ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF THE NOVEL SILVER NANOPARTICLES BIOSYNTHESIS FROM *Cordyceps militaris* FRUITING BODY EXTRACT



ธนาวัฒน์ อินตา

ปรียาภรณ์ ใจนันตะ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF THE NOVEL SILVER NANOPARTICLES BIOSYNTHESIS FROM *Cordyceps militaris* FRUITING BODY EXTRACT

THANAWAT INTA
PREEYAPORN JAINANTA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง Antibacterial activities of the novel silver nanoparticles biosynthesis from *Cordyceps militaris* fruiting body extract
ชื่อนักศึกษา	นายธนาวัฒน์ อินตา รหัสนักศึกษา 57050698 นางสาวปรียาภรณ์ ใจนันตะ รหัสนักศึกษา 57050724
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ ประธานกรรมการ	
ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการ	
รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

ชื่อนักศึกษา นายธนาวัฒน์ อินตา รหัสนักศึกษา 57050698
นางสาวปรียาภรณ์ ใจนันตะ รหัสนักศึกษา 57050724

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์อารี ฤทธิบูรณ์

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากนั้นนำมาสกัดสารคอร์ไดเซปินและวิเคราะห์สารคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง ผลที่ได้จากการทดลองพบว่ามีปริมาณคอร์ไดเซปินเท่ากับ 4.11 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้งของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนของเงินและนำมาวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงิน พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 74.31 และ 14.21 นาโนเมตร ตามลำดับ สำหรับผลการดูดกลืนสเปคตรัมซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 418 และ 419 นาโนเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำไปศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนังทั้ง 3 ชนิด พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดี และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *(P. aeruginosa)* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *S. epidermidis*) โดยบริเวณที่มีการยับยั้งมีค่าเท่ากับ 17.37 15.27 และ 14.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่อนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์ และสารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ จากนั้นนำอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *S. epidermidis*) คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *(P. aeruginosa)* คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สุดท้ายนำอนุภาคนาโนของเงินที่ได้ มาใช้ในการทำสบู่เพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย

คำสำคัญ : เห็ดถั่งเช่าสีทอง สารคอร์ไดเซปิน อนุภาคนาโนของเงิน แบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย สบู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Antibacterial activities of the novel silver nanoparticles biosynthesis from *Cordyceps militaris* fruiting body extract
Students	Mr.Thanawat Inta Student ID 57050698
	Miss Preeyaporn Jainanta Student ID 57050724
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Assoc. Prof. Aree Rittiboon

Abstract

In this study, Fruiting body of *C. militaris* was cultivated. The cordycepin was extracted, then it was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). The result of experiment, it was found that the cordycepin 4.11 mg/1 g dry weight of *C. militaris*. Then, the extract was synthesize as silver nanoparticles and the specific characteristics were analyzed, found that the silver nanoparticles 1 and 10 mM were prepared from of silver nitrate solution have diameters about 74.31 and 14.21 nm, respectively. The absorption spectrums were analyzed using spectrophotometer found that absorption maximum at 418 and 419 nm, respectively. And to study the antibacterial activity effect three type of Pathogenic bacteria on the skin. Found that the silver nanoparticles 10 mM were prepared from of silver nitrate solution was inhibited the growth of bacteria as well. Moreover, it could inhibit Gram-negative bacteria *(P. aeruginosa)* more than Gram-positive bacteria (*S. aureus and S. epidermidis*). The inhibition zone test of silver nanoparticles exhibited excellent activity against was determined as 17.37, 15.27 and 14.53 mm, respectively. Statistically significant. At the same time, the silver nanoparticles 1 mM were prepared from of silver nitrate solution and fruiting body of *C. militaris* extract couldn't inhibit the growth of bacteria. Then the silver nanoparticles 10 mM were prepared from of silver nitrate solution to study the minimal inhibitory concentration found that the minimum concentration could inhibit Gram-positive bacteria (*S. aureus and S. epidermidis*) is 1000 µg/ml. and Gram-negative bacteria *(P. aeruginosa)* is 500 µg/ml. Finally, the silver nanoparticles were used to make soap for inhibit the growth of bacteria.

Keywords : *Cordyceps militaris,* cordycepin, silver nanoparticles, Pathogenic bacteria on the skin, Antibacterial activity, Soap

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเล่มนี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และข้อคิดเห็นต่างๆ ในทุกๆด้าน ตลอดจนแนวทางการแก้ปัญหาต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างมากในการทำงานโครงงานพิเศษเล่มนี้ ทางคณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ และ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการ และกรรมการ อีกทั้งยังคอยให้คำแนะนำ ปรับปรุง แก้ไขในการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณ นางสาวศันสุนีย์ ภู่ประกิจ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำในเรื่องของการใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง

ขอขอบพระคุณ นายตันติกร เติมแก้ว และนางสาวจิราภรณ์ พิมพ์ทอง ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำเรื่องของเครื่องมือในการใช้งานต่างๆ และข้อมูลต่างๆ ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณนักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา นักศึกษาปริญญาโท และเพื่อนๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงราที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ จนโครงงานพิเศษสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณพ่อ แม่ ผู้ปกครอง ที่สนับสนุน คอยรับฟังปัญหา และให้กำลังใจคณะผู้จัดทำเสมอมาจนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ธนาวัฒน์ อินตา
ปรียาภรณ์ ใจนันตะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ฌ
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4
2.1 ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*).....4
2.1.1 อนุกรมวิธานของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....4
2.1.2 สรรพคุณของเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....4
2.2 สารคอร์ไดเซปิน (cordycepin).....5
2.3 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า.....5
2.3.1 การเพาะด้วยตัวหนอน.....5
2.3.2 การเพาะด้วยอาหาร.....6
2.3.3 แหล่งอาหาร.....6
2.3.3.1 แหล่งคาร์บอน.....6
2.3.3.2 แหล่งไนโตรเจน.....6
2.3.3.3 แหล่งเกลือแร่.....6
2.3.4 อุณหภูมิ.....6
2.3.5 ค่าพีเอช.....7
2.3.6 อายุของหัวเชื้อ.....7
2.3.7 อากาศและความชื้น.....7
2.3.8 แสง.....7
2.3.9 แสงไฟแอลอีดี.....7
2.4 อนุภาคนาโนของเงิน (Silver Nanoparticles).....8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน.....9
2.5.1 วิธีการทางเคมี (chemical approach) 9
2.5.2 วิธีการทางกายภาพ (physical approach).....9
2.5.3 วิธีการทางชีวภาพ (biological approach) 10
2.6 กลไกการทำงานของอนุภาคนาโนของเงิน.....10
2.7 แบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง.....12
2.7.1 *Staphylococcus aureus*.....13
2.7.3 *Pseudomonas aeruginosa*.....14
2.7.2 *Staphylococcus epidermidis*.....15
2.8 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antibacterial activity).....16
2.8.1 Dilution Method.....16
2.8.2 Diffusion Method.....16
2.9 สบู่.....16
2.9.1 ประเภทของผลิตภัณฑ์สบู่.....18
2.9.2 ส่วนประกอบที่สำคัญของผลิตภัณฑ์สบู่.....18
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....21
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....21
3.1.1 วัตถุดิบ.....21
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์.....21
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....21
3.1.4 อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....21
3.1.5 สารเคมี.....22
3.2 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....23
3.2.1 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยหนอนในขวดแก้ว.....23
3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA เสริม.....23
3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม.....23
3.2.4 การถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว PDB เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอน.....23
3.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง....23
3.3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ....23
3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง....24
3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง....24
3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ....24
3.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน....24
3.6 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry....24
3.7 การวิเคราะห์ลักษณะ ขนาด และธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)....24
3.8 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย....25
3.8.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย....25
3.8.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion....25
3.8.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย....25
3.8.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้....26
3.9 การนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่....26
3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ....26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล....27
4.1 ผลของการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง....27
4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง....28
4.3 ผลการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินและการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry....28
4.4 ผลการวิเคราะห์ลักษณะ ขนาด และธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)....30
4.5 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion....34
4.6 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย....36
4.7 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้....36
4.8 ผลการนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่....36
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ....39
5.1 สรุปผลการวิจัย....39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.2 ข้อเสนอแนะ.....39
เอกสารอ้างอิง.....41
ภาคผนวก.....45
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร.....45
ภาคผนวก ข ขั้นตอนและรูปภาพการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง.....48
ภาคผนวก ค ขั้นตอนและรูปภาพการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน.....52
ภาคผนวก ง ขั้นตอนและรูปภาพการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.....53
ภาคผนวก จ ขั้นตอนและรูปภาพการทำสบู่.....56
ภาคผนวก ฉ การวิเคราะห์และการคำนวณ.....58
ภาคผนวก ช การวิเคราะห์ทางสถิติ.....64
ภาคผนวก ซ ผลการทดลอง.....67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 ปริมาณธาตุๆ ของอนุภาคนาโนของเงิน ที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์.....34
4.2 ผลของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่ยับยั้ง (มิลลิเมตร) ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค บนผิวหนังต่างๆ.....35
4.3 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....38
4.4 ผลการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้.....38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*).....4
2.2 โครงสร้างสารคอร์ไดเซปิน.....5
2.3 อนุภาคนาโนของเงิน (Silver Nanoparticles).....8
2.4 แสดงกลไกการทำงานของอนุภาคนาโนของเงินต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย.....11
2.5 ลักษณะโครงสร้างของผลึกของอนุภาคนาโนซิลเวอร์.....11
2.6 จุลินทรีย์บนผิวหนัง.....13
2.7 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*.....14
2.8 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis*.....14
2.9 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*.....15
2.10 การเกิดปฏิกิริยาซาพอนนิฟิเคชัน (saponification).....17
2.11 สบู่.....17
4.1 ลักษณะเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA เสริม ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 14 วัน.....27
4.2 ลักษณะเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญในอาหารเหลว PDB เสริมในที่มืด ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....27
4.3 ลักษณะของเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเหลว PDB เสริม ในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 45 วัน.....28
4.4 การเปลี่ยนสีของสารละลายก่อนและหลังการเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์.....29
4.5 การดูดกลืนสเปคตรัมของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ (ข) การดูดกลืนสเปคตรัมของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์.....30
4.6 ลักษณะและขนาดของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) ที่กำลังขยาย 40000 เท่า (ข) ที่กำลังขยาย 5000 เท่า.....31
4.7 ลักษณะและขนาดของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) ที่กำลังขยาย 20000 เท่า (ข) ที่กำลังขยาย 5000 เท่า.....32
4.8 ธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....33
4.9 ผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion ของเชื้อแบคทีเรีย.....35
4.10 ลักษณะภายนอกของสบู่.....36
4.11 ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ผิวหนังของมนุษย์เป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศ จุลินทรีย์ก่อโรคและไม่ก่อโรค รวมทั้งเชื้อราและยีสต์ ซึ่งปกติแล้วจุลินทรีย์เหล่านี้จะไม่ก่ออันตรายต่อผิวหนังเนื่องจากผิวหนังจะมีกลไกการป้องกันตัวเองอยู่แล้ว ยกเว้นหากผิวหนังนั้นเกิดการผิดปกติหรือได้รับบาดเจ็บจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้แทรกซึมตามผิวหนังที่บาดเจ็บเข้าไปในร่างกายทำให้สามารถก่อโรคได้ และโดยทั่วไปแล้วเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Streptococcus epidermidis* และ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแทรกซึมแล้วจะก่อให้เกิดการติดเชื้อของผิวหนัง (Walker และคณะ 2004; Bowersox และ John, 1999) ซึ่งจะเห็นได้ว่ายาที่ใช้รักษาการติดเชื้อของผิวหนังมีหลายขนาน อีกทั้งยังมีผลข้างเคียงและราคาค่อนข้างแพง เนื่องจากราคาและช่วงระยะเวลาในการรักษาที่นานทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง และหากมีการรับประทานยาปฏิชีวนะในช่วงอายุที่เร็วเกินไปหรือมีการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มเดิมๆ อย่างต่อเนื่องโดยไม่จำเป็น อาจส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อต่อยาและเป็นภาวะเสี่ยงต่อการรักษาโรคร้ายแรงอื่นๆได้ในอนาคต ด้วยเหตุนี้เองจึงเป็นการพัฒนาเพื่อหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อของผิวหนัง

โดยอนุภาคนาโนของเงินได้มีการนำมาใช้ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง สิ่งทอและทางการแพทย์ ซึ่งได้รับความสนใจและได้พัฒนาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินผ่านสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกัน เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ สาหร่ายหรือพืช เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ พบว่ากระบวนการทางชีวภาพมีข้อดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระหว่างการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินองค์ประกอบในสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตจะทำหน้าที่เป็นสาร reducing และรักษาเสถียรภาพ นอกจากนี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการสกัดทำให้อนุภาคนาโน (NPS) มีคุณสมบัติเฉพาะและสามารถปรับปรุงลักษณะได้ ดังนั้นการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินจึงเป็นแนวคิดสำหรับการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Wang และคณะ, 2016)

เชื้อราเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายและสามารถนำไปใช้ได้ทุกสภาพแวดล้อม โดยการใช้เชื้อรามีความน่าสนใจ เนื่องจากเชื้อรามีปริมาณเอนไซม์และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสาร reducing และสาร capping agents ระหว่างการสังเคราะห์อนุภาคนาโน แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีเชื้อราเพียงไม่กี่สายพันธุ์ เช่น *Aspergillus clavatus, Penicillium citrinum, Pleurotus ostreatus* และ *Schizophyllum commune* ที่มีการนำมาใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน (Wang และคณะ, 2016) โดยเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*) เป็นเชื้อราแมลง (Entomopathogenicfungi) ในกลุ่ม Ascomycetes ซึ่งมีฤทธิ์ทางยาและประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด เช่น โมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ โพลีแซคคาไรด์ คอร์ไดเซปิน กรดคอร์ไดเซปิก อะดีโนซีน กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด มีงานวิจัยหลายฉบับยืนยันว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับเห็ดถั่งเช่าทิเบต ซึ่งเส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองนั้นยังสามารถผลิตคอร์ไดเซปิน ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่มีพื้นฐานมาจากกรดนิวคลีอิกถือว่าเป็นเมแทบอไลต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีสรรพคุณทางยาช่วยต้านการเกิดเนื้องอก ยับยั้งการแพร่กระจายของมะเร็ง ป้องกันไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการสร้างพังผืดที่ตับ ป้องกันการเสื่อมของปอดและมีฤทธิ์ทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (Nurmila และคณะ, 2016) จึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับการต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้สารสกัดจากดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองในการสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนของเงิน

ด้วยเหตุนี้เองจึงได้สนใจที่จะนำดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองซึ่งมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ โดยเฉพาะคอร์ไดเซปินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาการนำอนุภาคนาโนของเงินจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบนผิวหนัง จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในการนำสมุนไพรจีนแบบดั้งเดิมเข้ามาใช้ในการดูแลรักษาการติดเชื้อของผิวหนัง โดยการนำไปทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคบนผิวหนัง ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคบนผิวหนัง ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบของอนุภาคนาโนของเงินจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Agar disc diffusion การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration ,MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) คาดว่าผลที่ได้จากศึกษาเบื้องต้นนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปสู่งานวิจัยและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการดูแลการติดเชื้อที่ผิวหนังต่อไป เช่น การนำไปทำสบู่หรือครีมบำรุงผิว เป็นต้น อีกทั้งยังลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อ ช่วยเพิ่มมูลค่าและสนับสนุนการใช้สารสกัดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.2.2 เพื่อศึกษาวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.2.3 เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ได้แก่ รูปร่าง ขนาด และธาตุต่างๆ

1.2.4 เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบนผิวหนังของอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ด้วยวิธี Agar disc diffusion

1.2.5 เพื่อศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบนผิวหนัง (Minimal inhibitory concentration, MIC) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบนผิวหนังได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC)

1.2.6 เพื่อศึกษาการนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่เพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยหนอนไหมในขวดแก้วจนเกิดเป็นดอกเห็ด จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 14 วัน แล้วนำมาค็อกลงในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PDB 3 วัน และสุดท้ายทำการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว PDB เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.2 ทำการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.3.3 นำสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ได้มาสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนของเงิน โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ และนำไปวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงิน

1.3.4 ทำการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินด้วยวิธี Agar disc diffusion หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) จากนั้นนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพมาทำสบู่

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพื่อให้ทราบถึงวิธีการเพาะเลี้ยงและกระบวนการสกัดสารคอร์ไดเซปินของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.4.2 เพื่อให้ทราบถึงวิธีการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินจากสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.4.3 สามารถนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่า

1.4.4 เพื่อให้ทราบความเข้มข้นต่ำสุดที่อนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพสามารถยับยั้งได้

1.4.5 เพื่อให้ได้อนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางชีวภาพที่มีความเสถียรและมีคุณสมบัติเฉพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ถั่งเช่าสีทอง (*Codyceps militaris*)

เห็ดถั่งเช่าสีทอง ดังแสดงในรูปที่ 2.1 เป็นเชื้อราแมลง (Entomopathogenic fungi) ในกลุ่ม Ascomycetes มีฤทธิ์ทางยาประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด เช่น โมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ โพลิแซคคาไรด์ (บีต้า-กลูแคน) คอร์ไดเซปิน กรดคอร์ไดเซปิก อะดีโนซีน กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด มีการเพาะเพื่อการค้ามาหลายสิบปีที่ประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี มาเลเซีย และอเมริกา มีการรายงานหลายฉบับยืนยันว่าเห็ดถั่งเช่าสีทองมีคุณสมบัติเทียบเท่าเห็ดถั่งเช่าทิเบต (วิโรจน์, 2556)



รูปที่ 2.1 ถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris*)
ที่มา : http://www.cordysine.com (13 มีนาคม 2561)

2.1.1 อนุกรมวิธานของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

อนุกรมวิธาน (Linnaeus และ Fries, 1818)

อาณาจักร Fungi
ไฟลัม Ascomycota
ชั้น Sordariomycetes
อันดับ Hypocreales
วงศ์ Cordycipitaceae
สกุล Cordyceps
ชนิด militaris
ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cordyceps militaris*

2.1.2 สรรพคุณของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

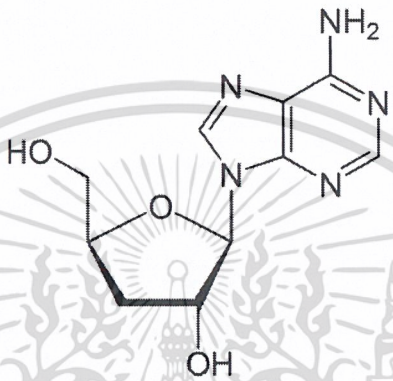
มีสรรพคุณทางยาช่วยบำรุงร่างกายให้แข็งแรง มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน ต้านการเกิดเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง เพิ่มการไหลเวียนเลือด ช่วยลดความดันโลหิตสูง ลดอาการอ่อนเพลีย หอบหืด บำรุงระบบประสาท เพิ่มความแข็งแรงของร่างกายให้ต้านทานต่อแบคทีเรีย และไวรัส ช่วยให้อสุจิแข็งแรง เหมาะสำหรับบำรุงกำลังหลังการฟื้นไข้ ลดไขมันในเส้นเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการใช้

บำรุงตับและไต จึงทำให้เป็นที่ต้องการอย่างมากของตลาดและถูกใช้ในรูปของยาหรืออาหารเสริมสุขภาพ (จารุวรรณ และคณะ, 2558)

2.2 สารคอร์ไดเซปิน (cordycepin)

สารคอร์ไดเซปิน หรือ 3´-ดีออกซีอะดีโนซีน เป็นอนุพันธ์ของนิวคลีโอไซด์ อะดีโนซีนที่แตกต่างกันคือไม่มีหมู่ของไฮดรอกซีในตำแหน่งที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีคือ $C_{10}H_{13}N_3O_3$ มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ 225.5 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.2 โครงสร้างสารคอร์ไดเซปิน
ที่มา : https://en.wikipedia.org/wiki/Cordycepin (13 มีนาคม 2561)

2.2.1 สรรพคุณของคอร์ไดเซปิน

สารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าทำให้การลดคลอเลสเตอรอลและไขมันไตรกลีเซอไรด์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยการลดปริมาณของคลอเลสเตอรอลชนิดไม่ดี (Low-density lipoprotein; LDL) และเพิ่มปริมาณคลอเลสเตอรอลชนิดดี (High-densitycholesterol; HDL) พร้อมทั้งช่วยขยายหลอดเลือด ลดความหนืดของเลือด (Plasma viscosity) และป้องกันการเกิดลิ่มเลือดในหลอดเลือดแดง (Prevention of anti-thrombosis) ส่งผลให้การไหลเวียนของโลหิตดีขึ้น เลือดจึงส่งไปเลี้ยงหัวใจและสมองได้อย่างมีประสิทธิภาพถือเป็นการป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจและสมองได้เป็นอย่างดี อีกทั้งยังมีฤทธิ์บำรุงและฟื้นฟูระบบการทำงานของไตและปอด ช่วยฟื้นฟูสมรรถนะของไต ช่วยบรรเทาอาการไตอักเสบและนิ่วในไต

2.3 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่า

2.3.1 การเพาะด้วยตัวหนอน

เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงที่เลียนแบบธรรมชาติ โดยนำเชื้อใส่ลงไปในตัวหนอนสกุล *Bombyx* เมื่อหนอนได้รับเชื้อแล้วเส้นใยของเห็ดก็จะงอกออกมาจากตัวหนอน ซึ่งหนอนที่ใช้เพาะเลี้ยงอาจเก็บมาจากธรรมชาติ โดยการเก็บรังไหมมาแล้วนำดักแด้ตัวหนอนออกมาใช้หรืออาจทำการเก็บไข่ผีเสื้อมาทำการเพาะจนได้ตัวหนอน การเพาะด้วยตัวหนอนทำได้ทั้งในสภาพปลอดเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงในขวดแก้ว หรืออาจเพาะในโรงเรือนที่สะอาดและสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมภายในได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การเพาะด้วยอาหาร

เห็ดถั่งเช่าแต่ละชนิดต้องการอาหารที่ไม่เหมือนกัน ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อเห็ดชนิดนั้นๆ อาหารที่ใช้เพาะเชื้อเห็ดนั้นอาจเป็นอาหารวิทยาศาสตร์ที่ได้มาจากการผสมสารเคมีหลายๆชนิด หรืออาจเป็นวัตถุดิบตามธรรมชาติก็ได้

2.3.3 แหล่งอาหาร

อาหารในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองมีสูตรอาหารมากมาย โดยหลักๆ แล้วจะประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ได้แก่ เมล็ดธัญพืช น้ำตาล และแป้ง แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ หนอนไหม ไข่ ดักแด้ ยีสต์สกัด เปปโตน บัฟเฟอร์ กรดซิตริก และวิตามินบี 1 เป็นต้น (ธัญญา, 2555)

2.3.3.1 แหล่งคาร์บอน

เป็นแหล่งอาหารที่ให้พลังงานแก่เซลล์ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดลองเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส ฟรุกโตส กาแล็กโทส มอลโทส ซูโครส เด็กซ์โทรส แป้ง และเซลล์ลูโลส พบว่าใช้เด็กซ์โทรสในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวทำให้เส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองมีปริมาณคอร์ไดเซปินมากที่สุด รองลงมาคือ แป้ง ซูโครส และมอลโทส ตามลำดับ นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าการใช้เด็กซ์โทสร้อยละ 4 ในอาหารเหลวจะให้ปริมาณคอร์ไดเซปินสูงสุด (Tuli และคณะ, 2014) ในการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งพบว่าการใช้กลูโคสจะให้คุณภาพดอกเห็ดที่ดีที่สุด รวมถึงน้ำหนักแห้ง ปริมาณอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินรองลงมา คือ ซูโครสและมอลโทส (Wen และคณะ, 2014)

2.3.3.2 แหล่งไนโตรเจน

เป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่จำเป็นในการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดลองเปรียบเทียบระหว่างแหล่งไนโตเจนอนินทรีย์กับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ พบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ให้ปริมาณคอร์ไดเซปินสูง ได้แก่ ยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ในอาหารเหลวเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้สารคอร์ไดเซปินมากที่สุด (Tuli และคณะ, 2014) ในการเพาะเลี้ยงดอกเห็ดได้มีการทำงานวิจัยพบว่า การใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงแบบอาหารแข็งจะให้ปริมาณน้ำหนักแห้ง สารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินที่สูง แต่การใช้น้ำมันถั่งเหลืองจะทำให้ได้ปริมาณคอร์ไดเซปินในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองมากที่สุด (Wen และคณะ, 2014) การใช้ยีสต์สกัดและเปปโตนรวมกันในการเพาะเลี้ยงช่วยในการสังเคราะห์กัวนีน อะดีโนซีน และคอร์ไดเซปิน โดยใช้อัตราส่วนทั้งเปปโตนและยีสต์สกัดร้อยละ 0.3 การใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันส่งผลต่อการสังเคราะห์นิวคลีโอไซด์และสารเมแทบอไลท์อื่นๆ (Gu และคณะ , 2007)

2.3.3.3 แหล่งเกลือแร่

เกลือแร่ช่วยในการเจริญและพัฒนาของเชื้อราชนิดต่างๆ ดังนั้นแล้วเกลือแร่จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องใส่ในอาหารเพาะเลี้ยง จากงานวิจัยการหาเกลือแร่ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตสารของเห็ดถั่งเช่าสีทองพบว่า โพแทสเซียมซัลเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตช่วยให้มีดอกเห็ดและสารคอร์ไดเซปินในปริมาณที่สูง (Wen และคณะ, 2014)

2.3.4 อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งนี้ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้

เป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ เนื่องจากเอนไซม์ของเชื้อแต่ละชนิดจะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่จำเพาะต่อการเจริญของเชื้อนั้นๆ จากการทดลอง

เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่าที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการเจริญของเห็ดถั่งเช่าสีทอง (Zhi-Li Yi และคณะ, 2014) และจากการทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่ดีที่สุดคืออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Byung-Joo Lee และคณะ, 2013)

2.3.5 ค่าพีเอช

พีเอชเป็นสิ่งสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์โดยเฉพาะกับเชื้อราในกลุ่มแอสโคไมซีสและเบซิโดโอไมซีส โดยทั่วไปแล้วพีเอชที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าจะอยู่ในช่วง 4 ถึง 7 พีเอชที่ต่างกันจะส่งผลต่อการเผาผลาญสารอาหารและการเจริญของเส้นใย ดังนั้นเมื่อทดลองเพาะเลี้ยงในช่วงพีเอช 4 ถึง 7 แล้วพบว่าพีเอชที่ให้ปริมาณคอร์ไดเซปินมากที่สุด คือพีเอชที่ 5.5

2.3.6 อายุของหัวเชื้อ

อายุของหัวเชื้อเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการผลิตคอร์ไดเซปินและสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ จากการทดลองการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อเหลวชั่วโมงที่ 24 ถึง 144 พบว่าหัวเชื้อที่ชั่วโมงที่ 72 จะให้ปริมาณคอร์ไดเซปินมากที่สุด (Tuli และคณะ, 2014)

2.3.7 อากาศและความชื้น

อากาศเป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้อากาศ มีงานวิจัยที่ยืนยันว่าออกซิเจนเป็นสิ่งที่สำคัญในการเจริญของเส้นใยและทำให้การผลิตสารทางชีวภาพของเชื้อรามีปริมาณสูง (Shih และคณะ, 2007) ความชื้นร้อยละ 70-80 เป็นความชื้นตามธรรมชาติที่เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีหากไม่ควบคุมความชื้นภายในขวดเพาะเลี้ยงที่เป็นอาหารแข็งทำให้อาหารแห้งอย่างรวดเร็วส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ

2.3.8 แสง

ในที่มืด เส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองจะมีสีขาว แสงจะไปกระตุ้นให้มีการสร้างเม็ดสีและทำให้เกิดการรวมกันของเส้นใยกลายเป็นดอก ช่วยในการปรับปรุงสี เพิ่มปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ คอร์ไดเซปิน แคโรทีนอยด์ และพอลิแซกคาไรด์ โดยแคโรทีนอยด์จะทำให้ดอกเห็ดมีสีทองเข้ม ซึ่งเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงคุณภาพทางการค้า นอกจากนี้แสงยังเป็นปัจจัยสำคัญที่จะกำหนดความหนาแน่น เนื้อสัมผัส และสีของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง แสงสีแดงส่งผลให้เกิดการเจริญของเส้นใยและเพิ่มปริมาณอะดีโนซีน ในขณะที่แสงสีฟ้าช่วยในการสังเคราะห์คอร์ไดเซปินของเส้นใย แสงสีชมพู (1/3 สีฟ้า + 2/3 สีแดง) ช่วยเพิ่มน้ำหนักแห้งและช่วยให้เกิดการสะสมของแคโรทีนอยด์และคอร์ไดเซปิน ขณะที่แสงสีแดงช่วยเพิ่มปริมาณอะดีโนซีนในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง แสดงให้เห็นว่าการให้แสงในการเพาะเลี้ยงนอกจากจะเพิ่มร้อยละผลได้แล้วยังส่งผลต่อคุณภาพของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองอีกด้วย

2.3.9 แสงไฟแอลอีดี

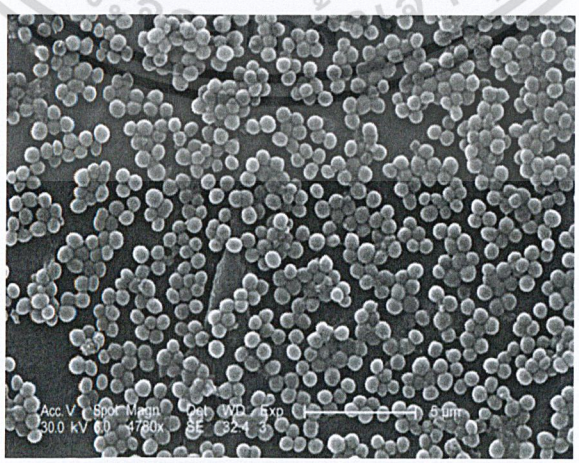
เป็นอุปกรณ์จำพวกไดโอดที่สามารถเปล่งแสงได้ในช่วงสเปกตรัมที่แคบ เปล่งแสงได้ในช่วงอัลตราไวโอเลตและในช่วงแสงที่มองเห็นได้ ไฟแอลอีดีสามารถปล่อยแสงที่ความยาวคลื่นหลายความยาวคลื่นผสมกันหรือแสงช่วงความยาวคลื่นใดคลื่นหนึ่งได้ขึ้นกับการผลิต ทำให้สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือกใช้ความยาวคลื่นที่ต้องการในการเพาะเลี้ยงราหรือพืชได้ หลอดไฟแอลอีดียังช่วยลดการใช้พลังงานลงร้อยละ 70 และปล่อยความร้อนเพียงเล็กน้อยทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการควบคุมอุณหภูมิ อีกทั้งมีอายุการใช้งานถึง 50000 ชั่วโมงขึ้นไป เมื่อเทียบกับหลอดไฟธรรมดาที่มีอายุการใช้งานเพียง 200 ชั่วโมง

2.4 อนุภาคนาโนของเงิน (Silver Nanoparticles)

อนุภาคนาโนของเงิน ดังแสดงในรูปที่ 2.3 มีลักษณะและคุณสมบัติเหมือนกันกับซิลเวอร์ทั่วไป คือเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำแต่สามารถเปลี่ยนรูปเป็นไอออนซิลเวอร์ที่แตกตัวอยู่ในน้ำได้ ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ต่อไป โดยอนุภาคนาโนของเงินซึ่งเป็นของแข็งที่เป็นโลหะมักจะไม่ละลายน้ำ แต่จะอยู่ลักษณะรวมเป็นกลุ่มก้อน หรือในรูปของอนุภาคนาโนของเงินที่ไม่ละลายน้ำเมื่ออนุภาคนาโนของเงินอยู่ในน้ำจะแตกตัวเป็นไอออนของซิลเวอร์และเกิดการออกซิเดชันที่ผิว ซึ่งจะทำให้ได้ไอออนของโลหะที่ถูกออกซิไดซ์ในรูปของ Ag^{+} ที่ล้อมรอบด้วยนาโนซิลเวอร์ที่ยังอยู่ในรูปโลหะหรืออนุภาคนาโนอยู่ในน้ำ อนุภาคนาโนของเงินเมื่ออยู่ในน้ำจึงจะให้ไอออนของซิลเวอร์ด้วย ซึ่งในการพิจารณาทางเคมีของอนุภาคนาโนของเงิน จึงต้องครอบคลุมถึงไอออนของซิลเวอร์ร่วมด้วย ด้วยเหตุที่อนุภาคนาโนของเงินมีขนาดเล็กกว่าซิลเวอร์ทั่วไปมาก จึงทำให้มีลักษณะและคุณสมบัติในส่วนของพื้นผิวที่แตกต่างกันไป เช่น มีแนวโน้มที่จะระเบิดได้ซึ่งมาจากการที่สารอนุภาคนาโนของเงินมักมีอนุภาคที่มีขนาดเล็ก และเล็กกว่าซิลเวอร์ทั่วไปอย่างมาก การสะสมหรือรวมตัวเป็นฝุ่นของสารอนุภาคนาโนของเงินจึงจะทำให้เกิดการระเบิดได้ นอกจากนี้อนุภาคนาโนของเงินสามารถรวมเป็นก้อนกรานูลได้ ซึ่งเกิดขึ้นจากการที่สารอนุภาคนาโนของเงินมีขนาดเล็กมารวมกัน แต่ยังคงมีขนาดในระดับเล็กมาก เช่น สารอนุภาคนาโนของเงินที่รวมกลุ่มมีขนาดเล็ก 15 หรือ 20 นาโนเมตร เป็นต้น ส่งผลให้มีลักษณะสมบัติอื่นๆ เช่น พื้นที่ผิว ชนิดประจุบนพื้นผิว รวมทั้งลักษณะควอนตัมแตกต่างจากซิลเวอร์ทั่วไป ซึ่งส่งผลให้เกิดการนำอนุภาคนาโนของเงินไปเป็นวัสดุสำหรับผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น พลาสติก ผ้า กระดาษ สี และสารเคลือบ ลักษณะและคุณสมบัติเด่นของอนุภาคนาโนของเงินที่นำไปสู่การใช้งานเชิงอุตสาหกรรม ได้แก่ คุณสมบัติการฆ่าเชื้อโรค เป็นต้น (พวงรัตน์ และจิรภัทร์, 2555)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.3 อนุภาคนาโนของเงิน (Silver Nanoparticles)
ที่มา : http://www.siamchemi.com/ซิลเวอร์นาโน/ (13 มีนาคม 2561)

2.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน

การสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนของเงินในปัจจุบัน สามารถสังเคราะห์ได้ 3 วิธีคือ วิธีการทางเคมี (Chemical approach) วิธีการทางกายภาพ (Physical approach) และวิธีการทางชีวภาพ (Biological approach)

2.5.1 วิธีการทางเคมี (chemical approach)

วิธีการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนด้วยวิธีการทางเคมีเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากสามารถสังเคราะห์ได้ในปริมาณมาก ควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่าย ในการสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี ประกอบไปด้วยส่วนประกอบหลัก 3 ส่วนคือ 1) เกลือของซิลเวอร์ (silver salt) ที่นิยมใช้คือซิลเวอร์ไนเตรต 2) ตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เช่น โซเดียมซิเตรท (sodium citrate) แอสคอร์เบต (ascorbate) โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (sodium borohydride) ไฮโดรเจน (elemental hydrogen) โพลิออล (polyol process) และ Tollens reagent เป็นต้น ซึ่งตัวรีดิวซ์มีหน้าที่รีดิวซ์ Ag^{+} ในสารละลายให้กลายเป็น Ag^{0} 3) สารให้ความคงตัว (stabilizer) หรือ capping agent ซึ่งสารให้ความคงตัวจะทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและป้องกันการรวมตัวกันของอนุภาคนาโนของเงิน ตัวอย่างการสังเคราะห์ เช่น การสังเคราะห์โดยเริ่มต้นจากการผสมซิลเวอร์ไนเตรตกับโพลีไวนิล ไพโรไลดอน (polyvinyl pyrrolidone) จากนั้นค่อยๆ หยดโซเดียมซิเตรท ลงไปในสารละลายผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สีสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว แสดงให้เห็นว่าซิลเวอร์ไอออนถูกเปลี่ยนเป็นอนุภาคนาโนของเงิน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาส่วนอนุภาคนาโนของเงิน ไปศึกษาลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงินต่อไป (Zielinska และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังมีหลายงานวิจัยที่ใช้ตัวทำละลายในขั้นตอนของการสังเคราะห์ เช่น เอทานอล ไดเมทิล-ฟอร์มาไมด์เอทิลีนไกลคอล โทลูอีน และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น (Gan และ Li, 2012) ซึ่งจะเห็นว่าการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ใช้สารเคมีค่อนข้างมาก และสารเคมีเหล่านี้ยังมีความเป็นพิษ ส่งผลอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต สิ่งแวดล้อม และส่งผลให้มีต้นทุนในการผลิตสูง อีกทั้งยังพบว่าสารเคมีบางชนิดมีโอกาสปนเปื้อนที่บริเวณพื้นผิวของอนุภาคนาโนของเงิน ทำให้ไม่เหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านชีวการแพทย์ (Shankar และคณะ, 2004)

2.5.2 วิธีการทางกายภาพ (physical approach)

วิธีการทางกายภาพเป็นอีกหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากอนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ได้มีความบริสุทธิ์สูง สามารถควบคุมขนาด รูปร่าง และปริมาณของอนุภาคเงินนาโนได้ง่าย (Mafuné และคณะ, 2002) แต่มีข้อเสีย คือเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง การสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางกายภาพโดยทั่วไปจะใช้วิธีการระเหยและการควบแน่น (evaporation–condensation) โดยใช้เตาเผาแบบหลอดแก้ว (tube furnace) ที่ความดันบรรยากาศ แต่มีข้อเสียของการใช้เตาเผาแบบหลอดแก้ว คือต้องใช้พลังงานสูงและใช้เวลานานเพื่อทำให้ความเกิดความเสถียรทางความร้อน ดังนั้นจึงมีการใช้เซรามิคฮีตเตอร์ขนาดเล็ก (small ceramic heater) เนื่องจากไอที่เกิดจากการระเหยจะควบแน่นกลับมาในอัตราเร็วที่เหมาะสม ทำให้พื้นผิวของฮีตเตอร์สามารถถ่ายเทความร้อนได้ดี นอกจากนี้อุณหภูมิที่พื้นผิวของฮีตเตอร์ยังค่อนข้างคงที่ตลอดเวลาทำให้อนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กและมีความเข้มข้นสูง และอีกหนึ่งวิธีที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคเงินนาโนคือวิธีการยิงด้วยเลเซอร์ (laser ablation) ซึ่งสามารถควบคุมขนาดและรูปร่างได้ง่ายด้วยการควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น ความยาวคลื่นของเลเซอร์ ความเข้มของแสงเลเซอร์ และเวลาในการยิงเลเซอร์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 วิธีการทางชีวภาพ (biological approach)

ปัจจุบันนักวิจัยให้ความสนใจการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินด้วยวิธีทางชีวภาพมากขึ้น เนื่องจากสามารถลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมแล้ว ยังสามารถใช้แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์และสารสกัดจากพืชในการสังเคราะห์ได้อีกด้วย ซึ่งส่วนประกอบหลักในการสังเคราะห์มี 3 ส่วน คือ 1) สารละลายตัวกลางในการสังเคราะห์ 2) ตัวรีดิวซ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และ 3) สารให้ความคงตัวที่ไม่เป็นพิษ ข้อดีของวิธีการสังเคราะห์ทางชีวภาพคือใช้สารเคมีในปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการสังเคราะห์ทางเคมีและทางกายภาพ เนื่องจากสารชีวโมเลกุลที่อยู่ในจุลินทรีย์และสารสกัดจากพืชสามารถเป็นได้ทั้งตัวรีดิวซ์และสารให้ความคงตัว ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ แต่ข้อเสียคือควบคุมขนาด รูปร่าง ความเป็นผลึกได้ยาก และหากเปรียบเทียบการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์กับการใช้สารสกัดจากพืชในแง่ของระยะเวลา เครื่องมือ ความเป็นพิษและการควบคุมขนาดและรูปร่างในการสังเคราะห์พบว่าการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินด้วยสารสกัดจากพืชมีขั้นตอนในการผลิตที่ไม่ยุ่งยาก เมื่อเปรียบเทียบกับการสังเคราะห์จากเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากการสังเคราะห์จากเชื้อจุลินทรีย์นั้นต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อและใช้เครื่องมือที่จำเพาะ อีกทั้งยังต้องมีการควบคุมการเจริญของเชื้อในขั้นตอนการสังเคราะห์เพื่อไม่ให้มีการแพร่ระบาดหากเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดอันตรายกับมนุษย์หรือสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การสังเคราะห์ด้วยสารสกัดจากพืชยังสามารถควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคนาโนของเงินได้ง่ายกว่าการสังเคราะห์จากเชื้อจุลินทรีย์ เพราะการควบคุมขนาดและรูปร่างของอนุภาคเงินนาโนที่ผลิตนั้นสามารถทำได้โดยการปรับเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิหรือความเป็นกรดด่าง ซึ่งการปรับเปลี่ยนปัจจัยดังกล่าวอาจจะส่งผลต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Gan และ Li, 2012)

2.6 กลไกการทำงานของอนุภาคนาโนของเงิน

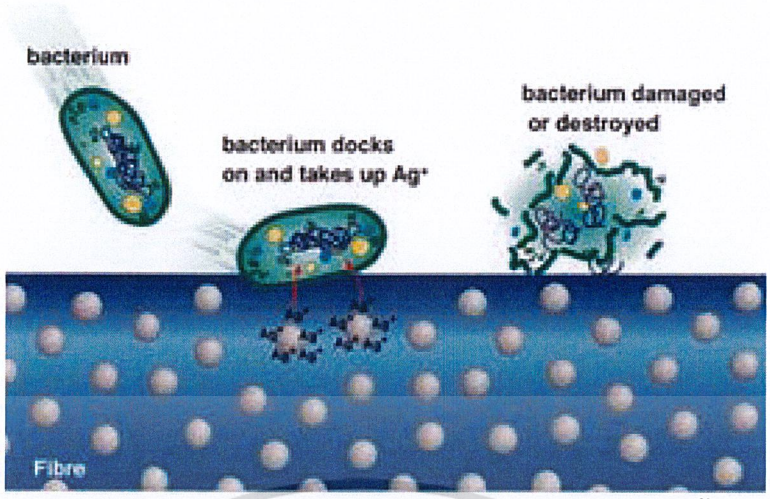
กลไกการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงิน ดังแสดงในรูปที่ 2.4 พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่มีประจุบวก (Ag^{+}) เมื่อสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือเชื้อราจะสามารถแพร่กระจายประจุไปเกาะตามผนังเซลล์และแทรกเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เกิดภาวะการรวมตัวของ DNA (Condensation) ภายในเซลล์ ทำให้ประจุบวกของซิลเวอร์ (Ag^{+}) เข้าไปจับกับเอนไซม์โปรติเนส (Proteinase) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบเมแทบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งจะจับกับหมู่ซัลฟิดริล (-SH) ที่มีอะตอมของซัลเฟอร์ (S) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีประจุเป็นลบ (S^{2-}) และทำให้กระบวนการทำงานของเอนไซม์หยุดการทำงาน จนกระทั่งเซลล์แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโตและเสื่อมสภาพตายในที่สุด กลไกการทำงานของอนุภาคนาโนของเงินมี 3 ตามขั้นตอนดังนี้

1. อนุภาคนาโนของเงินในช่วง 1–10 นาโนเมตร จับกับผิวหน้าของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและรบกวนการทำงานระดับเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น การขนส่งสารเข้าออกเซลล์

2.อนุภาคนาโนของเงินสามารถแทรกเข้าไปภายในเซลล์แบคทีเรียและรบกวนการทำงานระดับโมเลกุล โดยจับกับสารที่มีซัลเฟอร์ (S) และฟอสฟอรัส (P) เป็นองค์ประกอบ เช่น DNA

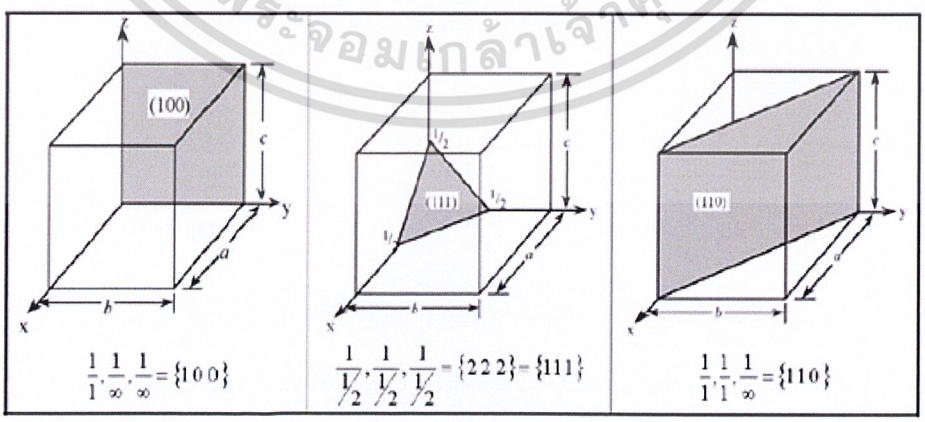
3.อนุภาคนาโนของเงินเกิดการสลายตัวและปลดปล่อย Silver ion (Ag^{+}) เนื่องจากอนุภาคนาโนของเงินมีขนาดเล็กและมีเป็นจำนวนมาก ทำให้สามารถปลดปล่อย Silver ion (Ag^{+}) ออกมาด้วยความเข้มข้นสูง จึงสามารถฆ่าแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว (พวงรัตน์ และจิรภัทร์, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงกลไกการทำงานของอนุภาคนาโนของเงินต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย
ที่มา : Nordqvist (2011)

อนุภาคนาโนของเงินเป็นสารที่ฆ่าเชื้อโรคได้ในวงกว้างทั้งในส่วนจุลินทรีย์ที่เป็นแกรมบวกและแกรมลบ โดยตัวอย่างของจุลินทรีย์แกรมลบได้แก่ *Acinetobacter, Escherichia, Pseudomonas, Salmonella* และ *Vibrio acinetobacter* และ ตัวอย่างของจุลินทรีย์แกรมบวกได้แก่ *Bacillus, Clostridium, Enterococcus, Listeria, Staphylococcus* และ *Streptococcus* ขนาดของอนุภาคนาโนของเงินที่มีขนาดเล็กมาก ทำให้สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ดี แม้ว่าจุลินทรีย์จะมีในปริมาณน้อยมากๆ นอกจากนี้รูปร่างของซิลเวอร์ที่แตกต่างกัน เช่น ทรงกลม แท่ง หรือแผ่นสามเหลี่ยม ทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมลบได้แตกต่างกันอีกด้วย โดยอนุภาคนาโนของเงินที่มีรูปร่างแผ่นสามเหลี่ยมสามารถกำจัดจุลินทรีย์ได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจากระนาบด้านบนเป็นบริเวณที่มีการจัดเรียงตัวที่ทำให้พื้นที่ผิวมีความหนาแน่นของอะตอมซิลเวอร์สูงสุด เช่น การเรียงตัว {111} เป็นต้น ในขณะที่อนุภาคนาโนของเงินทรงกลมจะมีลักษณะเป็น {100} โดยมีส่วนน้อยที่เป็น {111} ส่วนอนุภาคนาโนของเงินแบบแท่งจะมีด้านเป็น {100} และมีส่วนด้านปลายเท่านั้นที่เป็น {111} ดังแสดงในรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ลักษณะโครงสร้างของผลึกของอนุภาคนาโนซิลเวอร์
ที่มา : http://web.eng.nu.ac.th/eng2012/ceri/nanodatabase (13 มีนาคม 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

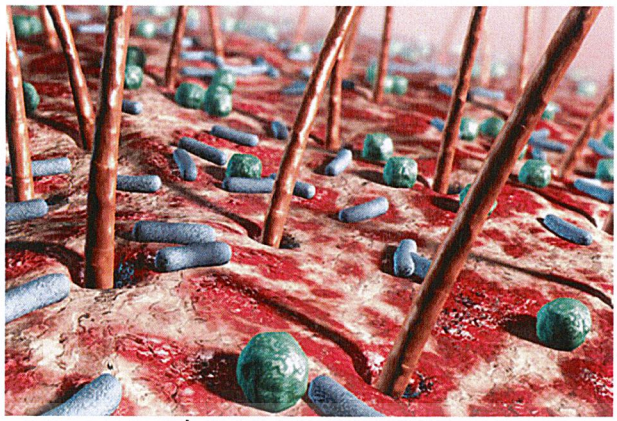
อนุภาคนาโนของเงินจะไปยึดติดและผ่านทะลุเข้าไปในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้โครงสร้างของเมมเบรนของเซลล์เปลี่ยนไปและไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของไซโตพลาสมิกเมมเบรนทำให้สิ่งต่างๆ ซึมผ่านเมมเบรนได้ ซึ่งทำให้เซลล์ตายในที่สุด นอกจากนี้ได้มีการรายงานกลไกในการฆ่าเชื้อโรคของอนุภาคนาโนของเงินว่ามาจากการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้ทำลายเมมเบรน ทำให้อนุภาคนาโนของเงินสามารถผ่านเข้าออกเซลล์ได้ ซึ่งทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายในที่สุด การทำลายเซลล์อาจมาจากการทำปฏิกิริยาของอนุภาคนาโนของเงินกับสารประกอบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวได้ และไม่สามารถสร้างดีเอ็นเอได้ ซึ่งทำให้เซลล์ตายในที่สุด อนุภาคนาโนของเงินทำให้สารฟอสโฟไทโรซีนในเปปไทด์ของแบคทีเรียลดน้อยลง ซึ่งจะทำให้การส่งผลต่อการส่งสัญญาณของเซลล์ ทำให้เกิดการขัดขวางการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด

2.7 แบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง

แบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง ดังแสดงในรูปที่ 2.6 แบคทีเรียจัดเป็นโพรแคริโอต (prokaryotes) ซึ่งเซลล์ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) แต่ขาดเยื่อหุ้มนิวเคลียสและออร์แกเนลล์ (organelle) ที่มีเยื่อหุ้มผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียมีองค์ประกอบ คือ เปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลที่เชื่อมกันด้วยสายของเปปไทด์ (peptide) โดยแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะมีความหนาของชั้นเปปทิโดไกลแคนที่แตกต่างกันออกไป ทำให้สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียออกได้เป็น 1) กลุ่มที่มีชั้นของเปปทิโดไกลแคนที่หนา ซึ่งเมื่อนำมาย้อมสีด้วยวิธี Gram stain จะติดสีม่วง (แบคทีเรียแกรมบวก) และ 2) กลุ่มที่มีชั้นของเปปทิโดไกลแคนที่บาง แต่มีชั้นของ bilayer phospholipid ที่หนากว่า กลุ่มนี้เมื่อย้อมสีด้วยวิธี Gram stain จะติดสีแดง (แบคทีเรียแกรมลบ) ซึ่งสามารถจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียได้หลายแบบ เช่น จำแนกตามการติดสีแกรม (แกรมบวกหรือแกรมลบ) จำแนกตามรูปร่างกลม (cocci) ทรงกระบอกหรือท่อน (bacilli) และรูปเกลียว (spiral) เป็นต้น เชื้อแบคทีเรียบางชนิดเคลื่อนที่ได้ บางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้ โดยชนิดที่เคลื่อนที่ ได้มักจะมีแฟลกเจลลา (flagella) ซึ่งอาจจะเป็นการงอกออกมาจากขั้วใดขั้วหนึ่งของเซลล์หรือการงอกออกรอบๆ เซลล์ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดมีพิไล (pili) ซึ่งทำให้เชื้อสามารถยึดเกาะกับเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) หรือเมทริกซ์ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix) ได้

นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียยังสามารถสังเคราะห์สารพันธุกรรมของตัวเองเพื่อสืบพันธุ์ได้ โดยทั่วไปแล้วในคนนั้นจะมีเชื้อแบคทีเรียที่ผิวหนังประมาณ 10^{12} ตัว ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่นี้จะอยู่บนผิวของมนุษย์โดยไม่ก่อโรค เราเรียกว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรียที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis* บนผิวหนัง และ *Streptococcus mutans* ในช่องปาก เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์ประจำถิ่นเหล่านี้จะคอยช่วยรักษาสมดุลของสภาวะแวดล้อมในอวัยวะเหล่านั้น และช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นมาได้ในบางสภาวะที่ร่างกายสูญเสียจุลินทรีย์ประจำถิ่นไป เมื่อนั้นเชื้อก่อโรคจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นและทำให้เกิดโรคขึ้นมาได้ ซึ่งร่างกายของมนุษย์นั้นมีวิธีการป้องกันไม่ให้ติดเชื้อแบคทีเรียได้หลายทาง แต่ในขณะเดียวกันเชื้อแบคทีเรียก็พัฒนาตัวเองให้สามารถรุกรานเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้โดยอาศัยส่วนของเซลล์แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (virulent factor) (Alexander และคณะ, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 จุลินทรีย์บนผิวหนัง

ที่มา : https://www.pastiche-training.com/flosaid/the-importance-of-the-skin-surface-microflora (13 มีนาคม 2561)

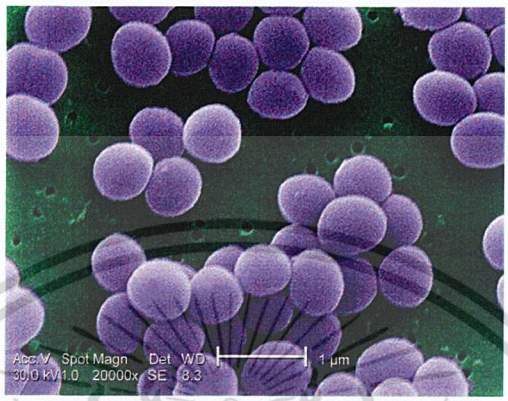
2.7.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ดังแสดงในรูปที่ 2.7 เป็นจุลินทรีย์ในวงศ์ Micrococcaceae ซึ่งมีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม ขนาดประมาณ 0.5–1.0 ไมครอน เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่บางครั้งอาจจะพบเป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ปกติแล้วมากไม่เกิน 4 เซลล์ อยู่ปะปนด้วยกันเสมอเวลาย้อมแกรม แบคทีเรียที่ไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะโคโลนีเป็นทรงกลม ขอบเรียบ นูน มีสีครีม เหลือง ส้ม ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของคาโรตินอยด์ในเซลล์เมมเบรน รวมถึงอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมที่ทำให้เชื้อเจริญ *S. aureus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6–46 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30–37 องศาเซลเซียส ทนความร้อนได้ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และยังสามารถสร้างสารพิษที่อุณหภูมิมากกว่า 10 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 4.0–10.0 พีเอชช่วงที่เหมาะสมคือ 7.0–7.5 ค่าแอคติวิตีของน้ำ (water activity) อยู่ในช่วง 0.85–0.999 ถ้าค่าแอคติวิตีของน้ำน้อยกว่า 0.94 จะเจริญได้อย่างช้าๆ สามารถทนเกลือได้ที่ร้อยละ 18-20

S. aureus ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Facultative anaerobe คือ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนมากกว่าในสภาพไม่มีออกซิเจน และสามารถสร้างสารพิษ enterotoxin แบ่งออกเป็น 8 ชนิดได้แก่ A, B, C1, C2, C3, D, E และ H ชนิดที่ พบบ่อยซึ่งเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษคือ A กับ D สารพิษนี้มีคุณสมบัติพิเศษ คือทนความร้อน ไม่ถูกทำลายแม้ต้มในน้ำเดือดครึ่งชั่วโมง และทนความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารพิษนี้ละลายได้ในน้ำและในสารละลายเกลือ เชื้อ *S. aureus* จะสร้างสารพิษดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่ 25 และ 10 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทั้งยังสามารถทนต่อรังสีแกมมาในปริมาณที่อนุญาตให้ใช้กับอาหารอีกด้วย แหล่งที่พบเชื้อสามารถพบได้ที่ผิวหนัง โพรงจมูก เยื่อบุทางเดินหายใจ ทางเดินอาหาร และบาดแผลที่เป็นฝีหนองรวมถึงในดิน ฝุ่นละออง อาหารที่มักพบเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ เนื้อสัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์จากไข่ อาหารประเภทสลัด เช่น ไข่ ทูน่า เนื้อไก่ มันฝรั่ง และมักกะโรนี ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ครีมพาย เอแคลร์ ช็อกโกแลต แซนวิช และผลิตภัณฑ์นมที่เก็บไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม และเก็บไว้เป็นเวลานานก่อนรับประทาน การทำให้เกิดโรค เชื้อ *S. aureus* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

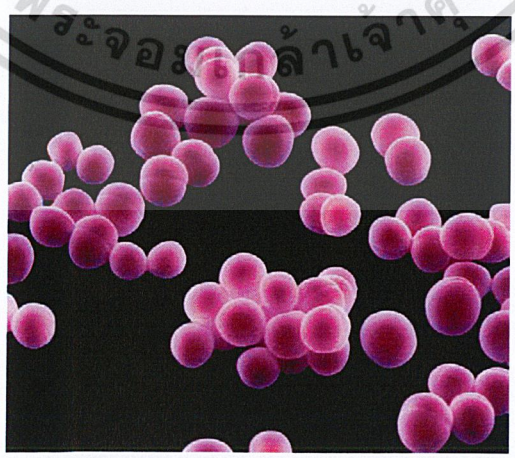
ปนเปื้อนสารพิษแม้ในปริมาณน้อยกว่า 1 ไมโครกรัม ก็สามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ สารพิษชนิดนี้จะมีปริมาณสูงมากเมื่อเชื้อ *S. aureus* ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร 100,000 เซลล์ต่อกรัมอาหาร ทำให้เกิดโรค Acute infection (ฝีหนองแผลติดเชื้อ septicemia) และ Acute toxaemias (heat stable enterotoxin) (ศิวาพร ศิวาเวช, 2542)



รูปที่ 2.7 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*
ที่มา : https://medicalxpress.com/bacteriapathogenic.html (13 มีนาคม 2561)

2.7.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis ดังแสดงในรูปที่ 2.8 เป็นจุลินทรีย์ในวงศ์ Micrococcaceae ซึ่งมีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะกลม ขนาดประมาณ 0.5–1.5 ไมครอน เรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น แต่บางครั้งอาจจะพบเป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ลักษณะโคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาว สามารถเจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในกลุ่ม *Staphylococcus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) และยังไม่สร้างแอลฟาท็อกซิน (α-toxin) เอกซ์โฟลิเอติน (exfoliatin) และซุปเปอร์แอนติเจนท็อกซิน (superantigen toxins) ได้



รูปที่ 2.8 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus epidermidis*
ที่มา : https://fineartamerica.com/staphylococcus-epidermidis (13 มีนาคม 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S. epidermidis เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) พบที่ผิวหนัง โพรงจมูก รูหู และทางเดินปัสสาวะส่วนปลาย ในอดีตไม่พบเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ แต่เนื่องจากมีการใช้สายสวนท่อปัสสาวะ (catheters) และชิ้นส่วนเทียม (prosthesis) กันอย่างแพร่หลาย จึงพบว่าในการติดเชื้อในโรงพยาบาลมากขึ้นและยังยากต่อการรักษาเนื่องจาก *S. epidermidis* สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ และมีแบบแผนการดื้อยาไม่แน่นอนและแตกต่างกับ *S. aureus* และยังพบว่าดื้อยาต่อกลุ่ม penicilinase-resistant penicillin และ cephalosporin มากกว่า *S. aureus* อีกด้วย

2.7.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ดังแสดงในรูปที่ 2.9 เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบ รูปร่างท่อนตรง ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ไม่ได้ สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำเงินที่เรียกว่า Pyocyanin โคโลนีแบคทีเรียจะสร้างกลิ่น คล้ายกลิ่นองุ่น (Grape-likeodor) จัดเป็นพวกแซฟโพไฟท์ (saprophyte) พบได้ตามพื้นดิน แหล่งน้ำ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเชื้อฉวยโอกาส



รูปที่ 2.9 ลักษณะเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*
ที่มา : https://fineartamerica.com/pseudomonas-aeruginosa (13 มีนาคม 2561)

แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญและแพร่กระจายไปยังอวัยวะของผู้ป่วยในส่วนต่างๆ พร้อมทั้งมีการทำลายเนื้อเยื่อของผู้ป่วยโดยสร้างสารพิษและเอนไซม์ต่างๆ (Strateva และ Mitov, 2011) เช่น 1) แอลจิเนต (Alginate) ซึ่งแบคทีเรียใช้ในการยึดเกาะเซลล์เจ้าบ้านและป้องกันการถูกกำจัดจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย 2) ไพไลหรือฟิมเบรีย จะเป็นส่วนที่คล้ายเส้นขนเล็กๆ ที่ยื่นออกมาจากผิวเซลล์เพื่อที่จะจับกับเยื่อบุผิวทางเดินหายใจ 3) เอนโดทอกซินหรือลิพิดเอ (Endotoxin หรือ lipid A) เอนโดทอกซินเป็นลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ตามผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบและเป็นแอนติเจน (antigen) ที่สำคัญอีกด้วย ส่วนลิพิดเอเป็นองค์ประกอบของเอนโดซินที่เกี่ยวกับความเป็นพิษ แต่ความเป็นพิษของเชื้อ *P. aeruginosa* นั้นจะน้อยกว่าแบคทีเรียในตระกูลเอน Enterobacteriaceae อยู่ประมาณ 10 เท่า 4) อีลาสเทส (Elastase) เป็นเอนไซม์ที่จะทำลายอีลาสติกไฟเบอร์ที่ผนังหลอดเลือด ซึ่งจะทำให้เกิดเลือดออกและเชื้อแพร่กระจายออกไปอีกด้วย 5) เอกโซทอกซินเอ (Exotoxin A) เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการเชื้อรุนแรง โดยจะขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ยูคาริโอต ซึ่งสารพิษนี้จะทำให้เซลล์ตายและมีความเป็นพิษแต่จะน้อยกว่าดิฟทีเรีย 6) โปรตีเอส (Proteases) เป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกมานอกเซลล์ โดยจะย่อยสลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อเยื่อของเซลล์เจ้าบ้านและทำลายอิมมิวโนกลอบิวลินและคอมพลีเมนต์ นอกจากนี้ยังจะช่วยให้เชื้อบุกรุกและแพร่กระจายออกไป 7) เอกโซทอกซินเอส (Exotoxin S) เป็นสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนจะต่างกับเอกโซทอกซินเอ ตรงที่ทนความร้อนได้ พบในบางสายพันธุ์ของ *P. aeruginosa* 8) ฟอสโพลิเพสซี (Phospholipase C) จะย่อยสลายไขมันและเลซิทินเพื่อที่จะให้ปล่อยฟอสโพริลโคลีนออกมาช่วยทำลายเนื้อเยื่อ 9) ลิวโคซิดิน (Leukocidin) จะยับยั้งการทำงานของลิมโฟไซต์ และนิวโทรฟิว โรคที่ติดเชื้อในโรงพยาบาลที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *P. aeruginosa* มักพบในการติดเชื้อที่บาดแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก การติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสโลหิต การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ การติดเชื้อหลังการผ่าตัดต้อกระจก (Bitsori และคณะ, 2012)

2.8 การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antibacterial activity)

การทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ทดสอบได้ 2 วิธี คือ

2.8.1 Dilution Method

เป็นการเจือจางสารให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ มาทดสอบกับเชื้อ วิธีนี้สามารถหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อได้ (Minimal Inhibition Concentration, MIC) ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 วิธี คือการเจือจางสารในอาหารเหลว (Broth dilution method) และการเจือจางในอาหารแข็ง (Agar dilution method) ซึ่งจะต้องใช้เวลา เครื่องมือ และแรงงานในการทำมากแต่ผลการทดลองที่ได้แน่นอนกว่า

2.8.2 Diffusion Method

เป็นการทดสอบโดยทำให้ตัวสารจากที่หนึ่งซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้ออาจใช้แผ่นสารเป็นกระดาษกรอง หรือเป็นเม็ด หรือเจาะหลุมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วใส่สารลงไป เพื่อให้สารซึมจากบริเวณหนึ่งที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่ที่ที่มีความเข้มข้นต่ำ อ่านผลการทดสอบโดยดูบริเวณที่เชื้อถูกยับยั้งการเจริญ (clear zone หรอ inhibition zone) วิธีนี้ ไม่สามารถอ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารโดยตรงได้ แต่ก็เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อยและวิธีที่นิยมทดสอบมากที่สุดคือแบบที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (disc diffusion method) (ธีรวุฒิ และรัชนี, 2550)

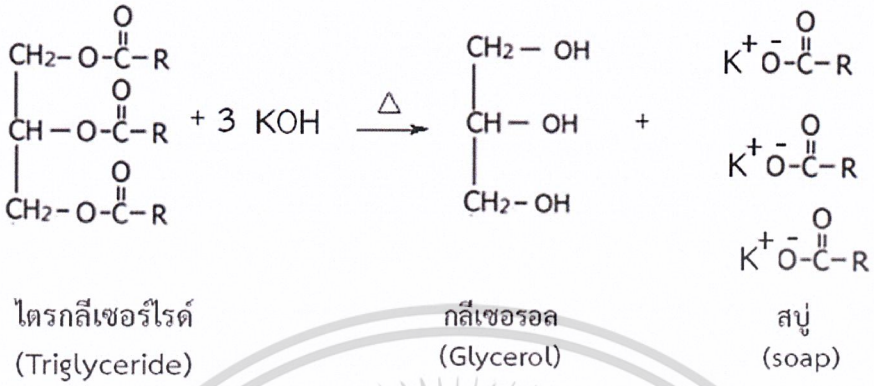
2.9 สบู่

สบู่หรือเกลือของกรดไขมัน เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ชำระล้างหรือทำความสะอาดร่างกาย ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อน สบู่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง ไขมันหรือน้ำมัน (ไตรเอซิลกลีเซอรอล) กับสารละลายด่าง เกิดเป็นเกลือของกรดไขมันกับกลีเซอรอล ดังแสดงในรูปที่ 2.10

แต่เดิมคนไทยมีการผลิตสบู่โดยใช้ไขมันหรือน้ำมันผสมกับน้ำขี้เถ้าไว้ใช้สำหรับอาบน้ำ สระผมตลอดจนล้างจานในครัวเรือน ภายหลังมีการผลิตสบู่ในระดับอุตสาหกรรมมากขึ้น สบู่เริ่มถูกเติมแต่งด้วยสารต่าง ๆ ตามความต้องการของผู้บริโภค นอกเหนือจากน้ำมันกับด่างแล้ว ยังได้ผสมกับน้ำหอม สี สารเพิ่มฟองเพื่อให้สบู่มีคุณสมบัติน่าใช้ยิ่งขึ้น อีกทั้งในอุตสาหกรรมการผลิตสบู่มีการแยกกลีเซอรอลหรือกลีเซอรีนออกไปเพื่อจำหน่ายให้กับอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมยา เพราะได้ราคาสูงกว่าการจำหน่ายสบู่เพียงอย่างเดียว ซึ่งสบู่ที่ได้ต่างจากสบู่ที่เราผลิตขึ้นมาเอง โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีกลีเซอรอลหรือกลีเซอรีนปนอยู่ในเนื้อสบู่อยู่แล้ว ทำให้ได้สบู่ที่ให้ความชุ่มชื้นกับผิวหลังอาบน้ำค่อนข้างสูงกว่าสบู่ที่วางขายตามท้องตลาดทั่วไป



รูปที่ 2.10 การเกิดปฏิกิริยาซาพอนนิฟิเคชัน (saponification)
ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/1631/saponification (14 มีนาคม 2561)

สบู่จัดเป็นสินค้าที่ผู้บริโภคโดยทั่วไปไม่ยึดติดกับตราสินค้ามากนัก เนื่องจากสามารถใช้ทดแทนกันได้อย่างสมบูรณ์ การที่สบู่มีผู้ผลิตมากประกอบกับต้นทุนการผลิตไม่สูงมาก จึงเป็นช่องทางให้ผู้ผลิตรายใหม่สามารถเข้าสู่ตลาดได้ง่าย และมีการแข่งขันในตลาดค่อนข้างสูง โดยถ้าผู้ประกอบการสามารถนำเสนอจุดขายที่แปลกใหม่ตรงกับความต้องการของผู้บริโภคก็จะสามารถครอบครองส่วนแบ่งการตลาดได้ในระยะเวลาที่สั้น ผู้ผลิตจึงพยายามพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเพื่อเพิ่มคุณภาพผลิตภัณฑ์ให้ได้มาตรฐานสูงขึ้น มีความหลากหลายและให้ผลิตภัณฑ์มีความแตกต่างจากคู่แข่ง เช่น การพัฒนารูปแบบบรรจุภัณฑ์ การเพิ่มตราผลิตภัณฑ์ หรือการเพิ่มส่วนประกอบต่างๆ ที่ทำให้เกิดจุดเด่นในสินค้า เช่น สี หัวน้ำหอม สารให้ความชุ่มชื้น (moisturizer) วิตามิน สารเพิ่มฟอง สารระงับเชื้อ สารสกัดจากธรรมชาติชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้อาจจะเพิ่มเมนทอลเพื่อเพิ่มทางเลือกให้ผู้บริโภค



รูปที่ 2.11 สบู่
ที่มา : http://www.siamchemi.com/สบู่ (14 มีนาคม 2561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.1 ประเภทของผลิตภัณฑ์สบู่

ผลิตภัณฑ์สบู่ที่จำหน่ายในท้องตลาดแบ่งตามลักษณะของผลิตภัณฑ์เป็น 2 ลักษณะ คือ สบู่ก้อน (bar soaps) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 ลักษณะที่ดี คือเป็นก้อนไม่มีสิ่งแปลกปลอมปนเปื้อน และสบู่เหลว (liquid soaps) ลักษณะที่ดี คือเป็นเนื้อเดียวไม่แยกชั้น อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งตามลักษณะการใช้เป็น 3 ประเภท คือ

1.สบู่หอมถนอมผิว จะมีส่วนผสมของสารบำรุงผิว สารให้ความชุ่มชื้น (moisturizer) สารช่วยในการทำความสะอาด และวิตามินต่างๆ ที่ช่วยบำรุงผิวพรรณ

2. สบู่อนามัย มีส่วนผสมของสารที่ใช้ระงับเชื้อและกลิ่น ใช้ทำความสะอาดผิวกาย ชำระล้างสิ่งสกปรกและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหนึ่งของกลิ่นกาย

3. สบู่เด็ก จะมีส่วนประกอบสำคัญที่เหมาะสำหรับผิวที่ละเอียดและอ่อนโยน

2.9.2 ส่วนประกอบที่สำคัญของผลิตภัณฑ์สบู่

1. ไขมันและน้ำมันจากพืชหรือสัตว์ เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว เป็นต้น

2. ด่าง (alkali) เป็นตัวทำปฏิกิริยากับกรดไขมันและส่วนประกอบอื่นๆ ทำให้สารลดแรงตึงผิวและสารลดความกระด้างของน้ำทำงานมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์

3. สารลดความกระด้างของน้ำ (builders) ใช้ลดความกระด้างของน้ำ เพื่อเพิ่มความสามารถในการทำความสะอาดและป้องกันการเสื่อมของผลิตภัณฑ์

4. สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ (synthic surfactants) บางชนิดไม่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ทำให้เกิดการตกค้างและสะสมในสิ่งแวดล้อม

5. สารปรับสภาพ (conditioners) เพื่อให้ผิวเกิดความชุ่มชื้นและเกิดความระคายเคืองต่อผิวน้อยลง เช่น ลาโนลิน และโคลด์ครีม เป็นต้น

6. สี ซึ่งจะต้องเป็นสีตามพระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2535 เช่น คลอโรฟิลด์ ซินนาบาร์อัลตรามารีนกรีน เป็นต้น

7. สารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agents) ทำหน้าที่ฆ่าและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดเชื้อโรคและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์

8. หัวน้ำหอม (fragrances) ทำหน้าที่ปกปิดกลิ่นของส่วนประกอบต่าง ๆ และให้มีกลิ่นหอมน่าใช้เพิ่มขึ้น

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nurmila และคณะ (2016) ได้ศึกษาการปรับปรุงการผลิตคอร์ไดเซปินบนผิวหน้าอาหารเหลวของ *Cordyceps militaris* ที่แยกได้จากสายพันธุ์ตามธรรมชาติ ซึ่งพบว่า *C. militaris* NBRC 103752-3 สามารถผลิตคอร์ไดเซปิน ได้เป็น 2 เท่าบนผิวหน้าอาหารซึ่งดีกว่าในอาหารเหลว การผลิตคอร์ไดเซปินมีผลอย่างมีนัยสำคัญ โดยพื้นที่ผิวจำเพาะ (specific surface area : SSA) ในการเพาะเลี้ยงแบบผิวหน้าอาหารเหลว มีพื้นที่ผิวจำเพาะ 1.57 ต่อเซนติเมตร (จากอาหาร 50 มิลลิลิตร) สามารถผลิตคอร์ไดเซปินได้ถึง 120.9 มิลลิกรัม เมื่อเพิ่มอะดีนีนลงไป 6.75 กรัม/ลิตรในอาหาร สามารถผลิตคอร์ไดเซปิน ได้ถึง 312.2 มิลลิกรัม จากอาหาร 50 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นการปรับปรุงการผลิตคอร์ไดเซปินได้ถึง 4.6 เท่า ในการศึกษานี้จะศึกษาการผลิตและผลผลิตของคอร์ไดเซปินที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับปรุงจากสายพันธุ์ตามธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญ โดยการแยกเซลล์จากโคโลนีเดี่ยวและไม่เติมสารเพิ่มเติมหรือใช้เทคโนโลยีในการกลายพันธุ์ ซึ่ง *C. militaris* NBRC10352-3 สามารถผลิตคอร์ไดเซปินได้ในปริมาณมากกว่าที่ได้จากการกลายพันธุ์

Dong และคณะ (2013) ศึกษาองค์ประกอบและการกระจายของสารออกฤทธิ์สำคัญในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง พบว่าแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งได้แก่ ซีลีเนียม (Se; selenium) สังกะสี (Zn; zinc) เหล็ก (Fe; iron) และสารออกฤทธิ์หลักอย่างอะดีโนซีน คอร์ไดเซปิน และแคโรทีนอยด์ (carotenoid) ส่วนใหญ่จะแพร่กระจายอยู่ในส่วนหัวของดอกเห็ด ส่วนฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมแพร่กระจายอยู่ทั่วดอกเห็ด

Li และคณะ (2015) ทำการศึกษาผลของการสกัดต่อปริมาณอะดีโนซีนและคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ ZORBAX SB-C18 (5 ไมโครเมตร และ 4.6x150 มิลลิเมตร) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยเมทานอลและน้ำบริสุทธิ์ในอัตราส่วน (16:84) ที่มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิของคอลัมน์ 27 องศาเซลเซียส และปริมาณการฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ใช้ช่วงแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการสกัดสารอะดีโนซีนซิปินอยู่ที่ 40 และสารคอร์ไดเซปินอยู่ที่ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งถ้าหากอุณหภูมิสูงไปกว่านี้สารอะดีโนซีนจะลดลงอย่างรวดเร็วทำให้เสียสรรพคุณทางยาของเห็ดถั่งเช่าสีทอง

Wang และคณะ (2016) ได้ศึกษาการใช้เส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน ซึ่งเส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองเป็นสารรีดิวซ์ในการสร้างอนุภาคนาโนของเงิน ได้มีการยืนยันโดยใช้เทคนิค surface plasmon resonance ที่แสดงผลในเครื่อง UV-visible spectrophotometer และวิเคราะห์การเลี้ยวเบนของรังสี X-ray พบว่าอนุภาคนาโนของเงินประกอบไปด้วยผลึกของเงิน (silver; Ag) ปริมาณมาก และเมื่อนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope: TEM) พบว่าอนุภาคนาโนของเงิน มีรูปร่างเป็นทรงกลมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 15 นาโนเมตร นอกจากนี้แล้ว การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน แสดงให้เห็นว่าสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคทางน้ำเช่นเดียวกับแบคทีเรียก่อโรคทางคลินิก อีกทั้งอนุภาคนาโนของเงินได้รับการยืนยันแล้วว่ามีความคงตัวสูง แม้จะเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน จากข้อมูลทั้งหมดนี้สามารถยืนยันได้ว่าสารสกัดจาก *C. militaris* สามารถใช้สังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินได้

Lin และคณะ (2010) พบว่าหากสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินจากสารสกัดใบราชพฤกษ์ (*Cassia fistula*) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ได้จะมีลักษณะเป็นแท่ง แต่หากสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อนุภาคนาโนของเงินที่ได้จะมีรูปร่างเป็นทรงกลม

Cruz และคณะ (2010) ได้สังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินจากเลมอนเวอบีน่า (*Lippia citriodora*) พบว่าอุณหภูมิในการสังเคราะห์มีผลต่อขนาดของอนุภาคนาโนของเงิน ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสที่ใช้ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน มีค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนของเงินจะมีความยาวคลื่นที่น้อยกว่า นั่นแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส อนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ได้มีขนาดเล็กกว่าอนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นคือเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นปฏิกิริยารีดักชั่นเกิดได้เร็วขึ้น และพบว่า ณ เวลาการเกิดปฏิกิริยาเท่ากันปฏิกิริยาที่เกิดที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นั่นแสดงว่ามีอนุภาคนาโนของเงินเกิดขึ้นมากกว่า

Rajakannu และคณะ (2015) ได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินโดยใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดและศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดจากเปลือกมังคุดที่นำมาสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินด้วยวิธีทางชีวภาพ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa*, *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีกว่าเปลือกมังคุดที่สกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญ

Rai และคณะ (2009) ได้ศึกษากระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินด้วยการสังเคราะห์ทางชีวภาพ พบว่าอนุภาคนาโนของเงินมีขนาดเท่ากับ 100-200 นาโนเมตร จึงมีความสามารถในการที่จะเข้าไปจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีมากขึ้น ซึ่งอนุภาคนาโนของเงินมีประจุบวก (Ag^{+}) เมื่อสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย สามารถแพร่ประจุบวกไปเกาะตามผนังเซลล์และแทรกเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เกิดการรวมตัวกันของ DNA เกิดเป็น DNA condensation และยังรบกวนการทำงานของการขนส่งสารเข้าออกระหว่างเซลล์และการหายใจระดับเซลล์ และหลังจากนั้นอนุภาคนาโนของเงินเกิดการสลายตัวและปลดปล่อย silver ion (Ag^{+}) ที่มีขนาดเล็กและจำนวนมากออกมาฆ่าแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว

Das และคณะ (2013) ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ด้วยสารสกัดจากใบแค (*Sesbania grandiflora*) พบว่าค่าการดูดกลืนสเปคตรัมสูงสุดอยู่ที่ 422 นาโนเมตร และมีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-25 นาโนเมตร อีกทั้งสามารถต้านเชื้อ *Salmonella enterica* (แกรมลบ) และ *Staphylococcus aureus* (แกรมบวก) โดยสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่า ซึ่งสามารถสังเกตได้จากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้มากกว่า 10 มิลลิเมตร

Singh และคณะ (2013) ได้ศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินจากสารสกัดจากใบโกงกางใบใหญ่ (*Rhizophora mucronata*) และศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* และ *Cryptococcus neoformans* โดยได้เปรียบเทียบความสามารถในการต้านเชื้อของ fluconazole และ itraconazole ที่ใช้เป็นยาต้านเชื้อกับ fluconazole และ itraconazole ที่มีการผสมรวมกับอนุภาคนาโนของเงินพบว่ายาต้านเชื้อทั้งสองชนิดที่มีการผสมรวมกับอนุภาคนาโนของเงินมีความสามารถในการต้านเชื้อทุกชนิดได้ดีกว่าแบบที่ไม่ได้ผสมกับอนุภาคนาโนของเงิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

3.1.1.1 ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ปทุมไรซมิล แอนด์ แกรนารี จำกัด)

3.1.1.2 ไข่ไก่ (ท็อปส์ มาร์เก็ต)

3.1.1.3 หนอนไหม (สยามแม็คโคร)

3.1.1.4 มันฝรั่ง (ท็อปส์ มาร์เก็ต)

3.1.1.5 ข้าวโพดอ่อน (ท็อปส์ มาร์เก็ต)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.2.1 *Cordyceps militaris* (รศ.อารี ฤทธิบูรณ์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20°ซ)

3.1.2.2 *Staphylococcus aureus* (ภาควิชาชีววิทยา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ)

3.1.2.3 *Staphylococcus epidermidis* (ภาควิชาชีววิทยา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ)

3.1.2.4 *Pseudomonas aeruginosa* (ภาควิชาชีววิทยา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ก)

3.1.3.1 Potato Dextrose Agar เสริมไข่ไก่

3.1.3.2 Potato Dextrose Broth เสริมไข่ไก่

3.1.3.3 Mueller Hinton Agar

3.1.3.4 Nutrient Agar

3.1.3.5 Nutrient Broth

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.4.1 ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น HT,VT (BOSSTECH ประเทศไทย)

3.1.4.2 ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (BINDER ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.1.4.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น HSYC-2112B (SHANGHAI HASNC INSTRUMENT MANUFACTURE ประเทศจีน)

3.1.4.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BSA224S-CW (SARTORIUS ประเทศเยอรมนี)

3.1.4.5 เครื่องโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง รุ่น LC-20A (BARA SCIENTIFIC ประเทศญี่ปุ่น)

3.1.4.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (HIRAYAMA ประเทศญี่ปุ่น)

3.1.4.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Z 216MK (HERMLE ประเทศเยอรมนี)

3.1.4.8 เครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูง (พี.อินเตอร์เทรด อิควิปเม้นท์)

3.1.4.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น UV-1800 (BARA SCIENTIFIC ประเทศญี่ปุ่น)

3.1.4.10 ตู้อบความร้อนแบบสุญญากาศ (BINDER ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.1.4.11 ตู้อบลมร้อน (MEMMERT ประเทศเยอรมนี)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ (ต่อ)

3.1.4.12 เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก รุ่น UC152 (STUART ประเทศอังกฤษ)

3.1.4.13 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) รุ่น QUANTA 250 (THERMO FISHER SCIENTIFIC ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.1.4.14 เครื่องฉาบทอง (CRESSINGTON SCIENTIFIC INSTRUMENTS ประเทศอังกฤษ)

3.1.4.15 ไมโครปิเปต (GILSON ประเทศเยอรมนี)

3.1.4.16 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร (SCHOTTDURAN ประเทศเยอรมนี)

3.1.4.17 บีกเกอร์ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร (SCHOTTDURAN ประเทศเยอรมนี)

3.1.4.18 จานเพาะเชื้อ (SCHOTTDURAN ประเทศเยอรมนี)

3.1.4.19 กระบอกตวง (VITLAB ประเทศเยอรมนี)

3.1.4.20 หลอดทดลอง (PYREX ประเทศเยอรมนี)

3.1.4.21 กรวยแก้วกรอง (PYREX ประเทศเยอรมนี)

3.1.4.22 เวอร์เนีย คาร์ลิเปอร์ (MOTUTOYO ประเทศญี่ปุ่น)

3.1.4.23 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.4.24 เตาแก๊ส

3.1.4.25 ผ้าขาวบาง

3.1.4.26 เข็มเขี่ยเชื้อ

3.1.4.27 ขวดแก้วแบน

3.1.4.28 กระดาษกรอง เบอร์ 1

3.1.4.29 ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.1.4.30 หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.1.4.31 ช้อนตักสาร

3.1.4.32 ขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงขนาด 16 ออนซ์

3.1.5 สารเคมี

3.1.5.1 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

3.1.5.2 เปปโตน (peptone)

3.1.5.3 กลูโคส

3.1.5.4 ผงวุ้น (agar)

3.1.5.5 น้ำบริสุทธิ์สูง (ultrapure)

3.1.5.6 สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$)

3.1.5.7 เอทานอลร้อยละ 95

3.1.5.8 ยาปฏิชีวนะเตตระไซคลิน (tetracycline)

3.1.5.9 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.1.5.10 สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 3 (hydrogen peroxide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

3.2.1 การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยหนอนในขวดแก้ว

เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีหนอนไหม จนเกิดเป็นดอกเห็ด (ดัดแปลงจากหยุด, 2556)

3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA เสริม

นำดอกเห็ดที่ได้มาทำการฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 2 ครั้ง จากนั้นตัดเป็นชิ้นๆ ความยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร นำชิ้นส่วนที่ตัดแล้วไปวางบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร PDA ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้คือ มันฝรั่ง 200 กรัมต่อลิตร ข้าวโพดอ่อน 50 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ไข่ไก่ 50 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 20 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (ดัดแปลงจากหยุด, 2556)

3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม

นำหัวเชื้อเริ่มต้นจากอาหารแข็ง PDA เสริม มาค็อกจำนวน 3 ชิ้นนำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้คือ มันฝรั่ง 200 กรัมต่อลิตร ข้าวโพดอ่อน 50 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และไข่ไก่ 50 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มืดในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (ดัดแปลงจากหยุด, 2556)

3.2.4 การถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว PDB เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอน

ทำการถ่ายหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม ในหัวข้อ 3.2.3 ร้อยละ 5 ลงไปตรงกลางขวดอาหารแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดโดยใช้ผ้าดำคลุมที่ขวดเพาะเลี้ยงอีกทีที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 14 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มขวดเพาะเลี้ยง (เส้นใยมีสีขาว) จากนั้นทำการเปิดดอกโดยให้แสงกับเส้นใย รอจนเกิดเป็นดอกเห็ดมีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นทำการฉีดฮอร์โมนและนำไปเลี้ยงต่อจนครบเวลาประมาณ 45 วัน นับตั้งแต่วันที่ทำการเปิดดอก โดยสูตรอาหารแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอน มีส่วนประกอบดังนี้คือ มันฝรั่ง 200 กรัมต่อลิตร ข้าวโพดอ่อน 50 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ไข่ไก่ 50 กรัมต่อลิตร ดักแด้ 30 กรัมต่อลิตร และข้าวไรซ์เบอรี่ 60 กรัมต่อขวดเพาะเลี้ยง

3.3 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

ทำการตัดแบ่งเห็ดถั่งเช่าสีทองออกเป็นสองส่วนคือส่วนดอกและฐาน นำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรืออบจนกว่าจะมีความชื้นเท่ากับร้อยละ 7-10 บันทึกน้ำหนักแห้ง จากนั้นบดเห็ดถั่งเช่าสีทองโดยใช้โกร่ง (ดัดแปลงจากสุกัลญา และคณะ, 2558)

3.3.2 การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) จากนั้นนำดอกเห็ดที่บดแล้ว 1.5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ โดยทำการกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบ 30 นาทีแล้วทำการกรองโดยใช้กระดาษกรองเพื่อแยกส่วนใส (ดัดแปลงจาก Cruz และคณะ, 2010)

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำสารสกัดที่ได้ในหัวข้อ 3.3.2 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกตะกอนกับส่วนใส จากนั้นนำส่วนใสไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ใส่ลงในขวดเก็บสารละลาย (vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และทำการเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยนำน้ำบริสุทธิ์สูง (ultrapure) และเมทานอล นำไปเข้าเครื่องเขย่าคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic sonicator) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30-45 นาที จากนั้นนำมากรองผ่านตัวกรอง 0.45 ไมครอนก่อนการวิเคราะห์ (ดัดแปลงจาก Li และคณะ, 2015)

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปินและสารมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ C18 (ขนาด 3.5 ไมโครเมตร× 250 มิลลิเมตร×4.6 มิลลิเมตร) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 40 องศาเซลเซียส ฉีดตัวอย่างเข้าคอลัมน์ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร โดยใช้เมทานอลต่อน้ำบริสุทธิ์สูงในอัตราส่วน 15:85 (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นเฟสเคลื่อนที่ (ดัดแปลงจาก Li และคณะ, 2015) แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์ไดเซปินจากพื้นที่ใต้กราฟ โดยการนำค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารคอร์ไดเซปินที่วัดได้แทนในสมการเส้นตรง คือ $Y=mX+c$ ของสารคอร์ไดเซปินมาตรฐาน โดยกำหนด Y คือ ค่าที่วัดได้จากพื้นที่ใต้กราฟ และ X คือ ค่าปริมาณสารคอร์ไดเซปิน

3.5 การสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน

นำบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ในหัวข้อ 3.3.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์ จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 5 มิลลิลิตร โดยทำการกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรท เป็น 1 และ10 มิลลิโมลาร์ (ดัดแปลงจาก Cruz และคณะ, 2010)

3.6 การวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry

นำอนุภาคนาโนของเงินในหัวข้อ 3.5 มาตรวจสอบลักษณะเฉพาะโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry โดยใช้แสง UV-visible (UV-vis) จากเครื่อง Shimadzu UV-1800 spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 200-800 นาโนเมตร (Wang และคณะ, 2016)

3.7 การวิเคราะห์ลักษณะ ขนาด และธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำอนุภาคนาโนเงินที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาทีจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงเพื่อกำจัดน้ำออก แล้วนำมาบดโดยใช้โกร่งหยกเพื่อให้เป็นผงละเอียด จากนั้นไปวางลงบนเทปคาร์บอน (carbon tape) แล้วนำไปทำให้พื้นผิวมีคุณสมบัตินำไฟฟ้าโดยการฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทอง (sputter coater) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบลักษณะ ขนาด และธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.8 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

3.8.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa* ที่อยู่ในหลอดอาหารเอียง (slant) มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ซึ่งประกอบด้วย Beef extract 3 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียที่บ่มมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ซึ่งเจือจางด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วนำไปวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สำหรับการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion เจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 (จำนวนเซลล์เท่ากับ 10^8 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร) และการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.09 (จำนวนเซลล์เท่ากับ 10^6 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร) ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของตัวอย่าง (ดัดแปลงจากรัชฎาวรรณ และสุดฤดี, 2548)

3.8.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion

ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนเงิน ด้วยวิธี agar disc diffusion โดยนำเชื้อแบคทีเรียในหัวข้อ 3.8.1 ที่ปรับความขุ่นไว้ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^8 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร นำมาทำการ swab โดยใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ซึ่งประกอบด้วย Beef extract 2 กรัมต่อลิตร Acid Hydrolysate of Casein 17.5 กรัมต่อลิตร แป้ง (starch) 1.5 กรัมต่อลิตร และผงวุ้น 17 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำ paper disc (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร) ที่หยดสารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง สารละลายอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพที่เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์ และ 10 มิลลิโมลาร์ รวมทั้งหยดสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท และสุดท้ายหยดยาปฏิชีวนะเตตระไซคลิน โดยใช้ automatic pipette ที่ปราศจากเชื้อ หยดสารสกัดตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นเดียวกัน คือ 25,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ใช้ความเข้มข้น 2,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะ ใช้ความเข้มข้น 3000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ดัดแปลงจากชลิดา อนุพันธ์, 2558)

3.8.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนของเงินที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *P. aeruginosa* ซึ่งใช้วิธีเจือจางในอาหารเหลว Nutrient Broth โดยนำอนุภาคนาโนของเงินที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่คัดเลือกในหัวข้อ 3.8.2 มาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยเจือจางอนุภาคนาโนของเงินเป็นลำดับส่วนจะได้ความเข้มข้นเป็น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9 และ 0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เติมลงไปจำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus, S. epidermidis* และ *P. aeruginosa* ที่ปรับความขุ่นไว้ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10^6 โคโลนีฟอร์มมิ่งยูนิตต่อมิลลิลิตร จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตร และสุดท้ายใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth จำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตรเช่นเดียวกัน ส่วนตัวควบคุมเชิงลบคือหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth เพียงอย่างเดียวและตัวควบคุมเชิงบวกคือหลอดที่มีอนุภาคนาโนของเงินเพียงอย่างเดียว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกผลเป็นบวกสำหรับหลอดที่อาหารมีลักษณะขุ่น (เชื้อเจริญเติบโต) และบันทึกผลเป็นลบสำหรับหลอดที่อาหารมีลักษณะไม่ขุ่น (เชื้อไม่เจริญเติบโต) (ดัดแปลงจากธนภพ โสตรโยม และคณะ, 2558)

3.8.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาค่า MBC ได้ โดยนำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดมา 0.1 มิลลิลิตร นำมา spread plate บนอาหาร Nutrient agar (NA) ซึ่งประกอบด้วย Beef extract 3 เปปโตน 5 และผงวุ้น 15 กรัมต่อลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจากธนภพ โสตรโยม และคณะ, 2558)

3.9 การนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่เพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย

นำเบสสบู่กลีเซอรีนใสไปหลอมละลายในไมโครเวฟ จากนั้นเติมอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพลงไปไม่เกินร้อยละ 4 ของน้ำหนักเบสสบู่กลีเซอรีนใส คนให้เข้ากัน หากเกิดฟองให้ใช้สเปรย์แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ฉีดบางๆ บนผิวหน้าเพื่อลดการเกิดฟอง จากนั้นเทลงพิมพ์สบู่และฉีดด้วยสเปรย์แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 บางๆ อีกครั้ง รอจนแข็งจะได้สบู่จากอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพ

3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

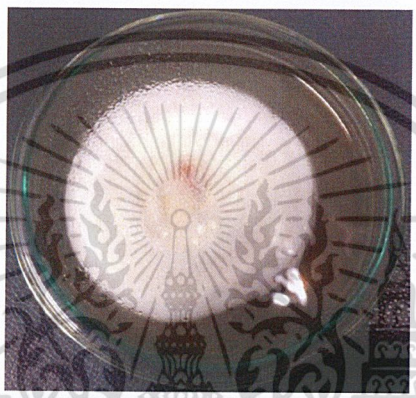
การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Minitab 16 ในหัวข้อที่ 3.8.2 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion โดยใช้วิธี Factorial design เพื่อหาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ยับยั้งได้ดีที่สุด โดยวิธีที่ใช้จะประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ เชื้อแบคทีเรียและสารที่ใช้ทดสอบ ซึ่งปัจจัยแรกจะมี 3 ระดับ คือ *S. aureus, S. epidermidis* และ *P. aeruginosa* ส่วนปัจจัยที่ 2 มี 3 ระดับ คือ อนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท และยาปฏิชีวนะเตตระไซคลิน ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยค่า $p \leq 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

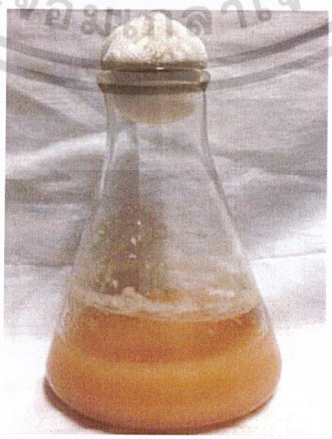
4.1 ผลของการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

จากการศึกษาระยะการเจริญเติบโตของหัวเชื้อเริ่มต้นและลักษณะเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA เสริมไข่ไก่ ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 14 วัน ลักษณะของเส้นใยมีสีขาว แผ่กระจายเป็นวงรอบชิ้นส่วนของเห็ดถั่งเช่าสีทอง



รูปที่ 4.1 ลักษณะเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA เสริม ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 14 วัน

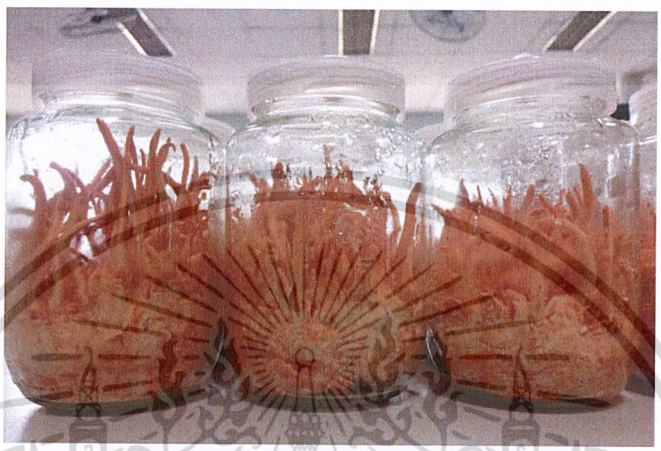
การศึกษาระยะการเจริญเติบโตของหัวเชื้อเริ่มต้นเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าอาหารเหลว PDB เสริมไข่ไก่ มีลักษณะหนืดและขุ่นขึ้น เนื่องจากเส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองมีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณมากขึ้น จึงทำให้อาหารมีลักษณะที่แตกต่างจากอาหารเริ่มต้น



รูปที่ 4.2 ลักษณะเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เจริญในอาหารเหลว PDB เสริม ในที่มืด ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อผลิตดอกในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อนำมาเปิดดอกในที่ที่มีแสงสว่างเป็นเวลา 7 วัน เส้นใยจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีส้มทอง จากนั้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาประมาณ 14 วันจะมีตุ่มดอกเกิดขึ้น และเมื่อครบเวลาประมาณ 45 วัน เห็ดถั่งเช่าสีทองจะมีการเจริญเติบโตเต็มที่ ดอกของเห็ดมีลักษณะสูงยาวเป็นทรงกระบอก มีสีส้มทอง ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ลักษณะของเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเหลว PDB เสริม ในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 45 วัน

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง

จากการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยการนำสารสกัดที่ได้จากเห็ดถั่งเช่าสีทองมาวิเคราะห์ปริมาณสารคอร์เซปินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง พบว่ามีสารคอร์ไดเซปินใน Retention Time (Rt) ใกล้เคียงกับ Rt ของคอร์ไดเซปินมาตรฐานที่เวลา 12.16 นาที ในปริมาณ 4.11 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งปริมาณสารคอร์ไดเซปินที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้มีปริมาณที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยการตรวจสอบและวิเคราะห์ปริมาณสารอะดีโนซีนและสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่า พบว่าดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณสารคอร์ไดเซปินเท่ากับ 3.41 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง (Lei และคณะ, 2009) จะเห็นได้ว่ามีปริมาณสารคอร์ไดเซปินน้อยกว่า อย่างไรก็ตามปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์ อาหารเพาะเลี้ยง ความเป็นกรดด่างของอาหาร สภาวะแวดล้อมที่ใช้เพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาการเก็บผลผลิต และวิธีการสกัดสาร เป็นต้น

4.3 ผลการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินและการวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry

ในการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินโดยการนำสารสกัดของเห็ดถั่งเช่าสีทอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 5 มิลลิลิตร โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท เป็น 1 และ10 มิลลิโมลาร์ ทำการกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

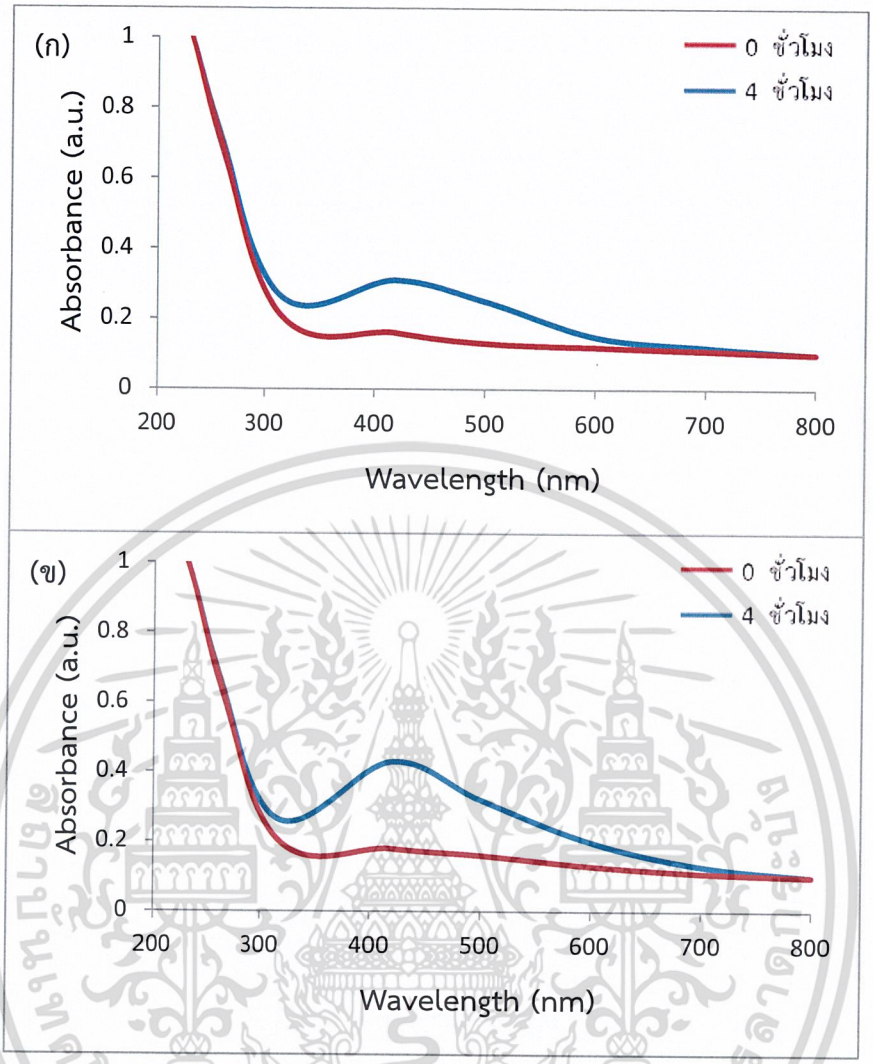
เวลา 4 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่าสีของสารละลายจะมีสีเหลืองอ่อนก่อนทำปฏิกิริยา และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มหลังจากทำปฏิกิริยา 4 ชั่วโมง กับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท แต่จะเห็นได้ว่าภาพที่ 4.4 (ข) สีของสารละลายจะมีสีเข้มกว่ารูปที่ 4.4 (ก) เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทต่างกัน ซึ่งลักษณะสีน้ำตาลเข้มที่ปรากฏเนื่องจากมีการปลดปล่อยคลื่นผิวพลาสมอน (Surface plasmon resonance, SPR) ของอนุภาคนาโนของเงิน ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดอนุภาคนาโนของเงินในส่วนผสมของปฏิกิริยา (Wang และคณะ, 2016)



รูปที่ 4.4 (ก) การเปลี่ยนสีของสารละลายก่อนและหลังการเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ (ข) การเปลี่ยนสีของสารละลายก่อนและหลังการเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่เติมลงไปในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรและสารสกัดของดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง 10 มิลลิลิตร

ซึ่งอนุภาคนาโนของเงินที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะโดยใช้เทคนิค UV-Visible Spectrophotometry ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ผลการดูดกลืนสเปคตรัมของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ที่ 418 และ 419 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องการงานวิจัยฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทองที่แสดงค่าการดูดกลืนแสงของอนุภาคนาโนของเงินสูงสุดที่ 415 นาโนเมตร และพีคก็จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตลอดระยะการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง ประกอบด้วย พอลิแซคคาไรด์ คอร์ไดเซปิน กรดคอร์ไดเซปิค ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส และไฟบริโอไลซิน ปริมาณมาก อีกทั้งองค์ประกอบเหล่านี้ในสารสกัดของเห็ดถั่งเช่าสีทองสามารถเป็นตัวรีดิวซ์สารเคมีและมีปริมาณเพียงพอสำหรับการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินทางชีวภาพ (Wang และคณะ, 2016)

เอกสารนี้มีไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลงเนื้อหา หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



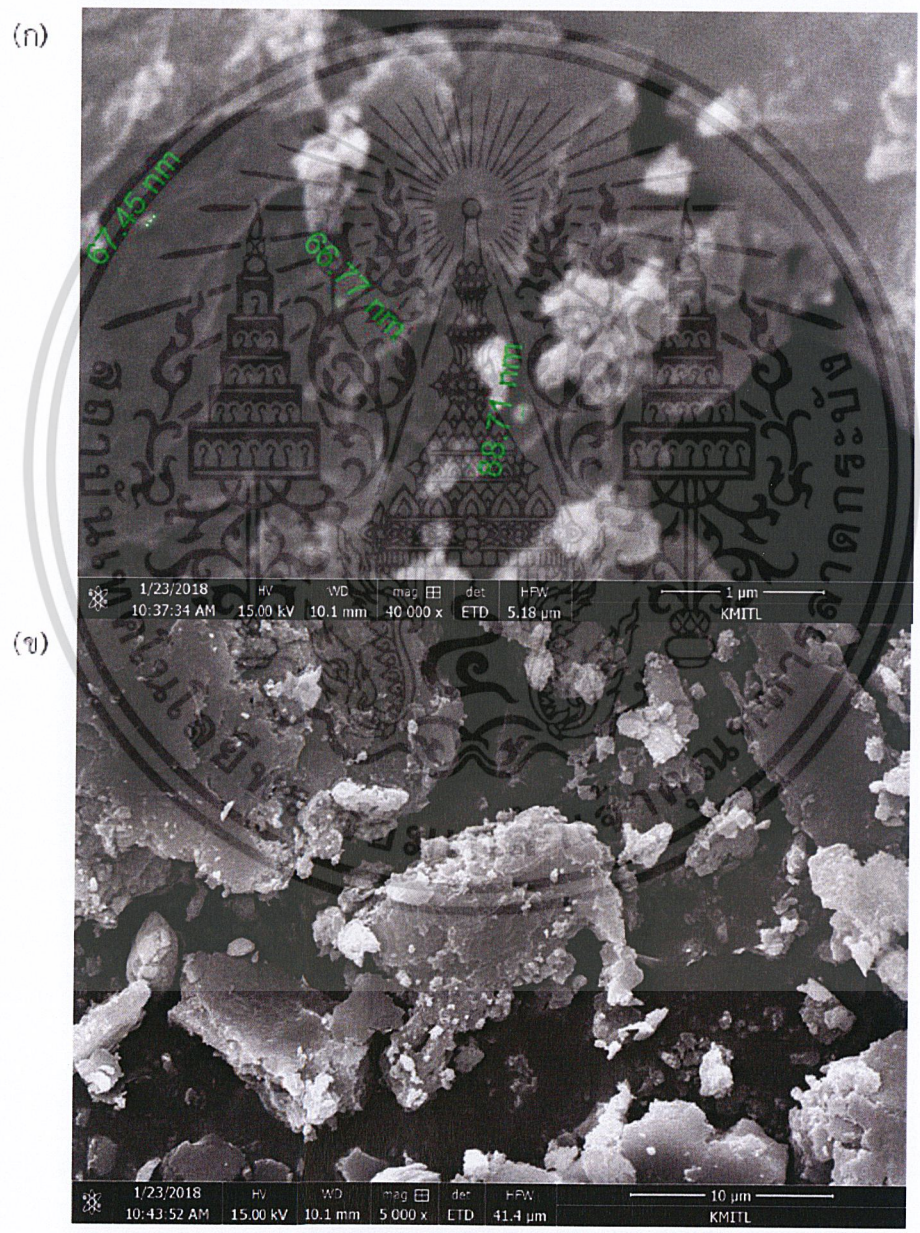
รูปที่ 4.5 (ก) การดูดกลืนสเปคตรัมของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ (ข) การดูดกลืนสเปคตรัมของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

4.4 ผลการวิเคราะห์ลักษณะ ขนาด และธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

การวิเคราะห์ลักษณะและขนาดของอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคนาโนของเงิน ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และ 4.7 แสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนของเงินมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอจึงสามารถระบุถึงความเสถียรภาพของอนุภาคนาโนของเงินได้ (Sadeghi และ Gholamhoseinpoor, 2015) และอนุภาคนาโนของเงินจะมีลักษณะเป็นทรงกลม โดยอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 74.31 และ 14.21 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความ

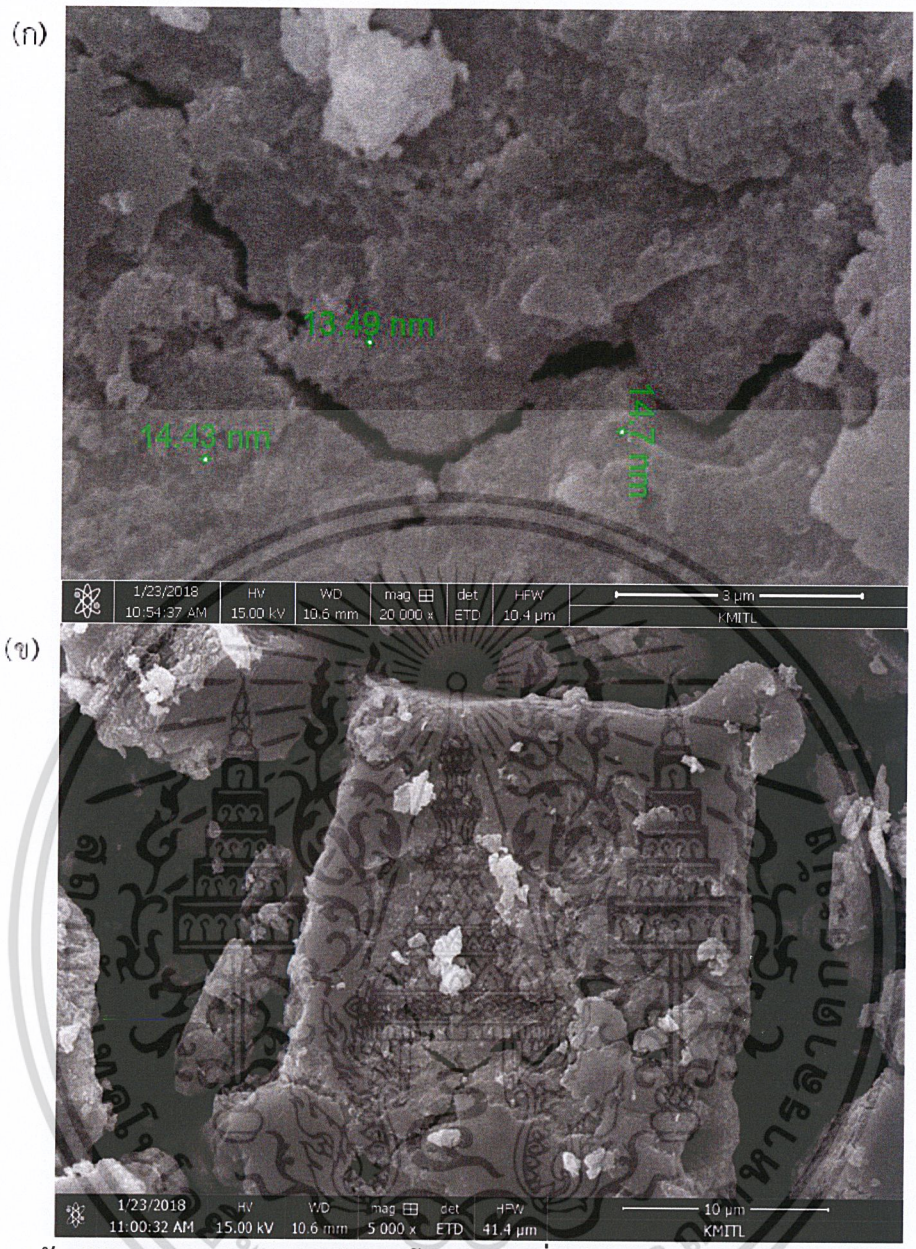
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีขนาดที่ใหญ่กว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และพบว่าขนาดของอนุภาคนาโนที่นำไปประยุกต์ใช้ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง 1–100 นาโนเมตร ซึ่งเป็นระดับขนาดที่มีความน่าสนใจทางนาโนเทคโนโลยีเป็นอย่างมาก (Dahl, Mqddux และ Hutchison, 2007) นอกจากนี้มีงานวิจัยได้ศึกษาการใช้เส้นใยของเห็ดถั่งเช่าสีทองในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน พบว่าเมื่อนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope: TEM) อนุภาคนาโนของเงิน มีรูปร่างเป็นทรงกลมและมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 15 นาโนเมตร (Wang และคณะ, 2016) ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการทดลองของผู้วิจัย



รูปที่ 4.6 ลักษณะและขนาดของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) ที่กำลังขยาย 40000 เท่า (ข) ที่กำลังขยาย 5000 เท่า

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

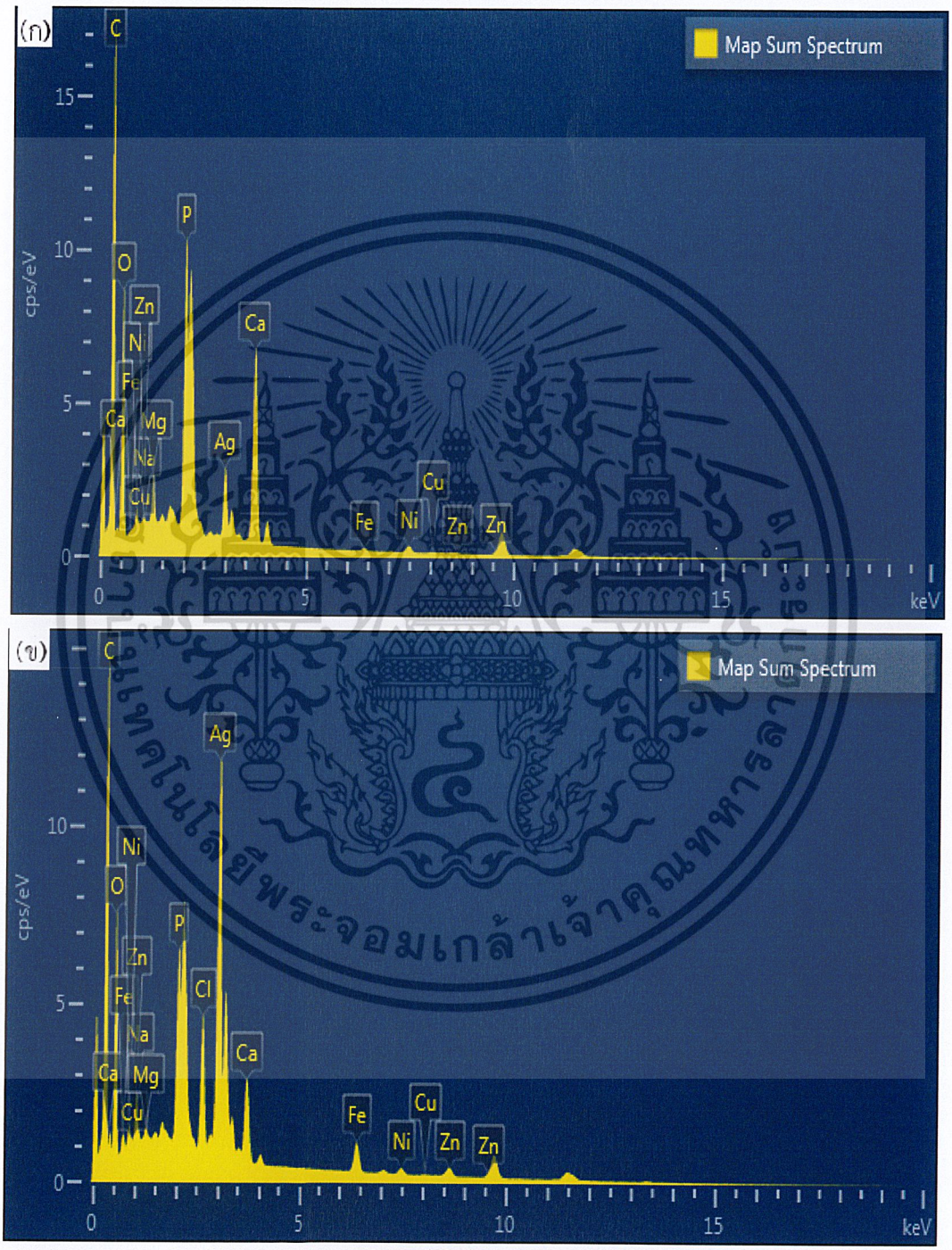


รูปที่ 4.7 ลักษณะและขนาดของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ก) ที่กำลังขยาย 20000 เท่า (ข) ที่กำลังขยาย 5000 เท่า

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุต่างๆ ในอนุภาคนาโนของเงินโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังแสดงในรูปที่ 4.8 และ 4.9 เป็นการศึกษาเพื่อหาชนิดและปริมาณของธาตุที่อยู่ในอนุภาคนาโนของเงิน โดยอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ พบปริมาณธาตุคาร์บอนสูงที่สุดร้อยละ 23.09 และ 20.73 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 เนื่องจากแผ่นเทปคาร์บอนที่นำมาติดอนุภาคนาโนของเงินเพื่อนำไปศึกษาลักษณะขนาด และธาตุต่างๆ เมื่อนำไปศึกษาหาปริมาณธาตุแล้วจึงทำให้พบธาตุคาร์บอนอยู่ในปริมาณมาก สำหรับปริมาณธาตุซิลเวอร์ของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบอยู่ที่ร้อยละ 2.78 ซึ่งน้อยกว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบอยู่ที่ร้อยละ 13.36 รองจากธาตุคาร์บอน ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สอดคล้องกับงานวิจัยการศึกษาความคงตัวและการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินโดยใช้สารสกัดจาก *Ziziphora tenuior* (*Zt*) ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเมื่อนำอนุภาคนาโนเงินที่สังเคราะห์ได้มาวิเคราะห์ธาตุต่างๆ มีปริมาณธาตุซิลเวอร์ของอนุภาคนาโนของเงินที่สูงเช่นกัน (Sadeghi และ Gholamhoseinpoor, 2015)



รูปที่ 4.8 ธาตุต่างๆ ของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจาก (ก) สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์ (ข) สารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณธาตุๆ ของอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์

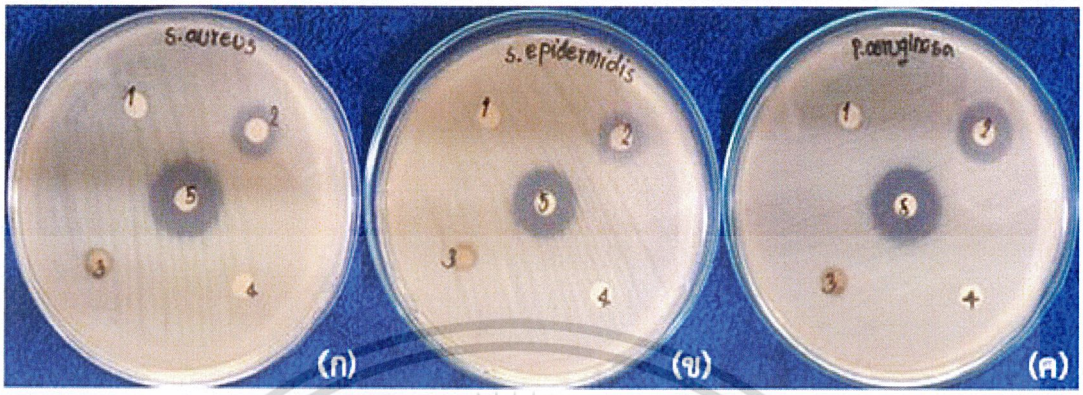
ธาตุ	ร้อยละของน้ำหนัก AgNPs ที่เตรียมจาก $AgNO_3$ 1 mM	ร้อยละของน้ำหนัก AgNPs ที่เตรียมจาก $AgNO_3$ 10 mM
คาร์บอน (C)	23.09	20.73
ออกซิเจน (O)	66.74	59.00
โซเดียม (Na)	0.00	0.24
แมกนิเซียม (Mg)	0.71	0.16
ฟอสฟอรัส (P)	2.23	1.01
คลอรีน (Cl)	0.00	1.41
แคลเซียม (Ca)	3.69	1.40
เหล็ก (Fe)	0.13	1.36
นิเกิล (Ni)	0.51	0.41
ทองแดง (Cu)	0.12	0.10
สังกะสี (Zn)	0.00	0.82
เงิน (Ag)	2.78	13.36

4.5 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion

การทดสอบบริเวณที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (inhibition zone test) ด้วยวิธี agar disc diffusion โดยใช้แบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในการทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ได้ดี เนื่องจากได้มีศึกษากระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินที่ได้จากการสังเคราะห์ทางชีวภาพ พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่มีขนาดเล็ก จะมีความสามารถในการที่จะเข้าไปจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีมากขึ้น ซึ่งอนุภาคนาโนของเงินมีประจุบวก (Ag^+) เมื่อสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จะสามารถแพร่ประจุบวกไปเกาะตามผนังเซลล์และแทรกเข้าไปภายในเซลล์ของแบคทีเรียทำให้เกิดการการรวมตัวกันของ DNA ซึ่งเกิดเป็น DNA condensation และยังรบกวนการทำงานของการขนส่งสารเข้าออกระหว่างเซลล์ การหายใจระดับเซลล์ และหลังจากนั้นอนุภาคนาโนของเงินจะเกิดการสลายตัวและปลดปล่อย silver ion (Ag^+) ที่มีขนาดเล็กและจำนวนมากออกมายับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว (Rai และคณะ, 2009) แต่ในทางตรงกันข้ามอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์และสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง ไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากอาจใช้ความเข้มข้นของสารดังกล่าวน้อยเกินไปจึงส่งผลให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ สารละลายซิลเวอร์ไนเตรทซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงลบ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เพียงเล็กน้อย และสุดท้ายยาปฏิชีวนะเตตราไซคลิน ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงบวกสามารถยับยั้งการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าอนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ทางชีวภาพโดยใช้ดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนังได้ดี



รูปที่ 4.9 ผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion ของเชื้อแบคทีเรีย (ก) *Staphylococcus aureus* (ข) *Staphylococcus epidermidis* (ค) *Pseudomonas aeruginosa*

ในขณะเดียวกัน ได้ทำการเปรียบเทียบบริเวณที่มีการยับยั้งของอนุภาคนาโนของเงินโดยแบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนัง 3 ชนิด ซึ่งมีแบคทีเรียแกรมบวก (Gram Positive) 2 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* แบคทีเรียเป็นแกรมลบ (Gram Negative) 1 ชนิด คือ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคนาโนของเงินสามารถต้านแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบคือความหนาของชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ในผนังเซลล์ ดังนั้นผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการต้านเชื้อของอนุภาคนาโนของเงินลดลงอาจจะเกิดจากความหนาผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Wang และคณะ, 2016)

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้ง (มิลลิเมตร) ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคบนผิวหนังต่างๆ

เชื้อแบคทีเรีย	AgNPs ที่เตรียมจาก $AgNO_3$ 1 mM	AgNPs ที่เตรียมจาก $AgNO_3$ 10 mM	$AgNO_3$	สารสกัด	ยาปฏิชีวนะ
S. aureus	-	14.53 ± 0.96^{b}	7.30 ± 0.10^{b}	-	20.87 ± 0.75^{a}
S. epidermidis	-	15.27 ± 0.90^{b}	7.13 ± 0.15^{b}	-	20.53 ± 0.40^{a}
P. aeruginosa	-	17.37 ± 0.75^{a}	8.03 ± 0.05^{a}	-	21.97 ± 0.05^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษในคอลัมน์ที่ต่างกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนของเงินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินที่แตกต่างกัน คือ 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9 และ 0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ได้ คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งสามารถสังเกตได้จากความขุ่นของอาหาร ถ้าหากอาหารมีลักษณะขุ่นเมื่อเทียบกับตัวควบคุมคืออาหารเหลว NB แสดงว่าเชื้อมีการเจริญเติบโต และถ้าอาหารมีลักษณะใสเมื่อเทียบกับตัวควบคุมคืออาหารเหลว NB แสดงว่าเชื้อไม่มีการเจริญเติบโต ดังแสดงในรูปที่ 4.11

4.7 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ โดยนำหลอดที่ทำการทดสอบในหัวข้อ 4.6 ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดมาศึกษา พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง NA ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 เนื่องจากเชื้อถูกยับยั้งการเจริญเติบโตในขั้นตอนการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของอนุภาคนาโนของเงินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้

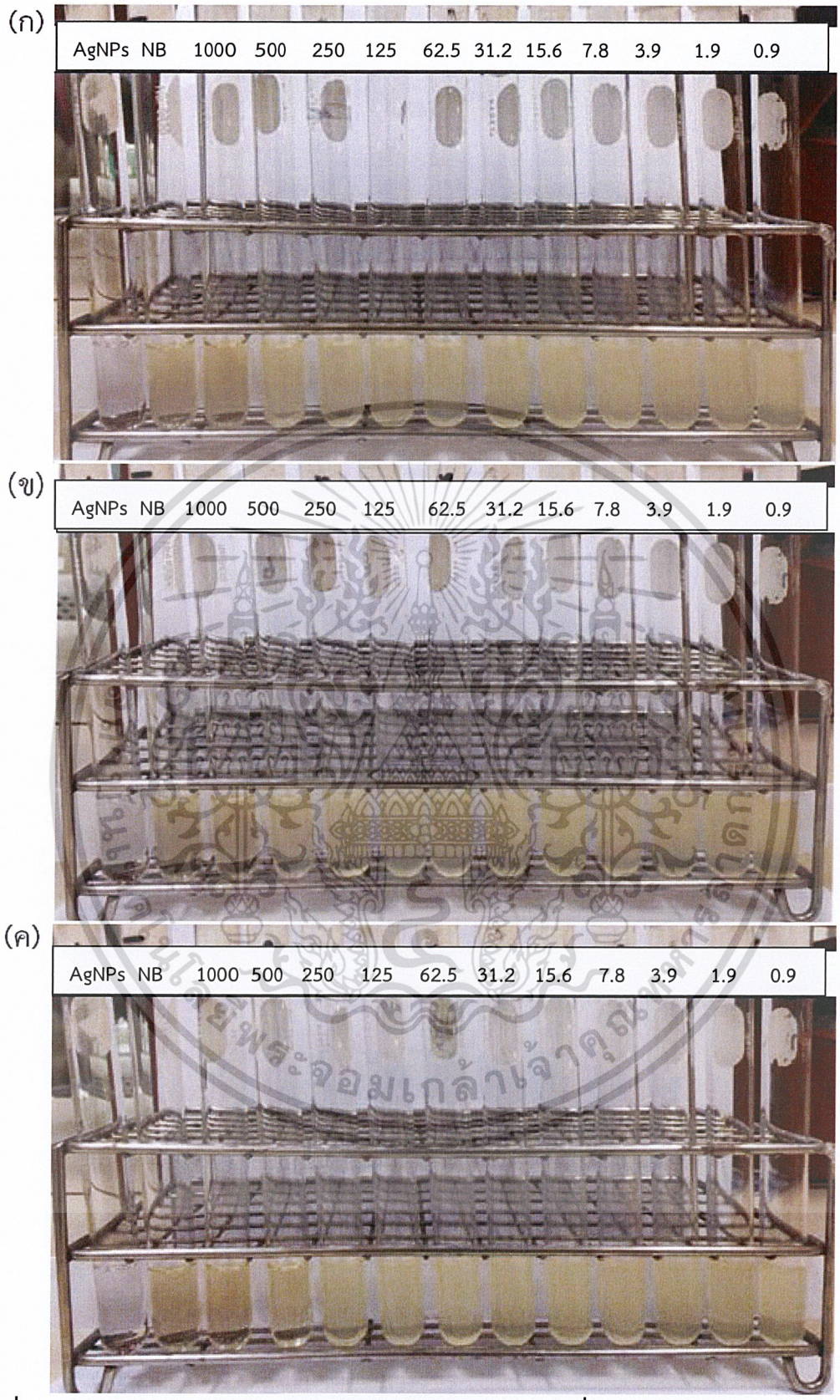
4.8 ผลการนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่เพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดลองการนำอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพไปใช้ในการทำสบู่เพื่อยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรียพบว่าสบู่ที่ได้นั้นมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ที่ 5.5 ซึ่งเป็นระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อผิวหรือทำลายชั้นไขมันของผิว (วลัยอร และอาภรณ์, 2553) ลักษณะภายนอกของสบู่มีลักษณะเป็นก้อนไม่มีเนื้อเหลวหรือแตกหักง่าย ดังแสดงในรูปที่ 4.10 ไม่มีกลิ่นหืน และมีคุณสมบัติเฉพาะในบางกรณี เช่น สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากในขั้นตอนการทำสบู่ได้เติมอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปร้อยละ 4 ของน้ำหนักเบสสบู่กลีเซอรีนใส



รูปที่ 4.10 ลักษณะภายนอกของสบู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ผลของความเข้มข้นของอนุภาคนาโนเงินสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (ก) *Staphylococcus aureus* (ข) *Staphylococcus epidermidis* (ค) *Pseudomonas aeruginosa*

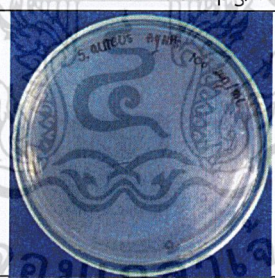
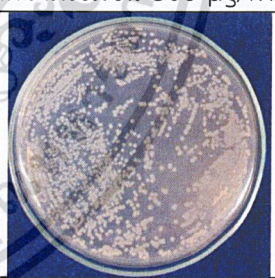
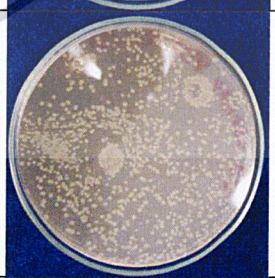
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมล.)	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*P. aeruginosa*
1000	-	-	-
500	+	+	-
250	+	+	+
125	+	+	+
62.5	+	+	+
31.2	+	+	+
15.6	+	+	+
7.8	+	+	+
3.9	+	+	+
1.9	+	+	+
0.9	+	+	+

หมายเหตุ : "-" หมายถึง เชื้อไม่เจริญเติบโต และ "+" หมายถึง เชื้อเจริญเติบโต โดยจะมีตัวควบคุม คือ อาหารเหลว NB

ตารางที่ 4.4 ผลการหาความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้

เชื้อแบคทีเรีย	อนุภาคนาโนเงินสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL	อนุภาคนาโนเงินสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL
S. aureus		
S. epidermidis		
P. aeruginosa		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินโดยใช้สารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย เมื่อนำมาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในดอกเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง ผลที่ได้จากการทดลองพบว่ามีปริมาณคอร์ไดเซปินเท่ากับ 4.11 มิลลิกรัมต่อ 1 กรัมน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของอนุภาคนาโนของเงิน พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 74.31 และ 14.21 นาโนเมตร ตามลำดับ สำหรับผลการดูดกลืนสเปคตรัม พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 418 และ 419 นาโนเมตร ตามลำดับ และเมื่อนำไปศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่าอนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดี และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *(P. aeruginosa)* ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *S. epidermidis)* โดยบริเวณที่มีการยับยั้งมีค่าเท่ากับ 17.37, 15.27 และ 14.53 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่อนุภาคนาโนของเงินที่เตรียมจากสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 มิลลิโมลาร์และสารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ และเมื่อนำอนุภาคนาโนของเงินมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียพบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *S. epidermidis*) ได้ คือ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเชื้อแบคทีเรีย (*P. aeruginosa*) คือ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลองคาดว่าผลที่ได้จากศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปสู่งานวิจัยและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการดูแลการติดเชื้อที่ผิวหนัง เช่น การนำไปทำสบู่หรือครีมบำรุงผิว เป็นต้น อีกทั้งยังลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อ ช่วยเพิ่มมูลค่าและสนับสนุนการใช้สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง รวมทั้งกระบวนการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินโดยใช้สารสกัดจากดอกเห็ดถั่งเช่าสีทอง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในโครงงานพิเศษฉบับนี้ได้ทำการศึกษาการสกัดสารในดอกของเห็ดถั่งเช่าสีทองเพื่อสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนของเงิน เนื่องจากสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทองมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นควรศึกษาสารตัวอื่นๆ ในเห็ดถั่งเช่าสีทอง เพื่อหาความจำเพาะของสารแต่ละชนิด และนำไปสังเคราะห์เป็นอนุภาคนาโนของเงินสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

2. ในโครงงานพิเศษฉบับนี้ได้ทำการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงินที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 14.21 นาโนเมตร ซึ่งได้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้กล่าวว่าหากอนุภาคนาโนของเงินมีขนาดเล็กก็จะทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ดีด้วย ดังนั้นควรจะทำการศึกษาการสังเคราะห์อนุภาคนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โนของเงินให้มีขนาดที่เล็กลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด

3. ในโครงงานพิเศษฉบับนี้ได้ศึกษาการทำสบู่เพื่อนำใช้ในการดูแลการติดเชื้อที่ผิวหนัง ดังนั้นควรศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสบู่ และการทำผลิตภัณฑ์ตัวอื่น เช่นครีมทางผิว เพื่อช่วยลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อ ช่วยเพิ่มมูลค่าและสนับสนุนการใช้สารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จารุวรรณ ฤทธิ์เดช ไอยรดา จันทร์โสม ถาวร วินิจสานันท์ หนึ่งฤทัย ธาราวัชรศาสตร์ และประภาพรรณ ซอหะซัน. 2558. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดถั่งเช่าสีทอง. วิทยาศาสตร์เกษตร 46 (3): 703.

ชลิดา อนุพันธ์. 2558. ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากมะสัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยราชภัฏกาญจนบุรี, กาญจนบุรี.

ธนภพ โสตรโยม. 2558. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย *Echerichia coli* และ *Salmonella* spp. ของสารสกัดจากหอมหัวใหญ่. โครงการวิจัย. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร, กรุงเทพมหานคร.

ธัญญา ทะพิงค์แก. 2555. เห็ดถั่งเช่า.(ออนไลน์). Available :http://www.facagri.cmru.ac.th/2013/wp-content/uploads/2015/02/poster-cordyceps. (สืบค้นวันที่ 13 มีนาคม 2561).

ธีรวุฒิ หวังอำนวยพร และรัชนี ไสยประจง. 2550. ความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระของพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. รายงานการวิจัยนี้ได้รับทุนส่งเสริมงานวิจัยจากมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย, กรุงเทพมหานคร.

พวงรัตน์ ขจิตวิทยานุกูล และจิรภทร์ อนันต์ภัทรชัย. 2555. นาโนซิลเวอร์ (Nano-Ag). (ออนไลน์). Available : http://web.eng.nu.ac.th/eng2012/ceri/nanodatabase/info2.php?cat_id=8&p_id=235. (สืบค้นวันที่ 13 มีนาคม 2561).

รัชฎาวรรณ เดชมณี และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2548. แถบ Thin-layer Chromatography ของสารทุติยภูมิที่ ผลิตโดย *Bacillus firmus* และการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*. รายงานการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 1-4 กุมภาพันธ์ 2548. หน้า 313 -320.

วลัยอร ปรัชญพฤทธิ์ และอาภรณ์ บุรีธาร. 2553. ค่าความเป็นกรด-ด่างของผิวหนังหลังล้างด้วยสบู่เหลว น้ำประปา และน้ำกลั่น ณ เวลาต่างๆ. วารสารกรมการแพทย์. 35 (2): 86-93.

วิโรจน์ แก้วเรือง. 2556. ถั่งเฉ้าไหมไทย. (ออนไลน์). Available : https://www.gotoknow.org/Posts/552691. (สืบค้นวันที่ 13 มีนาคม 2561).

ศิวาพร ศิวาเวช . 2542. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สุกัลญา หลีแจ้ นาชนีน บากาสะแต วริยา อินตะมนต์ ชณิสา ก่อกิจไพศาล ธีรทัศน์ สุดสาย และอัมพรรัตน์ ประไพวงศ์. 2558. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดถั่งเช่าสีทองที่เพาะเลี้ยงบนข้าวไรซ์เบอรี่และข้าวหอมมะลิ. รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติ ณ มหาวิทยาลัยรังสิต. 24 เมษายน 2558. หน้า 210-217.

หยุด แช่มประเสริฐ. 2556. การเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง. การนำเสนอการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง. สระบุรี.

Alexander J.M., Arlene H.S. 2010. Infectious diseases. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th edition. Philadelphia: Elsevier pp.357-380.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bitsori M., Maraki S., Koukouraki S. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infec tion in children: risk factors and outcomes. Journal of Urology. 187: 260-4.

Byung-Joo Lee, Mi-Ae Lee, Yong-Gyun Kim, Kwang-Won Lee, Young-Sang Choi, Byung-Eui Lee and Ho-Yeon Song. 2013. Cultural characteristics of *C. militaris* strain 'Yedang 3'on various media and nutritional conditions. Journal.

C. Nordqvist. 2011. What Is Body Odor (B.O.)? What Causes Body Odor. (Online). Avai lable : http://www.vali-tech.net/home/article-read.php?ArticleId=9.

Cruz D., P.L. Fale, A. Mourato, P.D. Vaz, M.L. Serralheiro, A.L. Lino. 2010. Preparation and physicochemical characterization of Ag nanoparticles biosynthesized by *Lippia citriodora* (Lemon Verbena). Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 81: 67-73.

Dahl J.A., Maddux B.L. and Hutchison, J.E. 2007. Toward greener nanosynthesis. Chemical Reviews (ACS Publications). 107: 2228-2269.

Das J., Paul Das, M., and Velusamy, P. 2013. *Sesbania grandiflora* leaf extract media-ted green synthesis of antibacterial silver nanoparticles against selected human pathogens. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 104: 265-270.

Dong J.Z., Ding, J., Yu P.Z., Lei, C., Zheng, J.X. and Wang, Y. 2013. Composition and distribution of the main active components in selenium-enriched fruit bodies of *Cordyceps militaris* link. Food Chemistry. 137: 164-167.

Gan P.P., and Li S. 2012. Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. Reviews in Environmental Science and Biotechnology. 11: 169-206.

Gu Y.X., Wang Z.S., Li S.X., Yuan Q.S. 2007. Effect of multiple factors on accumulation of nucleoside and bases in *Cordyceps militaris*. Food Chemistry. 102: 1304-1309.

John B. 1999. Experimental Staph Vaccine Broadly Protective in Animal Studies. National Institutes of Health. 301: 402-1663.

Lei H., Li Q., Chen Y., Wang X. and Zhou X. 2009. Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp. African Journal of Microbiology Research. 3: 957–961.

Lin L., Wang W., Huang J., Li, Q., Sun D., Yang X. and Wang Y. 2010. Nature factory of silver nanowires: Plant-mediated synthesis using broth of *Cassia fistula* leaf. Chemical Engineering Journal. 162: 852-858.

Linnaeus and Fries. 1818. *Cordyceps militaris*. (ออนไลน์). Available : https://inpn.mnhn .fr/Espece/cd_nom/46486/tab/taxo?lg=en. (สืบค้นวันที่ 13 มีนาคม 2561).

Li Yi., Guan M., Li J. 2015. Effects of cooking on the contents of adenosine and cordycepin in *Cordyceps militaris*. Procedia Engineering. 102: 485–491.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mafuné F., Kohno J.y., Takeda Y. and Kondow T. 2002. Full Physical Preparation of Size-Selected Gold Nanoparticles in Solution: Laser Ablation and Laser-Induced Size Control. The Journal of Physical Chemistry. 106: 7575-7577.

Nurmila Nari, Ahmad Suparmin, Tatsuya Kato, and Enoch Y. Park. 2016. Improved Cordycepin Production in a Liquid Surface Culture of *Cordyceps militaris* Isolated from Wild Strain. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 21: 595-600.

Rai M.K., Deshmukh S.D., Ingle A.P. and Gade A.K. 2009. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug - resistant bacteria. Journal of Applied Microbiology. 112: 841-852.

Rajakannu S., Shankar S. and Subramanian S. 2015. Original Research Article Biosynthesis of silver Nanoparticles using *Garcinia mangostana* Fruit Extract and their Antibacterial, Antioxidant Activity. International Journal of Current Microbiology. 4: 944–952.

Sadeghi B. and Gholamhoseinpoor F. 2015. A study on the stability and green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphora tenuior* (*Zt*) extract at room temperature. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 134: 310-315.

Shankar S.S., Rai A., Ahmad A. and Sastry M. 2004. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. Journal of Colloid and Interface Science. 275: 496- 502.

Shih I.L., Tsai K.L. and Hsieh C.Y. 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. Biochemical Engineering Journal. 33: 193-201.

Singh M., Kumar M., Kalaivani R., Manikandan S. and Kumaraguru, A.K. 2013. Metallic silver nanoparticle: a therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. Bioprocess and Biosystems Engineering. 36: 407-415.

Strateva T., Mitov I. 2011. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Annals of Microbiology. 61: 717-32.

Tuli H.S., Sharma A.K., Sandhu S.S., Kashyap D. 2014. Optimization of fermentation conditions for Cordycepin production using *Cordyceps militaris* 3936. Journal of Biological and Chemical Sciences. 1: 35-47.

Walker T.S., Bais H.P. and Déziel E. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interacttions. Pathogenicity, biofilm formation and root exudation. Plant Physiol. 134: 320–331.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น และไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wang L., Liu C.C., Wang Y.Y., Xu H., Su H., Cheng X. 2016. Antibacterial activities of the novel silver nanoparticles biosynthesized using *Cordyceps militaris* extract. Current Applied Physics. 16: 969-973.

Wen T.C., Li M.F., Kang J.C., Kevin D.H. 2014. Optimization of Solid-state Fermentation of fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris*. Chiang Mai Journal of Science. 41: 858-872.

Zielinska A., Skwarek E., Zaleska A., Gazda M. and Hupka J. 2009. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. Procedia Chemistry. 1: 1560-1566.

Yi Z.L., Huang W.F., Yan R., Eugen O., Zhou G.F., Sheng P., Wang X.J., Li H.H., 2014. LED lights increase bioactive substances at low energy costs in culturing fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. Scientia Horticulturae. 175: 139–143.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหาร

1. สูตรอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar เสริมไข่ไก่ (ดัดแปลงจากสูตรลุงหยุด)

ตารางภาคผนวก ก-1 สูตรอาหารแข็ง PDA เสริมไข่ไก่

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
มันฝรั่ง	200
ข้าวโพดอ่อน	50
กลูโคส	20
ไข่ไก่	50
ผงวุ้น	20
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ขั้นตอนการทำอาหารเพาะเลี้ยง

1. นำมันฝรั่งไปล้างน้ำให้สะอาดและปอกเปลือก นำมาหั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ชั่งมันฝรั่งที่หั่นแล้วให้ได้ 200 กรัม
2. นำข้าวโพดอ่อนมาปอกเปลือกออกล้างให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กหนาประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งข้าวโพดอ่อนที่หั่นแล้วให้ได้ 50 กรัม
3. ต้มน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เมื่อน้ำเดือดให้ใส่มันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนที่ชั่งไว้ลงไปจับเวลา 20 นาที
4. กรองเอาแต่น้ำด้วยผ้าขาวบาง
5. ใส่น้ำตาลกลูโคส ไข่ไก่ และผงวุ้นรวมกันในน้ำมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อน แล้วคนส่วนผสมให้เข้ากัน
6. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร
7. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. สูตรอาหารเหลว Potato Dextrose Broth เสริมไข่ไก่ (ดัดแปลงจากสูตรลุงหยุด)

ตารางภาคผนวก ก-2 สูตรอาหารแข็ง PDB เสริมไข่ไก่

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
มันฝรั่ง	200
ข้าวโพดอ่อน	50
กลูโคส	20
ไข่ไก่	50
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการทำอาหารเพาะเลี้ยง

1. นำมันฝรั่งไปล้างน้ำให้สะอาดและปอกเปลือก นำมาหั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ชั่งมันฝรั่งที่หั่นแล้วให้ได้ 200 กรัม
2. นำข้าวโพดอ่อนมาปอกเปลือกออกล้างให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กหนาประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งข้าวโพดอ่อนที่หั่นแล้วให้ได้ 50 กรัม
3. ต้มน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เมื่อน้ำเดือดให้ใส่มันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนที่ชั่งไว้ลงไปจับเวลา 20 นาที
4. กรองเอาแต่น้ำด้วยผ้าขาวบาง
5. ใส่น้ำตาลกลูโคส และไข่ไก่ รวมกันในน้ำมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อน แล้วคนส่วนผสมให้เข้ากัน
6. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร
7. เทอาหารลงขวดรูปชมพู ขวดละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. สูตรอาหาร Potato Dextrose Broth เสริมไข่ไก่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอน (ดัดแปลงจากสูตรลุงหยุด)

อาหารเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ข้าวไรซ์เบอร์รี่และสูตรอาหาร PDB เสริมไข่ไก่ โดยจะเตรียมทั้ง 2 ส่วนแยกออกจากกัน

ส่วนที่ 1

ตารางภาคผนวก ก-3 น้ำหนักข้าวไรซ์เบอร์รี่กรัมต่อขวด

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อขวด)
ข้าวไรซ์เบอร์รี่	60

ส่วนที่ 2

ตารางภาคผนวก ก-4 สูตรอาหารเหลว PDB เสริมไข่ไก่

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
มันฝรั่ง	200
ข้าวโพดอ่อน	50
กลูโคส	20
ไข่ไก่	50
ดักแด้	30
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ขั้นตอนการทำอาหารเพาะเลี้ยง

1. นำมันฝรั่งไปล้างน้ำให้สะอาดและปอกเปลือก นำมาหั่นเป็นลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ชั่งมันฝรั่งที่หั่นแล้วให้ได้ 200 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. นำข้าวโพดอ่อนมาปอกเปลือกออกล้างให้สะอาดแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กหนาประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งข้าวโพดอ่อนที่หั่นแล้วให้ได้ 50 กรัม

3. ต้มน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เมื่อน้ำเดือดให้ใส่มันฝรั่งและข้าวโพดอ่อนที่ชั่งไว้ลงไปจับเวลา 20 นาที

4. กรองเอาแต่น้ำด้วยผ้าขาวบาง

5. ใส่น้ำตาลกลูโคส ไข่ไก่และดักแด้ รวมกันในน้ำมันฝรั่งและข้าวโพดอ่อน แล้วคนส่วนผสมให้เข้ากัน

6. ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

7.ชั่งข้าวไรซ์เบอร์รี่ลงในขวดเพาะเลี้ยง ขวดละ 60 กรัม แล้วนำส่วนผสมตามข้อ 6 ใส่ลงไปในแต่ละขวด ขวดละ 40 มิลลิลิตร

8. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

4. สูตรอาหาร Nutrient Agar

ตารางภาคผนวก ก-5 สูตรอาหารแข็ง NA

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
Beef extract	3
เปปโตน	5
ผงวุ้น	15
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5. สูตรอาหาร Nutrient Broth

ตารางภาคผนวก ก-6 สูตรอาหารเหลว NB

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
Beef extract	3
เปปโตน	5
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

6. สูตรอาหาร Mueller Hinton Agar

ตารางภาคผนวก ก-7 สูตรอาหารแข็ง MHA

วัตถุดิบ	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
Beef extract	2
Acid Hydrolysate of Casein	17.5
แป้ง	1.5
ผงวุ้น	17
น้ำกลั่น	ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ขั้นตอนและรูปภาพการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

1.ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองด้วยหนอนในขวดแก้ว

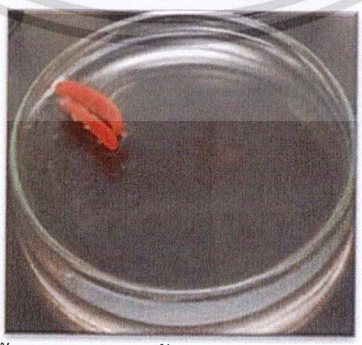


1.1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีหนอนไหมร้อยละ 100 จนเกิดเป็นดอกเห็ด

2. ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อในอาหารแข็ง PDA เสริมไข่ไก่



2.1 ดอกเห็ดที่ได้มาทำการฆ่าเชื้อด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นเวลา 5 นาที

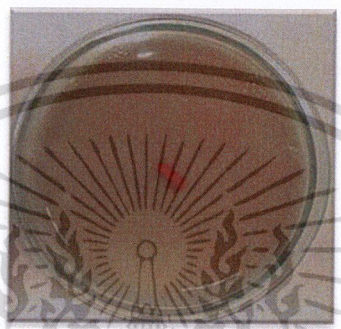


2.2 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 2 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2.3 ตัดเป็นชิ้นๆความยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร



2.4 นำชิ้นส่วนที่ตัดแล้วไปวางบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร PDA จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

3. ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริมไข่ไก่

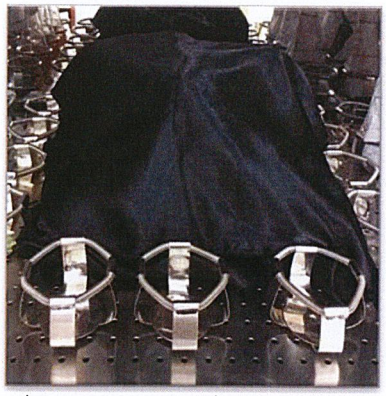


3.1 นำหัวเชื้อเริ่มต้นจากอาหารแข็ง PDA เสริม มาค็อกจำนวน 3 ชิ้น



3.2 นำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

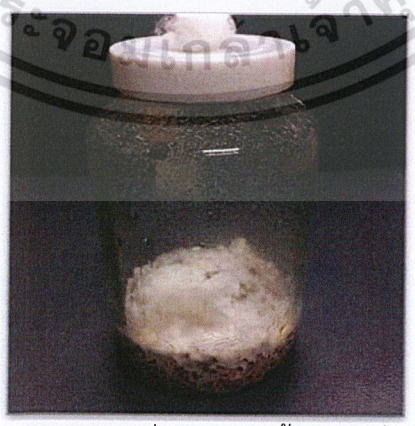


3.3 จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มืดในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

4. ขั้นตอนการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลว PDB เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอน



4.1 ทำการถ่ายหัวเชื้อในอาหารเหลว PDB เสริม ร้อยละ 5 ลงไปตรงกลางขวดอาหารแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอน



4.2 จากนั้นนำไปบ่มในที่มืดโดยใช้ผ้าดำคลุมที่ขวดเพาะเลี้ยงอีกทีที่อุณหภูมิ 18-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 14 วัน เส้นใยจะเจริญเต็มขวดเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



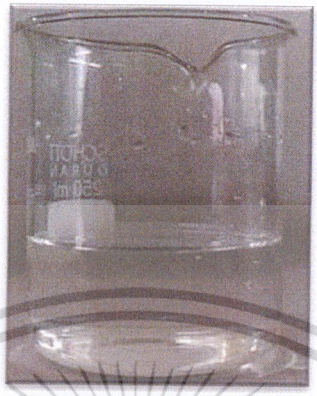
4.3 จากนั้นทำการเปิดดอกโดยให้แสงกับเส้นใย รอจนเกิดเป็นดอกเห็ดมีความสูงประมาณ 1 เซนติเมตร



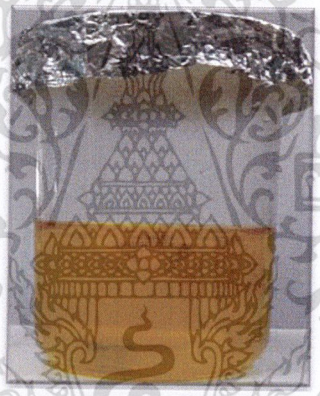
4.4 นำไปเลี้ยงต่อจนครบเวลาประมาณ 45 วัน นับตั้งแต่วันที่ทำการเปิดดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
ขั้นตอนและรูปภาพการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน



1. นำบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ไปให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก



2. จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในบีกเกอร์

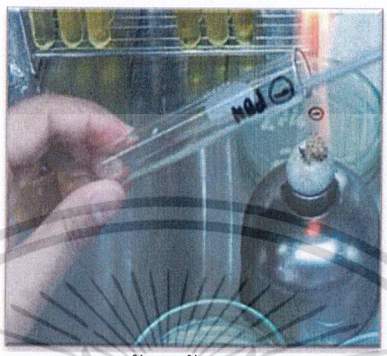


3.จากนั้นค่อยๆเติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 5 มิลลิลิตร โดยทำการกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของซิลเวอร์ไนเตรท เป็น 1 และ 10 มิลลิโมล

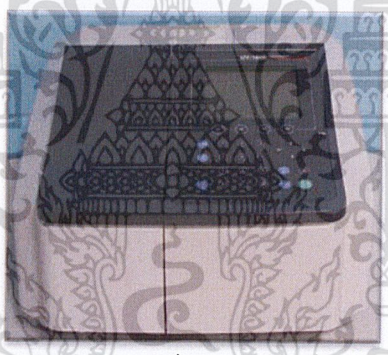
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ขั้นตอนและรูปภาพการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1.การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย



1.1 นำเชื้อแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.



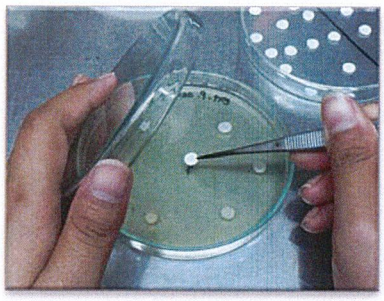
1.2 วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2.การทดสอบการยับยั้งเชื้อด้วยวิธี Agar disc diffusion



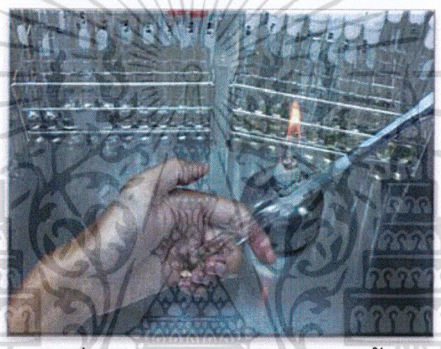
2.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้มาทำการ swab ให้ทั่วบนผิวอาหาร MHA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2.2 จากนั้นนำ paper disc วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration : MIC)



3.1 ทำการเติมอนุภาคนาโนของเงินที่เจือจางเป็นลำดับส่วน เชื้อแบคทีเรีย และอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth เติมลงไปจำนวนหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

4.การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal bactericidal concentration : MBC)



4.1 นำหลอดที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีความขุ่นทุกหลอดมา 0.1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



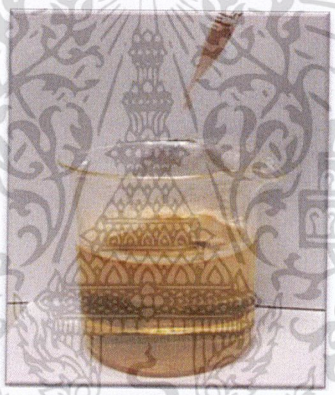
4.2 spread plate บนอาหาร NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

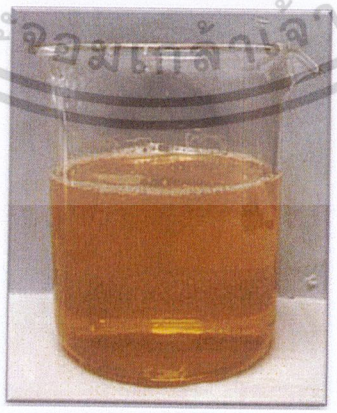
ภาคผนวก จ
ขั้นตอนและรูปภาพการทำสบู่



1. นำเบสสบู่กลีเซอรีนใสไปหลอมละลายในไมโครเวฟ

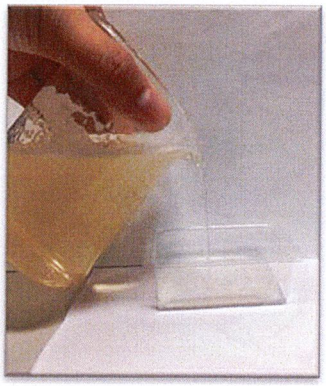


2. จากนั้นเติมอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพลงไปไม่เกินร้อยละ 4 ของน้ำหนักเบสสบู่กลีเซอรีนใส

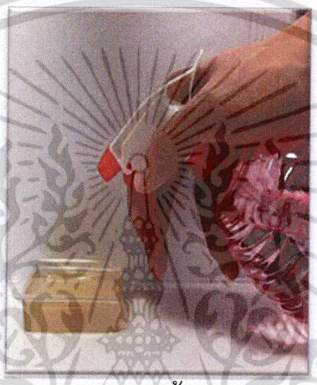


3. คนให้เข้ากัน หากเกิดฟองให้ใช้สเปรย์แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ฉีดบางๆ บนผิวหน้าเพื่อลดการเกิดฟอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



4. เทลงพิมพ์สบู่



5. ฉีดด้วยสเปรย์แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 บางๆ อีกครั้ง



6. รอจนแข็งจะได้สบู่จากอนุภาคนาโนของเงินสังเคราะห์ทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ
การวิเคราะห์และการคำนวณ

1.วิธีการคำนวณน้ำหนักแห้ง

1.ชั่งน้ำหนักถาดเปล่าที่อบแล้วบันทึกค่า

2.เก็บตัวอย่างและชั่งน้ำหนัก (น้ำหนักถาดเปล่าและน้ำหนักเห็ด)

3.นำไปอบแห้งแล้วบันทึกค่า

4.นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการดังนี้

น้ำหนักแห้ง = น้ำหนักถาดที่มีเห็ดแห้งหลังอบ – น้ำหนักถาดเปล่าหลังอบ

2.วิธีการคำนวณร้อยละความชื้น

1.ชั่งกระดาษฟรอยด์เปล่าหลังอบแล้วบันทึกค่า

2.ชั่งน้ำหนักตัวอย่างก่อนนำไปอบแห้ง บันทึกค่าและนำไปอบแห้ง

3.ชั่งน้ำหนักฟรอยด์พร้อมตัวอย่างหลังอบแห้ง

4.นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสมการดังนี้

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนอบ - น้ำหนักหลังอบ}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ}} \times 100$$

3.วิธีคำนวณสารละลายเข้มข้น (Stock Solution)

เตรียมสารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปิน 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินมา 0.002 กรัม ละลายในน้ำบริสุทธิ์สูง 2 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อมิลลิลิตร

1	กรัม	เท่ากับ	1000	มิลลิกรัม
0.001	กรัม	เท่ากับ	1	มิลลิกรัม
1	มิลลิกรัม	เท่ากับ	1000	ไมโครกรัม

ดังนั้น สารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปินความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x V_1 = 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 2000 ไมโครลิตร

$$V_1 = 200 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปินความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาณ 1800 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x V_1 = 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 2000 ไมโครลิตร

$$V_1 = 200 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปินความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 160 ไมโครลิตร และเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาตร 1840 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x V_1 = 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 2000 ไมโครลิตร

$$V_1 = 120 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปินความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 120 ไมโครลิตร และเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาตร 1880 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x V_1 = 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 2000 ไมโครลิตร

$$V_1 = 80 \text{ ไมโครลิตร}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นถ้าต้องการความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปินความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 80 ไมโครลิตร และเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาตร 1920 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการสารละลายความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 2 มิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x V_1 = 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 2000 ไมโครลิตร

$$V_1 = 40 \text{ ไมโครลิตร}$$

ดังนั้นถ้าต้องการความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องใช้สารละลายมาตรฐานคอร์ไดเซปินความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และเติมน้ำบริสุทธิ์สูงปริมาตร 1960 ไมโครลิตร

4.การหาปริมาณคอร์ไดเซปิน

จากผลการทดสอบปริมาณคอร์ไดเซปินมาตรฐาน โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูงจะได้สมการเส้นตรง y = ax+b (ดังรูปภาคผนวกที่ ฉ-1) เมื่อนำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากตารางภาคผนวกที่ ฉ-1 แทนลงในสมการที่ 1 เพื่อหาค่าปริมาณคอร์ไดเซปิน

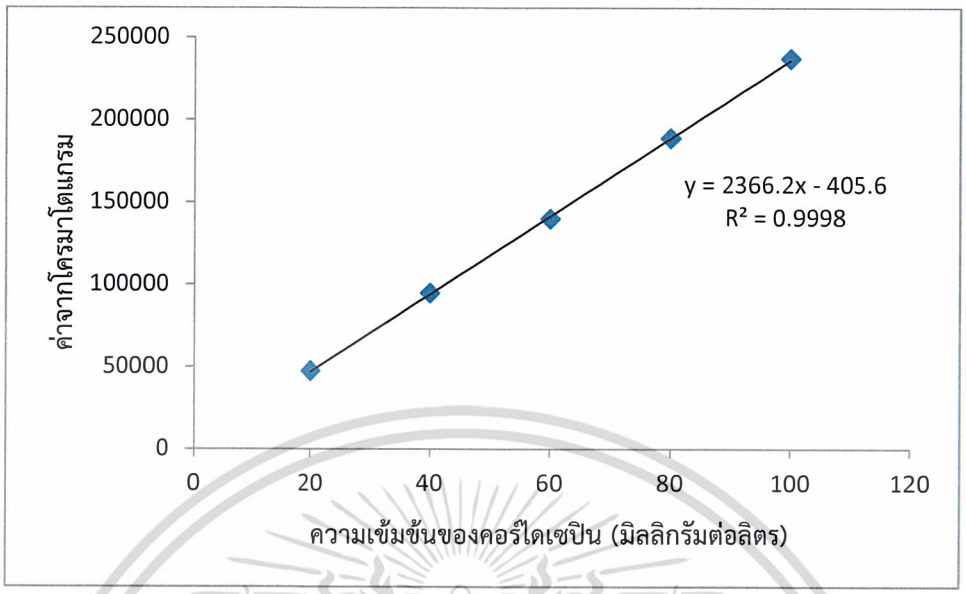
ตารางภาคผนวกที่ ฉ-1 ตารางแสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมของคอร์ไดเซปินในการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทอง

จำนวนซ้ำ	ค่าพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรมของคอร์ไดเซปิน
1	146795
2	145110
3	144626

หมายเหตุ ค่าโครมาโตแกรมที่อ่านได้จากเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูงของปริมาณคอร์ไดเซปินดูได้จากภาคผนวก ซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการคำนวณปริมาณคอร์ไดเซปิน



รูปภาคผนวกที่ ฉ-1 กราฟมาตรฐานคอร์ไดเซปิน ในการวิเคราะห์ด้วยการใช้ HPLC ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0, 20, 40, 60, 80 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำค่าโครมาโตแกรมที่ได้จากการสกัดตัวอย่างมาคำนวณหาปริมาณคอร์ไดเซปินโดยใช้สมการ ดังนี้

$$Y=2366.17x-405.406$$

โดย Y = ค่าจากโครมาโตแกรม

X = ความเข้มข้นของคอร์ไดเซปิน

ตัวอย่างเช่น

$$X = \frac{146795 - 405.406}{2366.17}$$

X = 61.868 มิลลิกรัมต่อลิตร

ใช้ตัวอย่างเห็ดต่อน้ำบริสุทธิ์สูง 1.5 กรัม : 100 มิลลิลิตร (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ความเข้มข้นของสารคอร์ไดเซปินที่ได้ 61.868 มิลลิกรัมต่อลิตร

ดังนั้น ใน 1000 มิลลิลิตร มีสาร 61.868 มิลลิกรัม

ถ้า 100 มิลลิลิตร มีสาร 6.1868 มิลลิกรัม

ดังนั้น ในตัวอย่างเห็ด 1.5 กรัม มีสาร 6.1868 มิลลิกรัม

ถ้าตัวอย่างเห็ด 1 กรัม มีสาร 4.1245 มิลลิกรัม

ดังนั้นความเข้มข้นของสารคอร์ไดเซปินในเห็ด 1 กรัม เท่ากับ 4.1245 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.การเตรียมสารเคมีและการคำนวณความเข้มข้นของสารต่างๆที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar disc diffusion

5.1 การคำนวณและการเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

$$M \times V = \frac{g}{M.W.}$$

$$g = M \times V \times M.W.$$

= 0.001 โมลต่อลิตร x 0.05 ลิตร x 169.87 กรัมต่อโมล

= 0.0085 กรัม

ดังนั้น การเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะต้องชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 0.0085 กรัม

5.2 การคำนวณและการเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

$$M \times V = \frac{g}{M.W.}$$

$$g = M \times V \times M.W.$$

= 0.01 โมลต่อลิตร x 0.05 ลิตร x 169.87 กรัมต่อโมล

= 0.0850 กรัม

ดังนั้น การเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะต้องชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 0.0850 กรัม

5.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้เข้ากัน

5.4 การเตรียมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ความเข้มข้น 2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

ชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 0.05 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้เข้ากัน

5.5 การเตรียมยาปฏิชีวนะเตตระไซคลิน ความเข้มข้น 3000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

ชั่งเตตระไซคลิน 0.06 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้เข้ากัน

5.6 การคำนวณและการเตรียมอนุภาคนาโนของเงินที่เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้น 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด 100 มิลลิลิตร มีเห็ด 1.5 กรัม ดังนั้นสารสกัด 10 มิลลิลิตร จะมีเห็ด 1.5 กรัม

ในการสังเคราะห์อนุภาคนาโนของเงิน ใช้สารสกัด 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และซิลเวอร์ไนเตรท 1 และ10 มิลลิโมลาร์

ดังนั้น ในสารสกัดผสมน้ำกลั่นรวม 60 มิลลิลิตร มีเห็ด 1.5 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าสารสกัดผสมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร มีเห็ด 0.025 กรัม

ดังนั้นความเข้มข้นของอนุภาคนาโนของเงินที่สังเคราะห์ได้คือ 0.025 กรัมต่อมิลลิลิตรหรือ 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.7 การคำนวณและการเตรียมอนุภาคนาโนของเงินที่เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 10 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ต้องการอนุภาคนาโนของเงินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จาก Stock ความเข้มข้น 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเตรียมโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x V_1 = 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x 10 มิลลิลิตร

$$V_1 = 0.4 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้น ทำการปิเปตอนุภาคนาโนของเงินจาก Stock มา 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำ 9.6 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.8 การคำนวณและการเตรียมสารสกัดจากเห็ดถั่งเช่าสีทอง ความเข้มข้น 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ในขั้นตอนการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ใช้เห็ด 1.5 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ต้องการเตรียมสารสกัดความเข้มข้น 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

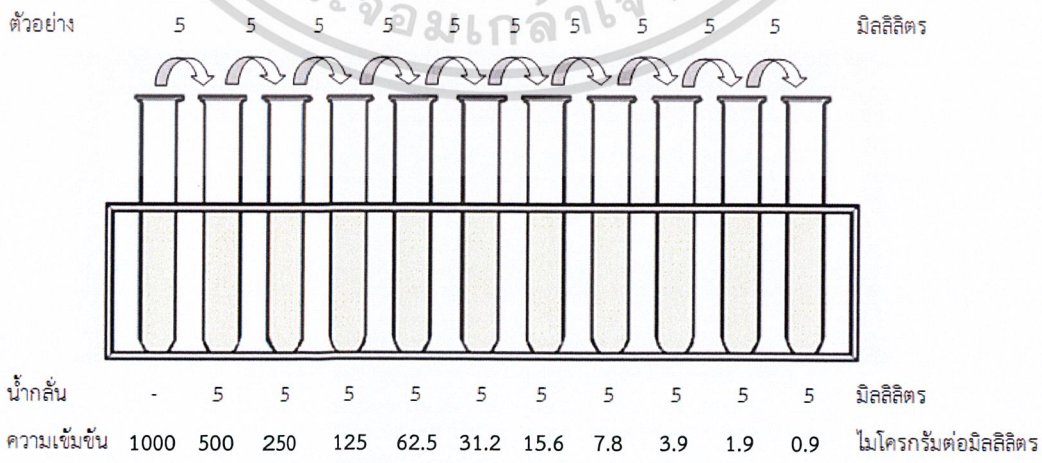
ดังนั้น ในสารสกัดผสมน้ำกลั่นรวม 60 มิลลิลิตร มีเห็ด 1.5 กรัม

ถ้าสารสกัดผสมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร มีเห็ด 0.025 กรัม

ดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัด คือ 0.025 กรัมต่อมิลลิลิตรหรือ 25000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6.การเจือจางอนุภาคนาโนของเงินเป็นลำดับส่วน

โดยจะทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9, 1.9 และ 0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร



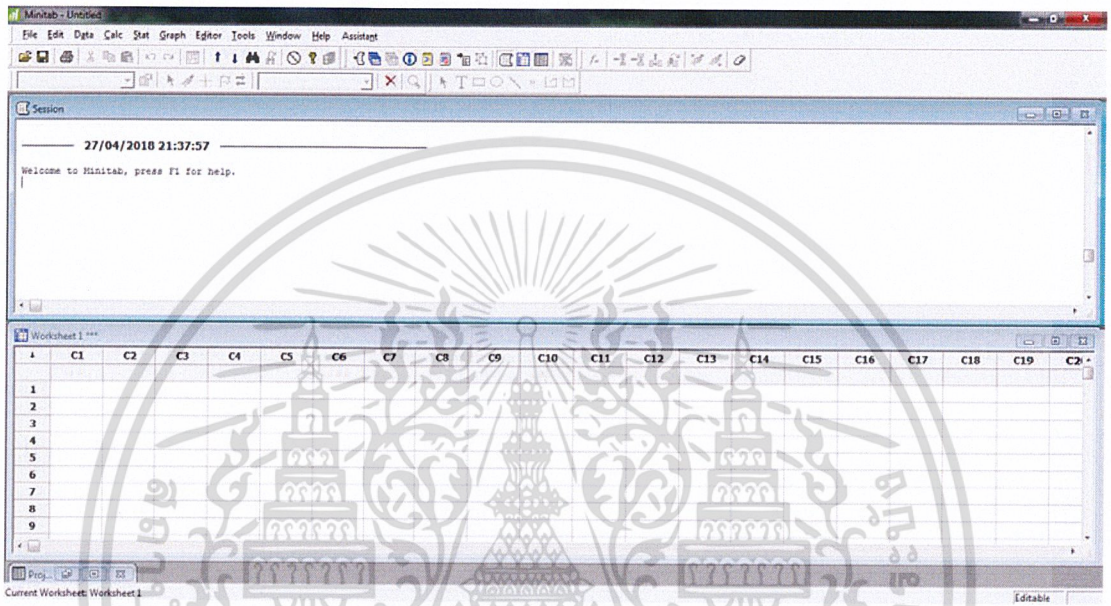
รูปภาคผนวก ฉ-2 การเจือจางอนุภาคนาโนของเงินเป็นลำดับส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

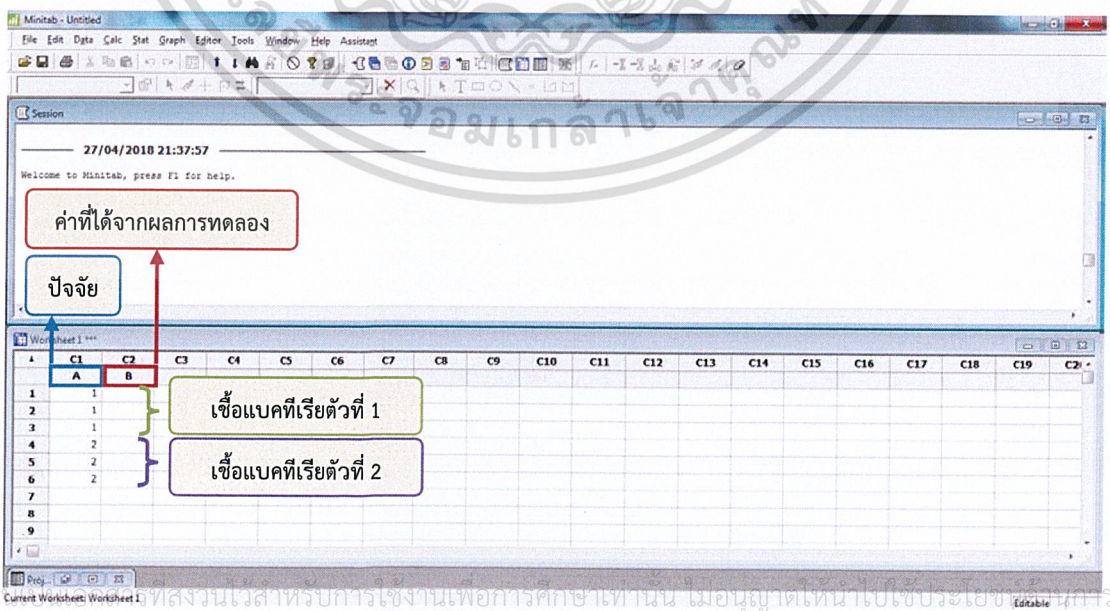
ภาคผนวก ช
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ขั้นตอนการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab 16

1.เปิดโปรแกรม Minitab 16

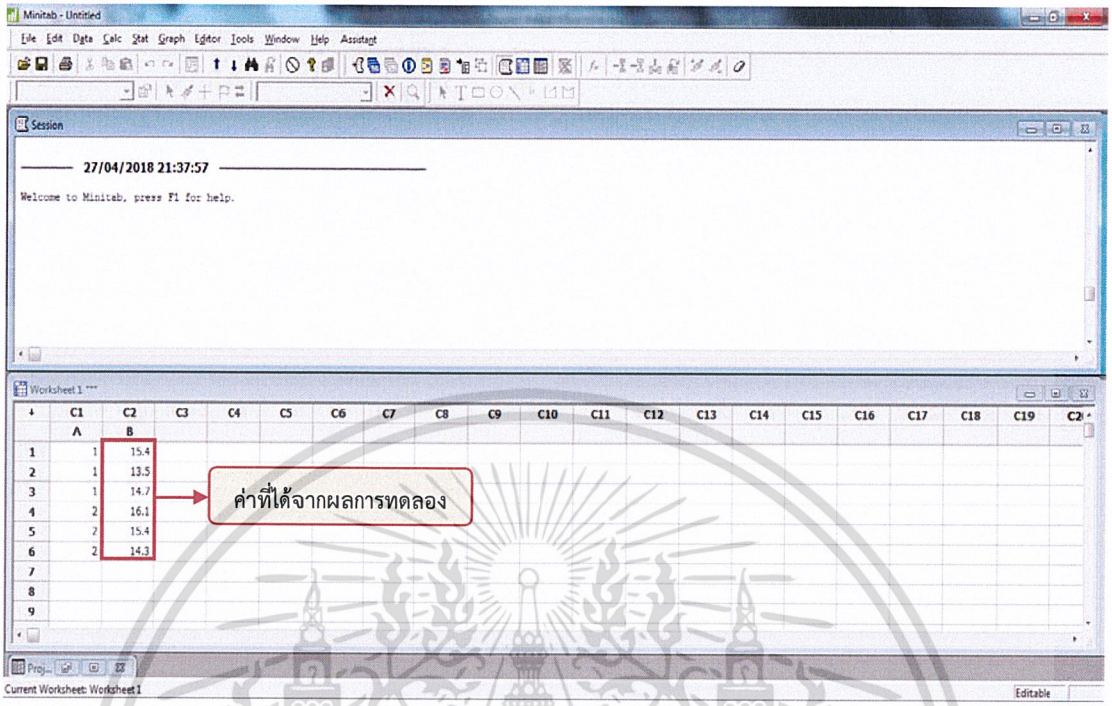


2.กำหนดตัวแปรในตารางโดยให้ A เป็นปัจจัย และ B เป็นค่าที่ได้จากผลการทดลองในรูปนี้จะกำหนดให้ A มี 2 ปัจจัย คือสูตรอาหารเสริมเปปโตนยีสต์สกัด (1) และสูตรอาหารเสริมไข่ไก่ (2) ซึ่งจะทำการทดลอง 3 ซ้ำดังรูป

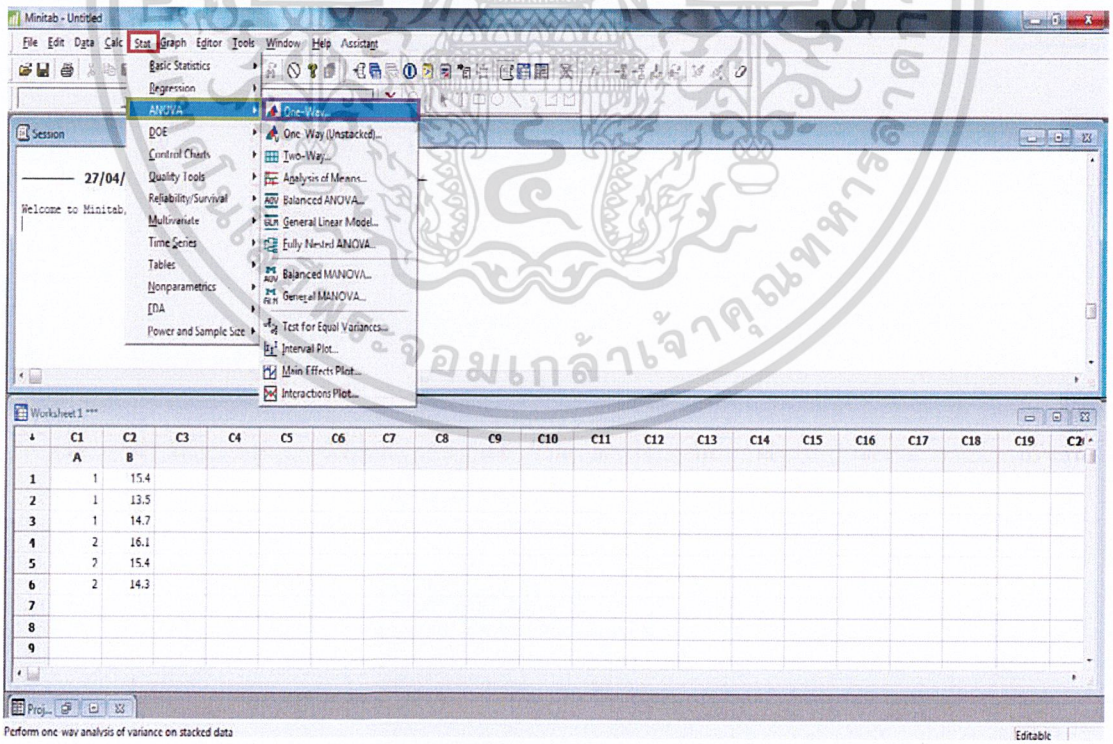


เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.หลังจากนั้นใส่ค่าผลการทดลองที่ได้ในแต่ละช้ำลงไปดังแสดงดังรูป

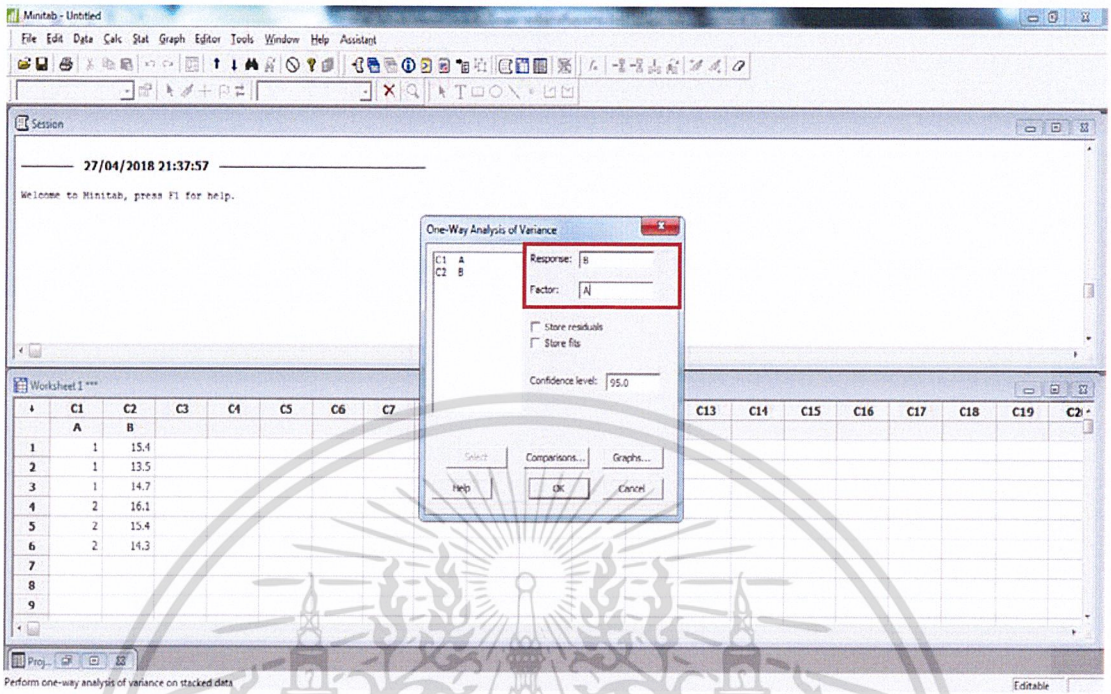


4.กด Stat » ANOVA » One – Way ตามลำดับ

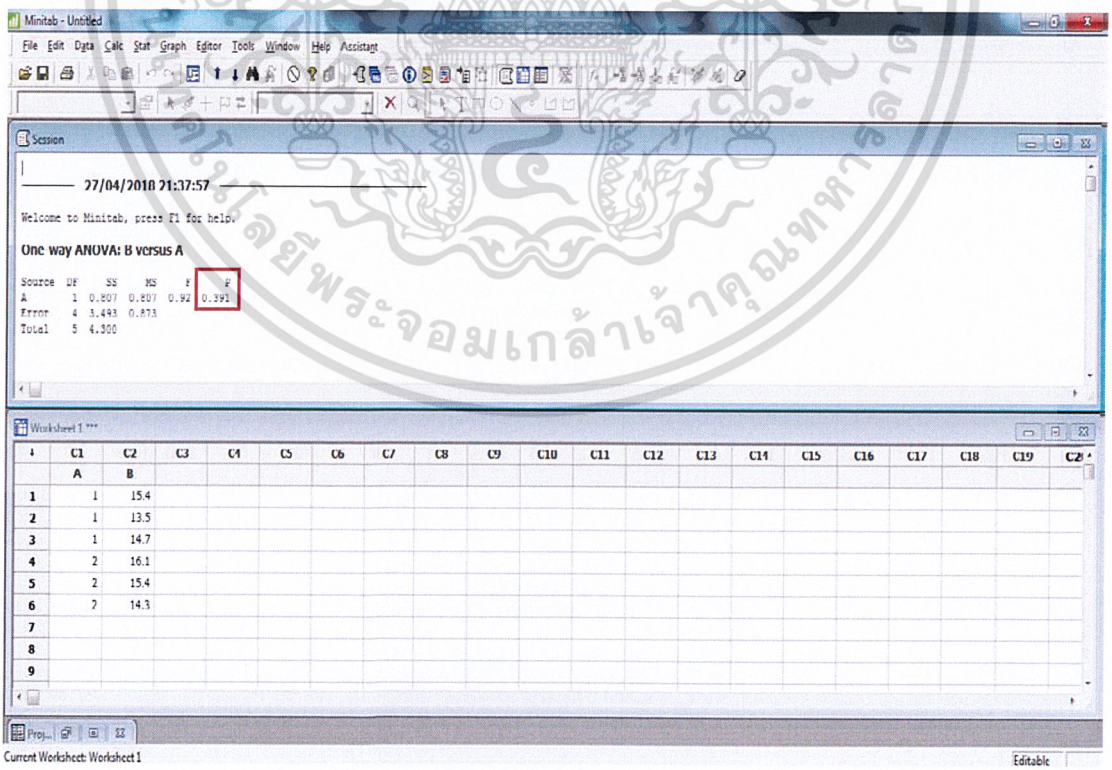


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.เมื่อขึ้นดังรูปให้ใส่ A ในช่อง Factor และใส่ B ในช่อง Response หลังจากนั้นกดตกลง



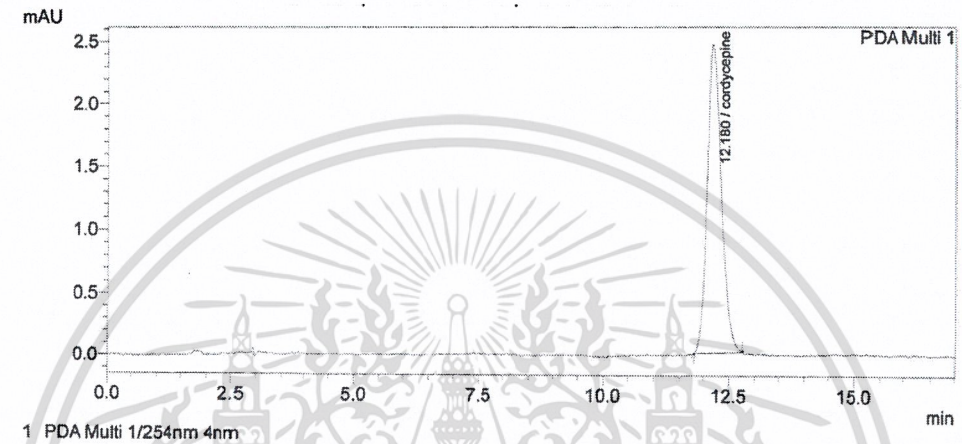
6.จะได้ค่าที่คำนวณได้จากโปรแกรม Minitab 16 ดังรูป ให้สังเกตจากค่า P ถ้าหากค่า $P \leq 0.05$ แสดงว่าผลการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ซ
ผลการทดลอง

1. โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 20, 40, 60, 80, 100



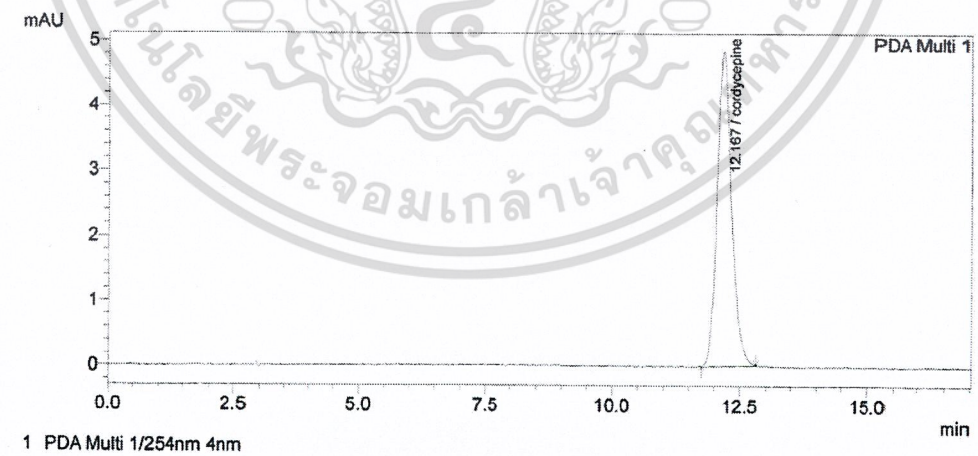
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1	cordycepine	12.180	47468	2440	1.278	0.000	20.000	mg/L
Total			47468	2440				

1.1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 20



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

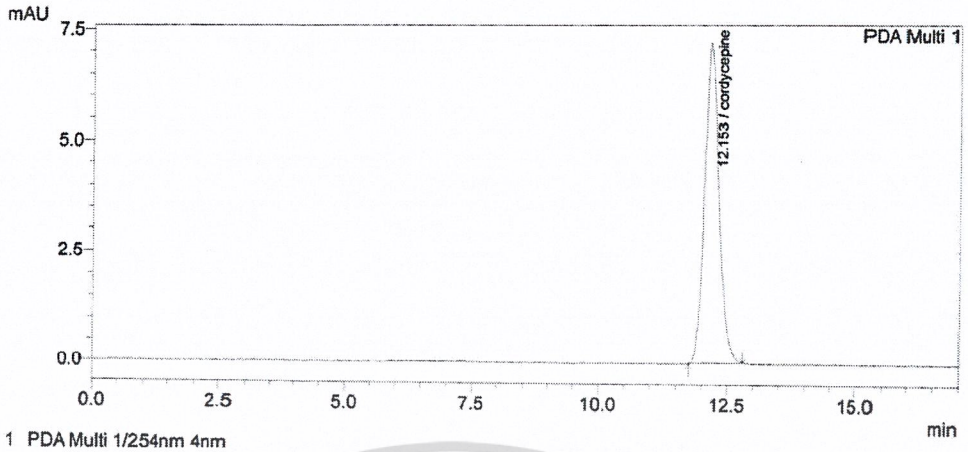
<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1	cordycepine	12.167	94665	4827	1.297	0.000	40.000	mg/L
Total			94665	4827				

1.2 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1	cordycepine	12.153	139893	7162	1.298	0.000	59.858	mg/L
Total			139893	7162				

1.3 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 60



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

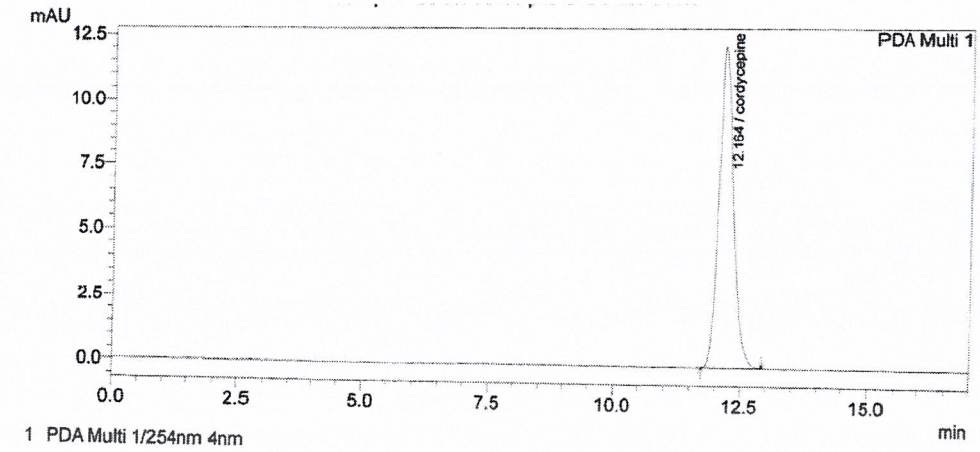
<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1	cordycepine	12.159	188760	9647	1.300	0.000	80.298	mg/L
Total			188760	9647				

1.4 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1	cordycepine	12.164	237038	12084	1.301	0.000	100.349	mg/L
Total			237038	12084				

1.5 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคอร์ไดเซปินที่ความเข้มข้นร้อยละ 100

2. โครมาโทแกรมแสดงพีคคอร์ไดเซปินของตัวอย่าง ในผลการทดลองหัวข้อที่ 4.2 การหาปริมารคอร์ไดเซปินด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถภาพสูง (HPLC)

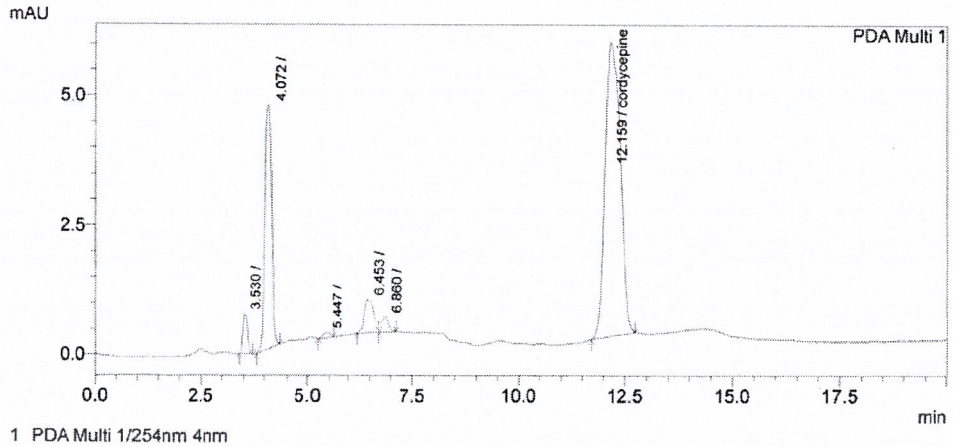


PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1		2.608	5874	348	0.813	0.000	0.000	
2		3.509	6337	708	1.367	2.701	0.000	
3		4.042	44413	4008	1.346	2.097	0.000	
4		6.412	8039	535	1.444	7.140	0.000	
5	cordycepine	12.092	146795	5127	1.405	10.149	0.000	mg/L
Total			211458	10726				

2.1 จากการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งค่า retention time ของโครมาโตแกรมของคอร์ไดเซปินในนาทีที่ 12.092

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1		3.530	6182	775	1.171	0.000	0.000	
2		4.072	44999	4707	1.169	2.329	0.000	
3		5.447	1287	104	0.967	4.900	0.000	
4		6.453	10162	646	0.000	2.840	0.000	
5		6.860	3653	294	0.000	0.713	0.000	
6	cordycepine	12.159	145110	5666	1.249	7.566	0.000	mg/L
Total			211393	12192				

2.2 จากการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งค่า retention time ของโครมาโตแกรมของคอร์ไดเซปินในนาทีที่ 12.159



1 PDA Multi 1/254nm 4nm

<Results>

PDA Ch1 254nm 4nm

Peak #	Name	Ret. Time	Area	Height	Tailing Factor	Resolution	Conc.	Units
1		2.542	2897	222	0.972	0.000	0.000	
2		3.516	6517	739	1.132	3.328	0.000	
3		4.075	44843	4213	1.021	2.264	0.000	
4		5.444	1454	107	0.978	4.455	0.000	
5		6.417	7924	538	1.393	2.702	0.000	
6	cordycepine	12.104	144626	5144	1.351	10.571	0.000	mg/L
Total			208262	10963				

2.3 จากการเพาะเลี้ยงเห็ดถั่งเช่าสีทองในอาหารเลี้ยงเชื้อสภาวะแข็งที่มีข้าวไรซ์เบอรี่เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งค่า retention time ของโครมาโตแกรมของคอร์ไดเซปินในนาทีที่ 12.104

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้