ฤทธิ์ต้านเอสเชอริเชีย โคไลที่ก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย

ธนัฏนัณ อนันตศิริสถาพร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI OF CRUDE EXTRACTS FROM AMOMUM ULIGINOSUM J. KOENIG FRUITS

THANATNUN ANUNTASIRISTAPORN

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for

Master of Science Program in Thai Tradition Pharmacy

Academic Year 2016

Copyright of Bansomdejchaopraya Rajabhat University

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ต้านเอสเชอริเชียโคไลที่ก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย
ชื่อผู้วิจัย	ธนัฏนัฌ อนันตศิริสฉาพร
สาขาวิชา	เภสัชกรรมไทย
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิลันธนา เลิศสลิดธนกร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.เธียร ธีระวรวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.สุภาวดี สืบศาสนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาอนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารีวรรณ เอี่ยมสะอาด)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิลาสินี หิรัญพานิช ซาโตะ)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิลันธนา เลิศสลิดธนกร)

..... กรรมการ

(ดร.สุภาวดี สืบศาสนา)

..... กรรมการ

(ดร.เธียร ธีระวรวงศ์)

..... กรรมการ

(ดร.อัจฉรา แก้วน้อย)

..... กรรมการและเลขานุการ

(อาจารย์สุชาดา มานอก)

อิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ชื่อเรื่อง **ฤทธิ์ต้านเอสเชอริเชีย โคไลที่ก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย**
ชื่อผู้วิจัย **ธนัฏนัณ อนันตศิริสถาพร**
สาขาวิชา **เภสัชกรรมไทย**
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร**
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม **ดร.เธียร ธีระวรวงศ์**
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม **ดร.สุภาวดี สืบศาสนา**
ปีการศึกษา **2559**

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) เพื่อตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญในสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย ที่สกัดโดยวิธีต้มเดือดและวิธีการหมัก และ 2) เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้าน *Escherichia coli* ก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยที่สกัดโดยวิธีต้มเดือดและวิธีการหมัก **วิธีการศึกษา** โดยทำการสกัดสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยที่ได้จากอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี ด้วยสองวิธีการคือ ต้มน้ำเดือด และหมักด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ เอทานอล (Ethanol) เฮกเซน (Hexane) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane) เอทิลอะซิเตท (Ethyl Acetate) และเมทานอล (Methanol) ตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญในสารสกัดหยาบเร่วน้อยโดยวิธีพฤกษเคมี ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยที่ได้จากการต้มเดือดและการหมักในการยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อ *Escherichia coli* ก่อโรคลำไส้จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) ด้วยวิธี Disc diffusion และวิธี Broth Microdilution

ผลการวิจัยพบว่า

1. ส่วนสกัดเร่วน้อยที่ได้จากการต้มเดือด ส่วนสกัดเอทานอลและส่วนสกัดเมทานอลพบกลุ่มสารสำคัญคือ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์และอัลคาลอยด์ ในขณะที่ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทพบเฉพาะแทนนิน ส่วนสกัดเฮกเซนและส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนไม่พบกลุ่มสารสำคัญใดๆ

2. ส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดเมทานอลและส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากเร่วน้อย มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* ก่อโรคในลำไส้ ทั้งนี้ส่วนสกัดเอทานอลสามารถฆ่าเชื้อได้มากชนิดที่สุด กล่าวคือมีค่า MBC ต่อเชื้อ EPEC, ETEC และ EAggEC เท่ากับ 0.0789-0.3155, 0.0075-0.0150 และ 0.0789-0.3155 กรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านเอสเชอริเชีย โคไลที่ก่อโรคในลำไส้ สารสกัดหยาบ เร่วน้อย

Title **Antibacterial Activity Against Pathogenic Escherichia coli of Crude Extracts from Amomum Uliginosum J. Koenig Fruits**

Author **Thanatnun Anatasiristaporn**

Program **Thai Traditional Pharmacy**

Major Advisor **Assistant Professor Dr. Pilanthana Lertsatitthanakorn**

Co-advisor **Dr. Thien Thiraworawong**

Co-advisor **Dr. Supawadee Subsasna**

Academic Year **2016**

ABSTRACT

The purposes of this research were to 1) determine the active ingredients in crude extracts from the *Amomum uliginosum* J. Koenig fruits extracted by boiling and maceration and 2) screen the *Escherichia coli* activity of the extract against enteric pathogenic bacteria. Methodology the authentic fruits of *Amomum uliginosum* J. Koenig were collected from Soi Dao district, Chanthaburi. The fruits were cleaned, dried, and either boiling with water or maceration with five types of solvents consisted of ethanol, hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol. The phytochemical groups in the crude extract were tested. *Escherichia coli* activity of the crude extract against Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), and Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) was determined by disc diffusion method and broth microdilution method.

The findings revealed as follow.

1. Phytochemical compound groups demonstrated in water extract, ethanol extract and methanol extract of *Amomum uliginosum* J. Koenig fruits were terpenoid, flavonoid and alkaloid while ethyl acetate extract possessed only tannin. In addition, no phytochemical group was found in hexane and dlchloromethane extract.

2. Ethanol extract, methanol extract and ethyl acetate extract of *Amomum uliginosum* J. Koenig fruits have showed *Escherichia coli* activity against enteric pathogens. The ethanol extract demonstrated the widest spectrum because, its MBC values against EPEC, ETEC and EAggEC were 0.0789-0.3155, 0.0075-0.0150 and 0.0789-0.3155 g/ml, respectively.

Keywords: *Escherichia coli* Activity Extracts, *Amomum uliginosum* J. Koenig Fruits

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ซึ่งไม่อาจจะนำมากล่าวได้ทั้งหมด ซึ่งผู้มีพระคุณท่านแรกที่ผู้เขียนใคร่ขอกราบพระคุณ คือ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิลันธนา เลิศสถิตธนกร ที่กรุณารับเป็นที่ปรึกษาและเสียสละเวลาที่มีค่าในการให้คำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ แนะนำตรวจทาน และแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่ทุกขั้นตอน เพื่อให้การเขียนรายงานฉบับนี้สมบูรณ์ที่สุด กราบขอบพระคุณ ดร.เธียร ธีระวรวงศ์ ที่ได้ให้ความรู้ ให้ข้อคิดที่เป็นประโยชน์ กราบขอบพระคุณ ดร.สุภาวดี สืบศาสนา ที่ให้ความรู้ เรื่องการตรวจสาระสำคัญ ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง อาจารย์สุชาดา มานอก ที่อนุเคราะห์สารเคมี ผู้ศึกษาใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

นอกจากนี้ ผู้ศึกษาขอขอบพระคุณ สาขาวิชาแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ให้การสนับสนุนการใช้วัสดุอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่สนับสนุนทุนทำวิจัยบางส่วน ขอขอบพระคุณ สำนักหอพรรณไม้ น.ส.รัมภ์รดา มีบุญญา น.ส.เทพวลี คะนานทอง ที่ติดตามตรวจสอบต้นเร่วน้อยขอขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาเภสัชกรรมไทย ขอขอบคุณเพื่อนๆ สาขาวิชาการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ที่ให้กำลังใจในการเรียนเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ผู้เขียนที่สนับสนุนด้านการเรียนและคอยให้กำลังใจเวลาที่เหนื่อยล้าจากการเรียนผ่านพ้นได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณครูบาอาจารย์ทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทั้งปวงให้แก่ผู้เขียนตลอดมา

ธนัฏนัณ อนันตศิริสถาพร

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ข
กิตติกรรมประกาศ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... ฉ
สารบัญภาพ..... ช
บทที่ 1 บทนำ..... 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2
ขอบเขตของการวิจัย..... 3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 3
นิยามศัพท์เฉพาะ..... 3
กรอบแนวคิดการวิจัย..... 5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ เร่วน้อยและการใช้ตามภูมิปัญญาไทย..... 6
โรคติดเชื้อในลำไส้ และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในลำไส้..... 9
การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย..... 11
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในผลเร่วน้อยและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคมีในผลเร่วน้อย..... 11
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย..... 14
พืชที่ใช้ในการวิจัย..... 14
อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี..... 14
ขั้นตอนการสกัดส่วนสกัดหยาบ..... 17
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 26
ผลการสกัดเร่วน้อยให้ได้ส่วนสกัดหยาบ..... 26
ผลการตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญในสารสกัดหยาบเร่วน้อยทุก 7 กลุ่ม..... 27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ผลการตรวจกลุ่มสาระสำคัญที่พบในส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย ทุกส่วนสกัด..... 36
ผลการตรวจสารสำคัญในส่วนสกัดเร่วน้อย ด้วยวิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) 37
ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบเร่วน้อยที่สกัดได้จากทั้งสองวิธีการ Disc Diffusion Method และ Broth Microdilution Method..... 57
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 60
สรุปผลการวิจัย..... 60
อภิปรายผลการวิจัย..... 61
ข้อเสนอแนะ..... 62
บรรณานุกรม..... 63
ภาคผนวก..... 65
ภาคผนวก ก การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบเร่วน้อยวิธี Disc diffusion และวิธี Broth Microdilution..... 66
ภาคผนวก ข ผลการตรวจสอบชนิดพันธุ์พืช..... 82
ภาคผนวก ค หนังสือตอบรับลงบทความ..... 84
ประวัติผู้วิจัย..... 86

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สรุปร้อยละผลผลิตของส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย.....	26
2	ผลการตรวจสอบกลุ่มสาระสำคัญที่พบในส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย.....	36
3	Inhibition zone ของสารสกัดหยาบเร่วน้อยต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้.....	58
4	ค่า MBC ของส่วนสกัดหยาบเร่วน้อยต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคในลำไส้.....	59

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กรอบแนวคิดการวิจัย.....	5
2	ต้นเร่วน้อย.....	6
3	ใบเร่วน้อย.....	7
4	ดอกเร่วน้อย.....	7
5	ไรโซม (เหง้า) ของเร่วน้อย.....	7
6	ขั้นตอนการสกัดผลเร่วน้อยโดยวิธีต้มเดือดและนำไป Freeze Dry.....	18
7	ขั้นตอนการสกัดผลเร่วน้อย โดยการหมัก 5 ขั้นตอน.....	20
8	การทดสอบกลุ่มสารแอนทราควิโนนในส่วนสกัดเร่วน้อย.....	27
9	การทดสอบเทอร์พีนอยด์ในส่วนสกัดผลเร่วน้อย.....	28
10	การทดสอบฟลาโวนอยด์ในส่วนสกัดผลเร่วน้อย.....	29
11	การทดสอบซาโปนินโดยการทดลองการเกิดฟองในส่วนสกัดผลเร่วน้อย.....	30
12	การทดสอบแทนนินในส่วนสกัดผลเร่วน้อย.....	31
13	การทดสอบอัลคาลอยด์ในส่วนสกัดผลเร่วน้อย.....	32
14	การทดสอบสเตียรอยด์ในส่วนสกัดผลเร่วน้อย.....	33
15	การทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวในส่วนสกัดผลเร่วน้อย.....	35
16	mobile phase ระบบที่ 1 การอ่านผลด้วยตาเปล่า.....	37
17	mobile phase ระบบที่ 1 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	37
18	mobile phase ระบบที่ 1 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	38
19	mobile phase ระบบที่ 2 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	38
20	mobile phase ระบบที่ 2 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	39
21	mobile phase ระบบที่ 2 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	39
22	mobile phase ระบบที่ 3 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	40
23	mobile phase ระบบที่ 3 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	40
24	mobile phase ระบบที่ 3 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	41
25	mobile phase ระบบที่ 4 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	mobile phase ระบบที่ 4 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	42
27	mobile phase ระบบที่ 4 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	42
28	mobile phase ระบบที่ 5 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	43
29	mobile phase ระบบที่ 5 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	43
30	mobile phase ระบบที่ 5 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	44
31	mobile phase ระบบที่ 6 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	44
32	mobile phase ระบบที่ 6 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	45
33	mobile phase ระบบที่ 6 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	45
34	mobile phase ระบบที่ 7 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	46
35	mobile phase ระบบที่ 7 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	47
36	mobile phase ระบบที่ 8 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	47
37	mobile phase ระบบที่ 8 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	48
38	mobile phase ระบบที่ 8 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	48
39	mobile phase ระบบที่ 9 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	49
40	mobile phase ระบบที่ 9 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	49
41	mobile phase ระบบที่ 9 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	50
42	mobile phase ระบบที่ 10 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	50
43	mobile phase ระบบที่ 10 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	51
44	mobile phase ระบบที่ 10 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	51
45	mobile phase ระบบที่ 11 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	52
46	mobile phase ระบบที่ 11 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	52
47	mobile phase ระบบที่ 11 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	53
48	mobile phase ระบบที่ 12 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	53
49	mobile phase ระบบที่ 12 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	54
50	mobile phase ระบบที่ 12 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
51	mobile phase ระบบที่ 13 อ่านผลด้วยตาเปล่า.....	55
52	mobile phase ระบบที่ 13 อ่านผลภายใต้แสงยูวี.....	55
53	mobile phase ระบบที่ 13 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน.....	56
54	ผลการตรวจสอบส่วนสกัดเร่วน้อยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Boneol และ Comphor	57

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สมุนไพรเป็นทรัพยากรจำนวนมากที่มีอยู่ทั่วทุกภาคในประเทศไทยและมีการนำ ไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ทั้งในเรื่องอาหารและยาสมุนไพร ประกอบไปด้วยสาร สำคัญหลายชนิด ทั้งอินทรีย์สาร แร่ธาตุ วิตามิน เอนไซม์และเกลือแร่ ซึ่งสารเหล่านี้แปรสภาพเป็นพลังงานไปกระตุ้นและทำปฏิกิริยาต่อต้านและทำลายเชื้อโรคและจุลินทรีย์ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค มนุษย์รู้จักการใช้สมุนไพรในการบำบัด รักษาอาการเจ็บ ป่วยมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน นำสมุนไพรมาใช้เพื่อบำบัดและรักษาโรค นักวิทยาศาสตร์ ได้พยายามพิสูจน์ประสิทธิภาพของสมุนไพรด้วยการแยกสารสำคัญออกจากสมุนไพรและ นำไปทดสอบทั้งในห้องปฏิบัติการและทางคลินิกเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสมุนไพร ตามที่มีบันทึกในตำราแพทย์แผนไทยที่ได้นำมาใช้ในการรักษาโรคตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ข้อมูลโรคอุจจาระร่วง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547-2556 พบว่า มีรายงานสูง ตั้งแต่เดือน มกราคม กุมภาพันธ์ มีนาคม ของทุกปี โดยมีรายงานตั้งแต่ 50,000 -120,000 ราย ยกเว้นเดือน ธันวาคม 2552 มีจำนวนต่ำสุด 24,606 ราย เมื่อเปรียบเทียบจำนวนผู้ป่วยในปี 2557 และปี 2556 จำแนกเป็นรายเดือน พบว่า จำนวนผู้ป่วยในปี 2557 มีจำนวนต่ำกว่าปี 2556 ตั้งแต่เดือนเมษายนถึงปัจจุบันในเดือนธันวาคม ปี2557 ณ วันที่ 31 ธันวาคม 2557 มีราย งาน ผู้ป่วย 45,806 ราย จำนวนใกล้เคียงกับที่คาดไว้ว่าจะมีผู้ป่วยในเดือนธันวาคม 2557 50,586 ราย (กรมควบคุมโรค, 2557, ออนไลน์) *Escherichia coli* เป็นเชื้อก่อโรคที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อที่พบบ่อยในมนุษย์ แหล่งอาศัยของเชื้อ *E. coli* อยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์นอกจากนี้การติดเชื้อนอกลำไส้ (Extraintestinal Infection) เช่นการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ มักเกิดขึ้นได้โดยสายพันธ์ที่เป็น Uropathogenic *E. coli* (UPEC)โรคติดเชื้อในลำไส้ส่วนใหญ่มักเกิดจากสายพันธุ์ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Enterotoxigenic, *E.coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC),โดย EPEC มักทำให้เกิดท้องเสียในเด็กทารกส่วน ETEC จะสร้าง Enterotoxin ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องเสียคล้ายอหิวาตกโรค (Cholera-Like) และ EIEC ทำให้เกิดการติดเชื้อในลำไส้ใหญ่คล้ายโรคบิด (Dysenterylike) (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2556, น.215-217)

เร่วน้อยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า*Amomum uliginosum* K.D.Koenig จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae จากงานวิจัยต่างๆ รุจิลักษณ์ รัตตะรมย์ 2547 ;ประสบอร รินทองและคณะ 2557; Pulbutr และคณะ

2012 กรมอุทยานสัตว์ป่าและพันธุ์พืช หอพันธุ์ไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ระบุว่าเร่วน้อย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amomum uliginosum* J. Koenig มีชื่อพื้นเมืองหลายชื่อ เช่น เร่ว กระวาน กระวานป่า (ภาคใต้) หมากอี้ มะอี้ หมากอี้ หมากเน็ง (อีสาน) หมากเน่ง (สระบุรี) เจริญได้ดีตามป่าที่ชื้นแฉะ ที่ลุ่มแม่น้ำ บ่อน้ำ สระน้ำ หนอง ลำคลองหรือริมบึง และได้นำปลูกไว้ตามบ้าน ตามสวน เพื่อประโยชน์ในการใช้ทำยา (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม, 2542,น.683) เร่วน้อย ต้นเป็นไม้ล้มลุก มีเหง้าอยู่ใต้ดิน สูง 2-4 เมตร มีเหง้าใต้ดิน ระยะที่แทงหน่อจะห่างกัน ใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปใบหอกแคบ กว้างประมาณ 7 เซนติเมตร ยาว 0.5 เมตร ปลายใบแหลมห้อยย้อยลง ไม่มีก้านใบ ดอกช่อ แทงจากเหง้า ก้านช่อดอกเล็ก มีดอกย่อยสีขาวประมาณ 15 ดอก ผลเป็นผลแห้ง เมื่อสุกมีสีแดง ลักษณะเหมือนผลเงาะขนาด 1.4-2.0 ซม.ภายในมีเมล็ดสีน้ำตาล12-18เมล็ด รวมกลุ่มเป็น 3 กลุ่ม โดยมีเยื่อบางๆกั้น กลิ่นคล้ายการบูร การใช้ประโยชน์และสรรพคุณของเร่วน้อย ผลแก้ไข้ แก้ริดสีดวง แก้ไอหืด ไอเสมหะ แก้โรคเกิดจากระดูขาวให้โทษ ต้น แก้ไข้อันเกิดแต่ดี ใบ ขับปัสสาวะ ดอก แก้ไข้ และมีผื่นขึ้นตามตัว รากแก้หืด เช่นเดียวกับกระวาน (รุ่งระวี เต็มศิริกุล วงศ์สถิต ฉั่วสกุล ภาณุพงษ์พงษ์ ชีวิน เบญญากาญจน์ พงศ์กิจวิทูรและคณะ, 2557,น.358)

เร่วน้อย เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในการเป็นยาเพื่อรักษาโรคในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาถึงฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของผลเร่วน้อย ซึ่งในประเทศไทยยังไม่พบรายงานการศึกษาค้นคว้าทางวิทยาศาสตร์ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดจากผลเร่วน้อย ซึ่งจากสรรพคุณของผลเร่วน้อยคาดว่าอาจมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวได้ โดยคาดหวังว่าผลการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนายาต้านเชื้อก่อโรคในลำไส้จากพืชสมุนไพรเพื่อเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคโดยไม่ใช้ยาปฏิชีวนะและเป็นการยืนยันภูมิปัญญาการ แพทย์แผนไทยเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญในสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยที่สกัดโดยวิธีต้มเดือดและวิธีการหมัก
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยที่สกัดโดยวิธีต้มเดือดและวิธีการหมัก

ขอบเขตของการวิจัย

1. ทำการสกัดสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย ที่ได้จากอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี ด้วยสองวิธีการคือต้มน้ำเดือดและหมักด้วยตัวทำละลาย 5 ชนิด คือ เอทานอล (Ethanol) เฮกเซน (Hexane) ไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane)เอทิลอะซิเตท (Ethyl Acetate) และเมทานอล (Methanol)

2. ตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญในสารสกัดหยาบเร่วน้อยโดยวิธีพฤกษเคมี

3. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย ที่ได้จากการต้มเดือดและการหมัก ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคลำไส้จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ คือ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) ด้วยวิธีDisc diffusion และวิธี Broth microdilution เลือกเฉพาะส่วนสกัดที่ทำให้เกิดบริเวณใส เรียกว่า inhibition zone ที่มีบริเวณตั้งแต่ 7 mm ขึ้นไป นำมาทดสอบด้วย Minimum inhibitory concentration (MIC) และ Minimum bactericidal concentration (MBC)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดของกลุ่มสารสำคัญในผลเร่วน้อย

2. ทำให้ทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย ในการยับยั้งการเจริญเติบโตและการฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้จำนวน 4 ชนิด คือ Enteropathogenic *E. col* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) และ Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC)

3. ยืนยันภูมิปัญญาแพทย์แผนไทยของสรรพคุณสมุนไพรเร่วน้อย เป็นการสนับสนุนให้ประชาชน ใช้สมุนไพรไทยในการดูแลตนเอง ทดแทนยาแผนปัจจุบัน

นิยามศัพท์เฉพาะ

Marceration หมายถึง ขบวนการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะที่ปิด เช่น โถ ขวดรูปชมพู่ หรือขวดปากกว้าง เป็นต้น ตั้งทิ้งไว้ 7 วัน หมั่นเขย่าเมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจึงรินเอาสารสกัดออกรวม สารสกัดที่ได้นำไปกรอง

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ก่อให้เกิดการท้องเสียในเด็กทารก อาจทำให้เกิดการตายในเด็กทารกในประเทศกำลังพัฒนา

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้ท้องเสียจะมีลักษณะถ่ายเป็นน้ำปริมาณมากโรคนี้พบได้ทุกวัย ถ้าเกิดโรคนี้แล้วจะมีภูมิต้านทานเชื้อเป็นเวลา 2-3 เดือน

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะเคลื่อนที่เข้าสู่เยื่อเมือกบริเวณลำไส้ใหญ่ ทำให้ เกิดแผลเปื่อย(ulcerous) เกิดการอักเสบ การก่อโรคของเชื้อนี้จะเหมือนกับโรคบิดที่เกิดจากแบคทีเรีย สายพันธุ์ EIEC มักไม่หมักน้ำตาลแลคโตส (lac-negative)

Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดการท้องเสียเป็นน้ำและอาจมีเลือดปนและเกิดอาการท้องเสียในเด็กทารกและเด็กเล็ก

Disc diffusion method หลักการคือสารต้านจุลชีพจำนวนแน่นอนจะแพร่ออกจากแผ่นกระดาษกรอง (Filter Paper Disk) รูปกลมทุกทิศทาง เพื่อไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารแข็ง ความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพสูงสุด จะอยู่ใกล้แผ่นกระดาษและลดลงตามระยะห่างจากแผ่นกระดาษ โดยสารต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าสารต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็ก หลังจากการบ่มเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมแล้วจะนำจานอาหารออกมาตรวจวัดขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบแผ่นกระดาษที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) เป็นหน่วยมิลลิเมตร

Broth microdilution method การหาความไวรับ (Susceptibility) ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ ต่อสารสกัดหยาบเร่วน้อยโดยวิธี Broth Microdilution Method เพื่อให้ได้ค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ต่อเชื้อทุกชนิด

กรอบแนวคิดการวิจัย

ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อดังต่อไปนี้

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเร่วน้อย และการใช้ตามภูมิปัญญาไทย
2. โรคติดเชื้อในลำไส้ และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในลำไส้
3. การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย การทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ
4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในผลเร่วน้อยและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคมีในผลเร่วน้อย

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเร่วน้อยและการใช้ตามภูมิปัญญาไทย

ชื่ออื่นๆ มะหมากอี มะอี้ (เชียงใหม่) หมากอี้ หมากเน็ง (อีสาน) หมากเน่ง (สระบุรี) เร่ว (ไทย) , เด่วดง (ตราด) กระวานป่า (ปัตตานี) เร่ว (ภาคตะวันออกเฉียงใต้)

ชื่อสามัญ -

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Amomum uliginosum* J. koenig

ชื่อวงศ์ Zingiberaceae

เร่วน้อยมักขึ้นตามธรรมชาติในป่าตามที่ชื้นแฉะ ที่ลุ่มแม่น้ำ บ่อน้ำ สระน้ำ หนองลำคลอง หรือ ริมบึงและได้นำปลูกไว้ตามบ้าน ตามสวน เพื่อประโยชน์ในการใช้ทำยา

ภาพที่ 2 ต้นเร่วน้อย

ภาพที่ 3 ใบเร่วน้อย

ภาพที่ 4 ดอกเร่วน้อย

ภาพที่ 5 ไรโซม(เหง้า) ของเร่วน้อย

ลักษณะสมุนไพรเร่วน้อย ต้นเป็นไม้ล้มลุก มีเหง้าอยู่ใต้ดิน สูง 2-4 เมตร ชอบขึ้นในภูมิประเทศ เช่นเดียวกับกระวาน เหง้าใต้ดิน ระยะที่แทงหน่อจะห่างกัน ใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปใบหอกแคบ กว้างประมาณ 7 เซนติเมตร ยาว 0.5 เมตร ปลายใบแหลมห้อยย้อยลง ไม่มีก้านใบ ดอกช่อแทงจากเหง้า ก้านช่อดอกเล็ก ดอกย่อยสีขาวประมาณ 15 ดอก ผล เป็นผลแห้งเมื่อสุกมีสีแดง ลักษณะเหมือนผลเงาะขนาด 1.4-2.0 เซนติเมตร ภายในมีเมล็ดสีน้ำตาล 12-18 เมล็ด รวมกลุ่มเป็น 3 กลุ่ม โดยมีเยื่อบางๆกั้น กลิ่นคล้ายการบูรเป็นเครื่องเทศเช่นเดียวกับกระวาน รุ่งระวี เต็มศิริกุล วงศ์สถิต ฉั่วสกุล ภาณุพงษ์พงษ์ชีวิน เบญญากาญจน์ พงศ์กิจวิทูร และคณะ ,2557, น.358) ขยายพันธุ์โดยการแยกหน่อ และเมล็ด (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม 2542, น. 683) เก็บเกี่ยวผลสุกในช่วงฤดูร้อนถึงฤดูใบไม้ร่วง ตากแดดให้แห้งสนิทหรือทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำในการป้องกันการเสื่อมสภาพของเมล็ดและการระเหยของน้ำมันอย่างรวดเร็ว ไม่ควรแกะเมล็ดก่อนเมล็ดแห้ง เก็บรักษาเมล็ดแห้งในกระสอบป่านหรือถุงพลาสติก เก็บไว้ในที่อากาศเย็นและแห้ง มีการระบายอากาศดี (กระทรวงสาธารณสุข, 2551, น.168) การเตรียมตัวยาพร้อมใช้มี 2 วิธี วิธีที่ 1 เตรียมโดยนำวัตถุดิบสมุนไพรมาแยกสิ่งอื่นที่ปะปนออก ทุบให้แตกก่อนใช้ วิธีที่ 2 เตรียมโดยนำตัวยาที่ได้จากวิธีที่ 1 มาใส่ในภาชนะที่เหมาะสม เติมน้ำเกลือคลุกเคล้าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งน้ำเกลือแทรกซึมเข้าไปในเนื้อตัวยา จากนั้นนำไปใส่กระทะผัดโดยใช้ไฟระดับปานกลาง ผัดจน กระทั่งตัวยาแห้ง นำออกจากเตา ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น (ใช้เกลือบริสุทธิ์ 2 กิโลกรัม ต่อตัวยา 100 กิโลกรัม) ตัวยาที่มีคุณภาพ มีขนาดผลใหญ่ แข็งและมีเนื้อมาก เนื้อในเมล็ดสีน้ำตาลแดง กลิ่นหอมฉุน รสเผ็ดและเย็นมาก การแพทย์แผนจีน ใช้ผลเร่ว 3-6 กรัม หรือมากกว่านี้ตามอาการโรค ต้มเอาน้ำดื่ม (ถ้าต้มกับยาอื่นควรใส่ทีหลัง)โดยมีรายละเอียด การใช้ทางคลินิก ดังนี้

1. แก้อาการแพ้ท้องอาเจียน รับประทานอาหารไม่ได้ให้ใช้เมล็ดบดเป็นผงชงกับน้ำขิงต้มรับประทาน

2. แก้อาการเป็นพิษ ให้ใช้เมล็ดบดเป็นผงรับประทานกับน้ำอุ่น

3. บำรุงธาตุ แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อและปวดท้อง โดยใช้เมล็ดเร่ว หัวแห้วหมู รากชะเอมเทศ และขิงแห้งร่วมกัน

4. แก้ประจำเดือนมามากกว่าปกติให้ใช้ผลเร่วแห้งรางไฟจนแห้งกรอบแล้วบดเป็นผงชงน้ำรับประทาน

ผลรสร้อนเผ็ดปร่า แก้ริดสีดวง แก้หืดไอ แก้ระดูขาว แก้ไข้ สันนิบาตเมล็ดรสร้อนเผ็ดปร่า ขับลมในลำไส้ แก้ท้องขึ้นอืดเฟ้อ แก้ปวดท้อง แก้คลื่นเหียนอาเจียน แก้ริดสีดวง หืดไอกัดเสมหะ แก้ไข้สันนิบาต ขับน้ำนม บำรุงธาตุ ต้นแก้ไข้อันเกิดแต่ดี ใบขับปัสสาวะดอกแก้ไข้และมีผื่นขึ้นตามตัว รากแก้หืด (กระทรวงสาธารณสุข, 2551, น.168) ผลเร่วจัดอยู่ใน พิกัดทศกุลาผล คือ การจำกัดจำนวนตัวยาตระกูลเดียวกัน10 อย่าง ชะเอมทั้งสอง (ชะเอมเทศ ชะเอมไทย), ลูกผักชีทั้งสอง (ผักชีล้อม ผักชีลา), อบเชยทั้งสอง (อบเชยเทศ อบเชยไทย) ลำพันทั้งสอง (ลำพันแดง ลำพันขาว)

ลูกเร่วทั้งสอง(เร่วน้อย เร่วใหญ่) มีสรรพคุณ แก้ไข้เพื่อดีและเสมหะ ขับลมในลำไส้ บำรุงธาตุ บำรุงปอด แก้รัตตะปิตตะโรค แก้ลมอัมพฤกษ์อัมพาต บำรุงกำลัง บำรุงดวงจิตให้แช่มชื่น แก้ไข้ ยาธรณีสัณฑะฆาต วัตถุส่วน ประกอบ ลูกจันทน์ ดอกจันทน์ ลูกกระวาน กานพลู เทียนดำ เทียนขาว หัวดองดึง หัวบุก หัวกลอย หัวกระดาดขาว หัวกระดาดแดง ลูกเร่ว ขิง ชะเอมเทศ รากเจตมูลเพลิงโกฐกระดูก โกฐเขมา โกฐน้ำเต้า หนักสิ่งละ1 ส่วนผักแพวแดง เนื้อลูกมะขาม ป้อม หนักสิ่งละ 2 ส่วน เนื้อลูกสมอไทย มหาหิงคุ์ การบูร หนักสิ่งละ 5 ส่วน รงทอง (ประสะแล้ว) หนัก 4 ส่วน ยาดำ หนัก 20 ส่วน พริกไทยล่อน หนัก 96 ส่วน สรรพคุณแก้กระษัยเส้น เถาดาน ท้องผูก สมุนไพรเร่ว จัดได้ว่าเป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่อยู่คู่กับคนไทยมาอย่างยาว นานสามารถโดยนำเมล็ดมาใช้ในการบรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นจุกเสียด ซึ่งอยู่ในตำรายาไทยในพิกัดเร่วทั้งสอง คือ เร่วน้อยและเร่วใหญ่และในยาสามัญประจำบ้าน ยาธรณีสัณฑะฆาต (กระทรวงศึกษาธิการ, 2555, น.829)

สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐานระบุการใช้สมุนไพรเร่ว รักษาโรค ท้องอืด ท้องเฟ้อ และแน่นจุกเสียด การทดลองทางคลินิกใช้สารสกัดเมทานอลและเอทานอลของผลเร่ว ยับยั้งการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร กระตุ้นการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ รสและสรรพคุณยาไทย รสเผ็ดปร่า แก้คลื่น เหียนอาเจียน และขับผายลม วิธีใช้เมล็ดในของผลแก่ แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อและแน่นจุกเสียด บดเป็นผง กินครั้งละ 3-9 ผล (หนัก 1-3 กรัม) วันละ3 ครั้ง (สมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน, 2551, น.258-259)

โรคติดเชื้อในลำไส้และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในลำไส้

โรคท้องเดิน (Diarrhea/Gastroenteritis) มีอาการถ่ายเป็นน้ำหรือถ่ายเหลวมากกว่า วันละ 3 ครั้ง หรือ ถ่ายเป็นมูกหรือมูกเลือดเพียงครั้งเดียวแต่ถ้าถ่ายเป็นน้ำจำนวนมากและบ่อยครั้งกว่าที่เคยเป็นก็ถือว่าผิดปกติท้องเดิน เป็นอาการที่พบได้บ่อยและมีสาเหตุได้หลายประการ ส่วนใหญ่อาการไม่รุนแรงและมักหายได้เองส่วนน้อยอาจมีอาการรุนแรงทำให้มีภาวะขาดน้ำและเกลือแร่เป็นอันตรายถึงเสียชีวิตได้โดยเฉพาะในเด็กเล็กและผู้สูงอายุ นอกจากอาการที่ถ่ายเป็นน้ำ ถ่ายเหลว หรือถ่ายมีมูกเลือดปนแล้ว อาจมีอาการเป็นไข้ ปวดท้อง อาเจียนร่วมด้วย (พรณภา ราญมีชัย, 2551) สาเหตุที่ทำให้เกิดอาการท้องเดิน เกิดจากการติดเชื้อซึ่งพบได้บ่อยกว่าสาเหตุอื่นเกิดจากเชื้อไวรัส (เช่น ไวรัสโรตา ไวรัสโคโรนา ไวรัสอะดีโน) เชื้อแบคทีเรีย (เช่น ชิเกลลา ไทฟอยด์ อหิวาต์) โปรโตซัว (เช่น อะมีบา ไกอาร์เดีย มาลาเรีย) หนอนพยาธิ (เช่น พยาธิแส้ม้า ทริคิเนลลาสไปราลิส) (สุรเกียรติ อาชานานุภาพ, 2551, น.536-540)

แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในลำไส้ *Escherichia coli* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ *E.coli* จัดเป็นเชื้อก่อโรคที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อที่พบในมนุษย์ การติดเชื้อนอกลำไส้ (Extraintestinal

Infection) เช่น การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ มักเกิดจากสายพันธุ์ EPEC, ETEC, EIEC, EHEC และEAggEC โดย EPEC และ EAggEC มักทำให้ท้องเสียคล้ายอหิวาตกโรค (Cholera-Like) และ EIEC ทำให้เกิดการติดเชื้อในลำไส้คล้ายโรคบิด (Dysentery-Like) และ EHEC จะสร้าง Verocytotoxin เป็นสาเหตุให้เกิดโรคลำไส้ใหญ่อักเสบมีเลือดออก (Hemorrhagic Colitis) เกิดอาการปัสสาวะเป็นเลือดที่เรียกว่า Hemolytic-Uremic Syndrome ได้ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบท่อนตรง *E. coli* ที่ก่อโรคท้องเสียพบได้ทั่วโลก โดยสามารถจำแนกได้ตามลักษณะที่แสดงถึงความรุนแรงของโรคโดยแต่ละกลุ่มจะทำให้เกิดโรคโดยใช้กลไกที่แตกต่างกันและคุณสมบัติในการเข้าเกาะเยื่อบุลำไส้ ทั้งในลำไส้ใหญ่และลำไส้เล็กก็จะแตกต่างกันไปด้วย

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นเชื้อสำคัญที่ก่อให้เกิดการท้องเสียในเด็กทารก อาจทำให้เกิดการตายในเด็กทารกในประเทศกำลังพัฒนา EPEC จะเข้าเกาะกับ Epithelia Cell ของลำไส้เล็กโดยใช้ EPEC Adhesion Factor (EAF) จากนั้นจะปล่อยโมเลกุลที่เป็นพิษเข้าไปยัง Enterocyte โดยใช้ระบบ Type III Secretion System ส่วนโครโมโซมา ของเชื้อจะช่วยสร้าง Factor ทำให้เชื้อเกาะติดได้อย่างแน่นหนามากขึ้น ลักษณะของแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบแผลที่บริเวณลำไส้เล็ก การติดเชื้อของ EPEC จะทำให้เกิดการถ่ายเป็นน้ำ มักจะหายได้เองแต่สามารถเกิดเรื้อรังได้ อาการท้องเสียจาก EPEC มักเกิดจาก Serotype ของ *E. coli* อาการท้องเสีย จากการติดเชื้อของ EPEC มักจะเป็นไม่นานและหากมีการเรื้อรังอาจใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) การก่อโรค ETEC มาจาก Fimbriae ที่จำเพาะที่เรียกว่า Colonizing Factor (CFA) ทำให้แบคทีเรียเกาะกับ Epithelial Cell ของลำไส้เล็ก ซึ่งจะช่วยในการป้องกันการกำจัดเชื้อแบบรวดเร็วจากการเคลื่อนตัวของลำไส้ (Intestinal Peristalsis) สำหรับ enterotoxin และCFA จะสร้างจากยีนบนพลาสมิดการติดเชื้อ ETEC จะมีลักษณะถ่ายเป็นน้ำปริมาณมาก โรคนี้พบได้ทุกวัย ถ้าเกิดโรคนี้แล้วจะมีภูมิต้านทานเชื้อเป็นเวลา 2-3 เดือน

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะเคลื่อนที่เข้าสู่เยื่อเมือกบริเวณลำไส้ใหญ่ทำให้เกิดแผลเปื่อย (Ulcerous) เกิดการอักเสบ การก่อโรคของเชื้อนี้จะเหมือนกับโรคบิดที่เกิดจากแบคทีเรียสายพันธุ์ EIEC มักไม่หมักน้ำตาลแลคโตส (lac-negative)

Enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC) แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดโรค Hemorrhagic Colitis และกลุ่มอาการ Hemolytic-Uremic Syndrome (HUS) คือ เกิดไตวายเฉียบพลัน ภาวะเกล็ดเลือดน้อย (Thrombocytopenia) และโลหิตจาง เชื้อ EHEC จะมี Fimbriae ที่จำเพาะซึ่งสร้างจากยีนบนพลาสมิดเพื่อช่วยในการยึดเกาะกับ Enterocyte นอกจากนี้ อาจเกิดจากโปรเฟจ (Prophage) ที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง Cytotoxin (Shiga-Like Toxins หรือ Verocytotoxin)

Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้เกิดการท้องเสียเป็นน้ำและอาจมีเลือดปนและเกิดอาการท้องเสียในเด็กทารกและเด็กเล็ก การรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะจะดูจากรูปแบบการดื้อยาของเชื้อก่อโรค โดยยาที่นิยมใช้ ได้แก่ Aminopenicillin, Ureidopenicillin,

Cephalosporin, 4-Quinolone หรือ Cotrimoxazole ถ้ามีอาการท้องเสียอย่างรุนแรงจำเป็นต้องให้สารน้ำและอิเล็คโตรไลท์ทางปากตามสูตรของ WHO คือ NaCI 3.5 กรัม $NaHCO_3$ 2.5 กรัม KCI 1.5 กรัม กลูโคส 20 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร อาจทำให้ลำไส้ทำงานน้อยลง โดยใช้โลเพอร์ราไมด์ (Loperamide) ซึ่งอนุพันธ์สังเคราะห์ของฝิ่นมีฤทธิ์ยับยั้งการบีบตัวของลำไส้ ทำให้ถ่ายอุจจาระลดจำนวนครั้งลงและอุจจาระรวมตัวเป็นก้อนได้มากขึ้น (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2556, น.216-217)

การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

Dise Diffusion Method คือการทดสอบโดยการให้สารต้านจุลชีพเข้าในเนื้อวุ้นแล้วดูการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งอยู่บนผิวหรือผสมอยู่ในเนื้อวุ้น สารต้านจุลชีพใส่ในรูปของ Disc คือ ใช้กระดาษกรองชุบสารต้านจุลชีพซึ่งนิยมใช้รูปกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หรืออยู่ในเม็ดคลายเม็ดยาหรือเจาะเป็นหลุมในวุ้น แล้วหยดสารต้านจุลชีพลงไป สารต้านจุลชีพจะซึมเข้าวุ้นแผ่เป็นรัศมีโดยรอบ โดยมีปริมาณลดลงเป็นสัดส่วนกับระยะห่างจากจุด เริ่มต้น แบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยปริมาณของสารต้านจุลชีพที่บริเวณใดก็จะไม่มีแบคทีเรียขึ้นตั้งแต่บริเวณ นั้นเกิดเป็นบริเวณใส เรียกว่า Inhibition Zone การทดสอบ โดยวิธีนี้มีการใช้อย่างกว้างขวาง คือ Dise Diffusion Method เป็นวิธีที่นำมาใช้สำหรับวัดปริมาณต้านจุลชีพจากแหล่งต่างๆ เช่น จากซีรุ่ม ปัสสาวะ น้ำไขสันหลังหรือตรวจปริมาณสารต้านจุลชีพเพื่อวัตถุประสงค์อื่น (วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์และคณะ, 2556, น.41-44,270-275,281-288)

Broth Dilution method เป็นวิธีทดสอบหาความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพเชิงปริมาณ โดยการเจือจางสารต้านจุลชีพในอาหารเหลวให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ที่ครอบคลุมค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพ และเติมเชื้อแบคทีเรียลงไปในปริมาณที่ถูกต้อง ภายหลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ้าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพสามารถยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียได้ อาหารเหลวนั้นจะใส ถ้ายับยั้งไม่ได้อาหารเหลวนั้นจะขุ่น (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) มีหน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml) ซึ่งสามารถนำไปทดสอบต่อเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลชีพที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ (Minimal Bactericidal Concentration: MBC) มีหน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร (µg/ml) (วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์และคณะ, 2556, น.41-44,270-275,281-288)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในผลเร่วน้อยและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเคมีในผลเร่วน้อย

รุจิลักษณ์ รัตตะรมย์ (2547) ศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตัวอย่างพืช 2 ชนิดในสกุล *Amomum* ที่เก็บได้จากธรรมชาติซึ่งใช้ชื่อเร่วสามารถระบุชนิดได้เป็น *Amomum uliginosum* K.d.Koenig และA. Fulviceps Thw. ศึกษาทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอม

ระเหยโดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟฟีแมส-สเปกโตรสโคปีของผลเร่วพบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีได้แก่กลุ่มที่มี Bornyl Acetate เป็นองค์ประกอบหลักและมี Camphor Borneol และ Limonene ตามลำดับเปรียบเทียบกับเครื่องยาจากผลเร่วที่จำหน่ายในร้านยาแผนโบราณพบว่าผลเร่วที่จำหน่ายในร้านยาแผนโบราณในประเทศไทยเป็นชนิด *Amomum uliginosum* K.d. Koenig อีกชนิดที่พบน้อยน่าจะเป็น Alpinia และพบ 2 ชนิดที่ปนปลอมในเครื่องยาจากผลเร่วคือ *Amomum* fulviceps Thw. และ Alpinia sp.

ประสบอร รินทองและคณะ (2557) ศึกษาการตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาเร่วน้อย *(Amomum uliginosum* K.D.Koenig) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ตำแหน่ง Its1 ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอพบว่าองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันเร่วน้อยซึ่งกลั่นจากตัวอย่างอ้างอิงในการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับสาร สำคัญที่พบในน้ำมันเร่วน้อย จากงานวิจัยของ Rattarom (2004) และ Pulbutr และคณะ (2012) คือ มีสาร Bornyl Acetate และ Camphor เป็นองค์ประกอบหลัก แต่ตัวอย่างที่เก็บตัวอย่างจากร้านขายยาแผนโบราณบางตัวอย่างพบสาร Bornyl Acetate Camphor และ Nerolidol เป็นองค์ประกอบหลัก บางตัวอย่างพบ Nerolidol เพียงสารเดียวเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งชนิดและปริมาณของสารสำคัญ ที่แตกต่างกันในน้ำมันกลั่นได้จากพืชชนิดเดียวกันนี้อาจเป็นผลจากปัจจัยหลายประการ เช่นแหล่งเพาะปลูกสมุนไพรวิธีการเก็บสมุนไพร เป็นต้น (Jansse,1987; Garcia,2002) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดพืชซึ่งเป็นแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเครื่องยากับองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันที่สกัดได้พบว่าเครื่องยาที่มีแหล่งที่มาจากพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *A. uliginosum* มี Nerolidol เพียงสารเดียวเป็นองค์ประกอบหลักในทุกตัวอย่างส่วนเครื่องยาที่มีแหล่งที่มาจากพืชชนิด *A. uliginosum* มีเพียงหนึ่งตัวอย่างเท่านั้นที่มี Nerolidol เป็นองค์ประกอบหลัก เห็นได้ว่าแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเครื่องยาที่แตกต่างกันจะมีสาระสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันแตก ต่างกันด้วยซึ่งอาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเครื่องยาได้

Pulbutr และคณะ (2012) ศึกษาผลทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาที่มีต่อเซลล์ของน้ำมันหอมระเหยจากผลเร่วน้อยที่ได้มาการกลั่นเองและซื้อจากร้านที่จำหน่ายผลการกลั่นมีค่าอยู่ที่ 2.90± 0.00 และ 2.90 ± 0.30% v/w ตามลำดับเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่ามีสารสำคัญ 21 ชนิดและ13 ชนิด ในน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นเองและซื้อจากร้าน สารเคมีที่สำคัญคือ Bornyl Acetate น้ำมันเร่วน้อย พบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคท้องเดิน ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Shigellasonnei* และ *Salmonella* Typhi ความเป็นพิษของน้ำมันเร่วน้อยเท่ากับ 0.0725 ± 0.0045 µl/ml ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์และมีฤทธิ์ยับยั้งการกลายพันธุ์ในเชื้อ *Salmonella* TA 98 โดยวิธี Ames test

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

พืชที่ใช้ในการวิจัยคือ ผลเร่วน้อย โดยนำต้น ดอกและผลเร่วน้อย จากอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี นำมาตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ที่สำนักงานหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ ผู้วิจัยนำผลเร่วสดจากอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี นำมาคัดแยกสิ่งปลอมปน จากนั้นนำผลสดมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการบดเป็นผงให้ละเอียด

พืชที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อจุลชีพที่ใช้ในการวิจัย จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข คือ

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) DMST 20972

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) DMST 30541

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) DMST 30545

Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) DMST 26453

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

อุปกรณ์

1. แท่งแก้ว
2. หลอดหยด
3. กรวยแก้ว
4. ช้อนตักสาร
5. ขวดรูปกรวย
6. Milipore Filter
7. ลวดแมกนีเซียม
8. โหลแก้วพร้อมฝาปิด
9. หลอดทดลองขนาดกลาง
10. จานเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish)

11. หลอดรูเล็ก (Capillary Tube)

12. Vernier Caliper (ประเทศเยอรมัน)

13. Norfloxacin 10 µl (Oxoid Ltd. ประเทศอังกฤษ)

14. Analytical Chromatography M TLC Silia gel 60 F_{254}

15. กระบอกตวง ขนาด 25 50 100 250 และ 500 มิลลิลิตร

16. บีกเกอร์ ขนาด 25 50 100 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

17. Mueller-Hinton-Broth (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)

18. Kapillaren (HIRSCHMANN® ABORGERATE ประเทศเยอรมัน)

19. ปิเปต (DOCTOR CALIBRATION CO.,LTD ประเทศเยอรมันนี)

20. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 (Whatman ® Ltd. ประเทศอังกฤษ)

21. Appendoft (DOCTOR CALIBRATION CO.,LTD ประเทศเยอรมันนี)

22. ไมโครปิเปต์ (DOCTOR CALIBRATION CO.,LTD ประเทศเยอรมันนี)

23. Mueller-Hinton Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. ประเทศอินเดีย)

24. 96 Well Palte (บริษัท Corning จำกัด Corning.NY 14831ประเทศสหรัฐ อเมริกา)

25. Sterile Pastic Pipette (DOCTOR CALIBRATION CO.,LTD ประเทศเยอรมันนี)

26. แผ่นทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเกรด AA DISCS 6 mm (Whatman® Ltd. ประเทศอังกฤษ)

เครื่องมือ

1. หม้อน้ำ (Water Bath)
2. ตู้อบ (Hot Air Oven) ยี่ห้อ Memmert (ประเทศเยอรมัน)
3. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมันนี)
4. ตู้เย็น (Refrigerator) (SANYO รุ่น SR-F811 MS ประเทศไทย)
5. ตู้เย็น (Refrigerator) (TOSHIBA รุ่นGR-T41KBZ ประเทศไทย)
6. เครื่องบดไฟฟ้า Sharp (บริษัท ชาร์ป ไทย จำกัด ประเทศไทย)
7. Hotplate stirrer (บริษัท DAIHANLATEH.,LTD. ประเทศเกาหลี)
8. เครื่องนึ่งภายใต้ความดัน (Autoclave) รุ่น JSAX-60 (บริษัท JSR ประเทศเกาหลี)
9. เครื่องนึ่งภายใต้ความดัน (Autoclave)รุ่น HVE-50 (บริษัท HIRAYAMA ประเทศญี่ปุ่น)
10. UV-VIS Spectrometer (บริษัท PG INSTRUMENTS CO.,LTD. ประเทศอังกฤษ)
11. ตู้แช่แข็ง (freezer) Panasonic (บริษัท พานาโซนิค (ประเทศไทย) จำกัด ประเทศไทย)
12. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Digital Balance) (บริษัท เมทเลอร์-โทเลโด ประเทศสวิสเซอร์แลนด์)

13. กล้อง Canon รุ่น Power Shot G15 (บริษัท แคนนอน มาร์เก็ตติ้ง (ไทยแลนด์) จำกัด ประเทศญี่ปุ่น)

14. เครื่องระเหิดสาร (Freeze Dryer) (LABCONO รุ่น RS 232 บริษัท LABCONO ประเทศสหรัฐอเมริกา)

15. เครื่องให้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 nm (บริษัท camag ประเทศเยอรมันนี)

16. Fume Hood เชื้อ (FLEXLAB บริษัท OFFICAL EQUIPMENT MANUFCTURING CO.,LTD. ประเทศไทย)

17. ตู้ปลอดเชื้อ FLEXLAB รุ่น RV1250 (บริษัท OFFICAL EQUIPMENT MANUFCTURING CO.,LTD. ประเทศไทย)

18. ตู้ปลอดเชื้อ FLEXLAB รุ่น VCB-9812G (บริษัท OFFICAL EQUIPMENT MANUFCTURING CO.,LTD.ประเทศไทย)

19. เครื่องระเหยแบบสุญญากาศ Rotavapor รุ่นR 215 (Buchi) (บริษัท บูชิ (ไทยแลนด์) จำกัด ประเทศสวิสเซอร์แลนด์)

สารเคมี

1. Absolute Ethanol (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
2. N-Hexane (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
3. Dichloromethane (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
4. Ethyl Acetate (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
5. Methanol Merck (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
6. Chloroform Labscan (ประเทศเบลเยี่ยม)
7. Ammonia Solution 25 % (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
8. Petroleum Benzene (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
9. Sulfuric Acid 95-97% Acid (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
10. Hydrochloric Acid Fuming 37% (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
11. Aceticacid (glacial) 100% Anhydrous for ACS (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
12. Iron (III) Chloride Anhydrous (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
13. Dinitrobenzoic Acid (บริษัท Sigma ประเทศสวีเดน)
14. Sodium Hydroxide (บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน)
15. Anisaldehyde (ศึกษาภัณฑ์พานิช)
16. Toluene (ศึกษาภัณฑ์พานิช)

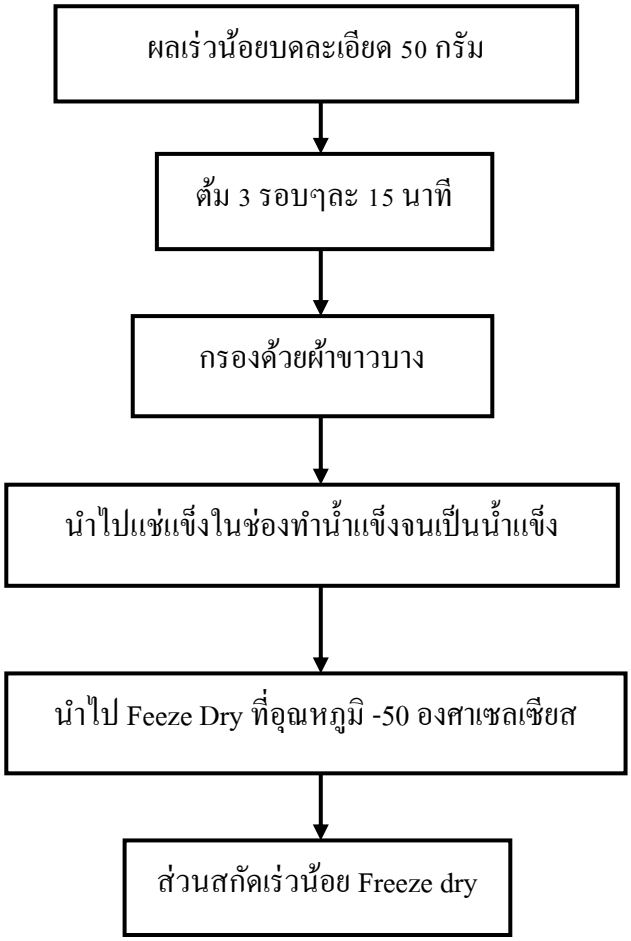
ขั้นตอนการสกัดส่วนสกัดหยาบ

งานวิจัยนี้ได้สกัดสารจากสมุนไพร แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ การสกัดสมุนไพรเร่วน้อยโดยใช้น้ำต้มเดือดเป็นตัวทำละลาย และการหมักสมุนไพรเร่วน้อย 5 ขั้นตอน

1. การสกัดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

ซื้อผลเร่วน้อยสด จากอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรี นำผลเร่วน้อยสด นำมาคัดแยกสิ่งปลอมปน จากนั้นนำผลสดมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการบดเป็นผงให้ละเอียด นำผงเร่วน้อยที่ได้ไปแร่ง ชั่งผงสมุนไพรเร่วน้อยแห้ง จำนวน 50 กรัม เติมน้ำปริมาตร 250 มิลลิลิตร (อัตราส่วนผงสมุนไพรต่อน้ำ 1 ต่อ 5) ยกขึ้นตั้งไฟ รอจนเดือดจับเวลา 15 นาที ยกลงแล้วทิ้งให้เย็นจึงกรองด้วยผ้าขาวบาง เก็บสารสกัด หลังจากนั้นนำกากมาเติมน้ำอีก 250 มิลลิลิตร นำไปต้มตามวิธีการเดิมซ้ำอีก 3 ครั้ง โดยเก็บสารสกัดทั้ง 3 ครั้งที่ได้มารวมกัน นำสารสกัดไประเหิดเพื่อกำจัดน้ำออกด้วยเครื่อง Freeze Dryer ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส สารที่ได้ เรียกว่าสารสกัดหยาบ (Crude Extract) ชั่งน้ำหนักและนำมาคำนวณ หา % Yield ดังสูตร และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

$$\% \text{ yield} = (\text{weight of extract recovered} / \text{weight of fresh dry plant}) \times 100$$



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการสกัดผลเร่วน้อยโดยวิธีต้มเดือดและนำไป Freeze Dry

2. การสกัดผลเร่วน้อยโดยการหมัก 5 ขั้นตอน

2.1 การสกัดโดยใช้ เอทานอล เป็นตัวทำละลาย

ชั่งผงสมุนไพรเร่วน้อยจำนวน 100 กรัม เติมเอทานอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิทที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำมากรองด้วยกระดาษ whatman เบอร์ 4 เพื่อแยกส่วนตัวอย่างพืชออก ทำการสกัดซ้ำอีก 3 ครั้ง ด้วยวิธีการเดิม เก็บสารสกัดหยาบเร่วน้อย ทั้ง 3 ครั้งที่ได้มารวมกัน นำสารสกัดไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หลังจากระเหยแอลกอฮอล์ออก จะได้สารที่มีลักษณะข้นเหนียว สารที่ได้เรียกว่าสารสกัดหยาบ (crude extract) ชั่งน้ำหนักนำมาคำนวณหา % yield ของเร่วน้อย ดังสูตร และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้

% yield = (weight of extract recovered /weight of fresh dry plant) × 100

2.2 การสกัดโดยใช้ เฮกเซน เป็นตัวทำละลาย

นำสมุนไพรเร่วน้อยที่ผ่านการสกัดด้วย เอทานอล เติมเฮกเซน ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท เป็นเวลา 3 วัน นำมากรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 4 เพื่อแยกส่วนตัวอย่างพืชออก ทำการสกัดซ้ำอีก 3 ครั้งด้วยวิธีการเดิม เก็บสารสกัดหยาบเร่วน้อย ทั้ง 3 ครั้งที่ได้มารวมกัน นำสารสกัดไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หลังจากระเหยแอลกอฮอล์ออกได้สารสกัดหยาบ (Hexane Extract) ชั่งน้ำหนักนำมาคำนวณหา % yield ของเร่วน้อย ดังสูตร และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้

% yield = (weight of extract recovered /weight of fresh dry plant) × 100

2.3 การสกัดโดยใช้ ไดคลอโรมีเทน เป็นตัวทำละลาย

นำสมุนไพรเร่วน้อยที่ผ่านการสกัดด้วย เฮกเซน เติมไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท เป็นเวลา 3 วัน นำมากรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 4 เพื่อแยกส่วนตัวอย่างพืชออก ทำการสกัดซ้ำอีก 3 ครั้งด้วยวิธีการเดิม เก็บสารสกัดหยาบเร่วน้อย ทั้ง 3 ครั้งที่ได้มารวมกัน นำสารสกัดไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หลังจากระเหยแอลกอฮอล์ออก ได้สารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทน ชั่งน้ำหนักนำมาคำนวณหา % Yield ของเร่วน้อย ดังสูตร และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้

% yield = (weight of extract recovered /weight of fresh dry plant) × 100

2.4 การสกัดโดยใช้ เอทิลอะซิเตท เป็นตัวทำละลาย

นำผงสมุนไพรเร่วน้อยที่ผ่านการสกัดด้วย ไดคลอโรมีเทน เติมเอทิลอะซิเตท ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท เป็นเวลา 3 วัน นำมากรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 4 เพื่อแยกส่วนตัวอย่างพืชออก ทำการสกัดซ้ำอีก 3 ครั้งด้วยวิธีการเดิม เก็บสารสกัดหยาบเร่วน้อย ทั้ง 3 ครั้งที่ได้มารวมกัน นำสารสกัดไประเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หลังจากระเหยแอลกอฮอล์ออก ได้สารสกัดหยาบเอทิลอะซิเตท (Ethyl Acetate Extract) ชั่งน้ำหนักนำมาคำนวณหา % Yield ของเร่วน้อย ดังสูตร และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้

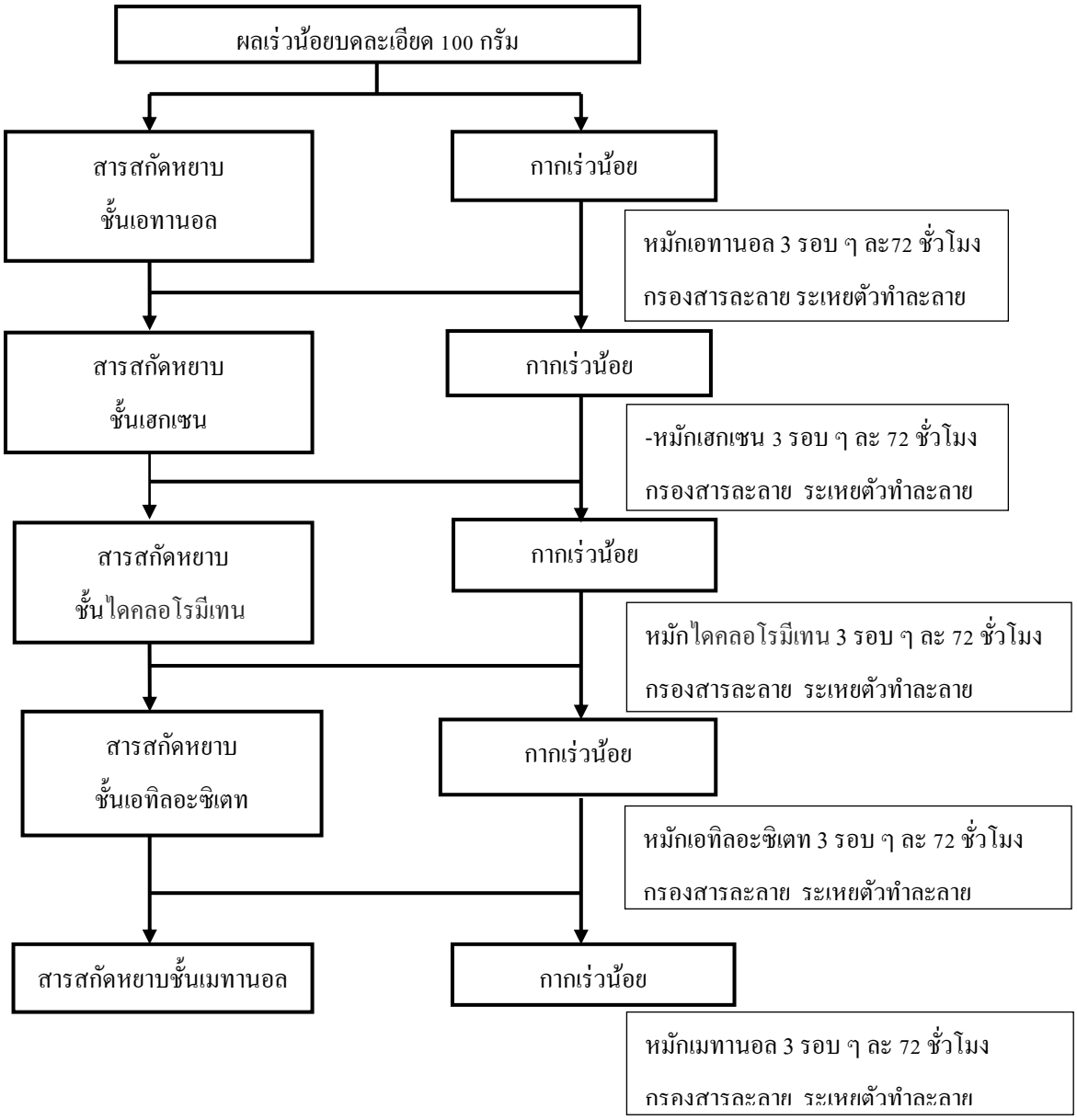
% yield = (weight of extract recovered /weight of fresh dry plant) × 100

2.5 การสกัดโดยใช้ เมทานอล (Methanol) เป็นตัวทำละลาย

นำผงสมุนไพรเร่วน้อยที่ผ่านการสกัดด้วย เอทิลอะซิเตท ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท นำมากรองด้วยกระดาษ Whatman เบอร์ 4 เพื่อแยกส่วนตัวอย่างพืชออก ทำการสกัดซ้ำอีก 3 ครั้งด้วยวิธีการเดิม เก็บสารสกัดหยาบเร่วน้อย ทั้ง 3 ครั้งที่ได้มารวมกัน นำสารสกัดไป

ระเหยให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หลังจากระเหยแอลกอฮอล์ออก ได้สารสกัดหยาบเร่วน้อยเมทานอล ชั่งน้ำหนักนำมาคำนวณหา % Yield ของเร่วน้อย ดังสูตร และเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้

% yield = (weight of extract recovered /weight of fresh dry plant) × 100



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการสกัดผลเร่วน้อยโดยการหมัก 5 ขั้นตอน

3. การทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่ได้จากสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย ที่สกัดโดยวิธีต้มเดือดและวิธีการหมัก 5 ขั้นตอน

โดยจะตรวจสอบสารพฤกษเคมี 7 กลุ่ม ได้แก่ แอนทราควิโนไกลโคไซด์ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน แอลคาลอยด์และคาดิแอกไกลโคไซด์ ซึ่งมีวิธีดังต่อไปนี้

3.1 การตรวจสอบแอนทราควิโนไกลโคไซด์ ชั่งส่วนสกัดน้ำซึ่งนำไป Freeze Dry ส่วนสกัดเร่วน้อย เอทานอล ส่วนสกัดเร่วน้อยเฮกเซน ส่วนสกัดเร่วน้อยไดคลอโรมีเทน ส่วนสกัดเร่วน้อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดเร่วน้อยเมทานอล หลอดละ 0.20 กรัม เติมสารละลาย 10% กรดซัลฟิริก (10% H_2SO_4) 5 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบนหม้อน้ำ (water bath) 5 นาที กรองแล้วปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง สกัดด้วยคลอโรฟอร์ม เติมสารละลายแอมโมเนีย (10% NH_3) 2-3 หยด สังเกตสีชมพูในชั้นละลายด่าง

3.2 การตรวจสอบเทอร์พีนอยด์ ใช้การทดสอบซาลโควสกี (Salkowski Test) ชั่งส่วนสกัดน้ำซึ่งนำไป Freeze Dry ส่วนสกัดเร่วน้อย เอทานอล ส่วนสกัดเร่วน้อยเฮกเซน ส่วนสกัดเร่วน้อยไดคลอโรมีเทน ส่วนสกัดเร่วน้อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดเร่วน้อยเมทานอล หลอดละ 0.20 กรัม สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ครั้ง 3-5 มิลลิลิตร 2-3 ครั้ง เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลลิตร เขย่า ค่อย ๆ เติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) 2 ml สังเกตสีน้ำตาลแดงระหว่างชั้นคลอโรฟอร์มและชั้นกรดซัลฟิวริก

3.3 การตรวจสอบฟลาโวนอยด์ ชั่งส่วนสกัดน้ำซึ่งนำไป Freeze Dry ส่วนสกัดเร่วน้อย เอทานอล ส่วนสกัดเร่วน้อยเฮกเซน ส่วนสกัดเร่วน้อยไดคลอโรมีเทน ส่วนสกัดเร่วน้อยเอทิลอะซิเตทและส่วนสกัดเร่วน้อยเมทานอล หลอดละ 0.20 กรัม สารละลายเอทานอล 50% 3 ml คนให้ละลาย เติมลวดแมกนีเซียมชิ้นเล็กๆ ลงไป 2-3 ชิ้น นำไปต้มประมาณ 5 นาที ปล่อยให้สารละลายเย็นลง หยดกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl) 3-4 หยด สังเกตสีภาย 1-2 นาที หากปรากฏ สีเหลือง ส้ม หรือแดง แสดงว่าพบฟลาโวนอยด์

3.4 การตรวจสอบซาโปนิน โดยการทดลองฟอง ชั่งส่วนสกัดน้ำซึ่งนำไป Freeze Dry ส่วนสกัดเร่วน้อย เอทานอล ส่วนสกัดเร่วน้อยเฮกเซน ส่วนสกัดเร่วน้อยไดคลอโรมีเทน ส่วนสกัดเร่วน้อยเอทิลอะซิเตทและส่วนสกัดเร่วน้อยเมทานอล หลอดละ 0.10 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 ml นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที มาเติมน้ำกลั่น 2-3 ml เขย่าอย่างแรง 1 นาที สังเกตลักษณะและความคงตัวของฟอง

3.5 การตรวจสอบแทนนิน ชั่งส่วนสกัดน้ำซึ่งนำไป Freeze Dry ส่วนสกัดเร่วน้อย เอทานอล ส่วนสกัดเร่วน้อยเฮกเซน ส่วนสกัดเร่วน้อยไดคลอโรมีเทน ส่วนสกัดเร่วน้อยเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดเร่วน้อยเมทานอล หลอดละ 0.20 กรัม เติมน้ำกลั่น 5 ml นำไปอุ่นบนเครื่องอังน้ำ เติม

สารละลาย 1% เฟอร์ริกคลอไรด์ (1% $FeCl_3$) จำนวน 2-3 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้น หากสารละลาย สีเขียวดำหรือน้ำเงินดำแสดงว่าพบแทนนิน

3.6 การตรวจสอบอัลคาลอยด์ ชั่งส่วนสกัดน้ำซึ่งนำไป Freeze Dry ส่วนสกัดเร่วน้อย เอทานอล ส่วนสกัดเร่วน้อยเฮกเซน ส่วนสกัดเร่วน้อยไดคลอโรมีเทน ส่วนสกัดเร่วน้อยเอทิลอะซิเตทและส่วนสกัดเร่วน้อยเมทานอล หลอดละ 0.20 กรัม เติมสารละลายกรดซัลฟิวริก 2% (2%H_2SO_4) 15 ml ต้มและคนด้วยแท่งแก้ว 10 นาที หยดน้ำยาดราเจนดอร์ฟ (Dragendorff's Regent) 3 ml สังเกตสีและปริมาณของตะกอน หากเกิดตะกอนสีส้มแดงแสดงว่าพบแอลคาลอยด์

3.7 การทดสอบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ เนื่องจากสารกลุ่มนี้ไม่มีน้ำยาเฉพาะสำหรับทดสอบ จึงต้องทำการทดสอบส่วนต่าง ๆ ของโครงสร้างประกอบกัน การทดสอบประกอบด้วยการทดสอบส่วนสเตียรอยด์นิวเคลียส ส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว และส่วนน้ำตาลดีออกซี ผลการทดสอบทั้ง 3 ส่วนให้ผลบวก จึงสรุปได้ว่า พบคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ วิธีทดสอบทำดังนี้ ชั่งส่วนสกัดน้ำซึ่งนำไป Freeze Dry ส่วนสกัดเร่วน้อย เอทานอล ส่วนสกัดเร่วน้อยเฮกเซน ส่วนสกัดเร่วน้อยไดคลอโรมีเทน ส่วนสกัดเร่วน้อยเอทิลอะซิเตทและส่วนสกัดเร่วน้อยเมทานอล หลอดละ 0.10 กรัม สกัดสีออกด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 2-3 ครั้ง ละลายส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย ทั้ง 6 ขั้นตอนด้วยเอทานอล 80%

3.7.1 ทดสอบส่วนสเตียรอยด์ โดยใช้การทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann Test) โดยเติมกรดแกลเชียลแอซีติก (Glacial Acetic Acid) 1 ml และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 ml สังเกตสีที่เกิดขึ้นทันที ปรากฏสีน้ำเงินหรือน้ำเงินเขียว แสดงว่าพบสเตียรอยด์

3.7.2 ส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว นำสารละลายตัวอย่างที่ละลายในเอทานอล 80% เติมน้ำยาเคดเด (Kedde's Reagent) 1-2 หยด ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย 5 % โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (5% KOH) ในแอลกอฮอล์ 1-2 หยด สังเกตสีที่เกิดขึ้นทันที หากปรากฏสีม่วง แสดงว่าพบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัว

3.7.3 ส่วนน้ำตาลดีออกซี ใช้การทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (Keller-Kiliani Test) นำสารละลายตัวอย่างที่ละลายในเอทานอล 80% เติมกรดแกลเชียลแอซีติก 1 ml สารละลาย 1% เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) 1-2 หยด เขย่าให้เข้ากัน เอียงหลอดแล้วค่อยๆ รินกรดซัลฟิวริกเข้มข้นไปตามข้างหลอดประมาณ 1-2 ml สังเกตสีตรงรอยต่อระหว่างชั้นของสารละลายหากปรากฏสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างชั้นสารสกัดและกรดซัลฟิวริก แสดงว่าพบน้ำตาลดีออกซี (ศิรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์ และคณะ, 2556, น.62-64)

4. การตรวจสารสำคัญ ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC)

การแยกสารด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี หาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกสารที่อยู่ในส่วนสกัดต่างๆ ดังนี้

4.1 เตรียมส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อยและส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry ผสมสารละลายในส่วนสกัดน้ำ

4.2 เตรียมแผ่น TLC ให้มีขนาด 3.50 เซนติเมตร×6 เซนติเมตร แล้วจุด (Spot) 6 จุด

4.3 นำส่วนสกัดในข้อที่ 1 ลงบนแผ่น TLC โดยใช้หลอดรูเล็ก (Capillary Tube) จุดส่วนสกัดเร่วน้อยที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น TLC 6 จุดโดยให้ห่างจากขอบล่างของแผ่น TLC ประมาณ 0.5 เซนติเมตร และแต่ละจุดห่างกันพอประมาณ ด้านบนของแผ่น TLC ขีดระดับตัวทำละลาย (Solvent Front)ไว้

4.4 เตรียมบีกเกอร์ โดยใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมใส่ในบีกเกอร์ ปิดด้วยกระดาษฟอยล์ นั้นนำกระดาษมาใส่ลงในบีกเกอร์โดยให้กระดาษทาบผิวด้านในบีกเกอร์ แล้วเตรียมกระดาษฟอยล์ปิดไว้เพื่อให้บีกเกอร์อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

4.5 Spot ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อยและส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry ลงบน TLC Plate แล้วไปจุ่มลงในบีกเกอร์ที่อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลายซึ่งเตรียมไว้ ปิดฝา ปล่อยให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่จนถึงระดับ (solvent front) ที่กำหนดไว้ นำแผ่น TLC ออกจากบีกเกอร์ ปล่อยให้ตัวทำละลายระเหยจนแห้ง

4.6 นำแผ่น TLC ไปทดสอบการดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

4.7 นำแผ่น TLC ไปย้อมด้วย Anisaldehyde แล้วนำไปอบ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส สังเกตการเปลี่ยนแปลงสี (อุดมเดชา พลเยี่ยม, 2556, น.35-36)

5. ทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบเร่วน้อยที่สกัดได้จากทั้งสองวิธีการ ด้วยวิธี Disc diffusion และวิธี Broth Microdilution ดังนี้

5.1 Disc Diffusion ทำการเตรียมส่วนสกัดแต่ละส่วน โดยละลายส่วนสกัดในเอทานอลให้ได้ความเข้มข้น ดังนี้

5.1.1 ส่วนสกัดน้ำที่นำไป Freeze dry ความเข้มข้น 0.3155 g/ml

5.1.2 ส่วนสกัดเอทานอล ความเข้มข้น 1.2620 g/ml

5.1.3 ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 0.6948 g/ml

5.1.4 ส่วนสกัดเมทานอล ความเข้มข้น 16.0976 g/ml

5.1.5 ส่วนสกัดเฮกเซน ความเข้มข้น 0.2758g/ml

5.1.6 ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน ความเข้มข้น 0.0864 g/ml

นำส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยแต่ละส่วนปริมาตร 30 ไมโครลิตรมาบ่มกับแผ่น Disc ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร เพื่อให้ได้แผ่นสารสกัดที่จะนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ คือ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) ให้ได้ปริมาณ 10^7 cfu/ml มา Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ให้ทั่วทั้ง Petri Dish จากนั้นทำการวางแผ่นสารสกัดเร่วน้อยบน Petri Dish แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยสภาวะที่ใช้ออกซิเจน เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ผลโดยสังเกตจากบริเวณใส (Inhibition Zone) รอบแผ่นยา ถ้ามีบริเวณใสจะหมายถึงแผ่นยามีฤทธิ์ต้านเชื้อที่ใช้ทดสอบนั้นๆ ทำการวัดความกว้างของบริเวณใสด้วย Vernier Caliper โดยมี Negative Control คือ Disc ที่บ่มด้วยตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารสกัด และ Positive Control คือแผ่น Disc ของยา Norfloxacin 10 µl โดยทำการทดลองกับสารสกัดเร่วน้อยแต่ละส่วนสกัด 3 ซ้ำต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด (Triplicate) และทำการทดลองกับ Negative Control และ Positive Control 3 ซ้ำ ต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดเช่นเดียวกัน

5.2 Broth Microdilution Method คัดเลือกสารสกัดเร่วน้อยที่แสดง Inhibition Zone มากกว่าหรือเท่ากับ 7 มิลลิเมตรต่อเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งผลการวิจัยจากข้อ 5.1 พบว่าส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท และส่วนสกัดเมทานอล เพียง 3 ส่วนนี้เท่านั้นที่แสดง Inhibition Zone ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ทุกชนิดต่อสารสกัดหยาบเร่วน้อยแต่ละส่วนสกัดโดยวิธี Broth Microdilution เพื่อให้ได้ค่า Minimum inhibitory Concentration (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentration (MBC) ต่อเชื้อทุกชนิด ดังนี้

5.2.1 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวปริมาตร 50 µl ลงใน 96-Well Microtiter Plate ทุก Well เติมสารละลายของส่วนสกัดเอทานอล ความเข้มข้น 1.262 g/ml สารละลายของส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท ความเข้มข้น 0.6948 g/ml สารละลายของส่วนสกัดเมทานอล ความเข้มข้น 16.0976 g/ml ปริมาตร 50 µl ลงใน Well ซ้ายสุดของแต่ละแถว แล้วเจือจางตัวอย่างลงใน Well ถัดไป โดยใช้เทคนิค 2-Fold Serial Dilution

5.2.2 เติมสารละลายของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด (ผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยสภาวะที่ใช้ออกซิเจน นาน 18-24 ชั่วโมง ประมาณ 10^7 CFU/ml ปริมาตร 50 µl ลงไปใน Well แล้วผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยสภาวะที่ใช้ออกซิเจน นาน 18-24 ชั่วโมง

5.2.3 สังเกตความขุ่น-ใส ของสารผสมในแต่ละ Well ด้วยสายตาและบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Minimum Inhibitory Concentration (MIC) คือความเข้มข้นต่ำสุดที่เริ่มสังเกตเห็นสารผสมใส ไม่มีตะกอนใน Well

5.2.4 ปิเปตสารผสมจาก Well ที่ใสทั้งหมด ปริมาตร 20 µl ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยสภาวะที่ใช้ออกซิเจน นาน 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี ที่รอดชีวิตจากแต่ละ Well และบันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดของตัวอย่างที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียรอดชีวิตน้อยกว่า 0.1% ของปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

5.2.5 ทำการทดลองกับส่วนสกัดเร่วน้อยอย่างต่ำ 3 ซ้ำต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด (Triplicate) รายงานผลเป็นช่วงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบเร่วน้อยทุกส่วนสกัดต่อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ดังนี้ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E.coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC)

5.2.6 ทำการ Test โดยใช้ สถิติ Kruskal Walis Test ในการวิเคราะห์เชิงกลุ่มของ Inhibition ของสารสกัดหยาบเร่วน้อยต่อเชื้อ *Escherichia coli* ก่อโรคในลำไส้

5.2.7 ทำการ Test โดยใช้ สถิติ Kruskal Walis Test ในการวิเคราะห์เชิงกลุ่มค่า MBC ของส่วนสกัดหยาบเร่วน้อยต่อเชื้อ *Escherichia coli* ก่อโรคในลำไส้

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

พืชที่ใช้ในการวิจัยคือ ผลเร่วน้อย โดยนำ ต้น ดอกและผลเร่วน้อย จากอำเภอสอยดาว จังหวัดจันทบุรีนำมาตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ที่สำนักงานหอพรรณไม้กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม กรุงเทพมหานคร พบว่าเร่วน้อยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amomum uliginosum* J. Koenig

ผลการสกัดเร่วน้อยให้ได้ส่วนสกัดหยาบ

จากการนำผลเร่วน้อยแห้งบดละเอียดด้วยวิธีการต้มเดือดและนำไป Freeze Dry และวิธีการหมัก ด้วยเอทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล โดยวิธี Marceration 3 ครั้ง จะได้ส่วนสกัดหยาบ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สรุปร้อยละผลผลิตของส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย

ส่วนสกัด	ร้อยละ ผลผลิต (Mean ± S.D.)
น้ำนำไป Freeze dry	9.76 ± 1.87
เอทานอล	2.30 ± 0.44
เฮกเซน	1.11 ± 1.01
ไดคลอโรมีเทน	0.88 ± 0.64
เอทิลอะซิเตท	0.53 ± 0.06
เมทานอล	3.59 ± 1.79

จากตารางที่ 1 พบว่า ส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย ส่วนน้ำซึ่งนำไป Freeze Dry ได้ค่าร้อยละ ผลผลิต เท่ากับ 9.76 ± 1.87 ส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยเอทานอล ได้ค่าร้อยละ ผลผลิต เท่ากับ 2.30 ± 0.44 ส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยเฮกเซน ได้ค่าร้อยละ ผลผลิต เท่ากับ 1.11 ± 1.01 ส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยไดคลอโรมีเทน ได้ค่าร้อยละ ผลผลิต เท่ากับ 0.88 ± 0.64 ส่วนสกัด

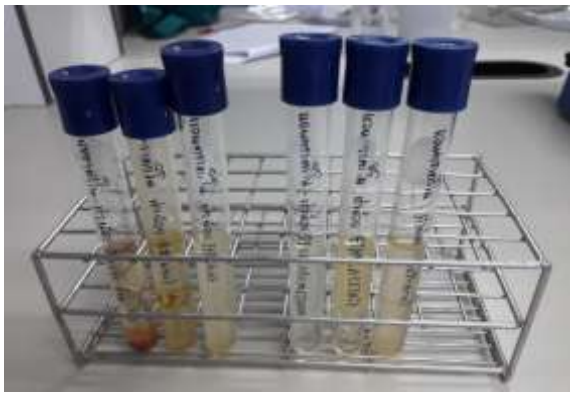
หยาบจากผลเร่วน้อยเอทิลอะซิเตท ได้ค่าร้อยละ ผลผลิต เท่ากับ 0.53 ± 0.06 ส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยเมทานอล ได้ค่าร้อยละ ผลผลิต เท่ากับ 3.59 ± 1.79

ผลการตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญในสารสกัดหยาบเร่วน้อย 7 กลุ่ม

ผลการตรวจสอบแอนทราควิโนน

1. ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze dry
   ไม่พบแอนทราควิโนนในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีน้ำตาลอ่อนใส ภายหลังทำปฏิกิริยา
2. ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบแอนทราควิโนนในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีใส ภายหลังทำปฏิกิริยา
3. ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบแอนทราควิโนนในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีขาวขุ่น ภายหลังทำปฏิกิริยา
4. ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบแอนทราควิโนนในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีขาวขุ่น ภายหลังทำปฏิกิริยา
5. ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบแอนทราควิโนนในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีเหลืองอ่อนขุ่น ภายหลังทำปฏิกิริยา
6. ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบแอนทราควิโนนในส่วนสกัดเร่วน้อยนี้ โดยปรากฏสีเหลืองอ่อนใส ภายหลังทำปฏิกิริยา

สรุปผลการทดสอบสารแอนทราควิโนนในส่วนสกัดเร่วน้อย ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 การทดสอบกลุ่มสารแอนทราควิโนนในส่วนสกัดเร่วน้อย

ผลการตรวจสอบเทอร์พีนอยด์

1. ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze dry

   พบว่า เทอร์พีนอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีน้ำตาลแดง ภายหลังทำปฏิกิริยา

2. ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย

   พบว่า เทอร์พีนอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีน้ำตาลแดงของสารละลาย ภายหลังทำปฏิกิริยา

3. ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย

   ไม่พบเทอร์พีนอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีเขียว ภายหลังทำปฏิกิริยา

4. ส่วนสกัดคลอโรมีเทน จากผลเร่วน้อย

   ไม่พบเทอร์พีนอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีขาวใส ภายหลังทำปฏิกิริยา

5. ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท จากผลเร่วน้อย

   ไม่พบเทอร์พีนอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีขาวขุ่น ภายหลังทำปฏิกิริยา

6. ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย

   พบว่า เทอร์พีนอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีน้ำตาลแดงของสารละลายภายหลังทำปฏิกิริยา

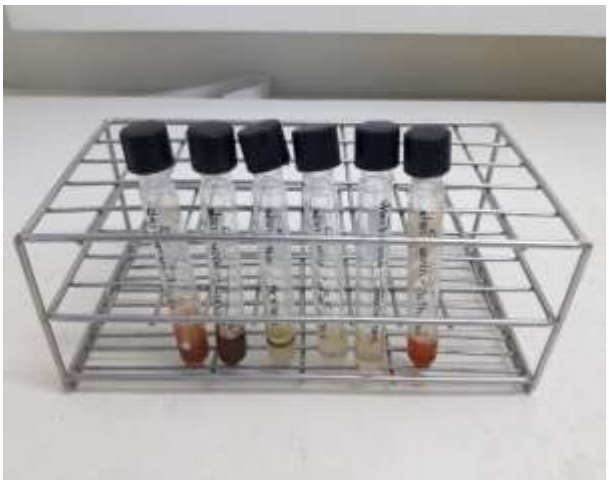
สรุปผลการทดสอบเทอร์พีนอยด์ในส่วนสกัดเร่วน้อย ดังภาพที่ 9

ภาพที่ 9 การทดสอบเทอร์พีนอยด์ในส่วนสกัดผลเร่วน้อย

ผลการตรวจสอบฟลาโวนอยด์

1. ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze dry
   พบว่า ฟลาโวนอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีส้ม ภายหลังทำปฏิกิริยา
2. ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย
   พบว่า ฟลาโวนอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีน้ำตาลแดงภายหลังทำปฏิกิริยา
3. ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบฟลาโวนอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีใสภายหลังทำปฏิกิริยา
4. ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบฟลาโวนอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีใสภายหลังทำปฏิกิริยา
5. ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบฟลาโวนอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีใสภายหลังทำปฏิกิริยา
6. ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย
   พบว่า ฟลาโวนอยด์ในส่วนนี้ โดยปรากฏสีส้ม ภายหลังทำปฏิกิริยา

สรุปผลการทดสอบฟลาโวนอยด์ ในส่วนสกัดเร่วน้อย ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 การทดสอบฟลาโวนอยด์ในส่วนสกัดผลเร่วน้อย

ผลการตรวจสอบซาโปนินโดยการทดลองการเกิดฟอง

1. ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze dry
   พบว่า ซาโปนินในส่วนสกัดนี้ เมื่อเขย่า ปรากฏฟองภายหลังทำปฏิกิริยา
2. ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบซาโปนินในส่วนสกัดนี้ เมื่อเขย่าไม่ปรากฏฟองภายหลังทำปฏิกิริยา
3. ส่วนสกัด เฮกเซน จากผลเร่วน้อย
   ไม่พบซาโปนินในส่วนสกัดนี้ เมื่อเขย่าไม่ปรากฏฟองภายหลังทำปฏิกิริยา
4. ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน จากผลเร่วน้อย
   ไม่พบซาโปนินในส่วนสกัดนี้ เมื่อเขย่าไม่ปรากฏฟอง ภายหลังทำปฏิกิริยา
5. ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบซาโปนินในส่วนสกัดนี้ เมื่อเขย่าไม่ปรากฏฟอง ภายหลังทำปฏิกิริยา
6. ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย
   พบว่า ซาโปนินในส่วนสกัดนี้ เมื่อเขย่า ปรากฏฟอง ภายหลังทำปฏิกิริยา

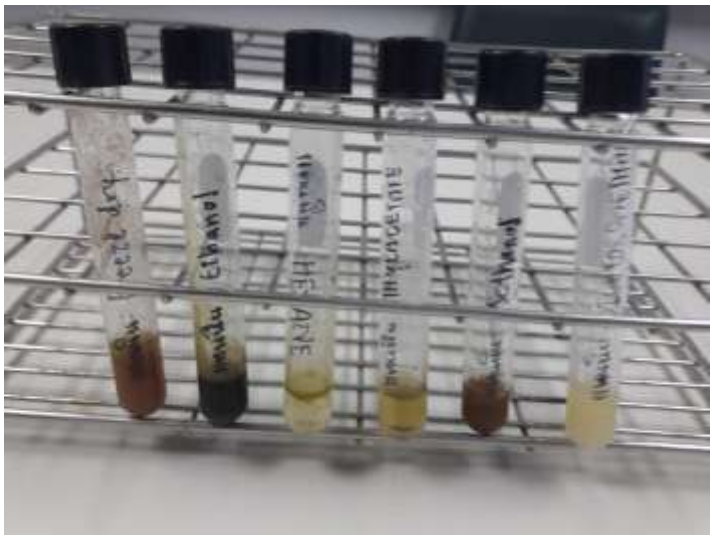
สรุปผลการทดสอบซาโปนินในส่วนสกัดเร่วน้อย ดังภาพที่ 11

ภาพที่ 11 การทดสอบซาโปนินโดยการทดลองการเกิดฟองในส่วนสกัดผลเร่วน้อย

ผลการตรวจสอบแทนนิน

1. ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze dry
   พบว่า แทนนินในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีเขียวดำภายหลังทำปฏิกิริยา
2. ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย
   พบว่า แทนนินในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีน้ำเงินดำภายหลังทำปฏิกิริยา
3. ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบแทนนินในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีเหลืองใส ภายหลังทำปฏิกิริยา
4. ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบแทนนินในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีเหลืองขุ่นภายหลังทำปฏิกิริยา
5. ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย
   พบว่า แทนนินในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีเขียวดำใส ภายหลังทำปฏิกิริยา
6. ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย
   ไม่พบแทนนินในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีน้ำตาลภายหลังทำปฏิกิริยา

สรุปผลการทดสอบแทนนินในส่วนสกัดเร่วน้อย ดังภาพ 12



ภาพที่ 12 การทดสอบแทนนินในส่วนสกัดผลเร่วน้อย

ผลการตรวจสอบอัลคาลอยด์

1. ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze dry

พบว่า อัลคาลอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีเหลืองอมเขียวใส พบตะกอนสีส้มแดงที่ก้นหลอด ภายหลังทำปฏิกิริยา

2. ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย

พบว่า อัลคาลอยด์ในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีเหลืองส้ม พบตะกอนสีส้มแดงที่ก้นหลอด ภายหลังทำปฏิกิริยา

3. ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย

ไม่พบอัลคาลอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีเขียวขี้ม้า พบตะกอนสีเขียวที่ก้นหลอด ภายหลังทำปฏิกิริยา

4. ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย

ไม่พบอัลคาลอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีเหลืองใส พบตะกอนสีดำที่ก้นหลอด ภายหลังทำปฏิกิริยา

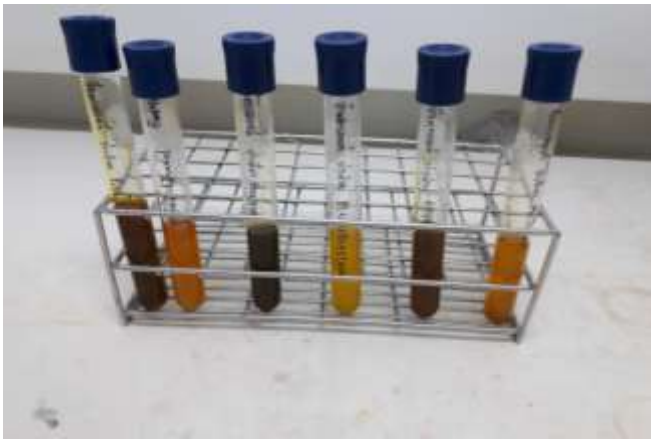
5. ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย

ไม่พบอัลคาลอยด์ในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีเหลือง พบตะกอนสีดำที่ก้นหลอด ภายหลังทำปฏิกิริยา

6. ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย

พบอัลคาลอยด์ในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีเหลืองส้ม พบตะกอนสีส้มแดงที่ก้นหลอด ภายหลังทำปฏิกิริยา

สรุปผลการทดสอบอัลคาลอยด์ในส่วนสกัดเร่วน้อย ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 การทดสอบอัลคาลอยด์ในส่วนสกัดผลเร่วน้อย

ผลการตรวจสอบคาร์ดิแอกไกโคไซด์

1. ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry

ผลการทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann Test)

- ไม่พบสเตียรอยด์ในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีใสภายหลังทำปฏิกิริยา

ผลการทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวด้วยน้ำยาเคดเด (Kedde Reagent)

- ไม่ปรากฏวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีเหลืองใส ภายหลังทำปฏิกิริยา

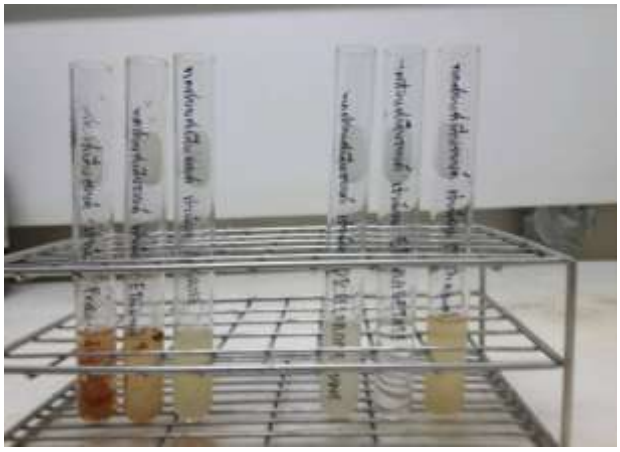
ผลการทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซี ด้วยการทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (Keller-KilianiTest)

- ไม่ปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างส่วนสกัดนี้ กับกรดซัลฟิวริก โดยปรากฏสีน้ำตาลใส ภายหลังทำปฏิกิริยา

ผลการทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann test)

- ไม่พบสเตียรอยด์ในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีขาวขุ่นภายหลังทำปฏิกิริยา

สรุปผลการทดสอบสเตียรอยด์ในส่วนสกัดเร่วน้อย ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 การทดลองสเตียรอยด์ในส่วนสกัดผลเร่วน้อย

2. ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อย Freeze dry

ทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann test)

- ไม่พบ สเตียรอยด์ในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีใสภายหลังทำปฏิกิริยา

ทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวด้วยน้ำยาเคดเด (kedde reagent)

- ไม่ปรากฏวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีเหลืองใส ภายหลังทำปฏิกิริยา

ทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซี ด้วยการทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (Keller-Kiliani Test)

- ไม่ปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างส่วนสกัดนี้กับกรดซัลฟิวริก โดยปรากฏสีน้ำตาลใส ภายหลังทำปฏิกิริยา

3. ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย

ทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann Test)

- ไม่พบ สเตียรอยด์ในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีขาวขุ่นภายหลังทำปฏิกิริยา

ทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวด้วยน้ำยาเคดเด (Kedde Reagent)

- ไม่ปรากฏวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีเหลืองขุ่น ภายหลังทำปฏิกิริยา

ทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซี ด้วยการทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (keller-kiliani test)

- ไม่ปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างสารสกัดนี้ กับกรดซัลฟิวริก โดยปรากฏสีน้ำตาลใส ภายหลังทำปฏิกิริยา

4. ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย

ผลการทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann Test)

- ไม่พบสเตียรอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีขาวขุ่นภายหลังทำปฏิกิริยา

ผลการทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวด้วยน้ำยาเคดเด (Kedde Reagent)

- ไม่ปรากฏวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีขาวขุ่น ภายหลังทำปฏิกิริยา

ผลการทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซี ด้วยการทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (Keller-Kiliani Test)

- ไม่ปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างสารสกัดนี้ กับกรดซัลฟิวริก โดยปรากฏสีขาวขุ่น มีตะกอนก้นหลอดสีดำ ภายหลังทำปฏิกิริยา

5. ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย

ผลการทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann Test)

- ไม่พบสเตียรอยด์ในส่วนสกัดนี้โดยปรากฏสีขาวขุ่นภายหลังทำปฏิกิริยา

ผลการทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวด้วยน้ำยาเคดเด (Kedde Reagent)

- ไม่ปรากฏวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีขาวใส มีฟองเล็กน้อยภายหลังทำปฏิกิริยา

ผลการทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซี ด้วยการทดสอบเคลเลอร์-คิเลีย(Keller-Kiliani Test)

- ไม่ปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างส่วนสกัดนี้ กับกรดซัลฟิวริกโดยปรากฏสีขาวขุ่น ภายหลังทำปฏิกิริยา

6. ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย

ผลการทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann Test)

- ไม่พบสเตียรอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีขาวใสภายหลังทำปฏิกิริยา

ผลการทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวด้วยน้ำยาเคดเด (Kedde Reagent)

- ไม่ปรากฏวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีเหลือง มีฟองเล็กๆ ภายหลังทำปฏิกิริยา

ผลการทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซีด้วยการทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (Keller-Kiliani Test)

- ไม่ปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างส่วนสกัดนี้ กับกรดซัลฟิวริกโดยปรากฏสีขาวขุ่น ภายหลังทำปฏิกิริยา

7. ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย

ผลการทดสอบส่วนสเตียรอยด์ด้วยการทดสอบลีเบอร์แมน (Liebermann Test)

- ไม่พบสเตียรอยด์ในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีขาวขุ่นภายหลังทำปฏิกิริยา

ผลการทดสอบส่วนวงแหวนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวด้วยน้ำยาเคดเด (Kedde Reagent)

- ไม่ปรากฏส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวในส่วนสกัดนี้ โดยปรากฏสีเหลืองใส ภายหลังทำปฏิกิริยา

ผลการทดสอบส่วนน้ำตาลดีออกซี ด้วยการทดสอบเคลเลอร์-คิเลียนิ (Keller -Kiliani Test)

- ไม่ปรากฏวงแหวนสีน้ำตาลตรงรอยต่อระหว่างส่วนสกัดนี้กับกรดซัลฟิวริกโดยปรากฏสีขุ่นใสภายหลังทำปฏิกิริยา

สรุปผลการทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวในส่วนสกัดผลเร่วน้อย ดังภาพที่ 15

ภาพที่ 15 การทดสอบส่วนวงแหวนแล็กโทนไม่อิ่มตัวในส่วนสกัดผลเร่วน้อย

ผลการตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญที่พบในส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยทุกส่วนสกัด

สรุปได้จากดังตารางที่ 2 ได้ดังนี้

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบกลุ่มสาระสำคัญที่พบในส่วนสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยทุกส่วนสกัด

ส่วนสกัด	แอนทราควิโน	เทอร์พีนอยด์	ฟลาโวนอยด์	ซาโปนิน	แทนนิน	อัลคาลอยด์	คาร์ดิแอก-ไกลโคไซด์
Freeze dry	-	++	+	+	+	+	-
เอทานอล	-	+	+	-	+	+	-
เฮกเซน	-	-	-	-	-	-	-
ไดคลอโรมีเทน	-	-	-	-	-	-	-
เอทิลอะซิเตท	-	-	-	-	+	-	-
เมทานอล	-	+	+	+	-	+	-

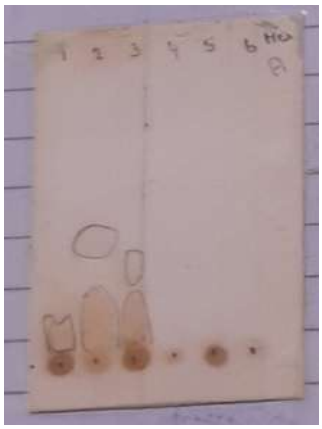
หมายเหตุ + หมายถึงพบกลุ่มสารนั้น, - หมายถึงไม่พบกลุ่มสารนั้น

จากตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญในสารสกัดหยาบเร่วน้อย 7 กลุ่ม พบว่า ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อย Freeze Dry พบสารสำคัญ คือ เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนินแทนนินและอัลคาลอยด์ ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย พบสารสำคัญ คือเทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนินและอัลคาลอยด์ ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย พบสารสำคัญ คือ แทนนิน ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย พบสารสำคัญ คือเทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนินและอัลคาลอยด์

ผลการตรวจสารสำคัญในส่วนสกัดเร่วน้อย ด้วยวิธีทินแลร์เยอร์โครมาโตกราฟี (TLC)

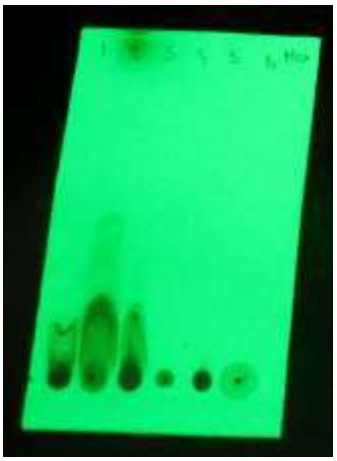
Mobile Phase ระบบที่ 1 ประกอบด้วย เฮกเซน 100% สารละลาย Anisaldehyde – Sulfuric นำอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อยส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 16 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเอทิล อะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



ภาพที่ 16 mobile phase ระบบที่ 1 การอ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ดังภาพที่ 17 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัด เอทิลอะซิเตท ส่วนสกัดเมทานอล ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



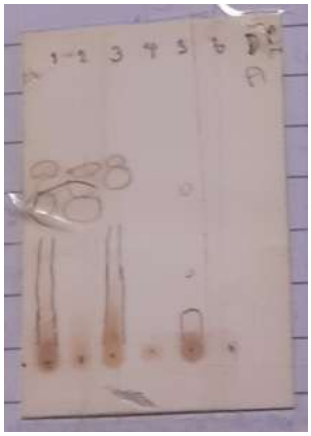
ภาพที่ 17 mobile phase ระบบที่ 1 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผล พบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 18 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry

ภาพที่ 18 mobile phase ระบบที่ 1 อ่านผลภายใต้ความร้อน

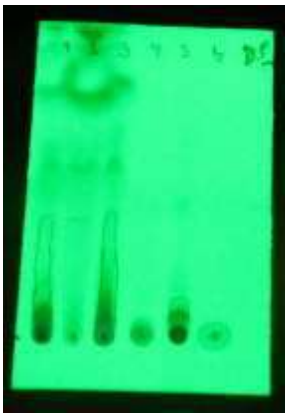
Mobile Phase ระบบที่ 2 ประกอบด้วย ไดคลอโรมิเทน 100% สารละลาย Anisaldehyde นำอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อยส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 19 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



ภาพที่ 19 mobile phase ระบบที่ 2 อ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าว ๆได้ ดังภาพที่ 20 ไม่พบ spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



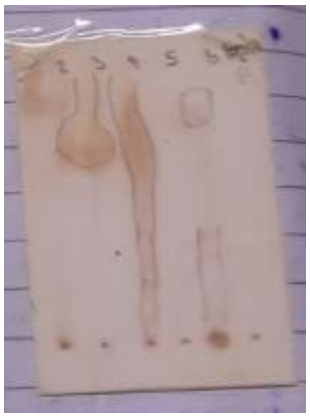
ภาพที่ 20 mobile phase ระบบที่ 2 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน พบว่า spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 21 ไม่พบ spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry

ภาพที่ 21 mobile phase ระบบที่ 2 อ่านผลภายใต้ความร้อน

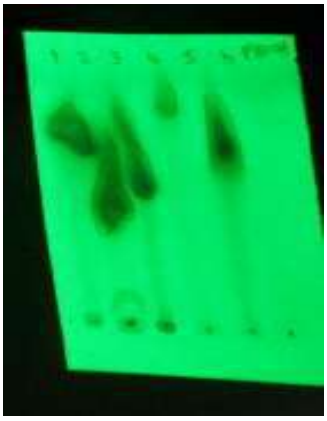
Mobile Phase ระบบที่ 3 ประกอบด้วย เอทิลอะซิเตท 100 % สารละลาย Anisaldehyde นำอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าว ๆได้ ดังภาพที่ 22 ไม่พบ spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze dry



ภาพที่ 22 mobile phase ระบบที่ 3 อ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 23ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



ภาพที่ 23 mobile phase ระบบที่ 3 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน พบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 24ไม่พบ Spot สารส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry

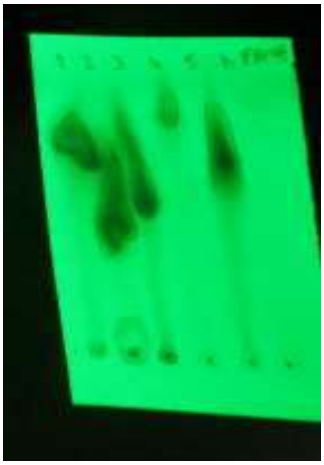
ภาพที่ 24 mobile phase ระบบที่ 3 อ่านผลภายใต้ความร้อน

Mobile Phase ระบบที่ 4 ประกอบด้วย เอทิลอะซิเตท 100 % สารละลาย Anisaldehyde นำอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 25 ไม่พบ spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry

ภาพที่ 25 mobile phase ระบบที่ 4 อ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 26 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



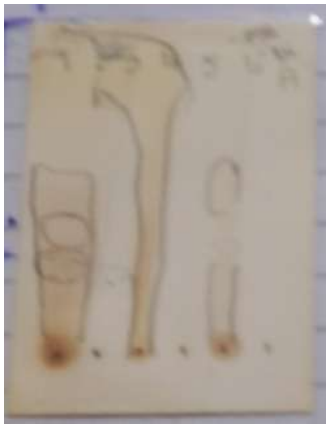
ภาพที่ 26 mobile phase ระบบที่ 4 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน พบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 27 ไม่พบ Spot สารส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze dry

ภาพที่ 27 mobile phase ระบบที่ 4 อ่านผลภายใต้ความร้อน

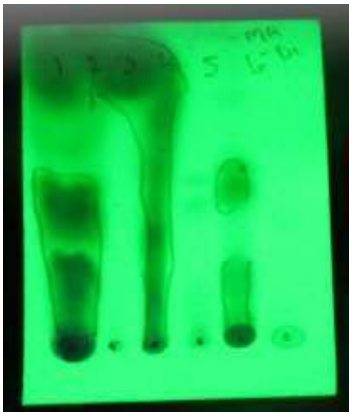
Mobile Phase ระบบที่ 5 ประกอบด้วย เมทานอล:ไดคลอโรมิเทน 50:50 สารละลาย Anisaldehyde นำอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าว ๆ ได้ ดังภาพที่ 28 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเฮกเซน จากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



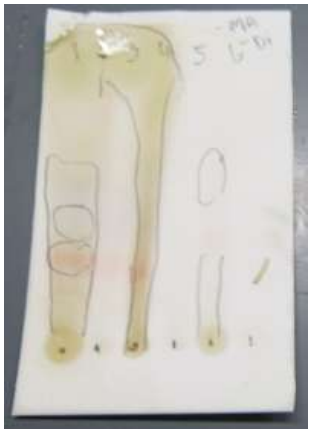
ภาพที่ 28 mobile phase ระบบที่ 5 อ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารใน ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆ ได้ ดังภาพที่ 29 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze dry



ภาพที่ 29 mobile phase ระบบที่ 5 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน พบว่า ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 30 ไม่พบ spot สารในส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



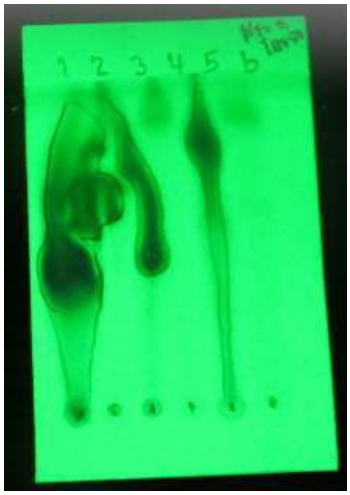
ภาพที่ 30 mobile phase ระบบที่ 5 อ่านผลภายใต้ให้ความร้อนโดยทำปฏิกิริยากับ Anisaldehyde-sulfuric

Mobile Phase ระบบที่ 6 ประกอบด้วย เมทานอล:ไดคลอโรมิเทน 50:50 สารละลาย Anisaldehyde- Sulfuric นำอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อยสามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 31ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry

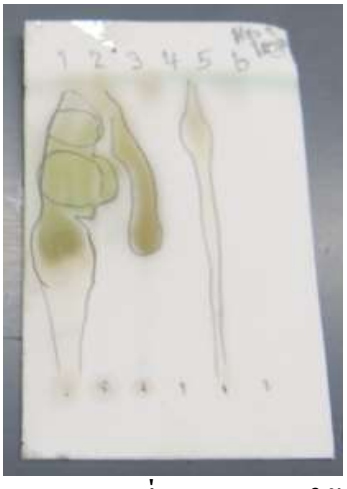
ภาพที่ 31 mobile phase ระบบที่ 6 อ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารใน ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 32 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



ภาพที่ 32 mobile phase ระบบที่ 6 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย ดังภาพที่ 33 ไม่พบ spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



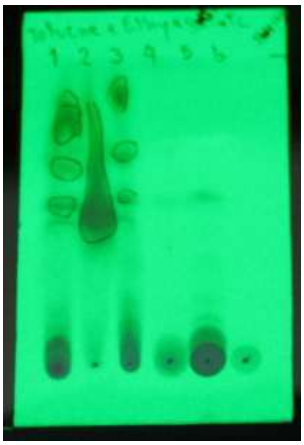
ภาพที่ 33 mobile phase ระบบที่ 6 อ่านผลภายใต้ความร้อน

Mobile Phase ระบบที่ 7 ประกอบด้วย โทลูอิน: เอทิลอะซิเตท 93:7 นำอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 34 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry

ภาพที่ 34 mobile phase ระบบที่ 7 อ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 35 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อยและส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



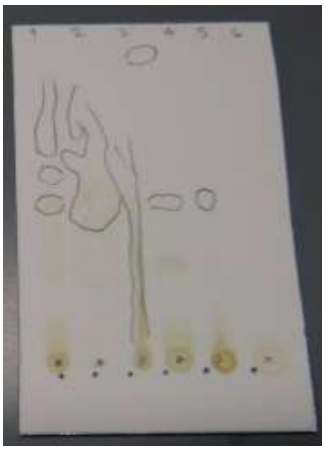
ภาพที่ 35 mobile phase ระบบที่ 7 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

Mobile Phase ระบบที่ 8 ประกอบด้วย โทลูอิน:เอทิลอะซิเตท 93:7 สารละลาย Anisaldehyde นำอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 36 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำ ไป Freeze Dry

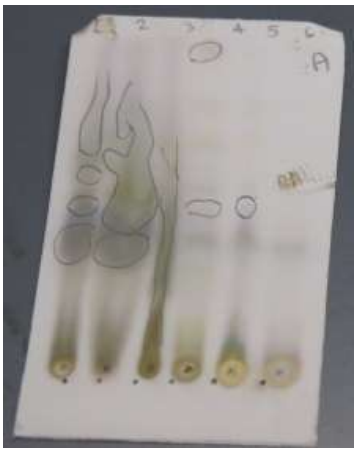
ภาพที่ 36 mobile phase ระบบที่ 8 อ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 37 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



ภาพที่ 37 mobile phase ระบบที่ 8 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน พบว่า ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 38 ไม่พบ Spot สารส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



ภาพที่ 38 mobile phase ระบบที่ 8 อ่านผลภายใต้ความร้อน

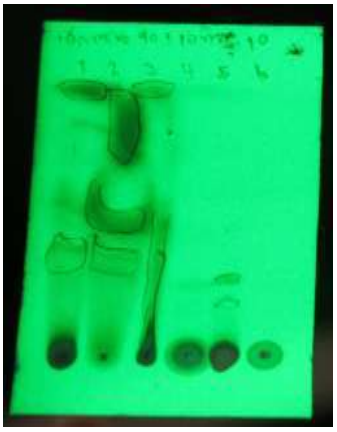
Mobile Phase ระบบที่ 9 ประกอบด้วย เฮกเซน:เอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 90:10 สารละลาย Anisaldehyde นำอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 39 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัด

เอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry

ภาพที่ 39 mobile phase ระบบที่ 9 อ่านผลด้วยตาเปล่า

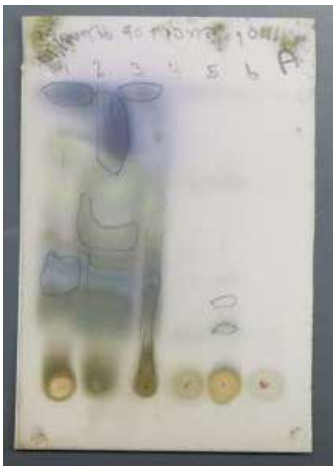
อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 40 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



ภาพที่ 40 mobile phase ระบบที่ 9 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย

สามารถแยกคร่าว ๆได้ ดังภาพที่ 41 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



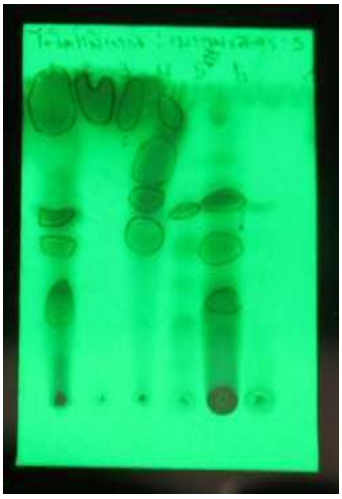
ภาพที่ 41 mobile phase ระบบที่ 9 อ่านผลภายใต้ความร้อน

Mobile Phase ระบบที่ 10 ประกอบด้วย ไดโคโรมิเทน:เมทานอล อัตราส่วน 95:5 สารละลาย Anisaldehyde นำอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 42ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry

ภาพที่ 42 mobile phase ระบบที่ 10 อ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 43 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



ภาพที่ 43 mobile phase ระบบที่ 10 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 44 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry

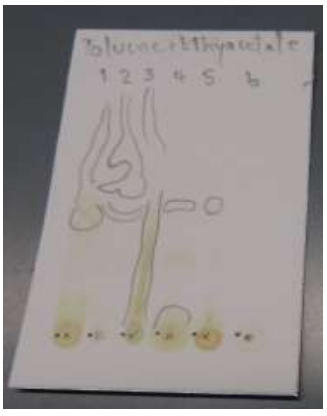
ภาพที่ 44 mobile phase ระบบที่ 10 อ่านผลภายใต้ความร้อน

Mobile Phase ระบบที่ 11 ประกอบด้วยโทลูอิน–เอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 93:7 สารละลายวานีลีน นำอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 45 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry

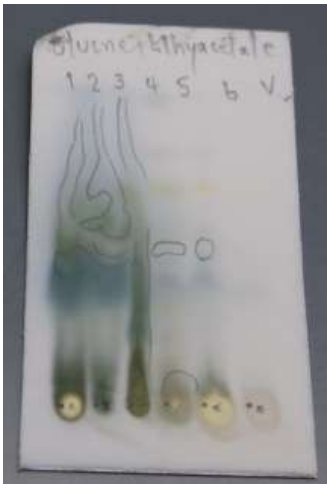
ภาพที่ 45 mobile phase ระบบที่ 11 อ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 46 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



ภาพที่ 46 mobile phase ระบบที่ 11 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผลภายใต้ให้ความร้อนพบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 47 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry



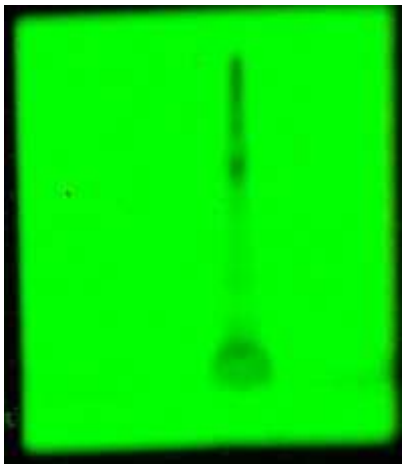
ภาพที่ 47 mobile phase ระบบที่ 11 อ่านผลภายใต้ความร้อน

Mobile Phase ระบบที่ 12 ประกอบด้วย ไดโคโรมิเทน:เมทานอล อัตราส่วน 95:5 โดยแยกสเปรย์กรดซัลฟูริกเอทานอล 5% และตามด้วยสเปรย์น้ำยา Vanillin 1% เอทานอล โดยอบด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆ ได้ ดังภาพที่ 48 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry สารมาตรฐาน Boneol และ Camphor

ภาพที่ 48 mobile phase ระบบที่ 12 อ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 49 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry สารมาตรฐาน Boneol และ Camphor



ภาพที่ 49 mobile phase ระบบที่ 12 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผลภายใต้ให้ความร้อน พบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อยและสารมาตรฐาน คือ Boneol สามารถแยกคร่าวๆได้ ดังภาพที่ 50 ไม่พบ Spot สารส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze dry สารมาตรฐาน คือ Camphor

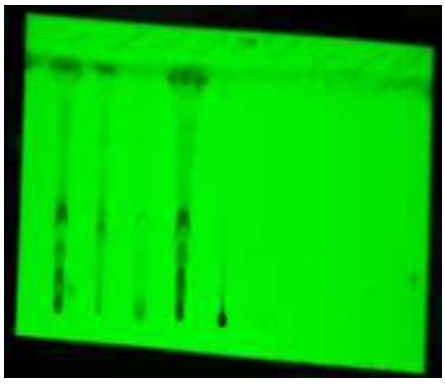
ภาพที่ 50 mobile phase ระบบที่ 12 อ่านผลภายใต้ความร้อน

Mobile Phase ระบบที่ 13 ประกอบด้วย ไดโคโรมิเทน:เมทานอล อัตราส่วน 95:5 โดยแยกสเปรย์กรดซัลฟูริกเอทานอล 5% และตามด้วยสเปรย์น้ำยา Vanillin 1% เอทานอล โดยอบด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

อ่านผลด้วยตาเปล่า พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆ ได้ ดังภาพที่ 51ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดไดโคโรมิเทนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry สารมาตรฐาน Boneol และ Camphor

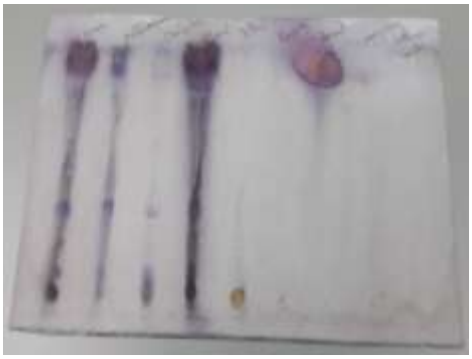
ภาพที่ 51 mobile phase ระบบที่ 13 อ่านผลด้วยตาเปล่า

อ่านผลภายใต้แสงยูวี พบว่า Spot สารในส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดโคโรมิเทน ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อยและส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย สามารถแยกคร่าวๆ ได้ ดังภาพที่ 52 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry สารมาตรฐาน Boneol และ Camphor



ภาพที่ 52 mobile phase ระบบที่ 13 อ่านผลภายใต้แสงยูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

อ่านผลหลังอบให้ความร้อนพบว่าส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดโคโรมิเทน ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อยและสารมาตรฐาน คือ Boneol สามารถแยกคร่าวๆ ได้ ดังภาพที่ 53 ไม่พบ Spot สารในส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry สารมาตรฐาน คือ Camphor

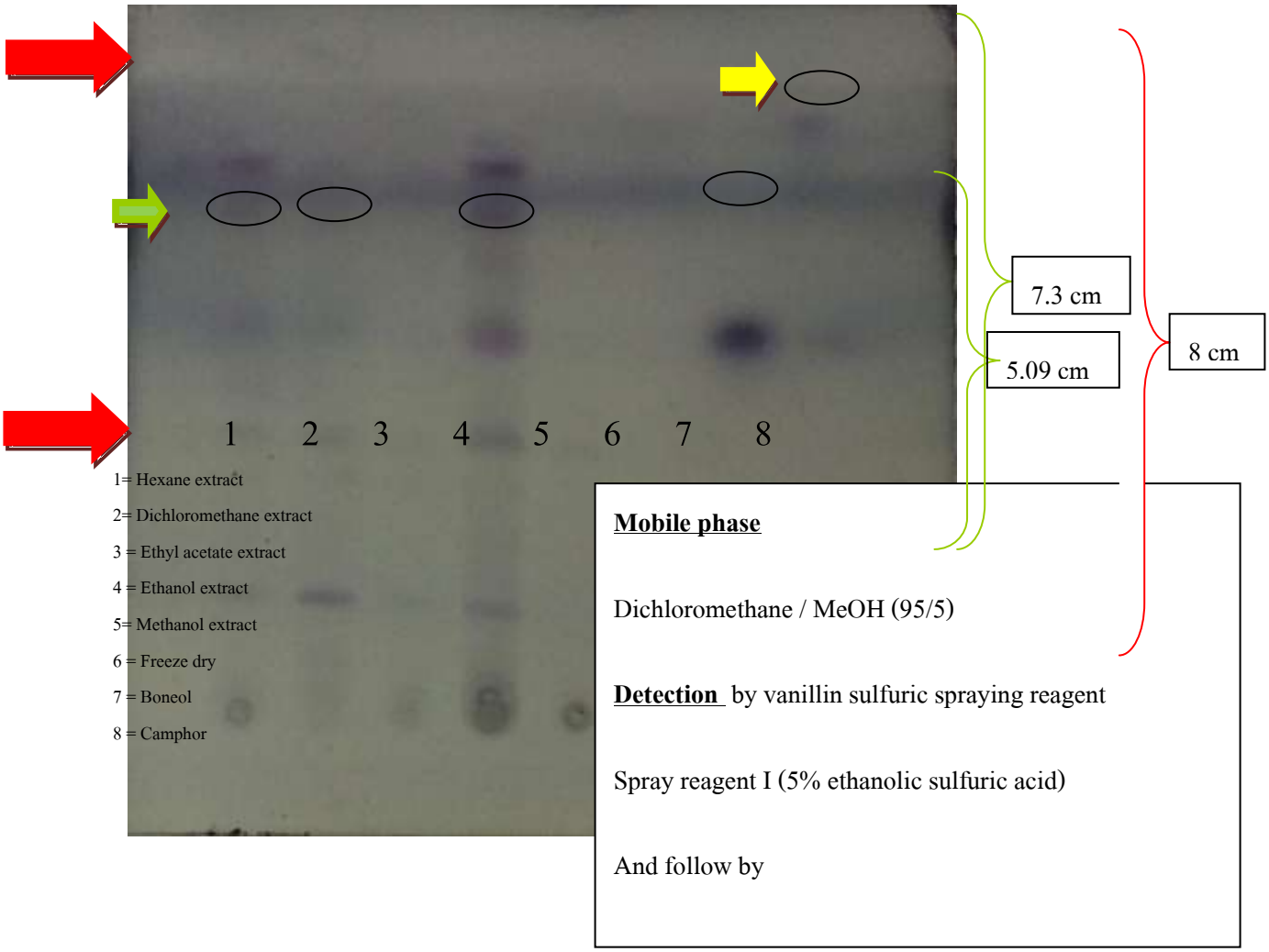


ภาพที่ 53 mobile phase ระบบที่ 13 อ่านผลภายใต้ความร้อน

จากการทดลอง Mobile Phase ทั้งหมด 13 ระบบ พบว่า Mobile Phase ระบบที่ 13 ประกอบด้วย ไดโคโรมิเทน:เมทานอล อัตราส่วน 95:5 โดยแยกสเปรย์กรดซัลฟูริกเอทานอล 5% และตามด้วยสเปรย์น้ำยา Vanillin 1% เอทานอล โดยอบด้วยความร้อน 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน คือ Boneol และ Camphor พบสาร Boneol ในส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อย และส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ดังภาพที่ 54

Boneol ลูกศรเขียว

Camphor ลูกศรเหลือง



ภาพที่ 54 ผลการตรวจสอบส่วนสกัดเร่วน้อยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Boneol และ Comphor

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบเร่วน้อยที่สกัดได้จากทั้งสองวิธีการด้วยวิธี Disc Diffusion และวิธี Broth Microdilution ดังนี้

ผล Disc Diffusion method

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) พบว่าส่วนสกัดที่ให้ Zone มากกว่า 7mm ต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ส่วนสกัดเอทานอล ส่วนสกัดเอธิลอะซีเตต และส่วนสกัด เมทานอล ดังแสดง ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 Inhibition Zone ของส่วนสกัดเร่วน้อยต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้

	บริเวณใสต่อเชื้อแบคทีเรีย (mm)			
	EPEC	**ETEC**	**EIEC**	**EAggEC**
Freeze dry	-	-	-	-
ส่วนสกัดเอทานอล	7.00±0.00 mm	-	7.33±0.58 mm	7.03±0.06 mm
ส่วนสกัดเฮกเซน	-	-	-	-
ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน	-	-	-	-
ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท	7.00±0.00 mm	-	-	-
ส่วนสกัดเมทานอล	-	7.67±1.15 mm	-	-
Norfloxacin (positive control)	26.22±1.49 mm	25.56±2.13 mm	22.00±1.26 mm	29.44±1.96 mm
Ethanol (negative control)	-	-	-	-

หมายเหตุ หมายถึง บริเวณใสน้อยกว่า 7 mm

จากตารางที่ 3 พบว่า Inhibition Zone ของส่วนสกัดเร่วน้อยต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) บริเวณใสต่อเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับ 7.00±0.00 mm Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) บริเวณใสต่อเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับ7.33±0.58 mm Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) บริเวณใสต่อเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับ 7.03±0.06 mm ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) บริเวณใสต่อเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับ 7.00±0.00 mm ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) บริเวณใสต่อเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับ 7.67±1.15 mm Norfloxacin (Positive Control) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) บริเวณใสต่อเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับ 26.22±1.49 mm Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) บริเวณใสต่อเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับ 25.56±2.13 mm Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) บริเวณใสต่อเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับ 22.00±1.26 mm Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) บริเวณใสต่อเชื้อแบคทีเรีย เท่ากับ 29.44±1.96 mm ไม่พบบริเวณใสต่อเชื้อแบคทีเรีย ในส่วนสกัดน้ำจากผลเร่วน้อยซึ่งนำไป Freeze Dry ส่วนสกัดเฮกเซนจากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทนจากผลเร่วน้อยและ Ethanol (Negative Control)

ผล Broth Microdilution Method

เมื่อคัดเลือกเฉพาะสารสกัดเร่วน้อยที่แสดง Inhibition Zone มากกว่าหรือเท่ากับ 7 มิลลิเมตรต่อเชื้อแบคทีเรีย มาหาความไวรับ (Susceptibility) ของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ทุกชนิดโดยวิธี Broth Microdilution ผลปรากฏว่าได้ค่า Minimum Bactericidalconcentration (MBC) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ค่า MBC ของส่วนสกัดหยาบเร่วน้อยต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคในลำไส้(n=5)

	EPEC (g/ml)	ETEC (g/ml)	EIEC(g/ml)	EAggEC(g/ml)
ส่วนสกัดเอทานอล	0.0789-0.3155	-	0.0075-0.0150	0.0789-0.3155
ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท	มากกว่า 0.1737	-	-	-
ส่วนสกัดเมทานอล	-	2.0122-4.0244	-	-
Norfloxacin (positive control)	-	-	-	-

จากตารางที่ 4 พบว่าค่า Minimum Bactericidalconcentration (MBC) ต่อแบคทีเรียที่ก่อโรคในลำไส้ ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เท่ากับ 0.0789-0.3155 g/ml Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เท่ากับ 0.0075-0.0150 g/ml Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) เท่ากับ 0.0789-0.3155 g/ml ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) มากกว่า 0.1737 g/ml ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เท่ากับ 2.0122-4.0244 g/ml

บทที่ 5
สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

การวิจัยเรื่อง ฤทธิ์ต้านเอสเชอริเชีย โคไลที่ก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อย สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะได้ดังนี้

สรุปผลการวิจัย

การนำเสนอสรุปผลการวิจัย ผู้วิจัยเสนอเป็นภาพรวมและข้อสรุปผลการวิจัยที่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยที่ตั้งไว้ ตามลำดับ ดังนี้

1. เพื่อตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญในสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยที่สกัดโดยวิธีต้มเดือดและวิธีการหมัก

1.1. ผลการตรวจสอบกลุ่มสารสำคัญ 7 กลุ่มในส่วนสกัดส่วนต่างๆ จากผลเร่วน้อย พบว่าส่วนสกัดน้ำซึ่งนำไป Freeze Dry พบเทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนินและอัลคาลอยด์ ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย พบเทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน อัลคาลอยด์ ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย พบแทนนิน และส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย พบฟลาโวนอยด์ ซาโปนินและอัลคาลอยด์

1.2 ผลการแยกองค์ประกอบของส่วนสกัดส่วนต่างๆ จากผลเร่วน้อย ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Boneol พบว่าในส่วนสกัดเฮกเซน จากผลเร่วน้อย ส่วนสกัดไดคลอโรมีเทน จากผลเร่วน้อย และส่วนสกัดเอทานอล จากผลเร่วน้อยและสารมาตรฐาน Camphor ไม่พบในส่วนสกัดผลเร่วน้อย

2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบจากผลเร่วน้อยที่สกัดโดยวิธีต้มเดือดและวิธีการหมัก

2.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ แบคทีเรียก่อโรคลำไส้ของส่วนสกัดเร่วน้อยด้วยวิธี Disc Diffusion Method พบว่า ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย แสดง Inhibition Zone ต่อ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. Coli* (ETEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย แสดง inhibition zone ต่อ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย แสดง inhibition zone ต่อ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

2.2 ผลการ Test โดยใช้สถิติ Kruskal Walis Test ในการวิเคราะห์เชิงกลุ่ม พบว่า Inhibition ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อย ต่อเชื้อ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. Coli* (ETEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตทจากผลเร่วน้อย ต่อเชื้อ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อยต่อ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เทียบทุกกลุ่ม เมื่อใช้สถิติ Kruskal Walis Test ผลไม่แตกต่างกัน

2.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดผลเร่วน้อย ด้วยวิธี Broth Microdilution Method พบว่าส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อยมีค่าMBC ต่อเชื้อ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) และ Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC) เป็น 0.0789-0.3155 mg/ml, 0.0075-0.0150 mg/ml และ 0.0789-0.3155mg/ml ตามลำดับ ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท จากผลเร่วน้อย มีค่า MBC ต่อเชื้อ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) มากกว่า 0.1737 mg/ml ส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย มีค่า MBC ต่อเชื้อ Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เท่ากับ 2.0122-4.0244 mg/ml

2.4 ผลการ Test โดยใช้สถิติ Kruskal Walis Test ในการวิเคราะห์เชิงกลุ่ม พบว่า ค่า MBC ส่วนสกัดเอทานอลจากผลเร่วน้อยต่อเชื้อ Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterotoxigenic *E. coli* (*ETEC)* และ *Enteroaggregative E. coli (EAggEC)* ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตท จากผลเร่วน้อย และส่วนสกัดเมทานอลจากผลเร่วน้อย ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เทียบทุกกลุ่ม เมื่อใช้ สถิติ Kruskal Walis Test ผลไม่แตกต่างกัน

อภิปรายผลการวิจัย

จากงานวิจัยของ กฤติกา นรจิตร (2548) ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* และ *Listeria monocytogenes* พบว่าน้ำมันหอมระเหยของ กระชายและเร่วหอม ที่ได้จากการต้มกลั่น สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ทุกชนิด ซึ่งในกระชายมี Borneol Camphor เร่วหอมมี Borneol เป็นส่วนประกอบ สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ที่พบว่ามี Borneol เป็นสารหลักในผลเร่วน้อย ซึ่งส่วนสกัดเร่วน้อยเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ EPEC EIEC EAggEC ส่วนสกัดเร่วน้อยเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ EPEC ส่วนสกัดเร่วน้อยเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ ETEC

จากงานวิจัยของ Jorg Hellmann และคณะ (2001) ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อ *Bacillus cereus, Escherichia coli* และ*Staphylococcus epidermidis* ทำการแยกเป็น 2 compounds พบว่า *Amomum aculeatum* มีผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ซึ่งส่วนสกัดเร่วน้อยเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ EPEC EIEC EAggEC ส่วนสกัดเร่วน้อยเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ EPEC ส่วนสกัดเร่วน้อยเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ ETEC

จากงานวิจัยของ J.Mathew, S. Shiburaj, V.George (2003) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจากเหง้า *Amomum cannicarpum* พบว่าส่วนสกัด ปิโตรเลียมอีเทอร์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli และ Salmonella typhi* และส่วนสกัด เมทานอล ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* และ*Arthrobacter protophormiae* สอด คล้องกับงานวิจัยนี้ ซึ่งส่วนสกัดเร่วน้อยเอทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ EPEC EIEC และ EAggEC ส่วนสกัดเร่วน้อยเอทิลอะซิเตท มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ EPEC ส่วนสกัดเร่วน้อยเมทานอล มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ ETEC

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

1. ควรนำส่วนสกัดเร่วน้อยที่แสดงผลการทดสอบการยับยั้ง การเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคลำไส้ ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในลำไส้ชนิดอื่นๆ ด้วยนอกเหนือจากเชื้อ *E. coli* เช่น เชื้อ *Salmonella* spp., *Vibrio* spp.

2. ควรศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ ของส่วนสกัดเร่วน้อยเพิ่มเติม เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น

บรรณานุกรม

กฤติกา นรจิตร. (2548). **คุณสมบัติของสารสกัดจากพืชวงศ์ขิง: อิทธิพลของวิธีการสกัดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.** วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. (2557). **รายงาน 506 ประจำสัปดาห์ที่ 51 สถานการณ์โรคอุจจาระร่วง (Acute Diarrhea).** ค้นเมื่อวันที่ 15 มิถุนายน 2558. จาก http://www.boe.moph.go.th/files/report/20150106_70733519.pdf

กรมวิชาการ. (2543). **แพทย์ศาสตร์สงเคราะห์:ภูมิปัญญาทางการแพทย์และมรดกทางวรรณกรรมของชาติ.** (พิมพ์ครั้งที่1). กรุงเทพฯ : คุรุสภาลาดพร้าว.

กรมพัฒนาการแพทย์ แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก. (2551). **คู่มือการใช้*สมุนไพรไทย-จีน.*** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ : องค์การทหารผ่านศึกในพระบรมราชูปถัมภ์. ค้นเมื่อวันที่ 20 มิถุนายน 2558. จาก http://www.puriku.com/download/herb/

รุจิลักษณ์ รัตตะรมย์. (2547). **ลักษณะทางเภสัชเวทและองค์ประกอบทางเคมีของผลเร่ว.** วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล สมภพ ประธานธุรารักษ์ วงศ์สถิต ฉั่วกุล จุฑาธิป เขียววงษ์จันทร์. (2555). **สมุนไพรและตำรับยาไทย การเลือกใช้ตามหลักวิชาการ.** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สามลดา.

ประสบอร รินทอง, วัชรินทร์ พากฏิพัทธ์, ปิลันธนา เลิศสถิตธนกรและวนิดา ไทรชมพู. (2557). **การตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาเร่วน้อย (Amomum uliginosum K.D.Koenig) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง Its1 ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ.** วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน.

พรณภา ราญมีชัย. (2551). **การส่งเสริมพฤติกรรมการดูแลตนเองในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร โดยใช้การพยาบาลระบบสนับสนุนและให้ความรู้ โรงพยาบาลอุดรธานี**. รายงานการศึกษาอิสระปริญญา พยาบาลศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการพยาบาลผู้ใหญ่ คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

รุ่งระวี เต็มศิริกุล วงศ์สถิต ฉั่วสกุล ภาณุพงษ์พงษ์ ชีวิน เบญญากาญจน์ พงศ์กิจวิทูรและคณะ (2557). **สมุนไพรและเครื่องยาไทยในยาสามัญประจำบ้าน.** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สามลดา.

ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์และศูนย์สมุนไพรทักษิณ. (2551). **สมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน**. (พิมพ์ครั้งที่ 1) .มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. (2556). **จุลชีววิทยาทางการแพทย์:แบคทีเรียก่อโรค**. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ : จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. (2542). **พจนานุกรมสมุนไพรไทย**. (พิมพ์ครั้งที่ 5). กรุงเทพฯ: รวมสาส์น.

วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, พรทิพย์ พึ่งม่วง, สมหญิง งามอุรุเลิศ, สุมลรัตน์ ชูวงษ์วัฒนะ (2550). **การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแบคทีเรียทางการแพทย์**. (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ : วี.พรินท์ (1991).

ศรินรัตน์ ฉัตรธีระนันท์, วรางคณา สบายใจ และสิริมาส นิยมไทย. (2556). **การทดสอบองค์ประกอบทางพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของใบข่อยดำ.** สาขาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.

สุรเกียรติ อาชานานุภาพ. (2551). **ตำราการตรวจ รักษาโรคทั่วไปเล่ม 2 350 โรคกับการดูแลรักษาและการป้องกัน.** (พิมพ์ครั้งที่4) กรุงเทพฯ : โฮลิสติกพับสิชชิ่ง.

อุดมเดชา พลเยี่ยม. (2556). **การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากมะเดื่อ.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.

Mathew**,** J. Shiburajb, S. Georgea,V.(2003). **Antimicrobial activity of Amomum cannicarpum.** Fitoterapia.

Pawitra Pulbutr ,Wanida Caichompoo, Pilanthana Lertsatitthanakorn, Methin Phadungkitand Sakulrat Rattanakiat . (2012). **Antibacterial Activity, Antimutagenic** Activity and Cytotoxic Effect of an Essential Oil Obtained from Amomum uliginosum K.D. Koenig. Journal of Biological Sciences.

Heilmann**,** J. Brunb,R. Mayra**,** S. Ralic, T. Stichera, O.(2003). **Minor cytotoxic and antibacterial compounds from the rhizomes of Amomum aculeatum.** Phytochemistry.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบเร่วน้อย วิธี Disc Diffusion และวิธี Broth Microdilution

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ของสารสกัดหยาบเร่วน้อย วิธี Disc Diffusion และวิธี Broth Microdilution

Disc diffusion method Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เอทานอล ครั้งที่ 1

Disc diffusion method Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เอทานอล ครั้งที่ 2

Disc diffusion method Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เอทานอล ครั้งที่ 3

Disc diffusion method Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เอทิลอะซิเตท ครั้งที่ 1

Disc diffusion method Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เอทิลอะซิเตท ครั้งที่ 2

Disc diffusion method Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เอทิลอะซิเตท ครั้งที่ 3

Disc diffusion method Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เมทานอล ครั้งที่ 1

Disc diffusion method Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เมทานอล ครั้งที่ 2

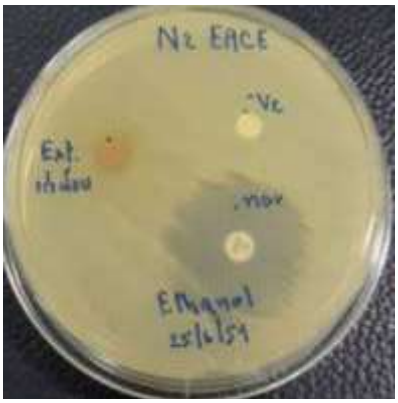
Disc diffusion method Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เมทานอล ครั้งที่ 3

Disc diffusion method Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เอทานอล ครั้งที่ 1

Disc diffusion method Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เอทานอล ครั้งที่ 2

Disc diffusion method Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เอทานอล ครั้งที่ 3

Disc diffusion method Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) เอทานอล ครั้งที่ 1

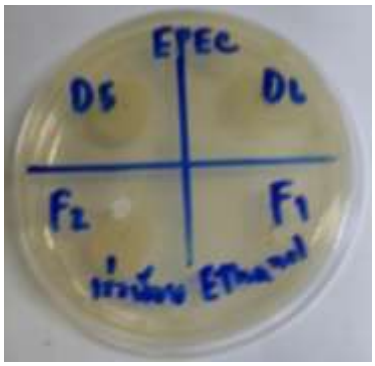


Disc diffusion method Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) เอทานอล ครั้งที่ 2

Disc diffusion method Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) เอทานอล ครั้งที่ 3

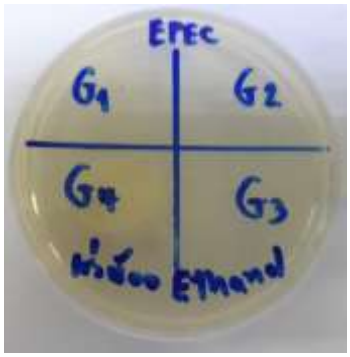
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เอทานอล



การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เอทานอล

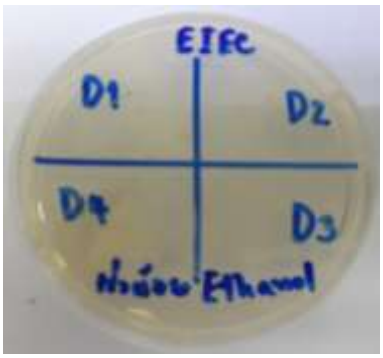


การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เอทานอล

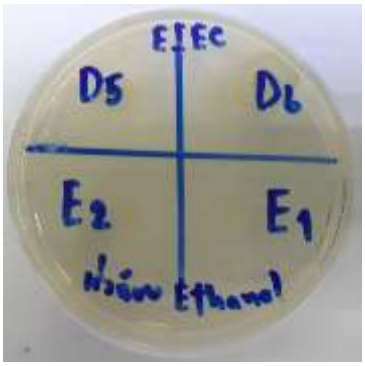
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เอทานอล



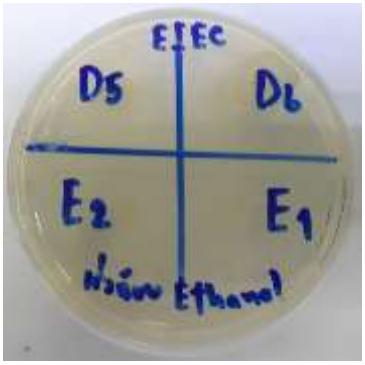
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เอทานอล



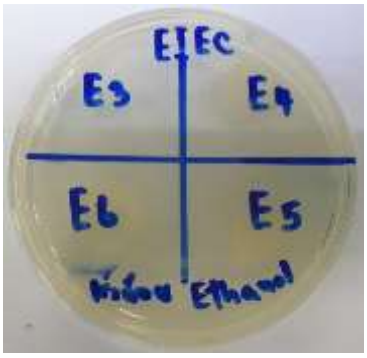
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เอทานอล



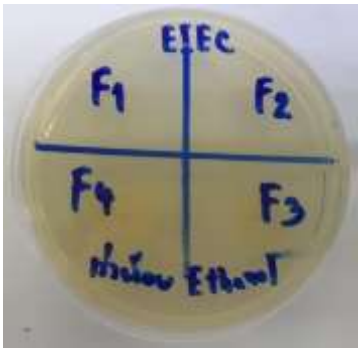
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เอทานอล



การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เอทานอล

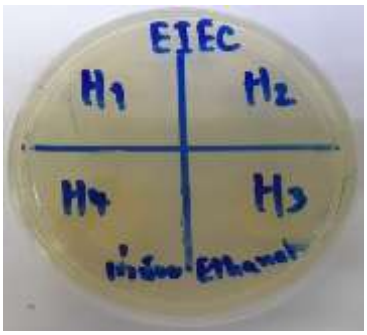


การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เอทานอล

การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เอทานอล



การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) เอทานอล

การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) เอทานอล

ผลการทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

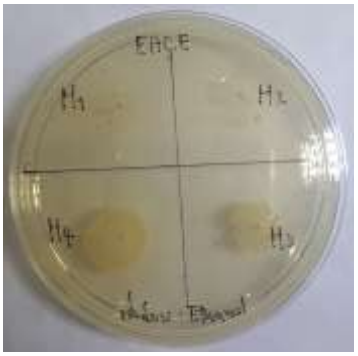
Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) เอทานอล

การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) เอทานอล

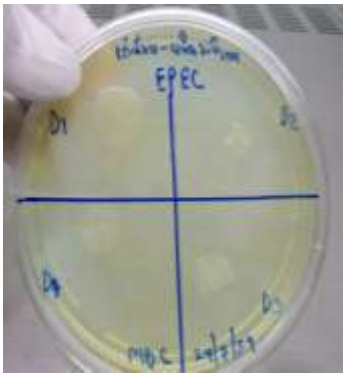
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) เอทานอล



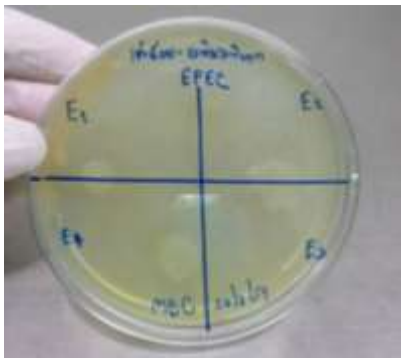
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

Enteroaggregative *E.coli* (EAggEC) เอทานอล



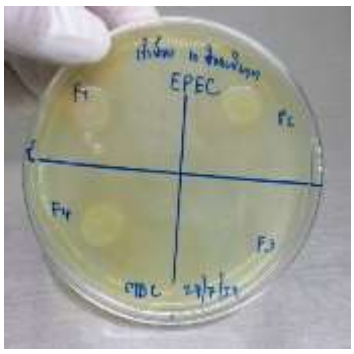
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

การทดสอบเชื้อ Enteropathogenic *E. Coli* (EPEC) เอทิลอะซิเตท



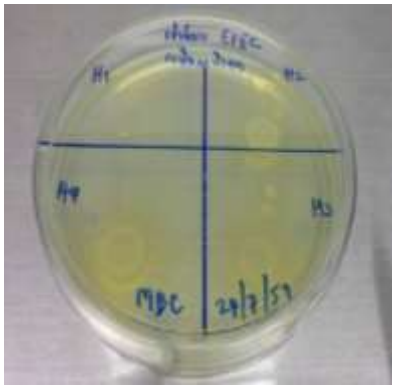
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

การทดสอบเชื้อ Enteropathogenic *E. Coli* (EPEC) เอทิลอะซิเตท

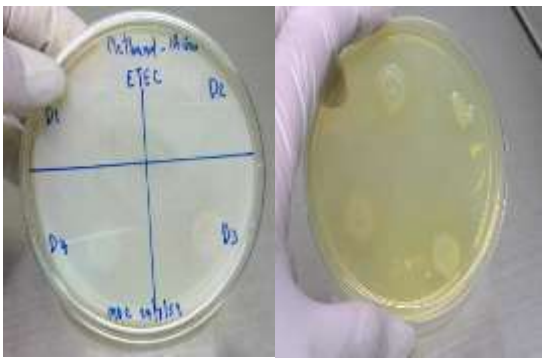


การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC
การทดสอบเชื้อ Enteropathogenic *E. Coli* (EPEC) เอทิลอะซิเตท

การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC
การทดสอบเชื้อ Enteropathogenic *E. Coli* (EPEC) เอทิลอะซิเตท



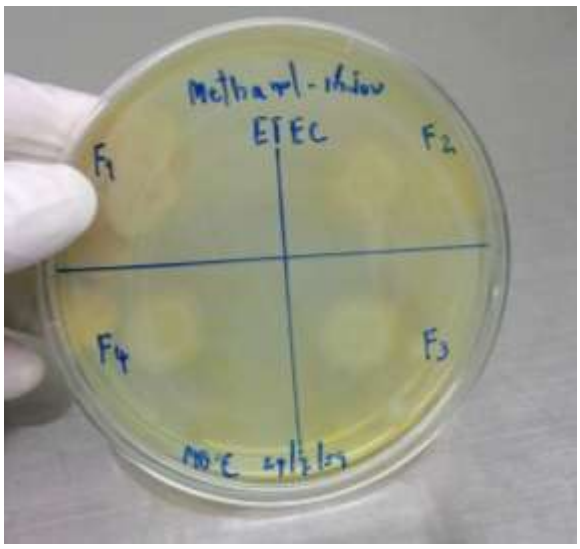
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC
การทดสอบเชื้อ Enteropathogenic *E. Coli* (EPEC) เอทิลอะซิเตท



การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC
การทดสอบเชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เมทานอล

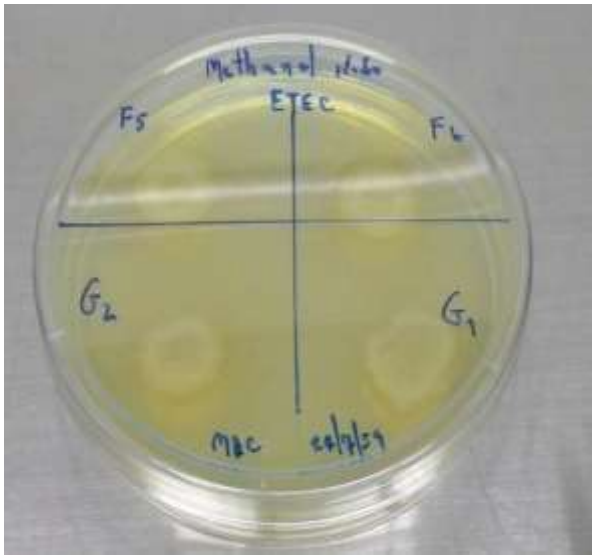
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC
การทดสอบเชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เมทานอล

การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC
การทดสอบเชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เมทานอล



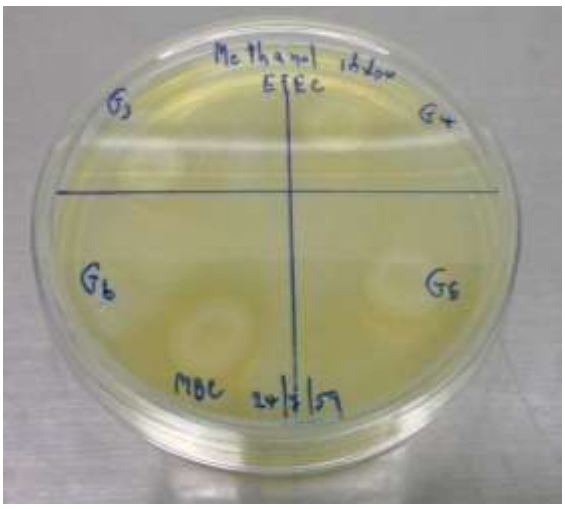
การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

การทดสอบเชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เมทานอล

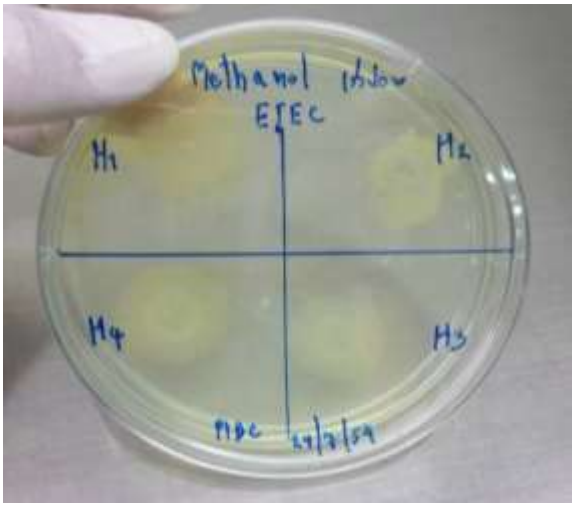


การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC

การทดสอบเชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เมทานอล



การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC
การทดสอบเชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เมทานอล

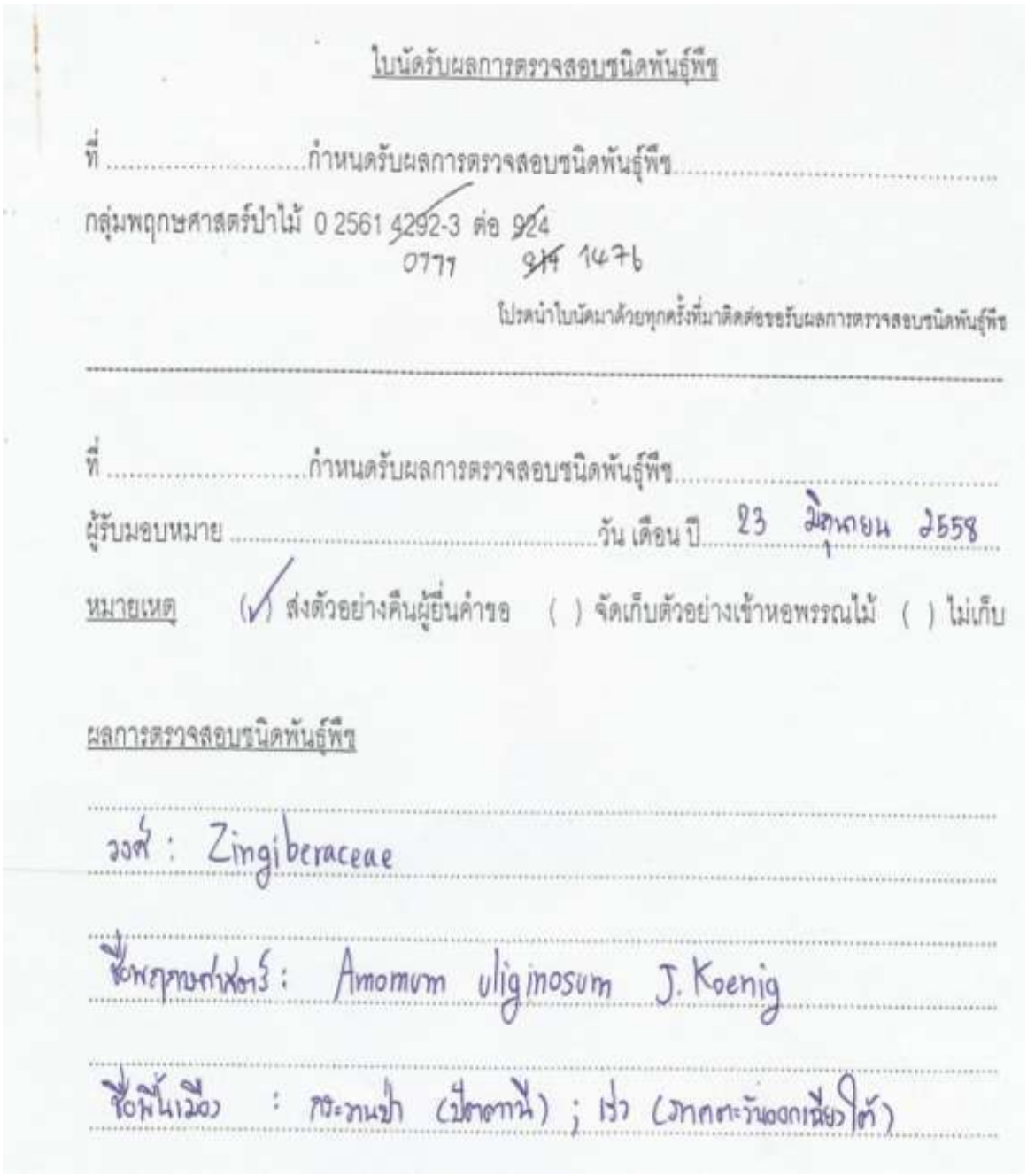


การทดลอง Minimal bactericidal concentration; MBC
การทดสอบเชื้อ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) เมทานอล

ภาคผนวก ข

ผลการตรวจสอบชนิดพันธุ์พืช

ใบนัดรับผลการตรวจสอบชนิดพันธุ์พืช



ใบนัดรับผลการตรวจสอบชนิดพันธุ์พืช

ที่ .....กำหนดรับผลการตรวจสอบชนิดพันธุ์พืช.....

กลุ่มพฤกษศาสตร์ป่าไม้ 0 2561 4292-3 ต่อ ~~924~~ 0771 ~~814~~ 1476

โปรดนำใบนัดมาด้วยทุกครั้งที่มาติดต่อขอรับผลการตรวจสอบชนิดพันธุ์พืช

.....

ที่ .....กำหนดรับผลการตรวจสอบชนิดพันธุ์พืช.....

ผู้รับมอบหมาย .....วัน เดือน ปี 23 มิถุนายน 2558

หมายเหตุ (✓) ส่งตัวอย่างคืนผู้ยื่นคำขอ ( ) จัดเก็บตัวอย่างเข้าหอพรรณไม้ ( ) ไม่เก็บ

ผลการตรวจสอบชนิดพันธุ์พืช

.....

วงศ์ : Zingiberaceae

.....

ชื่อพฤกษศาสตร์ : Amomum uliginosum J. Koenig

.....

ชื่อพื้นเมือง : กระวานป่า (ปัตตานี) ; เร่ว (ภาคตะวันออกเฉียงใต้)

ภาคผนวก ค
หนังสือตอบรับลงบทความ

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Khon Kaen University
Muang District, Khon Kaen 40002, THAILAND
Tel/Fax. +66 (0)43-362093 pharm.kku.ac.th

The Second International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2017 (HTM 2017)
"Value-Added of Herbs and Phytotherapy: Challenges for The 21st Century"
25-27 January 2017 at Asia Hotel, Bangkok, Thailand.

January 5, 2017

Dear Assistant Professor Dr. Pilanthana Lertsatitthanakorn,

We are pleased to inform you that your full paper titled "Antibacterial Activity Against Enteric Pathogens of Crude Extracts from *Amomum uliginosum* J. Koenig fruits " has been accepted for poster presentation during The Second International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2017 (HTM 2017), "Value-Added of Herbs and Phytotherapy: Challenges for The 21st Century" 25-27 January 2017 at Asia Hotel, Bangkok, Thailand. Further details for poster presentation, please see the conference website http://www.htm2017.com.

We look forward to seeing your presentation and thank you for your contribution.

Yours sincerely,

Natsajee Nualkaew

Assist. Prof. Dr. Natsajee Nualkaew
Editorial Board
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen,
Thailand 40002
E-mail: nnatsa@kku.ac.th

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวธนัฏนัณ อนันตศิริสถาพร
วัน เดือน ปีเกิด	23 มิถุนายน พ.ศ. 2506
สถานที่เกิด	1/6 ถนนวุฒากาศ แขวงบางค้อ เขตจอมทอง
	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	
ระดับปริญญาตรี	แพทย์แผนไทยบัณฑิต มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช
	นิเทศศาสตรศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช
	รัฐประศาสนศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช
ใบประกอบโรคศิลปะ	ประเภทเวชกรรมไทย
	ประเภทเภสัชกรรมไทย
	ประเภทการผดุงครรภ์ไทย