

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับฮวานจ็อก (วิสุตา สุวิทยวัฒน์, 2551)

ฮวานจ็อก มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. อยู่ในวงศ์ Acanthaceae ชื่อพ้อง คือ *Eranthemum palatiferum* Nees เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-3 เมตร ลำต้นเป็นรูปสี่เหลี่ยม เปลือกต้นผิวเรียบสีเขียว ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปรีถึงรูปใบหอก กว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 5-15 เซนติเมตร โคนใบสอบ ปลายใบแหลมเรียว ขอบใบเรียบ มีเส้นแขนงใบ 8-11 คู่ ผิวใบมีขนยาวหยาบ (pilose) ดอกช่อแยกแขนงแบบช่อเชิงลด (spiciform paniculate) ใบประดับรูปแถบหรือไม่มีใบประดับ มีก้านดอกย่อย ยาวประมาณ 0.5 มิลลิเมตร มีขนสั้นนุ่มที่ใบประดับ ก้านดอกย่อยและกลีบเลี้ยง กลีบเลี้ยงมี 5 กลีบ รูปแถบ วงกลีบดอกสีชมพู น้ำเงิน ม่วง หรือเกือบดำ หลอดดอกรูปทรงกระบอก ดอกปากแตร รูปห้าแฉก เกสรเพศผู้สมบูรณ์ และเป็นหมัน รังไข่เรียบ



รูปที่ 2.1 ลักษณะของใบฮวานจ็อก (www.buddhakhun.org)

2.1.1 การขยายพันธุ์ (วิสุตา สุวิทยวัฒน์, 2551)

ในปัจจุบันฮวานจ็อกได้ปลูกอย่างแพร่หลายในประเทศไทยมากขึ้นเพราะสามารถปลูกได้ง่าย การขยายพันธุ์นิยมขยายพันธุ์ด้วยการตัดยอดปักชำลงดิน เพราะสามารถเกิดรากได้เร็วและย้ายลงปลูกในกระถางเพื่อเป็นไม้ประดับได้

2.1.2 สรรพคุณพื้นบ้าน

ในเวียดนามจะใช้ใบในการรักษาโรคต่าง ๆ ในคน ได้แก่ ความดันโลหิต ท้องเสีย ไขข้ออักเสบ คออักเสบ กระเพาะอาหารอักเสบ เนื้องอก ลำไส้อักเสบ ตกเลือด รักษาแผล ท้องผูก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันโรคในสัตว์เลี้ยง ได้แก่ แก้วท้องเสียในสุกรและสุนัข รักษาแผลและอหิวาต์ในเป็ดและไก่ เป็นต้น

ในใบหวานร็อกประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ ได้แก่ โปรตีน (ซึ่งพบในปริมาณ 30.8 % ของน้ำหนักแห้ง) กรดอะมิโน ได้แก่ ไลซีน เมทไทโอนีน และทรีโอนีน เกลือแร่ ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และทองแดง

2.1.3 องค์ประกอบทางเคมี

จากการศึกษาพบว่าในใบประกอบด้วย ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), β -sitosterol, phytol, 3-O-(β -D-glucopyranosyl)-sitosterol, สารผสมระหว่าง stigmasterol และ poriferasterol, n-pentacosan-1-ol และสารผสมระหว่าง kaemferol-3-methyl ether-7-O- β -glucoside และ apigenin-7-O- β -glucoside, 1-triacontanol, salicylic acid, glycerol 1-hexadecanoate, palmitic acid และ pseudouridine ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน

2.1.4ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

2.1.4.1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตตและบิวทานอลจากใบ ซึ่งมีฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อทดสอบโดยใช้ human blood peroxidase model

2.1.4.2 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

ส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตและบิวทานอลจากใบ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย 10 ชนิด โดยเฉพาะส่วนสกัดเอทิลอะซีเตตจะมีฤทธิ์แรงต่อเชื้อ *Salmonella typhi* 158, *Shigella flexneri* และ *E. coli*

2.1.4.3 ฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ส่วนสกัดด้วยเอทิลอะซีเตตและบิวทานอลจากใบ มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* และ *C. stellatoidea*

2.1.4.4 ผลต่อสัตว์

มีการศึกษาผลของหวานร็อกที่มีต่อการเจริญเติบโต และแก้ท้องเสียในลูกสุกรเล็ก โดยแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ทดลองในลูกสุกรที่ยังไม่ได้หย่านมโดยให้กินใบสดขนาด 1 กรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 30 วัน การทดลองที่ 2 ทดลองในลูกสุกรที่ยังไม่ได้หย่านมโดยให้กินใบสดขนาด 0.5 กรัม/กิโลกรัม/วัน และผงใบแห้งขนาด 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 30 วัน และการทดลองที่ 3 ทดลองในลูกสุกรที่หย่านมแล้วโดยให้กินใบสดขนาด 0.5 กรัม/กิโลกรัม/วัน และผงใบแห้งขนาด 0.1 และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม/วัน นานเวลา 30 วัน พบว่าในการทดลองที่ 1 ลูกสุกรที่กินใบหวานร็อกจะมีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มควบคุมจำนวน

เม็ดเลือดแดง packed cell และฮีโมโกลบินสูงกว่า ไม่พบการตายและอาการท้องเสีย เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 และ 3 ลูกสุกรที่กินใบฮวานจ็อกจะมีน้ำหนักตัว จำนวนเม็ดเลือดแดง packed cell และฮีโมโกลบินมากกว่ากลุ่มควบคุม ลูกสุกรมีอาการท้องเสียและตายน้อยกว่า โดยผงแห้งที่ขนาด 0.2 กรัม/กิโลกรัม จะให้ผลดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตและแก้ท้องเสียในลูกสุกรเล็ก

การทดลองเปรียบเทียบผลของฮวานจ็อกกับยาปฏิชีวนะ Coli-norgent (ประกอบด้วย Colistine sulfate 125,000,000 UL, Norfloxacin 2,000 มิลลิกรัม, Gentamicin sulfate 1,000 มิลลิกรัม, Trimethoprim 1,000 มิลลิกรัม, excipient q.s. 100 กรัม) และ Cotrimxazol (ประกอบด้วย Trimethoprim 160 มิลลิกรัม, Sulfamethoxazol 800 มิลลิกรัม) ในการรักษาอาการท้องเสียในลูกสุกร โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่กินผงใบฮวานจ็อกแห้ง ขนาด 1 กรัม/กิโลกรัม กลุ่มที่ได้รับยา Coli-norgent และ Cotrimxazol ขนาด 0.1 กรัม/กิโลกรัม วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน พบว่าฮวานจ็อกให้ผลดีเทียบเท่ากับยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด ดังนั้นจึงสามารถใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในการรักษาอาการท้องเสียในลูกสุกรได้

2.1.4.5 พิษต่อเซลล์

สารสกัดเมทานอลจากใบ เป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็ง B16 melanoma โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ครึ่งหนึ่ง (GI_{50}) คือ มากกว่า 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2.1.4.6 ยับยั้งการสร้างหลอดเลือด

สารสกัดเมทานอลจากความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มีฤทธิ์อย่างอ่อน (น้อยกว่า 25%) ในการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดในเซลล์ human umbilical venous

2.2 กลุ่มสารสำคัญในพืช (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, 2544)

สารเคมีที่พบในพืชมีจำนวนมากโดยสามารถแบ่งกลุ่มสารเคมีในพืชตามสารตั้งต้น (biosynthetic origin) ของสารเหล่านี้ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ สารปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารทุติยภูมิ (secondary metabolites)

สารปฐมภูมิ เป็นสารเคมีพื้นฐานที่พบในพืชชั้นสูงโดยทั่วไปและพบในพืชเกือบทุกชนิด เป็นกลุ่มสารที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมที่จำเป็น (essential metabolism) ของเซลล์ ส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชและกระบวนการชีวสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด สารปฐมภูมินี้ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต (carbohydrates) ไขมัน (lipids) โปรตีน กรดอะมิโน และเอนไซม์ (enzymes)

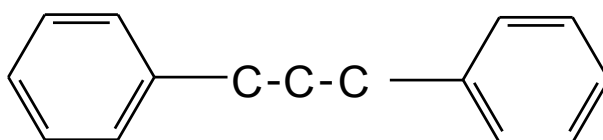
สารทุติยภูมิ เป็นสารประกอบที่พบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิดซึ่งเชื่อว่าสารเหล่านี้เกิดจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ในพืช สารเหล่านี้มักจะแสดงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอย่างชัดเจนแต่ยังเกี่ยวข้องกับวงจรเมตาบอลิซึมพื้นฐานในเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้คือ แอลคาลอยด์ (Alkaloids) สารกลุ่มฟีนอลิก (Phenolic compounds) เทอร์ปีนอยด์และสเตอรอยด์ (Terpenoids and Steroids) กลัยโคไซด์ชนิดอื่น ๆ (Other glycosides)

2.2.1 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

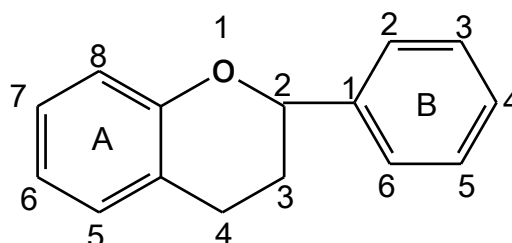
ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (Phenolic compounds) จำพวกฟีนิลโครโมน (phenyl chromones) และอนุพันธ์ พบมากในธรรมชาติโดยมากพบเป็นเม็ดสี (pigments) ในส่วนต่าง ๆ ของพืชโดยเฉพาะดอกไม้ ส่วนใหญ่จะเป็นเม็ดสีที่ละลายได้ในน้ำทำให้ดอกไม้มีสีสวยงาม โดยส่วนใหญ่จะเป็นสีแดง เหลือง ม่วง และน้ำเงิน ในธรรมชาติจะพบฟลาโวนอยด์ทั้งในรูปอิสระและในรูปกลัยโคไซด์ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น O-glycoside แต่บางครั้งก็อาจเป็น C-glycoside น้ำตาลมักจะมาจับที่ตำแหน่ง 3, 5 หรือ 7 สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในรูปกลัยโคไซด์ เรียกว่า ฟลาโวนอกลัยโคไซด์ (Flavonoid glycoside) ซึ่งมักพบใน cell sap ของดอกไม้ ผลไม้ และใบไม้ในรูปของ soluble pigments สำหรับพวก aglycone มักพบในเนื้อไม้ นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์ยังพบได้ในเมล็ด เปลือก ราก และลำต้นด้วย

2.2.1.1 คุณสมบัติทางเคมี

ฟลาโวนอยด์ส่วนมากเป็น phenylbenzo-γ-pyrone มีโครงสร้างพื้นฐานเป็น C₆-C₃-C₆ ส่วนใหญ่ประกอบด้วย pyran ring จับกับ 3 carbon chain และ 1 benzene ring ดังรูปที่ 2.2 และรูปที่ 2.3 ฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันที่ oxidation state ของ 3 carbon chain เนื่องจากการเติมกลุ่ม hydroxyl (OH) ลงบน pyran ring



รูปที่ 2.2 โครงสร้าง flavonoid skeleton (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ 2544)

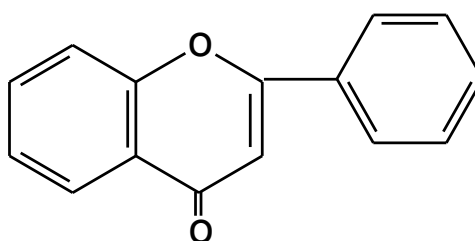


รูปที่ 2.3 โครงสร้าง flavonoid (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ 2544)

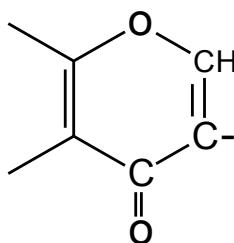
2.2.1.2 ชนิดของฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์อาจแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะโครงสร้างได้เป็น 12 กลุ่ม ดังนี้

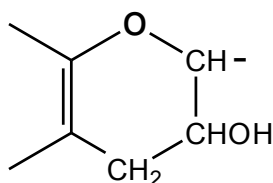
1. ฟลาโวนส์ (flavones)
2. ไอโซฟลาโวนส์ (isoflavones)
3. ฟลาโวนอลส์ (flavonols)
4. ฟลาวาโนนส์ (flavanones)
5. ฟลาวาโนนอลส์ (flavanonols)
6. ลิวโคแอนโทไซยานินส์ (leucoanthocyanins)
7. แอนโทไซยานินส์ (anthocyanins)
8. คาทิซินส์ (catechins)
9. ชาลโคนส์ (chalcones)
10. ไดไฮโดรชาลโคนส์ (dihydrochalcones)
11. ออโรนส์ (aurones)
12. แซนโทนส์ (xanthenes)



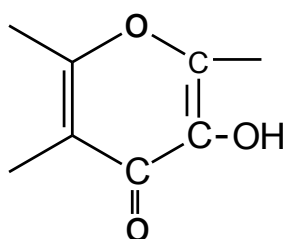
รูปที่ 2.4 โครงสร้างพื้นฐานของ flavones (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ 2544)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างพื้นฐานของ isoflavones (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ 2544)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างพื้นฐานของ flavonols (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ 2544)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างพื้นฐานของ catechins (นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ 2544)

ฟลาโวนส์ และฟลาโวนอลส์ เป็นสารที่ให้ pigment สีเหลือง ซึ่งพบได้ในพืชเป็นจำนวนมาก (ยกเว้นสีเหลืองเข้ม ซึ่งมักจะเป็นจำพวก carotenoids) สารจำพวกฟลาโวนส์บางตัว เช่น luteolin ใช้เป็นสีย้อมชนิดแรกในยุโรป quercetin และ kaempferol เป็นฟลาโวนอลส์ที่พบบ่อยที่สุดในพืชชั้นสูง ในรา *Aspergillus candidus* พบฟลาโวนอลส์ชื่อ chlorflavonin ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ ส่วนไอโซฟลาโวนส์เป็นสารไม่มีสี พบได้น้อยในพืช การเกิดกลัยโคไซด์ของสารทั้งสามกลุ่ม พบว่า ฟลาโวนส์และไอโซฟลาโวนส์มักเกิดกลัยโคไซด์ที่ตำแหน่ง C-7 ส่วนฟลาโวนอลส์มักเกิดที่ C-3 น้ำตาลที่พบมากคือ กลูโคส กาแล็คโทส และแร็มโนส (rhamnose) ฟลาโวนส์บางตัวจะพบเป็น C-glycoside เช่น vitexin

คาร์ทีชินส์ มีโครงสร้างเป็น polyhydroxy flavan-3-ol เป็นสารไม่มีสีพบได้ในพืชทั่วไปโดยเฉพาะ woody plant คาร์ทีชินส์เป็นสารตั้งต้นของ condensed tannin มีคุณสมบัติพิเศษคือ เมื่อถูกความร้อน กรด หรือเอนไซม์ จะเปลี่ยนจากสารที่ไม่มีสีเป็นสารสีแดง (tannin red) ซึ่งไม่ละลายน้ำ ตัวอย่างคาร์ทีชินส์ ได้แก่ catechin, gallocatechin

2.2.1.3 การสกัดและการตรวจสอบฟลาโวนอยด์ในพืช

การสกัดฟลาโวนอยด์จากพืชสดนิยมสกัดด้วยเมทานอล หรือเอทานอล ทั้งฟลาโวนอยด์กลัยโคไซด์และ aglycone จะไม่ละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์ จึงมักสกัดพืชด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ก่อนเพื่อสกัดเอาไขมันออกก่อนที่จะสกัดด้วยแอลกอฮอล์ ในการ screening เพื่อ

หาฟลาโวนอยด์มักใช้สกัดด้วย 80 % เอทานอล เอทิลอะซิเตทเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับใช้สกัดคาร์ทีซินส์และลิวโคแอนโธไซยานินดิโนส ส่วนเอมิลแอลกอฮอล์มักนิยมใช้สกัดแอนโธไซยานินส์

การตรวจสอบฟลาโวนอยด์มักใช้ปฏิกิริยา cyaniding reaction ซึ่งใช้ทดสอบ benzo-y-pyrone nucleus แต่ปฏิกิริยานี้จะให้ผลเป็นบวกกับสารอื่น ๆ ที่มี nucleus นี้แต่ไม่ใช้ฟลาโวนอยด์ด้วย วิธีทดสอบทำได้โดยนำสารสกัดแอลกอฮอล์ที่สกัดจากพืชที่ต้องการทดสอบมาเติม magnesium ribbon ชิ้นเล็กๆลงไป 2-3 ชิ้น แล้วหยดกรดเกลือเข้มข้น 3-4 หยด ดูสีที่เกิดขึ้นภายใน 1-2 นาที ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นอยู่กับปริมาณของฟลาโวนอยด์ ถ้ามีสีที่เกิดขึ้นสีส้ม-แดง แสดงว่ามีฟลาโวนส์ ถ้าสีที่เกิดขึ้นเป็นสีแดง-แดงเลือดหมู แสดงว่ามีฟลาโวนอลส์ ถ้าเป็นสีแดงเลือดหมู-ม่วง แสดงว่ามีฟลาวาโนนส์ ในบางกรณีสีที่เกิดขึ้นอาจเป็นสีเขียว-น้ำเงิน ถือว่าเป็น + test ของฟลาโวนอยด์เช่นกัน สำหรับแซนโทนส์จะให้ + test กับ cyaniding reaction แต่ชาโลโคนส์และออโรนส์ให้ - test อย่างไรก็ตามปัญหาที่พบสำหรับการตรวจสอบโดยใช้ cyaniding reaction คือสีที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจน เนื่องจากในพืชมี pigments อื่น ๆ มาปะปน

2.2.1.4 ประโยชน์ของฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์หลายชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น rutin (rhamnoglucoside ของ quercetin) ซึ่งพบได้ในพืชหลายชนิด rutin ใช้รักษาโรคเส้นเลือดฝอยเปราะ quercetin ซึ่งเป็นฟลาโวนอลมีฤทธิ์ต้านการอักเสบและต้านไวรัสโดยออกฤทธิ์เป็นทั้ง anti-infective และ antireplicative ของไวรัสหลายชนิด แต่ hesperetin ซึ่งเป็นฟลาวาโนมีฤทธิ์ต้านไวรัสเฉพาะในด้าน antireplicative เท่านั้น นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์บางชนิดยังมีฤทธิ์เป็น antioxidant อีกด้วย

2.3 การสกัดการสกัด (ประเสริฐ ศรีไพโรจน์, 2538)

เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยสมบัติการละลายของสารในตัวทำละลาย หรือการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ต้องการออกจากของผสม หลักการสกัดสาร เดิมตัวทำละลายที่เหมาะสมลงในการที่เราต้องการสกัด จากนั้นก็เขย่าแรงๆหรือนำไปต้ม เพื่อให้สาร ที่เราต้องการจะสกัดละลายในตัวทำละลายที่เราเลือกไว้ สารที่เราสกัดได้นั้นยังเป็นสารละลายอยู่ ถ้าเราต้องการทำให้บริสุทธิ์เราควรจะนำสารที่ได้ไปแยกตัวทำละลายออกมาก่อน อาจจะนำไประเหย หรือนำไปกลั่นต่อไป ตัวอย่างเช่น การสกัดน้ำขิงจากขิง การสกัดคลอโรฟิลล์ของใบไม้ และเป็นเทคนิคในการแยกสารอินทรีย์ออกจากของผสม โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมซึ่งจะต้องละลายสารอินทรีย์ที่ต้องการได้ดี ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับสารละลายของของผสมและไม่ควรละลายสิ่งเจือปนหรือสารที่ไม่ละลาย

2.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction)

เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยสมบัติการละลายของสารในตัวทำละลาย หรือการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ต้องการออกจากของผสม

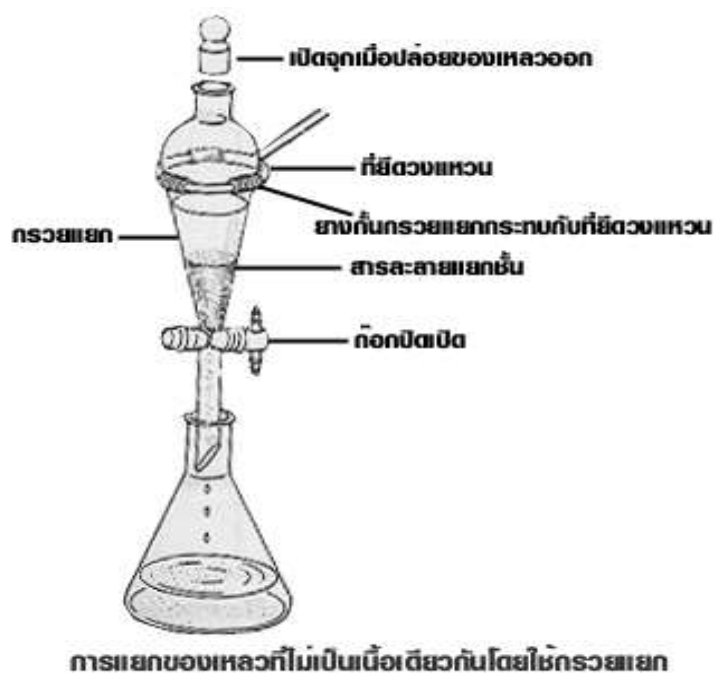
หลักการ เลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก

1. ตัวทำละลายสามารถละลายที่ต้องการสกัดได้
2. ตัวทำละลายจะต้องไม่ละลายสารอื่นๆ
3. ตัวทำละลายจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด
4. ตัวทำละลายสามารถแยกจากสารที่เราต้องการสกัดได้ง่าย
5. ตัวทำละลายไม่เป็นพิษ และมีราคาถูก

2.3.2 เทคนิคการสกัด

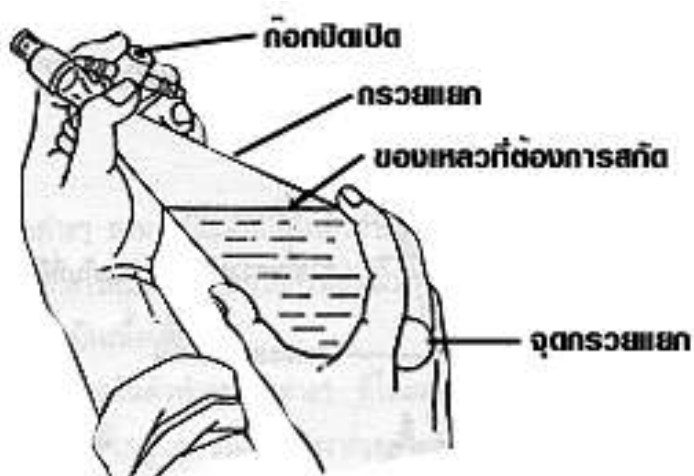
เราทราบแล้วว่าสารต่าง ๆ สามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน คุณสมบัติอันนี้จะนำมาใช้เป็นหลักในการแยกสารออกจากสารละลายได้ เรียกวิธีการเช่นนี้ว่าการสกัด ต่อไปนี้จะกล่าวถึงการสกัดตัวทำละลายโดยใช้สารที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เนื่องจากสารจะละลายในตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อให้สารละลายนั้นมีตัวทำละลายที่ไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอยู่ 2 ชนิดหลังจากเขย่าแล้วสารจะมีอยู่ในตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด นั้นในปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน อัตราส่วนของความเข้มข้นของสารที่ละลายในสารละลายในตัวทำละลายในหน่วยโมลต่อลิตรนี้เรียกว่า Distribution coefficient ซึ่งอัตราส่วนนี้ขึ้นกับปริมาณของตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดและความเข้มข้นทั้งหมดของสาร ดังนั้นการสกัดจึงเป็นการเคลื่อนย้ายตัวละลายจากตัวทำละลายชนิดหนึ่งไปยังตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งโดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่ากรวยแยกมีวิธีการดังนี้

1. ทำความสะอาดกรวยแยกที่ใช้ให้สะอาด สำหรับบริเวณก้นกอกปิดเปิดควรทำความสะอาดด้วย เช่นเดียวกับบิวเรตต์
2. เติสารละลายที่จะสกัดลงในกรวยแยก ไม่ควรใส่สารละลายมากเกินไปเพราะจะต้องเติมตัวทำละลายเพื่อสกัดมีสารในสารละลายนั้นอีก หากมีมากควรแบ่งทำ 2 ถึง 3 ครั้ง
3. เติมตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดแล้วปิดจุกให้แน่น
4. เขย่ากรวยแยกเบา ๆ ในแนวนอนแล้ว เปิดก๊อกเป็นครั้งคราวหลังจากหยุดเขย่าเพื่อลดแรงดันภายในกรวยแยก



รูปที่ 2.8 การแยกของเหลวที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้กรวยแยก
(<http://web.ku.ac.th>)

5. นำกรวยแยกไปตั้งในแนวตั้งบนที่ยึดดวงแหวน เพื่อให้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น เอาจุกที่ปิดออก
6. เปิดก๊อกให้สารละลายที่อยู่ชั้นล่างไหลลงในภาชนะรองรับอย่างช้า ๆ
7. ทำซ้ำ โดยเริ่มตั้งแต่ขั้นตอนที่ 3 และใช้ตัวทำละลายในการสกัดใหม่
8. นำสารละลายที่สกัดออกมารวมกันจะเป็นสารที่สกัดได้ทั้งหมด



รูปที่ 2.9 แสดงการใช้กรวยอย่างถูกวิธี (<http://web.ku.ac.th>)

2.3.3 ข้อควรระวัง

1. เนื่องจากกรวยแยกง่ายและมีราคาแพง ในขณะที่แยกสารถ้าตั้งอยู่บนที่ยึดวงแหวนซึ่งทำด้วยเหล็กโดยไม่มีสิ่งใดกันเมื่อปล่อยให้สารละลายชั้นล่างไหลออกมาจะเกิดฟองอากาศพุ่งขึ้นจากสารละลาย อาจทำให้กรวยแยกกระเด็นและกระทบกับที่ยึดวงแหวนรุนแรงจนอาจแตกได้ เพื่อป้องกันปัญหานี้ระหว่างที่ยึดวงแหวนกับกรวยแยกจึงควรกันด้วยยาง

2. ก๊อกรวยแยกจะต้องปิดให้อยู่ในตำแหน่งเดิม ก่อนที่จะตั้งกรวยแยก ให้อยู่ในตำแหน่งปกติ และควรระมัดระวังในการวางกรวยแยกบนที่ยึดวงแหวนด้วย

3. เมื่อแยกกรวยแยกเพื่อให้ตัวทำละลายทั้งสองผสมกัน ความดันภายในกรวยแยกจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากความดันไอของตัวทำละลายที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกันนั่นเอง เช่น ถ้าใช้ NaHCO_3 เติมลงไป ในสารละลายที่เป็นกรด ความดันจะสูงขึ้นมากเนื่องจากเกิดก๊าซ CO_2 จำเป็นจะต้องลดความดันโดยขณะแยกกรวยแยก มือทั้งสองจะต้องจับกรวยแยกให้มีลักษณะดังภาพ คือมือหนึ่งจับที่ก๊อกปิดเปิด อีกมือหนึ่งจับที่จุกปิดเปิดของกรวยแยกค่อย ๆ เปิดก๊อกเพื่อให้ความดันภายในออกไป อาจทำเช่นนี้หลายๆ ครั้ง จนกระทั่งไม่มีความดันภายในกรวยแยก

สารที่สกัดได้อาจยังไม่บริสุทธิ์พอที่จะนำไปใช้ต่อในการทำให้สารบริสุทธิ์มีหลายวิธีต่าง ๆ กัน เช่น สำหรับของแข็งจะทำการตกผลึก หรือสารที่เป็นของเหลวจะทำการกลั่น แต่ถ้าใช้วิธีทั้งสองแล้วยังไม่บริสุทธิ์มักใช้วิธีโครมาโทกราฟี ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด

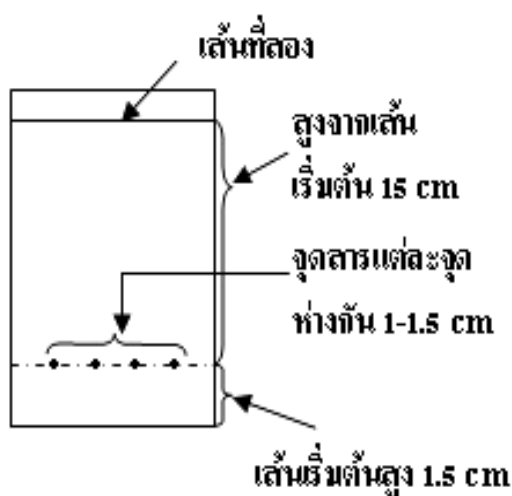
2.4 โครมาโทกราฟี (Chromatography) (สุนันทา วิบูลย์จันทร์ 2538)

โครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารละชนิดออกจากสารผสมโดยอาศัยคุณสมบัติที่สารต่างชนิดกันมีแรงดึงดูดกับสารชนิดเดียวกันต่างกัน การแยกนี้จึงใช้สารหลักสองชนิดได้แก่สารที่อยู่กับที่เรียกว่าสเตชันนารีเฟส (stationary phase) เป็นตัวยึดสารตัวอย่างเอาไว้ กับสารอีกชนิดหนึ่งที่เคลื่อนที่เรียกว่า โมบายเฟส (mobile phase) ทำหน้าที่เป็นตัวพาสารตัวอย่างออกไป

2.4.1 โครมาโทกราฟีแบบทินเลเยอร์ (thin-layer chromatography)

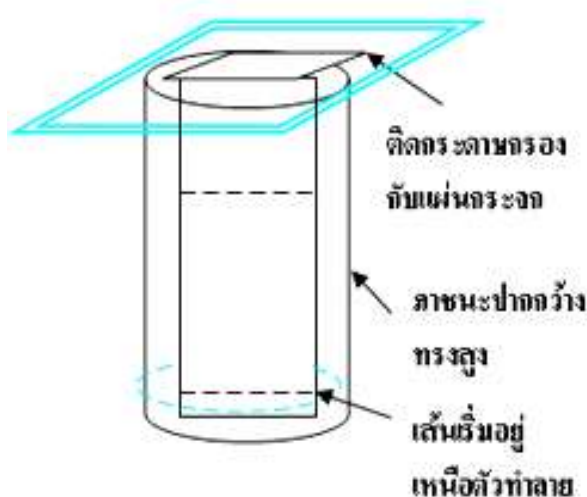
ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีเป็นโครมาโทกราฟีที่เป็นแผ่น โดยมีสเตชันนารีเฟสเป็นของแข็งที่นิยมใช้มากได้แก่ ซิลิกาเจล อะลูมินา หรือโพลีเอไมด์ สเตชันนารีเฟสเหล่านี้เป็นผงละเอียดจึงนำมาฉาบกับวัสดุแผ่นเรียบเช่น แผ่นแก้ว แผ่นอะลูมินา หรือแผ่นพลาสติก ให้มีความหนาต่างกัน ขึ้นกับการใช้งาน การวิเคราะห์ขั้นต้นมักใช้ความหนาประมาณ 0.01 ถึง 0.02 มิลลิเมตร ส่วนการแยกสารที่มีปริมาณมากขึ้นจะหนาประมาณ 1.0 ถึง 2.0 มิลลิเมตร ซึ่งในกรณีนี้จะเรียกว่า เป็นแผ่นพาราเรทีฟ

การวิเคราะห์สารด้วย TLC ทำโดยใช้หลอดแก้วแคปิลารีที่มีปลายเล็กมากจุ่มลงในสารละลายของสารผสมที่ต้องการวิเคราะห์สารละลายจะเข้าไปในหลอดเองเนื่องจากมีแรงตึงผิวเกิดขึ้นและปลายหลอดแก้วแคปิลารีลงบนแผ่น TLC โดยให้อยู่เหนือขอบล่างประมาณ 1.5 เซนติเมตร ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 การจุดสารบนแผ่น TLC (www.aksorn.com)

สารละลายจากหลอดจะซึมลงบนแผ่น TLC เกิดเป็นจุดขึ้นวิธีนี้เรียกว่า การจุดสาร (spot) แผ่น TLC หนึ่งแผ่นอาจจุดสารได้มากกว่า 1 จุด เมื่อตัวทำละลายของจุดแห้งแล้วจึงนำแผ่น TLC นั้นใส่ภาชนะปิดที่มีโมบายเฟสหรือตัวทำละลายอยู่ที่ก้นภาชนะทั้งนี้ต้องให้มีระดับต่ำกว่าระดับของการจุดสารเพื่อไม่ให้สารที่ต้องการจะวิเคราะห์ละลายออกไปภาชนะปิดนิยมใช้แท่งแก้วที่มองเห็นการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายได้ ดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 แท่งที่ใช้ในการวิเคราะห์โครมาโทกราฟีแบบทินเลเยอร์

(www.aksorn.com)

เมื่อสารต่างชนิดกันเคลื่อนที่ไม่เท่ากัน ระดับจุดสารจึงเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ซึ่งวัดเป็นค่าที่เรียกว่า Retardation Factor (R_f value) โดยคิดเป็นอัตราส่วนของระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อระยะทางที่โมบายเฟสเคลื่อนที่ได้ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่โมบายเฟสเคลื่อนที่}}$$

สารที่มีค่า R_f มาก แสดงว่าสารนั้นละลายในตัวทำละลายได้ดีแต่ถูกดูดซับได้น้อยซึ่งตรงข้ามกับสารที่มีค่า R_f น้อย ที่ละลายในตัวทำละลายได้น้อย แต่ถูกดูดซับได้มาก

ค่า R_f ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายและชนิดของตัวดูดซับดังนั้นในการหาค่า R_f ควรระบุชนิดของตัวทำละลาย และชนิดของตัวดูดซับควบคู่ไปด้วย

การตรวจหา (detection) เนื่องจากสารที่เคลือบบนแผ่น TLC เป็นพวก silica และ alumina ซึ่งเฉื่อย (inert) ดังนั้นสารละลายที่ไวต่อปฏิกิริยามากสามารถนำมาใช้ในการบอกตำแหน่งของสารที่แยกออกจากกันได้ กรดซัลฟูริกเข้มข้นสามารถนำมาใช้พ่นให้เป็นฝอยลงบนแผ่น silica ได้ และทำให้สารอินทรีย์เกิดเป็นสีดำ (charred) ซึ่งมองเห็นได้ชัดหลังจากให้ความร้อนกับแผ่นนอกจากนี้ยังสามารถใช้สารเคมีให้เกิดสี เช่นไอโอดีนได้อีกด้วยหรืออาจใช้วิธีส่องแผ่น TLC และเมื่อส่องด้วยแสงยูวีจะเห็นสารเป็นจุดสีดำบนพื้นหลอดฟลูออเรสเซนต์ อย่างนี้เรียกว่าเกิด quenching effect ซึ่งจะพบสารในกลุ่มโพลีฟีนอล

ข้อดีของ thin-layer chromatography

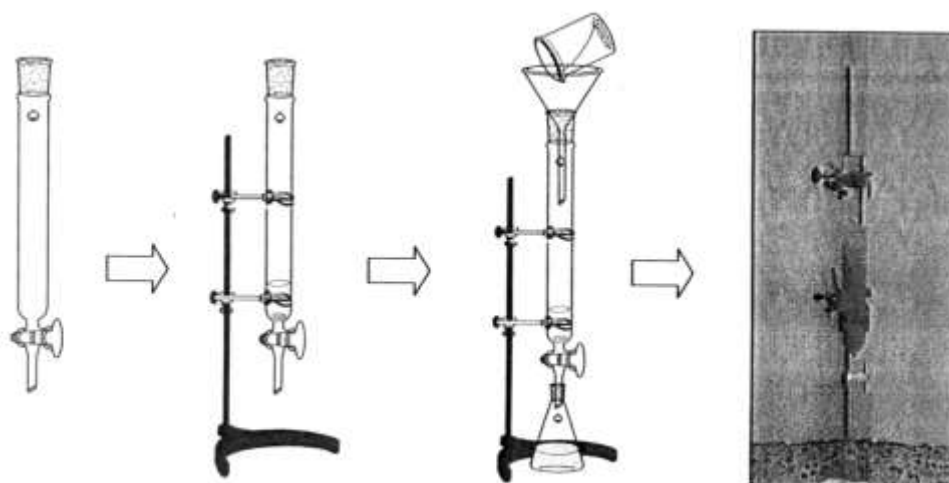
- มี stationary phase ให้เลือกหลายชนิด ทำให้สามารถแยกสารได้หลายชนิด
- การแยกของสารเร็วกว่าใน paper chromatography

- การ spot ตัวอย่างมีขนาดเล็กกว่า paper chromatography เนื่องจาก paper chromatography จะมี diffusion มากกว่า
- Resolution ดีกว่า paper chromatography

2.4.2 คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography ; CC)

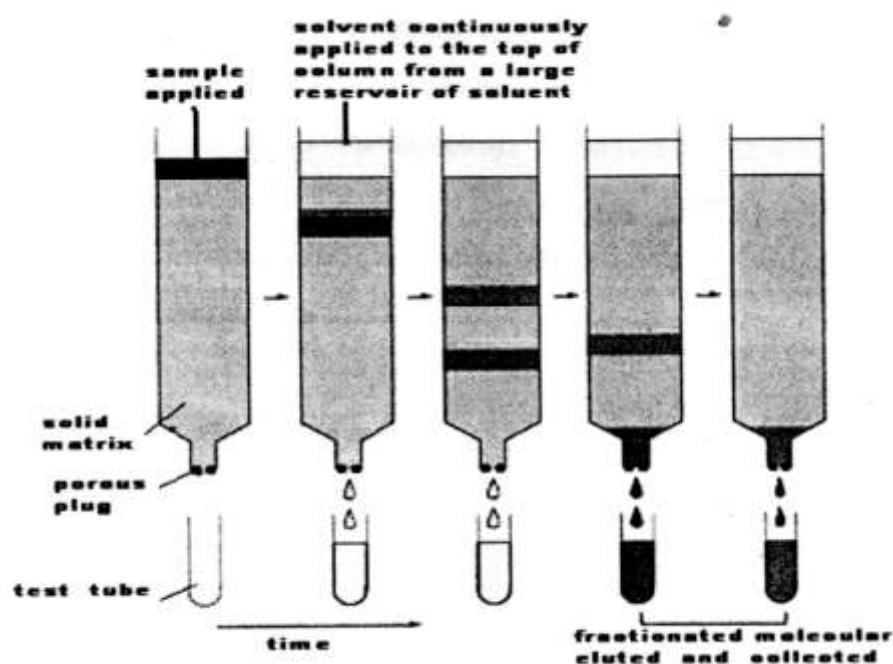
คอลัมน์โครมาโทกราฟี เป็นโครมาโทกราฟีที่มีสเตชันนารีเฟสเป็นของแข็งบรรจุในท่อแก้วที่เรียกว่า โครมาโทกราฟีคอลัมน์ (Column Chromatography) หรือเรียกอย่างง่ายว่า คอลัมน์ ซึ่งมีก๊อกปิด-เปิดที่ปลายด้านล่าง ส่วนโมบายเฟสเป็นตัวทำละลายที่เป็นของเหลว การเตรียมโครมาโทกราฟีคอลัมน์จะผสมสเตชันนารีเฟสและโมบายเฟสไว้ด้วยกัน ก่อนที่จะใส่ลงคอลัมน์

สำหรับคอลัมน์จะใส่ใยแก้วหรือสำลีไว้ด้านล่างสุดหลังจากนั้นจะใส่ตัวทำละลายลงไปตามด้วยสารผสมของสเตชันนารีเฟสกับโมบายเฟสที่เตรียมไว้เมื่อเปิดก๊อกให้ตัวทำละลายไหลลงด้านล่าง สเตชันนารีเฟสจะเคลื่อนที่ลงทำให้แน่นขึ้นการอัดตัวของสเตชันนารีเฟสต้องทำให้แน่นอย่างสม่ำเสมอ คอลัมน์จึงมีประสิทธิภาพสูงในทางปฏิบัติจึงมักจะใช้เครื่องสั่นตะกั่วที่คอลัมน์และไขให้ตัวทำละลายไหลออกจากคอลัมน์ในระยะเวลาหนึ่ง ทั้งนี้จึงต้องระวังไม่ให้ระดับของ ตัวทำละลายต่ำกว่าระดับของสเตชันนารีเฟสมิฉะนั้นจะเกิดฟองอากาศแทรกอยู่ทำให้การแยกไม่ได้ผลดีเท่าที่ควรสารที่นำมาแยกต้องเตรียมเป็นสารละลายที่เข้มข้นโดยใช้ตัวทำละลายชนิดเดียวกับโมบายเฟสถ้าสารนั้นไม่ละลายในโมบายเฟสจะเตรียมเป็นของแข็งโดยใช้ตัวทำละลายชนิดอื่นที่ละลายได้ก่อนจากนั้นนำมาผสมกับสเตชันนารีเฟสเล็กน้อยแล้วจึงระเหยเอาตัวทำละลายออกสารกับสเตชันนารีเฟสจะผสมกันอย่างทั่วถึงและมีลักษณะเป็นผงเมื่อใส่สารผสมลงในคอลัมน์แล้วจึงเปิดก๊อกเพื่อให้สารเคลื่อนที่ลงด้านล่าง ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 ภาพจำลองการเตรียมคอลัมน์ (สุนันทา วิบูลย์จันทร์ 2538)

การแยกสารจะเกิดที่สเตชันนารีเฟสเมื่อโมบายเฟสลงไปเรื่อย ๆ สารที่ต่างกันจะละลายในโมบายเฟสหรือจะเกาะติดกับสเตชันนารีเฟสได้ต่างกันจึงเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ไม่พร้อมกันเมื่อนำสารละลายที่ออกจากคอลัมน์แต่ละส่วนนำไประเหยตัวทำละลายออกจะทำให้ได้สารบริสุทธิ์ขึ้นในบางครั้งสารที่แยกได้อาจยังไม่บริสุทธิ์พอการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีซ้ำกันหลายครั้งจึงเป็นสิ่งจำเป็น



รูปที่ 2.13 การแยกสารด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี (<http://fig.cox.miami.edu>)

2.4.2.1 การ Partition chromatography

อาศัยคุณสมบัติการกระจายตัว (partition) ของสาร โดยสารแต่ละชนิดจะมี partition coefficient แตกต่างกัน

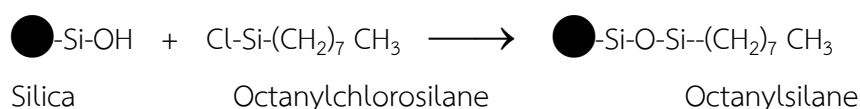
$$\text{Partition coefficient (K)} = \frac{\text{conc. of solute in stationary phase}}{\text{conc. of solute in mobile phase}}$$

ใน Partition chromatography สารที่เป็น stationary phase จะเคลือบอยู่บน solid support หรือ matrix เมื่อเอาตัวอย่าง load ลงบน column สารในตัวอย่างจะเคลื่อนที่ไปกับ mobile phase ในระหว่างที่ผ่าน stationary phase สารจะเกิดการ partition โดยสารที่ละลายได้ดีใน stationary phase จะเคลื่อนที่ช้ากว่าสารที่ละลายได้ดีใน mobile phase

Partition chromatography แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

ก. Normal-phase partition chromatography สารที่ใช้เป็น support มีคุณสมบัติเป็นสาร polar ได้แก่ silica gel, celite, cellulose powder, cross-linked dextran (Sephacrose® LH20) ดังนั้น stationary phase ที่ใช้จะต้องมีคุณสมบัติเป็นสาร polar เช่น น้ำ, Alcohol, acetonitrile ส่วนสารที่เป็น mobile phase มีคุณสมบัติ non-polar เช่น n-hexane เทคนิค normal-phase partition chromatography ใช้ในการแยกสาร polar solute ที่มีขนาดเล็กเช่น amino acids, fatty acids

ข. Reversed-phase partition chromatography สารที่เป็น support เป็นสาร chemically bonded support กล่าวคือถูกยึดด้วย hydrocarbon chain เช่น octadecyl (C18), octyl (C8) group ดังรูปที่ 2.14 ทำให้มีคุณสมบัติ non-polar สารที่เป็น stationary phase จึงเป็น



รูปที่ 2.14 ปฏิกิริยาการเกิด bonded stationary phase โดยสารประกอบ organochlorosilane ทำปฏิกิริยากับ OH group บน silica gel (www.centallab.msu.ac.th)

สารที่มีคุณสมบัติ non-polar ในขณะที่ mobile phase มีคุณสมบัติ polar เช่น น้ำ, methanol, acetonitrile เมื่อ solute ที่มีคุณสมบัติ non-polar เคลื่อนที่มากับ mobile phase จะเกิดการกระจายตัวได้ใน stationary phase มากกว่าสารที่มีคุณสมบัติ polar จึงเคลื่อนที่ออกจาก column ช้ากว่า ชนิดของ solute และคุณสมบัติการคงอยู่ (retained) กับ column แสดงในตารางที่ 1 สารที่เป็นกรดหรือเบสจะอยู่ใน column ที่เป็น normal phase ได้ดี ส่วน fluorocarbon ซึ่งมีคุณสมบัติ non-polar จะถูก retained ได้ดีใน column ชนิด reversed phase เทคนิคนี้ใช้ในการแยกสารที่มีคุณสมบัติ non-polar เช่น steroids, fat-soluble vitamins

2.4.3 โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC)

การวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นการรวบรวมการบวกรวมการแยกสารผสมและการตรวจวัดคุณสมบัติสารไว้ด้วยกันคือ เครื่องตรวจวัดสัญญาณจะต่อตรงกับคอลัมน์ปิดที่ปลายทั้งสองด้านมีรูเล็ก ๆ เปิดให้สารละลายผ่าน ภาชนะในคอลัมน์บรรจุอนุภาคตัวกลางที่มีลักษณะเป็นรูพรุนและมีขนาดเล็ก (1-5 ไมครอน) ในระบบจะมีแรงดันให้ของเหลวที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) และสารตัวอย่าง (สารผสม) ไหลผ่านอนุภาคตัวกลางที่อยู่ในคอลัมน์ ความแตกต่างของสารตัวอย่างและผิวหน้าของอนุภาคตัวกลางและผิวหน้า

เพิ่มเติมที่สามารถควบคุมอุณหภูมิ Column จึงเรียกว่า column thermostat คอลัมน์เป็นหัวใจของการแยกสารด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ซึ่งทำหน้าที่ในการแยกสารผสมออกจากกันเป็นสารแต่ละตัว HPLC column โดยทั่วไปมีความยาว 10-30 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3-4.6 มิลลิเมตร ซึ่งบรรจุวัสดุบรรจุมีอนุภาคขนาด 3-10 ไมโครเมตร ส่วนปลายทั้งสองของคอลัมน์ปิดด้วย stainless steel frits ซึ่งเป็นตาข่ายเล็ก ๆ ขนาด 2 ไมโครเมตร เพื่อป้องกันการรั่วของวัสดุบรรจุออกจากคอลัมน์ คอลัมน์ที่ใช้ใน HPLC มีขนาดต่าง ๆ กันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การใช้งาน ซึ่งได้แก่

- Preparative column มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในขนาด 100 มิลลิเมตร ความยาวคอลัมน์ 600 มิลลิเมตร คอลัมน์ชนิดนี้มักบรรจุวัสดุบรรจุที่มีขนาดใหญ่คือ ในช่วง 10-50 ไมโครเมตร อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่มักสูงกว่า 5 มิลลิลิตรต่อนาที

- Normal bore ใช้เป็น analytical column มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3.9-5.0 มิลลิเมตร แต่ส่วนใหญ่จะมีขนาด 4.6 มิลลิเมตร ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดนี้เหมาะสมกับความจุสารตัวอย่าง ปริมาตรของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้ ความเร็วและการแยกสาร อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่คือ 1.5-5 มิลลิลิตรต่อนาที

- Minibore column มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.1-3.9 มิลลิเมตร อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ในช่วง 500-1500 ไมโครลิตรต่อนาที

- Microbore column มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 1.0-2.1 มิลลิเมตร อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ในช่วง 100-500 ไมโครลิตรต่อนาที ทำให้ประหยัดวัฏภาคเคลื่อนที่นิยมใช้กับเครื่องตรวจวัดแมสสเปกโตรมิเตอร์ ซึ่งจะเพิ่มความไวในการตรวจวัดสำหรับสารที่มีปริมาณน้อย

- Capillary column มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 50ไมโครเมตร-1.0 มิลลิเมตร อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่อยู่ในช่วง 0.2-100 ไมโครลิตรต่อนาที จึงเรียกว่า nanobore column พื้นผิวภายในของคอลัมน์จะต้องเรียบมากที่สุด ดังนั้นจึงต้องใช้ glass-lined stainless steel หรือ fuse silica column แทน stainless steel column ซึ่งพื้นผิวภายในที่ทำให้เรียบได้ยาก

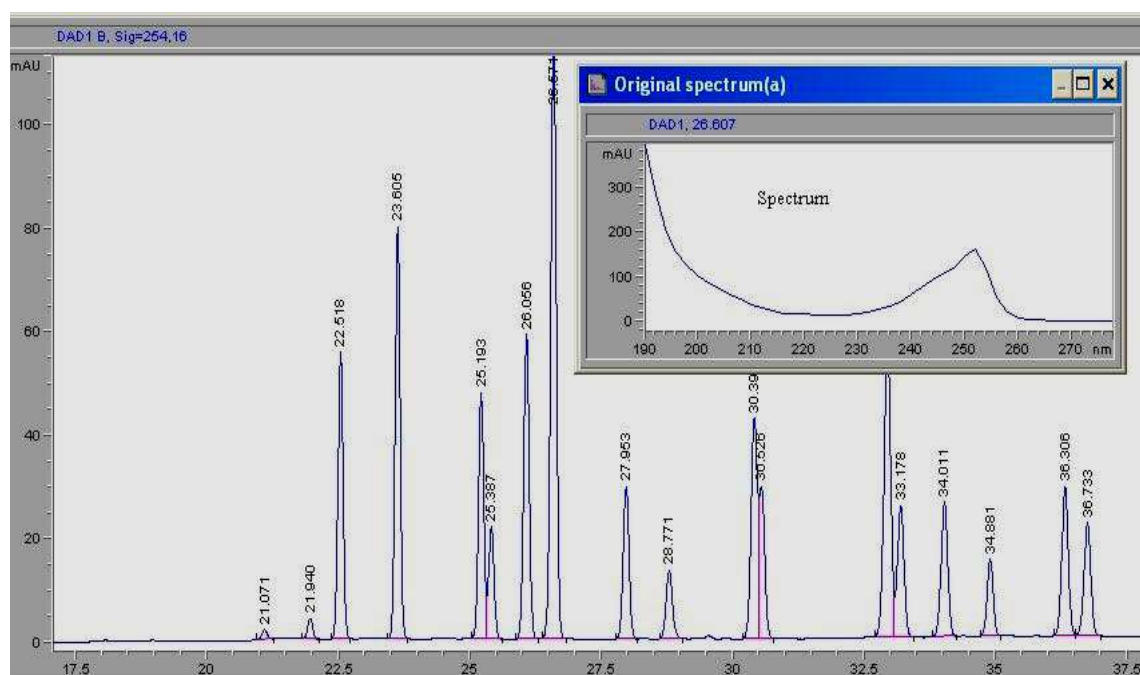
6. Detector : ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก มีหลายชนิดด้วยกัน การเลือกใช้ขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ Detector ชนิดไหนได้ดี โดยเครื่องตรวจวัดสัญญาณที่ดีควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

- มีความไว (sensitive) ต่อสารที่ต้องการตรวจวัดสูง
- การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรืออัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการตรวจวัด ทำให้สามารถใช้ใน gradient elution ได้
- Detector cell ควรมีปริมาตรน้อยเพื่อป้องกันการเกิด band broadening
- ไม่ทำลายสารตัวอย่าง
- มีความทนทาน ราคาไม่แพง และมีค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาต่ำ

- สัญญาณในการตรวจวัดเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณสารในช่วงความเข้มที่กว้าง

- มีสัญญาณรบกวนต่ำ และให้ baseline คงที่

ตัวอย่างเครื่องตรวจวัดสำหรับ HPLC ที่นิยมใช้คือ Diode array detector (DAD) เป็น detector ที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร สามารถวัดได้ทีละหลายความยาวคลื่นในเวลาเดียวกัน และวัดได้ตั้งแต่ 190-850 nm ระบบการเดินทางของแสงจะเป็นแบบย้อนแสง Reverse optics คือ แสงจากแหล่งกำเนิดแสง light source จะผ่านไปยัง flow cell ก่อนที่จะผ่านไปยัง monochromator คือ slit และ grating เมื่อแสงตกกระทบบน grating แสงจะกระจายออกเป็นความยาวคลื่นต่างๆ แล้วไปตกกระทบบนแผงของ Diode array ตรวจวัดสัญญาณออกมาเป็นโครมาโทแกรม Diode array detector สามารถเก็บข้อมูล spectrum ของพีคต่างๆ ของโครมาโทแกรมได้ด้วยตัวอย่างที่เหมาะสมกับ detector นี้ ต้องเป็นตัวอย่างที่สามารถดูดกลืนแสงได้

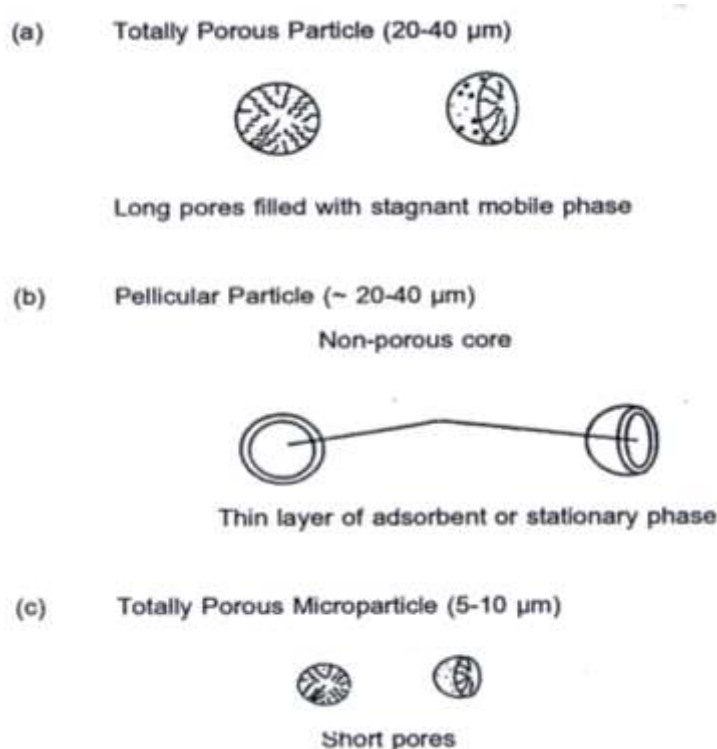


รูปที่ 2.16 ตัวอย่างโครมาโทแกรมโดยใช้ Diode array detector เป็นตัวตรวจวัด

(www.centallab.msu.ac.th)

2.4.3.2 วัสดุบรรจุ

วัสดุที่ใช้ใน HPLC ส่วนใหญ่จะเป็นอนุภาคขนาดไมโครเมตรที่มีรูพรุนและรูพรุนต่างกัน พื้นผิวของอนุภาคสามารถดัดแปลงทางภาพหรือทางเคมีเพื่อใช้ในวิธีต่าง ๆ (modes) ของโครมาโทกราฟีได้ ลักษณะของวัสดุบรรจุที่ใช้มีสามชนิดดังแสดงในรูป 2.16 ซึ่งในปัจจุบันที่นิยมใช้คือพวก totally porous microparticle เพราะมีประสิทธิภาพในการแยกสารความจุและความรวดเร็วในการวิเคราะห์ดีกว่า



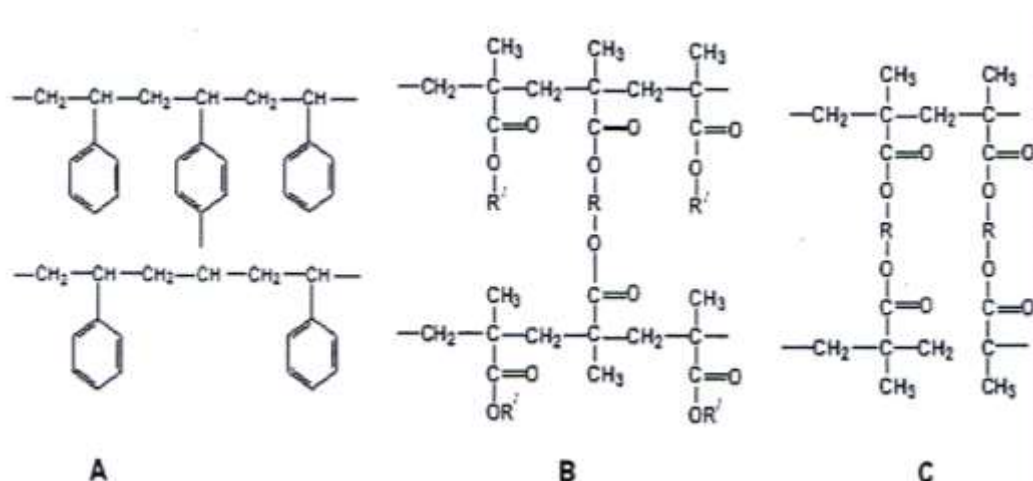
รูปที่ 2.17 ลักษณะทางกายภาพของอนุภาคของวัสดุภาคนิ่ง

(จุฑารัตน์ พิมพ์ทนต์, 2553)

ก. Silica-based packing material silica ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) เป็นวัสดุที่บรรจุในคอลัมน์ที่นิยมใช้กันมากที่สุด ประกอบด้วยร่างแห (network) ของ siloxane linkages (Si-O-Si) ต่อกันในรูปแบบ 3 มิติที่แข็งแรงและมีรูพรุนเชื่อมต่อกัน มีพื้นที่ผิวอยู่ในช่วง 100-800 ตารางเมตรต่อกรัม และขนาดของรูพรุนเฉลี่ย 4-33 ไมโครเมตร silica ที่ไม่ได้ดัดแปลงพื้นที่ผิวจะใช้เป็นวัสดุภาคนิ่งชนิด absorption chromatography Silica ชนิดรูพรุน (porous silica) นิยมใช้เป็นวัสดุพื้นฐานสำหรับ HPLC column เพราะทนต่อความดันสูงได้ (6000 psi) เข้ากันได้กับน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ใช้เป็นวัสดุภาคนิ่งที่ silica ยังสามารถใช้เป็นวัสดุพื้นเพื่อเตรียม bonded phase ชนิดต่าง ๆ โดยหมู่ฟังก์ชันเกิดพันธะกับหมู่ silanol ทำให้เกิดพันธะ Si-O-Si R ถ้าพวก

hydrocarbon เชื่อมต่อกับ silica ทำให้พื้นผิวของวัสดุบรรจุไม่มีขั้ว เหมาะสำหรับใช้เป็น reversed phase column ที่นิยมมากที่สุดคือ octadecylsilica (ODS, C_{18}) ซึ่งปัจจุบันมีถึง C_{30} Silica-based column ใช้สำหรับแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ข้อเสียของคอลัมน์ประเภทนี้คือ ต้องใช้วัฏภาคเคลื่อนที่และสารตัวอย่างใน pH ช่วง 2-8 เพราะถ้าใช้ pH ต่ำกว่า 2 siloxane linkage จะแตก และถ้า pH สูงกว่า 8 silica จะละลาย

ข. Polymer-based packing materials วัสดุบรรจุในคอลัมน์ที่ใช้พวก organic polymers เป็นวัสดุพื้น ในปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น polystyrene-divinyl benzene และ acrylic-based polymer ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic character) ใช้ใน reversed phase chromatography ข้อดีคือสามารถใช้กับวัฏภาคเคลื่อนที่และสารตัวอย่างใน pH ช่วง 1-14 แต่มีประสิทธิภาพในการแยกสารที่มีโมเลกุลต่ำได้น้อยกว่าพวก Silica-based column เนื่องจากมีพื้นที่ผิวน้อยกว่า ไม่ทนทานต่อความดันสูง



รูปที่ 2.18 แสดง resins ที่มีขายในท้องตลาด (A) คือ polystyrenes-divinylbenzene, (B และ C) คือ polymethacrylatebased copolymers (จุฑารัตน์ พิมพ์ทนต์, 2553)

2.4.3.3 คุณสมบัติของอนุภาคของวัสดุบรรจุ

ก. รูปร่างของอนุภาค (Partical shape) รูปร่างของอนุภาคของ silica เดิมจะมีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular shape) ซึ่งในปัจจุบันใช้งานใน preparative ส่วน analytical column ในปัจจุบันใช้อนุภาคที่มีรูปร่างทรงกลม (spherical shape) เพราะมีประสิทธิภาพสูง ความคงตัวดี และความดันกลับ (back pressure) จะมีน้อยกว่าอนุภาคที่มีรูปร่างไม่แน่นอน

ข. ขนาดของอนุภาค (Partical size) ขนาดของอนุภาคของวัสดุบรรจุเป็นตัวบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์ (number of theoretical plate, N) และความดันของคอลัมน์คือขนาดของอนุภาคลดลง ความดันและประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ถ้าต้องการคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพสูง

เพื่อแยกสารผสมที่ซับซ้อนต้องใช้อนุภาคที่มีขนาด 3 และ 4 ไมโครเมตร ถ้าใช้ในงานประจำเพื่อใช้ในการแยกสารตัวอย่างที่มีโครงสร้างต่างกันมากใช้อนุภาคขนาด 5 และ 7 ไมโครเมตร ถ้าใช้งาน preparative ต้องใช้อนุภาคขนาด 15-20 ไมโครเมตร

ค. ขนาดของรูพรุน (Pore size) ขนาดของรูพรุนของอนุภาคมักบอกเป็นค่าเฉลี่ย การเลือกขนาดของรูพรุนของอนุภาคจะต้องเลือกให้เหมาะกับขนาดของสารตัวอย่าง โดยทั่วไปถ้าขนาดของรู 100 Å หรือน้อยกว่าใช้สำหรับสารที่มีโมเลกุลต่ำกว่า 3000 ถ้าขนาดของรู 100 -300 Å ใช้สำหรับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 3000-10000 ถ้าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10000 รวมทั้งพวก peptides และ proteins ใช้อนุภาคที่มีขนาดรูพรุน 300 Å

ง. เส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ (Internal diameter of column) มีผลต่อปริมาณสารตัวอย่างที่จะฉีดเข้าคอลัมน์ (sample load) ถ้าคอลัมน์มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในใหญ่ ปริมาณสารที่ฉีดเข้าจะมีมากและมี flow rate สูง แต่ความไวในการตรวจวัดจะน้อยเพราะ peak dilution เพิ่มตามเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์จะอยู่ในช่วง 2-5 มิลลิเมตร พวก narrow-bore (or smaller) column มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร หรือน้อยกว่า ใช้สำหรับการวิเคราะห์ที่ต้องการความไวสูง เนื่องจากมีข้อจำกัดเกี่ยวกับปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้

จ. ความยาวของคอลัมน์ (Column length) มีผลต่อประสิทธิภาพและความเร็วของการแยกสาร คอลัมน์ยาวจะใช้เวลานาน ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะเพิ่มขึ้นตามความยาวของคอลัมน์ โดยทั่วไปการแยกสารที่ไม่ยุ่งยากจะใช้คอลัมน์สั้น ส่วนใหญ่จะมีความยาวอยู่ในช่วง 30-300 มิลลิเมตร

2.4.3.4 คุณสมบัติของคอลัมน์ HPLC ที่ดี

ก. อนุภาคของวัสดุบรรจุต้องเป็นพวก spherical ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในช่วง 3-10 ไมโครเมตร

ข. อนุภาคของวัสดุบรรจุจะต้องทนต่อความดันที่ใช้สำหรับ HPLC และต้องไม่พองตัวหรือหดตัวในวัฏภาคเคลื่อนที่

ค. อนุภาคของวัสดุบรรจุควรมีรูพรุนในช่วง 50-70 % และสูงถึง 80 %

ง. อนุภาคของวัสดุบรรจุไม่ควรมีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนน้อยกว่า 60 Å และควรมีขนาดของรูพรุนสม่ำเสมอ

จ. อนุภาคของวัสดุบรรจุควรมี mean pore diameter ในช่วง 60-1000 Å

ฉ. พื้นที่ผิวของอนุภาควัสดุบรรจุควรเหมือนกัน

ช. พื้นที่ผิวภายในอนุภาควัสดุบรรจุสามารถถูกดัดแปลงให้มีพื้นที่ผิวที่มีหมู่ฟังก์ชันต่าง ๆ ได้

ซ. อนุภาคของวัสดุบรรจุจะต้องไม่เกิดปฏิกิริยาเคมีภายใต้สภาวะของ pH และส่วนผสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

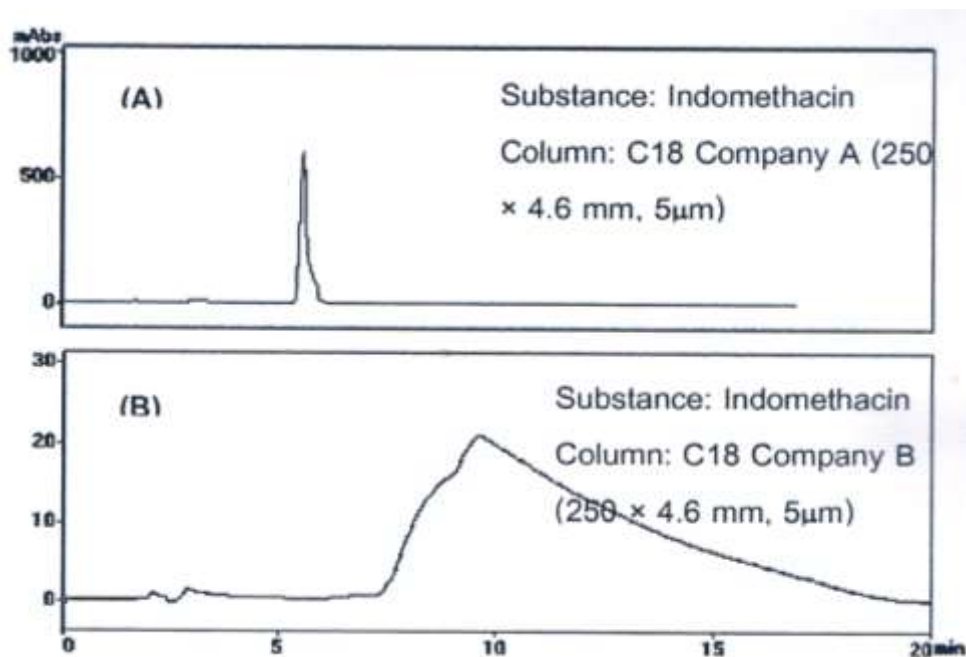
ณ. คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของวัสดุบรรจุแต่ละ batch และแต่ละบริษัท ควรจะเหมือนกัน (reproducible)

ญ. วัสดุที่ใช้ต้องมีขายในท้องตลาด ไม่แพง และต้องทราบคุณสมบัติทางเคมีด้วย

2.4.3.5 การเลือกคอลัมน์ HPLC (Selection of HPLC column)

ในการวิเคราะห์สำหรับตัวอย่างที่ไม่ซับซ้อนมากควรเริ่มต้นด้วยคอลัมน์ที่มีความยาว 10-15 เซนติเมตร เพื่อประหยัดเวลาการวิเคราะห์ ขนาดอนุภาคของวัฏภาคหนึ่งคือ 3 หรือ 5 ไมครอน อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ควรใช้ประมาณ 1-1.5 มิลลิลิตรต่อนาที วัฏภาคหนึ่งผลิตมาจากวัสดุหลายชนิด เช่น ซิลิกา อลูมินา โพลีเมอร์ วัสดุที่ใช้กันมากคือ ซิลิกา วัฏภาคหนึ่งในระบบ reversed-phase ที่นิยมใช้คือ octadecylsilane และ octylsilane ได้จากการนำซิลิกามาทำปฏิกิริยาเคมีกับ organosilane เพื่อเปลี่ยนให้วัฏภาคหนึ่งมีคุณสมบัติไม่ขั้วเพิ่มขึ้น วัฏภาคหนึ่งชนิด octadecylsilane และ octylsilane เรียกว่าวัฏภาคหนึ่งชนิด C18 และ C8 หรือคอลัมน์ชนิด C18 และ C8

คอลัมน์ชนิด C18 ที่ผลิตออกมาจากบริษัทต่าง ๆ มักจะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ขึ้นกับวิธีการผลิตและคุณภาพของวัสดุแต่ละบริษัท ทำให้คอลัมน์ C18 ของแต่ละบริษัทมีคุณสมบัติแตกต่างกัน เช่น surface area, pore diameter ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มีผลต่อเวลาที่คงอยู่ (retention time) และรูปร่างของพีค (peak shape)



รูปที่ 2.19 แสดงการแยกยา idomethacin โดยคอลัมน์ C18 Company A (A) และคอลัมน์ C18 Company B (B) (จุฑารัตน์ พิมพ์พันธ์, 2553)

จากตัวอย่างการฉีด idomethacin โดยคอลัมน์ C18 สองคอลัมน์ซึ่งมีคุณสมบัติต่างกันคือ C18 company A ซึ่งมี surface area $170 \text{ m}^2/\text{g}$, pore diameter $130 \text{ \AA}$ และ C18 company B ซึ่งมี surface area $390 \text{ m}^2/\text{g}$, pore diameter $105 \text{ \AA}$ และพบว่าเวลาที่คงอยู่ (retention time) ของ idomethacin ในคอลัมน์ที่มี surface area ของวัฏภาคนิ่งมากกว่าคือ C18 company B จะมีค่าสูงกว่า เมื่อเทียบกับคอลัมน์ที่มี surface area น้อยกว่า

2.4.3.6 การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของ HPLC

การวิเคราะห์โดยใช้ HPLC เป็นวิธางฟิสิกส์ที่ใช้แยกและวิเคราะห์สารผสม (mixture) สารที่แยกจะแพร่กระจาย (distribute) ระหว่าง 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคนิ่ง (stationary phase) และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) โครมาโทกราฟีอาศัยคุณสมบัติ like dissolve like คือ สารที่มีขั้วจะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว สารที่ไม่มีขั้วจะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นสารผสมซึ่งประกอบด้วยสารแต่ละชนิดที่มีขั้วต่างกันจึงเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่งด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน สารที่มีขั้วคล้ายวัฏภาคนิ่งจะเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคนิ่งได้เร็วกว่าและออกมาจากวัฏภาคนิ่งก่อน ทำให้เกิดการแยกกันระหว่างสารชนิดต่าง ๆ ในสารผสม สารที่ถูกแยกจะถูกวัดด้วยเครื่องวัด (detector) ที่เหมาะสม

ก. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพ (Qualitative analysis) การวิเคราะห์โดยใช้ HPLC สามารถใช้เป็นเทคนิคในการแยกสารเพื่อตรวจเอกลักษณ์ วัดปริมาณและสามารถแยกเก็บสารแต่ละชนิดรวมทั้งตรวจเอกลักษณ์ของสารที่แยกออกมาได้ ทำได้โดยเปรียบเทียบค่าเวลาของการคงอยู่ (retention time) ของสารสำคัญ (active ingredient) ของสารตัวอย่างกับค่าเวลาของการคงอยู่ของ

สารมาตรฐานโดยสารตัวอย่างและสารมาตรฐานจะต้องทำการวิเคราะห์โดยมีสภาวะต่างๆเหมือนกัน เช่น อุณหภูมิ ชนิดของคอลัมน์ ชนิดและอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ เป็นต้น สารที่ให้ค่าเวลาของการคงอยู่ต่างกันภายใต้การวิเคราะห์สภาวะเดียวกันแสดงว่าเป็นสารต่างชนิดกัน

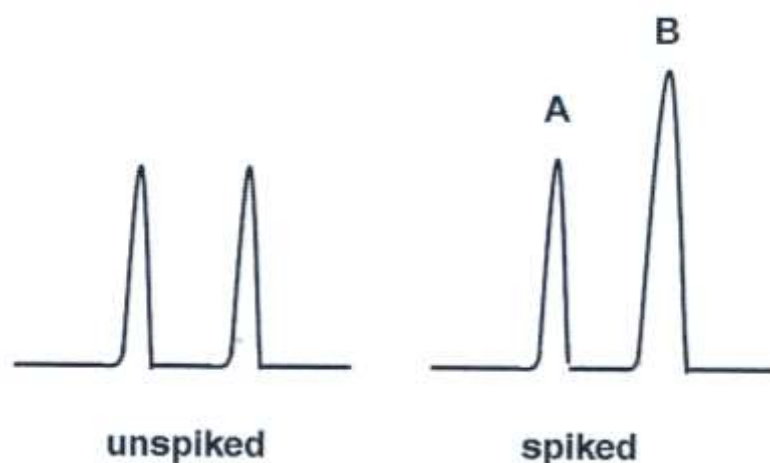
เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสาร

- เปรียบเทียบค่าเวลาของการคงอยู่ (retention time)

- เปรียบเทียบปริมาตรของการคงอยู่ (retention volume) ถ้าสารตัวอย่างให้ ปริมาตรของการคงอยู่ต่างจากสารมาตรฐาน เมื่อทำการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกันแสดงว่าเป็น สารต่างชนิดกัน แต่ถ้าปริมาตรของการคงอยู่เท่ากันสารตัวอย่างก็อาจเป็นสารชนิดเดียวกับสาร มาตรฐาน

- เปรียบเทียบ relative retention กับสารมาตรฐานอื่นที่ให้ค่าเวลาของการ คงอยู่ไม่ตรงกัน เช่น ต้องการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารตัวอย่างว่าเป็น cocaine หรือไม่ก็อาจใช้ codeine เป็นสารมาตรฐานที่สอง โดยเติม codeine ลงในสารมาตรฐาน cocaine และในสาร ตัวอย่างด้วย ฉีดสารผสมทั้งสองเข้า HPLC สารผสมละ 1-2 ครั้ง เปรียบเทียบอัตราส่วน retention time ของ cocaine กับ codeine ถ้าอัตราส่วนทั้งสองต่างกันแสดงว่าสารตัวอย่างไม่ใช่ cocaine ต้องเพิ่มความมั่นใจด้วยวิธีต่างๆที่กล่าวมาข้างต้น

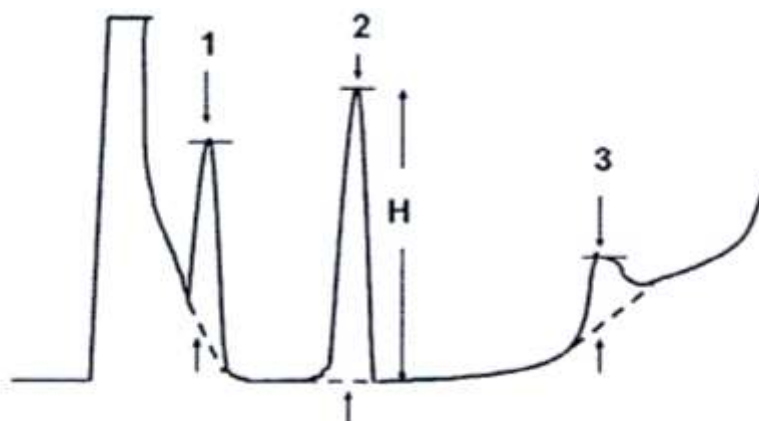
- Spiking ในกรณีนี้วิเคราะห์ด้วย HPLC แล้วแยกได้ 2 peak ถ้าทราบว่าเป็นสาร ตัวอย่างเป็นสารผสมของ A และ B แต่อยากทราบว่า peak ใดเป็นของ A peak ใดเป็นของ B สามารถทำได้โดยเติมสารมาตรฐาน A และ B ลงไป เช่น ถ้าเติมสาร B ลงไป peak ที่มีพื้นที่มาก หรือสูงขึ้นก็แสดงว่าเป็น peak ของสาร B ดังรูปที่ 2.19



รูปที่ 2.20 การวิเคราะห์ peak ด้วยเทคนิค spiking (จุฑารัตน์ พิมพ์พันธ์, 2553)

ข. การวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative analysis) หลังจาก HPLC แยกสารออกมาเป็น peak ปริมาณของสารในแต่ละ peak สามารถคำนวณ ได้ดังนี้

- โดยวัดความสูงของพีค (peak height) เทียบกับความสูงของพีคของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป เนื่องจากความสูงของพีคจะแปรตามปริมาณของสารที่ผ่านเข้าไปในเครื่อง ตรวจวัดความสูงของพีค (H) วัดจากระยะ baseline ถึงจุดสูงสุดของพีค (peak maximum) ดังแสดงในพีคที่ 2 ในรูปที่ 2.20 การวัด H ทำได้ง่ายและสะดวกโดยใช้ไม้บรรทัดวัด หรือได้จาก integration หรือ computer ซึ่งต่อกับเครื่องตรวจวัด กรณีที่ baseline drift สามารถแก้ไขโดยลาก baseline จากจุดที่เริ่มต้นถึงจุดสิ้นสุดของพีค ดังแสดงที่พีค 1 และ 3 ในรูปที่ 2.20 อย่างไรก็ตามการให้ค่าที่วิเคราะห์ได้มี precision ดี baseline ควรอยู่ในแนวราบดังแสดงที่พีค 2



รูปที่ 2.21 แสดงการวัดความสูงของพีค (จุฑารัตน์ พิมพ์พันธ์, 2553)

เมื่อใช้วิธีนี้ต้องควบคุมไม่ให้อัตราการไหล (flow rate) ของวัฏภาคเคลื่อนที่เปลี่ยน เนื่องจากมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของพีค ซึ่งทำให้ความสูงของพีคมีรูปร่างเปลี่ยนไป นอกจากนี้ห้ามใช้กับพีคที่มี tailing และพีคที่มีลักษณะกว้าง (broad peaks) เพราะจะทำให้ค่าที่คำนวณได้ไม่ถูกต้อง

- โดยการวัดพื้นที่พีค (peak area) เทียบกับพื้นที่พีคของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่ฉีดเข้าไป ซึ่งให้ผลแม่นยำกว่าวิธีแรก

โดยสรุปสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อวิเคราะห์สาร สิ่งที่สำคัญที่สุดคือการตั้งสภาวะเริ่มต้นของวัฏภาคเคลื่อนที่ให้เหมาะสมกับชนิดของตัวอย่างโดยพิจารณาเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่เข้ากันได้กับคอลัมน์และน้ำหรือบัฟเฟอร์ แนวทางตั้งต้นในการเลือกสภาวะเริ่มต้นของวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับวิเคราะห์ด้วยระบบ reversed phase กรณีที่ใช้บัฟเฟอร์ต้องพิจารณาเลือกบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมทั้งชนิดและความเข้มข้น ส่วนการปรับหรือ optimization เพื่อให้ได้การแยกที่ดีนั้นสิ่งที่ทำได้มากที่สุดคือ การปรับวัฏภาคเคลื่อนที่ทั้งชนิดและองค์ประกอบความเข้มข้น รวมทั้ง pH การพิจารณาเปลี่ยนคอลัมน์ใหม่อาจทำได้ยากและใช้เวลา

2.5 สูตร Spraying reagent (เสรี ไตรรัตน์, 2520)

2.5.1 10% Sulfuric acid

ผสมกรดกำมะถัน เข้มข้น 5-10 มิลลิลิตร ในใน ethanol หรือ butanol ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร หลังจากการพ่นด้วยน้ำยาแล้ว ให้อบแผ่นที่แอลซีที่ 105°C เป็นเวลา 10-15 นาที ใช้ตรวจสอบสารกลุ่ม steroids, saponins, cardiac glycosides, alkaloids, lipids

ผลบวกจะให้สีม่วงแดง สีแดงอิฐ สีน้ำเงิน เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติและเรืองแสงสีต่างๆ เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

2.5.2 Anisaldehyde - sulfuric acid reagent

1. ละลาย anisaldehyde 0.5 มิลลิลิตร ใน glacial acetic acid 10 มิลลิลิตร

2. เติมน Methanol 85 มิลลิลิตร

3. ก่อนใช้ให้เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 5 มิลลิลิตร

4. หลังจากการพ่นด้วยน้ำยาแล้ว ให้อบแผ่นที่แอลซีที่ 105°C เป็นเวลา 15 นาที

ใช้ตรวจสอบกลุ่มสาร steroids , prostaglandins, carbohydrates, phenols, glycosides, (cardiac glycosides, diterpene glycosides) saponins, น้ำมันหอมระเหย

ผลบวกจะได้สีม่วงแดงสีแดงอิฐสีน้ำเงิน เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติ และเรืองแสงสีต่างๆ เมื่อตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

2.5.3 ferric chloride reagent

สารละลาย aqueous 100%

ใช้ตรวจสอบสาร oleuropein และ hop bitter principles.

2.5.4 Bartons reagent

1. สารละลาย A 1 กรัม potassium hexacyanoferrate (III) 100 มิลลิลิตร ในน้ำ
2. สารละลาย B 2 กรัม iron III chloride 100 มิลลิลิตร ในน้ำ
3. ผสม สาร A และ B ในอัตราส่วน 1:1 ก่อนนำไปฉีดพ่น

ใช้ตรวจสอบสารกลุ่ม gingerols (zingiberis rhizome)

2.5.5 Natural product reagent

1. สารละลาย A 1 % diphenyl boric acid - β - ethyl amino ester ใน methanol 10 มิลลิลิตร

2. สารละลาย B 5 % Polyethylene glycol ใน ethanol

3. ผสม สาร A และ B ในอัตราส่วน 1:1 นำไปฉีดพ่น แล้วส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 356 นาโนเมตร

ใช้ตรวจสอบสารกลุ่ม flavonoids, carbohydrates, anthocyanidins, hydroxyl- และ methox-cinnamic acid

ผลบวกจะให้การเรืองแสงสีต่างๆ อัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 356 นาโนเมตร

2.5.6 DPPH reagent

ละลาย 0.1% 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical ใน methanol 100 มิลลิลิตร

ใช้ตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ผลบวกจะได้สีชาบนแผ่นที่แอลซีเมื่อตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติ

2.5.7 Dragendorff reagent

1. สารละลาย A ละลาย basic bismuth nitrate 0.85 กรัม ในส่วนผสมของ acetic acid 10 มิลลิลิตร และน้ำ 40 มิลลิลิตร

2. สารละลาย B ละลาย potassium iodide 16 กรัม ในน้ำ 40 มิลลิลิตร

3. ผสม สาร A และ B ในปริมาณที่เท่าๆกัน เก็บใส่ขวดสีชาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

ใช้ตรวจสอบสารกลุ่ม alkaloids

ผลบวกจะให้สีส้มเมื่อตรวจสอบภายใต้แสงธรรมชาติ

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) (โอภา วัชรคุปต์, 2549)

อนุมูลอิสระ (Free Radicle) คือ โมเลกุลที่มีธาตุที่ไม่มั่นคงเนื่องจากขาดอิเล็กตรอน ไป 1 ตัว ปกติแร่ธาตุทั้งหลายในร่างกายของเรามีอิเล็กตรอนอยู่รอบเป็นจำนวนคู่ ซึ่งทำให้โมเลกุลนั้นคง

ตัวในกรณีที่มีการสูญเสีย อิเล็กตรอน หรือรับ อิเล็กตรอน มาอีกเพียง 1 ตัวจะทำให้โมเลกุลนั้นไม่มั่นคง กลายเป็นตัวอันตรายและตัวเจ้าปัญหาคือพอเจอใครเขาดี ๆ ก็แย่ง อิเล็กตรอน มาจากเขาแทน 1 ตัว ผู้ถูกแย่งก็กลายเป็นตัวเจ้าปัญหาแทนเพราะตนไม่มั่นคง ต้องไปแย่งคนอื่นมาเป็นทอด ๆ ยกเว้นตัวที่ไม่มั่นคง 2 ตัวมาเจอกันก็จะรวมกันกลายเป็นมั่นคงก็หมดเรื่องไป ตัวอย่างของอนุมูลอิสระ ได้แก่ O_2^- Superoxide anion อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์, OH^- Hydroxylradicle อนุมูลไฮดรอกซิล, ROO Peroxy radicle อนุมูลเปอร์ออกซี, H_2O_2 Hydrogen Peroxide ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้ยังมีอีกจำนวนมากอนุมูลอิสระจึงเป็นสารพิษต่อเซลล์ร่างกาย ถ้ามีมาก ในเซลล์ก็เป็นอันตรายได้โดยจะทำลายดีเอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์ และอื่น ๆ แต่เซลล์ร่างกายพวกเม็ดเลือดขาว ก็ใช้สารพวกนี้กำจัดแบคทีเรีย หลังจากที่เซลล์กินแบคทีเรียเข้าไปในตัวแล้ว อนุมูลอิสระเชื่อว่า มีผลต่อการอักเสบ และการทำลายเนื้อเยื่อในระยะสั้น ในระยะยาวอาจมีผลต่อ ความเสื่อมหรือการแก่ของเซลล์ และอาจเป็นสารการก่อมะเร็ง และโรคหัวใจ ต้อกระจกอนุมูลอิสระ มีที่มาจากแหล่งภายนอกในร่างกาย ได้แก่ มลพิษในอากาศ โอโซน ไนโตรสออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ ฝุ่น ควันบุหรี่ อาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว (แก้วได้โดยใส่วิตามิน อี ลงไปด้วย) หรือธาตุเหล็กมากกว่าปกติ แสงแดด ความร้อน รังสีแกมมา ยาบางชนิด เช่น Doxorubicin , Penicillamine, paracetamol, CCl_4 เป็นต้น และแหล่งภายในร่างกายได้แก่ ออกซิเจน เป็นต้น

ร่างกายก็มีกลไกที่จะกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้โดย 2 วิธี คือ ใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ในร่างกายเช่น Superoxide dismutase (SOD) และไมใช้เอนไซม์ ได้แก่ วิตามิน อี และ วิตามิน ซี เนื่องจากมีผู้สังเกตว่า เอนไซม์ต่างๆที่ใช้กำจัด อนุมูลอิสระ เช่น SOD มีได้จำกัด แต่สารที่เราสามารถทานเสริมได้แก่ วิตามิน อี วิตามิน ซี เบต้าแคโรทีน ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือมีอีกชื่อว่า Antioxidant เนื่องจาก เบต้าแคโรทีนมีมากในผักและผลไม้บางชนิด จึงมีการสนับสนุนให้ทานสิ่งเหล่านี้เพิ่มมากขึ้น โดยมีความเชื่อว่าอาจลดการก่อมะเร็ง ลดการเป็นโรคหัวใจ ชาติเลือดและ โรคอื่น ๆ สำหรับอาหารที่มีเบต้าแคโรทีนสูง ได้แก่ ผักใบเขียว (เช่น ตำลึง และ ผักบุ้ง) อาหารที่มีสีเหลือง(เช่น มะละกอสุก มะม่วงสุก มะเขือเทศ ฟักทอง) อาหารที่ให้วิตามินซีสูง คือ พืช ผักสีเขียวและผลไม้รสเปรี้ยว เช่น ตำลึง ผักบุ้ง พริกหยวก ส้ม มะนาว สับปะรด เป็นต้น ส่วนวิตามิน อี มีในน้ำมันพืชต่าง ๆ รายงานที่บอกว่าการทานผักและผลไม้สามารถลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งมีมากมายซึ่งคิดว่ากลไกทั้งด้านที่ผักและผลไม้มีสารกาเบียมมากซึ่งจะช่วยทางด้านลดมะเร็งลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้กลไกทางด้านต้านอนุมูลอิสระก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งของการลดความเสี่ยงของโรคมะเร็ง ตัวอย่างรายงานเหล่านี้มีมาก เช่น ผักและผลไม้ลดความเสี่ยงต่อมะเร็งกระเพาะอาหารได้ ถึง 5.5 เท่าซึ่งรายงานนี้ก็ป็นรายงานใหญ่ในการศึกษาแบบติดตามคนไข้ถึง 11,546 คนเป็นเวลาถึง 25 ปี ผักและผลไม้ลดความเสี่ยงต่อมะเร็งปอด ก็มีรายงานเช่นกัน บางรายงานตรวจสอบชัดเจนไปถึงชนิดของผักด้วยเช่นพบว่า ผักที่มีสีเหลืองเช่น แครอท มันฝรั่ง พบว่าลดมะเร็งของปอดได้มากกว่าผักชนิดอื่นเป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานใหญ่ที่ติดตามการเป็นมะเร็งของประชากร 10,068 คน เป็นเวลาถึง 19 ปีในจำนวนนี้พบมะเร็งปอด 248 คน พบว่าการทานผักและผลไม้ที่มีวิตามิน เอ หรือ เบต้าแคโรทีนจะสามารถลดความเสี่ยงของ

มะเร็งปอดได้ การทานผักและผลไม้ที่มี เบต้าแคโรทีน วิตามิน ซี วิตามิน อีสูงสามารถที่จะลดอุบัติการณ์การ เป็นมะเร็งเต้านมได้จริง ในสตรีวัยเจริญพันธุ์ จากการติดตาม คนไข้ 83,234 คน เป็นเวลา 14 ปี สำหรับมะเร็งชนิดอื่น เช่น มะเร็งต่อมลูกหมากพบว่าการทานผักและผลไม้ไม่ช่วยลดความเสี่ยงแต่อย่างใดแต่มะเร็งกระเพาะปัสสาวะลดความเสี่ยงได้ด้วยการทาน ผักประเภท บรอกเคอรี่ และหัวผักกาด นอกจากนี้ผักและผลไม้ที่มี เบต้าแคโรทีนสูงก็มีผลต่อการลดอุบัติการณ์ของโรคหัวใจขาดเลือดได้จริง จากการวิจัยย้อนหลังในคนไข้ 4,802 คนติดตามไป 4 ปี มีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากได้พยายามศึกษาและรายงานผลของการทานสารต้านอนุมูลอิสระคือวิตามินอี วิตามินซี และ เบต้าแคโรทีน โดยตรง ดูว่าจะลดความเสี่ยงต่อโรคต่าง ๆ เช่นมะเร็งต่าง ๆ โรคหัวใจ และโรคอื่นอีกหรือไม่ โดยมีทั้งรายงานที่สนับสนุนผลดีและรายงานที่บอกว่าไม่ได้ผลก็มีเช่นการทานวิตามินเอ วิตามินอี และ วิตามินซี โดยตรงก็สามารถลดความเสี่ยงมะเร็งได้เช่นกัน แต่ไม่มากนักและ

การทานวิตามินตามินเหล่านี้ในปริมาณที่มากกว่าความต้องการของร่างกาย ในแต่ละวันกลับไม่ช่วยลดอุบัติการณ์ของการเป็นมะเร็งปอด การทานเบต้าแคโรทีน วันละ 30 มก.และ วิตามินซี 500 มก. เป็นเวลา 2 ปี ไม่มีผลป้องกันการเปลี่ยนแปลงเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติไป สู่การเป็นเซลล์มะเร็ง แสดงว่าไม่มีผลดีทางด้านนี้ การทานสารต้านอนุมูลอิสระ คือ วิตามินซี วิตามินอี ก็ยังไม่มีรายงานว่ายับยั้งโรคประสาทตาเสื่อมได้ ซึ่งจากการติดตามผู้ป่วย 21,120 คน เป็นเวลา 12.5 ปี จากการวิเคราะห์โดยรวมเฉพาะการวิจัยที่ติดตามผลหรือมีการทดลองที่ชัดเจนพบว่าไม่มีเพียงวิตามินอี เท่านั้นที่อาจมีบทบาทในการป้องกันโรคหัวใจขาดเลือดและลดอัตราการตาย ในโรคหัวใจได้ส่วน เบต้าแคโรทีน และ วิตามินซี ไม่มีดีผลที่ชัดเจน และผลดีนี้ ไม่เกี่ยวกับกลไกทางด้านไขมันในเลือดและความดันโลหิตสำหรับ เบต้าแคโรทีนนั่นแม้จะพบว่า อาหารที่มีเบต้าแคโรทีนมีผลต่อการลดอุบัติการณ์ของโรคหัวใจขาดเลือดได้จริง แต่เมื่อให้สารสกัดเบต้าแคโรทีนโดยตรงต่อผู้ป่วยก็ยังไม่พบผลดีชัดเจนต่อโรคหัวใจสำหรับวิตามินซีมีเพียงการการวิจัยแบบวิเคราะห์ย้อนหลังที่พบว่าวิตามินซีอาจมีผลดี ต่อการลดความเสี่ยงโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จากการค้นพบว่าวิตามินอี อาจมีผลต่อการลดความเสี่ยงของโรคหัวใจขาดเลือดโดยลดอัตราการตายได้ ก็เริ่มมีการวิจัยโดยมีการทดลองที่มากขึ้นโดยทดลองในคนไข้ 2,000 คนเป็นเวลาปีกว่า ก็พบว่าวิตามินอี ลดอุบัติการณ์ของโรคหัวใจขาดเลือดจริง แต่ก็มีผลน้อยมาก และจากการทดลองในรายงานหลังก็พบว่า เบต้าแคโรทีนกลับไม่มีผลดีอันนี้

2.7 เชื้อแบคทีเรีย (อุณหภูมิลักษณะ สุกซ์ตตะ, 2548)

2.7.1 *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1.2 ไมครอน ส่วนใหญ่มีการเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งน บางครั้งอาจพบเดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ ได้ เชื้อนี้ไม่มีแฟกเจลลาไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ เนื่องจาก *S. aureus* มีชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของผนังเซลล์ที่หนาและมีกรดไตรโคริกกระจายอยู่ทั่วไปทำให้ผนังเซลล์แข็งแรงถูกทำลายได้ด้วยกรดเข้มข้นและไลโซซิมเท่านั้น ชั้นของเปปติโดไกลแคนนี้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน

อลมีความจำเพาะสำหรับ *S. aureus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ถัดจากชั้นเปปติโดไกลแคนเป็นชั้นของโปรตีน *S. aureus* เกือบทุกสายพันธุ์จะมีโปรตีน A สามารถนำไปใช้ในการพิสูจน์และแยกสายพันธุ์เชื้อได้ นอกจากนี้ *S. aureus* บางสายพันธุ์มีแคปซูลทำให้เชื้อไม่ถูกจับกินโดยกระบวนการกินของเซลล์ เชื้อ *S. aureus* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาที่ 37 องศาเซลเซียส หรือช่วงอุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) และเจริญได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic) สามารถทนความแห้งและความร้อนได้ดี และสามารถเจริญได้ดีที่ pH 4.5-9.3 แต่ที่ดีที่สุดคือ pH 7.0-7.5 ลักษณะโคนิกลม นูน ขอบเรียบ เป็นเงาขนาด 1-4 มิลลิเมตร สามารถสร้างรงควัตถุสีเหลืองทำให้เห็นโคลินีสีเหลืองทอง เกือบทุกสายพันธุ์สลายเม็ดเลือดแดงได้ซึ่งเมื่อเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเลือดจะเห็นวงใสรอบ ๆ โคลินี เชื้อนี้สามารถย่อยน้ำตาลได้หลายชนิดผลผลิตจากการย่อยน้ำตาลจะได้เป็นกรดแลคติก นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง (15 % NaCl) ซึ่งต่างจากแบคทีเรียทั่วไป เชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อก่อโรคในคน โดยแหล่งของเชื้อมาจากธรรมชาติและบาดแผลที่ติดเชื้อ หรือคนปกติที่เป็นพาหะของ *S. aureus* คนปกติเป็นพาหะของเชื้อนี้ได้ถึง 25 % โดยส่วนใหญ่พบเชื้อได้ในบริเวณระบบทางเดินหายใจส่วนต้น ในคนที่เป็นพาหะอาจพบเชื้อได้ถึง 10^3 - 10^4 เซลล์ และอาจพบเชื้อได้มากกว่าหนึ่งสายพันธุ์ในคนเดียว เชื้อสามารถปนเปื้อนตามร่างกายของคนปกติได้ตั้งแต่แรกเกิดจนถึงเป็นผู้ใหญ่ สำหรับ *S. aureus* พบว่าทำให้เกิดโรคในอวัยวะและเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของร่างกาย พบได้บ่อยที่สุดคือ การติดเชื้อที่ผิวหนัง เริ่มต้นจะเป็นการอักเสบเฉพาะที่ ต่อมาจะมีการคั่งของเม็ดเลือดขาวและการเน่าตายของเนื้อเยื่อกลายเป็นการอักเสบแบบมีหนอง (phlogogenic infection) บางครั้งเชื้อสามารถแพร่กระจายไปทางท่อน้ำเหลือง หรือทางกระแสโลหิตทำให้เกิดการติดเชื้อที่อวัยวะส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้

2.7.2 *Escherichia coli*

เชื้ออีโคไล (*E. coli*) หรือเรียกชื่อเต็มๆ ว่า เอสเชอริเชียโคไล (*Escherichia coli*) เป็นเชื้อแบคทีเรีย (bacteria) ชนิดหนึ่งในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีรูปร่างยาวเรียวยาวเป็นแท่ง (rod) และสามารถอยู่ได้โดยไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic) ความจริงแล้วแบคทีเรียชนิดนี้มีอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์หลายชนิด เช่น วัว ม้า หมู แบคทีเรียชนิดนี้มีหลากหลายสายพันธุ์มาก และมีทั้งชนิดที่ “ก่อโรค” และ “ไม่ก่อโรค” เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้อยู่ในลำไส้คนและสัตว์ มันจึงออกมากับอุจจาระและสามารถปนเปื้อนไปในสิ่งแวดล้อมและอาหารด้วย แบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้และปนเปื้อนออกมากับอุจจาระนี้หลายๆ ชนิดรวมกันจะเรียกว่าแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform bacteria) ในการตรวจคุณภาพของน้ำนั้น สำหรับบางแห่งที่มีความเสี่ยง เช่น น้ำเสียจากโรงพยาบาล หรือน้ำที่จะเอาไปใช้ทำน้ำดื่ม นักวิทยาศาสตร์ที่ทำหน้าที่ควบคุมคุณภาพน้ำ ก็จะต้องตรวจดูปริมาณของเจ้าแบคทีเรียโคลิฟอร์มนี้ด้วย ในการตรวจคุณภาพของอาหาร เพื่อความปลอดภัยก็อาจจะมีการสุ่มตรวจดูปริมาณปนเปื้อนของแบคทีเรียพวกนี้ด้วย

สำหรับอีโคไลชนิดที่ไม่ก่อโรคนั้น มันมีอยู่ในลำไส้ของเราทุกคนอยู่แล้ว ในสภาวะปกติมันก็อยู่ของมันไปอย่างนั้น อาจไม่เกิดประโยชน์แต่ก็ไม่ก่อโทษอะไร ในเรื่องการสร้างประโยชน์ของแบคทีเรียชนิดนี้อาจมีบ้าง เช่น มีความพยายามของนักวิจัยทางการแพทย์บางกลุ่ม ที่จะเอาเจ้าแบคทีเรียนี้บางสายพันธุ์ไปทำเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติก (probiotic) คือแบคทีเรียที่สร้างประโยชน์ต่อลำไส้คล้ายๆ กับที่มีอยู่ในโยเกิร์ตหรือนมเปรี้ยวทำนองนั้น แต่เอาเข้าจริงการผลิออกมาใช้ในวงการแพทย์ปัจจุบันก็ยังไม่ได้รับความนิยม

ส่วนเชื้อที่ก่อโรคแบคทีเรียคือเชื้อแอนติเจน (antigen) ซึ่งเป็นสารเคมีที่อยู่รอบเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่จะแตกต่างกันไป แอนติเจนหลักๆ ที่ใช้แบ่งแยกแบคทีเรียอีโคไลแต่ละสายพันธุ์ก็คือ O antigen ซึ่งเป็นส่วนของเยื่อไขมันโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide layer) และ H antigen ที่เป็นสารเคมีที่ส่วนหางแบคทีเรีย (flagellin) เช่น แบคทีเรียอีโคไลสายพันธุ์หนึ่งที่มีกพบก่อโรคได้บ่อยคือสายพันธุ์ O157:H7 เป็นต้น สายพันธุ์ก่อโรคที่มีอยู่นับร้อยสายพันธุ์นี้ ทำให้เกิดอาการอย่างเดียวกันคือทำให้เกิดโรค “ท้องเสีย” แต่ความรุนแรง และอาการร่วมของการเกิดท้องเสียที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียอีโคไลแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกัน ในบรรดาสายพันธุ์ที่ก่อโรคนั้น ในวงการแพทย์ได้ทำการจัดกลุ่มเอาไว้ ตามกลไกการก่อโรคและลักษณะอาการของผู้ป่วยที่เกิดขึ้น แบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆ หลายกลุ่ม ดังต่อไปนี้

2.7.2.1 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ก่อโรคโดยการปล่อยสารพิษออกมาจากเซลล์เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียได้บ่อยมาก ทั้งในเด็ก ผู้ใหญ่ รวมถึงโรคท้องเสียในนักท่องเที่ยว (traveler diarrhea) อาการถ่ายท้องที่พบบ่อยมักถ่ายเหลวเป็นน้ำ ไม่มีเลือดปน ไม่มีไข้ แม้กลไกก่อโรคจะดูไม่รุนแรง แต่ถ่ายมากๆ จนร่างกายขาดน้ำและช็อกแล้ว ก็ทำให้เสียชีวิตได้เหมือนกัน

2.7.2.2 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) อีโคไลก่อโรคกลุ่มนี้ ทำให้เกิดอาการท้องเสียลักษณะคล้ายๆ กับกลุ่ม ETEC แต่กลไกการก่อโรคจะแตกต่างกัน คือพวกมันจะยึดเกาะติดกับเซลล์ลำไส้ และจะปล่อยสารพิษชนิดหนึ่งกับกลุ่ม ETEC เข้าไปในเซลล์ลำไส้ ทำให้เซลล์ลำไส้เกิดการอักเสบขึ้นด้วย

2.7.2.3 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เป็นกลุ่มที่ก่ออาการที่ร้ายแรงขึ้นอีก เนื่องจากอีโคไลกลุ่มนี้ มีความสามารถในการรุกรานเซลล์ลำไส้ ทำลายเซลล์ลำไส้และก่อให้เกิดการอักเสบต่อเซลล์ลำไส้อย่างรุนแรง อาการท้องเสียที่เกิดขึ้นมักจะมีไข้ร่วมด้วย ถ่ายมีมูกเลือดปนออกมา และมีอาการปวดบิดท้อง

2.7.2.4 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ก่ออาการร้ายแรงที่สุด เนื่องจากอีโคไลกลุ่มนี้สามารถยึดติดกับเซลล์ลำไส้ และปล่อยสารพิษที่มีพิษรุนแรงออกมา สารพิษในกลุ่มนี้จะมีลักษณะคล้ายกับของเชื้อก่อโรคบิด (Shiga-like toxin) อาการที่เกิดขึ้นจะทำให้ท้องเสีย มักไม่มีไข้ แต่ถ่ายเป็นเลือดหรือมีเลือดปน และสารพิษที่ปล่อยออกมานี้ยังก่อให้เกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า Hemolytic Uremic Syndrome หรือ HUS ซึ่งประกอบด้วยภาวะโลหิตจาง (anemia) เกร็ดเลือด

ต่ำ (thrombocytopenia) และไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure) เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตได้มาก

แบคทีเรียอีโคไลสายพันธุ์ที่แพร่ระบาดในทวีปยุโรปเมื่อเดือน มิถุนายน - กรกฎาคม พ.ศ. 2554 ที่ผ่านมาคือสายพันธุ์ O104:H4 ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม EHEC จึงทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยที่ และมีผู้เสียชีวิตจำนวนมาก อีโคไลที่ก่ออาการรุนแรงได้บ่งชี้สายพันธุ์หนึ่งคือ O157:H7 ก็อยู่ในกลุ่ม EHEC เช่นกัน อีโคไลในกลุ่ม EHEC นั้น บางทีก็เรียกว่า Shiga-like Toxin Producing E.coli (STEC) หรืออาจเรียก Verotoxin-producing E.coli (VTEC) หรือเรียก Hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic E.coli (HUSEC) ก็ได้ อีโคไลกลุ่มนี้ก่ออาการรุนแรงเนื่องจากมันปล่อยสารพิษชื่อชิกา (Shiga-like toxin) ออกมา ทำให้อาการรุนแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้

2.7.3 Bacillus cereus

กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ ประกอบด้วย 2 จินัส คือ *Bacillus* และ *Clostridium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อมีลักษณะเป็นรูปท่อนยาว 3-8 ไมโครเมตร ในสภาพที่สร้างสปอร์จะทนความร้อนสารเคมีได้ดี วิธีทำลายเชื้อที่ได้ผลโดยการนิ่งอัดความดันที่ 15 ปอนด์ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เชื้อส่วนใหญ่ดำรงชีวิตเป็นแซโพรไฟต์ อยู่ดิน น้ำ พืชผัก มีบางชนิดอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่ทำให้เกิดโรคกับคน เนื่องจากเชื้อมีความรุนแรงในการก่อโรค

2.7.3.1 *Bacillus* เป็นเชื้อแบคทีเรียรูปท่อนแกรมบวก แอโรบหรือแฟคัลเตติฟแอนแอโรบที่สร้างสปอร์ได้ มีอยู่ 34 สปีชีส์ เฉพาะ *Bacillus anthracis* เป็นเชื้อโรคแอนแทรกซ์ (anthrax) ส่วนสปีชีส์อื่นพบในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ ฝุ่นละออง *Bacillus cereus* อาจปนเปื้อนในอาหารและอาจเกี่ยวข้องกับอาหารเป็นพิษ *Bacillus* สปีชีส์อื่น เช่น *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อโรค ทำให้เกิดโรคได้ ถ้ามีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ลักษณะของ *Bacillus* ที่แตกต่างจากจิ้นอื่นคือมีเปอร์เซ็นต์ของปริมาณเบส G + Cค่อนข้างกว้าง คือ 32-62 โมลเปอร์เซ็นต์ และยังมี ความแตกต่างกันมากทั้งทางด้านเมแทบอลิซึม ความต้องการสารอาหาร องค์ประกอบและโครงสร้างของผนังเซลล์ ในจิ้นนี้พบได้ทั้งพวกที่ชอบอุณหภูมิเย็น (psychrophiles), อุณหภูมิปานกลาง (mesophiles), อุณหภูมิสูง (thermophilis), พวกชอบเบส (alkalophiles), พวกชอบ pH เป็นกลาง (neutrophiles) และพวกที่ชอบกรด (acidophiles) สมาชิกบางตัวในจิ้นนี้มีความสำคัญที่เป็นผู้ผลิตยาปฏิชีวนะ (เช่น พอลิไมกซินและบาซิลตราซิน) บางตัวใช้ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญทางอุตสาหกรรม เช่น ตัวทำลายลายแอลกอฮอล์ เอนไซม์ และวิตามิน

ก. *Bacillus anthracis* เป็นเชื้อโรคแอนแทรกซ์ซึ่งเป็นโรคระบาดในสัตว์จำพวก วัว ควาย แพะ แกะม้า และสัตว์อื่นๆ ที่ติดต่อกันอย่างรวดเร็วและทำให้ตายได้ โรคนี้สามารถติดต่อจากสัตว์มาสู่คนโดยการสัมผัสกับสัตว์ที่เป็นโรค หรือการหายใจเอาสปอร์เชื้อเข้าไป หรือโดยการกินเนื้อสัตว์ที่มีเชื้อโรคเข้าไป เชื้อ *B. anthracis* นี้พบโดยโรเบิร์ต คอคซ์ (Robert Koch) ใน

ปี ค.ศ. 1877 และเลี้ยงให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ พบว่าเชื้อนี้มีการสร้างสปอร์ได้และทำให้เกิดโรคแอนแทรกซ์ เมื่อฉีดเข้าสู่สัตว์

- ลักษณะเชื้อ *B.anthraxis* มีขนาดใหญ่ คือกว้าง 1-1.5 ไมโครเมตร ยาว 4-10 ไมโครเมตร รูปท่อนตรง อยู่เป็นสายโซ่ ติดสีแกรมบวก แอโรบิก ไม่เคลื่อนที่ เมื่อเชยเชื้อมาจากเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ จะพบเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือสายสั้นๆ แต่จะไม่สร้างสปอร์เมื่ออยู่ในสิ่งมีชีวิตหรืออยู่ในเลือด สปอร์จะถูกสร้างขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เชื้อเจริญได้ดีในอาหารที่มีเลือด (blood agar) แต่ไม่เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือด(hemolysis) โคโลนีของสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค จะมีขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร สีขาวเทา ชุ่ม ชรุขระ มีลักษณะหยิกงอ ขอบหยัก เรียกว่าmedusa head เชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่ pH 7.0-7.4 อุณหภูมิเหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส แต่ทนอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ 15 ถึง 40 องศาเซลเซียสได้ ในสภาพที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 6 % หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไบคาร์บอเนตเชื้อจะสร้างแคปซูล ทำให้โคโลนีมีลักษณะเรียบและเป็นเมือก (mucoid colony) ปกติเชื้อสร้างแคปซูลเมื่ออยู่ในสิ่งมีชีวิต ส่วนสปอร์จะถูกสร้างตอนปลายระยะ logarithmic phase เมื่อเลี้ยงในอาหาร และหลังจากเลี้ยงไว้ 48 ชั่วโมง จะมีสปอร์จำนวนมากมาย สปอร์เป็นรูปไข่ เห็นได้ชัดอยู่ตรงกลางเซลล์ แต่ถ้าเชื้ออยู่ในเนื้อเยื่อจะไม่สร้างสปอร์ เชื้อนี้สามารถเลี้ยงให้เจริญในอาหารธรรมดาได้ เจริญดีที่สุดเมื่อมีอากาศ แต่ก็เพิ่มจำนวนได้แม้อยู่ในสภาพไร้อากาศ สภาพที่มีอากาศจำเป็นสำหรับการสร้างสปอร์ แต่ไม่จำเป็นสำหรับการงอกของสปอร์ อาหารที่เชื้อต้องการคือโทอะมีน กรดอะมิโนบางชนิดยูราซิล อะดีนีน กวานีน แมงกานีส จะกระตุ้นการเจริญการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ เชื้อนี้สามารถเฟอร์เมนต์กลูโคส ซูโครส มอลโทส ยกเว้นแมนนิทอล สปอร์เชื้อ *Bacillus anthracis* สามารถทนความร้อนและสารเคมีได้ค่อนข้างดี มักถูกทำลายโดยการต้ม 10 นาที หรือโดยความร้อนแห้ง 140 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง และมีความสามารถมีชีวิตได้นานเป็นเดือนหรือเป็นปีในดินแห้ง

- การทำให้เกิดโรค ปัจจัยที่ทำให้เชื้อ *B.anthraxis* มีความรุนแรงในการเกิดโรคมี 2 ปัจจัย คือ โปรตีนที่เป็นทอกซิน และแคปซูล

1. แคปซูล เป็นสารประกอบพอลิเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดกลูตามิก (D-glutamicacid) พบว่าเชื้อที่ไม่มีแคปซูลจะเป็นพวกที่ไม่ทำให้เกิดโรค แคปซูลต่อต้าน การกินของเม็ดเลือดขาว (antiphagocytosis) แอนติเจนของแคปซูลกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดี แต่แอนติบอดีที่สร้างขึ้นนี้ไม่มีผลในการป้องกันโรค

2. ทอกซิน สารพิษที่ *B.anthraxis* สร้างขึ้นเป็นชนิดเอกโซทอกซินซึ่งทำให้สัตว์ตายได้ (lethal) เมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำของสัตว์ทดลอง เช่น หนู mice นอกจากนี้เมื่อฉีดเข้าใต้ผิวหนังของหนูตะเภาหรือกระต่ายจะทำให้บวม น้ำ และยังทำหน้าที่เป็นอิมมูโนเจน (immunogen) ทอกซินนี้มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้ระบบหายใจล้มเหลวทอกซินประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด Protective antigen (PA), Edema factor (EF), Lethal factor (LF)

โปรตีนทั้งสามอย่างรวมกันหรือ PA+LF ทำให้สัตว์ตายได้ เมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดดำหนูหนูตะเภา ส่วน EF+PA เมื่อฉีดเข้าใต้ผิวหนังกระต่ายหรือหนูตะเภาจะทำให้เกิดบวมน้ำแต่หากเป็นสารตัวใดตัวหนึ่งเพียงชนิดเดียว จะไม่มีพิษต่อร่างกาย การสร้างทอกซินขึ้นอยู่กับความควบคุมของพลาสมิด pXO_1 ซึ่งไม่มีพลาสมิดก็ไม่มีการสร้างทอกซิน

- ชนิดของโรคแอนแทรกซ์ การเกิดโรคในคนมี 3 แบบ แยกตามวิธีการแพร่กระจายเชื้อของโรคคือ

1. แอนแทรกซ์ของผิวหนัง (cutaneous anthrax) พบได้มากกว่า 95% ของแอนแทรกซ์ทั้งหมด การติดต่อโดยสปอร์จะเข้าทางบาดแผลหรือรอยข่วนที่ผิวหนังหรือเพื่อเมือก คนอาจได้รับเชื้อโดยสัมผัสกับสัตว์พวก วัว ควาย แกะ หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์นั้น เช่น ขนสัตว์ เขา สัตว์ เป็นต้น เมื่อสปอร์เข้าไปแล้ว จะงอกที่เนื้อเยื่อบริเวณนั้นและเพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้เกิดการอักเสบ ระยะฟักตัวของโรค 2-5 วัน จะเกิดอาการบวมเป็นตุ่มเล็กๆ (papule) น้ำใสไม่มีหนอง ต่อมาตุ่มใหญ่ขึ้น (vesicle) มีหนองแล้วตุ่มแตกออก มีสะเก็ดสีดำๆ (black eschar) ตรงกลางแผลจะบวมลงไป และรอยบวมล้อมรอบสะเก็ดนั้น คำดูตึงๆ และ ชิ่ง แต่มักไม่ปวด ตุ่มนี้จะพบตามมือ แขน ศีรษะไม่ค่อยพบตามลำตัว เมื่อสปอร์เข้าทางผิวหนัง ต่อน้ำเหลืองบริเวณนั้นจะบวมเชื้อจะกระจายผ่านท่อน้ำเหลืองเข้ากระแสเลือด และเพิ่มจำนวนในเลือดและเนื้อเยื่อจนเกิดโลหิตเป็นพิษและตายได้

2. แอนแทรกซ์ที่ปอด (pulmonary anthrax) เชื้อนี้จะเข้าสู่ร่างกายคนโดยการสูดดมหรือหายใจเอาฝุ่นละอองจากขน หนัง กระดูก ที่มีเชื้อสปอร์เชื้อเข้าไป มักเกิดกับคนที่ทำงานในโรงงานขนสัตว์ จึงเรียกว่าโรค woolsorters disease สปอร์จะงอกที่ปอดหรือต่อน้ำเหลืองที่หลอดเลือดและข้อปวด ทำให้เกิดอาการเลือดออกและเกิดการอักเสบที่ผนังกันช่องอก เยื่อหุ้มปอดอักเสบ เยื่อหุ้มสมองและไขสันหลังอักเสบ ต่อน้ำเหลืองที่ผนังกันช่องอกจะขยายใหญ่เกิดอาการบวม น้ำ มีอาการไข้สูง คอบวม ปวดกล้ามเนื้อ หายใจลำบาก เจ็บหน้าอก อาการจะเกิดต่อไปอย่างรวดเร็ว จนช็อก ทำให้ตายก่อนได้ก่อนจะรักษาทัน

3. แอกร์ทางเดินอาหาร (gastrointestinal anthrax) เป็นโรคที่เกิดจากการบริโภคเนื้อสัตว์ที่ติดเชื้อเข้าไป ซึ่งมีอาการทางเดินกระเพาะอาหารและลำไส้คล้ายอหิวาต์ คือ เจ็บปวดท้อง ท้อง มีไข้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย อ่อนเพลีย ถ่ายเป็นเลือด ลำไส้อุดตัน โลหิตเป็นพิษ และช็อก มีอัตราการตายสูงทีเดียว เมื่อผ่าศพดูจะพบว่าลำไส้เล็กมีการอักเสบและมีเลือดออก ปกติโรคนี้เกิดขึ้นในวัว ควาย ที่กินหญ้าและติดเอาสปอร์ของเชื้อเข้าไป ไม่ค่อยพบในคน

- การวินิจฉัยโรค ทำได้โดยตรวจดูรอยแผลที่ผิวหนัง พบแผลมีสะเก็ดสีดำ (eschar) ตรงกลาง มีตุ่ม รอบแผลเปื่อย บวมน้ำ ต่อน้ำเหลืองบริเวณแผลเปื่อยโต มีไข้ มักไม่ปวดแผลมาก

1. เก็บตัวอย่างจากหนอง น้ำเหลือง จากบริเวณรอยแผล เลือด เสมหะ
2. ย้อมสีตัวอย่างที่เก็บมา จะได้ลักษณะเซลล์เป็นท่อนขนาดใหญ่ แกรมบวก อยู่เป็นสายโซ่ หรืออาจย้อมแบบอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

3. การเพาะเลี้ยงเชื้อโรค เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารผสมเลือดจะให้โคโลนีสีเทา ขนาดใหญ่ (medusa head) แบบ ไม่ย้อยเม็ดเลือดแดง ในอาหารกึ่งแข็งเชื้อนี้จะไม่เคลื่อนที่ในขณะที่เชื้อใกล้เคียง (*B.cereus*) มีการเคลื่อนที่ได้ดี

4. Ascoli test สารสกัดจากเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ ทำปฏิกิริยากับอิมมูโนซีรัม จะเกิดการตกตะกอนเป็นวงแหวน (ring precipitate)

5. การทดสอบทางซีโรโลยี (serologic test) คนหรือสัตว์ที่ติดเชื้อมีแอนติบอดีชนิด precipitate antibody หรือ haemagglutinate antibody

- ความต้านทานและภูมิคุ้มกันโรค สัตว์บางชนิดเช่นหนูตะเภา ไวต่อการติดเชื้อมาก ในขณะที่สัตว์บางชนิด เช่น หนู (rat) ทนทานมากต่อการติดเชื้อโรคแอนแทรกซ์ ซึ่งขึ้นอยู่กับกลไกการป้องกันร่างกายที่แตกต่างกัน เช่นการทำงานของเม็ดเลือดขาว อุณหภูมิร่างกาย กลไกการทำลายแบคทีเรียในเลือดการสร้างภูมิคุ้มกันตัวเอง (active immunity) ต่อโรคแอนแทรกซ์ อาจทำได้โดยฉีดวัคซีนที่ทำจากเชื้อเป็นๆที่อ่อนกำลัง หรือซัสเพนชันของสปอร์หรือ protective antigen (PA) จากฟิลเตรตของเชื้อ

- การรักษา ยาปฏิชีวนะหลายชนิดให้ผลในการรักษาแอนแทรกในคน โดยเฉพาะเมื่อมีอาการเริ่มต้นเพนิซิลลินจะให้ผลการรักษาได้ดี ยกเว้นโรคแอนแทรกซ์ที่ติดโดยการหายใจ เพราะยังไม่ปรากฏว่าการจมน้ำเชื้อจะเข้ากระแสเลือดแล้วจึงทำให้มีอัตราการตายสูง เชื้อบางสายพันธุ์อาจดื้อยาเพนิซิลลิน เพราะสร้างเอนไซม์บีตาแล็กทามาเอสได้ การรักษาจึงอาจใช้เตตราไซคลิน อีริโทรไมซิน คลินดาไมซิน และ คลอแรมเฟนิคอล แทนได้

- การระบาด การป้องกันและการควบคุม เนื่องจากสปอร์ของเชื้ออาจอยู่ในดินหรือในซากสัตว์ที่ตายแล้วและสปอร์ยังมีชีวิตอยู่ยาวนานเป็นสิบๆปีได้ สปอร์สามารถงอกอยู่ในดินที่มี pH 6.5 ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อสัตว์มากินหญ้าหรือฟางจึงอาจได้รับสปอร์เข้าไปหรือเข้าทางเยื่อเมือกที่มีบาดแผลหรือในคนอาจติดเชื้อโดยการสัมผัสกับผลิตภัณฑ์สัตว์ เช่น ขน หนัง เนื้อสัตว์ ทั้งขณะชำแหละหรือการประกอบอาหารก็ได้ และ โดยการบริโภคเนื้อสัตว์ที่เป็นโรค

- การควบคุมและการป้องกันโรค สามารถกระทำได้โดย

1. ให้ความรู้แก่ประชาชนให้ทราบถึงอันตรายของโรค และการกินอาหารสุกๆ ดิบๆ ว่าอาจติดโรคนี้ได้ พร้อมให้ความรู้เกี่ยวกับอาการของโรคในสัตว์ หรือถ้าสัตว์ตายโดยไม่ทราบสาเหตุต้องให้สัตวแพทย์ชันสูตรก่อน

2. ถ้าสัตว์ตายด้วยโรคนี้ ต้องเผาทำลายหรือฝังซากสัตว์ที่ตายปิดทับด้วยปูนขาว และทับด้วยดินทรายอีกชั้นหนึ่ง ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ตายด้วยโรคนี้ ต้องทำลายทิ้งให้สิ้นเชิง ห้ามผ่าซากศพหรือเคลื่อนย้ายซาก เพราะเชื้อที่มีสปอร์จะแพร่กระจายในบริเวณนั้น และสปอร์สามารถมีชีวิตอยู่ในดินได้นานเป็นสิบปี ทำให้เกิดการระบาดของโรคได้และยังติดเชื้อมาถึงคนได้ในขณะชำแหละซาก

3. สวมถุงมือและเสื้อคลุมเมื่อต้องสัมผัสกับสิ่งของที่ติดเชื้อ

4. สร้างเสริมภูมิคุ้มกันให้สัตว์เลี้ยงโดยการฉีดวัคซีนของเชื้ออ่อนกำลังท้องที่เคยมีโรคระบาดทุกปี

ข. *Bacillus cereus*

- ลักษณะเชื้อ *B.cereus* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปท่อนขนาดใหญ่ที่สร้างสปอร์ได้ ติดสีแกรมบวก มีลักษณะคล้ายกับ *B.anthraxis* ยกเว้นเคลื่อนที่ได้และไม่สร้างแคปซูล การดำรงชีวิตเป็นแซโพรไฟต์ พบอยู่ในดิน น้ำ ตามพืชผักต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงจะมีลักษณะคล้ายกับ *B.anthraxis* คือสร้างโคโลนีขนาดใหญ่สีเทา จึงเรียกว่า anthracoil เมื่อฉีดเชื้อจำนวนมากเข้าสัตว์ทดลองอาจทำให้ตายได้ แต่ไม่ทำให้เกิดการตกเลือดเหมือนแอนแทรกซ์ และการสเมียร์เชื้อจากเลือดก็ไม่ให้แคปซูลสีชมพูจากการย้อมแบบ Mc-Fadyen stain (การย้อมสีด้วยพอลิโครม เมลิลีนบลู (polychrome methyleneblue) เชื้อจะติดสีฟ้า ส่วนแคปซูลที่อยู่ล้อมรอบติดสีแดง)

- การทำให้เกิดโรค *B.cereus* อาจทำให้เกิดโรคได้หลายแบบคือ อาหารเป็นพิษ หรือกระเพาะและลำไส้อักเสบ ตาอักเสบ และการติดเชื้อแบบฉวยโอกาส

1. อาหารเป็นพิษ (food poisoning) หรือกระเพาะและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) อาหารเป็นพิษหรือกระเพาะและลำไส้อักเสบจากเชื้อ *B.cereus* เกิดจากเอนเทอโรทอกซินซึ่งมี 2 ชนิด คือ เอนเทอโรทอกซินที่ทนความร้อน (heat stable enterotoxin) ทำให้อาหารเป็นพิษแบบมีอาการอาเจียน (emetic form) และเอนเทอโรทอกซินที่ไม่ทนความร้อน (heat labile enterotoxin) ทำให้เกิดอาการแบบท้องร่วง (diarrheal form) เอนเทอโรทอกซินที่ไม่ทนความร้อนคล้ายกับเอนเทอโรทอกซินที่สร้างจาก *Escherichia coli* และ *Vibrio cholerae* ซึ่งกระตุ้นเอนไซม์อะดีนิเลตไซเคเลสที่เกี่ยวข้องกับ cyclic AMP ที่เยื่อลำไส้ ซึ่งทำให้เกิดการสะสมของเหลวในลำไส้โดยทดลองฉีดทอกซินเข้าในลำไส้ส่วนไอเลียมของกระต่าย พบว่ามีของเหลวสะสมในลำไส้มากขึ้น แต่ยังไม่ทราบกลไกการทำงานของเอนเทอโรทอกซินที่ทนความร้อน

2. ตาอักเสบ (panophthalmitis) กลไกการทำให้เกิดโรคตาอักเสบจากเชื้อ *B.cereus* นั้น เราทราบกลไกการทำให้เกิดโรคไม่สมบูรณ์ แต่ก็ทราบว่ามีการทอกซินที่เกี่ยวข้องด้วยอย่างน้อย 3 ชนิด คือ necrotic toxin ซึ่งเป็นเอนเทอโรทอกซินที่ไม่ทนความร้อน cereolysin เป็นฮีโมไลซินที่มีฤทธิ์ร้ายแรง และ phospholipase C ซึ่งก็คือเลซิทีเนส (lecithinase) การทำลายตาอย่างรวดเร็วเนื่องจากการติดเชื้อ *B.cereus* เป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของทอกซินเหล่านี้และปัจจัยอื่นๆอีก

- อาการของโรค

1. อาหารเป็นพิษ *B.cereus* ทำให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ 2 แบบ คือ แบบที่มีอาการอาเจียนและแบบท้องร่วง แบบที่มีอาการอาเจียน (emetic form) เกี่ยวข้องกับการกินอาหารจำพวกข้าวที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ ในขณะที่หุงข้าว เซลล์ปกติ (vegetative bacilli) จะถูกฆ่าตายแต่สปอร์ที่ทนความร้อนยังมีชีวิตอยู่ ถ้าไม่ได้แช่เย็นข้าวนั้น สปอร์ก็จะงอกและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เอนเทอโรทอกซินที่ทนความร้อนที่ปล่อยออกมาจะไม่ถูกทำลายเมื่อข้าวนั้นอุ่นซ้ำ ระยะพักตัวของเชื้อกินเวลา 1-6 ชั่วโมงหลังจากกินเอนเทอโรทอกซินเข้าไปคนไข้จะมีอาการของโรคอยู่เพียงระยะสั้นๆ เท่านั้น (น้อยกว่า 24 ชั่วโมง) อาการที่สำคัญคือ อาเจียน คลื่นไส้ ปวดท้อง แต่จะไม่มีไข้ และท้องร่วง อีกแบบคือ อาการท้องเสีย (diarrheal form) เกี่ยวข้องกับการกินอาหารพวกเนื้อหรือผักที่มีเชื้อปนเปื้อน มีระยะพักตัวนานกว่า โยที่เชื้อจะเพิ่มจำนวนในบริเวณนั้นและสร้างทอกซินที่ทนความร้อน คนไข้จะมีอาการท้องร่วง คลื่นไส้ และปวดท้อง อาการของโรคจะเป็นอยู่ 1 วัน หรือนานกว่านั้น

2. ตาอักเสบ *B.cereus* เป็นสาเหตุของตาอักเสบมากที่สุด แหล่งของเชื้ออาจอยู่ในสิ่งของที่ปนเปื้อนกับดินและแพร่เข้าตา หรือเชื้ออยู่บริเวณรอบๆ ตาแล้วเข้าสู่ตาโดยตรง ตาอักเสบจากเชื้อนี้จะลุกลามอย่างรวดเร็ว จนทำให้สูญเสียการมองเห็นภายใน 48 ชั่วโมง โดยเชื้ออาจทำงานเยื่อเยื่อที่เรตินาได้

3. การติดเชื้อแบบฉวยโอกาส การติดเชื้อแบบนี้พบได้ใน *Bacillus* สปีชีส์อื่น โดยการติดเชื้อเนื่องจากเครื่องมือสวนหลอดเลือด การติดเชื้อในทางเชื่อมของระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system shunt infections) เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (endocarditis) รวมทั้งปอดอักเสบ เยื่อหุ้มสมองอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือดในคนไข้ที่ภูมิคุ้มกันถูกกดอย่างรุนแรง เชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้ส่วนใหญ่พบว่าเป็นเชื้อปนเปื้อนจากผิวหนังคนไข้ตัวเอง

- การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ ในกรณีโรคอาหารเป็นพิษนำอาหารที่สงสัย (เช่น ข้าว เนื้อสัตว์ ผัก) มาเพาะเชื้อ การวินิจฉัยขึ้นอยู่กับการพบเชื้อตั้งแต่ 10^5 เซลล์ต่อกรัม หรือมากกว่า เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารผสมเลือด (blood agar) โดยบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ทั้งไว้ข้ามคืน พบว่าเชื้อเจริญเป็นโคโลนีลักษณะแบบ anthracoid คือให้โคโลนีขนาดใหญ่ สีเทา โคโลนีไม่ราบเรียบ ย้อมติดสีแกรมบวกเซลล์ขนาดใหญ่ และเป็นแฟลคเตตัสแอนแอโรบ

- การรักษา ป้องกันและควบคุม เนื่องจากโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *B.cereus* เกิดอาการในระยะเวลาสั้นๆ และไม่มีโรคแทรก การรักษาจึงรักษาตามอาการ แต่ถ้าเป็นการติดเชื้อที่อื่นและมีการลุกลามของโรคเร็ว การรักษาจะยุ่งยากเชื้อมีแนวโน้มจะดื้อยาหลายชนิด (เชื้อส่วนใหญ่ที่แยกได้ดื้อต่อยาเพนิซิลลินและเซฟาโลสปอริน รวมทั้งยาปฏิชีวนะอื่น) ยาที่ใช้ได้คือ คลินดาไมซิน แวนโคไมซิน และอะมิโนไกลโคไซด์ ถึงแม้จะต้องทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะก่อน การป้องกันโรคอาหารเป็นพิษทำได้โดยนำอาหารและผลิตภัณฑ์จากอาหารแช่ตู้เย็นหลังจากปรุงเสร็จแล้ว

2.7.4 *Enterobacter aerogenes*

แบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ทรงแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์Oxidase แต่สร้างเอนไซม์Catalaseได้ สามารถ ferment กลูโคสและรีดิวซ์ไนไตรต์ให้เป็นไนไตรต์ได้ มีทั้งพวกที่เคลื่อนที่ได้และไม่เคลื่อนที่ โดยพวกที่เคลื่อนที่ได้จะอาศัยแฟลเจลลารอบเซลล์ (Peritrichous flagella) แบคทีเรียวงศ์นี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ และพืช นอกจากนี้ยังพบในลำไส้ของคนและสัตว์จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “Enteric bacilli”

2.7.4.1 ความสำคัญทางคลินิก

แบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ส่วนใหญ่พบเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของคนและสัตว์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. ซึ่งเชื่อกันว่าเป็นได้ทั้ง true pathogen และ Opportunistic pathogen จินัสที่พบเป็นเชื้อก่อโรคจริง (True pathogen) ได้แก่ *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* และบางสายพันธุ์ของ *Escherichia coli* โดยแบคทีเรียเหล่านี้มักก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยการกินอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อปนเข้าไป และกรณีการพบเป็นเชื้อก่อโรคแบบฉวยโอกาส (Opportunistic pathogens) พบก่อให้เกิดการติดเชื้อ นอกกระบบทางเดินอาหารและ เป็นสาเหตุสำคัญส่วนใหญ่มักจะเป็นการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infection)⁽¹⁾ โรคที่พบบ่อยที่สุด คือติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ โดยเฉพาะภาวะกระเพาะปัสสาวะอักเสบ (Cystitis) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียวงศ์นี้เป็นสาเหตุของโรคนี้ถึงร้อยละ 70 ของเชื้อที่เป็นสาเหตุทั้งหมด นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อของแผล การติดเชื้อในกระแสเลือด และเป็นการติดเชื้อในระบบประสาทส่วนกลาง แบคทีเรียวงศ์นี้แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยถึงร้อยละ 50 ของแบคทีเรียทั้งหมดและพบประมาณร้อยละ 70-80 ของแบคทีเรียแกรมลบทรงแท่ง⁽²⁾ ดังนั้นจึงจำเป็นที่ห้องปฏิบัติการจะต้องแยกพิสูจน์เชื้อรวมทั้งทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียวงศ์นี้จากสิ่งส่งตรวจ

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

P. Padee และคณะ (2553) รายงานการวิจัยว่าไบฮวานร็อกมีประสิทธิภาพในการลดระดับน้ำตาลในหนูและอาจป้องกันโรคแทรกซ้อนในโรคเบาหวานได้ โดยศึกษาจากการสกัดด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์

วิชุดา สุวิทย์วัฒน์ (2551) รายงานว่ามีการวิจัยการใช้ไบฮวานร็อกชนิดแห้งขนาด 0.2 กรัม ต่อกลีโกรัม ให้ผลดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตและแก้ท้องเสียในสุกรขนาดเล็ก เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับไบสดและกลุ่มควบคุม

Hung NV. (Available from www.English.vista.gov.vn) รายงานด้านฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย 10 ชนิด ที่สำคัญได้แก่ เชื้อ *Salmonella typhi* 158, *Shigella flexneri* และ *E.coli*

Num N-H et al. (2003) รายงานฤทธิ์การต้านเชื้อรา การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จากสารสกัดเมทานอลจากใบฮวานง็อกยังพบว่าเป็นพิษอย่างอ่อนต่อเซลล์มะเร็ง B16 melanoma โดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ครึ่งหนึ่ง (GI_{50}) คือมากกว่า 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ส่วนการทดสอบการยับยั้งการสร้างหลอดเลือด จากสารสกัด เมทานอลจากใบ ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบว่ามีฤทธิ์อย่างอ่อน (น้อยกว่า 25%) ในการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดในเซลล์ human umbilical venous