บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลพืชสมุนไพร

หน่อกะลา

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Alpinia nigra* B. L. Burrt

ชื่อวงศ์ : Zingiberaceae

ชื่ออื่น ๆ : ข่าน้ำ, กะลา, เร่วน้อย เป็นต้น

ผศ. ดร. จันทนา กาญจน์กมล ได้กล่าวถึงหน่อกะลาว่า หน่อกะลา หรือข่าน้ำ มีสรรพคุณเป็นสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae อยู่ในวงศ์เดียวกันกับข่า และเร่ว แต่เร่วมีความต่างทางสายพันธุ์ หน่อกะลาเป็นไม้เนื้ออ่อนที่ขึ้นได้ทั้งบนบกและริมน้ำหรือที่ที่มีน้ำขัง ส่วนมากมักจะขึ้นในท้องร่องสวน ลำต้นเทียม สูง 1.5-2 เมตร แตกกอแน่น ใบเดี่ยวเรียงสลับเป็นสองแถว ใบรูปขอบขนาน ช่อดอกออกที่ปลายใบ เป็นช่อแยกแขนง ลักษณะช่อดอกจะยาว กลีบดอกเป็นสีขาวอมชมพู ก่อนช่อดอกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จะมีผลกลมสีเขียวขนาดเท่าเมล็ดบัว เมื่อผลแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและสีดำ เหง้ามีรสจืดและมีกลิ่นที่อ่อนกว่าข่า มีชื่อเป็นภาษาท้องถิ่นต่าง ๆ เช่น ประเทศอินเดียเรียกว่า ทาลังคา ทาลูโค ส่วนในประเทศไทย คนไทยเชื้อสายรามัญ (มอญ) โดยทั่วไปเรียกว่าต้นกูม คนไทยเรียกว่าต้นกะลา และเมื่อนำหน่อมารับประทานจึงเรียกว่าหน่อกะลาหรือข่าน้ำ

พบพืชชนิดนี้โดยทั่วไปในดินเลนบริเวณร่องสวน และที่มีน้ำเฉอะแฉะ บนพื้นที่เกาะเกร็ด จังหวัดนนทบุรี หน่อกะลาเป็นพืชสมุนไพรที่ช่วยขับลม แก้ร้อนใน ชาวบ้านในเกาะเกร็ดมักจะนำมาประกอบอาหารหลายชนิด เช่น ทอดมันกะลา ต้มจิ้มน้ำพริก หรือใช้แทนข่าสำหรับทำต้มยำ เหง้า และดอกของหน่อกะลาสามารถใช้พอกแผลแก้ผื่นคันตามผิวหนัง เป็นภูมิปัญญาไทยที่กล่าวว่าสามารถยับยั้งเชื้อราบนผิวหนังและหนองฝีได้หลายชนิด ผล รักษาโรคท้องอืด แน่นเฟ้อ จุกเสียด ราก รักษาอาการหืดหอบ หน่อกะลาสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายชนิด คนไทยจะรับประทานไม่เป็น จึงถือเป็นอาหารพื้นเมืองของชาวมอญดั้งเดิม เช่น นำมาแทนถั่วฝักยาวในทอดมัน สามารถใช้เป็นผักจิ้มน้ำพริก ทั้งรับประทานสดหรือนำมาต้ม อาจใช้ใส่ในแกงส้ม ห่อหมก ผัดกะเพรา แกงคั่วหอย ผัดเผ็ดปลา และอื่น ๆ อีกมากมาย ที่มาของชื่อพื้นเมืองอีกอย่างของหน่อกะลาก็คือ ข่าน้ำ เพราะสามารถใช้แทนข่าจริง ๆ เพื่อใช้ในการต้มยำ หรือต้มข่าไก่ ความเชื่อของชาวมอญเชื่อว่า รับประทานหน่อกะลาแล้วท้องไส้จะสบาย เพราะมีสรรพคุณ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ขับลมเหมือนขิง ข่า ขมิ้น และยังไปช่วยกวาดลำไส้ทำให้ขับถ่ายสะดวก ซึ่งจะไม่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งลำไส้ จึงถือเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่ทรงคุณค่าควรแก่การอนุรักษ์และทำวิจัยขั้นสูงต่อไป

เนื่องจากหน่อกะลาเป็นพืชน้ำที่ขึ้นอยู่ทั่วไปบนเกาะเกร็ด จังหวัดนนทบุรีเพียงที่เดียวในประเทศไทย ชาวบ้านบนเกาะเกร็ดแต่เดิมไม่เคยนิยมรับประทานกันมากนัก แต่ปัจจุบันเป็นพืชพื้นบ้านที่มีชื่อเสียง จึงนิยมนำมาบริโภคและขายกันเป็นจำนวนมาก โดยไม่มีการปลูกทดแทน ประกอบกับพื้นที่แถบบริเวณนี้มีความเจริญจากสังคมเมือง มีคนเข้าไปอาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม หรือเกิดจากการทำลายของมนุษย์เอง ก่อให้เกิดปัญหาเรื่องมลภาวะ แหล่งน้ำเสีย จึงเป็นสาเหตุให้หน่อกะลาลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว พื้นที่บางแห่งได้สูญพันธุ์หรือกำลังจะสูญพันธุ์ไปอย่างน่าเป็นห่วง และหากไม่มีการส่งเสริมให้ปลูกทดแทนในไม่ช้า พืชชนิดนี้อาจสูญพันธุ์ไปในที่สุด

ภาพที่ 2-1 หน่อกะลา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้นไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีใดหรือใช้ตัวทำละลายใดก็จะได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดหยาบ (Crude Extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกจากสมุนไพร โดยใช้น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย (Solvent) สารสกัดหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรซึ่งจะมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacologically Active Constituents) ซึ่งมักเรียกว่าสารสำคัญ (Active Constituents) และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacologically Inactive Constituents) ซึ่งเรียกว่า สารเฉื่อย (Inert Substances) โดยชนิดและสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดหยาบจะแปรเปลี่ยนไปตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการสกัด (วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

วิธีการสกัด

1. มาเซอเรชัน (Maceration)

เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยการหมักสมุนไพรกับน้ำยาสกัด จนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่ม และน้ำยาสกัดสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้

การหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท ในการสกัดจะใช้เวลานาน 7 วัน หรือตามกำหนดในเภสัชหรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ในระหว่างการหมักนั้นควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกาก (Marc) ออกจากน้ำยาสกัด การสกัดแบบนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีสกัดโดยใช้น้ำยาสกัดน้อย จึงประหยัด วิธีการสกัดแบบนี้มักจะไม่สมบูรณ์เนื่องจากไม่มีการเคลื่อนที่ของน้ำยาสกัด การสกัดแบบนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้สกัดในกรณีที่ต้องการสกัดสาระสำคัญจากสมุนไพรออกอย่างสมบูรณ์

เนื่องจากวิธีการสกัดแบบมาเซอเรชันช้า และใช้เวลานาน จึงมีผู้ดัดแปลงใช้มิกเซอร์ (Mixer) หรือโฮโมเจไนเซอร์ (Homogenizer) มาช่วยทำให้เซลล์พืชแตกออกก่อนทำการสกัด เพื่อย่นเวลาในการสกัด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. เพอร์โคเลชัน (Percolation)

เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรโดยการปล่อยให้น้ำยาสกัดไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้า ๆ พร้อมกับละลายเอาองค์ประกอบออกจากผงสมุนไพรออกมา โดยใช้เครื่องมือ ที่เรียกว่า เพอร์โคเลเตอร์ (Percolator)

วิธีการทำเพอร์โคเลชัน คือ นำผงสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายก่อน 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่แล้วค่อยๆ บรรจุผงสมุนไพรทีละชั้นลงในเพอร์โคเลเตอร์ ซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ (Column) ปลายปิดทั้งสองด้าน โดยด้านบนจะกว้างกว่าด้านล่างเพื่อความสะดวกในการบรรจุผงสมุนไพร ส่วนปลายด้านล่างเปิดปิดได้ เพื่อควบคุมอัตราการไหลของสารสกัดจากเพอร์โคเลเตอร์ได้ จากนั้นเติมตัวทำละลายหรือน้ำยาสกัด (Menstruum) ลงไปให้น้ำยาสกัดสูงเหนือสมุนไพร (Solvent Head) ประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงปล่อยให้น้ำยาสกัดไหลผ่านผงสมุนไพรในอัตราเร็วที่พอเหมาะ พร้อมกับเติมน้ำยาสกัดลงไปเรื่อย ๆ อย่าให้แห้งเก็บเพอร์โคเลตจนการสกัดสมบูรณ์และนำเพอร์โคเลตที่ได้จากการสกัดไปกรอง

วิธีเพอร์โคเลชันจัดเป็นวิธีการสกัดที่ดีสำหรับการสกัดสารจากสมุนไพรแบบสมบูรณ์และไม่ต้องใช้ความร้อน แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ เปลืองน้ำยาสกัดและใช้ระยะเวลานาน ดังนั้นจึงมีการดัดแปลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดสาร โดยใช้เพอร์โคเลเตอร์ต่อกันหลายตัว และให้มีการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเข้าหากัน

3. การสกัดแบบต่อเนื่อง (Continuous Extraction)

เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรทำนองเดียวกับเพอร์โคเลชันแต่ต้องใช้ความร้อนเข้าช่วย และใช้ซ็อกเล็ทเอกซ์แทรกเตอร์ (Soxhlet Extractor) ซึ่งเป็นระบบปิดโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ เมื่อได้ความร้อนจากเครื่องให้ความร้อน (Heating Mantle) น้ำยาสกัดในภาชนะ จะระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาในทิมเบิล (Thimble) ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ น้ำยาสกัดจะผ่านผงสมุนไพรซ้ำแล้วซ้ำอีกไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งองค์ประกอบในสมุนไพรถูกสกัดออกมา เมื่อน้ำยาสกัดในเอกซ์แทรกติงแชมเบิล (Extracting Chamble) สูงถึงระดับหนึ่งจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในภาชนะวนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งสารสกัดสมบูรณ์ วิธีการสกัดแบบต่อเนื่องนี้เหมาะสำหรับการสกัดองค์ประกอบที่ทนต่อความร้อน และใช้น้ำยาสกัดน้อยไม่สิ้นเปลือง แต่มีข้อเสียคือ ไม่เหมาะที่จะใช้กับองค์ประกอบที่ไม่ทนต่อความร้อน และน้ำยาสกัดที่ใช้ไม่ควรเป็นของผสม เพราะจะเกิดการแยกของตัวทำละลายแต่ละชนิดเนื่องจากมีจุดเดือดต่างกันจะมีผลให้สัดส่วนของน้ำยาสกัดแตกต่างไปจากเดิมและผลการสกัดไม่ดีเท่าที่คาดเอาไว้ (นิจศิริ เรืองรังสี และพะยอม ตันติวัฒน์, 2534)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม

ในการสกัดสารสำคัญจากพืชนั้นจะต้องเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการจะแยก ซึ่งมีหลักที่ควรพิจารณาในการเลือกตัวทำละลาย ดังต่อไปนี้

1. คุณสมบัติของสารที่ต้องการสกัด เช่น ความมีขั้วของสาร ความคงตัวของสารในตัวทำละลายนั้นในอุณหภูมิสูง
2. มีความสามารถในการละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี
3. ไม่ละลายปนเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายของสารผสมที่ถูกสกัดนั้น
4. ไม่ควรละลายสิ่งเจือปนหรือสารที่ไม่ต้องการ
5. สามารถแยกออกจากตัวถูกละลายได้ง่ายภายหลังที่สกัดแล้ว
6. ไม่ควรทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด
7. ตัวทำละลายควรมีราคาไม่แพงมาก

ความมีขั้วของตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญจากพืช แสดงดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 แสดงความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ความมีขั้ว	ตัวทำละลาย
ไม่มีขั้ว	ปิโตรเลียมอีเทอร์
↓	เฮกเซน
↓	คาร์บอนเตตระคลอไรด์
↓	เบนซีน
↓	ไดคลอโรมีเทน
↓	คลอโรฟอร์ม
↓	ไดเอทิลอีเทอร์
↓	เอทิลแอซิเตต
↓	อะซิโตน
↓	1- โพรพานอล
↓	เอทานอล
มีขั้ว	เมทานอล
	น้ำ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

เป็นวิธีที่สามารถทำนายชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารได้อย่างค่อนข้างแม่นยำ โดยอาศัยการเปรียบเทียบ Fingerprint ของเลขมวล (Mass Number) ของสารตัวอย่างนั้น ๆ กับข้อมูลที่มีอยู่ใน Library นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณ (Quantitative Analysis) และเชิงคุณภาพ (Qualitative Analysis)

GC/MS ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของเครื่อง GC (Gas Chromatography) และส่วนของเครื่อง Mass Spectrometer

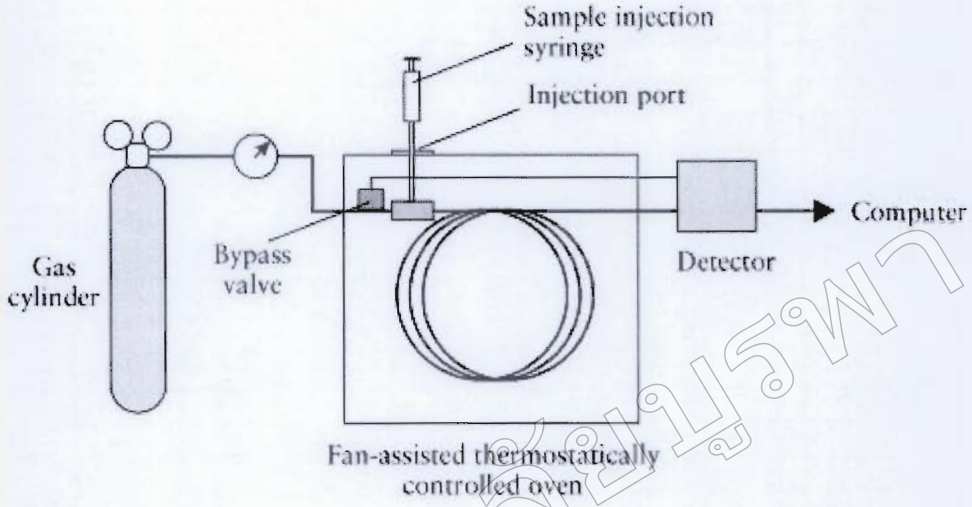
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 2-2 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี

แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography)

ทำหน้าที่ในการแยกองค์ประกอบของสารที่สามารถระเหยกลายเป็นไอ (Volatile Organic Compounds) ได้เมื่อถูกความร้อน กลไกที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ในสารตัวอย่างอาศัยหลักของความชอบที่แตกต่างกันขององค์ประกอบในตัวอย่างที่มีต่อเฟส 2 เฟส คือ Stationary Phase และ Mobile Phase

องค์ประกอบที่สำคัญของเครื่อง GC สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ



ภาพที่ 2-3 ส่วนประกอบพื้นฐานของเครื่อง GC

1) Injector คือ ส่วนที่สารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าสู่เครื่องและระเหยเป็นไอก่อนที่จะเข้าสู่ Column อุณหภูมิที่เหมาะสมของ Injector ควรเป็นอุณหภูมิที่สูงพอที่จะทำให้สารตัวอย่างสามารถระเหยได้แต่ต้องไม่ทำให้สารสลายตัว ตัวอย่างของ Injectorได้แก่ Split, Splitless, On Column

2) Oven คือ ส่วนที่ใช้สำหรับบรรจุ Column และเป็นส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิของ Column ให้เปลี่ยนไปตามความเหมาะสมกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งการควบคุมอุณหภูมิของ Oven นั้นมี 2 แบบ คือ

2.1) Isocratic Temperature

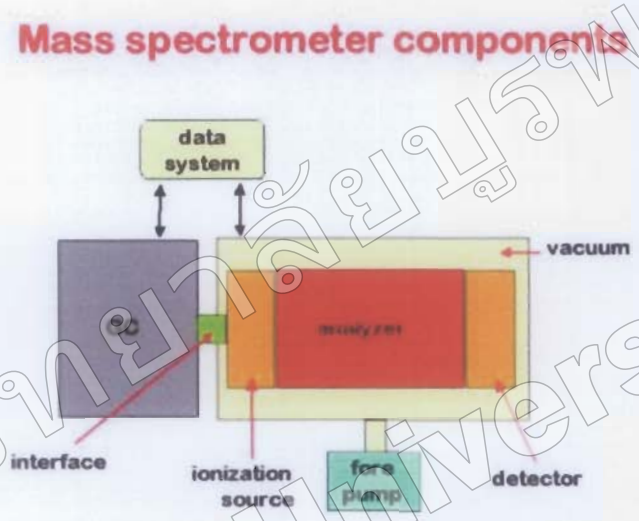
2.2) Gradient Temperature ข้อดีของการทำ Gradient Temperature คือสามารถใช้กับสารตัวอย่างที่มีจุดเดือดกว้าง (Wide Boiling Range) และยังช่วยลดเวลาในการวิเคราะห์

3) Detector คือส่วนที่จะใช้สำหรับตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างและดูว่าสารตัวอย่างชนิดที่เราสนใจมีปริมาณอยู่เท่าใด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แมสสเปกโตรเมตรี (Mass Spectrometer)

เป็น Detector ที่ใช้ตรวจวัดองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างโดยอาศัยกลไก คือ โมเลกุลขององค์ประกอบที่ถูกแยกออกมาจากสารตัวอย่างโดยเครื่อง GC จะถูกไอออไนซ์ในสภาวะสุญญากาศแล้วตรวจวัดออกมาเป็นเลขมวล (Mass Number) เทียบกับฐานข้อมูลอ้างอิง แล้วแปลผลออกมาเป็นชื่อขององค์ประกอบนั้น ๆ



ภาพที่ 2-4 ส่วนประกอบพื้นฐานของเครื่อง MS

องค์ประกอบสำคัญของ MS แบ่งออกเป็น

1) Ionization Source แบ่งออกเป็น 2 แบบคือ

Electron Ionization (EI) เป็นการทำให้สารเกิด Fragment โดยใช้ลำ Electron ซึ่ง Ionization chamberต้องมีความดันต่ำประมาณ 10-8 Torr โดย Electron จาก Filament ที่ร้อนจะถูกโฟกัสผ่านห้องนี้และถูกดึงเข้าหา Repeller Voltage ที่มีความต่างศักย์ 70 โวลต์ ซึ่งจะให้พลังงานกับ Electron เป็น 70 eV ทำให้ของผสมที่ซับซ้อนของไอออนเกิดการแตกหัก (Fragmentation Ion) ที่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างและความอุดมสัมพัทธ์ (Relative Abundance)

Chemical Ionization (CI) เป็นการทำให้สารเกิดการ Fragment ด้วยวิธีทางเคมี โดยผสมสารตัวอย่าง (ความดัน 10-4 Torr) เข้ากับแก๊สที่ทำปฏิกิริยาด้วย (ความดัน 1 Torr) แล้วผ่านสารผสมเข้าไปใน Ionization Chamber โดยการทำให้เกิดการ Fragment ด้วยการชนกับ Electron เช่นเดียวกันแก๊สที่ใช้ได้แก่ Methane, Isobutane, Ammonia

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2) Mass Analyzer

เป็นเครื่องวิเคราะห์มวล มีหลายแบบ คือ Magnetic-Sector Analyzer, Electrostatic Analyzer, Time-of-flight Analyzer, Ion Cyclotron Resonance Analyzer, Quadrupole Mass Spectrometer, Quadrupole Mass Spectrometer ใช้หลักการวิเคราะห์ด้วยสนามแม่เหล็ก คือ เป็น Path-Stability Mass Spectrometer ซึ่งมีแหล่งผลิต Ion Source 2 ส่วนโดยส่วนแรกจะทำให้ตัวอย่างกลายเป็นไอออน และส่วนที่ 2 ทำให้สารมาตรฐานกลายเป็นไอออนลำไอออนทั้งสอง จะถูกบังคับให้ผ่านเครื่องแยกไอออนชุดเดียวกัน ดังนั้นไอออนทั้งหมดจะได้รับอิทธิพลจากสนามแม่เหล็กในสภาวะเดียวกัน แต่ถูกตรวจและวัดด้วยเครื่อง Detector แยกกันซึ่งมีข้อดีคือทำให้สามารถวัดมวลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

3) Detector

ที่ใช้โดยทั่วไปมีหลายอย่าง คือ Faraday Cup Dectector, Electron Multiplier Detector, Scintillation Counter Dectector, Photographic Plate Dectector

ข้อดีของ GC/MS

1. สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งแบบทั่วไปและแบบเฉพาะเจาะจงให้ Sensitivity ที่สูง
2. สามารถบ่งชี้ชนิดขององค์ประกอบที่มีอยู่ในสารตัวอย่างได้
3. สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

ข้อเสียของ GC/MS

1. ราคาแพง และค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาเครื่องสูง
2. ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญสูง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพร

Disc diffusion techniques

เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นวิธีซึ่งสามารถปฏิบัติง่าย สะดวกและรวดเร็ว รวมทั้งสามารถให้ผลที่แน่นอนและถูกต้อง การทดสอบวิธีนี้ใช้หลักการแพร่โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เติมลงบนกระดาษกรอง (Filter Paper Disc) ซึ่งวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบไว้ จะแพร่จากจุดเริ่มต้น ไปในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเมื่อระยะทางที่สารแพร่ออกไปเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารนั้นจะลดลงทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของสาร ณ จุดต่าง ๆ กันรอบแผ่นกระดาษกรอง ในขณะเดียวกันจุลินทรีย์บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ถูกยับยั้งโดยสารออกฤทธิ์ ณ ความเข้มข้นของสารที่จุดใด ๆ (ไกลกระดาษกรอง) ก็จะเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นจนเห็นได้ชัด แต่บริเวณใกล้กระดาษกรองซึ่งมีความเข้มข้นของสารมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้ จะไม่มีการเจริญของเชื้อให้เห็นจึงเกิดเป็นโซนใส Iinhibition Zone) ขึ้น อัตราการแพร่ของสารออกฤทธิ์ผ่านไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส ซึ่งจะบอกถึงความสามารถของสารที่นำมาทดสอบว่าสามารถยับยั้งเชื้อได้มากน้อยเพียงใด ผลการยับยั้งจุลินทรีย์วัดได้จากขนาดของโซนใส โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration หรือ MIC)

การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

ใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ต้องในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งโดยทั่วไปจะนิยมใช้เชื้อปริมาณ 10^5–10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วิธีการทำมีดังต่อไปนี้

1. เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มาประมาณ 2-3 โคโลนี นำมาใส่ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบปริมาตรหลอดละ 2 มิลลิลิตร

2. นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 1 ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. นำเชื้อจากข้อ 2 มาเจือจางให้ได้จำนวนแบคทีเรีย 10^5–10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปวัดความขุ่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งโดยวิธี Agar Diffusion โดยใช้อาหาร Plate Count Agar (PCA)

การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์

1. เขียนที่จานอาหารแข็ง เพื่อระบุตำแหน่งที่จะวางแผ่นกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง

2. วิธีเพาะแบคทีเรียลงบนอาหารทดสอบ ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้โดยมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^5–10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วบิดให้แห้งพอหมาด ๆ กับข้างหลอดทดลอง จากนั้นทำการ swab ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยลากเส้นผ่านศูนย์กลางจานเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วป้ายเป็นเส้นตั้งฉากผ่านเส้นที่ลากไว้ถี่ ๆ ให้ทั่วผิวหน้าแล้วหมุนจานเพาะเชื้อไปประมาณ 60 องศา แล้วป้ายเช่นกันทำเช่นนี้ 3 ครั้ง เพื่อให้แบคทีเรียกระจายสม่ำเสมอทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 3-5 นาทีเพื่อให้ส่วนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

3. การทดสอบสารสกัด โดยใช้กระดาษกรองปราศจากเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบ (Forceps) คีบกระดาษวางบนจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นแล้วกดเบา ๆ มาวางที่ตำแหน่งที่กำหนดไว้

4. หยดตัวอย่างสารสกัดจากหน่อกะลา ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่จะทดสอบวางใส่ลงแผ่นกระดาษกรอง คนละตำแหน่งตามลำดับตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร รวมทั้งหยดตัวทำละลายนั้นๆ เป็น control โดยใช้ Automatic Pipette ที่ปราศจากเชื้อ เสร็จแล้วนำจานเพาะเชื้อที่นี้ไปเลี้ยงที่ 35-37°C เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมงแล้วนำมาวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียขึ้น (Inhibition Zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

5. การอ่านผล เมื่อบ่มเชื้อจนครบ 16-18 ชั่วโมง แล้ว ให้วัดขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้น โดยวัดจากขอบโซนข้างหนึ่งไปยังขอบโซนอีกข้างหนึ่ง โดยให้ผ่านจุดศูนย์กลางของ Paper Disc ด้วย บันทึกหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ขอบโซนที่วัดต้องเป็นโซนที่ชัด ถ้ามีเชื้อขึ้นบาง ๆ ให้ถือว่าบริเวณนั้นยังมีปริมาณยาหรือสารสกัดชีวภาพสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้)

ขนาดของโซนใส (Inhibition Zone; มิลลิลิตร) = (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Paper Disk และโซนใสของเชื้อ) ลบด้วย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Paper Disk 6 มิลลิลิตร)

$$\text{อัตราส่วนของ inhibition zone} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสของเชื้อ}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Negative Control}}$$

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จันทนา กาญจน์กมล (2549) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การศึกษาสารสำคัญ การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากหน่อกะลา โดยหาวิธีที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนตาข้างของหน่อกะลา และศึกษาประสิทธิภาพการเป็นพืชสมุนไพรของสารสกัดจากหน่อกะลา พบว่าสารสกัดจากหน่อกะลาที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ *S. typhimurium* เป็น 2.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารสกัดจากหน่อกะลาที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. typhimurium* เป็น 2.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน และศึกษาสารสำคัญในสารสกัดจากหน่อกะลา โดยวิธีโครมาโทรกราฟีอย่างบาง (Thin Layer Chromatography, TLC) โดยนำตัวอย่างต้นหน่อกะลามาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบให้แห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40-50 °C จากนั้นชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 10 กรัม แช่ในตัวทำละลายอีเทอร์ : ปิโตรเลียมอิเทอร์ อัตราส่วน 1 : 1 นำสารสกัดที่ได้ระเหยตัวทำละลายออก นำสารตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC พบว่าสารสกัดหน่อกะลามีส่วนประกอบทางเคมีเป็นสารประเภทเทอร์ปีน สารฟีโนลิก สารกลุ่มแอลคาลอยด์

ปริยานุช อินทร์รอด (2551) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของส่วนสกัดย่อยเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ ของต้นเร่วหอม (*Etlingera pavieana*) และว่านสาวหลง (*Amomum biflorum*) โดยนำมาทำการทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ และความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะ ในการทดสอบกำจัดฤทธิ์อนุมูล DPPH เปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน คือกรดแอสคอร์บิก และบีเอชที (BHT) จากการทดสอบพบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของต้นเร่วหอมและว่านสาวหลง มีฤทธิ์กำจัดอนุมูล DPPH สูงที่สุด รองลงมาคือส่วนสกัดย่อยน้ำ และส่วนสกัดย่อยเฮกเซนตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทของต้นเร่วหอมและว่านสาวหลงมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุด ส่วนความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะ พบว่าส่วนสกัดย่อยเฮกเซนของต้นเร่วหอม และส่วนสกัดย่อยน้ำของต้นว่านสาวหลงมีความสามารถในการคีเลทไอออนของโลหะสูงที่สุด และเมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม พบว่าส่วนสกัดย่อยเอทิลอะซิเตทของเร่วหอมและว่านสาวหลงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9731

พิมลพร เที่ยงธรรม (2549) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของรากและใบจันทน์ชะมด ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านการเกิดฮิสทามีนเบื้องต้นของต้นจันทน์ชะมดโดยใช้เซลล์ RBL-2H3 ชี้ให้เห็นว่าสิ่งสกัดไดคลอโรมีเทนจากรากและใบ แสดงฤทธิ์ต้านการเกิดอาการแพ้ในระดับสูงจากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากจันทน์ชะมด พบสารบริสุทธิ์ 9 ชนิด สามารถหาโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยอาศัยสมบัติทางกายภาพและข้อมูล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

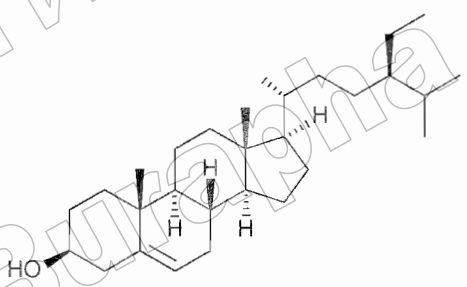
ทางสเปกโทรสโกปีได้ 8 ชนิดได้แก่ 2,5-Dimethoxy-1,4-benzoquinone, Mansonone T และ Stigmastane-3β,6α-diol สาร Mansonone T พบว่าเป็นสารใหม่ จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบจันทน์ชะมดสามารถแยกได้สารบริสุทธิ์เพิ่มอีก 3 ชนิด สามารถหาโครงสร้างโดยอาศัยสมบัติทางกายภาพ และข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีได้ 2 ชนิด คือ 3,11-Dioxo-β-amyrin, 11α-Hydroxy-β-amyrin และของผสม 2 ชนิด ได้แก่ ของผสมของไฮโดรคาร์บอนโซ่ตรง และของผสมของกรดคาร์บอกซิลิกโซ่ตรง Mansonones G และ C แสดงฤทธิ์ต้านฮีสทามีนสูงสุดเมื่อเทียบกับสารชนิดอื่น โดยมีค่า IC_{50} 212 ไมโครเมตร และ 222 ไมโครเมตร ตามลำดับ

รัชนก เชื้อเตชะ และคณะ (2549) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของส่วนสกัดเอทานอลของเหง้า ลำต้น และใบของหน่อกะลา (*Alpinia nigra* B.L. Burtt) 2 วิธีคือวิธีที่ใช้ β-carotene กับ Linoleic acid พบว่าสารสกัดจากส่วนใบและลำต้นแสดงการต้านออกซิเดชันสูงสุด ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 12.517 และ 13.260 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และวิธีการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH) พบว่าสารสกัดจากส่วนใบให้การกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงกว่าสารสกัดจากส่วนอื่น ๆ และสูงกว่าสารสกัดจากข่า

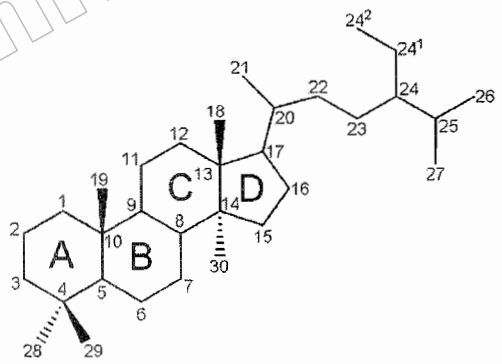
เวียงทอง นุ่นภักดี (2550) ได้ศึกษาการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของรากพังคี พังคี จัดเป็นสมุนไพรพื้นบ้านชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของรากพังคี พบว่าได้สาร 4 ชนิด คือ Cyperenoic acid, Chettaphanin-I, Acetylaleuritolic acid และ β-amyrin แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารที่สกัดได้จากรากของพังคี วิทยานิพนธ์นี้ มีความมุ่งหมายเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากรากของต้นพังคี นำรากของต้นพังคีที่แห้งและบดละเอียดน้ำหนัก 5 กิโลกรัม มาทำการสกัดด้วยด้วยเฮกเซน เมทธิลลีนคลอไรด์และเมทานอล ตามลำดับ ได้สารสกัดจากเฮกเซน สารสกัดจากเมทธิลลีนคลอไรด์ และสารสกัดจากเมทานอล เมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังต่อไปนี้ การต้านมะเร็ง การต้านเชื้อวัณโรค การต้านเชื้อมาลาเรีย การต้านเชื้อรา การต้านเชื้อไวรัส และความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัดจาก เมทธิลลีนคลอไรด์มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อมาลาเรีย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และต้านเชื้อวัณโรค โดยมีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำเอาสารสกัดเมทธิลลีนคลอไรด์ มาแยกหาสารบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่าได้สารบริสุทธิ์ 2 ชนิด คือ Cyperenoic acid และ Chettaphanin-I ซึ่งโครงสร้างของสารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวสามารถยืนยันได้ด้วยวิธีทางสเปกโทรสโกปีและเมื่อนำสาร Cyperenoic acid ไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสามารถต้านเชื้อวัณโรคได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังสามารถต้านเชื้อไวรัสได้เล็กน้อย ส่วน Chettaphanin-I

ไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยสรุป องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ สาร 2 ชนิด คือ Cyperenoic acid และ Chettaphanin-I โดยพบว่า Cyperenoic acid มีฤทธิ์ในการต้านต้านเชื้อวัณโรค ให้ค่า MIC เท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถต้านเชื้อไวรัสได้เล็กน้อย ส่วน Chettaphanin-I ไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

สังวาลย์ กัมพลาศิริ (2550) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีส่วนลำต้นเหนือดินของต้นกะลา *(Alpinia nigra)* และทดสอบฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ โดยนำสารที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}HNMR FTIR และ MS วิเคราะห์สารอาหารและแร่ธาตุจากส่วนลำต้นเหนือดินของต้นกะลาด้วยวิธี AOAC นำส่วนสกัดทดสอบฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ด้วยวิธี DPPH antioxidant Assay โดยนำส่วนของลำต้นเหนือดินของต้นกะลาหั่นละเอียด อบที่อุณหภูมิ 60°C แล้วบดให้มีขนาดเล็ก แล้วชั่งน้ำหนักแห้ง 685 กรัม แช่ในตัวทำละลายเฮกเซน ระเหยตัวทำละลายออก ได้สารสกัดหยาบเฮกเซน นำสารที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{1}HNMR FTIR และ MS พบสารกลุ่มสเตียรอยด์ที่พบในพืช เช่นเบต้า-ซิโตสเตอรอล (β-sitosterol) ดังแสดงในภาพที่ 2-5 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไฟโตสเตอรอล (Phytosterol) มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคอเลสเตอรอล และสติกมาสเตอรอล (Stigmasterol) ดังแสดงในภาพที่ 2-6 เป็นส่วนประกอบในพืชกลุ่มสเตอรอล (Sterols)



ภาพที่ 2-5 เบต้า-ซิโตสเตอรอล (β –sitosterol) (สังวาลย์ กัมพลาศิริ, 2550)



ภาพที่ 2-6 สติกมาสเตอรอล (Stigmasterol) (สังวาลย์ กัมพลาศิริ, 2550)

นำส่วนลำต้นเหนือดินของต้นกะลามาวิเคราะห์สารอาหารและแร่ธาตุด้วยวิธี AOAC พบว่าสารอาหารส่วนลำต้นเหนือดินของต้นกะลา 100 กรัม มีคาร์โบไฮเดรต 1.4 % สารสกัดหยาบโปรตีน 15.86 % ไขมัน 0.85 % และเส้นใย 17.04 % สำหรับกลุ่มแร่ธาตุพบว่ามีแคลเซียม 0.16 % ฟอสฟอรัส 0.64 % แมกนีเซียม 0.23 % และโปตัสเซียม 0.85 % นำส่วนสกัดทดสอบฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ด้วยวิธี DPPH antioxidant Assay ผลการทดลองพบว่าส่วนลำต้นเหนือดินของต้นกะลามีฤทธิ์แอนติออกซิแดนท์ในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทมากที่สุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อรสา พันธุ์เจริญ และคณะ (2546) ศึกษาฤทธิ์ในการรักษาโรคของสารสกัดเอทานอลจากลำต้นใต้ดินของข่าพบว่าสามารถยับยั้งพยาธิตัวกลมได้ ส่วนสกัดน้ำผสมเอทานอล 50 % รักษาความดันโลหิตต่ำและโรคต่อมลูกหมากโตได้ ส่วนสกัดเมทานอลยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอก รักษาแผลพุพอง รักษาโรคกระเพาะอาหารเป็นแผลได้ ส่วนสกัดอีเทอร์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ และส่วนสกัดคลอโรฟอร์มยับยั้งอาการเรื้อรังจากโรคมะเร็งได้

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University