องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของผักเขียด

อชิรวิทย์ จันทร์แก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
กันยายน 2558
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ อชิรวิทย์ จันทร์แก้ว ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ดร.เนาวรัตน์ กองคำ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น)

.....กรรมการ
(ดร.ศิริรัตน์ ชาญไววิทย์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมีศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 8 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.จงกลณี จงอร่ามเรือง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ช่วยเหลือในทุกปัญหาการวิจัย พร้อมทั้งให้กำลังใจ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่าน ที่ช่วยสอนวิชาเคมีในส่วนของเนื้อหา และปฏิบัติการเคมีอย่างเข้มข้น เพื่อปลูกฝังให้ข้าพเจ้าเป็นนักวิทยาศาสตร์ และเป็นครูวิทยาศาสตร์ที่มีความรู้ในภาคทฤษฎี และภาคปฏิบัติวิชาเคมีเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ ดร.วรนาฏ จงโยธา เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร อุมา ประวัติ ดร.สายธาร ทองพร้อม และคณาจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต ทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำปรึกษาในการแก้ปัญหา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่เช้า จันทร์แก้ว ที่ให้กำลังใจ และสนับสนุนด้านปัจจัยต่าง ๆ ในการศึกษาของข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

อชิรวิทย์ จันทร์แก้ว

53990127: สาขาวิชา: เคมีศึกษา; วท.ม. (เคมีศึกษา)
คำสำคัญ: ผักเขียด / ขาเขียด / ฤทธิ์ทางชีวภาพ

อชิรวิทย์ จันทร์แก้ว: องค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของผักเขียด (CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Monochorai vaginalis)*
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จงกลณี จงอร่ามเรือง, Ph.D. 58 หน้า. ปี พ.ศ. 2558.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอทิลอะซีเตดจากผักเขียดแห้ง และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทางการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และ เชื้อรา เมื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี ในส่วนของสารสกัดหยาบเอทิลอะซีเตดจากผักเขียดแห้ง พบองค์ประกอบทางเคมีมากกว่า 15 ชนิดโดยอาจจะมีองค์ประกอบหลัก 8 ชนิดได้แก่ linoleic acid, palmitic acid, 9-*cis*-oleic acid methyl linolenate, acetic acid, stearic acid, neophytadiene และ *trans*-oleic acid โดยมี linoleic acid เป็นองค์ประกอบหลักที่มีปริมาณสูงสุดในสารสกัดหยาบ ซึ่งมีปริมาณถึง 17.59% รองลงมา คือ palmitic acid มีปริมาณ 17.13% และ methyl linolenate มีปริมาณ 5.95% นอกจากนี้ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar disc diffusion ของสารสกัดหยาบเอทิลอะซีเตดจากผักเขียดทุกความเข้มข้น ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Staphyllococcus aureus*, *Bacillus cereus* แบคทีเรีย แกรมลบ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella thyphimurium*, *Serratia marcescen*, *Pseudomonas aeruginosa* เชื้อรา *Aspergillus niger* และยีสต์ *Candida albican*

53990127: MAJOR: CHEMICAL EDUCATION; M.Sc. (CHEMICAL EDUCATION)
KEYWORDS: *Monochoria vaginalis* / biological activities

ACHIRAWIT JANKAEW: CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Monochoria vaginalis*. ADVISORY COMMITTEE: JONGKOLNEE JONGARAMRUONG, Ph.D. 58 P. 2015.

This research aimed to study in chemical constitution of ethyl acetate crude extract from the dried *Monochoria vaginalis*, and tested their biological activities against bacteria, yeast and fungi. The chemical constitution of the crude extract was analyzed by gas chromatography/ mass spectrometry. Linoleic acid, palmitic acid, 9-*cis*-oleic acid, methyl linolenate, acetic acid, stearic acid, neophytadiene and *trans*-oleic acid were eight major components among a total of more than fifteen components from the crude extract of *Monochoria vaginalis*. Linoleic acid was analyzed as the highest amount of 17.59%. The second component was palmitic acid as the value of 17.13% and methyl linolenate was analyzed as the value of 5.95%. In addition, the crude ethyl acetate extract of *Monochoria vaginalis* was tested its biological activity by the agar disc diffusion method. It was inactive against gram-positive bacteria; *Staphyllococcus aureus*, *Bacillus cereus*, gram-negative bacteria; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella thyphimurium*, *Serratia marcescen*, *Pseudomonas aeruginosa*, the fungi *Aspergillus niger* and the yeast *Candida albican*.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ฌ
บทที่
1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1
สมมติฐานของการวิจัย 1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 2
ขอบเขตของการวิจัย 2
นิยามศัพท์เฉพาะ 2
2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
ผักเขียด 3
ลักษณะทางพฤษศาสตร์ 3
นิเวศวิทยาของผักเขียด 4
ประโยชน์ของผักเขียด 5
พืชสมุนไพร 6
การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร 7
การทำการสกัดสารให้เข้มข้น 9
การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม 9
สารประกอบทางเคมีและเภสัชวิทยาของสมุนไพร 10
ลิพิด 14
กรดไขมัน 15
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพร 16
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์โดย Diffusion Method 17
ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์โดย Diffusion Method 18
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 21

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3 วิธีดำเนินการวิจัย 24
เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี 24
ขั้นตอนการดำเนินงาน 24
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS 26
การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย 26
4 ผลการศึกษา 28
5 สรุปและอภิปรายผล 33
สรุปและอภิปรายผล 33
ข้อเสนอแนะ 34
บรรณานุกรม 35
ภาคผนวก 38
ภาคผนวก ก 39
ภาคผนวก ข 56
ประวัติย่อของผู้วิจัย 58

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า
2-1 แสดงความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ 10
4-1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดผักเขียดด้วยเทคนิค GC/MS 28
4-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ
ของสารสกัดผักเขียด 31
4-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผักเขียดต่อยีสต์ และเชื้อรา 32

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 ส่วนประกอบของผักเขียด 4
2-2 นิเวศวิทยาของผักเขียด 5
2-3 การสกัดสารด้วยวิธีแพอร์โคเลชัน (Percolation) 8
2-4 ซอกเลตเอกซ์แทรกเตอร์ 8
2-5 โครงสร้าง Cyclopentanoperhydrophenanthrene 14
2-6 การเปรียบเทียบโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัว ไม่อิ่มตัว และแสดงการเกิดรูปแบบของ cis และ tran ของกรดไลโนเลอิก 16
2-7 โครงสร้างทางเคมีของสารใหม่ที่พบในผักเขียดด้วยวิธีโครมาโทรกราฟี 21
2-8 GC-MS โครมาโทแกรมของสารสกัดเอทานอลของผักเขียด *Monochoria vaginalis* 22
2-9 โครงสร้างทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดหยาบผักเขียด (*M.vaginalis*) ที่สกัดด้วยเอทานอล 23
3-1 ผักเขียดแช่ในตัวทำละลายเทิลอะซีเตต 24
3-2 ขั้นตอนการทำวิจัยการสกัดสารจากผักเขียด 25
4-1 สารสกัดหยาบจากผักเขียดหลังระเหยตัวทำระลาย 28
4-2 โครมาโทแกรมของสารสกัดผักเขียดที่ได้จากเครื่อง GC/MS 30
ก-1 โครมาโทแกรมของสารสกัดผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : Wiley7N edition, Retention Time 7.99 minute, Quality: 90 %, Total: 3.77%, ID: Acetic acid 40
ก-2 โครมาโทแกรมของสารสกัดผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched : Wiley7N edition, Retention Time 11.39 minute, Quality: 99 %, Total: 3.077%, ID: Neophytadiene 41
ก-3 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 12.46 minute, Quality: 97 %, Total: 0.307%, ID: 6, 10, 14-trimethyl-2-Pentadecanone 42
ก-4 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 13.88 minute, Quality : 94 %,Total: 0.167, ID: benzoic acid 43
ก-5 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 14.07minute, Quality : 99 %,Total: 0.266%, ID: Laurie acid 44

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ก-6 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 15.28 minute, Quality : 98 %,Total: 0.983%, ID: Myristic acid 45

ก-7 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 15.427 minute, Quality: 99 %, Total: 3.421%, ID: Stearic acid..... 46

ก-8 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 15.80 minute, Quality: 98 %, Total: 0.416%, ID: 12-methyl-tetradecanoic acid..... 47

ก-9 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 16.07 minute, Quality: 97 %, Total: 6.6%, ID: 9-cis-Oleic acid 48

ก-10 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 16.202 minute, Quality: 97 %,Total: 2.136%, ID: trans-Oleic acid..... 49

ก-11 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 17.50 minute, Quality: 91 %,Total: 1.507%, ID: 9-hexadecenoic acid 50

ก-12 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 18.26 minute, Quality: 99 %, Total: 0.773%, ID: margaric acid..... 51

ก-13 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 19.87 minute, Quality: 99 %,Total: 0.773%, ID: stearic acid 52

ก-14 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 17.18 minute, Quality: 99 %,Total: 17.18%, ID: Palmitic acid..... 53

ก-15 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 21.61 minute, Quality: 97 %,Total: 17.59%, ID: Linoleic acid 54

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า
ก-16 โครมาโทแกรมของสารผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 23.14 minute, Quality: 81 %, Total: 5.95%, ID: Methyl linolenate..... 55
ข-1 เครื่องGas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS)..... 57
ข-2 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator)..... 57

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในสมัยโบราณคนไทยมักจะเก็บผักพื้นบ้านจากริมรั้วบ้านป่า ไร่ นา หรือสวน มาประกอบอาหาร ผักสดจะมีคุณค่าอาหารสูง ดังนั้นคนไทยจึงนำผักบางชนิดที่สามารถรับประทานสดได้ นำมารับประทานคู่กับน้ำพริก ซึ่งได้วิตามินซี และเกลือแร่อื่น ๆ สูง ในบางชนิดอาจจะเป็นอันตราย ถ้านำมารับประทานแบบสด จึงนำมาลวก ต้ม ตามภูมิปัญญาดั้งเดิม ผักพื้นบ้านซึ่งนอกจากจะนิยมนำมาบริโภคเป็นอาหารแล้ว ส่วนใหญ่ยังมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร เนื่องจากมีรสยาที่หลากหลายอยู่ในผักพื้นบ้าน ตามทฤษฎีการแพทย์แผนไทย ให้ความสำคัญกับรสอาหารพื้นบ้าน พืชผักพื้นบ้านของไทยที่มีสรรพคุณเป็นสมุนไพรก็มีมากมายหลากหลายชนิด มีการศึกษาการใช้สมุนไพรเป็นยารักษาโรค หรือศึกษาการสกัดสมุนไพรเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางด้านชีวภาพ เช่นการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา เป็นต้น

ผักเขียดหรือจัดเป็นวัชพืชน้ำ พบทั่วไปในบริเวณที่มีน้ำขัง ซึ่งสามารถพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศ การนำผักเขียดมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ เช่น ด้านอาหารโดยนำยอดอ่อน ใบอ่อน และดอก ซึ่งจะออกในช่วงหน้าฝน รับประทานเป็นผัก นิยมรับประทานทั้งต้น มักเก็บช่วง 2-3 อาทิตย์แรกเท่านั้น สรรพคุณทางยา ของผักเขียด นำมาคั้นน้ำรับประทาน แก้ไอ ขับปัสสาวะ ตำพอกฝี หรือรับประทานใบสดจะมีสรรพคุณ ช่วยลดความร้อนในร่างกาย

ผู้วิจัยจึงได้สนใจในการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของสารที่มีในผักเขียดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด และนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (GC/MS) พร้อมทั้งทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทางการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disc diffusion

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผักเขียด
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบจากผักเขียด

สมมติฐานของการวิจัย

1. ค้นพบองค์ประกอบหลักทางเคมีที่สำคัญ และเป็นสารเคมีซึ่งมีปริมาณมากอยู่ในผักเขียด
2. สารสกัดจากผักเขียดมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย รา และยีสต์ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบของก้านผักเขียดที่แช่ในตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด
2. ทำให้ทราบฤทธิ์ทางชีวภาพของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบของผักเขียดที่แช่ในตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของต้นผักเขียดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตดจนได้สารสกัดหยาบ แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (GC/MS) โดยเก็บตัวอย่างต้นขาเขียดจากหมู่บ้านเกาะทองสม หมู่ 15 ตำบลโคกม่วง อำเภอเขาชัยสน จังหวัดพัทลุง เมื่อวันที่ 15 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2555
2. ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก *Staphyllococcus aureus, Bacillus cereus* แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* โดยมี Ampicillin, Streptomycin และ Cefotaxime เป็น Positive Control ยีสต์ *Candida albicans* และเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยมี Cycloheximide, Nysatatin และ Fluconazole เป็น Positive Control ด้วยวิธี Agar disc diffusion

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. GC/MS คือเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี
2. Crude extract คือ สารสกัดหยาบ ในงานวิจัยนี้คือสารสกัดหยาบของผักเขียด

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผักเขียด

ผักเขียดมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Monochoria vaginalis* วงศ์ (Family) Pontederiaceae ชื่อเรียกอื่น ๆ ขากบขาเขียด นิลบล ผักเขียด ขาเขียด (ภาคกลาง) ผักเป็ด (ชลบุรี) ผักริ้น (ภาคใต้) ผักฮี้น ผักฮี้นน้ำ (ภาคเหนือ) ผักอีฮิน ผักอีฮินใหญ่ ผักริ้นน้ำ ผักฮี้น (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) (ก่องกานดา ชยามฤต และนันท์นภัส ภัทรหิรัญไตรสิน, 2551) ผักเขียด *(M. Vaginalis)* จัดเป็นพืชในวงศ์ผักตบชวา (Pontederiaceae) ซึ่งพืชในวงศ์นี้จัดเป็นพืชน้ำจืดทั้งหมด ผักเขียด *(M. Vaginalis)* มีตลอดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีน ญี่ปุ่น อินเดีย มาเลเซีย (Boonkird, 1975; Burkill, 1966; Hooker, 1894) มีการเจริญเติบโตแบบรากหยั่งยึดดินที่เป็นโคลตมในนาข้าว หรือที่ลุ่มน้ำขัง ตามคลอง หนองบึงต่าง ๆ โดยสามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำและบนบกที่มีน้ำขัง (Anonymous, 1962; Handerson, 1954)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของผักเขียด

ผักเขียด *(M. Vaginalis)* มีลำต้นตรง หรือบางต้นอาจเลื้อยทอดนอนเล็กน้อย และมีลักษณะเป็นเหง้า (Rhizome) หรือเป็น Rootstock สั้น ๆ (Hooker, 1894) ก้านใบเรียวยาวความยาวประมาณ 9-85 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2-1(ค)) Hooker (1894) กล่าวว่า แผ่นใบมีรูปร่างแตกต่างกันจากรูปร่างเรียวยาว (Linear) ไปจนถึงรูปไข่ (Ovate) และรูปหัวใจแกมรูปไข่ (Ovate cordate) Mahershwar (1963) แผ่นใบมีลักษณะเป็นรูปไข่ (Ovate) (ภาพที่ 2-1(ก)) หรืออาจมีลักษณะเป็นรูปหอกแกมรูปไข่ (Ovate lenceolate) ปลายใบแหลม ขนาด 6-13 x 2.5-5 เซนติเมตร ดอกเป็นช่อแบบ Raceme (Alston, 1938) (ภาพที่ 2-1(ข)) ก้านดอกยาว 2.5-25 มิลลิเมตร ช่อดอกหนึ่ง ๆ ประกอบด้วยดอกย่อยสีขาว หรือสีน้ำเงิน มีตั้งแต่ 2-3 ดอก หรือมากกว่า ก้านดอกยื่นออกจากก้านใบด้านบน กลีบรวมมี 6 แฉก (Lobe) แต่ละกลีบยาว 11-15 มิลลิเมตร ด้านนอกของกลีบมีสีเขียว เกสรตัวผู้ มี 6 อัน โคนติดกันเป็นแผงตั้งอยู่บนฐานรองดอก (Receptacle) เกสรตัวเมียมีรังไข่อยู่เหนือโคนกลีบรวม (Superior overy) สีเขียวรูปร่างยาวรี เกสรตัวเมีย 1 อันสีม่วงยาว 0.4 เซนติเมตร ปลายโค้งงอ ตรงกลางคอดเล็กน้อย ยอดเกสรตัวเมียแยกเป็น 6 แฉกสีม่วงอ่อน รากมีลักษณะเป็นรากฝอย (ภาพที่ 2-1(ค)) มีจำนวนมาก สีค่อนข้างขาวน้ำตาลแดง รากแขนงที่เกิดขึ้นรอบๆ มีขนาดเล็ก และเกิดห่าง ๆ

(ก)

(ข)

(ค)

ภาพที่ 2-1 ส่วนประกอบของผักเขียด
(ก) ลักษณะใบผักเขียด
(ข) ดอกผักเขียด
(ค) รากและก้านใบผักเขียด

นิเวศวิทยาของผักเขียด

ผักเขียด เป็นพืชที่มีขนาดเล็ก มีรากยึดกับดินที่เป็นโคลนตม พบมากในนาข้าวที่มีน้ำขัง เช่น นาดำ และตามหนองน้ำที่มีระดับน้ำไม่ลึก (ภาพที่ 2-2) จะเจริญอยู่ในที่มีน้ำขังเท่านั้น หากน้ำแห้งมาก ผักเขียดจะตายทันที ในนาข้าวเมื่อถึงฤดูดำนามีน้ำขัง ปุ๋ยอย่างดี เมล็ดผักเขียดที่ตกหล่นอยู่ในดินจากฤดูที่ผ่านมาจะงอกเป็นต้นอ่อนและจะเจริญอย่างรวดเร็ว แตกกอเป็นกอใหญ่แทรกปะปนในระหว่าต้นข้าว พร้อมทั้งออกดอกและออกผลทิ้งเมล็ดไว้ เมื่อข้าวเริ่มแก่ และน้ำใน

นาข้าวแห้งผักเขียดจะเริ่มตาย ในแหลงน้ำตื้น ๆ เช่นหนองน้ำที่ผักเขียดเจริญอยู่จะมีลักษณะลำต้นยาว แผ่นใบและก้านใบจะมีลักษณะอวบน้ำ ดินที่เหมาะในการเจริญเติบโตของผักเขียดคือดินเหนียวที่มีลักษณะเป็นโคลนตม และสามารถเจริญร่วมกับพืชอื่น ๆ เช่น กก หญ้า แพงพวยน้ำ ตับเต่านา และที่สำคัญคือต้นข้าว จึงถือว่าผักเขียดเป็นวัชพืชอย่างหนึ่งในนาข้าว

ภาพที่ 2-2 นิเวศวิทยาของผักเขียด
(ที่มา: www.biogang.net)

ประโยชน์ของผักเขียด

1. ประโยชน์ทางอาหาร ใช้ประโยชน์จากส่วนที่เป็นผักตามฤดูกาล เช่นยอดอ่อน ใบอ่อนและดอก ใช้รับประทานเป็นผัก สำหรับยอดอ่อน ใบอ่อน และดอกจะออกในช่วงหน้าฝน ผักเขียดนิยมรับประทานช่วงยังอ่อนโดยถอนทั้งต้น มักเก็บรับประทานช่วง 2-3 อาทิตย์แรกเท่านั้น หลังจากนั้นต้นจะแก่ รับประทานไม่อร่อย ชาวไทยทุกภาคนิยมรับประทานผักเขียดเป็นอาหารในรูปของผัก สำหรับวิธีรับประทานเป็นอาหาร จะรับประทานเป็นผักสดร่วมกับน้ำพริก หรือ กับแกง รสจัดของภาคใต้ หรืออาหารรสจัดประเภท ลาบ ยำ ก้อย ส้มตำได้ นอกจากนี้ยังนำไปแกงส้ม แกงกับปลา หรือเนื้อหมูก็ได้

2. ประโยชน์ต่อสุขภาพ ผักเขียดมีรสจืด เย็น จึงเหมาะที่จะรับประทานเพื่อลดความร้อนในร่างกาย สรรพคุณทางยาของผักเขียด นำมาคั้นน้ำรับประทาน แก้ไอ ขับปัสสาวะ ตำพอกฝีหรือรับประทานใบสดจะมีสรรพคุณ ช่วยลดความร้อนในร่างกาย ผักเขียด 100 กรัม ให้พลังงานต่อร่างกาย 13 กิโลแคลอรี ประกอบด้วย เส้นใย 0.8 กรัม แคลเซียม 13 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 6 มิลลิกรัม เหล็ก 2 มิลลิกรัม วิตามินเอ 3000 IU วิตามินบีหนึ่ง 0.04 มิลลิกรัม วิตามินบีสอง 0.10 มิลลิกรัม ไนอาซิน 0.1 มิลลิกรัม วิตามินซี 18 มิลลิกรัม

พืชสมุนไพร (Medicinal plant หรือ Herb)

ตามพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พ.ศ. 2525 คำว่า สมุนไพร หมายถึง พืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยา สมุนไพร กำเนิดมาจากธรรมชาติและมีความหมายต่อชีวิตมนุษย์ โดยเฉพาะ ในทางสุขภาพ หมายถึง ทั้งการส่งเสริมสุขภาพ และการรักษาโรคแต่ความหมายตามตำรายาไทย หมายถึง ยาที่ได้จากพฤษชาติ สัตว์ หรือแร่ ซึ่งมิได้ปรุงแต่งหรือแปรสภาพ ความหมายตามพระราชบัญญัติสมุนไพร หมายถึง ยาที่ได้จากสัตว์หรือแร่ ซึ่งยังมิได้ผสม ปรุง หรือแปรสภาพ สมุนไพรนอกจากจะใช้เป็นยาแล้ว ยังใช้ประโยชน์เป็นอาหาร ใช้เตรียมเป็นเครื่องดื่มใช้เป็นอาหารเสริม เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ใช้แต่งกลิ่น แต่งสีอาหารและยา ตลอดจนใช้เป็นยาฆ่าแมลงอีกด้วย ในทางตรงกันข้าม สมุนไพรจำนวนไม่น้อยที่มีความเป็นพิษถ้าใช้ไม่ถูกวิธีหรือใช้เกินขนาดอาจทำให้เสียชีวิตได้ ดังนั้นจึงควรใช้ด้วยความระมัดระวัง และใช้อย่างถูกต้อง (รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2550)

สมุนไพร หมายถึง “พืชที่ใช้ทำเป็นเครื่องยา” การที่จะนำสมุนไพรไปใช้หรือทดสอบจริงในตัวสัตว์ทดลอง ต้องเลือกชนิดของสมุนไพรที่ผ่านการพิสูจน์มาแล้ว และที่สำคัญคือ ต้องมี การทดลองในหลอดทดลองหรือในห้องปฏิบัติการมาก่อน (ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร และคณะ, 2551)

คุณสมบัติของสมุนไพร

1. ทำลายหรือยับยั้งเชื้อโรค
2. ส่งเสริมการสร้างภูมิคุ้มกันโรค
3. บรรเทาอาการเจ็บป่วยและปรับสภาพร่างกายให้เป็นปกติ
4. มีผลข้างเคียงหรือตกค้างน้อยมาก เนื่องจากเป็นสารธรรมชาติ

สมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐานส่วนใหญ่เป็นพืชสมุนไพร พืช หรือ ต้นไม้ มีองค์ประกอบสำคัญ 5 ส่วน คือ ราก ลำต้น ใบ ดอก และผล ส่วนของพืชเหล่านี้มีรูปร่าง ลักษณะโครงสร้าง และบทบาท ต่อพืชที่แตกต่างกัน การนำสมุนไพรมาใช้เป็นยาต้องคำนึงถึง ธรรมชาติของสมุนไพรแต่ละชนิด พันธุ์สมุนไพร ชื่อสามัญ ชื่อท้องถิ่น ชื่อวิทยาศาสตร์ สภาวะ แวดล้อมในการปลูก ฤดูกาล และช่วงเวลาที่เก็บสมุนไพร นับเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดคุณภาพ ของสมุนไพร และสิ่งสำคัญ คือ ต้องมีการตรวจสอบเอกลักษณ์ว่าใช่สมุนไพรที่ต้องการ การ เก็บตัวอย่างในระยะเวลาที่เหมาะสม ระวังการปนเปื้อน ระวังเรื่องพืชเป็นโรค และการตาก สมุนไพรต้องไม่ใช้อุณหภูมิสูงเกินไป ระวังเรื่องการเก็บรักษาให้สะอาด แห้ง การระบายดี และ ป้องกันเชื้อรา

สมุนไพรที่ถูกนำมาศึกษาส่วนใหญ่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพได้กว้าง กล่าวคือ สารเคมีที่อยู่ในสุมนไพรมีฤทธิ์ในการป้องกันการติดเชื้อ และสามารถฆ่าเชื้อโรคได้ ดังนั้นการนำสมุนไพรไปใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างเหมาะสมจึงอาจจะไม่ได้เกิดจากสารสำคัญเพียงชนิดเดียว แต่เกิดจากการ

ทำงาน / ออกฤทธิ์ของสารประกอบหลายชนิดร่วมกัน ถ้าสมุนไพรที่ใช้ไม่ใช่พืช อาหารควรต้องดูหลักฐานว่าปลอดภัยหรือไม่ โดยพิจารณาดูจากการทดสอบความเป็นพิษ ขนาดที่ใช้ และระยะเวลาที่ปลอดภัยก่อนนำผู้บริโภค

ในกระบวนการสกัดสมุนไพรมีสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ ควรทราบว่าตัวทำละลาย ชนิดใดที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการสกัดเพื่อให้ได้สารสำคัญที่สนใจในปริมาณมาก และที่ สำคัญไปกว่านั้นคือ ต้องสามารถกำจัดตัวทำละลายดังกล่าวออกจากสารสกัดสมุนไพรจนหมด หรือ เหลือตกค้างน้อยที่สุด และควรเป็นกรรมวิธีที่มีผลทำให้เกิดการสูญเสียสารออกฤทธิ์น้อยที่สุดด้วย ตัวอย่างการสกัดสมุนไพร เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล

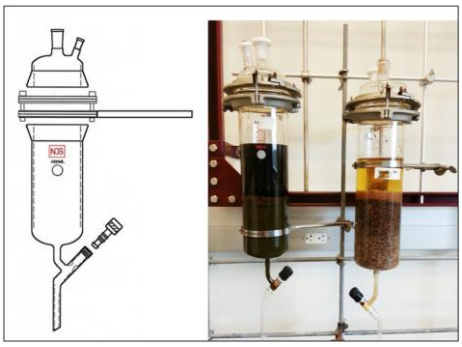
การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร

นันทวัน บุญยะประภัศร (2534) กล่าวว่าสารสกัดสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารสกัด คุณสมบัติของสารทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ได้แก่

1. มาเซอเรชัน (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยการหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายจนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่ม และตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้โดยการหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิท ในการสกัดจะใช้เวลานาน 7 วัน หรือตามกำหนดในเภสัชหรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลายออกมาหมด ระหว่างทำการหมักนั้น ควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราวเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกากออกจากตัวทำละลายการสกัดแบบนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้างหรือเนื้อเยื่อไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีใช้นำยาสกัดน้อย จึงประหยัด และเนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อนจึงเหมาะกับการสกัดสารที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่วิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์ เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของน้ำยาสกัดเมื่อสารในสมุนไพรละลายออกมาได้ระดับหนึ่งจะเกิดความสมดุลขององค์ประกอบภายในสมุนไพรและน้ำยาสกัดที่ใช้ ทำให้อัตราเร็วของการสกัดชะงักลง จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้สกัดในกรณีที่ต้องการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรจนสมบูรณ์

2. เพอร์โคเลชัน (Percolation) (ภาพที่ 2-3) เป็นขบวนการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่าเพอร์โคเลเตอร์ (percolator) นำผงสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลายพอชื้นทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พองตัวเต็มที่ แล้วค่อยๆบรรจุผงสมุนไพรทีละชั้นลงในเพอร์โคเลเตอร์ เติมตัวทำละลายลงไปให้ระดับตัวทำละลายสูงเหนือสมุนไพร (Solvent head) ประมาณ 0.5 ซม. ทิ้งไว้ 24 ชม. จึงเริ่มไขเอาสารสกัดออก โดยคอยเติมตัวทำละลายเหนือสมุนไพรอย่าให้แห้ง เก็บสารสกัด

จนการสกัดสมบูรณ์ บีบเอากากเอาสารสกัดออกให้มากที่สุด นำสารสกัดที่เก็บได้ทั้งหมดรวมกันนำไปกรอง



ภาพที่ 2-3 การสกัดสารด้วยวิธีแพอร์โคเลชัน (Percolation)
(ที่มา: www.mdpi.com)

3. ซอกเลตเอกซ์แทรกเตอร์ (Soxhlet extractor) (ภาพที่ 2-4) เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในภาชนะระเหยขึ้นไป แล้วกลั่นตัวลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน Extracting chamber สูงถึงระดับจะเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในภาชนะด้วยวิธีกาลักน้ำ ขวดภาชนะนี้ได้รับความร้อนจาก เครื่องให้ความร้อน (Heating mantle) หรือหม้ออังไอน้ำ (Water bath) ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปทิ้งสารสกัดไว้ในภาชนะ ตัวทำละลายเมื่อกระทบเครื่องควบแน่น (Condenser) จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว

ภาพที่ 2-4 ซอกเลตเอกซ์แทรกเตอร์
(ที่มา: www.chemistryland.com)

4. ลิควิด-ลิควิดเอกซ์แทรกเตอร์ (Liquid-liquid extractor) เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรกแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

4.1 เอกซ์แทรกเตนท์ ไลท์เตอร์ (Extractant lighter) คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดเบากว่าตัวทำละลายที่ใช้ละลายสาร

4.2 ราฟฟิเนท ไลท์เตอร์ (Raffinate lighter) คือตัวทำละลายที่ใช้สกัดหนักกว่าตัวทำละลายที่ใช้สารละลาย

การทำสารสกัดให้เข้มข้น

นันทวัน บุญยะประภัศร (2534) กล่าวว่าเมื่อสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมแล้ว สารสกัดที่ได้มักจะมีปริมาตรและเจือจาง ทำให้นำไปแยกส่วนได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนซึ่งอาจทำได้หลายวิธี คือ

1. การระเหย (Free evaporation) คือการระเหยให้แห้งโดยใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ (Water bath) หรือแท่นให้ความร้อน (Hot plate) บางครั้งอาจเป่าเป็นอากาศร้อนลงไปในสารสกัดด้วยเพื่อให้ระเหยเร็วขึ้น

2. การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (Distillation *in vacuo*) เป็นวิธีการระเหยแห้งโดยกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำและลดความดันเกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ Vacuum pump เครื่องมือนี้เรียกว่า Rotary evaporator ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ Distillation flask, Condenser และ Receiving flask โดย Distillation flask จะหมุนทำงานอยู่ตลอดเวลาที่ทำงาน และแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำเพื่อให้การกระจายของความร้อนทั่วถึงและสม่ำเสมอ เครื่องที่ดีควรมีระบบสุญญากาศที่ดี ระยะระหว่าง Distillation flask และ Condenser สั้น และมีระบบทำความเย็นของ Condenser ที่ดี

3. การแช่แข็ง (Freezing) ถ้าเป็นการสกัดด้วยน้ำใช้ Lyophilizer แต่ถ้าเป็นตัวทำละลายอื่นเฉพาะตัวทำละลายเท่านั้นที่แข็ง ซึ่งเราแยกออกจาก Concentrated extract โดย Centrifuge

4. อัลตราฟิลเทรชั่น (Ultrafitration) เป็นการสกัดด้วยน้ำโดยใช้ Membrane ใช้กับสารที่มี Molecular weight สูงกว่า 5,000

การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม

ในการสกัดสารสำคัญจากพืชนั้น จะต้องเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการจะแยก ซึ่งมีหลักที่ควรพิจารณาในการเลือกตัวทำละลาย ดังต่อไปนี้

1. คุณสมบัติของสารที่ต้องการสกัด เช่น ความมีขั้วของสาร ความคงตัวของสารในตัวทำละลายนั้นในอุณหภูมิสูง

2. มีความสามารถในการละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดี
3. ไม่ละลายปนเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายของสารผสมที่ถูกสกัดนั้น
4. ไม่ควรละลายสิ่งเจือปนหรือสารที่ไม่ต้องการ
5. สามารถแยกออกจากตัวถูกละลายได้ง่ายภายหลังที่สกัดแล้ว
6. ไม่ควรทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด
7. ตัวทำละลายควรมีราคาไม่แพงมาก

ความมีขั้วของตัวทำละลายต่าง ๆ ที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญจากพืชแสดงดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ความมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ

ความมีขั้ว	**ตัวทำละลาย**
ไม่มีขั้ว	ปิโตรเลียมอีเทอร์
	เฮกเซน
	คาร์บอนเตตระคลอไรด์
	เบนซีน
	ไดคลอโรมีเทน
	คลอโรฟอร์ม
	ไดเอทิลอีเทอร์
	เอทิลแอซิเตต
	อะซิโตน
	1- โพรพานอล
	เอทานอล
	เมทานอล
มีขั้ว	น้ำ

สารประกอบทางเคมีและเภสัชวิทยาของพืชสมุนไพร

ตามทัศนะของวงการวิทยาศาสตร์สมัยใหม่เชื่อว่า ในพืชสมุนไพรซึ่งเป็นสิ่งที่เป็นยารักษาโรคมานาน ประกอบด้วยสารประกอบทางเคมีหลายชนิด แต่ละส่วนของพืชสมุนไพรมีสารประกอบที่แตกต่างกันออกไป สารเหล่านี้เป็นตัวกำหนดสรรพคุณของพืชสมุนไพร ชนิด และปริมาณของสารจะแปรตามชนิดของพันธุ์สมุนไพร สภาพแวดล้อมที่ปลูกและช่วงเวลาที่เก็บพืช

สมุนไพร นักวิทยาศาสตร์ได้นำความรู้ และวิธีการทางเคมีมาค้นคว้าวิจัย สารเคมีที่มีฤทธิ์ในพืชสมุนไพร ทำให้ทราบรายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้าง ลักษณะ วิธีการสกัด การจำแนกและการตรวจสอบสารเหล่านั้นนอกจากนี้ยังใช้ขบวนการวิทยาศาสตร์มาค้นคว้าสมุนไพรด้านเภสัชวิทยา พิษวิทยา การพัฒนารูปแบบยา การทดสอบทางเภสัชจลนศาสตร์ และการวิจัยทางคลินิกอีกด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ได้ยาที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการรักษาโรค สารประกอบทางเคมี ในพืชสมุนไพร จำแนกได้เป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ

Primary metabolite (สารปฐมภูมิ) เป็นสารที่มีอยู่ในพืชขั้นสูงทั่วไป พบในพืชทุกชนิด เป็นผลิตผลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) เช่น คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน เม็ดสี (pigment) และเกลืออนินทรีย์ (Inorganic salt) เป็นต้น

Secondary metabolite (สารทุติยภูมิ) เป็นสารประกอบที่มีลักษณะค่อนข้างพิเศษ พบต่างกันในพืชแต่ละชนิด คาดหมายว่าเกิดจากขบวนการชีวสังเคราะห์ (Biosynthesis) ที่มีเอมไซม์ เข้าร่วมในปฏิกิริยา สารประกอบประเภทนี้ได้แก่ อัลคาลอยด์ (Alkaloid) แอนทราควิโนน (Anthraquinone) และน้ำมันหอมระเหย (Essential oil) เป็นต้น

ส่วนใหญ่สารพวก Secondary metablite จะมีสรรพคุณทางยา แต่ก็มิได้แน่นอนตายตัวเสมอไป จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารพวก primary metabolite บางตัวก็ออกฤทธิ์ในการรักษาโรคได้เช่นกัน และยังมีข้อสังเกตอีกว่าสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางยาในพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งอาจมิใช่เพียงตัวเดียว อาจมีหลายตัวก็ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีความเข้าใจที่ถ่องแท้จึงจะสามารถสกัดสารที่มีฤทธิ์ทางยามาใช้ได้ ตัวอย่างสารทุติยภูมิที่สำคัญ ได้แก่

1. อัลคาลอยด์ (Alkaloid) อัลคาลอยด์เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจน (nitrogen) เป็นส่วนประกอบมีรสขม ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เป็นสารที่พบมากในพืชสมุนไพร แต่ปริมาณสารจะต่างกันไปตามฤดูกาล สารประเภทนี้จะมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหลายระบบ ตัวอย่างเช่น Reserpine ในรากระย่อม สรรพคุณลดความดันเลือด สาร Quinine ในเปลือกต้นซิงโคนา (Cinchona) มีสรรพคุณรักษาโรคมาเลเรีย และสาร Morphine ในยางของผลฝิ่นมีสรรพคุณระงับอาการปวด เป็นต้น

2. น้ำมันหอมระเหย (Volatile oil หรือ Essential oil) เป็นสารที่อยู่ในพืช มีลักษณะเป็นน้ำมันที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation) มีกลิ่นรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิปกติ เบากว่าน้ำ น้ำมันนี้เป็นส่วนผสมของสารเคมีหลายชนิด มักเป็นส่วนประกอบของพืชสมุนไพรที่เป็นเครื่องเทศ คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา มักเป็นด้านขับลมและฆ่าเชื้อโรค (Antibacterial และ Antifungal) พบในพืชสมุนไพร เช่น กระเทียม ขิง ข่า ตะไคร้ มะกรูด ไพล ขมิ้น เป็นต้น

3. ไกลโคไซด์ (Glycoside) เป็นสารประกอบที่พบมากในพืชสมุนไพร มีโครงสร้างแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาล กับส่วนที่ไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เรียกชื่อว่า Aglycone (หรือ Genin) การที่มีน้ำตาล ทำให้สารนี้ละลายน้ำได้ดี ส่วน Aglycone เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง และเภสัชวิทยาแตกต่างกันไป และส่วนนี้เองที่ทำให้คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของ Glycoside แตกต่างกันไป และทำให้แบ่ง Glycoside ได้เป็นหลายประเภท เช่น

-Cardiac glycoside เป็นไกลโคไซด์ที่ออกฤทธิ์ต่อกล้ามเนื้อหัวใจโดยตรง โดยมีผลไปกระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้บีบตัวแรงขึ้น แต่จะเต้นช้าลง สารกลุ่มนี้มีความสำคัญทางการแพทย์ ใช้รักษาโรค Congestive heart failure โดยเริ่มการใช้กันมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1785 ในตำรายาของตะวันตกมีการใช้คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ จากพืชในสกุล *digitalis* หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีการนำพืชที่มีคาร์ดิแอกไกลโคไซด์มาใช้ทำน้ำยาสำหรับลูกดอกอาบยาพิษร่วมกับสารพิษจากพืชชนิดอื่น ๆ

-Anthraquinone glycoside มีฤทธิ์เป็นยาระบาย (laxative) ยาฆ่าเชื้อ (antibiotic) และสีย้อม สารนี้มีในใบชุมเห็ดเทศ เมล็ดชุมเห็ดไทย ใบขี้เหล็ก ใบมะขามแขก เป็นต้น

-Saponin เป็นสารประกอบพวกไกลโคไซด์ ซึ่งละลายน้ำได้ พบกระจายทั่วไปในพืชชั้นสูง และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเล ซาโปนินเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ เมื่อถูกการแยกสลายด้วยกรดจะได้ส่วน Aglycone หรือ Genin ซึ่งเรียกว่า Sapogenin ส่วนใหญ่จะมีรสเผ็ดขม หรือเฝื่อน แต่บางชนิดมีรสหวาน เช่น ที่พบในชะเอมเทศ ซาโปนิน มีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ ลดแรงตึงผิวของน้ำ เมื่อนำซาโปนิน มาละลายน้ำแล้วเขย่าจะเกิดฟอง สมบัตินี้เป็นที่รู้จัก และใช้ประโยชน์กันมาแต่โบราณ โดยใช้เป็นสารซักฟอก

-Flavonoid glycoside เป็นสีที่พบในดอกและผลของพืช ทำเป็นสีย้อมหรือสีแต่งอาหาร บางชนิดใช้เป็นยา เช่น สารสีในดอกอัญชัน

4. แทนนิน (Tannin) เป็นสารที่พบในพืชทั่วไป มีรสฝาด มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน และสามารถตกตะกอนโปรตีนได้มีฤทธิ์ฝาดสมาน และฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย พบในใบฝรั่ง เนื้อของกล้วยน้ำว้าดิบ ยังมีสารอินทรีย์ที่พบในพืชทั่วไป เช่น คาร์โบไฮเดรท ไขมัน กรดอินทรีย์ สเตอรอยด์ สารเรซิน สารกัม (gum) วิตามิน แต่บางอย่างก็มีฤทธิ์ทางยา เช่น น้ำมันละหุ่งให้เป็นยาระบาย เป็นต้น

5. คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrates) ได้แก่ สารจำพวก แป้ง น้ำตาลและเซลลูโลส (Cellulose) ซึ่งเป็นกากใยอาหารอยู่ในพืชรวมทั้งวุ้น และสารจำพวก กัม (Gum) และมิวซีเลท (mucilage) ต่าง ๆ คาร์โบไฮเดรตมักเป็นสารที่พืชเก็บไว้ในรูปของแป้ง โดยเก็บไว้ในบริเวณส่วนหัว ราก ใบ และเมล็ด เป็นต้น ประโยชน์ที่ได้จากสารพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น เป็นแหล่งพลังงาน กากใยในพืชช่วยในการขับถ่าย หรือวุ้นใช้เป็นยาระบาย เป็นต้น

6. ไขมัน (Lipids) ประกอบด้วย (Wax) และน้ำมันไม่ระเหย (Fix oils) ตัวอย่างของน้ำมันไม่ระเหยได้แก่ น้ำมันจากเมล็ดพืช น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันเหล่านี้บางชนิดใช้เป็นอาหาร บางชนิดใช้เป็นยาระบาย

7. เรซินและบาลซัม (Resins and balsams) หมายถึง สารกลุ่มที่ประกอบด้วยเรซิน และสารประกอบที่มีเรซินเป็นองค์ประกอบ เป็นสารประกอบที่มีรูปร่างไม่แน่นอน มักเปราะ แตกง่าย แต่บางชนิดอาจนิ่มเมื่อเผาไฟจะหลอมเหลวได้สารใส ข้นและเหนียว เช่น ชันสน

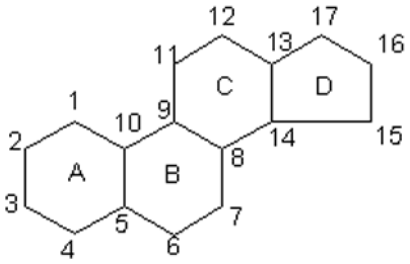
8. โปรตีน-กรดอะมิโน (Protein-amino acid) โปรตีนเป็นสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกรดอะมิโน มาจับกันเป็นโมเลกุลใหญ่มีประโยชน์บำรุงร่างกายแต่โปรตีนบางชนิดมีพิษ เช่น โปรตีนจากเมล็ดละหุ่ง และเมล็ดละหุ่งตาหนู

9. เอนไซม์ (Enzymes) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 13,000 ถึง 840,000 ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ

10. น้ำมันหอมระเหย (Volatile oils) เป็นสารที่มีลักษณะเป็นน้ำมันที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำมีกลิ่นเฉพาะ ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิปกติเป็นส่วนผสมของสารเคมีหลายชนิดมักเป็นส่วนประกอบพืชสมุนไพร ที่เป็นเครื่องเทศและเครื่องหอม มักใช้เป็นยาขับลม และฆ่าเชื้อโรค เช่น น้ำมันหอมระเหยในกระเทียม ขิง มะกรูด เป็นต้น ตัวอย่างของสารประกอบเคมีที่สำคัญในน้ำมันหอมระเหย เช่น การบูร (Camphor) บอร์นีออล (Borneol)

11. แอนทราควิโนน (Antraquinones) เป็นสารจำพวกสารประกอบ Quinines เป็นสารที่พบในธรรมชาติมีสีเหลือง ส้ม แดงเข้ม จนเกือบถึงดำ แต่ไม่ได้มีส่วนแต่งสีสันให้กับธรรมชาติเหมือนสารสี (Pigments) อื่นๆ เช่น Flavanoids หรือ Anthocyanins สารประกอบ Quinines มีโครงสร้างเป็น (Aromatic diketone) ประกอบด้วยวงแหวนเบนซีน (Benzene ring) ตั้งแต่ 1 ขึ้นไป และมีหมู่คีโตน 2 หมู่ อยู่ในตำแหน่งพาราซึ่งกันและกัน ควิโนนพบในธรรมชาติทั้งรูปแบบอิสระและรูปแบบไกลโคไซด์ ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ด้วยกรด-ด่าง หรือเอนไซม์ สีของ Quinines จะเปลี่ยนได้ตาม pH โดยในกรด สีของ Quinines จะออกสีเหลือง หรือสีส้ม และจะเปลี่ยนไปทางสีแดงเมื่ออยู่ในด่าง Quiones ที่ใช้ประโยชน์ทางยาจะมีฤทธิ์แก้โรคผิวหนัง กลาก เกลื้อน ใช้เป็นยาระบายและยาถ่าย

12. สเตอรอยด์ (Steroids) (ภาพที่2-5) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เกิดจากไอโซพรีน 6 หน่วย มาเชื่อมต่อกัน และมีโครงสร้างหลักเป็น Cyclopentanoperhydrophenanthrene ซึ่งวงแหวน A, B และ C จะอยู่ในลักษณะ Chair conformation การเชื่อมต่อกันระหว่างวงแหวน A และ B จะมีได้ 2 แบบ คือ *trans-* และ *cis-* การแบ่งกลุ่มของสเตอรอยด์ จากธรรมชาติตามแหล่งที่มา และฤทธิ์ทางชีวภาพ



ภาพที่ 2-5 โครงสร้าง Cyclopentanoperhydrophenanthrene
(ที่มา: http://www.promma.ac.th/chemistry)

13. ลิพิด (Lipid) ซึ่งพบในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ในที่นี้จะขอกล่าวถึงลิพิดเพิ่มเติมดังต่อไปนี้

ลิพิด คือ สารอินทรีย์ที่มีสมบัติไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วเล็กน้อย เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เฮกเซน และ อัลกอฮอลล์ เป็นต้น ทั้งนี้ยกเว้นกรดบิวทีริกซึ่งเป็นกรดไขมันขนาดเล็กที่สุดซึ่งละลายในน้ำได้ โมเลกุลของลิพิดประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และ ออกซิเจน อาจมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเล็กน้อย ลิพิดพบทั้งในพืชและสัตว์เช่น พบในผลปาล์มและพืชเมล็ด เช่น ถั่วเหลือง งา เมล็ดทานตะวัน เป็นต้นในสัตว์พบในชั้นใต้ผิวหนังและเครื่องในสัตว์ ทำหน้าที่เป็นฉนวนความร้อนแก่ร่างกาย เป็นสารอาหารที่ให้พลังงานสูงกว่าสารอาหารชนิดอื่น คือให้พลังงาน 9 แคลอรี่ต่อกรัม และทำหน้าที่เป็นตัวละลายวิตามินบางชนิด คือ วิตามินเอ วิตามินดี วิตามินอี และวิตามินเค

ประเภทของลิพิด

ลิพิด แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามโครงสร้างคือ

1. ลิพิดอย่างง่าย (Simple lipid) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน และอัลกอฮอลล์ ชนิดต่าง ๆ ซึ่งยังแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ ไขมัน และขี้ผึ้ง ไขมัน (Fat) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน กับกลีเซอรอล ซึ่งเป็นอัลกอฮอลล์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ ถ้ามีกรดไขมันเพียง 1 โมเลกุลรวมตัว กับกลีเซอรอล เรียกว่า มอนอกลีเซอไรด์ ถ้ามีกรดไขมัน 2 และ 3 โมเลกุล รวมตัวกับกลีเซอรอล เรียกว่า ไดกลีเซอไรด์ และไตรกลีเซอไรด์ ตามลำดับ ดังโครงสร้างด้านล่าง ถ้ามีสถานะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องเรียกว่าไขมัน แต่ถ้าเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้องเรียกว่า น้ำมัน เช่น น้ำมันที่ได้จากพืชและสัตว์ทั่วไป

2. ลิพิดเชิงประกอบ (Compound lipid) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน และกลีเซอรอล มีสารอื่นรวมอยู่ด้วย จึงจำแนกออกเป็นชนิดต่างๆ คือ ฟอสโฟลิพิด ไกลโคลิพิด และลิพิดเชิงประกอบอื่นๆ

3. อนุพันธ์ลิพิด (Derived lipids) เป็นสารประกอบลิพิดอื่นๆ ที่ไม่อยู่ในสองกลุ่มแรก เช่น กรดไขมัน มอนอกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ และโคเลสเตอรอล เป็นต้น

กรดไขมัน (Fatty acids)

กรดไขมันคือกรดแอลิแฟติกคาร์บอกซิลิก (Aliphatic carboxylic acid) ที่มีสายของไฮโดรคาร์บอนยาวขนาดต่างๆ กันมีสูตรโครงสร้างโดยทั่วไปเป็น R-COOH โดย R คือสายไฮโดรคาร์บอน กรดไขมันที่พบในไขมันและน้ำมัน ตามธรรมชาติจะอยู่ในรูปของเอสเทอร์ (Ester) ลิพิดชนิดกรดไขมันมักมีโครงสร้างเป็นสายตรง ไม่แตกแขนง และมีคาร์บอนเป็นจำนวนคู่ สายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันอาจจะมีพันธะคู่ หรือไม่มีก็ได้ ดังนั้นจึงแบ่งกรดไขมันออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid)

การจำแนกชนิดของกรดไขมัน

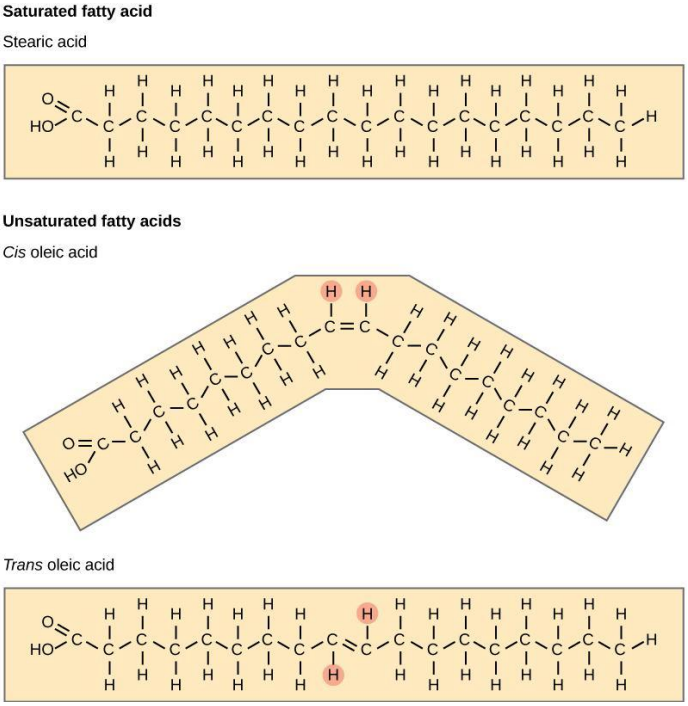
กรดไขมันสามารถจำแนกตามโครงสร้างได้ 2 ชนิด ดังนี้

1. กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่มีโครงสร้างอะตอมคาร์บอนและไฮโดรเจนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเดี่ยวตลอดสาย กรดไขมันอิ่มตัวที่มีมากที่สุดธรรมชาติ คือ กรดพาลมิติก (Palmitic acid) รองลงมา คือ กรดสเตียริค (Stearic acid) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้ร่างกายได้รับจากอาหารหรือสังเคราะห์ขึ้นได้เอง

2. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่อยู่บนโครงสร้างคาร์บอน ตรงตำแหน่งพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีโครงสร้าง 2 แบบ คือ แบบ *cis* และ *trans* ส่วนใหญ่กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีพันธะคู่อยู่ในรูปแบบ *cis* ในธรรมชาติจะพบกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวมากที่สุดและมักพบว่าพันธะคู่จะอยู่ระหว่างอะตอมของคาร์บอนที่ 9 หรือ 10 โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวจำแนกออกได้เป็น 2 ชนิด ตามลักษณะของโครงสร้างและจำนวนพันธะคู่ ดังนี้

2.1 กรดไขมันที่มี 1 พันธะคู่ (Monounsaturated fatty acids) เป็นกลุ่มที่พันธะคู่เพียง 1 พันธะ กรดไขมันที่มีมากที่สุดในร่างกาย คือ กรดพาล์มิโทเลอิค (Palmitoleic) และกรดโอเลอิค (Oleic acid)

2.2 กรดไขมันที่มีพันธะคู่มากกว่า 2 พันธะขึ้นไป (Polyunsaturated fatty acids) ปกติพันธะคู่ของกรดไขมันจะไม่อยู่ชิดกัน มีหมู่ Methylene ($-CH_2-$) คั่นกลาง ตัวอย่างเช่น กรดลิโนเลอิก (Linoleic) กรดลิโนเลนิก (Linolenic) และ กรดอะแรชิโดนิก (Arachidonic) เป็นต้น



ภาพที่ 2-6 การเปรียบเทียบโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว และแสดงการเกิดรูปแบบของ cis และ trans ของกรดไลโนเลอิก
ที่มา: OpenStax College (2013)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพร

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากสมุนไพร ได้ดัดแปลงวิธีการมาจากการทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารต้านจุลินทรีย์หรือยาปฏิชีวนะ (Koneman et al., 1994) ซึ่งสามารถแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 วิธี คือ Dilution method และ Diffusion method มีรายละเอียด ดังนี้

Dilution method

Dilution method เป็นวิธีหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยจะเรียกความเข้มข้นต่ำสุดของสารต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์นี้ว่า Minimal inhibition concentration หรือ MIC ซึ่งการวิเคราะห์หา MIC สามารถทำได้โดยการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธี (Ingraham & Ingraham, 1995) คือ การเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในของเหลว (Broth dilution method) และการเจือจางสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารแข็ง (Agar dilution

method) ซึ่ง Dilution method จะให้ผลที่ละเอียดกว่า Diffusion method แต่ขณะเดียวกันก็ต้องใช้เวลา เครื่องมือ และแรงงานในการทำการทดลองมากกว่า

Diffusion method

Diffusion method เป็นวิธีการทดสอบความไวของสารต้านจุลินทรีย์ ในการยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาศัยหลักการที่ว่าสารจะซึมจากที่มีความเข้มข้นสูงไปยังที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นจึงนำสารต้านจุลินทรีย์ซึ่งอยู่ในรูปแผ่นยาที่เป็นกระดาษกรองหรือเม็ดยาวางบนอาหารเลี้ยงเพื่อซึมไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์อยู่ ซึ่งที่นิยมมากที่สุดก็คือ วิธีที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc diffusion method หรือ Filler paper disc) และการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นสามารถสังเกตได้จากการที่จุลินทรีย์จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณโดยรอบที่มีสารต้านจุลินทรีย์อยู่ (Tortora et al., 1995) Diffustion method เป็นที่นิยมกันมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกประหยัดค่าใช้จ่าย และใช้เวลาทดลองน้อย แต่วิธีนี้ไม่สามารถอ่านผลได้โดยตรงเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

จากที่กล่าวมาแล้วนั้น จะเห็นได้ว่าการที่จะเลือกการทดสอบวิธีใดนั้น จะต้องพิจารณาจากความละเอียดที่ผู้ทดลองต้องการจำนวนสารสกัดที่จะทดสอบ ปริมาณของสารสกัดที่มีอยู่ ตลอดจนแรงงานงบประมาณในการทดลอง โดยการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกวิธีที่เหมาะสมกับการทดลอง คือ Diffusion method

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์โดย Diffusion method

Diffusion method เป็นวิธีที่ใช้ในการทดสอบความไวในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ วิธีการนี้โดยทั่วไปมักทำการทดสอบกับสารต้านจุลินทรีย์เพียงความเข้มข้นเดียวเท่านั้นโดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อใส่สารต้านจุลินทรีย์ปริมาณหนึ่งไว้ในภาชนะบรรจุ (Reservoir) ซึ่งอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar medium) ที่เพาะเชื้อจุลินทรีย์ไว้ ภายหลังจากการบ่มเพาะเชื้อให้สังเกตดูรอบบริเวณภาชนะ ที่ตัวสารต้านจุลินทรีย์ซึมไปนั้นจะมีบริเวณใส (Clear zone) ที่ไม่มีเชื้อเจริญเติบโต โดยบริเวณใสนี้เรียกว่า Inhibition zone แล้ววัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น เพราะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น จะมีขนาดแคบกว้างแตกต่างกันนอกจากนี้ยังพบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นนั้น จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความไวของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ(Mckane,Larry, & Kandel, 1996)

ในอดีตนั้น Diffusion method เริ่มต้นด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แล้วใช้แท่งแก้วหรือแท่งเหล็กเจาะบนผิววุ้นให้มีช่องเกิดขึ้น จากนั้นเติม

สารละลายของสารต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ ใส่ลงไปในช่องวุ้นเหล่านั้นสารต้านจุลินทรีย์จะแพร่กระจายไปในเนื้อวุ้น โดยสารต้านจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการยับยั้งต่อจุลินทรีย์ชนิดนั้น จุลินทรีย์จะไม่เจริญบริเวณรอบๆบริเวณที่มีสารต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวอยู่ ซึ่งหากมีบริเวณที่ถูกยับยั้งมากนั้นหมายถึงสารต้านจุลินทรีย์หรือยาชนิดนั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดนั้นมาก ต่อมาในปี ค.ศ.1960 ได้มีการพัฒนาวิธีการใหม่ โดย Alcamo (1997) โดยใช้แผ่นกระดาษกรองหรือกระดาษกรองวงกลม (Filter paper disc) ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้กันมาก บางครั้งอาจเรียกวิธีการทดสอบที่ใช้แผ่นกระดาษดังกล่าวนี้ว่า Kirby-Bauer test หรือ Disc sensitivity test

ดังจะเห็นได้ว่า Diffusion method เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการทดสอบความไวต่อจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ใช้ค่าใช้จ่าย แรงงานและเวลาในการทำการทดลองน้อย แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดหลายประการด้วยกัน อาทิเช่น วิธีนี้ไม่สามารถใช้ในการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีอัตราเร็วในการเจริญเติบโตต่ำ หรือเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเติบโต และเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้เฉพาะแต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดเป็นต้นนอกจากนี้วิธีการทดสอบนี้ยังไม่สามารถอ่านผลเป็นค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้โดยตรง

ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งต่อจุลินทรีย์โดย Diffusion method

ปัจจัยหลายชนิดมีผลต่อขนาดบริเวณใสที่เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์นั้น โดยบางปัจจัยจะรบกวนการออกฤทธิ์ หรือการดูดซึมของสารต้านจุลินทรีย์ หรือบางปัจจัยที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มาก ก็จะทำให้ขนาดบริเวณใสลดลงได้ ส่วนบางปัจจัยที่ส่งเสริมการออกฤทธิ์หรือการดูดซึมสารต้านจุลินทรีย์ หรือพวกที่รบกวนการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก็จะทำให้บริเวณใสนี้เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงควรตระหนักถึงปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญ มีดังนี้

อาหารเลี้ยงเชื้อ

สารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นั้นจะถูกกระทบจากส่วนประกอบต่าง ๆ ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน โดยมีตัวอย่างดังนี้

1. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ส่วนมากจะเจริญเติบโตได้ดีที่ pH 6.8-7.2 แต่ถ้า pH ต่ำหรือสูงกว่าระดับนี้ จะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (Pelezar, 1958)

2. บัฟเฟอร์ (Buffer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดนั้น อาจมีผลกระทบต่อการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์บางชนิดได้ เช่น การทดสอบ Gentamicin ในอาหาร ซึ่งมีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่างกัน ก็จะทำให้ได้ผลการตรวจสอบความไวที่แตกต่างกัน นอกจากนี้จุลินทรีย์บาง

ชนิดก็สามารถอยู่ได้ในที่ที่มี pH ในช่วงแคบ ๆ ถ้า pH สูงหรือต่ำกว่านี้ก็จะทำให้ตายได้ เช่น *Legionella pneumophia* สามารถอยู่ได้ที่ pH 6.85-7.00 ดังนั้นจึงต้องใช้บัฟเฟอร์ช่วย เพื่อไม่ให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ๆ เปลี่ยนแปลงไปมากนัก (Nester, Evans, & Martha, 1995)

3. ปริมาณไอออนที่ปรากฏในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลกระทบต่อความไวของเชื้อ และการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น ผลของ Aminoglycoside ที่ทำให้บริเวณใสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ลดลง นอกจากนี้สำหรับยา Tetracyclines ฤทธิ์ของยาจะลดลงเมื่อปริมาณของ Divalent cation เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} เพิ่มขึ้น (Koneman et. al., 1994)

4. วุ้น (Agar) ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบของ Polysaccharides ซึ่งสารต้านจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น Cationic จะสามารถจับกับหมู่ Acidic sulfate ของ Polysaccharides ในวุ้นได้ จึงมีผลทำให้การออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ นั้นลดลงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับยาในกลุ่ม Polymyxins (Brown & Gilbert, 1995)

5. ความหนาของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar Medium) โดยทั่วไปจะกำหนดให้มีความหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร ซึ่งไม่ทำให้กระทบต่อขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้นมากนัก โดยการเทอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาด 25 และ 60 มิลลิลิตร ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Plate) ที่เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 9 และ 15 เซนติเมตร ตามลำดับ จะทำให้ได้ความหนาดังกล่าว ส่วน Plate ที่เทวุ้น (Agar) ไว้แล้วถ้าต้องการเก็บไว้ใช้เกิน 5 วัน ควรใส่ถุงพลาสติกแล้วไว้ในที่มีอุณหภูมิ 4-8 °C แต่ไม่ควรเก็บเกิน 2 สัปดาห์ และก่อนใช้ควรให้พื้นผิววุ้น (Agar) แห้งเสียก่อน (Collins, Lyne, & Grange, 1989)

6. ความชื้นหรือน้ำของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งจะมีบทบาทโดยตรงต่อจุลินทรีย์เกี่ยวกับแรงดันออสโมซิสของเซลล์เพราะผลของแรงดันออสโมซิสมีต่อจุลินทรีย์นั้นจะแตกต่างกันออกไปซึ่งจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายและชนิดของจุลินทรีย์นั้นๆ เช่น เซลล์ของ *Escherichia coli* น้ำจะแพร่ออกนอกเซลล์ (Plasmolysis) เมื่อเจริญในสารละลายซูโครสเข้มข้น 12% เป็นเวลานาน 5-20 นาที ส่วนเซลล์ของแบคทีเรียพวก *Bacillus* มีความสามารถทนต่อสารละลายของเกลือเข้มข้น 10-15% หรือสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 30-60% ได้ดี (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบนั้น มีผลต่อการทดสอบเป็นอย่างมาก เช่น การใช้เชื้อจุลินทรีย์มากเกินไปจะทำให้บริเวณใสมีขนาดเล็กเกินไปได้ ดังนั้นการทดสอบทุกครั้งจึงต้องมีการปรับปริมาณของเชื้อทดสอบให้อยู่ในปริมาณที่แน่นอนและเป็นมาตรฐาน เช่น การปรับปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบให้ความเข้มข้นประมาณ 1.5×10^{9} เซลล์/มิลลิลิตร โดยเทียบกับ 0.5 McFarland standard (Koneman et al., 1994)

ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ใน Disc ที่ใช้ทดสอบ

ในกรณีที่ใช้แผ่นกระดาษกรอง (Disc) ที่มีสารต้านจุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเอง โดยการชุบ Disc ลงในสารต้านจุลินทรีย์ อาจจะมีผลทำให้ปริมาณความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ใน Disc แต่ละอันแตกต่างกัน และจะส่งผลต่อขนาดของบริเวณใสที่เกิดจากสารต้านจุลินทรีย์ได้โดยตรง

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อมีผลกระทบอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งโดยปกติจุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 0 °C (Psychrophilic bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 75 °C (Thermophilic bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 20-45 °C (Mesophilic bacteria) ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ เช่น *Salmonella typhi* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Pelezar, 1958) ดังนั้นอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด จึงควรปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยในกรณีที่ทดสอบความไวของจุลินทรีย์ที่สามารถทำให้เกิดโรคในมนุษย์ จะใช้อุณหภูมิในการบ่มเชื้อประมาณ 35-37 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิเฉลี่ยของสัตว์เลือดอุ่น (Kleyn & Bicknell, 1999)

เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ

เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการซึมของสารต้านจุลินทรีย์ใน Agar medium ได้ ดังนั้นภายหลังวาง Disc แล้วควรนำ Plate ที่ได้เข้าตู้บ่มเชื้อทันที แล้วบ่มเชื้อเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (Collins, Lyne, & Grange, 1989)

บรรยากาศขณะบ่มเชื้อ

บรรยากาศขณะที่บ่มเชื้อมีผลต่อการทดสอบเป็นอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อบ่มเชื้อที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้เกิด Carbonic acid บนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Agar) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสภาวะกรดขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อจุลินทรีย์ และการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์บางชนิด (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2536)

การวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น

การวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น มีความสำคัญอย่างมากที่จะทำให้ผลที่แปรออกมาผิดหรือถูกได้เช่นกัน โดยทั่วไปการวัดขนาดบริเวณใสต้องการความละเอียดเป็นค่ามิลลิเมตร ซึ่งจะวัดได้โดยใช้ไม้บรรทัดคาลิปเปอร์ หรือเครื่องมือไฟฟ้า นอกจากนี้การที่ขอบบริเวณส่วนใสไม่ชัดเจน คือ ขอบริม ๆ ที่ยังมีเชื้อจุลินทรีย์ยังเจริญประปรายหรือเชื้อจุลินทรีย์ถูกยับยั้งไม่หมดการวัดขนาดบริเวณใสในลักษณะนี้จะต้องวัดเฉพาะขอบนอกที่ใสสม่ำเสมอ (Ingraham, 1995)

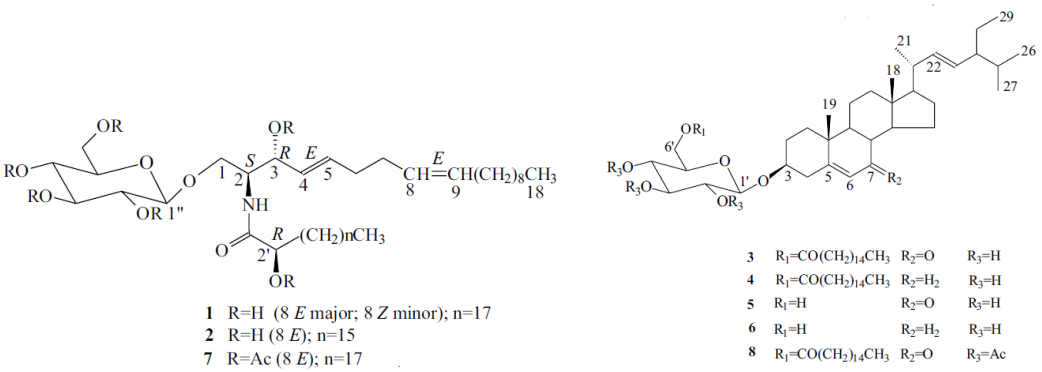
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Row et al. (2003) ศึกษาต้นขาเขียด (*Monochoria vaginalis*) ทั้งต้นทำให้แห้ง แล้วสกัดด้วยเมทานอล จนได้สารสกัดหยาบ แล้วนำไปแยกด้วยวิธีโครมาโทรกราฟี วิเคราะห์สารบริสุทธิ์ด้วย เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (Nuclear magnetic resonance, NMR) พบสารใหม่สามชนิด (1-3) (ภาพที่ 2-11) คือ

- (2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,2'*R*)-1-O-(α-D-Glucopyranosyl)-N-(2'-hydroxy icosanoyl)-4,8-sphingadienine (1)

- (2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,2'*R*)-1-O-(α-D-Glucopyranosyl) -N-(2'-hydroxy octadecanoyl)-4,8-sphingadienine (2)

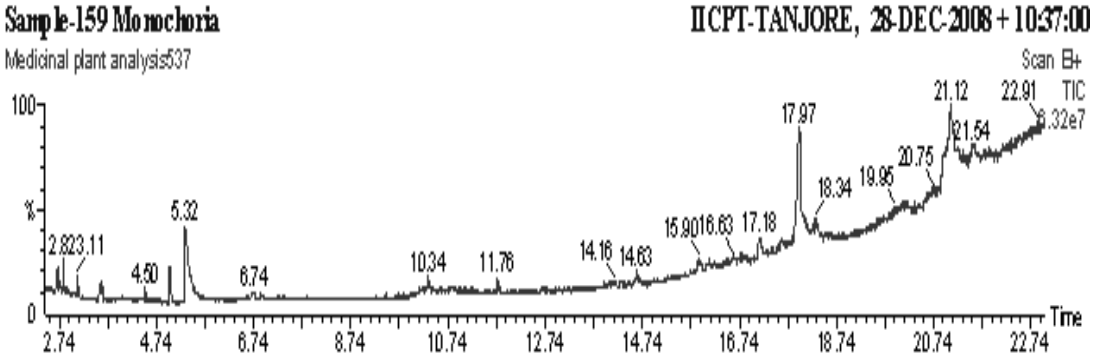
- 7-Oxostigmasteryl-3-O-(6'-hexadecanoyl)-D-glucopyranoside (3)



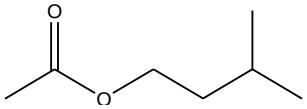
ภาพที่ 2-7 โครงสร้างทางเคมีของสารใหม่ (1-3) ที่พบในผักเขียดด้วยวิธีโครมาโทรกราฟี

Sundararajan et al. (2011) ศึกษาสารสกัดหยาบด้วยเอทานอล จากส่วนเหนือดินของต้นผักเขียด *M. vaginalis* ทำให้แห้งในที่ร่มแล้วบดเป็นผง ร่อนด้วยตะแกรง 40 Mesh sieve และสกัดด้วยเอทานอล 90% v/v ในเครื่องซอกห์เล็ต (Soxhlet apparatus) ที่อุณหภมิ 60 °C ได้สารสกัดหยาบที่ทำ

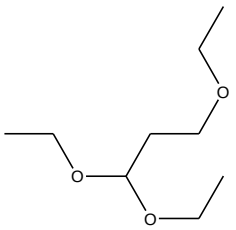
ให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน และทำให้แห้งด้วยเทคนิค Freeze dried จากนั้นวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วยเทคนิค Gas chromatograph-mass spectrograph (GC/MS) พบว่ามีโครงสร้างที่สำคัญ ได้แก่ 3-Methyl-acetate-1-butanol, 1,1,3-triethoxy-propane, Z,Z,Z-1,4,6,9-Nonadecatetraene, Undecanoic acid, 3-Trifluoroacetoxypentadecane, 4-Ethyl-5-octyl-2,2-bis(trifluoromethyl)-*cis*-1,3-dioxalone



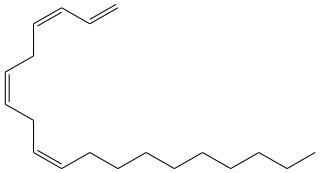
ภาพที่ 2-8 GC-MS โครมาโทแกรมของสารสกัดเอทานอลของผักเขียด *Monochoria vaginalis*



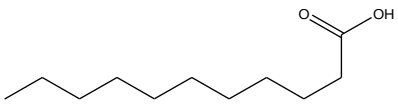
3-Methyl-acetate-1-butanol



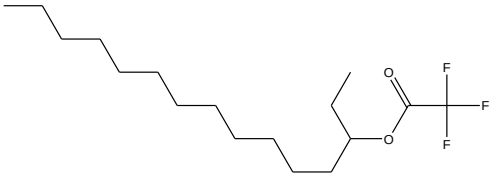
1,1,3-triethoxy-propane



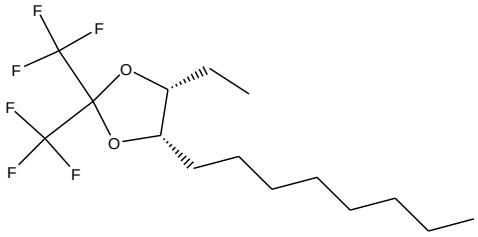
Z,Z,Z-1,4,6,9-Nonadecatetraene



Undecanoic acid



3-Trifluoroacetoxypentadecane



4-Ethyl-5-octyl-2,2-bis(trifluoromethyl)-*cis*-1,3-dioxalone

รูปที่ 2-9 โครงสร้างทางเคมีที่สำคัญของสารสกัดหยาบผักเขียด (*M.vaginalis*) ที่สกัดด้วยเอทานอล

อมรรัตน์ สีสุกอง และคณะ (2551) ศึกษาผลของสารสกัดจากส่วนต้น และดอกของกกรังกา *(Cyperus alternifolius* L.) และส่วนรากและใบของผักตบชวา (*Eichlornia crassipes* Solms) ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcusaureus Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* ในการสกัดใช้วิธีการแช่ (Marceration) โดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทานอล และเมทานอล การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบของสารสกัดหยาบจากกกรังกา และ ผักตบชวาด้วยวิธี Disc diffusion techniques พบว่า สารสกัดหยาบจากต้นกกรังกาที่สกัดด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Staphylococcus aureus* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเฉลี่ยเท่ากับ 3.375 และ 2.000 mm และพบว่าสารสกัดหยาบจากผักตบชวาไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบ การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากดอกกกรังกาที่สกัดด้วยเอทานอลด้วยวิธี Macro broth dilution technique ในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* เท่ากับ 25 mg/mL สำหรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากต้นกกรังกา ที่สกัดด้วยเอทานอล พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง *B. subtilis* และ *Staphylococcus aureus* คือ 6.25 mg/mL แต่เมื่อทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ (Minimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดหยาบจากต้นกกรังกาที่สกัดด้วยเอทานอลต่อ *B. subtilis* และ *Staphylococcus aureus* พบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรียทั้ง *B. subtilis* และ *Staphylococcus aureus* คือ 25 mg/mL

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง บริษัท Mettler toledo รุ่น AG203-S
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง บริษัท Mettler toledo รุ่น AG245
3. เครื่องระเหยสุญญากาศ บริษัท Buchi รุ่น R-124
4. ขวดรีเอเจนต์สีชา ขนาด 500 มิลลิลิตร
5. บีกเกอร์ ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร

สารเคมี

เอทิลอะซีเตด (Analytical grade)

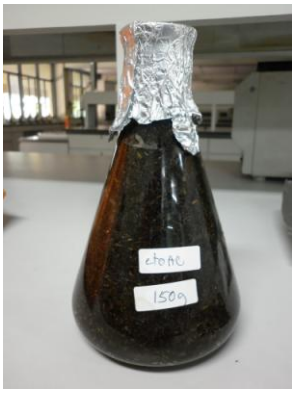
ขั้นตอนการดำเนินงาน

การเก็บตัวอย่าง ผักเขียด

ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างผักเขียด จากหมู่บ้านเกาะทองสม หมู่ 15 ต.โคกม่วง อ.เขาชัยสน จ.พัทลุง ในวันที่ 15 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2555

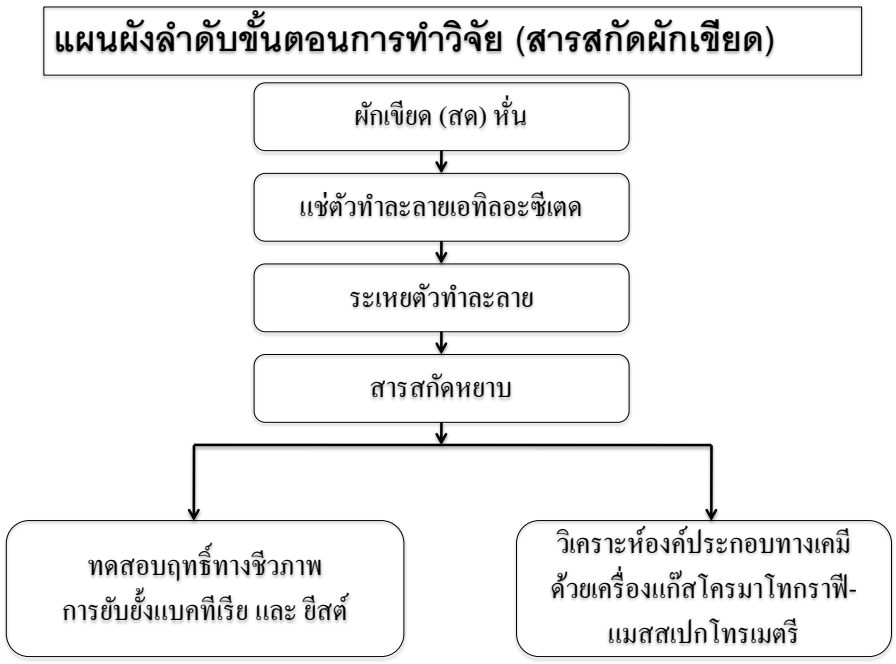
การสกัดสารจาก ผักเขียด และการนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปทดสอบ

1. นำผักเขียดมาหั่นเป็นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ยาวประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร ทำการผึ่งลมในที่ร่มให้แห้ง และนำมาชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ให้มีน้ำหนัก 500 กรัม แล้วนำมาแช่ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามภาพ 3-1



ภาพที่3-1 ผักเขียดแช่ในตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด

2. ทำการกรองแยกส่วนของผักเขียด และตัวทำละลายเอทิลอะซีเตดด้วยสำลี
3. นำสารละลายผักเขียดมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน และเครื่องดูดสุญญากาศตามลำดับ จะได้สารสกัดหยาบ
4. นำสารสกัดหยาบที่ได้มาชั่งโดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. นำสารสกัดหยาบที่ได้แบ่งเป็น 2 ส่วน ใส่ไว้ในขวดรีเอเจนต์สีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 2-8 °C เพื่อรอการวิเคราะห์
6. นำสารสกัดหยาบส่วนที่ 1 มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมา – โทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี ณ ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี
7. นำสารสกัดหยาบส่วนที่ 2 มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา



ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการทำวิจัยการสกัดสารจากผักเขียด

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

การเลือกสภาวะของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์สารสกัดจากต้นผักเขียด ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี รุ่น Agilent 7890A Gas chromatography ต่อเข้ากับ Mass selective detector รุ่น 5975C ใช้คอลัมน์ DB-5MS 30 m x 250 μm x 0.25 μm ใช้ดีเทคเตอร์เป็น Mass spectrometer อุณหภูมิ heater 280 °C ที่ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้ 20 °C/min จนถึง 280 °C เป็นเวลา 10 นาที

MS ACQUISITION PARAMETERS

Low Mass	: 30.0
High Mass	: 650.0
Plot 2 low mass	: 50.0
Plot 2 high mass	: 550.0
MS Source	: 230 °C maximum 250 °C
MS Quad	: 150 °C maximum 200 °C
Mode	: Split

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1. การเตรียมสารสกัด

สารสกัดจากผักเขียด นำมาละลายโดยใช้ Dimethyl sulfoxide (Riedel-dehaen, Germany) เป็นตัวทำละลาย และกรองสารสกัดผักเขียดให้ปราศจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วยเมมเบรน 0.45 ไมครอน ชนิด PTFE (Sartorious, Germany)

2. การเตรียมจุลินทรีย์สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง โดยวิธี Agar disc diffusion โดยมีรายละเอียดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ดังนี้

แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus*

แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* และ *Salmonella typhimurium*

ยีสต์ ได้แก่ *Candida albicans*

เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger*

สำหรับแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบเลี้ยงในอาหาร Tryptic soy broth (Oxoid, England) หรือ Tryptic soy agar (Oxoid, England) ที่อุณหภูมิ 37 °C ส่วนยีสต์และเชื้อราเลี้ยงในอาหาร Sabouraud dextrose agar (Difco TM, USA) หรือ Sabouraud dextrose broth (Difco TM, USA) ที่อุณหภูมิ 30 °C

นอกจากนี้จุลินทรีย์สำหรับทดสอบได้มาจากการเตรียมจุลินทรีย์แขวนลอย (Microbial suspension) จากจุลินทรีย์ที่กำลังเจริญอยู่ใน Log phase ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ Mac Farland standard No. 0.5 หลังจากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อป้ายแบคทีเรียแขวนลอยลงบนจานอาหารแข็ง Mueller Hinton agar (Oxoid, England) ยีสต์ และเชื้อราแขวนลอย ให้ป้ายลงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar

3. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งของจุลินทรีย์ โดยวิธี Agar disc diffusion หยดสารสกัดที่ผ่านการกรองเพื่อให้ปลอดเชื้อ 10 ไมโครลิตรลงบนแผ่นกระดาษกรองวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ที่วางอยู่บนจานอาหารแข็งที่ป้ายจุลินทรีย์แขวนลอยไว้เรียบร้อย โดยแบคทีเรียแกรมบวกใช้ Ampicillin, streptomycin เป็น Positive control แบคทีเรียแกรมลบใช้ Cefotaxime, streptomycin เป็น Positive control หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม คืออุณหภูมิ 37 °C ใช้เวลา 24 ชั่วโมง และสำหรับยีสต์และเชื้อราใช้ Cycloheximide, Nystatin, Fluconazole เป็น Positive control หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม คือ 30 °C 24-48 ชั่วโมง

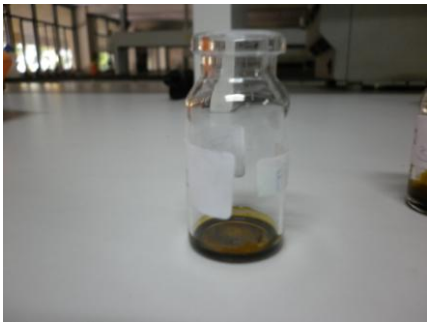
วิธีการประเมินประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ให้พิจารณาที่เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (Inhibition zone) ซึ่งจะปรากฏเป็นวงใสไม่มีโคโลนีของจุลินทรีย์เจริญ แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง โดยจุดศูนย์กลางคือจุดศูนย์กลางของกระดาษกรอง

บทที่ 4
ผลการศึกษา

การสกัด

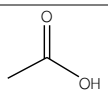
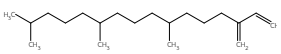
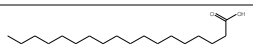
ผัดเขียดแห้ง จำนวน 500 กรัม นำมาสกัดโดยแช่ในตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด แล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกได้สารสกัดหยาบ มีลักษณะข้นหนืด มีสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 4-1) น้ำหนัก 20 กรัม คิดเป็น % yield = 4.00

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอทิลอะซีเตดของผักเขียดด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรมิเตอร์

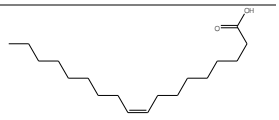
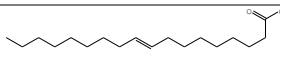
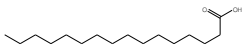
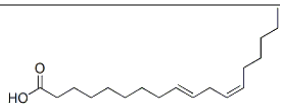
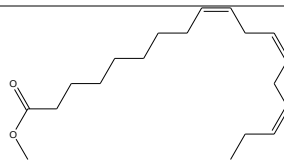


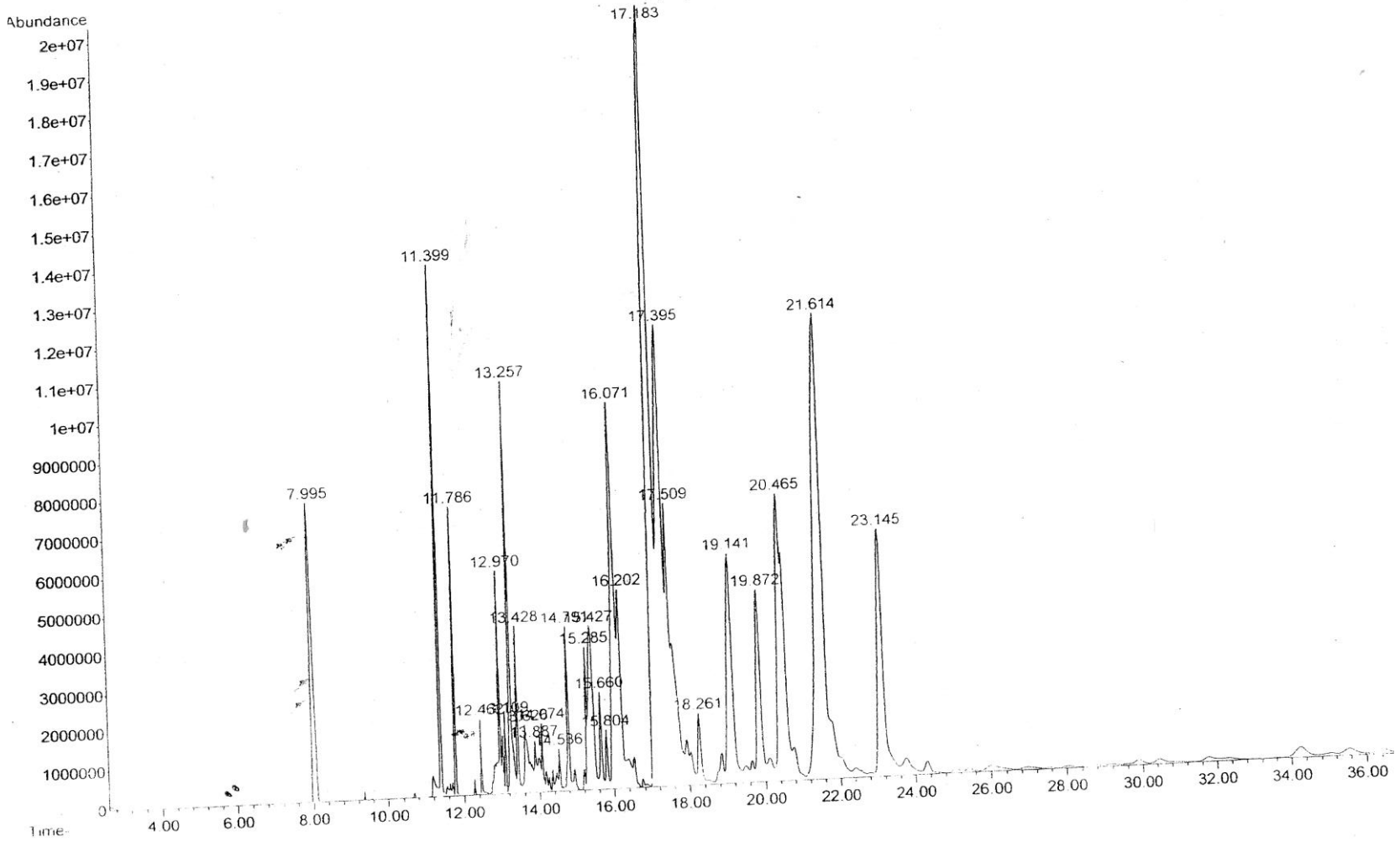
ภาพที่ 4-1 สารสกัดหยาบของผักเขียดหลังระเหยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด

ตารางที่ 4-1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเอทิลอะซีเตดของผักเขียดด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี

Peak	Retention Time (minute)	% of total	% Quality	Library Name (Wiley7N edition)	สูตรโครงสร้างทางเคมี
1	7.995	3.77	90	Acetic acid	
2	11.39	3.077	99	Neophytadiene	
3	15.427	3.421	99	Stearic acid	

ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

Peak	Retention Time (minute)	% of total	% Quality	Library Name (Wiley7N edition)	สูตรโครงสร้างทางเคมี
4	16.07	6.6	97	*9-cis*-Oleic acid	
5	16.202	2.136	97	trans-Oleic acid	
6	17.18	17.18	99	Palmitic acid	
7	21.61	17.59	97	Linoleic acid	
8	23.14	5.95	81	Methyl linolenate	



ภาพที่ 4-2 โครมาโทแกรมของสารสกัดผักเขียดที่ได้จากเครื่อง GC/MS

ตารางที่ 4-2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบของสารสกัดผักเขียด (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

จุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของ control		เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของสารสกัดผักเขียด							
	Ampi-cillin 10 mg/disc	**Strepto-mycin** 10 mg/disc	**DMSO** ± SD 10 µL	**0.037 mg/disc** ± SD	**0.073 mg/disc** ± SD	**0.120 mg/disc** ± SD	**0.146 mg/disc** ± SD	**0.183 mg/disc** ± SD	**0.366 mg/disc** ± SD	**1.828 mg/disc** ± SD
แบคทีเรียแกรมบวก										
Staphyllo-coccus aureus	32 ±0.00	20 ±0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
Bacillus cereus	10 ±0.00	11 ±0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
แบคทีเรียแกรมลบ										
Escherichia coli	19 ±1.15	11 ±0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
Klebsiella pneumoniae	19 ±1.15	14 ±0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
Serratia marcescens	19 ±1.15	13 ±0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
Pseudo-monas aeruginosa	19 ±1.15	10 ±0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
Salmonella typhimu-rium	19 ±1.15	11 ±0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive

ตารางที่4-3 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดผักเขียดต่อยีสต์ และเชื้อรา (ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง)

จุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของ control				เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของสารสกัดผักเขียด						
	Cyclo - hexi - mide 50 mg/disc	**Nystatin** 500 μg/disc	**Fluco - nazole** 50 μg/disc	**DMSO** 10 μL	**0.037 mg/disc** ± SD	**0.073 mg/disc** ± SD	**0.120 mg/disc** ± SD	**0.146 mg/disc** ± SD	**0.183 mg/disc** ± SD	**0.366 mg/disc** ± SD	**1.828 mg/disc** ± SD
ยีสต์											
Candida albicans	30 ±0.00	13 ±0.00	2 ±0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive
เชื้อรา											
Aspergil-lus niger	30 ±0.00	13 ±0.00	2 ±0.00	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive	Inactive

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผักเขียด จำนวน 500 กรัม ด้วยวิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด ได้สารสกัดหยาบ มีลักษณะข้นหนืดสีน้ำตาลเข้มจำนวน 20 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 4.00 เทียบกับน้ำหนักตัวอย่างแห้ง แล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้ มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟีแมสสเปกโทรเมตรี พบว่าสารสกัดหยาบเอทิลอะซีเตดของผักเขียด มีองค์ประกอบทางเคมีมากกว่า 15 ชนิด และน่าจะมีองค์ประกอบหลัก 8 ชนิดได้แก่ Linoleic acid, Palmitic acid, 9-*cis*-Oleic acid, Methyl linolenate, Acetic acid, Stearic acid, Neophytadiene และ *trans*-Oleic acid โดยมี Linoleic acid เป็นองค์ประกอบหลักที่มีปริมาณสูงสุดในสารสกัดหยาบ ซึ่งมีปริมาณถึง 17.59% รองลงมา คือ Palmitic acid มีปริมาณ 17.13% และ 9-cis-Oleic acid มีปริมาณ 6.6% จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าสารสกัดหยาบเอทิลอะซีเตดจากผักเขียดทุกความเข้มข้น ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *S. aureus*, *B. cereus* แบคทีเรียแกรมลบ *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescen*, *P. aeruginosa* เชื้อรา *A. niger* และยีสต์ *C. albican* สอดคล้องกับงานวิจัยของ อมรรัตน์ สีสุกอง และคณะ (2551) ที่ศึกษาผลของสารสกัดจากจากส่วนต้น และดอกของกกรังกา *(Cyperus alternifolius* L.) และส่วนรากและใบของผักตบชวา (*Eichlornia crassipes* Solms) ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* และ *Escherichia coli* ซึ่งการสกัดใช้วิธีการแช่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทานอล และเมทานอล พบว่าสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยตัวทำละลายทั้งสี่ชนิดของผักตบชวาซึ่งจัดเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันกับผักเขียด (วงศ์: Pontederiaceae) ไม่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งสามชนิดดังกล่าวเช่นเดียวกับงานวิจัยของเราที่ใช้ผักเขียดแช่ในตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด และเมื่อเปรียบเทียบด้านองค์ประกอบทางเคมีของผักเขียดที่วิเคราะห์ได้กับงานวิจัยของ Sundararajan et al.(2011) ที่ศึกษาส่วนเหนือดินของต้นผักเขียด *M. vaginalis* ที่ทำให้แห้งในที่ร่มแล้วบดเป็นผงร่อนด้วยตะแกรง 40 mesh sieve และสกัดด้วยเอทานอล 90% v/v ในเครื่องซอกห์เล็ต (Soxhlet apparatus) ได้สารสกัดหยาบที่ทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน และทำให้แห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบระเหิด (Freeze dried) จากนั้นวิเคราะห์สารสกัดหยาบด้วยเทคนิค GC/MS พบองค์ประกอบของสารที่เหมือนกันคือ Palmitic acid เท่านั้น

จากที่กล่าวมาแล้วว่าผักเขียดจัดเป็นพืชจำพวกวัชพืชน้ำที่พบเห็นได้ทั่วไปในนาข้าวทั่วทุกภาคของไทย ผักเขียดเป็นพืชที่สามารถนำมาเป็นยาสมุนไพรรักษาโรค ผู้วิจัยจึงศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของผักเขียดด้วยการแช่ในตัวทำละลายเอทิลอะซีเตด และหาองค์ประกอบทางเคมีของผักเขียดด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโทรเมตรี (GC/MS) พร้อมทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยทางการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา ด้วยวิธี Agar disc diffusion โดยเลือกใช้ตัวแทนที่ครอบคลุม และหลากหลาย เช่น โดยใช้สารสกัดที่ทดลองหลายความเข้มข้น อีกทั้งมีการควบคุมเชิงบวกเพื่อให้งานวิจัยมีผลการทดลองที่สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น แต่ก็ไม่พบการแสดงฤทธิ์การยับยั้ง ทั้งนี้อาจต้องมีการเพิ่มวิธีการสกัดให้หลากหลายมากขึ้น พร้อมกับใช้ตัวทำละลายที่ครอบคลุมตั้งแต่ไม่มีขั้วจนถึงมีขั้วมาก เช่น เฮกเซนจนถึงบิวทานอลและน้ำ เป็นต้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการสกัดผักเขียดด้วยตัวทำละลายและเทคนิคการสกัดในรูปแบบอื่น ๆ เช่น ใช้ตัวทำลายเอทานอล เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน หรือการสกัดด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ เป็นต้น เพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีที่ได้แต่ละวิธี

2. ควรศึกษาการแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้มาวิเคราะห์หาสูตรโครงสร้างทางเคมี ตลอดจนทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารบริสุทธิ์ที่ได้

บรรณานุกรม

ก่องกานดา ชยามฤต และนันท์นภัส ภัทรหิรัญไตรสิน. (2551*) ลักษณะประจำวงศ์พรรณไม้ 3*. กรุงเทพฯ: สำนักหอพรรณไม้ สำนักอนุรักษ์ป่าไม้ และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช .

กัญจนา ตีวิเศษ, ไฉน น้อยแสง และจิรัชยา แก้วสนธยา. (2542). *ผักพื้นบ้านภาคใต้*. กรุงเทพฯ: สถาบันการแพทย์แผนไทย มูลนิธิการแพทย์แผนไทยพัฒนา.

บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ์. (2549). *ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน*. โครงการพิเศษเภสัชศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยมหิดล.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. (2550). *การตรวจสอบและการสกัดแยกสาระสำคัญจากสมุนไพร* (พิมพ์ครั้งที่2). กรุงเทพฯ:สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. (2521) *การศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาและเซลวิทยาของพืชในวงศ์ Pontederiaceae ในประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต,สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทวัน บุณยะประภัศร. (2534). *ก้าวไปกับสมุนไพร เล่ม 1*. กรุงเทพฯ: ศูนย์ข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหิดล.

นงนุช วณิตย์ธนาคม. (2540).*วิทยาเชื้อราทางการแพทย์*. กรุงเทพฯ: พีบี ฟอเรนบุ๊คส์.

บัญญัติ สุขศรีงาม. (2536). *จุลชีววิทยา*. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. (2551) การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.ใน *การประชุมวิชาการสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 9 "สัตว์แพทย์ทางเลือกวันนี้" คณะสัตว์แพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น* (หน้า 91-101). ห้องประชุมใหญ่ คณะสัตว์แพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม, พลกฤษณ์ แสงวณิช, ภควดี สุทธิ์ไวยกิจ, มานพ สิทธิเดช, สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์, อุมาพร สุขม่วง และวันเพ็ญ ช้อนแก้ว. (2555). *หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ*. กรุงเทพฯ: ชวนพิมพ์ 50.

อมรรัตน์ สีสุกอง, วกัลยาภรณ์ จันตรี และ ศรีสุดา หาญภาคภูมิ. (2551). *การสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัชพืชท้องถิ่น ในจังหวัดนนทบุรี*. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต.

Alcamo, E. J. (1997). *Fundamentals of Microbiology* (5th ed.). California: Addision Wesley Longman.

Alston, A. H. G. (1983). *Kandy Flora*. Colomba: Government Press.

Anonymous. (1962). *The Wealth of India: A Dictionary Indian Raw Materials*, Vol. VI. L-M. New Delhi: Council of Scientific & Industrial Research.

Brown, Micheal, R. W. & Gilbert, P. (1995). *Microbiological Quality Assurance*. Boca Raton: CRC Press.

Collins, C. H., Lyne, M. P., & Grange, J. M. (1989). *Collins and Lyne's Microbiological Methods* (6th ed.). Oxford: Buterworth-Heinemann.

Honderson, M. R. (1954*). Malayan Wild Flowers Monocotyledons*. Kuala Lumpur: The Malayan Nature Society.

Hooker, J. D. (1897) *The Flora of India Vol.VI. Orchidaceae to Cyperaceae*. Kent: L. Reeve.

Ingraham, J. L., & Ingraham, C. A. (1995). *Introduction to Microbiology.* Belmont, CA: Wadsworth.

Jecquat, C.(1990) *Plants from the Markets of Thailand*. Bangkok: Editions Duang Kamol.

Kubitzki, K.(1990). Gnetaceae. In *the Families and Genera of Vascular Plants: Pteridophytes and Gymnosperms,* Vol. I, 383-886.

Koneman, W. E., Allen, D. S., Janda, M. W., Schreckenberger, C. P., & Washington, C. (1994). *Introduction to Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: J. B. Lippincott.

Kleyn, J., & Bicknell, M. (1999). *Microbiology Experiments*: *A Health Science Perspective* (2nd ed.). Boston: McGraw-Hill.

Latha, B.K.,& Latha, M.S. (2014). Curative Efficacy of Methanolic Extract of *Monochoria vaginalis* against Carbon Tetrachloride (CCl_4) induced Liver Fibrosis in Male Wistar Rats. *J. Pharm. Bio. Sci*., *9(1)*, 71-76.

Machshwari, J. K. (1963). *The Flora of Delhi*. New Deihi: Council of Scientific & Industrial Research.

Mckane, L., & Kandel, J. (1996). *Microbiology* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill.

Nester, Eugene, Roberts.W , Evans. C, & Nester, Martha T. (1995). *Microbiology: a Human Perspective*. Dubugue: WCB.

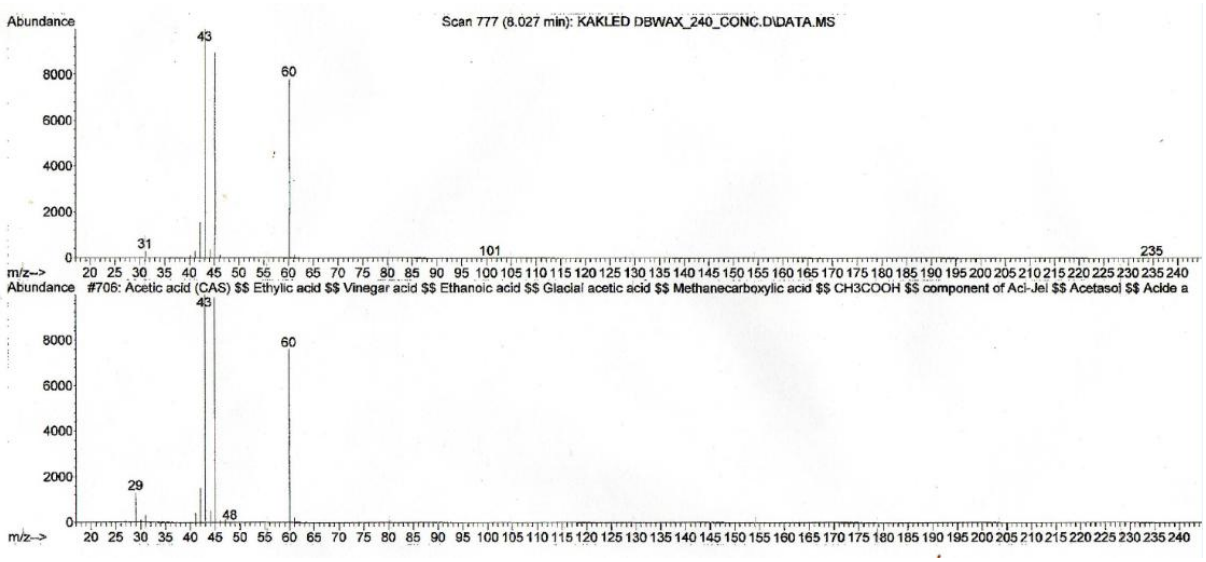
Row, L. -C., Chen, L. -M., & Ho, J. -C., (2003). Two Cerebrosides and One Acylglycosyl Sterol from *Monochoria vaginalis. J. Chin. Chem. Soc., 50(5*), 1103-1107.

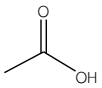
Sundararajanraja, S., Praveenkumar, R., Selvarajand, R., & Kumar, S.B. (2011) Evaluation of Phytoconstituents and Anti-nephrotoxic and Antioxidant Activities of *Monochoria vaginalis*. *J. Pharm. Sci., 24(3)*, 293-301.

Tortora, G. J., Berdell, R. F., & Christine, L. C. (1995). *Microbiology* (5th ed.). California: Benjamin/Cummings.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
โครมาโทแกรมและสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดหยาบผักเขียด

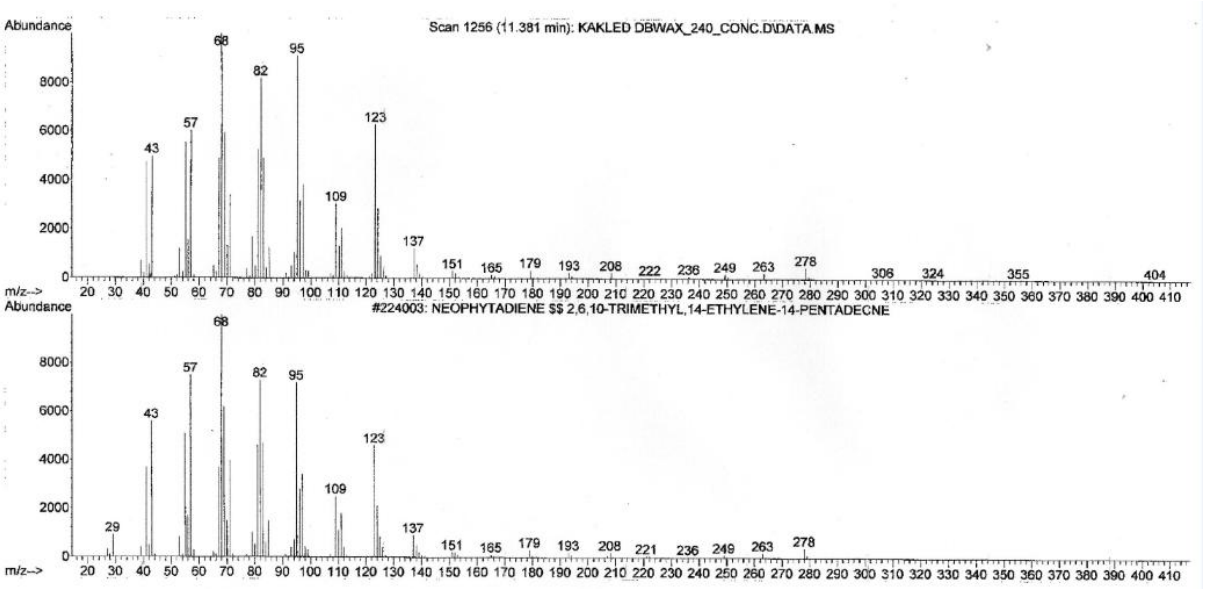


Structure: 

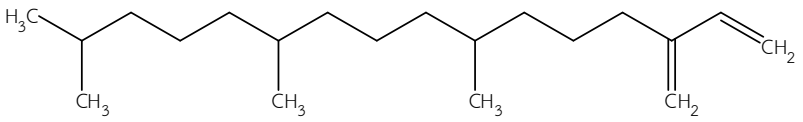
Molecular formula: $C_2H_4O_2$

Molecular weight: 60

ภาพภาคผนวก ก-1 โครมาโทแกรมของ Acetic acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 7.99 minute, Quality: 90 %, Total: 3.77%, ID: Acetic acid



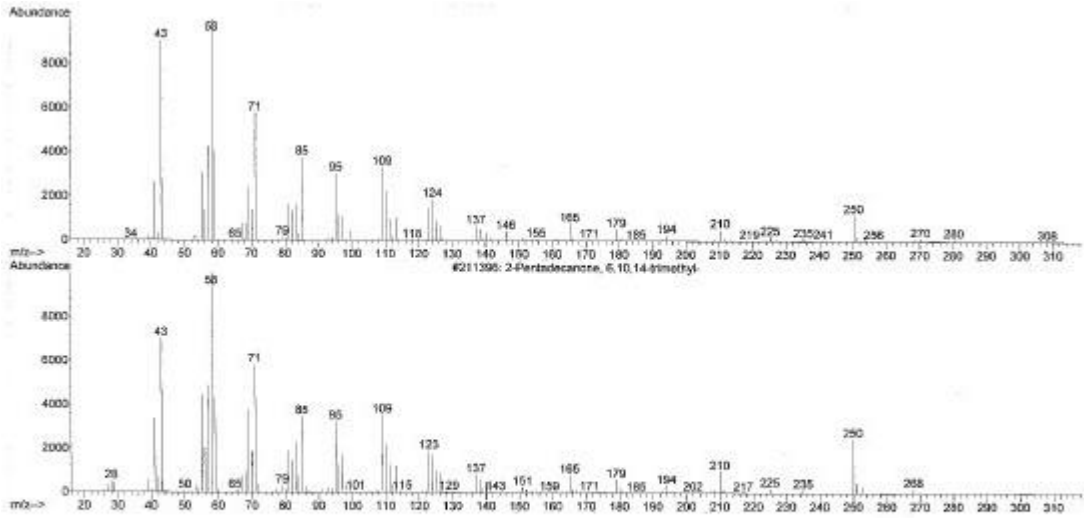
Structure:



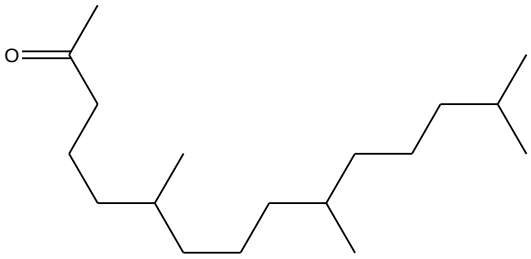
Molecular formula: $C_{20}H_{32}$

Molecular weight: 278.52

ภาพภาคผนวก ก-2 โครมาโทแกรมของ Neophytadiene ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 11.39 minute, Quality: 99 %, Total: 3.077%, ID: Neophytadiene



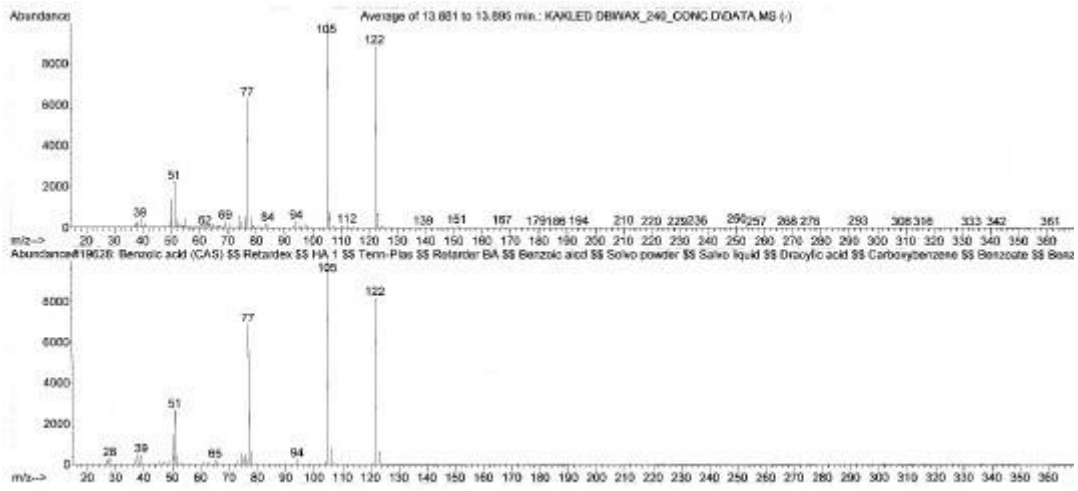
Structure:



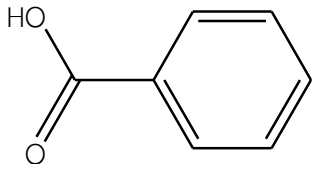
Molecular formula: $C_{18}H_{36}O$

Molecular weight: 268.48

ภาพภาคผนวก ก-3 โครมาโทแกรมของ6, 10, 14-trimethyl-2-Pentadecanone ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 12.46 minute, Quality: 97 %, Total: 0.307%, ID: 6, 10, 14-trimethyl-2-Pentadecanone



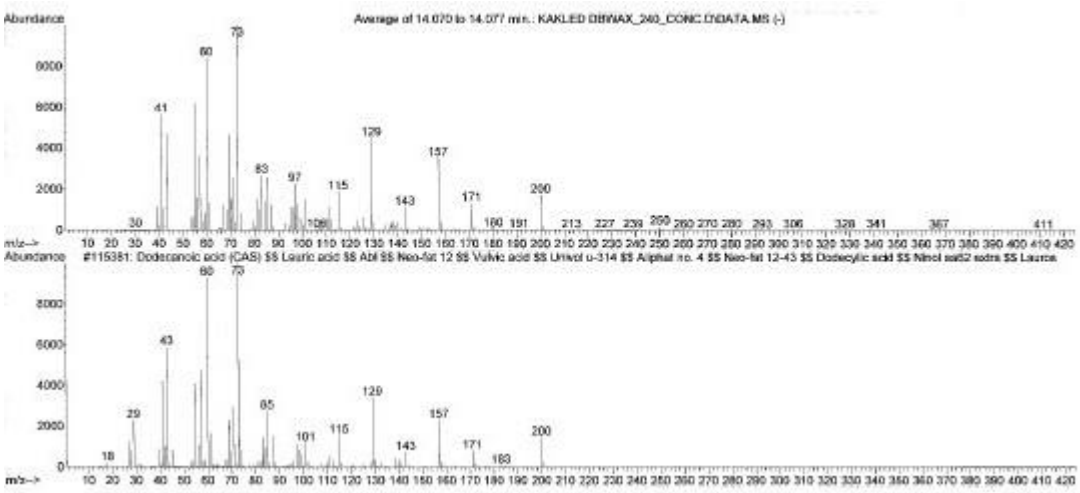
Structure:



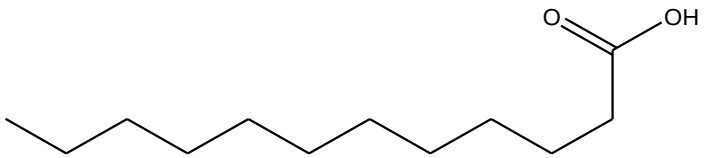
Molecular formula: $C_7H_6O_2$

Molecular weight: 122.12

ภาพภาคผนวก ก-4 โครมาโทแกรมของ benzoic acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MSเทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 13.88 minute, Quality: 94 %, Total: 0.167, ID: benzoic acid



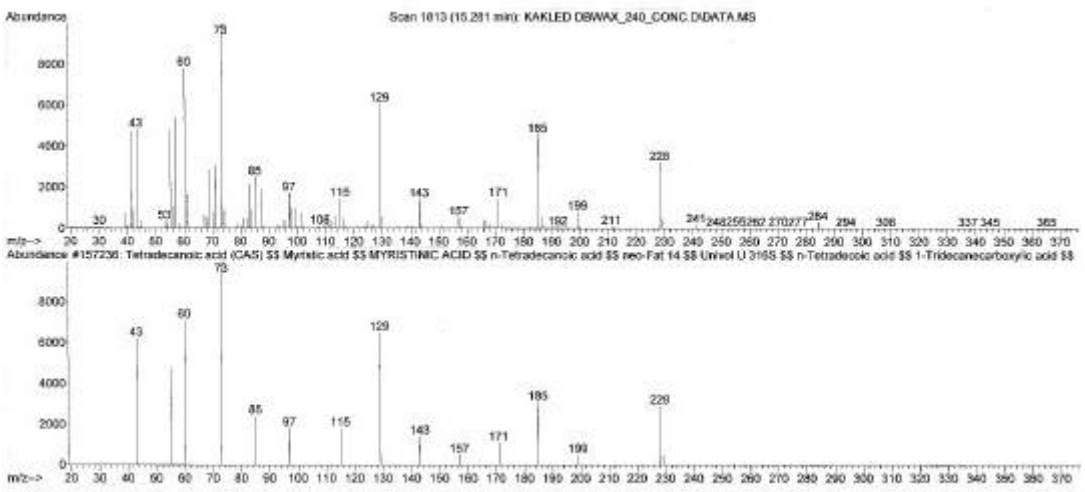
Structure:



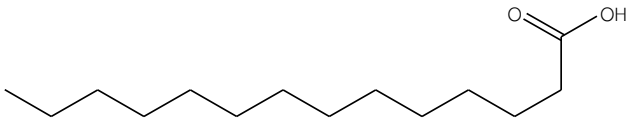
Molecular formula: $C_{12}H_{24}O_2$

Molecular weight: 200.32

ภาพภาคผนวก ก-5 โครมาโทแกรมของ Laurie acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 14.07minute, Quality: 99 %, Total: 0.266%, ID: Laurie acid



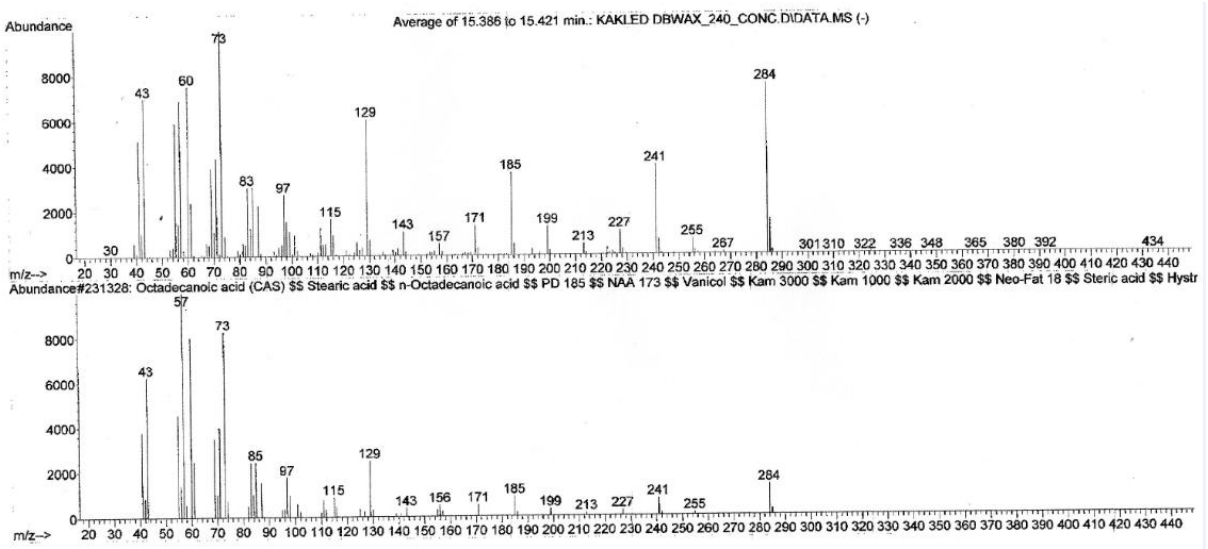
Structure:



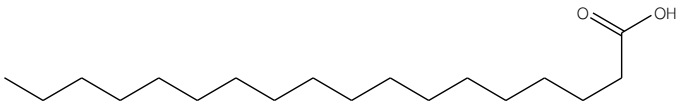
Molecular formula: $C_{14}H_{28}O_2$

Molecular weight: 228.37

ภาพภาคผนวก ก-6 โครมาโทแกรมของ Myristic acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 15.28 minute, Quality: 98 %, Total: 0.983%, ID: Myristic acid



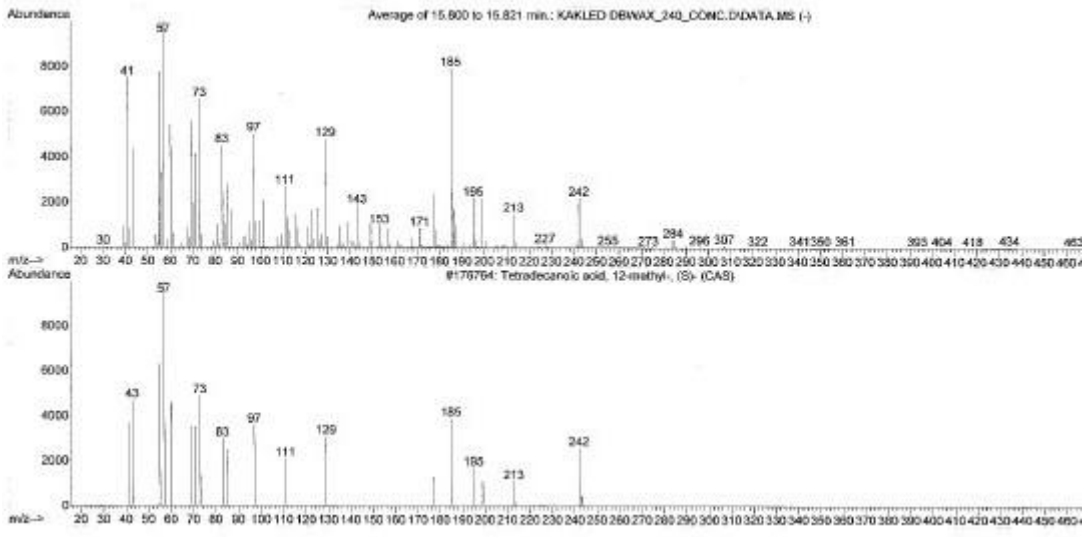
Structure:



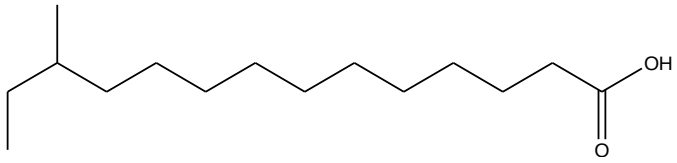
Molecular formula: $C_{18}H_{36}O_2$

Molecular weight: 284.48

ภาพภาคผนวก ก-7 โครมาโทแกรมของ Stearic acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 15.427 minute, Quality: 99 %, Total: 3.421%, ID: Stearic acid



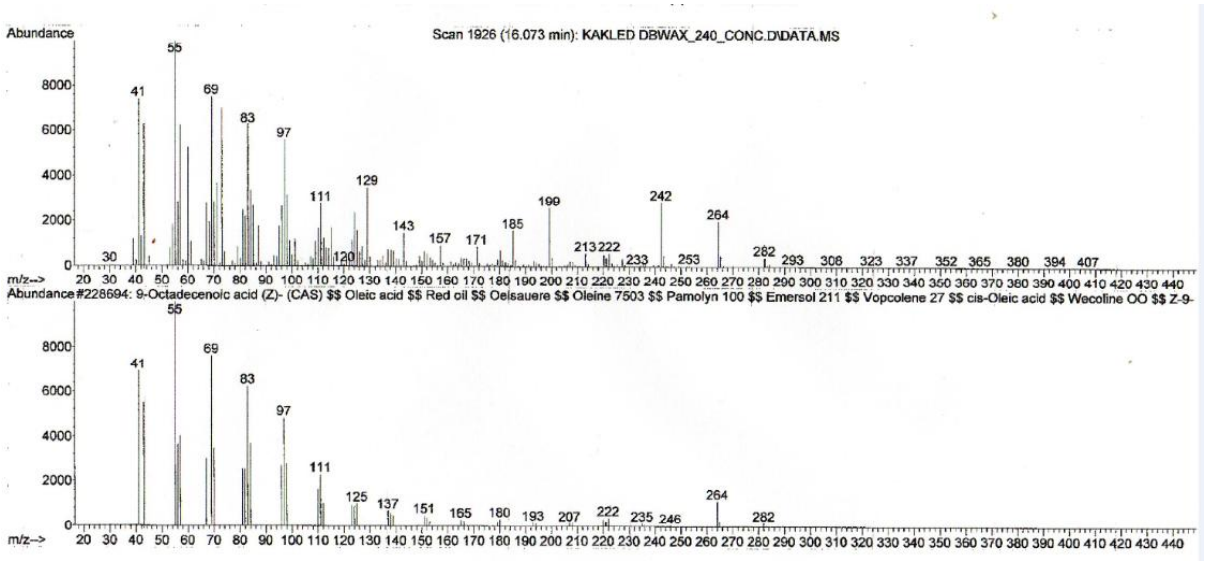
Structure:



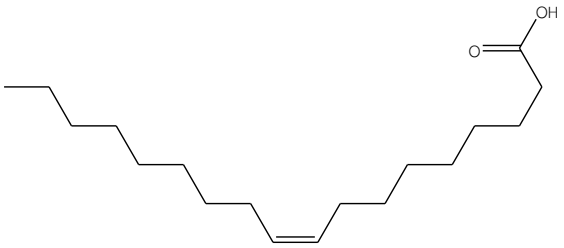
Molecular formula: $C_{15}H_{30}O_2$

Molecular weight: 242.40

ภาพภาคผนวก ก-8 โครมาโทแกรมของ12-methyl-tetradecanoic acid ของสารสกัดหยาบผักเขียดที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 15.80 minute, Quality : 98 %, Total: 0.416%, ID: 12-methyl-tetradecanoic acid



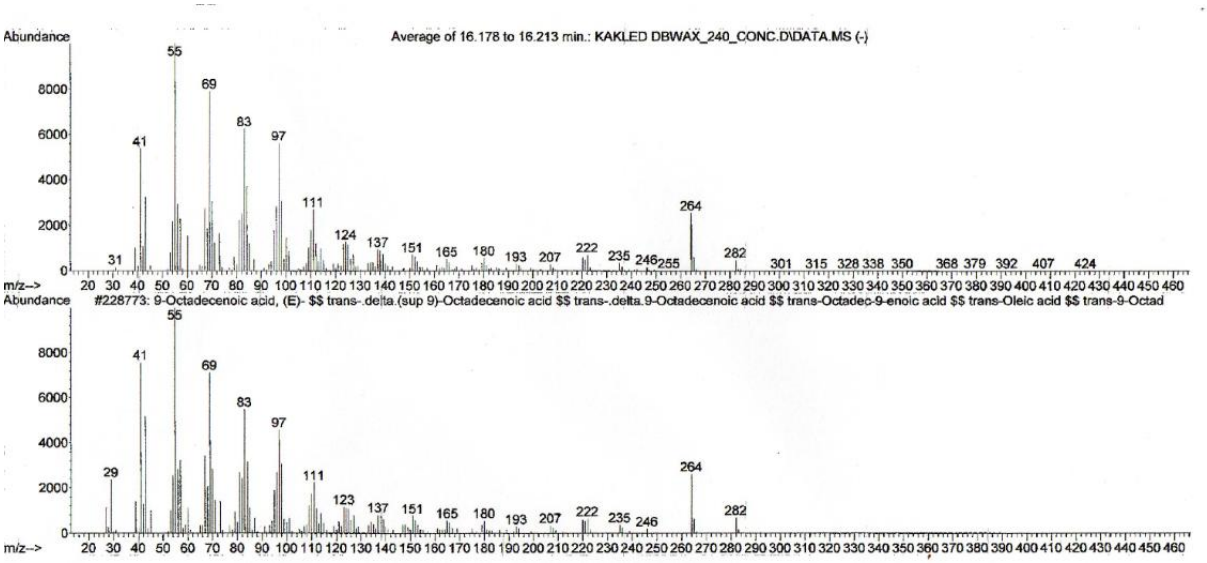
Structure:



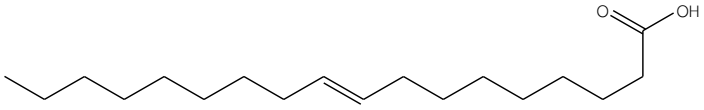
Molecular formula: $C_{18}H_{34}O_2$

Molecular weight: 282.46

ภาพภาคผนวก ก-9 โครมาโทแกรมของ*9-cis*-Oleic acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่องGC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 16.07 minute, Quality: 97 %,Total: 6.6%, ID: *9-cis*-Oleic acid



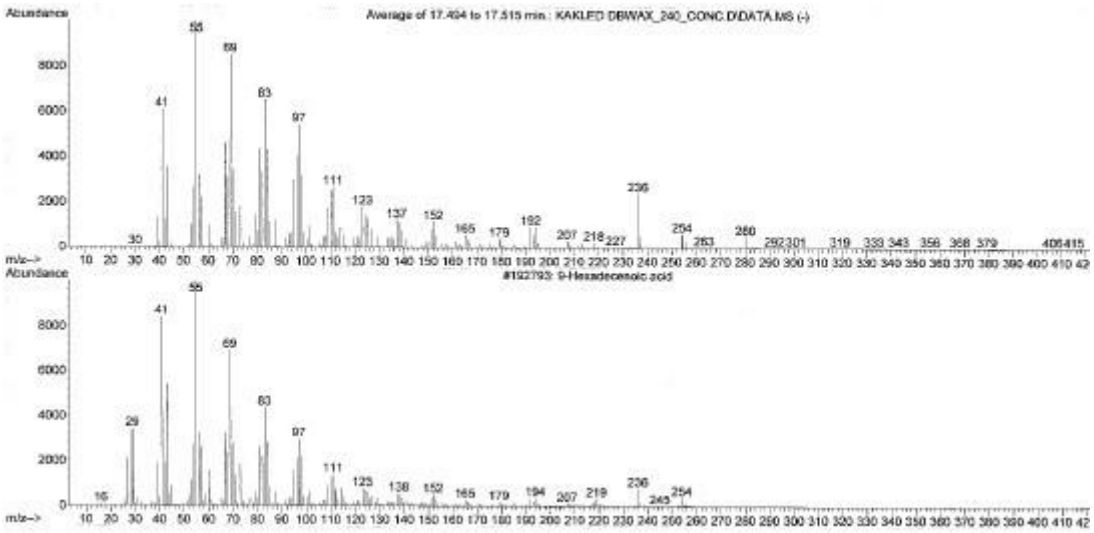
Structure:



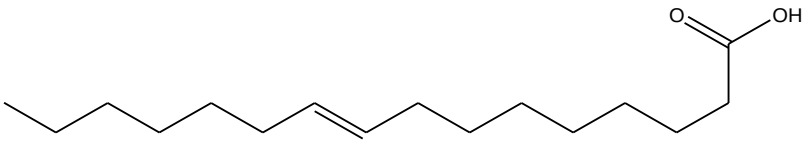
Molecular formula: $C_{18}H_{34}O_2$

Molecular weight: 282.46

ภาพภาคผนวก ก-10 โครมาโทแกรมของ *trans*-Oleic acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 16.202 minute, Quality: 97 %,Total: 2.136%, ID: *trans*-Oleic acid



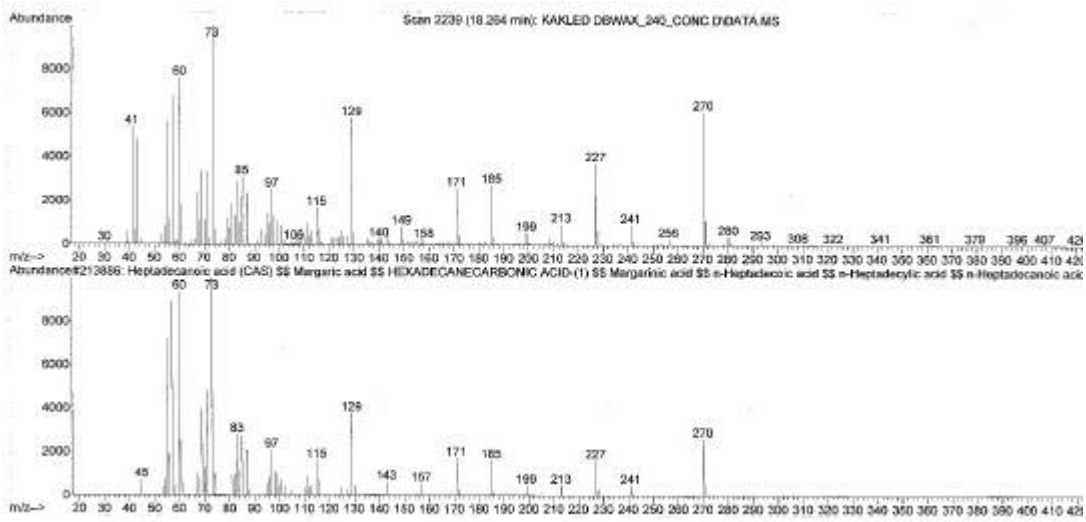
Structure:

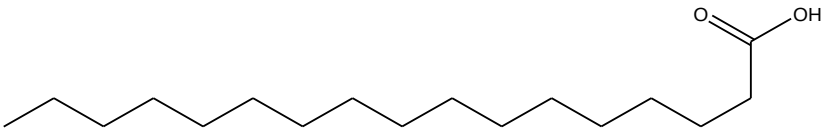


Molecular formula: $C_{16}H_{30}O_2$

Molecular weight: 254.40

ภาพภาคผนวก ก-11 โครมาโทแกรมของ9-hexadecenoic acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่องGC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 17.50 minute, Quality: 91 %,Total: 1.507%, ID: 9-hexadecenoic acid



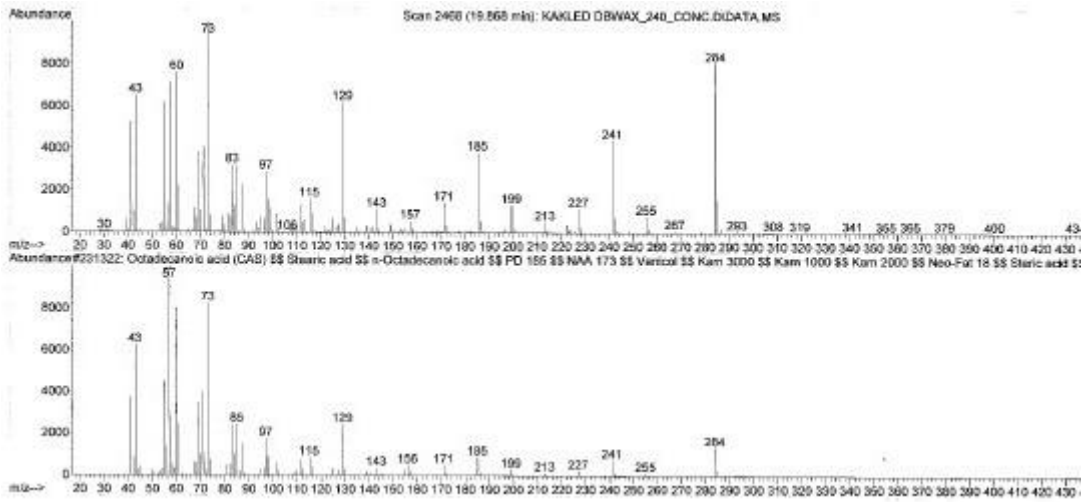


Structure:

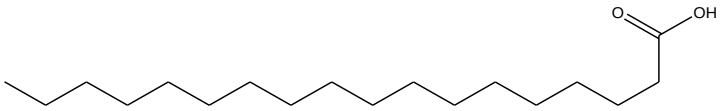
Molecular formula: $C_{17}H_{34}O_2$

Molecular weight: 270.45

ภาพภาคผนวก ก-12 โครมาโทแกรมของ margaric acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่องGC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 18.26 minute, Quality: 99 %, Total: 0.773%, ID: margaric acid



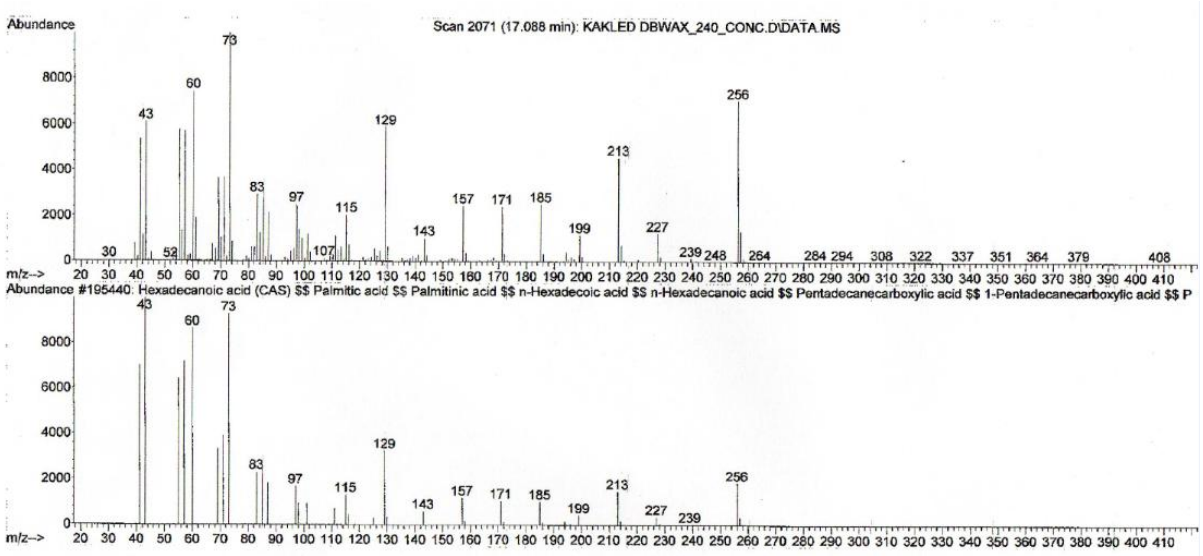
Structure:



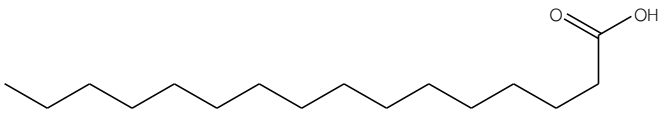
Molecular formula: $C_{18}H_{36}O_2$

Molecular weight: 284.47

ภาพภาคผนวก ก-13 โครมาโทแกรมของ stearic acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 19.87 minute, Quality: 99 %,Total: 0.773%, ID: stearic acid



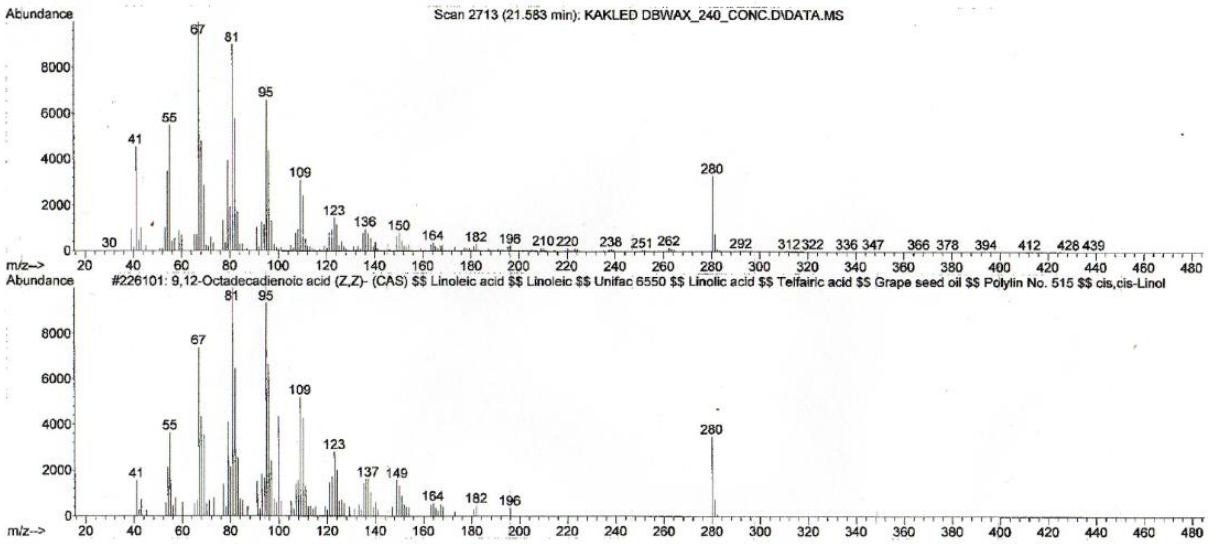
Structure:



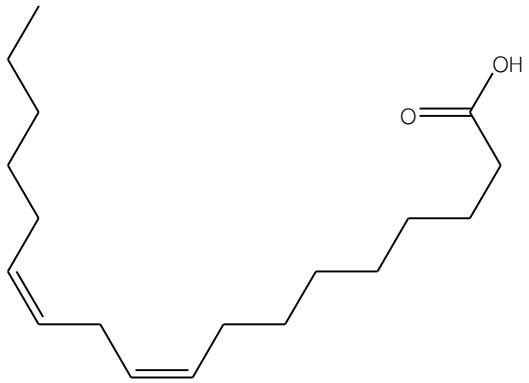
Molecular formula: $C_{16}H_{32}O_2$

Molecular weight: 256.62

ภาพภาคผนวก ก-14 โครมาโทแกรมของ Palmitic acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 17.18 minute, Quality: 99 %,Total: 17.18%, ID: Palmitic acid



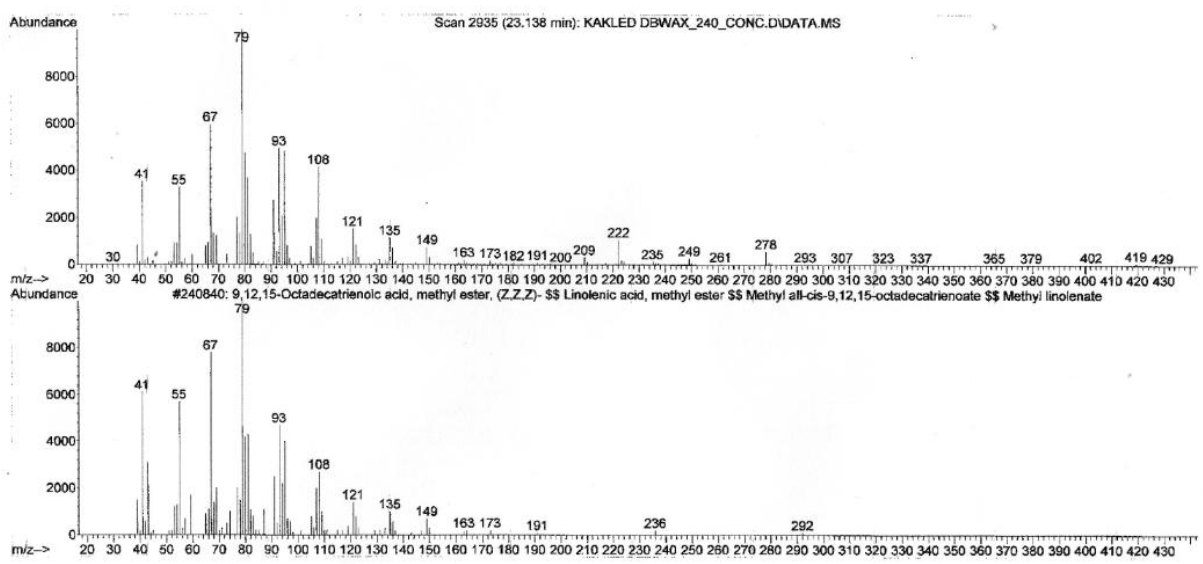
Structure:



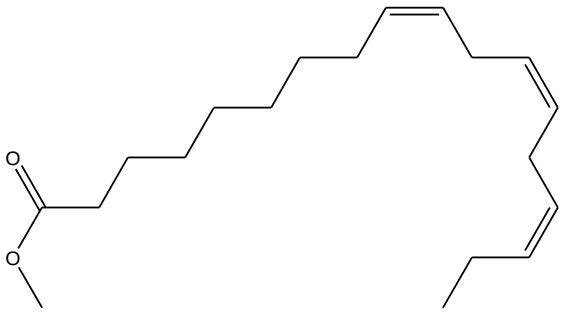
Molecular formula: $C_{18}H_{32}O_2$

Molecular weight: 280.45

ภาพภาคผนวก ก-15 โครมาโทแกรมของ Linoleic acid ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 21.61 minute, Quality: 97 %,Total: 17.59%, ID: Linoleic acid



Structure:



Molecular formula: $C_{19}H_{32}O_2$

Molecular weight: 292.46

ภาพภาคผนวก ก-16 โครมาโทแกรมของ Methyl linolenate ของสารสกัดหยาบผักเขียด ที่ได้จากเครื่อง GC/MS เทียบกับ Library Searched: Wiley7N edition, Retention Time 23.14 minute, Quality: 81 %, Total: 5.95%, ID: Methyl linolenate

ภาคผนวก ข

เครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ภาพภาคผนวก ข-1 เครื่อง Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS)

ภาพภาคผนวก ข-2 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)