



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้ซีรัมน้ำยางพาราให้เกิดประโยชน์ทางด้าน
การแพทย์ การเกษตร และ อุตสาหกรรมยาง

Application of Latex Serum for Medicinal,
Agricultural and Rubber Industrial

โดย มธุรส ชัยหาญ และ คณะ

31 ธันวาคม 2559

สัญญาเลขที่ RDG5950022

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้ซีรัมน้ำยางพาราให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์
 การเกษตร และ อุตสาหกรรมยาง

Application of Latex Serum for Medicinal, Agricultural and
Rubber Industrial

คณะผู้วิจัย

- | | |
|----------------------------|----------------------------------|
| 1. ดร. มธุรส ชัยหาญ | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| 2. ดร. วชิระ ชุ่มมงคล | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| 3. ดร. กิตติคุณ พระกระจ่าง | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |
| 4. คุณ กันยา พรมมา | คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	จ
บทนำ	5
จุดมุ่งหมายของงานวิจัย	6
ตรวจเอกสาร	7
บทที่ 2 อุปกรณ์ และ วิธีการ	34
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	36
บทที่ 4 ผลการวิจัย	47
บทที่ 5 วิจัยรณผลการวิจัย	88
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	92
เอกสารอ้างอิง	95
ภาคผนวก	98
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ และ วิธีการเตรียม	99
ภาคผนวก ข ชุดสีย้อมแกรม	101
ภาคผนวก ค การสกัดสารสกัดหยาบจากซีรัมน้ำยางพารา	103
ภาคผนวก ง การเพิ่มมูลค่าของน้ำยางพาราสดในเชิงพาณิชย์	110

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อ ร้อยละ 35	8
2. โครมาโตกราฟีแบบต่าง ๆ	28
3. สูตรการทำเจลพื้นฐาน	46
4. จำนวนเชื้อที่แยกได้จากยางแผ่นผึ่งแห้งจาก จังหวัดพัทลุง และ จังหวัดปัตตานี	47
5. จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากยางก้อนถ้วย	48
6. คุณสมบัติทางกายภาพของสารสกัดจากซีรัมน้ำยางพารา	52
7. น้ำหนัก และ ร้อยละผลผลิต (% Yield) ของสารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา	52
8. การเทียบ $^1\text{H-NMR}$ และ $^{13}\text{C-NMR}$ ของ สาร P กับสาร L-quebrachitol	57
9.ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่เจริญบนแผ่นยางดิบและยางก้อนถ้วยโดยการใช้สารสกัดหยาบซีรัมของน้ำยางพารา	61
10. ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารสกัดซีรัมน้ำยางพารา	62
11. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราบนแผ่นยางดิบโดยการใช้สารสกัดซีรัมน้ำยางพาราชนิดต่างๆ	65
12. ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus</i> sp. และ <i>Penicillium</i> sp. บนยางแผ่น ภายหลังการชุบสารสกัดซีรัมน้ำยางพาราเมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาแตกต่างกัน	69
13.การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร และ แบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิวโดยใช้สารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา	74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
14.ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง และ แบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว โดยสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา ทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion	78
15.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา ด้วยวิธี Scavenging activity of ABTS radical แสดงค่า % Inhibition ของ สารสกัดหยาบ	82
16.ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ด้วยวิธี Scavenging activity of ABTS radical แสดงค่า % Inhibition ของสาร บริสุทธิ์ L-quebrachitol	83
17.ผลทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เจลบำรุงผิวหน้าซีรุ่มน้ำยางพารา ก่อน และ หลัง ทดสอบความคงตัว	83
ง.1 การคำนวณต้นทุนผลิตภัณฑ์เจลยับยั้งการเกิดสิว และ ชลอริวรอยแห้งวัย จากซีรุ่มน้ำยางพาราสด	110
ง.2 การคำนวณต้นทุนผลิตภัณฑ์เจลยับยั้งการเกิดสิว และ ชลอริวรอยแห้ง วัย จากน้ำรีดยางแผ่น	111
ง.3 การคำนวณต้นทุนผลิตภัณฑ์สารเคลือบยางแผ่นเพื่อป้องกันเชื้อรา บนแป้นจากน้ำรีดยางแผ่น	112

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. สูตรโมเลกุลของไอโซพรีน และ พอลิไอโซพรีน	7
2. ลักษณะของ <i>Staphylococcus aureus</i>	11
3. ลักษณะของ <i>Escherichia coli</i>	19
4. ลักษณะของ <i>Bacillus cereus</i>	20
5. ลักษณะของ <i>Propionibacterium acnes</i>	22
6. ลักษณะของ <i>Propionibacterium acnes</i> โคโลนีสีเหลืองอ่อน บนอาหาร Blood agar	22
7. TLC ที่แต้มนสารตัวอย่าง A,B และ unknown ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ ตำแหน่ง สาร A, B และ unknown, solvent front (S) บน TLC และ การคำนวณ R_f	30
8. สวนยางพาราบริเวณพื้นที่ อ.แม่อรม จ.เชียงใหม่	36
9. น้ำยางพาราสดจากสวนเกษตรกร อ.แม่อรม จ.เชียงใหม่	37
10. ซีรัมน้ำยางพาราที่แยกได้ด้วยการปั่นเหวี่ยง ส่วนบนเป็นอนุภาคยาง ส่วนล่าง เป็นซีรัมน้ำยางพารา	37
11. ขั้นตอนการสกัดซีรัมน้ำยางพารา	38
12. แผ่น paper disc ชุบสารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพาราในตัวทำละลายชนิดต่างๆ พร้อมแสดงน้ำหนักสารที่อยู่ในแผ่น paper disc แต่ละชิ้น	43
13. สารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา และ สาร L-quebrachitol ที่ความเข้มข้น 10 ppm และ 20 ppm	44
14. แผ่นยางชุบสารสกัดหยาบ และ สาร L-quebrachitol จากซีรัมน้ำยางพารา	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15. การแบ่งพื้นที่แผ่นยางทดสอบในการบันทึกผล	45
16. ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง PDA ของเชื้อราปนเปื้อนจากยางแผ่น ผึ่งแห้ง และ ยางก้อนถ้วย เมื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นระยะเวลา 14 วัน	49
17. ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 400 เท่า ของ เชื้อราที่ปนเปื้อนจากแผ่นยางผึ่งแห้ง และ ยางก้อนถ้วย	50
18. การแยกซีรัม และ การสกัดซีรัมด้วยน้ำยาล้าง สารสกัดหยาดเฮกเซน (HC) สารสกัดหยาดเอทิลอะซีเตต (EAC) และ สารสกัดหยาดเมทานอล (MC)	51
19. TLC ของสารสกัดหยาดเฮกเซน (HC) เอทิลอะซีเตต (EAC) เมทานอล (MC) และ สารที่แยกได้ (P) ภายใต้แสง UV 254 nm และ สเปกตรัม สารละลาย Anisaldehyde ตามลำดับ	53
20. TLC ของ 16 fraction ที่แยกได้จากสารสกัดเอทิลอะซีเตต (EAC) ภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 nm และ ¹ H-NMR ของ fraction EAC-3 และ EAC-5 จากสารสกัดหยาดเอทิลอะซีเตต (EAC)	54
21. TLC ของ 16 fraction ที่แยกได้จากสารสกัดหยาดเมทานอล (MC) ภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 nm และ ¹ H-NMR ของ fraction MC-2 จากสาร สกัดหยาดเมทานอล (MC)	55
22. ลักษณะทางกายภาพของสาร P (L-quebrachitol)	56
23. สเปกตรัม ¹ H-NMR ของสาร P (L-quebrachitol)	58
24. สเปกตรัม ¹³ C-NMR ของสาร P (L-quebrachitol)	58
25. การเก็บน้ำรีดยางแผ่นจากการทำยางแผ่น	59
26. การแยก L-quebrachitol จากน้ำรีดยางแผ่น และ TLC ของ L-quebrachitol (PC) เทียบกับสารจากน้ำรีดยางแผ่น (PC*)	60
27. ผลการยับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางดิบและยางก้อนถ้วยโดยใช้สาร สกัดหยาดซีรัมของน้ำยาล้าง	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
28. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความทนแรงดึงสูงสุดต่อเวลาของแผ่นยางที่เคลือบในสารบริสุทธ์ L-quebrachitol (PC)	70
29. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความทนแรงดึงสูงสุดต่อเวลาของแผ่นยางที่เคลือบในสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพาราชั้นเมทานอล (MC)	70
30. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนาแน่น และ เวลาของแผ่นยางที่เคลือบด้วยสารบริสุทธ์ L-quebrachitol (PC) และ สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพาราชั้นเมทานอล (MC)	71
31. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความทนแรงดึงสูงสุด และ เวลาของแผ่นยางที่เคลือบด้วยสาร L-quebrachitol ความเข้มข้น 20 ppm	72
32. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนาแน่น และ เวลาของแผ่นยางที่เคลือบด้วยสาร L-quebrachitol ความเข้มข้น 20 ppm	72
33. ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง <i>Escherichia coli</i> โดยสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา และ สารสกัดหยาบจากน้ำรีดยางแผ่น บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	77
34. ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง <i>Escherichia coli</i> โดยสารบริสุทธ์ L-quebrachitol ที่น้ำหนัของสารบริสุทธ์ L-quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	79
35. ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง <i>Proteus vulgaris</i> โดยสารบริสุทธ์ L-quebrachitol ที่น้ำหนัของสารบริสุทธ์ L-quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	79
36. ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง <i>Bacillus cereus</i> โดยสารบริสุทธ์ L-quebrachitol ที่น้ำหนัของสารบริสุทธ์ L-quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	80

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
37. ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว <i>Staphylococcus aureus</i> โดยสาร บริสุทธ์ L-quebrachitol ที่น้ำหนักของสารบริสุทธ์ L-quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็น ระยะเวลา 48 ชั่วโมง	80
38. ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว <i>Staphylococcus epidermidis</i> โดยสารบริสุทธ์ L-quebrachitol ที่น้ำหนักของสารบริสุทธ์ L- quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	81
39. ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว <i>Propionibacterium acnes</i> โดยสารบริสุทธ์ L-quebrachitol ที่น้ำหนักของสารบริสุทธ์ L- quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	81
40. เจลซีรุ่มน้ำยาพารา ที่มีส่วนผสมของ L-quebrachitol 10% แสดงฤทธิ์ ยับยั้งการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย (Anti-acne and Anti-ageing gel)	84
41. สบู่สำหรับผิวหน้าซีรุ่มน้ำยาพารา ที่มีส่วนผสมของ L-quebrachitol 10% แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย (Anti-acne and Anti- ageing soap bar)	85
42. สารบริสุทธ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยาพารา สำหรับชุบแผ่นยางดิบ เพื่อลดการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น ที่ความเข้มข้น 10 ppm, 20 ppm และ 40 ppm ตามลำดับ	86
43. สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล จากซีรุ่มน้ำยาพารา สำหรับชุบแผ่นยางดิบ เพื่อลดการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น ที่ความเข้มข้น 10 ppm และ 20 ppm ตามลำดับ	86
ค 1. ขั้นตอนการสกัดซีรุ่มน้ำยาพาราด้วยตัวทำละลาย	103
ค 2. ¹ H-NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต EAC-3	104

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ค 3. ^1H -NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตรท EAC-5	105
ค 4. ^1H -NMR สเปกตรัมของสารสกัดหยาบเมทานอล (MC)	106
ค 5. FT-IR สเปกตรัมของสาร L-quebrachitol ที่แยกได้	107
ค 6. ^1H -NMR สเปกตรัมของ L-quebrachitol	108
ค 7. ^{13}C -NMR สเปกตรัมของ L-quebrachitol	109
ง 1 ราคา D-pinitol จาก http://www.sigmaaldrich.com	110

โครงการ “การประยุกต์ใช้ชีร้มน้ำยางพาราให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ การเกษตร และ อุตสาหกรรมยาง”

บทคัดย่อ

ยางพาราเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยมีการส่งออกยางธรรมชาติมากเป็นอันดับหนึ่งของโลก ในกระบวนการผลิตยางแผ่นหากยางแผ่นมีเชื้อราเกิดขึ้นจะทำให้คุณภาพของยางแผ่นลดลงส่งผลให้เกษตรกรขายยางแผ่นในราคาที่ต่ำลงและอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของเกษตรกร ประกอบกับราคาน้ำยางธรรมชาติราคาถูกลง คณะผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาการเพิ่มมูลค่าของน้ำยางธรรมชาติในเชิงพาณิชย์ โดยนำสารสกัดชีร้มน้ำยางพารามากำจัดเชื้อราบนแผ่นยางดิบและนำชีร้มน้ำยางธรรมชาติมาใช้ประโยชน์เชิงเภสัชกรรม

เมื่อนำตัวอย่างยางแผ่นผึ่งแห้งมาแยกเชื้อราบนแผ่น สามารถแยก และ จัดจำแนกเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง และ ลักษณะโครงสร้างสปอร์ รวมถึงเส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จำนวน 47 ไอโซเลท สามารถจัดอยู่ในจีนัส *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. และ *Geotrichum* sp. จากนั้น การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราจากสารสกัดหยาบชีร้มน้ำยางพารา ด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบเฮกเซนให้ผลการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้ 17 mm สารสกัดหยาบเมทานอลให้ผลการยับยั้ง *Fusarium* sp. และ *Trichoderma* sp. ได้ 23 และ 24 mm ตามลำดับ ส่วนสารสกัดหยาบเอทิล อะซิเตท และ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของน้ำรีดยางแผ่นไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา

การสกัด การแยก และการพิสูจน์เอกลักษณ์สารสกัดชีร้มน้ำยางพารา พบสาร L-quebrachitol จากการสกัดชีร้มน้ำยางพาราสด ร้อยละ 0.054 และ จากน้ำทิ้งในกระบวนการรีดยางแผ่น ร้อยละ 0.036 เมื่อนำสารสกัดหยาบ และ L-quebrachitol ทดสอบการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นยาง ด้วยการเคลือบบนแผ่นยาง พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอล (10 ppm) และ สาร L-quebrachitol (20 ppm) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้ 45 % สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้ เป็น ระยะเวลา นาน 2 เดือน แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. บนแผ่นยาง ได้ จากนั้น ศึกษาสมบัติทางกายภาพของแผ่นยางหลังเคลือบด้วยสารสกัดชีร้มน้ำยางพารา พบว่า สารเคลือบแผ่นยาง ไม่ส่งผลต่อความทนแรงดึงสูงสุด และ ความหนาแน่นของแผ่นยางดิบอย่างมีนัยสำคัญ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า สารสกัดหยาบเฮกเซน ให้ผลการยับยั้ง *Bacillus cereus* 6.67 mm สารสกัดหยาบเอทิล อะซิเตต ให้ผลการยับยั้ง *Bacillus cereus* 12.00 mm สารสกัดหยาบเมทานอล ไม่แสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของน้ำรีดยางแผ่น สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* 20.00 mm และสาร L-quebrachitol ให้ผลการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* 17.80 mm ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) ของ L-quebrachitol มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 57.23 % รองลงมา ได้แก่ สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตต มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ที่ 39.90 % และ สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 37.58 %

จากฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังกล่าว จึงพัฒนาชีวภัณฑ์ต้นแบบ 4 ชนิด ได้แก่ เจลซีรุ่มน้ำยางพาราสำหรับผิวหนังเพื่อยับยั้งการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย (Anti-acnes Anti-ageing Gel) สบู่ใสซีรุ่มน้ำยางพาราสำหรับผิวหนัง (Transparent Latex Serum Soap bar) สารเคลือบแผ่นยางจาก L-quebrachitol และ สารเคลือบแผ่นยางจากสารสกัดหยาบเมทานอล ผลการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์เจลซีรุ่มน้ำยางพารา พบว่า เจลยังคงสภาพปกติ เมื่อเทียบกับเจลพื้นฐาน และ การทดสอบผลิตภัณฑ์เคลือบแผ่นยางจาก L-quebrachitol เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อรา ภายหลังจากการเคลือบด้วย L-quebrachitol สามารถยับยั้งการปนเปื้อนของเชื้อราบนยางแผ่น จินัส *Penicillium* sp. ได้ ระยะเวลา นาน 2 เดือน สุดท้ายแล้วนักวิจัยเห็นว่าชีวภัณฑ์ต้นแบบนี้สามารถพัฒนาในเชิงพาณิชย์ต่อไป

คำสำคัญ ซีรุ่มน้ำยางพารา, L-quebrachitol, เจลซีรุ่มน้ำยางพารา, สบู่ใสซีรุ่มน้ำยางพารา, สารเคลือบยางแผ่น สำหรับป้องกันการเจริญของเชื้อรา

Abstract

Natural rubber is an important crop in Thailand and export of natural rubber is one of the world's exports accounted for 90.57 % of total exports in the world. Contaminated fungal rubber occurs on rubber sheets result in the lower quality and price of rubber sheets. Thus, may cause effects to the farmer health or workers in rubber smoked sheet industries. The objective of research were improved the value of natural rubber and latex serum extracts in commercial. To inhibited the contaminated rubber sheets fungi by latex serum extracts and to develop the latex serum to pharmaceutical benefits.

Forty-seven fungal strains were isolated on rubber sheets and they were classified into five genera, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. and *Geotrichum* sp. L-quebrachitol are the active compound identified from latex serum and waste water from rubber sheets process. Comparing the L-quebrachitol, latex serum was found 0.054 % than waste water from rubber sheets process 0.036 %, respectively. All fungal strain were tested with latex serum extracts and L-quebrachitol by agar disc diffusion assay and Minimal inhibitory concentrations (MICs). Results showed that the best anti-fungal extracts are methanol extracts effect of 1.7-2.4 cm and the MICs in the range of 0.312-1.25 mg / ml by genus *Penicillium* sp., and *Geotrichum* sp. followed by L-quebrachitol showed anti-fungal activity in 1.0-1.7 cm and the MICs in 1.25-5.00 mg/ml inhibit to *Fusarium* sp. and *Geotrichum* sp., respectively. The last are hexane extracts showed the inhibition zone of 1.0-1.7 cm and the MICs of fungi in 1.25-5.00 mg/ml to *Fusarium* sp. and *Geotrichum* sp., respectively. The rubber coating extract, methanol and L-quebrachitol could be reduce fungal contamination and reduce the growth of fungi on the rubber for two months' periods when used at a concentration of 20 ppm of extracts. L-quebrachitol inhibited *Penicillium* sp. for 45 % and methanol extracts inhibited *Aspergillus* sp. for 20 %, respectively. The physical properties of the coated sheet do not affect the ultimate tensile strength and density of raw rubber sheet significantly.

Also, L-quebrachitol inhibited the growth of acnes bacteria; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Probionibacterium acnes* and bacterial diarrhea; *Escherichia coli*. Methanol extracts inhibited all tested bacteria. Further, L-quebrachitol showed the highest antioxidant activity 57.23 %, followed by ethyl acetate extract and waste water from rubber sheet process extract showed 39.90% and 37.58%, respectively. Biological activity of latex serum were developed four types of the bioproducts; Latex serum gel with L-quebrachitol, Transparent Latex serum with L-quebrachitol soap bar, methanol extracts product for coating rubber sheets and coating product from L-quebrachitol to inhibit contaminated fungi. After testing the stability of latex serum gel, the product was stable and slightly liquid gel. Coating rubber sheets bioproducts; L-quebrachitol product and methanol extract product on the 20 ppm concentration inhibited the growth of rubber sheet fungi for two-month period. All four types of bioproducts could be developed in a commercial.

Keywords: Latex serum, L-quebrachitol, Latex serum gel, Coating bioproducts for protection of rubber sheets fungi, Commercial development.

บทนำ

จากข้อมูลวิชาการยางพารา สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร (2553) พบว่า ในการผลิตยางธรรมชาติ เกษตรกรมักจะประสบปัญหาการเจริญของราบนยางแผ่นดิบ ทำให้คุณภาพ และ มูลค่าของยางแผ่นลดลง เชื้อรา ที่ พบบนยางแผ่นดิบ ได้แก่ *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* และ *Trichoderma* sp. เชื้อรา ดังกล่าว ทำให้น้ำหนักยางแห้งลดลง 20-50 % ของน้ำหนักยางเริ่มต้น ทำให้ผลผลิต คุณภาพ และ ราคา ยางแผ่นที่ส่งออกทั้งใน และ ต่างประเทศ ลดลง(Linos and Steinbuche 2001) เพื่อแก้ปัญหา นี้ จึงมีการเติม สารเคมีในน้ำ ยางพาราสดเพื่อป้องกันการหมักเน่า และ ลดการปนเปื้อนจากเชื้อราบนยางแผ่นดิบ สารเคมีที่ใช้ คือ ฟอร์มาลีน โซเดียมไฮโปคลอไรท์ และ แอมโมเนีย แต่หากใช้เกินอัตราที่กำหนดจะเกิดผลเสียต่อคุณภาพยางแผ่น เป็นพิษต่อผู้ใช้ และ สิ่งแวดล้อม (Yeang et al. 2002) ประกอบกับ น้ำยางธรรมชาติที่นำมาผลิตเป็นยางแผ่น โดยวิธีการง่ายๆของเกษตรกรชาวสวนยาง บางครั้ง พบว่า กระบวนการผลิตแต่ละขั้นตอน อาจเป็นสาเหตุการเกิด เชื้อราบนยางแผ่น เช่น การนำยางแผ่นที่ขึ้นมาซ้อนกัน การล้างยางแผ่นดิบไม่สะอาด ก่อนนำไปอบ หรือ ผึ่งแห้ง อาจพบปัญหา ยางแผ่นมีสีสนิม หรือ มีเชื้อราแห้ง (ต่อสู 2536) การมีเชื้อราเจริญบนยางแผ่น นอกจากจะทำให้ ยางแผ่นมีคุณภาพลดลง ส่งผลให้เกษตรกรขายยางแผ่นในราคาต่ำลง ยังอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของ เกษตรกร หรือ คนงานในโรงงานยางแผ่นรมควัน (ประภัสสร และ คณะ 2555) การใช้สารที่ได้จากธรรมชาติใน การยับยั้งเชื้อรา เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ ในการควบคุม หรือ ยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus* sp., *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Escherichia coli* (กาญจนา และ คณะ 2555)

ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยจึงสนใจที่จะนำ serum น้ำยางพารา มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดโดยการสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพจาก serum น้ำยางพารา เพื่อใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น สารต้านเชื้อรา (Antifungal) และ สารต้าน แบคทีเรีย (Antibacterial) และ สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) นอกจากนี้ สามารถนำมาใช้ในการยับยั้ง เชื้อราปนเปื้อนยางแผ่นผึ่งแห้ง ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางการแพทย์ เพื่อลดการใช้สารเคมีในการควบคุมเชื้อราบน ยางแผ่น และ สารเคมีในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคทางการแพทย์ และ สารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อประยุกต์ใช้ ในทางการแพทย์ และ ระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็กทำให้เกิดแนวทางเลือกแก่เกษตรกร สามารถลดต้นทุนการ ผลิต ทำให้เกษตรกรมีกำไรเพิ่มขึ้น สามารถแข่งขัน และ อยู่รอดในตลาดได้

1. เพื่อศึกษาวิธีรื้อน้ำยางพาราในการยับยั้งเชื้อราบนเปลือกบนยางแผ่นผึ่งแห้ง
2. เพื่อศึกษาวิธีรื้อน้ำยางพาราใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม
3. เพื่อศึกษาการเพิ่มมูลค่าของน้ำยางพาราในเชิงพาณิชย์

ตรวจเอกสาร

1 น้ำยางพารา (Latex)

น้ำยาง มาจากภาษาละติน หมายถึง ของเหลว (liquid) หรือ ของไหล (fluid) บางครั้ง หมายถึง ของเหลว หรือ ของไหล ที่มีลักษณะคล้ายน้ำนม (milky) น้ำยาง จึงเป็นคำที่ใช้กันทั่วไปในอุตสาหกรรมยาง

1.1 ส่วนประกอบของน้ำยางสด

น้ำยาง จากต้นยางพารา ขณะที่ยังสดจะมีสีขาว หรือ สีครีม สามารถไหลได้เองโดยอิสระมีความหนืด ประมาณ 12 - 15 เซนติพอยส์ (centipoises) ความหนาแน่น ประมาณ 0.975 - 0.980 กรัม ต่อ ลูกบาศก์ เซนติเมตร(g/cm^3) และ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 6.5 - 7.0 รูปร่างของอนุภาคยางเป็นรูปกลม หรือ รูปลูกแพร ขนาด 0.05 - 5 ไมโครเมตร น้ำยางสด เป็นสารแขวนลอยของอนุภาคยางในของเหลว ที่เรียกว่า ซีรัม (serum) อนุภาคยาง ดังกล่าว เป็นสารพอลิเมอร์ไฮโดรคาร์บอน ที่มีชื่อทางเคมี 1, 4 - พอลิไอโซพรีน มีโครงสร้างโมเลกุล แบบซิส (cis-1, 4-polyisoprene) ประกอบ ด้วย มอนอเมอร์ (monomer) ของไอโซพรีน (isoprene) ซึ่งมี คาร์บอน (carbon, C) 5 อะตอม กับ ไฮโดรเจน (hydrogen, H) 8 อะตอม ต่อกันจำนวนมาก ต่อกันเป็นสายโซ่ โมเลกุลยาว



ภาพที่ 1 สูตรโมเลกุลของไอโซพรีนและพอลิไอโซพรีน

1.2 ส่วนประกอบของน้ำยางสด แบ่งเป็น 2 ส่วนหลัก คือ

1. ส่วนที่เป็นยาง (Dry Rubber Content, DRC) เป็นอนุภาคยางของไอโซพรีน ที่เชื่อมต่อกัน ประมาณ 2000 - 5000 หน่วย ต่อ 1 โมเลกุล

ตารางที่ 1 ส่วนที่เป็นเนื้อยาง ร้อยละ 35

เนื้อยางแห้ง	ร้อยละส่วนประกอบ (%)
ยาง (hydrocarbon)	86
น้ำ (กระจายอยู่ใน hydrocarbon)	10
ไขมัน	3
โปรตีน	1

2. ส่วนที่ไม่ใช่ยาง (Non Rubber Content) ประมาณร้อยละ 65 แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ

2.1 ส่วนที่เป็นน้ำ หรือ ซีรัม (Serum) มีความหนาแน่น ประมาณ 1.02 ประกอบด้วย สารพวก คาร์โบไฮเดรต และ กรดอะมิโน

2.2 ส่วนของลูตอยด์ (Lutoid) และ สารอื่น ลูตอยด์เป็นอนุภาคกลมมีเยื่อบางหุ้มอยู่ ขนาดใหญ่กว่าอนุภาคยาง มีเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 2-5 ไมครอน ภายในเป็นเยื่อบางๆ ประกอบด้วยส่วนที่ เรียกว่า บี-ซีรัม (B-Serum) ที่มีส่วนของสารละลายกรดเกลือ โปรตีน น้ำตาล และ โพลีฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้ยางมีสีคล้ำเมื่อสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ มี pH = 5.5 และ ส่วนที่เป็น ของเหลวใส เรียกว่า ซี-ซีรัม (C-serum)

3. สารอื่น หรือ อนุภาค ฟรีวิลลิง (Frey Wyssling)

เป็นอนุภาคที่มีสีเหลืองเข้ม สีเหลืองเข้มจะมาก หรือ น้อย ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารคาโรทีนอย (carotenoid) ที่ประกอบอยู่ มีขนาดใหญ่กว่าอนุภาคของยาง และ มีความหนาแน่นมากกว่ายางเล็กน้อย มีส่วนประกอบของไขมันรวมอยู่ด้วย

2 ผลกระทบของเชื้อราปนเปื้อนในยางแผ่น

สำหรับในอุตสาหกรรมการผลิตยาง ในประเทศไทย โดยเฉพาะยางก้อนถ้วย และ ยางแผ่นผึ่งแห้ง มักมีปัญหา เชื้อรา ขึ้นบนยางแผ่น ทำให้ได้ยางแผ่นคุณภาพต่ำ และ ราคาขายลดลง แนวทางในการแก้ปัญหา โดยการนำยางแผ่น จุ่มลงในสารละลายพาราไนโตรฟีนอล หรือ ผสมลงในน้ำยาง ก่อนการทำให้น้ำยางแข็งตัว ทำให้เกิดการแยกชั้นของส่วนที่เป็นเนื้อยาง กับ ส่วนที่เป็นน้ำยาง สำหรับส่วนที่ไม่ใช่เนื้อยาง หรือ เรียกว่า ซีรัม (serum) เป็นส่วนที่ไม่มีประโยชน์ และ ทิ้งไป ทำให้เกิดปัญหาของมลพิษทางกลิ่น และ มลพิษทางน้ำ โดย การศึกษาเรื่องนี้จะนำส่วน serum น้ำยางพารา ที่เหลือทิ้งมาทำให้เกิดประโยชน์ โดยการหาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ สารยับยั้งเชื้อราบนเปลือกยางแผ่นดิบ เจลแต้มผิว และ ชโลมร้วยรอยแห้งวัย และ สบู่สำหรับผิวหน้าจากซีรั่มน้ำยางพารา ในอนาคตได้

2.1 การยับยั้งเชื้อราบนเปลือกยางดิบ มี 2 วิธี คือ การใช้สารเคมี และการรมควัน

การใช้สารเคมี หมายถึง การนำสารเคมีมาชุบ หรือ ฉีดพ่นในแผ่นยาง สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ กลุ่ม โซเดียม ซอร์เบต โซเดียมเปอร์บอเรต โซเดียมดีไฮโดรอะซิเตต และ เอทิลแอลกอฮอล์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (กิตติกานต์, 2554)

การรมควัน หมายถึง การนำยางแผ่นที่ผ่านการรีด ไปรมควันในโรงรม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ยางแผ่นแห้งสนิท และ ลดการปนเปื้อนของเชื้อราบนแผ่นยาง เนื่องจาก ในควันมีสารประกอบกลุ่ม ฟีนอลิก คอมพาวด์ (phenolic compound) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ยางแผ่นรมควัน สามารถนำไปจำหน่ายได้เลย หาก นำแผ่นยางตากทิ้งไว้ให้แห้งตามธรรมชาติ (Air Dry Sheet) แผ่นยางดิบ จะเกิดความชื้น ทำให้เชื้อราเจริญบนแผ่นยางได้ ยางแผ่นที่ผ่านการรมควันแล้ว เรียกว่า ยางแผ่นรมควัน (Ribbed Smoked Sheet)

2.2 สารที่พบในซีรั่มน้ำยางพารา (Bioactive compound from Latex Serum) (Kanokwiroon *et al.* 2008)

ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ เช่น β -1,3-glucanase isozymes, Polyphenol oxidase, NADPH quinine reductase, Protease inhibitor, Glucosidase, β -galactosidase, β -N-acetyl-glucosaminidase และ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ กลุ่ม Antimicrobial, Anticancer, Antifungal, Antibacterial, Antiviral, Antitumor และ Hydroxynitrile lyase บริเวณใบยางพารา ช่วย สังเคราะห์สาร cyanohydrins ในอุตสาหกรรมยา (Lee *et al.* 2012)

3 กลุ่มของจุลินทรีย์ที่นำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของซีรั่มน้ำยางพารา

เชื้อราบนเปลือกยางแผ่น (พงษ์สวัสดิ์, 2555)

เชื้อราที่พบบนยางพาราแผ่น ได้แก่ *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Paecilomyces* และ *Trichoderma* สาเหตุที่เชื้อราเจริญบนยางแผ่น เนื่องจาก มีการรมควันน้อยเกินไป การนำยางที่ยังไม่สะอาด น้ำเข้ารม ยางมีความชื้นมาก ไม่แห้ง ความร้อนเริ่มแรกต่างกันไป ยางแผ่น ที่มีเชื้อราเจริญมาก น้ำหนักจะลดลงประมาณ 20 % ในเวลา 1 เดือน ยางแผ่นรมควัน สามารถเกิดราสนิมได้ เนื่องจาก ฝังยางไว้นานเกินไปก่อนเข้ารม หรือ ความชื้นสูง ไม่ได้ทำความสะอาดยางที่เข้ารม และ ระหว่างรมด้วยความร้อน แผ่นยาง ดังกล่าว จะมีสาร

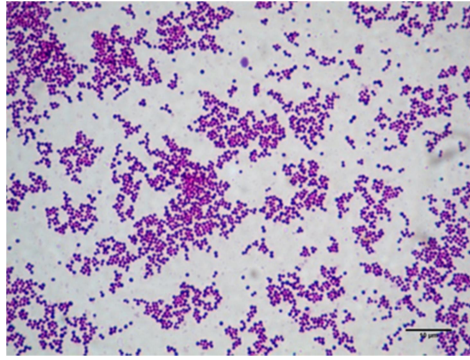
ถูกขับออกมาจากแผ่นยาง แล้วแผ่ออกไปเคลือบที่ผิว ราสนิม เกิดจาก การแห้งตัวอย่างช้าๆ ในระยะแรกของการ รม การแก้ไข ทำได้โดยจุ่มยางแผ่นดิบด้วยสารละลายพาราไนโตรฟินอล ควรผึ่งยางให้สะเด็ดน้ำก่อนนำเข้ารม แล้ว ให้นำเข้ารมทันที เตรียมห้องรมให้มีความร้อน พร้อมก่อนนำยางเข้ารม ไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงก่อนเข้ารม และ ยาง แผ่นดิบที่แขวนบนราวไม้ ไม่ควรวางซ้อนทับกัน อุณหภูมิ ความชื้น ค่าพีเอช มีผลทำให้เชื้อราเจริญได้เช่นกัน เนื่องจากเชื้อราที่เจริญได้บนยางแผ่น มักเป็นเชื้อราในกลุ่มที่เจริญบนผลิตภัณฑ์ขนมอบ หรือ เมล็ดธัญพืช ซึ่ง ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ก็มักเกิดปัญหาจากการเจริญของเชื้อราเช่นกัน

3.1 แบคทีเรียที่ก่อโรคท้องร่วง และ แบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว (วาริรัตน์, 2557)

การติดเชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ หลายวิธี เช่น การรับประทานอาหารที่มีเชื้อ การหายใจ เอาอากาศที่มีเชื้อโรคเข้าไป รวมถึงการสัมผัสเชื้อโรคจากพื้นผิวต่างๆ แล้วมาสัมผัสกับร่างกาย หรือ อาหาร แล้ว รับประทานเข้าไป ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ ดังนั้น พื้นผิวสัมผัสต่างๆ อาจเป็นแหล่งแพร่เชื้อโรค ซึ่งเชื้อโรคอาจถูก แพร่จากผู้ติดเชื้อโดยตรง หรือ นำมาโดยตัวกลาง หรือ พาหะอื่นๆ เช่น ลม น้ำ และ แมลง เป็นต้น เชื้อก่อโรคที่มัก พบ บนพื้นผิวสัมผัส พบได้หลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus* เป็นต้น

Staphylococcus aureus (วาริรัตน์, 2557)

แบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นกลุ่มๆ คล้าย พวงองุ่น แต่จะพบ เป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ และ สายสั้นๆ (โดยมากไม่เกิน 4 เซลล์) อยู่ปะปนด้วยเสมอ (ภาพที่ 2) แบคทีเรียชนิดนี้ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนไหว ไม่มีแคปซูล ให้ผลบวกในการทดสอบ Catalase และ ในสถานะที่ไม่ มีออกซิเจน จะสลายน้ำตาลให้กรด การติดต่อของเชื้อกลุ่มนี้มาสู่คน ติดต่อกับการรับประทาน หรือ ดื่มน้ำที่มีเชื้อ ปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 1-6 ชั่วโมง เนื่องจาก *S. aureus* ผลิต เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) สารพิษ ที่สร้าง มีสมบัติพิเศษ คือ ทนความร้อน ออกฤทธิ์ที่เยื่อลำไส้ ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และ ท้องเดิน ส่วนมาก ไม่มีไข้ ในรายที่รุนแรงอาจช็อกได้ หรือ บางชนิดทำให้เกิดสิวได้ แต่ส่วนใหญ่อาการจะดีขึ้นใน 8-24 ชั่วโมง อาการรุนแรงของโรคนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารพิษที่ปนเปื้อน *S. aureus* เป็นเชื้อที่ผลิตสารพิษ และ สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ coagulase ได้



ภาพที่ 2 ลักษณะของ *Staphylococcus aureus*

(ที่มา <http://cit.vfu.cz/alimentarni- html> วันที่ สืบค้น 26/04/ 59)

Staphylococcus epidermidis

แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ขนาด 0.5-1.5 μm อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือ รวมกันเป็นกลุ่มคล้าย พวงองุ่น ลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก สีขาว สามารถเจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจน หรือ มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C เป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่ม *Staphylococcus* sp. ไม่ผลิตเอนไซม์ coagulase ไม่ผลิตแอลฟาที่ออกซิน (α -toxin) เอกซ์โฟลิเอติน (exfoliatin) และ ซูเปอร์แอนติเจนที่ออกซิน (superantigen toxins) ได้

Staphylococcus epidermidis เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) พบ บริเวณผิวหนัง โพรงจมูก รูหู และ ทางเดินปัสสาวะส่วนปลาย ยากต่อการรักษา เนื่องจาก *S. epidermidis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และมี แบบแผนการดื้อยาไม่แน่นอน ซึ่งแตกต่างกับ *S. aureus* ที่พบการดื้อยา penicillinase-resistant penicillin และ cephalosporin มากกว่า ยาทั้ง 2 กลุ่ม นี้ ได้ผลดีกับ *S. aureus* เท่านั้น

การติดเชื้อผิวหนัง

Staphylococcus spp. พบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนัง (pyoderma) ได้บ่อยที่สุด ทั้ง แบบปฐมภูมิ และ ทุติยภูมิ (primary and secondary pyodermas) (Craft *et al.*, 2008) การติดเชืวดังกล่าว มี ดังต่อไปนี้

Impetigo

การติดเชื้อบริเวณผิวหนังชั้นตื้น พบบ่อยมากทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อน พบมาก ในเด็ก และ ทุกกลุ่มอายุ แบ่งตามอาการทางคลินิก ได้ 2 ประเภท ได้แก่

Non-bullous impetigo

พบได้บ่อยที่สุด ประมาณ 70% ของการติดเชื้อผิวหนังชนิดนี้ใช้เวลา ประมาณ 11 วัน ในการกระจายของ แผลที่เรียกว่าโพรงจุมพวยยังผิวหนัง และ ก่อให้เกิดรอยโรคขึ้น มักพบบริเวณใบหน้าโดยเฉพาะรอบจุมพวย เนื่องจาก โพรงจุมพวยเป็นบริเวณที่พบ *S. aureus* ในปริมาณมากที่สุด แต่อาจพบได้ บริเวณแขนขา หากมีการบาดเจ็บของ ผิวหนัง นอกจากนี้ พบว่า โรค และ ภาวะที่ผิดปกติบริเวณผิวหนัง เช่น การติดเชื้อรา เริ่ม อีสุกอีใส การถูกแมลง กัด รอยถลอก บาดแผล อาจเพิ่มโอกาสในการติดเชื้อผิวหนังชนิดนี้ อาการมักเริ่มต้นเป็นตุ่มใส (vesicles) หรือ ตุ่มหนอง (pustules) จากนั้น เปลี่ยนเป็นสะเก็ดสีน้ำตาล (honey-colored crusted plaque) อย่างรวดเร็ว หาก ไม่ได้รับการรักษา ผู้ป่วยจะเกิดอาการต่อมน้ำเหลืองโตได้ (regional lymphadenopathy) และ รอยโรคอาจ ขยายขนาด และ ลงลึกถึงชั้นหนังแท้ ก่อให้เกิดแผลได้ (ulcer)

Ecthyma

เกิดจาก *Staphylococcus aureus* และ group A *Streptococcus* อาการเป็นรอยถลอก หรือ แผลที่ ปกคลุมด้วยสะเก็ดหนาสีเหลืองเทา แผลมีลักษณะ ‘punched out’ ขอบยกนูนหนา อยู่ในบริเวณที่มีการกดทับ อับชื้น พบมาก ในผู้ป่วยที่อยู่ในสภาพอากาศที่ร้อนชื้น มักพบรอยโรคบริเวณ ขา และ เท้า

Furuncle และ Carbuncle

Furuncle หรือ ฝี คือ deep-seated inflammatory nodule ที่เกิดขึ้นรอบๆ hair follicle ส่วน carbuncle หรือ ฝีฝักบัว เป็นรอยโรคที่มีความรุนแรงมากกว่า ลึกกว่า มักมีช่องทางเชื่อมต่อกันเป็นโพรงขนาดใหญ่ มักเกิดจาก furuncles จำนวนมากอยู่ใกล้กันมาเชื่อมต่อกัน (Ryan and Ray 2010)

Furuncle มักเริ่มด้วย hard, tender, red folliculocentric nodule ในบริเวณที่มีขน หลายวันต่อมา จะเริ่มกลายเป็นฝีหนอง เจ็บ และ แตกออกในที่สุด

Carbuncle มักพบบริเวณท้ายทอย หลัง ต้นขา โดยพบเป็นฝีขนาดใหญ่ ลึก มีการอักเสบ และ เจ็บมาก มักมีไข้ และ ปวดเมื่อยร่วมด้วย

Escherichia coli (วาริรัน, 2557)

จีโนม *Escherichia* มีอยู่ 5 สปีชีส์ โดยมี *Escherichia coli* เป็น type species *E. coli* เป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ ปกติจะไม่ทำให้เกิดโรค แต่จะทำให้เกิดโรคได้ถ้าเชื้อมีอยู่นอกลำไส้ เช่น ท้องเสีย ท่อน้ำดี ปอด เยื่อหุ้มปอด เยื่อหุ้มสมอง และ ไชสันหลังในเด็กแรกเกิด *E. coli* บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในคน และ สัตว์

ลักษณะของ *Escherichia coli*

Escherichia coli เป็นเซลล์รูปท่อน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ อาจเคลื่อนที่ได้ หรือ ไม่เคลื่อนที่ บางสายพันธุ์ที่แยกได้จากนอกลำไส้สร้างแคปซูลได้ โคโลนีเรียบ ไม่มีสี มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร ในเวลา 18 ชั่วโมง แต่ถ้าเลี้ยงในอาหารที่แตกต่าง เช่น Mac Conkey agar โคโลนีมีสีแดงชมพู ขนาดใหญ่ เนื่องจาก เฟอ์เมนต์แล็กโทส หรือ เลี้ยงในอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) โคโลนี มีลักษณะมันวาวคล้ายโลหะ บางสายพันธุ์เฟอ์เมนต์น้ำตาลแล็กโทสได้ช้า ถ้าเลี้ยงในอาหารผสมเลือด (Blood agar) บางสายพันธุ์ เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง แบบบีตาฮีโมไลซิส เชื้อนี้เจริญได้ในอุณหภูมิช่วงกว้าง (15-45°C) บางสายพันธุ์ทนความร้อน 60°C 15 นาที หรือ 55°C 60 นาที

สมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญ คือ การทดสอบ IMViC ได้ผล + + - - คือ สามารถใช้ทริปโทเฟนให้อินโดล และ ให้ผลบวก กับ Methyl red แต่ ไม่สร้างอะซิติกเมทิลคาร์บินอล (acetyl methyl carbinol) และ ไม่ใช่ซิเตรต เป็น แหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ ยังมีไลซีนดีคาร์บอกซิลเลส และ สามารถใช้อะซิเตต เป็น แหล่งคาร์บอนได้

ปัจจัยในการทำให้เกิดโรค

การที่ *E. coli* ทำให้เกิดโรค ได้ เนื่องจาก มี virulence factors หลายชนิดที่ ไม่พบใน *E. coli* ที่เป็นเชื้อประจำถิ่น อย่างน้อยที่สุดจะต้องมีปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่ง คือ

1. มีความสามารถที่จะเกาะติดกับเซลล์บางชนิดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

2. ความสามารถที่จะบุกรุก และ เข้าไปเจริญในเซลล์ของเยื่อบุผิวลำไส้
3. ความสามารถในการสร้างเอนเทอโรทอกซิน ที่ทำให้ร่างกายสูญเสีย น้ำ และ ของเหลว จึงเกิดอาการท้องร่วง การที่ไวโททอกซินที่ไปขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีน จึงทำให้เกิดการตกเลือดที่ลำไส้
4. การมีแคปซูลที่ป้องกันไม่ให้ถูกเม็ดเลือดขาวจับกิน ไวรูเลนซ์แฟกเตอร์ ที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงนี้เกิดจากยีนใน พลาสมิด จึง สามารถถ่ายยีนนี้ไปยัง *E. coli* สายพันธุ์อื่น โดยวิธีทรานสดักชัน (transduction) หรือ วิธีรีคอมบิเนชัน (recombination)

การทำให้เกิดโรค

Escherichia coli สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรค อาจทำให้เกิดโรคดังนี้ คือ ท้องร่วง (gastroenteritis) ทางเดิน ปัสสาวะอักเสบ (neonatal meningitis) เป็นต้น

1. ท้องร่วง

เชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงในคน และ สัตว์ คือ

1.1 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

ทำให้เกิดโรคท้องร่วงกับเด็ก และ ผู้ใหญ่ เชื้อจะสร้างเอนเทอโรทอกซิน จำนวน 2 ชนิด คือ

ก. ทอกซินชนิดไม่ทนความร้อน (Heat-labile enterotoxin; LT)

ทอกซินนี้ จะถูกทำลายด้วยความร้อน 65°C ในเวลา 30 นาที การสร้างทอกซินมีพลาสมิด (Ent plasmid) ควบคุม และ ถ่ายทอดไปยังเซลล์อื่นได้ เอนเทอโรทอกซิน มีกลไกการทำงานคล้ายกับ cholera toxin ของ *Vibrio cholerae*

LT มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 8600 ดาลตัน ประกอบด้วยเพปไทด์ต่อกัน มี 2 ส่วนย่อย คือ ส่วนย่อย A ส่วนย่อย B จะเกาะกับ GM1 แกงกลีโคไซด์ที่บริชบอร์ดอร์ (bush border) ของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้เล็ก เป็นตัวช่วยให้ส่วนย่อย A

ข. ทอกซินชนิดทนความร้อน (Heat-stable enterotoxin; STa และ STb)

STa มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1500-2000 ดาลตัน ทนความร้อน 100°C 30 นาที และ ทน เอนไซม์ โปรตีเอส ไม่มีสมบัติเป็นแอนติเจน STa จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กัวนิเลตไซเคเลส ที่เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ ทำให้เพิ่มการสะสม cyclin guanosine-5-monophosphate (cGMP) ภายในเซลล์ cGMP เป็นตัวยับยั้งการดูด ซึมโซเดียมไอออน และ คลอไรด์ไอออน กลับที่บริชบอร์ดอร์ จึงกระตุ้นการหลั่งของเหลวออกจากลำไส้

STb เป็นทอกซินที่ทนความร้อนอีกชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดท้องร่วงในลูกหมู แต่ ไม่ให้ผล เมื่อทดลองกับลูกหมู ยังไม่ทราบกลไกการทำงานของ Stb ชัดเจน แต่จะไม่เกี่ยวข้องกับ การเพิ่มการสะสมเอนไซม์อะดีนิลไซเคลส หรือ กัวนิเลตไซเคลส ในมิวโคซาเซลล์ของลำไส้ แต่อาจจะกระตุ้นการสร้างโปรสตาแกลนดิน ทำให้เพิ่มการผลิต ไบคาร์บอเนตไอออน

การสร้างทอกซินชนิดทนความร้อน(Heat-stable enterotoxin; ST) อยู่ในความควบคุมของพลาสมิด

ในการทำให้เกิดโรค ลำพังเอนเทอโรทอกซินอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดท้องร่วงได้ แต่จะต้องเกาะติดกับผิวมิวโคซาของเยื่อบุผิวลำไส้เล็ก ดังนั้น ETEC จะต้องสร้างพิโล หรือ ฟิมเบรีย ไปยึดกับเยื่อบุผิวลำไส้เล็ก สารที่จับกับเซลล์ของโฮสต์ เรียกว่า Fimbrial adhesions หรือ colonization factor ระยะฟักตัวของเชื้อ ETEC กินเวลา 1-2 วัน แต่โดยเฉลี่ยกินเวลา 3-4 วัน มีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และ ถ่ายเหลวเป็นน้ำ โดยทั่วไปมีอาการไม่รุนแรง

ปัจจุบัน ETEC เป็นตัวการทำให้เกิดโรคตั้งแต่อาการคล้ายอหิวา และ ท้องร่วงรุนแรงในเด็กทารก จนถึงท้องร่วงอ่อนๆในผู้เดินทาง โดยเกิดจากการกินน้ำ และ อาหารที่ปนเปื้อน และ จะต้องมีเชื้อ 10^8 CFU/ml จึงจะทำให้เกิดโรคได้

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

ทำให้เกิดท้องร่วงรุนแรงในเด็กแรกเกิด และ เด็กทารก จนถึง 2 ขวบ ไม่ทำให้เกิดโรคในผู้ใหญ่ *E. coli* สายพันธุ์นี้ทำให้เกิดท้องร่วงแบบเป็นน้ำ ไม่มีเลือดปน และ มีอาการมีไข้ คลื่นไส้ อาเจียน

EPEC ไม่สร้างทอกซินทั้ง LT และ ST และ ไม่มี colonization factor เหมือน EPEC แต่ พบว่า มีทอกซิน คล้ายกับทอกซินที่สังเคราะห์โดย *Shigella* บางตัว จึงเรียกว่า Shiga like toxin เชื้อ EPEC จะจับแน่นกับผิวเยื่อ บุลำไส้เล็ก และ ทำลายไมโครวิลไลเฉพาะที่ จึงอาจเรียกว่า enteroadherent *E. coli* แต่เชื่อว่าจะไม่บุกรุกเข้าเซลล์ ความสามารถของ EPEC ที่จับแน่นกับเซลล์ลำไส้เล็ก เกี่ยวข้องกับพลาสมิดที่มีขนาด 55-65 ล้านดาลตัน พลาสมิดนี้จะควบคุม การสร้างสารแอดฮีซิน ที่เรียกว่า EPEC adhesion (adherence) factor

การป้องกันโรคที่เกิดจาก EPEC พบว่า ไม่มีวัคซีนป้องกัน การรักษาโรคนี้ โดยให้ นิโอไมซิน หรือ เจนตาไมซิน ร่วมกับการให้น้ำเกลือ

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

ทำให้เกิดโรคท้องร่วงคล้ายโรคบิด ที่เกิดจาก *Shigella* โรคนี้เกิดได้กับทุกวัยทั้งเด็กโต และ ผู้ใหญ่

เชื้อ EIEC คล้ายกับเชื้อ *Shigella* ทั้งกลไกการเกิดโรค และ อาการของโรค นอกจากนี้ เชื้อยังไม่เคลื่อนที่เหมือน *Shigella* และ ให้ผลกับการย่อน้ำตาลแล็กโทส เป็นลบ ทำปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับ O แอนติเจนของ *Shigella*

ปัจจัยที่ทำให้เชื้อมีความรุนแรง อยู่ที่ความสามารถในการบุกรุกเข้าเยื่อบุผิวลำไส้ นอกจากนี้ ยังสร้าง Shiga-like toxin-I และ Shiga-like toxin-II อย่างไรก็ตาม ปริมาณทอกซินที่สร้าง ก็น้อยกว่าที่สร้างโดย *Shigella* หรือ EHEC

EIEC มี พลาสมิดขนาดใหญ่ (140 ล้านดัลตัน) อาจทำหน้าที่เกี่ยวกับ การจับของเชื้อกับเซลล์ของโฮสต์ ทำให้แบคทีเรียก่อโรคชนิดนี้ บุกรุกเข้าเยื่อบุผิวลำไส้คน เมื่อบุกรุกแล้ว จะเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อบุผิวของไอเลียม และ โคลอน และ เข้าทำลายเซลล์ ทำให้เกิดเป็นแผล จึงทำให้มีอาการปวดท้อง มีหนอง และ เลือดออกในอุจจาระ

การทดสอบ ความสามารถในการบุกรุกเข้าเนื้อเยื่อ ทดสอบโดยวิธี Sereny test โดยหยดเชื้อ EIEC เข้าไปในลูกตาของหนูตะเภา เพื่อดูว่าเกิดกระจกตาและเยื่อตาขาวอักเสบหรือไม่

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)

พบครั้งแรกใน ค. ศ 1982 ในสหรัฐอเมริกา *E. coli* ที่พบ คือ *E. coli* O157 ที่พบมาก คือ *E. coli* O157 :H7 ทำให้เกิดอาการ ดังต่อไปนี้

1. ท้องร่วงที่แตกต่างจากโรคบิด คือ ทำให้เกิดการตกเลือดที่ลำไส้ มีอาการท้องเสีย และ ปวดท้องรุนแรง อุจจาระมีน้ำมาก ต่อมาเมื่อเลือดปนมากจนถ่ายเป็นเลือด อาเจียน ไม่มีไข้ หรือ มีไข้เล็กน้อย ระยะพักตัว 3-9 วัน โดยทั่วไป มีอาการภายใน 4 วัน โดยมีอาการมีน้ำسهสม บวม น้ำ ลำไส้แดงเหมือนลายนิ้วหัวแม่มือ มีเลือดคั่งที่มิวโคซา โรคนี้สามารถเกิดได้กับคนทุกวัย แต่ส่วนใหญ่พบในเด็ก และ หายเองได้

2. โรค hemolytic uremic syndrome (HUS) พบได้ ในคนทุกวัย แต่พบมากในเด็กทารก และ เป็นสาเหตุของไตวายในเด็ก โดยผู้ป่วยมีอาการถ่ายอุจจาระเป็นเลือด อาเจียน ชีตขาว เนื่องจาก ทอกซินทำลายเอนโดเธลิเยลเซลล์ ในหลอดเลือดแดงในไต ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ต่อมาเกล็ดเลือดลดลง และ ไตทำงานผิดปกติ

เชื้อไม่มี LT, ST และ ไม่บุกรุกเข้าเซลล์เยื่อบุผิว แต่ทอกซิน ที่สามารถทำลายเวโรเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์จากเซลล์ไตลิงชนิดหนึ่ง เรียกทอกซินนี้ว่า เวโรไซโททอกซิน หรือ เวโรทอกซิน ดังนั้นจึงอาจเรียก ชื่อ *E. coli* ชนิดนี้ ว่า เวโรไซโททอกซิเจนิก *E. coli* (Verocytotoxigenic *E. coli* หรือ VTEC) ทอกซินชนิดนี้ ยังมีสมบัติทาง

แอนติเจนคล้ายกับทอกซินจาก *Shigella dysenteriae* type 1 และ ทำให้เป็นกลางด้วยแอนติซีรัมที่ ต้าน *Shigella* toxin จึงเรียกทอกซินของเชื้อนี้ว่า Shiga-like toxin

กลไกที่สารพิษมีผลต่อการทำงานของลำไส้ นั้น เนื่องจาก Shiga-like toxin ประกอบด้วยหน่วยย่อย A 1 และ ส่วนย่อย B 5 ส่วน ส่วนย่อย B จะจับกับไกลโคลิปิด ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของไมโครวิลไล แล้วปล่อยส่วนย่อย A ออกไปเพื่อยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยยับยั้งที่ 60s ไรโบโซม การยับยั้ง เกิดจาก การที่ทอกซินไปย่อยโมเลกุล อะดีนีน ออกจาก 28s ribosomal RNA ทำให้โครงสร้างของ 60s ไรโบโซมเปลี่ยนไป ความสามารถในการจับกับ EF-1 (Elongation factor 1) ลดลง จึงยับยั้งการจับของ aminoacyl-tRNA กับไรโบโซม นั้น คือ ผลของทอกซิน จะไปหยุดยั้งการสังเคราะห์โปรตีนนั่นเอง จึงทำให้เซลล์ตาย และ หลุดลอกออก จึงเกิดอาการถ่ายเป็นเลือด

การระบาดของโรคที่เกิดจาก *E. coli* ชนิดนี้ เกิดจาก การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ หรือ อาหารที่ ได้รับความร้อนไม่เพียงพอ เช่น แฮมเบอร์เกอร์ แซนด์วิช เนื้อดิบ นมดิบ รวมทั้ง น้ำดื่ม น้ำใช้ และ ติดต่อกับ บุคคลหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่ง เช่น ตามสถานพยาบาล หรือ สถานเลี้ยงเด็ก

การรักษาและการป้องกันโรคท้องร่วงจาก *Escherichia coli*

เชื่อนี้ไว ต่อยาซัลโฟนาไมด์ อะมิโนไกลโคไซด์ คลอแรมเฟนิคอล เตตราไซคลิน คาร์เบนซิลลิน เซฟาโลสปอริน

การรักษา ด้วยซัลโฟนาไมด์ หรือ แอมพิซิลลิน เพียงพอในรายที่ติดเชื้อทางปัสสาวะเฉียบพลัน แต่ไม่มีโรคแทรกซ้อน ในรายที่เป็นเรื้อรัง จึงใช้ยาเมธินาไมนแมนดีเลท กรดนาลิดิซิก ไตรเมโทพริม-ซัลฟาเมธอกซาโซล

ในเด็กทารกที่เกิดท้องเดิน เนื่องจาก EPEC จะให้กินนิโอไมซิน หรือ โคลิสตินนิค จากการรักษาด้วยยาแล้ว ยังต้องรับให้น้ำเกลือและอิเล็กโทรไลต์ เพื่อไปทดแทนน้ำส่วนที่สูญเสียไป

การป้องกันที่ดีที่สุด คือ การหลีกเลี่ยงการได้รับเชื้อจากอาหาร และ น้ำที่ปนเปื้อน รวมทั้ง ให้ความรู้เกี่ยวกับสุขอนามัยในการจับต้อง หรือ ประุงอาหาร โดยเฉพาะอาหารที่ปรุงให้เด็กๆ นักเดินทางที่เดินทางเข้าไปในท้องถิ่นด้อยพัฒนา โดยเฉพาะในเขตร้อน ควรระวัง เลือกรับประทานอาหารที่ทำเสร็จใหม่ และ ยังร้อนอยู่ รวมทั้ง ดื่มน้ำที่บรรจุขวด ที่ผ่านกระบวนการบรรจุที่สะอาดปลอดภัย และ ไม่รับประทานอาหารที่ไม่ผ่านการปรุงสุก หรือ ไม่รับประทานอาหารสุกๆดิบๆ รวมทั้ง ดื่มนมที่ผ่านความร้อน

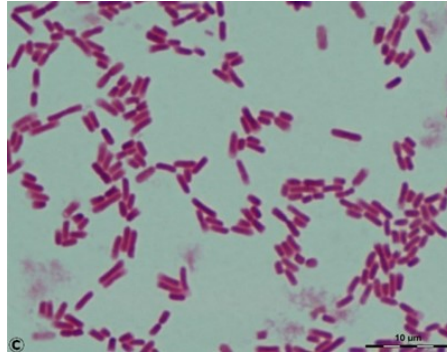
ทางเดินปัสสาวะอักเสบเนื่องจากเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli* Urinary Tract Infection)

Escherichia coli เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดทางเดินปัสสาวะอักเสบได้บ่อยที่สุด กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ ซีโรทัยป์ 1,2,4,6,7,9,15,16,18 และ 75 การที่เชื้อก่อโรคได้รุนแรง เนื่องจาก สร้างฮีโมไลซิน และ เกาะติดกับเยื่อบุผิวของทางเดินปัสสาวะ การเกาะติด นี้เกี่ยวข้องกับ พี พิล (P pili) และ แอดฮีซิน ผู้หญิงมีโอกาสเป็นโรคนี้ได้มากกว่าผู้ชาย เพราะ หลอดปัสสาวะของผู้หญิงสั้นกว่า โดยเชื้อจะอยู่ในอุจจาระ และ อาจรวมกลุ่มอยู่ใกล้ช่องคลอด และ รอบๆหลอดปัสสาวะ ทำให้เชื้อมีโอกาสเข้าไปยังกระเพาะปัสสาวะได้ ผู้ป่วยที่ได้รับการสวนหลอดปัสสาวะมีโอกาสติดเชื้อประมาณ 1 % ของคนไข้ ทำให้มีแบคทีเรียจำนวนมากอยู่ในน้ำปัสสาวะ อาการจะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อบุกรุกเข้ามามีโคซา ทำให้เซลล์ตาย และ เกิดการอักเสบ ทำให้เกิดโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ เชื้อที่บุกรุกอาจเข้าสู่ท่อไต เพิ่มจำนวนในกรวยไต ทำให้เกิดโรคภาวะไต และ กรวยไตอักเสบ

3. เยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กทารก (Neonatal meningitis)

Escherichia coli และ streptococci group B เป็นสาเหตุของ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบในเด็กทารกอายุ 1 เดือนแรก มากที่สุด เยื่อหุ้มสมองอักเสบ ที่เกิดจาก *E. coli* เกิดจากสายพันธุ์ K1 มากที่สุด การเกิดโรค เข้าใจว่าทารกได้รับเชื้อจากมารดาโดยผ่านทางนาโซฟาริงซ์ หรือ ลำไส้ หลังจาก เชื้อเข้ากระแสเลือด จะถูกนำไปยังเยื่อหุ้มสมอง

Escherichia coli รูปร่างเป็นแท่ง ติดสีแกรมลบ (ภาพที่ 3) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เคลื่อนที่โดยใช้ Peritrichous flagella ไม่สร้างสปอร์ สามารถได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-40°C โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35-37°C ก่อให้เกิดโรค เมื่อได้รับเชื้อภายใน 18-24 ชั่วโมง สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ enterotoxin ผู้ป่วยจะมีอาการ อุจจาระร่วงบ่อยครั้ง อุจจาระเป็นมูกเลือด ปวดท้อง มีอาการช็อค เนื่องจาก สารพิษของเชื้อไปทำลายเม็ดเลือดแดงจึงเกิดสภาวะไตวายได้ แต่ผู้ติดเชื้อบางราย อาจไม่แสดงอาการของโรค แต่ สามารถถ่ายทอดเชื้อให้ผู้อื่นได้



ภาพที่ 3 ลักษณะของ *Escherichia coli*

(ที่มา <https://www.google.co.th/ur/sa/> =1461 วันที่สืบค้น 26/04/ 59)

Proteus sp. (นงลักษณ์ 2544)

Proteus sp. มีลักษณะคล้ายกับโคลิฟอร์มแบคทีเรีย คือ รูปท่อน ขนาด 1.3×0.6 ไมโครเมตร เป็นจีสที่เคลื่อนที่ได้ดีมาก ด้วยแฟลกเจลลารอบตัว แต่ไม่มีแคปซูล ไม่เฟอร์เมนต์แล็กโทส ที่สำคัญ คือ มีเอนไซม์เพนิลอะลานิลดีอะมิเนส ที่เปลี่ยนเพนิลอะลานิน ให้เป็นกรดไพนัลไพรูวิก

Proteus ประกอบด้วย เชื้อก่อโรคที่พบบ่อย 2 สปีชีส์ คือ *P. mirabilis* และ *P. vulgaris* ส่วน *P. penneri* พบการก่อโรคในคนน้อยมาก ทั้ง 3 สปีชีส์แยกจากกันโดย การทดสอบอินโดล และ ออร์นิตินคลอแรมเฟนิคอล ขณะที่ *P. mirabilis* และ *P. vulgaris* ส่วนใหญ่ไวต่อยานี้

Proteus พบได้ทั่วไป ในดิน และ น้ำเสีย บางครั้ง พบในอุจจาระของคนปกติ แต่จะพบได้มาก ในคนที่ได้รับยาปฏิชีวนะ หรือ ระหว่างที่เกิดอาการท้องร่วงจากเชื้ออื่น

โครงสร้างทางแอนติเจนของ *P. vulgaris* น่าสนใจเพราะสายพันธุ์ที่มี O แอนติเจน จะจับกลุ่มกับซีรัมคนไข้ที่เป็นโรคจากกรีกเกตเซีย

Proteus mirabilis และ *P. vulgaris* เคลื่อนที่ได้ว่องไวที่ 37°C เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง จะเจริญเติบโตเร็ว และ ไม่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ถ้าต้องการแยกโคโลนีเดี่ยว (single colony) ทำได้โดย ใส่วัน 5 % หรือ ใส่ 0.1 % chloral hydrate ในอาหารเพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

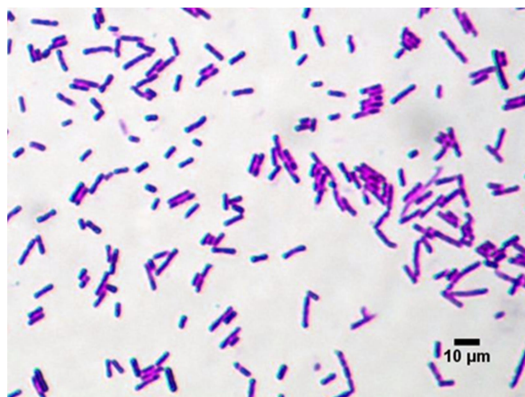
การรักษา

Proteus mirabilis เชื้อส่วนใหญ่ไวต่อยา อะมิโนไกลโคไซด์ และ ไตรเมโทพริม - ซัลฟาเมทอกซาโซน *Providencia* ต่อยากว่าเชื้ออื่นๆในกลุ่มนี้

Bacillus cereus (วาริรัตน์, 2557)

แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง เรียงตัวเป็นสาย และ สร้างเอนโดสปอร์ (ภาพที่ 4) เจริญได้ดีทั้งสภาวะที่มี และ ไม่มีออกซิเจน แหล่งที่อยู่อาศัยของเชื้อในธรรมชาติ ดิน น้ำ พืช และ อาหาร *B. cereus* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อสุขภาพ ลักษณะ ความสะอาดของอาหาร น้ำ และ เครื่องดื่ม เพราะ สามารถทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ ภายใน 8-16 ชั่วโมง และ ต่อเนื่องจนถึง 12-24 ชั่วโมง การเกิดพิษมี 2 ลักษณะอาการ คือ อาเจียน (Emetic illness) และ ท้องเสีย (Diarrhea illness) ทำให้ผู้ป่วยที่รับสารพิษมีอาการท้องร่วง ผู้ป่วยจะเป็นตะคริวที่ท้อง ทำให้มีอาการปวดท้องรุนแรง และ อุจจาระเหลวเป็นน้ำ ไม่ค่อยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน และ อีกแบบหนึ่งผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้อาเจียน บางครั้ง รุนแรง เป็นเชื้อที่สามารถอยู่ได้ในสิ่งแวดล้อมได้นาน และ เพิ่มโอกาสในการสัมผัสมากขึ้น

แหล่งที่พบ *Bacillus cereus* พบได้ ทั่วไปในธรรมชาติ ในดิน ฝุ่นละออง ผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น ข้าว ธัญพืช แป้ง ผลิตภัณฑ์จากแป้ง เครื่องเทศ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และ เครื่องปรุงรสต่างๆ ทำให้สามารถปนเปื้อนอาหารได้ง่าย เป็นเชื้อสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งคนสามารถรับเข้าสู่ร่างกายโดยการสัมผัสอาหาร ภาชนะที่ใส่อาหารอาหาร และ สัมผัสจากอุปกรณ์ หรือ เครื่องมือที่ปนเปื้อน *B. cereus* เข้าสู่ร่างกายก่อให้เกิดการเจ็บป่วยได้



ภาพที่ 4 ลักษณะของ *Bacillus cereus*

(ที่มา <http://cit.vfu.czxbc01s.jpg> วันที่สืบค้น 26/04/ 59)

Propionibacterium acnes (Sharon and Bernard 1995)

Genus *Propionibacterium* แบคทีเรียเป็นชนิด anaerobes (บางสายพันธุ์เป็น microaerophilic) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างขนาดเล็ก ไม่มีสปอร์ พบมีการแตกแขนงได้บางครั้ง เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่ผิวหนัง โดยเฉพาะ บริเวณที่มีไขมันมาก เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ จะพบเชื้อได้ที่ความหนาแน่น 10^5 - 10^7 เซลล์ ต่อ ตารางเซนติเมตร ลักษณะโคโลนีเป็นโดมสีขาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm เจริญเติบโตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไขมัน ในสภาวะที่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37°C ในเวลา 3 วัน สามารถทำการทดสอบคุณสมบัติทางเคมีต่างๆ เพื่อตรวจสอบ ยืนยันว่า เป็น *Propionibacterium acnes* กล่าวคือ DNase ให้ผลลบ gelatinase, casein hydrolase และ indole ให้ผลลบ แบคทีเรียชนิดนี้เดิมจัดอยู่ในสกุล *Corynebacterium* เนื่องจาก มีรูปร่างคล้าย diptheroid ปัจจุบัน จัดอยู่ในสกุล *Propionibacterium* เนื่องจาก ลักษณะโครงสร้างส่วนประกอบของผนังเซลล์ DNA และ ให้ผลผลิตของเมแทบอลิซึม เป็น กรดโพรพิโอนิก และ แอซีติก ซึ่งแตกต่างจาก *Corynebacterium* แบคทีเรียสกุลนี้ พบได้ทั่วไปตามผิวหนัง ผผ ขน ช่องปาก ระบบทางเดินอาหารของคน และ สัตว์ มีอยู่ทั้งหมด 8 ชนิด แต่ที่พบบ่อย ได้แก่ *P. acnes*, *P. granulosum* และ *P. avidum*

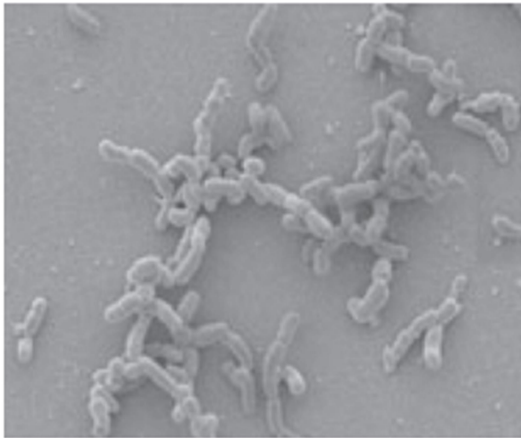
Propionibacterium acnes ผลิตกรดโพรพิโอนิก ชอบอาศัยอยู่บริเวณจมูก สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสแบบไม่ใช้ออกซิเจน เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดสิว และ บางครั้งอาจทำให้เกิดเยื่อหูอักเสบ

P. avidum มีขนาด $0.3 - 1.3 \times 1 - 10$ ไมโครเมตร อาจมีรูปร่างหลายแบบ คือ คล้ายกระบอง ลักษณะ

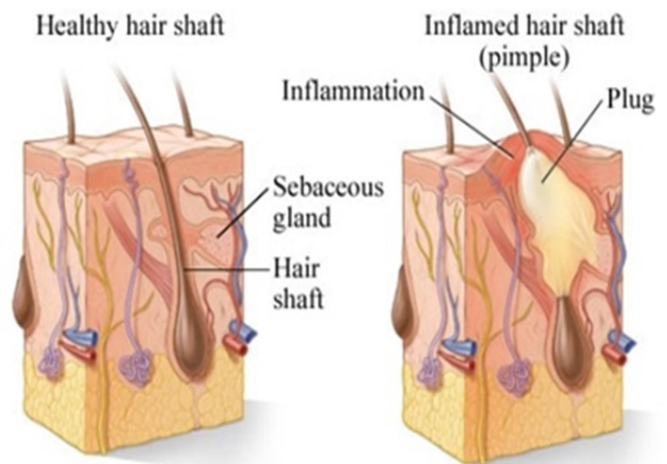
เป็น coccobacilli คล้ายอักษรจีน บางครั้งต่อเป็นกิ่งก้านสายสั้นๆ

P. granulosum มีขนาด $0.3 - 1.3 \times 1 - 10$ ไมโครเมตร อาจมีรูปร่างหลายแบบ คือ คล้ายกระบอง

ลักษณะ เป็น coccobacilli คล้ายอักษรจีน บางครั้งต่อเป็นกิ่งก้านสายสั้นๆ หากพบ แสดงว่ามีการปนเปื้อนที่ผิวหนังเกิดขึ้น



รูป แบคทีเรีย *P. acnes*



รูป แสดงการเกิดสิ่วุดตันในรูขุมขน

ภาพที่ 5 ลักษณะของ *Propionibacterium acnes*



ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของ *Propionibacterium acnes* โคโลนีสีเหลืองอ่อน บน

อาหาร Blood agar

สิว และ การติดเชื้อบริเวณผิวหนัง

พยาธิกำเนิด (Pathogenesis) พยาธิกำเนิดในการเกิดสิว มี 4 กลไก คือ

การหนาตัวขึ้นของเซลล์ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าบริเวณรูขุมขน (Follicular epidermal hyperproliferation)

ผู้ที่เป็นสิว เซลล์ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าจะไม่หลุดลอกตามปกติ แต่จะรวมตัวกันหนาขึ้นจนอุดตันท่อเปิดของรูขุมขน เกิดเป็นสิ่วอุดตันขนาดเล็ก ซึ่งมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า (microcomedones) เมื่อมีไขมันจากต่อมไขมัน เคอราตินและแบคทีเรียมาสะสมมากขึ้น จะอัดแน่นอยู่ในรูขุมขน เกิดเป็นสิ่วอุดตันที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (comedones) (Gollnick et al. 2003)

การขยายขนาดของต่อมไขมัน และ การสร้างไขมันที่เพิ่มขึ้น (sebaceous gland hyperplasia and excess sebum production)

Androgen มีบทบาทในกระตุ้นต่อมไขมันให้มีขนาดใหญ่ขึ้น ผลิตไขมันมากขึ้น โดยในผู้ที่เป็นสิว อาจมีระดับแอนโดรเจนที่สูงขึ้น และ ต่อมไขมันมีการตอบสนองต่อแอนโดรเจนมากขึ้น (Gollnick et al. 2003)

การอักเสบ และ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Inflammation and immune responses)

หลังจากเกิดการอุดตันของไขมัน (follicular epidermal hyperproliferation) จะมีเคอราติน ไขมัน และ แบคทีเรีย มารวมตัวกันมากขึ้น จนทำให้ผนังของรูขุมขนขยายออก และ แตกออกในที่สุด ทำให้สิ่งต่างๆ ทั้ง keratin, ไขมัน และ แบคทีเรีย หลุดเข้าสู่ชั้นหนังแท้ และ เกิดการอักเสบตามมา โดย CD 4⁺ lymphocytes พบมากในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการอักเสบ จากนั้น 1-2 วัน จะพบ neutrophils มากขึ้น (Norris and Cunliffe 1988)

การเพิ่มจำนวนของ *Propionibacterium acnes* (*P. acnes* proliferation)

Propionibacterium acnes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่งขนาดเล็ก เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic and microaerobic) พบใน ต่อมไขมัน มีส่วนสำคัญในกระบวนการเกิดสิ่วอักเสบ ในผู้ที่เป็นสิว พบมีปริมาณ *P. acnes* มากขึ้น คาร์โบไฮเดรตที่ผนังเซลล์ของ *P. acnes* จะไปกระตุ้นให้มีการสร้าง

antibody ซึ่งไปกระตุ้นระบบ complement ทั้ง clanical และ alternative pathway C 5a และ ก่อให้เกิดการอักเสบตามมา โดยพบว่า ระดับของ antibody ที่สูงขึ้น ไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของสิว และ ยังพบว่า macrophage บริเวณรูขุมขน และ ต่อมนไขมันในบริเวณที่เป็นสิวนั้น จะมีการ express Toll-like receptor 2 (TLR 2) พบว่า *P. acnes* จะมากระตุ้นให้เกิดการหลั่ง cytokines ต่างๆ เช่น IL-1, IL-8, IL-12 และ tumor necrosis factor- α ออกมาผ่านทาง TLR 2- dependent pathway (Jugeau et al. 2005) นอกจากนั้น *P. acnes* ยังสร้างและหลั่ง lipases, proteases และ hyaluronidases ซึ่งก่อให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อ และ ก่อให้เกิดการอักเสบมากขึ้นอีกด้วย (Hoeffler 1977)

สาเหตุของการเกิดสิว

สิว เกิดจาก ความผิดปกติของหน่วยรูขุมขน และ ต่อมนไขมัน (pilosebaceous unit) มีหลายสาเหตุ กล่าวคือ การขยายขนาดของต่อมนไขมัน และ การสร้างไขมันที่มากขึ้น (sebaceous gland hyperplasia and excess sebum production) การขยายตัวของเซลล์ผิวหนังชั้นกำพร้าบริเวณรูขุมขน (follicular epidermal hyperproliferation) การอักเสบ และ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (Inflammation and immune response) และ การเพิ่มจำนวนของ *P. acnes* เริ่มต้น เนื่องจาก มีการอุดตันของรูขุมขน เกิดจากผิวหนังที่ตายแล้วไม่ยอมหลุดลอกออกไป จับตัวกันแน่นอยู่ในรูขุมขน เมื่อรวมตัวกับเชื้อสาเหตุ โดยเฉพาะ *P. acnes* และ ไขมันที่ต่อมนไขมันบริเวณรูขุมขนขับออกมาจะกลายเป็นก้อนอุดตันขึ้นมา เรียกว่า คอมิโดน (comedone) ซึ่งจะเห็นเป็นหัวขาวๆ อยู่บริเวณผิวหนัง ต่อมา แบคทีเรีย *P. acnes* มีการแบ่งตัว เพิ่มจำนวน และสามารถย่อยไขมัน ดังกล่าว ให้กลายเป็นกรดไขมัน (fatty acid) กรดไขมัน ดังกล่าว จะไปรบกวนผิวหนังทำให้เกิดการอักเสบ และ มี ผื่นแดง เมื่อมีการอักเสบขึ้นมากๆ จะเกิดเป็นตุ่มหนอง ลักษณะสิหัวหนอง ถ้าแตกออกมาจะหายเป็นรอยดำ และ ถ้าเป็นหัวหนองใหญ่ จะมีแผลเป็นร่วมด้วย แบคทีเรีย *Propionibacterium* มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ เตตราไซคลิน และ อีริโทรมัยซิน

ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะทั้งในรูปแบบยาทาภายนอก และ ยารับประทาน เพื่อรักษาสิวมากขึ้น และ มีการใช้ต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ทำให้พบอุบัติการณ์ของการดื้อยาปฏิชีวนะของ *P. acnes* มากขึ้น โดยพบว่าการใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับยากุ่มอื่น เช่น benzoyl peroxide อาจช่วยลดการดื้อยาของเชื้อได้บ้าง แต่ก็ไม่สามารถกำจัดเชื้อดื้อยาได้ทั้งหมด (Patel et al., 2010; Cunliffe et al., 2002) ผิวหนังของมนุษย์จะมีแบคทีเรียประจำถิ่นอาศัยอยู่หลายชนิด โดยชนิดที่พบบ่อย ได้แก่ *S. epidermidis* และ *S. aureus* โดยพบ *S. epidermidis* ได้ถึง 10-24 สายพันธุ์บนผิวหนังของมนุษย์ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังชั้นตื้น หรือ การ

ติดเชื้อที่รุนแรงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเก็บเชื้อที่เกี่ยวกับ prosthesis และ catheters (Craft *et al.*, 2008) และ พบว่า การใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาผิวหนังชนิดเดียว ทำให้เกิดการดื้อยาของ *S. epidermidis* และ *S. aureus* ได้มาก

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย และการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ เป็นการทดสอบความสามารถของยาต้านจุลชีพ ว่า สามารถยับยั้งการเจริญ หรือ ฆ่าจุลชีพได้หรือไม่ โดยทั่วไป ทำในหลอดทดลอง (*in vitro* study) อาจทำได้ 2 วิธี คือ dilution method และ diffusion method

Dilution method

การทดสอบความไวของเชื้อ วิธีนี้ นิยมใช้ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง หรือ ฆ่าจุลชีพได้ อาจทำในอาหารวุ้น หรือ อาหารเหลว หลักการ คือ ยาจะถูกเจือจาง แบบ two-folded serial dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้น ใส่เชื้อลงในอาหารที่มียาความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่มองไม่เห็นการเจริญของเชื้อ โดยความเข้มข้นที่ใช้จะต่างกันขึ้นกับ ชนิดของยา ชนิดของเชื้อที่นำมาทดสอบ และ บริเวณที่มีการติดเชื้อ วิธีนี้ ได้ผล 2 ประเภท คือ ผลเชิงคุณภาพ (Qualitative) เช่น เชื้อที่ทดสอบมีความไวต่อยา (susceptible) ไวต่อยาปานกลาง (intermediate) หรือ ดื้อต่อยา (resistant) และ ผลเชิงปริมาณ (Quantitative) เช่น ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (MIC)

การทำ dilution method สามารถแบ่งได้ เป็น 3 แบบ คือ

Agar dilution ทำการเจือจางยาในอาหารวุ้นให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากนั้น นำเชื้อที่ต้องการทดสอบ จำนวน 10^4 CFU/ml มาจุดลงบนผิวหน้าอาหาร และ สังเกตการเจริญของเชื้อ เมื่อผ่านการเพาะเชื้อตามเวลาที่กำหนด ความเข้มข้นต่ำสุดที่เชื้อไม่เจริญ คือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

Macrobroth dilution ทำการเจือจางสารที่จะทดสอบในอาหารเหลวให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยทำในหลอดทดลอง จากนั้น ใส่เชื้อที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 10^5 CFU/ml มาทดสอบในปริมาตรสุดท้าย เท่ากับ 1-2 ml

Microbroth dilution ทำการทดลองเช่นเดียวกับ Macrobroth dilution แต่ทดสอบในปริมาตรสุดท้าย เท่ากับ 0.1-0.2 ml

Broth dilutions มี **ข้อดี** คือ เป็นวิธีที่ให้ผลเชื่อถือได้ สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ สามารถใช้ทดสอบฤทธิ์ฆ่าเชื้อของสารได้

ข้อเสีย คือ ไม่สามารถสังเกตการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นได้

Diffusion method

อาศัยหลักการแพร่ของยาออกจากภาชนะบรรจุยา เช่น หลุมที่เจาะลงในอาหารวุ้น (well) ถ้วยทรงกระบอก (cylinder cup) เม็ดยา (tablet) หรือ กระดาษกรองวงกลม (filter paper disc) เข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบอยู่ ในขณะที่ยาแพร่เข้าไปในอาหารวุ้น แบคทีเรียที่อยู่ในอาหารวุ้น และไม่ถูกยับยั้งจะแบ่งตัว ทำให้เชื้อเจริญเต็มพื้นที่ ส่วนบริเวณที่ถูกยายับยั้งจะไม่มี การเจริญของเชื้อ ดังนั้น จะมองเห็นเป็นวงใส (inhibition zone) รอบภาชนะบรรจุยา ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่ได้ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อที่ทดสอบ

ข้อดี ค่าใช้จ่ายน้อย ทำได้ง่าย ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษ สะดวกรวดเร็ว เนื่องจาก ความแรงของยาที่ใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้นเดียว สามารถใช้ได้กับยาหลายๆตัว

ข้อเสีย ผลการทดสอบที่ได้เป็นเพียงผลการทดสอบเบื้องต้นเท่านั้น ไม่สามารถหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ หน่วยที่ใช้ คือ ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร หรือ หน่วยสากล IU (international unit) ต่อ มิลลิลิตร ค่า MIC สามารถนำไปใช้เป็นค่าเปรียบเทียบ ดู ความไวของเชื้อทดสอบต่อยาต้านแบคทีเรีย การทดสอบที่นิยมใช้มากที่สุด คือ broth dilution test ค่าความเข้มข้นที่ระดับของยาที่ต่ำสุด ซึ่งไม่พบการเจริญของเชื้อ คือ MIC

Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถฆ่าเชื้อได้ 99.99 % โดยทั่วไป รายงานผลในหน่วย ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร หรือ หน่วยสากล (IU, international unit) ต่อ มิลลิลิตร

5 การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย (Solvent Extraction) (ประเสริฐ, 2555)

การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์มากในการแยกสาร และ ทำสารให้บริสุทธิ์ เช่น การสกัดแยกสารประกอบบางชนิดออกจากแหล่งที่เกิดในธรรมชาติ เช่น ใบไม้ ดอกไม้ การสกัดแยกสารผลิตภัณฑ์ออกจากของผสมหลังทำปฏิกิริยา หลักการของการสกัด คือ การใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสม การสกัดแบ่งได้คร่าวๆ เป็น 3 วิธี ดังนี้

- 1) Solid/Liquid Extraction เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสม ซึ่งเป็นของแข็งการสกัดแบบนี้หลักการไม่แตกต่างจากการหาตัวทำละลายเพื่อตกผลึกสาร
- 2) Liquid/Liquid Extraction เป็นการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของเหลว
- 3) Acid/Base Extraction เป็นการใช้ปฏิกิริยากรดเบสเพื่อแยกสารอินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นกรดแก่ กรดอ่อน กลาง และ เบสออกจากกัน

ในงานวิจัย ใช้ Liquid/Liquid Extraction ในการสกัดสารออกจากซีรุ่มน้ำยางพารา

5 การแยกสารด้วยวิธี โครมาโตกราฟี (Chromatography)

วิธีการแยกสารอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้แพร่หลายมาก คือ วิธีโครมาโตกราฟี วิธีนี้สามารถแยกสารที่ผสมกันอยู่ โดยอาศัยหลักการที่ว่า สารต่างชนิดกันจะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) หรือ ตัวดูดซับ และ วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ ตัวทำละลายได้ไม่เท่ากัน สารต่างชนิดกัน จึงเดินทางผ่านวัฏภาคนี้ ออกมากับวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ไม่พร้อมกัน จึงเกิดการแยกชั้น ปัจจุบัน มีเทคนิคทางโครมาโตกราฟีหลายประเภท ดังจำแนกไว้ใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 โครมาโตกราฟีแบบต่าง ๆ

โครมาโตกราฟี	วัสดุภาคนิ่ง	วัสดุภาคเคลื่อนที่	หลักการทำงาน
Column Chromatography	Solid	Liquid	Adsorption
Thin-Layer Chromatography (TLC)	Solid	Liquid	Adsorption
Gas-Solid Chromatography	Solid	Gas	Adsorption
Paper Chromatography	Liquid	Liquid	Partition
Gas-Liquid Chromatography	Liquid	Gas	Partition

เทคนิคทางโครมาโตกราฟี สามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง และ ยังมีการใช้งานกันทั่วไป ได้แก่ คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Column chromatography) และ ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin-layer chromatography)

5.1 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

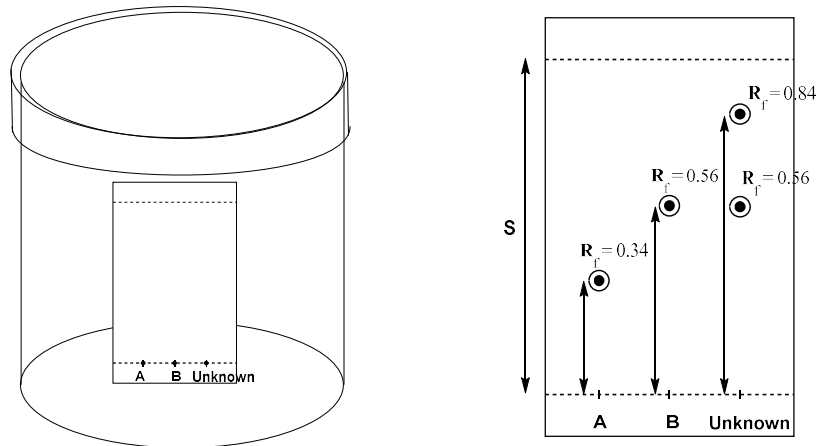
TLC เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสาร ที่รวดเร็ว สะดวก และ ราคาไม่แพง นิยมใช้ในการตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาเคมี ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสาร ใช้ในการยืนยันชนิดของสาร และสามารถตรวจหาจำนวนองค์ประกอบในของผสม

หลักการของ TLC คล้ายคลึงกับคอลัมน์โครมาโตกราฟี เพียงต่างกันในกรณีของ TLC วัสดุภาคนิ่งจะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระจก แผ่นอลูมิเนียม หรือ แผ่นพลาสติกบางๆ สารจะถูกแต้มไว้ที่ใกล้ๆ ปลายด้านหนึ่งของแผ่นโดยใช้หลอดแคปิลลารี จากนั้น จึงนำแผ่นดังกล่าว วางลงในภาชนะที่ใส่วัสดุภาคเคลื่อนที่ไว้ตั้งๆ เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับด้วย capillary action จะพาสารตัวอย่างขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสารเกิดขึ้น ตัวอย่างเช่น หากใช้ ซิลิกาเป็นวัสดุภาคนิ่ง และ ใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันเป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ สารที่มีขั้วน้อยจะละลายได้ดีในวัสดุภาคเคลื่อนที่ แต่ถูกดูดซับด้วยวัสดุภาคนิ่งได้น้อย จึงเคลื่อนที่ไปได้ดี ด้วยระยะที่มากกว่า สารที่มีขั้วสูงซึ่งละลายในวัสดุภาคเคลื่อนที่ได้น้อยแต่ดูดซับบนวัสดุภาคนิ่งได้ดี เนื่องจาก ใช้สารปริมาณน้อยมากในการแยก เทคนิค TLC จึงเหมาะสมเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ มากกว่าที่จะเป็นเครื่องมือในการแยกสาร เพื่อเก็บแต่ละ องค์ประกอบ ดังในกรณีของ คอลัมน์โครมาโตกราฟี ประโยชน์ของ TLC นอกเหนือ จากที่กล่าวมาข้างต้นแล้วยังรวมถึงการใช้ในการทดลอง หาระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมก่อนการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี (โดยการใช้วัสดุภาคนิ่งชนิดเดียวกับที่จะบรรจุลงคอลัมน์ในการทำTLC) รวมถึง การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารที่ออกมาจากคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วย ตัวดูดซับที่นิยมใช้ในเทคนิค TLC ได้แก่ อลูมินา และ ซิลิกาเจล เช่นเดียวกับ ที่ใช้ใน

การทำคอลัมน์โครมาโตกราฟี ดังนั้น ระบบตัวทำละลาย รวมถึง ความเร็ว และ ค่า ของการเคลื่อนที่ของสารมีขั้ว และ ไม่มีขั้ว จึงมีแนวโน้มทำนองเดียวกันกับที่กล่าวไว้ในคอลัมน์โครมาโตกราฟี โดยทั่วไปแล้ว นิยมใช้ตัวดูดซับ เป็น อลูมินากับสารกลุ่มที่ไม่มีขั้ว หรือ มีขั้วน้อยๆ เช่น ไฮโดรคาร์บอน อัลคิลเฮไลด์ อีเทอร์ และ นิยมใช้ ซิลิกาเจล กับ สารที่ค่อนข้างมีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอมีน

ขั้นตอนการทำ TLC ต้องเริ่มด้วยการเตรียมแผ่นที่มีวัฏภาคหนึ่งเคลือบอยู่ โดยทั่วไปสามารถทำได้เองโดย จุ่มแผ่นกระจก (ขนาดประมาณแผ่นสไลด์ที่ใช้กับกล้องจุลทรรศน์) ที่สะอาดลงในสารแขวนลอยที่ข้นเหลว (slurry) ของสารที่เป็นวัฏภาคหนึ่งในตัวทำละลายที่เหมาะสม ยกขึ้นมาให้ได้การเคลือบที่สม่ำเสมอแล้วทิ้งให้แห้ง ปัจจุบันมี การทำแผ่นทินแลร์สำเร็จรูป ซึ่งเคลือบวัฏภาคหนึ่งไว้บนแผ่นอะลูมิเนียมบางๆจำหน่าย โดยมักผสมสารเรืองแสง เช่น ซิงค์ซัลไฟด์ (ZnS) ไว้ด้วย ซึ่งจะทำให้สามารถสังเกตตำแหน่งของสารโดยใช้แสง UV ได้สะดวก ควรเตรียม สารตัวอย่างให้อยู่ในรูปสารละลายที่มีความเข้มข้นประมาณ 1 % แม้ว่า ตัวอย่างนั้น จะเป็นของเหลวอยู่ก็ตาม จากนั้น แต้้ม (spotting) ลงบนแผ่นทินแลร์ ให้ห่างจากปลายด้านล่างขึ้นมาประมาณ 0.5-1 cm นำแผ่นดังกล่าว ไปจุ่มลงใน ปีกเกอร์ ที่มีตัวทำละลายใส่ไว้เพียงเล็กน้อย โดยให้ระดับตัวทำละลายสูงไม่เกินระดับที่แต้้มสาร ตัวอย่าง (อย่าให้ท่วมจุดสารตัวอย่าง) และ อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย (ซึ่งต้องเตรียมไว้ก่อนหน้านี้โดยใช้ กระดาษกรองไว้ที่ผนังด้านในของปีกเกอร์ แล้ว ปิดด้วยกระจกนาฬิกา) (ภาพที่ 7) คอยสังเกตรอยเปียกของตัว ทำละลายที่ซึมขึ้นด้านบนของแผ่น TLC ที่เรียกว่า solvent front เมื่อมาเกือบถึงปลายด้านบนของแผ่น (ห่างจาก ปลายบนลงมา 0.5-1 cm) ก็ให้รีบเอาแผ่นออก ใช้ดินสอขีดบ่งรอย solvent front ไว้ เพื่อใช้ในการคำนวณค่า R_f (retention factor) ต่อไป ระหว่างที่รอต้องแน่ใจว่าแผ่น TLC อยู่ในระบบปิดตลอดเวลา

ค่า R_f เป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่จากจุดที่ทำการแต้้ม ไปถึงตำแหน่งสุดท้ายของแผ่น TLC เทียบกับ ระยะทางทั้งหมดที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (จาก spotting ถึง solvent front) เนื่องจาก สารต่างชนิดกัน จะถูกดูดซับด้วยวัฏภาคหนึ่งได้ไม่เท่ากัน จึงถูกตัวทำละลายพาขึ้นมาสูงได้ไม่เท่ากัน การแยกจึงเกิดขึ้น ค่า R_f ของ สารแต่ละชนิด ในวัฏภาคหนึ่ง และ วัฏภาคเคลื่อนที่หนึ่งๆ จะเป็นค่าคงที่ และ ใช้ในการบ่งบอกชนิดของสารได้ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน รูปรูป และ ตัวอย่างการคำนวณ R_f ใน ภาพที่ 7



ภาพที่ 7 TLC ที่แต้มสารตัวอย่าง A, B และ unknown ในตัวทำละลายเคลื่อนที่ ตำแหน่งสาร A, B และ unknown, solvent front (s) บน TLC และ การคำนวณ R_f

กรณีที่ต้องประกอบในสารตัวอย่างมีสี ทุกองค์ประกอบจะสามารถเห็นจุดของแต่ละองค์ประกอบที่เคลื่อนที่ไปได้ แต่ก็มีสารจำนวนมากที่ไม่ให้สี โดยทั่วไปสารอินทรีย์ทั้งหลายที่ถูกดูดซับอยู่บนแผ่นทินแลร์เยอร์ จะให้จุดสีได้เมื่อนำแผ่น TLC ส่องด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่นเหมาะสม เมื่อทำการแยกแล้วให้นำแผ่น TLC มาส่องกับแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 nm หากสารที่วิเคราะห์มีสมบัติเป็นตัวควENCHER (quencher) จะเห็นจุดสารดูดกลืนแสง UV เป็นสีม่วง สารที่มีสมบัติดังกล่าว ได้แก่ สารที่มีโครโมฟอร์ เช่น double bond หรือ aromatic ring จึงจะใช้การตรวจสอบแบบนี้ได้

6 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) (อนันต์, 2551)

สารอนุมูลอิสระ (free radical) เป็นอะตอม กลุ่มอะตอม หรือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนอิสระ หรือ อิเล็กตรอนไร้คู่ (unpaired electron) อยู่ 1 ตัว หรือ มากกว่า ที่ชั้นนอกสุดของออร์บิทัล (orbital) ทำให้อนุมูลอิสระมีความไวต่อการทำปฏิกิริยา จัดเป็นสารออกซิแดนท์ (oxidant) อย่างแรง (ณรงค์ และ คณะ, 2541; รัชฎาภ, 2543) อนุมูลอิสระ อาจมีประจุบวก หรือ ประจุลบก็ได้ ประจุเหล่านี้จะถ่ายทอดเป็นพลังงานสู่เนื้อเยื่อใกล้เคียง และสามารถเพิ่มจำนวนเป็นทวีคูณอย่างต่อเนื่องด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) เกิดภาวะอนุมูลอิสระเกิน (oxidative stress) เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เช่น การทำลายของ DNA ภายในเซลล์ (DNA damage) การทำลายโปรตีนภายในเซลล์ (protein damage) หรือ เกิดการเปลี่ยนแปลงในไขมันไม่อิ่มตัว (lipid peroxidation) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ ผนังเซลล์ ทำให้เซลล์หยุดทำงาน หยุดการซ่อมแซม การทำหน้าที่ต่างๆของเซลล์เสียไป (Aruoma and Halliwell, 1978; Cotran *et al.* 1999) อนุมูลอิสระ เป็นปัจจัยที่สำคัญ ปัจจัยหนึ่ง ที่มีผลต่อการก่อให้เกิดพยาธิสภาพในอวัยวะต่างๆ เช่น หัวใจ ซึ่งส่งผลให้โครงสร้าง และ หน้าที่ของอวัยวะเหล่านั้นเสียไป มีงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นว่าอนุมูลอิสระ มีความเกี่ยวข้องกับโรคหลายชนิด เช่น

โรคเส้นเลือดหัวใจอุดตัน (coronary heart disease) โรคเมเร็งบางชนิด และ โรคพาร์กินสัน (Parkinson disease) (Sies, 1980) ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ ได้แก่

1. O_2^- Superoxide anion อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์
2. OH. Hydroxyl radical อนุมูลไฮดรอกซิล
3. ROO. Peroxy radical อนุมูลเปอร์ออกซี
4. H_2O_2 Hydrogen Peroxide ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ในทางชีวเคมีสมัยใหม่ รายงานว่า ร่างกายของคนเราเสื่อมลงทุกวัน ความเสื่อมที่ปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจน คือ ภาวะหลอดเลือดแข็งตัว ความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดสูง ไขข้อเสื่อม เกิดแอนติออกซิแดนท์ (antioxidants) เป็นสารธรรมชาติ มีสมบัติในการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่ ดูดซับอิเล็กตรอนเดี่ยวจากสารอนุมูลอิสระไว้ในตัว ทำให้อนุมูลอิสระหมดคุณสมบัติที่จะออกซิไดซ์ต่อไป ทำให้หยุดปฏิกิริยาถูกใช้ในการทำลายสารชีวโมเลกุล ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และ ดีเอ็นเอในเซลล์ของร่างกาย ในอาหารและผลิตภัณฑ์ แอนติออกซิแดนท์ เป็นสารกลุ่มหนึ่ง ที่เรียกว่า สารพฤกษเคมี (phytochemicals) ส่วนใหญ่ได้มาจากพืชผัก ผลไม้ เมล็ด และ ธัญพืช เป็นสารเคมีธรรมชาติ เช่น โพลีฟีนอล (เช่น แคเทชินอีจีซีจี) ไบโอฟลาโวนอยด์ (เช่น เคอร์ซีทิน รุทีน และ โปรแอนโธไซยานิดิน) มีแร่ธาตุบางชนิด เช่น เซเลเนียม และ สังกะสี เป็นสารที่ช่วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทำหน้าที่ กำจัดอนุมูลอิสระ อาหารบางชนิดมีแอนติออกซิแดนท์ ที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ เช่น butylated hydroxy anisole (BHA), butylated hydroxy toluene (BHT) ที่ใช้เป็นสารกันหืนในน้ำมันปรุงอาหาร แอนติออกซิแดนท์ มีความสามารถในการต้านทานอนุมูลอิสระ จึงมีประโยชน์ในการปกป้อง หรือ การชะลอความชรา การต้านทานภาวะผิดปกติจากสารพิษในสิ่งแวดล้อม และการหยุดยั้งการเกิดโรค เนื่องจากสารเคมีก่ออนุมูลอิสระได้ แต่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์แอนติออกซิแดนท์เองได้ (ไมตรี และ ศิริวรรณ, 2540)

ปกติร่างกาย มีขบวนการในการกำจัดอนุมูลอิสระ ซึ่งกระทำโดยการทำงานของ เอนไซม์บางชนิด เช่น catalase, superoxide dismutase หรือ peroxidase นอกจากนี้ มีสารต้านอนุมูลอิสระ ในรูปของวิตามิน เช่น เบต้าแคโรทีน วิตามินซี วิตามินอี ซึ่งสารนี้จะมี ส่วนร่วมในขบวนการยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระ หรือรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลอิสระทำให้มีสภาพเสถียร (อัจฉรวรรณ, 2550) มีการวิจัย ค้นพบว่า ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานจะมีสารอนุมูลอิสระอยู่มากกว่าในคนปกติ ดังนั้น จึงควรได้รับสารอาหาร และ สารต้านอนุมูลอิสระอย่างเหมาะสม สารต้านอนุมูลอิสระ 5 ชนิดที่สำคัญกับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานจะพบใน วิตามินเอ ซี อี โคเอนไซม์คิวเทน และ alpha-lipoic acid ยังมีสารอาหารที่สำคัญต่อผู้ป่วย

ดังนั้นส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้จึงสนใจการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อจะทำไปต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับบำรุงผิวในเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

6.1 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination) (บุหรณ์, 2556)

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแต่ละประเภท จะมีหลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน โดย ปกติมักใช้หลายวิธีร่วมกันในการตรวจสอบ และ สรุปผล

1 วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ เป็นการทดสอบเพื่อหาชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการต่างๆ เช่น การทำให้เกิดสี การทำให้เกิดตะกอน ความสามารถในการละลายในตัวทำละลาย และ การถูกดูดซับโดยตัวดูดซับ วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยม ได้แก่ การตรวจวัดสารโพลีฟีนอลชนิดต่างๆ (เช่น Shinoda test และ Pew test) โครมาโตกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography, TLC) และ การตรวจหาสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2. วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ เป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่างๆ วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH•) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส (ABTS^{•+}) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้น จะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และ วิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง หรือ กำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลง หรือ ที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น ABTS^{•+} และ DPPH• การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ หาได้จาก อัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง กับ สารมาตรฐาน (เช่น trolox, vitamin C และ ferrous sulfate) หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ คือ

(1) ปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูง แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

(2) ปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50% (IC_{50} , 50% of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำ แสดงว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

ทั้งสองแบบสามารถแสดงหน่วยได้หลากหลาย ได้แก่ $\mu M/mg$, mM/mg , $\mu M/mL$, mM/mL เป็นต้น

7. สาร L-quebrachitol

L-quebrachitol เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งที่สามารถพบได้ในพืชบางชนิดและในส่วนที่เป็นซีรัมของน้ำยางธรรมชาติ โดยโครงสร้างทางเคมีของ L-quebrachitol เป็น monomethyl ether ของ L-inositol โดยสารนี้พบว่ามีอยู่ในรูปของ L-(-)-2-O-methyl-chiro-inositol และมีอยู่ในซีรัมของน้ำยางธรรมชาติประมาณ 1% สารนี้มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวที่ดูมีความชื้น และมีความหวานเล็กน้อย ประโยชน์ของสารชนิดนี้ได้มีการรายงานว่าสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์สารจำพวก optically active organic compound ต่างๆ ได้มากมาย อาทิ เป็นสารต่อต้านแบคทีเรีย เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ยา เช่น ยาต้านมะเร็ง และ สารเคมีทางการเกษตรต่างๆ สำหรับราคาของสาร L-quebrachitol ที่มีแสดงในแคตตาล็อกสารเคมี ของบริษัทชั้นนำต่างๆ พบว่ามีราคาค่อนข้างสูงอยู่ที่ 35 US\$ ต่อ 100 mg ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสาร L-quebrachitol มีมูลค่าที่สูงกว่าน้ำยาง หรือ ยางแห้งหลายเท่า นอกจากนั้น L-quebrachitol ที่มีความบริสุทธิ์สูงจากน้ำยางธรรมชาติ โดยศึกษาสมบัติต่างๆ ทั้งทางเคมีและทางคลินิกของสาร L-quebrachitol เช่น ความหวาน ความสามารถในการดูความชื้น ความสามารถในการใช้เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการใช้เป็นสารยับยั้ง หรือต้านเชื้อชนิดต่างๆ ทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย (antifungi, antibacteria) ซึ่งจากประโยชน์ที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ สำหรับอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ยาสีฟันที่ผสมสารยับยั้งเชื้อในปาก เครื่องสำอางได้ นอกจากนั้นยังสามารถนำไปใช้เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็งเมื่อมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสาร L-Quebrachitol ให้เป็นอนุพันธ์ชนิดอื่นเพื่อให้สามารถนำไปใช้เป็นยาชนิดต่างๆ ได้ (จิตต์ลัดดา, 2550)

งานวิจัยนี้ สนใจที่จะศึกษาคุณสมบัติของซีรัมน้ำยางพารา (Latex Serum) ในการยับยั้งเชื้อรา การยับยั้งแบคทีเรีย และ สารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นแนวทางการศึกษา และ ต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าของซีรัมน้ำยางพาราในการผลิตเชิงพาณิชย์ได้

บทที่ 2

อุปกรณ์ และ วิธีการ

1. อุปกรณ์

- 1.1 ตู้ปลอดเชื้อชนิด Biohazard (Micro flow, USA)
- 1.2 ตู้อบลมร้อน (Binder, Germany)
- 1.3 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, Switzerland)
- 1.4 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Olympus, Japan)
- 1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Lab gene Denmark)
- 1.6 อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่
 - จานเพาะเชื้อ
 - หลอดทดลอง
 - ปิเปต
 - ขวดใส่อหารเลี้ยงเชื้อ
 - ห่วงถ่ายเชื้อ
 - ปากคีม
 - สไลด์
 - Microcentrifuge tube
 - Micropipette

2. สารเคมี และ อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 สารเคมีที่ใช้ย้อมสปอร์เชื้อรา
- 2.2 สารเคมีที่ใช้ย้อมแบคทีเรีย
- 2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัด ซีรัมน้ำยารักษา
- 2.4 สารเคมี
 - Agar (Untoniscience, Thailand)
 - Beef extract (LAB-SCAN, Thailand)

- Peptone (BD, USA)
- Potato
- Dextrose (MERCK Germany)
- alcohol 95%
- Lactophenol

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างแผ่นยางพารา และ ยางก้อนถ้วย

การเก็บตัวอย่างที่เป็นยางก้อนถ้วยและยางแผ่นผึ่งแห้ง เก็บในพื้นที่จังหวัดสุโขทัย และ ยางแผ่นผึ่งแห้ง (Air dry sheet) เก็บจากจังหวัดปัตตานีและพัทลุง ทั้งหมด 10 แหล่งเป็น ยางก้อนถ้วย 8 แหล่ง ยางแผ่นผึ่งแห้ง 2 แหล่ง

2. การแยกและการสกัดซีรุ่มน้ำยางพารา

2.1 การแยกซีรุ่มน้ำยางพาราออกจากน้ำยางพาราสด

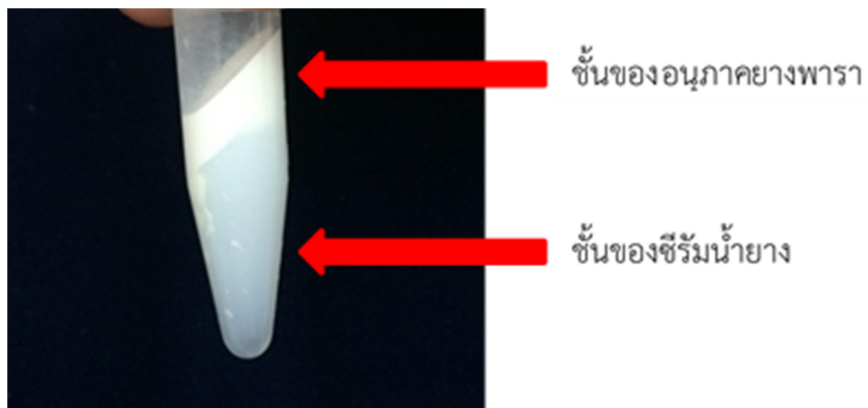
เมื่อได้น้ำยางพาราสด จาก ต้นยางพารา สายพันธุ์ RRIM 600 ที่ปลูกบริเวณพื้นที่ อ. แม่ริม จ.เชียงใหม่ (ภาพที่ 8 และ ภาพที่ 9) นำน้ำยางพาราสด ใส่หลอดเซนติฟิวขนาด 2.5 ml เพื่อนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12000 rpm 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จะเกิดการแยกชั้นโดยจะมีชั้นครีมยางพาราอยู่ด้านบนจะมีลักษณะเป็นสีขาวเหนียวเพราะน้ำยางมีทั้งประจุบวก และ ประจุลบ ทำให้น้ำยางเกิดการจับกันเองส่วนด้านล่างจะเป็นส่วนใสเรียกว่า ซีรุ่ม จากนั้นเก็บส่วนใส (serum) ใส่หลอดเซนติฟิวขนาด 50 ml เพื่อนำมารวมกัน และ นำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บส่วนใส ใส่ขวด และ เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 8 สวนยางพาราพื้นที่ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่



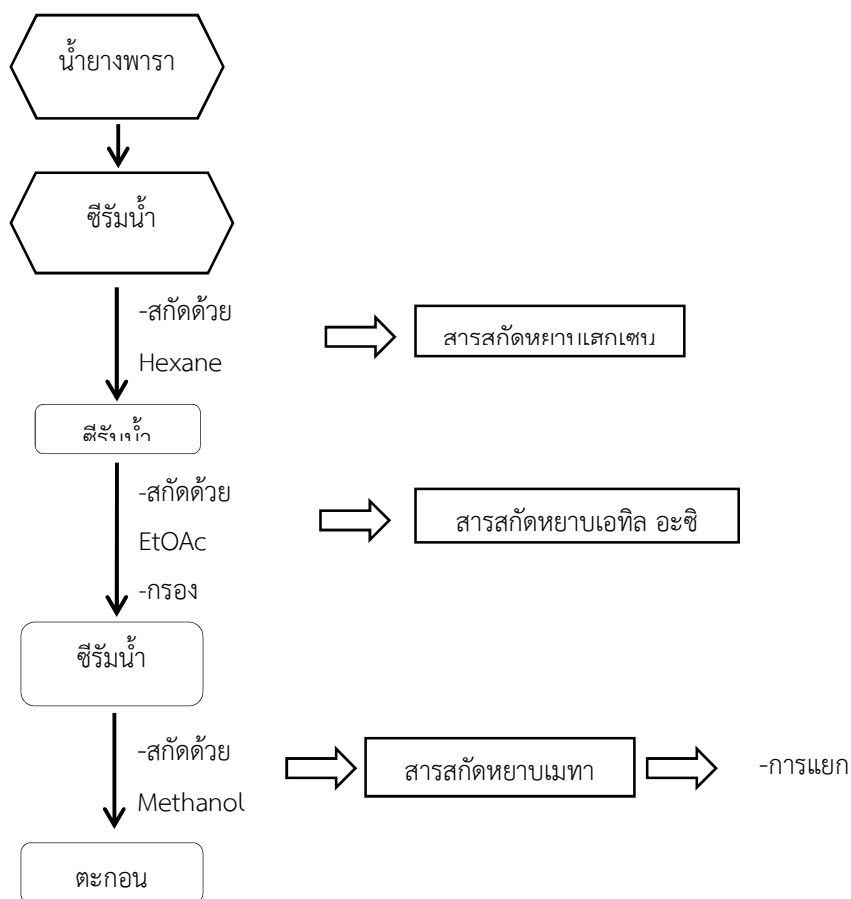
ภาพที่ 9 น้ํายางพาราสดจากสวนเกษตรกร



ภาพที่ 10 ซีรัมนํายางพาราที่แยกได้ด้วยการปั่นเหวี่ยง อนุภาคนํายาง (ส่วนบน) ซีรัมนํายางพารา (ส่วนล่าง)

2.2 การสกัดซีรุ่มน้ำยางพาราและการแยกสารสกัดด้วยเทคนิค Chromatography

เก็บตัวอย่างน้ำยางพาราสด ในเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2558 จำนวน 35 ลิตร (25.7 kg) ตั้งทิ้งไว้ในภาชนะที่ปิด เป็นเวลา 1 วัน แยกส่วนที่เป็นของเหลวออกจากยางพารา นำของเหลวที่ได้เก็บไว้ในตู้เย็น 5°C 1 วัน กรองได้ซีรุ่มน้ำหนัก 7.14 kg แบ่งซีรุ่มน้ำยางพารา 500 ml มาสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน 150 ml จำนวน 2 ครั้ง ด้วย กรวยแยก เก็บชั้นของเฮกเซน นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาดชั้นเฮกเซน และ นำซีรุ่มน้ำยางพาราสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตต 150 ml จำนวน 2 ครั้ง เก็บชั้นเอทิลอะซิเตตไประเหยด้วยเครื่องสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาดชั้นเอทิลอะซิเตต จากนั้นนำส่วน ซีรุ่มน้ำยางพารา นำไปผึ่งลมให้แห้งแล้วสกัดด้วยทำละลายเมทานอล 150 ml จำนวน 2 ครั้ง เก็บชั้นของเมทานอล นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ได้สารสกัดหยาดเมทานอล แสดงดัง **ภาพที่ 11** แล้วทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการตกผลึก และ โครมาโทกราฟี



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการสกัดซีรุ่มน้ำยางพารา

2.3 การแยกให้บริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา

นำสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบเบื้องต้นด้วย TLC ทำให้เห็นจุดสารด้วย UV 254 nm และสเปรย์สารละลาย Anisaldehyd (H_2SO_4 /Acetic acid) แยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี โดยใช้ silica gel 60 PF254 Merck ในส่วนของสารสกัดหยาบเอทิล อะซิเตรต (EAC) และ เมทานอล (MC) ทำการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์ แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรสโคปี (NMR) Bruker 400 MHz

3. การคัดแยกเชื้อราจากแผ่นยางพารา และ ยางก้อนถ้วย

3.1 การแยกเชื้อราจากยางแผ่นผึ่งแห้ง และ ยางก้อนถ้วย

ยางแผ่นผึ่งแห้ง และ ยางก้อนถ้วยที่ เก็บจากพื้นที่จังหวัดสุโขทัยนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และ นำไปฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% ทิ้งไว้ 5 นาที ล้างน้ำกลั่น 1 นาที 5 ครั้ง ภายใต้สภาวะปราศจากเชื้อ

3.2 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา และการวัดการเจริญของเชื้อราบนอาหารแห้ง

เตรียมอาหาร PDA (pH = 4.7-5) นำชิ้นยางพาราที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก และ ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาวางบนอาหาร PDA จำนวน 5 จุด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3-5 วัน จะเห็นการเจริญของเชื้อรา เชื้อราจะมีลักษณะเส้นใย ผิวหน้าแห้ง เมื่อได้เชื้อราจากจุดที่วางยางพาราแล้ว จะใช้ไม้ปลายแหลม (needer) เขี่ยเชื้อราใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำให้เชื้อราบริสุทธิ์ดูจาก ไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อรา หรือ แบคทีเรียชนิดอื่น เมื่อได้เชื้อราที่บริสุทธิ์จะเก็บรักษาไว้ในอาหารวุ้นเอียง

4. การจำแนกเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางพารา

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้บนอาหาร PDA ทำการหยด Lactophenol cotton blue บนสไลด์ 1-2 หยด และ ใช้ไม้ปลายแหลม (Needer) เกี่ยสปอร์ของเชื้อราอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้สปอร์เชื้อราฟุ้งนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบที่ กำลังขยาย 400 เท่า สังเกตลักษณะสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะสปอร์ สีสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ กำลังขยาย 400 เท่า

5. การทดสอบการยับยั้งเชื้อราจากซีรุ่มน้ำยางพาราด้วยวิธี Agar disc diffusion method

5.1 การเตรียมสารละลายสปอร์ (Spore suspensions)

เชื้อราที่แยกได้บนอาหาร PDA นำมาเลี้ยงในอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ จานใหม่ เลี้ยงเชื้อรา เป็นเวลา 5 วัน นำมาผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 10 ml ใช้ spreader ขูดเบาๆบนผิวหน้าโคโลนีเชื้อรา เพื่อให้สปอร์กระจายตัว จากนั้น ใส่ tween 80 2.5 ml เพื่อไม่ให้สปอร์จับตัวเป็นก้อน เก็บใส่ในหลอดทดลองเพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อราบนแผ่นยางพารา

5.2 การเตรียม paper disc สารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา

นำสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซีเตรท และ เมทานอล ละลายในตัวทำละลายของแต่ละชนิด แล้วนำ paper disc จุ่มในสารสกัดหยาบแต่ละชนิดจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำไปดึงตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Vacuum pomp) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อราบนแผ่นยางดิบจากสารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา

นำสารละลายสปอร์ (spore suspensions) มาเจือจาง 2 เท่า และ นับจำนวนสปอร์ ด้วย Haemocytometer เพื่อให้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^6 spore/ml ใช้ไม้พันสำลี (swab) ที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มสารละลายสปอร์ 10^6 spore/ml นำมาเกลี่ย (Spread) บน อาหาร PDA ทับไปมา 3-4 ครั้ง ทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้สารละลายสปอร์แห้ง จากนั้น ใช้คีม (forceps) ปราดจากเชื้อหีบแผ่น paper disc วางบนอาหาร PDA ที่ระยะห่าง จากขอบ 1.5 cm กดแผ่น disc ให้ติดกับผิวอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตผลการยับยั้งเชื้อรา จะเห็นบริเวณวงใส (clear zone) หรือ inhibition zone วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใส บันทึกผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสหน่วย mm

6. การทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในสารสกัดหยาบและสาร L-quebrachitol จากซีรัมน้ำยางพารา โดยวิธี Scavenging activity of ABTS radical

6.1 ชั่งสาร ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] 0.0192 g ละลาย

ในน้ำกลั่นปริมาตร 5 ml จะได้สารละลาย ABTS ที่มีความเข้มข้น 7 mM

6.2 ชั่งสาร Potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) 0.3784 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml จะได้

สารละลาย Potassium persulfate ที่มีความเข้มข้น 140 mM

6.3 ผสมสารละลาย 7 mM ABTS 2 ml กับสารละลาย 140 mM $K_2S_2O_8$ 35.5 μ l ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้

ในที่มืด 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาใช้งาน จะได้ stock ABTS radical cation

6.4 เจือจาง Stock ABTS radical action ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 734

nm เท่ากับ 0.700 ± 0.02 (ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน)

6.5 เตรียมตัวอย่างสารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ที่ความเข้มข้น
ต่าง ๆ ปริมาตร 0.01 ml ในหลอดทดลองและใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม 7.6 เติม ABTS 1 ml ผสมให้

เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 6 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ค่า

ดูกราฟที่ได้นำไปคำนวณ เทียบกับกราฟมาตรฐาน Trolox 7.7 นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{[(A_{734} \text{ control} - A_{734} \text{ test sample})]}{A_{734} \text{ control}} \times 100$$

7. การทดสอบคุณสมบัติเชิงฟิสิกส์ของยางแผ่นเคลือบสารจากซีรุ่มน้ำยางพารา

7.1 การทดสอบการต้านทานแรงดึง (Tensile Test)

เตรียมตัวอย่างแผ่นยางดิบแบบชุบด้วยสารสกัด serum น้ำยางพาราและแผ่นยางดิบที่ไม่ชุบสารสกัด มาทดสอบสมบัติรับแรงดึง (Tensile properties) โดยใช้เครื่องทดสอบแรงดึง Universal Testing Machine บันทึกแรงดึงที่ทำให้ชิ้นตัวอย่างฉีกขาด เพื่อนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความต้านทานต่อการฉีกขาด (Tear strength) จากสมการ

$$T_s = F/D$$

เมื่อ T_s คือ ความต้านทานต่อการฉีกขาด (Tear strength, N / mm)

F คือ ค่าแรงดึงสูงสุด (N)

D คือ ความหนาของชิ้นตัวอย่าง (mm)

7.2 การหาความหนาแน่นของพันธะเชื่อมโยง (Crosslink density) (Marykutty *et al.* 2003)

ตัดชิ้นส่วนตัวอย่างรอบคอสะพานด้านใน และ ด้านนอกที่ได้จากการอัดที่เวลาต่างๆ มาชั่งน้ำหนักให้มีค่าที่แน่นอน (W) โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง จากนั้นนำตัวอย่างมาแช่ในตัวทำละลายโทลูอีนในขวดแบบปิดเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำตัวอย่างที่เกิดการบวมตัว มาชั่งด้วยกระดาษหิซซูให้แห้ง และ นำมาชั่งน้ำหนัก (W_1) แล้ว นำตัวอย่างไปอบในตู้อบแบบสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบกำหนดแล้ว นำตัวอย่างมาชั่งน้ำหนัก (W_2) อีกครั้ง แล้วคำนวณ ดังสมการ

$$-\ln(1 - V_r) + V_r + X V_r^2 = \frac{dV_s}{V_r} (V_r)^{1/3} M_c^{-1}$$

V_s คือ ปริมาตรโมลาร์ (molar volume) ของโทลูอีน

X คือ ค่าพารามิเตอร์ของการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยางกับสารละลาย (Rubber-solvent

interaction parameter) ค่า X (NR-toluene) มีค่าเท่ากับ 0.42

M_c คือ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสายโซ่ยางที่อยู่ระหว่างพันธะเชื่อมโยง (Number-average molecular weight of rubber chains between crosslinks)

V_r คือ สัดส่วนปริมาตร (Volume fraction) ของยาง

ค่าน้ำหนักโมเลกุลของสายโซ่ที่อยู่ระหว่างพันธะเชื่อมโยง (M_c) สามารถหาได้จากความสัมพันธ์ที่ว่า $M_c = \frac{1}{2} V$ (Marykuty et al. 2003) และคำนวณค่า volume fraction (V_r) (Alex 2003) ตามสมการ

$$V_r = \frac{W_2 (d_r - 1)}{W_2 (d_r - 1) + (W_1 - W_2) (d_r - 1)}$$

เมื่อ d_r และ d_s คือ ความหนาแน่นของยางและตัวทำละลาย ตามลำดับ

โดยค่าความหนาแน่นของโพลีเอทิลีน เท่ากับ 0.886 g/cm^3

W_1 น้ำหนักของตัวอย่างหลังแช่ในตัวทำละลายโพลีเอทิลีน (g)

W_2 น้ำหนักของตัวอย่าง หลังจากแช่ในตัวทำละลายโพลีเอทิลีน แล้วนำไปอบในตู้อบแบบสุญญากาศ ที่ อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2 วัน (g)

7.3 การวัดค่าความหนาแน่นของยาง

ตัดชิ้นตัวอย่างเพื่อทำการทดสอบ จากนั้น ชั่งน้ำหนักในอากาศและจذبบันทึกค่า และ นำชิ้นส่วนตัวอย่าง ชั่งน้ำหนักในน้ำ และจذبบันทึกค่า จากนั้นนำค่าน้ำหนักที่ได้มาคำนวณหาความหนาแน่น จากสมการ

$$d_r = \frac{W}{(W - W_1)}$$

โดย d_r คือ ความหนาแน่นของยาง (g/cm^3)

W คือ น้ำหนักของชิ้นตัวอย่างที่ชั่งในอากาศ (g)

W_1 คือ น้ำหนักของชิ้นอากาศที่ชั่งในน้ำ (g)

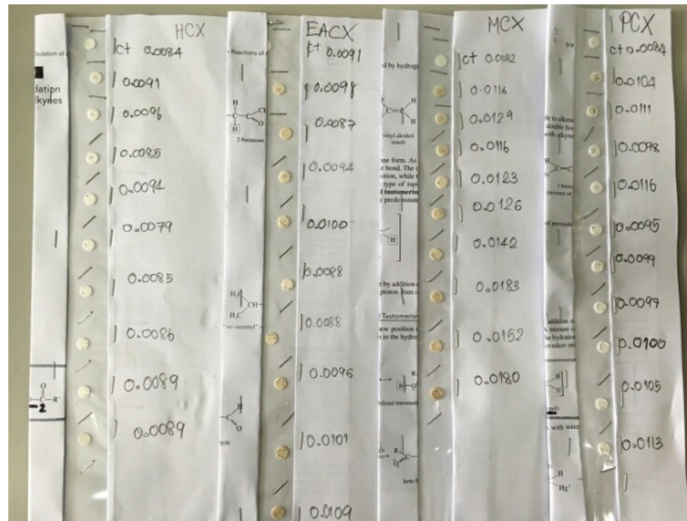
8. การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดชีรมันน้ำยางพาราด้วยวิธี Ager disc diffusion method

8.1 การเตรียมแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อจากสต็อก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus epidermidis* นำมาเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) เช้าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วยน้ำเกลือ ความเข้มข้น 1 M

8.2 การเตรียม paper disc สารสกัดหยาบชีรมันน้ำยางพารา

นำสารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และ เมทานอล ละลายในตัวทำละลายแต่ละชนิด แล้วนำ paper disc จุ่มในสารสกัดหยาบแต่ละชนิด จำนวน 3 ครั้ง แล้วนำไปดึงตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Vacuum pomp) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง paper disc ชุบสารสกัดชีรมันน้ำยางพารา แสดงดัง ภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แผ่น paper disc ชุบสารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพาราในตัวทำละลายชนิดต่างๆ พร้อม
แสดงน้ำหนักสารที่อยู่ในแผ่น paper disc แต่ละชิ้น

8.3 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียจากซีรัมน้ำยางพารา

นำแบคทีเรียที่เตรียมจากข้อ 6.1 ใช้ไม้พันสำลี (swab) ที่ฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงแบคทีเรียที่เจือจางไว้ นำมา
เกลี่ย ให้ทั่ว บน อาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ทับไปมา 3-4 ครั้ง ทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง
จากนั้นใช้คีบ (forceps) ปราศจากเชื้อหีบแผ่น paper disc วางบนผิวอาหาร TSA ที่ระยะห่าง 2 cm กดแผ่น
paper disc ให้ติดกับผิวอาหาร บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าสารสกัดซีรัมน้ำยางพารา สามารถ
ยับยั้งเชื้อเราได้ จะเห็นบริเวณใสรอบแผ่น disc เรียก บริเวณนี้ว่า clear zone หรือ inhibition zone วัดเส้นผ่าน
ศูนย์กลางของบริเวณวงใส และ บันทึกผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสหน่วยเป็น มิลลิเมตร (mm)

9. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราบนยางแผ่น

ตัดแผ่นยางพารา ให้ได้ขนาด 5 x 5 เซนติเมตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ทิ้งไว้ให้แห้ง นำ
แผ่นยางผึ่งแห้ง ชุบสารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา ที่สกัดด้วย เฮกเซน เอทิลอะซิเตท เมทานอล และ สาร
บริสุทธิ์ L-quebrachitol ที่ความเข้มข้น 10 ppm, 20 ppm และ 40 ppm ทั้ง 2 ด้าน (ภาพที่ 13) ทิ้งไว้ให้แห้ง
นำแผ่นยางที่ชุบสารสกัดซีรัมน้ำยางพาราชนิดต่างๆ (ภาพที่ 14) วางในกล่องพลาสติก ปิดเตสเปอร์เชื้อรา ความ
เข้มข้น 10^6 spore/ml ปริมาณ 1 ml ลงบนแผ่นยาง ทาให้ทั่วแผ่นที่ชุบสารสกัดซีรัมน้ำยางพารา เติมน้ำกลั่น

ปลอดเชื้อลงในสำลีผ้าเช็ดในกล่องที่ใส่ยางแผ่น โดยควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ที่ 90 % ในสภาวะปิด ปิดฝากล่อง สังเกตการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นด้วยสายตา และ บันทึกผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่นด้วย สารสกัดหยาบชีรมน้ำยางพารา และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ด้วยสายตา โดยดูจากพื้นที่ของยางแผ่นที่เชื้อรามีการเจริญ เทียบกับ พื้นที่ของยางแผ่นที่เชื้อราไม่พบการเจริญ



ภาพที่ 13 สารสกัดหยาบชีรมน้ำยางพารา และ สาร L-quebrachitol (PC) ที่ความเข้มข้น 10 ppm และ 20 ppm



ภาพที่ 14 แผ่นยางชุบสารสกัดหยาบ และ สาร L-quebrachitol จากชีรมน้ำยางพารา

การบันทึกผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราด้วยสายตา โดยแบ่งแผ่นยางเป็น 4 ส่วนๆ ละ 25 % โดยผลการยับยั้งดูจากพื้นที่ของแผ่นยางทดสอบที่ไม่พบการเจริญของเชื้อรามากกว่าหรือเท่ากับ 50% แสดงดังภาพที่ 15

25%	25%
25%	25%

ภาพที่ 15 การแบ่งพื้นที่แผ่นยางทดสอบในการบันทึกผล

10. การผลิตเวชภัณฑ์จากซีรุ่มน้ำยางพารา

ทำการตั้งสูตรเจล เป็น 2 แบบ คือ เนื้อเจลเปล่า (gel base) และ เนื้อเจลที่ผสมสารบริสุทธิ์ L-Quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา (gel base = active compound)

การทำเจลเปล่า ใช้ส่วนผสมพื้นฐาน ดังนี้ Deionized water เจล (Gel) สารกันเสีย (Preservative) ตัวประสานน้ำ และ น้ำมัน (emulsifier) โดยนำสารกันเสียละลายด้วย Deionized water คนละลายให้ทั่ว จากนั้น เติมเจลลงไป แล้วทำการผสมด้วยเครื่องปั่น (homogenizer) ปั่นจนเนื้อละเอียดเนียน ได้เป็นเนื้อเจลเปล่า

การทำเจลที่ผสมสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา จะทำการเตรียมเจลเปล่า และ เติมสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา (10 %) ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว และ แสดงฤทธิ์ antioxidant ที่ดีที่สุด มาผสมในเจลเปล่า ได้เป็นเจลผสมสารบริสุทธิ์จากซีรุ่มน้ำยางพารา รายละเอียด ดังแสดงใน ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สูตรการทำเจลพื้นฐาน

ลำดับ	ส่วนผสม	จำนวน (%)
1.	Gel	2
2.	Preservative-Methylisothiazolinone, chlorophenesis	0.5
3.	Active compound (Pure compound from latex serum)	10
4.	Deionized water	100

หมายเหตุ : ได้รับการอนุเคราะห์การขึ้นรูปผลิตเจลซีรัมน้ำยางพาราที่มีส่วนผสมของ L-quebrachitol 10 % จาก
 ผศ.ดร. ดวงพร อมรเลิศพิศาล คณะเทคโนโลยีประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่

10.1. การทดสอบความคงตัว (Stability test by cool and heating test) และ สภาวะเร่ง (Cooling and Heating) ของเวชภัณฑ์จากซีรัมน้ำยางพารา

เป็นการศึกษาความคงตัวของผลิตภัณฑ์ในรูปของเจลในสภาวะเร่ง โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ ไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น นำไปวางที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คิดเป็น 1 รอบ ทำการทดสอบ 6 รอบ (Mapaisansin *et al.*, 2010) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปดูความเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ สี การแยกชั้น และ ความหนืด ที่สามารถวัดได้ด้วยสายตา

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การแยกเชื้อราปนเปื้อนจากแผ่นยางผึ่งแห้ง (Air Dry Sheets) และ ยางก้อนถ้วย

จากตัวอย่างแผ่นยาง ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง สามารถแยก เชื้อราปนเปื้อน ได้ทั้งหมด 47 ไอโซเลท โดยแบ่งเชื้อราออกเป็น 5 จีแนส คือ *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp. และ *Trichoderma* sp. การแยกเชื้อราจากยางแผ่นผึ่งแห้ง สามารถแยกได้ 12 ไอโซเลท คิดเป็น 23.53 % และ ยางก้อนถ้วย แยกได้ 35 ไอโซเลท คิดเป็น 74.46 % (ดังตารางที่ 4 และ 5)

ตารางที่ 4 จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากยางแผ่นพื้นที่จังหวัดพัทลุง และ จังหวัดปัตตานี

พื้นที่เก็บ	กลุ่มของเชื้อราที่พบ / จำนวนไอโซเลท				
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp.
อ.โตนด	4 ไอโซเลท	1 ไอโซเลท	-	1 ไอโซเลท	3 ไอโซเลท
จ.พัทลุง (PL)					
อ.โคกโพธิ์	-	1 ไอโซเลท	1 ไอโซเลท	-	1 ไอโซเลท
จ.ปัตตานี (PTN)					

ตารางที่ 5 จำนวนเชื้อราที่แยกได้จากยางก้อนถ้วย

พื้นที่เก็บ	กลุ่มของเชื้อราที่พบ / จำนวนไอโซเลต				
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Trichoderma</i> sp
อ.แม่แตง	-	2 ไอโซเลต	-	-	1 ไอโซเลต
จ.เชียงใหม่ (MT)					
ต.แม่สลิ	2 ไอโซเลต	1 ไอโซเลต	2 ไอโซเลต	-	-
จ.สุโขทัย (MS1)					
ต.แม่สลิ	4 ไอโซเลต	2 ไอโซเลต	1 ไอโซเลต	-	1 ไอโซเลต
จ.สุโขทัย (MS2)					
ต.บ้านแก่ง	3 ไอโซเลต	-	-	-	4 ไอโซเลต
จ.สุโขทัย (BK)					
ต.สารจิต	-	-	-	-	4 ไอโซเลต
จ.สุโขทัย (SLG)					
ต.สันหีบ	-	2 ไอโซเลต	-	-	1 ไอโซเลต
จ.สุโขทัย (SP)					
อ.สวรรคโลก	2 ไอโซเลต	-	-	-	-
จ.สุโขทัย (PV)					
อ.เมือง จ. สุโขทัย	-	1 ไอโซเลต	-	1 ไอโซเลต	1 ไอโซเลต
(SS)					

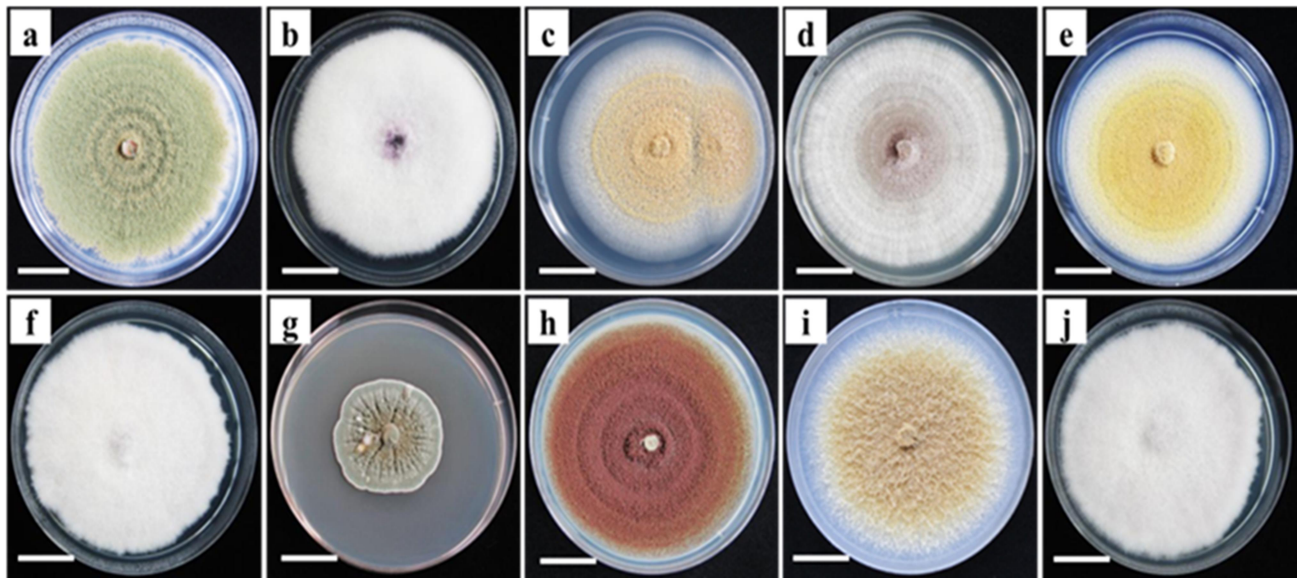
เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง (Macroscopic examination) และ ลักษณะของ โครงสร้างสปอร์ และ เส้นใย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) ของเชื้อราที่แยกได้จาก ยาง แผ่นผึ่งแห้ง และ ยางก้อนถ้วย สามารถจัดจำแนกเชื้อราบนเป็อนบนแผ่นยาง ใน จินัส *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Fusarium* sp. *Geotrichum* sp. และ *Trichoderma* sp. ตามลำดับ (ภาพที่ 16 และ ภาพที่ 17)

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Macroscopic examination) และ ลักษณะโครงสร้างสปอร์ และ เส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) ของเชื้อราปนเปื้อนบนยางแผ่นผึ่งแห้งและยาง ก้อนถ้วย

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Macroscopic examination) ของเชื้อราบนอาหาร

Potato dextrose agar (PDA)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Macroscopic examination) ของโคลนเชื้อรา ทั้งหมด 47 ไอโซเลท เมื่อทำการตรวจการเจริญบนผิวหน้าอาหาร PDA พบว่า ลักษณะของเชื้อรา มีผิวหน้าหยาบ ไม่มันวาว สามารถแยกได้ทั้งหมด 5 กลุ่มสี คือ ส้มขาว คิดเป็น 4.25% ขาว คิดเป็น 12.02% เขียว คิดเป็น 44.68% ดำ คิดเป็น 17.02% และ น้ำตาล คิดเป็น 5.00 % ตามลำดับ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยานบนอาหารแข็ง PDA ดังกล่าว สามารถจัดจำแนกเชื้อราออกเป็น 5 จินัส ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., และ *Geotrichum* sp. โดยจินัส ที่พบ ปนเปื้อนในยางแผ่นผึ่งแห้ง และ ยางก้อนถ้วย มาก ที่สุด ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. และ *Fusarium* sp. ตามลำดับ แสดงดัง ภาพที่ 16

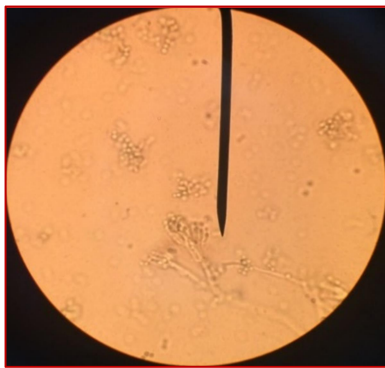


ภาพที่ 16 ลักษณะสัณฐานวิทยานบนอาหารแข็ง PDA ของเชื้อราที่ปนเปื้อนจากยางแผ่นผึ่งแห้ง และ ยางก้อนถ้วย เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นระยะเวลา 14 วัน

2.2 การศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic examination) แบบเลนส์ประกอบของเชื้อราที่แยกได้จากยางแผ่นผึ่งแห้งและ ยางก้อนถ้วย

จากการเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 วัน แล้วนำมาตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound microscope) กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า ลักษณะโครงสร้างของสปอร์ และ เส้นใย มีลักษณะแตกต่างกัน 4 แบบ เมื่อแบ่งตามลักษณะสปอร์ และ โครงสร้างสปอร์ จัดอยู่ในกลุ่ม Conidiospore, Sporangiospore, Arthrospore และ Macrospore ตามลำดับ แสดงดัง ภาพที่

17



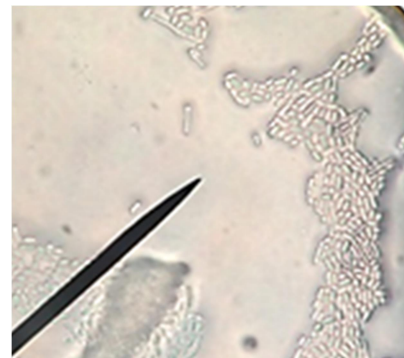
Penicilium sp.



Aspergillum sp.



Fusarium sp.



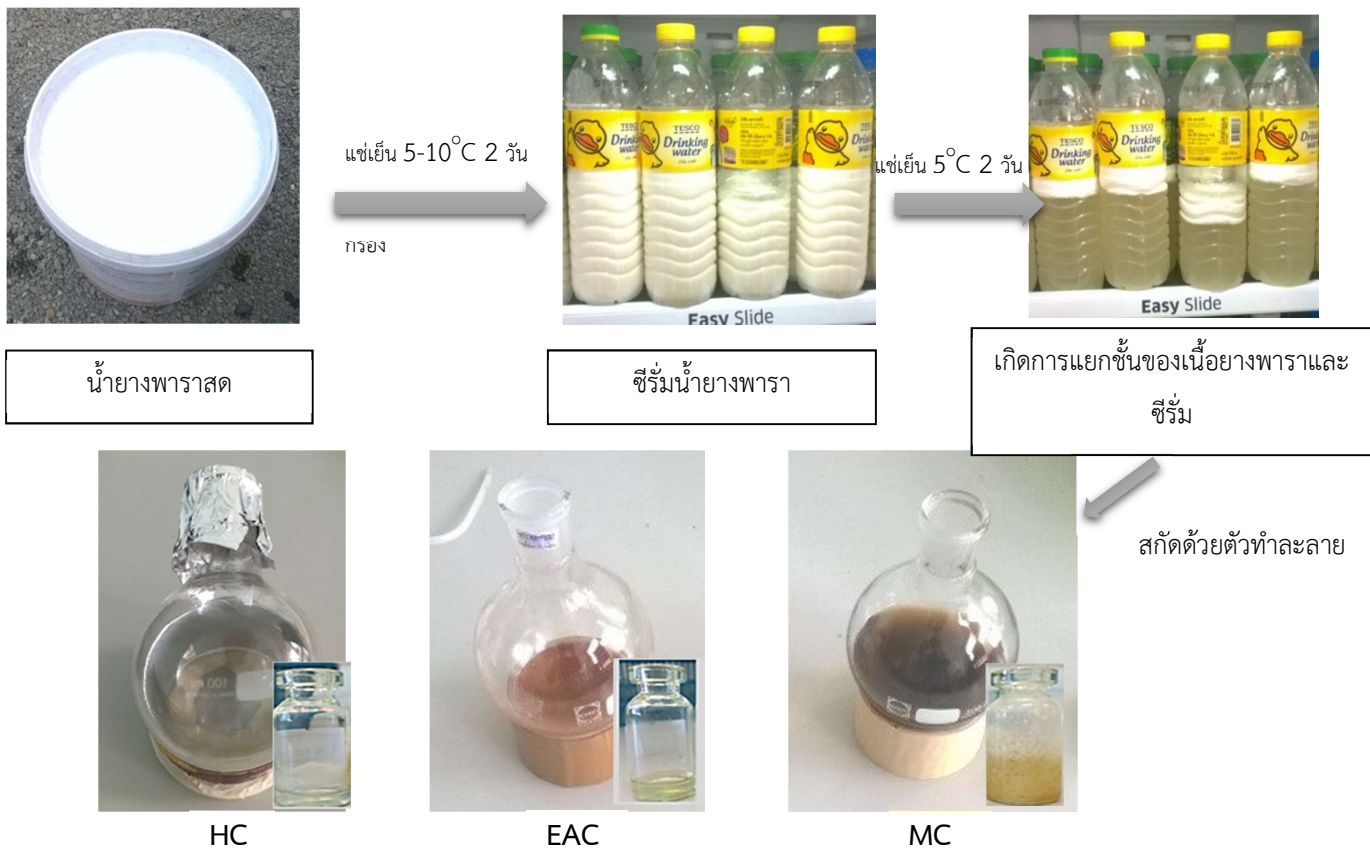
Geotrichum sp.

ภาพที่ 17 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound microscope) กำลังขยาย 400 เท่าของเชื้อราที่ปนเปื้อนจาก ยางแผ่นผึ่งแห้ง และ ยางก้อนถ้วย

3. การสกัดและการแยกสารจากซีรัมน้ำยางพารา

3.1 การสกัดสารจากซีรัมน้ำยางพารา

นำตัวอย่างน้ำยางพาราสด 35.7 kg (35 L) ใส่ในภาชนะที่เปิด แช่ในถังน้ำแข็งอุณหภูมิ 5-10°C เป็นเวลา 1 วัน แยกส่วนที่เป็นของเหลวออกจากอนุภาคยางพารา นำของเหลวที่ได้เก็บไว้ในตู้เย็น 5°C เป็นเวลา 2 วัน กรองแยกเอาส่วนใส (ซีรัม) ออก ได้น้ำหนัก 7.14 kg สกัดด้วยตัวทำละลายโดย แบ่งซีรัมน้ำยางพารา 500 ml สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ปริมาตร 150 ml จำนวน 2 ครั้ง ด้วยกรวยแยก เก็บชั้นของเฮกเซน นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาดชั้นเฮกเซน และ นำซีรัมน้ำยางพาราสกัดต่อด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตรต ปริมาตร 150 ml จำนวน 2 ครั้ง เก็บชั้นเอทิลอะซิเตรตไประเหยด้วยเครื่องสุญญากาศ จะได้สารสกัดหยาดชั้นเอทิลอะซิเตรต จากนั้น นำส่วนซีรัมน้ำยางพารานำไปผึ่งลมให้แห้งแล้วสกัดด้วยตัวทำละลายเมทานอล ปริมาตร 150 ml จำนวน 2 ครั้ง เก็บชั้นของเมทานอล นำไประเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ได้สารสกัดหยาดเมทานอล จากนั้น นำสารสกัดหยาดระเหยตัวทำละลายด้วยปั๊มสุญญากาศ ได้ลักษณะทางกายภาพ (ตารางที่ 6 ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 การแยกซีรัม และการสกัดจากซีรัมน้ำยางพารา สารสกัดหยาดเฮกเซน (HC)

สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตรต (EAC) และ สารสกัดหยาบเมทานอล (MC)

ตารางที่ 6 คุณสมบัติทางกายภาพของสารสกัดจากซีรุ่มน้ำยางพารา

สารสกัดจากซีรุ่มน้ำยางพารา	สถานะ	สี	การเกิดผลึก	pH
สารสกัดหยาบเฮกเซน (HC)	ของเหลว	ขาวใส	ไม่พบผลึก	5.0
สารสกัดเอทิลอะซิเตรต (EAC)	ของเหลว	เหลืองอ่อน	ไม่พบผลึก	5.0
สารสกัดหยาบเมทานอล (MC)	ของเหลว	เหลืองเข้ม	พบผลึก	4.0

ตารางที่ 7 น้ำหนัก และ ร้อยละผลผลิต (% yield) ของสารสกัดหยาบจากซีรุ่มน้ำยางพารา

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (g)	ร้อยละผลผลิต (%)
น้ำยางพาราสด	35700	-
ซีรุ่มน้ำยางพารา	7,140	20
สารสกัดหยาบ		
HC	0.0351	0.0005
EAC	1.2756	0.018
MC	103.7768	1.4

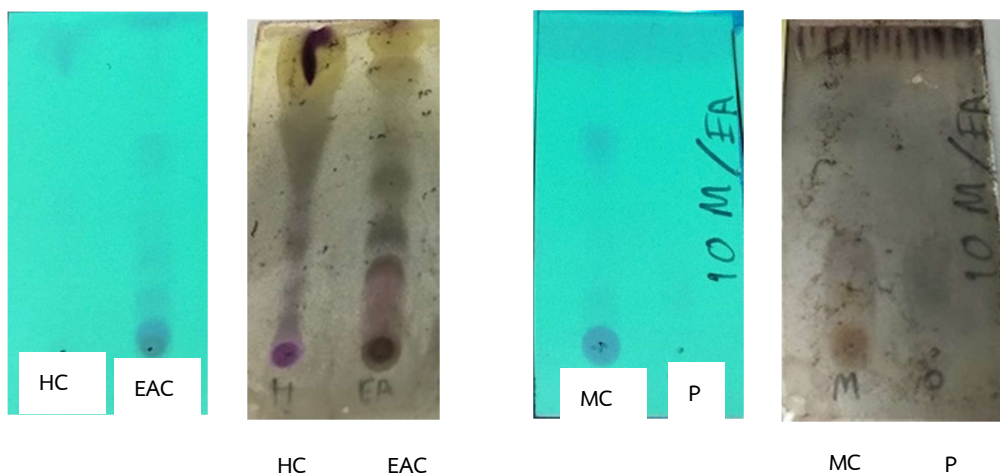
หมายเหตุ %yield ของสารสกัดหยาบเทียบจากน้ำหนักซีรุ่มน้ำยางพารา

3.2 การทดสอบสารสกัดหยาบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี

นำสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา (Crude extracts) นำมาแยกองค์ประกอบของสารสกัดหยาบเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC โดยนำสารสกัดหยาบแต่ละชนิด ละลายในตัวทำละลายของแต่ละชนิดแล้วทำการหยดลงบนแผ่น TLC จากนั้น จุ่มลงในตัวทำละลายเคลื่อนที่ โดยที่ สารสกัดหยาบ HC และ EAC ใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็น EtOAc : Hexane (4:6) และ สารสกัดหยาบ MC และ สาร P ใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่เป็น MeOH : EtOAc (1:9) จากนั้น ตรวจวิเคราะห์ผลภายใต้ UV 254 nm และ สเปรย์ด้วยสารละลาย Anisaldehyde ดังแสดงในภาพที่ 19

สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน (HC) มีจุดสาร 1 จุด และ มีปริมาณสารน้อย จึงไม่ได้ทำการแยกต่อ ส่วนสารสกัดหยาบชั้นเอทิล อะซิเตรต (EAC) พบสารหลายชนิด และ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (MC) พบสาร 2 จุด

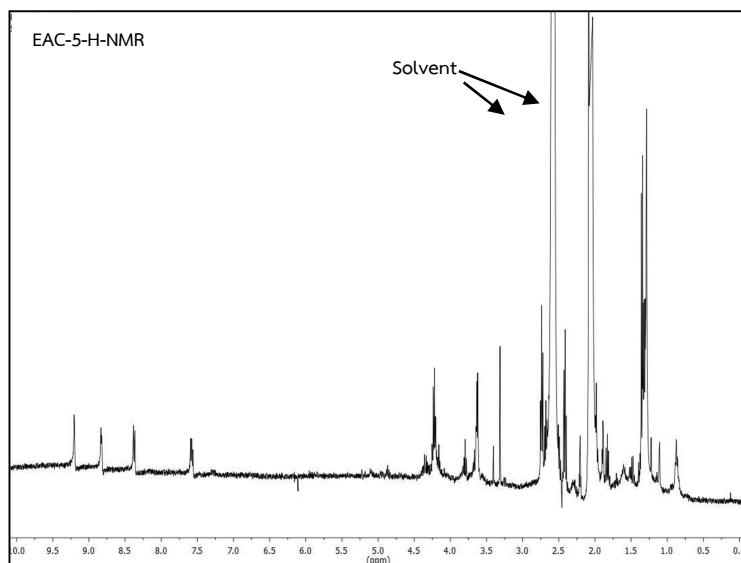
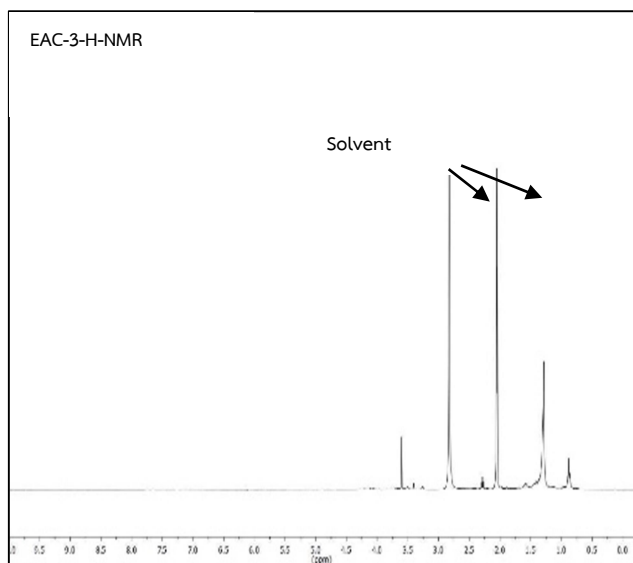
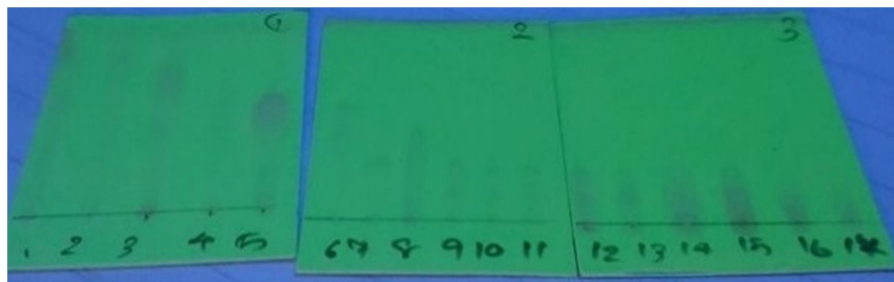
และ มีปริมาณมาก คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการแยกสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล(MC) ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีต่อไป โดยสาร P (L-quebrachitol) ที่แยกได้จากการตกผลึกของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (MC) นำมาตกผลึกใหม่อีกครั้ง เพื่อให้บริสุทธิ์ขึ้น เมื่อทำ TLC ของสาร P เทียบกับสาร MC พบว่า ใน MC มีสาร P (L-quebrachitol) เหลืออยู่จะทำการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีต่อไป



ภาพที่ 19 TLC ของสารสกัดหยาบเฮกเซน (HC) เอทิลอะซิเตรต (EAC) เมทานอล (MC) และ สารที่แยกได้ (P) ภายใต้แสง UV 254 nm และ สเปรย์สารละลาย Anisaldehyde ตามลำดับ

3.2.1 การแยกสารให้บริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตรต (EAC)

แยกสารสกัดหยาบชั้นเอทิลอะซิเตรต (EAC) โดยใช้ Column Chromatography ตัวทำละลายเคลื่อน ได้แก่ EtOAc : Hexane (4:6) ได้สาร ทั้งหมด 16 fraction โดย EAC-3 (0.0048 g) และ EAC-5 (0.0190 g) เป็น fraction ที่สนใจ เมื่อนำไปยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ (Acetone d_6) ดังภาพที่ 20 พบว่า สาร EAC-3 และ EAC-5 ไม่บริสุทธิ์ และ มีปริมาณน้อยจึงไม่สามารถแยกต่อไปได้

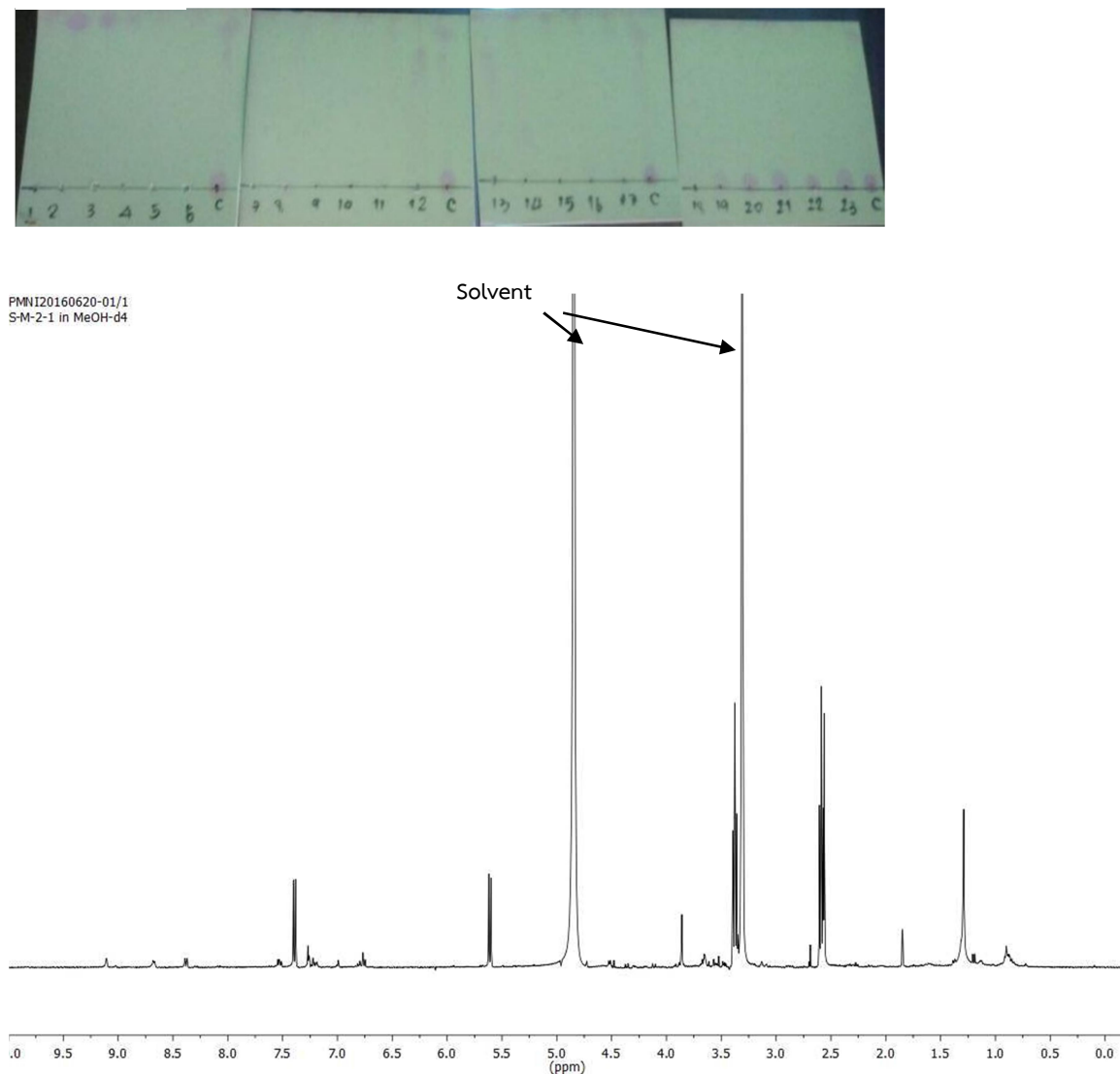


ภาพที่ 20 TLC ของ 16 fraction ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตรต (EAC) ภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 nm และ $^1\text{H-NMR}$ ของ fraction EAC-3 และ EAC-5 จากสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตรต (EAC)

3.2.2 การแยกสารให้บริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล (MC)

นำสารสกัดหยาบเมทานอล (MC) แยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ด้วย Column Chromatography silica gel โดยใช้ เฟสเคลื่อนที่ได้แก่ MeOH : Acetone : Ethyl acetate (1:1.5:75) ได้จำนวน fraction ทั้งหมด 16 fraction เมื่อตรวจสอบสารเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC พบว่า fraction 2 (0.0448 g) เป็น fraction ที่น่าสนใจ เมื่อนำไปยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค $^1\text{H-NMR}$ (MeOH d_4) พบว่า สารไม่บริสุทธิ์ และ มีปริมาณน้อยจึงไม่สามารถยืนยันต่อได้ว่าเป็นสารกลุ่มใด (ภาพที่ 21)

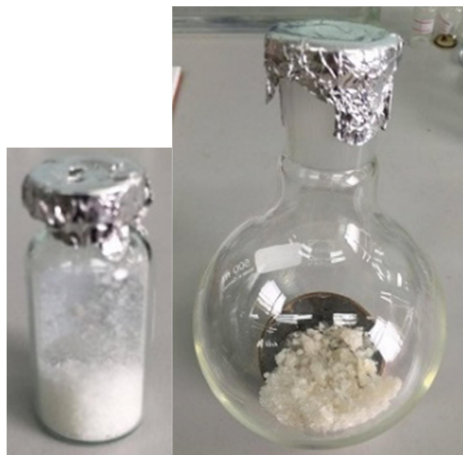
MC-2-H-NMR



ภาพที่ 21 TLC ของ 16 fraction ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบเมทานอล (MC) ภายใต้ UV ความยาวคลื่น 254 nm และ $^1\text{H-NMR}$ ของ fraction MC-2 จากสารสกัดหยาบเมทานอล (MC)

3.2.3 การตกผลึกสารให้บริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบเมทานอล (MC)

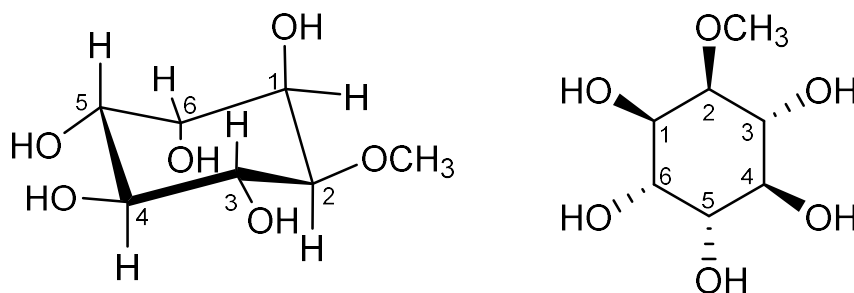
จากสารสกัดหยาบเมทานอล เก็บไว้ในอุณหภูมิ 5-6°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลึกสาร กรอง และ ตกผลึกใหม่ด้วยตัวทำละลายเมทานอล แยกด้วยเทคนิคการผลึก และ เทคนิค Chromatography column ได้สาร P (L-quebrachitol) เป็นของแข็งสีขาว ดัง ภาพที่ 21 น้ำหนัก 19.2935 g ($R_f = 0.30$; MeOH:EtOAc (1:9)) คิดเป็นร้อยละ 18.59 เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบเมทานอล หรือ คิดเป็นร้อยละ 0.054 เมื่อเทียบกับน้ำยางพาราสด จากนั้นทำการยืนยันโครงสร้างด้วยด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีต่อไป



ภาพที่ 22 ลักษณะทางกายภาพของสาร P (L-quebrachitol)

ในการยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิคทางสเปกโทรสโกปีพบ FTIR (KBr) $\nu_{\max}$ 3000-3400, 2930, 1437, 1107 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 4.79 (s, 5H), 4.26 (t, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.05 (t, $J = 3.7$ Hz, 1H), 3.78 – 3.69 (m, 1H), 3.67 – 3.54 (m, 2H), 3.44 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H), 3.42 – 3.36 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 80.11, 72.79, 71.88, 71.32, 70.32, 67.10, 56.88 ดังแสดงใน ภาพที่ 19 และ ภาพที่ 20

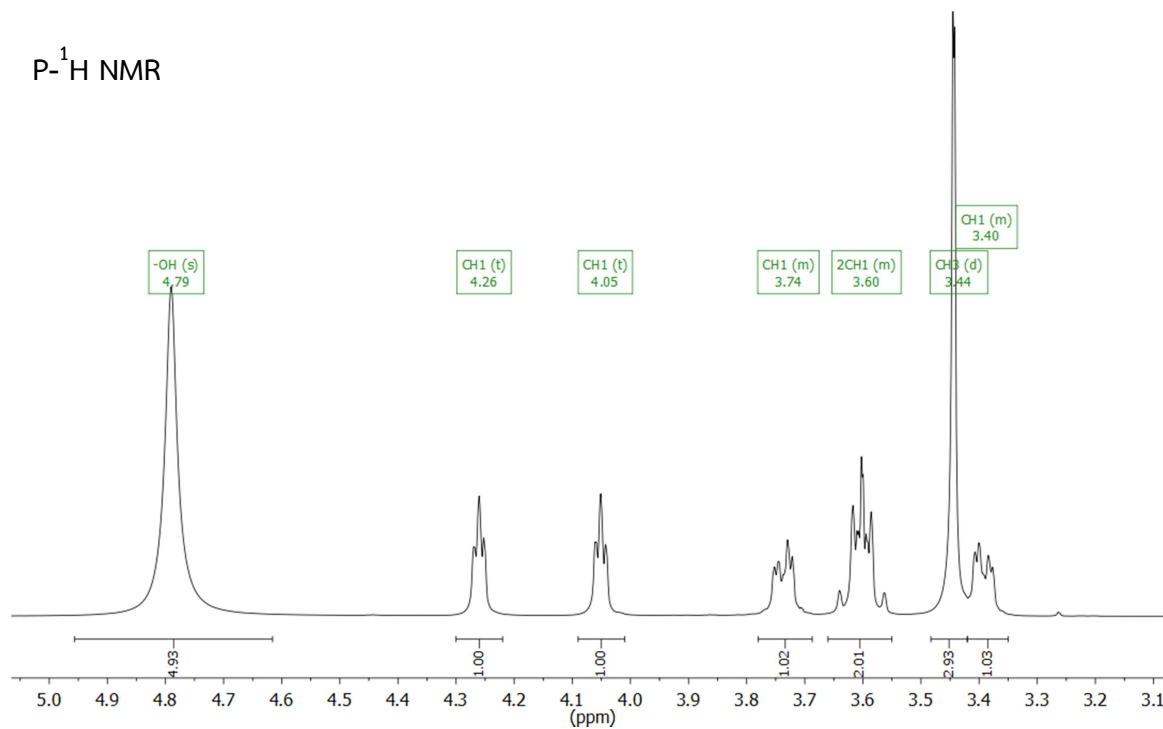
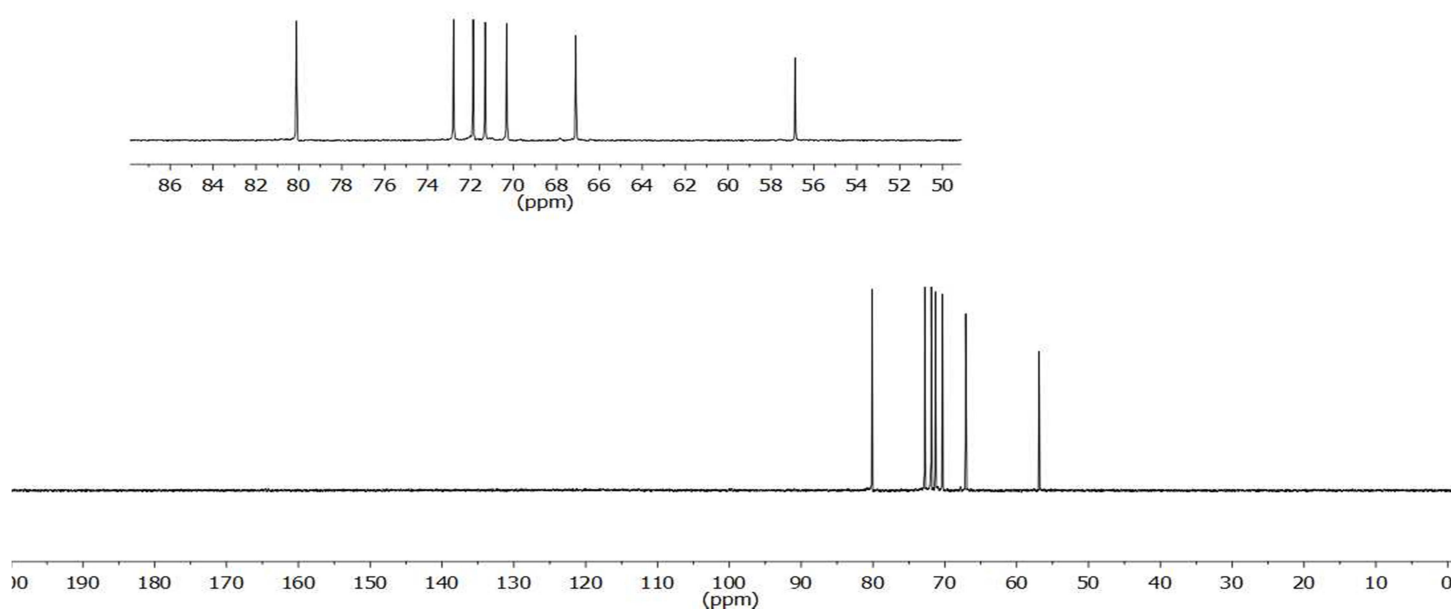
เมื่อนำผลมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของคุณ Diaz Martina และคณะ, 2008 ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าให้ตำแหน่งของ ^1H , ^{13}C NMR ที่ตรงกัน จึงยืนยันได้ว่า สาร P ที่แยกได้เป็นสาร L-quebrachitol



L-quebrachitol

ตารางที่ 8 การเทียบ ^1H -NMR และ ^{13}C -NMR ของ สาร P กับสาร L-quebrachitol

Positions	สาร P		L-quebrachitol [Diaz และคณะ]	
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR
1	4.26 (t, $J = 3.4$ Hz, 1H),	67.10	4.25 (dd, 1H, $J = 3.5, 3.6$ Hz)	67.601
2	3.42 – 3.36 (m, 1H).	80.11	3.39 (dd, 1H, $J = 3.2, 9.5$ Hz)	80.602
3,4	3.67 – 3.54 (m, 2H)	72.79 71.88	3.60 (m, 2H)	73.283 72.369
5	3.78 – 3.69 (m, 1H),	70.32	3.73 (dd, 1H, $J = 9.6, 3.2$ Hz)	70.877
6	4.05 (t, $J = 3.7$ Hz, 1H),	71.32	4.05 (dd, 1H, $J = 3.6, 3.7$ Hz)	71.809
-OCH ₃	3.44 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H)	56.88	3.44 (s, 3H, OMe)	57.333

P- ^1H NMRภาพที่ 23 สเปกตรัม ^1H -NMR ของ สาร P (L-quebrachitol)P- ^{13}C -NMRภาพที่ 24 สเปกตรัม ^{13}C -NMR ของ สาร P (L-quebrachitol)

3.3 การแยก L-quebrachitol จากน้ำรีดยางแผ่น

ในขั้นตอนการทำยางแผ่น นำน้ำยางพาราสด 62 กิโลกรัม ขึ้นรูปเป็นยางก้อนด้วยกรดฟอร์มิก ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที จะได้ยางก้อน 20 ก้อน แล้วจึงรีดด้วยเครื่องรีด เพื่อให้ได้แผ่นยาง 20 แผ่น โดยออกแบบใช้น้ำเปล่าจำนวน 20 ลิตร ในการหล่อเลี้ยงการรีดด้วยปั้ม แบบระบบปิด แล้วเก็บน้ำที่ผ่านกระบวนการรีดยางแผ่นได้ทั้งหมด 37 กิโลกรัม



น้ำยางพาราสด



การทำยางก้อน



ยางก้อน



เครื่องรีดยาง



การรีดยางแผ่น

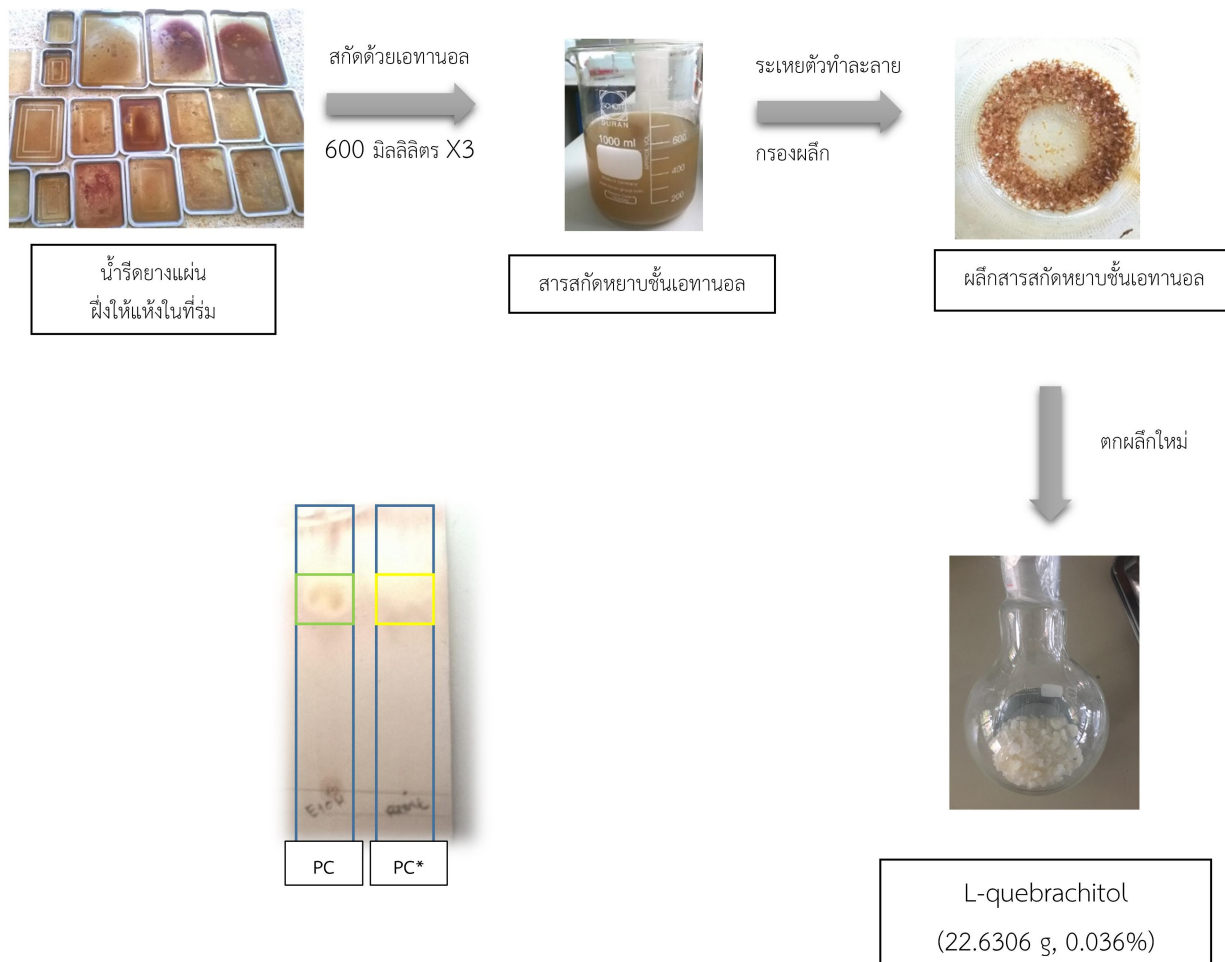


ยางแผ่น (บน) และน้ำรีดยาง (ล่าง)

ภาพที่ 25 การเก็บน้ำรีดยางแผ่นในการทำยางแผ่น

นำน้ำที่รีดยางแผ่น ผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ในภาชนะเปิด (ประมาณ 4 วัน) ทำการสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล 600 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง กรองผ่านสำลี ได้สารสกัดหยาบชั้นเอทานอล ระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน ที่อุณหภูมิห้อง ได้ผลึกสาร กรอง และ ตกผลึกใหม่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล ดังแสดงในแผนภาพ 2.3 ได้ L-quebrachitol น้ำหนัก 22.6306 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.036 เมื่อเทียบกับน้ำยางพาราสด

นำสาร L-quebrachitol ที่ได้จากซีรัมยางพาราสดยืนยันกับสารที่แยกได้จากน้ำรีดยางแผ่นด้วยใช้เทคนิคThin Layer Chromatography (TLC) ใช้โมบายเฟส เมทานอล ต่อ เอทิล-อะซิเตท (1:1) พบว่า สารทั้งสองไม่สามารถมองเห็นได้ในช่วง UV ความยาวคลื่น 254 nm นำไปจุ่มสารละลายแอสีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) แล้วให้ความร้อน พบสารจากน้ำรีดยางแผ่น มีค่า R_f ได้เท่ากับ 0.63 ตรงกับ L-quebrachitol ดังแสดงใน ภาพที่ 26



ภาพที่ 26 การแยก L-quebrachitol จากน้ำรีดยางแผ่น และ TLC ของ L-quebrachitol (PC) เทียบกับสารจากน้ำรีดยางแผ่น (PC*)

4. การยับยั้งเชื้อราที่เจริญบนแผ่นยางดิบ และ ยางก้อนถ้วยโดยการใช้สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา และ น้ำรีดแผ่นยาง

จากทดสอบการยับยั้งเชื้อราบนแผ่นยางดิบ สามารถจัดจำแนกเชื้อรา ได้ 5 จินัส คือ *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp. และ *Trichoderma* sp. โดย คัดเลือกเชื้อรา จินัส ละ 2 ไอโซเลท เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราจากสารสกัดซีรุ่มน้ำยางพารา และ น้ำรีดแผ่นยาง พบว่า สาร L-quebrachitol สารสกัดหยาบเมทานอล และ สารสกัดหยาบเฮกเซน สามารถยับยั้งเชื้อราได้ทุกชนิด โดย สาร L-quebrachitol ให้ผลการยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด เมื่อวัดจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 1.8-3.8 cm รองลงมา ได้แก่ สารสกัดหยาบเมทานอล ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส ในช่วง 1.7-2.4 cm และ สารสกัดหยาบเฮกเซน ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส ในช่วง 1.0-1.7 cm ตามลำดับ โดยให้ผลยับยั้ง เชื้อรา จินัส *Penicillium* sp., *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ เชื้อรา จินัส *Trichoderma* sp. แสดงผล ดังตารางที่ 9 จากนั้น ทำการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา ทดสอบ ทั้ง 5 จินัส จาก สารสกัดที่ให้ผลบวก (แสดงการเกิดวงใส) 3 ชนิด ได้แก่ สาร L-quebrachitol สารสกัดหยาบเมทานอล และ สารสกัดหยาบเฮกเซน พบว่า สารสกัดหยาบเมทานอล แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ทดสอบได้ดีที่สุด มีค่า MICs อยู่ในช่วง 0.312-1.25 mg/ml โดยยับยั้ง *Penicillium* sp. และ *Geotrichum* sp. ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ L-quebrachitol มีค่า MICs ในการยับยั้งเชื้อราอยู่ในช่วง 0.312-2.5 mg/ml ให้การยับยั้ง *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ได้ดีที่สุด และ สารสกัดหยาบเฮกเซน มีค่า MICs ในการยับยั้งเชื้อรา ในช่วง 1.25-5.00 mg/ml ให้การยับยั้ง *Fusarium* sp. และ *Geotrichum* sp. ได้ดีที่สุด แสดงผลดัง ตารางที่ 10 และ ภาพที่ 27

ตารางที่ 9 ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่เจริญบนแผ่นยางดิบโดยการใช้สารสกัดซีรุ่มน้ำยางพาราชนิดต่างๆ

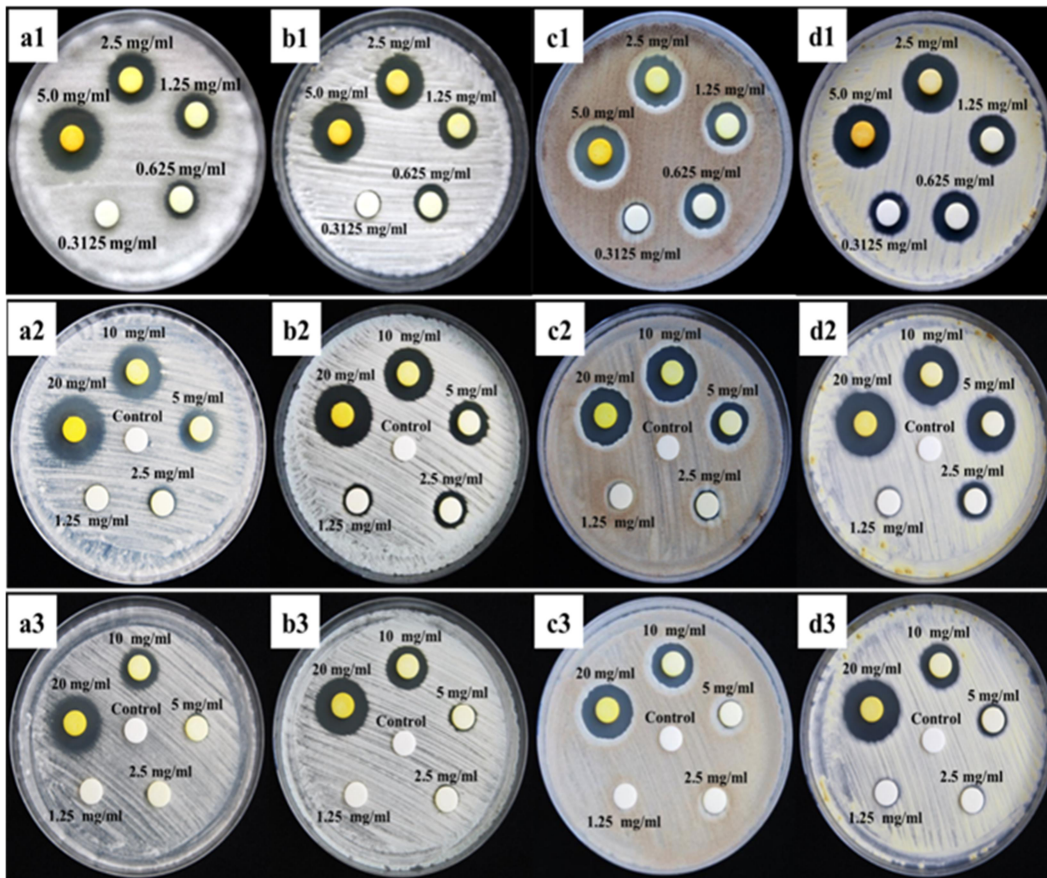
ชนิดของเชื้อรา	ชนิดของสารสกัด / เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดวงใส (cm)							
	HC	EAC	MC	MCC*	L-quebracitol	H	EA	M
<i>Aspergillus</i> sp.	1.5	-	2.0	-	2.5	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	1.0	-	2.3	-	3.0	-	-	-
<i>Geotrichum</i> sp.	1.7	-	2.7	-	3.2	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	1.7	-	1.7	-	3.8	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	1.2	-	2.3	-	1.8	-	-	-

หมายเหตุ ชุดควบคุม ได้แก่ ตัวทำลายชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดสอบ HC คือ สารสกัดยับยั้งเชื้อเฮเซน; EAC คือ สารสกัดยับยั้งเชื้อเอชไอวี; MC คือ สารสกัดยับยั้งเชื้อเมทานอล; MCC* คือ สารสกัดยับยั้งเชื้อน้ำร้อน; L-quebrachitol คือ สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพแยกจากชีรมน้ำยางพารา
H คือ เฮเซน; EA คือ เอชไอวี; M คือ เมทานอล

ตารางที่ 10 ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal Inhibitory Concentration; MICs) ของสารสกัดชีรมน้ำยางพารา ต่อเชื้อราบนแผ่นยาง

ชนิดของเชื้อรา	ชนิดของสารสกัด / MIC (mg/ml)		
	HC	MC	L-quebrachitol
<i>Aspergillus</i> sp.	2.50	1.25	0.625
<i>Fusarium</i> sp.	1.25	0.625	1.25
<i>Geotrichum</i> sp.	1.25	0.312	0.312
<i>Penicillium</i> sp.	2.50	0.312	0.625
<i>Trichoderma</i> sp.	5.00	0.625	2.50

หมายเหตุ HC คือ สารสกัดยับยั้งเชื้อเฮเซน; MC คือ สารสกัดยับยั้งเชื้อเมทานอล;
L-quebrachitol คือ สารบริสุทธิ์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพแยกจากชีรมน้ำยางพารา



ภาพที่ 27 ผลการยับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนบนแผ่นยางโดยการใช้สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพาราชั้นเมทานอล ที่ระยะเวลาต่างกัน ได้แก่ 5 วัน (1) 7 วัน (2) และ 14 วัน (3) ตามลำดับ

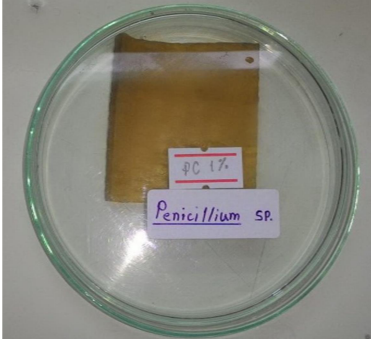
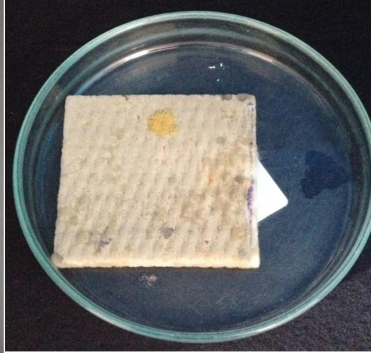
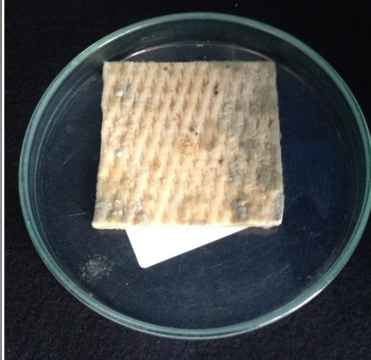
หมายเหตุ a คือ *Aspergillus* sp., b คือ *Penicillium* sp., c คือ *Trichoderma* sp. และ d คือ *Fusarium* sp.; ชุดควบคุม (Control) ได้แก่ ตัวทำละลายเมทานอล

5. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบและสาร L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา

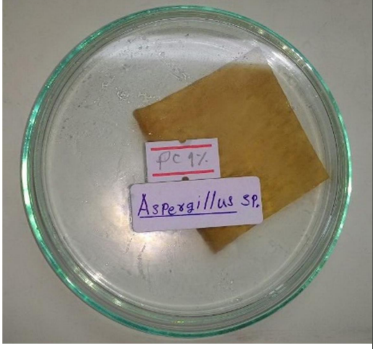
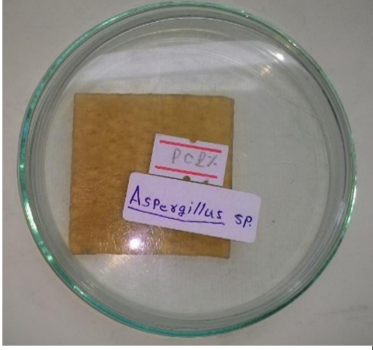
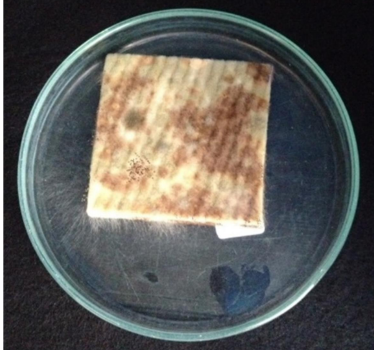
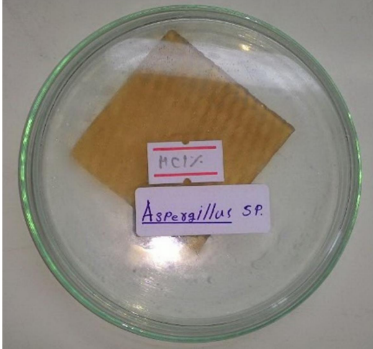
เมื่อนำยางแผ่นที่จุ่มสารสกัดซีรุ่มน้ำยางพาราด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ และ ยางแผ่นที่ไม่ได้จุ่มสารสกัดไปวางไว้ที่สภาวะธรรมชาติ เป็นระยะเวลา 1-6 เดือน พบว่า สารสกัดหยาบจากซีรุ่มน้ำยางพาราทุกชนิด ความเข้มข้น 10 ppm, 20 ppm และ 40 ppm สามารถป้องกันการเกิดเชื้อราได้ และ มีระยะเวลาการเก็บรักษา นาน 2 เดือน โดยสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพาราทุกชนิด สามารถยับยั้ง *Penicillium* sp. ได้ดีกว่า *Aspergillus* sp. โดย สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol (PC) ความเข้มข้น 20 ppm มีฤทธิ์ยับยั้ง *Penicillium* sp. ได้ดีที่สุด รองลงมา สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol (PC) ความเข้มข้น 10 ppm และ ความเข้มข้น 40 ppm ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราบนแผ่นยางดิบ คือ 70 % 60 % และ 60 % ตามลำดับ สำหรับ *Aspergillus* sp. สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล ความเข้มข้น 20 ppm สามารถยับยั้ง *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 50 % เมื่อเทียบกับ แผ่นยางที่ไม่ได้ชุบสารสกัดจากซีรุ่มน้ำยางพารา

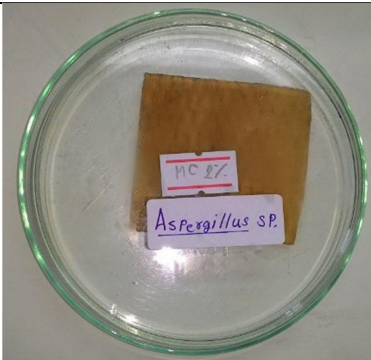
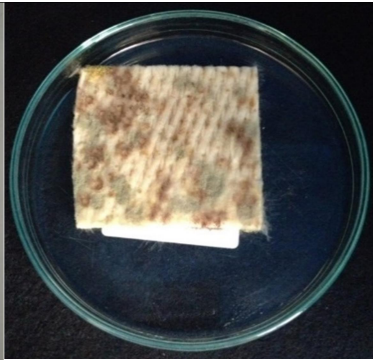
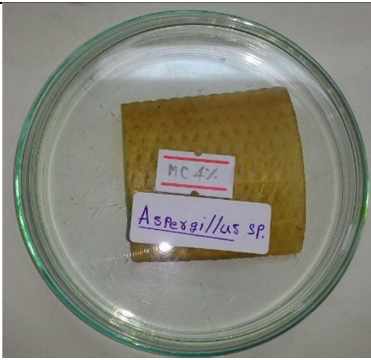
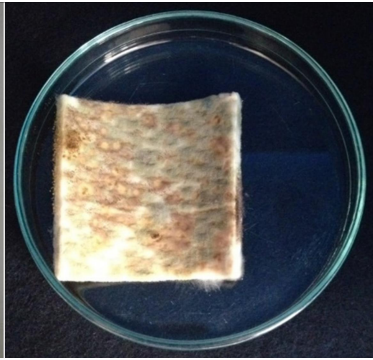
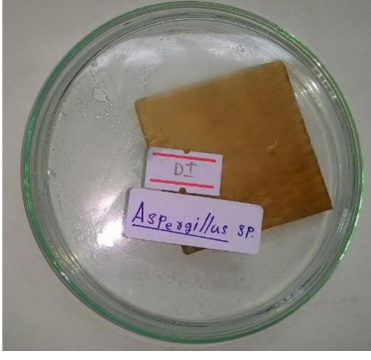
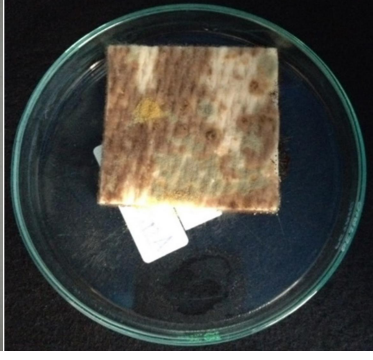
นอกจากนี้ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา และ สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพาราชั้นเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ได้นาน 2 เดือน โดย สารบริสุทธิ์ แสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราบนยางแผ่น จีนัส *Penicillium* sp. ได้เพียงชนิดเดียว โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เท่ากับ 45 % เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 20 ppm แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Aspergillus* sp. ได้ และ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล ความเข้มข้น 20 ppm สามารถยับยั้ง *Aspergillus* sp. ได้เพียงชนิดเดียว เมื่อใช้ ที่ความเข้มข้น 20 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น ได้ 20 % ส่วนชุดควบคุมที่ไม่ได้ชุบสารสกัดซีรุ่มน้ำยางพารา ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบได้ ต้นแบบสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา สามารถลดการเกิดเชื้อราบนยางแผ่นได้ โดยเกิดเชื้อราช้ากว่ายางแผ่นที่ไม่ได้ชุบสารสกัด เป็นระยะเวลา 2 เดือน ดังตารางที่ 11 และ ตารางที่ 12

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราบนเปื้อนแผ่นยางดิบจากสารสกัดซีรุ่มน้ำยางพารา

ชนิดสารสกัด	ชนิดเชื้อรา	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ยางแผ่นดิบชุบด้วยสารสกัดซีรุ่มน้ำยางพารา และ สเปรย์ด้วยเชื้อราบนเปื้อนแผ่นยางดิบ	
			0 วัน	60 วัน
1. PC 10 ppm	<i>Penicillium</i> sp.	40 %		
2. PC 20 ppm	<i>Penicillium</i> sp.	45 %		
3. PC 40 ppm	<i>Penicillium</i> sp.	10 %		

4. MC 10 ppm	<i>Penicillium</i> sp.	15 %		
5. MC 20 ppm	<i>Penicillium</i> sp.	ไม่ยับยั้ง		
6. MC 40 ppm	<i>Penicillium</i> sp.	ไม่ยับยั้ง		
7. น้ำปราศจาก ไอออน (DI) ชุด ควบคุม	<i>Penicillium</i> sp.	ไม่ยับยั้ง		

8. PC 10 ppm	<i>Aspergillus</i> sp.	ไม่ยับยั้ง		
9. PC 20 ppm	<i>Aspergillus</i> sp.	ไม่ยับยั้ง		
10. PC 40 ppm	<i>Aspergillus</i> sp.	ไม่ยับยั้ง		
11. MC 10 ppm	<i>Aspergillus</i> sp.	ไม่ยับยั้ง		

12. MC 20 ppm	<i>Aspergillus</i> sp.	20 %		
13. MC 40 ppm	<i>Aspergillus</i> sp.	ไม่ยับยั้ง		
14. น้ำปราศจากไอออน (DI) ชุดควบคุม	<i>Aspergillus</i> sp.	ไม่ยับยั้ง		

หมายเหตุ PC คือ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา

MC คือ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล

DI คือ น้ำปราศจากไอออน (DI) ชุดควบคุม

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. บนยางแผ่น ภายหลังจากการชุบสารสกัดซีรัมน้ำยางพารา เมื่อเก็บไว้ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

สารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา	จำนวนเดือนที่ไม่พบการเจริญของเชื้อราบน ยางแผ่น / ชนิดของเชื้อราทดสอบ	
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	0	0
เฮกเซน	0.5	0.5
เอทิลอะซิเตท	0.5	0.5
เมทานอล	2	2
สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรัมน้ำ ยางพารา	2	2

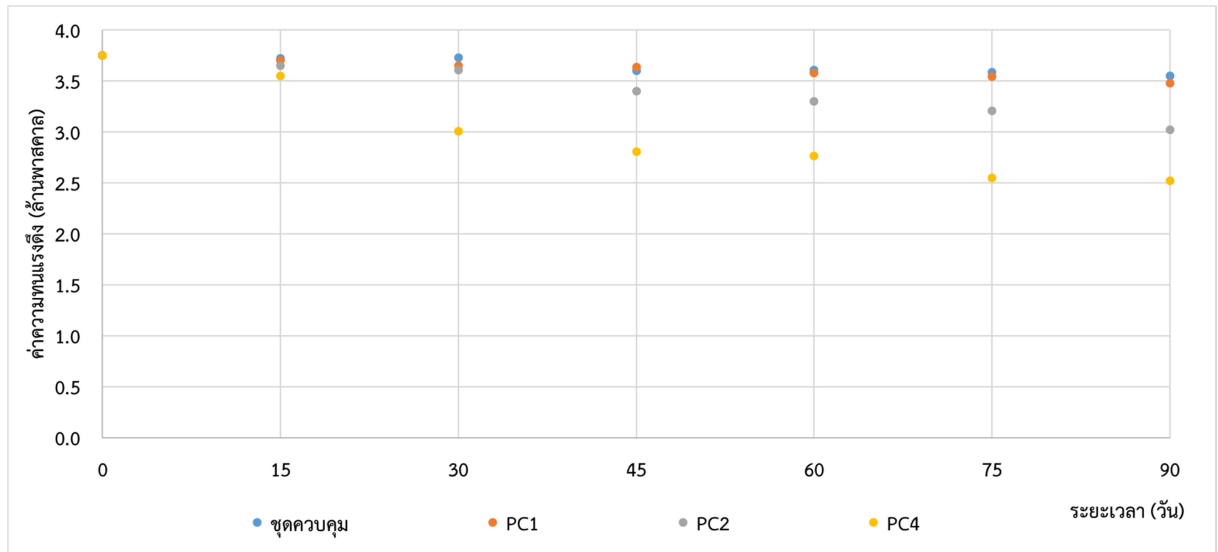
6. การศึกษาคุณสมบัติเชิงกลบางประการของยางแผ่นที่ชุบด้วยสารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา

ผลการทดลองหาค่าความทนแรงดึงสูงสุดในกลุ่มสาร L-quebrachitol (PC) และสารสกัดหยาบชันเมทานอล (MC) โดยกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความทนแรงดึงสูงสุด และ ระยะเวลา เมื่อเวลาผ่านไปค่าความทนแรงดึงสูงสุดโดยภาพรวมมีค่าลดลงเล็กน้อยตามเวลา ดังภาพที่ 28-30 และ ผลการทดลองหาค่าความหนาแน่นในกลุ่ม L-quebrachitol PC และ MC โดยกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนาแน่น และ ระยะเวลา เมื่อเวลาผ่านไป ค่าความหนาแน่นโดยภาพรวมมีค่าลดลงเล็กน้อยตามเวลา ดังภาพที่ 28 โดย

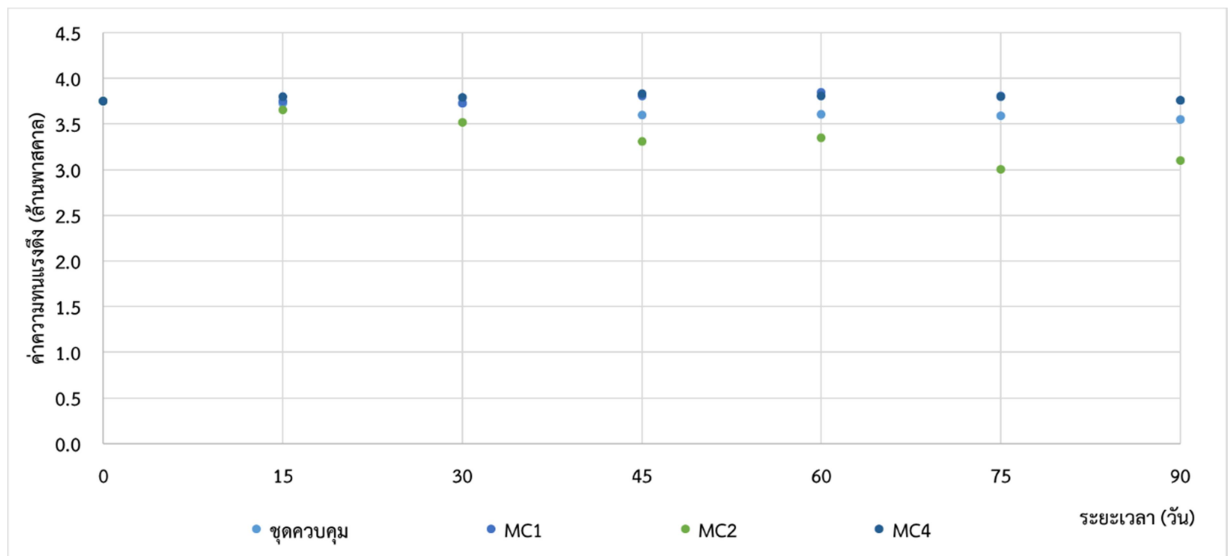
ชุดควบคุม คือ แผ่นยางที่ถูกเคลือบด้วยน้ำ DI

PC1, PC2 และ PC4 คือ แผ่นยางที่ถูกเคลือบด้วยสาร L-quebrachitol ที่ความเข้มข้น 10 ppm, 20 ppm และ 40 ppm ตามลำดับ

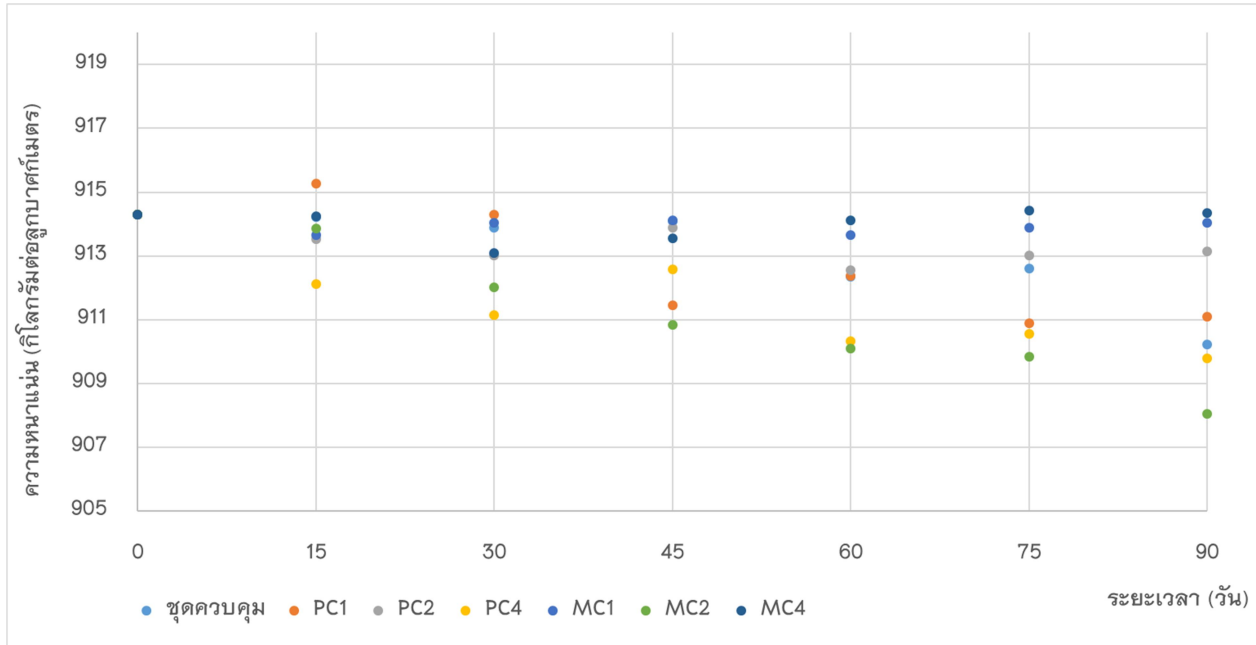
MC1, MC2 และ MC4 คือ แผ่นยางที่ถูกเคลือบด้วยสารสกัดหยาบชันเมทานอล ที่ความเข้มข้น 10 ppm, 20 ppm และ 40 ppm ตามลำดับ



ภาพที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความทนแรงดึงสูงสุดต่อเวลาของแผ่นยางที่เคลือบในสารบริสุทธ์ L-quebrachitol (PC)

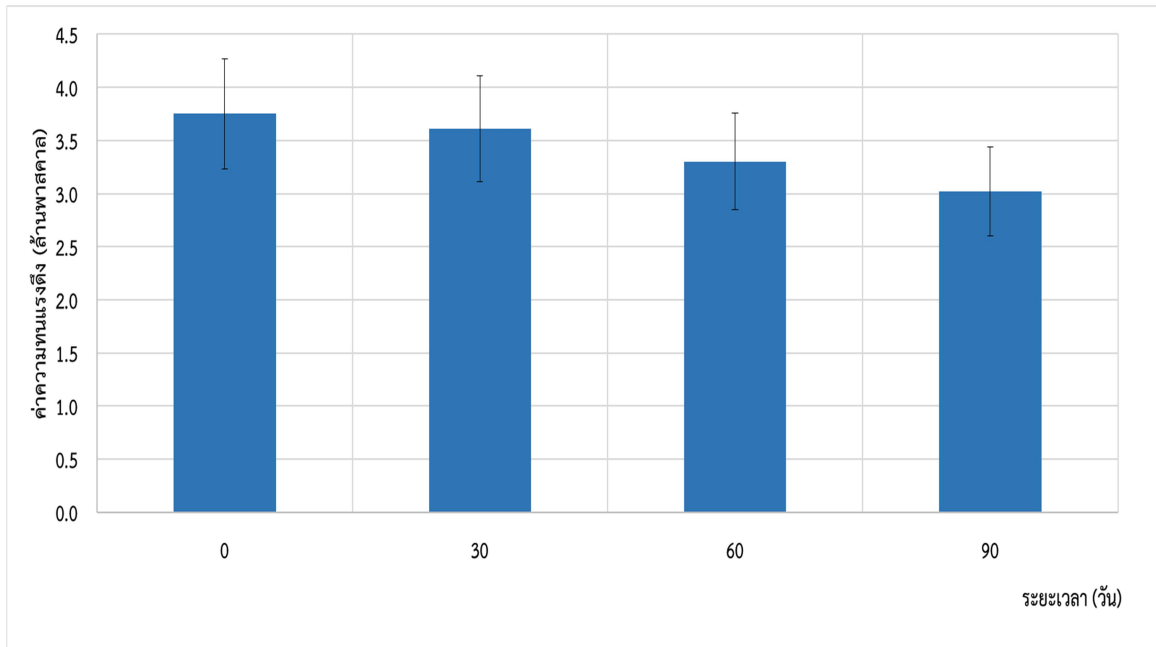


ภาพที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความทนแรงดึงสูงสุดต่อเวลาของแผ่นยางที่เคลือบสาร สกัดหยาบซีรึมน้ำยางพาราชั้นเมทานอล (MC)

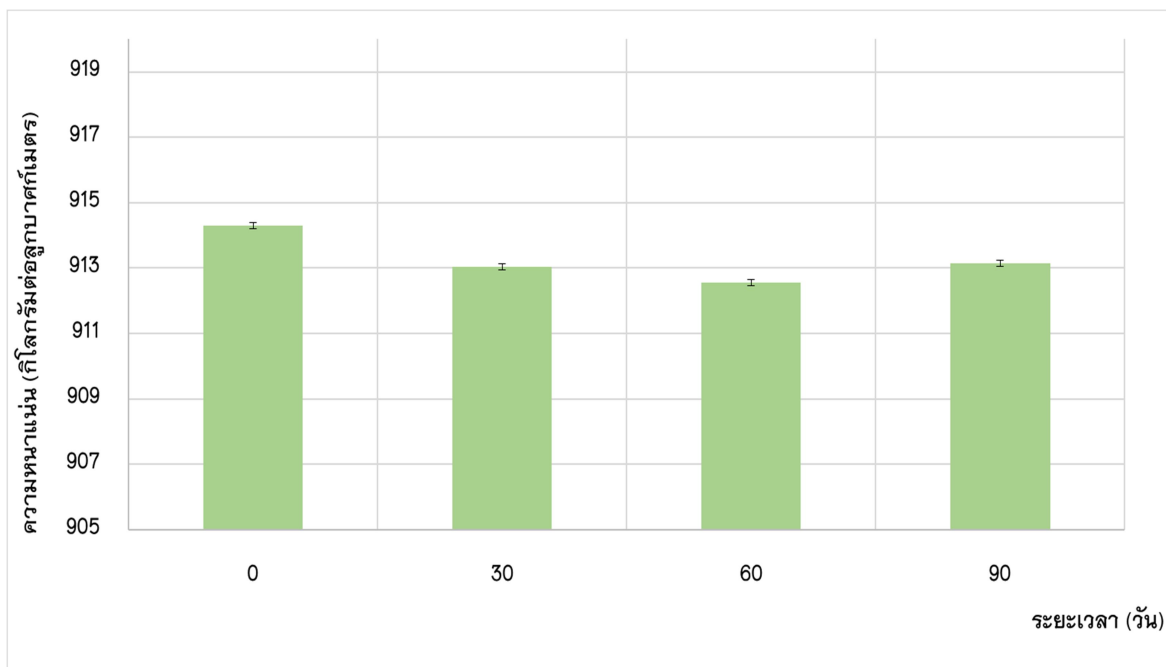


ภาพที่ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนาแน่น และ เวลาของแผ่นยางที่เคลือบด้วยสาร
บริสุทธิ์ L-quebracitol (PC) และ สารสกัดหยาดชีรมัน้ำยางพาราชั้นเมทานอล (MC)

ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพของแผ่นยางหลังจากเคลือบด้วยสารสกัดชีรมัน้ำยางพารา พบว่า ในชุดควบคุมเคลือบด้วยน้ำปราศจากไอออน (DI) มีการลดลงของค่าความหนาแน่นถึงสูงสุด และ ค่าความหนาแน่นเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งสาเหตุเกิดจากมีเชื้อราเกิดขึ้นบนแผ่นยางตามธรรมชาติ ส่งผลให้มีการลดลงของค่าความหนาแน่นถึงสูงสุด และ ค่าความหนาแน่นในชุดที่มีการเคลือบด้วยสารสกัดชีรมัน้ำยางพาราด้วย หากพิจารณาสาร L-quebrachitol ความเข้มข้น 20 ppm ซึ่งมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรามากที่สุดในกลุ่ม จะเห็นได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไป 90 วัน มีค่าความหนาแน่นถึงสูงสุดและค่าความหนาแน่นลดลง $19.47 \pm 13.8 \%$ และ $0.12 \pm 0.01 \%$ ตามลำดับ ดังภาพที่ 39-40 ดังนั้นการเคลือบแผ่นยางด้วยสารสกัดชีรมัน้ำยางพาราด้วยสาร L-quebrachitol ส่งผลให้ความหนาแน่นถึงสูงสุดและความหนาแน่นมีค่าลดลงน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ



ภาพที่ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความทนแรงดึงสูงสุด และ เวลาของแผ่นยางที่เคลือบด้วยสาร L-quebrachitol ความเข้มข้น 20 ppm



ภาพที่ 32 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนาแน่น และ เวลาของแผ่นยางที่เคลือบด้วยสาร L-quebrachitol ความเข้มข้น 20 ppm

7. การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วงและแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว ด้วยสารสกัดหยาบและสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา และ สารสกัดหยาบจากน้ำรีดยางพารา ด้วยเทคนิค Ager disc diffusion method

จากสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา และ สารสกัดหยาบจากน้ำรีดยางแผ่น นำ paper disc มาชุบสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา ปริมาณ 20 μ l/disc ทิ้งไว้ให้แห้ง 5 นาที จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยปั๊มสุญญากาศ จากนั้นนำแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 6 ชนิดที่เตรียมทดสอบ (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* และ *Bacillus cereus*) พบว่า

สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทุกชนิด โดยสามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ *Proteus vulgaris* และ *Staphylococcus epidermidis* ให้ค่าขนาดวงใสเท่ากับ 12 mm 11.67 mm และ 9 mm ตามลำดับ

สารสกัดหยาบเฮกเซน แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้เพียงชนิดเดียว ได้แก่ *Bacillus cereus* โดยให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 6.67 mm สารสกัดหยาบน้ำรีดแผ่นยาง สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว ได้เพียงกลุ่มเดียว (*S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. acnes*) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง วงใสระหว่าง 7-20 mm และ ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วงได้ (*E. coli*, *Proteus vulgaris* และ *B. cereus*)

สารสกัดหยาบเมทานอล ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้

ชุดควบคุมบวก (Positive control) Streptomycin (20 μ g/ml) ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ อาจเนื่องจากว่า ยาปฏิชีวนะชนิดดังกล่าว มีความเข้มข้นที่ต่ำเกินไป หรือ เป็นยาปฏิชีวนะชนิดที่ไม่เหมาะสมในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ จึงควรเปลี่ยนเป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่

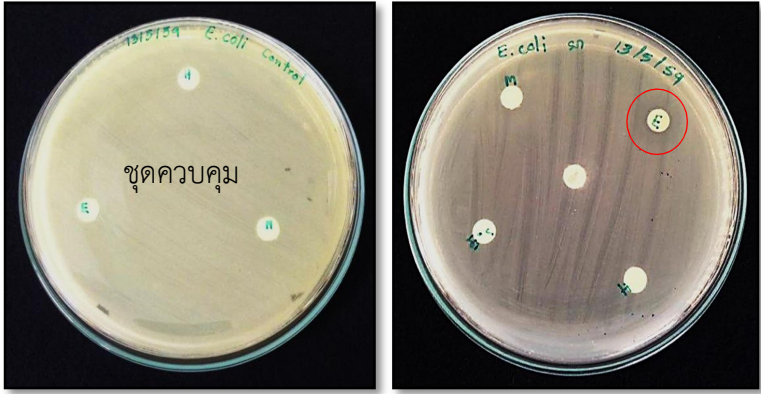
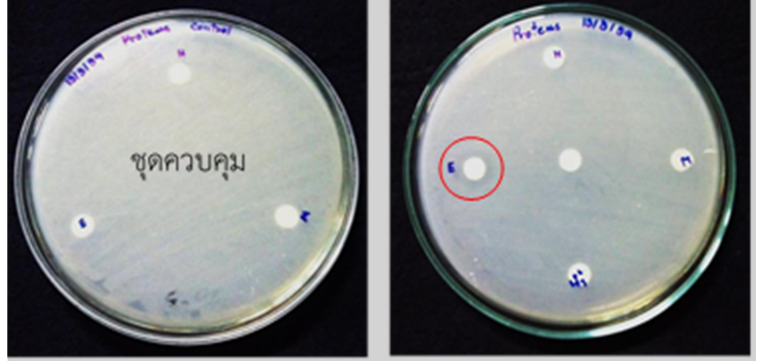
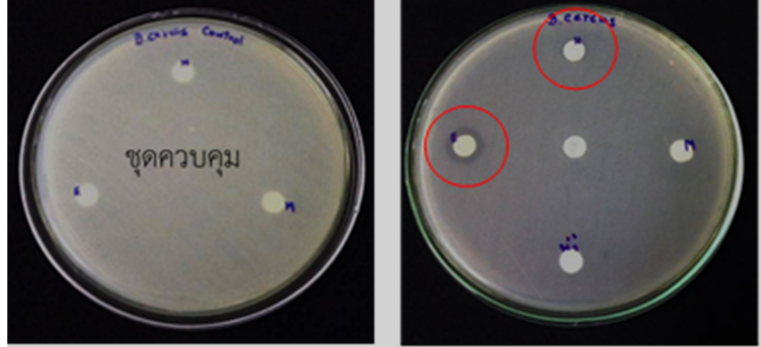
ชุดควบคุมลบ (Negative control) ได้แก่ ตัวทำละลายชนิดต่างๆ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และ เมทานอล ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้

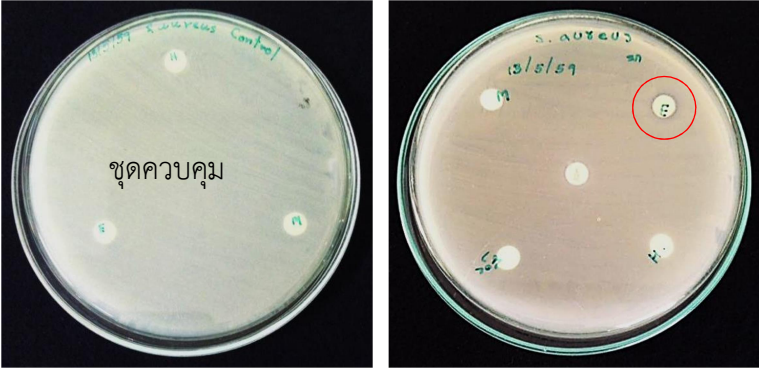
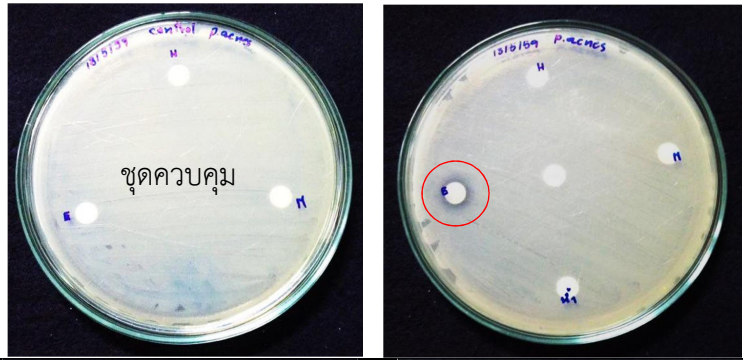
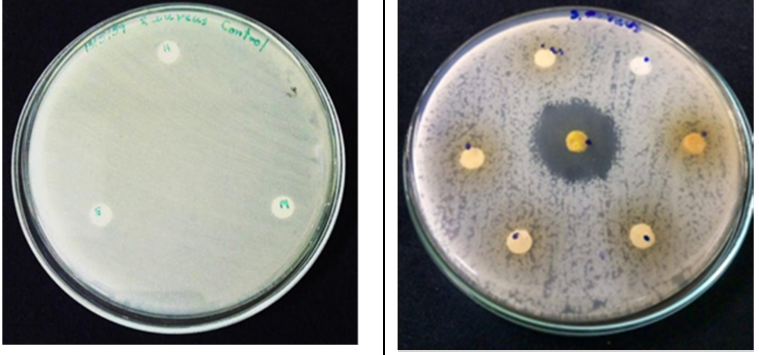
แสดงผลดัง ตารางที่ 13 และ ภาพที่ 33

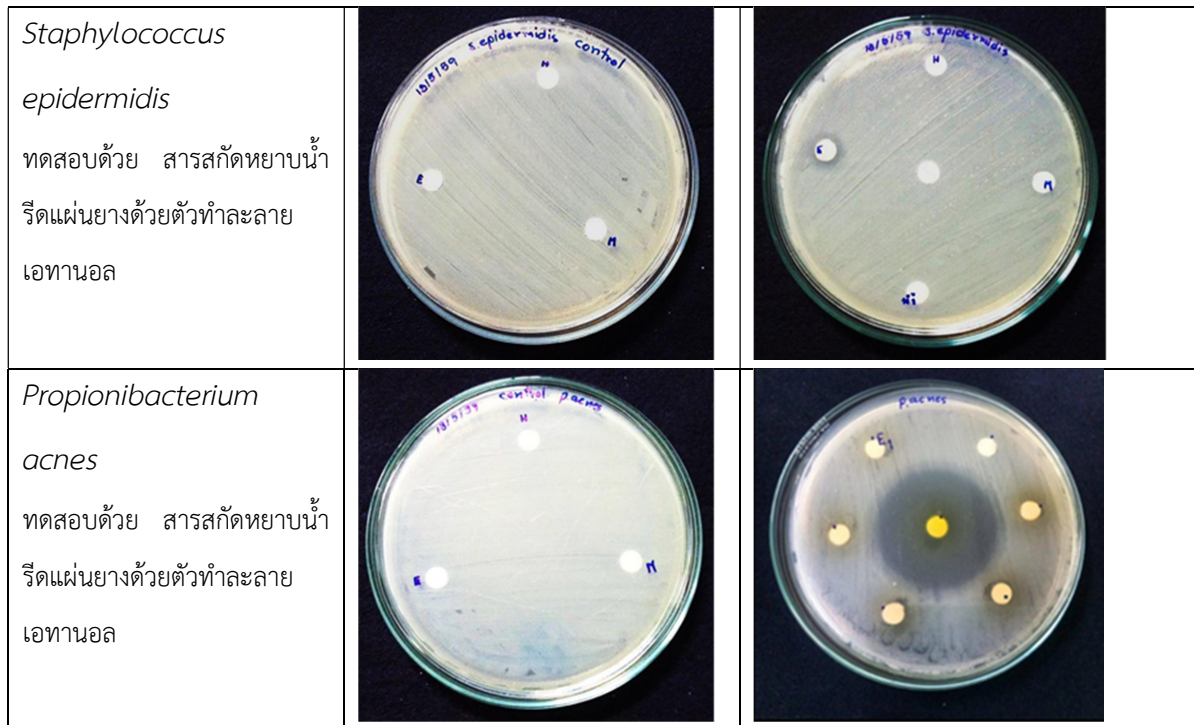
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย ของสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา และ สารสกัดหยาบน้ำรีด
แผ่นยาง ด้วยเทคนิค Ager disc diffusion method

ชนิดแบคทีเรีย	Clear zone (mm)							
	Streptomycin (20 µg/ml)	H	EA	M	HC	EAC	MC	MCC
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	7.33 ± 0.33 c	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	11.67 ± 0.33 a	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	6.67 ± 0.33 d	12.00 ± 0.00 a	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	8.00 ± 0.00 b	-	20.00± 0.58 a
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-	-	-	9.00 ± 0.58 b	-	7.00 ± 0.15 c
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	-	-	-	-		-	10.00± 0.47b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± S.E. (n = 3) - คือ ไม่เกิดการยับยั้ง
 HC คือ สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ; H คือ เฮกเซน
 EAC คือ สารสกัดหยาบชั้นเอธิลอะซีเตท ; EA คือ เอธิลอะซีเตท
 MC คือ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล ; M คือ 95 % เมทานอล
 MCC คือ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลของน้ำรีดยางแผ่น

<i>Escherichia coli</i> (แบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง)	
<i>Proteus vulgaris</i> (แบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง)	
<i>Bacillus cereus</i> (แบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง)	

<i>Staphylococcus aureus</i> (แบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (แบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว)	
<i>Propionibacterium acnes</i> (แบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว)	
<i>Staphylococcus aureus</i> ทดสอบด้วย สารสกัดหยาบน้ำ รีดแผ่นยางด้วยตัวทำละลาย เอทานอล	



ภาพที่ 33 การยับยั้งแบคทีเรียของสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา และ สารสกัดหยาบน้ำรีดแผ่นยางด้วยเทคนิค

Ager disc diffusion method

หมายเหตุ

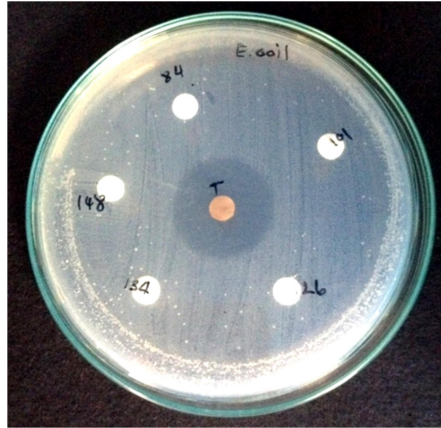
1. Negative control คือ ตัวทำละลายชนิดต่างๆ
2. Positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Streptomycin ความเข้มข้น 20 µg/ml
3. H คือ สารสกัดหยาบเฮกเซน (HC)
4. E คือ สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตรต (EAC)
5. M คือ สารสกัดหยาบเมทานอล (MC)
6. MCC* คือ สารสกัดหยาบน้ำรีดแผ่นยาง (MCC*)
7. แบคทีเรียที่ใช้ มีปริมาณเซลล์ $10^6 - 10^7$ CFUs/ml โดยเทียบจากความขุ่นมาตรฐานของ McFarland Standards No. 0.5
8. เส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc ขนาด มิลลิเมตร 6

ผลการวิจัย พบว่า สาร L-quebrachitol และ สารสกัดหยาบจากน้ำรีดยางแผ่น สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิวได้เพียงกลุ่มเดียว โดยสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ *Propionibacterium acnes* และ *Staphylococcus epidermidis* ตามลำดับ สาร L-quebrachitol มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 18-7 mm และ สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 20-8 mm ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคผิวหนังของสาร L-quebrachitol แสดงฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่ายาปฏิชีวนะ Tetracyclin (10 µg/ml) ที่ใช้ในการทดสอบ สำหรับแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง สาร L-quebrachitol และ สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น ไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคดังกล่าวได้ ผลการวิจัย แสดงให้เห็น สาร L-quebrachitol จากซีรัมน้ำยางพารา และ สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น แสดงฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะเจาะจง (Narrow spectrum antibiotics) กับกลุ่มของแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว แสดงดัง ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 34 - ภาพที่ 39

ตารางที่ 14 ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง และ แบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิวโดยสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรัมน้ำยางพารา ทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion

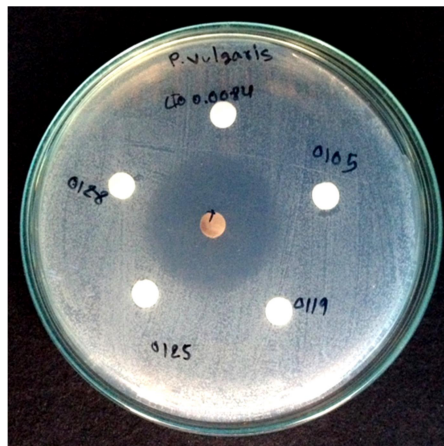
ชนิดแบคทีเรีย	ชุดควบคุม (น้ำกลั่น)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (Clear zone) (mm)/ น้ำหนักของสาร บริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรัมน้ำยางพารา ต่อแผ่น paper disc	
		สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรัมน้ำยางพารา (0.0127 g)	Tetracyclin (10 µg/ml)
<i>Escherichia coli</i>	-	เกิดวงใสกว้าง แสดงผลการยับยั้งร่วมกัน	23.0 ± 0.15
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	28.7 ± 0.15
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	23.5 ± 0.15
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	17.8.0 ± 0.45	29.5 ± 0.27
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	7.4 ± 0.21	24.4 ± 0.35
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	9.6 ± 0.21	27.0 ± 0.12

หมายเหตุ - คือ ไม่เกิดการยับยั้ง ค่าเฉลี่ย ± S.E. (n = 3)



ภาพที่ 34 ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง *Escherichia coli* โดยสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ที่น้ำหนักของ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็น ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ แบคทีเรียที่ใช้ มีปริมาณเซลล์ 10^6 CFUs/ml โดยเทียบจากความขุ่นมาตรฐานของ McFarland Standards No. 0.5 เส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc ขนาด 6 มิลลิเมตร; Negative control คือ ตัวทำลายละยชนิดต่างๆ ; Positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Tetracycline ความเข้มข้น 20 μ g/ml

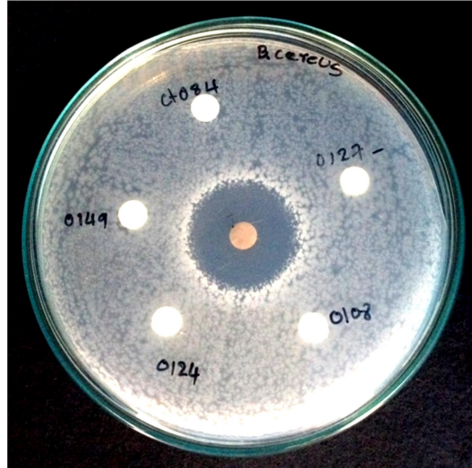


ภาพที่ 35 ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง *Proteus vulgaris* โดยสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ที่น้ำหนักของสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็น ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ แบคทีเรียที่ใช้ มีปริมาณเซลล์ 10^6 CFUs/ml โดยเทียบจากความขุ่นมาตรฐานของ McFarland Standards

No. 0.5 เส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc ขนาด 6 มิลลิเมตร ; Negative control คือ ตัวทำลายละยชนิด

ต่างๆ ; Positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Tetracycline ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 36 ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง *Bacillus cereus* โดยสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ที่น้ำหนักของสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar

บ่ม

ที่อุณหภูมิ 37°C เป็น ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

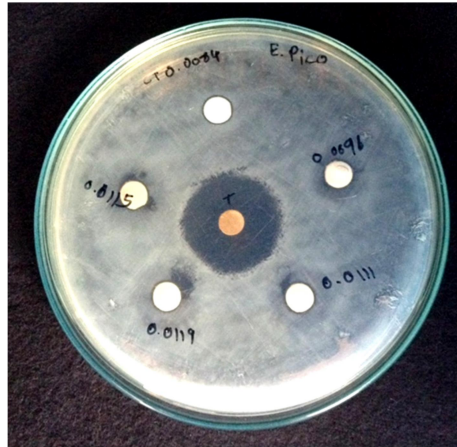
หมายเหตุ แบคทีเรียที่ใช้ มีปริมาณเซลล์ 106 CFUs/ml โดยเทียบจากความขุ่นมาตรฐานของ McFarland Standards No. 0.5 เส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc ขนาด 6 มิลลิเมตร; Negative control คือ ตัวทำลายละยชนิดต่างๆ; Positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Tetracycline ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่37 ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว *Staphylococcus aureus* โดยสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ที่น้ำหนัก ของ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

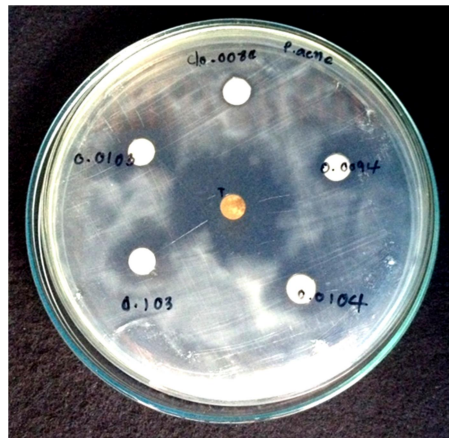
หมายเหตุ แบคทีเรียที่ใช้ มีปริมาณเซลล์ 10⁶ CFUs/ml โดยเทียบจากความขุ่นมาตรฐานของ McFarland Standards

No. 0.5 เส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc ขนาด 6 มิลลิเมตร; Negative control คือ ตัวทำลายชนิดต่างๆ; Positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Tetracycline ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 38 ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว *Staphylococcus epidermidis* โดยสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ที่ น้ำหนักของ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ แบคทีเรียที่ใช้ มีปริมาณเซลล์ 10^6 CFUs/ml โดยเทียบจากความขุ่นมาตรฐานของ McFarland Standards No. 0.5 เส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc ขนาด 6 มิลลิเมตร ; Negative control คือ ตัวทำลายชนิดต่างๆ ; Positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Tetracycline ความเข้มข้น 20 $\mu\text{g/ml}$



ภาพที่ 39 ผลการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว *Propionibacterium acnes* โดยสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ที่ น้ำหนักของ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol แตกต่างกัน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็น ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ แบคทีเรียที่ใช้ มีปริมาณเซลล์ 10^6 CFUs/ml โดยเทียบจากความขุ่นมาตรฐานของ McFarland Standards No. 0.5 เส้นผ่านศูนย์กลางของ paper disc ขนาด 6 มิลลิเมตร; Negative control คือ ตัวทำลายชนิด

ต่างๆ ; Positive control คือ ยาปฏิชีวนะ Tetracycline ความเข้มข้น 20 µg/ml

8. ผลทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดซีรัมน้ำยางพาราด้วยวิธี Scavenging activity of ABTS radical

ABTS radical cation (ABTS^{•+}) เป็นสารอนุมูลอิสระกึ่งสังเคราะห์ ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในการวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันวิธีหนึ่ง เมื่อนำสาร ABTS ผสมกับสาร Potassium persulfate (K₂S₂O₈) จะกลายเป็นสีน้ำเงินอมเขียว และ เมื่อได้รับ Hydrogen atom จากสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบ จะทำให้ ABTS^{•+} ลดลง ซึ่งทำให้สีจางลง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 nm เมื่อนำสารสกัดซีรัมน้ำยางพาราในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน (Hexane, EtOAc และ MeOH) ที่ความเข้มข้น 1% มาทำปฏิกิริยากับสารละลายของ ABTS^{•+} radical พบว่า สารสกัดซีรัมน้ำยางพาราในตัวทำละลาย EtOAc สามารถยับยั้ง ABTS^{•+} radical ได้ดีที่สุด เท่ากับ 39.99 % รองลงมาคือ สารสกัดหยาดน้ำรีดแผ่นยาง สามารถยับยั้ง ABTS^{•+} radical ได้ดีที่สุด เท่ากับ 37.58 % สารสกัดซีรัมน้ำยางพาราในตัวทำละลาย MeOH สามารถยับยั้ง ABTS^{•+} radical ได้เท่ากับ 16.06 % และ สุดท้าย คือ สารสกัดน้ำยางพาราในตัวทำละลาย Hexane สามารถยับยั้ง ABTS^{•+} radical ได้เท่ากับ 0.39 % แสดงดัง ตารางที่ 15

ตารางที่ 15ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาดซีรัมน้ำยางพารา ด้วยวิธี Scavenging activity of ABTS radical แสดงค่า% Inhibition ของสารสกัดหยาด

ชนิดตัวทำละลาย (700 ppm)	% Inhibition
HC	0.399 ± 0.34c
EAC	39.900 ± 1.58a
MC	16.067 ± 0.96b
MCC	37.580 ± 1.38a

หมายเหตุ

HC คือ สารสกัดหยาดชั้นเฮกเซน

EAC คือ สารสกัดหยาดชั้นเอธิลอะซีเตท

MC คือ สารสกัดหยาดชั้นเมทานอล

MCC คือ สารสกัดหยาดชั้นเมทานอลของน้ำรีดยางแผ่น

เมื่อนำสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา ที่ความเข้มข้น 1 % มาทำปฏิกิริยากับ สารละลายของ ABTS+• radical พบว่า สามารถยับยั้ง ABTS+• radical ได้ดีที่สุด เท่ากับ 57.23 % ผลการวิจัยที่ได้ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพาราแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้สูงกว่า สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา ผลการวิจัยแสดงดัง ตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ด้วยวิธี Scavenging activity of ABTS radical แสดงค่า% Inhibition ของสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol

ความเข้มข้นของ L-quebrachitol (ppm)	% Inhibition ของ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา
50	8.33 ± 0.69
250	27.84 ± 0.73
500	47.04 ± 1.38
700	57.23 ± 1.42

9. การทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ (Stability test by cool and heating test)

จากสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ซีรุ่มน้ำยางพารา ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุสิว และ แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี นำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับบำรุงผิวหน้าชนิดเจล พบว่า ผลิตภัณฑ์ต้นแบบสำหรับบำรุงผิวหน้าเจลซีรุ่มน้ำยางพารา มีลักษณะทางกายภาพทั้งก่อน และ หลัง การทดสอบความคงตัว ลักษณะเป็นเนื้อเจล มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เจลบำรุงผิวหน้าซีรุ่มน้ำยางพารา ก่อน และ หลังการทดสอบความคงตัว

ผลิตภัณฑ์	ลักษณะเนื้อเจล	สี	ความเป็น กรด-ด่าง
เจลซีรุ่มน้ำยางพารา ก่อนทดสอบ	ใส	เขียวใส	7.0
เจลซีรุ่มน้ำยางพารา หลังทดสอบ	ใส เหลวลงเล็กน้อย	เขียวใส	7.0

10. การนำไปใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์

จากผลการทดสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ต้นแบบเจลซีรัมน้ำยางพาราที่มีส่วนผสมของ L-quebrachitol 10 % โดยการทำให้ heating and cooling มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพ เพียงเล็กน้อย โดยผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหน้า เจลซีรัมน้ำยางพารา มีลักษณะเหลวลงเล็กน้อย ซีวภัณฑ์ดังกล่าว มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราบนผิวหนังแผ่นดิบ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จึงสามารถนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ ต้นแบบ ได้ 4 ชนิด ได้แก่

- 1) ซีวภัณฑ์สำหรับผิวหน้ารูปแบบเจล ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย (Anti-acne and Anti-ageing Gel)
 - 2) สบู่สำหรับผิวหน้าที่มีส่วนผสมของ L-quebrachitol สำหรับยับยั้งการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย (Anti-anes and Anti-ageing Transparent Soup)
 - 3) สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สำหรับชุบแผ่นยางดิบ เพื่อลดการเจริญของเชื้อราบนผิวหนังแผ่น
 - 4) สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล สำหรับชุบแผ่นยางดิบ เพื่อลดการเจริญของเชื้อราบนผิวหนังแผ่น
- ต้นแบบผลิตภัณฑ์ ทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว แสดงดัง ภาพที่ 40 – ภาพที่ 43



ภาพที่ 40 เจลซีรัมน้ำยางพารา ที่มีส่วนผสมของ L-quebrachitol 10 % แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย (Anti-acne and Anti-ageing Gel)



ภาพที่ 41 สบู่สำหรับผิวหนังซีรั่มน้ำยาฟารา ที่มีส่วนผสมของ L-quebrachitol 10 % แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิด
สิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย (Anti-acne and Anti-ageing Transparent Soap Bar)



ภาพที่ 42 สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา สำหรับชุบแผ่นยางดิบเพื่อลดการเจริญของเชื้อรา
บนแผ่นยางแผ่น ที่ความเข้มข้น 10 ppm, 20 ppm และ 40 ppm ตามลำดับ



ภาพที่ 43 สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลจากซีรุ่มน้ำยางพารา สำหรับชุบแผ่นยางดิบเพื่อลดการเจริญของเชื้อรา
บนแผ่นยางแผ่น ที่ความเข้มข้น 10 ppm และ 20 ppm ตามลำดับ

11. ศึกษาการเพิ่มมูลค่าของน้ำยางพาราสดในเชิงพาณิชย์

จากงานวิจัยการประยุกต์ใช้ซีรัมน้ำยางพาราให้เกิดประโยชน์สามารถแยก L-quebrachitol ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive agents) ที่สกัดจากซีรัมน้ำยางพารา L-quebrachitol เป็นสารบริสุทธิ์ที่มีค่าราคาสูง และสามารถนำไปใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ ได้หลายแบบ คณะผู้วิจัยได้นำสารบริสุทธิ์ ดังกล่าว พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหน้าเจลยับยั้งการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย สารเคลือบยางแผ่นสำหรับยับยั้งเชื้อราบนยางแผ่น และ เมื่อคำนวณต้นทุนการผลิต L-quebrachitol จากน้ำยางพาราสด (ภาคผนวก ง) พบว่า

การแยก L-quebrachitol จากน้ำยางพาราสด คิดต้นทุนได้ L-quebrachitol 19.29 กรัม คิดเป็น 167 บาท ต่อ กรัม และ การแยก L-quebrachitol จากน้ำรีดยางแผ่นที่ได้จากกระบวนการรีดยางแผ่นได้

L-quebrachitol 22.63 กรัม คิดเป็น 78 บาทต่อกรัม เมื่อเทียบจากราคา D-pinitol ที่เป็นอินแทนทิโอเมอร์โมเลกุลของ L-quebrachitol ทางการค้าจาก <http://www.sigmaaldrich.com> พบว่า ที่ โดย D-pinitol 0.5 กรัม ราคา 1,725 บาท ($69 \text{ SGD} \times 25.01 \text{ บาท}$) เมื่อเทียบกันแล้วเห็นได้ว่า L-quebrachitol จากน้ำยางพารามีราคาที่ถูกลงกว่าถึง 44 เท่า จึงอาจนำไปเพิ่มมูลค่าให้แก่เกษตรกรการยางพาราในการพัฒนาเป็นเจลซีรัมน้ำยางพาราในเชิงพาณิชย์ต่อไป

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากศึกษาการแยกเชื้อราบนเปื้อนบนยางแผ่นผึ่งแห้ง และ ยางก้อนถ้วย สามารถแยกเชื้อรา ได้ทั้งหมด 47 ไอโซเลท จำแนกเชื้อรา ได้ทั้งหมด 5 จินัส คือ *Aspergillus* sp. (31.91 %), *Penicillium* sp. (21.27 %), *Fusarium* sp. (8.51 %) *Geotrichum* sp. (4.25 %) และ *Trichoderma* sp. (34.04 %) ดังนั้น การศึกษาขั้นต่อไปได้มีการนำเชื้อราทั้ง 5 จินัส ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราที่เจริญบนแผ่นยางโดยสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา สารสกัดหยาบจากน้ำรีดแผ่นยาง และ สารบริสุทธิ์จากซีรุ่มน้ำยางพารา

ในการสกัดและแยกสารจากซีรุ่มน้ำยางพารา พบว่า สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน และ ชั้นเอทิลอะซิเตท มีปริมาณสารน้อย คณะผู้วิจัย จึงทำการแยกสารอินทรีย์จากสารสกัดหยาบชั้นเมทานอล ซึ่งมีปริมาณสารมาก และเพียงพอสำหรับแยกสารให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิคการตกผลึก และ โครมาโทกราฟี รวมทั้ง การยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR โดยพบ ^1H NMR (400 MHz, Deuterium Oxide) δ 4.79 (s, 5H), 4.26 (t, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.05 (t, $J = 3.7$ Hz, 1H), 3.78 – 3.69 (m, 1H), 3.67 – 3.54 (m, 2H), 3.44 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H), 3.42 – 3.36 (m, 1H) และ ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O) δ 80.11, 72.79, 71.88, 71.32, 70.32, 67.10, 56.88 ให้ผลตรงกับงานวิจัยของ Diaz Martina และ คณะ (2008) ดังนั้น สามารถแยกสาร L-quebrachitol จากน้ำยางพาราสด และ สาร L-quebrachitol จากน้ำรีดยางแผ่น ได้ปริมาณสาร เท่ากับ 19.2935 และ 22.6306 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.054 และ 0.036 เมื่อเทียบกับน้ำยางพาราสด และ น้ำรีดแผ่นยาง ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่า สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา สารสกัดหยาบน้ำรีดแผ่นยาง และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิวได้ทุกชนิด มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 0.7-2.5 cm และ สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง ได้เพียงชนิดเดียว ได้แก่ *Escherichia coli* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 0.9-2.0 cm งานวิจัยนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jankangram (2013) มีการศึกษาการใช้ซีรุ่มน้ำยางพาราในการยับยั้ง *Escherichia coli* มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส 1.04 cm จากการใช้ตัวทำละลาย เอทานอล ในการสกัดซีรุ่มน้ำยางพารา

เมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อราที่เจริญบนยางแผ่นผึ่งแห้ง โดยใช้สารสกัดหยาบซีรึมน้ำยางพารา สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol พบว่า สารสกัดหยาบซีรึมน้ำยางพารา และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สามารถยับยั้งเชื้อราบนแป้นบนยางแผ่น จีแนส *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ด้วยวิธี Agar disc diffusion ได้ดีที่สุด ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส เท่ากับ 1.8-3.8 cm และ ค่า MICs 0.312-2.50 mg/ml รองลงมา ได้แก่ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล และ สารสกัดหยาบชั้นเฮกเซน ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส และ MICs เท่ากับ 1.7-2.7 cm และ 0.312-1.25 mg/ml สารสกัดหยาบ ทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าว สามารถยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* sp. และ *Geotrichum* sp. ได้ดีที่สุด ลำดับสุดท้าย ได้แก่ สารสกัดหยาบเฮกเซน สามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Geotrichum* sp. ได้ดีที่สุด แสดงค่าวงใส เท่ากับ 1.0-1.7 cm และ MICs เท่ากับ 1.25-5.00 mg/ml ตามลำดับ คณะผู้วิจัย จึงคัดเลือก สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ทดสอบการยับยั้งเชื้อราบนยางแผ่นผึ่งแห้ง ลำดับต่อไป

สำหรับการทดสอบการยับยั้งเชื้อราบนยางแผ่นผึ่งแห้ง พบว่า สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สามารถยับยั้งเชื้อราบนแป้นบนยางแผ่น จีแนส *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ได้ โดย สาร L-quebrachitol ความเข้มข้น 20 ppm สามารถยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้เพียงชนิดเดียว แสดงผล การยับยั้ง 45 % และ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. บนยางแผ่นได้ และ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล ความเข้มข้น 20 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้เพียงชนิดเดียว แสดงผลการยับยั้ง ได้ดีที่สุด เท่ากับ 20 % ตามลำดับ สารสกัดซีรึมน้ำยางพาราทั้ง 2 ชนิด ภายหลังจากเคลือบบนยางแผ่น สามารถขลอ และ ลดการปนเปื้อนของเชื้อรา ได้ระยะเวลา นาน 2 เดือน เนื่องจาก ซีรึมน้ำยางพารา และ สารสกัดหยาบเมทานอล มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางกลุ่ม เช่น เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อรา และ สารต้านเชื้อรา (Antifungal) บางชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ดังเช่นในงานวิจัยของ Phattara-orn *et al.* (2016) ได้อธิบาย กลไกการยับยั้งเชื้อราของซีรึมน้ำยางพารา พบว่า ซีรึมน้ำยางพาราประกอบด้วย เอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ β -1,3-glucanase, chitinase และ lectinase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ สามารถทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราได้ ประกอบกับ สารสกัดต่างชนิด แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราชนิดที่ต่างกัน อาจเนื่องมาจาก ชนิดของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Type of bioactive compound) และ กลไกการออกฤทธิ์ของสารชีวภาพ (Mechanism of bioactive compound) ต่อเชื้อราทดสอบทั้งสองจีแนสแตกต่างกัน จึงแสดงผลการยับยั้งแตกต่างกัน งานวิจัยนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ สายสมร และ พงษ์รินทร์ (2559) ศึกษาชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนยางแผ่น พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรต่างชนิดกัน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราทดสอบแตกต่างกัน เนื่องจาก กลไกการออกฤทธิ์

และ ชนิดของสารชีวภาพที่ได้จากสมุนไพรต่างชนิด มีคุณสมบัติแตกต่างกัน สมุนไพรทดสอบ ชนิดที่ดีที่สุด คือ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย เมื่อนำไปเคลือบบนยางแผ่น ความเข้มข้น 100,000 ppm สามารถขลอและลดการเกิดเชื้อรา *Aspergillus* sp. ไอโซเลท T 2 ได้ระยะเวลา 28 วัน เมื่อเทียบผลการวิจัย ดังกล่าว กับ งานวิจัยชิ้นนี้ สารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สามารถใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่า (20 ppm) น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย ถึง 5,000 เท่า และสามารถยับยั้งเชื้อรากลุ่มหลัก ที่พบปนเปื้อนบนยางแผ่นจี้นัส *Aspergillus* sp. กับ *Penicillium* sp. ได้

ผลการศึกษาสมบัติทางกายภาพของยางแผ่นหลังจากเคลือบด้วยสารสกัดซีรัมน้ำยางพารา พบว่า ในชุดควบคุมซึ่งถูกเคลือบด้วยน้ำปราศจากไอออน (DI) มีการลดลงของค่าความทนแรงดึงสูงสุด และ ค่าความหนาแน่น เมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งสาเหตุเกิดจาก มีเชื้อราเกิดขึ้นบนแผ่นยางตามธรรมชาติ ส่งผลให้มีการลดลงของค่าความทนแรงดึงสูงสุด และ ค่าความหนาแน่นในชุดที่มีการเคลือบด้วยสารสกัดซีรัมน้ำยางพาราด้วย หากพิจารณา สารสกัด L-quebrachitol ความเข้มข้น 20 ppm ซึ่งมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรามากที่สุดในกลุ่ม จะเห็นได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไป 90 วัน มีค่าความทนแรงดึงสูงสุด และ ค่าความหนาแน่น ลดลง $19.47 \pm 13.8 \%$ และ $0.12 \pm 0.01 \%$ ตามลำดับ ดังภาพที่ 39-40 ดังนั้น การเคลือบแผ่นยางด้วยสารสกัดซีรัมน้ำยางพาราด้วยสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ส่งผลให้ความทนแรงดึงสูงสุด และ ความหนาแน่นมีค่าลดลงน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรัมน้ำยางพารา พบว่า สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรัมน้ำยางพารา สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น สารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา สามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 57.23 % รองลงมา คือ สารสกัดส่วนเมทานอล สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น สารสกัดหยาบส่วนเอทิลอะซิเตท และ สารสกัดส่วนเฮกเซน ตามลำดับ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% Inhibition) เท่ากับ 39.90 %, 37.58 %, 16.06 % และ 0.39 % ตามลำดับ เพราะฉะนั้น สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรัมน้ำยางพารา สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น และ สารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพาราชั้นเมทานอล จึงเป็นสารสกัดที่น่าสนใจ ควรนำมา พัฒนาต้นแบบชีวภัณฑ์สำหรับใช้ประโยชน์ในลำดับต่อไป งานวิจัยนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ วณิชณี (2552) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระในซีรัมน้ำยางพารา เมื่อ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค DPPH พบว่า สารสกัดหยาบซีรัมน้ำยางพารา ประกอบด้วย สารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูง 47.58 % ซึ่งเป็นไปได้ว่า ควรนำไปพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ต่อไป

การทดลองครั้งนี้ ถือว่า ประสบผลสำเร็จตามที่คาดหวังไว้ สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำย่างพารา สารสกัดหยาบน้ำริดยางแผ่น และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium acnes* ได้ทุกชนิด และแบคทีเรียสาเหตุโรคท้องร่วง บางชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* ได้ นอกจากนี้ ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเชื้อราบนผิวหนังแผ่น และ ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติเชิงฟิสิกส์ของแผ่นยางหลังเคลือบด้วยสารสกัดดังกล่าว

ดังนั้น จากฤทธิ์ทางชีวภาพ (Biological activity) ที่กล่าวมาข้างต้น ของสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำย่างพารา สารสกัดหยาบจากน้ำริดยางแผ่น และ สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำย่างพาราชั้นเมทานอล คณะผู้วิจัยจึงนำมาพัฒนาเป็นต้นแบบผลิตภัณฑ์ 4 ชนิด เพื่อสามารถต่อยอดในเชิงพาณิชย์ ได้แก่

1. เจลซีรุ่มน้ำย่างพาราสำหรับผิวหนังเพื่อลดการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย ที่มีส่วนผสมของสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol (Anti-acnes and Anti-ageing gel)
2. สบู่ซีรุ่มน้ำย่างพาราสำหรับผิวหนัง เพื่อลดการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย ที่มีส่วนผสมของสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol (Anti-acnes and Anti-ageing soap bar)
3. ชีวภัณฑ์ชุบแผ่นยางดิบ เพื่อป้องกันเชื้อราบนแผ่นยางจากสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำย่างพารา
4. ชีวภัณฑ์ชุบแผ่นยางดิบ เพื่อป้องกันเชื้อราบนแผ่นยางสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำย่างพาราชั้นเมทานอล

ชีวภัณฑ์ต้นแบบทั้ง 4 ชนิด สามารถนำไปใช้งานได้จริง ในการทดสอบเบื้องต้น โดยเจลซีรุ่มน้ำย่างพาราสำหรับผิวหนัง ที่มีส่วนผสมของสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สามารถคงตัวอยู่ในอุณหภูมิสูง 45°C โดยลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และ ชีวภัณฑ์สำหรับชุบแผ่นยางดิบ จากสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราจากอากาศ สามารถนำไปชุบยางแผ่น เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อรา เมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 2 เดือน ชีวภัณฑ์ที่ได้จากผลงานวิจัย ทั้งหมด 4 ชนิดนี้สามารถนำไปต่อยอดเพื่อผลิตเชิงพาณิชย์ได้

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเชื้อราปนเปื้อนในยางแผ่นผึ่งแห้ง และ ยางก้อนถ้วย พบว่า เชื้อราที่แยกได้จากยางแผ่นผึ่งแห้ง และ ยางก้อนถ้วย มี จำนวน 47 ไอโซเลท สามารถแยกเชื้อรา ได้ 5 จินัส คือ *Aspergillus* sp. (31.91 %) *Penicillium* sp. (21.27 %), *Fusarium* sp. (8.51 %), *Geotrichum* sp. (4.25 %) และ *Trichoderma* sp. (34.04 %)

การสกัด แยก และ พิสูจน์เอกลักษณ์ สารจากน้ำยางพารา สามารถแยกสาร L-quebrachitol ได้ 19.2935 g คิดเป็นร้อยละ 18.59 (เมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบเมทานอล) หรือ ร้อยละ 0.054 (เมื่อเทียบกับน้ำยางพาราสด) และ ในการแยก L-quebrachitol จากน้ำทิ้งในกระบวนการรีดยางแผ่น พบ L-quebrachitol 22.6306 กรัม คิดเป็นร้อยละ 0.036 เมื่อเทียบกับน้ำยางพาราสด

จากนั้น ศึกษาการยับยั้งเชื้อราปนเปื้อนบนยางแผ่นผึ่งแห้งด้วยสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol พบว่า สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพาราชั้นเมทานอล สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพาราชั้นเฮกเซน และ L-quebrachitol สามารถยับยั้งเชื้อราปนเปื้อนแผ่นยางดิบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อได้ จากนั้น เมื่อนำสารสกัดดังกล่าว เคลือบบนยางแผ่น พบว่า สาร L-quebrachitol ความเข้มข้น 20 ppm สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อราในอากาศ จินัส *Penicillium* sp. ได้เพียงชนิดเดียว สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้ 45 % และ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล ความเข้มข้น 20 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้เพียงชนิดเดียว โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง เท่ากับ 20 % ตามลำดับ สารสกัดซีรุ่มน้ำยางพารา ทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าว สามารถยับยั้งเชื้อราปนเปื้อนยางแผ่น กลุ่มหลัก ได้แก่ *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ได้ระยะเวลานาน 2 เดือน เมื่อใช้ในความเข้มข้นต่ำ (20 ppm)

การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา ในการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* และ แบคทีเรียก่อโรคท้องร่วง ได้แก่ *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* และ *Bacillus cereus* พบว่า สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพาราชั้นเอทิลอะซิเตท สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดได้ สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิวได้ทุกชนิด (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Propionibacterium acnes*), และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สามารถยับยั้ง

แบคทีเรียก่อโรคท้องร่วง *Escherichia coli* ได้ดี รวมถึง การศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระของซีรุ่มน้ำยางพารา พบว่า สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา และ สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น สามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ โดยสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 57.23 % รองลงมา คือ สารสกัดส่วนเอทิลอะซีเตท สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น สารสกัดหยาบส่วนเมทานอล และ สารสกัดหยาบส่วน เฮกเซน ตามลำดับ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% Inhibition) เท่ากับ 39.90 %, 37.58 %, 16.06 % และ 0.39 % ตามลำดับ

ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา สารสกัดหยาบน้ำรีดยางแผ่น และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol มาใช้เป็นสารเคลือบยางแผ่น เพื่อป้องกันเชื้อราบนแป้นบนยางแผ่นที่มาจากอากาศ โดยสารเคลือบยางแผ่นยาง ไม่ส่งผลกระทบต่อสมบัติเชิงกลของค่าความทนแรงดึงสูงสุด และ ค่าความหนาแน่นของแผ่นยางดิบ อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ผลของสารสกัดหยาบซีรุ่มน้ำยางพารา และ สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol ต่อสมบัติของ ยางแผ่นรมควัน (Smoked sheets) ยางคอมปาวด์ และ ยางวัลคาไนซ์ เพื่อสามารถประยุกต์ใช้ สารสกัดซีรุ่มน้ำยางพารา ดังกล่าว กับยางชนิดต่างๆในลำดับต่อไป

จากผลการวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่า สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากซีรุ่มน้ำยางพารา มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียสาเหตุของการเกิดสิว (Anti-acne bacterial activities) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) และ ฤทธิ์ต้านเชื้อราบนแป้นยางแผ่น (Antifungal activity) ดีที่สุด สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สามารถพัฒนาเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหน้าต่อไปในอนาคต เพื่อลดการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย และ สารเคลือบยางแผ่น จากสารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สามารถต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์สำหรับเคลือบยางแผ่นเพื่อป้องกันเชื้อรา ระยะเวลา นาน 2 เดือน และ สารเคลือบแผ่นยางซีรุ่มน้ำยางพารา สามารถนำไปใช้งานได้จริง

การใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol เป็นสารที่น่าสนใจ ควรนำมาพัฒนาต้นแบบชีวภัณฑ์ โดยนำมาผลิต เจลสำหรับผิวหน้า และ สบู่สำหรับผิวหน้า ซีรุ่มน้ำยางพารา ที่มีส่วนผสมของ L-quebrachitol สำหรับลดการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย เนื่องจาก สามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุการเกิดสิว จินัส *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Propionibacterium acnes* ได้ โดยเจลซีรุ่มน้ำยางพารา สำหรับผิวหน้า มีความคงตัวต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง จึงนำไปใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรมได้

การใช้ประโยชน์ทางการเกษตร คณะผู้วิจัยได้นำซีรัมน้ำยางพารา มาผลิตเป็นชีวภัณฑ์สำหรับชุบยางแผ่น เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อรา โดย สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้ 45 % และ สารสกัดหยาบชั้นเมทานอล สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ได้ 20 % ดังนั้น คณะผู้วิจัย จึงเห็นว่า ในการผลิตซีรัมน้ำยางพาราผลิตเป็นชีวภัณฑ์สำหรับชุบแผ่นยางควรใช้สารสกัดหยาบชั้นเมทานอลเป็นสารตั้งต้น เนื่องจาก สามารถสกัดได้ง่าย และมีสาร L-quebrachitol อยู่

การเพิ่มมูลค่าของน้ำยางพาราในเชิงพาณิชย์ คณะผู้วิจัย สามารถแยก สารบริสุทธิ์ L-quebrachitol จากน้ำยางพาราสด และ น้ำรีดยางแผ่น โดย L-quebrachitol มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรีย ยับยั้งเชื้อรา ยับยั้งเซลล์มะเร็ง เป็นสารทดแทนน้ำตาลสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน โดยต้นทุนการแยกสาร L-quebrachitol ถูกกว่าราคา L-quebrachitol ที่มีขายตามท้องตลาดถึง 44 เท่า

จากงานวิจัยนี้ สามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้ปลูกยางพารา กลุ่มเกษตรกร สามารถนำน้ำรีดยางแผ่นที่ทิ้งจากกระบวนการรีดยาง มาเพิ่มมูลค่า โดยการแยก L-quebrachitol ที่มีกระบวนการที่ไม่ยุ่งยาก จากงานวิจัย และ เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มรายได้แก่เกษตรกรชาวสวนยางพารา

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา วรราชกูร์ ฤกษ์ณ สงวนพวก ผ่องเพ็ญ จิตอารีญรัตน์ เฉลิมชัย วงษ์ยารี และ มัณฑนา บัวหนอง.
(2555). ประสิทธิภาพการใช้น้ำมันหอมระเหยในการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ที่ได้จากสารละลายยักแฉกกันของกุหลาบตัด
ดอก. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 43 (พิเศษ) ; 523-527.

กิตติกานต์ ฤกษ์. (2551). ความเป็นไปได้ในการใช้สารเคมียับยั้งการเจริญของราบนยางแผ่นดิบ บทคัดย่อ
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เกษร เทพแปง. (2550). รู้จักกับเชื้ออีโคไล *Escherichia coli* นักวิชาการแรงงานชำนาญการ สำนักความ
ปลอดภัยแรงงานคณาจารย์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2544). คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. เอกสารประกอบการสอนคณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 134 น.

จิตต์ลัดดา ศักดาภิพาณิชย์. (2550). การพัฒนาวิธีการแยกและเพิ่มมูลค่าสาร L-Quebrachitol คุณภาพสูงจาก
น้ำยางธรรมชาติ บทคัดย่อ มหาวิทยาลัยมหิดล

ชลธิชา บุรณะ สุชาติพิทย์ แสงสว่าง อมรัตน์ ศิริชัย. (2556). ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบสมุนไพรต่อการยับยั้ง
เชื้อ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* บทคัดย่อวิทยานิพนธ์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ต่อสู โตรักษา. (2536). โรงอบรมยาง. วารสารข่าวสวนยาง 122: 28-31.

ทัศนีย์ ปัญจนาท กันทิมา ชูแสง และ ชีรกุล อาภรณ์สุวรรณ. (2548). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดผลอย.
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 21-24 น.

นลิน วงศ์ขัตติยะ และ ศรีกาญจนา คล้ายเรือง. (2552). คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์.
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 124 น.

บุหรัน พันธุ์สุวรรณ. (2556). อนุมูลอิสระ สารด้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ วารสาร
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 21 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม - กันยายน

ประภัสสร อักษรพันธ์ วีระพร ศุทธากรณ์ และ วราภรณ์ เลิศพูนวิไลกุล. (2555). ปัจจัยคุกคามสุขภาพจากการ
ทำงาน และ ภาวะสุขภาพตามความเสี่ยงของแรงงานโรงงานยางแผ่นรมควัน. วารสารพยาบาล 39: 26-37.

พงษ์สวัสดิ์ เปรมเพชร คมกฤต เล็กสกุล ธวัชชัย ศรีริน และ พชรินทร์ ชุ่มแก้ว. (2555). การวิเคราะห์การเกิดเชื้อ
ราและการประเมินการปล่อยก๊าซเรือนกระจก ในกระบวนการรมควันยางพารา สาขาวิชาวิศวกรรมอุตสาหกรรม คณะ
วิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

รัชนี้ ไสยประจง สุรพงษ์ พินิจกลาง และ กนก รัตน์กนกชัย. (2552). การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะจำเพาะของ เอนไซม์ซีเอสเตอีน โปรตีนเอส จากผัก และ ผลไม้บางชนิด. วิทยานิพนธ์สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย.

วาริรัต หนูหตี. (2557). การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนพื้นผิวสัมผัสโดยใช้สารสกัดจากพืชตระกูลขิง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิชุดา จันทรข้างแรม. (2556). โปรตีนในน้ำยางพารา. คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. (2551). *Streptomyces* spp: แบคทีเรียคุณค่าสูงจากธรรมชาติ ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ และ หน่วยความร่วมมือการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ และ เทคโนโลยีชีวภาพ แห่ง มหาวิทยาลัยมหิดล และ มหาวิทยาลัยโอซาก้า (MU-OU: CRC) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ศิริประภา ลำภา. (2550). การทดสอบทางพิษเคมีและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืช. ปัญหา พิเศษสายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์ และ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร วชิรินทร์ รุณไชยศิริกุล. (2543). ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* ของสาร สกัดสมุนไพรไทยบางชนิด วิทยานิพนธ์คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สายสมร ลำลอง และ พงษ์นรินทร์ ยอดสิงห์. (2559). การใช้น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งการ เจริญของเชื้อราที่พบบนแผ่นยางพารา.วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 18 (1); 30-38.

อนันต์ สกฤตภูมิ. (2551). อนุมูลอิสระสารอันตรายต่อสุขภาพ และ ร่างกาย. บทความวิชาการสาขาวิชาเทคนิค การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.

Chandrasekaran, R., K. Sudha. and G. Sathishkumar. (2015). Antibacterial and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized using latex of *Calotropis gigantea* L. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **136**: 924–930.

Claudla, G. (2000). Degradation of Latex and of Natural Rubber by *Streptomyces* Strain La 7. *Systematic and Applied Microbiology* **23**: 433-441.

Díaz M, González A, Castro-Gamboa I, Gonzalez D, Rossini C. (2008) First record of L-quebrachitol in *Allophylus edulis* (Sapindaceae). *Carbohydrate Research* **343**: 2699-2700.

Giovanna D, P., M.B. O'Keeffe., A. Poyarkov. and G. Lomolino. (2014). Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica* L.-derived proteinase. *Food Chemistry* **156**: 305–311.

Kowiyou, Y., O.E. Hosam. and A.M. Eman. (2015). Antifungal, antibacterial and anticancer activities of *Ficus drupacea* L. stem bark extract and biologically active isolated compounds. *Industrial Crops and Products* **74**: 752–758.

Mady, A. I., N. H. Mohamed. and A. A .M. Shoreit. (2013). Degradation of *Ficus elastica* rubber latex by *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* and *Myceliophthora thermophile*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **78**: 82-88.

Phattara-orn, H., A. Bourchookarn., A. J. Kettermann. and C. Krittana. (2016). Comparative proteome analysis of rubber latex serum from pathogenic fungi tolerant and susceptible rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Journal of Proteomics* **131**: 82–92.

Shunsuke, I., K. Ichikawa., Y. Muramatsu., D. Kasai., E. Masai. and M. Fukuda. (2011). Isolation and characterization of *Streptomyces*, *Actinoplanes* and *Methylibium* strains that are involved in degradation of natural rubber and synthetic poly (cis-1,4-isoprene). *Enzyme and Microbial Technology* **49**: 526-531.

Zhiying, C., G. Li., C. Lin., T. Shi., L. Zhai., Y. Chen. and G. Huang. (2013). Identifying pathogenicity genes in the rubber tree anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides* through random insertional mutagenesis. *Microbiological Research* **168**: 340-350.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ และ วิธีการเตรียม

Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Distilled water	1000 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

Nutrient agar (NA)

Nutrient Broth

Agar	15 g
Distilled water	1000 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200 g
Dextrose	20 g
Agar	15 g
Distilled water	1000 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

Potato dextrose Broth (PDB)

Potato	200 g
Dextrose	20 g
Distilled water	1000 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

20% Sterile Tween 80

Tween 80	20 g
Distilled water	100 ml

ชั่ง Tween 80 20 กรัม เติมน้ำกลั่น 100 ml ผสมให้เข้ากันนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

การคำนวณหาปริมาณสารสกัด (% Yield Crude Extract)

วิธีการคำนวณ

จากสูตร Yield Crude Extract = $a/b \times 100 \%$

a = น้ำหนักสารที่สกัดได้ (กรัม)

b = ปริมาณเปลือกส้มที่ใช้ในการสกัด (กรัม)

ภาคผนวก ข

ชุดสีย้อมแกรม

ชุดสีย้อมแกรม (คณาจารย์จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2544)

1.1. Crystal violet solution

Crystal violet	5 g
Distilled water	100 ml

1.2. Gram iodine solution

Iodine	1 g
Potassium iodine	2 g
Distilled water	100 ml

1.3. Decolorizer

Ethanol 95%	250 ml
Acetone	250 ml

1.4. Safranin O solution

Safranin O	2.5 g
Ethanol 95%	100 ml

เมื่อจะนำมาใช้ต้องนำมาเจือจางอีก 5-10 เท่า โดยใช้ น้ำกลั่น

ชุดสีย้อมสปอร์เชื้อรา

ชุดสีย้อมสปอร์เชื้อรา (คณาจารย์จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2544)

การย้อมสีแกรม

ใช้ห้วงถ่ายเชื้อบนไฟเพื่อฆ่าเชื้อ นำไปแตะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาผสมในน้ำบนสไลด์ เคลี่ยเชื้อบนสไลด์ ให้กระจายออกเป็นบริเวณบางๆ ปล่อยให้สไลด์แห้งในอากาศให้แห้ง (air dry) นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อนๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์ เพื่อให้เชื้อติดแน่นบนสไลด์ (heat-fixed) ปล่อยให้สไลด์เย็นลงก่อนจึงนำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูการติดสีของแบคทีเรีย เชื้อที่ติดสีย้อมครั้งแรก คือ สีม่วงของ crystal violet เรียกว่า แบคทีเรียแกรมบวก ส่วน

เชื้อที่ถูกล้างออกด้วย decolorizer นั้นจะติดสีย้อนครั้งหลัง คือ สีแดงของ safranin O เรียกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (คณาจารย์จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้, 2552)

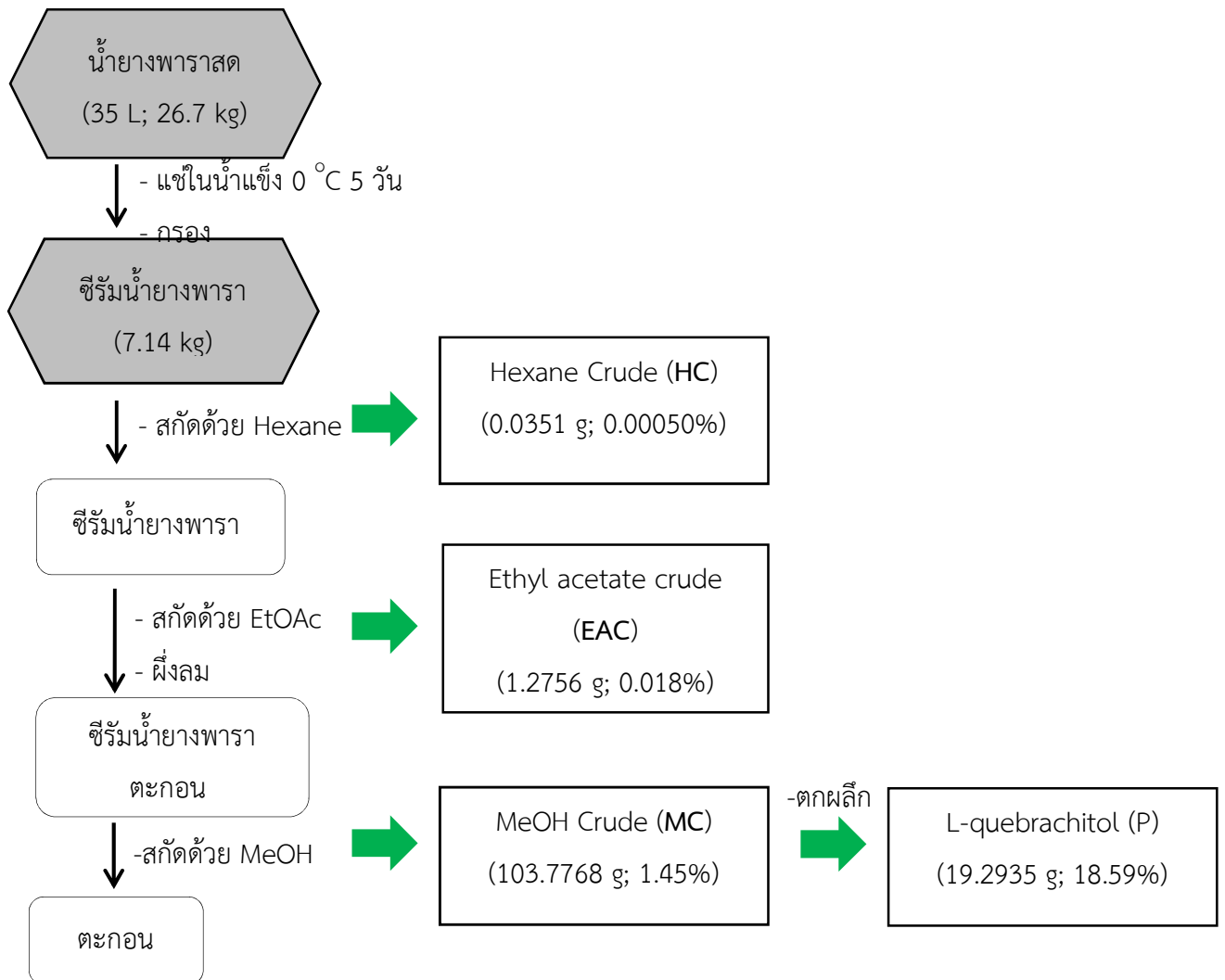
วิธีย้อมสีแกรม

1. หยด crystal violet ลงบนแผ่นสไลด์ที่มีเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที
2. เทสีออกล้างด้วยน้ำเบาๆ จากนั้นหยด iodine ทิ้งไว้ 1 นาทีเพื่อให้สีย้อนติดดีขึ้น
3. เทออกล้างด้วยน้ำเบาๆ หยด decolorizer 3-4 หยด ล้างน้ำออกเบาๆอย่างรวดเร็ว
4. ย้อมด้วย safranin O เป็นเวลา 30 วินาที
5. ล้างออกด้วยน้ำเบาๆ ซับน้ำออกจากสไลด์ปล่อยให้แห้งสนิทด้วยอากาศ
6. นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบต่อไป

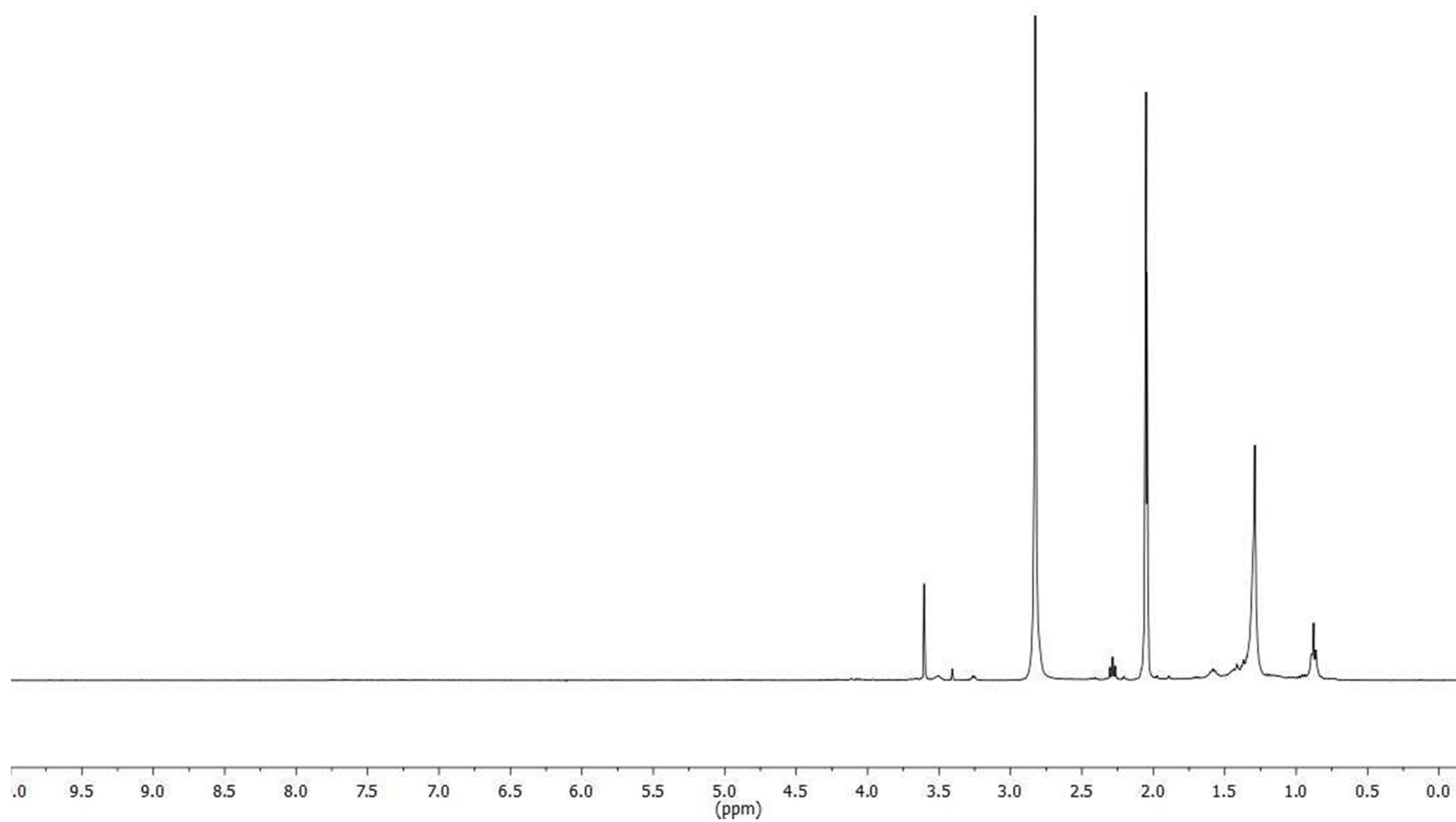
ภาคผนวก ค

การสกัดสารสกัดหยาบจากซีรุ่มน้ำยางพารา

ภาพที่ ค1 ขั้นตอนการสกัดซีรุ่มน้ำยางพาราด้วยตัวทำละลาย

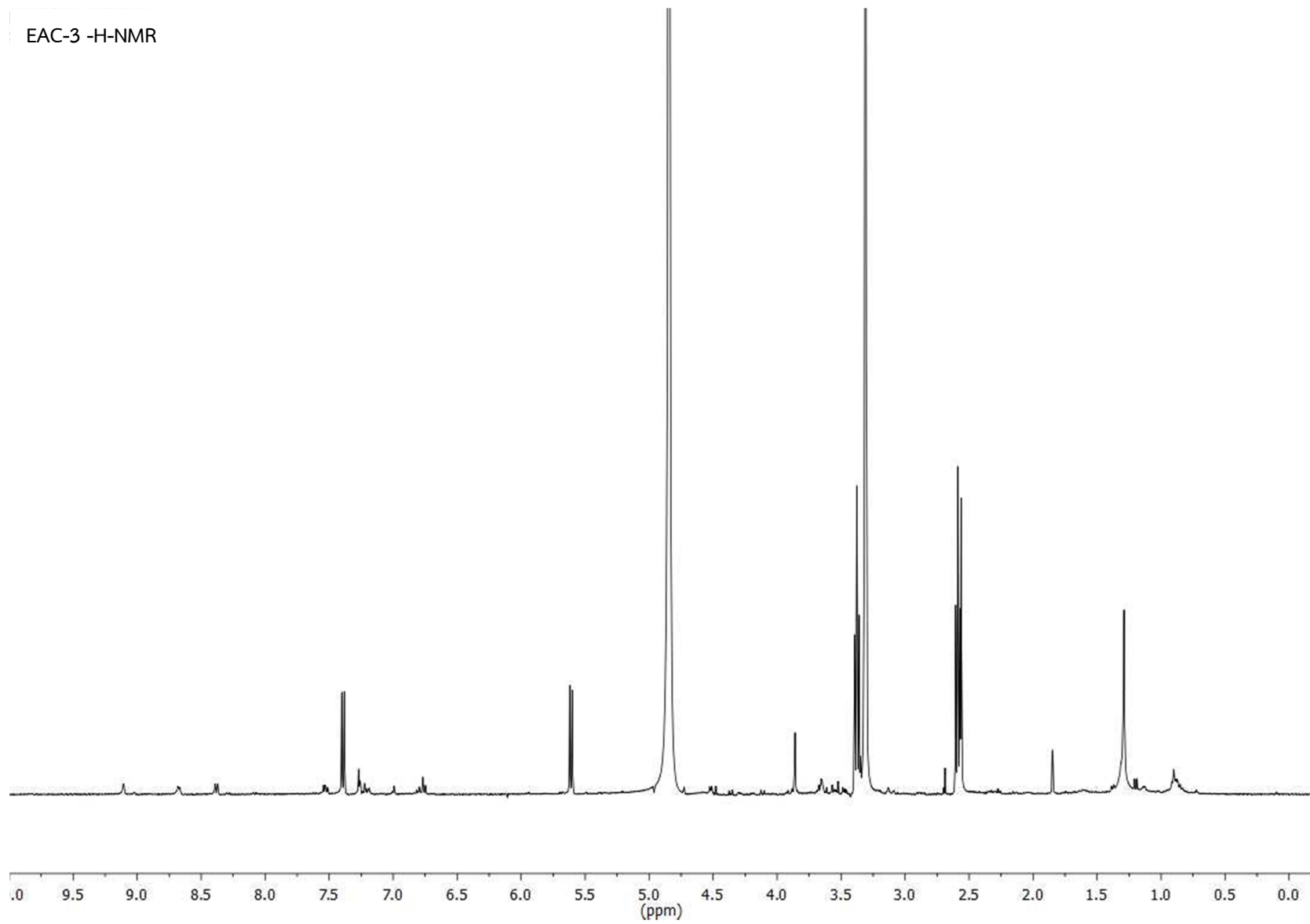


EAC-3 -H-NMR



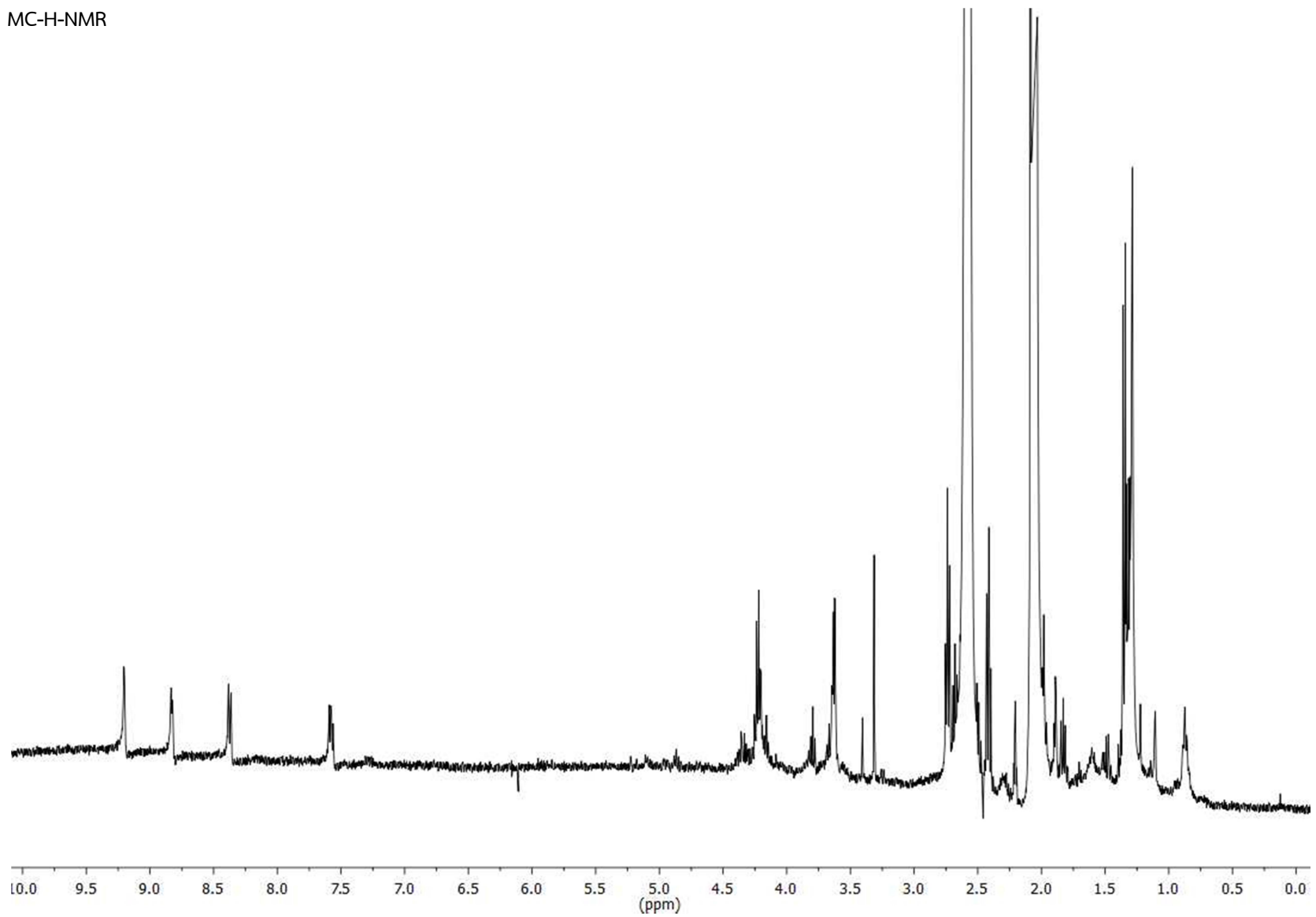
ภาพที่ ค 2 ^1H -NMR สเปกตรัม ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตรท EAC-3

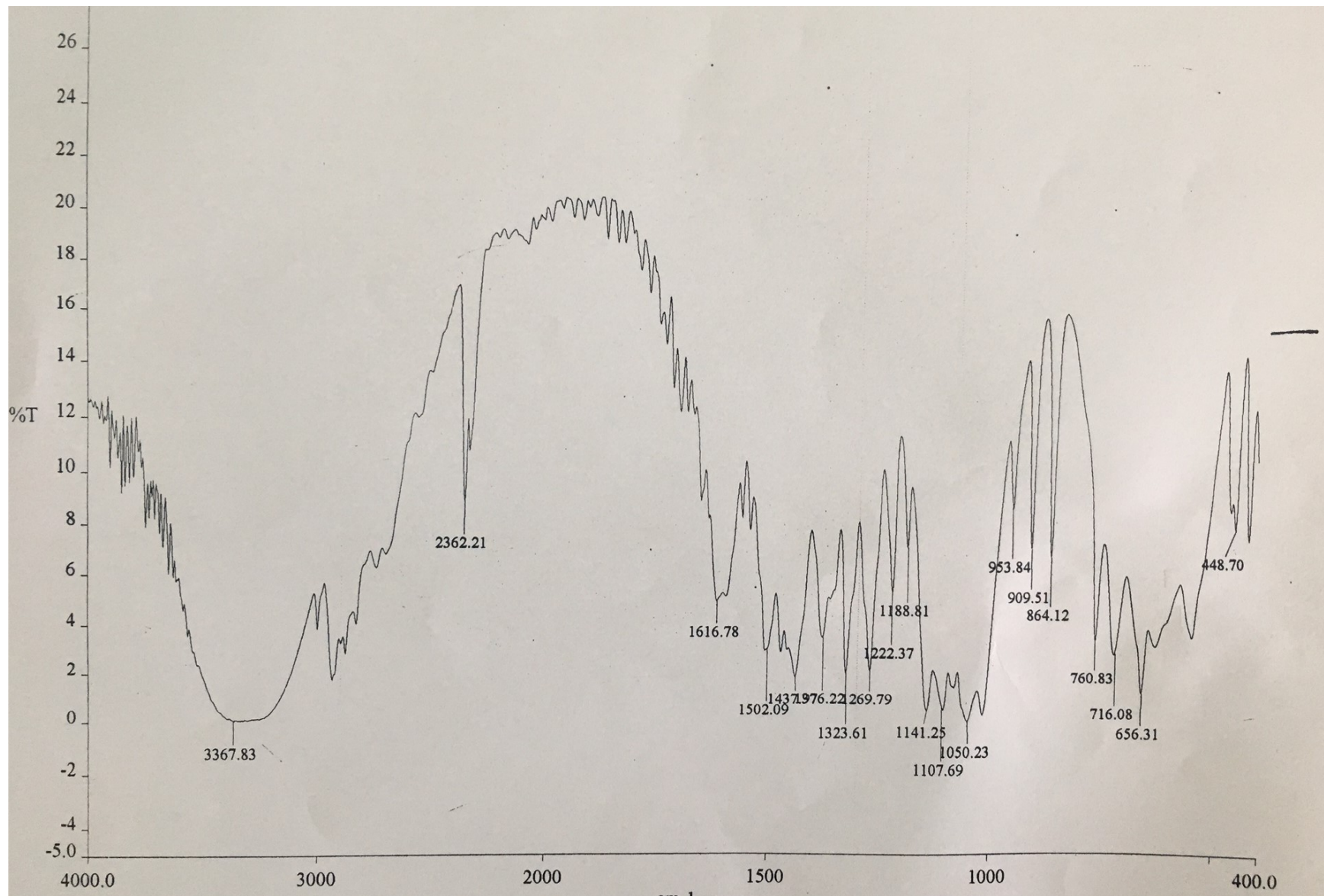
EAC-3 -H-NMR



ภาพที่ ค 3 ^1H -NMR สเปกตรัม ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตรท EAC-5

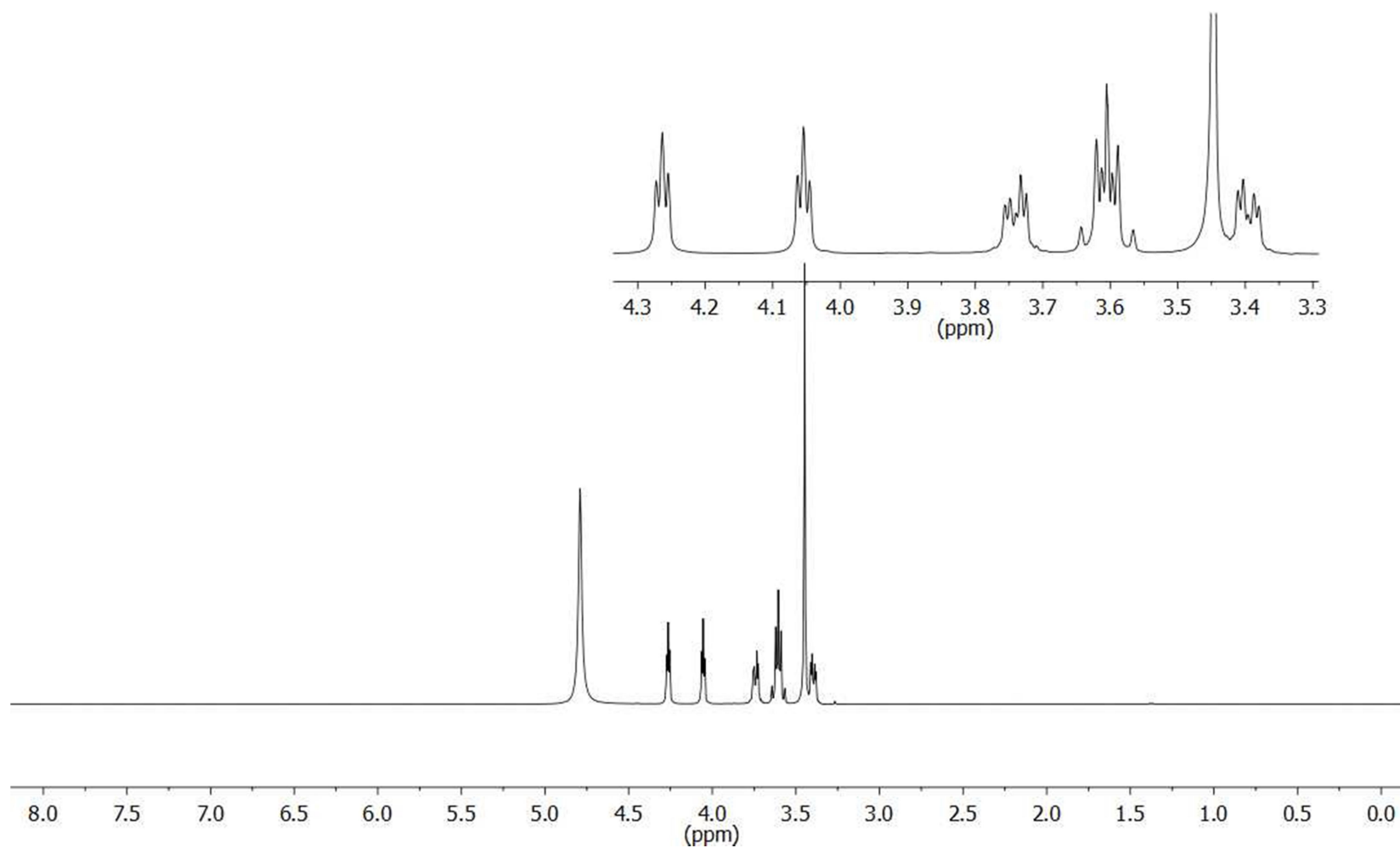
MC-H-NMR

ภาพที่ ค 4 ^1H -NMR สเปกตรัม ของสารสกัดหยาบเมทานอล MC

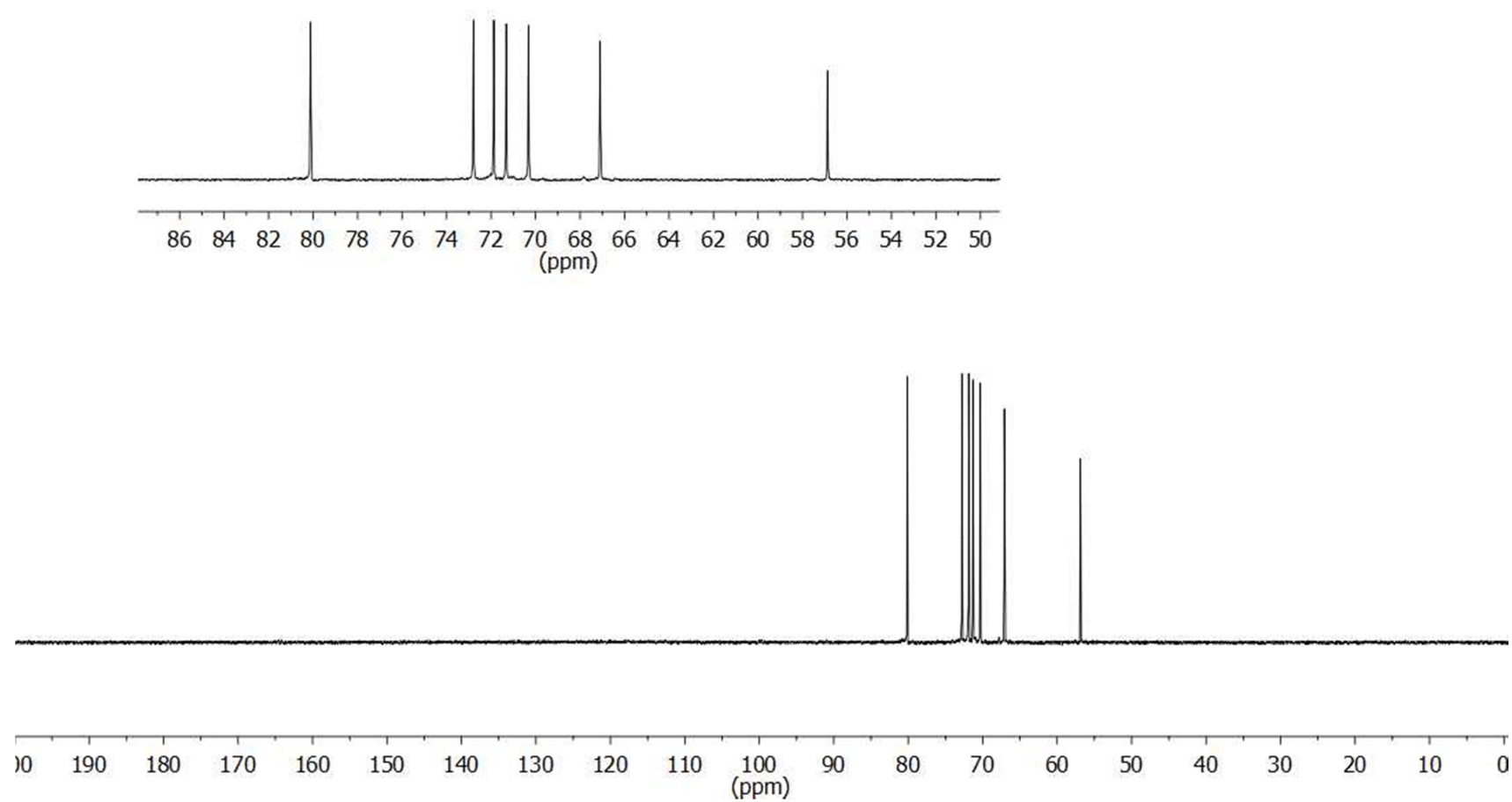


ภาพที่ ค 5 FT-IR สเปกตรัมของสาร L-quebrachitol ที่แยกได้

$^1\text{H-NMR}$ -L-quebrachitol



ภาพที่ ค 6 $^1\text{H-NMR}$ สเปกตรัม ของ L-quebrachitol

^{13}C -NMR -L-quebrachitol

ภาพที่ ค 7 ^{13}C -NMR สเปกตรัม ของ L-quebrachitol

ภาคผนวก ง

การเพิ่มมูลค่าของน้ำยางพาราสดในเชิงพาณิชย์

D-Pinitol
95%
Synonym: 3-O-Methyl-D-chiro-inositol

CAS Number 10284-63-6 | Empirical Formula (Hill Notation) C₇H₁₄O₆ | Molecular Weight 194.18
MDL number MFCD00216659 | PubChem Substance ID 24867648

POPULAR DOCUMENTS: SPECIFICATION SHEET (PDF)

Properties

Related Categories	Acacia, Asymmetric Synthesis, Carbohydrates, Cell Biology, Chemical Synthesis, More...
assay	95%
optical activity	[α] _D ²⁰ 60.0 to 70.0°, c = 1% in H ₂ O
mp	179-185 °C (lit.)

Price and Availability

SKU-Pack Size	Availability	Price (\$/G)	Quantity
441252-100MG	Estimated to ship on 18.01.17	32.00	0
441252-500MG	Estimated to ship on 18.01.17	69.00	0

Bulk orders? [ADD TO CART](#)

ภาพที่ ง 1 ราคา D-pinitol จาก <http://www.sigmaaldrich.com>

ตารางที่ ง 1 การคำนวณต้นทุนผลิตภัณฑ์เจลยับยั้งการเกิดสิว และ ชลอริ้วรอยแห่งวัย จากซีรัมน้ำยางพาราสด

รายการต้นทุน	หน่วย	ปริมาณหน่วย	ราคาต่อหน่วย (บาท)	รวม (บาท)
น้ำยางพารา	กิโลกรัม	35.7	45	1,606
เอทานอล	ลิตร	5	120	600
ค่าแรง	วัน	3	300	900
บรรจุภัณฑ์	ขวด	8	15	120
รวมต้นทุน				3,226
L-quebrachitol ที่แยกได้	กรัม	19.29		3226
L-quebrachitol ที่แยกได้	กรัม	1		167
เจลซีรัมน้ำยางพารา 1 ขวด 25 ml ใช้ มี L-quebrachitol 10%	ขวด			418

ตารางที่ ง 2 การคำนวณต้นทุนผลิตภัณฑ์เจลยับยั้งการเกิดสิว และ ชลอริวรอยแห่งวัย จากน้ำรีดยางแผ่น

รายการต้นทุน	หน่วย	ปริมาณหน่วย	ราคาต่อหน่วย (บาท)	รวม (บาท)
น้ำยางพารา	กิโลกรัม	62	0	0
เอทานอล	ลิตร	5	120	600
ค่าแรง	วัน	3	300	900
บรรจุภัณฑ์	ขวด	8	15	120
รวมต้นทุน				1,620
L-quebrachitol ที่แยกได้	กรัม	22.63		
L-quebrachitol ที่แยกได้	กรัม	1		72
เจลซีรุ่มน้ำยางพารา 1 ขวด 25 ml ใช้ มี L-quebrachitol 10%	ขวด			180

ตารางที่ ง 3 การคำนวณต้นทุนผลิตภัณฑ์สารเคลือบยางแผ่นเพื่อป้องกันเชื้อราบนเบื่อน จากน้ำรีดยางแผ่น

รายการต้นทุน	หน่วย	ปริมาณหน่วย	ราคาต่อหน่วย (บาท)	รวม (บาท)
น้ำยางพารา	กิโลกรัม	62	0	0
เอทานอล	ลิตร	5	120	600
ค่าแรง	วัน	3	300	900
บรรจุภัณฑ์	ขวด	8	15	120
รวมต้นทุน				1,620
L-quebrachitol ที่แยกได้	กรัม	22.63		
L-quebrachitol ที่แยกได้	กรัม	1		72
สารเคลือบยางแผ่น 1 ขวด 500 ml ใช้ มี L-quebrachitol (20%, 10 g)	ขวด			720