



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนาอาหารกึ่งที่มีส่วนผสมของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์
เพื่อระงับการเจริญของเชื้อไวรัสโคโรนาในกึ่ง

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษัชกร ดร. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์ และคณะ

ตุลาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนาอาหารกึ่งที่มีส่วนผสมของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์
เพื่อระงับการเจริญของเชื้อไวรัสโคโรนาในกึ่ง

คณะผู้วิจัย

- ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภก. ดร. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์
- รองศาสตราจารย์ สพญ. ดร. เจนนุช ว่องธวัชชัย

สังกัด

ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี
คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

จากการที่สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ได้อนุมัติทุนวิจัยพื้นฐานเชิงยุทธศาสตร์ “สมุนไพร ยารักษาโรคและสารเสริมสุขภาพ” ประจำปี 2548 สำหรับดำเนินการวิจัยโครงการ “การพัฒนาอาหารกึ่งที่มีส่วนผสมของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์เพื่อระงับการเจริญของเชื้อไวรัสโกลีโรโคโรนาในกึ่ง” ตามสัญญาเลขที่ DBG4780004 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งทำให้งานวิจัยสำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการวิจัย

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะกรรมการพิจารณาทุน คณะกรรมการติดตามและประเมินผลงานวิจัย ที่ให้ข้อเสนอแนะต่างๆ ที่ทำให้งานวิจัยนี้มีคุณค่ามากยิ่งขึ้น

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ:	DBG4780004
ชื่อโครงการ:	การพัฒนาอาหารกึ่งที่มีส่วนผสมของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์เพื่อระงับการเจริญของเชื้อไวรัสโคโรนาในกึ่ง
ชื่อนักวิจัย:	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภก. ดร. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์ ภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รองศาสตราจารย์ สพญ. ดร. เจนนุช ว่องธวัชชัย ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail Address:	pornchai.r@chula.ac.th
ระยะเวลาโครงการ:	2 ปี

การวิจัยนี้ได้นำสารสกัดจากขมิ้นชัน (*Curcuma Longa L.*, Turmeric) ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมาตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญ curcuminoids และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสกุลไวรัสที่แยกได้จากกึ่งทะเลเปวย ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ curcuminoids ในสารสกัดขมิ้นชันด้วยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่ามี curcuminoids 99.42% ซึ่งประกอบไปด้วยสาร 3 ชนิด ได้แก่ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ในปริมาณ 72.29, 23.50 และ 3.63% ตามลำดับ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดดังกล่าวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสจำนวน 71 isolates ซึ่งแยกจากตัวอย่างกึ่งปวยที่มีอาการของโรคไวรัสโคโรนาที่เก็บจากเขตพื้นที่การเลี้ยงต่างๆ ของประเทศไทย และเวียดนาม โดยเชื้อไวรัสผ่านการจำแนกชนิดของเชื้อตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API-20 (BioMerieux) ผลการทดสอบด้วยวิธี agar dilution method พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส (Minimum Inhibitory Concentrations; MICs) ของสารสกัดขมิ้นชันอยู่ในช่วง 64-1200 µg/ml โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสได้ 50% (MIC₅₀) และ 90% (MIC₉₀) เท่ากับ 625 µg/ml และ 800 µg/ml ตามลำดับ สำหรับการทดสอบความคงตัวของสารสกัดขมิ้นชันที่ผสมอยู่ในอาหารกึ่งในน้ำ โดยการแช่อาหารที่มีสารเคอร์คิวมินอยด์ความเข้มข้น 1200 µg/g ในน้ำ พบว่า มีสารเคอร์คิวมินอยด์ที่คงเหลืออยู่ในอาหารประมาณ 70% และ 60% ของความเข้มข้นเริ่มต้น เมื่อแช่อาหารอยู่ในน้ำเป็นเวลา 30 และ 60 นาทีตามลำดับ ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสและความคงตัวของสารสกัดขมิ้นชันในอาหารกึ่งเมื่ออยู่ในน้ำ แสดงถึงศักยภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการนำมาพัฒนาเพื่อเป็นทางเลือกสำหรับใช้เป็นสารต้านจุลชีพสำหรับผสมในอาหารกึ่งเพื่อป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อไวรัสในกึ่งทะเล

คำหลัก: สารสกัดขมิ้นชัน, เคอร์คิวมินอยด์, ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส, กึ่งทะเล

Abstract

Project Code: DBG4780004

Project Title: Development of Shrimp Feed Containing Curcuminoid Extract for Inhibitory Effect Against Shrimp Pathogenic Vibrios

Investigator: Assistant Professor Pornchai Rojsittisak, Ph.D.
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University
Associate Professor Janenuj Wongtavatchai, D.V.M., Ph.D.
Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University

E-mail Address: pornchai.r@chula.ac.th

Project Period: 2 years

The commercially available turmeric extract from *Curcuma longa* L. was standardized and evaluated for antibacterial activity against shrimp pathogenic vibrios. HPLC determination of the extract revealed 99.42% of total curcuminoids, consisting of curcumin (72.29%), demethoxycurcumin (23.50%) and bisdemethoxycurcumin (3.63%). The antibacterial activity of the extract was tested *in vitro* against seventy one vibrio isolates obtained from diseased shrimps. The diseased shrimps with clinical signs suggesting vibriosis were sampled from different culture areas of Thailand and Vietnam, and the clinical bacterial isolates were identified by API-20 system (BioMerieux). Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of the turmeric extract determined by agar dilution method were in the range of 64-1200 µg/ml. Analysis of MIC values indicated that 50% of the tested isolates (MIC₅₀) were susceptible to 625 µg/ml extract while 90% of the tested isolates (MIC₉₀) were susceptible to 800 µg/ml. The standardized turmeric extract was subsequently incorporated in commercial shrimp feed. The stability of turmeric extract in the incorporated feed was tested by immersion of the incorporated feed in water and the amount of curcuminoids was assayed over different immersion times. In comparison to the starting amount of curcuminoids found in the incorporated feed before stability testing (1200 µg/g), the amounts of curcuminoids were approximately 70% and 60% measured at 30 and 60 minutes immersion, respectively. This study demonstrated *in vitro* anti-vibrio potency of turmeric extract and the stability of the compound when incorporated in shrimp feed, thus suggesting potential application as an alternative to antimicrobial chemicals in shrimp feed for the treatment of vibriosis in shrimp culture.

Keywords: Turmeric, Curcumin, Minimum inhibitory concentration, Vibrio, Shrimp

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
สารบัญภาพ	vi
สารบัญตาราง	xii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	xiii
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	9
บทที่ 3 ผลการทดลอง	13
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	26
บทที่ 5 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	29
เอกสารอ้างอิง	31
Output จากโครงการวิจัย	35
ภาคผนวก	36

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 โครงสร้างทางเคมีของ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin	7
2 HPLC chromatograms ของสารละลาย curcumin 0.03 mg/ml (A), desmethoxy-curcumin 0.01 mg/ml (B), bisdesmethoxycurcumin 0.002 mg/ml (C) และสารสกัดขมิ้นชัน 0.04 mg/ml (D)	14
3 ค่า MIC ₅₀ และ MIC ₉₀ ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทย และเวียดนาม จำนวน 71 isolates	21
4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันในอาหารเทียบกับตอนเริ่มต้น กับระยะเวลาของอาหารกุ้งที่แช่อยู่ในน้ำ	25

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การจำแนกชนิดของเชื้อ vibrios ตามคุณสมบัติทางกายภาพ และชีวเคมี	15-16
2 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานของยา Chloramphenicol (positive control) และสารสกัดขมิ้นชัน	17
3 ค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วย ในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยและเวียดนาม	18-20
4 ค่า MIC ₅₀ และ MIC ₉₀ ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยและเวียดนาม จำนวน 71 isolates	22
5 ปริมาณสารสำคัญเคอร์คิวมินอยด์ในอาหารกุ้งที่คงอยู่ เมื่อแช่ในน้ำที่ระยะเวลาต่าง ๆ	23
6 ร้อยละของความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันในอาหารเทียบกับ ตอนเริ่มต้น เมื่อแช่อยู่ในน้ำที่เวลาต่าง ๆ	24

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้

°C	องศาเซลเซียส
HPLC	high-performance liquid chromatography
mg	มิลลิกรัม
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
min	นาที
ml	มิลลิลิตร
ng	นาโนกรัม
nm	นาโนเมตร
μ	micron
μg	ไมโครกรัม
μl	ไมโครลิตร

บทที่ 1

บทนำ

โรค vibrio cholerae ในกุ้งเพาะเลี้ยง

ตั้งแต่ปี 2529 เป็นต้นมา การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของประเทศไทยได้เข้าสู่ระบบการเลี้ยงแบบพัฒนา เกษตรกรมีการเลี้ยงกุ้งอย่างหนาแน่นเพื่อเพิ่มผลผลิต ลักษณะการเลี้ยงกุ้งดังกล่าวเป็นการโน้มนำให้เกิดปัญหาในระหว่างการเลี้ยง เช่น ปัญหาการจัดการคุณภาพน้ำ ปัญหาการเกิดโรคติดเชื้อ เป็นต้น ปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญและอาจทำให้กุ้งตายในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้เป็นจำนวนมาก คือ การติดเชื้อแบคทีเรีย แบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำมีหลายกลุ่ม แต่มีเพียงสองกลุ่มที่ก่อให้เกิดความสูญเสียเป็นจำนวนมาก คือ กลุ่ม filamentous bacteria และกลุ่ม vibrios bacteria เชื้อ vibrios ทำให้เกิดโรคได้รุนแรงและมีอัตราการตายสูง เนื่องจากเชื้อ vibrios ก่อโรคได้ทั้งแบบ external และ internal infection (Lavilla-Pitogo, 1995) เชื้อ vibrios เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบได้ปกติทั่วไปในน้ำทะเลและเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) การเกิดโรค vibriosis ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสูญเสียของผลผลิตกุ้งในฟาร์ม โดยกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อมีอัตราการตายตั้งแต่เล็กน้อยจนถึง 100% โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่การจัดการไม่เหมาะสมหรือสภาวะที่ทำให้กุ้งเครียด กินอาหารลดลง (Jiravanichpaisal et al., 1994)

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ vibrio

เชื้อแบคทีเรียสกุล vibrio เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ผลทดสอบ oxidase เป็นบวก (ยกเว้น 2 ชนิด) ลักษณะเป็นรูปแท่งหรือเป็นแท่งโค้ง สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) (Elliot et al., 1992) ใช้เอนไซม์ catalase และ oxidase ใช้น้ำตาลได้โดยผ่านกระบวนการหมักและกระบวนการหายใจ เป็นแบคทีเรียชนิดไซโครโทรปส์ คือ เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง แต่ที่อุณหภูมิต่ำก็สามารถเจริญได้ (สุมณฑา, 2545) เชื้อ vibrio เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด blood agar และใน selective media Thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการจำแนกเชื้อ vibrio อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ประกอบด้วย sucrose oxgall sodium cholate bromthymol blue และ thymol blue indicators มีคุณสมบัติเป็นต่าง pH เท่ากับ 8.6 ซึ่งช่วยในการเจริญเติบโตของ vibrio ค่า pH ที่สูง oxgall และ cholate ช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก และเชื้อ bacilli lactose-fermenting แกรมลบ การ fermentation ของ sucrose ใช้ในการแยกเชื้อ vibrio เช่น *V. cholerae* มีคุณสมบัติ sucrose fermentative เป็นบวก และ *V. parahaemolyticus* เป็นลบ (Delost, 1997) เชื้อ vibrio หลายชนิดทำให้เกิดโรคในมนุษย์และเป็นสาเหตุของ food borne disease เชื้อ vibrio (ยกเว้น

V. cholerae และ *V. mimicus*) ต้องการ sodium chloride ในการเจริญเติบโต จึงเรียกเชื้อในกลุ่มนี้ว่า “halophilic” (Elliot et al., 1992)

แบคทีเรียจำพวก vibrio มีอย่างน้อย 28 species โดยมี 5 species ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษโดยแบคทีเรียในกลุ่มอาศัยอยู่ในน้ำทะเลและปนเปื้อนกับอาหารทะเล ได้แก่ *V. parahaemolyticus* *V. cholera* *V. vulnificus* *V. alginolyticus* โดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำบริเวณชายฝั่งทะเลปิด การตรวจพบเชื้อชนิดนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำทะเล คือ ถ้าอุณหภูมิของน้ำทะเลต่ำกว่า 15 °C มักตรวจไม่พบเชื้อนี้ แม้ว่าแบคทีเรียจะมีชีวิตอยู่ในดินตะกอนก้นทะเลที่ไม่ลึกมากนักก็ตาม เพราะแบคทีเรียไม่ทนต่อสภาวะที่มีความกดของอากาศต่ำ ซึ่งเป็นสภาวะของก้นทะเล ณ ระดับที่มีความลึกมาก ๆ ในน้ำทะเล พบว่าแบคทีเรียชอบที่จะอาศัยอยู่กับสัตว์น้ำจำพวก crustacean เช่น กุ้ง กั้ง ปู มากกว่าสัตว์ทะเลชนิดอื่นๆ *V. cholera* เป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของอหิวาตกโรค โดยแบคทีเรียนี้อาศัยอยู่ในน้ำสกปรกและปนเปื้อนในอาหาร *V. vulnificus* อาศัยอยู่ในน้ำทะเลและอาหารทะเล โดยเฉพาะหอยที่เลี้ยงในบริเวณซึ่งมีอินทรีย์วัตถุปนเปื้อนอยู่สูง หรือใกล้น้ำทะเลที่มีน้ำเสียซึ่งไม่ผ่านการบำบัด หรือบำบัดไม่ถูกต้อง ส่วนมากแยกได้จากหอยชนิดต่างๆ มากกว่าจากกุ้ง กั้งและปู เชื้อ *V. alginolyticus* และ *V. hollisae* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำทะเล ทำลายเนื้อเยื่อและทำให้หุ้กเสป พบ *V. alginolyticus* ในตัวอย่างสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและในตะกอนดินมากกว่าในน้ำทะเล นอกจากนี้ยังพบในหอย อัตราการพบขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำทะเล ถ้าน้ำทะเลอุ่นจะพบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สูง (สุมนทนา, 2545)

การก่อโรคของเชื้อ vibrio ในกุ้งกุลาดำ

เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำมีหลายกลุ่ม แต่มี 2 กลุ่มที่มีผลทำให้เกิดความสูญเสียมาก คือ กลุ่ม filamentous bacteria และ vibrio โดยเชื้อ vibrio ทำให้เกิดโรครุนแรงกว่าและมีอัตราการตายสูง เนื่องจาก filamentous bacteria ก่อโรคโดยไปเกาะบริเวณเปลือกนอกของกุ้ง (fouling) ทำให้กุ้งเจริญเติบโตช้าและลอกคราบไม่ได้ ขณะที่เชื้อ vibrio ก่อโรคได้ทั้งแบบ external หรือ internal infection (Lavilla-Pigoto, 1995) เชื้อ vibrio เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดที่พบได้ในกุ้งกุลาดำ เป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) อัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อแตกต่างกันไป ตั้งแต่เล็กน้อยจนถึง 100% ในกุ้งที่อยู่ในสภาวะเครียด (Jiravanichpaisal et al., 1994) โดยอุณหภูมิมีผลต่ออุบัติการณ์และชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบ มีการศึกษาในกุ้งที่โตช้าพบว่าปริมาณของเชื้อแอโรโมนาสและ vibrio มาก เชื้อ vibrio ที่พบว่าทำให้เกิด septicemia ในสัตว์จำพวก crustacean ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* และ *V. anguillarum* (Eduardo et al., 1998) เชื้อ vibrio ที่พบว่าทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงในเอเชีย ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. cholera* (non-01), *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. harvey*, *V. neresis*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus*, *V. tubiashii* และ *V. vulnificus* (Lavilla-Pigoto, 1995) และเชื้อ vibrio ที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำป่วยในเขตการเลี้ยงแถบต่างๆ ของประเทศไทย ได้แก่

V. alginolyticus, *V. cholera*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* (Jarernporn et al., 2003)

การศึกษาชนิดของเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ โดยเก็บตัวอย่างกุ้งป่วยมาเพาะเชื้อจากส่วนต่างๆ ของกุ้ง ได้แก่ hepatopancreas และ hemolymph พบว่า เชื้อไวรัสที่แยกได้ส่วนใหญ่ประกอบด้วย *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. anguillarum*, *V. fluvialis* และ *V. harveyi* (Jiravanichpaisal et al., 1995) โดยพบการติดเชื้อทั้งแบบชนิดเดียวหรือแบบ mixed infection จากเชื้อไวรัส 2 ชนิด อาการของกุ้งป่วยที่พบได้แก่ ไม่มีแรงว่ายน้ำ โดยเกาะบริเวณผิวน้ำ หรือจมลงก้นบ่อ ไม่มีการติดตัวหนึ่เมื่อมีสิ่งรบกวน กุ้งส่วนใหญ่มี zoothamnium สาหร่าย หรือเพรียงเกาะบริเวณเหงือกและเปลือก ทางเดินอาหารว่างเปล่า hepatopancreas มีขนาดเล็กลง ความรุนแรงของโรคในกุ้งโตพบอาการน้อยกว่าแต่มักพบว่ามีอาการกร่อนของขอบ uropods, pleopods, periopods และ telson เป็นสีน้ำตาล มักพบรอยโรคสีขาวหรือดำบริเวณเปลือก อวัยวะภายในเกิด nodule สีดำ การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า การติดเชื้อแบบ mild infection ใน hepatopancreas tubule มีเชื้อแบคทีเรียและมีการลอกหลุดของ necrotic hepatopancreatic cells ใน lumen ร่วมกับ haemolytic infiltration ใน interstitial haemal sinuses สำหรับกุ้งที่ติดเชื้อรุนแรงพบเชื้อแบคทีเรียปริมาณมากภายใน tubular lumen ร่วมกับการเกิด hepatopancreatic tubular necrosis basal lamina ของ tubule ที่มีเชื้อแบคทีเรียมีลักษณะหนาตัวขึ้นเนื่องจากการสร้าง collagenous fibers และพบเซลล์ที่มี nucleus ลักษณะ spindle-shaped อยู่ใน collagenous fiber และมี hemocyte มาล้อมรอบบริเวณ tubule ทำให้เกิดเป็นรอยโรคแบบ granulomatous ซึ่งบริเวณ interstitial tissue เกิด edema enlarged sinuses มีการสะสมของ eosinophilic granules และ amorphous matter มี infiltrated hemocyte ร่วมกับ semi granular และ granular cells hemocyte ซึ่งส่วนใหญ่เป็น semigranular จะมารวมตัวกันเป็นผนังล้อมรอบ tubules ที่มี bacteria เข้ามา กรณีที่เป็น old granulomatous พบว่ามี melanization และไม่พบเชื้อแบคทีเรีย interstitial tissue รอบก้อน granulomatous ขยายออกมากขึ้น มีการสร้าง granulation tissue ซึ่งประกอบด้วย collagenous fiber และการ adhering ของ cell ที่มี nucleus ลักษณะ spindle-shapes haemal sinuses และ infiltrated hemocyte นอกจากใน hepatopancreas แล้ว ยังพบการ infiltrated ของ hemocyte ที่เก็บกินเชื้อแบคทีเรีย ในกล้ามเนื้อหัวใจ (Jiravanichpaisal et al., 1995)

ปัญหาที่พบได้บ่อยในฟาร์มเพาะฟักและอนุบาลวัยอ่อน คือ โรคติดเชื้อไวรัสเรืองแสง (luminescent vibriosis) ซึ่งทำให้เห็นลูกกุ้งเป็นสีเขียวเรืองแสง (Lavilla-Pigoto, 1995) มีสาเหตุจาก *V. harveyi* แยกได้จากสิ่งแวดล้อมในทะเล มักพบเชื้อชนิดนี้บริเวณผิวนอกและจากในลำไส้ของสัตว์ทะเล รวมถึงกุ้งกุลาดำวัยอ่อน โดยพบเชื้อปริมาณมากใน maternal content ซึ่งทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อระหว่างการวางไข่ อาการที่พบได้แก่ เปลือกเปราะแตกง่าย มีจุดสีน้ำตาล

หรือดำบริเวณเปลือก ตัวมีสีเข้มขึ้นหรือมีสีแดง เหงือกเป็นสีชมพูหรือน้ำตาล กล้ามเนื้อสีขาวขุ่น ไม่มีอาหารในลำไส้ หางกร่อน hepatopancreas มีสีเข้ม ฝ่อและแน่น หรือบวมซืดและนิ่ม (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994) แหล่งของเชื้อ *V. harveyi* ที่สำคัญในฟาร์มเพาะฟัก นอกเหนือจาก น้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้ง ได้แก่ สิ่งขับถ่าย เปลือกนอกของแม่กุ้ง และน้ำที่ใช้เลี้ยง *artemia* โดยในลำไส้ของ แม่กุ้งมีเชื้อแบคทีเรียปริมาณมากถึง 2×10^9 cells/g โดย 63-77% เป็นเชื้อไวรัส และเป็นเชื้อ *V. harveyi* ปริมาณมากที่สุด (16-18%) โรคไวรัสโรเรืองแสงทำให้เกิดความเสียหายต่อ hepatopancreas เช่น ทำให้เกิดการอักเสบบริเวณ intertubular sinuses ทำให้เกิดความเสียหายต่อ ทาง สรีรวิทยาและทำให้ลูกกุ้งเครียด โตช้า และตายในที่สุด (Eduardo *et al.*, 1998)

V. parahaemolyticus ทำให้เกิดโรค red leg disease ในกุ้ง โดยพบว่าทำให้กุ้งมีอัตราการ ตายถึง >90% ลักษณะของโรค คือ พบการกระจายของ chromatophores บริเวณ periopods และ pleopods ทำให้เห็นระยางค์เป็นสีแดง พบการเกิด pigmentation บริเวณ brachial region ของ cephalothorax การศึกษาของ Sudheesh and Huai-Shu (2001) โดยการฉีดเชื้อ *V. parahaemolyticus* 0.1 ml เข้ากล้ามเนื้อบริเวณปล้องลำตัวที่ 3 และ 4 เท่ากับปริมาณเชื้อ 1×10^8 , 1×10^6 , 1×10^4 และ 1×10^2 CFU ต่อตัว ภายใน 6 ชั่วโมงหลังจากฉีดเชื้อ พบว่ากุ้งมีอาการ เคลื่อนที่ ช้าลง เสียการทรงตัว ว่ายน้ำวน และไม่มีแรง hemolymph ไม่แข็งตัว ระยางค์มีสีแดง เมื่อครบ 7 วัน กุ้งในกลุ่มควบคุม (ฉีดน้ำกลั่น) ไม่ตาย ขณะที่กลุ่ม 1×10^8 CFU ตาย 100% และกลุ่ม 1×10^6 , 1×10^4 และ 1×10^2 CFU ตาย 80, 20 และ 10% ตามลำดับ ค่า LD_{50} เท่ากับ 1×10^5 CFU

V. vulnificus ทำให้เกิดโรค black splint syndrome ในกุ้งระยะ juvenile พบรอยโรค ลักษณะเป็นจุดดำ filament หรือ splints ในกล้ามเนื้อ ซึ่งรอยโรคนี้ยังคงอยู่แม้จะผ่านกระบวนการ ปรุงอาหาร ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (Lavilla-Pigoto, 1995)

การรักษาโรคไวรัสในกุ้งกุลาดำให้ได้ผลดีควรเริ่มรักษาเมื่อติดเชื้อในระยะแรก ซึ่งในทาง ปฏิบัติสามารถตรวจสอบได้ยาก ซึ่ง Nash และคณะ (1992) ได้ให้ข้อเสนอว่าควรมีการป้องกันโรค ซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดโดยควรมีการจัดการที่ดี เช่น ไม่เลี้ยงกุ้งหนาแน่นเกินไป และรักษาคุณภาพน้ำให้ มีปริมาณ phytoplankton ที่เหมาะสม การให้อาหารเหมาะสม ร่วมกับการเฝ้าระวังโรคอย่าง สม่ำเสมอเพื่อให้วินิจฉัยโรคได้รวดเร็ว

การจัดการปัญหาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำ

หลังจากที่ประเทศไทยประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ทำให้มีการเลี้ยงเพิ่ม มากขึ้น พบว่าฟาร์มเลี้ยงกุ้งมีปัญหาด้านการเกิดโรคติดเชื้อมากขึ้น ส่งผลให้มีการใช้ยาเพื่อป้องกัน และรักษาโรคในฟาร์มกุ้งอย่างแพร่หลาย รวมทั้งการใช้ยาอย่างไม่ถูกต้อง

ยาต้านจุลชีพที่มีการใช้มากในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีหลายชนิด เช่น oxytetracycline ซึ่งเป็นยาที่ทางสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทยและหลายประเทศอนุญาตให้ใช้ในสัตว์น้ำ โดยแนะนำให้ใช้ผสมในอาหารขนาด 25-50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ให้กินติดต่อกัน 7-10 วัน oxytetracycline เป็นยาที่ให้ผลดีในการควบคุมโรคติดเชื้อไวรัสใน ประเทศไทย แม้ว่าผลทดสอบทางห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อแบคทีเรียเริ่มมีความต้านทานต่อยา (Tonguthai and Chanratchakool, 1992; Jarernporn et al., 2003) ยาในกลุ่ม nitrofurans ได้แก่ furazolidone, furacin, nitrofurazone และ nitrofurantoin เป็นยาที่มีการใช้เพื่อรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียในกุ้งวัยอ่อน โดยใช้ขนาด 1-2 ppm แซ่เป็นเวลานาน พบว่ายากลุ่มนี้ได้ผลดีในการต่อต้านเชื้อไวรัสในหอยทดลองแต่พบว่าการใช้อาจไม่ได้ผลในการใช้ในบ่อดิน แต่ปัจจุบันยาในกลุ่มนี้ไม่ได้รับอนุญาตให้ใช้ (Tonguthai and Chanratchakool, 1992) เช่นเดียวกับยา chloramphenicol ซึ่งมีการใช้ในประเทศไทยมานาน เนื่องจากยา chloramphenicol ที่ตกค้างในอาหารทำให้เกิด aplastic anemia ในมนุษย์ โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของยา (Spoo and Riviere, 1995) oxolinic acid เป็นยาอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำ โดยอยู่ในรูปของ premix ขนาดยาที่ใช้ขึ้นอยู่กับขนาดกุ้ง โดยให้ขนาด 2 กรัม/กิโลกรัมอาหาร ต่อวันในกุ้งที่น้ำหนักตัวน้อยกว่า 2 กรัม และให้ขนาด 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร ในกุ้งที่น้ำหนักตัวมากกว่า 2 กรัม ระยะเวลาหยุดยาควรมากกว่า 25-30 วันหลังจากให้ยาครั้งสุดท้าย นอกจากนี้ยาด้านจุลชีพอื่นที่มีการใช้ในสัตว์น้ำ เช่น ยากลุ่ม sulfa-trimetroprim กลุ่ม fluoroquinolone เป็นต้น (Tonguthai and Chanratchakool, 1992) เนื่องจากการจำกัดชนิดของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในสัตว์ที่เป็นอาหารและปัญหายาสัตว์ตกค้างในเนื้อกุ้ง (Graslund et. al., 2002 และเจนนุช 2547) ทำให้มีการทดสอบการใช้สมุนไพรไทยชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ โดยการผสมสมุนไพรในอาหารกุ้งทดแทนการใช้ยาต้านจุลชีพ

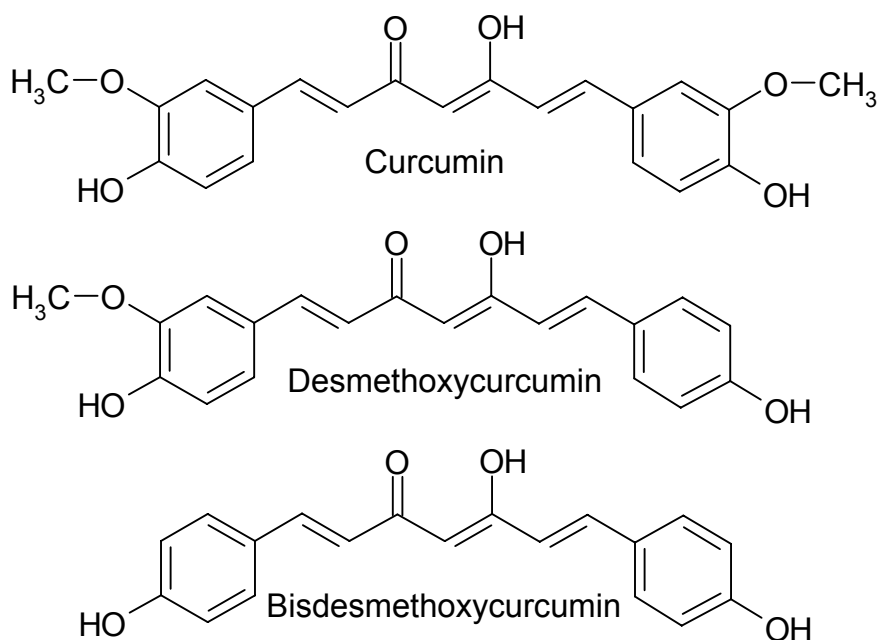
สมุนไพรขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชล้มลุกมีเหง้าอยู่ใต้ดิน เนื้อในของเหง้าขมิ้นชันมีสีเหลืองเข้มจนสีแสดจัด มีกลิ่นเฉพาะตัว ใบรูปรียาว ปลายแหลมคล้ายใบพุทธรักษา ดอกออกเป็นช่อ มีก้านช่อแทงจากเหง้าโดยตรง ออกตรงกลางระหว่างใบคู่ในสุด ดอกสีขาว มีแถบสีเหลืองคาด มีกลีบประดับสีขาวหรือเขียว สำหรับส่วนหัวและเหง้า (rhizome) ถูกนำมาใช้เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็นสารแต่งสีเหลือง เป็นเครื่องเทศปรุงแต่งกลิ่นและรสในอาหาร และนิยมใช้ในเครื่องสำอาง สบู่ ครีมนวดผิว แชมพูสระผม และโลชั่นต่างๆ ส่วนเหง้าทั้งแบบสดและแห้งสามารถนำมาทำเป็นยา โดยเหง้าของขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และลดการอักเสบ น้ำมันหอมระเหยในขมิ้นชันมีสรรพคุณบรรเทาอาการปวดท้อง ท้องอืด แน่นจุกเสียด

สารสำคัญที่พบในเหง้าของขมิ้นชันประกอบด้วยสารหลัก 2 ประเภท คือ 1) น้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีสารประกอบหลัก ได้แก่ aromatic turmerone, α -turmerone และ β -turmerone และ 2) curcuminoids ซึ่งเป็นสารสีส้ม ประกอบด้วย curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin (Jayaprakasha et al., 2002) (รูปที่ 1)

curcuminoids มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial) (Mishra et al., 2005) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Grinberg et al., 1996; Bonte et al., 1997; Das et al., 2002) ต้านอักเสบ (anti-inflammatory) (Ammon and Wahli et al., 1991; Brouet and Oshima et al., 1995; Joe and Lokesh et al., 1997; Rajakrishnan et al., 2000) ต้านปรสิต (antiparasite) (Heng et al., 2000) ต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic) (Polasa et al., 2004) ต้านและป้องกันมะเร็ง (chemoprotective และ anticancer) (Limtrakul et al., 1997; Inano et al., 2000; Khafif et al., 1998; Perkins et al., 2002) และฤทธิ์ป้องกันความเป็นพิษต่อตับ (hepatoprotective) (Song et al., 2001) จากการทดสอบความเป็นพิษของ curcuminoids นั้น ไม่พบความเป็นพิษเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน (Sharma et al., 2001) จากข้อมูลด้านเภสัชวิทยาและพิษวิทยาข้างต้น มีความเป็นไปได้สูงว่า curcuminoids จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโคโรนาในกุ่ม นอกจากนี้ ความเป็นพิษที่ต่ำมากทำให้ curcuminoids มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารกุ่ม เพื่อการป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อในกุ่ม

เนื่องจากสารสกัดจากสมุนไพรมักประกอบไปด้วยสารเคมีหลายชนิด โดยสารแต่ละชนิดอาจมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและความเป็นพิษที่ไม่เท่ากันหรือแตกต่างกัน ทั้งนี้ หากสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดมีปริมาณไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้งของการผลิต เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาใช้เป็นยาหรืออาหารเสริมย่อมทำให้เกิดปัญหาด้านความไม่แน่นอนในการออกฤทธิ์ ด้วยเหตุนี้ การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพร จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบปริมาณที่แน่นอนของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดที่นำมาศึกษา โดยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่พบในสารสกัดหนึ่ง ๆ ก็จะเป็นฤทธิ์ของสารสกัดที่ประกอบไปด้วยสารสำคัญแต่ละชนิดในอัตราส่วนที่คงที่ ดังนั้น ข้อมูลด้านเคมีขององค์ประกอบในสารสกัดที่ศึกษาจึงมีความจำเป็นและมีประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัด การนำสารสกัดที่มีมาตรฐาน (standardized extract) ไปใช้จึงสามารถลดปัญหาด้านความไม่แน่นอนของการออกฤทธิ์ และสามารถใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิงในการนำไปศึกษาและพัฒนาต่อไป



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin

วัตถุประสงค์

ในการศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโคโรนาในกุ้งทะเลโดยมีการควบคุมคุณภาพของสารสกัดก่อนนำมาศึกษา โดยสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาใช้ศึกษาเป็นสารสกัดที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด โดยนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ curcuminoids 3 ชนิด ได้แก่ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin เพื่อให้สารสกัดที่นำมาใช้เป็นสารสกัดที่มีมาตรฐาน จากนั้นทำการศึกษาผลของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโคโรนาในกุ้ง ในงานวิจัยนี้ ยังได้ทดลองผสมสารสกัดขมิ้นชันในอาหารกุ้ง และทดสอบการสูญเสียสารสกัดขมิ้นชันจากอาหารกุ้งไปในน้ำ (Leaching Effect) เพื่อทราบสัดส่วนการคงสารสกัดไว้ในอาหารและการสูญเสียจากอาหารไปกับน้ำ ในระหว่างการให้อาหารกุ้ง ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส และความคงตัวของสารสกัดขมิ้นชันในอาหารกุ้ง แสดงถึงศักยภาพในการใช้สกัดขมิ้นชันเป็นส่วนผสมในอาหารกุ้งเพื่อป้องกันการติดเชื้อในกุ้ง ซึ่งอาจเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรในการใช้ทดแทนยาต้านจุลชีพ และเนื่องจากสารสกัดขมิ้นชันได้จากสมุนไพรธรรมชาติ ที่มีรายงานว่ามีความปลอดภัยสูง จึงสามารถหลีกเลี่ยงจากปัญหาการตกค้างของยาต้านจุลชีพในเนื้อกุ้ง นอกจากนี้ยังเป็นการส่งเสริมการใช้ทรัพยากรของประเทศไทยโดยไม่ต้องนำเข้ายาหรือสารเคมีจากต่างประเทศ

ขั้นตอนการวิจัย

1. พัฒนาการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเคอร์คิวมินอยด์ในวัตถุดิบสารสกัดขมิ้นชัน
2. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการระงับการเจริญของเชื้อไวรัสโอ
3. คำนวณหาค่า MIC_{50} และ MIC_{90} เพื่อให้ทราบปริมาณที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็น ส่วนประกอบในอาหารกุ้ง
4. พัฒนาการเตรียมอาหารกุ้งที่มีส่วนประกอบของสารสกัดขมิ้นชัน
5. ทดสอบการสูญเสียสารสกัดขมิ้นชันจากอาหารกุ้งไปในน้ำ (Leaching Effect) เพื่อทราบว่า อาหารกุ้งที่เตรียมขึ้นนั้นจะยังสามารถคงสารสกัดไว้ในอาหารหรือสูญเสียจากอาหารไปกับ น้ำในระหว่างการให้อาหารกุ้ง

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

สารเคมี

สารบริสุทธิ์ curcumin (99.56%), desmethoxycurcumin (98.77%) และ bisdesmethoxycurcumin (98.05%) ได้ถูกเตรียมขึ้นสำหรับใช้เป็นสารมาตรฐาน โดยแยกจากผงขมิ้นชันด้วยเทคนิค column chromatography และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก การพิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสารทั้ง 3 ชนิด ใช้เทคนิค spectroscopy และ high-performance liquid chromatography (HPLC) (Rojsitthisak et al., 2009) Chloramphenicol เป็นของ Sigma และตัวทำละลายอื่น ๆ ได้แก่ methanol, acetonitrile และ glacial acetic acid เป็นของ Labscan

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชัน

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxy-curcumin แต่ละชนิดใน methanol ให้มีความเข้มข้น 0.3, 0.2 และ 0.2 mg/ml แล้วเจือจางด้วย 50% methanol ให้มีความเข้มข้น 0.03, 0.01, 0.002 mg/ml ตามลำดับ สารละลายของสารสกัดขมิ้นชันนั้น เตรียมใน methanol ให้มีความเข้มข้น 0.40 mg/ml แล้วเจือจางด้วย 50% methanol ให้มีความเข้มข้น 0.04 mg/ml ฉีดสารละลายเข้า HPLC system (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (HiQsil[®], 4.6mm x 150mm, 5 μ) ควบคุมอุณหภูมิที่ 33[°]C มีวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น acetonitrile และ 2% acetic acid (40:60, v/v) ด้วยอัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 2.0 ml/min ใช้ UV-Visible Detector ตรวจวัดสารที่ 425 nm โดยฉีดสารละลายตัวอย่างที่ปริมาตรเท่ากับ 20 μ l บันทึก HPLC chromatogram และ peak area ของสารละลายที่ฉีดคำนวณหาปริมาณ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin

การแยกเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษาจากกุ้งป่วย

เก็บตัวอย่างกุ้งป่วยจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีกุ้งแสดงอาการป่วย เช่น วายเกยขอบบ่อ และกินอาหารลดลง จากนั้นทำการแยกเชื้อไวรัสจากกุ้งดังกล่าว โดยการเพาะเชื้อจาก hepatopancreas ของกุ้งป่วยลงใน Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับไวรัส ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 [°]C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเลือกเฉพาะเชื้อที่ขึ้นได้โคโลนีที่เป็นสีเขียวหรือสีเหลืองมาพิสูจน์เชื้อ โดยการย้อมแกรม oxidase test และวิธีทางชีวเคมีดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ API 20E[®] หรือ API 20NE[®] (BioMerieux)

การทดสอบระดับความไวรับของเชื้อมาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพ

การควบคุมคุณภาพงานนั้น ทำโดยการทดสอบระดับความไวรับของเชื้อมาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพ โดยการหาค่า MIC ของ chloramphenicol ต่อเชื้อมาตรฐาน 3 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC[®] (American Type Culture Collection) 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213 และ *Vibrio parahemolyticus* ATCC[®] 17802 ซึ่งทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ที่ระบุใน National Committee for Clinical Laboratory Standards (NLCCS, 2000)

การทดสอบความไวรับของเชื้อไวรัสต่อสารสกัดไขมันชั้น

การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดไขมันชั้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส (Minimum Inhibitory Concentrations; MICs) ด้วยวิธี Antimicrobial Agar Dilution Susceptibility Tests ทำตามมาตรฐานของ National Committee of Clinical Laboratory Standard ปี ค.ศ. 2000 (NCCLS, 2000) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การเตรียมสารสกัดไขมันชั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 1.1 ละลายสารสกัดไขมันชั้น ด้วย 0.1 N NaOH จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 24000 µg/ml และทำ Two-Fold Dilution ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 1-1200 µg/ml
 - 1.2 เจือจางสารสกัดที่เตรียมขึ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วย Mueller-Hinton Agar (MHA) ในอัตราส่วน 1:10 โดยดูดสารละลายของสารมา 2 ml ใส่ลงใน MHA 18 ml จะได้ MHA ที่มีสารสกัดตามความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบที่ 1200, 875, 800, 750, 625, 512, 256, 64, 32, 16, 8, 4, 2 และ 1 µg/ml
2. การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ
 - 2.1 เตรียมเชื้อมาตรฐาน 3 ชนิด สำหรับการ inoculate แต่ละครั้งเพื่อควบคุมคุณภาพของงาน เชื้อมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC[®] 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213 และ *Vibrio parahemolyticus* ATCC[®] 17802 โดยเพาะเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ลงใน Tryptic Soy Agar (TSA) ส่วนเชื้อ *V. parahemolyticus* จะต้องผสมเกล็ด 1% ลงใน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ได้มาใส่ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ปรับให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland ซึ่งจะมีเชื้ออยู่ประมาณ 10⁸ CFU/ml เจือจางในน้ำเกลือลงอีก 10 เท่า ได้ปริมาณเชื้อประมาณ 10⁷ CFU/ml
 - 2.2 เพาะเชื้อไวรัสลงใน TSA ที่ผสมเกล็ด 1% เช่นเดียวกันการเตรียมเชื้อมาตรฐาน *V. parahemolyticus*

3. การทดสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดขมิ้นชัน
 - 3.1 ใส่เชื้อที่เตรียมในหลุม multipoint inoculator ซึ่งใส่เชื้อได้ 25 isolates โดยแบ่งเป็นที่สำหรับใส่เชื้อมาตรฐานได้ 3 isolates และสำหรับใส่เชื้อไวรัสโอทดสอบได้ 22 isolates
 - 3.2 ถ่ายเชื้อจากหลุมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันไว้แล้ว จะได้จุดเชื้อซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^4 CFU/spot
 - 3.3 เมื่อใช้ multipoint inoculator ถ่ายเชื้อลงใน MHA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันไว้แล้ว ทิ้งไว้จนจุดที่ถ่ายเชื้อแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ $35-37^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ บันทึกเป็นค่า MIC
 - 3.4 วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม WHONET5 (WHO, 2000)

การเตรียมและควบคุมคุณภาพอาหารกึ่งผสมสารสกัดขมิ้นชัน

การเตรียมและควบคุมคุณภาพอาหารกึ่งผสมสารสกัดขมิ้นชัน ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. เตรียมอาหารกึ่งที่มีส่วนผสมของสารสกัดขมิ้นชัน ทำโดยการเตรียมสารละลายของสารสกัดขมิ้นชันในตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ไปผสมในอาหารกึ่ง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดขมิ้นชันในอาหารกึ่ง
2. การควบคุมคุณภาพอาหารกึ่งผสมสารสกัดขมิ้นชันที่เตรียมขึ้น ทำโดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเคอร์คิวมินอยด์ในอาหารกึ่ง เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันในอาหารกึ่งที่เตรียมขึ้น ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้
 - 2.1 การเตรียมสารละลายของสารมาตรฐานเคอร์คิวมินอยด์ ทำโดยนำสารมาตรฐานเคอร์คิวมินอยด์ที่ประกอบไปด้วย curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ละลายใน methanol ให้มีความเข้มข้น 0.5 mg/ml จากนั้น เจือจางด้วย 50% methanol ให้มีความเข้มข้นในช่วง $3.25 - 97.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$
 - 2.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่างอาหารกึ่ง นำอาหารกึ่งที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันแล้วมาประมาณ 1 g ละลายด้วย methanol ใน volumetric flask ขนาด 10 ml จากนั้นบีบออกมาจำนวน 5 ml และเจือจางด้วย 50% methanol ใน volumetric flask ขนาด 10 ml
 - 2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณและความเข้มข้นของสารเคอร์คิวมินอยด์ในอาหารกึ่งด้วย HPLC โดยฉีดสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างเข้า HPLC system (Shimadzu, Japan) ใช้คอลัมน์ชนิด C18 (HiQsil[®], 4.6mm x 150mm, 5 μ) ควบคุมอุณหภูมิที่ 33°C มีวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น

acetonitrile และ 2%acetic acid (40:60, v/v) ด้วยอัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 2.0 ml/min ใช้ UV-Visible Detector ตรวจวัดสารที่ 425 nm โดยฉีดสารละลายตัวอย่างที่ปริมาตรเท่ากับ 20 μ l บันทึก HPLC chromatogram และ peak area ของสารละลายที่ฉีด คำนวณหาปริมาณและความเข้มข้นของ curcumin, desmethoxycurcumin, bisdesmethoxycurcumin และ total curcuminoids ในอาหารกึ่ง

การทดสอบการสูญเสียสารสกัดขมิ้นชันจากอาหารกึ่งไปในน้ำ (Leaching Effect)

การทดสอบการสูญเสียสารสกัดขมิ้นชันจากอาหารกึ่งไปในน้ำ (Leaching Effect) ทำได้โดยการแช่อาหารที่มีส่วนผสมของสารสกัดขมิ้นชันในน้ำเป็นเวลาต่าง ๆ กัน คือ 5, 10, 20, 30 และ 60 นาที จากนั้นนำตัวอย่างอาหารที่เก็บมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเคอร์คิวมินอยด์ที่คงเหลืออยู่ในอาหาร โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ที่กล่าวมาในหัวข้อการเตรียมและควบคุมคุณภาพอาหารกึ่งผสมสารสกัดขมิ้นชัน จากนั้น คำนวณหาร้อยละของความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันในอาหารเทียบกับตอนเริ่มต้น และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของความเข้มข้นที่ได้กับระยะเวลาของอาหารกึ่งที่แช่อยู่ในน้ำ

บทที่ 3

ผลการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันโดยวิธี HPLC

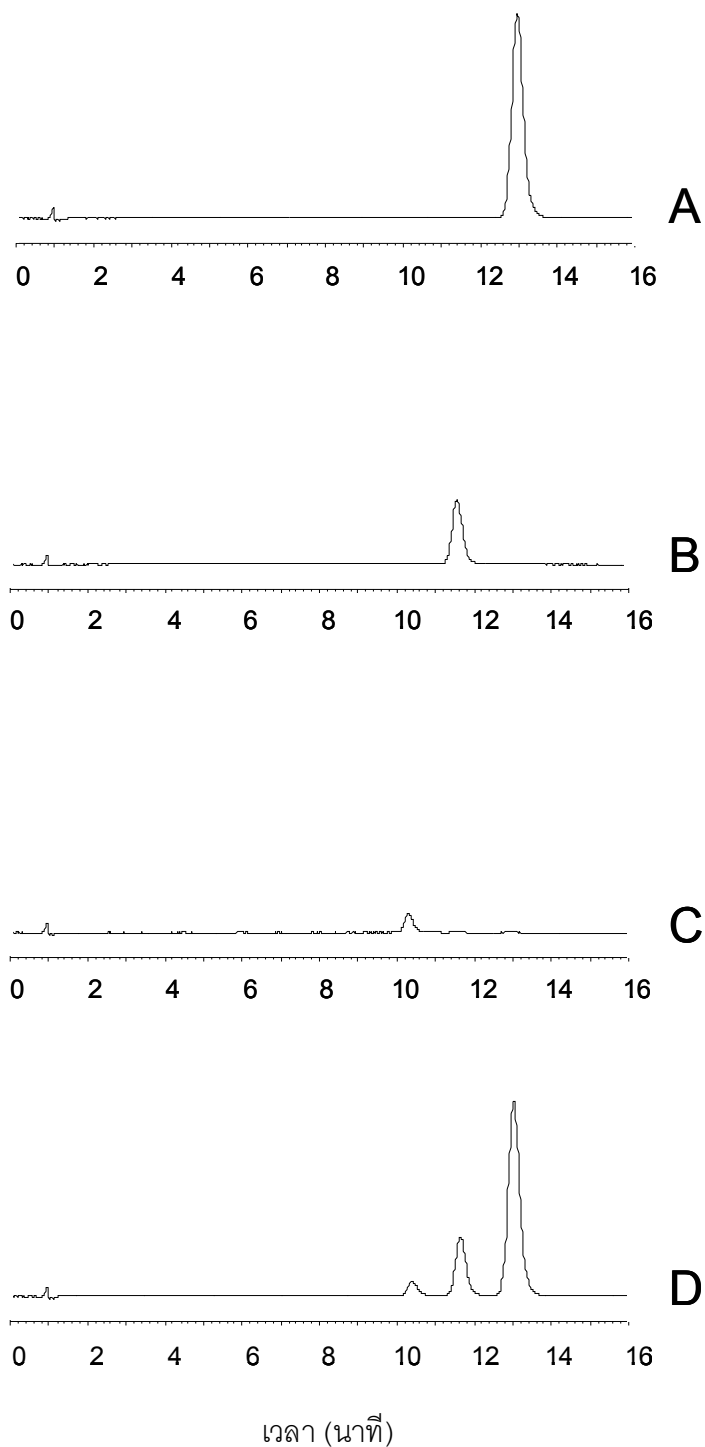
จากการวิเคราะห์ปริมาณ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ในสารสกัดขมิ้นชันด้วย HPLC ได้ chromatogram ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่า สารสกัดขมิ้นชันให้พีคเกิดขึ้นที่ retention time ประมาณ 12.97, 11.58 และ 10.33 นาที สอดคล้องกับพีคของสารมาตรฐาน curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ตามลำดับ จากการคำนวณพบว่า สารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโกลด์โรคในกุ้ง ประกอบไปด้วยปริมาณสารสำคัญคือ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin เท่ากับ 72.29%, 23.50% และ 3.63% ตามลำดับ และมีปริมาณของ curcuminoids รวม เท่ากับ 99.42%

การแยกเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษาจากกุ้งป่วย

เมื่อเก็บตัวอย่างกุ้งป่วยจากพื้นที่การเลี้ยงในจังหวัดกระบี่ ระยอง นครศรีธรรมราช จันทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ปัตตานี และชุมพร และจากเมือง Nha Trang ประเทศเวียดนาม พบว่า เชื้อไวรัสที่แยกจากกุ้งป่วยจำนวน 71 isolates สามารถจำแนกได้เป็น *V. alginolyticus* 4 isolates, *V. cholerae* 14 isolates, *V. damsela* 5 isolates, *V. fluvialis* 22 isolates, *V. parahaemolyticus* 18 isolates และ *V. vulnificus* 8 isolates (ตารางที่ 1) นำเชื้อไวรัสที่แยกไปใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโกลด์โรคในกุ้ง

ผลการทดสอบระดับความไวรับของเชื้อมาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพและสารสกัดขมิ้นชัน ได้แสดงในตารางที่ 2 โดยพบว่า ค่า MIC ของ chloramphenicol เท่ากับ 2 µg/ml สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* และ เท่ากับ 1 µg/ml สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ส่วนค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด มีค่าเท่ากัน คือ 625 µg/ml (ตารางที่ 2) สำหรับการศึกษาความไวรับของเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของกุ้งป่วยต่อสารสกัดขมิ้นชัน พบว่าค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันอยู่ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 64-1200 µg/ml (ตารางที่ 3 และ 4) โดยค่า MIC₅₀ (Minimum Inhibitory Concentration 50%) และ MIC₉₀ (Minimum Inhibitory Concentration 90%) เท่ากับ 625 และ 800 µg/ml ตามลำดับ (รูปที่ 3, ตารางที่ 4)



รูปที่ 2 HPLC chromatograms ของสารละลาย curcumin 0.03 mg/ml (A), desmethoxy-curcumin 0.01 mg/ml (B), bisdesmethoxycurcumin 0.002 mg/ml (C) และสารสกัดขมิ้นชัน 0.04 mg/ml (D)

ตารางที่ 1 การจำแนกชนิดของเชื้อ vibrios ตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี (Forbes et al., 1998; Barrow and Feltham, 1993; Wachsmuth et al., 1980; Elliot et al., 1992)

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. arahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Colony on TCBS	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green / Yellow ²	Green	Green / Yellow [•]
Growth at 42°C	+	+	-	v	v	+	+
Gram stain	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Cell morphology	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+
Decarboxylation of							
- arginine	-	-	+	+	-	-	-
- lysine	+	+	d ¹ / v ²	-	+	+	+
- ornithine	d ¹ / + ²	d ¹ / + ²	-	-	+	d ¹ / + ²	v ¹ / + ²
Citrate utilization	d	d	-	-	nd	d	d
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+ ¹ / v ²	+	-	-	-	-
Growth in NaCl							
- 0%	-	+	-	-	-	-	-
- 3%	+	+	+	+	+	+	+
- 6%	+	d ¹ / - ²	d ¹ / v ²	d ¹ / + ²	+	d ¹ / + ²	+
- 8%	+	-	-	v	v	+	-
- 10%	+	-	-	-	v	-	-

ตารางที่ 1 (ต่อ) การจำแนกชนิดของเชื้อ vibrios ตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี (Forbes et al., 1998; Barrow and Feltham, 1993; Wachsmuth et al., 1980; Elliot et al., 1992)

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. arahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Acid production from							
- salicin	d	-	-	d	nd	-	+
- lactose	-	-	-	-	V	-	+
- arabinose	-	-	- ¹ / + ²	+	-	d ¹ / + ²	-
- sucrose	d ¹ / + ²	+	-	+	v	-	-
- sorbitol	-	-	-	-	nd	-	-
- mannitol	+	+	- ¹ / + ²	+	+	+	d ¹ / v ²
- mannose	+	+	+	+	+	+	+
- D-Cellobiose	-	-	+	+	nd	v	+
Synthesis indole	+	+	-	d	nd	+	+
Synthesis urease	-	-	+	-	v	- ¹ / v ²	-
Synthesis gelatinase	+	+	-	+	+	+	+
ONPG	-	+	-	+	V	-	+
Susceptible to							
- 10 µg/kg O/ 129	R	S	S	R	R	R	S
- 150 µg/kg O/ 129	S	S	S	S	S	S	S

+ = 85-100% ที่ให้ผลบวก

d = 16-80% ที่ให้ผลบวก

- = 0-15% ที่ให้ผลบวก

v = ผลแปรผัน

S = มีความไวรับ

R = มีความต้านทาน

nd = no data

● = โคลนนี้ของเชื้อส่วนใหญ่มีสีเขียว

O/129 = Vibrio static agent : 2,4-diamino-6,7-di-isopropyl pteridine

ONPG = O-nitro-beta-D-galactopyranoside hydrolysis by beta-galactisidase

1 = อ้างจาก (25-27) และ 2 = อ้างจาก (28)

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานของยา Chloramphenicol (positive control) และสารสกัดขมิ้นชัน

สารทดสอบ	เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		ผลการทดสอบ	ค่าอ้างอิง*
Chloramphenicol	<i>E. coli</i>	2	2-8
	<i>S. aureus</i>	2	2-8
	<i>V. parahaemolyticus</i>	1	-
สารสกัดขมิ้นชัน	<i>E. coli</i>	625	-
	<i>S. aureus</i>	625	-
	<i>V. parahaemolyticus</i>	625	-

*Acceptable quality control limits of MICs ตามมาตรฐาน NCCLS (23)

ตารางที่ 3 ค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยและเวียดนาม

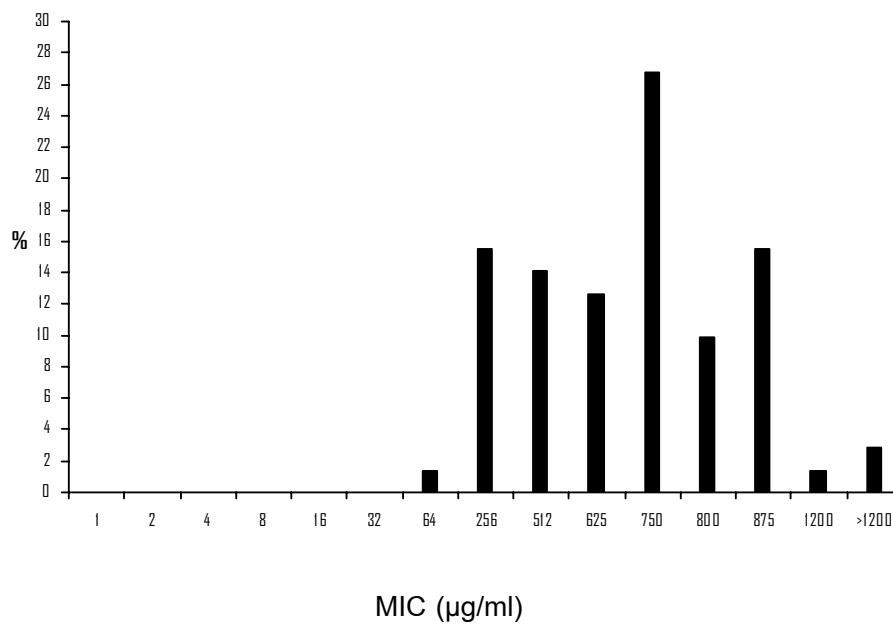
No.	Isolation	Regional	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ID
1	<i>V. alginolyticus</i>	กระบี่	750	15
2	<i>V. alginolyticus</i>	กระบี่	256	18
3	<i>V. alginolyticus</i>	นครศรีธรรมราช	625	124
4	<i>V. alginolyticus</i>	ระยอง	256	60
5	<i>V. cholerae</i>	กระบี่	750	16
6	<i>V. cholerae</i>	จันทบุรี	750	77/1
7	<i>V. cholerae</i>	จันทบุรี	750	77/2
8	<i>V. cholerae</i>	จันทบุรี	875	78
9	<i>V. cholerae</i>	ตรัง	750	32
10	<i>V. cholerae</i>	ตรัง	750	33
11	<i>V. cholerae</i>	นครศรีธรรมราช	1200	127
12	<i>V. cholerae</i>	นครศรีธรรมราช	750	140
13	<i>V. cholerae</i>	นครศรีธรรมราช	256	141
14	<i>V. cholerae</i>	ประจวบคีรีขันธ์	800	193
15	<i>V. cholerae</i>	ประจวบคีรีขันธ์	750	197
16	<i>V. cholerae</i>	ปราจีนบุรี	875	179
17	<i>V. cholerae</i>	ปราจีนบุรี	750	180
18	<i>V. cholerae</i>	สงขลา	750	157
19	<i>V. damsela</i>	ตรัง	875	42
20	<i>V. damsela</i>	ชุมพร	625	99
21	<i>V. damsela</i>	ปัตตานี	625	263
22	<i>V. damsela</i>	ระยอง	256	65
23	<i>V. damsela</i>	ประเทศเวียดนาม	256	V16
24	<i>V. fluvialis</i>	กระบี่	> 1200	1B
25	<i>V. fluvialis</i>	กระบี่	512	7

ตารางที่ 3 (ต่อ) ค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยและเวียดนาม

No.	Isolation	Regional	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ID
26	<i>V. fluvialis</i>	กระบี่	750	11
27	<i>V. fluvialis</i>	กระบี่	875	13
28	<i>V. fluvialis</i>	กระบี่	875	21
29	<i>V. fluvialis</i>	กระบี่	875	26
30	<i>V. fluvialis</i>	กระบี่	750	28
31	<i>V. fluvialis</i>	จันทบุรี	512	49
32	<i>V. fluvialis</i>	จันทบุรี	750	57
33	<i>V. fluvialis</i>	จันทบุรี	800	81
34	<i>V. fluvialis</i>	นครศรีธรรมราช	512	132
35	<i>V. fluvialis</i>	นครศรีธรรมราช	> 1200	139
36	<i>V. fluvialis</i>	ประจวบคีรีขันธ์	256	192/1
37	<i>V. fluvialis</i>	ประจวบคีรีขันธ์	256	192/2
38	<i>V. fluvialis</i>	ปัตตานี	512	268
39	<i>V. fluvialis</i>	ระยอง	500	63
40	<i>V. fluvialis</i>	ระยอง	625	69
41	<i>V. fluvialis</i>	ระยอง	875	72
42	<i>V. fluvialis</i>	ระยอง	875	73
43	<i>V. fluvialis</i>	ระยอง	256	74
44	<i>V. fluvialis</i>	ระยอง	875	75
45	<i>V. fluvialis</i>	ประเทศเวียดนาม	256	V29
46	<i>V. parahaemolyticus</i>	กระบี่	750	14
47	<i>V. parahaemolyticus</i>	กระบี่	512	19
48	<i>V. parahaemolyticus</i>	จันทบุรี	800	83
49	<i>V. parahaemolyticus</i>	ชุมพร	64	103
50	<i>V. parahaemolyticus</i>	ชุมพร	800	104/1

ตารางที่ 3 (ต่อ) ค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยและเวียดนาม

No.	Isolation	Regional	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	ID
51	<i>V. parahaemolyticus</i>	ชุมพร	800	104/2
52	<i>V. parahaemolyticus</i>	นครศรีธรรมราช	750	237
53	<i>V. parahaemolyticus</i>	นครศรีธรรมราช	512	238
54	<i>V. parahaemolyticus</i>	ประจวบคีรีขันธ์	750	184
55	<i>V. parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	256	265
56	<i>V. parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	512	267
57	<i>V. parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	625	279
58	<i>V. parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	512	281
59	<i>V. parahaemolyticus</i>	ระยอง	800	58
60	<i>V. parahaemolyticus</i>	ระยอง	625	59
61	<i>V. parahaemolyticus</i>	ระยอง	512	245
62	<i>V. parahaemolyticus</i>	ระยอง	750	251
63	<i>V. parahaemolyticus</i>	สงขลา	600	234
64	<i>V. vulnificus</i>	กระบี่	875	5
65	<i>V. vulnificus</i>	กระบี่	750	17
66	<i>V. vulnificus</i>	กระบี่	800	217
67	<i>V. vulnificus</i>	ตรัง	750	31
68	<i>V. vulnificus</i>	ตรัง	625	44
69	<i>V. vulnificus</i>	ตรัง	625	46
70	<i>V. vulnificus</i>	ระยอง	256	61
71	<i>V. vulnificus</i>	ระยอง	875	67



รูปที่ 3 ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยและเวียดนาม จำนวน 71 isolates

ตารางที่ 4 ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยและเวียดนาม จำนวน 71 isolates

	MIC (µg/ml)		
	MIC ₅₀ ¹	MIC ₉₀ ²	MIC Range ³
สารสกัดขมิ้นชัน	625	800	64- >1200

¹ Minimum Inhibitory 50%

² Minimum Inhibitory 90%

³ Range of MIC observed in 71 pathogenic vibrio isolates

การเตรียมและการทดสอบการสูญเสียสารสกัดขมิ้นชันจากอาหารกุ้งไปในน้ำ

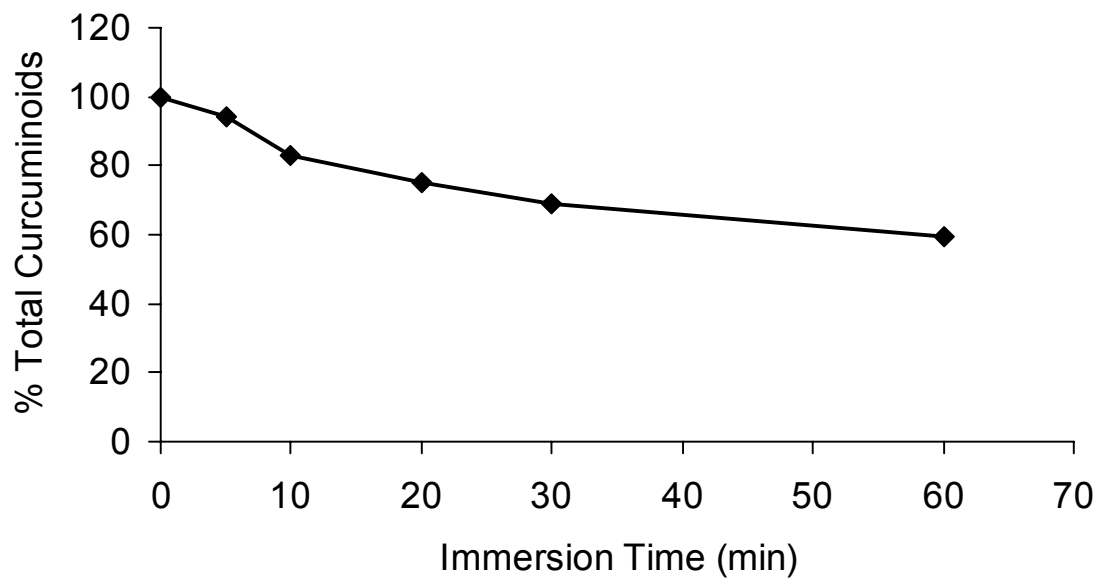
จากการเตรียมอาหารกุ้งที่มีส่วนผสมของสารสกัดขมิ้นชันนั้น พบว่าอาหารที่เตรียมขึ้นที่ ปริมาณสารเคอร์คิวมินอยด์ประมาณ 1200 µg ต่ออาหารกุ้ง 1 g (1200 µg/g) เมื่อทำการวิเคราะห์ สารเคอร์คิวมินอยด์ในอาหารกุ้งที่แช่อยู่ในน้ำเป็นเวลาต่าง ๆ ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 ทั้งนี้ ร้อยละของความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันในอาหารเทียบกับตอนเริ่มต้น และสร้างกราฟ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของความเข้มข้นที่ได้และระยะเวลาของอาหารกุ้งที่แช่อยู่ในน้ำ ได้ แสดงไว้ในตารางที่ 6 และ รูปที่ 4

ตารางที่ 5 ปริมาณสารสำคัญเคอร์คิวมินอยด์ในอาหารกุ้งที่คงอยู่เมื่อแช่ในน้ำที่ระยะเวลาต่าง ๆ

Immersion Time (min)	Amount of Curcuminoids in the Feed (µg/g)			Total Curcuminoids
	Bisdesmethoxy- curcumin	Desmethoxy- curcumin	Curcumin	
0	42.6	292.9	870.8	1206.4
5	37.1	267.1	831.4	1135.6
10	34.9	239.5	725.6	1000.1
20	31.2	216.4	660.5	908.0
30	29.0	198.6	602.5	830.0
60	25.5	172.5	519.3	717.4

ตารางที่ 6 ร้อยละของความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันในอาหารเทียบกับตอนเริ่มต้น เมื่อแช่อยู่ในน้ำที่เวลาต่างๆ

Immersion Time (min)	Percentage of Total Curcuminoids Found in the Feed (%)
0	100.0
5	94.1
10	82.9
20	75.3
30	68.8
60	59.5



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันในอาหารเทียบกับตอนเริ่มต้น กับระยะเวลาของอาหารกึ่งที่แช่อยู่ในน้ำ

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรแต่ละครั้งนั้น มักมีความแปรปรวนอันเนื่องมาจากความไม่แน่นอนของปริมาณสารออกฤทธิ์ ซึ่งเกิดจากคุณภาพวัตถุดิบในการศึกษาและกระบวนการในการสกัด กล่าวคือ 1) ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่มีในวัตถุดิบ และ 2) กระบวนการเตรียมสารสกัดหยาบแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา ดังนั้นในการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสในกุ่มทะเล จึงควรมีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญเพื่อให้สามารถระบุขนาดหรือปริมาณของสารสำคัญในการยับยั้งเชื้อและเปรียบเทียบผลที่ได้กับการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันโดยวิธี reversed-phase HPLC ด้วยคอลัมน์ชนิด C18 พบว่า curcumin เคลื่อนที่ได้ช้าที่สุด (ค่า retention time สูงสุด) โดย desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin เคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นและเร็วที่สุดตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin พบว่าสารแต่ละชนิดมีโครงสร้างต่างกันที่จำนวนหมู่ methoxy (-OCH₃) ในโมเลกุล ซึ่งหมู่ methoxy จัดเป็นหมู่ที่ non-polar ส่งผลให้ curcumin ซึ่งมี methoxy 2 หมู่ มีความชอบไขมัน (lipophilicity) มากกว่าสารอีก 2 ชนิด ทำให้มีความชอบต่อวัฏภาคหนึ่ง (stationary phase) บนคอลัมน์ได้ดีกว่า จึงทำให้สารเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า ในทำนองเดียวกัน desmethoxycurcumin ซึ่งมี methoxy 1 หมู่ ยอมเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า bisdesmethoxycurcumin เนื่องจาก lipophilicity สูงกว่า ในขณะที่ bisdesmethoxycurcumin ไม่มีหมู่ methoxy ทำให้เคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด

จาก chromatogram ของสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาศึกษา พบว่า สารสกัดขมิ้นชันให้พีคจำนวน 3 พีค ที่มีค่า retention time สอดคล้องกับพีคบน chromatogram ของสารมาตรฐาน curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้เป็นสาร curcuminoids ซึ่งมีปริมาณรวมเท่ากับ 99.42% ประกอบไปด้วย curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ในปริมาณเท่ากับ 72.29%, 23.50% และ 3.63% ตามลำดับ โดยฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสที่แยกจากกุ่มป่วยในการศึกษานี้ จัดว่าเป็นฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันที่มีอัตราส่วนของ curcumin : desmethoxycurcumin : bisdesmethoxycurcumin เท่ากับ 72.29 : 23.50 : 3.63 ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนโดยประมาณเท่ากับ 20 : 6.5 : 1 ตามลำดับ

การควบคุมคุณภาพงานด้วยการทดสอบระดับความไวรับของเชื้อมาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพ นั้น ผลการทดสอบในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าค่า MIC ของ chloramphenicol ต่อเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* นั้นอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์มาตรฐานของ NCCLS แต่สำหรับค่า MIC ของ chloramphenicol ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ ค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด นั้นยังไม่มีค่ามาตรฐาน ค่า MIC ที่ได้จึงถือเป็นการเก็บข้อมูลสำหรับใช้เป็นประโยชน์ในการอ้างอิงเปรียบเทียบกับผลการทดสอบสารสกัดขมิ้นชันในครั้งอื่น ๆ ต่อไป

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส พบว่า ค่า MIC₅₀ ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อไวรัส มีค่าเท่ากับ 256 µg/ml หากพิจารณาค่าดังกล่าวให้อยู่ในหน่วยของ µmol/ml โดยการคำนวณมวลโมเลกุลของสารสกัดขมิ้นชันด้วยวิธีการหาค่าเฉลี่ยแบบถ่วงน้ำหนัก ซึ่งขึ้นกับปริมาณและมวลโมเลกุลของสารสำคัญแต่ละชนิดในสารสกัด โดย curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin มีปริมาณและมวลโมเลกุลเท่ากับ 72.29%, 368.39; 23.50%, 338.36; และ 3.63%, 308.34 ตามลำดับ จะได้ว่า มวลโมเลกุลเฉลี่ยของสารสกัดที่ใช้ในการศึกษา เท่ากับ 357.01 ดังนั้น ค่า MIC₅₀ ของสารสกัดต่อเชื้อไวรัส ซึ่งมีค่าเท่ากับ 256 µg/ml สามารถคิดได้เป็น 0.72 µmol/ml เมื่อเปรียบเทียบค่าดังกล่าวกับค่า MICs ที่ได้จากการศึกษาของ Mishra และคณะ (6) ซึ่งรายงานค่า MICs ของสารบริสุทธิ์ curcumin ต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *Enterococcus* ในช่วง 10-20 µmol/ml แสดงให้เห็นว่า ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโดยสารสกัดขมิ้นชันมีประสิทธิภาพที่สูง ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ที่ไม่เท่ากันของสารสำคัญแต่ละชนิดในสารสกัดขมิ้นชัน นอกจากนี้ ยังอาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของเชื้อที่ใช้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากไม่พบการรายงานของค่า MIC ต่อเชื้อไวรัสที่แยกจากกุ้งทะเล ทำให้ไม่สามารถนำค่า MIC มาเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในครั้งนี้

การทดสอบความคงตัวของสารสกัดขมิ้นชันที่ผสมอยู่ในอาหารกุ้ง โดยการแช่อาหารที่มีสารเคอร์คิวมินอยด์ที่ความเข้มข้น 1200 µg/g ในน้ำเป็นเวลาต่าง ๆ กัน พบว่า เมื่ออาหารแช่อยู่ในน้ำเป็นเวลา 30 และ 60 นาที ตรวจพบสารสกัดขมิ้นชันที่คงเหลืออยู่ในอาหารประมาณ 70% และ 60% ของความเข้มข้นเริ่มต้น ตามลำดับ สาเหตุที่สารสกัดขมิ้นชันยังคงอยู่ในอาหารกุ้ง เนื่องจากสารเคอร์คิวมินอยด์เป็นสารซึ่งละลายน้ำได้ไม่ดี จึงยังคงอยู่ในอาหารโดยไม่สูญเสียไปในน้ำ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสารเหล่านี้มีความไม่คงตัวสูง สามารถสลายตัวได้ง่ายด้วยปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น oxidation และ hydrolysis ดังนั้น เมื่ออาหารกุ้งสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศ แสง และน้ำ ทำให้สารเคอร์คิวมินอยด์ในอาหารสามารถสลายตัวไปได้ ด้วยเหตุนี้ การลดลงของสารเคอร์คิวมินอยด์ในอาหาร จึงอาจมีสาเหตุมาจากการสลายตัวของสารได้ด้วย อย่างไรก็ตาม ในเชิงปฏิบัติโดยทั่วไป กุ้งรับประทานอาหารหมดภายใน 30 นาที ซึ่งทำให้กุ้งได้รับสารสกัดไม่น้อยกว่า 70% ของสารสกัดที่ผสมอยู่ในอาหาร

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโอและ ความคงตัวของสารสกัดขมิ้นชันในอาหารกุ้งเมื่ออยู่ในน้ำ แสดงถึงศักยภาพของสารสกัดขมิ้นชันใน การนำมาพัฒนาเพื่อเป็นทางเลือกสำหรับใช้เป็นสารต้านจุลชีพสำหรับผสมในอาหารกุ้ง เพื่อป้องกัน และรักษาโรคติดเชื้อไวรัสโอในกุ้ง

บทที่ 5

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ที่ผ่านมาได้มีรายงานขัดแย้งในเรื่องประสิทธิภาพของสมุนไพรเข้มข้นในการป้องกันการติดเชื้อมากุ้ง ทั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่า สมุนไพรเข้มข้นเองไม่มีประสิทธิภาพในการระงับการเจริญของเชื้อ vibrio อาหารที่เตรียมขึ้นอาจมีสารสำคัญของสมุนไพรที่ไม่เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ รวมถึงการสูญเสียสารสำคัญจากอาหารไปในน้ำระหว่างการให้อาหารกุ้ง ส่งผลให้กุ้งไม่ได้รับสารที่จำเป็นต่อการออกฤทธิ์ นอกจากนี้ อาหารที่เตรียมขึ้น อาจไม่เป็นที่ต้องการรับประทานของกุ้ง ดังนั้น การวิจัยที่ครบวงจรจะช่วยตอบคำถามต่าง ๆ รวมถึงแก้ปัญหาความไม่แน่นอนในด้านประสิทธิภาพของการใช้สมุนไพร

จากการวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคูณสมบัติสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ที่ได้จากสมุนไพรเข้มข้นในการระงับการเจริญของเชื้อ vibrio (Vibrio sp.) ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญในกุ้ง ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน โดยผลการทดลองที่ได้จากการหาค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ในการยับยั้งการเจริญเชื้อ vibrio พบว่า สารสกัดเคอร์คิวมินอยด์มีคุณสมบัติในการระงับการเจริญของเชื้อ vibrio พร้อมกันนี้ ทางคณะผู้วิจัยได้คำนวณหาปริมาณของสารสกัดที่เหมาะสมสำหรับผสมในอาหารกุ้ง โดยพิจารณาจากค่า MIC ที่ได้ จากนั้น นำอาหารที่เตรียมขึ้นมาทดสอบ Leaching effect พบว่า สูตรอาหารที่ได้สามารถเก็บสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ไว้ในตัวอาหาร โดยไม่มีการสูญเสียสารเคอร์คิวมินอยด์จากอาหารไปในน้ำ ดังนั้น สูตรอาหารที่พัฒนาขึ้นดังกล่าว นับว่ามีศักยภาพในการใช้เป็นอาหารกุ้งเพื่อป้องกันการติดเชื้อมากุ้ง

แนวทางเพื่อต่อยอดการวิจัย เพื่อให้ได้สูตรอาหารกุ้งที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อมากุ้ง คือ การตรวจสอบว่ากุ้งจะรับประทานอาหารที่เตรียมขึ้นหรือไม่ หากกุ้งไม่รับประทานอาหารดังกล่าวย่อมไม่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ vibrio และสูตรอาหารก็จะต้องได้รับการพัฒนาต่อไป แต่หากสูตรอาหารดังกล่าว เป็นที่ต้องการรับประทานของกุ้ง ก็ถือได้ว่าสูตรอาหารที่พัฒนาขึ้นมีศักยภาพที่สามารถนำไปใช้ได้จริง จากนั้น สูตรอาหารที่เหมาะสมสามารถนำไปตรวจสอบประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อมากุ้งได้ ทั้งนี้ สามารถทำได้โดยให้อาหารที่พัฒนาขึ้นกับกุ้งที่ได้รับเชื้อจุลชีพ เปรียบเทียบกับการให้อาหารที่ไม่มีส่วนผสมของสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์ และพิจารณาจำนวนกุ้งที่รอดชีวิตและที่ตาย

วิธีดำเนินการสำหรับงานวิจัยในอนาคตเพื่อพัฒนาการพัฒนาอาหารกุ้งที่มีส่วนผสมของ สารสกัดขมิ้นชันที่มีสารเคอร์คิวมินอยด์เป็นสารสำคัญ สำหรับระบบการเจริญของเชื้อไวรัสโรคในกุ้ง มีรายละเอียดดังนี้

1. ทำการเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่พัฒนาขึ้น ซึ่งเป็นสูตรอาหารกุ้งที่มีส่วนผสมของสารเคอร์คิวมินอยด์ เพื่อทดสอบว่ากุ้งต้องการรับประทานอาหารที่เตรียมขึ้นหรือไม่
2. พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญเคอร์คิวมินในเนื้อเยื่อกุ้ง
3. ตรวจสอบปริมาณของสารเคอร์คิวมินอยด์ในเนื้อเยื่อของกุ้งที่ได้รับอาหารที่เตรียมขึ้น เพื่อให้แน่ใจว่ากุ้งได้รับสารเคอร์คิวมินอยด์เข้าไป
4. ตรวจสอบประสิทธิภาพของอาหารในการป้องกันการติดเชื้อในกุ้งได้ โดยให้อาหารที่มี และไม่มีสารเคอร์คิวมินอยด์กับกุ้ง จากนั้นทำให้กุ้งได้รับเชื้อจุลชีพ นับจำนวนกุ้งที่รอดชีวิตและที่ตาย
5. เก็บตัวอย่างกุ้งเป็นและกุ้งตายเพื่อตรวจหาเชื้อก่อโรค
6. ประเมินประสิทธิภาพของอาหารกุ้งที่มีและไม่มีสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์

เอกสารอ้างอิง

1. เจนนุช ว่องธวัชชัย. (2547) ผลของยาและสารเคมีต่อสุขภาพกุ้ง. รายงานการวิจัย การรวบรวมวิเคราะห์และสังเคราะห์งานวิจัยกุ้งทะเลของประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพมหานคร. หน้า 249-275.
2. สุขมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545) จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. หน้า 178-184.
3. Ammon, H.P., and Wahl, M.A. (1991) Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 57: 1-7.
4. Barrow G.I., and Feltham, R.K.A. (eds.) (1993) Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed., Cambridge University Press, pp. 754-759.
5. Bonte, F., Noel-Hudson, M.S., Wepierre, J., and Meybeck, A. (1997) Protective effect of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen radical stress. *Planta Med.* 63: 265-266.
6. Brouet, I., and Oshima, H. (1995) Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206: 533-540.
7. Das, K.C., and Das, C.K. (2002) Curcumin (diferuloylmethane), a singlet oxygen (1O_2) quencher. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295: 62-66.
8. Delost, M.D. 1997. Introduction to Diagnosis Microbiology: A Text and Workbook. Mosby, 240-241.
9. Eduardo, M.L., Celia, R.L., and Milagros, G.P. (1998) Bacterial flora in the hepatopancreas of pond-reared *Penaeus monodon* juveniles with luminous vibriosis. *Aquaculture* 164: 367-374.
10. Elliot, E.L., Kaysner, A., and Tamplin, M.L. (1992) FDA Bacteriological Analytical Manual. 7th ed. 111-120.
11. Elliot, E.L., Kaysner, A., and Tamplin, M.L. (1992) FDA Bacteriological Analytical Manual. 7th ed., pp. 111-120.
12. Forbes, B.A., Sahm, D.F., and Weissfeld, A.S. (1998) *Vibrio aeromonas*, *Plesiomonas shigelloides*, and *Chromobacterium violaceum*. In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10th ed., St.Louis: Mosby, Inc., pp. 488-500.

13. Gräslund, S., Karisson, K., and Wongtavatchai, J. (2002) Responsible use of antibiotics in shrimp farming. *Aquaculture Asia Magazine* 7:3.
14. Grinberg, L.N., Shalev, O., Tønnesen, H.H., and Rachmilewitz, E.A. (1996) Studies on curcumin and curcuminoids: XXVI. Antioxidant effects of curcumin on the red blood cell membrane. *Int. J. Pharm.* 132: 251-257.
15. Heng, M.C., Song, M.K., Harker, J., and Heng, M.K. (2000) Drug-induced suppression of phosphorylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by clinical, histological and immunohistochemical parameters. *Br. J. Dermatol.* 143: 937-949.
16. Inano, H., Onoda, M., Inafuku, N., Kubota, Y., Osawa, T., Kobayashi, H., and Wakabayashi, K. (2000) Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*. 21: 1835-1841.
17. Jarernporn, N., Bantaokul, C., Tipmongkolsilp, N., Lertworapreecha, M., and Wongtavatchai, J. (2003) Antimicrobial susceptibility tests on *Vibrio* pathogens from Black tiger shrimps *Penaeus monodon* Thai J. Vet. Sci. 33: 71-78.
18. Jayaprakasha, G.K., Jagan Mohan Rao, L., and Sakariah, K.K. (2002) Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *J. Agri. Food Chem.* 50: 3668-3672.
19. Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T., Limsuwan, C. and Somjetlerdchalern, A. (1995) Comparative Histology of Vibriosis in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. In :Diseases in Asian Aquaculture II, M.Shariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe (eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 131-140.
20. Jiravanichpaisal, P., Miyazaki, T., and Limsuwam, C. (1994) Histopathology, Biochemistry, and Pathogenicity of *Vibrio harveyi* infection Black Tiger Prawn *Penaeus monodon*. *Journal of Aquatic Animal Health*. 6: 27-35.
21. Joe, B., and Lokesh, B.R. (1997) Prophylactic and therapeutic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids, capsaicin, and curcumin on adjuvant induced arthritis in rats. *J. Nutr. Biochem.* 8: 397-407.
22. Khafif, A., Schantz, S.P., Chou, T.C., Elderstein, D., and Sacks, P.G. (1998) Quantitation of chemopreventive synergism between (-)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. *Carcinogenesis*. 19: 419-424.

23. Lavilla-Pitogo, C.R. 1995. Bacterail diseases of penaeid shrimps: an Asian view. In: Diseases in Asian Aquaculture II, M.Shariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe (eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 107-121.
24. Limtrakul, P., Lipigorngoson, S., Namwong, O., Apisariyakul, A., and Dunn, F.W. (1997) Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* 116: 197-203.
25. Mishra, S., Narain, U., Mishra, R., and Misra, K. (2005) Design, development and synthesis of mixed bioconjugates of piperic acid-glycine, curcumin-glycine/alanine and curcumin-glycine-piperic acid and their antibacterial and antifungal properties. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 1477-1486.
26. Nash, G., Nithimathachoke, C., Tungmandi, C., Arkarjamorn, A., Prathanpipat, P., and Ruamthaveesub, P. (1992) Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand. In: Diseases in Asian Aquaculture I. M.Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.) Manila : Fish Health Section, Asian Fisheries Society.
27. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2000) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard-Fifth Edition. 20: 26.
28. Perkins, S., Verschoyle, R.D., Hill, K., Parveen, I., Threadgill, M.D., Sharma, R.A., Williams, M.L., Steward, W.P., and Gescher, A.J. (2002) Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the Min/+ Mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 11: 535-540.
29. Polasa, K., Naidu, A.N., Ravindranath, I., and Krishnaswamy, K. (2004) Inhibition of B(α)P induced strand breaks in presence of curcumin. *Mutat. Res.* 557:203-213.
30. Rajakrishnan, V., Jayadeep, A., Arun, O.S., Sudhakaran, P.R., and Menon, V.P. (2000) Changes in the prostaglandin levels in alcohol toxicity: effect of curcumin and *N*-acetylcysteine. *J. Nutr. Biochem.* 11: 509-514.
31. Sharma, R.A., McLelland, H.R., Hill, K.A., Ireson, C.R., Euden, S.A., and Manson, M.M. (2001) Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 7: 1984-1900.
32. Song, E.K., Cho, H., Kim, J.S., Kim, N.Y., An, N.H., Kim, J.A., Lee, S.H., and Kim, Y.C. (2001) Diarylheptanoids with free radical scavenging and hepatoprotective activity in vitro from *Curcuma longa*. *Planta Med.* 67:876-877.

33. Spoo, J.W., and Riviere, J.E. (1995) Chloramphenicol, Macrolides, Lincosamides, Fluoroquinolones, and Miscellaneous Antibiotics. In : Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Adams, H.R. (ed.) 7th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 820-821.
34. Sudheesh, S.H., and Huai-Shu, X. (2001) Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture* 196: 37-46.
35. Tonguthai, K., and Chanratchakool, P. (1992) The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in Thailand. In: Diseases in Asian Aquaculture I. M.Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Arthur (eds.) Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society. 555-565.
36. Wachsmuth, L.K., Morris, G.K., and Feeley, J.C. (1980) *Vibrio*. In E. H. Lennette, A. Balows, W. J. JR. Hausler, and J. P. Truant, (eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd ed., American Society for Microbiology, Washinton D.C., pp. 226-234.
37. Wichitnithad, W., Jongaroonngamsang, N., Pummangura S., and Rojsitthisak, P. (2009) A Simple Isocratic HPLC Method for Simultaneous Determination of Curcuminoids in Commercial Turmeric Extracts. *Phytochem. Anal.*, 20: 314-319.
38. World Health Organization (WHO). (2000) Department of Communicable Disease Surveillance and Response. WHONET 5 Laboratory Database Software. Geneva.

Output จากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Wisut Wichitnithad, Nutthapon Jongaroonngamsang, Sunibhond Pummangura and Pornchai Rojsitthisak. A Simple Isocratic HPLC Method for Simultaneous Determination of Curcuminoids in Commercial Turmeric Extracts. *Phytochem. Anal.*, 2009, 20(4), 314-319

2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

Pornchai Rojsitthisak, Yanin Limpanon, Nuchanart Thipmongkolsilp, Bang-on Kongtong and Janenuj Wongtavatchai. *In vitro* inhibitory effect of turmeric extract from *Curcuma longa* on shrimp pathogenic vibrios. *Thai J. Pharm. Sci.*, 2005, 29(3-4), 165-177.

2. ผลงานตีพิมพ์ที่อยู่ระหว่างการดำเนินการ

Pornchai Rojsitthisak and Janenuj Wongtavatchai. Development of Curcuminoids as a Shrimp Feed Additive for Anti-Vibriosis. *J. Agric. Food Chem.* To be submitted.

ภาคผนวก

A Simple Isocratic HPLC Method for the Simultaneous Determination of Curcuminoids in Commercial Turmeric Extracts

Wisut Wichitnithad, Nutthapon Jongaroonngamsang, Sunibhond Pummangura and Pornchai Rojsitthisak*

ABSTRACT:

Introduction – Turmeric (*Curcuma longa*) extracts contain three curcuminoids (curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin) as major bioactive substances. Previously reported HPLC-UV methods for the determination of curcuminoids have several disadvantages, including unsatisfactory separation times, poor resolution and/or complicated solvent mixtures with gradient elution.

Objective – To develop a simple isocratic HPLC-UV method for the simultaneous determination of individual curcuminoids for the quality control of turmeric extracts.

Methodology – The sample was prepared by dissolving the extract in acetonitrile and subsequently diluting with 50% acetonitrile. This solution was analysed by reverse-phase chromatography on an Alltima C₁₈ column with isocratic elution of acetonitrile and 2% v/v acetic acid (40:60, v/v) at a flow rate of 2.0 mL/min, a column temperature of 33°C, and UV detection at 425 nm. The method was validated and applied for quantification of individual curcuminoids in commercial turmeric extracts.

Results – The method allowed simultaneous determination of curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin in the concentration ranges of 10–60, 4–24 and 0.5–3.0 µg/mL, respectively. The limits of detection and quantification were, respectively, 0.90 and 2.73 µg/mL for curcumin, 0.84 and 2.53 µg/mL for desmethoxycurcumin and 0.08 and 0.23 µg/mL for bisdesmethoxycurcumin, and the percentage recoveries were, respectively, 99.16–101.75 (%RSD ≤ 1.11%), 99.50–101.01 (%RSD ≤ 1.74%) and 99.67–101.92 (RSD ≤ 1.31%).

Conclusion – The method was found to be simple, accurate and precise and is recommended for routine quality control analysis of turmeric extracts containing the three curcuminoid compounds as the main principles in the herb. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: HPLC; curcuminoids; curcumin; turmeric; *Curcuma longa*

Introduction

Turmeric (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) is a herbaceous plant originating from India and Southeast Asia. The powdered rhizome of turmeric is widely used as a spice and colouring agent in food by virtue of its yellowish-orange colour and pleasant aroma. Medicinally, turmeric is used as a treatment for inflammation and skin wounds (Ammon and Wahl, 1991). Studies of turmeric have revealed numerous pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-parasitic, anti-mutagenic, anticancer, chemoprotective, hepatoprotective, antimicrobial and antiviral activities (Srimal, 1997; Jayaprakasha *et al.*, 2005; Rojsitthisak *et al.*, 2005; Anand *et al.*, 2008). These activities are attributable to polyphenolic curcuminoids, and most commercially available turmeric extracts include three naturally occurring diarylheptanoid curcuminoids, namely, curcumin (60–80%), desmethoxycurcumin (15–30%) and bisdesmethoxycurcumin (2–6%; Fig. 1; Ahsan *et al.*, 1999; Jayaprakasha *et al.*, 2002, 2005).

A variety of techniques for the quantification of total and individual curcuminoids in different matrices have been reported, especially spectrophotometric methods for the determination of total curcuminoids on account of the colour and absorption of these compounds in the visible wavelength (ASTA Method, American Spice Trade Association, 1985; *Standard ASEAN Herbal*

Medicine, 1993; Pothitirat and Gritsanapan, 2006). However, this approach cannot be used to quantify individual curcuminoids, and various liquid chromatographic methods have been developed for this purpose employing TLC, HPTLC, CE and HPLC. Simple and efficient separation of curcuminoids using hydrogen phosphate-impregnated silica gel TLC plates was reported by Rasmussen *et al.* (2000), and recently Sotanaphun *et al.* (2008) developed a TLC image analysis approach using Scion Image software to determine curcuminoids in turmeric. In order to improve the performance of the TLC method, a number of HPTLC methods have been developed. Gupta *et al.* (1999) and Pathania *et al.* (2006) have reported the determination of curcuminoids in turmeric, and Ansasi *et al.* (2005) described a stability-indicating HPTLC method for assessing the stability of curcumin in bulk drug and

* Correspondence to: P. Rojsitthisak, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand. E-mail: Pornchai.R@chula.ac.th

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand

Contract/grant sponsor: National Research Council of Thailand.

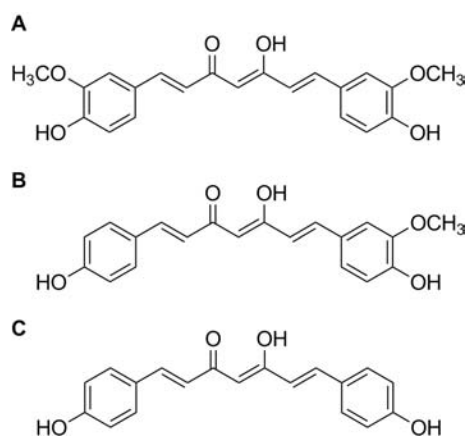


Figure 1. Chemical structures of (A) curcumin, (B) desmethoxycurcumin and (C) bisdesmethoxycurcumin.

pharmaceutical formulations. Interestingly, Pozharitskaya *et al.* (2008) combined HPTLC with a photodiode array detector (PAD) and post-chromatographic DHP radical derivatisation to determine the composition and free radical-scavenging activity of individual curcuminoids simultaneously. To take advantage of the short analysis time and low production of organic waste, CE methods have been developed for the quantitative analysis of curcuminoids (Sun *et al.*, 2002) and the rapid differentiation between *C. domestica* (*C. longa*) and *C. xanthorrhiza* has been described (Lechtenberg *et al.*, 2004).

HPLC coupled to various detectors has largely replaced spectroscopic methods in the qualitative and quantitative analysis of pharmaceutical and food products. HPLC for the determination of curcuminoids has been used in combination with detection using mass spectrometry (MS), PAD or UV absorption. He *et al.* (1998) reported HPLC-ESI-MS analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric, and Hiserodt *et al.* (1996) used HPLC-MS and GC-MS for the separation and characterisation of curcuminoids in powdered turmeric. Jiang *et al.* (2006) reported an HPLC-ESI-MS/MS method with PAD for the on-line identification of curcuminoids in turmeric extracts, following development of the HPLC-PAD method for the quantitative determination of curcuminoids in ethanolic extracts of turmeric using a polymeric Hamilton PRP-1 column (Taylor and McDowell, 1992). Bos *et al.* (2007) described a new HPLC-PAD method for the determination of curcuminoids in various *Curcuma* species native to and used medicinally in Indonesia, using a solvent mixture of methanol, trifluoroacetic acid and acetonitrile.

HPLC coupled with UV detection is the most common method for the determination of curcuminoids in turmeric samples. Tonnesen and Karlsen (1983) first reported this method for curcumin and its related compounds in turmeric, and Smith and Withowska (1984) compared UV and electrochemical detection in HPLC for the determination of curcumin in turmeric powder. Khurana and Ho (1988) developed an HPLC-UV analysis of curcuminoids and their photo-oxidative decomposition compounds in turmeric using an NH_2 and WCX column, and Rouseff (1988) improved the separation of curcuminoids on an ODS column by use of a gradient water–tetrahydrofuran system with a run time of 22 min. Jayaprakasha *et al.* (2002) reported an improved HPLC-UV method for the determination of curcuminoids with gradient elution of a solvent mixture of methanol, acetic acid and acetonitrile with a run time of 20 min.

Previously reported HPLC-UV methods for curcuminoids, especially those in the older literature, have several disadvantages, including unsatisfactory separation times, poor resolution and/or complicated solvent mixtures with gradient elution. The aim of the present work was to develop a simple and rapid isocratic HPLC-UV method for the simultaneous determination of individual curcuminoids for routine analysis and quality control of turmeric extract raw materials.

Experimental

Chemicals

Curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin standards were synthesised in the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. The standards were characterised by IR, MS and NMR. The purity of standards was ca. >99%. Five commercially available turmeric extracts were kindly provided by Thai-China Flavors and Fragrances Industry Co., Ltd. (TCFF, Nonthaburi, Thailand) and the Government Pharmaceutical Organization (GPO, Nakhonnayok, Thailand). The three lots of turmeric extracts obtained from TCFF were designated TCFF-WS, TCFF-RM090304 and TCFF-RM261101, and the two lots obtained from GPO were designated GPO-U480006 and GPO-NP50046. HPLC-grade acetonitrile was purchased from Lab-Scan (Samutsakorn, Thailand) and AR-grade glacial acetic acid was purchased from Carlo Erba (Bangkok, Thailand).

HPLC instrumentation

HPLC analysis was performed using a Shimadzu-VP system (Shimadzu, Japan) consisting of an SCL-10A VP system controller, an LC-10AD VP pump, an SIL-10AD VP auto-injector, a DGU-14A degasser, an SPD-10A VP UV-VIS detector, LC Solution software and an Alltech Alltima C_{18} column (150 × 4.6 mm i.d.; 5 μm ; Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, USA).

Chromatographic conditions

A reverse-phase HPLC assay was carried out using an isocratic system with a flow rate of 2.0 mL/min, a column temperature of 33°C, a mobile phase of acetonitrile and 2% acetic acid (40:60, v/v), and a detection wavelength of 425 nm. The injection volume was 20 μL . Solutions were filtered through a 0.45 μm nylon membrane prior to HPLC injection. The total chromatographic analysis time was 16 min per sample, with curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin eluting at retention times of 13.6, 12.1 and 10.8 min, respectively (Fig. 2).

Preparation of standard solutions

Stock solutions of curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin in acetonitrile were prepared separately at concentrations of 1000, 400 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Standard solutions were prepared by diluting the stock solutions with 50% acetonitrile to obtain concentrations of 10, 20, 30, 40, 50 and 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for curcumin; 4, 8, 12, 16, 20 and 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for desmethoxycurcumin; and 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for bisdesmethoxycurcumin. A system suitability solution was prepared by mixing different volumes of the stock solutions of curcuminoids to obtain final concentrations of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for

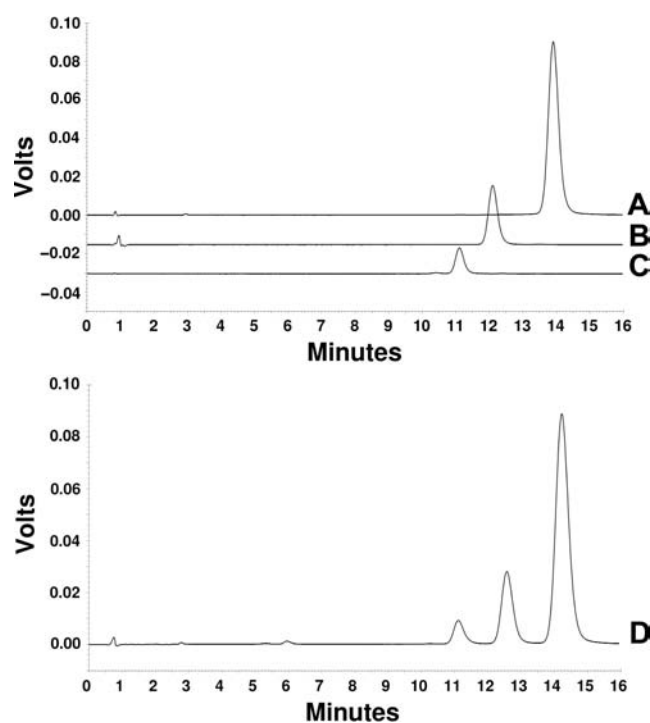


Figure 2. Typical HPLC chromatograms of solutions of (A) curcumin, (B) desmethoxycurcumin, (C) bisdesmethoxycurcumin and (D) turmeric extract.

curcumin, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for desmethoxycurcumin and 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for bisdesmethoxycurcumin.

Sample preparation

Each commercial turmeric extract sample (100 mg) was accurately weighed and transferred into a 250 mL volumetric flask. Approximately 100 mL of acetonitrile was added and the solution was sonicated for 10 min and then diluted with acetonitrile to obtain a stock sample solution at 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This solution was subsequently diluted 10 times with 50% acetonitrile to obtain a sample solution with a final concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Validation of the HPLC method

System suitability test. System suitability was assessed by six replicate analyses of the system suitability solution. The acceptance criterion was $\pm 2\%$ for the percentage relative standard deviation (%RSD) of peak area and retention time. The resolution and tailing factor were also determined.

Linearity (calibration curve). Linearity was performed for each curcuminoid standard. Six different standard solutions—10–60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for curcumin, 4–24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for desmethoxycurcumin and 0.5–3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for bisdesmethoxycurcumin—were analysed in triplicate for each concentration. Calibration curves were constructed by plotting peak areas against analyte concentrations. The linearity was assessed by calculating the slope, y-intercept and coefficient of determination (r^2) using least squares regression.

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). The linear regression equation of the calibration curve was used to deter-

mine the LOD and LOQ. The LOD and LOQ were calculated based on the standard deviation (SD) of the y-intercept and the slope (s) as $3.3\text{SD}/s$ and $10\text{SD}/s$, respectively.

Precision and accuracy. The repeatability (intra-day precision), the intermediate precision (inter-day precision) and the accuracy of the method were determined at three different concentrations. Samples were prepared by spiking stock standard solutions with commercial turmeric extract to give additional concentrations of 10, 30 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for curcumin; 4, 12 and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for desmethoxycurcumin; and 0.5, 1.5 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for bisdesmethoxycurcumin. Intra-day precision and accuracy were performed by six replicate analyses for each concentration on the same day ($n = 6$). Inter-day precision and accuracy were performed for each concentration on three different days ($n = 3$). The precision is expressed as %RSD and the accuracy is expressed as the percentage recovery of the added curcuminoids.

Results and Discussion

Validation of the HPLC method

System suitability. Six replicate injections of the system suitability solution gave %RSD values for retention time and peak area within 2%, indicating low variation of the measured values (Table 1). The tailing factors (T) for curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin were 1.06, 1.06 and 1.03, demonstrating symmetry of all peaks ($T < 2$). The resolution (R) between curcumin and desmethoxycurcumin and between desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin was 2.72 and 2.66, respectively, indicating a high degree of peak separation ($R > 2$). The efficiency of the column, as expressed by the number of theoretical plates, was more than 1500. These results indicate the suitability of the HPLC system and conditions, which were then used for further validation and sample analysis.

Linearity. The slopes, y-intercepts, and correlation coefficients (r^2) obtained from regression analysis are shown in Table 2. The calibration curves were linear in the tested concentration ranges. The regression equations were $y = 96313x - 43526$ ($r^2 = 0.9998$), $y = 66702x - 32253$ ($r^2 = 0.9993$) and $y = 86255x - 6948$ ($r^2 = 0.9995$) for curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin, respectively. The correlation coefficients were all greater than

Table 1. System suitability study for the determination of curcuminoids ($n = 5$)

	Retention time (min)	Peak area	Tailing factor	Theoretical plate
<i>Curcumin (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)</i>				
Mean	13.6	1,747,093	1.063	56,860
%RSD	0.25	0.84	0.64	0.61
<i>Desmethoxycurcumin (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$)</i>				
Mean	12.1	484,114	1.062	56,768
%RSD	0.27	0.50	0.32	0.53
<i>Bisdesmethoxycurcumin (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)</i>				
Mean	10.8	126,702	1.025	61,109
%RSD	0.24	0.68	1.51	1.47

Table 2. Linear regression analysis parameters for the determination of curcuminoids

Curcuminoids	Concentration range ($\mu\text{g/mL}$)	Linear regression parameters		
		Slope	y-Intercept	r^2
Curcumin	10–60	96,313	-43,526	0.9998
Desmethoxycurcumin	4–24	66,702	-32,253	0.9993
Bisdsmethoxycurcumin	0.5–3	86,255	-6,948	0.9995

0.999, indicating high degrees of correlation and good linearity of the method.

LOD and LOQ. The LOD was 0.90 $\mu\text{g/mL}$ for curcumin, 0.84 $\mu\text{g/mL}$ for desmethoxycurcumin and 0.08 $\mu\text{g/mL}$ for bisdesmethoxycurcumin, and the LOQ was 2.73 $\mu\text{g/mL}$ for curcumin, 2.53 $\mu\text{g/mL}$ for desmethoxycurcumin and 0.23 $\mu\text{g/mL}$ for bisdesmethoxycurcumin. These results indicate that the method provided adequate sensitivity.

Precision and accuracy. The intra-day and inter-day precision and accuracy for determination of curcuminoids are given in Table 3. The %RSD values for intra-day precision were 1.22–1.76, 1.07–1.52 and 0.94–1.31 for curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin, respectively, and those for inter-day precision were 0.49–1.11, 0.40–1.74 and 0.20–1.31, respectively. The low values of %RSD (<2%) reflect the high precision of the method. The percentage recoveries for intra-day accuracy were 99.87–101.75, 100.35–100.82 and 100.76–101.92, respectively, and those for inter-day accuracy were 99.16–100.75, 99.50–101.01 and 99.67–101.92, respectively. All percentage recoveries were within 98–102%, indicating the good accuracy of the method.

Application of the HPLC method

The method was used to quantify the amounts of curcumin, desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin in five commercially available turmeric extracts. The total curcuminoid content was calculated based on the sum of the three components. The assay results are summarised in Table 4. The percentages of curcumin, desmethoxycurcumin, bisdesmethoxycurcumin and the total curcuminoid content in the extracts (%w/w) were 60.19–71.50, 17.40–27.83, 2.65–4.43 and 81.90–99.86%, respectively.

Conclusion

In this study a simple and isocratic HPLC-UV method for the simultaneous determination of individual and total curcuminoids in turmeric extracts was developed and validated. The experimental conditions, including the diluting solvent, mobile phase composition, column temperature and flow rate, were optimised to provide high-resolution and reproducible peaks. From preliminary experiments the best results were obtained using a mobile phase of acetonitrile and 2% v/v acetic acid (40:60, v/v). Sample solutions of turmeric extracts should be prepared in aqueous acetonitrile and can be injected directly into the HPLC column without a prior extraction process. A flow-rate of 2.0 mL/min was found to be appropriate for shortening the run time without compromising the peak resolution. A column temperature of

33°C was required to obtain reproducible peaks while the higher temperature caused poor peak resolution.

The method was validated in compliance with the International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines [ICH-Q2 (R1), 2005] and is suitable for the simultaneous determination of individual curcuminoids in commercial turmeric extracts with excellent precision, accuracy and linearity. The method is isocratic with an uncomplicated mobile phase, and the sample preparation and assay procedure are simple and rapid. Therefore, we suggest that this method can be used for routine analysis of curcuminoids in turmeric extracts and formulations containing turmeric extracts.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the National Research Council of Thailand (NRCT) for providing research fund. We also thank the faculty and staff of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their suggestions, and Dr. Ian S. Haworth (University of Southern California) for his comments on the manuscript.

References

- Ahsan H, Parveen N, Khan NU and Hadi SM. 1999. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Chem-Biol Interact* **121**: 161–175.
- American Spice Trade Association. 1985. *ASTA Method. 18.0 Official Analytical Methods of the American Spice Trade Association*, 3rd edn. ASTA: Englewood Cliffs, NJ.
- Ammon HPT and Wahl MA. 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med* **57**: 1–7.
- Anand P, Thomas SG, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Sung B, Tharakan ST, Misra K, Priyadarsini IK, Rajasekharan KN and Aggarwal BB. 2008. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and mother nature. *Biochem Pharmacol* **76**: 1590–1611.
- Ansari MJ, Ahmad S, Kohli K, Ali J and Khar RK. 2005. Stability-indicating HPTLC determination of curcumin in bulk drug and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* **39**: 132–138.
- Bos R, Windono T, Woerdenbag HJ, Boersma YL, Koulman A and Kayser O. 2007. HPLC-photodiode array detection analysis of curcuminoids in *Curcuma* species indigenous to Indonesia. *Phytochem Anal* **18**: 118–122.
- Gupta AP, Gupta MM and Kumar S. 1999. Simultaneous determination of curcuminoids in *Curcuma* samples using high performance thin layer chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol* **22**: 1561–1569.
- He XG, Lin LZ, Lian LZ and Lindernmaier M. 1998. Liquid chromatography–electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*). *J Chromatogr A* **818**: 127–132.
- Hiserodt R, Hartman TG, Ho CT and Rosen RT. 1996. Characterization of powdered turmeric by liquid chromatography–mass spectrometry

Table 3. Precision (% RSD) and accuracy (% recovery) for the determination of curcuminoids

Compound	Amount added ($\mu\text{g/mL}$)	Amount found ($\mu\text{g/mL}$)	% RSD	% Recovery
<i>Repeatability (intra-day) n = 6</i>				
Curcumin	9.27	9.31 \pm 0.16	1.72	100.38
	29.04	28.99 \pm 0.35	1.22	99.87
	49.85	50.22 \pm 0.88	1.76	100.75
Desmethoxycurcumin	4.27	4.30 \pm 0.06	1.38	100.82
	13.38	13.43 \pm 0.20	1.52	100.41
	22.05	22.35 \pm 0.24	1.07	100.35
Bisdemethoxycurcumin	0.45	0.45 \pm 0.01	1.25	101.40
	1.43	1.43 \pm 0.01	0.94	100.76
	2.35	2.40 \pm 0.03	1.31	101.92
<i>Intermediate precision (inter-day, 3 days) n = 3</i>				
Curcumin				
First day	9.27	9.26 \pm 0.04	0.49	99.84
	29.04	29.08 \pm 0.32	1.11	100.14
	49.85	49.61 \pm 0.59	0.97	99.51
Second day	9.37	9.53 \pm 0.06	0.63	101.75
	28.83	29.61 \pm 0.19	0.64	101.15
	50.40	50.44 \pm 0.35	0.69	100.08
Third day	10.37	10.43 \pm 0.09	0.87	100.56
	31.83	31.56 \pm 0.18	0.58	99.16
	54.90	54.59 \pm 0.01	0.18	99.44
Desmethoxycurcumin				
First day	4.27	4.29 \pm 0.08	1.38	100.82
	13.38	13.34 \pm 0.18	1.52	100.41
	22.05	22.32 \pm 0.33	1.07	100.35
Second day	4.70	4.69 \pm 0.03	0.72	99.68
	14.40	14.46 \pm 0.07	0.48	100.41
	23.90	23.78 \pm 0.10	0.40	99.50
Third day	4.62	4.67 \pm 0.08	1.74	101.01
	14.16	14.28 \pm 0.16	1.11	100.83
	23.55	23.73 \pm 0.39	1.63	100.75
Bisdemethoxycurcumin				
First day	0.45	0.45 \pm 0.01	1.25	101.40
	1.43	1.45 \pm 0.02	0.94	100.76
	2.35	2.39 \pm 0.05	1.31	101.92
Second day	0.55	0.56 \pm 0.01	1.00	101.82
	1.58	1.58 \pm 0.01	0.40	99.67
	2.56	2.56 \pm 0.02	0.95	100.85
Third day	0.55	0.56 \pm 0.00	0.20	101.57
	1.57	1.58 \pm 0.01	0.44	100.95
	2.53	2.56 \pm 0.03	1.11	101.33

and gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* **740**: 51–63.

ICH-Q2 (R1) 2005. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. International Conference on Harmonization: Geneva.

Jayaprakasha GKL, Rao LJM and Sakariah KK. 2002. Improve HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *J Agric Food Chem* **50**: 3668–3672.

Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L and Sakariah KK. 2005. Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Trends Food Sci Tech* **16**: 533–548.

Jiang H, Timmermann BN and Gang DR. 2006. Use of liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry to identify diarylheptanoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) rhizome. *J Chromatogr A* **1111**: 21–31.

Khurana A and Ho CT. 1998. High-performance liquid chromatography analysis of curcuminoids and their photo-oxidative decomposition compound in *Curcuma longa* L. *J Liq Chromatogr* **11**: 2295–2304.

Lechtenberg M, Quandt B and Nahrstedt A. 2004. Quantitative determination of curcuminoids in *Curcuma* rhizomes and rapid differentiation of *Curcuma domestica* Val. and *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by capillary electrophoresis. *Phytochem Anal* **15**: 152–158.

Pathania V, Gupta AP and Singh B. 2006. Improved HPTLC method for determination of curcuminoids from *Curcuma longa*. *J Liq Chromatogr Relat Tech* **29**: 877–887.

Pothitirat W and Gritsanapan W. 2006. Variation of bioactive components in *Curcuma longa* in Thailand. *Curr Sci* **91**: 1397–1400.

Pozharitskaya ON, Ivanova SA, Shikov AN and Makarov VG. 2008. Separation and free radical-scavenging activity of major curcuminoids of *Curcuma longa* using HPTLC–DPPH method. *Phytochem Anal* **19**: 236–243.

Ramussen HB, Christensen SB, Kvist LP and Karazmi A. 2000. A simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. *Planta Med* **66**: 396–397.

Table 4. Assay of curcuminoids in commercial turmeric extracts

Supplier lot no.	Amount (%w/w) in turmeric extracts			
	Curcumin	Desmethoxycurcumin	Bisdsmethoxycurcumin	Total
TCFF-WS	71.50	23.63	4.43	99.56
TCFF-RM090304	69.38	27.83	2.65	99.86
TCFF-RM261101	70.94	23.32	2.91	97.17
GPO-U480006	63.23	17.40	3.01	83.64
GPO-NP50046	60.19	18.66	3.05	81.90

- Rojstithisak P, Limpanon Y, Thipmongkolsilp N, Kongtong B and Wongtavatchai J. 2005. *In vitro* inhibitory effect of turmeric extract from *Curcuma longa* on shrimp pathogenic vibrios. *Thai J Pharm Sci* **29**: 165–177.
- Rouseff RL. 1988. High-performance liquid chromatographic separation of spectral characterization of the pigments in turmeric and annatto. *J Food Sci* **53**: 1823–1826.
- Smith R and Withowska B. 1984. Comparison of detectors for the determination of curcumin in turmeric by high performance liquid chromatography. *Analyst* **109**: 259–261.
- Sotanaphun U, Phattanawasin P and Sriphong L. 2009. Application of scion image software to the simultaneous determination of curcuminoids in turmeric (*Curcuma longa*). *Phytochem Anal* **20**: 19–23.
- Srimal RC. 1997. Turmeric: a brief review of medicinal properties. *Fitoterapia* **68**: 483–493.
- Standard ASEAN Herbal Medicine. 1993. Volume 1. Aksara Buana Printing: Jakarta; 193–206.
- Sun X, Gao C, Cao W, Yang X and Wang E. 2002. Capillary electrophoresis with amperometric detection of curcumin in Chinese herbal medicine pretreated by solid-phase extraction. *J Chromatogr A* **962**: 117–125.
- Taylor SJ and McDowell IJ. 1992. Determination of the curcuminoid pigments in turmeric (*Curcuma domestica* Val) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* **34**: 73–77.
- Tonnesen HH and Karlsen J. 1983. High-performance liquid chromatography of curcumin and related compounds. *J Chromatogr* **259**: 367–371.

*Original Article****In Vitro* Inhibitory Effect of Turmeric Extract from *Curcuma longa* on Shrimp Pathogenic Vibrios**Pornchai Rojsitthisak¹, Yanin Limpanon², Nuchanart Thipmongkolsilp², Bang-on Kongtong¹ and Janenuj Wongtavatchai^{2,*}¹Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330²Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

* Corresponding author. Tel & Fax: 02-2189591, E-mail address: Janenuj.W@chula.ac.th

Abstract

The commercially available turmeric extract from *Curcuma longa* L. was standardized and evaluated for antibacterial activity against shrimp pathogenic vibrios. High-performance liquid chromatographic determination of the extract revealed 99.42% of the total active compounds, namely curcuminoids, consisting of curcumin (72.29%), desmethoxycurcumin (23.50%) and bisdesmethoxycurcumin (3.63%). The antibacterial activity of the extract was subsequently tested *in vitro* against twenty vibrio isolates. The vibrios were isolated from hepatopancreas of the diseased shrimps collected from different culture areas of Thailand and Vietnam, and identified by API-20 system (BioMerieux). Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of the extract determined by agar dilution method were \leq 512 μ g/ml (64-512 μ g/ml). Analysis of MIC values indicated that 50% of the tested isolates were susceptible to the extract at 256 μ g/ml (MIC₅₀) while 90% of the tested isolates were susceptible to 512 μ g/ml (MIC₉₀). The study demonstrated the antivibrio activity of the standardized turmeric extract, thus, suggesting the potential use of the naturally extracted compound as an alternative to antimicrobial chemicals for the treatment of vibriosis in shrimp culture.

Key words

Turmeric, Curcumin, Minimum inhibitory concentration, Vibrio, Shrimp

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของสารสกัดขมิ้นชันต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโกลีไวรัสในกึ่งทะเล

พรชัย โรจนสิทธิ์ศักดิ์¹, ญาณิน ลิ้มปานนท์², นุชนารถ ทิพย์มงคลศิลป์², บังอร กงทอง¹ และ เจนนุช ว่องธวัชชัย^{2,*}

¹ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

²ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

* ผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้ โทรศัพท์และโทรสาร: 02-2189591, ที่อยู่ทางอิเล็กทรอนิกส์: Janenuj.W@chula.ac.th

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้นำสารสกัดจากขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L., Turmeric) ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมาตรวจสอบหาปริมาณสารสำคัญ และทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสกุลไวรัสที่แยกได้จากกึ่งทะเลป่วย ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันด้วยวิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าสารสกัดขมิ้นชันมีสารสำคัญ curcuminoids ในปริมาณ 99.42% ซึ่งประกอบไปด้วยสาร 3 ชนิด ได้แก่ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ในปริมาณ 72.29, 23.50 และ 3.63% ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันดังกล่าวในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสด้วยวิธี agar dilution method โดยทดสอบกับเชื้อไวรัสที่แยกจาก hepatopancreas ของกึ่งทะเลป่วย ซึ่งเก็บจากเขตพื้นที่การเลี้ยงต่างๆ ของประเทศไทยและเวียดนาม จำนวน 20 isolates และที่ได้ผ่านการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API-20 (BioMerieux) ผลการทดสอบพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส (Minimum Inhibitory Concentrations; MICs) \leq 512 $\mu\text{g/ml}$ (64-512 $\mu\text{g/ml}$) โดยความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสที่ทดสอบได้ 50% (MIC₅₀) และ 90% (MIC₉₀) เท่ากับ 256 $\mu\text{g/ml}$ และ 512 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการศึกษามีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเพื่อเป็นทางเลือกสำหรับใช้เป็นสารต้านจุลชีพเพื่อรักษาโรคติดเชื้อไวรัสในกึ่งทะเล

กุญแจคำ

สารสกัดขมิ้นชัน, เคอร์คิวมินอยด์, ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ, ไวรัส, กึ่งทะเล

บทนำ

กึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญต่อการส่งออกของประเทศไทย ในปีพ.ศ. 2547 ประเทศไทยส่งออกกึ่งประมาณ 240,945.28 ตัน คิดเป็นมูลค่า 67,311.56 ล้านบาท (1) สำหรับการเลี้ยงกึ่งเป็นระบบอุตสาหกรรมต้องประสบกับการสูญเสียผลผลิตเนื่องจากการเกิดโรคติดเชื้อในบ่อเพาะเลี้ยง โดยการติดเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กึ่งตายในระหว่างการเพาะเลี้ยง

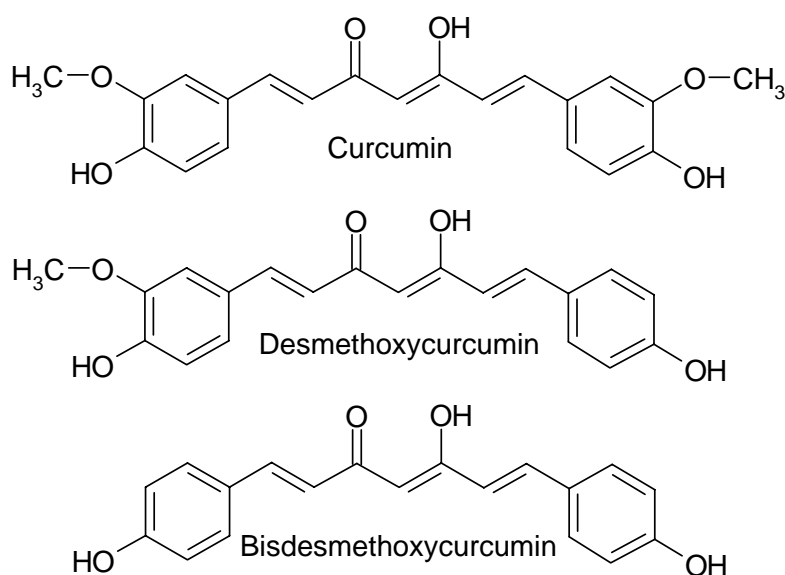
และแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคในกึ่งที่เพาะเลี้ยง คือแบคทีเรียในสกุลไวรัส ทำให้มีการใช้ยาต้านจุลชีพหรือสารเคมีชนิดต่างๆ ในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสในฟาร์มเลี้ยงกึ่งและพบว่าการใช้ยาต้านจุลชีพอย่างไม่ถูกต้องก่อให้เกิดปัญหาทั้งในด้านการควบคุมโรคในกึ่ง เช่น แบคทีเรียเกิดความต้านทานต่อยาทำให้การใช้ยาต้านจุลชีพไม่ได้ผล เกิดการตกค้างของยาในเนื้อเยื่อกึ่งซึ่งอาจไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (2-3) ดังเช่นปัญหา

เรื่องสารตกค้างในกุ้งที่ส่งออกไปยังสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 สารตกค้างที่เป็นปัญหาหลัก ได้แก่ ยาต้านจุลชีพในกลุ่มไนโตรฟูแรน (Nitrofurans) คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) และอิมิดาโซล (Imidazole) ซึ่งทำให้ในสัตว์เพื่อการบริโภค เนื่องจากการจำกัดชนิดของยาต้านจุลชีพที่ใช้ในสัตว์ที่เป็นอาหารและปัญหายาสัตว์ตกค้างในเนื้อกุ้ง ทำให้เกษตรกรและผู้วิจัยทำการทดสอบการใช้สมุนไพรไทยชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ โดยการผสมสมุนไพรในอาหารกุ้งทดแทนการใช้ยาต้านจุลชีพ (3)

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชล้มลุกมีเหง้าอยู่ใต้ดิน เนื้อในของเหง้าขมิ้นชันมีสีเหลืองเข้มจนสีแสดจัด มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ใบรูปรียาว ปลายแหลมคล้ายใบพุทธรักษา ดอกออกเป็นช่อ มีก้านช่อแทงจากเหง้าโดยตรง ออกตรงกลางระหว่างใบคู่ในสุด ดอกสีขาว มีแถบสีเหลืองคาด มีกลีบประดับสีขาวหรือเขียว สำหรับส่วนหัวและเหง้า (rhizome) ถูกนำมาใช้เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็นสารแต่งสีเหลือง เป็นเครื่องเทศ ปรุงแต่งกลิ่นและรสในอาหาร และนิยมใช้ในเครื่องสำอาง สบู่ ครีมนวดผิว แชมพูสระผม และโลชั่นต่างๆ ส่วนเหง้าทั้งแบบสดและแห้งสามารถนำมาทำเป็นยา โดยเหง้าของขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ลดการอักเสบ และมีฤทธิ์ในการขับน้ำดี น้ำมันหอมระเหยในขมิ้นชันมีสรรพคุณ

บรรเทาอาการปวดท้อง ท้องอืด แน่นจุกเสียด (4) สารสำคัญที่พบในเหง้าของขมิ้นชันประกอบด้วยสารหลัก 2 ประเภท คือ 1) น้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีสารประกอบหลัก ได้แก่ aromatic turmerone, α -turmerone และ β -turmerone และ 2) curcuminoids ซึ่งเป็นสารสีส้ม ประกอบด้วย curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin (5) (รูปที่ 1)

curcuminoids มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านจุลชีพ (antimicrobial) (6) ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (7-9) ต้านอักเสบ (anti-inflammatory) (10-13) ต้านปรสิต (antiparasite) (14) ต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic) (15) ต้านและป้องกันมะเร็ง (chemoprotective และ anticancer) (16-19) และ ฤทธิ์ป้องกันความเป็นพิษต่อตับ (hepatoprotective) (20) จากการทดสอบความเป็นพิษของ curcuminoids นั้น ไม่พบความเป็นพิษเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน (21) จากข้อมูลด้านเภสัชวิทยาและพิษวิทยาข้างต้น ความเป็นไปได้ที่สูงว่า curcuminoids จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโคโรนาในกุ้ง นอกจากนี้ ความเป็นพิษที่ต่ำมากทำให้ curcuminoids มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารกุ้ง เพื่อการป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อในกุ้ง



รูปที่ 1. โครงสร้างทางเคมีของ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin

เนื่องจากสารสกัดจากสมุนไพรมักประกอบไปด้วยสารเคมีหลายชนิด โดยสารแต่ละชนิดอาจมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และความเป็นพิษที่ไม่เท่ากันหรือแตกต่างกัน ทั้งนี้ หากสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดมีปริมาณไม่สม่ำเสมอในแต่ละครั้งของการผลิต เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวมาใช้เป็นยาหรืออาหารเสริมย่อมทำให้เกิดปัญหาด้านความไม่แน่นอนในการออกฤทธิ์ ด้วยเหตุนี้ การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพร จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทราบปริมาณที่แน่นอนของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดที่นำมาศึกษา โดยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่พบในสารสกัดหนึ่ง ๆ ก็จะเป็นฤทธิ์ของสารสกัดที่ประกอบไปด้วยสารสำคัญแต่ละชนิดในอัตราส่วนที่คงที่ ดังนั้น ข้อมูลด้านเคมีขององค์ประกอบในสารสกัดที่ศึกษาจึงมีความจำเป็นและมีประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัด การนำสารสกัดที่มีมาตรฐาน (standardized extract) ไปใช้จึงสามารถลดปัญหา ด้านความไม่แน่นอนของการออกฤทธิ์ และสามารถใช้เป็นมาตรฐานอ้างอิงในการนำไปศึกษาและพัฒนาต่อไป

ในการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโกลีโคโนไวรัสทะเลโดยมีการควบคุมคุณภาพของสารสกัดก่อนนำมาศึกษา โดยสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาใช้ศึกษาเป็นสารสกัดที่มีจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด โดยนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ curcuminoids 3 ชนิด ได้แก่ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin เพื่อให้สารสกัดที่นำมาใช้เป็นสารสกัดที่มีมาตรฐาน ซึ่งผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโกลีโคโนไวรัส อาจเป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรในการใช้ทดแทนยาต้านจุลชีพ และเนื่องจากสารสกัดขมิ้นชันได้จากสมุนไพรธรรมชาติ ที่มีรายงานว่ามีความปลอดภัยสูง จึงสามารถหลีกเลี่ยงจากปัญหาการตกค้างของยาต้านจุลชีพในเนื้อกุ้ง นอกจากนี้ยังเป็น การส่งเสริมการใช้ทรัพยากรของประเทศไทยโดยไม่ต้องนำเข้ายาหรือสารเคมีจากต่างประเทศ

วัสดุและวิธีวิจัย

สารเคมี

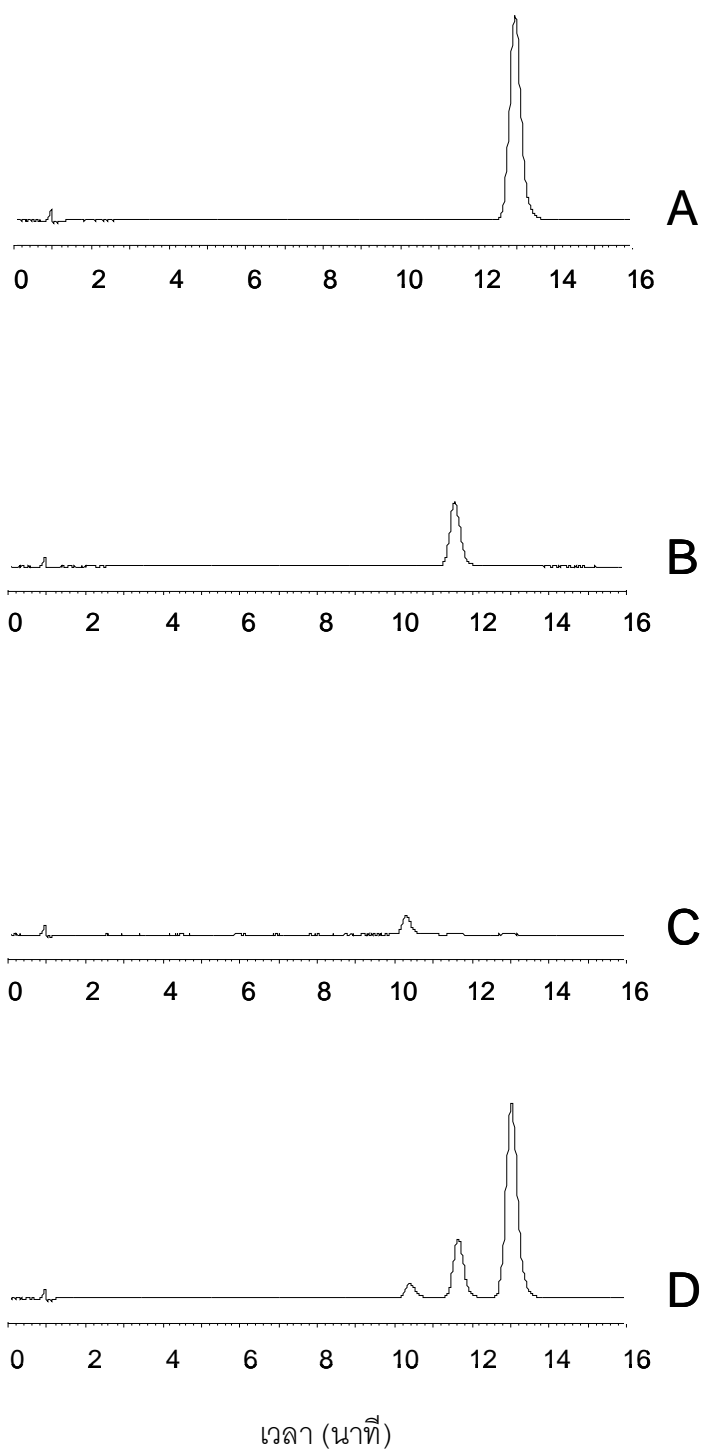
สารบริสุทธิ์ curcumin (99.56%), desmethoxycurcumin (98.77%) และ bisdesmethoxycurcumin (98.05%) ได้ถูกเตรียมขึ้นสำหรับใช้เป็นสารมาตรฐาน โดยแยกจากผงขมิ้นชันด้วยเทคนิค column chromatography และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึก การพิสูจน์เอกลักษณ์และความบริสุทธิ์ของสารทั้ง 3 ชนิด ใช้เทคนิค spectroscopy และ high-performance liquid chromatography (HPLC) (22) สำหรับสารสกัดขมิ้นชันได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อุตสาหกรรมไทย-จีนเครื่องหอม จำกัด Chloramphenicol เป็นของ Sigma และตัวทำละลายอื่น ๆ ได้แก่ methanol acetonitrile และ glacial acetic acid เป็นของ Labscan

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชัน

เตรียมสารละลายของสารมาตรฐาน curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin แต่ละชนิดใน methanol ให้มีความเข้มข้น 0.3, 0.2 และ 0.2 mg/ml แล้วเจือจางด้วย 50% methanol ให้มีความเข้มข้น 0.03, 0.01, 0.002 mg/ml ตามลำดับ สารละลายของสารสกัดขมิ้นชันนั้นเตรียมใน methanol ให้มีความเข้มข้น 0.40 mg/ml แล้วเจือจางด้วย 50% methanol ให้มีความเข้มข้น 0.04 mg/ml ฉีดสารละลายเข้า HPLC system (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (HiQsil[®], 4.6 mm × 150 mm, 5 μ) ควบคุมอุณหภูมิที่ 33°C มีวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็น acetonitrile และ 2% acetic acid (40:60, v/v) ด้วยอัตราการไหล (flow rate) เท่ากับ 2.0 ml/min ใช้ UV-Visible detector ตรวจวัดสารที่ 425 nm โดยฉีดสารละลายตัวอย่างที่ปริมาตรเท่ากับ 20 μ l บันทึก HPLC chromatogram (รูปที่ 2) และ peak area ของสารละลายที่ฉีด คำนวณหาปริมาณ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin

การแยกเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษาจากกุ้งป่วย

เก็บตัวอย่างกุ้งป่วยจากฟาร์มเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีกุ้งแสดงอาการป่วย เช่น ว่ายเกยขอบบ่อ และกินอาหารลดลง จากนั้น



รูปที่ 2. HPLC chromatograms ของสารละลาย curcumin 0.03 mg/ml (A), desmethoxycurcumin 0.01 mg/ml (B), bisdesmethoxycurcumin 0.002 mg/ml (C) และสารสกัดไขมันชั้น 0.04 mg/ml (D)

ทำการแยกเชื้อไวรัสจากกึ่งด่างกล่าว โดยการเพาะเชื้อจาก hepatopancreas ของกึ่งป่วยลงใน Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) agar ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับไวรัส-โอ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเลือกเฉพาะเชื้อที่ขึ้นได้โคโลนีที่เป็นสีเขียวหรือสีเหลืองมาพิสูจน์เชื้อ โดยการย้อมแกรม oxidase test และวิธีทางชีวเคมีดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ API 20E[®] หรือ API 20NE[®] (Bio-Merieux)

การทดสอบระดับความไวรับของเชื้อ มาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพ

การควบคุมคุณภาพงานนั้น ทำโดยการทดสอบระดับความไวรับของเชื้อมาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพ โดยการหาค่า MIC ของ chloramphenicol ต่อเชื้อมาตรฐาน 3 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC[®] (American Type Culture Collection) 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213 และ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC[®] 17802 ซึ่งทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ที่ระบุใน NLCCS (23)

การทดสอบความไวรับของเชื้อไวรัสต่อ สารสกัดขมิ้นชัน

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส (Minimum Inhibitory Concentrations; MICs) ด้วยวิธี Antimicrobial Agar Dilution Susceptibility Tests ทำตามมาตรฐานของ National Committee of Clinical Laboratory Standard ปี ค.ศ. 2000 (23) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 ละลายสารสกัดขมิ้นชัน ด้วย 0.1 N NaOH จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 10240 µg/ml และทำ Two-Fold Dilution ให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัด 10240-10 µg/ml

1.2 เจือจางสารสกัดที่เตรียมขึ้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วย Mueller-Hinton Agar (MHA) ในอัตราส่วน 1:10 โดยดูดสารละลายของสารมา 2 ml ใส่ลงใน MHA 18 ml จะได้

MHA ที่มีสารสกัดตามความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบที่ 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 และ 1 µg/ml

2. การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

2.1 เตรียมเชื้อมาตรฐาน 3 ชนิด สำหรับการ inoculate แต่ละครั้งเพื่อควบคุมคุณภาพของงาน เชื้อมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC[®] 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 29213 และ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC[®] 17802 โดยเพาะเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ลงใน Tryptic Soy Agar (TSA) ส่วนเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะต้องผสมเกลือ 1% ลงใน TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ได้มาใส่ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ปรับให้ได้ความขุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland ซึ่งจะมีเชื้ออยู่ประมาณ 10⁸ CFU/ml เจือจางในน้ำเกลือลงอีก 10 เท่า ได้ปริมาณเชื้อประมาณ 10⁷ CFU/ml (23)

2.2 เพาะเชื้อไวรัสลงใน TSA ที่ผสมเกลือ 1% เช่นเดียวกับการเตรียมเชื้อมาตรฐาน *V. parahaemolyticus*

3. การทดสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดขมิ้นชัน

3.1 ใส่เชื้อที่เตรียมในหลอด multipoint inoculator ซึ่งใส่เชื้อได้ 25 isolates โดยแบ่งเป็นที่สำหรับใส่เชื้อมาตรฐานได้ 3 isolates และสำหรับใส่เชื้อไวรัสทดสอบได้ 22 isolates

3.2 ถ่ายเชื้อจากหลุมลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันไว้แล้ว จะได้จุดเชื้อซึ่งมีเชื้อประมาณ 10⁴ CFU/spot

3.3 เมื่อใช้ multipoint inoculator ถ่ายเชื้อลงใน MHA ที่ผสมสารสกัดขมิ้นชันไว้แล้ว ทิ้งไว้จนจุดที่ถ่ายเชื้อแห้งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดขมิ้นชันที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ บันทึกเป็นค่า MIC

3.4 วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม WHONET5 (24)

ตารางที่ 1. การจำแนกชนิดของเชื้อ vibrios ตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี (25-28)

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Colony on TCBS	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green	Green / Yellow [•]
Growth at 42°C	+	+	-	v	+	+
Gram stain	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Cell morphology	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod	Short rod
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+
Decarboxylation of						
- arginine	-	-	+	+	-	-
- lysine	+	+	d ¹ / v ²	-	+	+
- ornithine	d ¹ / + ²	d ¹ / + ²	-	-	d ¹ / + ²	v ¹ / + ²
Citrate utilization	d	d	-	-	d	d
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+ ¹ / v ²	+	-	-	-
Growth in NaCl						
- 0%	-	+	-	-	-	-
- 3%	+	+	+	+	+	+
- 6%	+	d ¹ / - ²	d ¹ / v ²	d ¹ / + ²	d ¹ / + ²	+
- 8%	+	-	-	v	+	-
- 10%	+	-	-	-	-	-
Acid production from						
- salicin	d	-	-	d	-	+
- lactose	-	-	-	-	-	+
- arabinose	-	-	- ¹ / + ²	+	d ¹ / + ²	-
- sucrose	d ¹ / + ²	+	-	+	-	-
- sorbitol	-	-	-	-	-	-
- mannitol	+	+	- ¹ / + ²	+	+	d ¹ / v ²
- mannose	+	+	+	+	+	+
- D-cellobiose	-	-	+	+	v	+
Synthesis indole	+	+	-	d	+	+
Synthesis urease	-	-	+	-	- ¹ / v ²	-
Synthesis gelatinase	+	+	-	+	+	+
ONPG	-	+	-	+	-	+
Susceptible to						
- 10 µg/kg O/129	R	S	S	R	R	S
- 150 µg/kg O/129	S	S	S	S	S	S

หมายเหตุ:

- = โคลนใหม่ของเชื้อส่วนใหญ่มีสีเขียว
- + = 85-100% ที่ให้ผลบวก
- = 0-15% ที่ให้ผลบวก
- d = 16-80% ที่ให้ผลบวก
- v = ผลแปรผัน
- 1 = อ้างจาก (25-27)
- 2 = อ้างจาก (28)
- S = มีความไวรับ
- R = มีความต้านทาน
- ONPG = o-nitro-beta-D-galactopyranoside hydrolysis by beta-galactosidase
- O/129 = vibrio static agent: 2,4-diamino-6,7-di-isopropylpteridine

ผลการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันโดยวิธี HPLC

จากการวิเคราะห์ปริมาณ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ในสารสกัดขมิ้นชันด้วย HPLC ได้ chromatogram ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่า สารสกัดขมิ้นชันให้พีคเกิดขึ้นที่ retention time ประมาณ 12.97, 11.58 และ 10.33 นาที สอดคล้องกับพีคของสารมาตรฐาน curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ตามลำดับ จากการคำนวณพบว่า สารสกัดขมิ้นชันที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสก่อโรคในกุ้ง ประกอบไปด้วยปริมาณสารสำคัญคือ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin เท่ากับ 72.29%, 23.50% และ 3.63% ตามลำดับ และมีปริมาณของ curcuminoids รวมเท่ากับ 99.42%

การแยกเชื้อไวรัสที่ใช้ในการศึกษาจากกุ้งป่วย

เมื่อเก็บตัวอย่างกุ้งป่วยจากพื้นที่การเลี้ยงในจังหวัดกระบี่ ระยอง นครศรีธรรมราช จันทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ปัตตานี และชุมพร และจากเมือง Nha Trang ประเทศเวียดนาม พบว่าเชื้อไวรัสที่แยกจากกุ้งป่วยจำนวน 20 isolates สามารถจำแนกได้เป็น *V. alginolyticus* 2 isolates, *V. cholerae* 1 isolate, *V. damsela* 2 isolates, *V. fluvialis* 8 isolates, *V. parahaemolyticus* 6 isolates และ *V. vulnificus* 1 isolate (ตารางที่ 1) นำเชื้อไวรัสที่แยกไปใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสก่อโรคในกุ้ง

ผลการทดสอบระดับความไวรับของเชื้อมาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพและสารสกัดขมิ้นชัน ได้แสดงในตารางที่ 2 โดยพบว่ามีค่า MIC ของ chloramphenicol เท่ากับ 2 µg/ml สำหรับเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* และ เท่ากับ 1 µg/ml สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ส่วนค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด มีค่าเท่ากัน คือ 625 µg/ml (ตารางที่ 2) สำหรับการศึกษความไวรับของเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของกุ้งป่วยต่อสารสกัดขมิ้นชัน พบว่าค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันอยู่ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 64-512 µg/ml (ตารางที่ 3) โดยค่า MIC₅₀ (Minimum Inhibitory Concentration 50%) และ MIC₉₀ (Minimum Inhibitory Concentration 90%) เท่ากับ 256 และ 512 (g/ml ตามลำดับ (รูปที่ 3, ตารางที่ 4)

อภิปรายผล

การศึกษาประสิทธิภาพของสมุนไพรแต่ละครั้งนั้น มักมีความแปรปรวนเนื่องจากความไม่แน่นอนของปริมาณสารออกฤทธิ์ที่เกิดจากตัววัตถุดิบในการศึกษา และกระบวนการในการสกัด กล่าวคือ 1) ปริมาณสารออกฤทธิ์ที่มีในวัตถุดิบ และ 2) กระบวนการเตรียมสารสกัดหยาบแตกต่างกันในแต่ละการศึกษา ดังนั้น ในการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสในกุ้งทะเล จึงควรมีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ เพื่อให้สามารถระบุขนาดหรือปริมาณ (dose) ของสารสำคัญในการยับยั้งเชื้อ และเปรียบเทียบผลที่ได้กับการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพชนิดอื่นๆ

ตารางที่ 2. ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานของยา Chloramphenicol (positive control) และสารสกัดขมิ้นชัน

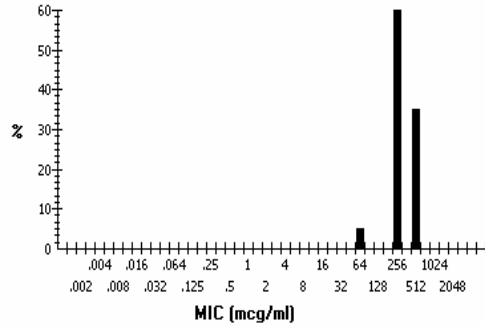
สารทดสอบ	เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
		ผลการทดสอบ	ค่าอ้างอิง*
Chloramphenicol	<i>E. coli</i>	2	2-8
	<i>S. aureus</i>	2	2-8
	<i>V. parahaemolyticus</i>	1	-
สารสกัดขมิ้นชัน	<i>E. coli</i>	256	-
	<i>S. aureus</i>	256	-
	<i>V. parahaemolyticus</i>	256	-

* Acceptable quality control limits of MICs ตามมาตรฐาน NCCLS (23)

ตารางที่ 3. ค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยและเวียดนาม

No.	Isolation	Region	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
1	<i>V. alginolyticus</i>	กระบี่	256
2	<i>V. alginolyticus</i>	ระยอง	256
3	<i>V. cholerae</i>	นครศรีธรรมราช	256
4	<i>V. damsela</i>	ระยอง	256
5	<i>V. damsela</i>	Nha Trang	256
6	<i>V. fluvialis</i>	กระบี่	512
7	<i>V. fluvialis</i>	จันทบุรี	512
8	<i>V. fluvialis</i>	นครศรีธรรมราช	512
9	<i>V. fluvialis</i>	ประจวบคีรีขันธ์	256
10	<i>V. fluvialis</i>	ประจวบคีรีขันธ์	256
11	<i>V. fluvialis</i>	ปัตตานี	512
12	<i>V. fluvialis</i>	ระยอง	256
13	<i>V. fluvialis</i>	Nha Trang	256
14	<i>V. parahaemolyticus</i>	กระบี่	512
15	<i>V. parahaemolyticus</i>	ชุมพร	64
16	<i>V. parahaemolyticus</i>	นครศรีธรรมราช	512
17	<i>V. parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	256
18	<i>V. parahaemolyticus</i>	ปัตตานี	512
19	<i>V. parahaemolyticus</i>	ระยอง	512
20	<i>V. vulnificus</i>	ระยอง	256

รูปที่ 3 และ ตารางที่ 4. ค่า MIC₅₀ และ MIC₉₀ ของสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อ vibrios ที่แยกจากกุ้งป่วยในเขตการเลี้ยงต่างพื้นที่ของประเทศไทยและเวียดนาม



	MIC (µg/ml)		
	MIC ₅₀ ¹	MIC ₉₀ ²	MIC Range ³
Curcuminoids	256	512	64-512

¹Minimum Inhibitory 50%

²Minimum Inhibitory 90%

³Range of MIC observed in 20 pathogenic vibrio isolates

จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดขมิ้นชันโดยวิธี reversed-phase HPLC ด้วยคอลัมน์ชนิด C18 พบว่า curcumin เคลื่อนที่ได้ช้าที่สุด (ค่า retention time สูงสุด) โดย desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin เคลื่อนที่ได้เร็วขึ้นและเร็วที่สุดตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างของ curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin พบว่าสารแต่ละชนิดมีโครงสร้างต่างกันที่จำนวนหมู่ methoxy (-OCH₃) ในโมเลกุล ซึ่งหมู่ methoxy จัดเป็นหมู่ที่ non-polar ส่งผลให้ curcumin ซึ่งมี methoxy 2 หมู่ มีความชอบไขมัน (lipophilicity) มากกว่าสารอีก 2 ชนิด ทำให้มีความชอบต่อวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) บนคอลัมน์ได้ดีกว่า จึงทำให้สารเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ได้ช้ากว่า ในทำนองเดียวกัน desmethoxycurcumin ซึ่งมี methoxy 1 หมู่ ย่อมเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า bisdesmethoxycurcumin เนื่องจาก lipophilicity สูงกว่า ในขณะที่ bisdesmethoxycurcumin ไม่มีหมู่ methoxy ทำให้เคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด

จาก chromatogram ของสารสกัดขมิ้นชันที่นำมาศึกษาพบว่า สารสกัดขมิ้นชันให้พีคจำนวน 3 พีค ที่มีค่า retention

time สอดคล้องกับพีคบน chromatogram ของสารมาตรฐาน curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างสารสกัดขมิ้นชันที่ใช้เป็นสาร curcuminoids ซึ่งมีปริมาณรวมเท่ากับ 99.42% ประกอบไปด้วย curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin ในปริมาณเท่ากับ 72.29%, 23.50% และ 3.63% ตามลำดับ โดยฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสที่แยกจากกุ้งป่วยในการศึกษาครั้งนี้ จัดว่าเป็นฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันที่มีอัตราส่วนของ curcumin : desmethoxycurcumin : bisdesmethoxycurcumin เท่ากับ 72.29 : 23.50 : 3.63 ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนโดยประมาณเท่ากับ 20 : 6.5 : 1 ตามลำดับ

การควบคุมคุณภาพงานด้วยการทดสอบระดับความไวรับของเชื้อมาตรฐานต่อยาต้านจุลชีพนั้น ผลการทดสอบในตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าค่า MIC ของ chloramphenicol ต่อเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* นั้นอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์มาตรฐานของ NCCLS (23) แต่สำหรับค่า MIC ของ chloramphenicol ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ ค่า MIC ที่ได้จากการทดสอบสารสกัดขมิ้นชันต่อเชื้อมาตรฐานทั้ง

3 ชนิด นั้นยังไม่มีค่ามาตรฐาน ค่า MIC ที่ได้จึงถือเป็นการเก็บข้อมูลสำหรับใช้เป็นประโยชน์ในการอ้างอิงเปรียบเทียบกับ การทดสอบสารสกัดขมิ้นชันในครั้งอื่น ๆ ต่อไป

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดขมิ้นชันในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อไวรัส พบว่าค่า MIC₅₀ ของสารสกัดขมิ้นชัน ต่อเชื้อไวรัส มีค่าเท่ากับ 256 µg/ml หากพิจารณาค่าดังกล่าว ให้อยู่ในหน่วยของ µmol/ml โดยการคำนวณมวลโมเลกุลของ สารสกัดขมิ้นชันด้วยวิธีการหาค่าเฉลี่ยแบบถ่วงน้ำหนัก ซึ่งขึ้นกับ ปริมาณและมวลโมเลกุลของสารสำคัญแต่ละชนิดในสารสกัด โดย curcumin, desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin มีปริมาณและมวลโมเลกุลเท่ากับ 72.29%, 368.39; 23.50%, 338.36; และ 3.63%, 308.34 ตามลำดับ จะ ได้ว่า มวลโมเลกุลเฉลี่ยของสารสกัดที่ใช้ในการศึกษา เท่ากับ 357.01 ดังนั้น ค่า MIC₅₀ ของสารสกัดต่อเชื้อไวรัส ซึ่งมีค่า เท่ากับ 256 µg/ml สามารถคิดได้เป็น 0.72 µmol/ml เมื่อ เปรียบเทียบค่าดังกล่าวกับค่า MICs ที่ได้จากการศึกษาของ Mishra และคณะ (6) ซึ่งรายงานค่า MICs ของสารบริสุทธิ์ curcumin ต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *Enterococcus* ในช่วง 10-20 µmol/ml แสดงให้เห็นว่า ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโดยสาร สกัดขมิ้นชันมีประสิทธิภาพที่สูง ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ที่ไม่ เท่ากันของสารสำคัญแต่ละชนิดในสารสกัดขมิ้นชัน นอกจากนี้ ยังอาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของเชื้อที่ใช้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากไม่พบการรายงานของค่า MIC ต่อเชื้อไวรัสที่แยก จากกึ่งทะเล ทำให้ไม่สามารถนำค่า MIC มาเปรียบเทียบกับผล การศึกษาในครั้งนี้

จากผลการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดขมิ้นชันมี ประสิทธิภาพในการนำมาใช้เป็นสารต้านเชื้อจุลชีพในกุ้ง รวมทั้ง แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้สารสกัดขมิ้นชันสำหรับ เป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อไวรัส ก่อโรคในกุ้ง ผลการศึกษาเบื้องต้นในครั้งนี้ สนับสนุนให้สมควร ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันดังกล่าวต่อเชื้อไวรัสก่อโรคใน กุ้งต่อไปให้ได้รวมไม่น้อยกว่า 50 isolates เพื่อให้ได้ค่า MIC ที่ มีความครอบคลุมมากขึ้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการคำนวณ ขนาดของสารสกัดที่เหมาะสมสำหรับเตรียมอาหารกุ้งที่มีสารสกัด ขมิ้นชันเป็นส่วนประกอบ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัย แห่งชาติ (วช.), สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทุน วิจัยเลขที่ DBG 4880004 และ ทุนโครงการวิจัย คณะเภสัช ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กอง ประมงระหว่างประเทศ กรมประมง. *ปริมาณและมูลค่าการ ส่งออกสินค้าประมงประเภทต่างๆ*. 2548. [Online] เข้าถึง โดย: <http://www.fisheries.go.th>
2. S. Gräslund, K. Karisson, and J. Wongtatchai. Responsible use of antibiotics in shrimp farming. *Aquaculture Asia Magazine* 7:3 (2002).
3. เชนนุช ว่องธวัชชัย. *ผลของยาและสารเคมีต่อสุขภาพกุ้ง*. รายงานการวิจัย การรวบรวมวิเคราะห์และสังเคราะห์ งานวิจัยกึ่งทะเลของประเทศไทย, สำนักงานคณะกรรมการ วิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพมหานคร, 2547, หน้า 249-275.
4. องค์การเภสัชกรรม. *ขมิ้นชัน*. 2548. [Online]. เข้าถึงโดย : [http:// www.gpo.or.th](http://www.gpo.or.th)
5. G. K. Jayaprakasha, L. J. M. Rao, and K. K. Sakariah. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3668-3672 (2002).
6. S. Mishra, U. Narain, R. Mishra, and K. Misra. Design, development and synthesis of mixed bioconjugates of piperic acid-glycine, curcumin-glycine/alanine and curcumin-glycine-piperic acid and their antibacterial and antifungal properties. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 1477-1486 (2005).
7. L. N. Grinberg, O. Shalev, H. H. Tønnesen, and E. A. Rachmilewitz. Studies on curcumin and curcuminoids: XXVI. Antioxidant effects of curcumin on the red blood cell membrane. *Int. J. Pharm.* 132: 251-257 (1996).
8. F. Bonte, M. S. Noel-Hudson, J. Wepierre, and A. Meybeck. Protective effect of curcuminoids on epidermal skin cells under free oxygen

- radical stress. *Planta Med.* **63**: 265-266 (1997).
9. K. C. Das and C. K. Das. Curcumin (diferuloyl-methane), a singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) quencher. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**: 62-66 (2002).
 10. H. P. Ammon and M. A. Wahl. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med.* **57**: 1-7 (1991).
 11. I. Brouet and H. Oshima. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**: 533-540 (1995).
 12. B. Joe and B. R. Lokesh. Prophylactic and therapeutic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids, capsaicin, and curcumin on adjuvant induced arthritis in rats. *J. Nutr. Biochem.* **8**: 397-407 (1997).
 13. V. Rajakrishnan, A. Jayadeep, O. S. Arun, P. R. Sudhakaran, and V. P. Menon. Changes in the prostaglandin levels in alcohol toxicity: Effect of curcumin and N-acetylcysteine. *J. Nutr. Biochem.* **11**: 509-514 (2000).
 14. M. C. Heng, M. K. Song, J. Harker, and M. K. Heng. Drug-induced suppression of phosphor-ylase kinase activity correlates with resolution of psoriasis as assessed by clinical, histological and immunohistochemical parameters. *Br. J. Dermatol.* **143**: 937-949 (2000).
 15. K. Polasa, A. N. Naidu, I. Ravindranath, and K. Krishnaswamy. Inhibition of B(α)P induced strand breaks in presence of curcumin. *Mutat. Res.* **557**: 203-213 (2004).
 16. P. Limtrakul, S. Lipigorngoson, O. Namwong, A. Apisariyakul, and F. W. Dunn. Inhibitory effect of dietary curcumin on skin carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* **116**: 197-203 (1997).
 17. H. Inano, M. Onoda, N. Inafuku, Y. Kubota, T. Osawa, H. Kobayashi, and K. Wakabayashi. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis* **21**: 1835-1841 (2000).
 18. A. Khafif, S. P. Schantz, T. C. Chou, D. Elderstein, and P. G. Sacks. Quantitation of chemopreventive synergism between (-)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. *Carcinogenesis* **19**: 419-424. (1998).
 19. S. Perkins, R. D. Verschoyle, K. Hill, I. Parveen, M. D. Threadgill, R. A. Sharma, M. L. Williams, W. P. Steward, and A. J. Gescher. Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the Min/+ Mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* **11**: 535-540 (2002).
 20. E. K. Song, H. Cho, J. S. Kim, N. Y. Kim, N. H. An, J. A. Kim, S. H. Lee, and Y. C. Kim. Diarylheptanoids with free radical scavenging and hepatoprotective activity *in vitro* from *Curcuma longa*. *Planta Med.* **67**: 876-877 (2001).
 21. R. A. Sharma, H. R. McLelland, K. A. Hill, C. R. Ireson, S. A. Euden, and M. M. Manson. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**: 1984-1900 (2001).
 22. พรชัย โรจน์สิทธิศักดิ์ สุนิพนธ์ ภูมิมางกูร สุวรรณมา เหลืองชลธาร สุทธาทิพย์ จันทรสกุล ชำนาญ ภัทรพานิช มิตร ปทีปวนิช และ ดาราวัลย์ ชาญญะวุฒิ. รายงานการวิจัย การวิเคราะห์คุณลักษณะวัตถุบสสารสกัดและยา เม็ดสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์. สำนักงานคณะกรรมการวิจัย แห่งชาติ, กรุงเทพมหานคร, 2548, หน้า 12-14.
 23. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, Approved Standard-Fifth Edition, 2000, 20 (2): 26.
 24. World Health Organizationl (WHO), Department of Communicable Disease Surveillance and Response, 2000. WHONET 5 Laboratory Database Software, Geneva.
 25. B. A. Forbes, D. F. Sahm, and A. S. Weissfeld. *Vibrio aeromonas, Plesiomonas shigelloides, and Chromobacterium violaceum*. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 10th ed., Mosby, St. Louis, 1998, pp. 488-500.

26. G. I. Barrow and R. K. A. Feltham (eds.), *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd ed., Cambridge University Press, 1993, pp. 754-759.
27. L. K. Wachsmuth, G. K. Morris, and J. C. Feeley. *Vibrio*. In E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler Jr., and J. P. Truant (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd ed., American Society for Microbiology, Washington D.C., 1980, pp. 226-234.
28. E. L. Elliot, A. Kaysner, and M. L. Tamplin. *FDA Bacteriological Analytical Manual*, 7th ed., 1992, pp. 111-120.