



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ
พฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านเชื้อซาลโมเนลลา
ของผลสุกพิลังกาสง

**Phytochemistry and anti-*Salmonella* activity of
the ripe fruits of *Ardisia elliptica***

โดย นายเมธีน ผดุงกิจ

กรกฎาคม 2546



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ
พฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านเชื้อซาลโมเนลลา
ของผลสุกพิลังกาสา

**Phytochemistry and anti-*Salmonella* activity of
the ripe fruits of *Ardisia elliptica***

โดย นายเมธิน ผดุงกิจ

กรกฎาคม 2546

สัญญาเลขที่ HERB30233/2545

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ พฤษเคมีและฤทธิ์ต้านเชื้อซาลโมเนลลา
ของผลสุกพิลังกาสา

Phytochemistry and anti-*Salmonella* activity of
the ripe fruits of *Ardisia elliptica*

ผู้วิจัย

นายเมธิน ผดุงกิจ นักศึกษาปริญญาเอก คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

อาจารย์ที่ปรึกษา

รศ. ดร. อัมมบุญ ล้วนรัตน์	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. ดร. ปรีมเจניים มุ่งการดี	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. น.สพ. ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ชุดโครงการการใช้ประโยชน์สมุนไพรในสัตว์

ชื่อเรื่อง

พฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านเชื้อซาลโมเนลลาของผลสุกพื้งกาสา

ผู้วิจัย

นายเมธิน ผดุงกิจ

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาด้านพฤกษเคมีและฤทธิ์ต้านเชื้อซาลโมเนลลาของสารสกัดจากผลสุกพื้งกาสา (*Ardisia elliptica* Thunb.) โดยได้แบ่งการทดลองเป็นสองส่วนคือ ด้านพฤกษเคมีโดยศึกษาถึงผลการสกัดสารจากผลสุกของพื้งกาสาโดยใช้ตัวทำละลายต่างกัน ผลการวิจัยพบว่า 95 % ethanol เป็นตัวทำละลายที่ให้สารสกัดมีปริมาณมากที่สุดและแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อซาลโมเนลลาโดยการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion method ส่วนการศึกษาด้านฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพื้งกาสา ได้ทดสอบความไวของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่เป็นส่วนประกอบหลักของผลสุกพื้งกาสา ด้วยวิธี broth dilution method ซึ่งพบว่า สารสกัดด้วยตัวทำละลายต่างๆ ให้ค่า MIC ในช่วง 2-4 mg/ml ส่วนสารบริสุทธิ์ให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.03- 0.50 mg/ml โดยสารที่ออกฤทธิ์ดีที่สุดคือ quercetin นอกจากนี้ได้นำสารสกัดด้วย ethanol ไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella Enteritidis* ในไก่เนื้อ โดยใช้ไก่อายุ 28 วัน จำนวน 45 ตัว ใช้แผนการทดลองแบบกลุ่มทดลอง โดยแบ่งไก่เป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัว และทำการป้อนเชื้อดังกล่าวด้วย 1×10^8 cfu ในไก่ทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่มสุดท้าย กลุ่มแรกให้สารสกัดผสมลงในอาหาร ในความเข้มข้น 4 เท่าของ MIC (16 กรัมต่อกิโลกรัมของอาหาร) กลุ่มที่ 2 ให้ สารสกัดโดยบรรจุแคปซูล 200 mg ต่อแคปซูล โดยจับป้อน 9 แคปซูลต่อตัวต่อวัน (1.8 กรัมต่อตัวต่อวัน) กลุ่มที่ 3 ไม่ให้ยาหรือสารสกัดใดๆ กลุ่มที่ 4 ให้ยาปฏิชีวนะ enrofloxacin ผสมในน้ำ ขนาด 50 ppm กลุ่มที่ 5 ไม่ให้ยาหรือสารสกัดใด ๆ ทำการทดสอบเป็นเวลา 7 วัน พบว่าไก่ในกลุ่ม 3 ตายไป 1 ตัว นำกระเพาะพักและไส้ตันของทุกตัวไปตรวจนับจำนวนเชื้อซาลโมเนลลาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม จากการศึกษาพบว่ากลุ่มแรกตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา จำนวน 0.31 ± 0.53 และ 0.59 ± 0.56 ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มที่สอง ซึ่งตรวจพบเชื้อจำนวน 3.51 ± 1.69 และ 9.13 ± 2.38 และกลุ่มที่สามซึ่งตรวจพบเชื้อ 13.16 ± 3.47 และ 39.82 ± 4.69 โคโลนีที่นับได้เป็นกรัมของกระเพาะพักและไส้ตันตามลำดับ โดยกลุ่มที่ 4 ที่ได้ยา enrofloxacin และกลุ่มที่ 5 ที่ไม่ได้ป้อนเชื้อซึ่งตรวจไม่พบเชื้อซาลโมเนลลาทั้งสองกลุ่ม และจากการทดสอบทางสถิติพบว่าจำนวนเชื้อในกลุ่มที่ 1-3 มีจำนวนเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยที่จำนวนโคโลนีที่ตรวจพบในกลุ่ม 1 มีจำนวนน้อยกว่าที่ตรวจพบในกลุ่ม 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังได้ตรวจหาสารตกค้างในเนื้อไก่ที่ให้สารสกัดพื้งกาสาโดยตรวจหา syringic acid ซึ่งเป็นสารหลักของสารสกัด ด้วยเครื่อง HPTLC พบว่า กลุ่มแรกพบ syringic acid ตกค้างที่ความเข้มข้น 73.20 ± 12.42 ppb กลุ่มที่ 2 ตรวจพบ syringic acid น้อยกว่า 45 ppb จากผลการศึกษาค้น

นี่พอจะสรุปได้ว่า สารสกัดจากผลสุกพื้ลังกาสามีสักยภาพที่จะนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อเติมลงในอาหารสำหรับลดจำนวนเชื้อซาลโมเนลลาในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกต่อไป

Title Phytochemistry and anti-*Salmonella* activity of the ripe fruits of *Ardisia elliptica*
Author Methin Phadungkit

Abstract

This experiment was designed, by dividing into two parts, to investigate in phytochemistry and anti-*Salmonella* activity of the extracts from the ripe fruits of *Ardisia elliptica* Thunb. The former part was aimed to study the effects of different solvents to be used in the extraction of the fruits of *Ardisia elliptica* Thunb. The results demonstrated that the ethanolic extract gave highest yield and was active against *Salmonella* spp. tested by disk diffusion method. The latter part was designed to study the biological activity of the ethanolic extract. In this experiment, the extracts and the main pure compounds isolated from the fruit extracts were tested for susceptibility against *Salmonella enteritidis* by broth dilution method. The results showed that the extracts gave the MIC values ranged from 2-4 mg/ml while the pure compounds gave 0.03-0.50 mg/ml. The most active compound against *Salmonella* was quercetin. The activity of the ethanolic extract against *Salmonella enteritidis in vivo* was also performed. The 28-day-old 45 broiler chickens were divided into five groups by completely randomized design. Each group consisted of 3 replicates with 3 chickens per replication. The experimental animals were treated as follows: Each chicken was challenged with 1×10^8 cfu of *Salmonella enteritidis* except the fifth group. The first group was fed with diet previously mixed with the ethanolic extract at the concentration of 4 MIC (16 g/ kg feed). The second group was enforced with 9 capsules containing 200 mg extract per capsule (1.8 g/day/chicken). The third group was a control group, both the extract and antibiotic was not given. The fourth group, positive control group, was given with enrofloxacin solution at a concentration of 50 ppm. The fifth group was a healthy control group which *Salmonella* was not challenged. After 7 day of treatment, a chicken in the third group was dead. All chickens were killed and the crops and caeca were removed. Each crop and caecum with its content was subjected to enumerate on *Salmonella* recovering colonies. The results demonstrated that the number of *Salmonella* colonies from crops and caeca were as follows :
The first group: 0.31 ± 0.53 and 0.59 ± 0.56 , the second group : 3.51 ± 1.69 and 9.13 ± 2.38 , the third group : 13.16 ± 3.47 and 39.82 ± 4.69 colonies per g of crop and caecum, respectively. Nevertheless, no *Salmonella* colony was detected in the fourth and the fifth group. The results also indicated that

the number of *Salmonella* colonies of the first and the second group was decreased significantly when compared with the control group ($P < 0.05$). The first group also contained significantly less *Salmonella* colonies than the second group ($P < 0.05$). In addition to this, the residue of the extract in chicken meat was also studied in the form of syringic acid by HPTLC. The results showed that very low residue i.e. syringic acid was detected in the concentration of 73.20 ± 12.42 ppb in the first group and less than 45 ppb in the second group. From the above results, it could be concluded that the ethanolic extract from the ripe fruits of *A. elliptica* Thunb. has high potential for further development as a feed additive for *Salmonella* decontamination in poultry industry.

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	5
3 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	17
4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	34
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก	39

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ซาลโมเนลลา (*Salmonella*) เป็นแบคทีเรียกรัมลบรูปแท่งซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ทั้งในสัตว์และมนุษย์ (6) *Salmonella* พบได้ทั่วไปในทางเดินอาหารของสัตว์หลายชนิดเช่น วัว ควาย หมู สัตว์เลี้ยงต่างๆ รวมทั้งสัตว์ปีก และสามารถติดต่อมายังคนได้โดยการบริโภคอาหารที่ปรุงไม่สุก ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่า เชื้อ *Salmonella* ซีโรวาร์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) คือ *Salmonella* Typhimurium และ *Salmonella* Enteritidis (16) และการบริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกที่ปรุงไม่สุก เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มีการติดต่อของโรคจากสัตว์สู่คนได้

สำหรับในประเทศไทย พบว่าโรคที่เกิดจากเชื้อซาลโมเนลลา (*Salmonellosis*) ยังคงเป็นปัญหาสำคัญในด้านสาธารณสุขและอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีก จากการรายงานของ WHO Nation *Salmonella* and *Shigella* Center พบว่า อุบัติการณ์ของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่แยกได้จากผู้ป่วยเพิ่มขึ้นเป็น 1.33, 2.98, 9.54 and 16.98% ในปี ค.ศ. 1990, 1991, 1992 และ 1993 ตามลำดับ และจากรายงานนี้ยังพบว่า การติดเชื้อ *Salmonella* มาจากการบริโภคผลิตภัณฑ์จากไก่มากกว่าแหล่งอื่นเช่น ไข่และผลิตภัณฑ์จากไก่อื่นๆ(15) จากรายการศึกษพบว่า ซีโรวาร์ที่พบบ่อยที่แยกได้จากคนและเนื้อไก่แช่แข็งในประเทศไทยในปี ค.ศ. 1999-2000 ได้แก่ *S. Weltevreden* and *S. Virchow* (8) นอกจากนี้ยังพบว่าจากการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* จากเนื้อไก่ที่ซื้อจากตลาดสด พบการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ถึง 72 % และจากโรงเชือดสำหรับการส่งออกพบ 10 % ของตัวอย่าง และซีโรวาร์ ที่พบบ่อยได้แก่ *S. Weltevreden*, *S. Muenchen* และ *S. Blockley* (16) นอกจากนี้จากรายงานของสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ (NIAH) ได้ตรวจซากไก่ที่ส่งตรวจจากฟาร์มในเขตภาคกลางของไทย พบว่า ไก่เนื้อติดเชื้อ *Salmonella* 7 % อัตราการตาย 1.7 % เป็ดติดเชื้อ *Salmonella* 13.6 % อัตราการตาย 11.7 % (11) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ประเทศไทยมีมาตรการที่ควบคุมเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์โดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกำหนดไว้ว่าจะต้องตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่าง 25 กรัม (27)

ปัจจุบันมีนักวิจัยหลายท่าน พยายามที่จะศึกษาเพื่อค้นหาวิธีการที่จะป้องกันการปนเปื้อนเชื้อซาลโมเนลลาในเนื้อสัตว์ปีก มีผู้รู้บางท่านเสนอว่าการควบคุมเชื้อซาลโมเนลลาในการผลิตสัตว์ควรที่จะเริ่มต้นจากขั้นตอนแรกในการผลิตเลย เช่นการผสมสารที่ยับยั้งเชื้อในอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์เหล่านั้น อย่างไรก็ตาม สารที่เติมลงไปไม่ควรที่จะเป็นยาปฏิชีวนะ ซึ่งจะก่อปัญหาเรื่องเชื้อดื้อยาและสารตกค้าง

ในเนื้อสัตว์เหล่านั้น นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามที่จะพยายามหาสารจากธรรมชาติมาเพื่อใช้ในการดังกล่าว

จากรายงานสารและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Salmonella* เช่น สารจำพวกกรดอินทรีย์ ได้แก่ lactic acid, citric acid และ propionic acid สารกลุ่ม saponins, grapefruit seed extracts capsaicin และสารกลุ่ม flavonoids ซึ่งได้แก่ quercetin, morin, galangin, kaempferol และ myricetin (9, 12, 13, 15, 22, 25, 27, 29)

ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อน อุดมไปด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ มีพันธุ์ไม้รวมทั้งพืชสมุนไพรหลากหลายชนิด ในทางการแพทย์แผนไทย สมุนไพรที่มีสรรพคุณแก้ท้องเสียหลายชนิดที่มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคท้องเสีย เช่น *Salmonella* โดยพื้งกาสาเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ดังกล่าว และปลูกได้ง่ายในประเทศไทย โดยลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพื้งกาสาพบว่าเป็นไม้พุ่มหรือต้นไม้เล็ก(รูป 5) สูงประมาณ 1-4 เมตร อยู่ในวงศ์ Myrsinaceae (17) พบมากในทางตอนใต้ของประเทศไทย และยังพบได้ในหลายประเทศ เช่น อินเดีย กัมพูชา แอลเบเนีย และอินโดนีเซีย ในการแพทย์พื้นบ้านใช้ผลสุกต้มน้ำเพื่อรักษาอาการท้องเสียที่มีไข้ (3) จากการศึกษาด้านพิษวิทยาพบว่าจากการทดสอบพิษเฉียบพลันในหนู mice โดยการให้สารสกัดจากผลสุกของพื้งกาสาในความเข้มข้น 10 g/kg ทางปากและฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ไม่พบสิ่งผิดปกติแต่อย่างใด (4) อนึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพโดยการทดสอบสารสกัดจากผลสุกพื้งกาสด้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคท้องเสียในคนพบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อ *Shigella* และ *Salmonella* ได้ (19) จากการศึกษาทางพฤกษเคมีของสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* ในผลสุกพื้งกาสาของผู้วิจัยเอง พบว่าสารสำคัญ คือ syringic acid, demethoxybergenin, norbergenin และ quercetin (18,24) ดังนั้นผู้วิจัยจึงคิดว่า น่าจะนำสารสกัดพื้งกาสา มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* ที่พบบ่อยในสัตว์ เช่น สัตว์ปีก โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อ โดยนำสารสกัดจากผลสุกของต้นดังกล่าวมาผสมกับอาหารที่ใช้เลี้ยงตามปกติในระยะก่อนเชือด เพื่อดูประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* ในทางเดินอาหารของไก่ อีกทั้งจะทดสอบหาการตกค้างที่เป็นสารหลักจากผลสุกที่อาจพบในเนื้อไก่อีกด้วย หากการทดลองนี้สำเร็จก็จะสามารถประยุกต์ใช้สมุนไพรในอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อต่อไป

วัตถุประสงค์ทั่วไป

1. วัตถุประสงค์ทั่วไป

เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อ *Salmonella* สารสกัดจากผลสุกพื้งกาสา ทั้งในหลอดทดลอง และในสัตว์ทดลอง

2. วัตถุประสงค์เฉพาะ

2.1 ด้านพิษวิทยาเคมี

2.1.1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากผลสุกพื้งกาสาโดยใช้เครื่องสกัด Soxhlet และการสกัดด้วยวิธี liquid-liquid extraction โดยใช้ตัวทำละลายแตกต่างกัน

2.1 ด้านฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.1.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* ของสารสกัดจากผลสุกของ พื้งกาสา ด้วยวิธี disk diffusion method และหาค่า Minimum inhibitory concentration (MIC) ของสาร ที่ออกฤทธิ์ ด้วยวิธี broth dilution

2.1.2 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านเชื้อ *Salmonella* ของสารสกัดของ ผลสุกพื้งกาสาในกระเพาะพักและไส้ตันของไก่เนื้อ

2.1.3 เพื่อศึกษาถึงผลของสารตกค้างเมื่อให้สารสกัดจากผลสุกพื้งกาสาใน เนื้อไก่

สมมุติฐานของการวิจัย

การศึกษากฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* ในไก่เนื้อ

เมื่อให้สารด้านเชื้อ *Salmonella* ต่างกัน มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* แตกต่างกัน

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ผลจากการวิจัยถ้าพบว่าได้ผลดี สามารถนำไปพัฒนาเป็นสารที่เติมลงไปในการอาหารของไก่เนื้อ เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ในอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อ

ขอบเขตของการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่าง คือ ผลสุกของพื้งกาสา (*Ardisia elliptica* Thunb.) เก็บในเดือนพฤศจิกายน 2545 ณ สวนสมุนไพรสิริรุกษชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จ.นครปฐม

2. ตัวแปรที่ศึกษา

การศึกษากฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* ในไก่เนื้อ

2.1 ตัวแปรอิสระมี 3 ชนิด ได้แก่

สารสกัดพิลังกาสพผสมลงในอาหารเลี้ยงไก่

สารสกัดพิลังกาสพบรรจุในแคปซูล

ยาปฏิชีวนะ enrofloxacin

2.1 ตัวแปรตามมี 1 ชนิด ได้แก่ การยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Enteritidis แสดงผลเป็นจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* ที่ตรวจพบจากตัวอย่าง ถ้าตรวจพบจำนวนโคโลนีของเชื้อมากแสดงว่าผลในการยับยั้งเชื่อน้อย

ระยะเวลาและสถานที่ทำการวิจัย

ระยะเวลาศึกษาทั้งหมดเป็นเวลา 13 เดือน ตั้งแต่ เดือน กรกฎาคม 2545 - กรกฎาคม 2546

ศึกษาด้านพิษวิทยาและฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* ในหลอดทดลอง ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ทดสอบในไก่ที่บริษัทสหฟาร์มจำกัด อ.ไชยบาดาล จ. ลพบุรี ในเดือน เมษายน 2546

ตรวจหาสารตกค้างที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ผลจากการวิจัยถ้าพบว่าได้ผลดี สามารถนำไปพัฒนาเป็นสารที่เติมลงไปในการอาหารของไก่เนื้อ เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ในอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อ

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

ผู้วิจัยได้แบ่งตามหัวข้อที่ศึกษาดังนี้

1. การศึกษาด้านพฤกษเคมี
2. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ
 - 2.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* ในหลอดทดลอง
 - 2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* ในไก่เนื้อ
 - 2.3 การตรวจหาสารตกค้างในเนื้อไก่

การศึกษาด้านพฤกษเคมี

การสกัดสมุนไพร

1. ตัวอย่างพืช

เก็บผลสุกพื้งกาสา (*Ardisia elliptica* Thunb.) ที่สวนสิริรุกษชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

จนครปฐม เมื่อเดือนธันวาคม 2545

2. ตัวทำละลาย

Petroleum ether, AR	(Merck, Germany)
Chloroform, AR	(Merck, Germany)
Methanol, AR	(Merck, Germany)
95 % Ethanol, commercial grade	(The Excise Department, Ministry of Finance, Thailand)
Butanol, AR	(Merck, Germany)
Hexane, AR	(Merck, Germany)
Ethyl acetate, AR	(Merck, Germany)
Water, distilled	

3. Spray reagents

10 % Sulfuric acid in ethanol for general detection

2 % Ferric chloride in ethanol for phenolic compound detection

4. สารอ้างอิงอ้างอิงมาตรฐาน (Reference standard)

Syringic acid (Fluka, Switzerland)

Ampicillin (Fluka, Switzerland)

5. วัสดุทาง Chromatography

Silica gel 60 F₂₅₄, pre-coated on TLC aluminium sheets 20 x 20 cm, layer thickness 0.25 cm, Merck, Germany

7. อุปกรณ์อื่น ๆ

ชุดสกัด Soxhlet apparatus

Rotary evaporator

Hot air oven

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella*

1. เชื้อที่ใช้ทดสอบ

ใช้เชื้อมาตรฐานจาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้แก่

S. Weltevreden DMST 10637*S. Typhimurium* ATTC 13311*S. Enteritidis* DMST 8536*S. Blockley* DMST 10639

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ

Mueller-Hinton agar (Fluka)

Mueller-Hinton broth (Fluka)

brilliant green agar (Fluka)

Salmonella and *Shigella* agar (Fluka)

3. วัสดุอุปกรณ์อื่น

Paper disk (6mm in diameter , Schleicher & Schuell)

Incubator

Laminar air flow

Autoclave

การทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อซาลโมเนลลาในไก่เนื้อ

1. ไก่ที่ใช้ในการทดลอง

ใช้ไก่เนื้อพันธุ์ Cobb คละเพศ อายุ จำนวน 45 ตัว อายุ 28 วัน

2. โรงเรือน กรงเลี้ยง ภาชนะสำหรับให้น้ำและอาหาร

3. อาหารไก่

ใช้อาหารไก่สูตรสำเร็จสำหรับเลี้ยงไก่ระยะที่ 3 ของบริษัทสหฟีดมิลส์ จำกัด ซึ่งประกอบไปด้วย กากถั่วเหลือง/กากถั่วลิสง/กากถั่วดำ ถั่วเหลืองอบ/ถั่วลิสงสุก กากมะพร้าว/กากงา/กากเรปซิด/กากเมล็ดทานตะวัน/กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม กระถินป่น/ถั่วคั่วโพด ข้าวโพดป่น/ข้าวฟ่างป่น/ปลายข้าว/ข้าวเปลือกอบ/มันสำปะหลัง รำละเอียด/รำหยาบ/รำสกัดน้ำมัน/รำข้าวสาลี/น้ำมันพืช น้ำตาล/กากน้ำตาล แคลเซียมคาร์บอเนต/ไคแคลเซียมฟอสเฟต/ไตรแคลเซียมฟอสเฟต เกลือ วิตามิน แร่ธาตุ กรดอะมิโน

4. อาหารไก่ผสมสารสกัดและแคปซูลบรรจุสารสกัด

อาหารไก่จากข้อ 3 ผสมสารสกัดในความเข้มข้น 16 กรัมของสารสกัดต่อกิโลกรัมอาหาร จำนวน 50 กิโลกรัม ส่วนสารสกัดบรรจุแคปซูลเบอร์ 1 ในขนาด 200 mg ของสารสกัดต่อแคปซูล จำนวน 600 แคปซูล โดยได้รับความอนุเคราะห์ในการเตรียมจากบริษัทชาวละออจำกัด

5. เชื้อที่ได้ทดสอบ

เชื้อ *Salmonella* Enteritidis ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ติดตามการคือยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สายพันธุ์ที่ได้ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ดังนี้

ไวต่อยา : ampicillin, ciprofloxacin, kanamycin, nalidixic acid, trimethoprim,

co-trimoxazole

ดื้อต่อยา : chloramphenicol, sulfonamide และ tetracycline

6. ยาต้านจุลชีพ ที่ใช้ในการทดลอง (กลุ่มควบคุม)

enrofloxacin oral solution (Polypharm)

7. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการตรวจและนับเชื้อ *Salmonella*

XLT 4 agar (Fluka)

XLT 4 agar supplement (Fluka)

Peptone Water phosphate-buffered (Fluka)

Salmonella-Shigella Agar (Fluka)

การตรวจหาสารตกค้างในเนื้อไก่

1. ตัวทำละลายและวัสดุทางโครมาโตกราฟี
ใช้เกรดและบริษัทเดียวกันกับการศึกษาด้านพิษเคมี

2. อุปกรณ์ที่ใช้หาปริมาณสารตกค้าง

High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC - Camag)

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาด้านพิษเคมี

การสกัดสาร

ได้ทำการสกัดสารจากผลสุกของพืชจากสาขาที่ห้องปฏิบัติการพิษเคมี ภาควิชาเภสัช
วินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยมีขั้นตอนดังนี้

ผงยาที่บดแล้วสกัดต่อเนื่องด้วยเครื่อง Soxhlet extraction apparatus โดยใช้ตัวทำ
ละลายในการสกัดตามลำดับคือ petroleum ether (b.p. 60-80 °C) chloroform และ 95 % ethanol
ส่วนสกัดจาก chloroform ที่ได้ระเหยตัวทำละลายให้แห้งด้วย rotary evaporator แล้วนำมาสกัดต่อด้วย
วิธี liquid-liquid extraction ระหว่าง chloroform กับน้ำกลั่นโดยใช้กรวยแยก (partition) ส่วนสกัด
คลอโรฟอร์มนำไประเหยให้แห้งด้วย rotary evaporator ส่วนสกัดด้วยน้ำนำไปทำให้แห้งด้วยวิธี
lyophilization โดยใช้วิธีศึกษาเดียวกับส่วนสกัด chloroform ส่วนสกัดด้วย ethanol นำแล้วนำมาสกัด
ต่อด้วยการ partition ระหว่าง n-butanol กับน้ำกลั่น ส่วนสกัดที่ได้ทั้งหมดนำไปทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อ
Salmonella ด้วยวิธี disk diffusion method

การศึกษาด้านฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. การทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี disk diffusion method

ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี disk diffusion method โดยดัดแปลงจากวิธี
ของ The National Committee for Clinical Laboratory Standards หรือ NCCLS (23) ที่ห้องปฏิบัติการ
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเตรียมตามขั้นตอน ดังนี้

1.1 การเตรียมสารสกัดและ disk ซับสมุนไพร

1.1.1 ส่วนสกัดสมุนไพรที่ระเหย ตัวทำละลายออกให้หมด จะได้เป็นสารสกัดหยาบ
(crude extract) จาก crude extract ละลายด้วย ตัวทำละลายเดิม เตรียมให้มีความเข้มข้น 250 mg / ml เป็น
stock solution

1.1.2 ไปเปิด stock solution ลงบน disk เป่าปริมาณ 40 µl จะได้ disk มีความเข้มข้น
ของ crude extract ที่ 10 mg/ml แล้วนำไปผึ่งให้แห้งใน incubator

1.2 การเตรียมเชื้อ *Salmonella* เพื่อการทดสอบ

เชื้อ *Salmonella* ที่ใช้ทดสอบ (*Salmonella* Typhi *S. Enteritidis* *S. Weltevreden* *S. Typhimurium*) ต้องเป็นเชื้อที่เพาะได้ใหม่ (18-24 ชั่วโมง) เตรียมเชื้อใน Mueller-Hinton broth นำไป incubated ที่ 37 °C เป็นเวลา 3 h ปรับเชื้อให้มีขุ่นเท่ากับ Mc Farland standard No. 0.5 (ประมาณ 1×10^8 cfu/ml)

1.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารวุ้นที่ใช้คือ Mueller-Hinton Agar เตรียมอาหารโดยละลายอาหาร 38 g ค่อน้ำกลั่น 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave) ที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นประมาณ 45 – 50 °C เทลงจานเพาะเชื้อ จานละ 25 ml ทิ้งไว้จนเย็นใน Laminar air flow

1.4 การทดสอบ

1.4.1 ป้ายเชื้อที่ปรับความขุ่นไว้จากข้อ 1.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ โดยป้ายแบบสามทิศทาง

1.4.2 นำ disks ยาสมุนไพรที่เตรียมไว้จากข้อ 1.1.2 มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อพร้อม disk ยามาตรฐาน ampicillin 10 µg/disk

1.4.3 นำจานอาหารเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

1.4.4 สังเกตดูโซนใสรอบ disks ที่เกิดขึ้นแล้ววัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสดังกล่าวในหน่วยมิลลิเมตร แล้วบันทึกผลโดยใช้ code ดังนี้

-	no activity
+	6-9 mm
++	>9-12 mm
+++	>12-15 mm
++++	> 15-19 mm
+++++	> 19 mm

2. การหาค่า MICs ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยวิธี broth dilution techniques

การหาค่า MICs ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ โดยวิธี broth dilution techniques โดยดัดแปลงจากวิธีของ Barry AL (10) ซึ่งทำการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

1.1 การเตรียมสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้เพื่อการทดสอบ

นำสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจากการทดสอบด้วยวิธี disk diffusion และสารบริสุทธิ์ที่ได้จากการแยก นำมาเตรียมเป็น stock solution ดังนี้

1.1.1 ส่วนสกัดที่ออกฤทธิ์

จากการทดสอบพบว่า สารสกัดที่ออกฤทธิ์ที่ทดสอบโดยวิธี disk diffusion พบว่าส่วนที่ออกฤทธิ์คือ 1) ethanol extract 2) water soluble fraction จาก chloroform extract 3) butanol fraction จาก ethanol extract ได้นำส่วนสกัดทั้งสามส่วนมาเตรียมเป็น stock solution ให้มีความเข้มข้น 64 mg/ml ในน้ำ (กรณีส่วนสกัดไม่ละลายในน้ำ ให้ละลายใน dimethylsulfoxide (DMSO) ก่อน แล้วค่อยเติมน้ำ ทั้งนี้จะต้องมีความเข้มข้นท้ายสุดจะมี DMSO ไม่เกิน 10%)

1.1.2 สารบริสุทธิ์ที่แยกได้

เตรียมสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ เตรียมเป็นสารละลายในน้ำ ในความเข้มข้น 4 mg/ml เป็น stock solution โดยการเตรียมวิธีเดียวกันกับ ข้อ 1.1.1

1.2 การเตรียมเชื้อที่จะทดสอบ

ใช้เชื้อ *S. Enteritidis* DMST 8536 ที่ได้จากเชื้อที่เพาะได้ใหม่ (18-24 ชั่วโมง) เตรียมเชื้อใน Mueller-Hinton broth นำไป incubated ที่ 37 °C for 3 h ปรับเชื้อให้มีขุ่นเท่ากับ Mc Farland standard No. 0.5 (ประมาณ 1×10^8 cfu/ml) แล้ว dilute ให้เชื้อมีความเข้มข้นประมาณ 5×10^6 cfu/ml

1.3 การทดสอบ

ทำตามวิธีของ Barry AL₁ และสรุปสารที่จะต้องเติมตามตาราง 1

1.3.1 การทดสอบสารแต่ละตัว เตรียมหลอดทดลองที่ sterile ชุดละ 14 หลอด

1.3.2 ไปเปิด 0.5 ml ของ Mueller Hinton broth (MHB) ลงในทุกหลอด

1.3.3 ไปเปิดสารสกัดหรือสารบริสุทธิ์ที่จะทดสอบจาก stock solution ที่เตรียมไว้ จากข้อ 1.1 ไปยังหลอดที่ 1 แล้วผสมให้เข้ากัน

1.3.4 ไปเปิด 0.5 ml ของของผสมจากหลอดที่ 1 ไปยังหลอดที่ 2 ผสมให้เข้ากัน แล้วไปเปิด 0.5 ml ของของผสมจากหลอดที่ 2 ไปยังหลอดที่ 3

1.3.5 ทำเหมือนข้อ 1.3.4 ไปทุกๆ หลอด จนถึงหลอดที่ 12 แล้วไปเปิดของผสมจากหลอดที่ 12 ทั้งไป 0.5 ml

1.3.6 ไปเปิดเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 ลงไปทุกหลอดยกเว้นหลอดที่ 14

1.3.7 นำหลอดทดลองทุกหลอดไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 h

1.3.8 หาค่า MIC ได้จากความเข้มข้นน้อยที่สุดของสารที่ใช้ทดสอบที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ (ของผสมจะใส)

ตาราง 1 ปริมาตรของสารสกัดที่จะทดสอบ อาหารเลี้ยงเชื้อและปริมาณเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

Tube No.	The test Solution (ml)	MHB (ml)	MHB from previous tube (ml)	Inoculum (ml)	Final conc. Of the test solution (mg/ml)
1	0.5	0.5	0.0	0.5	16
2	0.0	0.5	0.5	0.5	8
3	0.0	0.5	0.5	0.5	4
4	0.0	0.5	0.5	0.5	2
5	0.0	0.5	0.5	0.5	1
6	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5
7	0.0	0.5	0.5	0.5	0.25
8	0.0	0.5	0.5	0.5	0.13
9	0.0	0.5	0.5	0.5	0.06
10	0.0	0.5	0.5	0.5	0.03
11	0.0	0.5	0.5	0.5	0.02
12	0.0	0.5	0.5	0.5	0.01
13	0.0	0.5	0.0	0.5	Positive control
14	0.0	0.5	0.0	0.0	Negative control

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อซาลโมเนลลาในไก่เนื้อ

ได้ทำการทดลองที่บริษัท สหฟาร์ม จำกัด จ. ลพบุรี โดยวิธีทดลองได้ดัดแปลงตามวิธีของ Banhart และคณะ (26) และได้ขออนุญาตทำการทดลองในสัตว์และได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับและดูแลการใช้สัตว์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เรียบร้อยแล้ว ในวันที่ 17 เมษายน 2546

ขั้นตอนการทดลอง มีรายละเอียดและขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 การวางแผนการทดลอง

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) ซิกนิฟิกันส์กำหนด (Fixed effect model) แบ่งไก่ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัว

(กลุ่มที่ 3-4-5 เป็นกลุ่มควบคุม) โดยมีปัจจัยเดียวคือ ชนิดของอาหารที่กินเชื้อ *Salmonella* ที่ให้ไก่กิน มี 3 ชนิดได้แก่

- สารสกัดจากผลสุกพืชผักที่ใช้ผสมลงในอาหารไก่ให้มีความเข้มข้น 16 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

- สารสกัดจากผลสุกพืชผักที่บรรจุในแคปซูล 200 mg/capsule
- enrofloxacin ผสมในน้ำที่เลี้ยงไก่ ให้มีความเข้มข้น 50 ppm

2.2 การเตรียมเชื้อที่จะทดสอบ

ใช้เชื้อ *S. Enteritidis* สายพันธุ์ที่คีย์มา ที่ได้จากเชื้อที่เพาะได้ใหม่ (18-24 ชั่วโมง) เตรียมเชื้อใน Mueller-Hinton broth นำไป incubated ที่ 37 °C for 3 h ปรับเชื้อให้มีขุ่นเท่ากับ Mc Farland standard No. 0.5 (ประมาณ 1×10^8 cfu/ml)

2.3 การทดสอบในไก่

- 2.3.1 แบ่งไก่เนื้อ อายุ 28 วัน ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ตัว
- 2.3.2 ให้อาหาร และน้ำตามปกติ เป็นเวลา 7 วัน (ปรับให้เข้ากับสถานะแวดล้อม)
- 2.3.3 หลังจากครบ 7 วัน ให้เชื้อ *Salmonella Enteritidis* ตัวละ 1×10^8 cfu ต่อตัว ในกลุ่มที่ 1, 2, และ 3, 4 (ยกเว้นกลุ่ม 5)
- 2.3.4 วันต่อมา หลังจากให้เชื้อแก่ไก่ทดลองแล้ว ได้ให้สารสกัดจากผลสุกพืชผัก ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้อาหาร ผสมสารสกัด ในขนาดเดียวคือ 1.6 % w/w (4 เท่าของ MIC ที่หาได้จากการทดสอบ in vitro)

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารตามปกติ แต่ป้อนสารสกัดที่บรรจุในแคปซูล ที่เตรียมไว้ ขนาด 1.8 กรัม (9 แคปซูล) /ตัว/วัน

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารตามปกติ (กลุ่มควบคุม – ได้รับเชื้อ)

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารตามปกติ (กลุ่มควบคุม – ได้รับเชื้อ – ได้รับยาปฏิชีวนะ) และเติม enrofloxacin ผสมในน้ำที่เลี้ยงไก่ในความเข้มข้น 50 ppm

กลุ่มที่ 5 ให้อาหารตามปกติ (กลุ่มควบคุม – ไม่ได้รับเชื้อ)

เป็นเวลาทั้งหมด 7 วัน

2.3.5 เมื่อครบ 7 วัน นำไก่ทุกกลุ่ม ตัดเอากระเพาะพักไก่ (crop) และไส้ตัน (caecum) ทุกตัว ชั่งน้ำหนักและนำไปตรวจนับจำนวนเชื้อ *Salmonella* และตัดเอาเนื้อส่วนอก ไปตรวจหาสารตกค้าง

2.4 การตรวจนับเชื้อ *Salmonella* : โดยการประยุกต์จากการตรวจและนับวิธีของ Xiong H (28) ดังนี้

2.4.1 กระเพาะพัก หรือ ไส้ตัน จากไก่แต่ละตัว นำมาชั่งน้ำหนัก และนำมาตัวละ 5 กรัม ใส่ถุงพลาสติก sterile และตีถุงให้กระเพาะพักหรือไส้ตันแตกละเอียด

2.4.2 เติมน้ำ 0.1 % buffered peptone water 45 ml คนให้เข้ากัน

2.4.3 นำสารละลายจากข้อ 2.4.2 มา 1 ml เติมน้ำใน 0.1 % buffered peptone water 9 ml ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง

2.4.4 นำสารละลายจากข้อ 2.4.3 มา 1 ml เติมน้ำใน 0.1 % buffered peptone water 9 ml ที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง

2.4.5 นำสารละลายจากข้อ 2.4.2, 2.4.3 และ 2.4.4 มา 0.1 ml ไปเปิดไปยังจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate) ที่มี xylose lysine tergitol 4 agar ที่เตรียมไว้แล้ว ในแต่ละ plate

2.4.6 นำ plate จากข้อ 2.4.5 ไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-20 h

2.4.7 ครบเวลานำแต่ละ plate มานับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* ทั้งหมดโดยโคโลนี ของเชื้อ *Salmonella* จะเป็นโคโลนีสีชมพู มีจุดดำตรงกลางโคโลนี แล้วรายงานเป็นจำนวนโคโลนีของเชื้อต่อน้ำหนักเป็นกรัมของอวัยวะ

2.4.8 นำตัวอย่างของ โคโลนี ของเชื้อ *Salmonella* ไปตรวจและหาชนิดของซีโรวาร์ที่ ศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต่อไป

2.5 การสกัดสารจากเนื้อไก่เพื่อนำไปตรวจหาสารตกค้าง

จากการศึกษาทางพฤกษเคมี พบว่า สารที่เป็นสารหลักของสารสกัดด้วย ethanol คือ syringic acid จึงตรวจหา syringic acid ซึ่งอาจตกค้างในเนื้อไก่ได้ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.5.1 นำเนื้อไก่ส่วนอกของแต่ละตัว นำมาบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักตัวอย่างละ 100 กรัม บรรจุใน flask

2.5.2 เติมน้ำ methanol 100 ml ลงในแต่ละ flask

2.5.3 คนให้เข้ากันและเขย่าด้วยเครื่องเขย่า เป็นเวลา 15 นาที

2.5.4 กรองด้วยกระดาษกรอง แล้วปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

2.5.5 เก็บส่วนใส ระเหยให้แห้ง แล้วเติม MeOH ปรับปริมาตร สุดท้ายให้เป็น 0.5

ml เก็บใส่ขวดแก้วไว้อัตราด้วยเครื่อง

2.6 การตรวจหาสารตกค้างด้วยเครื่อง High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

การตรวจหาสารตกค้าง โดยใช้เครื่อง HPTLC ได้จากการดัดแปลงจากวิธีของ Ramírez และคณะ (26) โดยทำที่ห้องปฏิบัติการพิษเคมี ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ตามขั้นตอนดังนี้

2.6.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

เตรียมสารมาตรฐาน syringic acid ละลายใน methanol ให้มีความเข้มข้น 25 ppm

2.6.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPTLC

ตัวอย่างจากข้อ 2.5.5 นำไป spot บน TLC plates (10x20 mm) ตัวอย่างละ 5 μ L โดยใช้เครื่อง Camag Linomat automsampler พร้อมกับ spot สารละลายของ standard จำนวน 5 ตำแหน่ง ในปริมาตร 2, 4, 8, 16, 32 μ L เพื่อให้มีปริมาณ syringic acid 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 μ g ตามลำดับ (เพื่อทำ calibration curve) จากนั้นนำ plate ไป develop ใน glass chamber ซึ่งมี solvent system ที่ประกอบด้วย chloroform-ethyl acetate-methanol-glacial acetic acid (9:1:2:0.2) ซึ่งจะเห็น syringic acid จะแยกจากสารอื่นในสารสกัดจากเนื้อไก่ ให้ค่า R_f ที่ 0.64 ± 0.03 นำแผ่น TLC ที่ develop แล้วไปทำให้แห้ง แล้วนำไปวางใน Camag TLC scanner ภายใต้ UV ที่ความยาวคลื่น 280 nm วัดพื้นที่ใต้ peak และจัดทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม Wincat หาปริมาณของสารตกค้าง (syringic acid residue) ในสารละลายตัวอย่าง จากกราฟมาตรฐาน จากโปรแกรม Wincat

2.6.3 การตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ (method validation)

2.6.3.1 accuracy

ใช้วิธี spike-placebo recovery method โดยการเติม syringic acid ลงในเนื้อไก่ที่เลี้ยงโดยไม่ได้ให้สารสกัดปลิงกาสา ให้มีปริมาณ syringic acid 5,10,20,40 μ g ลงในตัวอย่างเนื้อไก่ตัวอย่างละ 100 g ตามลำดับ ทำการสกัดและตรวจหา syringic acid ตามวิธี ในข้อ 2.5.2 แล้วรายงานผลเป็น % recovery จากสูตร (ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ)

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์}}{\text{ปริมาณที่เติมสารมาตรฐานลงไป}} \times 100$$

2.6.3.2 precision

a) intra-day precision

หาปริมาณ syringic acid โดยการเติมสารมาตรฐาน syringic acid ลงไปในเนื้อไก่ที่เลี้ยงโดยไม่ได้ให้สารสกัดฟัลกาสา ให้มีปริมาณ syringic acid 5,10,20,40 μg ลงในตัวอย่างเนื้อไก่ 100 g ตามลำดับ ทำการสกัดและตรวจหา syringic acid ตามวิธี ในข้อ 2.6.2 (3 ข้าง) ภายในวันเดียว

b) inter-day precision

หาปริมาณ syringic acid โดยการเติมสารมาตรฐาน syringic acid ลงไปในเนื้อไก่ที่เลี้ยงโดยไม่ได้ให้สารสกัดฟัลกาสา ให้มีปริมาณ syringic acid 5,10,20,40 μg ลงในตัวอย่างเนื้อไก่ 100 g ตามลำดับ ทำการสกัดและตรวจหา syringic acid ตามวิธี ในข้อ 2.6.2 ทำซ้ำติดต่อกัน 3 ครั้ง วันละครั้งติดต่อกัน 3 วัน

2.6.3.3 limit of quantitation (LOQ) และ limit of detection (LOD)

หาปริมาณ syringic acid ที่เครื่อง HPTLC สามารถตรวจสอบได้ โดยใช้ standard syringic acid แล้ว spot บนแผ่น TLC โดยใช้ปริมาณ เริ่มต้นตั้งแต่ 200 ng ลงมา แล้วใช้เครื่อง Camag TLC scanner ภายใต้อัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 280 nm หาปริมาณ syringic acid ที่น้อยที่สุดที่เครื่องตรวจพบได้ รายงานเป็นค่า limit of detection (LOD) เติม standard syringic acid ลงไปในเนื้อไก่ที่ไม่ได้ผ่านการเลี้ยงด้วยสารสกัดฟัลกาสา โดยเริ่มจากความเข้มข้น 400 ppb ลงมา แล้วหาความเข้มข้นน้อยที่สุด ที่สามารถคำนวณได้และค่า accuracy และ precision เป็นที่ยอมรับ แล้วรายงานผลเป็นค่า limit of quantitation (LOQ)

การวิเคราะห์ข้อมูล

สำหรับข้อมูลที่ได้จากการทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อซาลโมเนลลาในไก่เนื้อ นำมาวิเคราะห์ข้อมูลตามลำดับดังนี้

1. ข้อมูล (จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Salmonella*) จากการทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อซาลโมเนลลาในไก่เนื้อ

1.1 นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

1.2 นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 1.1 ไปทดสอบสมมุติฐานโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way analysis of variance)

1.3 จากการทดสอบทางสถิติในข้อ 1.2 พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติจึงเปรียบเทียบความแตกต่างรายคู่ของ Duncan's new multiple range test สำหรับจำนวนซ้ำที่เท่ากัน

2. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

2.1 สถิติพื้นฐาน ใช้ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.2 ทดสอบโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว โดยใช้สูตรดังนี้ (20)

$$F = \frac{MS_{Tr}}{MS_E}$$

เมื่อ	F	แทน	ค่าสถิติที่ใช้พิจารณาใน F-distribution
	MS_{Tr}	แทน	ค่ากำลังสองเฉลี่ยของสิ่งทดลอง
	MS_E	แทน	ค่ากำลังสองเฉลี่ยของความคลาดเคลื่อน

2.3 เมื่อผลการทดสอบสมมติฐานมีนัยสำคัญทางสถิติจึงได้เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธีของ Duncan 's new multiple range test โดยใช้สูตรดังนี้ (เมื่อมีจำนวนซ้ำที่เท่ากัน) (20)

$$SSR_p = r_p \sqrt{\frac{MS_E}{n}}$$

เมื่อ	SSR_p	แทน	Shortest significant range
	r_p	แทน	Least significant studentized range
	MS_E	แทน	ค่ากำลังสองเฉลี่ยของความคลาดเคลื่อน
	n	แทน	จำนวนตัวอย่างในกลุ่มทดลอง

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

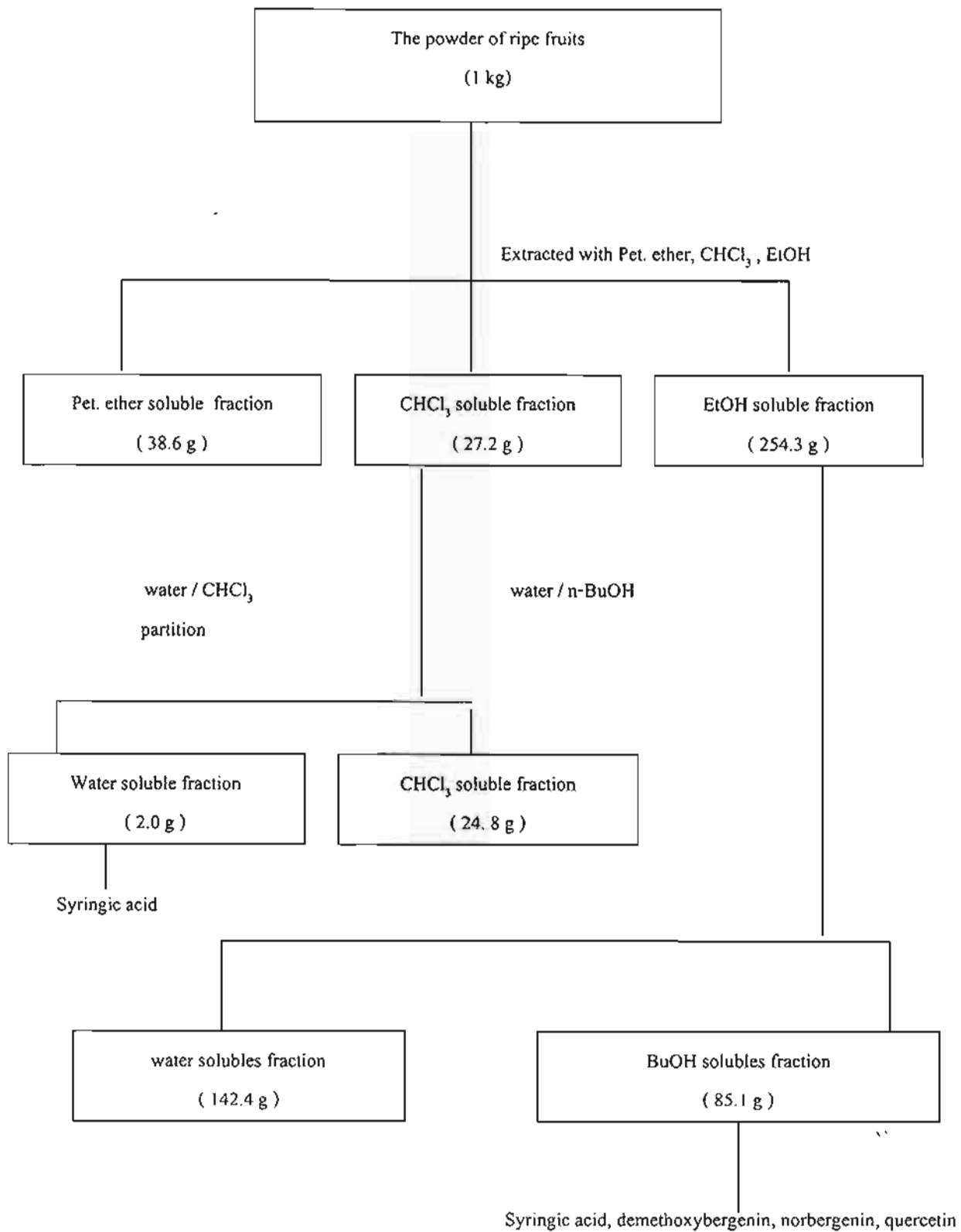
การศึกษาด้านพฤกษเคมี

จากผงยาที่บดแล้ว (1 Kg) สกัดต่อเนื่องด้วยเครื่อง Soxhlet extraction apparatus โดยใช้ตัวทำละลายในการสกัดตามลำดับคือ petroleum ether (b.p. 60-80 °C) chloroform และ 95 % ethanol ส่วนสกัดจาก chloroform ที่ได้ระเหยตัวทำละลายให้แห้ง แล้วนำมาสกัดต่อด้วยวิธี liquid-liquid extraction (partition) ระหว่าง chloroform กับน้ำกลั่น ส่วนสกัดด้วย ethanol นำแล้วนำมาสกัดต่อด้วยวิธี liquid-liquid extraction ระหว่าง n-butanol กับน้ำกลั่น ได้ผลการสกัดตามตาราง 2

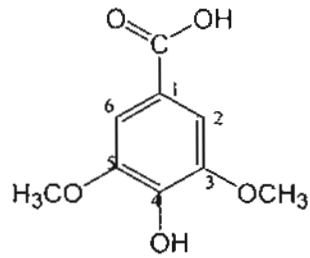
ตาราง 2 ผลของการสกัดผลสุกพืชผักด้วยเครื่องสกัด Soxhlet และการสกัดด้วยต่อด้วยวิธี liquid-liquid extraction (partition)

Extract/fraction	Weight (g)	% yield of powdered drug	ลักษณะของ extract/fraction ที่ได้
petroleum ether extract	38.6	3.86	สารสกัดสีดํา มีสารสีเหลืองแยกตกตะกอนแยกชั้นออกมา
chloroform extract	27.2	2.72	สารสกัดสีน้ำตาล หนืด
ethanol extract	254.3	25.4	สารสกัดสีดําปนม่วง หนืดเยิ้ม
water soluble fraction from the chloroform extract	2.0	0.02	สารสกัดสีน้ำตาล มีผลึกสีขาวปนออกมา
chloroform soluble fraction from the chloroform extract	24.9	2.49	สารสกัดสีน้ำตาล
water soluble fraction from the ethanolic extract	142.4	14.24	สารสกัดสีดําปนม่วง หนืดมากกว่าส่วนสกัดด้วย butanol
butanolic soluble fraction from the ethanolic extract	85.1	8.51	สารสกัดสีดําปนม่วง หนืดเยิ้ม

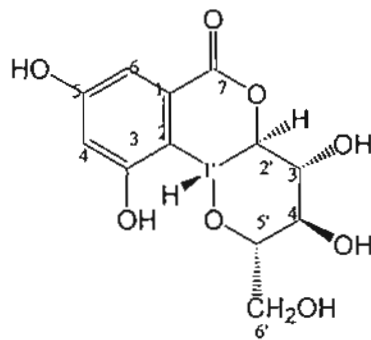
จากการสกัดด้วยเครื่อง soxhlet ด้วย petroleum ether (กำจัดพวงสาร non polar ที่ไม่ต้องการ เช่น waxes หรือพวงไขมันอื่นๆ) เมื่อนำสารสกัดด้วย petroleum ether ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* พบว่าไม่มีฤทธิ์ ส่วนสารสกัดด้วย chloroform สารสกัดที่ได้จะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลหนืด แต่ % yield จะได้น้อยที่สุด เมื่อเทียบกับ การใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ตัว และเมื่อนำไป partition ระหว่างน้ำกับ chloroform จะได้ fraction 2 ส่วนคือ water soluble fraction from the chloroform extract และ chloroform soluble fraction from the chloroform extract และจากการนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* พบว่า fraction แรกออกฤทธิ์ดี จากการศึกษาด้านพิษวิทยาของตัววิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารที่เป็นส่วนประกอบหลักของ fraction นี้คือ syringic acid (18,24) สารสกัดส่วนที่ 3 คือสารสกัด ethanolic extract ซึ่งได้ % yield มากที่สุด และจากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* พบว่ามีฤทธิ์ จึงได้นำสารสกัดดังกล่าวไป partition ระหว่างน้ำและ butanol ได้ fraction สองส่วนคือ water soluble fraction from the ethanolic extract และ butanolic soluble fraction from the ethanolic extract ซึ่งจากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* พบว่า fraction ที่ 2 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Salmonella* ได้ดี จากผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ของตัววิจัย ได้นำ fraction นี้ไปแยกเพื่อหาสารออกฤทธิ์ และจากหาสูตรโครงสร้างพบว่า สารที่เป็นส่วนประกอบหลักของ fraction นี้คือ syringic acid, quercetin, norbergenin และ demethoxybergenin (18,24) ตัววิจัยได้สรุปการศึกษาทางพิษวิทยาเคมีตามรูป 1,2



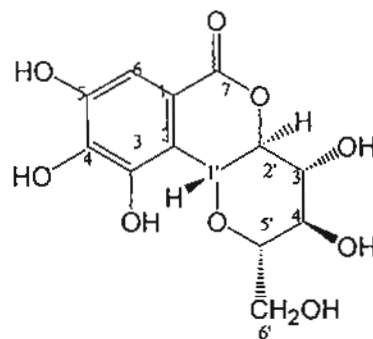
รูป 1 แผนภาพการสกัดสารจากผลสุกพื้งกาสามและสารที่แยกได้จาก fraction ต่างๆ



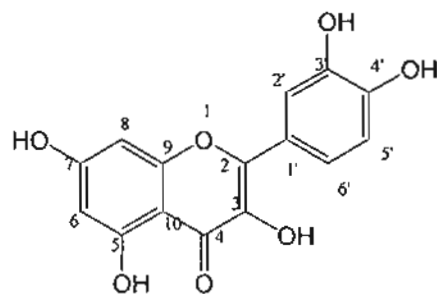
Syringic acid



Demethoxybergenin



Norbergenin



Quercetin

รูป 2 สูตรโครงสร้างของสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากผลสุกพื้งกาสา (18,19)

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี disk diffusion method

จากการสกัดผงยาที่ได้จากผลสุกพื้ลังกาสา (1Kg) สกัดต่อเนื่องด้วยเครื่อง Soxhlet extraction apparatus และทำการ partition สารสกัดตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วตามหัวข้อการศึกษาทางพฤกษเคมี หลังจากนั้นได้นำสารสกัดทุกสารสกัด(extracts) และ fractions ทุก fraction ไปตรวจหาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* โดยวิธี disk diffusion method (ตาราง3) พบว่า extracts/fractions ที่ออกฤทธิ์คือ ethanolic extract, water soluble fraction from chloroform extract และ butanolic soluble fraction from ethanolic extract จากผลการวิจัยส่วนนี้พบว่า สารสกัดจากผลสุกพื้ลังกาสา ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* จริง ในทุกๆ ซีโรวาร์ ซึ่งตรงกับสรรพคุณในการแพทย์แผนไทย ซึ่งใช้ผลสุกพื้ลังกาต้มกินแก้ท้องเสีย ซึ่งโรคท้องเสีย ส่วนหนึ่งมีสาเหตุจากเชื้อไทฟอยด์ (*Salmonella Typhi*) อนึ่งจากผลการวิจัยพบว่า สารสกัดยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* serotypes ที่พบในสัตว์ *S. Enteritidis* *S. Weltevreden* *S. Typhimurium* *S. Blockley* จึงอาจมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ปีกที่มักจะมี *Salmonella* เหล่านี้อยู่บ่อยๆ อย่างไรก็ตาม จากผลการวิจัยจะเห็นว่า extracts/fractions ที่ออกฤทธิ์ได้ดี เป็น extracts/fractions ที่ใช้ตัวทำละลายที่ค่อนข้างมีขี้ แสดงว่าสารออกฤทธิ์น่าจะเป็นสารที่มีขี้ และได้นำ fractions ที่ออกฤทธิ์เหล่านั้น ไปทำการแยกสารโดยใช้เทคนิคทาง chromatography เพื่อหาสารออกฤทธิ์ตามที่กล่าวแล้วในส่วนการศึกษาด้านพฤกษเคมี

ตาราง 3ฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella*¹ ของ extracts² และ fractions จากผลสุกพิลังกาส

Extracts/fractions	<i>S. Enteritidis</i> DMST 8536	<i>S. Weltevreden</i> DMST 10637	<i>S. Typhimurium</i> ATTC 13311	<i>S. Blockley</i> DMST 10639
pet. ether extract	-	-	-	-
Choroform extract	+	-	-	-
ethanolic extract	++	+	+	+
water soluble fraction from chloroform extract	+++	+++	+++	+++
Butanolic soluble fraction from ethanolic extract	++	++	++	++
water soluble fraction from ethanolic extract	+	-	-	+
Ampicillin 10 µg /disk	++++	++++	++++	++++

¹ สัญลักษณ์ที่ใช้ : (-) ไม่มีฤทธิ์, (+) > 6-9 mm, (++) > 9-12 mm, (+++) > 12-15 mm, (++++) 15-19 mm, (+++++) > 19 mm ; เส้นผ่าศูนย์กลางของ disk : 6 mm

² ใช้ความเข้มข้นของสารสกัด หรือ fractions ที่ 10 mg/disk

2. การหาค่า MICs ของสารสกัดและสารบริสุทธิ์ที่แยกได้โดยวิธี broth dilution methods

จากผลการวิจัยพบว่า extracts/fractions ที่ออกฤทธิ์ที่ทดสอบโดยวิธี disk diffusion พบว่าส่วนที่ออกฤทธิ์ดีคือ 1) ethanol extract 2) water soluble fraction จาก chloroform extract 3) butanol fraction จาก ethanol extract ได้นำ extracts/fractions เหล่านี้มาทดสอบความไวของสารสกัดด้วยวิธี broth dilution methods พร้อมนี้ได้นำสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ด้วยวิธีดังกล่าวอีกด้วย