรูปร่างท่อนปลายตัด และ catalase test ให้ผลลบ แสดงว่าเป็น *C. perfringens*

<u>ตารางที่ 1</u> ตารางการแปลผล MPN test ในการทดสอบเชื้อ coliform และ *E.coli*

Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

การทดลองทางเคมีวิเคราะห์

อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย

1. แผ่น Silica gel GF 254
2. TLC chamber
3. เครื่อง Spectrophotometry
4. เครื่อง Ultrasonic Bath
5. Syringe 100 ไมโครลิตร
6. เครื่อง Densitometer
7. Volumetric Flask ขนาด 50, 100 มิลลิลิตร
8. Beaker ขนาด 50, 100,250 มิลลิลิตร
9. Dryer

สารเคมี

1. Haematoxylin : Lot & filling code 446086/1 30704291 Fluka Chemie, Switzerland.
2. Brazilin : CI 75280 Catalog # 860, Anatech LTD. Lot 2956
3. Ethyl Acetate : analytical reagent AR Code No.A3513 J, Batch No.04080097, Lab scan Asia Co,Ltd
4. Acetone : code No. A3501 J, Batch No. 02021110, Lab scan Asia Co,Ltd
5. Methanol : analytical reagent AR Code No. A3513 J, Batch No.01/07/1051, Lab scan Asia Co,Ltd
6. Dichlorometane
7. Concentrated Hydochloric acid
8. Aluminium Alum
9. Hydrochloric acid (1:100)
10. Sodium Hydroxide (1M)
11. Glacial acetic acid

1. **การตรวจสอบสารสำคัญในสารสกัดฝางด้วยวิธี** Thin Layer Chromatography (TLC)

1.1 ทดลองหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทำละลายสารสกัดฝาง

ทำละลายสารสกัดฝางในตัวทำละลาย ดังแสดงในตารางที่ 2 เปรียบเทียบการละลายและการเปลี่ยนแปลงของสารละลาย

ตารางที่ 2 ตัวทำละลายในการทดสอบการละลายของสารสกัด

ลำดับที่	ตัวทำละลาย	อัตราส่วน
1	MeOH : NaOH (1 M)	3 : 0.7
2	MeOH	-
3	Acetone : conc.HCl	3 : 1
4	MeOH : conc. HCl	3 : 0.7
5	HCl (1 : 100)	-

1.2 ทดลองหา Solvent system ที่เหมาะสมในการสกัดแยกสาร

ทำการ run TLC โดยนำสารสกัดฝางละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม ไป spot บนแผ่น TLC ที่มี Silica gel GF_{254} เป็นเฟสคงที่เทียบกับสารมาตรฐาน Brazilin และ Haematoxylin ดังนี้

1.2.1 เตรียมแต่ละ Solvent system ให้มีปริมาตรประมาณ 10 มิลลิลิตร โดยทดลองใน 5 system ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดและอัตราส่วนของสารที่ใช้เป็น Solvent system

system	solvent	ratio
A	Ethyl Acetate : CH_3OH	4:1
B	Ethyl Acetate : CH_2Cl_2	4:1
C	Ethyl acetate (EA)	-
D	EA : glacial acetic acid	4:1
E	EA : CH_3OH : NH_4OH	4:1:1

1.2.2 เท solvent system ลงใน chamber แล้วทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้ chamber อิ่มตัว

1.2.3 นำแผ่น TLC ที่ spot สารสกัดฝางและสารมาตรฐานใน chamber อิ่มตัวด้วย mobile phase

1.2.4 develop TLC จนถึง solvent front ที่กำหนด

1.2.5 ประเมินหา system ที่เหมาะสม

1.3 ศึกษาลักษณะโครมาโตกราฟฟีใน Solvent system ที่เหมาะสม โดยใช้เครื่อง Densitometer

1.3.1 นำสารสกัดฝางมา spot บนแผ่น TLC ที่มี Silica gel GF_{254} เป็นเฟสคงที่โดยแต่ละแผ่นจะประกอบด้วย spot ของสารสกัดฝาง สารมาตรฐาน Brazilin และ Haematoxylin ทำซ้ำ 3 ครั้ง

1.3.2 ทำการ run TLC ใน chamber ที่อิ่มตัวด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม

1.3.3 เมื่อเฟสเคลื่อนที่เคลื่อนที่ถึงตำแหน่งที่ต้องการจึงนำแผ่น TLC ออกมาให้ความร้อนเพื่อไล่เฟสเคลื่อนที่ด้วย dryer

1.3.4 นำไปตรวจสอบโดยการส่องภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

1.3.5 เปรียบเทียบค่า Rf value

2 การตรวจสอบชนิดและปริมาณสารสำคัญในสารสกัดฝางด้วยวิธี spectrophotometry

2.1 การตรวจหาความยาวคลื่น (λ) ที่ให้ค่าการดูดกลืนรังสี UV สูงสุด (λ max) ของ Brazilin

2.1.1 ชั่งสารมาตรฐาน Brazilin 50 มิลลิกรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.1.2 เติม Ammonium Alum 2 กรัม เติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องอัลตราโซนิคเป็นเวลา 10 นาที

2.1.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตในช่วงความยาวคลื่น 200 – 800 นาโนเมตร

2.1.4 บันทึกสเปกตรัมการดูดกลืนรังสี UV ของสารมาตรฐาน Brazilin ที่ให้ค่าดูดกลืนรังสี UV สูงสุด

2.2. การสร้างกราฟมาตรฐาน

2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Brazilin 7 ความเข้มข้น โดยให้มีความเข้มข้นดังตารางที่12

2.2.2 นำไปวัดค่าดูดกลืนรังสี UV ที่ 505 nm (จากผลการทดลองข้อ 2.1) และบันทึกผลการทดลอง

2.2.3 หาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนรังสี UV กับความเข้มข้นของสารละลาย Brazilin

2.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างของสารสกัดฝาง

2.3.1 ชั่งสารสกัดฝาง 50 มิลลิกรัม ใส่ใน vol. flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี Ammonium alum 2 กรัม

2.3.2 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปทำละลายด้วยเครื่องอัลตราโซนิค เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร

2.3.3 นำไปวัดค่า Absorbance (λ = 505 nm) ทำซ้ำ 3 ครั้ง บันทึกผล

2.3.4 นำผลการทดลองไปวิเคราะห์หาปริมาณ Brazilin (ไมโครกรัม) ในสารสกัดฝาง 1 มิลลิกรัม (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม)

ผลการวิจัย

ผลการทดลองทางจุลชีววิทยา

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อตัวอย่าง 4 ชนิดด้วยการหาค่า MIC และ MBC

จากผลการทดลองจะเห็นว่า สารสกัดฝางมีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญ เติบโตของเชื้อ (MIC) ต่อเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ *S.aureus* ATCC 6538, *E.coli* ATCC 2592, *S.typhimurium* ATCC 13311 ซึ่งได้ค่า MIC ดังนี้ 125, 250, 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ Haematoxylin ได้ค่า MIC ดังนี้ 62.5, 125, 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และ Brazilin ได้ค่า MIC ดังนี้ 250, 500, 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับค่าความเข้มข้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) ต่อ *C.albicans* ATCC 10231 ไม่สามารถสังเกตผลได้

หลังจากนำมาทดลองหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อได้ (MBC) ต่อเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ *S.aureus* ATCC 6538, *E.coli* ATCC 2592, *S.typhimurium* ATCC 13311, *C.albicans* ATCC 10231 ได้ผลดังนี้ สารสกัดฝางมีค่า MBC ดังนี้ 125, 500, 500 และ 16000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ Haematoxylin มีค่า MBC ดังนี้ 125, 250, 500 และ 4000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และ Brazilin มีค่า MBC ดังนี้ 250, 1000, 1000 และ 8000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า Haematoxylin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดีที่สุด รองลงมาคือ สารสกัดฝาง และ Brazilin ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

<u>ตารางที่ 4</u> แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อตัวอย่าง *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium* ATCC 13311 และ *C. albicans* ATCC 10231

สารที่ใช้ทดสอบ / **เชื้อที่ใช้ทดสอบ**	Haematoxylin		**สารสกัดฝาง**		Brazilin	
	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
S. aureus ATCC 6538	62.5	125	125	125	250	250
E. coli ATCC 25922	125	250	250	500	500	1000
S. typhimurium ATCC 13311	250	500	250	500	1000	1000
C. albicans ATCC 10231	อ่านผลไม่ได้	4000	อ่านผลไม่ได้	16000	อ่านผลไม่ได้	8000

<u>หมายเหตุ</u> อ่านผลไม่ได้เนื่องจากสารมีสีเข้ม และมีตะกอนของสารที่ก้นหลุม

(µg/ml = ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

2. **ผลการทดสอบฤทธิ์กันเสียของฝางในน้ำพริกตัวอย่าง**

จากการตรวจสอบตามเกณฑ์มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่เวลา วันที่เริ่มเก็บน้ำพริกตัวอย่าง เดือนที่ 1, 2 และ 3 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (x 10^2 cfu/กรัม) ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก

* ตัวอย่าง / เดือน	cp	cg	2p	2g	4p	4g	8p	8g
0	59	77	86	66.5	85.5	68	88	86
1	125	101.5	51	60.5	69	28.5	44	34
2	107	99	68	70	48	70	44	68
3	84.5	93.5	59.5	41	44	73.5	48	60

ตารางที่ 6 จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (cfu/กรัม) ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก

* ตัวอย่าง / เดือน	cp	cg	2p	2g	4p	4g	8p	8g
0	360	840	545	660	680	645	755	815
1	245	60	165	180	40	95	50	285
2	595	570	410	270	350	370	265	510
3	150	360	125	95	195	80	85	55

* กลุ่มควบคุมบรรจุภาชนะแก้ว (cp)
กลุ่มควบคุมบรรจุภาชนะพลาสติก (cg)
ฝาง 4 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (4p)
ฝาง 4 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (4g)
ฝาง 8 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (8p)
ฝาง 8 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (8g)
ฝาง 16 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (16p)
ฝาง 16 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (16g)

ตารางที่ 7 MPN Coliforms ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก

* ตัวอย่าง / เดือน	cp	cg	2p	2g	4p	4g	8p	8g
0	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
1	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
2	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

ตารางที่ 8 จำนวน *E.coli* ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก

* ตัวอย่าง / เดือน	cp	cg	2p	2g	4p	4g	8p	8g
0	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
1	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
2	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

* กลุ่มควบคุมบรรจุภาชนะแก้ว (cp)
กลุ่มควบคุมบรรจุภาชนะพลาสติก (cg)
ฝาง 4 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (4p)
ฝาง 4 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (4g)
ฝาง 8 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (8p)
ฝาง 8 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (8g)
ฝาง 16 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (16p)
ฝาง 16 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (16g)

<u>ตารางที่ 9</u> จำนวน *S.aureus* (cfu/g) ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก

* ตัวอย่าง / เดือน	cp	cg	2p	2g	4p	4g	8p	8g
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-

<u>ตารางที่ 10</u> จำนวน *B.cereus (x)*, จำนวน *Salmonella (y)*, จำนวน *C. perfringen (z)* ที่ตรวจพบในตัวอย่างน้ำพริก

*sam / เดือน	cp			cg			2p			2g			4p			4g			8p			8g		
	x	*y*	*z*	*x*	*y*	*z*	*x*	*y*	*z*	*x*	*y*	*z*	*x*	*y*	*z*	*x*	*y*	*z*	*x*	*y*	*z*	*x*	*y*	*z*
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* กลุ่มควบคุมบรรจุภาชนะแก้ว (cp)
กลุ่มควบคุมบรรจุภาชนะพลาสติก (cg)
ฝาง 4 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (4p)
ฝาง 4 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (4g)
ฝาง 8 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (8p)
ฝาง 8 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (8g)
ฝาง 16 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะแก้ว (16p)
ฝาง 16 เท่าค่า MIC บรรจุภาชนะพลาสติก (16g)

ผลการทดลองทางเคมีวิเคราะห์

ผลการตรวจสอบสารสำคัญในสารสกัดฝางด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC)

1. Solvent system ที่เหมาะสมในการสกัดแยกสาร

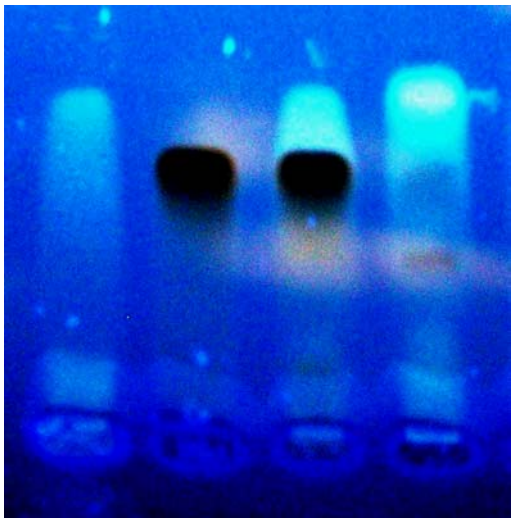
จากการเปรียบเทียบลักษณะของแถบสารที่ได้จากการสกัดสาร ได้ Solvent system ที่เหมาะสม คือ Ethyl acetate (EA)

ตารางที่ 11 ชนิดและอัตราส่วนของสารที่ใช้เป็น Solvent system

system	solvent	ratio	**ลักษณะแถบ**
A	Ethyl Acetate : CH_3OH	4:1	เอียงออกนอกแผ่น แยกได้ไม่ชัดเจน
B	Ethyl Acetate : CH_2Cl_2	4:1	สารไม่ถูก elute จากจุด spot
C	Ethyl acetate (EA)	-	แถบสารแยกกันชัดเจน
D	EA : glacial acetic acid	4:1	เอียงออกนอกแผ่น แยกได้ไม่ชัดเจน
E	EA : CH_3OH : NH_4OH	4:1:1	เอียงออกนอกแผ่น แยกได้ไม่ชัดเจน

2. ผลการศึกษาลักษณะโครมาโตกราฟฟีใน Solvent system ที่เหมาะสม

ในสารสกัดฝางที่นำมาทดลอง ตรวจพบสาร Brazilin แต่ไม่สามารถตรวจพบ Haematoxylin โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานของ Brazilin และ Haematoxylin ดังแสดงในรูปที่ 5



1 2 3 4

1 = Brazilin

2 = Haematoxylin

3 = Brazilin + Haematoxylin

4 = สารสกัดฝาง

รูปที่ 5 แสดงแถบสารที่ได้จากการสกัดแยกด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ใน solvent system (EA) ภายใต้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

ผลการตรวจสอบสารด้วยวิธี spectrophotometry

เนื่องจากการตรวจสอบด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) ไม่สามารถตรวจพบ Haematoxylin ได้ ในการตรวจสอบด้วยวิธี spectrophotometry จึงวิเคราะห์ปริมาณของ Brazilin เพียงชนิดเดียว

1. ผลการทดลองหา λ ที่ให้ค่าการดูดกลืนรังสี UV สูงสุด (λ max) ของ Brazilin

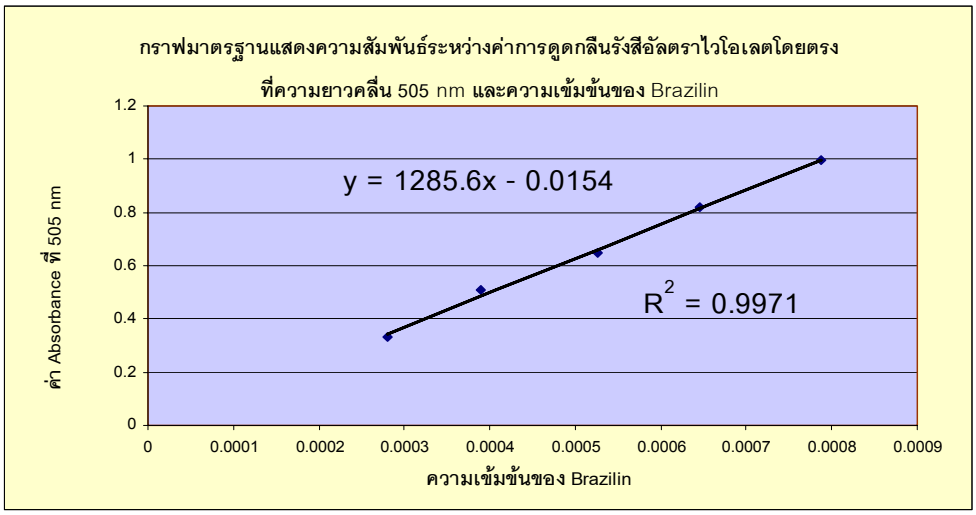
ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตสูงสุด (λ max) ของ Brazilin เท่ากับ 505 นาโนเมตร

2. การสร้างกราฟมาตรฐานของ Brazilin

จากการนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ไปวัดค่าดูดกลืนรังสี UV ที่ 505 nm ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 นำผลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนรังสี UV ที่ 505 nm และความเข้มข้นของ Brazilin จะได้กราฟมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ 6

ตารางที่ 12 ค่าการดูดกลืนรังสี UV ที่ 505 nm และความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Brazilin

Brazilin (mg/ml)	Absorbance (λ = 505 nm)
0	0.000
0.000288	0.333
0.000390	0.508
0.000526	0.648
0.000646	0.817
0.000788	0.998
0.000900	1.095



<u>รูปที่ 6</u> กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนรังสี UV โดยตรงที่ความยาวคลื่น 505 nm และความเข้มข้นของ Brazilin

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณ Brazilin ในสารสกัดฝางด้วยวิธี spectrophotometry

จากการวิเคราะห์ สารสกัดฝาง 1 กรัม มีปริมาณของ Brazilin 1.68 ไมโครกรัม คิดเป็น 0.168 %

การทดลอง	ค่าดูดกลืนรังสี UV (λ = 505 nm)	ความเข้มข้นของ Brazilin ในสารสกัดฝาง (mg/ml)	ปริมาณ Brazilin ในสารสกัดฝาง 1 mg (µg)
ครั้งที่ 1	0.442	0.000332	1.61
ครั้งที่ 2	0.455	0.000342	1.71
ครั้งที่ 3	0.477	0.000359	1.72
ค่าเฉลี่ย			1.68

<u>ตารางที่ 13</u> ผลการวัดค่าดูดกลืนรังสี UV ที่ 505 นาโนเมตร ของสารสกัดฝาง และปริมาณ Brazilin ในสารสกัดฝาง 1 มิลลิกรัม (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม)

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลอง ในส่วนของการทดลองทางจุลชีววิทยา สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งและฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลชีพดีที่สุด คือ Haematoxylin รองลงมาได้แก่ สารสกัดของฝาง และ Brazilin ตามลำดับ และการใช้สารสกัดของฝางเป็นวัตถุกันเสียในน้ำพริกตัวอย่าง พบว่าสามารถลดปริมาณแบคทีเรียและเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ทำให้สีและกลิ่นของน้ำพริกตัวอย่างเปลี่ยนแปลง ดังนั้นจึงสามารถนำสารสกัดฝางมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปประเภทน้ำพริกได้

สำหรับในส่วนของการทดลองทางเคมีวิเคราะห์ ด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography โดยใช้ Silica gel GF_{254} เป็น stationary phase ทำละลายสารสกัดของฝาง ใน methanol ผสมกับ concentrated hydrochloric acid ในอัตราส่วน 3:0.7 และใช้ ethyl acetate เป็น solvent system พบว่า สารสกัดของฝางดังกล่าว ให้ chromatogram เพียง 1 แถบ ซึ่งเมื่อพิจารณาจากค่า Rf value แล้วได้ผลว่าเป็น Brazilin และไม่สามารถตรวจพบ Haematoxylin จึงเป็นไปได้ว่าในสารสกัดดังกล่าวน่าจะมี Brazilin เพียงอย่างเดียว หรืออาจมีปริมาณของ Haematoxylin น้อยเกินกว่าที่จะตรวจพบได้ ซึ่งหลังจากนำมาตรวจสอบด้วยวิธี spectrophotometry พบว่า Brazilin มีการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตสูงสุดที่ 505 นาโนเมตร และมีปริมาณของ Brazilin ในสารสกัดของฝาง คิดเป็น 0.168%

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. จากการทดลองหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *C. sappan* ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ (MIC) ด้วยวิธี well method ไม่สามารถอ่านผลของ *Candida albican* ได้ เนื่องจากสารตัวอย่างมีความเข้มข้นมาก ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายได้หมด และสารตัวอย่างมีสีเข้มจัด หลังจากนำ well ไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผล พบตะกอนขุ่นอยู่ที่ก้นหลุมใน หลุมที่ 1-6 ประกอบกับสารละลายมีสีเข้ม จึงไม่สามารถบอกได้ว่าสารตะกอนดังกล่าวเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นหรือคือผงของสารที่ละลายในตัวทำละลายได้ไม่หมด ซึ่งเมื่อนำไปทดลองหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *C. sappan* ที่สามารถทำลายเชื้อได้ (MBC) ด้วยวิธี

plate method ซึ่งสังเกตผลได้ง่ายเนื่องจาก agar มีลักษณะใส ได้ผลการทดลองดังที่ระบุไว้ในผลการทดลอง ซึ่งไม่สอดคล้องกับค่า MIC อาจเป็นผมาจากสารตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด มีความเข้มข้นมาก ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายให้เป็นสารละลายเนื้อเดียว เมื่อนำไปเจือจางใน well แบบ 2-fold serial ทำให้ความเข้มข้นของสารในหลุมเปลี่ยนแปลงไป

2. ในการวิเคราะห์ส่วนประกอบในสารสกัดฝาง โดยละลายสารใน methanol :conc. hydrochloric acid และใช้ ethyl acetate เป็น solvent system พบว่ายังเกิด tailing อยู่บ้าง อาจเนื่องมาจาก solvent system ยังไม่เหมาะสม และไม่พบแถบสีของสาร Haematoxylin ซึ่งอาจเป็นเพราะไม่มีสารดังกล่าวในสารสกัดฝาง หรือสารมีปริมาณน้อยเกินกว่าที่จะสามารถตรวจสอบได้

3. เนื่องจากสาร Brazilin เป็นสารที่ถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย ดังนั้นในการวิเคราะห์ส่วนประกอบและปริมาณของ Brazilin ในสารสกัดฝาง ด้วยวิธี spectrophotometry ต้องทำ freshy prepare และใส่ ammonium alum เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยจะไปจับกับ Brazilin เกิดเป็น complex ที่ stable

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดฝาง ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพทั้ง 4 ชนิดได้ อาจเปลี่ยนแปลงวิธีการทดลอง เป็นการทดสอบในหลอดทดลอง ซึ่งอ่านผลได้ชัดเจน อาจทำการเปลี่ยนตัวทำละลาย หรือใส่สารช่วยทำละลาย เพื่อให้สารละลายได้ดียิ่งขึ้น และเป็นเนื้อเดียวกัน

2. อาจทำการทดลองเพื่อหาตัวทำละลาย และ solvent system ที่เหมาะสมมากยิ่งขึ้น เพื่อลดการเกิด tailing ในการทดสอบด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography

3. ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารสำคัญในสารสกัดฝาง ด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography และ spectroscopy อาจมีความละเอียดไม่เพียงพอ จึงอาจเลือกใช้วิธีวิเคราะห์อื่นที่มีความละเอียดมากยิ่งขึ้น เช่น High Performance Liquid Chromatography แทน เพื่อให้ได้ผลการทดองที่ถูกต้อง แม่นยำ นอกจากนี้อาจพบสารอื่น ๆ ที่สามารถนำมาวิเคราะห์และพัฒนาต่อไป

4. จากข้อมูลที่ได้ศึกษาและค้นคว้า พบว่ายังมีพืชสมุนไพรที่น่าสนใจและมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพอีกหลายชนิด ซึ่งควรมีการนำมาศึกษาเพื่อนำมาใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

5. ในการสร้างกราฟมาตรฐาน ควรมีการกำหนดค่า concentration ของสารก่อน โดยทำการประเมินคร่าว ๆ ให้อยู่ในช่วง 0.2-0.8 เพื่อความสะดวกในการ plot graph

6. สำหรับการนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์ ต้องมีการตรวจสอบเทคโนโลยี และ ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยา

7. เพื่อความมั่นใจได้ว่า ผลิตภัณฑ์น้ำพริกที่นำมาใช้ในการวิจัย ไม่มีการใส่สารกันเสียมาก่อน ซึ่งจะทำให้ผลการวิจัยทั้งหมดคลาดเคลื่อนไปนั้น ผู้ทำการวิจัยควรเตรียมน้ำพริกที่ใช้ในการทดสอบขึ้นเอง

เอกสารอ้างอิง

1. Mi-Youn Lim,et.al. Antimicrobial activity of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone isolated from *Caesalpinia sappan* toward intestinal bacteria *Food Chemistry, 100, 3, 2007, 1254-1258*
2. Y.W. Xie, D.S. Ming, H.X. Xu, H. Dong and P.P. But, Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sappan* involvement of endogenous nitric oxide, *Life Sci* 67 (2000), pp. 1913–1918.
3. N.I. Baek, S.G. Jeon, E.M. Ahn, J.T. Hahn, J.H. Bahn and Js. Jang *et al*., Anticonvulsant compounds from the wood of *Caesalpinia sappan* L, *Arch Pharm Res* 23 (2000), pp. 344–348.
4. F.C. de Oliveira Luiz, G.M. Edwards Howell, S. Velozo Eudes and M. Nesbitt, Vibrational spectroscopic study of brazilin and brazilein, the main constituents of brazilwood from Brazil, *Vib Spectrosc* 28 (2002), pp. 243–249.
5. H.X. Xu and S.F. Lee, The antibacterial principle of *Caesalpina sappan*, *Phytother Res* 18 (2004), pp. 647–651
6. H. Hikino, T. Taguchi, H. Fujimura and Y. Hiramatsu, Antiinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* wood and of *Haematoxylon campechianum* wood, *Planta Med.* 31 (1977), pp. 214–220.
7. V.L., Ravikanth, V., Jansi Lakshmi, V.V.N.S., Suryanarayan Murty, U. and Venkateswarlu, Y., 2003. Inhibitory activity of homoisoflavonoids from *Caesalpinia sappan* against *Beauveria bassiana*. *Fitoterapia* 74, pp. 600–602.
8. Asif Saeed, M., Sabir, A.W.Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds (2001) *Fitoterapia*, 72 (7), pp. 807-809.
9. Bahia, M.V., Dos Santos, J.B., David, J.P., David, J.M. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae) *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16 (6 B), pp. 1402-1405
10. Indrayan, A.K., Sharma, A., Guleria, B.S., Gupta, C.P. Antimicrobial activity of dye from *Caesalpinia sappan* (Patang/Brazilwood) *Indian Journal of Microbiology* 42 (4), pp. 359-360.

11. Ali, M.S., Azhar, I., Amtul, Z., Ahmad, V.U., Usmanghani, K. **Antimicrobial screening of some Caesalpiniaceae** (1999) *Fitoterapia*, 70 (3), pp. 299-304.

12. Guleria, B.S., Manav, A.K., Indrayan, A.K. **Isolation and Extraction of Medicinally Useful Dye from the Heartwood of *Caesalpinia sappan* Linn. using Different Solvents** (1997) *Asian Journal of Chemistry*, 9 (4), pp. 816-818.

13. Oh, S.R., Kim, D.S., Lee, I.S., Jung, K.Y., Lee, J.J. and Lee, H.K., 1998. **Anticomplementary activity of constituents from the heartwood of *Caesalpinia sappan*.** *Planta Medica* 64, pp. 456–458.

14. โยธิน คำอุดม, รชตะ ปาระดี. **โรคผิวหนังจากเชื้อราและความไวของเชื้อสาเหตุต่อสารสกัดชุมเห็ดเทศ**. [*โครงการพิเศษปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต*]. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย มหิดล; 2543.

15. รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, สุมาลย์ สาระยา, ยุวดี วงษ์กระจ่าง, นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, วงศ์สถิต ฉั่วสกุล. **การศึกษาวัตถุกันเสียจากสมุนไพรเพื่อยืดอายุผลิตภัณฑ์น้ำพริกชุมชน**. *วารสารอาหารและยา* 2549; 2(13): 34-45.

16. ฤทัยวรรณ นพเก้า, ลินดา ประทุมทอง. **การศึกษาลักษณะทางโครมาโทกราฟีของสารสกัดจากพืชจำพวกมะระและคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชั่นของสารสกัด**. [*โครงการพิเศษปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต*]. กรุงเทพฯ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2546.

17. สมฤทัย บูรพาศิริวัฒน์, สุภัชชา หมื่นแก้ว. **การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของยาต้านจุลชีพต่อเชื้อ *Escherichaiae coli* ในหลอดทดลอง**. [*โครงการพิเศษปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต*]. กรุงเทพฯ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2547.