

บทนำ

น้ำมันกระเบา (chaulmoogra oil หรือ hydnocarpus oil) ได้มาจากการบีบส่วนเมล็ดของกระเบา (*Hydnocarpus anthelminthica* Pierre ex Laness.) ที่ประกอบด้วย fatty acid คือ chaulmoogric acid ($C_{18}H_{32}O_2$), hydnocarpic acid ($C_{16}H_{28}O_2$) (1) และองค์ประกอบทางเคมีอื่นหลายชนิด

ประวัติการใช้น้ำมันกระเบาในการรักษาโรคเรื้อน (leprosy) และรักษาโรคผิวหนังอื่นๆพบได้จากหลายประเทศโดยเฉพาะในทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย จีน พม่า การนำน้ำมันกระเบามาพิสูจน์ฤทธิ์โดยวิธีทางวิทยาศาสตร์ เป็นอีกทางหนึ่ง เพื่อเกิดการสนับสนุนการนำพืชสมุนไพรนี้ไปใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ รวมถึงการประยุกต์ใช้น้ำมันกระเบาในด้านอื่นเช่น เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ของเหลวที่ใช้ในการอาบน้ำ ทำความสะอาด จากคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อโรคในมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่นการใช้ในทางยาสำหรับโรคไม่ติดต่อ (NCDs: Noncommunicable diseases) หรือแม้กระทั่งเป็นสารสกัดชนิดต่างๆที่ใช้ในวงการอุตสาหกรรม อันเป็นประโยชน์ทางการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อม และการใช้และผลิตในเชิงพาณิชย์

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

กระเบา (*Hydnocarpus anthelminthicus* Pierre. ex Laness.) เป็นพืชอยู่ในวงศ์ Flacourtiaceae ที่เรียกทั่วไปว่า กระเบา น้ำ กระเบาบ้าน แข็ง ดงกระเบา (ลำปาง) กระเบาตึก (เขมร-ตะวันออก) กาหลง (ไทยเรียกดอกตัวผู้) ตัวโง้งจี (จีนเรียกเมล็ด) เบา (ใต้) จัดอยู่ในกลุ่มพืชดอก (angiospermic plants) ที่กึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างเพื่อใช้ในการสืบพันธุ์พืชในวงศ์ Flacourtiaceae มี 89 genus 1300 species ที่พบทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่น³ชนิดที่มีประวัติการให้น้ำมันที่น่าสนใจ ได้แก่ *H. calvipetalus* Craib; *H. sumatrana* Koord.; *H. alpina* Wight var. *elongata* Boerl., *H. alpina* Wight var. *macrocarpa* Boerl., *H. anthelminthica* Pierre ex Gagnep. Lacourtiaceae, รวมถึงกระเบาใกล้ *H. ilicifolius* King; กระเบาต่าง *H. castaneus* Hook. f. & Th.⁴ปัจจุบัน Germplasm Resources Information Network (GRIN) ที่มีบทบาททาง taxonomy ทางพืช ในองค์กร United States Department of Agriculture Agricultural Research Service ได้ให้ *H. anthelminthicus* อยู่ในวงศ์ *Achariaceae* ได้เช่นกัน⁵

ต้นกระเบา เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ สูงได้ถึง 10-20 เมตร ใบมีสีเขียวแก่ เป็นใบเดี่ยวรูปหอกแกมรูปไข่ กว้าง 3-7 ซม. ยาว 10-30 ซม. โคนใบมน ปลายใบสอบเรียวขอบใบเรียบ กิ่งใบหนาหิบบาก และมีรสเบื่อเมา เนื้อไม้กรอบ ดอกสีขาวนวล หรือมีสีเหลืองแกมชมพู ออกเป็นช่อหรือเป็นกระจุกประมาณ 2-3 ดอก แยกเพศและอยู่ต่างต้นดอกเพศผู้ดอกเดี่ยวๆ ตามซอกใบ มีกลิ่นหอมฉุน กลีบดอก 5 กลีบ เกสรผู้ 5 อันดอกเพศเมียออกเป็นช่อสั้นๆ คล้ายดอกเพศผู้ รังไข่มีขนสีน้ำตาลแดงผลสีน้ำตาล ทรงกลมขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 นิ้ว ผิวค่อนข้างเรียบ เปลือกหนาแข็ง หุ้มด้วยขนสั้นภายในมีเมล็ด 30-50 เมล็ด อัดกันแน่นซ่อนอยู่ในเนื้อ

การกระจายพันธุ์พบมากในภูมิภาคอินโดจีน สำหรับประเทศไทยพบได้ทุกภาค บริเวณริมน้ำ ริมห้วยตามป่าดิบและป่าเบญจพรรณที่ระดับความสูง 30-1,300 เมตร ออกดอกและติดผลช่วงเดือนมกราคมถึงมิถุนายน โดยพบมากในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง นครสวรรค์ สระบุรี กรุงเทพฯ และเกือบทุกจังหวัดในภาคใต้

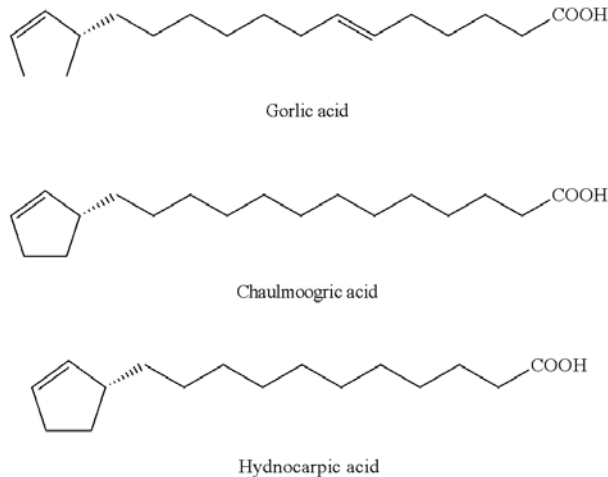
ประโยชน์ที่ใช้จากกระเบาตามบันทึก ได้แก่ เนื้อไม้ใช้เป็นวัสดุในการก่อสร้าง เนื้อผลที่แก่สุก ใช้รับประทานเป็นอาหารคล้ายเผือกต้ม ใบและเมล็ดมีความเป็นพิษจาก cyanogenetic glycoside ในเมล็ดจะมีน้ำมันเรียกว่า chaulmoogra oil มีสารจำพวก glycerides อยู่ เช่น oleic acid, hydnocarpic acid, palmitic acid, chaulmoogric acid น้ำมันสกัดจากเมล็ดใช้แก้โรคผิวหนังทุกประเภท โดยนำมา 5-10 เมล็ดแกะเปลือกออก ตำให้ละเอียด เติมน้ำมันพืชลงไปพอควรแล้วคลุกเข้ากันและเอามาทาผิวหนังได้⁶ ใช้เป็นยารักษาโรคเรื้อนโดยการนำเอาน้ำมันจากเมล็ด 3 มล. น้ำเชื่อม 40 มล. น้ำมะนาว 30 มล. น้ำ 160 มล. ผสมให้เข้ากัน กินวันละ 3 เวลา หลังอาหาร หรือใช้น้ำมันจากเมล็ดฉีดเข้าผิวหนังหรือกลัมน้ำให้ซึมผ่านแผล (direct infusion) ในครั้งแรกใช้ 1.5 มล. ต่อมา 1 มล. อาทิตย์ละครั้ง โดยสมัยก่อนใช้น้ำมันจากเมล็ดของกระเบาทำให้อยู่ในลักษณะของ Ethyl chaulmoograte หรือ Sodium ใช้ฉีดรักษาผู้ป่วยโรคเรื้อน ซึ่งปัจจุบันไม่มีการรักษาเช่นนี้อีกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นที่มีบันทึกไว้ ได้แก่ รักษาวัณโรค กระตุ้นการหายใจยับยั้งมดลูกบีบตัว ระคายเคืองระบบทางเดินอาหาร ยับยั้งมะเร็งเต้านมเชื้อแบคทีเรีย ต้านยีสต์ แก้ไข้ คลายกล้ามเนื้อเรียบกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด นอกจากนี้ ตามข้อมูลจาก หนังสือพรรณไม้สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 4 มีการระบุถึงการใช้สำหรับอาการปวดบวมตามข้อ และยังสามารถใช้เป็นน้ำมันใส่ผม รักษาโรคบนศีรษะคุดทะราด แก้มะเร็ง⁷

สารสำคัญจากกระเบา

Chaulmoogra plant เป็นพืชในวงศ์ Flacourtiaceae ที่ประกอบด้วย genus ต่างๆ ได้แก่ *Hydnocarpus*, *Carpotroche*, *Coloncoba*, *Oncoba*, *Lindackeria* และ *Mayna* แต่สองชนิดหลัง ไม่มีการนำไปใช้รักษาโรคเรื้อน โดยมากจะใช้ *Hydnocarpus* มากที่สุด ได้แก่ *H. anthelmintica*, *H. laurifolia* (*H. wigtiana*) และ *H. kurzii* (*Takaktogenos kurzii*) โดยน้ำมันที่สกัดจาก *H. laurifolia* ถูกนำมาใช้บ่อยที่สุดในอินเดียในการทดแทนน้ำมันจาก *T. Kurzii* และได้มีการนำมาใช้ทั่วโลก เนื่องจากราคาไม่สูงมาก⁸

น้ำมันกระเบา (chaulmoogra oil หรือ hydnocarpus oil) ที่ได้มาจากการบีบส่วนเมล็ดของกระเบา ประกอบด้วย fatty acid ที่มี terminal cyclopentenyl group คือ chaulmoogric acid ($C_{18}H_{32}O_2$) และ hydnocarpic acid ($C_{16}H_{28}O_2$)^{9,10} ซึ่ง fatty acids ดังกล่าว มีส่วนประกอบเป็น 2-cyclopentene-1-undecanoic acid (hydnocarpic acid, 50%), 13-(2-cyclopentene-1-yl) 6-tridecanoic acid (gorlic acid, 10%) และ 2-cyclopentene-1-tridecanoic acid (chaulmoogric acid, 32%)^{11,12} หลังจากนั้น มีงานวิจัยของ Jaroszewski และคณะ¹³ ในปี 1987 ที่รายงานถึงส่วนประกอบของกระเบาสายพันธุ์ *H. anthelmintica* Pierre ex Laness. ได้แก่ cyclopentenoid cyanohydringlucosides และ taraktophyllin และ epivolkenin

การศึกษาสารจากเมล็ดกระเบาได้มีผู้รายงานไว้หลายชนิด โดยส่วนประกอบหลักของน้ำมัน ได้แก่ Chaulmoogric acid (8%), ethylchaulmoograte และ hydnocarpic acid (67%) และ homologs ของ hydnocarpic acids (รูปที่ 1) รวมถึง alepric acid, alprestic acid, alprylic acid, aleprolic acid, oncobic acid และ manoaic acid นอกจากนี้ยังพบ fatty acids ทั่วไป เช่น myristic, palmitic, stearic, palmitoleic, oleic, linoleic และ linolenic acids และได้พบกลุ่ม Steroidal compounds เช่น 24-methylenecycloartenol, campesterol, stigmasterol, และ β -sitosterol^{14,15,16,17,18} ในขณะที่ chaulmoogric acids ได้จัดเป็นสารที่ปลอดภัย¹⁹ แต่ที่พบว่ามี cyanogenetic และ glycoside ที่มีความเป็นพิษ²⁰



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดไขมัน จากบนลงล่าง; Gorlic acid, . Chaulmoogric acid, Hydnocarpic acid²¹

ที่มา: Ramos-Stanburt L, Andrean H, Blaise C. Cationic surfactant compounds, use thereof as conditioner, cosmetic treatment method, and cosmetic or pharmaceutical compositions comprising same. (US 2011/0052513 A1) 2011.

ศักยภาพของสารสำคัญจากกระเบา

ศักยภาพที่มีสนใจและการศึกษากันมากได้แก่ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยมีการอ้างถึงประวัติการใช้ chaulmoogra ในการรักษาโรคที่พัฒนาอาการอย่างช้าๆ และรักษาได้ยากคือ วัณโรค และโรคเรื้อนที่พบแต่สมัยโบราณ ก่อนคริสตกาล (1550 B.C.) จากจารึกใน Egyptian papyrus โรคนี้พบได้มากแถบประเทศจีน อียิปต์ และอินเดีย²² รวมถึงเกาหลีใต้²³ การแพร่เชื้อโรคเรื้อนมาจาก nasal droplet ของผู้ป่วยที่อยู่ในระยะแพร่เชื้อ ทำให้เชื้อกระจายตามกระแสโลหิตไปอยู่เนื้อเยื่อที่ตื้นกว่าจากการที่มีความเย็นกว่า²⁴ โรคเรื้อนหรือ Leprosy ได้ถูกเรียกว่า Hansen Disease ตามชื่อของ Gerhard Henrik Armauer Hansen ผู้พิสูจน์จำแนกแบคทีเรียก่อโรค *Microbacterium leprae* ได้ในปี 1873 ที่เชื่อกันทำให้เกิดอาการผิดปกติกับประสาทส่วนปลายของผิวหนัง และเยื่อเมือกของระบบทางเดินหายใจส่วนต้น รวมถึงตา ทำให้อวัยวะ เช่น แขนขา ผิดรูปร่าง หรือสูญเสียไป²⁵

จากการที่ Power ในปี 1904 ได้นำเมล็ด chaulmoogra จาก *T. kurzii* มาแยกน้ำมัน เมื่อพบ unsaturated fatty acid ชนิดใหม่ จึงให้ชื่อว่า chaulmoogric acid ($C_{18}H_{32}O_2$) หลังจากนั้น เมื่อทำการสกัดน้ำมันจากเมล็ดของ *H. wightiana* และ *H. anthelmintica* ได้ chaulmoogra acid และ Hydnocarpus acid ($C_{16}H_{28}O_2$) ที่เป็น lower homologue หลังจากนั้นน้ำมัน chaulmoogra จากกระเบาจึงมีบทบาทสำคัญในการรักษาโรคเรื้อนทั้งนี้จากบันทึกถึงพืชในการรักษาโรคเรื้อนที่พบได้ทั่วไปในอินเดียและแอฟริกา^{26,27,28} คือ เมล็ดกระเบาที่นำมาบีบได้ chaulmoogra oil การนำมารักษาโรค ได้ใช้ทาแผลบริเวณผิวหนังร่วมกับรับประทานน้ำมัน แต่ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้รุนแรง จึงดัดแปลงโดยผสมของเหลวอื่น เช่น Heiser mixture ประกอบด้วย น้ำมันกระเบา 60 ml, Camphorated oil 60 ml และ resorcin 4 gm ซึ่ง Heiser และผู้ร่วมงานได้เติม camphor ลงในตำรับ Chaulmoogra and resorcin สำหรับรับประทาน ซึ่งต่อมาได้ตีพิมพ์ถึง camphor-resorcin solution ของ Chaulmoogra ว่าสามารถดูดซึมได้ดี รวมทั้งการรายงานผลในปี 1913 ถึงการรักษาผู้ป่วยสองรายที่น่าจะหายขาด เพราะไม่พบเชื้อภายใต้การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์^{29,30} ต่อมาจึงได้มีการรักษาในลักษณะคล้ายกันอีกหลายราย โดยการฉีด mixture ข้างต้นร่วมกับการให้วัคซีน³¹ นอกจากนี้ผลการทดลอง *in vitro* จาก Walker และ

Sweeney เมื่อนำ total fatty acids จาก chaulmoogra oil ทดสอบกับ acid-fast bacteria ผลได้จากสารทดสอบที่เจือจาง 106 เท่า มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อก่อโรคเรื้อนและวัณโรค แต่ไม่สามารถยับยั้ง nonacid-fast bacteria ผู้วิจัยคาดว่าฤทธิ์ที่ใช้กับ acid-fast bacteria มาจากการรบกวนกระบวนการทางเมตาบอลิซึม ที่ทำให้โมเลกุลของ chaulmoogric acid สะสมอยู่ที่บริเวณไขมันของเชื้อ³¹

รายงานฤทธิ์ของ chaulmoogra oil โดย Walker และ Voegtlin^{31,32} ถึงความสามารถยับยั้ง acid-fast bacteria ทั้งในโรคเรื้อนคือ *Mycobacterium leprae* และในวัณโรคคือ *Mycobacterium tuberculosis* แต่ไม่ออกฤทธิ์ต่อ non acid-fast organisms โดยเสริมว่าน้ำมันนี้มีฤทธิ์มากกว่าสาร phenolic ในการยับยั้งเชื้อ acid-fast ถึง 100 เท่า นอกจากนี้ Voegtlin กล่าวถึงการนำ chaulmoogra oil และน้ำมันมะกอก 1 ml ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหนู guinea-pig พบว่าเกิดการระคายเคือง พบการบวมและเนื้อตาย เซลล์กล้ามเนื้อฝ่อตัวและมีเซลล์ไขมันแทรก (fatty degeneration) เมื่อฉีดสารเพียง 10 mg เข้าใต้ผิวหนังจะเกิด haemorrhage ผิวหนาขึ้นและมี necrosis อย่างไรก็ตาม เมื่อทำให้ chaulmoogric acid อยู่ในรูปของ ethyl ester ทำให้ลดความรุนแรงดังกล่าว จึงสรุปว่า chaulmoogra oil และ chaulmoogra acid และอนุพันธ์ แม้มีความเป็นพิษต่ำแต่มีฤทธิ์ระคายเคืองสูง ซึ่งไม่เป็นผลดีเมื่อนำไปใช้กับผู้ป่วยนอกจากนี้ chaulmoogra oil และอนุพันธ์ยังออกฤทธิ์ต้าน *M. vaccae* ได้เช่นเดียวกับผลการวิจัยของ Kolmer³³ นอกจากวัณโรคแล้ว Peers และ Shipman³⁴ ยังรายงานการใช้ chaulmoogra oil เพื่อบรรเทาอาการ ในผู้ป่วย tuberculous laryngitis อีกเช่นกัน

การรักษาที่ใช้ไขมันทาแผล แม้จะให้ผลน้อยและเข้าร่วมกับการกินน้ำมันที่ผู้ป่วยทราบมาจากการคลีนไส้ ต่อมา มีการกล่าวถึงการฉีดน้ำมันเข้ากล้ามเนื้อหรือใต้ผิวหนังว่า ให้ผลดีกว่าการให้ทางปาก แต่จะมีความเจ็บปวดรุนแรงมาก^{8,35} การให้น้ำมันในรูปของ ethyl ester หรือ sodium salts ของ fatty acid ให้ผลที่ดีกว่าโดยกำจัดเชื้อได้ในบางรายและถือว่าหายขาด Stanley และคณะ³⁵ ในปี 1932 จึงศึกษาสารออกฤทธิ์ของ chaulmoogra oil, chaulmoogric และ hydnocarpic acids และสรุปว่า ส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์อยู่ที่ ring structure และจำนวนของ carbon atom ต่อมา Ranganathan (1974)³⁶ ได้กล่าวถึงส่วนประกอบชนิดหนึ่งของ chaulmoogra oil จากเมล็ดของต้น *Hydnocarpus trees* สารนั้น คือ 5*-methoxyhydnocarpin (5-MHC) Stermitz และคณะ ในปี 2000³⁷ ในการศึกษาพืชอื่นที่มีสารนี้เช่นกัน โดย 5-MHC ออกฤทธิ์ยับยั้ง multidrug resistance pumps (MDRs) ของแบคทีเรีย ทำให้กำจัดเชื้อที่ดื้อยาต้านจุลชีพจากการใช้กลไกนี้ได้

หลังจากนั้น Desai³⁸ รายงานถึงการนำน้ำมันนี้ผสมกับตัวยา โดยทดลองใช้ hydnocarpus oil อย่างเดียว และที่ผสมกับ dapsone ผสมอาหารให้กับหนู mice ซึ่งมีการตีพิมพ์ผลงานว่า hydnocarpus oil ผสม dapsone สามารถให้ผลแบบ additive ต่อการเจริญของ *M. leprae*

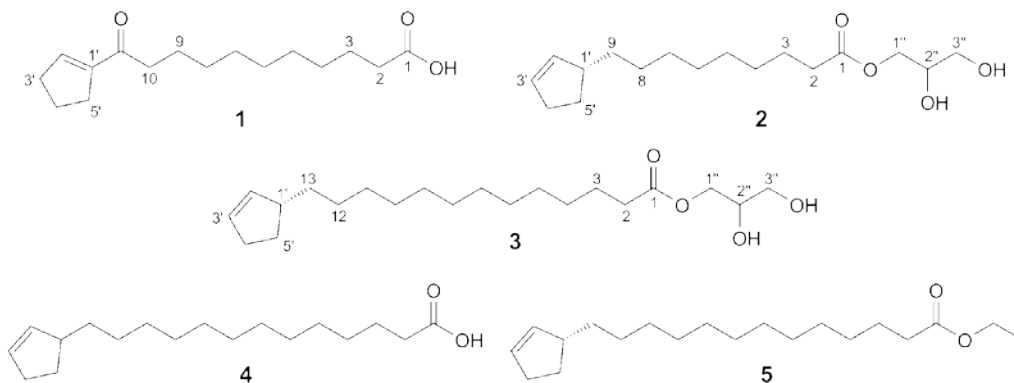
เพื่อศึกษากลไกการทำงานของน้ำมันที่ใช้กับจุลินทรีย์ประเภททกรด Levy และ Cabot^{39,40} รายงานถึงน้ำมันกระเบาที่สกัดหยาบ หรือเป็น cyclic fatty acid ที่แยกบริสุทธิ์ มีฤทธิ์ยับยั้ง *Mycobacterium leprae* โดย fatty acid หรือที่ทำให้เป็น amino alcohol ที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไปจับไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดความผิดปกติ ในการทำหน้าที่ขนส่งสาร การทำงานของเอนไซม์ที่เยื่อหุ้ม หรือเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนและไขมัน เป็นต้น และการจับ cyclopentenyl fatty acid เข้าในเซลล์เชื้อ *M. vaccae* ทำให้ยับยั้งการเจริญของเชื้อ สันนิษฐานว่าเกิดจากการ oxidation ของ chaulmoogric acid ไปเป็น carboxylic acid, 2-cyclopentenyl หรือ aleprolic acid กลไกเช่นนี้ พบได้ในโปรโตซัว, ยีสต์ และแบคทีเรียเช่นกัน

น้ำมันกระเบาได้ถูกใช้เป็นสารมาตรฐานในการรักษาโรคเรื้อน จนถึงปี 1940 ที่เสื่อมความนิยมลงจากการที่พบยาในกลุ่ม sulfones เช่น promin และ dapsone Norton⁴¹ จากองค์การอนามัยโลก(World Health Organization)ที่รายงานถึงโรคเรื้อนว่า ในปี 1981 มีการใช้ยาหลายชนิด เช่น rifampicin, dapsone, clofazime ทำให้ลดอุบัติการณ์ได้กว่าร้อยละ 90 อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังพบโรคเรื้อนในประเทศต่างๆ 122 ประเทศ โดยพบผู้ป่วย 213,000 ราย ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, สหรัฐอเมริกา และแอฟริกา ที่นับเป็นร้อยละ 67, 17 และ 12 ของผู้ป่วยทั้งหมด^{42,43} จากในสมัยก่อนที่โรคเรื้อนจัดว่าเป็นโรคที่รักษาไม่ได้มาจนปัจจุบันองค์การอนามัยโลกได้ถือว่าสามารถรักษาได้โดยการให้ยาาร่วมกันหลายชนิด

การออกฤทธิ์ต้านราโดยPawar (2007)⁴⁴ได้ศึกษาโดยใช้น้ำมันจากพืช 75 ชนิดมาทดสอบฤทธิ์กับรา *Fusarium oxysporum* f. sp cicer (FOC) และ *Alternaria porri* (A. porri)ตามวิธี disc diffusion โดยใช้ น้ำมันทดสอบ 5 µl/discบน plate ที่spread สปอร์ของเชื้อทดสอบบน Potato dextrose agarผลที่ได้คือ *Hydnocarpus laurifolia* (Dennst.) Sleumerฤทธิ์ต้าน FOC ที่ให้ขอบเขตการยับยั้ง 8.5 ± 1.2 มม. แต่ไม่พบฤทธิ์ยับยั้ง A. porriนอกจากนี้ หน่วยงานของท้องถิ่นในเซี่ยงไฮ้คือCorporation of Zhonghua Bencao(1988) ได้กล่าวในเอกสารตีพิมพ์ถึงประวัติการนำเมล็ดกระเบา ที่นอกจากใช้กับโรคเรื้อน วัณโรคแล้ว ยังใช้ได้กับโรคกลาก (ringworm หรือ tinea) และโรคหนองในอีกด้วย⁴⁵

รายงานจาก Sharma 1979, Ranganathan 1973 และ 1974^{46,47,48}ที่มีการแยก flavonolignans, flavonesและ chaulmoogric acid analogues จาก *H. anthelminticus*ซึ่งflavonolignans มีฤทธิ์ antitumor และฤทธิ์ hypoglycemic ⁴⁹

Wangในปี 2010⁵⁰ที่ได้ศึกษาเพื่อค้นหา antiinfectivemetabolites จากพืชสมุนไพรที่ใช้เป็นยา ได้แยก compounds ต่างๆ 5 ชนิดจาก nonpolar extracts และพบสารใหม่ 3 ชนิด คือ AnthelminthicaA, B และ C(รูปที่ 2) และได้เสนอวิธีการแยก การพิสูจน์โครงสร้างตลอดจนตรวจสอบanti-infective activities ของสารที่แยกได้ กับ *M. tuberculosis* H37Rv โดยวิธี expressing GFP assay



รูปที่2โครงสร้างสาร 5 ชนิด*จาก *Hydnocarpus anthelmintica* Pierre ex Laness⁵⁰

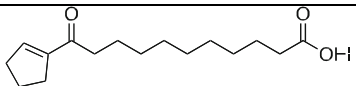
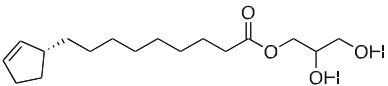
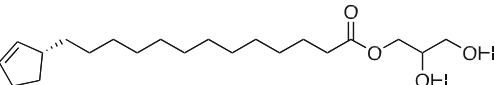
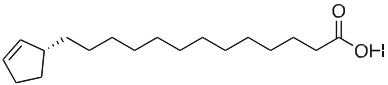
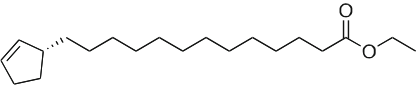
* molecular formula: 1. white powder -C₁₆H₂₆O₃ 2. yellowish syrup - C₁₇H₃₀O₄

3. yellowish syrup - C₂₁H₃₈O₄ 4. chaulmoogric acid 5. ethyl chaulmoograte

ที่มา: Wang JF, Dai HQ, Wei YL, Zhu HJ, Yan YM, Wang YH, Long CL, Zhong HM, Zhang LX, Cheng YX. Antituberculosis agents and an inhibitor of the para-aminobenzoic acid biosynthetic pathway from *Hydnocarpus anthelmintica* seeds. Chem Biodivers. 2010;7(8):2046-53

Liu และคณะ⁵¹ รวบรวมผลงานจาก High-throughput screening จาก marine microbes ที่ถือเป็น traditional medicines รวมถึงสารanthelminticins จากผลงานของ Wang⁵⁰ ในการตรวจหาค่า Anti-TB MIC (μM) ที่แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 โครงสร้างของสารจากกระเบาที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค แสดงค่าเป็น MIC⁵¹

Name	Structure	Anti-TB MIC (μM)
Anthelminthicin A		5.54
Anthelminthicin B		16.70
Anthelminthicin C		4.38
Chaulmoogric acid		9.82
Ethyl chaulmoograte		16.80

ที่มา: Liu X, Chen C, He W, Huang P, Liu M, Wang Q, Guo H, Bolla K, Lu Y, Song F, Dai H, Liu M, Zhang L. Exploring anti-TB leads from natural products library originated from marine microbes and medicinal plants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2012;102: 447–461.

ประโยชน์ด้านอื่นจากฤทธิ์ของกระเบา

นอกจากคุณสมบัติของกระเบาที่ออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในคน มีการศึกษาคุณสมบัติอื่น เช่น Ikawa⁵² ในปี 1984 ได้ศึกษาฤทธิ์ของ chaulmoogric acid โดยวิธี disc diffusion พบการยับยั้งการเจริญของสาหร่ายสีเขียว *Chlorella pyrenoidosa* แม้ว่า chaulmoogric acid ให้ขอบเขตการยับยั้งที่ไม่กว้างมากนัก แต่ออกฤทธิ์ดีกว่ากรดไขมันชนิดอื่น อย่างไรก็ตามจากธรรมชาติของน้ำมัน ที่การซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบไม่สูงมาก ขึ้นกับชนิดของน้ำมันการวิจัยนี้ เท่ากับเป็นการประยุกต์ใช้ทางนิเวศวิทยา

การศึกษา chaulmoogra oil ที่น่าสนใจคือ การใช้เป็นแนวทางในการค้นพบโมเลกุลขนาดเล็กที่เสริมการกระตุ้นการทำงานของ protein phosphatase 5 (PP5) โดยที่ระบบประสาทส่วนกลางในผู้ป่วย Alzheimer มีการลดปริมาณ PP5 สันนิษฐานว่า small molecule PP5 activator อาจมีบทบาทสำคัญด้านการบำบัดรักษาผู้ป่วย โดยเฉพาะในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของ chaulmoogric acid กับ การ activate⁵³ จากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้มีผู้ผลิตสำหรับการพาณิชย์ที่สำคัญ เช่น Beijing Hengye Zhongyuan Chemical Co., Ltd ในสาธารณรัฐประชาชนจีน และ M.M. Arochem PVT LTD, Value Chemical (India) Limited จากอินเดีย เป็นต้น

การสร้าง nitric oxide และ PGE₂ จัดว่าเป็นต้นเหตุในปฏิกิริยาการอักเสบหรือ inflammation และมีหลักฐานเพิ่มมากขึ้น ถึงความสัมพันธ์ของ inflammation กับ การก่อโรคติดเชื้อ มะเร็ง และ rheumatoid arthritis ในปี

2011 Wang และคณะ⁵⁴ได้ศึกษาสารสกัดจาก *Hydnocarpus anthelminthica* ที่เป็น amorphous yellow powder และมี molecular formula $C_{25}H_{20}O_9$ ที่น่าจะเป็น flavonolignan analog (สาร 1) และ compound อีก 4 ชนิด (สาร 2 – 5) ได้แก่ isohydnocarpin, hydnocarpin-D, hydnocarpin และ sinaiticin ตามลำดับ โดยสาร ทั้ง 5 ชนิด มีความสามารถในการยับยั้งการสร้าง nitric oxide และ PGE_2 (Prostaglandin E_2) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ >25, >25, 7.81, 9.38 และ 10.55 mM ตามลำดับชี้ให้เห็นการออกฤทธิ์ที่น่าสนใจจากน้ำมันกระเบา

จากรายงานการศึกษาเบื้องต้นเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์จากต้นกระเบา⁵⁵ การใช้ น้ำมันเมล็ดกระเบา ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินโดยใช้ร่วมกับยาทาไตรแอมซิโนโลนอะเซโตไนด์ 0.1 % ที่ผสมน้ำมันเมล็ดกระเบา เทียบกับการใช้ยาทาไตรแอมซิโนโลนอะเซโตไนด์ 0.1 % ผสมน้ำมันมินิเออร์รัล เมื่อวัดประสิทธิภาพจากความสามารถในการลดความแดงและขุยได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อรักษานาน 4 สัปดาห์พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างการรักษาทั้งสองแบบ และไม่มีผลข้างเคียงรุนแรงจากการรักษาอย่างใดก็ตาม ใน Indian Patent: Herbal Ayurvedic Composition for Treatment of Psoriasis ⁵⁶มีการทำเป็น capsule ที่ประกอบด้วย *Clerodendrum Inerme*, *Hydnocarpus wightiana* และ *Lepidagathis cristata* และสำหรับทา ประกอบด้วย *Hydnocarpus Wightiana*, *Lepidagathis cristata*, *Pongamia glabra*, *Meua azadirachta* 10 % w/w และครีมพื้น

นอกเหนือจากฤทธิ์ที่สำคัญ คือ ฤทธิ์ต้านเชื้อโรคเรื้อน วัณโรค จาก cyclopentenyl fatty acids ฤทธิ์อื่นจากเมล็ดกระเบาที่เป็น triglycerides ของ fatty acids, sterols, flavonoids และ flavonolignans โดยเฉพาะ hydnocarpin น่าจะเป็นสารสำคัญในการแสดงออกของฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และต้านมะเร็ง ได้มีการทดสอบสารสกัดและส่วนประกอบอื่นจากกระเบา พบฤทธิ์ต่างๆทางเภสัชกรรมอย่างกว้างขวาง ได้แก่ ฤทธิ์ antibacterial, antileprotic, antitubercular, antipsoriatic, antirheumatic, hypolipidemic, antidiabetic, anticancer, anti-inflammatory และ antioxidant⁵⁷

กระเบาเป็นไม้เศรษฐกิจที่อยู่ในกลุ่มพันธุ์พืชที่ควรค่าแก่การอนุรักษ์ในประเทศไทย โดยเฉพาะประวัติการนำมาใช้กับการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในหลายภูมิภาค รวมทั้งการนำประโยชน์ด้านอื่นนอกจากการติดเชื้อจากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ที่เน้นให้เห็นถึงความน่าสนใจและคุณประโยชน์หลากหลายของสารสำคัญจากพืชกระเบา และสารอื่นอีกหลายชนิดจากพืชนี้ที่ยังไม่ได้รับการศึกษา รวมถึงผลการวิจัยสารจากกระเบาที่สำเร็จมาแล้ว เช่น น้ำมันจากเมล็ดผลกระเบาสารที่ได้จากเปลือกและเนื้อเมล็ด⁵⁵ การนำข้อมูลเหล่านี้ เพื่อไปใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ จะช่วยเสริมคุณประโยชน์ทั้งทางการสาธารณสุข การแพทย์ และด้านสิ่งแวดล้อมจากพืชชนิดนี้ได้อย่างเป็นรูปธรรม

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบและผลิตภัณฑ์กระเบา นำมาทดสอบ 2 หัวข้อใหญ่ คือ การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราและตรวจสอบคุณภาพด้านจุลชีววิทยา

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

1.1 จัดหาตัวอย่างสมุนไพร: นำมาจากสี่จังหวัดคือขอนแก่น ลำปาง อำนาจเจริญ และ อุบลราชธานี

เตรียมตัวอย่างน้ำมันกระเบาให้เหมาะสมต่อการทดสอบ

1.1.1 เตรียมเป็น emulsion

1.1.2 ใช้ตัวทำละลาย โดยให้มีชนิดและอัตราส่วนที่เหมาะสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการ

ทดสอบ

1.2 วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ใช้หลักการของ broth microdilution ใน microtiter plates ใน CLSI M27-A3 (2008)⁵⁸, CLSI M38-A2 (2008)⁵⁹, CLSI M07-A9 (2012)⁶⁰ และ CLSI M11-A8 (2012)⁶¹

1.2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราของวัตถุดิบ

1.2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราของผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

2. ตรวจสอบคุณภาพด้านจุลชีววิทยาของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป ตามวิธีของ USP 38 (2015): Microbiological examination of Nonsterile products: Chapter 61: Enumeration tests และ Chapter 62: Tests for specified microorganisms⁶²

การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและราของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

เชื้อทดสอบ

แบคทีเรีย

Bacillus cereus ATCC 1291

Escherichia coli ATCC 25922

Klebsiella pneumoniae ATCC 33499

Pseudomonas aeruginosa ATCC9027

Salmonella typhi

Shigella flexneri

Staphylococcus aureus ATCC 25923 และ ATCC 29213

Staphylococcus epidermidis ATCC 14990

Propionibacterium acnes ATCC 6919

Propionibacterium acnes P6

รา

Candida albicans ATCC 10231 และ ATCC 71023

Microsporum gypseum

Trichophyton mentagrophytes DMST 19735

อาหารเลี้ยงเชื้อที่สำคัญ

Tryptic soy agar/Tryptic soy broth (TSA/TSB)

Mueller Hinton broth (MHB)

Cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB)

Sabouraud dextrose agar/ Sabouraud dextrose broth (SDA/SDB)

RPMI 1640 medium (w L-glutamine and MOPS w/o bicarbonate, pH 7.0)

Reinforced Clostridial Agar

ยาและสารเคมี

ampicillin
Anaerocult A
ciprofloxacin
clindamycin
dimethyl sulfoxide (DMSO)
ketoconazole
lactophenol cotton blue
tween 20 และ tween 80

เครื่องมือ/วัสดุ/อุปกรณ์ที่สำคัญ

96-well microtiter plate
anaerobic jar
biosafety cabinet Class II
digital balance (4 digit)
incubator
McFarland number 0.5
micropipette (10, 200, 1000 ml)
shaking incubator
vortex

วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

ในการเพาะเชื้อและการทดสอบ “ใช้ Aseptic technique ทุกขั้นตอน”

การเตรียม Inoculum

แบคทีเรียทดสอบชนิด **aerobic** ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 1291, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 33499, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ ATCC 29213, และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 แต่ละเชื้อ ให้ทำดังนี้

1. เพาะเชื้อทดสอบ ลงบน Tryptic soy agar plate และ incubate ที่ 35-37°C 18-24 ชั่วโมง ให้ได้เชื้อที่แยกโคโลนีเดี่ยวและไม่พบการปนเปื้อน
2. นำ 4-5 โคโลนีที่เลือกมาแล้ว เพาะลงใน Tryptic soybroth และ incubate ที่ 35-37°C overnight
3. นำมาปรับความเข้มข้นของเชื้อ ให้เท่ากับมาตรฐานความขุ่นของ McFarland no. 0.5 ได้ความหนาแน่นเชื้อประมาณ 1.5×10^8 cfu/ml

4. นำ bacterial suspension จากข้อ 3 มา 0.5 ml เติมด้วย sterile distilled water 9.5 ml
 - เมื่อนำ suspension มา 10 μ l จะมีความหนาแน่นเชื้อประมาณ 7.5×10^4 cfu ที่ใช้ในการเติมลงในการทดสอบ
 - การปรับความเจือจางในอัตราส่วนอื่น เพื่อให้ได้ความหนาแน่นเชื้อที่มาก-น้อยตามต้องการในการทดสอบ และมีการทำ count ในการทดสอบแต่ละครั้ง เพื่อให้ความหนาแน่นเชื้ออยู่ในเกณฑ์กำหนดของแต่ละการทดสอบ
 - Inoculum ที่เตรียมแล้ว ควรใช้ภายในเวลา 20 นาที เพื่อไม่ให้ความหนาแน่นเชื้อเปลี่ยนแปลง

แบคทีเรียทดสอบชนิด anaerobic ได้แก่ *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 และ *P. acnes* P 6 ให้ทำดังนี้

1. เพาะเชื้อทดสอบ ลงบน Tryptic soy agar plate หรือ Modified Reinforced Clostridial Agar) โดยเร็วตามเทคนิคปลอดเชื้อให้ได้เชื้อที่แยกโคโลนีเดี่ยวและไม่พบการปนเปื้อน นำ plate บรรจุใน anaerobic jar ทันที
2. เติมน้ำ 35 ml ลงบน anaerocult A แล้วบรรจุลงใน jar ปิดฝาให้สนิท นำ jar ไป incubate ที่ 35-37°C 72 ชั่วโมง
3. เมื่อพบการเจริญเต็มทีบน plate นำ 4-5 โคโลนีที่เลือกมาแล้ว เพาะลงใน Tryptic soybroth และ incubate ในลักษณะเดิม ที่ 35-37°C 72 ชั่วโมง
4. เมื่อมีการเจริญเต็มทีใน broth นำมาปรับความเข้มข้นของเชื้อ ให้เท่ากับมาตรฐานความขุ่นของ McFarland no. 0.5
5. นำ bacterial suspension จากข้อ 4 มาทำการเจือจางให้ได้ความหนาแน่นเชื้อตามต้องการ โดย Inoculum ที่เตรียมแล้ว ควรนำมาใช้ทันที เพื่อไม่ให้เชื้อสัมผัสอากาศมากจนเกิดความเปลี่ยนแปลง

การเตรียม emulsion น้ำมันกระเบา

1. pipette น้ำมันกระเบา 1.6 ml (หรือปริมาตรตามต้องการ) ลงใน volumetric flask ที่ฆ่าเชื้อโดยใช้ 95% ethanol และแห้งแล้วหรือใน sterile screw cap test-tube
2. เติมด้วย sterile DMSO 0.2 ml (หรือปริมาตรตามต้องการ) ปั่นโดยใช้ vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาที
3. เติมด้วย tween 80 (หรือปริมาตรตามต้องการ) ปั่นโดยใช้ vortex mixer เป็นเวลา 30 วินาที
 - จัดอัตราส่วนของสารที่ใช้ หลังการผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง
 - เลือกปรับอัตราส่วนของสารที่ใช้และเวลาที่นำไปปั่นผสมที่ทำให้ไม่เกิดการแยกชั้น และสารที่ไ้ยังมีความเหลวที่สามารถใช้กับ micropipette ได้จึงมีทำการทดลองหลายครั้ง และเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของสารทดสอบและ emulsifier

วิธีทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ำมันกระเบา (หรือ emulsion)

1. นำ CAMHB ใส่ลงใน 96 well microtiter plate หลุม 1 ถึง 10 หลุม ละ 100 μ l

2. เติม น้ำมันกระเบา 100 μl ที่เตรียมไว้ลงในหลุม 1 ใช้ micropipette ดูด-ปล่อย เพื่อผสมสารให้เข้ากันดี
 3. นำสารในหลุม 1 มา 100 μl ใส่ลงในหลุม 2 และผสมให้เข้ากันดี
 5. นำสารในหลุม 2 มา 100 μl ใส่ลงในหลุม 3 และผสมให้เข้ากันดี ทำเช่นนี้จนถึงหลุม 10 แล้วดูดทิ้ง 100 μl
 6. เติม suspension ของเชื้อ ที่ปรับความเข้มข้นแล้ว ลงในหลุม 1 ถึง 10 ปริมาณหลุมละ 10 μl ผสมให้เข้ากันดี
 7. นำไปไว้ใน shaking incubator ที่ 37°C 18-24 ชั่วโมง
 8. อ่านค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นของน้ำมันกระเบาในหลุมที่มีความเข้มข้นสารทดสอบที่น้อยที่สุด ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ บันทึกผล
- แต่ละการทดสอบ ทำ 2 ซ้ำ โดยมีตัวควบคุมได้แก่ 100 μl ของหลุมต่อไปนี้
- หลุมที่ใส่ CAMHB (sterility control)
 - หลุมที่ใส่น้ำมันกระเบาหรือ emulsion ลงใน CAMHB (sterility of extract control)
 - หลุมที่เพาะเชื้อลงใน CAMHB (positive growth control) และย้อม Gram หลังการเพาะเชื้อ

นอกจากนี้ มีการทดสอบที่ใช้ยาต้านจุลชีพเป็น standard drug control ให้พร้อมกันกับการทดสอบสารทดสอบ ในลักษณะเดียวกันกับข้อ 1 ถึง ข้อ 8 โดยใช้ Cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) และใช้ standard drug แทนสารทดสอบ ค่าความเข้มข้นที่ใช้ เป็นไปตามกำหนดของยาต้านจุลชีพนั้นๆ

วิธีทดสอบหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ของน้ำมันกระเบา (หรือ emulsion)

1. จากหลุมแต่ละแถว บน 96 well microtiter plate เลือกทุกหลุมที่ไม่พบการเจริญของเชื้อที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และหลุมถัดไปอีก 1 หลุม หลังการผสมให้เข้ากันดี ใช้ sterile loop หรือ micropipette นำเชื้อจากส่วนใต้สุดแต่ละหลุม มา drop/streak ลงบน MHA plate ที่แบ่งเป็นช่องตามจำนวนหลุมที่ใช้ แต่ละช่องแทนแต่ละความเข้มข้นของสารทดสอบแต่ละหลุม
2. นำ MHA plate ไป incubate ที่ $35-37^{\circ}\text{C}$ 18-24 ชั่วโมง
3. อ่านค่า MBC คือ ค่าความเข้มข้นสารทดสอบที่น้อยที่สุด ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ- บันทึกผล

วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านรา

การทดสอบ ใช้ unicellular fungi คือ *Candida albicans* ATCC 10231 และ ATCC 71023 และ multicellular คือ *Microsporum gypseum* และ *Trichophyton mentagrophytes* DMST 19735

การเตรียม Inoculum

Candida albicans

ใช้เทคนิค-วิธีการ เช่นเดียวกับในการเตรียมแบคทีเรีย

1. นำ *Candida albicans* เพาะลงบน Sabouraud dextrose agar(SDA) โดย streak ให้ได้ isolated colony นำไปบ่มไว้ที่ 20-25°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หรือจนเจริญเต็มที่
2. เลือก 3-5 โคโลนีที่มีลักษณะคล้ายกัน นำมาทำ suspension ใน Sabouraud dextrose broth (SDB) ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland no. 0.5
3. ปรับให้ได้เชื้อมีปริมาณ $1-5 \times 10^5$ cfu/ml

Microsporum gypseum* และ *Trichophyton mentagrophytes

1. เพาะแต่ละเชื้อโดยการใส่เชื้อเข้าใน inoculum ของราเส้นใยประมาณหัวเข็มหมุดที่อยู่ในระยะการสร้างสปอร์เต็มที่ มา spot ลงบนผิวหน้า SDA plate/slant ใช้เชื้อเข้าใน inoculum ให้เนบอาหาร
 2. บ่มไว้ที่ 20°-25°C หรืออุณหภูมิห้อง จนเจริญเต็มที่และพบการสร้างสปอร์
 3. เลือกบริเวณที่มีการสร้างสปอร์ที่เจริญเต็มที่ เชื้อลงใน RPMI1640 broth หรือ SDB ที่ผสม DMSO 0.5% ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland no. 0.5
 4. ปรับให้ได้เชื้อมีปริมาณ $1-5 \times 10^5$ cfu/ml
- กรณีที่ราเส้นใยอยู่ในระยะการสร้างสปอร์เต็มที่ และเลี้ยงอยู่ใน slant อาจใช้วิธีดังต่อไปนี้
1. broth หรือ buffer เดิมลงบน culture ใช้เชื้อเข้าในหลอดสปอร์ให้อยู่ในของเหลว
 2. นำส่วนของเหลวไป centrifuge นำสปอร์ด้านล่าง ไป resuspend ด้วย RPMI1640
 3. suspension ที่ได้ นำไปปรับความขุ่น และทำการนับโดยทำ serial dilution และ ทำการ plate count

วิธีทดสอบหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของน้ำมันกระเบา (หรือ emulsion)

1. นำ RPMI 1640 broth ใส่ลงใน 96 well microtiter plate หลุม 1 ถึง 10 หลุมละ 100 μ l
 2. เติมน้ำมันกระเบา 100 μ l ที่เตรียมไว้ลงในหลุม 1 ใช้ micropipette ดูด-ปล่อย เพื่อผสมสารให้เข้ากันดี
 3. นำสารในหลุม 1 มา 100 μ l ใส่ลงในหลุม 2 และผสมให้เข้ากันดี
 5. นำสารในหลุม 2 มา 100 μ l ใส่ลงในหลุม 3 และผสมให้เข้ากันดี ทำเช่นนี้จนถึงหลุม 10 แล้วดูดทิ้ง 100 μ l
 6. เติม suspension ของเชื้อ ที่ปรับความเข้มข้นแล้ว ลงในหลุม 1 ถึง 10 ปริมาณหลุมละ 10 μ l ผสมให้เข้ากันดี
 7. สำหรับ candida นำไปบ่มที่ 37°C 24-48 ชั่วโมงสำหรับราเส้นใยนำไปบ่มที่ 25°C ควรอ่านเปรียบเทียบกับหลุม growth control
 8. อ่านค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นของน้ำมันกระเบาในหลุมที่มีความเข้มข้นสารทดสอบที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ บันทึกผล
- แต่ละการทดสอบ ทำ 2 ซ้ำ โดยมีตัวควบคุมได้แก่ 100 μ l ของหลุมต่อไปนี้
- หลุมที่ใส่ RPMI 1640 broth (sterility control)
 - หลุมที่ใส่น้ำมันกระเบาหรือ emulsion ลงใน RPMI 1640 (sterility of extract control)

-หลุมที่เพาะเชื้อลงใน RPMI 1640 (positive growth control) หลังการเพาะและพบการเจริญของเชื้อ ให้ย้อม Gram ใน candida และทำ wet mount ด้วย lactophenol cotton blue (ดู appendix)

นอกจากนี้ มีการทดสอบที่ใช้ ketoconazole เป็น standard drug control ให้พร้อมกันกับการทดสอบสารทดสอบ ในลักษณะเดียวกันกับข้อ 1 ถึง ข้อ 8 โดย standard drug แทนสารทดสอบ ค่าความเข้มข้นที่ใช้ เป็นไปตามกำหนดของยาด้านจุลชีพ

วิธีทดสอบหาค่า Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของน้ำมันกระเบา (หรือ emulsion)

1. จากหลุมแต่ละแถว บน 96 well microtiter plate เลือกทุกหลุมที่ไม่พบการเจริญของเชื้อที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า และหลุมถัดไปอีก 1 หลุม ใช้ sterile loop หรือ micropipette นำเชื้อจากส่วนใต้สุดแต่ละหลุม มา streak ลงบน SDA plate ที่แบ่งเป็นช่องตามจำนวนหลุมที่ใช้ แต่ละช่องแทนแต่ละความเข้มข้นของสารทดสอบแต่ละหลุม

2. สำหรับ candida นำ SDA plate ไปบ่มที่ 37°C 24-48 ชั่วโมงสำหรับราเส้นใยนำไปบ่มที่ 25°C และควรอ่านผล เปรียบเทียบกับหลุม growth control

3. อ่านค่า MBC คือ ค่าความเข้มข้นสารทดสอบที่น้อยที่สุด ที่ไม่พบการเจริญของเชื้อ- บันทึกผล

คุณภาพด้านจุลชีววิทยาของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

Microbial enumeration tests: Plate Method

แบคทีเรีย

1. ชั่งตัวอย่าง 10.0 กรัมหรือ 10.0 ml ใส่ลงใน Buffered Sodium Chloride-Peptone Solution pH 7.0 (buffer) ให้มีปริมาตรเป็น 100.0 ml ผสมให้เข้ากันดี

2. ทำ serial dilution โดยใช้ pipette ดูดสารข้อ 1. มา 1 ml ใส่ลงใน buffer 9 ml ผสมให้เข้ากัน

3. ดูด suspension จากข้อ 2 ใส่ลงใน buffer 9 ml ผสมให้เข้ากันดี ทำเช่นนี้ต่อจนได้อีก 5 dilution (10^{-2} – 10^{-6})

4. ดูด 1 ml ของแต่ละ dilution ของ 3 dilution ท้ายโดย pipet ลงบน plate เปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำ dilution ละ 2 plate รวมเป็น 6 plate

5. เติม 15 – 20 ml Soybean-Casein Digest Agar Medium ที่หลอมเหลวและอุ่นไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 45°C ปิดฝา plate และเอียงไปมาหรือหมุน plate จนตัวอย่างและ agar เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง จน agar set ตัว

6. incubate plate ทั้งหมดที่ 37°C 3-5 วัน

7. นับจำนวนโคโลนีจาก plate ที่มีการเจริญไม่น้อยกว่า 250 cfu ค่าเฉลี่ยที่ได้ให้นำมาคำนวณเป็นจำนวนของจุลชีพต่อกรัมหรือ ต่อ ml ของสารทดสอบ (TAMC: Total aerobic microbial count)

Fungi

1. ชั่งตัวอย่าง 10.0 กรัมหรือ 10.0 ml ใส่ลงใน Buffered Sodium Chloride-Peptone Solution pH 7.0 (buffer) ให้มีปริมาตรเป็น 100.0 ml ผสมให้เข้ากันดี

2. ทำ serial dilution โดยใช้ pipette ดูดสารข้อ 1. มา 1 ml ใส่ลงใน buffer 9 ml ผสมให้เข้ากัน

3. คูด suspension จากข้อ 2 ใส่ลงใน buffer 9 ml ผสมให้เข้ากันดี ทำเช่นนี้ต่อจนได้อีก 5 dilution (10^{-2} – 10^{-6})
4. คูด 1 ml ของแต่ละ dilution ของ 3 dilution ทำโดย pipet ลงบน plate เปลาที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำ dilution ละ 2 plate รวมเป็น 6 plate
5. เติม 15 – 20 ml Sabouraud Dextrose agar ที่หลอมเหลวและอุ่นไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 45°C ปิดฝา plate และเอียงไปมาหรือหมุน plate จนตัวอย่างและ agar เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง จน agar set ตัว
6. incubate plate ทั้งหมดที่ 25°C 5-7 วัน
7. นับจำนวนโคโลนีจาก plate ที่มีการเจริญไม่น้อยกว่า 50 cfu ค่าเฉลี่ยที่ได้ให้นำมาคำนวณเป็นจำนวนของจุลชีพต่อกรัมหรือ ต่อ ml ของสารทดสอบ (TYMC: Total combined yeasts and molds count)

Tests for Specified microorganisms

Salmonella

1. เตรียม 1:10 ตัวอย่างทดสอบนำมาตัวอย่างทดสอบที่เตรียมนี้มาในปริมาณที่มีตัวอย่างไม่น้อยกว่า 10 g เพาะลงใน Soybean-casein digest broth ผสมให้เข้ากันดี
 2. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C – 35°C ในเวลา 18-24 ชั่วโมง
 3. นำ 0.1 mL Soybean-casein digest broth ข้างต้นเพาะลงปริมาณที่เหมาะสมของ Rappaport Vasiliadis *Salmonella* enrichment broth
 4. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C – 35°C ในเวลา 18-24 ชั่วโมง
 5. นำมาเพาะลงบน Xylose lysine deoxycholate agar
 6. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C – 35°C ในเวลา 18-48 ชั่วโมง
- ตัวอย่างทดสอบอาจมี *Salmonella* เมื่อพบการเจริญที่ชัดเจนให้ลักษณะโคโลนีสีแดงที่อาจพบจุดดำตรงกลางหรือไม่ก็ได้ควรนำไปพิสูจน์จำแนกชนิดจุลินทรีย์เพื่อยืนยันต่อไป

Pseudomonas aeruginosa

1. เตรียม 1:10 ตัวอย่างทดสอบที่มีตัวอย่างไม่น้อยกว่า 1 g นำตัวอย่างทดสอบที่เตรียมนี้มา 10 mL ที่มีตัวอย่างเท่ากับ 1 g เพาะลงใน Soybean-casein digest broth ผสมให้เข้ากันดี
 2. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C – 35°C ในเวลา 18-24 ชั่วโมง
 3. นำตัวอย่างจากข้อ 2 เพาะลงบน Cetrimide agar
 4. บ่มที่อุณหภูมิ 30°C – 35°C ในเวลา 18-72 ชั่วโมง
- ตัวอย่างทดสอบอาจมี *P. aeruginosa* เมื่อพบโคโลนีบนอาหารข้างต้นควรนำไปพิสูจน์จำแนกชนิดจุลินทรีย์เพื่อยืนยันต่อไป

Staphylococcus aureus

- 1.เตรียม 1:10 ตัวอย่างทดสอบที่มีตัวอย่างไม่น้อยกว่า 1 g นำมา 10 mL ที่มีตัวอย่างเท่ากับ 1 g เพาะลงใน Soybean-casein digest broth ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน
 - 2.บ่มที่อุณหภูมิ 30° C- 35° C ในเวลา 18-24 ชั่วโมง
 - 3.นำตัวอย่างข้างต้นเพาะลงบน Mannitol salt agar
 - 4.บ่มที่อุณหภูมิ 30° C- 35° C ในเวลา 18-72 ชั่วโมง
- ตัวอย่างทดสอบอาจมี *S. aureus* เมื่อพบโคโลนีสีเหลืองหรือขาวล้อมด้วยบริเวณสีเหลืองบนอาหารข้างต้นควรนำไปพิสูจน์จำแนกชนิดจุลินทรีย์เพื่อยืนยันต่อไป

Clostridia

- 1.นำผลิตภัณฑ์ตัวอย่างไม่น้อยกว่า 2 g หรือ 2 mL มาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ Soybean casein digest broth ให้เป็น 1:10
 - 2.แบ่งผลิตภัณฑ์เจือจางนี้เป็น 2 ส่วนส่วนละอย่างน้อย 10 mL นำเฉพาะส่วนแรกมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80° C องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีแล้วทำให้เย็นโดยเร็ว 4.2.6.2 Selection and subculture
 - 3.นำ 10 mL ที่มีผลิตภัณฑ์ไม่น้อยกว่า 1 g ของแต่ละส่วนมาเพาะลงใน Reinforced medium for Clostridia
 - 4.บ่มที่อุณหภูมิ 30° C-35° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
 - 5.นำแต่ละส่วนเพาะลงบน Columbia agar และบ่มภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30° C-35° C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง
- ตัวอย่างทดสอบอาจมี *clostridium* g,njv พบการเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนและเมื่อนำจุลินทรีย์ชนิดนี้ไปเพาะจากโคโลนีไปย้อมอาจพบการสร้างสปอร์หรือไม่ก็ได้ นอกจากนี้ยังไม่พบการสร้างเอ็นไซม์คาตาเลสควรนำไปพิสูจน์จำแนกชนิดจุลินทรีย์เพื่อยืนยันต่อไป

Candida albicans

- 1.นำผลิตภัณฑ์ตัวอย่างมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ Soybean casein digest broth ให้เป็น 1:10
 - 2.นำตัวอย่างเจือจาง 10 mL ที่มีผลิตภัณฑ์ไม่น้อยกว่า 1 g เพาะลงใน Sabouraud dextrose broth 100 mL ผสมให้เข้ากัน
 - 3.นำไปเพาะภายใต้อุณหภูมิ 30° C -35° C เป็นเวลา 3-5 วัน
 - 4.นำมาเพาะบน Sabouraud dextrose agar ภายใต้อุณหภูมิ 30° C -35° C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
 - 5.นำข้อ 4 ข้างต้นมาเพาะบน Sabouraud dextrose agar
 - 6.บ่มที่อุณหภูมิ 30° C -35° C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- ตัวอย่างทดสอบที่มี *Candida albicans* จะพบโคโลนีสีขาวบนอาหารชนิดนี้ควรนำไปพิสูจน์จำแนกชนิดจุลินทรีย์เพื่อยืนยันต่อไป

