สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว

ดาริณี ดังก้อง

ปิยธิดา สัมพันธ์ประสิทธิ์

วพ.
ด 4371
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83751
วัน,เดือน,ปี.....15 ก.ย. 2551

b.....11983516
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Inhibitory Effect of Essential Oils from Lemongrass, Citronella, and Whitewood on Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus*

Darinee Dungkong

Piyadhida Sampanprasit

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว

รหัสนักศึกษา ดาริณี ดังก้อง รหัสนักศึกษา 47050508

ปิยธิดา สัมพันธ์ประสิทธิ์ รหัสนักศึกษา 47050517

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. เยาวพา สุวัตถิ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์	
กรรมการ รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์	
กรรมการ ดร. เยาวพา สุวัตถิ	

.....

(รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว	
นักศึกษา	คาริณี ดังก้อง	รหัสนักศึกษา 47050508
	ปิยธิดา สัมพันธ์ประสิทธิ์	รหัสนักศึกษา 47050517
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม	
ปีการศึกษา	2550	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. ดุษฎี ธนะบริพัฒน์	
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. เยาวพา สุวัตถิ	

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหย 3 ชนิด ได้แก่ ตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 28 วัน พบว่าน้ำมันหอมระเหยทุกชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุด 7 วัน โดยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอม ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 ระยะเวลาการบ่ม 7 วัน ให้ผลการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีที่สุดไม่แตกต่างกัน วัดค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้เท่ากับ 58.22 มิลลิเมตร และ 57.06 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนเสม็ดขาวสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้น้อยที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้ตั้งแต่ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 ขึ้นไป วัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3, 4 และ 5 ได้เป็น 11.34, 13.90 และ 17.40 มิลลิเมตร ของระยะเวลาการบ่มวันที่ 7 ตามลำดับ เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 4 และ 5 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินบนปลายข้าวที่มีเชื้อรา *A. flavus* และทำการบ่มไว้ 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ปรากฏว่า ชุดควบคุมมีปริมาณอะฟลาทอกซิน 20 พีพีบี ในขณะที่ปลายข้าวที่มีการใส่น้ำมันหอมระเหยลงไป มีปริมาณอะฟลาทอกซินอยู่ในช่วง 10 พีพีบี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	:	Inhibitory Effect of Essential Oils from Lemongrass, Citronella and Whitewood on Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus*
Student	:	Miss Darinee Dungkong Miss Piyadhida Sampanprasit
Department	:	Applied Biology
Program	:	Industrial Microbiology
Academic Year	:	2007
Special Project Advisor	:	Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat
Special Project Co-advisor	:	Dr. Yaowapa Suwatthi

Abstract

Three essential oils, i. e., lemon grass, citronella and whitewood at concentrations of 1, 2, 3, 4 and 5% were tested for their ability to inhibit the growth of *A. flavus* IMI242684 incubated on PDA for 28 days. The result showed that all essential oils could inhibit fungal growth for 7 days. Essential oils from lemon grass and citronella at 5% gave the best inhibition without any significant difference, with the inhibition zones of 58.22 and 57.06 mm, respectively. Whitewood gave the least inhibition with the inhibition zones of 11.30, 13.90 and 17.40 mm. at concentrations of 3, 4 and 5%, respectively when incubated the fungus for 7 days. Essential oils from lemongrass and citronella at 4 and 5% were further tested for the control of aflatoxin production when *A. flavus* was grown on rice for 7 days. The result showed that these essential oils could reduce the aflatoxin from 20 to 10 ppb.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาวิชาโครงงานพิเศษ เรื่อง การยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอมและเสม็ดขาว โครงงานนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีได้หากไม่ได้รับการช่วยเหลือจากบุคคลดังต่อไปนี้

ทางผู้จัดทำขอขอบคุณ รศ.ดร. ดุษฎี ธนะบริพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษา และ ดร. เยาวพา สุวัตถิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่เสียสละเวลาให้ความรู้คำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทดลอง พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะและข้อแก้ไขความบกพร่องที่เกิดขึ้นในขณะทำการทดลอง ตลอดจนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์ ซึ่งเป็นประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษที่ให้คำชี้แนะในการแก้ไขให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ผศ. สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์ ภาควิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับความช่วยเหลือทางด้านการวิเคราะห์และแปลผลทางสถิติเพื่อให้ได้มาซึ่งความถูกต้องและแม่นยำของผลการทดลอง

ขอบคุณองค์การเภสัชกรรมสำหรับความอนุเคราะห์ ทั้งในด้านอุปกรณ์ต่างๆในการทำการทดลองที่สะดวกยิ่งขึ้น และด้านข้อมูลต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี ขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและประสานงาน

ขอบคุณเพื่อนๆในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ อีกทั้งยังคอยให้ความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์สำหรับการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้

และที่สำคัญ ขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวสัมพันธ์ประสิทธิ์ และครอบครัวดังก้อง ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนในด้านกำลังทรัพย์

สำหรับคุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากรายงานฉบับนี้ ผู้จัดทำขอมอบให้กับคุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน และผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้คงจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ที่สนใจในงานที่เกี่ยวข้องทางด้านนี้หรือผู้ที่ต้องการศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้ หากมีข้อผิดพลาดประการใด ผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

นางสาวดาริณี ดังก้อง
นางสาวปิยธิดา สัมพันธ์ประสิทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 สารพิษอะฟลาทอกซิน	4
2.1.1 การออกฤทธิ์ของอะฟลาทอกซิน	6
2.2 อันตรายที่เกิดจากสารพิษอะฟลาทอกซิน	8
2.2.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณอะฟลาทอกซินในร่างกาย	10
2.3 การวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน	11
2.3.1 การวิเคราะห์โดยวิธีมินิคอลัมน์ (minicolumn)	11
2.3.2 การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง (Thin-layer chromatography:TLC)	13
2.3.3 การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง (High performance liquid chromatography:HPLC)	14
2.3.4 การวิเคราะห์โดยอีไลซ่า (Enzyme-linked imunosorbent assay:ELISA)	15
2.4 การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน	17
2.5 การควบคุมการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยสมุนไพร	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.1 ตะไคร้ (Lemongrass)	19
2.5.2 ตะไคร้หอม (Citronella)	22
2.5.3 เสม็ดขาว (Whitewood)	23
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	27
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	27
3.2 อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ	27
3.3 น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดลอง	28
3.4 วิธีการทดลอง	28
3.4.1 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus*	28
3.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง	28
3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอมและเสม็ดขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*	28
3.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน	29
3.4.5 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์และการสกัดสารพิษจากตัวอย่าง	30
3.4.6 การวิเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินโดยวิธีอีไลซ่า	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	
4.1 ผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ที่บ่มเป็นระยะเวลา 7 , 14 , 21 และ 28 วัน ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอม เสม็ดขาวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	32
4.2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 ผลการทดสอบความสามารถของน้ำมันหอมระเหยบางชนิดต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนปลายข้าว	38
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	45
ภาคผนวก ข ข้อมูลทางสถิติ	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การสังเคราะห์อะฟลาทอกซินบี1	5
2.2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของอะฟลาทอกซินบี1 ที่ตับ	7
2.3 โครงสร้างอะฟลาทอกซินบี1 บี2 จี1 และจี2	8
2.4 ระบบการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ	10
2.5 ลำดับสารเคมีที่บรรจุในมินิคอลัมน์	12
2.6 แผ่นเพลต (plate) และทีแอลซี แทงค์ (TLC tank)	14
2.7 หลุมทดสอบ (Miro ELISA plate)	16
2.8 ลักษณะลำต้นของเสม็ดขาว	24
2.9 ลักษณะใบและผลของเสม็ดขาว	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน	18
4.1 ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA โดยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้	32
4.2 ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA โดยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม	33
4.3 ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA โดยน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว	33
4.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย(มิลลิเมตร) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหย 3 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ	34
4.5 ตารางแสดงผลการเปรียบเทียบเชิงซ้อนรายคู่ของค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ของน้ำมันหอมระเหย 3 ชนิดในทุกระดับความเข้มข้นเมื่อมีระยะเวลาในการบ่ม 7 , 14 , 21 และ 28 วัน	36
ข.1 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ที่ระยะเวลาการบ่ม 7 , 14 , 21 และ 28 วัน	46
ข.2 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ที่ระยะเวลาการบ่ม 7 , 14 , 21 และ 28 วัน	47
ข.3 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ที่ระยะเวลาการบ่ม 7 , 14 , 21 และ 28 วัน	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เชื้อราในโลกนี้มีมากกว่า 2000 ชนิด แต่มีเชื้อราเพียงบางพันธุ์ที่สามารถผลิตสารพิษได้ และมีสารพิษเพียงบางชนิดที่มีผลกระทบต่อสุขภาพคนหรือสัตว์เลี้ยง แต่ถึงกระนั้นประมาณกันว่ากว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์พืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ในโลกมีการปนเปื้อนด้วยเชื้อราและ/หรือสารพิษจากเชื้อรา สารพิษจากเชื้อราเหล่านี้ ได้แก่ อะฟลาทอกซิน(aflatoxin) โอคราทอกซิน เอ (ochratoxin A) และ พาทูลิน(patulin) เป็นต้น (ปวีณาและสุรวิทย์, 2548) สารพิษอะฟลาทอกซินเป็นสารประกอบจำพวกไบฟูราโนคูเมอริน(Bifuranocoumarin) ซึ่งสร้างจากเชื้อราบางชนิด กลุ่มเชื้อราที่สำคัญได้แก่ *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* (Park และคณะ, 2006)โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. flavus* เป็นสายพันธุ์ที่สำคัญในการสร้างสารพิษดังกล่าว ซึ่งมีบทบาทมากโดยก่อให้เกิดผลเสียต่อคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด การนำอาหารสัตว์ที่มีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินไปเลี้ยงสัตว์ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจด้านการปศุสัตว์ รวมทั้งผลผลิตและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น สัตว์มีอัตราการเจริญลดลง อัตราการตายเพิ่มขึ้น ผลผลิตเนื้อ นม ไข่ลดลง ขนาดไข่ลดลง การฟักไข่ลดลง เปลือกไข่บางลง นอกจากนี้อะฟลาทอกซินยังสามารถผ่านไปตามกระแสโลหิต เกิดการผสมในเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆและผ่านไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ อะฟลาทอกซินสามารถผ่านสู่คนได้เช่นเดียวกัน ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ถ้ากินอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินเข้าไป สารนี้จะถูกขับออกมาปนเปื้อนในน้ำนม (อภิษฐา, 2548) กระทรวงสาธารณสุขได้มีประกาศฉบับที่ 98/2529 กำหนดให้มีการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินบี1(B1)ในอาหารได้ไม่เกิน 20 พีพีบี(ppb) (20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) (ดวงจันทร์ และวนิดา, 2545) ในปัจจุบันได้มีการกำหนดค่าการปนเปื้อนให้ต่ำลงกว่า 15 พีพีบี (สุธี, 2549)

A. flavus เจริญได้ดีในอาหารที่มีความชื้นระหว่าง 14-30 เปอร์เซ็นต์ เจริญในอาหารที่มีความชื้นสัมพัทธ์ตั้งแต่ 75 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ซึ่งประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสภาวะอากาศและสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราในผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ปลายข้าว ถั่วลิสง กากถั่วเหลือง ปลาป่น กระดูกป่น เป็นต้น(กนกรัตน์, 2544) เชื้อราชนิดนี้สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าเพราะมีสปอร์สีเขียวอมเหลืองหรือสีเขียวเข้ม สามารถปนเปื้อนในเมล็ดธัญพืชได้ทั้งในแปลงปลูก ระยะเก็บเกี่ยว เก็บรักษา จนถึงระยะรอจำหน่ายของพ่อค้า อะฟลาทอกซินที่ราจำพวกนี้ผลิตขึ้น คือ อะฟลาทอกซินบี1(B1) บี2(B2) จี1(G1)และจี2 (G2) โดย อะฟลาทอกซินบี1และบี2 นั้น มีคุณสมบัติเรืองแสงในช่วงสีน้ำเงิน(Blue) ส่วนอะฟลาทอกซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จี1 และจี2 มีคุณสมบัติเรืองแสงในช่วงสีเขียว(Green) ซึ่งอะฟลาทอกซินบี1เป็นชนิดที่มีความรุนแรงที่สุด รองลงมาคือ จี1 บี2 และจี2 ตามลำดับ (อภิษฐา, 2548) สำหรับอะฟลาทอกซินชนิดเอ็ม1(M1)และเอ็ม2(M2) นั้นพบครั้งแรกจากน้ำนมวัว สารพิษอะฟลาทอกซินเหล่านี้มีคุณสมบัติในการทนความร้อนและสามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 260 องศาเซลเซียส การหุงต้มธรรมดาที่ใช้ความร้อนไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส จึงไม่สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้เลย ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อราชนิดนี้กันมาก

ในปัจจุบันได้มีผู้ศึกษาวิธีการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* และสารพิษอะฟลาทอกซินกันอย่างกว้างขวาง โดยมีการควบคุมทั้งในระยะปลูก ระยะเก็บเกี่ยว และเก็บรักษา โดยมีทั้งการควบคุมทางกายภาพ การควบบคุมโดยใช้วิธีทางชีวภาพ และการใช้สารเคมี เช่น การใช้สารสกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ โดยมีการศึกษาที่พบว่าการสังเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินบี1 สามารถยับยั้งได้ด้วยสารประกอบจำนวนหนึ่ง สารสกัดที่ได้มาจากพืชนั้นเป็นพิษแก่เชื้อราและอาจมีประโยชน์ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารไมโคทอกซิน(mycotoxin)ได้ สารสกัดจากพืช เช่น กระเทียมและหัวหอมสามารถชะลอการเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ทักษอรและคณะ, 2549) จากการศึกษาโดยใช้สารสกัดจากตะไคร้และใบช้าพลูที่ความเข้มข้น 10,000 มิลลิลิตรต่อลิตร ฉีดพ่นเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พบว่าสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ได้ถึง 2 เท่า สารสกัดทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง แต่ดัชนีความงอกลดลงมากกว่าชุดควบคุม เมื่อนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทุกชุดการทดลองทุกชุดมาเพาะบนกระดาษเพาะที่ปนเปื้อนสปอร์เชื้อรา *A. flavus* พบว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมล็ดที่มีการฉีดพ่นสารสกัดตะไคร้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของต้นกล้ามากที่สุด เมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ นอกจากนั้นสารประกอบธรรมชาติ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ไบฟลาโวนอยด์ (biflavonoid) สติลบีนส์ (stilbenes) น้ำมันหอมระเหย (essential oil) และอื่นๆ นั้นก็มีผลในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินเช่นเดียวกัน(Gonçalez และคณะ, 2001) ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงได้มีการศึกษาวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยการใช้น้ำมันหอมระเหยจาก ตะไคร้ (Lemongrass, *Cymbopogon citratus* Stapf.) ตะไคร้หอม (Citronella, *Cymbopogon nardus* Rendle.) และเสม็ดขาว(whitewood, *Melaleuca leucadendra* Linn.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* โดยน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว บนอาหาร PDA

1.2.2 เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา *A. flavus* ด้วยน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว บนอาหารแข็ง

1.2.3 เพื่อทดสอบอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus*

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1.3.1 ศึกษาความสามารถของการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารวุ้น PDA ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดมาจากพืชสมุนไพร 3 ชนิด คือ ตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว ที่ความเข้มข้นต่างๆ

1.3.2 ศึกษาความสามารถของสมุนไพรในการยับยั้งสารพิษอะฟลาทอกซินที่เชื้อรา *A. flavus* สร้างขึ้น

1.3.3 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ระหว่างน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงชนิดและความเข้มข้นของสารสกัดจากสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA

1.4.2 ทราบถึงชนิดและความเข้มข้นของสารสกัดจากสมุนไพรที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* เพื่อช่วยลดความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสารพิษนั้น รวมถึงเป็นข้อมูลในการศึกษาต่อไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

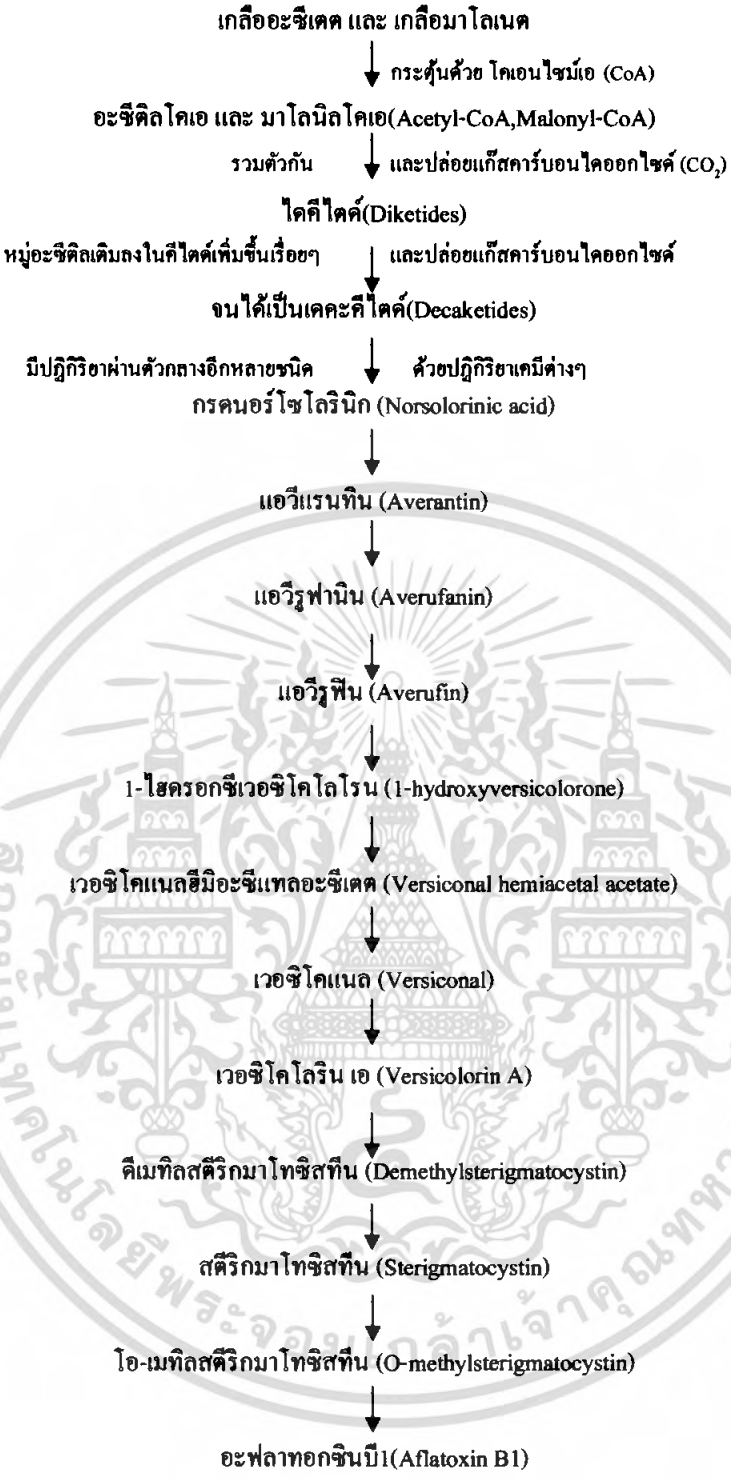
บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 สารพิษอะฟลาทอกซิน

สารพิษอะฟลาทอกซินเกิดจากเชื้อรา *A. flavus, A. parasiticus, A. nomius, A. bombycis* และ *A. tamarii* (Park และคณะ, 2006) อะฟลาทอกซินได้จากการสังเคราะห์ทางชีวภาพของสารกลุ่มคีไตด์(Ketide) ซึ่งจัดเป็นสารตัวกลาง สารตั้งต้นคือ เกลืออะซีเตต และเกลือมาโลเนต ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยโคเอนไซม์เอ(Coenzyme A)ได้เป็นอะซิติลโคเอ(Acetyl-CoA)และมาโลนิลโคเอ (Malonyl-CoA) หลังจากนั้นสารทั้งสองจะรวมตัวกันได้เป็นสารโมเลกุลใหม่ของไดคีไตด์ หรืออะซิโทอะซิติลโคเอ พร้อมกับปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในปฏิกิริยาการรวมตัวทุกครั้ง หมู่อะซิติลจะถูกเติมลงในสารตัวกลางคีไตด์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆจนได้เป็นเคคะคีไตด์ และจะมีปฏิกิริยาผ่านตัวกลางอีกหลายชนิดซึ่งสารตัวกลางเหล่านี้จะถูกดีคาร์บอกซีเลต ถูกออกซิไดส์และด้วยปฏิกิริยาทางเคมีต่างๆจนเกิดวงแหวนกลายเป็นสารพิษอะฟลาทอกซิน (Bhatnagar และคณะ, 1991) (รูปที่ 2.1)

อะฟลาทอกซินเป็นสารพวกบิส-ฟิวราโน-ไอโซคูมาริน เชื่อมกับวงแหวนไซโคลเพนตีโนน ได้เป็นอะฟลาทอกซินชนิดบี(B) ซึ่งเรืองแสงให้สีน้ำเงินภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตในช่วงความยาวคลื่น 256 ถึง 365 นาโนเมตร หรือเชื่อมกับวงแหวนแลคโตนได้เป็นอะฟลาทอกซินชนิดจี(G) ซึ่งเรืองแสงให้สีเขียวภายใต้แสงช่วงคลื่นเดียวกัน ความเข้มของแสงที่เรืองนี้ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน ดังนั้นจึงใช้คุณสมบัติการเรืองแสงเป็นวิธีการทดสอบและตรวจวัดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ อะฟลาทอกซินที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลทางชีวภาพหรือเมแทบอลิซึมชนิดทุติยภูมิของเชื้อรา ทำให้เชื้อราสร้างสารพิษได้ 4 ชนิด คือ อะฟลาทอกซินบี1(B1) บี2(B2) จี1(G1)และจี2(G2) เมื่อคนและสัตว์ได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลทางชีวภาพของสารพิษอะฟลาทอกซินหรือการเมแทบอลิซึมชนิดทุติยภูมิของสารพิษในร่างกาย อะฟลาทอกซินที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลไปจากเดิม เรียกว่าอะฟลาทอกซินเมแทบอไลท์ ซึ่งอาจมีคุณสมบัติการเรืองแสงให้สีเหมือนเดิมหรือเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น อะฟลาทอกซินเอ็ม1(M1) เรืองแสงให้สีน้ำเงิน อะฟลาทอกซินพี1(P1) และอะฟลาทอกซินคิว1(Q1) เรืองแสงให้สีเหลือง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 การสังเคราะห์อะฟลาทอกซินบี1

ที่มา: Bhatnagar และคณะ, 1991

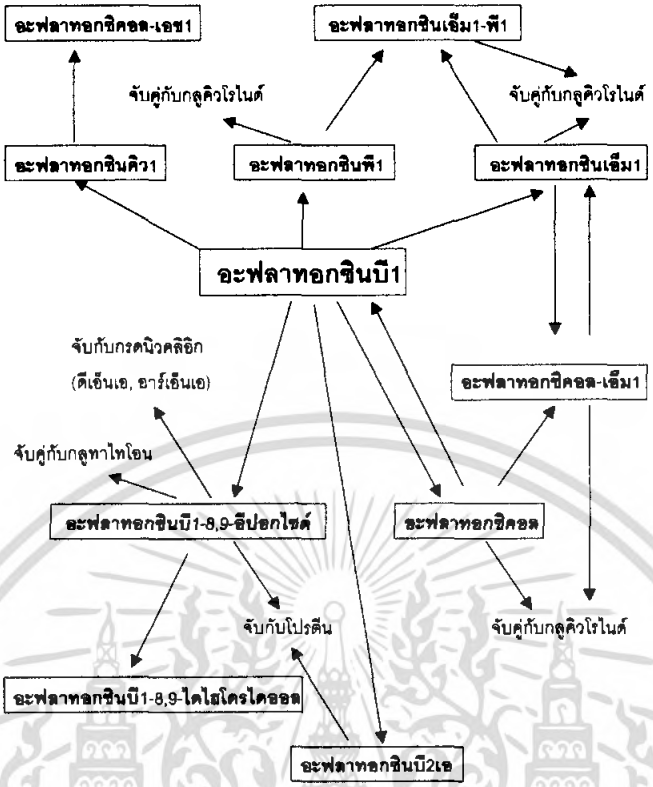
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 การออกฤทธิ์ของอะฟลาทอกซิน (อนงค์, 2546)

อะฟลาทอกซินออกฤทธิ์ทำลายตับซึ่งจัดเป็นอวัยวะเป้าหมาย สามารถทำให้เกิดพิษแบบเฉียบพลัน หรือเรื้อรัง ทั้งในคนและสัตว์โดยเฉพาะสัตว์เศรษฐกิจ ทำให้เกิดโรคตับอักเสบ ตับแข็ง ดีซ่าน และมะเร็งตับ ซึ่งในคนยังพบว่าทำให้เกิดโรค Reye's syndrome โดยพบว่ามีอาการทางสมองในเด็กอายุระหว่าง 1-7 ปี และส่วนใหญ่พบเด็กที่ป่วยมากในฤดูฝน

การเกิดพิษจากอะฟลาทอกซินขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร และระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ เพศ อายุ และชนิดสัตว์ ซึ่งสัตว์แต่ละชนิด มีความไวต่อการเกิดพิษจากอะฟลาทอกซินแตกต่างกัน สัตว์ปีกมีความไวต่อการเกิดพิษมากกว่าสุกรและโค กระบือ สัตว์ที่อายุน้อยมีความไวต่อการเกิดพิษมากกว่าสัตว์ที่โตเต็มวัยแล้ว เช่น กระต่ายและลูกเป็ดมีความไวต่อการเกิดพิษแบบเฉียบพลันมากกว่าหนูถีบจักรและแฮมสเตอร์ ลูกเป็ดมีความไวต่อการเกิดพิษมากกว่าเป็ด ไก่ นกกระทา แฮมสเตอร์และหนูแรท ลูกเป็ดจัดว่ามีความไวต่อการเกิดพิษจากอะฟลาทอกซินมากที่สุด มีการศึกษาในสัตว์หลายชนิดพบว่า การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลทางชีวภาพของสารพิษที่ตับ มีบทบาทสำคัญต่อการแสดงปฏิกิริยาทางเคมีของอะฟลาทอกซินบี1 โดยเอนไซม์ไมโครโซมอลพี-450(Microsomal P-450) ในตับ (รูปที่ 2.2) ทำให้อะฟลาทอกซินบี1 เปลี่ยนเป็นอะฟลาทอกซินบี1-8, 9- อีปอกไซด์(aflatoxin B1-8,9-epoxide) ซึ่งไม่คงตัวและมีพันธะโควาเลนต์สามารถจับกับโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนในเซลล์ ได้เป็นอะฟลาทอกซินบี1 จับกับดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ หรือโปรตีน ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงจนเกิดสารพิษรุนแรงมากขึ้นและเป็นเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้อะฟลาทอกซินบี1-8, 9- อีปอกไซด์สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นอะฟลาทอกซินบี1-8, 9-ไดไฮโดรไดออลหรือจับกับโปรตีนหรือจับคู่กับกลูทาไทโอน อะฟลาทอกซินบี1 สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเมแทบอไลท์ชนิดอื่นๆโดยใช้เอนไซม์ไมโครโซมอลพี-450 ในตับ และจับกับโปรตีน เช่น อะฟลาทอกซินบี2เอ หรือจับคู่กับกลูคิวโรไนด์ เช่น อะฟลาทอกซินเอ็ม1-พี1 เป็นต้น และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลเป็นอะฟลาทอกซิคอล(aflatoxicol) โดยใช้เอนไซม์ไซโทซอลรีดักเทสในตับ รวมทั้งเมแทบอไลท์เปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลทุติยภูมิได้เป็นอะฟลาทอกซินเอ็ม1-พี1 อะฟลาทอกซิคอล-เอ็ม1 อะฟลาทอกซิคอล-เอช1 เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เป็นขั้นตอนลดความรุนแรงของอะฟลาทอกซินบี1 เพราะการเกิดพิษ และการเกิดมะเร็งของอะฟลาทอกซินเมแทบอไลท์เหล่านี้มีความรุนแรงน้อยกว่าอะฟลาทอกซินบี1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



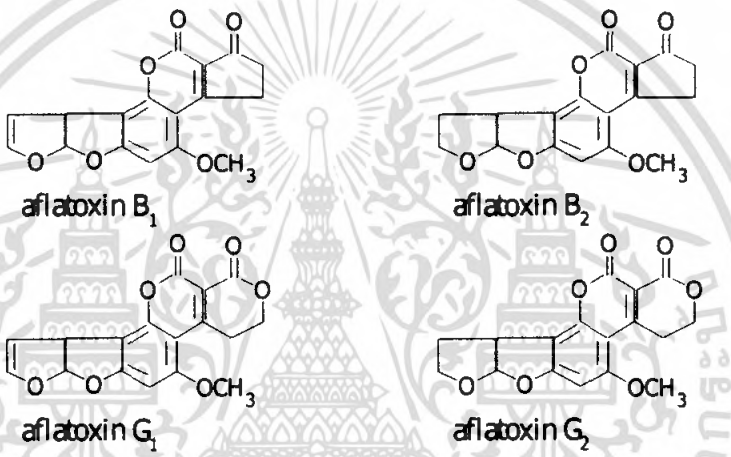
รูปที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของอะฟลาทอกซินบี1 ที่ตับ

ที่มา: Eaton และคณะ, 1994

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของอะฟลาทอกซินบี1ในตับเหล่านี้อาจเกิดแตกต่างกันในแต่ละสัตว์ และอาจไม่พบทุกขั้นตอน ดังนั้นการศึกษาทดลองในสัตว์ชนิดต่างๆ สามารถบ่งชี้ถึงความไวต่อการเกิดพิษของอะฟลาทอกซินที่แตกต่างกันในแต่ละสัตว์ได้ ในทางปศุสัตว์อะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์และนำไปเลี้ยงสัตว์เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียเศรษฐกิจด้านการเลี้ยงสัตว์ รวมทั้งผลผลิตและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น อัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตราการตายเพิ่มขึ้น ผลผลิตเนื้อ นม ไข่ลดลง คุณภาพไข่ลดลง ขนาดไข่ลดลง เปลือกไข่บางลง การฟักไข่ลดลง นอกจากนี้ อะฟลาทอกซินสามารถผ่านไปตามกระแสโลหิต เกิดการสะสมหรือตกค้างในเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆ และผ่านไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น เนื้อ น้ำนม ไข่ เป็นต้น ทำให้เกิดความเสี่ยงอันตรายต่อผู้บริโภคอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสัตว์ ความรุนแรงของการเกิดพิษขึ้นอยู่กับการมีพันธะคู่ในวงแหวนที่ 1 และการไม่มีวงแหวนแลคโตนในวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหวนที่ 5 เช่น อะฟลาทอกซินบี1 มีพิษรุนแรงมากกว่าอะฟลาทอกซินบี2 เพราะมีพันธะคู่ที่วงแหวนที่ 1 และอะฟลาทอกซินบี1 มีความรุนแรงมากกว่าอะฟลาทอกซินจี1 เพราะไม่มีวงแหวนแลคโตนในวงแหวนที่ 5 ดังนั้น อะฟลาทอกซินบี1 ทำให้เกิดพิษเฉียบพลันและก่อให้เกิดมะเร็งตับได้รุนแรงมากที่สุด รองลงมาคือ อะฟลาทอกซินจี1 อะฟลาทอกซินบี2 และอะฟลาทอกซินจี2 ตามลำดับ ส่วนอะฟลาทอกซินเมแทบอไลท์อื่นๆ เช่น อะฟลาทอกซินเอ็ม1 เอ็ม2 พี1 คิว1 บี2เอ จี2เอ อะฟลาทอกซิคอล เป็นต้น มีความรุนแรงของการเกิดพิษลดลงน้อยกว่าอะฟลาทอกซินที่เป็นสารตั้งต้น คือ อะฟลาทอกซินบี1 บี2 จี1 จี2 (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างอะฟลาทอกซินบี1 บี2 จี1 และจี2

ที่มา: อนงค์, 2546

2.2 อันตรายที่เกิดจากสารพิษอะฟลาทอกซิน (อนงค์, 2546)

อะฟลาทอกซินที่เข้าสู่ร่างกายแล้วกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างใหม่หรืออะฟลาทอกซินเมแทบอไลท์ ต้องอาศัยเอนไซม์จากไมโครโซมของตับ โดยเอนไซม์และองค์ประกอบต่างๆที่จำเป็นอยู่ในส่วนเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) ซึ่งเป็นระบบเยื่อในไซโทพลาสซึมของเซลล์ เป็นที่สร้างและขนส่งโปรตีนและไขมันในเซลล์ เมื่อปั่นแยกเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมออกมา จะได้โครโมโซมเป็นส่วนตกตะกอนและไซโทซอลเป็นส่วนน้ำในเซลล์ ซึ่งเอนไซม์จากไมโครโซมเรียกว่า ไมโครโซมอลเอนไซม์ (microsomal enzyme) หรือเรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์เปลี่ยนแปลงโครงสร้างยา (drug metabolizing enzyme) หรือ ไซโทโครมพี-450 โมโนออกซิจีเนส (cytochrome P-450 monooxygenase) มักนิยมเรียกว่า ไซโทโครมพี-450 เอนไซม์ จากไมโครโซมประกอบด้วยลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain) ซึ่งมีองค์ประกอบ ดังนี้

ก. อิเล็กตรอนที่ถูกจับและนำเข้าสู่ลูกโซ่การหายใจด้วยนิวคลีโอไทด์โคเอนไซม์ เอ็นเอดีพีเอช (NADPH)

ข. ฟลาโวโปรตีนซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เรียกว่า ไซโทโครมซีรีดักเทส (NADPH-cytochrome C reductase, Cyt. C)

ค. โปรตีนพิเศษที่ไม่มีฮีม (non-heme protein, NH-IP)

ง. ไซโทโครม พี-450 (cytochrome P-450)

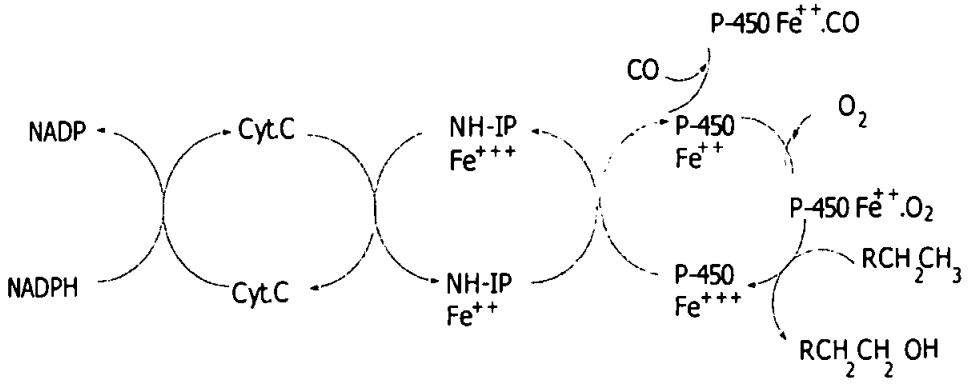
จ. เอนไซม์ออกซิเดสชนิดต่างๆที่ร่วมในปฏิกิริยาเร่งอีกจำนวนหนึ่ง

ฉ. โมเลกุลออกซิเจน (O_2) จากอากาศภายนอก ซึ่งร่างกายจะนำไปยังเซลล์ต่างๆ เพื่อช่วยการทำงานของระบบหายใจและระบบไหลเวียนโลหิต โมเลกุลออกซิเจนนี้จะถูกกระตุ้น (activation) ให้เป็นออกซิเจนที่ออกฤทธิ์ได้ (active oxygen)

ลูกโซ่การหายใจจะทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนจากเอ็นเอดีพีเอช เพื่อนำไปใช้ในการกระตุ้นไซโทโครม พี-450 การเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนนี้เรียกว่าระบบการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน (electron transfer system) โดยจะนำอิเล็กตรอนมาทำปฏิกิริยากับฟลาโวโปรตีนหรือเอนไซม์ไซโทโครมรีดักเทส เพื่อเปลี่ยนสภาพของฟลาโวโปรตีนจากรูปออกซิไดส์เป็นรูปรีดิวส์ จากนั้นทำปฏิกิริยากับโปรตีนพิเศษที่ไม่มีฮีม (NH-IP) โดยเปลี่ยนเฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) เป็นเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ในโปรตีนพิเศษที่ไม่มีฮีมนี้ ส่วนขั้นตอนต่อไปพบว่าไซโทโครมพี-450-เฟอร์ริกไอออนจะเข้าร่วมปฏิกิริยาจนได้ไซโทโครมพี-450-เฟอร์รัสไอออนซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นโมเลกุลออกซิเจนได้ออกซิเจนจำนวน 1 อะตอม ในสารพิษโครงสร้างใหม่นี้ปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายจะมีเอนไซม์โมโนออกซิเดสชนิดต่างๆเข้าร่วมในปฏิกิริยาด้วย

ไซโทโครม พี-450-เฟอร์รัสไอออน นอกจากจะทำหน้าที่ในการกระตุ้นโมเลกุลของออกซิเจน (O_2) ยังสามารถจับตัวกับคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) ได้อีกด้วย ดังนั้นถ้าได้รับแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์จากอากาศ จะทำให้ความสามารถในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษด้วยกลไกนี้ลดลงได้ (รูปที่ 2.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 ระบบการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในลูกโซ่การหายใจ

ที่มา: อนงค์, 2546

2.2.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของอะฟลาทอกซินในร่างกาย (อนงค์, 2546)

อะฟลาทอกซินที่อยู่ในร่างกายคนและสัตว์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารพิษในร่างกายเพื่อการปรับสมดุลของร่างกาย หรือเรียกว่าการจลนศาสตร์ของสารพิษ ประกอบด้วยการดูดซึม การกระจายตัว การสะสมหรือตกค้าง และการกำจัดหรือขับสารพิษออกจากร่างกาย

การเกิดพิษของอะฟลาทอกซินต่อร่างกายขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่คงอยู่ในร่างกาย การหมุนเวียนของสารพิษในกระแสโลหิต การออกฤทธิ์ของสารพิษที่เซลล์เฉพาะ ซึ่งมีตัวรับที่จะตอบสนองต่อการเกิดพิษ การหมุนเวียนสารพิษเข้าและออกจากร่างกายแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน คือ

1) การดูดซึมสารพิษเข้าสู่ร่างกาย เกิดขึ้นตามบริเวณต่างๆของร่างกายและเข้าสู่กระแสโลหิต ตำแหน่งที่เกิดการดูดซึม ได้แก่ ทางเดินอาหาร(เช่น ช่องปาก กระเพาะ ลำไส้) ทางเดินหายใจ(เช่น โพรงจมูก หลอดลม ปอด) ทางผิวหนัง (เช่น หนังกำพร้า หนังแท้) ดูดซึมโดยตรง (เช่น โดยการฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ ทางช่องท้อง ทางใต้ผิวหนัง ฉีดเข้าภายในผิวหนังและฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อ)

2) การกระจายตัวของสารพิษ โดยสารพิษแพร่กระจายจากกระแสโลหิตและน้ำเหลืองไปยังอวัยวะและส่วนต่างๆของร่างกาย ตำแหน่งที่เกิดการกระจายตัว ได้แก่ หลอดโลหิต พลาสมา ต่อมน้ำเหลือง อวัยวะอื่นๆ เช่น ตับ ไต ปอด กระเพาะอาหาร ลำไส้ น้ำภายนอกเซลล์ ชีวสารอื่นๆ ไขมัน รก เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) การสะสมหรือตกค้างของสารพิษ สารพิษที่อยู่ในอวัยวะและส่วนต่างๆ ของร่างกาย บางส่วนเกิดการตกค้างและสะสมอยู่ได้ ตำแหน่งที่เกิดขึ้น ได้แก่ ไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กระดูก ส่วนของน้ำในร่างกาย

4) การกำจัดหรือขับสารพิษออกจากร่างกาย สารพิษที่อยู่ในอวัยวะและส่วนต่างๆของร่างกาย บางส่วนเกิดการกำจัดหรือขับออกจากร่างกาย ตำแหน่งที่เกิดขึ้นได้แก่ ทางน้ำดีโดยตับ ขับสารพิษผ่านทางน้ำดีลงไปในทางเดินอาหาร และอุจจาระในที่สุด ทางปัสสาวะโดยไต ทางอากาศที่หายใจออกโดยถุงลมและปอด ทางต่อมต่างๆ เช่น ต่อมสร้างน้ำย่อยในทางเดินอาหาร ตับอ่อนสร้างน้ำย่อยในลำไส้เล็ก ต่อมน้ำลาย ต่อมเหงื่อ เป็นต้น

2.3 การวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน

การวิเคราะห์อะฟลาทอกซินสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

2.3.1 การวิเคราะห์โดยวิธีมินิคอลัมน์ (minicolumn) (เยาวมาลย์ และคณะ, 2548)

1) การเตรียมคอลัมน์ โดยใช้แท่งแก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ยาว 15 เซนติเมตร ไม่เรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต จากนั้นบรรจุสารเคมีตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.5

2) การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพิษอะฟลาทอกซิน

- ชั่งตัวอย่างหนัก 500 กรัมลงในฟลาสก์และเติมสารละลายผสมระหว่างเมทานอล:โซเดียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 60:40 โดยปริมาตร จำนวน 200 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงเป็นเวลา 3 นาที
- กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เติมสารละลายซิงค์อะซีเตต 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
- เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 หรือเบอร์ 4
- เก็บน้ำยาที่กรองได้ 50 มิลลิลิตร ใส่กรวยแยกชั้น เติมสารเบนซีน 4 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 1 นาที
- แยกน้ำยาชั้นล่างออกและเก็บน้ำยาชั้นบนไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. สำลี สูง 0.5 ซม.

6. แคลเซียมซัลเฟต แอนไฮดรัส 1 ซม.

5. อะลูมินา นิวทรอล 1.5 ซม.

4. ซิลิกาเจล 4 ซม.

3. ฟลอริซิล 1.5 ซม.

2. แคลเซียมซัลเฟต แอนไฮดรัส 1ซม.

1. สำลี สูง 0.5 ซม.

รูปที่ 2.5 ลำดับสารเคมีที่บรรจุในมินิคอลัมน์

ที่มา: เยาวมาลย์และคณะ, 2548

3) การตรวจโครมาโทแกรม โดยเปิดปลายปิดทั้ง 2 ด้านของหลอดมินิคอลัมน์ จากนั้นปิเปตต์สารละลายอะฟลาทอกซินที่สกัดได้ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายเบนซีนลงในหลอดมินิคอลัมน์ ปล่อยให้ไหลออกมาตามแรงดึงดูดของโลก เติมสารละลายผสมระหว่างคลอโรฟอร์มกับอะซีโตน อัตราส่วน 90:10 โดยปริมาตร และปล่อยให้สารละลายไหลออกจนหมด

4) การอ่านผล นำหลอดมินิคอลัมน์มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของการเรืองแสงสีน้ำเงินของหลอดมาตรฐานภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 365-366 นาโนเมตร ค่าที่อ่านได้เมื่อเทียบกับหลอดมาตรฐานใดแล้วสามารถอ่านค่าออกมาเป็นค่านั้นๆได้เลย หรืออาจจะอ่านค่าออกมาเป็นช่วงๆในกรณีที่ความเข้มของแสงอยู่ก้ำกึ่งระหว่างหลอดมาตรฐาน 2 หลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง (Thin-layer chromatography: TLC) (ปวีณา และสุวิทย์, 2548)

1) การเก็บตัวอย่างและการสกัดขั้นต้น นำตัวอย่างจำนวน 50 กรัม มาบดให้ละเอียดใส่ลงในฟลาสก์ เติมเมทานอล 200 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง เป็นเวลา 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้สารตกตะกอนหรือแยกชั้นแล้วกรองสารละลายเก็บไว้

2) การแยกสารให้บริสุทธิ์

- นำสารละลายอะฟลาทอกซินที่สกัดได้ 80 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์แล้วเติมซิงค์อะซีเตต 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- เติมไดอะโตมาเซียสเอิร์ท 5 กรัม แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง
- นำสารละลายที่กรองได้มาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 มิลลิลิตร และไลท์ปิโตรเลียม 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- แยกเก็บเฉพาะสารละลายส่วนล่าง แล้วสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน 50 มิลลิลิตร
- นำสาระลายที่ได้มาต้มให้ระเหยจนแห้ง

3) การวิเคราะห์ นำสารละลายที่ระเหยจนแห้งมาเติมคลอโรฟอร์มกับอะซีโตนแล้วเขย่าจนละลายหมด จากนั้นหยดสารละลายที่มีสารอะฟลาทอกซิน สารละลายมาตรฐาน และหยดสารละลายมาตรฐานจุดเดียวกับสารละลายตัวอย่างลงบนแผ่นเพลต (plate) อย่างละหนึ่งจุด นำแผ่นเพลตใส่ในทีแอลซีแทงก์ (TLC tank) ซึ่งมีเฟสเคลื่อนที่อยู่ แล้วปล่อยให้เพลตเคลื่อนที่วิ่งได้ระยะที่เหมาะสม (รูปที่ 2.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.6 แผ่นเพลต (plate) และทีแอลซีแทงค์ (TLC tank)

ที่มา: Kako, 2005

4) การแปลผล จุดเรืองแสงของสารอะฟลาทอกซินแต่ละชนิดจะปรากฏแยกกันชัดเจนบนแผ่นเพลต โดยมีตำแหน่งและสีที่แตกต่างกัน ทำการประมาณความเข้มข้นโดยการเปรียบเทียบความเข้มข้นจุดเรืองแสงของตัวอย่างอะฟลาทอกซิน กับอะฟลาทอกซินมาตรฐาน

2.3.3 การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง (High performance liquid chromatography: HPLC) (ปวีณา และสุวิทย์, 2548)

1) การสกัดสารอะฟลาทอกซิน

- ชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 50 กรัมลงในฟลาสก์และเติมสารละลายผสมระหว่างเมทานอล: โซเดียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 60:40 โดยปริมาตร จำนวน 200 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงเป็นเวลา 3 นาที
- กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เติมสารละลายซิงค์อะซีเตต 20 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
- เติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 หรือ เบอร์4
- เก็บน้ำยาที่กรองได้ 50 มิลลิลิตร ใส่กรวยแยกชั้น เติมสารเบนซีน 4 มิลลิลิตร ปิดจุกและเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 1 นาที
- แยกน้ำยาชั้นล่างออกและเก็บน้ำยาชั้นบนไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) การแยกให้บริสุทธิ์

- นำสารอะฟลาทอกซินที่สกัดได้ 80 มิลลิลิตรใส่บีกเกอร์แล้วเติมซิงค์อะซีเตต 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- เติมไดอะโตมาเซียสเอิร์ท 5 กรัม แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง
- นำสารละลายที่กรองได้มาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 มิลลิลิตร และไลท์ปิโตรเลียม 25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- แยกเก็บเฉพาะสารละลายส่วนล่าง

3) การวิเคราะห์ นำสารอะฟลาทอกซินที่สกัดได้และแยกสารให้บริสุทธิ์แล้วมาฉีดเข้าวิเคราะห์ในเครื่องโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง

4) การแปลผล นำความสูงของพื้นที่กราฟของสารมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่องโครมาโตกราฟีชนิดของเหลวความดันสูงมาเพื่อหาสมการ แล้วนำความสูงของพื้นที่กราฟของสารตัวอย่างมาหาความเข้มข้นโดยเทียบกับสมการของสารมาตรฐาน

2.3.4 การวิเคราะห์โดยอีไลซ่า (Enzyme-linked imunosorbent assay: ELISA) (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

1) การสกัดสารอะฟลาทอกซินออกจากตัวอย่าง

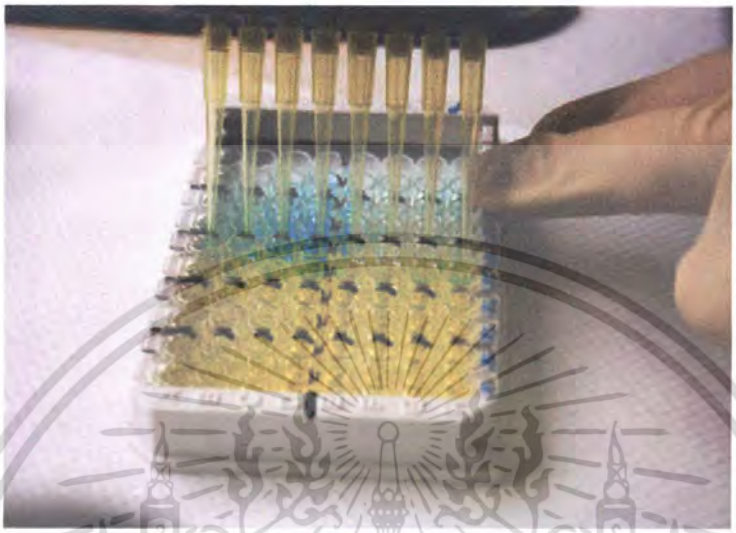
- ชั่งตัวอย่างหนัก 20 กรัมลงในฟลาสก์และเติมสารละลายผสมระหว่างเมทานอล:โซเดียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 60: 40 โดยปริมาตร จำนวน 100 มิลลิลิตร
- ปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงเป็นเวลา 3 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4

2) การเจือจาง นำสารสกัดอะฟลาทอกซินที่ได้มาเจือจาง 1:20 เท่า โดยใช้สารละลายวอชชิ่งบัฟเฟอร์ (washing buffer) ก่อนการนำไปวิเคราะห์ให้เจือจางอีกครั้งในอัตราส่วน 1:30 เท่า

3) การวิเคราะห์ โดยหยดสารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซิน ระดับความเข้มข้นต่างๆและสกัดตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงในหลุมทดสอบ (รูปที่ 2.7) จากนั้นหยดเอนไซม์คอนจูเกตลงไปทุกหลุม บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นเทสารลงในหลุมทดสอบทิ้งโดยการคว่ำหลุม ล้างหลุมทดสอบด้วยสารละลายวอชชิ่งบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง คว่ำแล้วเคาะให้แห้ง จากนั้นหยดสารตั้งต้นลงในหลุมทดสอบทุกหลุมแล้วบ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-10 นาที จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีฟ้า ตามลำดับความเข้มข้นของสารพิษ ตัวอย่างที่มีสีฟ้าเข้มแสดงว่าไม่มีสารพิษหรือมีน้อย และตัวอย่างที่มีสีฟ้าจางหรือสีขาวแสดงว่ามีสารพิษมาก หยุดปฏิกิริยาโดยเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดฟอสฟอริก 100 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบทุกหลุม ปฏิกิริยาจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง และอ่านค่าความเข้มข้นด้วยเครื่องไมโครอีไลซ่ารีดเดอร์ (Micro ELISA Reader) ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร



รูปที่ 2.7 หลุมทดสอบ (Micro ELISA plate)

ที่มา: Firmenprofil Company, 2005

4) การอ่านผล อ่านได้ 2 แบบ คือ

- การอ่านผลเชิงคุณภาพ โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของสีฟ้าจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในหลุมตัวอย่างกับหลุมมาตรฐาน หากสีเข้มแสดงว่ามีปริมาณสารพิษอิสระน้อย แต่ถ้าสีจางแสดงว่ามีปริมาณสารพิษอิสระมาก อ่านค่าเป็นส่วนในพันล้านส่วน (พีพีบี) ตามความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐานที่นำไปเปรียบเทียบ
- การอ่านผลเชิงปริมาณ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance Value) ด้วยเครื่องไมโครอีไลซ่ารีดเดอร์ ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน แต่ปัจจุบันเครื่องไมโครอีไลซ่ารีดเดอร์อ่านค่าเป็นส่วนในพันล้านส่วนได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินโดยวิธีต่างๆ พบว่าแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน โดย Shannon และ Shotwell (1979) กล่าวว่า การวิเคราะห์อะฟลาทอกซินโดยวิธีมินิคอลัมน์ เป็นวิธีที่เหมาะสมและมีราคาถูก ซึ่งมีความเห็นสอดคล้องกับ Wilson (2005) แต่อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินโดยวิธีนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ที่ต้องการความละเอียดเล็กน้อย สำหรับการวิเคราะห์หาสารอะฟลาทอกซิน วิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางเป็นวิธีหนึ่งที่มีความเหมาะสม รวดเร็ว และมีความถูกต้องในการวิเคราะห์ แต่มีข้อเสียเปรียบอยู่ 2 ประการ คือ ค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากสารละลายที่ใช้สกัดต้องใช้ในปริมาณมาก และสารละลายที่ใช้สกัดคือคลอโรฟอร์มซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้วิเคราะห์

Wilson (2005) รายงานว่าวิธีโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง มีข้อได้เปรียบมากกว่าวิธีโครมาโตกราฟีชนิดผิวบางคือ ความรวดเร็วของการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ ความถูกต้องแม่นยำ และระดับความละเอียด วิธีนี้ต้องลงทุนมากในครั้งแรกเนื่องจากต้องซื้อเครื่องวิเคราะห์แต่สามารถใช้งานได้หลายครั้ง วิธีนี้จึงเหมาะสมกับห้องปฏิบัติการที่มีประสิทธิภาพ

Chu และ Ueno (1977) รายงานว่า วิธีอีไลซ่า มีข้อได้เปรียบคือมีความรวดเร็ว การจัดเตรียมตัวอย่างง่าย ค่าใช้จ่ายถูกต่อการวิเคราะห์ 1 ครั้ง วิธีนี้เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ที่ต้องการความละเอียดมาก แต่วิธีนี้มีความอ่อนไหวต่ออุณหภูมิ ต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมเท่านั้น วิธีนี้มีความถูกต้องแม่นยำหากผู้วิเคราะห์มีความชำนาญ (Wilson, 2005)

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีวิเคราห์อะฟลาทอกซิน (ตารางที่ 2.1) พบว่า วิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง ใช้ชนิดและปริมาณของสารเคมีมากกว่าวิธีมินิคอลัมน์ วิธีโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง และวิธีอีไลซ่าคือ 13, 9, 6 และ 6 ชนิด ตามลำดับ ปริมาณสารเคมีสำหรับวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางและวิธีโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวความดันสูงใช้ในปริมาณมาก วิธีมินิคอลัมน์ใช้ปริมาณปานกลาง และวิธีอีไลซ่าใช้ปริมาณน้อย วิธีมินิคอลัมน์ใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบนานกว่าวิธีอื่นคือ 3 ชั่วโมง รองลงมาคือ วิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง 2 ชั่วโมง ส่วนวิธีโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง และวิธีอีไลซ่า ใช้เวลาเท่ากันคือ 1 ชั่วโมง สำหรับความยุ่งยากในการทำงานนั้นวิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางมีความยุ่งยากมากกว่าวิธีอื่น วิธีโครมาโทกราฟีชนิดผิวบางและชนิดของเหลวความดันสูงและวิธีอีไลซ่ามีความถูกต้องในการวิเคราะห์สูงกว่าวิธีมินิคอลัมน์

83751
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน

รายการเปรียบเทียบ	มินิคอลัมน์	โครมาโทกราฟีชนิดผิวบาง	โครมาโทกราฟีชนิดของเหลวความดันสูง	อีไลซ่า
จำนวนสารเคมี (ชนิด)	9	13	6	6
ปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์	ปานกลาง	มาก	มาก	น้อย
เวลาการตรวจสอบ (ชั่วโมง)	3	2	1	1
ความยุ่งยากในการทำงาน	น้อย	มาก	ปานกลาง	น้อย
ความถูกต้อง	น้อย	มาก	มาก	มาก

ที่มา : ปวีณา และสุวิทย์, 2548

2.5 การควบคุมการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยสมุนไพร

มีผู้ทำการศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* โดยรายงานว่าสารสกัดจากใบยาสูบ ผลมะระขี้นก และใบมะกรูดมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยผลมะระขี้นกจะให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุด คือ ในช่วงความเข้มข้น 6-10 เปอร์เซ็นต์ (Thanaboripat และคณะ, 2006) มีรายงานถึงผลของการใช้กระเทียม กานพลู และแครอท ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยกระเทียมและกานพลูที่มีความเข้มข้น 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถลดปริมาณสารพิษของเชื้อราได้จาก 5.94 ไมโครกรัมต่อกรัม เป็น 0.15 และ 0.06 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในขณะที่แครอทที่ความเข้มข้น 20,000 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษได้โดยลดปริมาณสารพิษจาก 5.94 เป็น 0.03 ไมโครกรัมต่อกรัม นอกจากนี้ทั้งกระเทียม กานพลู และแครอทที่ระดับความเข้มข้น 100,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้อีกด้วย (Thanaboripat และคณะ, 1997) มีรายงานของการใช้มะนาว หอม และขิงที่ระดับความเข้มมข้น 20,000, 40,000, 60,000, 80,000 และ 100,000 พีพีเอ็ม ในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* โดยมะนาวที่ความเข้มข้นสูง คือ 100,000 พีพีเอ็ม จะยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ ในขณะที่ขิงที่ความเข้มข้น 60,000 พีพีเอ็ม ขึ้นไป จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าขิงที่มีระดับความเข้มข้นต่ำกว่า ในขณะที่หอม ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ (ดุษฎี และคณะ, 2532) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดหยาบที่ได้จากใบสะเดาที่ระดับความเข้มข้น 6 และ 2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ตามลำดับ (ดุษฎี และคณะ, 2543)

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เป็นการนำน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ ตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว มาศึกษาหาความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยของน้ำมันหอมระเหยที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* โดยสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มีคุณสมบัติดังนี้

2.5.1 ตะไคร้ (Lemongrass)

ตะไคร้ (*Cymbopogan citrates* Stapf.) จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Gramineae มีชื่อเรียกอื่น ได้แก่ คาหอม ไคร จะไคร เชิดเกรต หัวสิงโต ห่อวอตะโป้ เหละเกรย เลพีน (Lepine) เลมอนกราส (Lemongrass) เวสท์ อินเดียน เลมอนกราส (West Indian Lemongrass)เป็นต้น ตะไคร้เป็นพืชล้มลุก มีลักษณะลำต้นขึ้นเป็นกอ รูปทรงกระบอก แข็ง เกลี้ยง ตามข้อปล้องมักมีไขปกคลุม ลำต้นใต้ดินเป็นเหง้า มีกลิ่นเฉพาะ มีสีขาวนวลหรือสีขาวปนม่วง ใบรูปขอบขนานแคบ แผ่นใบสากและคม มีสีเขียวแกมเทา ปลายใบค่อนข้างแหลม ตามขอบมีขนเล็กน้อย เมื่อขยี้ใบจะมีกลิ่นฉุน เนื่องจากมีน้ำมันหอมระเหย ดอกขนาดเล็กเป็นช่อกระจาย ช่อดอกมีก้านออกเป็นคู่ๆดอกหนึ่งมีก้านอีกดอกหนึ่งไม่มีก้าน พบกันทั่วไปในประเทศไทย เวียตนาม อินโดนีเซีย และมาเลเซีย (อรัญญา และจีรเดช, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.1 องค์ประกอบทางเคมี (Foda และคณะ, 1975; Abergaz และคณะ, 1983; Wannisorn และคณะ, 1996)

สารเคมีที่พบในตะไคร้จะอยู่ในส่วนของน้ำมันหอมระเหย น้ำมันนี้มีสีเหลืองอ่อน เมื่อตั้งทิ้งไว้จะมีสีเข้ม มีกลิ่นหอม ปริมาณของน้ำมันขึ้นอยู่กับแหล่งที่ปลูก อายุ และส่วนที่นำมาสกัด ส่วนที่อ่อนของใบจะมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าส่วนที่แก่ องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหยได้แก่ ไซทรอล (citral) 70-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง มี 2 ไอโซเมอร์ (isomer) คือ ไซทรอลเอ (citral A; geranial) และ ไซทรอลบี (citral B; neral) เจราไนออล (geraniol) ไมร์ซีน (myrcene) ไซโทรเนลลอล (citronellal) นอกจากนี้ยังพบ ไลนาโลโอล (linalool) นีรอล (nerol) เจอรานิล อะซิเตต (geranyl acetate) 1,8-ไซนีออล (1,8-cineol) ไซโทรเนลโลล (citronellol) ไลนาลิล อะซิเตต (linalyl acetate) แอลฟา-เทอร์ปีนีออล (α-terpineol) แอลฟา-ไพนีน (α-pinene) ไลโมนีน (limonene) คารีโอโพลีลีน (caryopolylene) โอไซมีน (ocimene) เทอร์เพนดีน (terpendene) เมทิล เฮพตะโนน (methyl heptanone) และ เบต้า-คารีฟิลลีน (β-caryphyllene)

2.5.1.2 ประโยชน์ (นันทวัน, 2530; นิจศิริ, 2534; พเยาว์, 2537)

ตะไคร้เป็นพืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ทุกส่วน ไม่ว่าจะเป็นต้น เหง้า ใบสด ราก และทั้งต้น ตะไคร้เป็นเครื่องเทศที่ใช้เป็นเครื่องปรุงแต่งกลิ่นและรสอาหาร และยังมีสรรพคุณในการบำบัดรักษาโรค คือ ต้น ช่วยขับลม แก้เบื่ออาหาร แก้โรคทางเดินปัสสาวะ และนิ่ว เหง้า ใช้ขับปัสสาวะ แก้นิ่ว รักษาเกลื้อน แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ ใบสด ช่วยลดความดันโลหิตสูง ราก แก้จุกเสียดแน่นท้องบริเวณหน้าอก ปวดกระเพาะปัสสาวะ ทั้งต้น แก้ปัสสาวะเป็นเลือด แก้โรคหืด เป็นยานวดแก้ฟกช้ำ ปวดข้อ

2.5.1.3 การนำมาใช้ประโยน์

1) น้ำมันหอมระเหยของตะไคร้ สามารถไล่ยุงได้ โดยมีการนำน้ำมันหอมระเหยมาผสมในเทียนเป็นเทียนกลิ่นตะไคร้ ผสมในเจลปรับอากาศ และทำยาจุดกันยุงกลิ่นตะไคร้ (วนิดา และทวีศักดิ์, 2541)

2) ใช้เป็นวัตถุดิบหรือสารเริ่มต้นในการผลิตไอโอโนน (ionone) และวิตามินเอ เพราะไซทรอลที่พบในน้ำมันหอมระเหยของตะไคร้สามารถเปลี่ยนเป็นเบต้า-ไอโอโนน (β-ionone) ได้ ซึ่งสารนี้จะนำไปใช้เป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอต่อไป (Simon และคณะ, 1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) การหยดน้ำมันตะไคร้ 2-3 หยดบนขอบโป๊ะหลอดไฟฟ้าหรือบนเครื่องใช้ ที่ให้ความร้อนสามารถใช้ไล่แมลงหรือขจัดกลิ่นบุหรี่ได้ (วนิดา และทวีศักดิ์, 2541)

4) การใช้น้ำมันหอมตะไคร้ผสมในเครื่องสำอางในอุตสาหกรรม เช่น โอเดอโคโลญ สบู่ ยาหม่อง หรือทำเป็นสเปรย์พ่นบนผิวหนัง เป็นยากันแมลง และผสมในยาฆ่าแมลง (Chungsamarnvart และ Jiwajinda, 1992; Mumcouglu และคณะ, 1996)

5) ครีมที่มีส่วนผสมของน้ำมันตะไคร้ 2.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถต้านเชื้อกลากได้ (Wannissorn และคณะ, 1996)

2.5.1.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและการทดสอบทางคลินิก

1) หนูที่ได้รับสารสกัดตะไคร้ มีการทำงานของเอนไซม์ อะมิโนไพรีน ไดเมทิลเลส (aminopyrine demethylase) เพิ่มขึ้นและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอะฟลาทอกซินบี1 เป็นอะฟลาทอกซินคิว1 ซึ่งเป็นเมแทบอไลท์ของอะฟลาทอกซินบี1 ที่มีฤทธิ์ก่อการกลายน้อยลง (Puatanachokchai, 1994; Thumvijit, 1999)

2) สารสกัดตะไคร้มีฤทธิ์ยับยั้งการกลายพันธุ์ในแบคทีเรียที่เหนี่ยวนำโดยอะฟลาทอกซินบี1 และสามารถป้องกันการเกิดรอยโรคก่อนเกิดมะเร็งที่ได้รับสารก่อมะเร็ง เอโซซีมีเทน (Azoxymethane :AOM) ในลำไส้หนูขาว (Lomsri, 1993; Puatanachokchai, 1993; Vinitketkumnuen และคณะ, 1994)

3) เมื่อทดสอบพิษของน้ำมันตะไคร้ในหนูขาวพบว่าอัตราส่วนระหว่างขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนที่ใช้ในการทดลอง และขนาดของสัตว์ทดลองทนต่อยาได้เท่ากับ 6.9 (Skramlik, 1959)

4) สารสกัดจากใบแห้งของตะไคร้ที่กลั่นด้วยไอน้ำมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา dermatophytes 4 ชนิดคือ *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Epidermophyton floccosum* และ *Microsporum gypseum* โดยสารที่ออกฤทธิ์คือ ไซทรอล และ ไมร์ซี (myrcene) (Wannissorn และคณะ, 1996)

5) ไซทรอลในสารสกัดตะไคร้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์แกรมบวก และไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน ไอระเหยของสารสกัดตะไคร้ที่มีไซทรอลสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Onawunmi, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) น้ำมันหอมระเหยของตะไคร้มีสารที่ออกฤทธิ์ทางลดการบีบตัวของลำไส้ คือ เมนทอล (menthol) ไซเนโอล (cineole) การบูร (camphor) และไลนาโลออล จึงลดอาการจุกเสียดแน่น

7) บอร์นีโอล (borneol) เฟนโคน (fenchone) และไซเนโอล (cineole) ในตะไคร้ ช่วยในการขับน้ำดีเพื่อช่วยการย่อย (Vogel, 1975: Yamachara และคณะ, 1987)

2.5.2 ตะไคร้หอม (Citronella) (อรัญญา และจีรเดช, 2548)

ตะไคร้หอม (*Cymbopogon nardus* Rendle) จัดอยู่ในวงศ์ Gramineae เช่นเดียวกับตะไคร้ มีชื่ออื่นๆได้แก่ จะไคมขูด ตะไครมะขูด ตะไคร้แดง ลักษณะคล้ายตะไคร้บ้าน แต่จะมีสีแดงที่ส่วนโคนด้านใน มีการนำตะไคร้หอมมาใช้ประโยชน์ดังนี้

1) การใช้ไล่ยุงและแมลง น้ำมันตะไคร้หอม (Citronella oil) ซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหยสกัดจากต้นตะไคร้หอมสามารถใช้ไล่แมลงได้ ครีมที่มีน้ำมันจากใบตะไคร้หอมความเข้มข้น 1.25, 2.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงกัด เมื่อทดสอบกับยุงก้นปล่องโดยมีระยะเวลาในการป้องกัน นาน 2 ชม. และที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีระยะเวลาในการป้องกันได้มากกว่า 4 ชม. ตำรับครีมที่มีส่วนผสมของน้ำมันข่า 5 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันตะไคร้หอม 2.5 เปอร์เซ็นต์ และวานิลลิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีประสิทธิภาพในการป้องกันยุงกัดได้เช่นกันโดยมีระยะเวลาในการป้องกันนานกว่า 6 ชม. เอทานอลจากตะไคร้หอมและสารสกัดตะไคร้หอมที่ผสมกับน้ำมันมะกอกและน้ำมันหอมระเหยกลิ่นชะมดเช็ดเมื่อนำมาทดสอบกับยุงลายและยุงรำคาญตัวเมีย จะมีประสิทธิภาพในการไล่ยุงได้นาน โดยมีค่าเฉลี่ยช่วงเวลาอยู่ที่ 114-126 นาที นอกจากนี้ยังมีผลในการควบคุมกำจัดลูกน้ำยุงได้ด้วย น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีฤทธิ์ดีในการไล่ตัวอ่อนของเห็บ โดยให้ผลในการไล่ได้นานถึง 8 ชม. ตะไคร้หอมยังมีฤทธิ์ไล่ผีเสื้อกลางคืนและพวกแมลงบินต่างๆ ได้

2) ฤทธิ์ฆ่าแมลง น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม เมื่อนำมารมเมล็ดถั่ว นาน 72 ชม. มีผลฆ่าแมลง *Callosobruchus maculatus* ที่เข้าทำลายเมล็ดถั่วได้ โดยไม่มีผลต่อการงอกของถั่ว แต่มีผลต่อปรสิตของแมลงชนิดนี้มากกว่า สารสกัดตะไคร้หอมผสมกับสารสกัดจากเมล็ดสะเดา และข่า ในอัตรา 200 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีผลลดการเข้าทำลายของเพลี้ยอ่อนและหนอนเจาะฝักซึ่งเป็นแมลงศัตรูถั่วฝักยาวได้ แต่ไม่สามารถควบคุมการเข้าทำลายของแมลงวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจาะต้นถั่ว สารสกัดตะไคร้หอม ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม จะให้ผลน้อยมากในการควบคุมแมลงศัตรูกะหล่ำ แต่จะมีผลทำให้ไรแดงกุหลาบตายร้อยละ 95 ภายใน 20.70 ชม. นอกจากนี้ยังพบว่าแชมพูที่ส่วนผสมของสารสกัดตะไคร้หอม สามารถฆ่าเห็บ หมัดในสัตว์เลี้ยงได้

3) การทดสอบความเป็นพิษ สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์และน้ำ (1:1) จากต้นทำให้หนูตายครึ่งหนึ่งของจำนวนที่ทดลอง คือ 1 กรัมต่อกิโลกรัม

2.5.3 เสม็ดขาว (Whitewood)

พืชสกุลเสม็ด (*Melaleuca* spp.) เป็นพืชในวงศ์ Myrtaceae เช่นเดียวกับยูคาลิปตัส มีอยู่หลายชนิด แต่ในประเทศไทยที่พบทั่วไป คือ เสม็ดขาว ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Melaleuca leucadendron* Linn. พบบริเวณพื้นที่ที่ชุ่มน้ำ เช่นชายทะเลและรอบนอกของป่าพรุ (ธนิตย์และบุญชู, 2542) ที่จริงแล้วทั่วโลกอาจมีเสม็ดมากกว่า 200 ชนิด พบในหลายพื้นที่และหลายประเทศ ส่วนใหญ่พบในประเทศออสเตรเลีย แต่บางชนิดพบเหนือประเทศออสเตรเลีย เช่น อินโดนีเซีย นิวกินี นิวคาโลดิเนีย มาเลเซีย รวมทั้งประเทศไทย เสม็ดขาวมีชื่อพื้นเมืองที่แตกต่างกันไปตามท้องถิ่น เช่น ภาคกลางเรียก เสม็ด ภาคใต้เรียก เหม็ด คนไทยมุสลิมทางใต้เรียกว่า กือแล ชื่อสามัญอื่นๆเช่น Cajuput tree, Milk wood, Whitewood, Paperbark tree และ Swamp tree ซึ่งทั่วโลกมีพันธุ์ไม้ในวงศ์นี้ประมาณ 100 สกุล 3,000 ชนิด แต่เท่าที่พบในประเทศไทยมีเพียง 14 สกุล 112 ชนิด เช่น สกุลหว้าและชมพู่ (Eugenia) สกุลสนทราย (Baeckea) สกุลขี้ใต้ (Decaspermum) สกุลทุ (Phodomyrtus) และสกุลเสม็ดขาว (Melaleuca) รวมทั้งไม้ยูคาลิปตัส (Eucalyptus)

2.5.3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเสม็ดขาว (ธนิตย์และบุญชู, 2542)

เสม็ดขาวเป็นไม้ยืนต้นที่ไม่ผลัดใบ มีรูปทรงชีวิตได้หลายรูปแบบ เช่น เป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ กิ่งก้านห้อยลง ในประเทศไทยส่วนใหญ่มีขนาดเล็กคือ มีความสูงตั้งแต่ 5-25 เมตร มีความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 20 เซนติเมตร แต่มีพบได้บ้างในบางพื้นที่ว่ามีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 50 เซนติเมตร ในป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส ส่วนในต่างประเทศพบว่า บางต้นมีความสูงถึง 35 เมตร ไม้เสม็ดขาวมีเรือนยอดทรงแคบรูปกรวยคว่ำ เปลือกนอกเป็นแผ่นบางๆ ซ้อนกันเป็นชั้น หนาเป็นปึกราว 1-2 เซนติเมตร มีสีขาวถึงน้ำตาลเทาเรียงเป็นชั้นจำนวน 10-20 ชั้น เปลือกชั้นในสีน้ำตาลอ่อนบางมาก ลำต้นมักบิด (รูปที่ 2.8) ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงเวียนสลับ แผ่นใบรูปหอกขาว 5-10 เซนติเมตร กว้าง 1.5-4.0 เซนติเมตร ใบอ่อนมีขนสีขาวเป็นมัน ใบแก่ผิวใบเกลี้ยงสีเทาแกมเขียว ปลายใบแหลม ก้านใบยาว 0.5-1.0 เซนติเมตร เส้นใบบางมาก 5-7 เส้น เรียงขนานตามความยาวของใบ (รูปที่ 2.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.8 ลักษณะลำต้นของเสม็ดขาว

ที่มา: ธนิตย์และบุญชู, 2542

รูปที่ 2.9 ลักษณะใบและผลของเสม็ดขาว

ที่มา: ธนิตย์และบุญชู, 2542

ราก มีระบบรากฝอย ไม่มีรากแก้ว มีรัศมีของราก 2.50-3.20 เมตร และยึดดินไว้ได้ดีมาก จึงช่วยป้องกันการพังทลายของดินได้ดีพอสมควร

ดอกและผล ดอกเล็กมีสีขาว เป็นประเภทดอกสมบูรณ์ กลิ่นหอม กลีบดอก 5 กลีบ เกสรตัวผู้มีจำนวนมาก ก้านเกสรขาวพ้นกลีบดอก ผลแห้งคล้ายถ้วยหรือหมอนสีน้ำตาลอมเทาถึงคล้ำ ปลายเป็นแอ่ง แป้น แตกได้ มี 3 พลู กว้างยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร เมล็ดเล็กมีมากประมาณ 200 เมล็ดต่อผล ผลสดของไม้เสม็ดขาวประมาณ 1 ลิตร มีจำนวนผลประมาณ 11,300 ผล และผลสด 1 กิโลกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีจำนวนผลประมาณ 26,000 ผล และเมล็ด 1 กิโลกรัม จะมีประมาณ 5-9 ล้านเมล็ด เก็บผลได้เกือบตลอดปี

2.5.3.2 การใช้ประโยชน์

เสม็ดขาวเป็นไม้ที่เอื้อประโยชน์ให้กับราษฎรที่อาศัยอยู่ในบริเวณใกล้เคียงหรือโดยรอบพื้นที่ป่าไม้เสม็ดขาวมาช้านานแล้ว (สมชัย และคณะ, 2544) โดยการนำส่วนต่างๆของไม้เสม็ดขาวมาใช้ประโยชน์ เช่น เนื้อไม้นำมาใช้ในการก่อสร้างที่อยู่อาศัย ทำเสา ทำรั้ว หรือเครื่องมือเครื่องใช้และเป็นเครื่องมือสำหรับใช้ในครัวเรือน เป็นต้น ชาวบ้านใช้ใบและยอดอ่อนรับประทานเป็นผัก ใบแก่ชงเป็นเครื่องดื่มชาได้ (ธนิตย์และบุญชู, 2542) ใบใช้กลั่นเป็นน้ำมันเขียวหรือน้ำมันเสม็ดขาว (cajuput oil) ใช้ทาแก้เคล็ด แก้ปวดเมื่อย ปวดบวม รักษาโรคไขข้ออักเสบ ใช้ทำยาหม่อง ยาแก้ปวด ปวดหู ปวดฟัน ยารักษาผิวหนัง รักษาสิว ใช้ฆ่าแมลง ใช้เป็นยาในเป็นยากระตุ้น ขับลม แก้อาการเกร็งกล้ามเนื้อในกระเพาะลำไส้ จุกเสียด แก้ท้องอืด ลมชัก ขับเสมหะ แก้หลอดลมอักเสบ ขับพยาธิ เป็นต้น ใบและเปลือกใช้พอกแผลที่กลัดหนองเพื่อดูดให้หนองแห้ง (คิด. 2527)

น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากเสม็ดขาวมีกลิ่นคล้ายการบูรและมีรสขม มีคุณค่าทางยาโดยมีฤทธิ์ในการไล่ยุงได้ดีกว่าน้ำมันตะไคร้หอม เพราะระเหยช้ากว่าและยังใช้ทาเพื่อฆ่าหมัดและเหาได้อีกด้วย (นิจศิริ และพยอม, 2534) สำหรับน้ำมันเขียวที่กลั่นได้ใหม่ๆ ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน แต่ซื้อขายกันในตลาดมีสีเขียวเพราะมีธาตุทองแดงปนอยู่เล็กน้อย น้ำมันเขียวใช้เป็นยาขับเสมหะ แก้หลอดลมและกล่องเสียงอักเสบ ขับลม ถ้ารับประทานเกินขนาดจะทำให้เกิดความระคายเคืองต่อทางเดินอาหาร

ศิรินันท์และคณะ (2545) ได้ทำการกลั่นน้ำมันเสม็ดขาวเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี พบว่าองค์ประกอบของน้ำมันเสม็ดขาวที่ได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารประกอบโมโนเทอร์พินส์ (monoterpenes) ที่สำคัญได้แก่ เทอร์พิโนลีน (tetpinolene) 24.74 เปอร์เซ็นต์ แกมมา-เทอร์พินีน (gamma-terpinene) 22.84 เปอร์เซ็นต์ แอลฟา-ไพนีน (alpha-pinene) 9.38 เปอร์เซ็นต์ พี-ไซมีน (p-cymene) 8.41 เปอร์เซ็นต์ แอลฟา-เทอร์พินีน (alpha-terpinene) 4.52 เปอร์เซ็นต์ แอลฟา-เฟลลาดรีน (alpha-phelladrene) 3.92 เปอร์เซ็นต์ และ เทอรร์พิเนน-4-ออล 2.57 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารประกอบเซสควรเทอร์พีนส์ (sesquiterpenes) 10.52 เปอร์เซ็นต์ ที่สำคัญได้แก่ คารีโอฟีลลีน (caryophyllene) 2.95 เปอร์เซ็นต์ และ ฮิวมูลีน (humulene) 2.61 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน 0.1 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบอื่นๆที่ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 10 อะตอม และ 15 อะตอม แต่ไม่ทราบสูตรโครงสร้างที่แน่นอน และองค์ประกอบที่ไม่ทราบว่าคืออะไรอีก 0.82 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบที่พบมากที่สุดในน้ำมันเสม็ดขาวที่ได้คือ เทอร์พีโนลีน (24.74 เปอร์เซ็นต์) และ แกมมา-เทอร์พินีน (22.84 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ซึ่งนอกจากไม่ใช่สารสำคัญที่ตลาดต้องการแล้วยังมีปริมาณไม่สูงพอที่จะนำมาเป็นจุดขายในท้องตลาดด้วย แต่เนื่องจากมีรายงานว่าองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดขาวมีความแปรผันสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เสม็ดเจริญเติบโต (Brophy และคณะ, 1989) จึงไม่ควรสรุปว่าเสม็ดขาวในบ้านเราไม่สามารถนำมาใช้ในการผลิตน้ำมันเสม็ดเพื่อค้าขายได้ แต่ควรศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเสม็ดที่เจริญเติบโตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันเปรียบกันดูด้วย

เนื่องจากองค์ประกอบหลายชนิดของน้ำมันเสม็ดที่กลั่นได้ในการทดลอง (ศิรินันท์และคณะ, 2545) มีฤทธิ์ไล่หรือฆ่าแมลง เช่น มด ยุง ปลวก และเพลี้ยได้ดี จากการนำน้ำมันเสม็ดไปทดสอบกับยุงพบว่าสามารถไล่ยุงได้ดี และมีรายงานว่าน้ำมันเสม็ดขาวสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดได้ดีด้วย (รุ่งระวี, 2544; Cuong และคณะ, 1994) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำมันเสม็ดขาวที่ได้ไปผลิตเป็นสเปรย์ไล่ยุง หรือผลิตเป็นสบู่อาบน้ำ แชมพูสระผมได้ นอกจากนี้จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อราทำลายไม้ร่วมกับกลุ่มป้องกันรักษาเนื้อไม้ พบว่าน้ำมันเสม็ดที่ได้ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อราทำลายไม้ได้ดีมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Aspergillus flavus IMI 242684 จาก International Mycological Institute ประเทศอังกฤษ

3.2 อุปกรณ์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

1. บีกเกอร์ (beaker)
2. หลอดทดลอง (test tube)
3. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
4. ขวดเตรียมอาหาร (duran flask)
5. เข็มเขี่ย (needle)
6. ลูป (loop)
7. สำลี
8. กรวยแยก (separator funnel)
9. ผ้าขาวบาง
10. กระบอกตวง (cylinder)
11. ปากคีบ (forcep)
12. ตู้เขี่ยเชื้อ (larminar air flow)
13. ปิเปตต์ (pipette)
14. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)
15. เครื่องชั่ง (balance)
16. หม้ออังไอน้ำ (water bath)
17. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
18. ไซลินเดอร์ คัพ (Cylinder cup) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
19. ชุดตรวจสอบสารพิษสำเร็จรูป (DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. น้ำเกลือ (normal saline)
2. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์
3. เมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Potato Dextrose Agar (PDA) จากบริษัท Scharlau

3.3 น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดลอง

1. น้ำมันหอมระเหยสำเร็จรูปตะไคร้จากบริษัท ฮงฮวด จำกัด
2. น้ำมันหอมระเหยสำเร็จรูปตะไคร้หอมจากบริษัท ฮงฮวด จำกัด
3. น้ำมันหอมระเหยสำเร็จรูปเสม็ดขาวจากบริษัท ฮงฮวด จำกัด

(บริษัท ฮงฮวด จำกัด สำนักงานใหญ่ เลขที่ 41-45 ถนนจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพฯ 10110)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus*

การเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นทำโดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ผ่านไฟจนร้อนแดงและทิ้งไว้ให้เย็น เขี่ยสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* จากหลอดทดลอง(slant)ลงในขวดเพาะเชื้อ ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องแล้วเตรียมสารละลายสปอร์ โดยใช้น้ำเกลือความเข้มข้น 0.09 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 0.018 กรัม ต่อน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงขวดเพาะเชื้อ ที่มีเชื้อราอายุ 7 วัน ใช้ลูปเขี่ยให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหาร นำสารละลายสปอร์ที่ได้ไปกรองด้วยชุดกรองสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นนำสารละลายที่กรองได้มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ได้จำนวนสปอร์ประมาณ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.4.2 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำน้ำมันหอมระเหย จาก ตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว มาทำละลายด้วยสารละลายเอทานอล เพื่อให้ได้ความเข้มข้น ร้อยละ 1, 2, 3, 4, และ 5 โดยปริมาตร (v/v)

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาวที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*

3.4.3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อPDA ใส่จานเพาะเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 14 เซนติเมตร โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ตามวิธีของ Lorian (1986) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที จากนั้นรอให้อาหารอุ่นที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เทอาหารเลี้ยงเชื้อ 25 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 200 ไมโครลิตร ใส่ลงใน PDA ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลองที่หลอมและทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อราให้เข้ากัน เททับให้ทั่วพื้นหน้าของอาหารในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

3.4.3.2 นำไซลินเดอร์ คัพ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการอบที่อุณหภูมิ 195 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง วางลงบนจานเพาะเชื้อแต่ละจาน จานละ 5 คัพ

3.4.3.3 ใช้ไมโครปิเปตต์ขนาด 300 ไมโครลิตร ดูดน้ำมันหอมระเหยที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นต่างๆมาหยดลงในไซลินเดอร์ คัพ จนเต็ม ทำการทดลองน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดทั้งหมด 5 ซ้ำ (1 จานต่อ 1 ซ้ำ)

3.4.3.4 ทำชุดการทดลองควบคุมเช่นเดียวกับในข้อ 3.4.4.3 แต่เปลี่ยนจากน้ำมันหอมระเหยเป็นเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95

3.4.3.5 นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7, 14 , 21 และ 28 วัน

3.4.3.6 เมื่อครบกำหนดตรวจผลสังเกตบริเวณที่เกิดการยับยั้ง ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง

3.4.3.7 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้ด้วยวิธี Bonferroni Simultaneous test (สิทธิชัย, 2547)

3.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

3.4.4.1 เตรียมอาหารแข็งคือ ปลายข้าวจำนวน 1,060 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นทิ้งให้ปลายข้าวเย็นลง

3.4.4.2 นำถ้วยวัดความชื้น ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำออกมาทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนัก นำกลับเข้าเตาอบแล้วทำตามขั้นตอนเดิม จนได้น้ำหนักคงที่

3.4.4.3 ชั่งปลายข้าวที่ต้องการหาความชื้นใส่ใน ถ้วยวัดความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอนให้ได้น้ำหนัก 2-5 กรัม บันทึกน้ำหนักของ กับน้ำหนักปลายข้าวก่อนอบ จากนั้นนำไปอบทำเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.4.4.2 น้ำหนักที่หายไปจะเป็นน้ำหนักที่มีอยู่ในปลายข้าว จากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในปลายข้าว (AOAC, 1995) ดังนี้

$$P = \frac{(A - B)\,100}{C}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ P คือ เปอร์เซ็นต์ความชื้นในปลายข้าว

A คือ น้ำหนักของถ้วยวัดความชื้นกับน้ำหนักของปลายข้าวก่อนอบ

B คือ น้ำหนักของถ้วยวัดความชื้นกับน้ำหนักของปลายข้าวหลังอบ

C คือ น้ำหนักปลายข้าวก่อนอบ

เมื่อแทนค่าที่ได้ในสูตรเป็นดังนี้

$$P = \frac{(20.0254 - 19.7980)100}{2.5159}$$

เพราะฉะนั้น ความชื้นเริ่มต้นในปลายข้าวเท่ากับ 9.0385 เปอร์เซ็นต์

3.4.4.4 ทำการปรับความชื้นของปลายข้าวให้เป็น 25 เปอร์เซ็นต์ โดยการเติมน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปจำนวน 167.1 มิลลิลิตร

3.4.4.5 เตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* ให้มีความเข้มข้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำสารละลายสปอร์ของเชื้อรา 5 มิลลิลิตร มาใส่ลงในถุงพลาสติกที่มีปลายข้าวจำนวน 50 กรัม ซึ่งแต่ละถุงมีสารละลายของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และ ตะไคร้หอมที่ความเข้มข้น 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ และทำชุดควบคุมโดยใส่เฉพาะสารละลายสปอร์ของเชื้อรา บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

3.4.5 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์และการสกัดสารพิษจากตัวอย่าง

3.4.5.1 เตรียมวอชชิ่งบัฟเฟอร์ โดยนำวอชชิ่งบัฟเฟอร์ในขวดมาเจือจางเป็น 0.01 M PBS-T โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร

3.4.5.2 เตรียมเอนไซม์คอนจูเกต โดยเติมเอนไซม์คอนจูเกต จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเอนไซม์คอนจูเกต 1 หลอด เขย่าเล็กน้อย

3.4.5.3 ทำการสกัดสารอะฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างโดยบดตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นชั่งตัวอย่างจากแต่ละถุงจำนวน 20 กรัม ใส่ในฟลาสก์และเติม 100 มิลลิลิตร ของ เมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ลงในฟลาสก์ทุกฟลาสก์ (อัตราส่วนของตัวอย่างต่อเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1:5)

3.4.5.4 ปิดปากฟลาสก์ด้วยแผ่นพาราฟิล์ม แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

3.4.5.5 นำสารสกัดที่ได้จากการเขย่ามาตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที แล้วจึงนำส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บส่วนที่กรองได้ไว้ในแก้วที่ปิดสนิท สารสกัดที่กรองได้นี้จะมีความเข้มข้นเป็น 1:5 เท่า

3.4.6 การวิเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินโดยวิธีอีไลซ่า

3.4.6.1 นำสารสกัดที่กรองได้มาทำการเจือจางเป็น 1:20 เท่า โดยใช้สารละลายวอชชิ่งบัฟเฟอร์(0.01 M PBS-T) ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.5.1 โดยใช้ส่วนที่กรองได้ 1 มิลลิลิตร ผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับวอชชิ่งบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร ทำการทดสอบสารพิษอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay (กรมวิชาการเกษตร, 2547) โดยหยดสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐานระดับความเข้มข้น 0, 0.2, 0.5, 1 และ 2 ng/ml จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ และหยดสารสกัดตัวอย่างที่เจือจางแล้วจำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบที่เหลือ

3.4.6.2 หยดเอนไซม์คอนจูเกต ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.4.5.2 จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมทดสอบทุกหลุม เขย่าเล็กน้อย แล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

3.4.6.3 หลังจากครบเวลาการบ่มแล้วเทสารในหลุมทดสอบทิ้งโดยการคว่ำหลุม แล้วล้างหลุมทดสอบโดยเติมวอชชิ่งบัฟเฟอร์ลงในหลุมให้เต็มทุกหลุมแล้วคว่ำทิ้ง ล้างอย่างน้อย 3 ครั้ง คว่ำหลุมทดสอบแล้วเคาะให้แห้ง

3.4.6.4 หยดสับสเตรท (A+B = 1 : 1) จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมทดสอบ แล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีฟ้าตามลำดับความเข้มข้นของสารพิษ ตัวอย่างที่มีสีฟ้าเข้มแสดงว่าไม่มีสารพิษอะฟลาทอกซินหรือมีน้อยและตัวอย่างที่มีสีฟ้าเจือจางหรือสีขาว แสดงว่ามีสารพิษมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ที่บ่มเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอม เสม็ดขาวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยสามชนิด คือ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0(ชุดควบคุม) , 1 , 2 , 3 , 4 และ 5 ที่บ่มเป็นระยะเวลา 7 , 14 , 21 และ 28 วัน ทำการวัดผลโดยวัดความยาวศูนย์กลางบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ให้ผลการทดลองของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด ดังตารางที่ 4.1 ถึง 4.3 พบว่าน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรามากขึ้น เมื่อระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเพิ่มขึ้น โดยสามารถยับยั้งการเจริญได้มากที่สุดใน 7 วันแรก และพบว่าความสามารถในการยับยั้งจะลดลงในวันที่ 14 , 21 และ 28 ตามลำดับ โดยจากการศึกษาพบว่า ตะไคร้ ตะไคร้หอม เสม็ดขาว ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 โดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเป็น 58.22 , 57.06 และ 17.40 มิลลิเมตร ที่ 7 วัน ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA โดยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละ)	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)			
	7	14	21	28
ชุดควบคุม	0.00	0.00	0.00	0.00
1	20.78	15.92	12.60	9.08
2	21.76	17.84	14.56	11.10
3	28.94	22.90	16.68	12.20
4	53.24	33.18	22.42	12.34
5	58.22	38.28	23.76	12.34

หมายเหตุ ผลการทดลองทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางรวมดัพ ที่มีขนาด 0.6000 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA โดยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละ)	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)			
	7	14	21	28
ชุดควบคุม	0.00	0.00	0.00	0.00
1	26.70	18.80	14.92	9.72
2	31.58	22.70	16.56	10.48
3	33.78	26.50	19.86	12.42
4	54.72	35.38	24.48	15.52
5	57.06	38.28	25.76	16.50

หมายเหตุ ผลการทดลองทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางรวมดัพ ที่มีขนาด 0.6000 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4.3 ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (มิลลิเมตร) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA โดยน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละ)	ระยะเวลาการบ่ม (วัน)			
	7	14	21	28
ชุดควบคุม	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00
3	11.34	9.42	0.00	0.00
4	13.90	11.38	9.45	0.00
5	17.40	12.62	10.18	0.00

หมายเหตุ ผลการทดลองทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางรวมดัพ ที่มีขนาด 0.6000 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA

จากการศึกษาหาชนิดของน้ำมันหอมระเหย ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย และระยะเวลาในการบ่ม ที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA โดยทำการทดลองแบบแฟกทอเรียลขนาด 3x6x4 ในแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (3x6x4 Factorial Experiment in Randomize Completely Block Design) และเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน ได้ผลดังตาราง 4.4 พบว่า ชนิดของน้ำมันหอมระเหย ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย และระยะเวลาในการบ่ม มีความสัมพันธ์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*

จากตารางที่ 4.4 พบว่า ชนิดของน้ำมันหอมระเหย ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย และระยะเวลาในการบ่ม มีอิทธิพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* โดยเห็นได้จากค่า P - value ของอิทธิพลร่วมระหว่างทั้ง 3 ปัจจัยมีค่าน้อยกว่า 0.05 (P-value<0.05) แสดงว่าทั้ง 3 ปัจจัยมีอิทธิพลร่วมกันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. flavus* ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) ต่อไป เพื่อหา 2 ระดับที่แตกต่างกันด้วยวิธีของ Bonferroni Simultaneous test ได้ผลดังตาราง 4.5

ตารางที่ 4.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย(มิลลิเมตร) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหย 3 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

แหล่งของความแปรปรวน	df	SS	MS	F_{cal}	P - value
ชนิดของน้ำมันหอมระเหย(A)	2	21943.599	10971.800	7857.735	0.000
ระดับความเข้มข้น (B)	5	26399.992	5279.998	3781.406	0.000
ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ (C)	3	14624.906	4874.969	3491.334	0.000
อิทธิพลรวมระหว่าง A*B	10	5253.723	525.372	376.259	0.000
อิทธิพลรวมระหว่าง B*C	15	7509.274	500.618	358.531	0.000
อิทธิพลรวมระหว่าง A*C	6	2509.181	418.197	299.502	0.000
อิทธิพลรวมระหว่าง A*B*C	30	1449.780	48.326	34.610	0.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	288	402.136	1.396		
รวม	359	80092.593			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.5 พบว่า สามารถแบ่งชนิดของน้ำมันหอมระเหย ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย และระยะเวลาในการบ่ม ตามสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ออกเป็น 12 กลุ่ม จากข้อมูลทั้งหมดสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอมมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญได้สูงสุดไม่แตกต่างกัน เมื่อน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอมมีระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 ระยะเวลาบ่ม 7 วัน รองลงมา คือ น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ4 ระยะเวลาการบ่ม 7 วัน โดยให้ผลการยับยั้งไม่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองของ Thanaboripat และคณะ (2004) แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอมความเข้มข้นร้อยละ 0.2 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* IMI 242684 , *A. flavus* M113 , *A. flavus* S 156 เป็นเวลา 21 วัน, 7 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกตัวอย่างสมบูรณ์ในวันที่ 28 สำหรับการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินที่สร้างโดย *A. flavus* IMI 242684 สามารถยับยั้งได้เพียง 3 วัน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในขณะที่สามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ 28 วัน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5

Nguefack และคณะ (2004) ได้ทำการประเมินประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย ในการควบคุมการบูดเสียของอาหารจากเชื้อรา 3 ชนิด คือ *Fusarium moniliforme* , *A. flavus* และ *A. flumigatus* ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ที่ความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม สามารถลดการเจริญของ *F . moniliforme* ได้ 64 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้น 300 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ ที่ความเข้มข้น 500 พีพีเอ็ม สามารถลดการเจริญของ *A. flavus* และ *A. flumigatus* ได้ 48 และ 77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 1200 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันตะไคร้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.01)

จากงานวิจัยของ Thanaboripat และคณะ (2007) ได้ศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหย 16 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA พบว่ามีน้ำมันหอมระเหย 3 ชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้คือ ลาเวนเดอร์ อบเชย และเสม็ดขาว โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาวมีอิทธิพลในการยับยั้งการเจริญได้สูงสุด และความเข้มข้นที่เหมาะสมคือระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5625

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.5 ตารางแสดงผลการเปรียบเทียบเชิงซ้อนรายคู่ของค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ของน้ำมันหอมระเหย 3 ชนิดในทุกระดับความเข้มข้นเมื่อมีระยะเวลาในการบ่ม 7 , 14 , 21 และ 28 วัน

Treatment			ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งรอบๆไซลินเดอร์ คัพ (มม.)
ชนิดน้ำมันหอมระเหย	ความเข้มข้น (ร้อยละ)	ระยะเวลาที่ทำการบ่ม (วัน)	
ตะไคร้	5	7	58.22 [a]
ตะไคร้หอม	5	7	57.06 [a]
ตะไคร้หอม	4	7	54.72 [b]
ตะไคร้	4	7	53.24 [b]
ตะไคร้หอม	5	14	38.26 [c]
ตะไคร้	5	14	38.26 [c]
ตะไคร้หอม	4	14	35.38 [d]
ตะไคร้หอม	3	7	33.78 [d]
ตะไคร้	4	14	33.18 [d]
ตะไคร้หอม	2	7	31.58 [de]
ตะไคร้	3	7	28.94 [de]
ตะไคร้หอม	1	7	26.70 [e]
ตะไคร้หอม	3	14	26.50 [ef]
ตะไคร้หอม	5	21	25.76 [ef]
ตะไคร้หอม	4	21	24.48 [f]
ตะไคร้	5	21	23.76 [g]
ตะไคร้	3	14	22.90 [g]
ตะไคร้หอม	2	14	22.70 [g]
ตะไคร้	4	21	22.42 [g]
ตะไคร้	2	7	21.76 [g]
ตะไคร้	1	7	20.98 [g]
ตะไคร้หอม	3	21	19.86 [g]
ตะไคร้หอม	1	14	18.80 [gh]
ตะไคร้	2	14	17.48 [h]
เสม็ดขาว	5	7	17.40 [h]
ตะไคร้	3	21	16.68 [h]
ตะไคร้หอม	2	21	16.56 [h]
ตะไคร้หอม	5	28	16.50 [h]
ตะไคร้	1	14	15.92 [h]
ตะไคร้หอม	4	28	15.52 [h]
ตะไคร้หอม	1	21	14.92 [hi]
ตะไคร้	2	21	14.51 [hi]
เสม็ดขาว	4	7	13.90 [hi]
เสม็ดขาว	5	14	12.62 [i]
ตะไคร้	1	21	12.60 [i]
ตะไคร้หอม	3	28	12.42 [i]

หมายเหตุ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งรอบๆไซลินเดอร์คัพ ที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.5 (ต่อ) ตารางแสดงผลการเปรียบเทียบเชิงซ้อนรายคู่ของค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) บริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ของน้ำมันหอมระเหย 3 ชนิดในทุกระดับความเข้มข้นเมื่อมีระยะเวลาในการบ่ม 7 , 14 , 21 และ 28 วัน

Treatment			ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งรอบๆไซลินเดอร์ คัพ (มม.)
ชนิดน้ำมันหอมระเหย	ความเข้มข้น (ร้อยละ)	ระยะเวลาที่ทำการบ่ม (วัน)	
ตะไคร้	5	28	12.34 [i]
ตะไคร้	4	28	12.34 [i]
ตะไคร้	3	28	12.02 [i]
เสม็ดขาว	4	14	11.38 [ij]
เสม็ดขาว	3	7	11.34 [ij]
ตะไคร้	2	28	11.10 [ij]
ตะไคร้หอม	2	28	10.48 [ij]
เสม็ดขาว	5	21	10.18 [ij]
ตะไคร้หอม	1	28	9.72 [ij]
เสม็ดขาว	3	14	9.42 [ij]
เสม็ดขาว	4	21	3.78 [k]
เสม็ดขาว	5	28	0.00 [l]
เสม็ดขาว	4	28	0.00 [l]
เสม็ดขาว	3	28	0.00 [l]
เสม็ดขาว	2	28	0.00 [l]
เสม็ดขาว	1	28	0.00 [l]
เสม็ดขาว	0(ควบคุม)	28	0.00 [l]
เสม็ดขาว	3	21	0.00 [l]
เสม็ดขาว	2	21	0.00 [l]
เสม็ดขาว	1	21	0.00 [l]
เสม็ดขาว	0	21	0.00 [l]
เสม็ดขาว	2	14	0.00 [l]
เสม็ดขาว	1	14	0.00 [l]
เสม็ดขาว	0	14	0.00 [l]
เสม็ดขาว	2	7	0.00 [l]
เสม็ดขาว	1	7	0.00 [l]
เสม็ดขาว	0	7	0.00 [l]
ตะไคร้หอม	0	21	0.00 [l]
ตะไคร้หอม	0	14	0.00 [l]
ตะไคร้หอม	0(ควบคุม)	7	0.00 [l]
ตะไคร้	0(ควบคุม)	28	0.00 [l]
ตะไคร้	0(ควบคุม)	21	0.00 [l]
ตะไคร้	0(ควบคุม)	14	0.00 [l]
ตะไคร้	0(ควบคุม)	7	0.00 [l]

หมายเหตุ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งรอบๆไซลินเดอร์คัพ ที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการทดสอบความสามารถของน้ำมันหอมระเหยบางชนิดต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนปลายข้าว

จากการทดสอบความสามารถของน้ำมันหอมระเหยจาก ตะไคร้ และตะไคร้หอม ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 4 และ 5 ต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* บนปลายข้าว โดยบ่มเป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นวัดผลโดยใช้ชุดทดสอบอะฟลาทอกซินบี1 (ELISA TEST KIT) อ่านผลโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารที่ทดสอบเมื่อเทียบกับสารอะฟลาทอกซินมาตรฐาน โดยเมื่อได้ทำการทดสอบ ให้ผลการทดสอบ คือ ชุดควบคุม(ไม่มีน้ำมันหอมระเหย) ตรวจพบระดับของอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในช่วงไม่เกิน 20 พีพีบี ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 4 และ 5 ให้ผลการทดสอบที่เหมือนกัน คือ ตรวจพบระดับของอะฟลาทอกซินบี 1 ไม่เกิน 10 พีพีบี

Paranagama และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (fungicial) และฤทธิ์ต้านการสร้างสารอะฟลาทอกซิน (anti-aflatoxigenic effect) ของเชื้อ *A. flavus* ด้วยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา (fungistatic) และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (fungicidal) และที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลตร พบสามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินโดยแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยตรวจวัดปริมาณของอะฟลาทอกซินได้เพียง 526 พีพีบี เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 2070 พีพีบี และที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถตรวจวัดปริมาณอะฟลาทอกซินได้เลย

Mahmoud (1994) ได้รายงานว่าน้ำมัน 5 ชนิด จำนวน 100 พีพีเอ็ม ได้แก่ เจอรานิออล เนรอล และซิโตรเนลลอล ซินนามาลดีไฮด์ และไทมอล สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถป้องกันการสังเคราะห์สารอะฟลาทอกซินได้

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า น้ำมันหอมระเหยที่นำมาทดสอบ มีแนวโน้มที่จะสามารถยับยั้งสารพิษอะฟลาทอกซินได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น และยังมีข้อจำกัดอยู่มากสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้จริงเพื่อให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ตะไคร้หอม และเสม็ดขาว สรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอม ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 ในระยะเวลาการบ่ม 7 วัน ให้ผลการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ได้ดีที่สุดไม่แตกต่างกัน โดยวัดค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งได้เท่ากับ 58.22 มิลลิเมตร และ 57.06 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนเสม็ดขาวนั้น สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้น้อยที่สุด โดยไม่พบการยับยั้งที่ความเข้มข้นต่ำ(ร้อยละ 1-2) แต่สามารถยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 ขึ้นไป โดยวัดค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 , 4 และ 5 ได้เป็น 11.34 , 13.90 และ 17.40 มิลลิเมตร เมื่อบ่มไว้ 7 วัน ตามลำดับ และมื่อทำการคัดเลือก ชนิดและความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* อย่างมีประสิทธิภาพ มาทำการทดลองโดยการศึกษาความเป็นไปได้ในการยับยั้งสารพิษอะฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้น โดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอม ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 4 และ 5 มาทำการทดสอบ พบว่าในชุดควบคุมมีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินไม่เกิน 20 พีพีบี ส่วนในตัวอย่างที่มีน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอมนั้น ตรวจพบสารพิษอะฟลาทอกซินไม่เกิน 10 พีพีบี แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้และตะไคร้หอมนั้น สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ระดับหนึ่ง แต่อย่างไรก็ดี การตรวจปริมาณสารพิษโดยวิธีนี้ เป็นเพียงการประมาณจากสีที่มองเห็นเมื่อเทียบสารพิษมาตรฐาน (เชิงคุณภาพ) ยังไม่มีการหาปริมาณของสารพิษอย่างละเอียด ค่าที่ได้ออกมาจึงไม่ได้เป็นปริมาณที่แน่นอน

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาสมุนไพรชนิดอื่นๆ ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นที่ความเข้มข้นต่ำกว่า รวมถึงความสามารถในการยับยั้งสารพิษอะฟลาทอกซิน
2. ศึกษาวิธีการ ขั้นตอน เพื่อที่จะสามารถทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อราที่นานขึ้น
3. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการขยายขนาดการทดลอง เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้กับทางการเกษตรกรรมได้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และสารพิษอะฟลาทอกซิน
4. ควรมีการทดสอบสารพิษอะฟลาทอกซินจากตัวอย่าง ด้วยการอ่านผลจากเครื่อง Micro reader ซึ่งเป็นการอ่านค่าเชิงปริมาณ เพื่อให้ความละเอียด ถูกต้อง แม่นยำมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกรัตน์ ป้องประทุม. 2544. สารพิษอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) [Online].Available: http://www.gpo.or.th/rdi/html/kanokrat.html.

กรมวิชาการเกษตร. 2547. คู่มือการใช้ชุดตรวจสอบสารอะฟลาทอกซินสำเร็จรูป. กลุ่มงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร.

คิด สุวรรณสุทธิ. 2527. ไม้และป่าบางชนิดในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: นำอักษรการพิมพ์.

ควงจันทร์ สุขประเสริฐ และวนิดา ยุรญาติ. 2545. สารพิษอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในเครื่องเทศ. วารสารสุขาภิบาลอาหาร. 4(2): 33-37.

ดุษฎี ธนะบริพัฒน์, นวลพรรณ ณ ระนอง และ ณหทัย พีระปกรณ์. 2532. ผลของสมุนไพรบางชนิดต่อการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 5(1): 33-39.

ดุษฎี ธนะบริพัฒน์, วัฒนะ เชื้อน้อย, อุเทน เพชรรัตน์, วรารัตน์ เรืองรัตนเมธี และ กฤษณา ไกรสินธิ์. 2543. Control of aflatoxigenic fungi by thai neem. วารสารองค์การเภสัชกรรม. 27(1): 41-49.

ทักษอร บุญชู, นงคราญ มหาวัง, บัณฑิต คันธา และทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย. 2549. ผลของสารสกัดจากใบช้าพลู และตะไคร้ต่อการปนเปื้อนของ *Aspergillus flavus* และการงอกของเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร 37(5): 208-211.

ธนิตย์ หนูยิ้ม และบุญชู บุญทวี. 2542. ไม้เสม็ดขาว. ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร.

นันทวัน บุณยะประภัศร. 2530. ก้าวไปกับสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: ธรรกมลพิมพ์.

นิจศิริ เรืองรังสี และพยอม ตันติวัฒน์. 2534. พืชสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

นิจศิริ เรืองรังสี. 2534. เครื่องเทศ. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปวีณา เกนขุนทด และ สุวิทย์ ธีรพันธุวัฒน์. 2548. วิธีการวิเคราะห์หาสารอะฟลาทอกซินบี 1 ในวัตถุดิบอาหารสัตว์ เอกสารนำเสนอในวิชาการสัมมนาทางสัตวศาสตร์ สาขาสัตวศาสตร์ [Online].Available: http://agserver.kku.ac.th/abag/wuttigrai/seminar/2548_1/Paveena.pdf.

พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ. 2537. สมุนไพรก้าวใหม่. กรุงเทพมหานคร: ที.พี. พริ้นท์.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ, สุวิทย์ ธีรพันธุวัฒน์ และ วินัย ใจขาน. 2548. คู่มือปฏิบัติการ โภชนาศาสตร์สัตว์ประยุกต์. ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รุ่งระวี เต็มฤกษ์ศิริกุล. 2544. บรรยายในการอบรมการพัฒนาพืชสมุนไพรเพื่อสรีรวิทยาการผลิตสัตว์และสุขภาพของมวลมนุษย์. 18-20 เม.ย. 2544 ณ. อาคารปฏิบัติการวิทยาศาสตร์พื้นฐาน, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

วนิดา จิตต์หมั่น และทวีศักดิ์ สุวคนธ์. 2541. กลยุทธ์คลายเครียด. เอกสารการประชุมวิชาการเภสัชกรรมชุมชน ครั้งที่ 17 ระหว่างวันที่ 19-20 มีนาคม.

ศิรินันท์ ทับทิมเทศ, ทรรศนีย์ กิติรัตน์ตระการ และชูจิตร อนันตโชค.2545. น้ำมันหอมระเหยจากใบเสม็ด (Cajuput oil). รายงานการประชุมวิชาการป่าไม้ประจำปี. 1-9.

สมชัย เบญจชย, ธวัช จิรายุส, พรพิมล อมรโชติ, ลักขมี สุทธิวิไลรัตน์, จรัส ช่วยชนะ, บุญส่ง สมเพาะ และวิชิต สนธิวณิช. 2544. การประเมินศุกยภาพการใช้ประโยชน์ไม้เสม็ดขาว. วารสารงานวิจัย ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุศิรินธร. นราธิวาส: 2.

สิทธิชัย เจริญเศรษฐศิลป์. 2546. การวางแผนการทดลอง. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุธี วัฒนาผาติ. 2549. Codex กำหนดมาตรฐานระดับการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดอัลมอน เฮเซลนัท และพิสตาชิโอ. National Food Institute Thailand [Online].Available: http://www.nfi.or.th/stat/codex/file/news/Codex49102.pdf.

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. สารพิษจากเชื้อรา : อะฟลาทอกซิน. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อภิษฐา ช่างสุพรรณ. 2548. อะฟลาทอกซินในผลผลิตทางการเกษตร. [Online].Available:http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/bsp_1_2548_aflatoxi n.pdf.

อรัญญา มโนสร้อย และจีรเดช มโนสร้อย. 2548. น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพร การใช้ทางยาและเครื่องสำอาง. เชียงใหม่: โรงพิมพ์ครองช่าง.

Abergaz, B., Yohannes, P.G. and Dieter, R.K. 1983. Constituents of the essential oils of Ethiopian *Cymbopogon citrates*. *Journal of Natural Products*. 46(3): 424-426.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemistry. Washington, D.C.

Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C. and Cleveland, T.E. 1991. Oxidation-reduction reaction in biosynthesis of secondary metabolites. In: Bhatnagar D. Lillehoj E.B. Arora D.K., eds. Mycotoxin in Ecological Systems. Newyork: Maecel Dekker.

Brophy, J.J., Boland, D.J. and Lassak, E.V. 1989. Leaf essential oils of *Melaleuca* and *Leptospermum* species from tropical Australia. In Tree for the Tropics: Growing Australia Multipurpose Trees and Shrubs in Developing Countries. Australian Centre for International Agriculture Research. Canberra, Monograph No. 10. 193-203.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chu, F.S. and Ueno, I. 1977. Production of antibody against B1. *Applied and Environmental Micorbiology*. 33: 1125-1128.

Chungsamarnvart, N. and Jiwajinda, S. 1992. Acaricidal activity of volatile oil from lemon and citronella grasses on tropical cattle ticks. *Kasetsart Journal.* (Nature Science). 26(5):46-51.

Cuong, D.N., Xuyen, T.T., Motl, O., Stransky, K., Presslova, J., Jedlickova, Z. and Sery, V. 1994. Antibacterial properties of vietnamese cajuput oil. *Journal of Essential Oil Research*. 6: 63-67.

Eaton, D.L., Ramsdell, H.S. and Neal, G.E. 1994. Biotransformation of aflatoxins. In : Eaton D.L, Groopman, J.D., eds. The Toxicology of Aflatoxins : Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. San Diego, California: Academic Press: 45-72.

Firmenprofil Company. 2005. [Online].Available:http://www.coring.de/intro.htm.

Foda, Y.H., Abd Allah, M.A. and Zaki, M. 1975. Identification of the volatile constituents of the Egyptian lemongrass oil. Gas-chromatographic analysis. *Nahrung*. 19:195.

Grasso, L., Scarano, G., Salzillo, A. and Serpe, L. 2001. Study of the presence of aflatoxin M1 in milk and its derivatives originating in the regions Campania and Calabria. *Rivista di Scienza dell' Alimentazione.* 30(1): 29-34.

Gonçalez, E., Felicio, J.D. and Pinto, M.M. 2001. Bioflavonoids inhibition the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34: 1453-1456.

Kako, T. 2005. Thin layer Chromatography
[Online].Available: http://www.taiseikako.co.jp/OMLAB.htm.

Lomsri, N. 1993. Partial purification of anti-mutagenic substances from lemongrass (*Cymbopogon citratus,* Stapf) and their possible mechanism of inhibition. Master Thesis. Chiang Mai University.

Lorain, V. 1986. *Antibiotic in Laboratory Medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams&Willkin.

Mahmoud, A.-L.E. 1994. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology*. 19: 110-113.

Mumcuoglu, K.Y., Galun, R., Bach, U., Miller, J. and Magdassi, S. 1996. Repellency of essential oil and their components to the human body louse, *Pediculus humanus. Entomologia Experimentalis et Applicata*. 78(3): 309-314.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nguefack, J., Leth, V., Amvam Zollo, P.H. and Mathur, S.B. 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 329-334.

Onawunmi, G.O. 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology*. 9(3): 105-8.

Paranagama, P.A., Abeysekera, K.H.T., Abeywickrama, K. and Nugaliyadde, L. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effect of the essential oil of *Cybopogon citrarus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*. 37: 86-90.

Park, A., Gonçalez, E., Felicio, J.D., Pinto, M.M., Medina, C., Fernandes, M.J.B., Simoni, I.C. and Lopes, M.N. 2006. Inhibitory activity of compounds isolated from *Polymnia sonchifolia* on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 199.

Puatanachokchai, R. 1994. Anti-mutagenicity, cytotoxicity and anti-tumor activity of lemon grass extract(*Cymbopogon citratus,* Stapf). Master Thesis. Chiang Mai University.

Shannon, G.M. and Shotwell, O.L. 1979. Minicolumn detection for aflatoxin in yellow corn: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemist*. 62: 1070-1075.

Simon, J.E., Chadwick, A.F. and Craker, L.E. 1984. Herbs: an Indexed Biolography. The Scientific Literatuer on Selected Herbs and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Book. Hamden. CT: 770.

Skramlik, E.V. 1959. Toxicity and toleration of volatile oils. *Pharmazie*. 14: 435-445.

Thanaboripat, D., Nontabenjawan, K., Leesin, K., Teerapiannont, D., Sukcharoen, O. and Ruangrattanametee, V. 1997 Inhibitory effect of garlic, clove and carrot on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production, *Journal of Forestry Research*. 8: 39-42.

Thanaboripat, D., Mongkontanawut, N., Suvathi, Y. and Ruangrattanametee, V. 2004. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil, *KMITL Science and Technology Journal*. 49(1): 1-8.

Thanaboripat, D., Chareonsettasilp, S., Pandee, K. and Udomwongsup, K. 2006. Inhibitory effect of kaffir lime,bitter cucumber and tobacco extracts on the growth of *Aspergillus flavus*, *KMITL Science and Technology Journal*. 6: 18-22.

Thanaboripat, D., Suvathi, Y., Srilohasin, P., Sripakdee, S., Patthanawanitchai, O. and Charoensettasilp, S. 2007. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*, *KMITL Science and Technology Journal*. 7(1): 1-5.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thumvijit, S. 1999. Effect of lemongrass extract on rat hepatic and interstinal xenobiotic-metabolizing enzyme. Master Thesis. Chiang Mai University.

Vinitketkumnuen, U., Puatanachokchai, R., Kongtawelert, P., Lertprasertsuke, N. and Matsushima, T. 1994. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in *Salmonella* mutation assay. *Mutation Research*. 341(1):71-5.

Vogel, G. 1975. Predictability of the activity of drug combinations. Yes or No. *Arzneimittel-Forschung*. 25(9): 1356-65.

Wannissorn, B., Jarikasem, S. and Soontorntanasart, T. 1996. Antifungal activity of lemongrass oil and lemongrass oil cream. *Indian Journal Pharmacy Science*. 56(6): 227-230.

Wilson, D.M. 2005. Aflatoxin analytical methods for groundnuts. [Online].Available: http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036EOm.htm.

Yamachara, J., Kobayashi, M., Yamasaki, T., Sawada, T. and Uji, A. 1987. Pharmacological effects of traditional preparation "Kiogan". *Shoyakugaku zasshi*. 38(4): 297-301.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato Dextrose Agar (PDA)

Formula (in g/l)		
Glucose	20.0	g.
Agar	15.0	g.
Potato,infusion from	4.0	g.
Tartaric acid solution	14.0	ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
ข้อมูลทางสถิติ

ตาราง ข.1 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ที่ระยะเวลาการบ่ม 7 , 14 , 21 และ 28 วัน

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละ)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
วันที่ 7	0	22.4	21.2	27.7	51.3	58.1
	0	19.9	24.6	30.9	55.0	57.5
	0	21.2	20.5	28.1	53.8	57.8
	0	20.3	18.7	26.5	52.6	58.4
	0	20.1	23.8	31.5	53.5	59.3
วันที่ 14	0	16.3	17.6	21.1	30.8	39.6
	0	15.5	18.5	24.7	36.9	35.0
	0	15.8	17.0	21.7	34.1	36.4
	0	16.0	14.8	19.8	32.5	38.8
	0	16.0	19.5	27.2	31.6	41.5
วันที่ 21	0	13.9	14.9	16.5	20.7	24.5
	0	11.3	15.4	18.1	25.6	22.9
	0	11.7	14.2	17.0	23.1	21.1
	0	13.1	11.6	15.3	21.1	23.9
	0	13.0	16.7	16.5	21.6	26.4
วันที่ 28	0	9.7	11.3	12.2	12.5	13.7
	0	8.2	11.9	12.7	13.4	11.8
	0	8.3	11.2	12.5	12.7	10.9
	0	9.7	8.7	11.4	11.6	11.5
	0	9.5	12.4	11.3	11.5	13.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.2 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ที่ระยะเวลาการบ่ม 7 , 14 , 21 และ 28 วัน

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละ)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
วันที่ 7	0	26.6	31.1	35.2	54.1	55.4
	0	26.4	31.9	32.3	55.6	59.5
	0	27.2	32.6	34.5	54.7	56.8
	0	25.8	30.8	33.2	53.9	57.0
	0	27.5	31.5	33.7	55.3	56.6
วันที่ 14	0	18.7	22.7	28.4	35.2	37.3
	0	18.5	22.9	26.5	36.4	41.1
	0	19.4	23.6	26.1	34.9	37.5
	0	18.1	21.4	25.7	34.1	38.2
	0	19.3	22.9	25.8	36.3	37.3
วันที่ 21	0	14.9	16.4	21.5	24.7	25.4
	0	14.7	16.6	19.7	25.5	27.3
	0	15.3	17.0	19.8	23.9	25.2
	0	14.4	16.1	19.2	23.6	25.8
	0	15.3	16.7	19.1	24.7	25.1
วันที่ 28	0	9.6	10.5	12.7	15.8	16.6
	0	9.4	10.4	12.4	16.0	17.2
	0	10.1	10.8	12.2	14.9	16.3
	0	9.7	10.5	12.5	15.2	16.5
	0	9.8	10.2	12.3	15.7	15.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข.3 เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ที่ระยะเวลาการบ่ม 7 , 14 , 21 และ 28 วัน

ระดับความเข้มข้น (ร้อยละ)	0%	1%	2%	3%	4%	5%
วันที่ 7	0	0	0	11.8	14.3	17.6
	0	0	0	10.6	13.8	17.1
	0	0	0	11.7	13.6	18.0
	0	0	0	12.5	14.6	16.5
	0	0	0	10.1	13.2	17.8
วันที่ 14	0	0	0	9.3	11.6	12.8
	0	0	0	9.5	11.2	12.3
	0	0	0	9.5	10.9	13.4
	0	0	0	9.7	11.9	12.1
	0	0	0	9.1	11.3	12.5
วันที่ 21	0	0	0	0	9.4	10.1
	0	0	0	0	9.5	10.8
	0	0	0	0	0	10.3
	0	0	0	0	0	10.2
	0	0	0	0	0	9.5
วันที่ 28	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้