

ฤทธิ์ทางชีวภาพและความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีปลากั้ง
(*Phlogacanthus pulcherrimus*)

BIOACTIVITY AND GENETIC DIVERSITY OF
Phlogacanthus pulcherrimus



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาดำเนินการตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-SC-M-020-011

ฤทธิ์ทางชีวภาพและความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีปลากั้ง
(*Phlogacanthus pulcherrimus*)

BIOACTIVITY AND GENETIC DIVERSITY OF
Phlogacanthus pulcherrimus



T145912



พฤษวรัช หลอดเข็ม
PRUSSAWAT LORDKHEM

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 145912
วันเดือนปี 27 ส.ค. 2560

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

BIOACTIVITY AND GENETIC DIVERSITY OF
Phlogacanthus pulcherrimus



A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2016

KMITL-2016-SC-M-020-011

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2016

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

“ฤทธิ์ทางชีวภาพ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีปลากั้ง
(*Phlogacanthus pulcherrimus*)”
(BIOACTIVITY AND GENETIC DIVERSITY OF *Phlogacanthus pulcherrimus*)

ชื่อนักศึกษา

นายพัชรวรรษ หลอดเข็ม

รหัสประจำตัว

57605110

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ	พนา โลหะทรัพย์ทวี
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง)	อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม
ผศ.ดร.โอฬการ วัฒนชาติ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ	โอฬการ วัฒนชาติ
ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	พัชนี เจริญยิ่ง
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

วัน/ เดือน/ ปี ที่สอบ 15 ธันวาคม พ.ศ. 2559 เวลา 09.00 - 12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 ตึกจุฬามณวลัยลักษณ์ 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุชนิ ธนะบริพัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 23 เดือน ธันวาคม พ.ศ. 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ขึ้นนิตยสารหรือสื่อ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ทางชีวภาพและความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ตีปลากิ่ง (<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i>)
ชื่อนักศึกษา	พฤษววรรษ หลอดเข็ม
รหัสประจำตัว	57605110
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.พชณี เจริญยิ่ง

บทคัดย่อ

ตีปลากิ่ง (*Phlogacanthus pulcherrimus*) อยู่ในวงศ์ Acanthaceae จัดเป็นผักพื้นบ้าน และพืชสมุนไพร วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากใบตีปลากิ่ง โดยสกัดสารจากใบตีปลากิ่งด้วยเมทานอล ตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดเมทานอล พบสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต อัลคาลอยด์ สารประกอบฟีนอลิก คูมาริน ไตรเทอร์ปีน ไดเทอร์ปีน และ สเตอรอยด์ จากนั้นสกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction (Partition) ได้สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน (DE) เอทิลอะซิเตท (EE) บิวทานอล (BE) และน้ำ (AE) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัด EE มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระสูงสุด สารสกัด DE มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงสุด ขณะที่สารสกัด BE มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมากที่สุด จากนั้นเลือกสารสกัด DE มาแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารสกัดส่วนย่อยไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane fraction : DF) 1-11 พบว่าสารสกัดส่วนย่อย DF1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงสุด และสารสกัดส่วนย่อย DF7 มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ จึงวิเคราะห์สารสกัดส่วนย่อย DF1 และ DF7 ด้วยเทคนิค GC/MS พบว่าในสารสกัดส่วนย่อย DF1 พบสารที่น่าสนใจ 3 สาร ได้แก่ 2,4-Di-*tert*-butylphenol, Squalene และ α -Pinene ส่วนสารสกัดส่วนย่อย DF7 พบสารที่น่าสนใจ 6 สาร ได้แก่ 2,4-Di-*tert*-butylphenol, Phytol, Neophytadiene, Dihydroactinidiolide, Isololiolide และ Loliolide นอกจากนี้ยังศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตีปลากิ่งที่เก็บจากหลายแหล่งในประเทศไทยด้วยเทคนิค Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าตีปลากิ่งในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ ความเป็นกลุ่มเดียวกันที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน Jaccard's coefficient เท่ากับ 0.75

คำสำคัญ : ความเป็นพิษต่อเซลล์ ความหลากหลายทางพันธุกรรม ตีปลากิ่ง ตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Bioactivity and genetic diversity of <i>Phlogacanthus pulcherrimus</i>
Student Name	Prussawat Lordkhem
Student ID	57605110
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2016
Thesis Advisor	Asst. Prof. Supattra Poeaim
Thesis Co-advisor	Asst. Prof. Patchanee Charoenying

Abstract

Phlogacanthus pulcherrimus (Acanthaceae) has been used as an indigenous vegetable and herbal medicine. The objective of this research was to investigate phytochemicals, antioxidant, antibacterial and cytotoxic activities of *P. pulcherrimus* leaves. *P. pulcherrimus* leaves were macerated with methanol. Phytochemical screening in the methanolic extract revealed the presence of carbohydrates, alkaloids, phenolics, coumarins, triterpenes, diterpenes and sterols. The methanolic extract was partitioned with dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol to obtained dichloromethane (DE), ethyl acetate (EE), butanolic (BE) and aqueous (AE) extracts. The EE extract showed the highest total phenolic content and antioxidant activities. The DE and BE extract showed the highest cytotoxic and antibacterial activities, respectively. The DE extract was separated by column chromatography to afford dichloromethane fractions (DF) 1-11. The DF1 exhibited the highest cytotoxic activities and the DF7 exhibited antioxidant potential. The GC/MS analysis of DF1 and DF7 were carried out. The result showed the occurrence of 3 interesting compounds; 2,4-di-*tert*-butylphenol, α -pinene and squalene, in DF1 and 6 interesting compounds; 2,4-di-*tert*-butylphenol, phytol, neophytadiene, dihydroactinidiolide, isololiolide and loliolide, in DF7. Moreover, this research also was to evaluate genetic diversity of *P. pulcherrimus* in various locations of Thailand using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) technique. The result indicated that they were together in group with Jaccard's coefficient at 0.75.

Keywords : Cytotoxic activity, Genetic diversity, *Phlogacanthus pulcherrimus*,

Phytochemical screening, Antioxidant activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ทางผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คอยช่วยเหลือและแก้ไขปัญหา ข้อบกพร่องต่างๆ ในทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร.พัชนี เจริญยิ่ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ เกี่ยวกับขั้นตอนและเทคนิคของการสกัดสารจากพืช และ แยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ตลอดจนการวิเคราะห์ต่างๆ ทางด้านเคมี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เยี่ยม อาจารย์บัณฑิตประจำ และ ผศ.ดร.โองการ วณิชชีวะ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ ที่ให้คำแนะนำและตรวจทานรูปเล่มวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ อาจารย์พรชัย หลายพสุ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ขอขอบพระคุณ ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับทุนอุดหนุนการศึกษาตลอดหลักสูตร และ ทุนสนับสนุนการวิจัย จากสำนักบริหารโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ขอขอบพระคุณ คุณวินัย สมประสงค์ ในการระบุชนิดตัวอย่างดีปลากั้ง และอนุเคราะห์ ตัวอย่างดีปลากั้งบางตัวอย่าง รวมทั้งผู้อนุเคราะห์ตัวอย่างดีปลากั้งท่านอื่นๆ ที่ให้ความร่วมมือในการจัดส่งตัวอย่าง หรือ ให้เข้าไปเก็บตัวอย่างดีปลากั้ง

ขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทยาศาสตร์ทั้งภาคชีววิทยาและภาควิชาเคมี ที่ได้เอื้ออำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีต่างๆ ซึ่งรวมไปถึงผู้อนุเคราะห์เซลล์ไลน์และเชื้อแบคทีเรีย สำหรับการทดลองในวิทยานิพนธ์นี้ ตลอดจนมิตรภาพและกำลังใจที่ดีจากเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ระดับปริญญาโทและปริญญาตรี ภาคชีววิทยาและภาควิชาเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณณัฐพร มานะประดิษฐ์ คุณวิภารัตน์ ศิริพงษ์ คุณเกษรา คงกล้า และคุณสุภานัน สุขศิริ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่มีส่วนช่วยในการสนับสนุนและเป็นกำลังใจอย่างมากในการทำวิทยานิพนธ์นี้ จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นายพลชววรรษ หลอดเข็ม

ธันวาคม 2559

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป	ญ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ดีปลาทั้ง (<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T. Anderson)	4
2.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ	7
2.2.1 วิธี DPPH.....	8
2.2.2 วิธี ABTS	8
2.2.2 วิธี FRAP	8
2.3 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์	9
2.3.1 วิธี Disc diffusion	9
2.3.2 วิธี Broth dilution และ Agar dilution	9
2.3.3 วิธี Bioautography	9
2.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์.....	11
2.5 เทคนิค Sequence-related amplified polymorphism (SRAP).....	13
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
2.6.1 การศึกษาสารสำคัญของพืชสกุล <i>Phlogacanthus</i> Nees	14
2.6.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล <i>Phlogacanthus</i> Nees	17
2.6.3 งานวิจัยเกี่ยวกับเทคนิค SRAP	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	23
3.1 พีช	23
3.2 เชื้อแบคทีเรีย	24
3.3 เซลล์ไลน์.....	24
3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ	25
3.5 โปรแกรม	27
3.6 สารเคมี	27
3.6.1 สารเคมีในการสกัดและแยกสาร	27
3.6.2 สารเคมีในการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น.....	28
3.6.3 สารเคมีในการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	29
3.6.4 สารเคมีในการศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ	29
3.6.5 สารเคมีในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	30
3.6.6 สารเคมีในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์	30
3.6.7 สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ.....	30
3.6.8 สารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค SRAP	31
3.6.9 สารเคมีในเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	31
3.7 วิธีการทดลอง	32
3.7.1 การสกัดและแยกสาร.....	32
3.7.2 การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS	34
3.7.3 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น	35
3.7.4 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	38
3.7.5 การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ	38
3.7.6 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.....	40
3.7.7 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์.....	41
3.7.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	42
3.7.9 การสกัดดีเอ็นเอ.....	42
3.7.10 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP.....	43
3.7.11 เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	46
4.1 สารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง	46
4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง	46
4.2.1 การตรวจสอบสารพฤษเคมีเบื้องต้น	46
4.2.2 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	47
4.2.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ	48
4.2.4 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	49
4.2.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์	49
4.2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS	51
4.3 สารสกัดใบตีปลากั้งชั้นต่างๆ	54
4.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบตีปลากั้งชั้นต่างๆ	55
4.4.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	55
4.4.2 การตรวจสอบอัลคาลอยด์	55
4.4.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ	57
4.4.4 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย	59
4.4.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์	61
4.4.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS	64
4.5 สารสกัดส่วนย่อยไคคลอโรมีเทน	67
4.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนย่อยไคคลอโรมีเทน	68
4.6.1 การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ	68
4.6.2 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์	69
4.6.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS	70
4.7 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP	75
4.7.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค SRAP	75
4.7.2 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม	77
4.7.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม	79
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	84
5.1 สรุปผลการวิจัย	84
5.2 ข้อเสนอแนะ	86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	87
ภาคผนวก.....	106
ภาคผนวก ก.....	107
ภาคผนวก ข.....	108
ภาคผนวก ค.....	111
ภาคผนวก ง.....	118
ประวัติผู้เขียน.....	124
ผลงานทางวิชาการ.....	125



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ข้อได้เปรียบและข้อจำกัดของวิธีการตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แต่ละวิธี.....10
3.1	ตัวอย่างดีปลาทั้งที่ใช้ในการศึกษา.....23
3.2	รหัสและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค SRAP31
3.3	การวิเคราะห์ผลการตรวจสอบสารประกอบโพลีไซคลิกในพืช37
3.4	ส่วนประกอบของสารเคมีในปฏิกิริยาพื้นฐานของเทคนิค SRAP สำหรับ 1 ตัวอย่าง44
3.5	ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคมีในปฏิกิริยาที่ปรับเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม44
3.6	อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในเทคนิค SRAP44
4.1	ผลการทดสอบสารพิษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดเมทานอลจากใบดีปลาทั้ง47
4.2	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดเมทานอลจากใบดีปลาทั้งด้วยเทคนิค GC/MS52
4.3	น้ำหนัก ผลได้ และลักษณะของสารสกัดชั้นต่างๆ.....54
4.4	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดชั้นต่างๆ.....55
4.5	ความเข้มข้นของสารสกัดชั้นต่างๆ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์.....59
4.6	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นต่างๆ.....59
4.7	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดชั้นต่างๆ.....60
4.8	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดชั้นต่างๆ ทดสอบที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร61
4.9	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด DE ด้วยเทคนิค GC/MS.....65
4.10	น้ำหนักและผลได้ของสารสกัดส่วนย่อยไคคลอโรมีเทน67
4.11	เปอร์เซ็นต์ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดส่วนย่อย DF1-DF7 ทดสอบเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร.....69
4.12	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดส่วนย่อย DF1 ด้วยเทคนิค GC/MS.....71
4.13	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดส่วนย่อย DF7 ด้วยเทคนิค GC/MS.....73
4.14	ความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสมในปฏิกิริยาของเทคนิค SRAP สำหรับ 1 ตัวอย่าง.....77
4.15	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค SRAP จากไพรเมอร์ที่เหมาะสม80
4.16	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน Jaccard's coefficient ของตัวอย่างดีปลาทั้ง82
ก-1	รายนามผู้วิเคราะห์ตัวอย่างดีปลาทั้ง107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง-1	สามารถฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 118
ง-2	สามารถฐานโทรลิกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH 119
ง-3	สามารถฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP 122



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ลักษณะลำต้น (ก) ใบ (ข) ช่อดอก (ค) และผล (ง) ของตีปลากั้ง5
2.2	ใบตีปลากั้งกับลาบปลาตุก.....6
2.3	การเปลี่ยน Tetrazolium เป็นฟอร์มมาซาน.....11
2.4	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Tetrazolium salt บางชนิด12
2.5	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Phlogantholide A และ Phloganthoside14
2.6	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Phlogacantholide B , Phlogacantholide C, Phlogacanthoside A , Phlogacanthoside B และ Phlogacanthoside C.....16
3.1	สรุปขั้นตอนการสกัดสารโดยเทคนิค Liquid-liquid extraction.....33
4.1	ลักษณะของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง46
4.2	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งกับ เปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH (ซ้าย) และ ABTS (ขวา).....48
4.3	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งกับ เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์50
4.4	GC/MS โครมาโทแกรมของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง51
4.5	ลักษณะของสารสกัดชั้นต่างๆ.....54
4.6	ผลการตรวจสอบอัลคาลอยด์โดยเทคนิค TLC สเปรย์ด้วย Dragendorff's spray56
4.7	ผลการตรวจสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นต่างๆ โดยเทคนิค TLC Bioautography สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล57
4.8	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดชั้นต่างๆ กับเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้าน สารอนุมูลอิสระ DPPH (บน) และ ABTS (ล่าง).....58
4.9	ลักษณะของเซลล์เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Phase contrast ที่กำลังขยาย 100 เท่า เปรียบเทียบระหว่างเซลล์หลุมชุดควบคุม (ซ้าย) กับเซลล์หลุมที่ทดสอบกับ สารสกัด DE ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ขวา) หลังจากบ่ม 20 ชั่วโมง62
4.10	ลักษณะของผลึกฟอร์มมาซานของเซลล์ Vero เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Phase contrast ที่กำลังขยาย 100 เท่า เปรียบเทียบระหว่างเซลล์หลุมชุดควบคุม (ซ้าย) กับเซลล์หลุมที่ทดสอบกับสารสกัด DE ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ขวา) หลังจากเติม MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมง.....63
4.11	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด DE กับเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ ของเซลล์63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.12 GC/MS โครมาโทแกรมของสารสกัด DE.....	64
4.13 ผลการตรวจสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยไคคลอโรมีเทน โดยเทคนิค TLC Bioautography บนแผ่น Normal phase TLC สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล.....	68
4.14 GC/MS โครมาโทแกรมของสารสกัดส่วนย่อย DF1.....	70
4.15 GC/MS โครมาโทแกรมของสารสกัดส่วนย่อย DF7.....	72
4.16 ผลจากการปรับความเข้มข้นของสารเคมีในปฏิกิริยา PCR ของเทคนิค SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ Me1/Em1 ; M คือ VC 100 bp plus DNA Ladder แถวที่ 1-4, 5-8, 9-12, 13-16 และ 17-20 ปรับความเข้มข้นของ dNTP, MgCl ₂ , ดีเอ็นเอต้นแบบ, Taq DNA polymerase และไพรเมอร์ ตามลำดับ บนเจลอะกาโรส 3 เปอร์เซ็นต์ ความยาวเจล 6 เซนติเมตร	76
4.17 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ Me1/Em1-Em6, Me2/Em1-Em6 และ Me3/Em1-Em6 กับตัวอย่าง PP01, PP05 และ PP07 เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา ในแต่ละคูไพรเมอร์.....	78
4.18 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ Me4/Em1-Em6 และ Me5/Em1-Em6 กับตัวอย่าง PP01, PP05 และ PP07 เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา ในแต่ละคูไพรเมอร์.....	79
4.19 เดนโดแกรมของดีปลากิ่งจากเทคนิค SRAP วิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA.....	83
ค-1 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ α -Pinene.....	111
ค-2 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Undecane	111
ค-3 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 3,5-Dimethylbenzaldehyde	111
ค-4 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 1,3-Di-tert-butylbenzene	112
ค-5 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Caprolactam.....	112
ค-6 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Tetradecane	112
ค-7 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 1-Dodecanol.....	112
ค-8 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 2,4-Di-tert-butylphenol.....	113
ค-9 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Dihydroactinidiolide.....	113
ค-10 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Hexadecane.....	113
ค-11 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Cyclododecane	113
ค-12 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 2-Hexyl-1-decanol.....	114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ค-13 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Isololiolide	114
ค-14 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Loliolide	114
ค-15 Mass spectrum ของ Pluchidiol.....	114
ค-16 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Octadecane.....	115
ค-17 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Neophytadiene.....	115
ค-18 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone.....	115
ค-19 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Phytol	115
ค-20 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Methyl palmitate	116
ค-21 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Palmitic acid.....	116
ค-22 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Eicosane.....	116
ค-23 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Methyl linoleate.....	116
ค-24 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Methyl linolenate	117
ค-25 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Methyl stearate	117
ค-26 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Docosane	117
ค-27 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Squalene.....	117
ง-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	118
ง-2 กราฟมาตรฐานโทรลิกซ์สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH 120	
ง-3 กราฟมาตรฐานโทรลิกซ์สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS 121	
ง-4 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP	122

คำย่อ/สัญลักษณ์

2,4-DTBP	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol
Abs _{control}	Control absorbance
Abs _{sample}	Sample absorbance
ABTS	2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]
AE	Aqueous extract
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AMOVA	Analysis of molecular variance
ANOVA	Analysis of variance
BE	Butanolic extract
BHA	Butylated hydroxyanisole
BHT	Butylated hydroxytoluene
CBDP	CAAT box derived polymorphism
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytidine triphosphate
DE	Dichloromethane extract
DF	Dichloromethane fraction
dGTP	Deoxyguanosine triphosphate
DMRT	Duncan's multiple range test
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EE	Ethyl acetate extract
FBS	Fetal bovine serum
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GC/MS	Gas chromatography/Mass spectrometer
HPLC	High performance liquid chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IC ₅₀	50 % Inhibitory concentration
INT	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride
ISSR	Inter-simple sequence repeat
ME	Methanolic extract
mgAAE	milligram ascorbic acid equivalent
mgGAE	milligram gallic acid equivalent
mgTE	milligram trolox equivalent
MHA	Mueller Hinton agar
MIC	Minimal inhibitory concentration
MLC	Minimal lethal concentration
MTS	5-[3-(carboxymethoxy)phenyl]-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MW	Molecular weight
NA	Nutrient agar
NBT	Nitroblue tetrazolium
NMR	Nuclear magnetic resonance
NSS	Normal saline solution
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffer saline
PC	Paper chromatography
PCR	Polymerase chain reaction
PMS	Phenazine methosulfate
PVP	Polyvinylpyrrolidone
QTL	Quantitative trait locus
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Retention time
SCoT	Start codon targeted polymorphism
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SRAP	Sequence-related amplified polymorphism
SSR	Simple sequence repeats

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับโรงเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TBE buffer	Tris-borate EDTA buffer
TE buffer	Tris-EDTA buffer
TBHQ	2- <i>tert</i> -butylhydroquinone
TLC	Thin layer chromatography
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)- <i>s</i> -triazine
TRAP	Total radical trapping antioxidant parameter
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean
UV	Ultraviolet
WST-1	Sodium 5-(2,4-disulfophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazolium inner salt
XTT	Sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium inner salt



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ตีปลากั้ง (*Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson) จัดอยู่ในวงศ์ Acanthaceae ถือเป็นผักพื้นบ้านชนิดหนึ่ง ชาวบ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ นิยมนำใบสดและยอดอ่อนมารับประทานเป็นผักเคียง ผักแก้มลาบ น้ำพริก (นงคราญ และปรัชญา, 2553 ; พรรณนีย์, 2553 ; วินัย และคณะ, 2554 ; ประทีป, 2555 ; วินัย และคณะ, 2555 ; นัทธี, 2556 ; สุภาภรณ์, 2558 ; Somprasong, 2014) สรรพคุณทางยาของตีปลากั้งมีความเชื่อกันว่ามีส่วนช่วยบำรุงกำลัง คลายเครียด ขับปัสสาวะ บำรุงตับ บำรุงสายตา แก้เบาหวาน และแก้ความดัน (พรรณนีย์, 2553 ; ผู้จัดการออนไลน์, 2557 ; ขนิษฐา และคณะ, 2558 ; สุภาภรณ์, 2558) ใบ ลำต้น และราก ต้มน้ำดื่ม แก้ดีซ่าน ปัสสาวะเหลือง ตาเหลือง (งานการแพทย์แผนไทย จังหวัดอุดรธานี, 2553; จันทร์ทิรา และคณะ, 2556) เป็นต้น ซึ่งที่ผ่านมายังไม่พบรายงานการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของตีปลากั้ง มีเพียงการศึกษาในพืชที่สกุลเดียวกัน เช่น ห่อมช้าง (*P. curviflorus* (Wall.) Nees) มีการศึกษาถึงสารสำคัญ (Yuan *et al.*, 2005 ; Lai *et al.*, 2009 ; Panyaphu *et al.*, 2012) และฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ (Panyaphu *et al.*, 2012) ห่อมใต้ (*P. thysiflorus* Nees) มีการศึกษาถึงสารสำคัญ (Barua *et al.*, 1985 ; Barua *et al.*, 1987 ; Chakravarty and Kalita, 2012 ; Ilham *et al.*, 2012a) ฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือด (Chakravarty and Kalita, 2012 ; Ilham *et al.*, 2012b) ฤทธิ์ระงับปวด (Mukherjee *et al.*, 2009 ; Ilham *et al.*, 2012b) ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Singh and Singh, 2010 ; Ahmed *et al.*, 2012 ; Devi *et al.*, 2012) และฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ (Chanu *et al.*, 2012 ; Tassa *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารสำคัญใน *P. tubiflorus* Nees (Yadav *et al.*, 1998) *P. guttatus* Nees (Yadav *et al.*, 1999) และ *P. pubinervius* Nees (Laitonjam *et al.*, 2012) เป็นต้น ดังนั้นตีปลากั้งจึงเป็นพืชที่น่าสนใจนำมาศึกษา ในเบื้องต้นได้มีการศึกษาในกรณีศึกษา และคณะ (2556) พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เกิดการต่อยอดในงานวิจัยนี้

ตีปลากั้งพบได้ในประเทศอินเดีย (Anderson, 1867) ไทย มาเลเซีย เมียนมา ลาว และเวียดนาม (วินัย และคณะ, 2554 ; สุภาภรณ์, 2558 ; Somprasong, 2014) ในประเทศไทยพบได้ในหลายจังหวัด โดยจะพบในป่าตามธรรมชาติ เช่น เขตพื้นที่ศูนย์ภูฟ้าพัฒนา จังหวัดน่าน (ยิ่งยง และคณะ, 2552) ตามสถานที่รวบรวมและแสดงพรรณไม้ เช่น ศูนย์รวบรวมและอนุรักษ์พันธุกรรมพืช พรรณไทย สวนเฉลิมพระเกียรติ 55 พรรษา กรุงเทพฯ (พรรณนีย์, 2553) และมักพบอยู่ตามบริเวณบ้านของชาวบ้านแถวภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ ที่ปลูกไว้เพื่อรับประทาน (สุภาภรณ์, 2558) ปัจจุบันตีปลากั้งยังถูกนำมาจำหน่ายตามตลาดสดทางภาคเหนือในรูปแบบใบสด เพื่อนำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ทางการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รับประทาน (พาณิชย์, 2553) หรือจำหน่ายเป็นต้นพันธุ์ตามร้านจำหน่ายต้นไม้เพื่อนำไปปลูก แต่ยังไม่แพร่หลายนัก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างดีปลากั้ง โดยศึกษาในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม สร้างแผนที่ทางพันธุกรรม และติดตามยีน เป็นต้น เทคนิค SRAP พัฒนาขึ้นมาโดย Li and Quiros (2001) เพื่อลดความยุ่งยากของขั้นตอนต่างๆ ในเทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) และทำให้สามารถทำซ้ำได้ เมื่อเทียบกับเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Li *et al.*, 2013) เทคนิค SRAP ถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่เริ่มพัฒนาขึ้น ตัวอย่างเช่น การศึกษาในหญ้าขน (Budak *et al.*, 2004) โปต้น (Han *et al.*, 2008) เบลูจมาศ (Shao *et al.*, 2010) บัวหลวง (Yang *et al.*, 2012) กระเทียม (Chen *et al.*, 2013) และหม่อน (Hu *et al.*, 2015) เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงเลือกเทคนิค SRAP มาใช้ในการศึกษาตัวอย่างดีปลากั้งในประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบดีปลากั้ง
- 2) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีปลากั้ง

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1) ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของดีปลากั้ง โดยสกัดสารจากใบดีปลากั้งด้วยวิธีการหมัก และเทคนิค Liquid-liquid extraction แยกสารด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี และตรวจสอบสารพิษทุกชนิดเบื้องต้น ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต อัลคาลอยด์ สารประกอบฟีนอลิก ซาโปนิน แอนทราควิโนน ไกลโคไซด์ คูมาริน และไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS), Ferric reducing antioxidant power (FRAP) และ TLC Bioautography ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Paper disc diffusion กับเชื้อ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 และ *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) กับเซลล์ HepG2, HT-29, KB, MCF-7 และ Vero แล้วนำสารสกัดมาตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตีปลากั้งด้วยเทคนิค SRAP โดยทำการหาสถานะและคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม แล้วนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ทราบถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบตีปลากั้ง ได้แก่ สารพฤษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ความเป็นพิษต่อเซลล์ และองค์ประกอบทางเคมี เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและเป็นแนวทางในการนำสารสกัดไปพัฒนาหรือประยุกต์ใช้ต่อไป

2) ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของตีปลากั้ง เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน และเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ดีปลากั้ง (*Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson)

ดีปลากั้ง (*Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson) จัดอยู่ในวงศ์ Acanthaceae ซึ่งปัจจุบันพืชในวงศ์นี้มีการจัดจำแนกตาม Scotland and Vollesen (2000) โดยอาศัยข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ สัณฐานวิทยาของละอองเรณู (Pollen morphology) และการเรียงของกลีบดอก (Collora aestivation) โดยดีปลากั้งมีการจัดจำแนก ดังนี้

วงศ์ (Family)	:	Acanthaceae
วงศ์ย่อย (Subfamily)	:	Acanthoideae
เผ่า (Tribe)	:	Ruellieae
เผ่าย่อย (Subtribe)	:	Andrographinae
สกุล (Genus)	:	<i>Phlogacanthus</i> Nees

ดีปลากั้งเป็นไม้พุ่มสูง สูงประมาณ 2 เมตร (รูปที่ 2.1ก) ใบเรียงตรงข้ามเป็นใบเดี่ยว รูปใบหอกหรือรูปใบหอกกลับถึงรูปขอบขนาน ยาว 8-25 เซนติเมตร กว้าง 2-8 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1ข) ช่อดอกเกิดตามปลายกิ่งเป็นแบบช่อเชิงลดหรือคล้ายช่อกระจุกแยกแขนง ยาว 3-15 เซนติเมตร ดอกมีกลีบดอก 5 กลีบ เชื่อมกันเป็นหลอด ปลายแยกเป็น 5 แฉก ขนาดเล็ก สีชมพูอมม่วงเข้ม (รูปที่ 2.1ค) ผลเป็นผลแบบแห้งแตก ยาว 3-4 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1ง) (พรรณนีย์, 2553 ; Somprasong, 2014) การขยายพันธุ์จะใช้การเพาะเมล็ดหรือปักชำ (สุภาภรณ์, 2558)

ดีปลากั้งพบได้ในประเทศอินเดีย (Anderson, 1867) ไทย มาเลเซีย เมียนมา ลาว และเวียดนาม (วินัย และคณะ, 2554 ; สุภาภรณ์, 2558 ; Somprasong, 2014) ในประเทศไทยพบที่จังหวัดลำพูน (นงคราญ และปรัชญา, 2553) เชียงใหม่ ดาก (วินัย และคณะ, 2555) ชุมพร ตราด พังงา ระนอง สุรินทร์ (Somprasong, 2014) และอุบลราชธานี (สำนักงานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมจังหวัดอุบลราชธานี, ม.ป.ป.) เป็นต้น โดยจะพบในป่าตามธรรมชาติ เช่น เขตพื้นที่ศูนย์ภูฟ้าพัฒนา จังหวัดน่าน (ยิ่งยง และคณะ, 2552) เขตอุทยานแห่งชาตินาญ-น้ำโสม จังหวัดอุดรธานี (งานการแพทย์แผนไทย จังหวัดอุดรธานี, 2553) และบริเวณพื้นที่ลุ่มน้ำสงครามตอนล่าง (รัศมี และอริรัช, 2553) ตามสถานที่รวบรวมและแสดงพรรณไม้ เช่น ศูนย์รวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชพรรณไทย สวนเฉลิมพระเกียรติ 55 พรรษา กรุงเทพฯ (พรรณนีย์, 2553) ศูนย์อนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชคลองไผ่ โครงการอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) จังหวัดนครราชสีมา (ขจรศักดิ์ และคณะ, 2554) สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่ (Fiyero, 2556) และสถานีทดลองการใช้น้ำชลประทานที่ 1 (แม่แตง) จังหวัดเชียงใหม่ (ฝ่ายเผยแพร่การใช้น้ำชลประทาน, 2558) และมักจะพบอยู่ตามบริเวณ

บ้านของชาวบ้านแถวภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ ที่ปลูกไว้เพื่อรับประทาน (สุภาภรณ์, 2558) ปัจจุบันตีปลากั้งยังถูกนำมาจำหน่ายตามตลาดสดทางภาคเหนือในรูปแบบใบสด เพื่อนำมา รับประทาน (พาณี, 2553) หรือจำหน่ายเป็นต้นพันธุ์ตามร้านจำหน่ายต้นไม้เพื่อนำไปปลูก



รูปที่ 2.1 ลักษณะลำต้น (ก) ใบ (ข) ช่อดอก (ค) และผล (ง) ของตีปลากั้ง
(ที่มา : รูปถ่ายโดย พฤษวรรณ หลอดเข็ม, 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตีปลากั้งนั้นถือเป็นผักพื้นบ้านชนิดหนึ่ง มีประโยชน์ คือ ชาวบ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ นิยมนำไปสดและยอดอ่อนมารับประทานเป็นผักเคียง ผักแก้มลาบ (รูปที่ 2.2) ยำ สำนํ้าพริก ซึ่งใบตีปลากั้งจะมีรสขมปนหวาน (นงคราญ และปรัชญา, 2553 ; พรรณนีย์, 2553 ; วินัย และคณะ, 2554 ; ประทีป, 2555 ; วินัย และคณะ, 2555 ; นัทธี, 2556 ; สุภาภรณ์, 2558 ; Somprasong, 2014) สรรพคุณทางยาของตีปลากั้งมีความเชื่อกันว่ามีส่วนช่วยบำรุงกำลัง คลายเครียด ขับปัสสาวะ บำรุงตับ บำรุงสายตา แก้เบาหวาน และแก้ความดัน (พรรณนีย์, 2553 ; ผู้จัดการออนไลน์, 2557 ; ขนิษฐา และคณะ, 2558 ; สุภาภรณ์, 2558) ใบ ลำต้น และราก ต้มน้ำดื่มแก้ดีซ่าน ปัสสาวะเหลือง ตาเหลือง (งานการแพทย์แผนไทย จังหวัดอุดรธานี, 2553; จันทร์ทิรา และคณะ, 2556) รากใช้ต้มน้ำดื่มแก้ปวดเมื่อย (วงศ์สถิตย์, 2553) และใบตากแห้งบดเป็นผง ตักมา 1 ช้อนกาแฟ ใส่น้ำผึ้ง เติมน้ำอุ่นแล้วคนให้เข้ากัน ดื่มเป็นยาบำรุงกำลังแก้ปวดเมื่อย (สุภาภรณ์, 2558) ซึ่งที่ผ่านมายังไม่พบรายงานการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของตีปลากั้ง



รูปที่ 2.2 ใบตีปลากั้งกับลาบปลาตุก
(ที่มา : สล่าปู, 2556)

ตีปลากั้งมีชื่อเรียกอื่นๆ ซึ่งเป็นชื่อพื้นเมืองหรือชื่อท้องถิ่น เช่น ตีปลาช่อน (นงคราญ และปรัชญา, 2553) ตีวัวดำ (พรรณนีย์, 2553 ; Somprasong, 2014) บีปลากั้ง (รัศมี และอิริช, 2553 ; ขนิษฐา และคณะ, 2558) ดิกระทิง (นัทธี, 2556) จะเลิม (ประทีป, 2555) ผักหลีปลา เพลี้ยพาน และ บีเบย (สุภาภรณ์, 2558) เป็นต้น ซึ่งในแต่ละท้องถิ่นอาจมีการเรียกชื่อสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันแตกต่างกันไปตามแต่ละภาษา หรืออาจมีชื่อเดียวกันแต่หมายถึงสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันก็ได้ จึงทำให้มีโอกาสเกิดความสับสน (ปรัชญา, ม.ป.ป.) ตีปลากั้ง (*P. pulcherrimus* T. Anderson) ก็เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีชื่อสามัญไปตรงกับชื่อท้องถิ่นของ *Aspidistra sutepensis* K. Larsen (กมลวรรณ, 2552) และ *Tupistra grandis* Ridl. (วสันต์, 2550) ที่เรียกว่าตีปลากั้งเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยที่เกี่ยวกับตีปลากุ้งที่ผ่านมา Jongrungruangchok *et al.* (2014) ได้ศึกษาคุณค่าทางอาหารและแร่ธาตุในตีปลากุ้งที่เก็บมาจาก 6 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ เชียงใหม่ น่าน แพร่ พะเยา เพชรบูรณ์ และกรุงเทพฯ พบว่ามีความชื้น 81.20-84.59 เปอร์เซ็นต์ มีโปรตีน ไขมัน เส้นใย และคาร์โบไฮเดรต 3.68-4.17, 0.83-1.22, 3.47-5.35 และ 0.51-5.10 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และมีแร่ธาตุ โพแทสเซียม แคลเซียม เหล็ก โซเดียม แมกนีเซียม และโครเมียม 39.65-105.05, 59.98-155.41, 0.57-1.85, 1.55-3.68, 47.81-119.30 และ 0.10-0.20 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งอาจนำไปเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตีปลากุ้ง (อพ.สธ., 2556 ; อพ.สธ., 2558)

2.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (Free radical หรือ Oxidant) คือ โมเลกุล หรือ ไอออนที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอก เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีในลักษณะเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายแก่องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงโปรตีนและไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือการสร้างพันธะโควาเลนต์ (Covalent bond) กับโปรตีนหรือเอนไซม์บางชนิด ทำให้การทำงานผิดปกติ เป็นสาเหตุสำคัญของโรคหลายชนิด อนุมูลอิสระเกิดจากผลพลอยได้จากการใช้ออกซิเจนของกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ รวมทั้งปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ มลพิษ การติดเชื้อโรค รังสีอัลตราไวโอเล็ต คิวบิกจากท่อไอเสียรถยนต์ และควันบุหรี่ เป็นต้น ตัวอย่างอนุมูลอิสระ เช่น Superoxide radical (O_2^-), Hydroxyl radical (OH \cdot) และ Peroxyl radical (ROO \cdot) เป็นต้น (เจนจิรา และประสงค์, 2554)

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ สารเคมีที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในที่นี้ยังรวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารสังเคราะห์และที่เป็นสารจากธรรมชาติ เช่น Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), 2-*tert*-butylhydroquinone (TBHQ), กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid), เควอซิทิน (Quercetin), กรดแกลลิก (Gallic acid), โทโคฟีรอล (Tocopherol), คาเทชิน (Catechin) และกรดคาเฟอิก (Caffeic acid) เป็นต้น (ไชยวัฒน์ และคณะ, 2555 ; He *et al.*, 2012)

ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระมีผลมาจากหลายปัจจัย เช่น กลไกของปฏิกิริยาและสถานะในการทดสอบ ทำให้ไม่สามารถใช้วิธีการใดเพียงวิธีหนึ่งมาอธิบายความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารต่างๆ ได้อย่างสมบูรณ์ จึงจำเป็นต้องใช้วิธีวิเคราะห์หลายๆ วิธีร่วมกัน ปัจจุบันมีวิธีในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ เช่น วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS), Phosphomolybdenum, Ferric reducing antioxidant power (FRAP), β -carotene-linoleic acid, Oxygen radical

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่สามารถนำออกจำหน่ายหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

absorbance capacity (ORAC), Total radical trapping antioxidant parameter (TRAP) และ Metal ion chelating เป็นต้น (Čiž *et al.*, 2010 ; He *et al.*, 2012)

2.2.1 วิธี DPPH

วิธี DPPH รายงานครั้งแรกโดย Blois (1958) โดยใช้ DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่มีสีม่วงและมีความคงตัว ดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่ออนุมูล DPPH ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ (AH) รับไฮโดรเจนจากสารต้านอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 2.1 จะเปลี่ยนเป็นไม่มีสีและดูดกลืนแสงลดลง ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจะแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระมักจะแสดงผลในรูปของ IC₅₀ (50 % Inhibitory concentration) คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้อนุมูล DPPH ลดลงครึ่งหนึ่ง ซึ่งวิธี DPPH เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เหมาะสำหรับทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารบริสุทธิ์และสารสกัดจากพืช แต่ก็ยังมีข้อจำกัดบางประการขึ้นกับโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาทดสอบ เช่น แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับ DPPH (Charles, 2013)



2.2.2 วิธี ABTS

วิธี ABTS เป็นวิธีการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งทำปฏิกิริยากับอนุมูล ABTS โดยอนุมูล ABTS จะมีสีเขียวน้ำเงิน เมื่อถูกรีดิวซ์โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนเป็นใส ไม่มีสี วัดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ผลการวิเคราะห์มักจะแสดงในรูปของความสัมพันธ์เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน โดยทั่วไปมักจะใช้โทรล็อกซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน ข้อดีของวิธี ABTS คือ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว เหมาะสำหรับศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระในการวิเคราะห์ด้านอาหารและงานวิจัยด้านการแพทย์ นอกจากนี้วิธีนี้ยังใช้ได้กับสารที่สามารถละลายได้ในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ (Charles, 2013)

2.2.3 วิธี FRAP

วิธี Ferric reducing antioxidant power หรือ FRAP เป็นวิธีที่วัดความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ (Ferric tripyridyl triazine) ให้เป็น Fe²⁺-TPTZ (Ferrous tripyridyl triazine) ซึ่งจะมีสีน้ำเงินเข้มขึ้น ในสถานะที่ pH ต่ำ (Benzie and Strain, 1996) โดยสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นสามารถวัดได้ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร วิธีการนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว ต้นทุนต่ำ และสามารถทำซ้ำได้ เหมาะสำหรับทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของทั้งสารบริสุทธิ์และสารสกัดหยาบที่สามารถละลายน้ำได้ แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสำหรับทดสอบกับสารประกอบที่มีหมู่ไทออล (Thiol) และแคโรทีนอยด์ (Charles, 2013)

2.3 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

วิธีการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในหลอดทดลองของสารสกัดจากพืชมีอยู่หลักๆ 3 วิธี ได้แก่ วิธี Diffusion, Dilution และ Bioautography (Choma and Grzelak, 2011) การเลือกใช้วิธีใดให้เหมาะสมนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอยู่หลายปัจจัย เช่น ชนิดของเชื้อ ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และคุณสมบัติของสารสกัด เช่น ความเป็นกรด-เบส ความสามารถในการละลาย เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีจะสามารถบอกได้ว่าสารสกัดมีหรือไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ และบางวิธีจะบอกได้ถึงค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimal inhibitory concentration : MIC) และค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (Minimal lethal concentration : MLC) สรุปข้อได้เปรียบและข้อจำกัดของแต่ละวิธีดังตารางที่ 2.1 (Wilkinson, 2005)

2.3.1 วิธี Disc diffusion

วิธี Disc diffusion เป็นวิธีการตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยใช้การกระจายเชื้อ (Spread) หรือกวาดเชื้อ (Swab) ที่ทราบความเข้มข้นลงบนผิวหน้าอาหาร และวางแผ่นดิสก์ (6 หรือ 8 มิลลิเมตร) ที่เติมสารสกัดที่ทราบปริมาณที่แน่นอน ลงบนผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อเตรียมไว้ นำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือมากกว่า ครบเวลาวัดบริเวณวงใส (Clear zone, Inhibition zone) เทียบกับยาปฏิชีวนะ (Wilkinson, 2005 ; ประสาทพร, 2551) บางครั้งสารมีความหนืดหรือเป็นสารกึ่งแข็ง (Semi-solid) เช่น น้ำผึ้ง ไม่สามารถเติมลงในแผ่นดิสก์ได้ จึงมีการพัฒนาวิธี Well diffusion หรือ Hole-plate diffusion โดยใช้การเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นหลุมแล้วเติมสารลงไปแทนการใช้แผ่นดิสก์ (Magaldi *et al.*, 2004 ; Wilkinson, 2005)

2.3.2 วิธี Broth dilution และ Agar dilution

วิธี Broth dilution วิธีการทดสอบนี้จะทำให้ทราบทั้ง MIC และ MLC หลักการโดยทั่วไปของวิธีนี้ คือ เลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวซึ่งมีสารสกัดในปริมาณต่างๆ กันผสมอยู่ และสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยดูความขุ่นด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้สารบางอย่างที่สามารถบ่งชี้การเจริญของเชื้อได้ เพื่อให้อ่านค่าได้ง่ายขึ้น วิธี Agar dilution หรือเรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่า Poisoned food technique มีหลักการคล้ายกับวิธี Broth dilution ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น กล่าวคือทำการทดสอบโดยการเจือจางสารสกัดในอาหารวุ้น และถ่ายเชื้อลงบนผิวของอาหารวุ้น ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถทำการทดสอบเชื้อหลายชนิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานเดียวกันได้ ซึ่งวิธีนี้สามารถหาค่า MIC ได้ แต่ไม่สามารถหาค่า MLC ได้ (ประสาทพร, 2551)

2.3.3 วิธี Bioautography

วิธี Bioautography มีหลักการเหมือนกับวิธี Diffusion แต่สารสกัดที่ทดสอบจะนำมาแยกโดยเทคนิคThin layer chromatography (Thin layer chromatography : TLC) หรือโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (Paper chromatography : PC) จากนั้นนำแผ่น TLC หรือ PC ดังกล่าวมาใช้ทดสอบ ซึ่งวิธี Bioautography แบ่งออกเป็นอีก 3 แบบ คือ Contact bioautography วิธีนี้จะนำ

แผ่น TLC ออก จากนั้นนำอาหารที่มีเชื้อไปบ่ม ครบเวลาตรวจผลโดยสังเกตบริเวณวงใสที่เกิดขึ้น ส่วนวิธี Direct bioautography วิธีนี้จะนำแผ่น TLC จุ่มลงในสารละลายเชื้อหรือสเปรย์ด้วยสารละลายเชื้อ จากนั้นนำแผ่น TLC ไปบ่ม ครบเวลาตรวจผลโดยอาศัยหลักการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ ดีไฮโดรจีเนส (Dehydrogenase) โดยสเปรย์สารละลาย Tetrazolium salt ลงบนแผ่น TLC เอนไซม์ ดีไฮโดรจีเนส จากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตจะสามารถเปลี่ยน Tetrazolium salt เป็นฟอร์มazan (Formazan) ที่มีสี ดังนั้นหากสารมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจะปรากฏเป็นจุดสีเหลืองครีมบนพื้นสีม่วง และวิธี Immersion หรือ Agar overlay bioautography วิธีนี้เป็นการรวมเอาทั้ง 2 วิธีแรกเข้าด้วยกันโดยนำแผ่น TLC เททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงเชื้อบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่ม ครบเวลาตรวจผลเช่นเดียวกันกับวิธี Direct bioautography (Choma and Grzelak, 2011 ; Dewanjee *et al.*, 2015) ซึ่งวิธี Bioautography สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับการศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ และการยับยั้งเอนไซม์ เป็นต้น (Dewanjee *et al.*, 2015)

ตารางที่ 2.1 ข้อได้เปรียบและข้อจำกัดของวิธีการตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แต่ละวิธี

วิธีการ	ข้อได้เปรียบ	ข้อจำกัด
Disc diffusion	ต้นทุนต่ำ ใช้เพียงอุปกรณ์และสารเคมีพื้นฐานที่พบได้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดได้เป็นจำนวนมากๆ	การแพร่ของสารแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดมีความแตกต่างกัน สารประกอบที่ระเหยง่ายอาจมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากอยู่ในสภาวะปิด
Agar dilution	ต้นทุนต่ำ ใช้เพียงอุปกรณ์และสารเคมีพื้นฐานที่พบได้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา	สารสกัดที่ไม่ละลายน้ำอาจแยกชั้นออกจากอาหาร สารประกอบที่ระเหยง่ายอาจมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากอยู่ในสภาวะปิด
Broth dilution	สามารถตรวจสอบผลได้ทุกช่วงเวลา มีความแม่นยำสูง ใช้ในการตรวจสอบฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดได้เป็นจำนวนมากๆ	น้ำมันหอมระเหยจะลอยขึ้นมาที่ผิวหน้าไม่คงตัวอยู่ในอาหารและสารสกัดบางชนิดมีสีเข้ม ซึ่งจะส่งผลต่อผลการวิเคราะห์
TLC-bioautography	สามารถใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ของสารที่เป็นส่วนย่อยได้พร้อมกัน	ไม่เหมาะสำหรับการศึกษากับสารที่ออกฤทธิ์ร่วมกัน

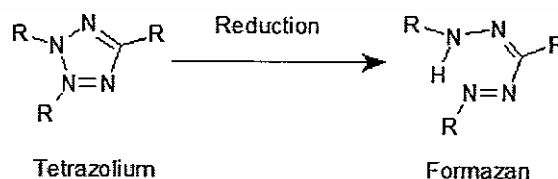
(ที่มา : Wilkinson, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นวิธีการใช้เซลล์หลายๆ ชนิด ทดสอบกับสาร แล้ววัดความมีชีวิต เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ ซึ่งมักนำไปประยุกต์ใช้ในงานคัดกรองหาสารที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งจากสารตัวอย่างหลายๆ ชนิด หรือประเมินความปลอดภัยของสารที่เป็นองค์ประกอบต่างๆ ในยา เครื่องสำอาง สารปรุงแต่งอาหาร ยาฆ่าแมลง สารเคมีทางอุตสาหกรรม และสารเคมีที่อาจปนเปื้อนสภาพแวดล้อม รวมทั้งใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารเคมีในด้านการเกิดการกลายพันธุ์ การเกิดมะเร็ง การเกิดความเป็นพิษเรื้อรัง และเฉียบพลันได้ เดิมการตรวจสอบหาความเป็นพิษของสารเหล่านั้นสามารถทำกับสิ่งมีชีวิตหรือเซลล์สัตว์ แต่ปัจจุบันเซลล์สัตว์เป็นแบบจำลองที่นิยมมากขึ้นแทนสัตว์ทดลอง ทำให้การประเมินความเป็นพิษของสารรวดเร็วและสูญเสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนาหรือผลิตภัณฑ์ลดลง (กัลยาณี และนวลอนงค์, 2550)

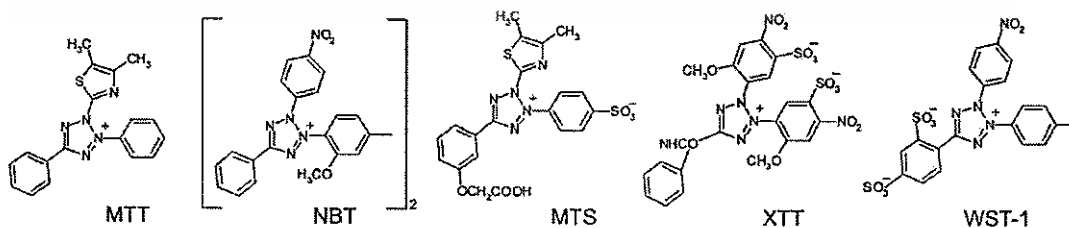
การวัดความเป็นพิษหรือความมีชีวิตของเซลล์ สามารถทำได้หลายวิธี ตัวอย่างเช่น การนับเซลล์โดยอาศัยสีย้อม (Include / Exclude dye) การวัดการปล่อยสารรังสี เช่น ^{51}Cr ที่ติดฉลากกับโปรตีนหลังจากทำการแตกเซลล์ และการวัดปริมาณการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ Radioactive nucleotides ($[^3\text{H}]$ thymidine หรือ $[^{125}\text{I}]$ iododeoxyuridine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี ในระหว่างการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งวิธีการใช้รังสีเป็นวิธีที่สามารถใช้กับปริมาณตัวอย่างจำนวนมากๆ ได้ แต่เป็นวิธีที่ยุ่งยากจะต้องวัดปฏิกิริยาเป็นจำนวนพันๆ ครั้งต่อวัน ส่วนในวิธีการย้อมด้วยสีย้อมจะต้องมีขั้นตอนในการล้างเซลล์ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่เพิ่มเวลาและอาจส่งผลให้แต่ละตัวอย่างเกิดความแตกต่างกันได้ เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader) สามารถวัดตัวอย่างได้ปริมาณมาก และมีความเที่ยงตรงสูง จึงนำมาใช้ในการวัดความมีชีวิตของเซลล์โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสี ซึ่งวิธีการวัดสี (Colorimetric assay) จะใช้สารตั้งต้นที่ไม่มีสีที่สามารถเปลี่ยนรูปเป็นสารที่มีสีได้โดยเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ซึ่ง Tetrazolium salt ถือเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจสามารถใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสหลายชนิด (Slater *et al.*, 1963) โดยวงแหวนของ Tetrazolium จะแตกออกโดยเอนไซม์จากไมโทคอนเดรีย (รูปที่ 2.3) ดังนั้นปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิต (Mosmann, 1983)



รูปที่ 2.3 การเปลี่ยน Tetrazolium เป็นฟอร์มazan
(ที่มา : <http://en.wikipedia.org/wiki/Formazan>)

การวัดความเป็นพิษหรือความมีชีวิตของเซลล์ โดยวิธีการวัดสีด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ พัฒนาโดย Mosmann (1983) โดยใช้ 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ซึ่งเป็น Tetrazolium salt มีสีเหลืองและละลายน้ำ จะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ซักซิเนตดีไฮโดรจีเนส (Succinate dehydrogenase) ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน สีม่วงและไม่ละลายน้ำ โดยผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานสามารถละลายในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide: DMSO) โพรพานอล ไอโซโพรพานอล เอทานอล DMSO : เอทานอล (1 : 1) กรดไฮโดรคลอริก 0.04 โมลาร์ในไอโซโพรพานอล โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate : SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ในกรดไฮโดรคลอริก 0.01 โมลาร์ หรือแอมโมเนียม 8-800 มิลลิโมลาร์ ใน DMSO (Kasugai *et al.*, 1990 ; Sladowski *et al.*, 1993 ; Morgan, 1998 ; Wang *et al.*, 2012 ; Septisetanyi *et al.*, 2014) และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ในช่วงความยาวคลื่น 550-600 นาโนเมตร (Twentyman and Luscombe, 1987)

นอกจาก MTT ยังมี Tetrazolium salt ชนิดอื่นๆ (รูปที่ 2.4) เช่น Nitroblue tetrazolium (NBT), Sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium inner salt (XTT), Sodium 5-(2,4-disulfophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H-tetrazolium inner salt (WST-1), 5-[3-(carboxymethoxy)phenyl]-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS) และ 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride (INT) เป็นต้น ที่สามารถนำมาใช้วัดกิจกรรมของเมตาบอลิซึมของเซลล์ ซึ่งสารแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน โดย MTT จะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานที่ไม่ละลายน้ำ สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ที่จุดสิ้นสุดปฏิกิริยา (End point) ส่วนสารชนิดอื่น เช่น XTT, MTS และ WST-1 ต้องใช้ควบคู่กับสารตัวรับอิเล็กตรอน (Intermediate electron acceptor) เช่น Phenazine methosulfate (PMS) เป็นต้น โดยจะเปลี่ยนเป็นฟอร์มาซานที่ละลายน้ำ สามารถใช้วิเคราะห์ขณะที่เกิดปฏิกิริยา (Real time) ได้ แต่ MTT เป็นสารที่นิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายมากกว่า (Berridge *et al.*, 2005) และมีราคาต่ำกว่า (เบ็ญจมาศ, 2553)



รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Tetrazolium salt บางชนิด

(ที่มา : Berridge *et al.*, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 เทคนิค Sequence-related amplified polymorphism (SRAP)

เทคนิค Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) พัฒนาขึ้นโดย Li and Quiros (2001) ซึ่งมีแนวคิดเพื่อลดความยุ่งยากของขั้นตอนต่างๆ ในเทคนิค Amplified fragment length polymorphism (AFLP) จึงทำการลดขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการต่อชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย Adapter ซึ่งเป็นขั้นตอนในเทคนิค AFLP ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ของเทคนิค SRAP ให้มีขนาดใกล้เคียงกับไพรเมอร์ของเทคนิค AFLP และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือ Polymerase chain reaction (PCR) เพียงรอบเดียว แทนการทำ PCR 2 รอบ ในเทคนิค AFLP โดยออกแบบขั้นตอนของ PCR ให้มีลักษณะเฉพาะ คือ Denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 35 องศาเซลเซียส 1 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 5 รอบ และเพิ่มอุณหภูมิ Annealing เป็น 50 องศาเซลเซียส อีกจำนวน 35 รอบ โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค SRAP และ AFLP จะมีลักษณะคล้ายกัน แถบดีเอ็นเอที่ได้จะเป็นแบบลักษณะข่มสมบูร์น (Dominant) ในรูปแบบของการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งตรงกัน และเมื่อเทียบกับเทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) เทคนิค SRAP จะใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาด 16-22 นิวคลีโอไทด์ แทนการใช้ไพรเมอร์ของ RAPD ที่ขนาดสั้นเพียง 10 นิวคลีโอไทด์ โดยเทคนิค SRAP มีข้อดีกว่าเทคนิค RAPD คือ ไพรเมอร์เส้นหนึ่งของ SRAP สามารถจับคู่กับไพรเมอร์เส้นอื่นได้อย่างอิสระ ถึงแม้ว่าเทคนิค SRAP จะเริ่มอุณหภูมิ Annealing ที่ 35 องศาเซลเซียส ใน 5 รอบแรก แต่ด้วยขนาดของไพรเมอร์ของ SRAP ที่ยาวทำให้สามารถเพิ่มอุณหภูมิของ Annealing เป็น 50 องศาเซลเซียส ได้ในรอบถัดมา ซึ่งทำให้เทคนิค SRAP สามารถทำซ้ำได้ เมื่อเทียบกับเทคนิค RAPD ที่ยังมีข้อจำกัด (Li *et al.*, 2013)

ไพรเมอร์ของเทคนิค SRAP ประกอบด้วย Forward และ Reverse primer ออกแบบโดย Li and Quiros (2001) โดย Forward primer มีขนาด 17 เบส ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า Core sequence ยาว 14 เบส โดยเริ่มต้น 10 เบสแรกที่ปลาย 5' เป็นเบสที่ไม่มีอะไรพิเศษ เรียกว่า Filler ตามด้วยเบส CCGG ออกแบบมาเพื่อให้เข้าจับกับบริเวณ Exon หรือ Open reading frame (ORF) ซึ่งเป็นบริเวณที่ประกอบด้วยเบส GC สูง ตามด้วยเบสคัดเลือก (Selective base) ที่ปลาย 3' อีก 3 เบส ที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ ส่วน Reverse primer มีขนาด 18 เบส ประกอบด้วยส่วนต่างๆ เหมือนกับ Forward primer แต่ในส่วน Filler ของ Reverse primer จะมีความยาว 11 เบส ตามด้วยเบส AATT ออกแบบมาเพื่อให้เข้าจับกับบริเวณ Promoter และ Intron ซึ่งเป็นบริเวณที่ประกอบด้วยเบส AT สูง

เทคนิค SRAP สามารถประยุกต์ใช้ในการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม (Genetic mapping) การทำ Quantitative trait locus (QTL) mapping การติดตามยีน (Gene tagging) การโคลนยีน (Gene cloning) และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Li *et al.*, 2013) Roberts and Wolfe (2014) ทำการรวบรวมงานวิจัยที่ใช้เทคนิค SRAP ตั้งแต่เริ่มพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 2001 จนถึงปี

ค.ศ. 2012 พบว่ามีมากกว่า 350 งานวิจัย ซึ่งประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

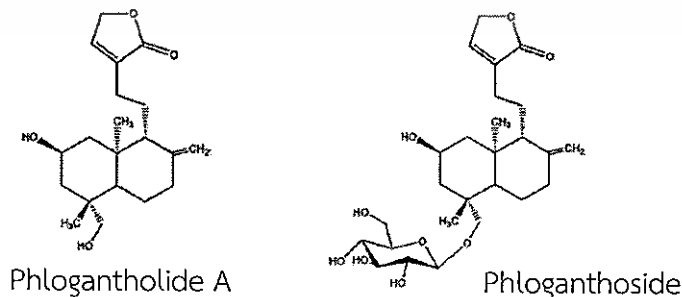
เทคนิค SRAP ถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชอย่างต่อเนื่อง เช่น การศึกษาในผักทอง (Ferriol *et al.*, 2004; ปณาลี และคณะ, 2555) หญ้าขน (Budak *et al.*, 2004) โปต้น (Han *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2008) พืชสกุลส้ม (Uzun *et al.*, 2009) เถยงมาศ (Shao *et al.*, 2010) แก่นตะวัน (ดลรัชต์ และคณะ, 2553) กาแฟอาราบิก้า (Mishra *et al.*, 2011) องุ่น (Guo *et al.*, 2012; Jing *et al.*, 2013) บัวหลวง (Yang *et al.*, 2012) กระเทียม (Chen *et al.*, 2013) และหม่อน (Hu *et al.*, 2015) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ศึกษาในเชื้อรา เช่น เห็ดหลินจือ (Sun *et al.*, 2006) เห็ดหูหนู (Tang *et al.*, 2010) เชื้อราสกุล *Monascus* (Shao *et al.*, 2011) เห็ดหอม (Fu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015) และเห็ดนางฟ้าภูฐาน (Yin *et al.*, 2014) เป็นต้น การศึกษาในสัตว์ เช่น ปลา *Takifugu obscurus* (Cheng *et al.*, 2012) หม่าจิ้งจอก อาร์กติก *Alopex lagopus* (Zhang and Bai, 2013) ปลา *Megalobrama amblycephala* (Ji *et al.*, 2014) ปลา *Harpadon nehereus* (Zhu *et al.*, 2014) และเพรียงทราย *Perinereis aibuhitensis* (Liu *et al.*, 2014) เป็นต้น

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.6.1 การศึกษาสารสำคัญของพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาสารสำคัญในดีปลาทั้ง (*P. pulcherrimus* T. Anderson) นั้นยังไม่พบว่ามีกรายงาน มีเพียงการรายงานในพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees ชนิดอื่นๆ โดยมีรายละเอียดดังนี้

Barua *et al.* (1985) ศึกษาสารสำคัญในหอมใต้ (*P. thyrsiflorus* Nees) พบสาร Phlogantholide A ($2\beta,15,18$ -trihydroxy-*ent*-labd-8(17),13-dien-16-oic lactone) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.5 เป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่มไดเทอร์ปีนแลคโตน (Diterpene lactone) และการศึกษาของ Barua *et al.* (1987) พบสาร Phloganthoside (Phlogantholide-A-19-O- β -D-glucopyranoside) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.5 เป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่มไดเทอร์ปีนกลูโคไซด์ (Diterpene glucoside)



รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Phlogantholide A และ Phloganthoside

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับค (ที่มา : KNApSACK Core System) ญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yadav *et al.* (1998) ศึกษาสารสำคัญในรากของ *P. tubiflorus* Nees พบสารชนิดใหม่ คือ Phlogacanthin เป็นสารในกลุ่มไดเทอร์พีนแลคโตน นอกจากนี้ยังพบ Lupeol, β -sitosterol และ 3-epibetulin

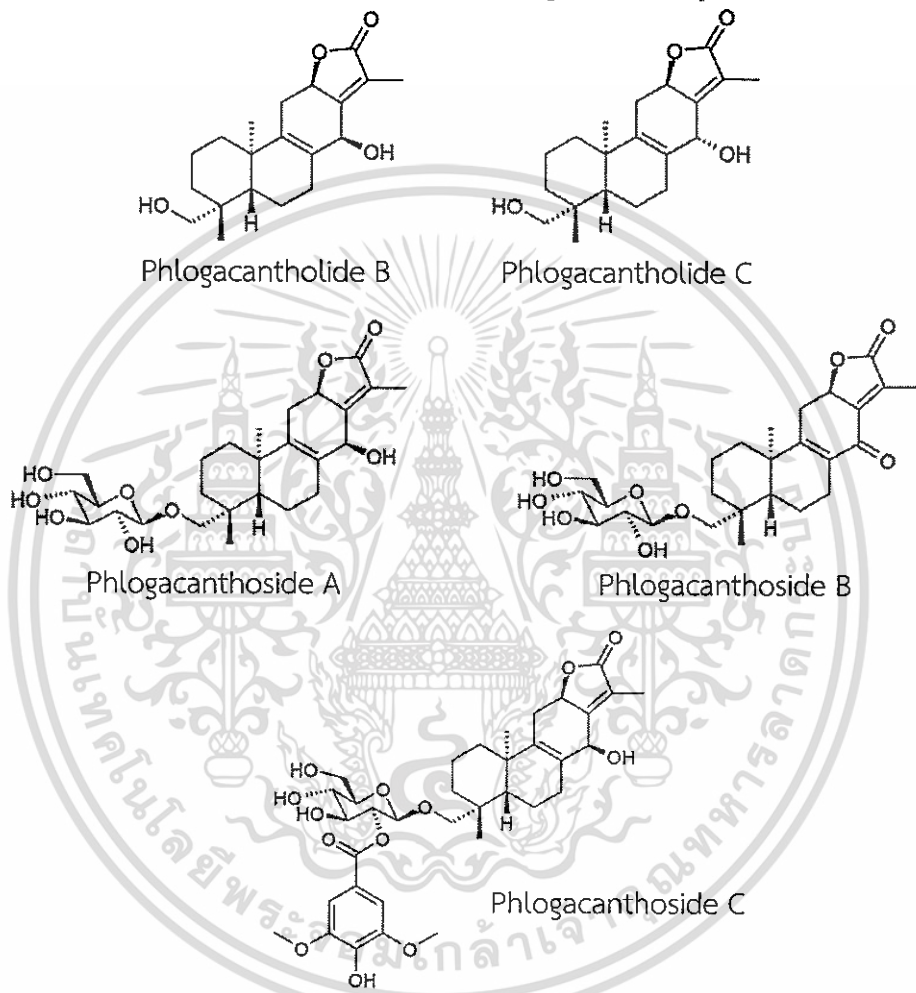
Yadav *et al.* (1999) ศึกษาสารสำคัญในก้านและรากของ *P. guttatus* Nees โดยสกัดสารด้วยตัวทำละลาย ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Preparative TLC และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR) พบสาร Guttoside เป็นสารชนิดใหม่ในกลุ่มไดเทอร์พีนแลคโตนกลูโคไซด์ (Diterpene lactone glucoside)

Yuan *et al.* (2005) ศึกษาสารสำคัญในรากหอมช้าง (*P. curviflorus* (Wall.) Nees) โดยสกัดสารจากรากหอมช้างด้วยเอทานอล และเทคนิค Liquid-liquid extraction แล้วแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column chromatography) และวิเคราะห์โดยเทคนิคทางเคมีและสเปกโตรสโคปี (Spectroscopy) พบสารชนิดใหม่ 5 สาร คือ Phlogacantholide B ($14\beta,19$ -dihydroxyabieta-8,13(15)-dien-16,12-olide) และ Phlogacantholide C ($14\alpha,19$ -dihydroxyabieta-8,13(15)-dien-16,12-olide) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไดเทอร์พีนแลคโตน Phlogacanthoside A ($14\beta,19$ -dihydroxyabieta-8,13(15)-dien-16,12-olide 19-O- β -D-glucopyranoside), Phlogacanthoside B (19-hydroxy-14-oxoabieta-8,13(15)-dien-16,12-olide 19-O- β -D-glucopyranoside) และ Phlogacanthoside C ($14\beta,19$ -dihydroxyabieta-8,13(15)-dien-16,12-olide 19-O-[2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyl)]- β -D-glucopyranoside) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มไดเทอร์พีนแลคโตนกลูโคไซด์ แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.6 นอกจากนี้ยังพบ Lupeol, β -sitosterol, β -daucosterol, Betulin, (+)-Syringaresinol และ (+)-Syringaresinol-4-O- β -D-glucopyranoside

Singh *et al.* (2008) ศึกษาสารสำคัญในใบของหอมใต้ (*P. thyriflorus* Nees) พบสารชนิดใหม่ในกลุ่มไตรเทอร์พีนแลคโตน (Triterpene lactone) 2 ชนิด และยังพบ Sitosterol, Lupeol และ Betulin

Lai *et al.* (2009) ศึกษาสารสำคัญจากรากหอมช้าง (*P. curviflorus* (Wall.) Nees) โดยสกัดสารจากรากหอมช้างด้วยเอทานอล และเทคนิค Liquid-liquid extraction แล้วแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี แล้ววิเคราะห์โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และ NMR พบสารชนิดใหม่ 7 สาร คือ Curvifloruside A ($(4\alpha,5\beta,10\alpha,14\alpha)$ -14,19-dihydroxyabieta-8,13(15)-dieno-16,12-lactone 19-(β -D-glucopyranoside)), Curvifloruside B ($(4\alpha,5\beta,10\alpha,14\alpha)$ -19-Hydroxy-14-oxoabieta-8,13(15)-dieno-16,12-lactone 19-[2-O-(4-hydroxy-3,5-dimethoxy benzoyl)]- β -D-glucopyranoside], Curvifloruside C ($(4\alpha,5\beta,10\alpha)$ -19-Hydroxy-14-oxoabieta-8,13(15)-dieno-16,12-lactone 19-[2-O-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoyl)]- β -D-glucopyranoside]) และ 19-Hydroxyjolkinolide E ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเทอร์พีน และ Curvifloruside D (9-oxo- α -bergamoten-1-yl- β -D-glucopyranoside) เป็นอนุพันธ์เบอกาโมทีน (Bergamotene) และ

Curvifloruside E (6-deoxyharpagoside) และ Curvifloruside F (6-epiharpagoside) เป็นสารจำพวก Iridoid monoterpene glucoside นอกจากนี้ยังพบ Phlogacantholide C, Phlogacantholide C diacetate, Phlogacanthoside B, Jolkinolide E, Caprarioside, Harpagoside, 8-O-(4-hydroxycinnamoyl)harpagide, 8-O-feruloylharpagide, Lup-20(29)-ene-3,23-diol, Acanthoside B และ Acetylmartynoside A



รูปที่ 2.6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ Phlogacantholide B , Phlogacantholide C, Phlogacanthoside A , Phlogacanthoside B และ Phlogacanthoside C

(ที่มา : Zhou *et al.*, 2011)

Ilham *et al.* (2012b) ศึกษาสารสำคัญในก้านของห้อมใต้ (*P. thyriflorus* Nees) โดยสกัดสารด้วยเมทานอล และเทคนิค Liquid-liquid extraction แยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และ Preparative TLC ตามลำดับ และวิเคราะห์โดยเทคนิค NMR พบสาร 19-hydroxy-labda8(17),13-diene-15,16-olide และ Pinusolidic acid (ent-labd-8(17),13-dien-15,16-olide-19-oic acid) เป็นสารในกลุ่มแลบเดนไดเทอร์ปีน (Labdane diterpene) และ Betulin

เอกลสารที่พบในก้านห้อมใต้ (P. thyriflorus Nees) โดยสกัดด้วยเมทานอล และเทคนิค Liquid-liquid extraction แยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และ Preparative TLC ตามลำดับ และวิเคราะห์โดยเทคนิค NMR พบสาร 19-hydroxy-labda8(17),13-diene-15,16-olide และ Pinusolidic acid (ent-labd-8(17),13-dien-15,16-olide-19-oic acid) เป็นสารในกลุ่มแลบเดนไดเทอร์ปีน (Labdane diterpene) และ Betulin

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Laitonjam *et al.* (2012) ศึกษาสารสำคัญในใบของ *P. pubinervius* Nees พบสาร 3-O-[β-D-glucopyranosyl-(1'→2')-α-L-rhamnopyranosyl]phlogacanthoside เป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีนอยด์ไกลโคไซด์ (Triterpenoidal glycoside) และยังพบ β-sitosterol, β-sitosterol-D-glucoside, Stigmasta-5,22-dien-7-on-3β-ol, 19-hydroxyphlogacantholide และ (2E,7Z)-2,6-dihydroxycycloocta-2,7-dienone

Ahmed *et al.* (2016) ศึกษาสารสำคัญในดอกหอมใต้ (*P. thyrsoiflorus* Nees) โดยสกัดสารจากดอกหอมใต้ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำสารสกัดที่ได้มาสกัดต่อด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction โดยใช้ไดคลอโรมีเทนและบิวทานอล ตามลำดับ สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนนำมาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และวิเคราะห์โดยเทคนิค NMR พบ β-sitosterol, Stigmasterol, 13-labdadien-15,16-olide-19-oic acid และ 19-hydroxy-8(17),13-labdadien-15,16-olide ส่วนสารสกัดชั้นบิวทานอลก็นำมาแยกสารด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี และวิเคราะห์โดยเทคนิค NMR พบ Luteolin

จากรายงานการวิจัยข้างต้น พบว่าสารสำคัญในพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees ส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มไตรเทอร์พีน ไตรเทอร์พีน แลคโตน และสเตอรอยด์

2.6.2 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees

พืชสกุล *Phlogacanthus* Nees เป็นพืชที่มีประโยชน์ มีการนำมาใช้เป็นผักและสมุนไพรพื้นบ้านหลายชนิด ตัวอย่างเช่น ดีปลากั้ง (*P. pulcherrimus* T. Anderson) นำมาใช้ประโยชน์ดังแสดงในหัวข้อ 2.1 ห่อมช้าง (*P. curvijlorus* (Wall.) Nees) ต้นใช้ต้มน้ำดื่มลดไข้ รากต้มน้ำดื่มแก้ลมพิษเดือน (ชูศรี และปริทรรศน์, 2554) ห่อมใต้ (*P. thyrsoiflorus* Nees) ใบนำมาใช้รักษาอาการไอ เสมหะ โรคหอบหืด หลอดลมผิดปกติ ดีซ่าน ท้องร่วง และโรคไขข้ออักเสบ ดอกใช้รับประทานรักษาอาการอาหารไม่ย่อย และมีกรดเกินในกระเพาะอาหาร (Singh and Singh, 2010) เป็นต้น จึงทำให้มีความสนใจในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees ในหลายชนิด แต่สำหรับดีปลากั้งยังไม่มีรายงานในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยตัวอย่างการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees มีดังนี้

Sobita and Bhagirath (2005) ศึกษาผลของสารสกัดจากพืชบางชนิดต่อโครโมโซมของรากถั่วปากอ้า (*Vicia faba*) ซึ่งรวมถึงสารสกัดจากใบของหอมใต้ (*P. thyrsoiflorus* Nees) โดยสกัดด้วยวิธี Soxhlet extraction ด้วยน้ำ ถั่วปากอ้าที่เตรียมไว้นำมาบ่มกับสารสกัดจากใบของหอมใต้ความเข้มข้น 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 ชั่วโมง ครบเวลาเตรียมสไลด์โดยตรึงเซลล์ด้วย Carnoy's fixative ย้อมด้วยสีอะซิโตคาร์มีน (Acetocarmine) และศึกษาความผิดปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสารสกัดหอมใต้ที่ความเข้มข้น 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม (Chromosome gap, Chromatid break, Chromosome break, Isochromatid break และ Centromeric break) 5.69 ± 0.014 และ 6.77 ± 0.021 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเกิดไมโคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิวเคลียส (Micronucleus) 0.14 ± 0.0004 และ 0.15 ± 0.0004 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการศึกษาดังกล่าวถือว่าสารสกัดของห้อมใต้ไม่มีผลต่อโครโมโซมของรากแก้วปาก้าในทางสถิติ

Singh and Singh (2010) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากใบของ *Cassia didymobotrya* และห้อมใต้ (*P. thyrsoiflorus* Nees) โดยสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำ เมทานอล และเอทิลอะซิเตท ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Paper disc diffusion กับเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้น โดยสารสกัดใบห้อมใต้ที่สกัดจากน้ำ และเอทิลอะซิเตท ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงที่สุด คือ *Candida albicans* ATCC 10231 ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสได้ 15 และ 17 มิลลิเมตร ส่วนสารสกัดใบห้อมใต้ที่สกัดจากเมทานอล ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงที่สุด คือ *Aspergillus niger* ATCC 16404 ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิสก์ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสได้ 17 มิลลิเมตร

Thu et al. (2010) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เบื้องต้นของสมุนไพรในประเทศเวียดนาม ซึ่งรวมถึง *P. turgidus* (Fua ex Hook. f.) Lindau โดยสกัดสารจากทั้งต้นด้วยเมทานอล ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT กับเซลล์มะเร็งเยื่อปอดของมนุษย์ (Human lung carcinoma epithelial cell line) ชนิด A549 เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (Human hepatoma cell line) ชนิด HepG2 เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด Huh-7 เซลล์มะเร็งเนื้อเยื่อของมนุษย์ (Human fibrosarcoma cell line) ชนิด HT1080 และเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (Human breast cancer cell line) ชนิด MCF-7 ผลการศึกษาพบว่าสารสกัด *P. turgidus* (Fua ex Hook. f.) Lindau เป็นพิษต่อเซลล์ทุกเซลล์ มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (50 % Inhibitory concentration : IC₅₀) เท่ากับ 4.5 ± 0.0 , 9.4 ± 0.2 , 12.8 ± 0.2 , 4.3 ± 0.1 และ 6.8 ± 0.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Ahmed et al. (2012) เปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบของห้อมใต้ (*P. thyrsoiflorus* Nees) พลุควา (*Houttuynia cordata*) ขมิ้นดำ (*Curcuma caesia*) และชมพู่น้ำดอกไม้ (*Syzygium jambos*) โดยสกัดสารด้วยเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Paper disc diffusion ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากใบของห้อมใต้ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิสก์ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 3 ชนิด ที่ใช้ศึกษา ได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสได้เท่ากับ 16.17 ± 0.477 , 15.83 ± 0.477 และ 17.67 ± 0.666 มิลลิเมตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chanu *et al.* (2012) ศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของ *Parkia javanica* (Lam.) Merr. และ ห้อมใต้ (*P. thyrsoiflorus* Nees) ทำการสกัดสารจากใบของห้อมใต้ด้วยวิธี Soxhlet extraction ด้วยน้ำ เอทานอล และเมทานอล ศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระเทียบ Trolox (Trolox) ของสารสกัดจากน้ำ เอทานอล และเมทานอล เท่ากับ 44.40 ± 1.39 , 42.53 ± 0.31 และ 61.01 ± 0.61 mg trolox equivalent (mgTE)/g extract ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เท่ากับ 55.58 ± 1.66 , 53.17 ± 0.38 และ 73.33 ± 0.76 mg ascorbic acid equivalent (mgAAE)/g extract ตามลำดับ และศึกษาด้วยวิธี FRAP พบว่าความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระเทียบ Trolox ของสารสกัดจากน้ำ เอทานอล และ เมทานอล เท่ากับ 58.90 ± 0.35 , 52.96 ± 0.69 และ 77.29 ± 0.51 mgTE/g extract ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิก เท่ากับ 32.12 ± 0.19 , 28.88 ± 0.38 และ 41.81 ± 0.68 mgAAE/g extract ตามลำดับ และศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยใช้กรด แกลลิกเป็นสารมาตรฐานพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดจากน้ำ เอทานอล และเมทานอล เท่ากับ 46.02 ± 0.47 , 37.34 ± 0.54 และ 48.75 ± 1.43 mg gallic acid equivalent (mgGAE)/g extract ตามลำดับ

Devi *et al.* (2012) ใช้สารสกัดจากใบของห้อมใต้ (*P. thyrsoiflorus* Nees) เพื่อต้าน เชื้อราบางชนิดที่ก่อโรคในหัวหอม (*Allium cepa* L.) ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus flavus*, *A. niger* และ *Rhizopus stolonifer* โดยสกัดสารจากใบของห้อมใต้ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เมทานอล และ น้ำ ทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อราตามวิธี Agar well diffusion พบว่าเมื่อสารสกัดมีความเข้มข้นมากขึ้น จะสามารถยับยั้งเชื้อราได้มากขึ้น โดยสารสกัดจากใบห้อมใต้ที่สกัดด้วยเมทานอลที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ได้สูงที่สุด ตามด้วย *A. niger* และ *R. stolonifer* ตามลำดับ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสได้เท่ากับ 30 ± 1.4 , 18.6 ± 1.1 และ 8.6 ± 1.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากใบห้อมใต้ที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้น้อยกว่าสารสกัดจากเมทานอลมีฤทธิ์ยับยั้งเพียงเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสได้เท่ากับ 8.6 ± 1.5 และ 4.3 ± 1.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ

Panyaphu *et al.* (2012) ศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสมุนไพรพื้นบ้านของชาวเมียนหรือ ชาวเข่า ที่อาศัยอยู่ทางภาคเหนือของประเทศไทย หนึ่งในสมุนไพรนั้น คือ ห้อมช้าง (*P. curviflorus* (Wall.) Nees) ผลการศึกษาพบว่า สารพฤกษเคมีเบื้องต้นที่พบ คือ สารประกอบฟีนอลิก แลคโตน โกลโคไซด์ และไตรเทอร์ปีน โดยมีของปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 17368.421 ± 0.009 mgGAE/g extract และผลการศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่าความสามารถ ในการต้านสารอนุมูลอิสระเทียบกับ BHT เท่ากับ 6588.367 mg/g extract วิธี FRAP พบว่า ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระเทียบกับเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) และ Trolox เท่ากับ

949.143±0.074 และ 12.914±0.714 mg/g extract ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย นั้นไม่ได้แสดงผล

Laitonjam *et al.* (2013) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระในใบ *P. jenkinsii* C.B. Clarke และ *P. pubinervius* T. Anderson โดยองค์ประกอบทางเคมีที่ศึกษา ได้แก่ อะมิโนอิสระ น้ำตาล สารประกอบฟีนอลิก แทนนิน ธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรอง และศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH เทียบกับ BHT โดยสกัดสารจากใบด้วยเมทานอล และคลอโรฟอร์ม ผลการศึกษาพบว่าสารสกัด *P. jenkinsii* C.B. Clarke จากเมทานอล มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัด *P. pubinervius* T. Anderson จากเมทานอล สารสกัด *P. jenkinsii* C.B. Clarke จากคลอโรฟอร์ม และสารสกัด *P. pubinervius* T. Anderson จากคลอโรฟอร์ม โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ เท่ากับ 357.718, 93.959, 32.885 และ 20.134 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Das *et al.* (2015) สกัดสารจากใบห้อมใต้ (*P. thyrsoiflorus* Nees) ด้วยเมทานอล โดยใช้วิธี Percolation จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาศึกษาสารพฤกษเคมีเบื้องต้น พบว่าในสารสกัดมี แทนนิน ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน สเตอรอยด์ อัลคาลอยด์ น้ำตาลรีดิวิซ์ และเทอร์ปีนอยด์ และศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่ามีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ต้านสารอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์ (50 % Inhibitory concentration : IC₅₀) เท่ากับ 16.73 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่กรดแอสคอร์บิกซึ่งใช้สารมาตรฐานมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Seal and Chaudhuri (2015) ศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของพืชป่าที่กินได้บางชนิดในรัฐเมฆาลัย (Meghalaya) ประเทศอินเดีย และเปรียบเทียบผลของชนิดตัวทำละลายที่นำมาสกัด หนึ่งในพืชนั้นคือ ห้อมข้าง (*P. curviflorus* (Wall.) Nees) สกัดสารจากใบห้อมข้างโดยหมักด้วยตัวทำละลายคือ เบนซีน คลอโรฟอร์ม อะซีโตน และเมทานอล ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสถานะเขย่า สารสกัดที่ได้มาศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดเบนซีน คลอโรฟอร์ม อะซีโตน และเมทานอล มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 7.82±0.67, 11.73±1.11, 27.83±5.41 และ 40.43±0.39 mgGAE/g extract ตามลำดับ และศึกษาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด โดยใช้รูติน (Rutin) เป็นสารมาตรฐาน พบว่าสารสกัดเบนซีน คลอโรฟอร์ม อะซีโตน และเมทานอล มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 33.95±0.34, 93.70±1.05, 50.78±0.51 และ 32.34±0.07 mg rutin equivalent/g extract ตามลำดับ และศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดเบนซีนมีฤทธิ์สูงที่สุด โดยมีค่า IC₅₀ ต่ำที่สุด เมื่อทดสอบกับทั้ง 2 วิธี

Tiway *et al.* (2015) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพร จากเมืองดาร์จีลิง (Darjeeling) ในรัฐเวสต์เบงกอล (West Bengal) ประเทศอินเดีย ซึ่งหนึ่งในสมุนไพรคือ ห้อมใต้ (*P. thyrsoiflorus* Nees) โดยสกัดสารจากใบของห้อมใต้ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

cancer cell line) ชนิด HeLa เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 และเซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF-7 ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากหอมไต้ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 แต่เป็นพิษต่อเซลล์ HeLa และ MCF-7 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 46.7 ± 1.3 และ 49 ± 0.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.6.3 งานวิจัยเกี่ยวกับเทคนิค SRAP

รายงานการวิจัยเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของตีปลากั้ง รวมถึงพืชในสกุล *Phlogacanthus* Nees ชนิดอื่นๆ ทั้งด้วยเทคนิค SRAP และเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ พบว่ายังไม่มีการรายงาน มีเพียงการรายงานในพืชสกุลอื่นๆ ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้เทคนิค SRAP มีดังนี้

Li *et al.* (2009) ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาในเทคนิค SRAP ของพืชสกุล *Linum* จำนวน 13 ชนิด ในการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมจะเลือกใช้ตัวอย่างเพียง 3 ชนิด โดยเริ่มจากการปรับอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ในช่วงที่ 2 ของ PCR จำนวน 12 อุณหภูมิ ตั้งแต่ 45.1 ถึง 54.8 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิ Annealing ที่ 54.5 องศาเซลเซียส ปรากฏแถบดีเอ็นเอจึงเลือกอุณหภูมิดังกล่าวมาใช้ศึกษาหาความเข้มข้นของสารเคมีในปฏิกิริยาที่เหมาะสม ได้แก่ ไพรเมอร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ dNTP และ *Taq* DNA polymerase โดยทำการปรับความเข้มข้นของสารเคมีแต่ละสารแยกกัน สารละ 4 ความเข้มข้น พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.2 ไมโครโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.3 มิลลิโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 0.08 ยูนิตต่อไมโครลิตร มีความเหมาะสมที่สุด จากนั้นรวมความเข้มข้นของแต่ละสารที่เหมาะสมเข้าในปฏิกิริยาเดียวกัน และนำไปใช้กับดีเอ็นเอตัวอย่างทั้ง 13 ชนิด พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนกับดีเอ็นเอตัวอย่างทุกชนิด แสดงให้เห็นว่าสภาวะดังกล่าวนี้มีความเสถียร เพียงตรง และเหมาะสม สามารถนำไปประยุกต์กับพืชสกุล *Linum* ได้

Shao *et al.* (2010) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเบญจมาศหนู (*Chrysanthemum morifolium*) 29 ตัวอย่าง เบญจมาศสวน (*C. indicum*) 1 ตัวอย่าง และ *C. nankingense* 1 ตัวอย่าง จากประเทศจีน โดยศึกษาลักษณะสัณฐานของดอก และศึกษาด้วยเทคนิค Inter-simple sequence repeat (ISSR) และ SRAP พบว่าจากลักษณะสัณฐานของดอกสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม ส่วนเทคนิค ISSR ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 182 แถบ จาก 22 ไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (Polymorphic band) จำนวน 149 แถบ คิดเป็น 81.87 เปอร์เซ็นต์ สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม ขณะที่เทคนิค SRAP ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 243 แถบ จากไพรเมอร์ 26 คู่ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 184 แถบ คิดเป็น 75.72 เปอร์เซ็นต์ ก็สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) พบว่าระหว่างลักษณะสัณฐานกับเทคนิค ISSR มีค่าเท่ากับ 0.246 ขณะที่ระหว่างลักษณะสัณฐานกับเทคนิค SRAP มีค่าเท่ากับ 0.624 อาจเนื่องจากเทคนิค ISSR จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ Microsatellite ส่วนเทคนิค SRAP จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนสำคัญของยีน หรือ ORF ดังนั้นเทคนิค SRAP จึงเป็นเทคนิคทางโมเลกุลที่เหมาะสมนำไปประเมินความสัมพันธ์ทางลักษณะสัณฐาน

Sun et al. (2011) ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาในเทคนิค SRAP ของ *Lonicera caerulea* L. โดยทำการปรับความเข้มข้นของสารเคมีในปฏิกิริยาแต่ละสารแยกกัน ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ Me3/Em4 แมกนีเซียมคลอไรด์ dNTP และ *Taq* DNA polymerase สารละ 4 ความเข้มข้น พบว่าไพรเมอร์ 0.2 ไมโครโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 2.0 มิลลิโมลาร์ dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์ ดีเอ็นเอต้นแบบ 30 นาโนกรัมต่อ 1 ปฏิกิริยา และ *Taq* DNA polymerase 1.0 ยูนิตต่อ 1 ปฏิกิริยา มีความเหมาะสม จึงรวมความเข้มข้นของแต่ละสารเคมีที่เหมาะสมเข้าด้วยกัน โดยใช้ไพรเมอร์คู่อื่นๆ กับดีเอ็นเอทุกตัวอย่าง พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ปฏิกิริยามีความเสถียร และยังคงแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ของตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา ซึ่งเก็บมาจากต่างสถานที่ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *L. caerulea* L. ได้

Liao et al. (2012) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Prunella vulgaris* จำนวน 26 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค SRAP และ ISSR พบว่า *P. vulgaris* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยในเทคนิค SRAP ได้แถบดีเอ็นเอ 153 แถบ จากไพรเมอร์ 17 คู่ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 134 แถบ คิดเป็น 87.93 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเทคนิค ISSR ได้แถบดีเอ็นเอ 219 แถบ จาก 20 ไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 195 คิดเป็น 89.19 เปอร์เซ็นต์ ผลจากทั้ง 2 เทคนิค สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน และมีความสัมพันธ์กับภูมิภาคของแหล่งที่มาของตัวอย่าง

Xu et al. (2013) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปอแก้ว (*Hibiscus cannabinus* L.) จำนวน 84 ตัวอย่าง จาก 26 ประเทศ โดยใช้เทคนิค ISSR และ SRAP ร่วมกัน พบว่าเทคนิค ISSR ได้แถบดีเอ็นเอ 287 แถบ จาก 28 ไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 193 แถบ คิดเป็น 81.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเทคนิค SRAP ได้แถบดีเอ็นเอ 329 แถบ จาก 26 คู่ไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 248 แถบ คิดเป็น 75.4 เปอร์เซ็นต์ รวมผลจากทั้ง 2 เทคนิค และสร้างเดนโดรแกรมพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของปอแก้วได้เป็น 2 กลุ่ม มีความสัมพันธ์กับลักษณะสัณฐาน โดยกลุ่มแรกเป็นกลุ่มของพันธุ์ป่า (Wild species) และกลุ่มที่สองเป็นพันธุ์ปลูก (Cultivars) ซึ่งในกลุ่มแรกยังสามารถออกได้เป็นสองกลุ่มย่อย คือกลุ่มของสายพันธุ์ป่าที่นำมาเพาะปลูก และกลุ่มของสายพันธุ์ป่าโดยแท้ ซึ่งในกลุ่มสายพันธุ์ป่าโดยแท้ประกอบด้วย 6 ตัวอย่าง จากประเทศแทนซาเนีย และ 3 ตัวอย่างจากประเทศเคนย่า ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าแหล่งกำเนิดของปอแก้ว อาจมาจากประเทศแทนซาเนียและเคนย่า

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 พืช

ตัวอย่างดีปลากิ่งที่ใช้ในศึกษามีจำนวน 24 ตัวอย่าง แทนด้วยรหัสตัวอย่าง PP โดยมีแหล่งที่เก็บหรือแหล่งที่ซื้อ ดังตารางที่ 3.1 มีรายชื่อบุคคลผู้ดูแลที่แสดงในตารางภาคผนวกที่ ก-1 ซึ่งตัวอย่างดีปลากิ่งได้รับการระบุชนิดโดย คุณวินัย สมประสงค์ กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร และบางตัวอย่างได้นำไปจัดทำเป็นพรรณไม้แห้ง เพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิง เก็บไว้ที่พิพิธภัณฑสถานพืชกรุงเทพ (Bangkok herbarium) กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างดีปลากิ่งที่ใช้ในการศึกษา

รหัส	แหล่งที่เก็บ/แหล่งที่ซื้อ
PP01	อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่
PP02	ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ตำบลเขาหินซ้อน อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา
PP03	วัดศิริชัยมงคล ตำบลห้วยลึก อำเภอเมือง จังหวัดหนองบัวลำภู
PP04	ตำบลโนนเมือง อำเภอนากลาง จังหวัดหนองบัวลำภู
PP05	ตำบลสะเมิงใต้ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่
PP06	ตำบลโคกกรวด อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา
PP07	ตำบลคอโค อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์
PP08	ตำบลยางใหญ่ อำเภอจังหาร จังหวัดร้อยเอ็ด
PP09	โรงเรียนวารินชำราบ ตำบลค่าน้ำแซบ อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี
PP10	ตลาดนัดธนบุรี (สนามหลวง 2) แขวงทวีวัฒนา เขตทวีวัฒนา กรุงเทพฯ
PP11	ตำบลบ้านพระ อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี
PP12	ตำบลป่าตัน อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
PP13	ตำบลบ้านกลาง อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม
PP14	ศูนย์กสิกรรมธรรมชาติมาบเอื้อง ตำบลหนองบอนแดง อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี
PP15	คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ตำบลพังโคน อำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร
PP16	จังหวัดเพชรบูรณ์

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

รหัส	แหล่งที่เก็บ/แหล่งที่ซื้อ
PP17	ศูนย์รวบรวมและอนุรักษ์พันธุกรรมพืชพรรณไทย สวนเฉลิมพระเกียรติ 55 พรรษา สมเด็จพระเทพฯ แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ
PP18	พระตำหนักชมดวง ตำบลหัวหิน อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
PP19	ตำบลแม่พูล อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์
PP20	วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีศรีสะเกษ ตำบลหนองครก อำเภอเมืองจังหวัดศรีสะเกษ
PP21	ตำบลริมกก อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย
PP22	ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ตำบลไม้ฝาด อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง
PP23	ตำบลป่าแฝก อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา
PP24	ตำบลบ่อใหญ่ อำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม

3.2 เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.จิตติ ท้าไว และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ดังนี้

- 3.2.1 *Bacillus cereus* DMST 5040
- 3.2.2 *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- 3.2.3 *Escherichia coli* ATCC 25922
- 3.2.4 *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- 3.2.5 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- 3.2.6 *Salmonella typhimurium* DMST 0562
- 3.2.7 *Staphylococcus aureus* TISTR 1466
- 3.2.8 *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

3.3 เซลล์ไลน์

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการศึกษามีทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.พรทิพา พิชางานวิจัยสารบำบัดมะเร็ง สถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 4 ชนิด ดังนี้

- 3.3.1 HepG2 เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ (Human hepatoma cell line)
- 3.3.2 HT-29 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และทวารหนักของมนุษย์ (Human colon adenocarcinoma cell line)
- 3.3.3 MCF-7 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (Human breast cancer cell line)
- 3.3.4 Vero เซลล์ไตลิง (African green monkey kidney cell line)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จำนวน 1 ชนิด ดังนี้

3.3.5 KB เซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ (Human mouth epidermal carcinoma cell line)

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.4.1 กรรไกร (Scissors)

3.4.2 กรวยกรองบุชเนอร์ (Büchner funnel)

3.4.3 กรวยแยก (Separating funnel)

3.4.4 กระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 (Whatman No. 1 filter paper)

3.4.5 กระบอกลูกทวง (Cylinder)

3.4.6 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบเชิงประกอบ (Compound light microscope)

3.4.7 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted microscope)

3.4.8 โกร่ง (Mortar) และที่บด (Pestle)

3.4.9 ขวดแก้ว (Bottle)

3.4.10 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask)

3.4.11 ขวดสเปรย์ (Sprayer)

3.4.12 เข็มเย็บเย็บ (Needle)

3.4.13 คอมพิวเตอร์ (Computer)

3.4.14 คิวเวตควอตซ์ (Semi-micro Quartz cuvettes)

3.4.15 คิวเวตพลาสติก (Plastic cuvettes)

3.4.16 เครื่องกวนสารละลายพร้อมให้ความร้อน (Hot plate magnetic stirrer)

3.4.17 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรมิเตอร์ (Gas chromatography/Mass spectrometer : GC/MS) รุ่น 6890/5973 (Agilent, USA)

3.4.18 เครื่องเขย่า (Shaker)

3.4.19 เครื่องชั่ง (Balance)

3.4.20 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) รุ่น Lyphlock6 (Labconco, USA)

3.4.21 เครื่องนับจำนวน (Counter)

3.4.22 เครื่องปั่น (Blender)

3.4.23 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Mikro 22 R (Hettich, Germany)

3.4.24 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spin down)

3.4.25 เครื่องเป่าลมร้อน (Air blower)

3.4.26 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.27 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Thermal cycler) รุ่น Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Germany)
- 3.4.28 เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate reader)
- 3.4.28.1 รุ่น Anthos Multiread 400 (Biochrom, UK)
- 3.4.28.2 รุ่น FLUOstar Omega (BMG Labtech, Germany)
- 3.4.29 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) รุ่น R-205 (Buchi, Switzerland)
- 3.4.30 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
- 3.4.30.1 รุ่น BioPhotometer (Eppendorf, Germany)
- 3.4.30.2 รุ่น UV-1601 (Shimadzu, Japan)
- 3.4.31 โครมาโทกราฟีคอลัมน์ (Chromatography column) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 60 เซนติเมตร
- 3.4.32 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes)
- 3.4.33 จุกคอร์ก (Cork)
- 3.4.34 ชุดถ่ายภาพเจล (Gel document system) รุ่น InGenius (Syngene, UK)
- 3.4.35 ชุดไมโครปิเปต (Micropipettes)
- 3.4.36 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis system) รุ่น Mupid-exU (Advance, Japan)
- 3.4.37 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)
- 3.4.38 ตู้แช่แข็ง (Deep freezer)
- 3.4.39 ตู้ดูดควัน (Fume hood)
- 3.4.40 ตู้ป้อน (Incubator)
- 3.4.41 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow hood)
- 3.4.42 ตู้เย็น (Refrigerator)
- 3.4.43 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.4.44 โถดูดความชื้น (Desiccator)
- 3.4.45 ทิป (Micropipette tips)
- 3.4.46 แท่งแก้ว (Glass rod)
- 3.4.47 แท่งแม่เหล็กกวนสาร (Magnetic bar)
- 3.4.48 บล็อกให้ความร้อน (Heating block)
- 3.4.49 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 3.4.50 ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)
- 3.4.51 ปากคีบ (Forceps)
- 3.4.52 ผ้าขาวบาง (White cloth)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.4.53 สำลี (Cotton balls)
- 3.4.54 พาราฟิล์ม (Parafilm)
- 3.4.55 พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipettes)
- 3.4.56 ฟลาสก์ (Erlenmeyer flask)
- 3.4.57 ไมโครเพลทชนิด 96 หลุม (96-well plates)
- 3.4.58 ไมโครเวฟ (Microwave oven)
- 3.4.59 ไม้พันสำลี (Cotton buds)
- 3.4.60 เวอร์เนียแบบดิจิตอล (Digital vernier caliper)
- 3.4.61 หลอดทดลอง (Microcentrifuge tubes) ขนาด 1.5, 0.5 และ 0.2 มิลลิลิตร
- 3.4.62 หลอดทดลอง (Test tubes)
- 3.4.63 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tubes) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 3.4.64 ท่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.4.65 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 3.4.66 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)
- 3.4.67 TLC Aluminium Sheets 20×20 cm
 - 3.4.67.1 ALUGRAM[®] Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Germany)
 - 3.4.67.2 RP-18 F_{254S} (Merck, Germany)
- 3.4.68 TLC tank (Camag, Switzerland)
- 3.4.69 UV box (Camag, Switzerland)

3.5 โปรแกรม

- 3.5.1 GraphPad Prism 5.0
- 3.5.2 IBM SPSS Statistic 23
- 3.5.3 Microsoft Excel 2010
- 3.5.4 NTSYSpC version 2.10m

3.6 สารเคมี

3.6.1 สารเคมีในการสกัดและแยกสาร

- 3.6.1.1 Acetic acid (VWR International, England)
- 3.6.1.2 *p*-Anisaldehyde (Sigma-Aldrich, Germany)
- 3.6.1.3 *n*-Butanol (Ajax Finechem, Australia)
- 3.6.1.4 Dichloromethane (VWR International, France)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 3.6.1.5 สำ Ethanol (VWR International, England) ญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.6.1.6 Ethyl acetate (VWR International, France)
- 3.6.1.7 Hexane (VWR International, Belgium)
- 3.6.1.8 Iodized table salt (Prung Thip ; Thai Refined Salt, Thailand)
- 3.6.1.9 Methanol, Analytical Reagent grade (VWR International, France)
- 3.6.1.10 Methanol, Commercial grade (Zen point)
- 3.6.1.11 Sea sand (Merck, Germany)
- 3.6.1.12 Silica gel (Diameter 0.06-0.20 mm for chromatography ; Carlo Erba, France)
- 3.6.1.13 Silica gel (VertiFlash™ Silica, Pore size 60 Å, Particle size 40-60 µm ; Vertical chromatography, Thailand)
- 3.6.1.14 Sodium sulfate anhydrous (Ajax Finechem, Australia)
- 3.6.1.15 Sulfuric acid (Carlo Erba, Italy)
- 3.6.1.16 Water

3.6.2. สารเคมีในการตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

- 3.6.2.1 Acetic acid (VWR International, England)
- 3.6.2.2 Aescin (Reparil-Dragees ; Madaus, Germany)
- 3.6.2.3 Bismuth nitrate (Ajax Finechem, Australia)
- 3.6.2.4 Chloroform (VWR International, France)
- 3.6.2.5 Colchicine (Sigma-Aldrich, Germany)
- 3.6.2.6 Copper(II) sulfate pentahydrate (Carlo Erba, Italy)
- 3.6.2.7 Defibrinated Sheep Blood (Oxoid, UK) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ
- 3.6.2.8 Diethyl ether (Panreac, Spain)
- 3.6.2.9 Ethanol (VWR International, England)
- 3.6.2.10 Ethyl acetate (VWR International, France)
- 3.6.2.11 Ferric chloride anhydrous (Fluka, Switzerland)
- 3.6.2.12 Gelatin (Thai Food and Chemical, Thailand)
- 3.6.2.13 Glucose anhydrous (Fluka, Switzerland)
- 3.6.2.14 Hydrochloric acid (Carlo Erba, Italy)
- 3.6.2.15 Iodine (Merck, Germany)
- 3.6.2.16 Mercury chloride (Polskie odczynniki chemiczne, Poland)
- 3.6.2.17 Methanol (VWR International, France)
- 3.6.2.18 α -Naphthol (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.6.2.19 Nitric acid (Carlo Erba, Italy)
- 3.6.2.20 Phosphate buffer saline (PBS ; Amresco, USA)
- 3.6.2.21 Picric acid (Merck, Germany)
- 3.6.2.22 Potassium hydroxide (VWR International, England)
- 3.6.2.23 Potassium iodide (VWR International, England)
- 3.6.2.24 Sennoside A & B (Senokot ; Reckitt Benckiser, UK)
- 3.6.2.25 Sodium bicarbonate (Carlo Erba, Italy)
- 3.6.2.26 Sodium carbonate (Fisher Scientific, UK)
- 3.6.2.27 Sodium chloride (Carlo Erba, Italy)
- 3.6.2.28 Sodium citrate dihydrate (VWR International, England)
- 3.6.2.29 Sodium hydroxide (VWR International, Belgium)
- 3.6.2.30 Sodium potassium tartrate (Carlo Erba, Italy)
- 3.6.2.31 Sulfuric acid (Carlo Erba, Italy)
- 3.6.2.32 Tannic acid (Carlo Erba, Italy)
- 3.6.2.33 Toluene (Labscan, Ireland)
- 3.6.2.34 Water
- 3.6.3 สารเคมีในการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
 - 3.6.3.1 Distillated water
 - 3.6.3.2 Folin-Ciocalteu reagent (Sisco Research Laboratories, India)
 - 3.6.3.3 Gallic acid (Sigma-Aldrich, Germany)
 - 3.6.3.4 Methanol (VWR International, France)
 - 3.6.3.5 Sodium carbonate (Carlo Erba, Italy)
- 3.6.4 สารเคมีในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ
 - 3.6.4.1 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS ; Sigma-Aldrich, Germany)
 - 3.6.4.2 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH ; Sigma-Aldrich, Germany)
 - 3.6.4.3 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ ; Sigma-Aldrich, Germany)
 - 3.6.4.4 Acetic acid (VWR International, England)
 - 3.6.4.5 Ascorbic acid (V-C injection ; Vesco Pharmaceutical, Thailand)
 - 3.6.4.6 Ferric chloride hexahydrate (Merck, Germany)
 - 3.6.4.7 Hydrochloric acid (Carlo Erba, Italy)
 - 3.6.4.8 Methanol (VWR International, France)
 - 3.6.4.9 Potassium persulfate (Ajax Finechem, Australia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.6.4.10 Sodium acetate trihydrate (Merck, Germany)
- 3.6.4.11 Trolox (Sigma-Aldrich, Germany)
- 3.6.4.12 Water
- 3.6.5 สารเคมีในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย
 - 3.6.5.1 Gentamicin sulfate (T.P. Drug Laboratories, Thailand)
 - 3.6.5.2 Methanol (VWR International, France)
 - 3.6.5.3 Mueller Hinton agar (MHA ; HiMedia Laboratories, India)
 - 3.6.5.4 Normal saline solution (NSS ; General Hospital Products, Thailand)
 - 3.6.5.5 Nutrient agar (NA ; HiMedia Laboratories, India)
- 3.6.6 สารเคมีในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์
 - 3.6.6.1 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT ; Invitrogen, USA)
 - 3.6.6.2 Dimethyl sulfoxide (DMSO ; Amresco, USA)
 - 3.6.6.3 Ethanol (VWR International, England)
 - 3.6.6.4 Fetal bovine serum (FBS ; Gibco, Life Technologies, USA)
 - 3.6.6.5 Gentamicin sulfate (T.P. Drug Laboratories, Thailand)
 - 3.6.6.6 Mitomycin C (Kyowa, Japan)
 - 3.6.6.7 Phosphate buffer saline (PBS ; Amresco, USA)
 - 3.6.6.8 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco, Life Technologies, USA)
 - 3.6.6.9 Sodium bicarbonate (Carlo Erba, Italy)
 - 3.6.6.10 Trypan blue solution 0.4 % (Gibco, Life Technologies, USA)
 - 3.6.6.11 Trypsin-EDTA 0.25 % (Gibco, Life Technologies, USA)
- 3.6.7 สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ
 - 3.6.7.1 Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB ; VWR International, Belgium)
 - 3.6.7.2 Chloroform (VWR International, France)
 - 3.6.7.3 Distillated water
 - 3.6.7.4 Ethanol (VWR International, England)
 - 3.6.7.5 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA ; APS Finechem, Australia)
 - 3.6.7.6 Liquid nitrogen (Linde, Thailand)
 - 3.6.7.7 Isoamyl alcohol (VWR International, France)
 - 3.6.7.8 Isopropanol (VWR International, France)

- 3.6.7.9 β -Mercaptoethanol (GE Healthcare, Sweden)
- 3.6.7.10 Polyvinylpyrrolidone (PVP ; USB Corporation, USA)
- 3.6.7.11 RNase A (Vivantis, Malaysia)
- 3.6.7.12 Sodium chloride (Vivantis, Malaysia)
- 3.6.7.13 Tris-HCl (US Biological, USA)

3.6.8 สารเคมีในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค SRAP

- 3.6.8.1 10X Standard *Taq* reaction buffer (New England BioLabs, USA)
- 3.6.8.2 Deoxyadenosine triphosphate (dATP ; Vivantis, Malaysia)
- 3.6.8.3 Deoxycytidine triphosphate (dCTP ; Vivantis, Malaysia)
- 3.6.8.4 Deoxyguanosine triphosphate (dGTP ; Vivantis, Malaysia)
- 3.6.8.5 Deoxythymidine triphosphate (dTTP ; Vivantis, Malaysia)
- 3.6.8.6 Magnesium chloride 50 mM (Vivantis, Malaysia)
- 3.6.8.7 Nuclease-free water (Vivantis, Malaysia)
- 3.6.8.8 SRAP primer (Li and Quiros, 2001) สั่งเคราะห์จากบริษัท 1st BASE Custom Oligos ประเทศมาเลเซีย ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 3.2
- 3.6.8.9 *Taq* DNA polymerase 5000 U/ml (New England BioLabs, USA)

ตารางที่ 3.2 รหัสและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค SRAP

รหัส	Forward primer	รหัส	Reverse primer
Me1	5'-TGAGTCCAAACCGGATA-3'	Em1	5'-GACTGCGTACGAATTAAT-3'
Me2	5'-TGAGTCCAAACCGGAGC-3'	Em2	5'-GACTGCGTACGAATTTGC-3'
Me3	5'-TGAGTCCAAACCGGAAT-3'	Em3	5'-GACTGCGTACGAATTGAC-3'
Me4	5'-TGAGTCCAAACCGGACC-3'	Em4	5'-GACTGCGTACGAATTTGA-3'
Me5	5'-TGAGTCCAAACCGGAAG-3'	Em5	5'-GACTGCGTACGAATTAAC-3'
		Em6	5'-GACTGCGTACGAATTGCA-3'

3.6.9 สารเคมีในเทคนิคอะกาโรสเจลอเล็กโทรโฟรีซิส

- 3.6.9.1 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs, USA)
- 3.6.9.2 6X loading dye (New England BioLabs, USA)
- 3.6.9.3 Agarose (Vivantis, Malaysia)
- 3.6.9.4 Boric acid (Vivantis, Malaysia)
- 3.6.9.5 Deionized water
- 3.6.9.6 Ethidium bromide (Amresco, USA)

- 3.6.9.7 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA ; APS Finechem, Australia)
- 3.6.9.8 Tris (Fisher Scientific, UK)
- 3.6.9.9 VC 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Malaysia)

3.7 วิธีการทดลอง

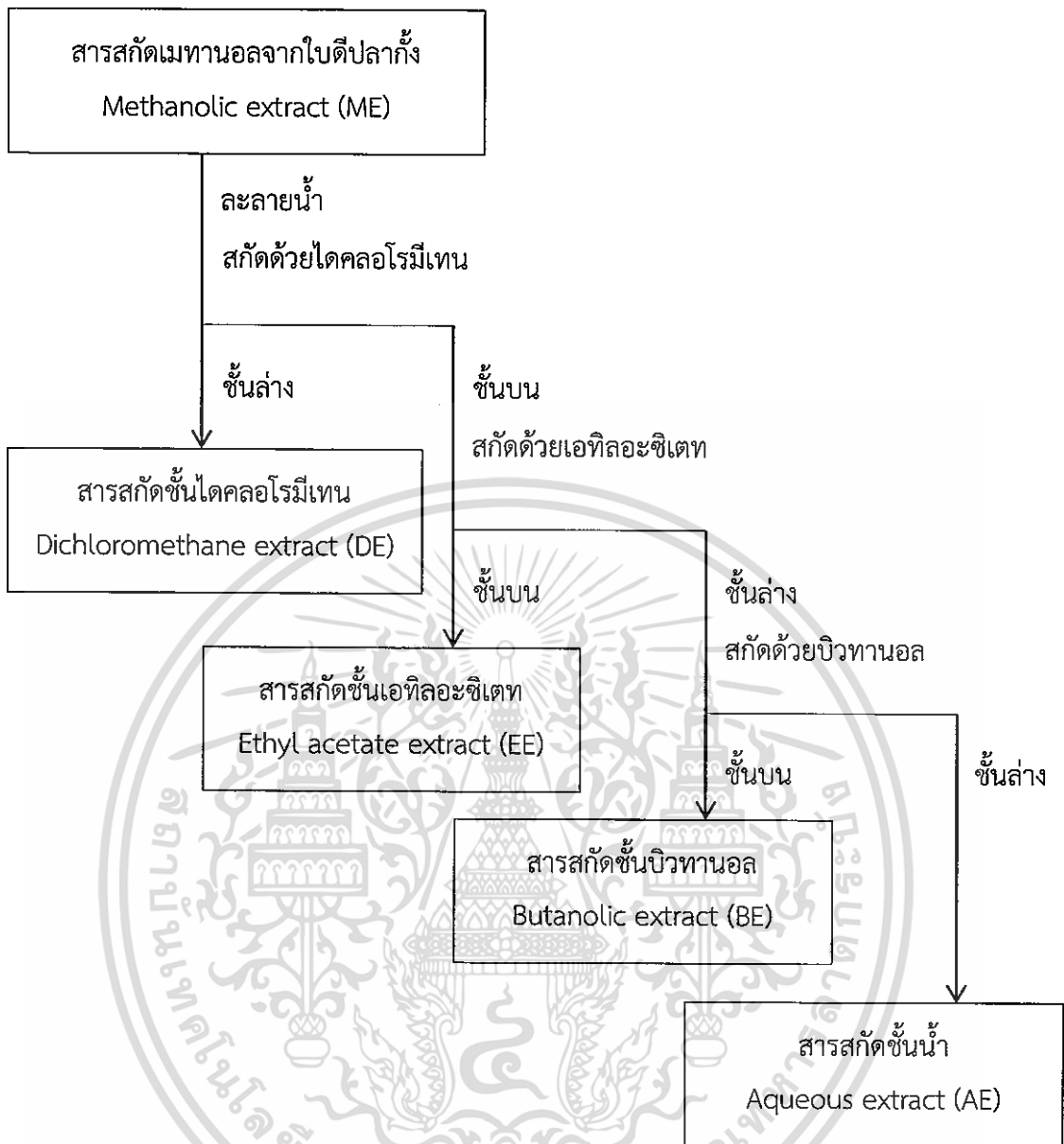
3.7.1 การสกัดและแยกสาร

3.7.1.1 การสกัดสารด้วยตัวทำละลาย

ใบตึปลาทั้ง (PP04) เก็บในช่วงเดือนเมษายน - ตุลาคม พ.ศ. 2557 โดยเก็บใบอ่อนถึงปานกลาง ล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ นำมาบดหยาบด้วยเครื่องบด ทำการสกัดด้วยการหมักในเมทานอลในขวดแก้วที่หุ้มด้วยกระดาษเพื่อป้องกันแสง เขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบประมาณ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วัน เปลี่ยนเมทานอลใหม่ ซ้ำจำนวน 2 ครั้ง สารสกัดที่ได้นำมากรองผ่านกระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 จำนวน 2 ชั้น โดยใช้กรวยกรองบุชเนอร์ รวมสารสกัดที่ได้ทั้ง 3 ครั้งเข้าด้วยกัน นำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ได้สารสกัดเมทานอล เก็บไว้ในขวดแก้วป้องกันแสงในโถดูดความชื้นจนสารสกัดแห้งสนิท แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.7.1.2 การสกัดสารโดยเทคนิค Liquid-liquid extraction (Partition)

ละลายสารสกัดเมทานอลด้วยน้ำกลั่น โดยทำการปั่นกวนด้วยแท่งแม่เหล็ก กวนสารบนเครื่องกวนสารละลาย เมื่อสารสกัดละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการเติมตัวทำละลายลงไปในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร จากนั้นใส่สารละลายลงในกรวยแยกเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนกว่าสารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้น โดยชั้นที่ 1 คือ สารละลายชั้นตัวทำละลาย ส่วนชั้นที่ 2 คือ สารละลายชั้นน้ำ นำมาสกัดด้วยตัวทำละลายดังกล่าวอีก 2 ครั้ง แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายอื่นต่อไป ตัวทำละลายละ 3 ครั้ง โดยตัวทำละลายที่ใช้คือ ไตคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล ตามลำดับ รวมสารสกัดจากตัวทำละลายเดียวกันเข้าด้วยกัน แล้วนำสารสกัดแต่ละชั้น ยกเว้นสารสกัดในชั้นน้ำ มาทำการดึงน้ำออกโดยการเติมสารละลายน้ำเกลืออิ่มตัวอัตราส่วน 1 : 1 ใส่ลงในกรวยแยก เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น โขเอาสารละลายชั้นตัวทำละลายดังกล่าว มาเติมผงโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสพอประมาณ กรองทันที แล้วจึงนำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ ส่วนสารสกัดสุดท้ายที่เหลือในชั้นน้ำนำมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) สรุปดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 สรุปขั้นตอนการสกัดสารโดยเทคนิค Liquid-liquid extraction

3.7.1.3 การแยกสารโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี

เตรียมคอลัมน์โดยบรรจุแบบเปียก (Wet packing) ตั้งคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 60 เซนติเมตร ให้ตรง แล้วเติมเฮกเซนลงในคอลัมน์ประมาณ 1/3 ของคอลัมน์ ใส่สำลีลงในคอลัมน์แล้วใช้แท่งแก้วกดสำลีลงไปให้อยู่ด้านล่างสุด เตรียมซิลิกาเจลขนาด 40-60 ไมโครเมตร (Vertical chromatography, Thailand) ประมาณ 900 กรัม ใส่ในปีกเกอร์ แล้วเติมเฮกเซนลงไปให้ท่วม ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน จะมีลักษณะเป็นของเหลวข้น หรือเรียกว่า Slurry จากนั้นเทลงในคอลัมน์ที่เตรียมไว้ พร้อมกับใช้ตัวทำละลายออกจากคอลัมน์ และใช้ลูกยางเคาะบริเวณด้านข้างคอลัมน์ โดยการใช้ตัวทำละลายออกจากคอลัมน์จะทำได้เป็นระยะๆ เมื่อตัวทำละลายใกล้หมดจะเติมตัวทำละลายเพิ่มเติม ทำเช่นนี้ประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อช่วยให้ซิลิกาเจลอัดแน่น และถ้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ป้องกันการเกิดฟองอากาศ จากนั้นใช้แท่งแก้วยาวเกลี่ยบริเวณผิวหน้าของซิลิกาเจลให้เรียบ แล้วบรรจุทรายลงในคอลัมน์ให้สูงประมาณ 3-5 มิลลิเมตร เพื่อป้องกันผิวหน้าของซิลิกาเจล

เตรียมสารสกัด DE สำหรับบรรจุลงคอลัมน์ โดยสารสกัด DE 110.97 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ 600 มิลลิลิตร ละลายด้วยเมทานอลพอประมาณ แล้วเติมซิลิกาเจลขนาด 0.06-0.20 มิลลิเมตร (Carlo Erba, France) ลงไปพอประมาณ จนมีลักษณะเป็น Slurry จากนั้นใช้เครื่องเป่าลมร้อน เป่าบริเวณด้านข้างบีกเกอร์ด้วยระดับความร้อนปานกลาง จนเมทานอลระเหยหมด และมีลักษณะเป็นผงของสารสกัดที่เคลือบบนซิลิกาเจล

ทำการแยกสารโดยบรรจุสารสกัดที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์ แล้วเริ่มต้นชะคอลัมน์ด้วยเฮกเซน 500 มิลลิลิตร จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นด้วยเอทิลอะซิเตททีละ 5 เปอร์เซ็นต์ เริ่มด้วยเฮกเซน : เอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 95 : 5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ครั้งละ 200 มิลลิลิตร จนใช้เอทิลอะซิเตท 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงเพิ่มความเข้มข้นด้วยเมทานอลทีละ 5 เปอร์เซ็นต์ จนใช้เมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ ชะรอบสุดท้ายด้วยเมทานอล 500 มิลลิลิตร เก็บสารที่ออกมาจากคอลัมน์ในหลอดทดลอง หลอดละ 20 มิลลิลิตร

ตรวจสอบสารที่เก็บจากคอลัมน์ โดยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin layer chromatography : TLC) โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเมทานอล ในอัตราส่วนต่างๆ ตามความเหมาะสม ตรวจผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร และสเปรย์ด้วย Anisaldehyde reagent แล้วให้ความร้อนบน Hot plate สังเกตจุดที่ปรากฏบนแผ่น TLC รวมสารที่เหมือนกันในแต่ละหลอดเข้าเป็นส่วนย่อย (Fraction) เดียวกัน เรียกว่าสารสกัดส่วนย่อยไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane fraction : DF) จากนั้นนำแต่ละส่วนย่อยมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

3.7.2 การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS

วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC/MS รุ่น 6890/5973 (Agilent, USA) ของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยใช้สภาวะดังนี้

GC Column : ZB-5MS (5% phenyl 95% dimethylpolysiloxane)
Length 30 m, Internal diameter 0.25 mm, Film thickness 0.25 μ m (Phenomenex, USA)

Injection mode : Split less

Injection volume : 1 μ l of 1 μ g/ μ l extract

Mobile phase : Helium 1 ml/min

Inlet temperature : 250 $^{\circ}$ C

GC temperature program : 40 $^{\circ}$ C 2 min, rate of 5 $^{\circ}$ C/min to 280 $^{\circ}$ C, 280 $^{\circ}$ C 10 min

MS source temperature : 230 $^{\circ}$ C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MS quad temperature : 150 °C
 Mass range : 40-600 amu
 MS library : Wiley 7

3.7.3 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

3.7.3.1 การตรวจสอบคาร์โบไฮเดรต (Evans, 2002)

1 Molisch's test

สารสกัด 5 มิลลิกรัม ละลายน้ำ 5 มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้วแบ่งสารละลายมา 2 มิลลิลิตร หยดสารละลายแอลฟา-แนฟทอล 5 เปอร์เซ็นต์ในเอทานอล 2 หยด จากนั้นค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริก 2 มิลลิลิตร ลงด้านข้างหลอดทดลอง ถ้าเกิดวงแหวนสีม่วงตรงกลางระหว่างสารละลายทั้งสองชั้น แสดงว่ามีคาร์โบไฮเดรต โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน

2 Benedict's test

สารสกัด 10 มิลลิกรัม ละลายน้ำ 10 มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เติม Benedict's solution 5 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 5 นาที ถ้าเกิดตะกอนสีแดงอิฐแสดงว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน

3 Fehling's test

สารสกัด 10 มิลลิกรัม ละลายน้ำ 10 มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เติม Fehling's solution 1 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 5 นาที ถ้าเกิดตะกอนสีแดงอิฐแสดงว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน

3.7.3.2 การตรวจสอบอัลคาลอยด์

1 วิธีการตกตะกอน

สารสกัด 0.5 กรัม ละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร อุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส นาน 2-3 นาที แล้วกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นทดสอบกับ Dragendorff's, Mayer's และ Wagner's reagent โดยหยดน้ำยาทดสอบ 2-3 หยด หากเกิดตะกอนแสดงว่ามีอัลคาลอยด์ (Farnworth, 1966) ใช้โคลชิซิน (Colchicine) เป็นสารมาตรฐาน

2 เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี

สารสกัดละลายด้วยเมทานอล จากนั้นนำมาทำ TLC โดยใช้สารสกัดปริมาณ 40 ไมโครกรัมต่อจุด โดยใช้แผ่น TLC และระบบตัวทำละลายตามความเหมาะสมของแต่ละสาร ส่วนสารมาตรฐานใช้โคลชิซิน ปริมาณ 20 ไมโครกรัมต่อจุด นำมาทำ TLC โดยใช้แผ่น TLC แบบ Normal phase ใช้ระบบตัวทำละลายคือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล อัตราส่วนคือ 95 : 5 จากนั้นตรวจผลโดยสเปรย์ด้วย Dragendorff's spray reagent หากพบจุดสีส้มหรือสีน้ำตาลบนพื้นสีเหลือง แสดงว่ามีอัลคาลอยด์ (Fried and Sherma, 1996)

3.7.3.3 การตรวจสอบแทนนิน และสารประกอบฟีนอลิก

สารสกัด 0.2 กรัม ละลายน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หยดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ 3-4 หยด กรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำมาทดสอบกับ Gelatin solution, Gelatin salt solution และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยหยดน้ำยาทดสอบ 2-3 หยด หากเกิดตะกอนสีขาว เมื่อหยด Gelatin solution และ Gelatin salt solution และเกิดตะกอนสีน้ำเงินเขียว เมื่อหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีแทนนิน และสารประกอบฟีนอลิก แต่ถ้าหากเกิดเฉพาะตะกอนสีน้ำเงินเขียว เมื่อหยดสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าไม่มีแทนนิน แต่มีสารประกอบฟีนอลิก (Farnworth, 1966 ; Evans, 2002) โดยใช้กรดแทนนิกเป็นสารมาตรฐาน

3.7.3.4 การตรวจสอบซาโปนิน

1 Froth test (Farnsworth, 1966)

เตรียมสารสกัดความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วเขย่าแรงๆ นาน 5 นาที ถ้าเกิดฟองรูปร่างคองตัวเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แสดงว่ามีซาโปนิน แต่ถ้าเกิดฟองขนาดเล็กและไม่คงตัวแสดงว่าอาจเป็นโปรตีน หรือกรดบางชนิดในพืช หากเติมโซเดียมคาร์บอเนตแล้วเกิดฟองเพิ่มขึ้นแสดงว่ามีกรดอยู่ โดยใช้ Aescin เป็นสารมาตรฐาน วิเคราะห์ผลดังตารางที่ 3.3

2 Hemolysis test

เตรียมสารสกัด โดยละลายสารสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์-ซาลีน (Phosphate buffer saline : PBS) ให้มีความเข้มข้น 1, 2 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ชุดควบคุมเชิงบวก คือ โซเดียมโอดีเดซิลซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ใน PBS และ Aescin 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยละลาย Aescin 1 เม็ด ด้วย PBS 10 มิลลิลิตร และชุดควบคุมเชิงลบ คือ PBS เตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยนำเลือดแกะ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตูดสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเจือจางเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วย PBS ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

ทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดง โดยนำเซลล์เม็ดเลือดแดง 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมกับสารสกัด ชุดควบคุมเชิงบวก หรือ PBS ปริมาตร 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (Santos *et al.*, 1997) ถ้าเกิดสีแดงของฮีโมโกลบินในสารละลายส่วนใส เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงว่าเกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง (Hostettmann and Marston, 1995) วิเคราะห์ผลดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 การวิเคราะห์ผลการตรวจสอบสารประกอบโพลีไซคลิกในพืช

Hemolysis test	Froth test	Liebermann-Burchard test	Substances Present
+	+	+ Blue or green	Saponins, probably steroidal
+	+	+ Red, pink, purple or violet	Saponins, probably triterpenoid
+	+	- Pale yellow	Saponins, possibly heterosides of saturated sterols or saturated triterpenes
±	-	+ Red, pink, purple or violet	Saponins absent, free triterpenes, diterpenes, sterols or related polycyclic substances present
-	-	- Pale yellow	Saponins absent, also unsaturated triterpenes, sterols, etc., absent, but may contain saturated sterols or saturated triterpenes
-	+ ^a	± Pale yellow, red, pink, purple or violet	Saponins absent, probably free diterpene acids

^a เกิดฟองหลังจากเติมโซเดียมคาร์บอเนตแล้วเขย่า

+ มีการเปลี่ยนแปลง ; - ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

(ที่มา : Farnsworth, 1966)

3.7.3.5 การตรวจสอบคูมาริน

สารสกัดละลายด้วยเมทานอล จากนั้นนำมาทำ TLC โดยใช้แผ่น TLC ขนาด 2×5 เซนติเมตร ใช้ระบบตัวทำละลายคือ โทลูอิน : อีเทอร์ (1 : 1 อิ่มตัวด้วยกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์) และเอทิลอะซิเตท : เมทานอล (7 : 3) ตรวจผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต 366 นาโนเมตร หากพบการเรืองแสงสีฟ้าหรือเขียว จากนั้นสเปรย์ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ในเอทานอล แล้วหากพบการเรืองแสงเข้มขึ้นที่จุดเดิม แสดงว่ามีคูมาริน เทียบผลกับ Wagner and Bladt (1996)

3.7.3.6 การตรวจสอบแอนทราควิโนนไกลโคไซด์

สารสกัดละลายด้วยเมทานอล จากนั้นนำมาทำ TLC โดยใช้แผ่น TLC ขนาด 2×5 เซนติเมตร ใช้ระบบตัวทำละลายคือ เอทานอล : เมทานอล : น้ำ (100 : 13.5 : 10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ขออนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นนำมาสเปรย์ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ในเอทานอล หากปรากฏจุดสีแดงมองเห็นด้วยตาเปล่า และพบการเรืองแสงสีแดงที่แสงอัลตราไวโอเล็ต 366 นาโนเมตร แสดงว่ามีแอนทราควิโนนไกลโคไซด์ (Wagner and Bladt, 1996) โดยใช้ Sennoside A และ B เป็นสารมาตรฐาน

3.7.3.7 การตรวจสอบไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์

วิธี Guignard (Harborne, 1998) ใบพืชสดประมาณ 2 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ พอประมาณ ใส่ลงในหลอดทดลอง หยดน้ำกลั่น 1 หยด และหยดโทลูอีน 2 หยด ปิดปากหลอดทดลองด้วยจุกคอร์กที่ติด Sodium picrate paper บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงสีของ Sodium picrate paper จากสีเหลืองเป็นสีแดง แสดงว่ามีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ ซึ่งถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ทำให้เกิดการปล่อยไฮโดรเจนไซยาไนด์ออกมา แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้บ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงสีของ Sodium picrate paper จากสีเหลืองเป็นสีแดง แสดงว่ามีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ ซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงจากภายในพืชทำให้เกิดการปล่อยไฮโดรเจนไซยาไนด์ออกมา โดยที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ แต่ถ้าสีของ Sodium picrate paper ยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงแสดงว่าไม่มีไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ โดยเทียบผลกับ Müller-Schwarze (2009)

3.7.4 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (Armania *et al.*, 2013) เตรียมสารสกัดโดยละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารสกัดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบผลจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก แสดงผลในหน่วย mg gallic acid equivalent (mgGAE)/g extract โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

3.7.5 การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ

3.7.5.1 วิธี DPPH

ศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ตามวิธีดัดแปลงจาก Armania *et al.* (2013) เตรียมสารสกัดโดยละลายด้วยเมทานอล ให้มีความเข้มข้น 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย DPPH 0.1 มิลลิโมลาร์ ในเมทานอล ผสมสารสกัดปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับสารละลาย DPPH ปริมาตร 195 ไมโครลิตร ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์รุ่น Anthos Multiread 400 (Biochrom, UK) โดยใช้โทรล็อกซ์ (Trolox) เป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตร จำนวนเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH (% DPPH radical scavenging activity) จากสมการที่ 3.1 และจำนวนค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ต้านสารอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์ (50 % Inhibitory concentration : IC₅₀) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.0 และความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH เทียบกับโทรล็อกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity) จากกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ แสดงผลในหน่วย mg trolox equivalent (mgTE)/g extract โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (3.1)$$

Abs_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงในชุดควบคุม (เมทานอล + DPPH)

Abs_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงในตัวอย่าง (สารตัวอย่าง + DPPH)

3.7.5.2 วิธี ABTS

ศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระวิธี 2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) ตามวิธีของ Armania *et al.* (2013) เตรียมสารละลายอนุมูล ABTS^{•+} โดยผสมสารละลาย ABTS 7 มิลลิโมลาร์ กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยปริมาตร (v/v) บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ เมื่อต้องการนำมาใช้ให้นำสารละลายอนุมูล ABTS^{•+} ดังกล่าว มาเจือจางด้วยเมทานอล ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.700±0.020 ส่วนสารสกัดเตรียมเช่นเดียวกับวิธี DPPH ทดสอบโดยนำสารละลายอนุมูล ABTS^{•+} ที่เจือจางแล้วปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารสกัดปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์รุ่น UV-1601 (Shimadzu, Japan) โดยใช้โทรล็อกซ์เป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวนเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS (% ABTS radical scavenging activity) จากสมการที่ 3.2 และจำนวนค่า IC₅₀ ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5.0 และความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS เทียบกับโทรล็อกซ์จากกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ แสดงผลในหน่วย mgTE/g extract โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

$$\% \text{ ABTS radical scavenging activity} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (3.2)$$

Abs_{control} = ค่าการดูดกลืนแสงในชุดควบคุม (เมทานอล + ABTS^{•+})

Abs_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงในตัวอย่าง (สารตัวอย่าง + ABTS^{•+})

3.7.5.3 วิธี FRAP

ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ตามวิธีดัดแปลงจาก Benzie and Strain (1996) เตรียม FRAP reagent โดยผสมสารละลาย Acetate buffer (pH 3.6) 300 มิลลิโมลาร์ : สารละลาย TPTZ 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลาร์ : สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ อัตราส่วน 10 : 1 : 1 เตรียมใหม่ทุกครั้ง ก่อนการใช้งาน สารสกัดเตรียมโดยละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ FRAP reagent 180 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม บ่มในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์รุ่น FLUOstar Omega (BMG Labtech, Germany) โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 4, 8, 12, 16 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก แสดงผลในหน่วย mg ascorbic acid equivalent (mgAAE)/g extract โดยทำการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ

3.7.5.4 วิธี TLC Bioautography

สารสกัดละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมของแต่ละสาร จากนั้นนำมาทำ TLC โดยใช้แผ่น TLC และระบบตัวทำละลายตามความเหมาะสมของแต่ละสาร ตรวจสอบผลโดยสเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล (DPPH 20 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล 100 มิลลิลิตร) หากพบจุดสีเหลืองบนพื้นสีม่วง แสดงว่าจุดบริเวณนั้นเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Rossi *et al.*, 2011) ส่วนสารมาตรฐานใช้กรดแอสคอร์บิก ปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อจุด นำมาทำ TLC โดยใช้แผ่น TLC แบบ Normal phase ใช้ระบบตัวทำละลายคือ เมทานอล : น้ำ อัตราส่วนคือ 7 : 3 (Ponder *et al.*, 2004)

3.7.6 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Paper disc diffusion (CLSI, 2012) เตรียมเชื้อแบคทีเรียโดยนำมา Streak บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้เป็น Stock เมื่อต้องการใช้แบคทีเรียสำหรับทดสอบ เตรียมหัวเชื้อด้วยวิธี Direct colony suspension โดยใช้ห้วงเชื้อเชื้อ เชื้อโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียประมาณ 3-5 โคโลนี ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้เชื้อมีอายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อเชื้อที่ได้ลงใน NSS ปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland 0.5 หรือวัดความขุ่นเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.08-0.13

เตรียมแผ่นกระดาษกลมหรือแผ่นดิสก์ โดยใช้กระดาษกรองวอทแมนเบอร์ 1 เจาะให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อ หยอดสารสกัดที่ต้องการทดสอบซึ่งละลายด้วยเมทานอลลงในแผ่นดิสก์ที่เตรียมไว้ให้มีความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ ($\mu\text{g}/\text{disc}$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ชุดควบคุมเชิงบวก คือ เจนตามัยซิน (Gentamicin sulfate) 10 ไมโครกรัมต่อดิสก์ และชุดควบคุมเชิงลบ คือ เมทานอล

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยนำไม้พินสำลีที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในเชื้อที่เตรียมไว้ บิดพอหมาด กวาดเชื้อ (Swab) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้งประมาณ 3-5 นาที แล้วนำแผ่นดิสก์ที่เตรียมไว้วางลงบนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง บันทึกผลการฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยวัดบริเวณวงใส (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นดิสก์ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ โดยทำจำนวน 3 ซ้ำ

3.7.7 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ตามวิธีดัดแปลงจาก Mosmann (1983) โดยทำการเก็บเกี่ยวเซลล์จาก ฟลาस्कเพาะเลี้ยงด้วยการ Trypsinization นับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และปลูกเซลล์ลงในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยเซลล์แต่ละชนิดมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นดังนี้ เซลล์ HepG2 1.0×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์ HT-29 1.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เซลล์ KB และ Vero 1.8×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ในการเลี้ยงเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เตรียมสารสกัดโดยเตรียม Stock ของสารสกัดให้มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายสารสกัด 0.5 กรัม ด้วย DMSO โดยค่อยๆ เติม DMSO ลงไปจนครบ 1 มิลลิลิตร ละลายสารสกัดให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรด้วย PBS ให้เท่ากับ 10 มิลลิลิตร กรองด้วยแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เก็บไว้เป็น Stock ของสารสกัด ซึ่งมีความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อต้องการนำสารสกัดมาใช้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ ให้ทำการเจือจาง Stock ของสารสกัดด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้นตามต้องการ และคำนวณความเข้มข้นของ DMSO กลับ เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบ ตัวอย่างเช่น สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนทดสอบกับเซลล์ที่ความเข้มข้น 62.5, 125, 250, 500, และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพราะเมื่อเติมสารสกัดลงในแต่ละหลุมที่ทดสอบ ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดจะลดลงครึ่งหนึ่ง โดยเตรียมสารสกัดที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จาก Stock ที่เตรียมไว้ แล้วนำสารสกัดความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางแบบ 2-fold dilution 4 ความเข้มข้น เพื่อให้ได้ความเข้มข้นครบตามต้องการ ความเข้มข้นของ DMSO คำนวณกลับจากสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุดเพียงความเข้มข้นเดียว คือ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ความเข้มข้นของ DMSO เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบ เมื่อเติมลงในหลุมทดสอบจะมีความเข้มข้น เท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมเชิงบวกใช้สารละลายไมโตมายซิน ซี (Mito-mycin C) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเติมลงในหลุมทดสอบจะมีความเข้มข้น 25

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเตรียมชุดควบคุมเชิงบวกและชุดควบคุมเชิงลบ เตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมสารสกัด คือ เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์

เมื่อบ่มครบเวลา 24 ชั่วโมง เติมหาอาหารเลี้ยงเซลล์เปล่าเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม เติมหาสารสกัด ชุดควบคุมเชิงบวก หรือชุดควบคุมเชิงลบที่เตรียมไว้ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ครบเวลาเติมหาสารละลาย MTT ใน PBS ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดสารละลายในแต่ละหลุมออก แล้วเติมหาสารละลาย DMSO : เอทานอล (1 : 1) เพื่อละลายผลึกฟออร์มาซาน หลุมละ 100 ไมโครลิตร เขย่าเป็นเวลา 3 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์รุ่น Anthos Multiread 400 (Biochrom, UK) คำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ (% Inhibition of cell growth) จากสมการที่ 3.3 และคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ 50 เปอร์เซ็นต์ (50 % Inhibitory concentration : IC₅₀) โดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism 5.0

$$\% \text{ Inhibition of cell growth} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (3.3)$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมชุดควบคุม (เซลล์ + อาหารเลี้ยงเซลล์เปล่า)

B = ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมทดสอบ (เซลล์ + สารสกัด)

โดยค่า A และ B จะต้องหักลบค่าการดูดกลืนแสงของ Blank ออกก่อน จากนั้นจึงนำไปคำนวณในสมการที่ 3.3

3.7.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความ เป็นพิษต่อเซลล์ นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance : ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์โดยโปรแกรม IBM SPSS Statistic 23

3.7.9 การสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบตึปลาทั้ง โดยเลือกเอาใบอ่อนพอประมาณ นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ผึ่งให้แห้ง แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) เริ่มโดยตัดใบเป็นชิ้นเล็กๆ พอประมาณ ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วเติม 2X CTAB ลงไปให้ท่วมใบ แช่ทิ้งไว้ประมาณ 1 คืน เท 2X CTAB ที่แช่ไว้แล้วนำตัวอย่างใบใส่ลงในโถงที่แช่เย็น เติมนิโตรเจนเหลวให้ท่วมตัวอย่างใบ และบดตัวอย่างใบจนละเอียดเป็นผง เตรียม 2X CTAB 700 ไมโครลิตร และ β-mercaptoethanol 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วตัดตัวอย่างใบที่บดใส่ลงในหลอดทดลองดังกล่าว กลับหลอดทดลองไปมา นำไปบ่มในอ่างน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น มิใช่เพื่อจำหน่าย
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1-1.5 ชั่วโมง โดยมีการกลับหลอดไปมาเบาๆ ทุก 10-15 นาที ครบเวลาแล้วเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วเติมสารละลาย CTAB 10 เปอร์เซ็นต์ในโซเดียมคลอไรด์ 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมไอโซโพรพานอลที่เย็นปริมาตร 1 : 2 โดยปริมาตร ของสารละลายส่วนใส กลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 15 นาที ครบเวลาแล้ว ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ และคว่ำหลอดทดลองลงบนกระดาษทิชชู เพื่อขับสารละลายส่วนใสที่ยังเหลืออยู่ออกให้หมด ล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง กลับหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเอทานอล เมื่อสารละลายส่วนใสออกหมดแล้ว ละลายตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม Tris-EDTA (TE) buffer ที่บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตรประมาณ 50-150 ไมโครลิตร ขึ้นกับปริมาณตะกอนดีเอ็นเอ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้ตะกอนดีเอ็นเอละลาย โดยบ่มไม่เกิน 1 คืน แล้วเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์คุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ BioPhotometer (Eppendorf, Germany) และเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความยาวเจล 6 เซนติเมตร ที่ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานคือ 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs, USA)

3.7.10 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP โดยทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR ของเทคนิค SRAP ใช้ความเข้มข้นของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบตาม Ding *et al.* (2008) ดังตารางที่ 3.4 เป็นปฏิกิริยาพื้นฐาน

ทำการปรับความเข้มข้นของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.5 ที่ ละสาร ซึ่งในการหาสภาวะที่เหมาะสมนั้นจะใช้ไพรเมอร์ Me1/Em1 มีขั้นตอนของปฏิกิริยาตาม Li and Quiros (2001) ดังตารางที่ 3.6 โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองรุ่น Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 ส่วนประกอบของสารเคมีในปฏิกิริยาพื้นฐานของเทคนิค SRAP สำหรับ 1 ตัวอย่าง

สารเคมี	Stock	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Standard <i>Taq</i> reaction buffer	10X	2.5	1X
dNTP	1.25 mM	4	200 µM
MgCl ₂	50 mM	1.25	2.5 mM
Forward primer	20 µM	1	0.8 µM
Reverse primer	20 µM	1	0.8 µM
<i>Taq</i> DNA polymerase	5000 U/ml	0.2	1 U/25 µl
DNA template	20 ng/µl	1.5	30 ng/25 µl
DI water		13.55	
ปริมาตรรวม		25	

ตารางที่ 3.5 ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคมีในปฏิกิริยาที่ปรับเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา			
	1	2	3	4
MgCl ₂ (mM)	2.0	2.5	3.0	3.5
dNTP (µM)	100	200	300	400
Primer (µM)	0.6	0.8	1.0	1.2
<i>Taq</i> DNA polymerase (U/25 µl)	0.5	1.0	1.5	2.0
DNA template (ng/25 µl)	20	30	40	50

ตารางที่ 3.6 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในเทคนิค SRAP

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	5	1
Denaturation	94	1	
Annealing	35	1	5
Extension	72	1	
Denaturation	94	1	
Annealing	50	1	35
Extension	72	1	
Final extension	72	7	1

เอกสารนี้ Storage การที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำเอาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ความยาวเจล 6 เซนติเมตร ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เวลาประมาณ 45 นาที โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานคือ VC 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Malaysia) เมื่อได้ความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสมแต่ละสาร นำความเข้มข้นที่เหมาะสมดังกล่าวนี้รวมเข้าในปฏิกิริยาเดียวกัน แล้วนำมาคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยทำการสุ่มเลือกตัวอย่างพืช 3 ตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค SRAP กับคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 30 คู่ ถ้าไพรเมอร์คู่ใดแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic band) ระหว่างตัวอย่างพืช ไพรเมอร์คู่นั้นจะนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดต่อไป

หลังจากตรวจสอบผลของเทคนิค SRAP จากแต่ละคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำการแปลผลแถบดีเอ็นเอโดยการให้คะแนนแบบ binary data matrix โดยให้คะแนนเป็น 1 เมื่อมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่มีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่าง นำคะแนนที่ได้มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน Jaccard's coefficient (Jaccard, 1908) และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) แสดงผลในรูปแบบเดนโดรแกรม (Dendrogram) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc รุ่น 2.10m (Rohlf, 2000)

3.7.11 เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมเจลอะกาโรส โดยใช้ผงอะกาโรส ละลายใน Tris-borate EDTA (TBE) buffer ให้ความร้อนจนอะกาโรสละลาย เช่น ในการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอจะใช้เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ความยาวเจล 6 เซนติเมตร เตรียมโดยชั่งผงอะกาโรส 0.2 กรัม เติม TBE buffer 20 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนปานกลางด้วยไมโครเวฟจนอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกัน รอจนกว่าอุณหภูมิจะลดลงพอประมาณ แล้วจึงทำการเทลงถาดเจล (Gel tray) ที่มีหวี (Combs) เตรียมไว้ เมื่อเจลอะกาโรสแข็งตัวเรียบร้อยแล้ว นำไปใส่ในช่อง Chamber ของชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสรุ่น Mupid-exU (Advance, Japan) จากนั้นเท TBE buffer ให้ท่วมเจลอะกาโรส ผสมผลิตภัณฑ์ PCR หรือดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กับสีย้อม (Loading dye) ความเข้มข้น 3X ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นหยอดลงไปในหลุม ทำการปล่อยกระแสไฟฟ้าลงไป ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เวลาขึ้นกับความเข้มข้นและความยาวของเจล ย้อมแผ่นเจลในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยการแช่น้ำกลั่นนาน 10 นาที จากนั้นนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายภาพโดยชุดถ่ายภาพเจลรุ่น InGenius (Syngene, UK)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 สารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง

ใบตีปลากั้งอบแห้งแล้วบั่นหยาบ 1580 กรัม สกัดด้วยการหมักในเมทานอล จากนั้นกรองแล้ว นำมาระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในขวดแก้วห่อฟอยล์ป้องกันแสง ทิ้งไว้ให้แห้งในโถดูดความชื้น เมื่อสารสกัดแห้งแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก พบว่าได้สารสกัดเมทานอล 345.81 กรัม คิดเป็นผลได้ 23.05 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งที่ได้มีสีเขียวเข้ม เป็นก้อนแข็ง เมื่อชูดออกมาจากขวดแก้วจะมีลักษณะเป็นผงสีเขียวเข้ม ดังรูปที่ 4.1 ซึ่งสารสกัดดังกล่าวที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ต่อไป



รูปที่ 4.1 ลักษณะของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง

4.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง

4.2.1 การตรวจสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น

ผลการทดสอบสารพิษเคมีเบื้องต้น แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง พบสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต อัลคาลอยด์ และคูมาริน โดยในการตรวจสอบแทนนิน และสารประกอบฟีนอลิกพบว่าเมื่อทดสอบกับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ เกิดตะกอนสีน้ำเงินเขียว และทดสอบกับ Gelatin solution และ Gelatin salt solution ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าไม่มีแทนนิน แต่มีสารประกอบฟีนอลิก (Farnworth, 1966; Evans, 2002) ส่วนในการตรวจสอบซาโปนินพบว่าให้ผลเป็นลบกับ Froth test แต่ให้ผลเป็นบวกกับ Hemolysis test แสดงว่าไม่มีซาโปนิน แต่อาจมีไตรเทอร์ปีน ไดเทอร์ปีน หรือสเตอรอยด์

ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง

กลุ่มสาร	วิธี / น้ำยาทดสอบ	ผลการทดสอบ
คาร์โบไฮเดรต	Molisch' test	+
	Benedict's test	+
	Fehling's test	+
อัลคาลอยด์	Dragendorff's reagent	+
	Mayer's reagent	+
	Wagner's reagent	+
แทนนินและสารประกอบฟีนอลิก	1% Ferric chloride solution	+
	Gelatin solution	-
	Gelatin salt solution	-
คูมาริน	Potassium hydroxide reagent	+
แอนทราควิโนนไกลโคไซด์	Potassium hydroxide reagent	-
ซาโปนิน	Froth test	-
	Hemolysis test	+
ไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์	Guignard's test	-

+ มีการเปลี่ยนแปลง ; - ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

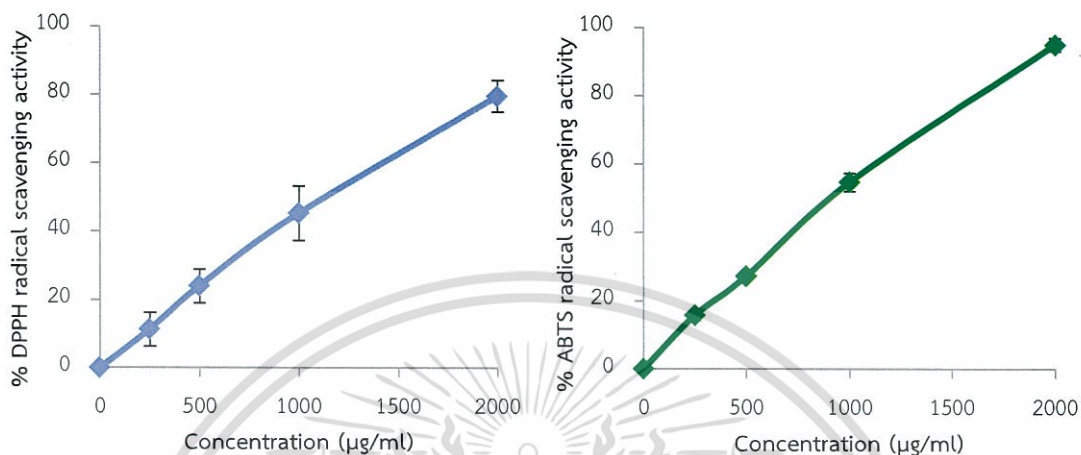
จากผลการตรวจสอบพฤกษเคมีดังกล่าวพบว่า ใกล้เคียงกับการตรวจสอบพฤกษเคมีเบื้องต้นในสารสกัดจากใบห้อมช้าง (*P. curviflorus* (Wall.) Nees) ซึ่งพบสารประกอบฟีนอลิก แลคโตนไกลโคไซด์หรือคูมาริน และไตรเทอร์ปีน (Panyaphu *et al.*, 2012)

4.2.2 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

จากการตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นพบว่า ในสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งพบสารประกอบฟีนอลิก จึงศึกษาต่อโดยวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าได้เท่ากับ 27.56 ± 0.90 mgGAE/g extract (แสดงตัวอย่างวิธีการคำนวณในภาคผนวก ง) ซึ่งสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งนี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยกว่าสารสกัดจากพืชในสกุลเดียวกัน เทียบจากการศึกษาของ Chanu *et al.* (2012) และ Seal and Chaudhuri (2015) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเมทานอลจากใบห้อมใต้ (*P. thyrsoiflorus* Nees) และใบห้อมช้าง (*P. curviflorus* (Wall.)) พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 48.75 ± 1.43 และ 40.34 ± 0.39 mgGAE/g extract ตามลำดับ

4.2.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ แสดงดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งกับเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH (ซ้าย) และ ABTS (ขวา)

จากรูปที่ 4.2 สารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1126.34 และ 909.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สารมาตรฐานโธเรลลิกซ์มีค่า IC_{50} เท่ากับ 26.86 และ 31.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (แสดงดังรูปภาคผนวกที่ ง-2 และ ง-3) จากวิธี DPPH และ ABTS ตามลำดับ เมื่อเทียบค่า IC_{50} ของสารสกัดกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโธเรลลิกซ์ พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งมีฤทธิ์น้อยกว่าสารมาตรฐานโธเรลลิกซ์ประมาณ 41.93 และ 28.78 เท่า จากวิธี DPPH และ ABTS ตามลำดับ จากนั้นเทียบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS กับสารมาตรฐานโธเรลลิกซ์ (แสดงตัวอย่างวิธีการคำนวณในภาคผนวก ง) พบว่ามีค่าเท่ากับ 24.02 ± 1.59 และ 33.42 ± 3.10 mgTE/g extract ตามลำดับ น้อยกว่าการศึกษาของ Chanu *et al.* (2012) ซึ่งพบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบห้อมใต้มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 61.01 ± 0.61 mgTE/g extract

เมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP พบว่ามีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ เท่ากับ 7.59 ± 1.06 mgAAE/g extract เทียบกับ Chanu *et al.* (2012) พบว่าสารสกัดใบห้อมใต้มีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ เท่ากับ 41.81 ± 0.68 mgAAE/g extract ซึ่งสูงกว่าสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง

จากการเปรียบเทียบในการศึกษานี้กับ Chanu *et al.* (2012) พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระนั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารสกัดเมทานอลใบห้อมใต้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดสูงกว่า และฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระสูงกว่าเช่นกัน

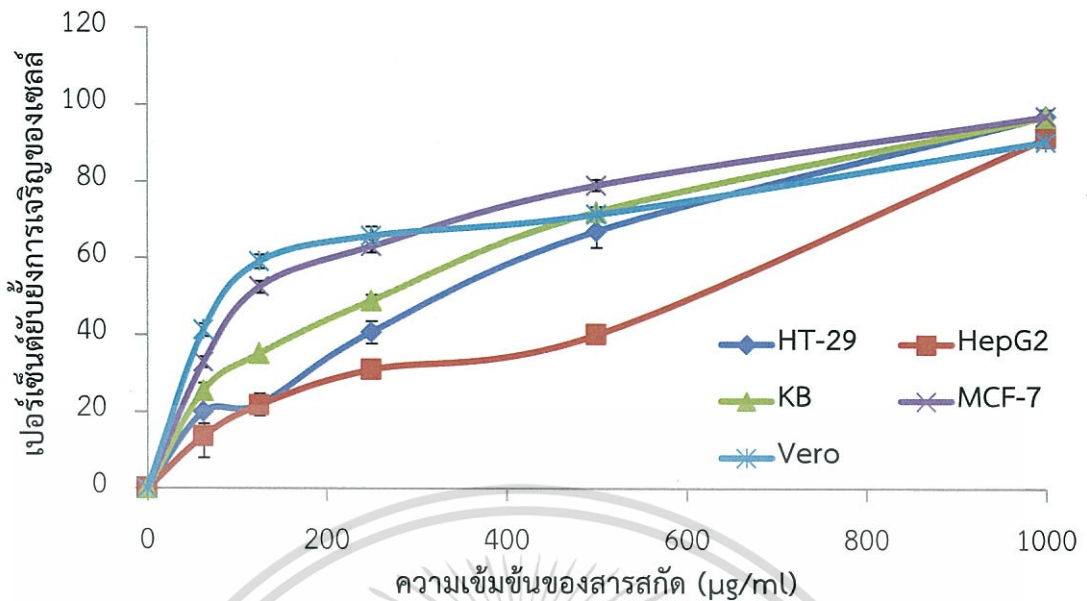
4.2.4 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง ที่ความเข้มข้นของ 2000 ไมโครกรัมต่อดิस्क พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสได้เท่ากับ 7.30 ± 0.71 มิลลิเมตร แตกต่างจากการศึกษาของ Ahmed *et al.* (2012) ที่ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบห้อมใต้ที่สกัดด้วยเอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อดิस्क สามารถยับยั้งเชื้อ *Esherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสได้ 16.17 ± 0.477 , 15.83 ± 0.477 และ 17.67 ± 0.666 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกัน Singh and Singh (2010) ได้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากใบห้อมใต้โดยสกัดสารจากเมทานอล ทดสอบที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อดิस्क พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Esherichia coli* ATCC 25922 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสได้ 12 มิลลิเมตร และมีฤทธิ์กับเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสได้ 13 มิลลิเมตร หากเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ พบว่าสารสกัดจากใบห้อมใต้ ซึ่งเป็นพืชสกุลเดียวกับตีปลากั้ง มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าสารสกัดจากใบตีปลากั้ง สามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยกว่า แต่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสที่กว้างกว่า

4.2.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง ทำการทดสอบเบื้องต้นกับเซลล์ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ MCF-7, HepG2, HT-29, KB และ Vero โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดเป็นพิษต่อเซลล์ทั้ง 5 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ เท่ากับ 94.95 ± 2.22 , 96.08 ± 1.19 , 90.95 ± 2.18 , 96.84 ± 2.00 และ 94.74 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไมโตมัยซิน ซี 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นชุดควบคุมเชิงบวก มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ เท่ากับ 65.81 ± 6.31 , 80.30 ± 4.41 , 49.95 ± 6.44 , 68.84 ± 3.98 และ 64.90 ± 5.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งต่อไป โดยทดสอบเพื่อหาค่า IC_{50}

ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งมีความเป็นพิษสูงที่สุดกับเซลล์ Vero มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด เท่ากับ 84.27 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือเซลล์ MCF-7, KB, HT-29 และ HepG2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 114.02, 259.88, 308.00 และ 642.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสารสกัดนั้นเป็นพิษกับเซลล์ปกติสูงที่สุด แต่ขณะเดียวกันก็เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปหากจะนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง

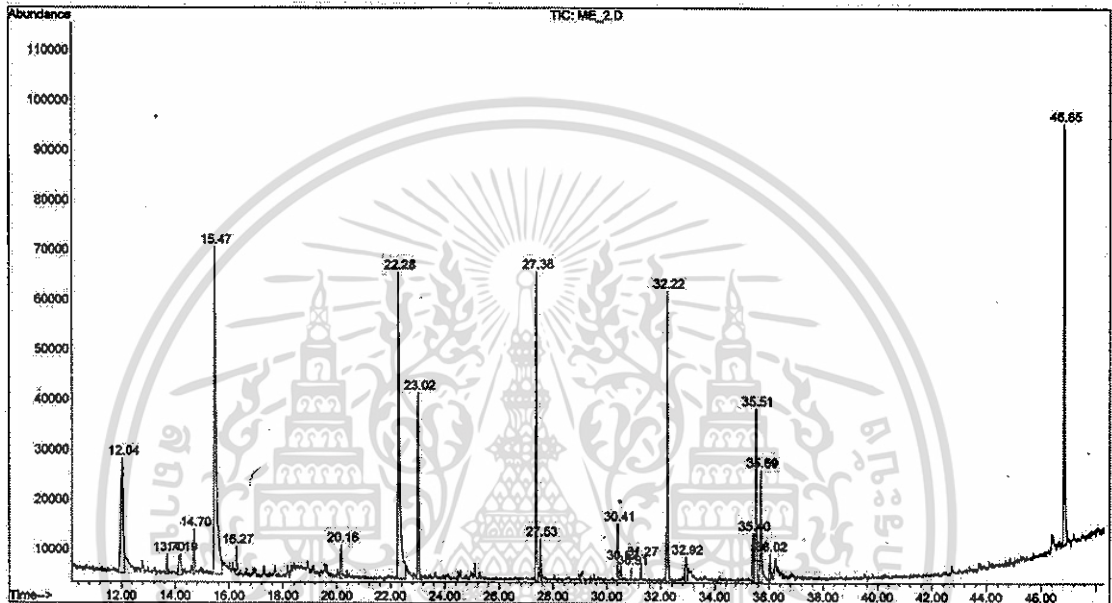


รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเมทานอลจากใบติปลากั้งกับเปอร์เซ็นต์ยั้งการเจริญของเซลล์

เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Thu *et al.* (2010) ที่สกัดสารจากทั้งต้น *P. turgidus* (Fua ex Hook. f.) Lindau ด้วยเมทานอล แล้วศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT กับเซลล์ MCF-7 และ HepG2 โดยบ่มเซลล์กับสารสกัดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดมีความเป็นพิษกับเซลล์ มีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.8 ± 0.0 และ 9.4 ± 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และการศึกษาของ Tiwary *et al.* (2015) สกัดสารจากใบของห้อมใต้ด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT กับเซลล์ MCF-7 และ HepG2 ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) บ่มเซลล์กับสารสกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีค่า IC_{50} เท่ากับ 49 ± 0.4 และมากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเทียบค่า IC_{50} ในการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ระหว่างเซลล์ MCF-7 และ HepG2 พบว่าสารสกัดจากพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees ทั้ง 3 ชนิดนี้ เป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7 มากกว่าเซลล์ HepG2 จึงมีแนวโน้มว่าพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees อาจนำไปพัฒนาเพื่อใช้รักษา มะเร็งเต้านมได้ดีกว่ามะเร็งตับ อย่างไรก็ตามไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้ว่าสารสกัดชนิดใดมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงกว่า เนื่องจากปัจจัยในการศึกษามีความแตกต่างกัน เช่น ระยะเวลาที่ทดสอบ ชนิดของอาหารเลี้ยงเซลล์ และปริมาณเซลล์เริ่มต้นแตกต่างกัน เป็นต้น นอกจากนี้ทั้ง 2 การศึกษาไม่ได้ทำการเปรียบเทียบในเซลล์ปกติด้วย จึงบอกได้เพียงว่าสารสกัดจากติปลากั้ง ห้อมใต้ และ *P. turgidus* (Fua ex Hook. f.) Lindau ต่างมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเมื่อทดสอบในหลอดทดลอง

4.2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS

สารสกัดเมทานอลจากใบดีปลากั้ง นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS ได้ผลโครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 4.4 พบองค์ประกอบทางเคมี 22 ชนิด โดยเป็นสารที่ทราบโครงสร้างจำนวน 11 ชนิด ดังตารางที่ 4.2 (Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารแต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก ค) เป็นสารที่ไม่ทราบโครงสร้าง (Unknown compound) จำนวน 11 ชนิด



รูปที่ 4.4 GC/MS โครมาโทแกรมของสารสกัดเมทานอลจากใบดีปลากั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากิ่งด้วยเทคนิค GC/MS

No.	RT* (min)	Compounds	Molecular formula	MW*	Types	Peak area (%)
1	12.035	Undecane	C ₁₁ H ₂₄	156	Alkane	7.435
2	15.467	3,5-Dimethylbenzaldehyde	C ₉ H ₁₀ O	134	Aromatic aldehyde	18.205
3	16.274	1,3-Di- <i>tert</i> -butylbenzene	C ₁₄ H ₂₂	190	Aromatic hydrocarbon	0.784
4	22.284	1-Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	186	Fatty alcohol	15.509
5	23.021	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206	Phenolic	4.785
6	27.377	Cyclododecane	C ₁₂ H ₂₄	168	Alkane	8.143
7	32.223	Methyl palmitate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	Fatty acid ester	7.746
8	35.403	Methyl linoleate	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	Fatty acid ester	1.149
9	35.513	Methyl linolenate	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	Fatty acid ester	6.244
10	36.023	Methyl stearate	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	Fatty acid ester	0.796
11	46.847	Squalene	C ₃₀ H ₅₀	410	Triterpene	16.123

* RT = Retention time ; MW = Molecular weight

จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS ในสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง พบว่ามีสาร 2 ชนิด ที่น่าสนใจ ได้แก่ 2,4-Di-*tert*-butylphenol และ Squalene

4.2.6.1 2,4-Di-*tert*-butylphenol

2,4-Di-*tert*-butylphenol (2,4-DTBP) พบได้ในพืช รา แบคทีเรีย และสัตว์ ใช้เป็นสารตัวกลางที่ใช้ในการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระและสารป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV stabilizer) ใช้กันมากในการผลิตด้านเภสัชกรรม (Choi *et al.*, 2013) มีการนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ เช่น ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ (Yoon *et al.*, 2006 ; Kadoma *et al.*, 2009 ; Choi *et al.*, 2013 ; Varsha *et al.*, 2015) ฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Antitumor activity) หรือความเป็นพิษต่อเซลล์ (Kadoma *et al.*, 2009 ; Malek *et al.*, 2009 ; Varsha *et al.*, 2015) ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Chawawisit *et al.*, 2015 ; Viszwapriya *et al.*, 2016) ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา (Dharni *et al.*, 2014 ; Maria Teresa *et al.*, 2014 ; Rangel-Sánchez *et al.*, 2014 ; Varsha *et al.*, 2015 ; Belghit *et al.*, 2016) และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Phytotoxic activity) (Chuah *et al.*, 2016) เป็นต้น

Malek *et al.* (2009) แยก 2,4-DTBP ได้จากใบกุหลาบพุกาม (*Pereskia bleo* (Kunth) DC.) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Neutral red โดยบ่มเซลล์กับสารเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีความเป็นพิษกับเซลล์ KB, MCF-7, A549, เซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ (Human cervical cancer cell line) ชนิด CasKi และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (Human colon carcinoma cell line) ชนิด HCT-116 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.81, 5.75, 6.00, 4.50 และ 29.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ใช้ทดสอบ คือ Human lung fibroblast cell ชนิด MRC-5 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Choi *et al.* (2013) แยก 2,4-DTBP ได้จากมันเทศ (Sweet potato) แล้วทดสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เทียบกับกรดแอสคอร์บิก พบว่า 2,4-DTBP มีฤทธิ์น้อยกว่ากรดแอสคอร์บิกเพียงครั้งหนึ่ง และพบว่ายังสามารถลดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) จากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเซลล์ Rat pheochromocytoma cell line ชนิด PC12

4.2.6.2 Squalene

Squalene พบได้ทั้งในสัตว์และพืช เป็นสารตัวกลางในวิถีการสังเคราะห์คลอเรสเตอรอล (Cholesterol) มีโครงสร้างคล้าย β -carotene และ Coenzyme Q10 มีประโยชน์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ให้ความชุ่มชื้นกับผิวหนัง และยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Huang *et al.*, 2009)

De Los Reyes *et al.* (2016) แยก Squalene ได้จากใบ *Dysoxylum gaudichaudianum* (A. Juss.) Miq. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป PrestoBlue บ่มเซลล์กับสารเป็นเวลา 4 วัน พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-29, MCF-7 และ HCT-116 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.84, 4.40 และ 7.86 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ก็พบว่ามีความเป็นพิษต่อ

เซลล์ผิวหนังปกติของมนุษย์ (Human dermal fibroblast cell line) ชนิด HDFn เล็กน้อย ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

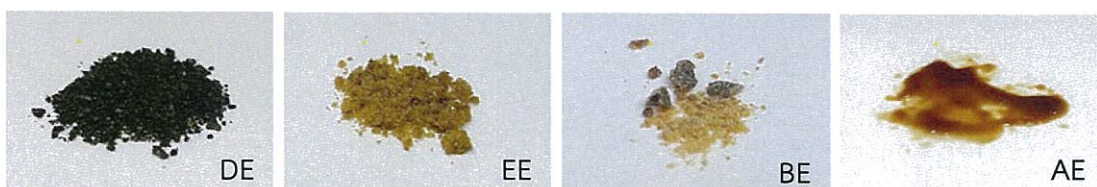
จากการศึกษา พบว่าสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งนั้นมีฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความเป็นพิษต่อเซลล์ ถึงแม้จะมีฤทธิ์ค่อนข้างน้อยกว่าในพืชสกุลเดียวกัน แต่พบสารที่มีความน่าสนใจเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS ได้แก่ 2,4-DTBP และ Squalene โดยฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนหนึ่งอาจมาจาก 2,4-DTBP และ Squalene จึงยังสนใจศึกษาต่อโดยนำสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้งมาสกัดต่อด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction แล้วนำสารสกัดที่ได้ไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

4.3 สารสกัดใบตีปลากั้งชั้นต่างๆ

สารสกัดเมทานอลปริมาณ 310.75 กรัม สกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction ซึ่งเป็นการแยกสารโดยอาศัยการละลายของสารที่แตกต่างกันในตัวทำละลายที่ไม่ผสมกัน (รัตนา, 2550) ในการศึกษาขั้นนี้สกัดโดยเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลาย ทำให้สามารถสกัดแยกสารได้ตามความเข้มข้นของตัวทำละลาย ได้สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน (DE) เอทิลอะซิเตท (EE) บิวทานอล (BE) และน้ำ (AE) ซึ่งสารที่ได้จากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนโดยส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มไขมัน น้ำมันหอมระเหย และอัลคาลอยด์ สกัดด้วยเอทิลอะซิเตทส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์และไกลโคไซด์ และสกัดด้วยน้ำส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มไกลโคไซด์ น้ำตาล และกรดอะมิโน (Houghton and Raman, 1998) ผลได้และลักษณะของสารสกัดชั้นต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.5 ซึ่งสารสกัดดังกล่าวจะนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

ตารางที่ 4.3 น้ำหนัก ผลได้ และลักษณะของสารสกัดชั้นต่างๆ

สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)	ลักษณะของสารสกัด
DE	209.95	67.56	ผงสีเขียวเข้ม
EE	3.89	1.25	ผงสีเหลืองน้ำตาล
BE	17.67	5.69	ผงสีส้มน้ำตาล
AE	67.72	21.76	ชั้นหนืดสีส้มน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม



รูปที่ 4.5 ลักษณะของสารสกัดชั้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดใบติปลากิ่งชั้นต่างๆ

4.4.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าสารสกัด EE มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัด BE ตามด้วยสารสกัด DE และ AE ซึ่งทั้ง 2 สารสกัดนี้ถือว่ามีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ

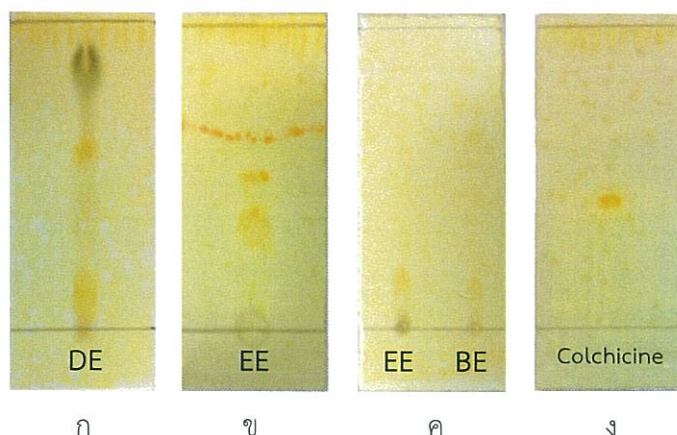
ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดชั้นต่างๆ

สารสกัด	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/g extract)
DE	15.16 ^c ± 0.82
EE	55.05 ^a ± 3.40
BE	25.02 ^b ± 5.60
AE	13.77 ^c ± 0.57

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.4.2 การตรวจสอบอัลคาลอยด์

จากการตรวจสอบอัลคาลอยด์เบื้องต้นในสารสกัดเมทานอลจากใบติปลากิ่งด้วยวิธีการตกตะกอน พบว่ามีอัลคาลอยด์อยู่ในสารสกัด จึงศึกษาต่อโดยตรวจสอบอัลคาลอยด์ในสารสกัดชั้นต่างๆ ในเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค TLC ตรวจสอบผลด้วย Dragendorff's spray reagent ผลการตรวจสอบ แสดงดังรูปที่ 4.6 และตรวจสอบอัลคาลอยด์ในเชิงปริมาณตามวิธีของ Sreevidya and Mehrotra (2003) ซึ่งใช้หลักการตกตะกอนอัลคาลอยด์ด้วย Dragendorff's reagent แต่พบว่าวิธีดังกล่าวไม่เหมาะสมกับตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ อาจเนื่องมาจากอัลคาลอยด์ที่มีอยู่ในตัวอย่างมีปริมาณน้อย



รูปที่ 4.6 ผลการตรวจสอบอัลคาลอยด์โดยเทคนิค TLC สเปรย์ด้วย Dragendorff's spray reagent

ก : สารสกัด DE บนแผ่น Normal phase TLC

ระบบตัวทำละลาย คือ เอทิลอะซิเตท : เมทานอล อัตราส่วน 8 : 2

ข : สารสกัด EE บนแผ่น Normal phase TLC

ระบบตัวทำละลาย คือ ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล อัตราส่วน 6 : 1

ค : สารสกัด EE และ BE บนแผ่น Reversed-phase TLC

ระบบตัวทำละลาย คือ เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 6 : 4

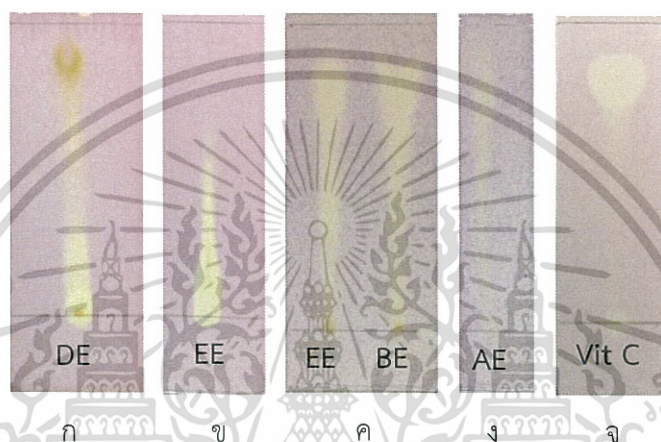
ง : โคลชิซินบนแผ่น Normal phase TLC

ระบบตัวทำละลาย คือ คลอโรฟอร์ม : เมทานอล อัตราส่วน 95 : 5

ผลการตรวจสอบพบว่า สารสกัด DE ตรวจพบจุดสีส้มจำนวน 2 จุด (รูปที่ 4.6ก) ดังนั้นในสารสกัด DE อาจจะมีสารอัลคาลอยด์อย่างน้อย 2 สาร สารสกัด EE บนแผ่น Normal phase TLC ตรวจพบจุดสีส้มจำนวน 2 จุด (รูปที่ 4.6ข) และบนแผ่น Reversed-phase TLC ตรวจพบจุดสีส้มจำนวน 1 จุด (รูปที่ 4.6ค) ซึ่งจุดสีส้มที่พบบนแผ่น Reversed-phase TLC อาจเป็นสารอัลคาลอยด์ชนิดเดียวกับที่พบบนแผ่น Normal phase TLC ดังนั้นในสารสกัด EE อาจมีสารอัลคาลอยด์อย่างน้อย 2 สาร และสารสกัด BE ตรวจพบจุดสีส้มจำนวน 1 จุด (รูปที่ 4.6ค) ดังนั้นในสารสกัด BE อาจจะมีสารอัลคาลอยด์อย่างน้อย 1 สาร ส่วนสารสกัด AE ตรวจสอบบนแผ่น Reversed-phase TLC ใช้ระบบตัวทำละลาย คือ เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 4 : 6 หลังจากสเปรย์ด้วย Dragendorff's spray reagent ไม่ปรากฏจุดใดๆ แสดงว่าในสารสกัด AE อาจจะไม่มีการอัลคาลอยด์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าในสารสกัดจากใบตึปลาทั้งอาจมีอัลคาลอยด์อย่างน้อย 5 สาร

4.4.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยเทคนิค TLC Bioautography ซึ่งเป็นการทดสอบในเชิงคุณภาพ ผลแสดงดังรูปที่ 4.7 โดยใช้กรดแอสคอร์บิกเป็นสารมาตรฐาน พบจุดสีเหลืองบนพื้นสีม่วงของแผ่น TLC เมื่อเทียบกับสารสกัดชั้นต่างๆ พบแถบสีเหลืองเป็นทางยาวบนพื้นสีม่วงของแผ่น TLC ลักษณะเดียวกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก แสดงว่าสารสกัดทั้ง 4 สาร มีสารที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่หลายชนิด จึงนำสารสกัดชั้นต่างๆ มาทดสอบด้วยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP



รูปที่ 4.7 ผลการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นต่างๆ โดยเทคนิค TLC Bioautography สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล

ก : สารสกัด DE บนแผ่น Normal phase TLC

ระบบตัวทำละลาย คือ เอทิลอะซิเตท : เมทานอล อัตราส่วน 8 : 2

ข : สารสกัด EE บนแผ่น Normal phase TLC

ระบบตัวทำละลาย คือ ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล อัตราส่วน 6 : 1

ค : สารสกัด EE และ BE บนแผ่น Reversed-phase TLC

ระบบตัวทำละลาย คือ เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 6 : 4

ง : สารสกัด AE บนแผ่น Reversed-phase TLC

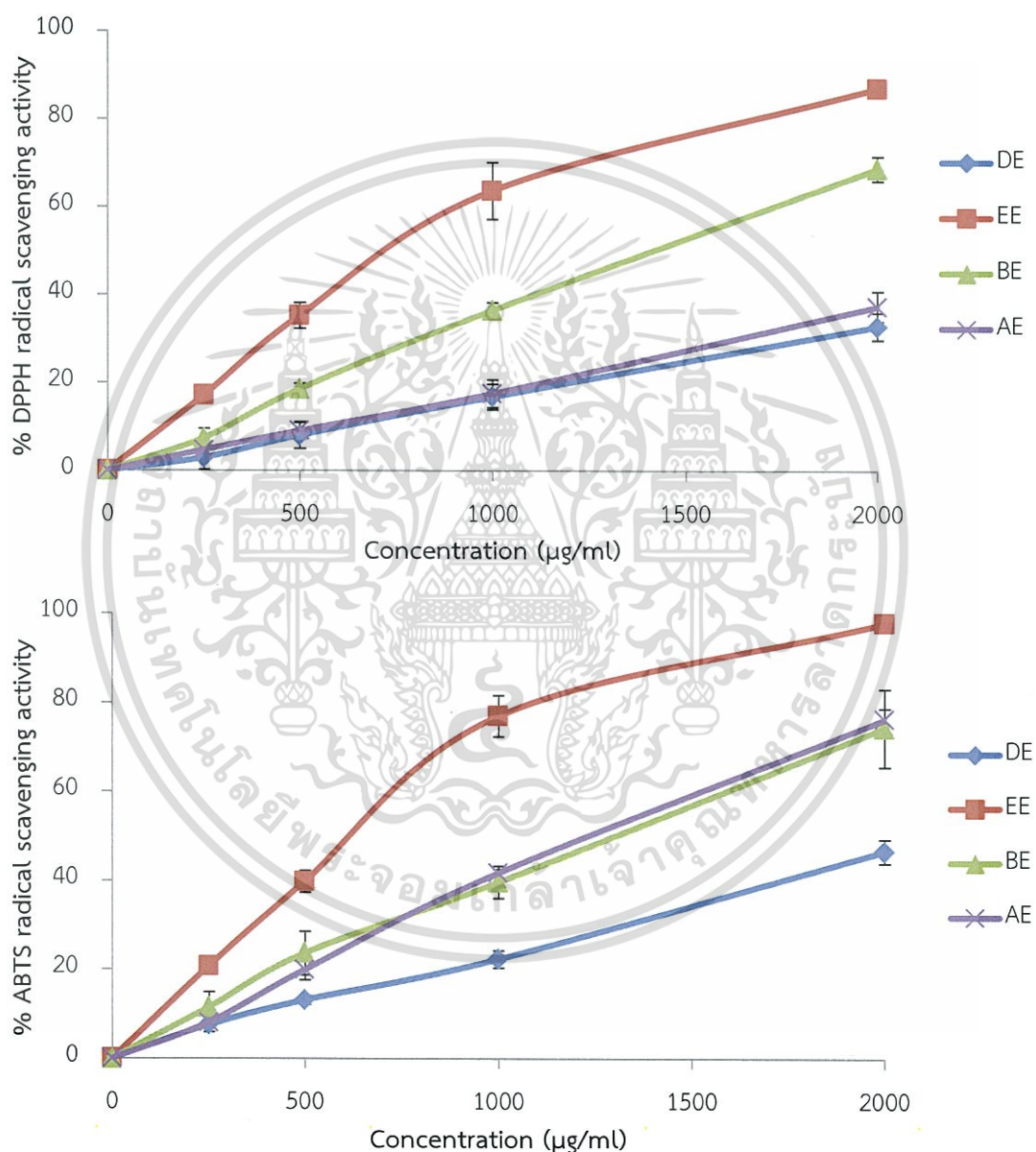
ระบบตัวทำละลาย คือ เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 4 : 6

จ : กรดแอสคอร์บิกบนแผ่น Normal phase TLC

ระบบตัวทำละลาย คือ เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 7 : 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นต่างๆ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS แสดงดังรูปที่ 4.8 สรุปค่า IC_{50} ของสารสกัดชั้นต่างๆ ดังตารางที่ 4.5 พบว่าสารสกัด EE มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทั้ง DPPH และ ABTS สูงที่สุด มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด แต่เมื่อเทียบกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทเรลล็อกซ์ จากทั้งวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัด EE นั้นมีฤทธิ์ต่ำกว่าสารมาตรฐานโทเรลล็อกซ์ประมาณ 27.19 และ 19.89 เท่า ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดชั้นต่างๆ กับเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (บน) และ ABTS (ล่าง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ความเข้มข้นของสารสกัดชั้นต่างๆ ที่มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ 50 เปอร์เซ็นต์

สารสกัด	IC ₅₀ (µg/ml)	
	DPPH	ABTS
DE	>2000	>2000
EE	730.28	628.39
BE	1422.93	1160.41
AE	>2000	1065.33
Trolox	26.86	31.59

เมื่อเทียบความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS กับสารมาตรฐานโทโรลิกซ์ และความสามารถในการรีดิวซ์ Fe³⁺-TPTZ กับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกของสารสกัดชั้นต่างๆ ผลแสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่าสารสกัด EE มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือ สารสกัด BE

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดชั้นต่างๆ

สารสกัด	ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ		
	DPPH (mgTE/g extract)	ABTS (mgTE/g extract)	FRAP (mgAAE/g extract)
DE	8.25 ^c ±1.07	15.45 ^c ±1.76	5.28 ^c ±1.72
EE	33.27 ^a ±5.81	45.50 ^a ±3.85	19.89 ^a ±0.95
BE	18.53 ^b ±1.62	26.44 ^b ±2.39	10.57 ^b ±0.34
AE	9.87 ^c ±0.26	23.06 ^b ±2.04	4.65 ^c ±0.19

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลอง พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยสารสกัด EE มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุด และมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระสูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัด BE ส่วนสารสกัด DE และ AE มีความใกล้เคียงกัน

4.4.4 การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดชั้นต่างๆ ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อดิสก์ สรุปดังตารางที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใสในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดชั้นต่างๆ

สารสกัด	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใส (มิลลิเมตร)							
	แบคทีเรียแกรมบวก					แบคทีเรียแกรมลบ		
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>
	DMST 5040	ATCC 6633	ATCC 9341	TISTR 1466	ATCC 12228	ATCC 25922	ATCC 27853	DMST 0562
DE	-	7.00 ^b ±0.70	-	-	-	-	-	-
EE	-	7.67 ^{ab} ±0.73	7.40±0.42	-	-	-	-	-
BE	-	8.14 ^a ±0.38	9.79±0.59	-	-	-	-	-
AE	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicin (10 µg/disc)	26.79±1.89	24.02±1.49	26.43±2.21	21.71±1.49	31.16±1.08	23.27±1.18	18.76±0.71	24.40±1.47

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากตารางที่ 4.7 พบว่าฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 มากที่สุด คือ สารสกัด BE รองลงมาคือ สารสกัด EE แต่พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ส่วนฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *M. luteus* ATCC 9341 พบว่าสารสกัด BE มีฤทธิ์มากกว่าสารสกัด EE ซึ่งจากผลการศึกษานี้ พบว่าฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ

4.4.5 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

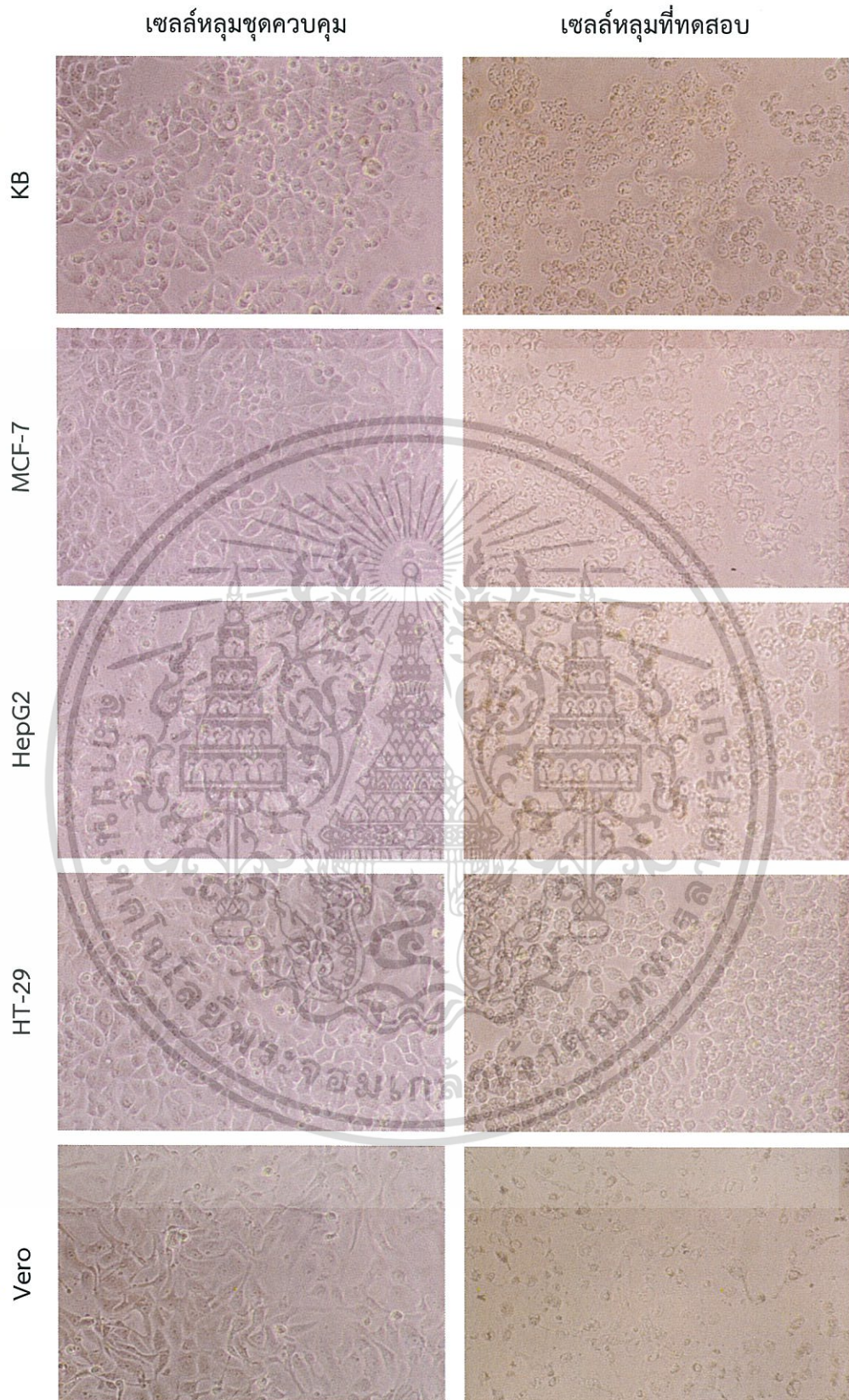
การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดชั้นต่างๆ ได้ทำการทดสอบเบื้องต้นโดยทดสอบที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.8 พบว่าสารสกัด DE มีความเป็นพิษกับเซลล์ที่ทดสอบทั้ง 5 ชนิดสูงสุด ส่วนสารอื่นๆ เป็นพิษต่อเซลล์เล็กน้อย มีเปอร์เซ็นต์ความยับยั้งการเจริญของเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับในสารสกัด DE ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะสารสกัด DE มาศึกษาต่อ

ตารางที่ 4.8 เปอร์เซนต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ของสารสกัดชั้นต่างๆ ทดสอบเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	เปอร์เซนต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์				
	Cancer cell lines				Normal cell line
	KB	MCF-7	HepG2	HT-29	Vero
DE	94.63 ^a ±2.48	92.25 ^a ±1.75	93.62 ^a ±3.62	94.45 ^a ±1.82	96.87 ^a ±1.69
EE	-7.84 ^c ±2.49	50.69 ^b ±5.28	32.45 ^b ±4.27	6.22 ^c ±2.89	72.64 ^b ±3.81
BE	-38.67 ^d ±6.94	22.79 ^c ±6.66	2.57 ^c ±2.04	-36.79 ^d ±5.18	21.15 ^c ±2.59
AE	26.85 ^b ±7.60	-2.70 ^d ±3.20	-8.35 ^d ±6.23	29.23 ^b ±3.94	0.13 ^d ±4.95

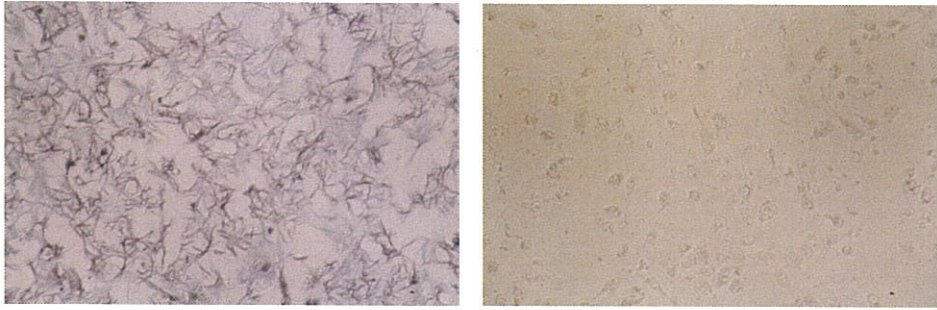
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

สารสกัด DE นำมาศึกษาต่อเพื่อหาค่า IC₅₀ โดยทดสอบสารสกัด DE ที่ความเข้มข้น 62.5-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สังเกตลักษณะสีฐานของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 4.9) โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์หลุมควบคุมกับเซลล์หลุมที่ทดสอบ พบว่าลักษณะเซลล์ในหลุมควบคุมรูปร่างเซลล์ยังคงปกติและเกาะอยู่บนพื้นผิวของหลุม ส่วนลักษณะของเซลล์ที่ทดสอบกับสารสกัด DE ยกตัวอย่างที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากบ่ม 20 ชั่วโมง เซลล์รูปร่างเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับเซลล์หลุมควบคุม เซลล์มีลักษณะกลมและลอยขึ้นมาจากพื้นผิวของหลุม เมื่อสังเกตลักษณะของเซลล์หลังจากเติม MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (รูปที่ 4.10) พบว่าเซลล์หลุมควบคุมเกิดผลึกฟอร์มazan อย่างชัดเจนซึ่งแสดงว่าเซลล์มีชีวิต ขณะที่เซลล์ในหลุมที่ทดสอบกับสารสกัด DE ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่พบผลึกฟอร์มazan เกิดขึ้นแสดงว่าไม่มีเซลล์มีชีวิต หลังจากนั้นละลายผลึกฟอร์มazan คำนวณเปอร์เซนต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด DE กับเปอร์เซนต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์แสดงดังรูปที่ 4.11

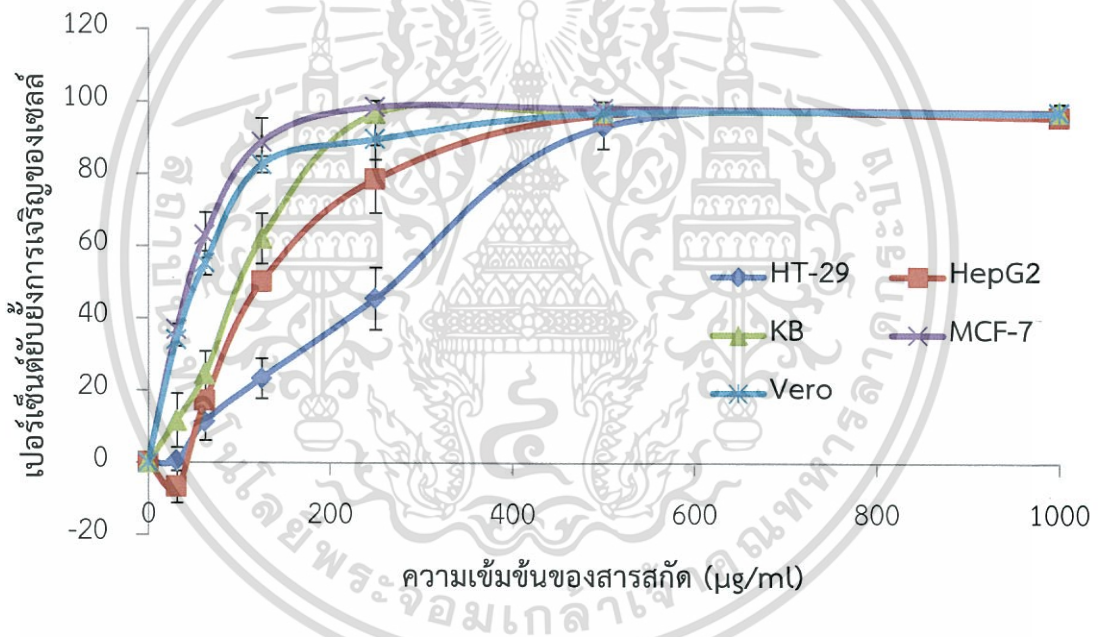


รูปที่ 4.9 ลักษณะของเซลล์เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Phase contrast ที่กำลังขยาย 100 เท่า เปรียบเทียบระหว่างเซลล์หลุมชุดควบคุม (ซ้าย) กับเซลล์หลุมที่ทดสอบกับสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารสกัด DE ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ขวา) หลังจากบ่ม 20 ชั่วโมง ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ลักษณะของผลึกฟอร์มาซานของเซลล์ Vero เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Phase contrast ที่กำลังขยาย 100 เท่า เปรียบเทียบระหว่างเซลล์หลุมชุดควบคุม (ซ้าย) กับเซลล์หลุมที่ทดสอบกับสารสกัด DE ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ขวา) หลังจากเติม MTT เป็นเวลา 4 ชั่วโมง



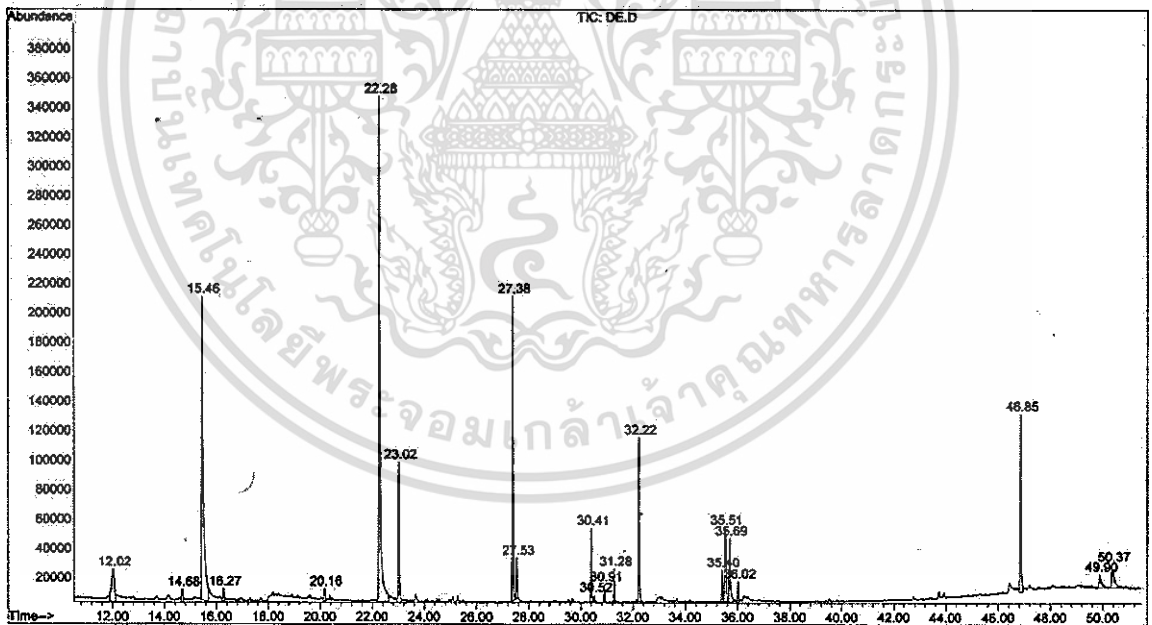
รูปที่ 4.11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด DE กับเปอร์เซ็นต์ยั้งการเจริญของเซลล์

จากรูปที่ 4.11 พบว่าสารสกัด DE มีความเป็นพิษสูงที่สุดกับเซลล์ MCF-7 มีค่า IC_{50} ต่ำที่สุด เท่ากับ 45.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือเซลล์ Vero, KB, HepG2 และ HT-29 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 53.41, 105.07, 124.98 และ 271.66 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.4.6 การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS จะเลือกเฉพาะสารสกัด DE โดยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารผสม เฟสเคลื่อนที่เป็นแก๊ส สารที่จะนำมาแยกด้วยวิธีนี้มักเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สามารถเปลี่ยนสถานะเป็นแก๊สได้ที่อุณหภูมิหนึ่งและมีความคงตัว ถ้าสารมีคุณสมบัติไม่เหมาะสมที่จะนำมาแยก เช่น ระเหยยาก ความคงตัวต่ำ หรือ สารมีความเป็นขี้สูงเกินไป จะทำให้ยากต่อการจะให้เคลื่อนตัวออกจากคอลัมน์ เป็นต้น จึงจำเป็นต้องปรับให้เป็นอนุพันธ์ (Derivatization) เข้าช่วย เพื่อเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของสารให้มีคุณสมบัติตามต้องการ เช่น การปรับให้เป็นอนุพันธ์ของ Trimethylsilyl ether (TME) เป็นต้น (รัตน์, 2550) ดังนั้นจึงเลือกเฉพาะสารสกัด DE มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS เนื่องจากสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด DE มีความเป็นขี้ต่ำและอาจไม่จำเป็นต้องปรับให้เป็นอนุพันธ์

ผลการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS ของสารสกัด DE ได้ผลโครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 4.12 พบองค์ประกอบทางเคมี 21 ชนิด โดยเป็นสารที่ทราบโครงสร้างจำนวน 13 ชนิด ดังตารางที่ 4.9 (Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารแต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก ค) และเป็นสารที่ไม่ทราบโครงสร้างจำนวน 8 ชนิด



รูปที่ 4.12 GC/MS โครมาโทแกรมของสารสกัด DE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัด DE ด้วยเทคนิค GC/MS

No.	RT* (min)	Compounds	Molecular formula	MW*	Types	Peak area (%)
1	12.022	Undecane	C ₁₁ H ₂₄	156	Alkane	3.467
2	15.460	3,5-Dimethylbenzaldehyde	C ₉ H ₁₀ O	134	Aromatic aldehyde	21.338
3	16.274	1,3-Di- <i>tert</i> -butylbenzene	C ₁₄ H ₂₂	190	Aromatic hydrocarbon	0.635
4	22.278	1-Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	186	Fatty alcohol	26.298
5	23.021	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206	Phenolic	5.215
6	27.376	Cyclododecane	C ₁₂ H ₂₄	168	Alkane	10.286
7	30.407	Neophytadiene	C ₂₀ H ₃₈	278	Diterpene	2.387
8	31.280	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	Diterpenoid	0.998
9	32.223	Methyl palmitate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	Fatty acid ester	5.903
10	35.396	Methyl linoleate	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	Fatty acid ester	1.089
11	35.512	Methyl linolenate	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	Fatty acid ester	3.805
12	36.023	Methyl stearate	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	Fatty acid ester	0.807
13	46.847	Squalene	C ₃₀ H ₅₀	410	Triterpene	7.488

* RT = Retention time ; MW = Molecular weight

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS ในสารสกัด DE พบสารที่มีความน่าสนใจเพิ่มเติม ได้แก่ Phytol และ Neophytadiene

4.4.6.1 Phytol

Phytol เป็นส่วนประกอบหนึ่งของคลอโรฟิลล์ พบได้ทั่วไปในสาหร่ายแบคทีเรีย ไชยาโนแบคทีเรีย และพืช ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมเครื่องหอม และใช้ในเครื่องสำอาง สบู่ แชมพู และน้ำยาทำความสะอาด เป็นต้น (Islam *et al.*, 2015) มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ เช่น ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ (Santos *et al.*, 2013 ; Pejin *et al.*, 2014b) ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Pejin *et al.*, 2014b ; Ghaneian *et al.*, 2015) ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Komiya *et al.*, 1999 ; Pejin *et al.*, 2014a) ฤทธิ์ต้านปรสิต (Antiparasitic activity) (Morales *et al.*, 2014) ฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย (Pongprayoon *et al.*, 1992) และฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) (Silva *et al.*, 2014) เป็นต้น

Malek *et al.* (2009) แยก Phytol ได้จากใบกุหลาบพุกาม (*Pereskia bleo* (Kunth) DC.) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Neutral red โดยบ่มเซลล์กับสารเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีความเป็นพิษกับเซลล์ KB, MCF-7, A549, CasKi และ HCT-116 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 7.1, 34, 31, 18 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ใช้ทดสอบ คือ เซลล์ MRC-5 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 74.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Pejin *et al.* (2014a) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ Phytol ด้วยวิธี MTT พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์ MCF-7, HeLa, HT-29, A549, เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MDA-MB-231, เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากของมนุษย์ (human prostate cancer cell line) ชนิด PC-3 และ Human melanoma cell line ชนิด Hs294T มีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.79 ± 0.41 , 15.51 ± 0.76 , 34.82 ± 1.66 , 56.98 ± 2.68 , 69.67 ± 2.99 , 77.85 ± 1.93 และ 65.15 ± 2.91 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แต่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติน้อยกว่า เซลล์ปกติที่ใช้ทดสอบ คือ เซลล์ MRC-5 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 124.84 ± 1.59 ไมโครโมลาร์

4.4.6.2 Neophytadiene

Neophytadiene พบในน้ำมันหอมระเหยของพืชหลายชนิด โดย Ragasa *et al.* (2009) แยก Neophytadiene ได้จากใบ *Erigeron sumatrensis* Retz. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* และ *Trichophyton mentogrophytes* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* และ *Aspergillus niger*

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัด DE ส่วนหนึ่งอาจมาจาก 2,4-DTBP, Squalene, Phytol และ Neophytadiene

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดชั้นต่างๆ พบว่าสารสกัด DE มีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยรวมสูงที่สุด สารสกัด EE มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระสูงที่สุด สารสกัด BE มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมากกว่าสารสกัดชั้นอื่นๆ จึงมีความสนใจที่จะนำมาสารสกัดชั้นต่างๆ มาแยกต่อด้วยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี แต่ในการศึกษานี้ได้เลือกเฉพาะสารสกัด DE เนื่องจากใช้เพียงคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ Normal phase แต่ในส่วนของสารสกัด EE และ BE อาจจำเป็นต้องใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ Reversed-phase หรือแบบ Size-exclusion เพราะสารมีความเป็นขั้วสูง สังเกตได้จากการทำ TLC ในการตรวจสอบอัลคาลอยด์ และฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ

4.5 สารสกัดส่วนย่อยไดคลอโรมีเทน

สารสกัด DE ปริมาณ 110.97 กรัม นำมาทำการแยกโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้เป็นสารสกัดส่วนย่อยไดคลอโรมีเทน (Dichloromethane fraction : DF) จำนวน 11 ส่วนย่อย โดยสารสกัดส่วนย่อย DF8-DF11 นั้นมีซิลิกาเจลปนอยู่ เนื่องจากในขั้นตอนการชะคอลัมน์ด้วยตัวทำละลาย เมื่อถึงระบบตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท : เมทานอล อัตราส่วน 9 : 1 พบว่ายังมีสารที่ต้องการแยกบริเวณด้านบนคอลัมน์เหลืออยู่ ทำให้จำเป็นต้องเพิ่มความมีขั้วด้วยเมทานอลขึ้น ส่งผลให้ซิลิกาเจลละลายออกมาด้วย โดยปกติแล้วซิลิกาเจลสามารถละลายในน้ำและเมทานอลได้เล็กน้อย (Alexander *et al.*, 1954) จึงสรุปน้ำหนักและผลได้เพียงสารสกัดส่วนย่อย DF1-DF7 ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 น้ำหนักและผลได้ของสารสกัดส่วนย่อยไดคลอโรมีเทน

สารสกัด	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	ผลได้ (เปอร์เซ็นต์)
DF1	0.4842	0.44
DF2	1.6339	1.47
DF3	0.5706	0.51
DF4	1.5914	1.43
DF5	0.9675	0.87
DF6	2.9789	2.68
DF7	1.4014	1.26

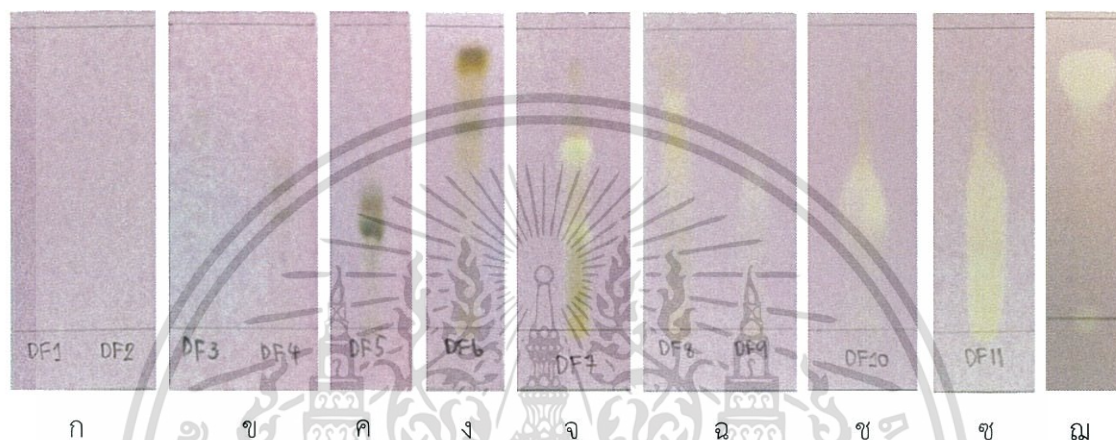
ผลได้รวมของสกัดส่วนย่อย DF1-DF7 รวม 8.66 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 91.34 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารสกัดส่วนย่อย DF8-DF11 ซึ่งมีซิลิกาเจลปน และบางส่วนอาจยังคงติดอยู่ในคอลัมน์ ทำให้ไม่สามารถนำส่วนนี้มาวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ซึ่งสารส่วนนี้ก็อาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดส่วนย่อยไดคลอโรมีเทน

4.6.1 การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ

การศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อย DF1-DF11 จะเลือกใช้วิธี TLC Bioautography เนื่องจากใช้สารเพียงปริมาณเล็กน้อย ซึ่งสารสกัดส่วนย่อย DF1-DF7 จะใช้สารปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อจุด ส่วนสารสกัดส่วนย่อย DF8-DF11 จะใช้ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อจุด โดยจะไม่ทราบปริมาณสารที่แน่นอน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 ผลการตรวจสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อยไดคลอโรมีเทน โดยเทคนิค TLC Bioautography บนแผ่น Normal phase TLC สเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในเมทานอล

ก : สารสกัดส่วนย่อย DF1 และ DF2

ระบบตัวทำละลาย คือ เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 8.5 : 1.5

ข : สารสกัดส่วนย่อย DF3 และ DF4

ระบบตัวทำละลาย คือ เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 8 : 2

ค : สารสกัดส่วนย่อย DF5 ระบบตัวทำละลาย คือ เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 8 : 2

ง : สารสกัดส่วนย่อย DF6 ระบบตัวทำละลาย คือ เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 5 : 5

จ : สารสกัดส่วนย่อย DF7 ระบบตัวทำละลาย คือ เฮกเซน : เอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 3 : 7

ฉ : สารสกัดส่วนย่อย DF8 และ DF9

ระบบตัวทำละลาย คือ เอทิลอะซิเตท : เมทานอล อัตราส่วน 9 : 1

ช : สารสกัดส่วนย่อย DF10 ระบบตัวทำละลาย คือ เอทิลอะซิเตท : เมทานอล อัตราส่วน 8 : 2

ซ : สารสกัดส่วนย่อย DF11 ระบบตัวทำละลาย คือ เอทิลอะซิเตท : เมทานอล อัตราส่วน 7 : 3

ฉ : กรดแอสคอร์บิก ระบบตัวทำละลาย คือ เมทานอล : น้ำ อัตราส่วน 7 : 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.13 พบว่าในสารสกัดส่วนย่อย DF7-DF11 ปรากฏจุดสีเหลืองบนพื้นสีม่วงของแผ่น TLC แสดงว่าในสารสกัดส่วนย่อย DF7-DF11 นั้นมีสารที่มีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเมื่อเทียบกับกรดแอสคอร์บิก จะพบจุดสีเหลืองบนพื้นสีม่วงของแผ่น TLC เช่นเดียวกัน

4.6.2 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดส่วนย่อยไดคลอโรมีเทน ทำการศึกษาได้เพียงสารสกัดส่วนย่อย DF1-DF7 เนื่องจากในสารสกัดส่วนย่อย DF8-DF11 มีซิลิกาเจลปนอยู่ในสารสกัด โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ของสารสกัดส่วนย่อย DF1-DF7 ทดสอบเบื้องต้นที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารสกัด	เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์				
	Cancer cell lines				Normal cell line
	KB	MCF-7	HepG2	HT-29	Vero
DF1	9.71 ^{bcd} ±5.50	84.02 ^a ±3.62	89.42 ^a ±4.15	20.39 ^a ±3.64	61.31 ^a ±4.51
DF2	15.98 ^a ±2.78	29.16 ^d ±3.90	-0.46 ^e ±4.90	16.49 ^{ab} ±3.08	6.90 ^c ±1.81
DF3	13.23 ^{ab} ±5.06	22.30 ^e ±3.76	5.51 ^d ±4.65	17.21 ^{ab} ±2.17	0.59 ^d ±3.11
DF4	12.96 ^{abc} ±4.74	25.38 ^{de} ±3.84	17.69 ^c ±4.02	14.89 ^b ±1.79	4.38 ^{cd} ±2.99
DF5	3.21 ^e ±3.74	28.48 ^d ±3.50	20.00 ^{bc} ±3.62	10.85 ^c ±3.33	6.71 ^c ±2.77
DF6	7.41 ^{cde} ±4.18	43.00 ^b ±1.92	18.13 ^{bc} ±3.53	15.77 ^b ±2.64	48.33 ^b ±5.26
DF7	6.78 ^{de} ±4.42	36.31 ^c ±4.98	23.24 ^b ±0.59	20.17 ^a ±2.77	50.91 ^b ±1.82

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

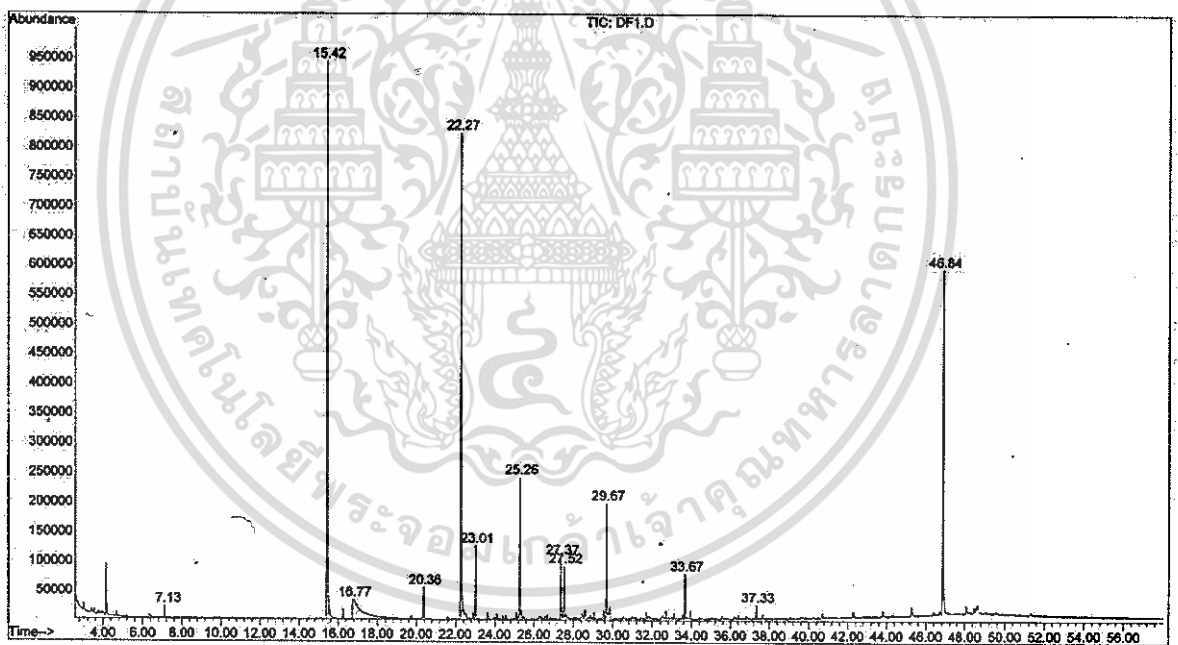
จากตารางที่ 4.11 พบว่าการทดสอบในเซลล์ KB และ HT-29 กับสารสกัดส่วนย่อยต่างๆ เป็นพิษต่อเซลล์เพียงเล็กน้อย ต่างจากการทดสอบกับสารสกัด DE จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสกัดส่วนย่อยต่างๆ อาจออกฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่วนการทดสอบในเซลล์ MCF-7 และ HepG2 พบว่าสารสกัดส่วนย่อย DF1 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์สูงที่สุด แต่การทดสอบในเซลล์ Vero ซึ่งเป็นเซลล์ปกติก็พบว่าสารสกัดยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ โดยสารสกัดส่วนย่อย DF1 มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเซลล์สูงที่สุด รองลงมา คือ สารสกัดส่วนย่อย DF5 และ DF6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระพบว่าสารสกัดส่วนย่อย DF7-DF11 มีสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ จึงเลือกสารสกัดส่วนย่อย DF7 มาทำวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS ต่อไป ส่วนสารสกัดส่วนย่อย DF8-DF11 มีสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน แต่สารสกัดส่วนย่อย DF8-DF11 นั้นมีซิลิกาเจลปนอยู่จึงไม่เลือกมาศึกษาต่อส่วนในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าสารสกัดส่วนย่อย DF1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง MCF-7 และ HepG2 สูงที่สุด แต่ก็ยังเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ Vero สูงที่สุดเช่นเดียวกัน มีความน่าสนใจในการนำมาวิเคราะห์ต่อไป

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS ในสารสกัดส่วนย่อย DF1 ได้ผลโครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 4.14 พบองค์ประกอบทางเคมี 13 ชนิด และเป็นสารที่ทราบโครงสร้างทุกชนิด ดังตารางที่ 4.12 (Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารแต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.14 GC/MS โครมาโทแกรมของสารสกัดส่วนย่อย DF1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดส่วนย่อย DF1 ด้วยเทคนิค GC/MS

No.	RT* (min)	Compounds	Molecular formula	MW*	Types	Peak area (%)
1	7.128	α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	136	Monoterpene	0.475
2	15.419	3,5-Dimethylbenzaldehyde	C ₉ H ₁₀ O	134	Aromatic aldehyde	28.610
3	16.770	Caprolactam	C ₆ H ₁₁ NO	113	Alkaloid	4.607
4	20.363	Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	198	Alkane	1.354
5	22.269	1-Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	186	Fatty alcohol	23.818
6	23.012	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206	Phenolic	2.965
7	25.261	Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	226	Alkane	6.169
8	27.368	Cyclododecane	C ₁₂ H ₂₄	168	Alkane	2.922
9	27.523	2-Hexyl-1-decanol	C ₁₆ H ₃₄ O	240	Fatty alcohol	2.641
10	29.668	Octadecane	C ₁₈ H ₃₈	254	Alkane	5.080
11	33.668	Eicosane	C ₂₀ H ₄₂	282	Alkane	2.132
12	37.332	Docosane	C ₂₂ H ₄₆	310	Alkane	0.647
13	46.845	Squalene	C ₃₀ H ₅₀	410	Triterpene	18.578

* RT = Retention time ; MW = Molecular weight

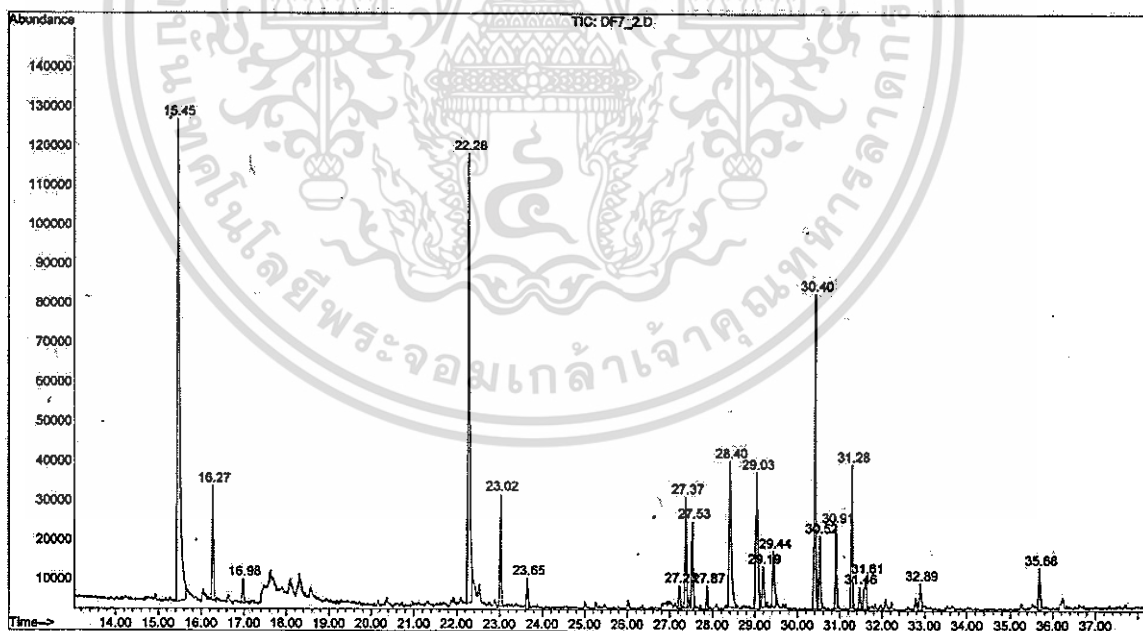
จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS ในสารสกัด DF1 พบสารที่น่าสนใจเพิ่มเติม นอกจาก 2,4-DTBP และ Squalene คือ α -Pinene

4.6.3.1 α -Pinene

α -Pinene เป็นสารประเภทโมโนเทอร์ปีน พบในน้ำมันหอมระเหยของพืชหลายชนิด มีการนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ เช่น ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ (Wang *et al.*, 2008 ; Aydin *et al.*, 2013 ; Dai *et al.*, 2013) ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Silva *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012 ; Dai *et al.*, 2013) ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Silva *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2012 ; Aydin *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2015) และฤทธิ์ระงับปวด (Antinociceptive activity) (Him *et al.*, 2008) เป็นต้น

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดส่วนย่อย DF1 ส่วนหนึ่งอาจมาจาก 2,4-DTBP, Squalene และ α -Pinene

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS ในสารสกัดส่วนย่อย DF7 ได้ผลโครมาโทแกรมแสดงดังรูปที่ 4.15 พบองค์ประกอบทางเคมี 22 ชนิด โดยเป็นสารที่ทราบโครงสร้างจำนวน 13 ชนิด ดังตารางที่ 4.13 (Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารแต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก ค) และเป็นสารที่ไม่ทราบโครงสร้างจำนวน 9 ชนิด



รูปที่ 4.15 GC/MS โครมาโทแกรมของสารสกัดส่วนย่อย DF7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดส่วนย่อย DF7 ด้วยเทคนิค GC/MS

No.	RT* (min)	Compounds	Molecular formula	MW*	Types	Peak area (%)
1	15.451	3,5-Dimethylbenzaldehyde	C ₉ H ₁₀ O	134	Aromatic aldehyde	25.035
2	16.272	1,3-Di- <i>tert</i> -butylbenzene	C ₁₄ H ₂₂	190	Aromatic hydrocarbon	3.768
3	22.275	1-Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	186	Fatty alcohol	17.454
4	23.019	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206	Phenolic	3.366
5	23.645	Dihydroactinidiolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	180	Monoterpene lactone	1.022
6	27.374	Cyclododecane	C ₁₂ H ₂₄	168	Alkane	3.427
7	28.402	Isololiolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	196	Monoterpene lactone	7.371
8	29.035	Loliolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	196	Monoterpene lactone	6.010
9	29.436	Pluchidiol	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	208	Diol	2.444
10	30.398	Neophytadiene	C ₂₀ H ₃₈	278	Diterpene	9.278
11	30.521	6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	C ₁₈ H ₃₆ O	268	Ketone	2.375
12	31.277	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	Diterpenoid	4.202
13	32.886	Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	Fatty acid	1.145

* RT = Retention time ; MW = Molecular weight

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC/MS ในสารสกัด DF7 พบสารที่น่าสนใจเพิ่มเติม ได้แก่ Dihydroactinidiolide, Loliolide และ Isololiolide

4.6.3.2 Dihydroactinidiolide

Dihydroactinidiolide พบได้ในพืชและแมลงหลายชนิด เป็นสารให้กลิ่นในชาและยาสูบ (Malek *et al.*, 2009) มีการนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ เช่น ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Malek *et al.*, 2009) ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่าย (Wang *et al.*, 2014) ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Kato *et al.*, 2003 ; Chotsaeng *et al.*, 2012) เป็นต้น

Malek *et al.* (2009) แยก Dihydroactinidiolide ได้จากใบกุหลาบพุกาม (*Pereskia bleo* (Kunth) DC.) ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Neutral red โดยบ่มเซลล์กับสารเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีความเป็นพิษกับเซลล์ KB, MCF-7, A549, CasKi และ HCT-116 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 6.7, 30, 97, 40 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ใช้ทดสอบ คือ เซลล์ MRC-5 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 91.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.6.3.3 Loliolide และ Isololiolide

Loliolide และ Isololiolide พบได้ทั้งในพืช สัตว์ สาหร่าย และปะการัง (Grabarczyk, 2015) มีการนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่างๆ เช่น ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ (Yang *et al.* 2011) ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Elkhayat, 2009 ; Zajdel *et al.*, 2012) ความเป็นพิษต่อเซลล์ (Elkhayat, 2009 ; Yang *et al.* 2011 ; Machado *et al.*, 2012 ; Youn *et al.*, 2014 ; Vizetto-Duarte *et al.*, 2016) ฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค (Zhao *et al.*, 2014) ฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (Immunosuppressive activity) (Okada *et al.*, 1994) และฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (Macías *et al.*, 1999 ; Kato *et al.*, 2003 ; Bich and Kato-Noguchi, 2014) เป็นต้น

Elkhayat (2009) แยก Loliolide ได้จากราก *Sonchus oleraceus* L. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี [³H]thymidine พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเลือดขาวของหนู (Mouse T lymphoma cell line) ชนิด L5178Y มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 4.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Paper disc diffusion พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Neisseria gonorrhoeae* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* และ *Aspergillus flavus*

Machado *et al.* (2012) แยก Loliolide ได้จากใบ *Arctium lappa* ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี Sulforhodamine โดยบ่มเซลล์กับสารเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีความเป็นพิษกับเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (Human epithelial colorectal adenocarcinoma cell line) ชนิด CaCo-2 มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 30.0±6.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดส่วนย่อย DF7 ส่วนนี้อาจมาจาก 2,4,-DTBP, Phytol, Neophytadiene, Loliolide Isololiolide และ Dihydroactinidiolide

4.7 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP

4.7.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค SRAP

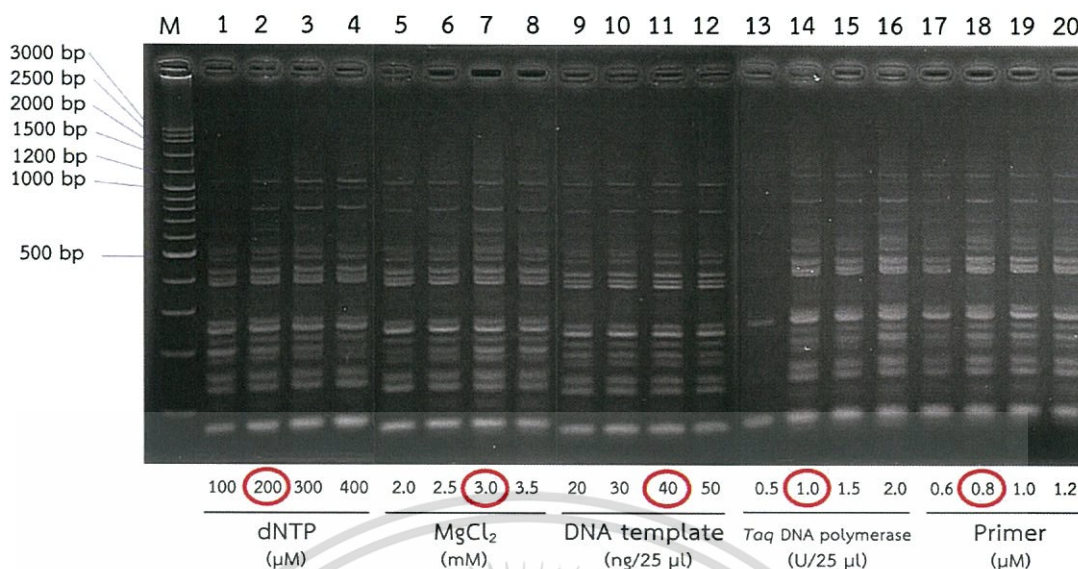
การหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค SRAP โดยทั่วไปจะทำการปรับความเข้มข้นของ สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ dNTP, $MgCl_2$, *Taq* DNA polymerase, ไพรเมอร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งสารเคมีแต่ละตัวล้วนมีความสำคัญต่อปฏิกิริยา PCR โดยอาจจะ ปรับที่ละปัจจัย (Li *et al.*, 2009 ; Xu *et al.*, 2010 ; Sun *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2012) หรือ ปรับที่หลายปัจจัย (Ai *et al.*, 2011 ; Guo *et al.*, 2011) นอกจากนี้ยังมีการปรับอุณหภูมิของ Annealing ช่วงที่ 2 (Li *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2012) ในการศึกษาได้เลือกปรับที่ละปัจจัยและ ไม่ปรับอุณหภูมิของ Annealing ช่วงที่ 2 โดยในการปรับหาความเข้มข้นที่เหมาะสมใช้ไพรเมอร์ Me1/Em1 และตัวอย่าง PP01 แสดงผลดังรูปที่ 4.16

dNTP มีโดยตรงต่อผลิตภัณฑ์ PCR หากความเข้มข้นของ dNTP ต่ำ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ก็จะลดลง แต่ถ้าหากความเข้มข้นของ dNTP สูงเกินไป อาจทำให้เกิดการต่อเบสคู่สมผิดพลาด และอาจจะไปรบกวน Mg^{2+} ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ลดลง (Xu *et al.*, 2010 ; Sun *et al.*, 2011) ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 200, 300 และ 400 ไมโครโมลาร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ แถบดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 600 คู่เบส ขึ้นไปจะไม่ชัดเจน (รูปที่ 4.16 แถวที่ 1-4) จึงเลือกใช้แค่เพียงที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

$MgCl_2$ มีส่วนช่วยให้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ทำงาน และยังมีส่วนช่วยให้ ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างจำเพาะ หากเติมในปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ หากเติมในปริมาณน้อยก็จะส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ลดลง (Li *et al.*, 2009) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.16 แถวที่ 5-8 พบว่าที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ แสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ชัดเจนที่สุด เมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นอื่นๆ ที่ แสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 600 คู่เบส เช่นเดียวกัน แต่จะค่อนข้างจางกว่า ส่วนแถบดีเอ็นเอแถบอื่นๆ ในแต่ละความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์

ไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ในขั้นตอน Annealing และเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สายใหม่ขึ้นในขั้นตอน Extension เป็นขั้นตอนที่สำคัญและมีความจำเพาะในปฏิกิริยา PCR หาก ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่ำ ประสิทธิภาพในการจับกับดีเอ็นเอต้นแบบจะลดลง แถบดีเอ็นเอที่ได้ก็ ลดลง ถ้าความเข้มข้นของไพรเมอร์สูง อาจทำให้เกิดการจับตัวกันของไพรเมอร์ (Primer dimer) และ อาจเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (Sun *et al.*, 2011) ผลการทดลอง (รูปที่ 4.16 แถวที่ 9-12) พบว่า ที่ความเข้มข้น 0.6 ไมโครโมลาร์ ให้ผลแถบดีเอ็นเอจางกว่าที่ความเข้มข้น 0.8, 1.0 และ 1.2 ไมโครโมลาร์ เล็กน้อย แต่ที่ความเข้มข้น 0.8, 1.0 และ 1.2 ไมโครโมลาร์ ต่างก็ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่าง

เหมือนกันอย่างชัดเจน จึงเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ ญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 ผลจากการปรับความเข้มข้นของสารเคมีในปฏิกิริยา PCR ของเทคนิค SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ Me1/Em1 ; M คือ VC 100 bp plus DNA Ladder แถวที่ 1-4, 5-8, 9-12, 13-16 และ 17-20 ปรับความเข้มข้นของ dNTP, MgCl₂, ดีเอ็นเอต้นแบบ, Taq DNA polymerase และไพรเมอร์ ตามลำดับ บนเจลอะกาโรส 3 เปอร์เซ็นต์ ความยาวเจล 6 เซนติเมตร

เอนไซม์ Taq DNA polymerase เป็นส่วนที่สำคัญมากของปฏิกิริยา จากผลการทดลองดังรูปที่ 4.16 แถวที่ 13-16 พบว่าความเข้มข้นเอนไซม์ 0.5 ยูนิตต่อ 25 ไมโครลิตร เกิดจำนวนแถบดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย หากเพิ่มปริมาณเอนไซม์ขึ้นแถบดีเอ็นเอที่ได้ก็ชัดเจนมากขึ้น และเมื่อสังเกตจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาที่ใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 1.0, 1.5 และ 2.0 ยูนิตต่อ 25 ไมโครลิตร พบว่าให้แถบดีเอ็นเอที่มีจำนวนแถบเท่ากัน จึงเลือกใช้เพียง 1.0 ยูนิตต่อ 25 ไมโครลิตร เพื่อเป็นการลดต้นทุน เช่นเดียวกับ dNTP และไพรเมอร์ที่เลือกใช้ที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า

สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.16 แถวที่ 17-20 พบว่าแต่ละความเข้มข้นที่ใช้ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเท่ากัน จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด โดยที่ดีเอ็นเอความเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อ 25 ไมโครลิตร ให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ค่อนข้างชัดเจนกว่าที่ใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้น 20, 30 และ 50 นาโนกรัมต่อ 25 ไมโครลิตร จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบมีผลต่อปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อย ส่วนความเข้มข้นของ MgCl₂, dNTP, ไพรเมอร์ และ Taq DNA polymerase จะมีผลต่อแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมากกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Sun *et al.* (2011) ที่พบว่าดีเอ็นเอต้นแบบมีผลเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ผลการทดลองดังกล่าวยังสามารถยืนยันได้อีกว่าเทคนิค SRAP สามารถทำซ้ำได้และให้ผลเหมือนเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

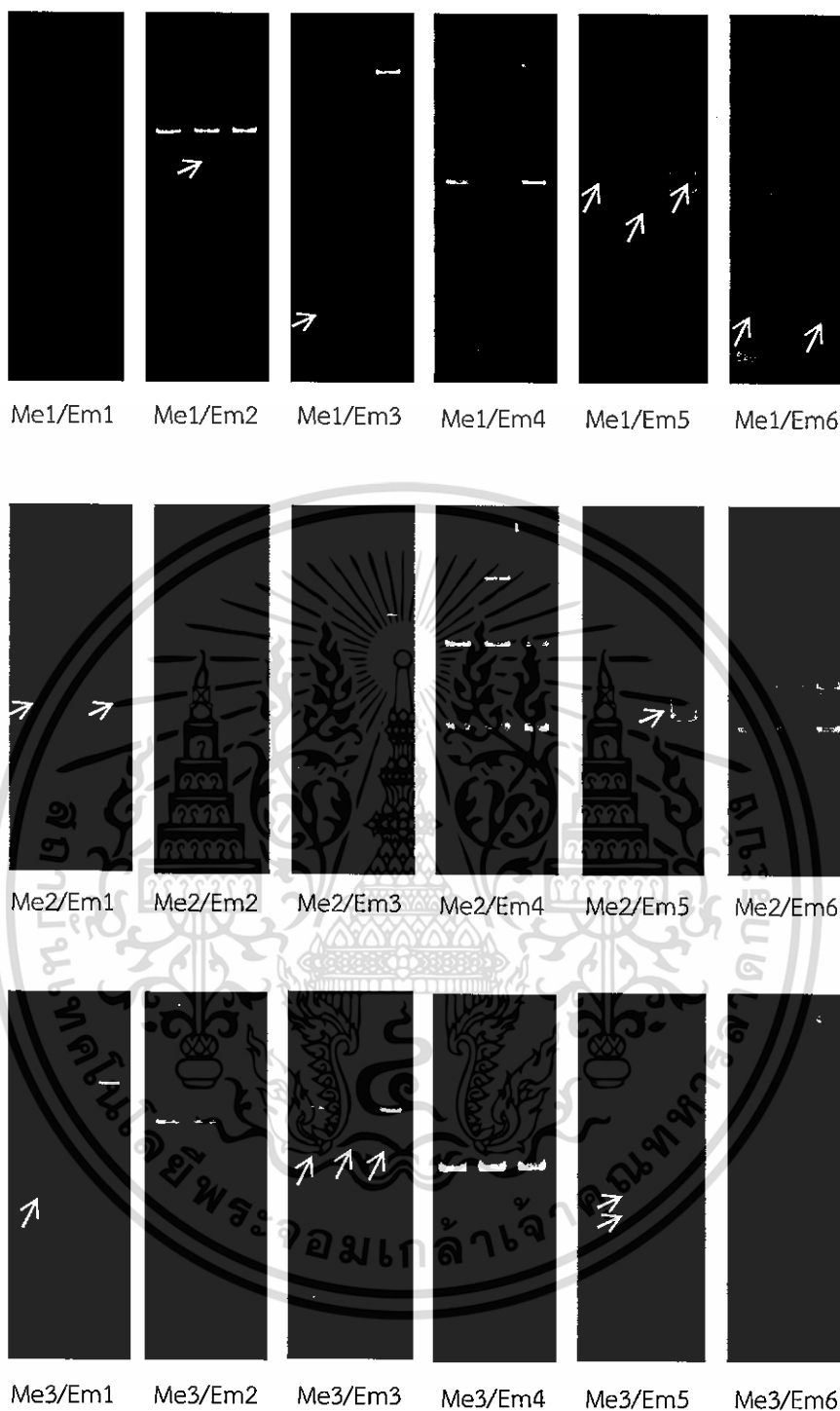
เมื่อได้ความเข้มข้นของสารเคมีแต่ละสารที่เหมาะสม รวมเข้าในปฏิกิริยาเดียวกัน สรุป ตารางที่ 4.14 จากนั้นนำไปใช้ในการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อไป ความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสมสำหรับดีปลาทั้งนี้ ต่างจากความเข้มข้นที่เหมาะสมของการศึกษาในพืชสกุล *Linum* (Li et al., 2009), *Panax ginseng* (Xu et al., 2010), *Lonicera caerulea* (Sun et al., 2011) และพืชสกุล *Cymbidium* (Li et al., 2012) เป็นต้น เนื่องจากจีโนมของพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.14 ความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสมในปฏิกิริยาของเทคนิค SRAP สำหรับ 1 ตัวอย่าง

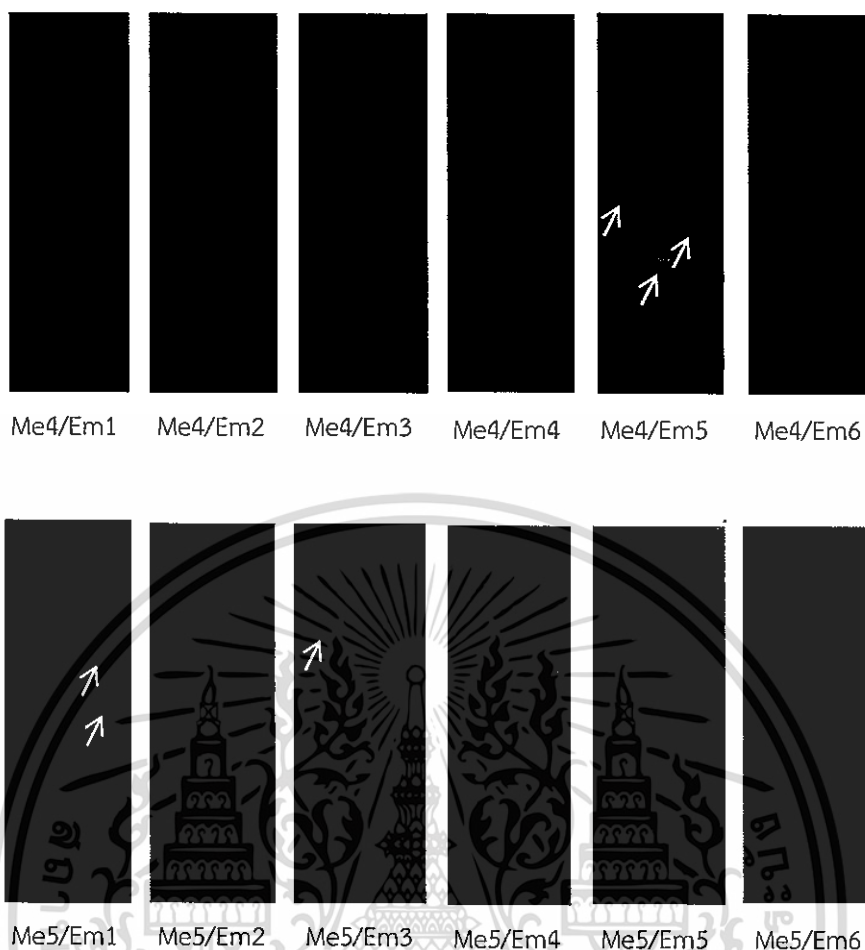
สารเคมี	Stock	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Standard Taq reaction buffer	10X	2.5	1X
dNTP	1.25 mM	4	200 µM
MgCl ₂	50 mM	1.5	3.0 mM
Forward primer	20 µM	1	0.8 µM
Reverse primer	20 µM	1	0.8 µM
Taq DNA polymerase	5000 U/ml	0.2	1 U/25 µl
DNA template	20 ng/µl	2	40 ng/25 µl
DI water		12.8	
ปริมาตรรวม		25	

4.7.2 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR ของเทคนิค SRAP ตารางที่ 4.14 นำมาใช้ คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ โดยทดสอบกับตัวอย่างดีปลาทั้งจำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ PP01, PP05 และ PP07 ได้ผลดังรูปที่ 4.17-4.18 พบว่าไพรเมอร์ทุกคู่สามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอของดีปลาทั้งทุกตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบได้ และยังพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละ คู่ไพรเมอร์ส่วนใหญ่มีความชัดเจน โดยมีทั้งคู่ไพรเมอร์ที่สามารถและไม่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่ แตกต่าง (Polymorphic band) ซึ่งคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่จะเลือกจะเป็นคู่ไพรเมอร์ที่แสดงแถบ ดีเอ็นเอที่ชัดเจน สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอเหมาะสม ไม่มาก จนเกินไป แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างดังลูกศรสีขาวชี้ในรูปที่ 4.17-4.18 โดยคู่ไพรเมอร์ที่เลือกจำนวน 7 คู่ ได้แก่ Me1/Em2, Me1/Em5, Me2/Em5, Me3/Em3, Me3/Em5, Me4/Em5 และ Me5/Em1



รูปที่ 4.17 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไฟรเมอร์ Me1/Em1-Em6, Me2/Em1-Em6 และ Me3/Em1-Em6 กับตัวอย่าง PP01, PP05 และ PP07 เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา ในแต่ละคู่ไฟรเมอร์



รูปที่ 4.18 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพโรเมอร์ Me4/Em1-Em6 และ Me5/Em1-Em6 กับตัวอย่าง PP01, PP05 และ PP07 เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา ในแต่ละคู่ไพโรเมอร์

4.7.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ผลจากไพโรเมอร์ทั้ง 7 คู่ แสดงดังตารางที่ 4.15 ได้แถบทั้งหมดจำนวน 126 แถบ ซึ่งแถบที่ได้มีอยู่ในช่วง 50-3000 คู่เบส โดยเป็น polymorphic band 59 แถบ คิดเป็น 46.82 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่า Shao *et al.* (2010) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเบญจมาศได้ polymorphic band 81.87 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ Liao *et al.* (2012) ใน *Prunella vulgaris* ได้ polymorphic band 87.93 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ Xu *et al.* (2013) ในปอแก้ว (*Hibiscus cannabinus* L.) ได้ polymorphic band คิดเป็น 75.4 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.15 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเทคนิค SRAP จากไพรเมอร์ที่เหมาะสม

Primer	Total amplified band	Total polymorphic band	% Polymorphic band
Me1/Em2	13	7	53.85
Me1/Em5	14	8	57.14
Me2/Em5	21	5	23.81
Me3/Em3	12	1	8.33
Me3/Em5	19	9	47.37
Me4/Em5	26	17	65.39
Me5/Em1	21	12	57.14
Total	126	59	46.82

จากการแปลผลแถบที่ได้จากเทคนิค SRAP นำมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน Jaccard's coefficient (ตารางที่ 4.16) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.693-1.000 จากนั้นวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยโปรแกรม NTSYSpc version 2.10m แสดงผลในรูปแบบของเดนโดรแกรม ดังรูปที่ 4.19 พบว่าตัวอย่างดีปลากั้งรวมเป็นกลุ่มเดียวกันที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.75 ไม่แยกกลุ่มออกจากกันอย่างชัดเจน ถึงแม้จะมาจากต่างภูมิภาคดังเช่นตัวอย่าง PP12 จากจังหวัดเชียงใหม่ PP13 จากจังหวัดนครพนม และ PP14 จากจังหวัดชลบุรี แต่พบว่าพันธุกรรมมีความใกล้เคียง แสดงว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีปลากั้งไม่สัมพันธ์กับภูมิภาคของแหล่งที่เก็บ อาจเนื่องมาจากดีปลากั้งเกิดการผสมภายในดอกเดียวกัน หรือ ผสมคนละดอกภายในต้นเดียวกัน (Self pollination) และการขยายพันธุ์สามารถทำได้ง่ายโดยการปักชำ ซึ่งจะทำให้พันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ผลการวิเคราะห์จึงรวมเป็นกลุ่มเดียวกัน โดยตัวอย่างที่แสดงให้เห็นชัดเจน คือ PP12 และ PP13 มีค่า Jaccard's coefficient เท่ากับ 1.000 ซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่างต่างมาจากร้านจำหน่ายต้นไม้ มีความเป็นไปได้ว่าร้านจำหน่ายต้นไม้แต่ละร้านนำต้นดีปลากั้งมาจากแหล่งเดียวกันแล้วนำไปจำหน่าย หรืออาจเป็นไปได้ว่าร้านจำหน่ายร้านหนึ่งซื้อมาจากอีกร้านหนึ่งแล้วนำมาจำหน่ายต่อ โดยดีปลากั้งที่นำมาจำหน่ายนั้นอาจมาจากการปักชำ

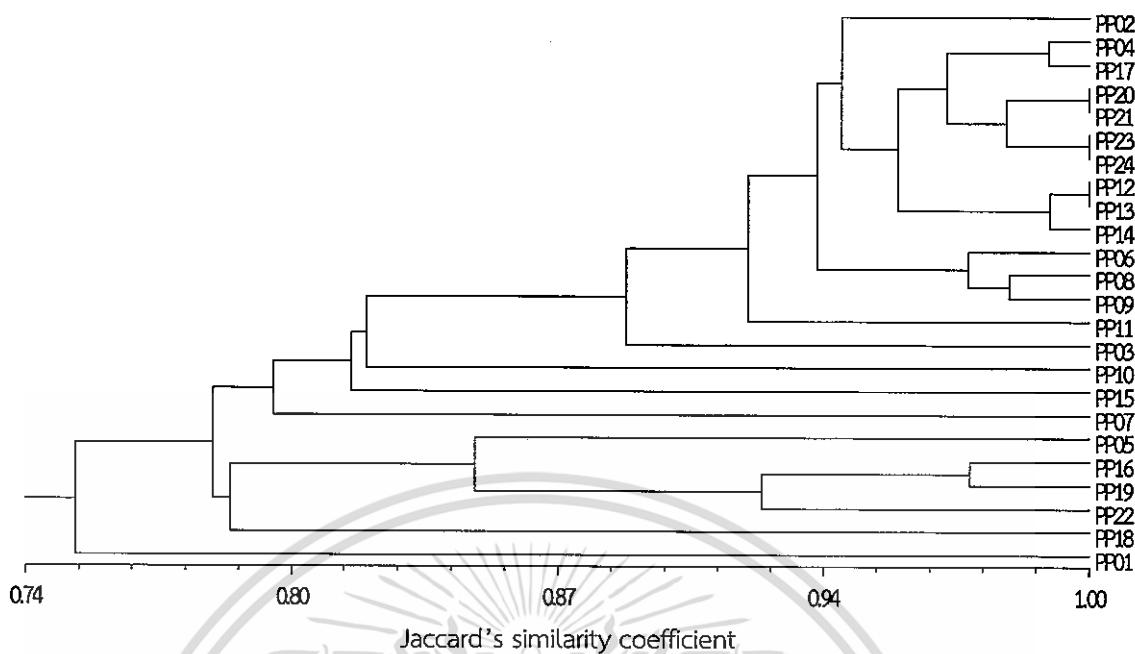
จากผลการศึกษา พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Latta *et al.* (2008) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) เป็นพืชที่จัดอยู่ในเผ่าย่อย Andrographinae ซึ่งเป็นเผ่าย่อยเดียวกับดีปลากั้ง จำนวน 53 ตัวอย่าง เก็บจากภาคต่างๆ ในประเทศอินเดีย ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าสามารถแยกกลุ่มของฟ้าทะลายโจร แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับภูมิภาคของแหล่งที่เก็บ และ Wijarat *et al.* (2012) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฟ้าทะลายโจรโดยศึกษาจำนวน 58 ตัวอย่าง จากภาคต่างๆ ของประเทศไทย ด้วย

เทคนิค Simple sequence repeats (SSR), AFLP และ RAPD พบว่ามีค่า Jaccard's coefficient คำนวณว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วง 0.978-1.000, 0.927-1.000 และ 0.809-1.000 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่าฟ้าทะลายโจรรวมเป็นกลุ่มเดียวกัน ไม่แยกออกเป็นกลุ่มอย่างชัดเจน แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กับภูมิภาคของแหล่งที่เก็บ และ Minz *et al.* (2013) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฟ้าทะลายโจรจำนวน 24 ตัวอย่าง จากสถานที่ต่างๆ ในภูมิภาค Chhattisgarh ของประเทศอินเดีย ด้วยเทคนิค RAPD พบว่าฟ้าทะลายโจรแยกเป็นกลุ่ม แต่ไม่สัมพันธ์กับแหล่งที่เก็บเช่นเดียวกัน นอกจากนี้การศึกษาของ Tiwari *et al.* (2016) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฟ้าทะลายโจรที่เก็บจากภูมิภาคต่างๆ ในประเทศอินเดีย จำนวน 39 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RAPD, ISSR, Start codon targeted polymorphism (SCoT) และ CAAT box derived polymorphism (CBDP) ผลจากทั้ง 4 เทคนิค พบว่ามีค่า Jaccard's coefficient ในช่วง 0.59-1.00, 0.58-1.00, 0.70-0.96 และ 0.65-1.00 ตามลำดับ วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับภูมิภาคที่เก็บ เมื่อวิเคราะห์ Analysis of molecular variance (AMOVA) พบความแตกต่างของฟ้าทะลายโจรระหว่างแต่ละภูมิภาคเพียง 2-10 เปอร์เซ็นต์ แต่ความแตกต่างของฟ้าทะลายโจรภายในภูมิภาคเดียวกัน 90-98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการถ่ายเทยีน (Gene flow) ระหว่างประชากรเป็นแบบ Cross pollination แต่ในความเป็นจริงโดยธรรมชาติของฟ้าทะลายโจรจะเกิดการผสมภายในดอกเดียวกัน หรือ ผสมคนละดอกในต้นเดียวกัน มีเพียงประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ ที่เกิดจากการผสมโดยแมลงผสมเกสร (Insect pollinators) เหตุผลที่ทำให้เกิดการถ่ายเทยีนแบบนี้ อาจเกิดขึ้นจากมนุษย์ที่แลกเปลี่ยนฟ้าทะลายโจรระหว่างแต่ละพื้นที่กัน เนื่องจากฟ้าทะลายโจรเป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญ ในทำนองเดียวกันดีปลากั้งอาจเกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย ผลการวิเคราะห์จึงไม่สัมพันธ์กับภูมิภาคของแหล่งที่เก็บ

ตารางที่ 4.16 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน Jaccard's coefficient ของตัวอย่างตีปลากั้ง

	PP01	PP02	PP03	PP04	PP05	PP06	PP07	PP08	PP09	PP10	PP11	PP12	PP13	PP14	PP15	PP16	PP17	PP18	PP19	PP20	PP21	PP22	PP23	PP24	
PP01	1.000																								
PP02	0.785	1.000																							
PP03	0.794	0.912	1.000																						
PP04	0.757	0.941	0.902	1.000																					
PP05	0.759	0.736	0.750	0.726	1.000																				
PP06	0.764	0.931	0.902	0.951	0.748	1.000																			
PP07	0.780	0.806	0.804	0.826	0.780	0.817	1.000																		
PP08	0.759	0.941	0.874	0.961	0.743	0.971	0.827	1.000																	
PP09	0.773	0.941	0.892	0.942	0.757	0.970	0.826	0.980	1.000																
PP10	0.775	0.784	0.772	0.836	0.728	0.827	0.733	0.838	0.820	1.000															
PP11	0.743	0.904	0.825	0.906	0.713	0.879	0.779	0.907	0.888	0.821	1.000														
PP12	0.768	0.951	0.874	0.971	0.722	0.924	0.820	0.952	0.933	0.830	0.934	1.000													
PP13	0.768	0.951	0.874	0.971	0.722	0.924	0.820	0.952	0.933	0.830	0.934	1.000	1.000												
PP14	0.775	0.941	0.883	0.961	0.728	0.914	0.827	0.943	0.924	0.838	0.925	0.990	0.990	1.000											
PP15	0.741	0.800	0.800	0.821	0.774	0.846	0.745	0.840	0.838	0.789	0.822	0.798	0.798	0.806	1.000										
PP16	0.719	0.775	0.752	0.827	0.867	0.802	0.802	0.813	0.795	0.781	0.796	0.805	0.805	0.813	0.796	1.000									
PP17	0.748	0.950	0.912	0.990	0.717	0.941	0.817	0.951	0.932	0.827	0.914	0.961	0.961	0.951	0.829	0.818	1.000								
PP18	0.693	0.748	0.730	0.784	0.723	0.775	0.728	0.786	0.768	0.770	0.818	0.779	0.779	0.786	0.785	0.809	0.791	1.000							
PP19	0.713	0.768	0.728	0.804	0.858	0.779	0.779	0.789	0.772	0.774	0.805	0.814	0.814	0.821	0.789	0.971	0.795	0.818	1.000						
PP20	0.732	0.931	0.891	0.970	0.702	0.922	0.800	0.933	0.913	0.827	0.933	0.961	0.961	0.951	0.829	0.802	0.980	0.791	0.795	1.000					
PP21	0.732	0.931	0.891	0.970	0.702	0.922	0.800	0.933	0.913	0.827	0.933	0.961	0.961	0.951	0.829	0.802	0.980	0.791	0.795	1.000	1.000				
PP22	0.743	0.841	0.798	0.844	0.824	0.818	0.802	0.813	0.795	0.789	0.862	0.855	0.855	0.862	0.806	0.915	0.852	0.809	0.925	0.852	0.852	1.000			
PP23	0.739	0.930	0.891	0.950	0.708	0.941	0.782	0.932	0.913	0.835	0.932	0.942	0.942	0.932	0.837	0.793	0.960	0.789	0.786	0.980	0.980	0.852	1.000		
PP24	0.739	0.930	0.891	0.950	0.708	0.941	0.782	0.932	0.913	0.835	0.932	0.942	0.942	0.932	0.837	0.793	0.960	0.789	0.786	0.980	0.980	0.852	1.000	1.000	



รูปที่ 4.19 เดนโดแกรมของตีปลากั้งจากเทคนิค SRAP วิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA

ดังนั้น ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตีปลากั้งในประเทศไทย เมื่อศึกษาด้วยเทคนิค SRAP ซึ่งมักจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนสำคัญขึ้น พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ รวมเป็นกลุ่มเดียวกันที่ค่า Jaccard's coefficient เท่ากับ 0.75 จึงมีความเป็นไปได้ว่าหากรับประทานตีปลากั้งที่มาจากต่างภูมิภาคกันในประเทศไทย อาจจะได้รับสารสำคัญที่พบได้ในตีปลากั้งเหมือนกัน เพียงแต่อาจได้รับในปริมาณแตกต่างกัน ดังเช่นการศึกษาของ Jongrungruangchok *et al.* (2014) ได้ศึกษาคุณค่าทางอาหารและแร่ธาตุในใบตีปลากั้งที่เก็บมาจาก 6 จังหวัด ในประเทศไทย ได้แก่ เชียงใหม่ น่าน แพร่ พะเยา เพชรบูรณ์ และกรุงเทพฯ แล้วพบว่าความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใย และคาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุโพแทสเซียม แคลเซียม เหล็ก โซเดียม แมกนีเซียม และโครเมียมในใบตีปลากั้งจากแต่ละจังหวัดมีความแตกต่างกันในทางสถิติ และการศึกษาของ Latto *et al.* (2008) ตรวจสอบปริมาณ Andrographolide สารสำคัญในฟ้าทะลายโจร ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าปริมาณ Andrographolide ในฟ้าทะลายโจรที่เก็บจากภาคต่างๆ ในประเทศอินเดีย 53 ตัวอย่าง มีปริมาณแตกต่างกันไป

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง ตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น พบสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต อัลคาลอยด์ สารประกอบฟีนอลิก คูมาริน และมีไตรเทอร์ปีน ไตรเทอร์ปีน และสเตอรอยด์ จากนั้นตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีปริมาณเท่ากับ 27.56 ± 0.90 mgGAE/g extract เมื่อตรวจสอบฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ พบว่ามีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ และตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเพียงเล็กน้อยกับเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 จากนั้นตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ HepG2, HT-29, KB และ MCF-7 แต่ในขณะเดียวกันยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero ซึ่งเป็นเซลล์ปกติที่ใช้ศึกษาด้วยเช่นกัน จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS พบองค์ประกอบทางเคมี 22 ชนิด โดยเป็นสารที่ทราบโครงสร้างจำนวน 11 ชนิด ซึ่งในสาร 11 ชนิด ประกอบด้วยสารที่น่าสนใจจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ 2,4-di-tert-butylphenol (2,4-DTBP) และ Squalene

จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดเมทานอลจากใบตีปลากั้ง พบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพและมีสารที่น่าสนใจ จึงศึกษาต่อโดยสกัดด้วยเทคนิค Liquid-liquid extraction โดยเพิ่มความเข้มข้นของตัวละลาย ทำให้สามารถสกัดแยกสารได้ตามความเข้มข้นของตัวทำละลาย ได้สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทน (DE) เอทิลอะซิเตท (EE) บิวทานอล (BE) และน้ำ (AE) เมื่อตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าสารสกัด EE มีปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 55.05 ± 3.40 mgGAE/g extract นอกจากนี้ได้ตรวจสอบอัลคาลอยด์ในเชิงคุณภาพ พบว่าในสารสกัดชั้นต่างๆ ยกเว้นสารสกัด AE นั้นมีสารกลุ่มอัลคาลอยด์เป็นส่วนประกอบ จากนั้นทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัด EE มีฤทธิ์สูงที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 730.28 และ 628.39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เทียบกับค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทเรลล็อกซ์ จากวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดนั้นมีฤทธิ์น้อยกว่าโทเรลล็อกซ์ประมาณ 27.19 และ 19.89 เท่า ตามลำดับ และเมื่อเทียบความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ กับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก พบว่าสารสกัด EE มีความสามารถสูงที่สุด มีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ เท่ากับ 19.89 ± 0.95 mgAAE/g extract จากนั้นตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียพบว่าสารสกัด BE มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *M. luteus* ATCC 9341 มากกว่าสารสกัดชั้นอื่นๆ และเมื่อตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารสกัด DE มีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงที่สุดกับทุกเซลล์ที่ใช้ในการศึกษา จากผลในการศึกษานี้พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ แต่ไม่สัมพันธ์กับ

เอกสารฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและความเป็นพิษต่อเซลล์เท่านั้น และยังพบว่าฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ ค่าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และความเป็นพิษต่อเซลล์ ต่างไม่มีความสัมพันธ์ต่อกัน จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC/MS เฉพาะในสารสกัด DE เนื่องจากที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด DE มีความเป็นขี้ด้าและสามารถระเหยได้ง่าย ผลการวิเคราะห์พบองค์ประกอบทางเคมี 21 ชนิด โดยเป็นสารที่ทราบโครงสร้างจำนวน 13 ชนิด ซึ่งยังคงพบ 2,4-DTBP และ Squalene อยู่ในสารสกัด นอกจากนี้ยังพบสารที่น่าสนใจเพิ่มเติม ได้แก่ Neophytadiene และ Phytol ซึ่งสารเหล่านี้ อาจเป็นส่วนหนึ่งที่ส่งผลให้สารสกัด DE มีฤทธิ์ต่างๆ จากนั้นจึงได้เลือกเฉพาะสารสกัด DE มาแยกสารด้วยเทคนิคคอลัมน์ โครมาโทกราฟี เนื่องจากใช้เพียงคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ Normal phase แต่ในส่วนของสารสกัด EE และ BE อาจจำเป็นต้องใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ Reversed-phase หรือแบบ Size-exclusion เพราะสารมีความเป็นขี้ด้าสูง

จากการแยกสารสกัด DE ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารสกัดส่วนย่อย 11 ส่วนย่อย (DF1-DF11) ซึ่งสารสกัดส่วนย่อยที่แยกได้มีปริมาณสารค่อนข้างน้อย และในสารสกัดส่วนย่อย DF8-DF11 นั้นซิลิกาเจลสะปอนออกมาจากคอลัมน์ด้วย จึงเลือกทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TLC Bioautography พบว่าสารสกัดส่วนย่อย DF7-DF11 มีสารที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH สังเกตได้จากจุดสีเหลืองที่ปรากฏบนพื้นสีม่วงบนแผ่น TLC หลังจากสเปรย์ด้วยสารละลาย DPPH และตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์กับสารสกัด DF1-DF7 พบว่าในเซลล์ KB กับ HT-29 สารสกัดส่วนย่อยต่างๆ มีความเป็นพิษเพียงเล็กน้อย ต่างจากผลของสารสกัด DE อาจเป็นผลจากสารสกัดส่วนย่อยแต่ละสารนั้นออกฤทธิ์ร่วมกัน หากแยกสารออกจากกันจึงทำให้มีพิษต่อเซลล์เพียงเล็กน้อย ส่วนการทดสอบในเซลล์ MCF-7, HepG2 และ Vero พบว่าสารสกัดส่วนย่อย DF1 มีเปอร์เซ็นต์ความพิษต่อเซลล์สูงสุด ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดส่วนย่อย DF1 และ DF7 มาวิเคราะห์ GC/MS พบสารที่น่าสนใจเพิ่มเติม โดยในสารสกัดส่วนย่อย DF1 พบสารที่น่าสนใจ ได้แก่ 2,4-DTBP, Squalene และ α -Pinene ส่วนในสารสกัดส่วนย่อย DF7 พบสารที่น่าสนใจ ได้แก่ 2,4-DTBP, Phytol, Neophytadiene, Dihydroactinidiolide, Isololiolide และ Loliolide

ส่วนการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตีปลากั้งในประเทศไทยด้วยเทคนิค SRAP พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ ความเป็นกลุ่มเดียวกัน ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน Jaccard's coefficient เท่ากับ 0.75 อาจเนื่องจากการขยายพันธุ์ของตีปลากั้งนั้นสามารถทำได้ง่าย โดยการปักชำ และเกิดการผสมภายในดอกเดียวกัน หรือ คนละดอกภายในต้นเดียวกัน ซึ่งจะทำให้พันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย จึงเป็นไปได้ว่าหากรับประทานตีปลากั้งที่ต่างภูมิภาคกันในประเทศไทย อาจจะได้รับสารสำคัญที่พบได้ในตีปลากั้งเหมือนกัน เพียงแต่ได้รับในปริมาณสารสำคัญไม่เท่ากัน

5.2 ข้อเสนอแนะ

นอกจากฤทธิ์ทางชีวภาพที่ศึกษาในการศึกษานี้ ยังมีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ ที่น่าสนใจนำมาศึกษาเพิ่มเติม เช่น ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาทั้งหมดเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นภายในหลอดทดลอง บอกได้เพียงว่าสารสกัดนั้นมีแนวโน้มเป็นอย่างไร มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ได้หรือไม่ อาจจะต้องนำไปศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลองและด้านอื่นๆ ก่อนที่จะใช้เป็นยารักษาโรค

จากการศึกษาในสารสกัดจากใบตึปลาทั้ง พบว่ามีศักยภาพที่จะสามารถนำไปพัฒนาไปเป็นยาได้ โดยในสารสกัดตรวจพบสารที่น่าสนใจ 8 ชนิด ด้วยเทคนิค GC/MS ได้แก่ 2,4-DTBP, Squalene, Neophytadiene, Phytol, α -Pinene, Dihydroactinidiolide, Isololiolide, และ Loliolide ซึ่งอาจมีสารสำคัญที่น่าสนใจมากกว่าที่ตรวจพบในการศึกษานี้ เนื่องจากสารสกัดชั้นเอทิลอะซิเตท ชั้นบิวทานอล ชั้นน้ำ และสารสกัดส่วนย่อยอื่นๆ ยังไม่ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม และในการวิเคราะห์สารสกัดชั้นไดคลอโรมีเทนวิเคราะห์เพียงเทคนิค GC/MS ซึ่งมีข้อจำกัดบางประการ ไม่สามารถวิเคราะห์สารที่เป็นองค์ประกอบได้ทั้งหมด จึงมีความน่าสนใจศึกษาวิเคราะห์หาสารสำคัญ หรือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากใบตึปลาทั้งทั้งหมด ด้วยเทคนิคอื่นๆ เพิ่มเติมต่อไป

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ หรือศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณตำแหน่งยีนต่างๆ หรือเพิ่มจำนวนตัวอย่างพืชให้มากขึ้น เพื่อเพิ่มความแม่นยำของข้อมูล และอาจนำมาศึกษาเปรียบกับฤทธิ์ทางชีวภาพของตัวอย่างแต่ละตัวอย่างที่มาจากแต่ละแหล่ง เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ที่แน่นอนระหว่างข้อมูลด้านพันธุกรรมกับฤทธิ์ทางชีวภาพ

เอกสารอ้างอิง

กมลวรรณ ศรีปลั่ง. 2552. “การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของดีปลาแห้ง.” โครงการวิจัยเฉลิมพระเกียรติ เนื่องในโอกาสพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมพรรษา 82 พรรษามหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.

ภรรณิกา เหล่านิพนธ์, พฤษววรรษ หลอดเข็ม และวริศรา แสงงาม. 2556. “การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุลห้อมช้าง (*Phlogacanthus* Nees).” โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ. 2550. ความรู้พื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ = Basic Knowledge in Animal Cell Culture. นครปฐม : มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์.

ขจรศักดิ์ วรประทีป, สุภาวดี เพชรโคตร, อุไรรัตน์ กาญจนขุนดี, ปิยรัชฎ์ เจริญทรัพย์ และพรชัย จุฑามาศ. 2554. “พืชวงศ์เหียงอกปลาหมอในศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืช อพ.สธ. คลองไผ่ จังหวัดนครราชสีมา.” หน้า 613-620. ใน การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย : ก้าวสู่โลกกว้างอย่างมั่นใจ. นครราชสีมา : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน.

ชนิษฐา มีประดิษฐ์, อรษา ชัยชุมพร, ไฉน น้อยแสง, สิริภัทร ชมัตมพงษ์ และยุพา คงพริก. 2558. “ภูมิปัญญาการรักษาและการใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรของหมอพื้นบ้านในชุมชนเขตพื้นที่วัดพระธาตุผาเงา อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย.” หน้า 73-81. ใน การประชุมวิชาการระดับชาติการแพทย์แผนไทย ครั้งที่ 1. สงขลา : คณะการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.). 2556. รายงานผลการดำเนินงานของหน่วยงาน ที่ร่วมสนองพระราชดำริ อพ.สธ. ประจำปีงบประมาณ 2556. เล่มที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี.

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.). 2558. รายงานการดำเนินงานเจ้าหน้าที่ อพ.สธ. ประจำปี 2558. เล่มที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี.

งานการแพทย์แผนไทย จังหวัดอุดรธานี. 2553. รายงานความก้าวหน้าโครงการสำรวจ ศึกษาสมุนไพรในเขตอนุรักษ์ ภูมิศึกษา เขตอุทยานแห่งชาติ นานูง-น้ำโสม ตำบลนาูง อำเภอ

นางยง จัหวัดอุตรธานี. [Online]. Available : <https://sites.google.com/site/ttmudon/ngankar-phaethy-phaen-thiy-1/phl-ngan/phl-ngan-tam-pingbpraman/pi2553/smumphir-na-yung>.

จันทร์ทิรา เจียรณย์, ณัฐจิตา เพชรประไพ, นรีลักษณ์ สุวรรณโณบล และศรีัญญา จุฬารี่. 2556. รายงานการวิจัยการศึกษาภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย การผดุงครรภ์แผนไทย และการใช้สมุนไพรของหมอฟันบ้าน : กรณีศึกษาหมอฟันบ้านรอบเขตพื้นที่เขื่อนน้ำพุง จังหวัดสกลนคร. นครราชสีมา : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554. “อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ: แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา.” *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์*. 1(1) : 59-70.

ชูศรี ไตรสนธิ และปรีทรศน์ ไตรสนธิ. 2554. “พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของชาวลัวะและชาวลีบนโดยภาค จังหวัดน่าน.” *วารสารพฤกษศาสตร์ไทย*. 3(2) : 163-185.

ไชยวัฒน์ ไชยสุด, สุนีย์ จันทร์สากว, เจริญพงษ์ แตรผ่องแผ้ว, ประสิทธิ์ สุวรรณเลิศ, เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม, สารพจัน ภิระจันทร์ และชุตินันท์ ประสิทธิ์ปฏิริษา. 2555. ความสามารถในการต้านออกซิเดชันและป้องกันการทำลายดีเอ็นเอของพืชผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทยบางชนิด. เชียงใหม่ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ดลรัชต์ สุดหล้า, ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก, พิเชษฐ์ศักดิ์ ศรีวงศ์, พินิจ หวังสมนึก, สนั่น จอกลอย และอารันต์ พัฒโนทัย. 2553. “ความหลากหลายของแก่นตะวันจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SRAPs.” หน้า 476-481. ใน การประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 11 ประจำปี 2553 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น : คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นงคราญ ร่มคำ และปรีชญา ศรีสง่า. 2553. ความหลากหลายของผักพื้นบ้าน ในท้องที่อำเภอแม่ทา จังหวัดลำพูน. [Online]. Available : http://www.qsbg.org/database/article/showarticle.asp?Art_ID=67.

นที เมืองเย็น. 2556. “พฤกษศาสตร์พื้นบ้านของไทยและลาวในอำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เบญจมาศ จิตรสมบุญ. 2553. การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพืชวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน. นครราชสีมา : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ปณาลี ภูวรัถชัย, สราวุฒิ เกตุแก้ว, เขมวรรณ ศรีตงกิม, บุปผา คงสมัย และอัญมณี อาวุชานนท์. 2555. “การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SRAP และลักษณะคุณภาพผลของฟักทองพันธุ์การค้าของไทยบางพันธุ์.” หน้า 1100-1106. ใน การประชุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ประสาทร บิริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญจนบุตร และสาธิต พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. “การทดสอบฤทธิ์ด้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ.” หน้า 91-101. ใน การประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มข. ครั้งที่ 9. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ประทีป ปัญญาดี. 2555. “ความหลากหลายของพืชในสวนครัวของชุมชนไทยใหญ่ ในอำเภอปางมะผ้า จังหวัดแม่ฮ่องสอน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปรัชญา ศรีสง่า. ม.ป.ป. อนุรักษ์มิชานพืช. [Online]. Available : http://region6.cbo.moph.go.th/it_chonburi/attach/news_1428476417_003.pdf.

ผู้จัดการออนไลน์. 2557. สูดยอดผักสุขภาพ เครื่องเคียงลาบ-น้ำตก. [Online]. Available : <http://www.manager.co.th/GoodHealth/ViewNews.aspx?NewsID=9570000148628&Html=1&CommentReferID=25887670&CommentReferNo=1&>.

ฝ่ายเผยแพร่การใช้น้ำชลประทาน. 2558. “ท่องเที่ยว ชมพันธุ์ไม้ภายในสถานีทดลองฯ.” *วารสารข่าวเกษตรชลประทาน*. 19(73) : 23-30.

พรรณนีย์ วิชชาชู. 2553. “ศูนย์รวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์กรรมพืชพรรณไทย.” *น.ส.พ. กลีกร*. 83(1) : 85-94.

พานี ศิริสะอาด. 2553. การใช้สมุนไพรในวัฒนธรรมล้านนา. [Online]. Available: <https://www.facebook.com/notes/ตำรับยา-ตำรายไทย/การใช้สมุนไพรในวัฒนธรรมล้านนา/152595871441198>.

ยิ่งยง ไพบูลย์ศานติวัฒนา, โอฟาร ตันตวิรุฬห์, วีระศรี เมฆตรง และจักรพงษ์ รัตตะมณี. 2552. “สถานภาพและการใช้ประโยชน์จากพืชพื้นเมืองในเขตพื้นที่ศูนย์ภูฟ้าพัฒนา.” หน้า 554-561. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 : สาขาพืช. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัตนา อินทรานุกุล. 2550. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากพืชสมุนไพร. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัศมี สุวรรณวิระกำธร และอริรัช ราชเจริญ. 2553. “คุณลักษณะของความหลากหลายทางชีวภาพและการเปลี่ยนแปลงการใช้ประโยชน์ที่ดิน บริเวณพื้นที่ลุ่มน้ำสงครามตอนล่าง โดยใช้ข้อมูลภาพถ่ายจากดาวเทียม.” หน้า 45-68. ใน สัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่อง ก้าวไกลกับเทคโนโลยีอวกาศดาวเทียม THEOS และภูมิสารสนเทศเพื่อการพัฒนา. ขอนแก่น : ศูนย์ภูมิภาคเทคโนโลยีอวกาศและภูมิสารสนเทศ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.

วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล. 2553. “สมุนไพรพื้นบ้านแก้ปวดเมื่อย.” *ไทยเกษตรศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ 5(1) : 1-13.ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วสันต์ ภูพิชิต. 2550. การสำรวจพรรณไม้ที่น่าสนใจที่ทุ่งโนนสนของอุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง. พิษณุโลก : สำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 11 กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

วินัย สมประสงค์, จารุวรรณ จาติเสถียร, พงษ์ศักดิ์ พลตรี, กาญจนา พฤษพันธ์, วิลาสินี จิตต์บรรจง, บดินทร สอนสุภาพ, ปาจริย์ อินทะสุข, ภัทรวิวี พรหมนัส และชัยนาท ชุ่มเงิน. 2555. การศึกษาอนุกรมวิธานและการใช้ประโยชน์ของพืชวงศ์เหงือกปลาหมอในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. [Online]. Available : http://www.doa.go.th/research/files/2270_2555.pdf.

วินัย สมประสงค์, ปราโมทย์ ไตรบุญ, ยุพดี เผ่าพันธุ์, นพรัตน์ ทูลมัลย์ และภัทรวิวี พรหมนัส. 2554. “ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์พืชสกุลห้อมช้าง (*Phlogacanthus* Nees) ในประเทศไทย.” *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 42(2)(พิเศษ) : 656-658.

สล่าปู่ (นามแฝง). 2556. วันนี้มีโชค เพราะได้กินลาบ. [Online]. Available : <http://pantip.com/topic/30411161>.

สำนักงานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมจังหวัดอุบลราชธานี. ม.ป.ป. คู่มือการดำเนินงาน โครงการพัฒนาป่าพื้นบ้านแหล่งอาหารชุมชนตามแนวพระราชดำริ. [Online]. Available: <http://123.242.163.1:8050/province/pindicator/data/KMForest/Forest%20development.pdf>.

สุภาภรณ์ ปิติพร. 2558. บันทึกของแผ่นดิน 8 สมุนไพร ชะลอวัย ไกลโรค. พิมพ์ครั้งที่ 1. ปรายจีนบุรี : มูลนิธิโรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร.

Ahmed, R. Sultana, T. Routary, R. Khan, S.H. Shaari, K. Abu Sayeed, M. Mosihuzzaman, M. and Rokeya, B. 2016. “Chemistry and antidiabetic effects of *Phlogacanthus thyriflorus* Nees flowers.” *Natural Products Chemistry & Research*. 4 : 229.

Ahmed, S. Borah, M. and Das, S. 2012. “A comparative study of antibacterial activity of the ethanolic extracts of *Phlogacanthus thyriflorus*, *Hottuynia cordata*, *Curcuma caesia* and *Syzygium jumbos*.” *International Research Journal of Pharmacy*. 3(9) : 282-285.

Ai, P.F. Wu, Y.F. and We, J.F. 2011. “Optimization of SRAP-PCR system of *Triticum aestivum*-based on orthogonal design.” *Agricultural Science & Technology-Hunan*. 12(3) : 366-368.

Alexander, G.B. Heston, W.M. and Iler, R.K. 1954. “The solubility of amorphous silica in water.” *The Journal of Physical Chemistry*. 58(6) : 453-455.

Anderson, T. 1867. “An enumeration of the Indian species of Acanthaceae.” *Journal of the Linnean Society of London, Botany*. 9(39) : 425-454.

- Armania, N. Yazan, L.S. Musa, S.N. Ismail, I.S. Foo, J.B. Chan, K.W. Noreen, H. Hisyam, A.H. Zulfahmi, S. and Ismail, M. 2013. “*Dillenia suffruticosa* exhibited antioxidant and cytotoxic activity through induction of apoptosis and G₂/M cell cycle arrest.” *Journal of Ethnopharmacology*. 146(2) : 525-535.
- Aydin, E. Türkez, H. and Geyikoğlu, F. 2013. “Antioxidative, anticancer and genotoxic properties of α -pinene on N2a neuroblastoma cells.” *Biologia*. 68(5) : 1004-1009.
- Barua, A.K. Biswas, S. Patra, A. Basu, K.A. Pandab, S.K. and Ghosh, A. 1987. “Phloganthoside—a diterpene lactone glucoside from *Phlogacanthus thysiflorus*.” *Phytochemistry*. 26(2) : 491-492.
- Barua, A.K. Chowdhury, M.K. Biswas, S. Das Gupta, C. Banerjee, S.K. Saha, S.K. Patra, A. and Mitra, A.K. 1985. “The structure and stereochemistry of phlogantholide-A, a diterpene from *Phlogacanthus thysiflorus*.” *Phytochemistry*. 24(9) : 2037-2039.
- Belghit, S. Driche, E.H. Bijani, C. Zitouni, A. Sabaou, N. Badji, B. and Mathieu, F. 2016. “Activity of 2,4-Di-*tert*-butylphenol produced by a strain of *Streptomyces mutabilis* isolated from a Saharan soil against *Candida albicans* and other pathogenic fungi.” *Journal of Medical Mycology*. 26(2) : 160-169.
- Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1996. “The ferric reducing ability of plasma as a measure of antioxidant power : The FRAP assay.” *Journal of analytical Biochemistry*. 293 : 70-76.
- Berridge, M.V. Herst, P.M. and Tan, A.S. 2005. “Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction.” *Biotechnology Annual Review*. 11 : 127-152.
- Bich, T.T.N. and Kato-Noguchi, H. 2014. “Isolation and identification of a phytotoxic substance from the emergent macrophyte *Centrostachys aquatic*.” *Botanical Studies*. 55 : 59.
- Blois, M.S. 1958. “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.” *Nature*. 181 : 1199-1200.
- Budak, H. Shearman, R.C. Parmaksiz, I. and Dweikat, I. 2004. “Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs.” *Theoretical and Applied Genetics*. 109 : 280-288.

- Chakravarty, S. and Kalita, J.C. 2012. "Antihyperglycaemic effect of flower of *Phlogacanthus thyrsoiflorus* Nees on streptozotocin induced diabetic mice." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(3) : S1357-S1361.
- Chanu, K.V. Ali, M.A. and Kataria, M. 2012. "Antioxidant activities of two medicinal vegetables: *Parkia javanica* and *Phlogacanthus thyrsoiflorus*." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(1) : 102-106.
- Charles, D.J. 2013. **Antioxidant properties of spices, herbs and other sources.** New York : Springer
- Chawawisit, K. Bhoopong, P. Phupong, W. and Lertcanawanichakul, M. 2015 "2,4-Di-*tert*-butylphenol, the bioactive compound produced by *Streptomyces* sp. KB1." *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5(S3) : 7-12.
- Chen, S. Zhou, J. Chen, Q. Chang, Y. Du, J. and Meng, H. 2013 "Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm by SRAP." *Biochemical Systematics and Ecology*. 50 : 139-146.
- Chen, W. Liu, Y. Li, M. Mao, J. Zhang, L. Huang, R. Jin, X. and Ye, L. 2015. "Anti-tumor effect of α -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest." *Journal of Pharmacological Sciences*. 127(3) : 332-338.
- Chen, W.Q. Xu, B. Mao, J.W. Wei, F.X. Li, M. Liu, T. Jin, X.B. and Zhang, L.R. 2014. "Inhibitory effects of α -pinene on hepatoma carcinoma cell proliferation." *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 15(7) : 3293-3297.
- Cheng, C.H. Zhang, M.Y. Liu, K. Xu, D.P. Duan, J.R. Zhou, Y.F. and Shi, W.G. 2012. "Analysis of genetic diversity of four *Takifugu obscurus* populations using SRAP markers." *Acta Hydrobiologica Sinica*. 36(5) : 858-865.
- Choi, S.J. Kim, J.K. Kim, H.K. Harris, K. Kim, C.J. Park, G.G. Park, C.S. and Shin, D.H. 2013. "2,4-Di-*tert*-butylphenol from sweet potato protects against oxidative stress in PC12 cells and in mice." *Journal of Medicinal Food*. 16(11) : 977-983.
- Choma, I.M. and Grzelak, E.M. 2011. "Bioautography detection in thin-layer chromatography." *Journal of Chromatography A*. 1218(19) : 2684-2691.
- Chotsaeng, N. Laosinwattana, C. Ruangsomboon, S. and Charoenying, P. 2012. "Allelopathic potential of *Phormidium angustissimum*." *Pakistan Journal of Weed Sciences Research*. 18(S) : 159-168.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่นำมาจากวารสาร *Weed Sciences Research*. 18(S) : 159-168. นั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chuah, T.S. Norhafizah, M.Z. Naimah, A.H. and Ismail, B.S. 2016. "Phytotoxic activity of the allelochemical, 2,4-di-*tert*-butylphenol on two selected weed species." *Sains Malaysiana*. 45(6) : 963-967.
- Čiž, M. Čížová, H. Denev, P. Kratchanova, M. Slavov, A. and Lojek, A. 2010. "Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables." *Food Control*. 21 : 518-523.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012. **M02-A11—Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests ; approved standard**. 11th ed. Wayne, Pennsylvania : Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dai, J. Zhu, L. Yang, L. and Qiu, J. 2013. "Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*." *EXCLI Journal*. 12 : 479-490.
- Das, B.K. Al-Amin, M.M. Chowdhury, N.N. Majumder, M.F.U. Uddin, M.N. and Pavel, M.A.M. 2015. "Analgesic, anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Phlogacanthus thysiflorus* leaves." *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 26(2) : 153-159.
- De Los Reyes, M.M. Oyong, G.G. Ng, V.A.S. Shen, C.C. and Ragasa, C.Y. 2016. "Cytotoxic compounds from *Dysoxylum gaudichaudianum* (A. Juss.) Miq." *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 8(4) : 668-674.
- Devi, J. Kotoky, J. and Sarma, T.C. 2012. "Application of leaf extracts of *Phlogacanthus thysiflorus* Nees against some fungi pathogenic to onion (*Allium cepa* L.)." *The Ecoscan : Special issue*. 1 : 393-396.
- Dewanjee, S. Gangopadhyay, M. Bhattacharya, N. Khanra, R. and Dua, T.K. 2015. "Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry." *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 5(2) : 75-84.
- Dharni, S. Sanchita, Maurya, A. Samad, A. Srivastava, S.K. Sharma, A. and Patra, D.D. 2014. "Purification, characterization, and *in vitro* activity of 2,4-Di-*tert*-butylphenol from *Pseudomonas monteilii* PsF84 : Conformational and molecular modeling studies." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(26) : 6138-6146.
- Ding, G. Zhang, D. Ding, X. Zhou, Q. Zhang, W. and Li, X. 2008. "Genetic variation and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium* កាំ

- officinale* based on SRAP analysis.” *Plant Systematics and Evolution*. 276(3) : 149-156.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. “A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues.” *Phytochemical Bulletin*. 9 : 11-15.
- Elkhayat, E.S. 2009. “Cytotoxic and antibacterial constituents from the roots of *Sonchus oleraceus* L. growing in Egypt.” *Pharmacognosy Magazine*. 5(20) : 324-328.
- Evans, W.C. 2002. *Trease and Evans Pharmacognosy*. 15th ed. Edinburgh : W.B. Saunders.
- Farnsworth, N.R. 1966. “Biological and phytochemical screening of plants.” *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55(3) : 225-276.
- Ferriol, M. Pico, B. and Nuez, F. 2004. “Morphological and molecular diversity of a collection of *Cucurbita maxima* landraces.” *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 129 : 60-69.
- Fiyero (นามแฝง). 2556. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ - QSBG. [Online]. Available : <http://akitia.com สวนพฤกษศาสตร์แมริม-qsbg/07/04/2013/>.
- Fried, B. and Sherma, J. 1996. *Practical thin-layer chromatography : A multidisciplinary approach*. New York : CRC Press.
- Fu, L.Z. Zhang, H.Y. Wu, X.Q. Li, H.B. Wei, H.L. Wu, Q.Q. and Wang, L.A. 2010. “Evaluation of genetic diversity in *Lentinula edodes* strains using RAPD, ISSR and SRAP markers.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26(4) : 709-716.
- Ghaneian, M.T. Ehrampoush, M.H. Jebali, A. Hekmatimoghaddam, S. and Mahmoudi, M. 2015. “Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant.” *Environmental Health Engineering and Management Journal*. 2(1) : 13-16.
- Grabarczyk, M. Winska, K. Maczka, W. Potaniec, B. and Aniol, M. 2015. “Loliolide - the most ubiquitous lactone.” *Folia Biologica et Oecologica*. 11(1) : 1-8.
- Guo, C.J. Hou, L.X. Cui, N. and Han, M.L. 2011. “Optimization of SRAP-PCR system for tomato based on orthogonal design.” *China Vegetables*. 1(2) : 48-52.
- Guo, D. Zhang, J. Liu, C. Zhang, G. Li, M. and Zhang, Q. 2012. “Genetic variability and relationships between and within grape cultivated varieties and wild species based on SRAP markers.” *Tree Genetics & Genomes*. 8 : 789-800.

- Han, X. Wang, L. Liu, Z.A. Jan, D.R. and Shu, Q. 2008. "Characterization of sequence-related amplified polymorphism markers analysis of tree peony bud sports." *Scientia Horticulturae*. 115(3) : 261-267.
- Hao, Q. Liu, Z.A. Shu, Q.Y. Zhang, R.E. Derick, J. and Wang, L.S. 2008. "Studies on *Paeonia* cultivars and hybrids identification based on SRAP analysis." *Hereditas*. 145 : 38-47.
- Harborne, J.B. 1998. **Phytochemical methods : A guide to modern techniques of plant analysis.** 3rd ed. London : Chapman & Hall.
- He, C. Pan, Y. Ji, X. and Wang, H. 2012. "Antioxidants : Introduction." 1-22 In Cirillo G. and Iemma, F. (Eds.). **Antioxidant polymers : Synthesis, properties, and applications.** Hoboken : John Wiley & Sons.
- Him, A. Ozbek, H. Turel, I. and Oner, A.C. 2008. "Antinociceptive activity of α -pinene and fenchone." *Pharmacologyonline*. 3 : 363-369.
- Hostettmann, K. and Marston, A. 1995. **Saponins.** Cambridge : Cambridge university press.
- Houghton, P.J. and Raman, A. 1998. **Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts.** 1st ed. London : Chapman & Hall.
- Hu, D. Zhang, P. Hao, W. Sun, Y. Wang, Z. and Chen, C. 2015. "SRAP analysis on the genetic relationships of 24 mulberry (*Morus* L.) accessions in the lower regions of the Yellow river." *Genetic Resources and Crop Evolution*. 62 : 13-19.
- Huang, Z.R. Lin, Y.K. and Fang, J.U. 2009. "Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds : Potential uses in cosmetic dermatology." *Molecules*. 14 : 540-554.
- Ilham, S. Ali, M.S. and Hasan, C.M. 2012a. "Phytochemical investigation of the stem bark of *Phlogacanthus thyrsoiflorus* (Roxb.) Nees." *Asian Journal of Chemistry*. 24(2) : 784-786.
- Ilham, S. Ali, M.S. Hasan, C.M. Kaiser, M.A. and Bachar, S.C. 2012b. "Antinociceptive and hypoglycemic activity of methanolic extract of *Phlogacanthus thyrsoiflorus* Nees." *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*. 5(S2) : 15-18.
- Islam, M.T. Alencar, M.V.O.B. Machado, K.C. Machado, K.C. Melo-Cavalcante, A.A.C. Sousa, D.P. and Freitas, R.M. 2015. "Phytol in a pharma-medico-stance." *Chemico-Biological Interactions*. 240 : 60-73.

- Jaccard, P. 1908. "Nouvelles recherches sur la distribution florale." *Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles*. 44 : 223-270.
- Ji, W. Zhang, G.R. Ran, W. Gardner, J.P.A. Wei, K.J. Wang, W.M. and Zou, G.W. 2014. "Genetic diversity of and differentiation among five populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) revealed by SRAP markers : Implications for conservation and management." *PLOS ONE*. 9(9) : e108967.
- Jing, Z.B. Wang, X.P. and Cheng, J.M. 2013. "Analysis of genetic diversity among Chinese wild *Vitis* species revealed with SSR and SRAP markers." *Genetics and Molecular Research*. 12(2) : 1962-1973.
- Jongrungruangchok, S. Songsak, T. and Wongwiwatthananut, S. 2014. "Evaluation of nutrient and mineral content of the leaves of *Phlogacanthus pulcherrimus* cultivated in Thailand." *Bulletin of Health, Science and Technology*. 12(1) : 22-26.
- Kadoma, Y. Ito, S. Atsumi, T. and Fujisawa, S. 2009. "Mechanisms of cytotoxicity of 2- or 2,6-di-*tert*-butylphenols and 2-methoxyphenols in terms of inhibition rate constant and a theoretical parameter." *Chemosphere*. 74(5) : 626-632.
- Kasugai, S. Hasegawa, N. and Ogura, H. 1990. "A simple *in vitro* cytotoxicity test using the MTT (3-(4,5)dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay : Analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A)." *The Japanese Journal of Pharmacology*. 52 : 95-100.
- Kato, T. Imai, T. Kashimura, K. Saito, N. and Masaya, K. 2003. "Germination response in wheat grains to dihydroactinidiolide, a germination inhibitor in wheat husks, and related compounds." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(8) : 2161-2167.
- Komiya, T. Kyohkon, M. Ohwaki, S. Eto, J. Katsuzaki, H. Imai, K. Kataoka, T. Yoshioka, K. Ishii, Y. and Hibasami, H. 1999. "Phytol induces programmed cell death in human lymphoid leukemia Molt 4B cells." *International Journal of Molecular Medicine*. 4(4) : 377-380.
- Lai, G.F. Wang, X.Y. Wang, Y.F. Cao, J.X. Luo, S.D. and Ju, P. 2009. "Diterpenes and diterpene glucosides from *Phlogacanthus curviflorus*." *Helvetica Chimica Acta*. 92 : 470-480.

- Laitonjam, W.S. Yumnam, R.S. and Kongbrailatpam, B.D. 2012. "Phytoconstituents of *Phlogacanthus pubinervius* Nees : Leaves and their free radical scavenging activities." *The Natural Products Journal*. 2(4) : 287-292.
- Laitonjam, W.S. Yumnam, R. Asem, S.D. and Wangkheirakpam, S.D. 2013. "Evaluative and comparative study of biochemical, trace elements and antioxidant activity of *Phlogacanthus pubinervius* T. Anderson and *Phlogacanthus jenkinsii* C.B. Clarke leaves." *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 4(1) : 67-72.
- Lattoo, S.K. Dhar, R.S. Khan, S. Bamotra, S. Bhan, M.K. Dhar, A.K. and Gupta, K.K. 2008. "Comparative analysis of genetic diversity using molecular and morphometric markers in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees." *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55 : 33-43.
- Li, D. Zhang, H.Z. Long, Y.L. Jiang, L. Cheng, J.R. Huang, D. Lü, C.P. 2012. "Establishment and optimization of SRAP-PCR reaction system in *Cymbidium*." *Subtropical Plant Science*. 41(3) : 21-24.
- Li, D. Zhou, Y. Leng, C. Su, Y. and Li, M. 2009. "Optimization of SRAP-PCR reaction system in flax." *Journal of Northeast Agricultural University*. 16(2) : 17-22.
- Li, G. and Quiros, C.F. 2001. "Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction : its application to mapping and gene tagging in *Brassica*." *Theoretical and Applied Genetics*. 103 : 455-461.
- Li, G. McVetty, P.B.E. and Quiros, C.F. 2013. "SRAP Molecular marker technology in plant science." 23-44. In Anderson, S.B. (Ed.). *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. Intech.
- Liao, L. Guo, Q. Wang, Z. Liu, L. and Zhu, Z. 2012. "Genetic diversity analysis of *Prunella vulgaris* in China using ISSR and SRAP markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 45 : 209-217.
- Liu, F. Guo, Q.S. Shi, H.Z. Lv, F. Yu, Y.B. Lv, L.L. Huang, J.T. Wang, A.M. and Liang, H.X. 2014. "Genetic diversity analysis of *Perinereis aibuhitensis* based on ISSR and SRAP markers of Chinese coast populations." *Biochemical Systematics and Ecology*. 57 : 262-269.

- Liu, J. Wang, Z.R. Li, C. Bian, Y.B. and Xiao, Y. 2015. "Evaluating genetic diversity and constructing core collections of Chinese *Lentinula edodes* cultivars using ISSR and SRAP markers." *Journal of Basic Microbiology*. 55(6) : 749-760.
- Machado, F.B. Yamamoto, R.E. Zanolli, K. Nocchi, S.R. Novello, C.R. Schuquel, I.T. Sakuragui, C.M. Luftmann, H. Ueda-Nakamura, T. Nakamura, C.V. and Mello, J.C. 2012. "Evaluation of the antiproliferative activity of the leaves from *Arctium lappa* by a bioassay-guided fractionation." *Molecules*. 17(2) : 1852-1859.
- Macías, A.F. Simonet, A.M. Galindo, J.C.G. and Castellano, D. 1999. "Bioactive phenolics and polar compounds from *Melilotus messanensis*." *Phytochemistry*. 50(1) : 35-46.
- Magaldi, S. Mata-Essayag, S. Hartung de Capriles, C. Perez, C. Colella, M.T. Olaizola, C. and Ontiveros, Y. 2004. "Well diffusion for antifungal susceptibility testing." *International Journal of Infectious Diseases*. 8(1) : 39-45.
- Malek, S.N.A. Shin, S.K. Wahab, N.A. and Yaacob, H. 2009. "Cytotoxic components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves." *Molecules*. 14 : 1713-1724.
- María Teresa, R.C. Rosaura, V.G. Elda, C.M. and Ernesto, C.P. 2014. "The avocado defense compound phenol-2,4-bis(1,1-dimethylethyl) is induced by arachidonic acid and acts via the inhibition of hydrogen peroxide production by pathogens." *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 87 : 32-41.
- Minz, P.L. Singh, N. Mishra, S.K. and Koche, V. 2013. "Genetic variability among *Andrographis paniculata* in Chhattisgarh region assessed by RAPD markers." *African Journal of Biotechnology*. 12(39) : 5714-5722.
- Mishra, M. Suresh, N. Bhat, A. Suryaprakash, N. Kumar, S. Kumar, A. and Jayarama, A. 2011. "Genetic molecular analysis of *Coffea arabica* (Rubiaceae) hybrids using SRAP markers." *Revista de Biologia Tropical*. 59 : 607-617.
- Moraes, J. Oliveira, R.N. Costa, J.P. Junior, A.L.G. Sousa, D.P. Freitas, R.M. Allegretti, S.M. and Pinto, P.L.S. 2014. "Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease *Schistosomiasis mansoni*." *PLOS Neglected tropical diseases*. 8(1) : e2617.
- Morgan, D.M.L. 1998. "Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity." 179-183. In Morgan, D.M.L. (Ed.). *Polyamine protocols*. New Jersey : Humana Press.

- Mosmann, T. 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods*. 65 : 55-63.
- Mukherjee, A. Chaliha, M. and Das, S. 2009. "Study of analgesic activity of ethanol extract of *Phlogacanthus thyrsoiflorus* on experimental animal models." *A Journal of the Bangladesh Pharmacological Society*. 4 : 147-149.
- Müller-Schwarze, D. 2009. **Hands-on chemical ecology : Simple field and laboratory exercises**. New York : Springer-Verlag.
- Okada, N. Shirata, K. Niwano, M. Koshino, H. and Uramoto, M. 1994. "Immunosuppressive activity of a monoterpene from *Eucommia ulmoides*." *Phytochemistry*. 37 : 281-282.
- Panyaphu, K. Sirisa-ard, P. Na Ubol, P. Nathakarnkitkul, S. Chansakaow, S. and Van On, T. 2012. "Phytochemical, antioxidant and antibacterial activities of medicinal plants used in northern Thailand as postpartum herbal bath recipes by the Mien (Yao) community." *Phytopharmacology*. 2(1) : 92-105.
- Pejin, B. Kojic, V. and Bogdanovic, G. 2014a. "An insight into the cytotoxic activity of phytol at *in vitro* conditions." *Natural Product Research*. 28(22) : 2053-2056.
- Pejin, B. Savic, A. Sokovic, M. Glamoclija, J. Ciric, A. Nikolic, M. Radotic, K. and Mojovic, M. 2014b. "Further *in vitro* evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol." *Natural Product Research*. 28(6) : 372-376.
- Ponder, E.L. Fried, B. and Sherma, J. 2004. "Thin-layer chromatographic analysis of hydrophilic vitamins in standards and from *Helisoma trivolvis* snails." *Acta Chromatographica*. 4 : 70-81.
- Pongprayoon, U. Baeckström, P. Jacobsson, U. Lindström, M. and Bohlin, L. 1992. "Antispasmodic Activity of β -Damascenone and *E*-Phytol Isolated from *Ipomoea pes-caprae*." *Planta Medica*. 58(1) : 19-21.
- Ragasa, C.Y. Tsai, P.W. and Shen, C.C. 2009. "Antimicrobial terpenoids from *Erigeron sumatrensis*." *NRCP Research Journal*. 10(1): 27-32.
- Rangel-Sánchez, G. Castro-Mercado, E. and García-Pineda, E. 2014. "Avocado roots treated with salicylic acid produce phenol-2,4-bis (1,1-dimethylethyl), a compound with antifungal activity." *Journal of Plant Physiology*. 171 : 189-198.

- Robarts, D.W.H. and Wolfe, A.D. 2014. "Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers : A potential resource for studies in plant molecular biology." *Applications in Plant Sciences*. 2(7) : 1400017.
- Rohlf, F.J. 2000. *NTSYS-pc : Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1*. New York : Exeter Software.
- Rossi, D. Guerrini, A. Maietti, S. Bruni, R. Paganetto, G. Poli, F. Scalvenzi, L. Radice, M. Saro, K. and Sacchetti, G. 2011. "Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil : A new functional food ingredient?" *Food Chemistry*. 126 : 837-848.
- Santos, C.C.M.P. Salvadori, M.S. Mota, V.G. Costa, L.M. Almeida, A.A.C. Oliveira, G.A.L. Costa, J.P. Sousa, D.P. Freitas, R.M. and Almeida, R.N. 2013. "Antinociceptive and antioxidant activities of phytol *in vivo* and *in vitro* models." *Neuroscience Journal*. 2013 : 949252.
- Santos, W.R. Bernado, R.R. Pecanha, L.M.T. Palatnik, M. Parente, J.P. and De Souza, C.B.P. 1997. "Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*." *Vaccine*. 15(9) : 1024-1029.
- Scotland, R.W. and Vollesen, K. 2000. "Classification of Acanthaceae." *Kew Bulletin*. 55 : 513-589.
- Seal, T. and Chaudhuri, K. 2015. "Antioxidant activities of some wild edible plants of Meghalaya state in India and effect of solvent extraction system." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 7(9) : 446-450.
- Septisetyani, E.P. Ningrum, R.A. Romadhani, Y. Wisnuwardhani, P.H. and Santoso, A. 2014. "Optimization of sodium dodecyl sulphate as a formazan solvent and comparison of 3-(4,5-dimethylthio-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay with WST-1 assay in MCF-7 cells." *Indonesian Journal of Pharmacy*. 25(4) : 245-254.
- Shao, Q.S. Guo, Q.S. Deng, Y.M. and Guo, H.P. 2010. "A comparative analysis of genetic diversity in medicinal *Chrysanthemum morifolium* based on morphology, ISSR and SRAP markers." *Biochemical Systematics and Ecology*. 38(6) : 1160-1169.

- Shao, Y. Xu, L. and Chen, F. 2011. "Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using SRAP and ISSR markers." *Mycoscience*. 52 : 224-233.
- Silva, A.C.R Lopes, P.M. Azevedo, M.M.B. Costa, D.C.M. Alviano, C.S. and Alviano, D.S. 2012. "Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers." *Molecules*. 17(6) : 6305-6316.
- Silva, R.O. Sousa, F.B. Damasceno, S.R. Carvalho, N.S. Silva, V.G. Oliveira, F.R. Sousa, D.P. Aragão, K.S. Barbosa, A.L. Freitas, R.M. and Medeiros, J.V. 2014 "Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress." *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 28 : 455-464.
- Singh, O.M. Singh, W.M. and Devi, K.S. 2008. "Isolation and characterization of triterpene lactones from *Phlogacanthus thyrsoiflorus* Nees (acanthaceae)." *Natural Products : An Indian Journal*. 4(1) : 71-73.
- Singh, S.A. and Singh, N.R. 2010. "Antimicrobial activity of *Cassia didymobotrya* and *Phlogacanthus thyrsoiflorus*." *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2(4) : 304-308.
- Sladowski, D. Steer, S.J. Clothier, R.H. and Balls, M. 1993. "An improved MTT assay." *Journal of Immunological Methods*. 157(1-2) : 203-207.
- Slater, T.F. Sawyer, B. and Sträuli, U. 1963. "Studies on succinate-tetrazolium reductase systems : III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts." *Biochimica et Biophysica Acta*. 77 : 383-393.
- Sobita, K. and Bhagirath, T. 2005. "Effects of some medicinal plant extracts on *Vicia faba* root tip chromosomes." *Caryologia*. 58(3) : 255-261.
- Somprasong, W. 2014. "Taxonomic revision of the subtribe Barlerinae and Andrographinae (Acanthaceae) in Thailand." Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy (Botany), Graduate school, Kasetsart University.
- Sreevidya, N. and Mehrotra, S. 2003. "Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials." *Journal of AOAC International*. 86(6) : 1124-1127.
- Sun, F. Huo, J. and Qin, D. 2011. "Establishment and optimization of SRAP amplification system in *Lonicera caerulea* L." *Journal of Northeast Agricultural University*. 18(4) : 26-31.

- Sun, S.J. Gao, W. Lin, S.Q. Zhu, J. Xie, B.G. and Lin, Z.B. 2006. "Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72(3) : 537-543.
- Tang, L. Xiao, Y. Li, L. Guo, Q. and Bian, Y. 2010. "Analysis of genetic diversity among Chinese *Auricularia auricula* cultivars using combined ISSR and SRAP markers." *Current Microbiology*. 61(2) : 132-140.
- Tassa, B.D. Gogoi, G. And Das, S. 2012. "A comparative study of the hypolipidaemic and antioxidant activities of ethanolic extracts of leaves of *Phlogacanthus thysiflorus*, *Oxalis cornicular* L. and *Fragaria vesca* in albino rats." *Asian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*. 2(1) : 12-17.
- Thu, N.B. Trung, T.N. Ha, D.T. Khoi, M.N. Hung, T.V. Hien, T.T. Namhui, Y. and Bae, K.H. 2010. "Screening of Vietnamese medicinal plants for cytotoxic activity." *Natural Product Sciences*. 16(1) : 43-49.
- Tiwari, G. Singh, R. Singh, N. Choudhury, D.R. Paliwal, R. Kumar, A. and Gupta, V. 2016. "Study of arbitrarily amplified (RAPD and ISSR) and gene targeted (SCoT and CBDP) markers for genetic diversity and population structure in Kalmegh [*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees]." *Industrial Crops and Products*. 86 : 1-11.
- Tiway, B.K. Bihani, S. Kumar, A. Chakraborty R. and Ghosh, R. 2015. "The *in vitro* cytotoxic activity of ethno-pharmacological important plants of Darjeeling district of West Bengal against different human cancer cell lines." *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15 : 22.
- Twentyman, P.R. and Luscombe, M. 1987. "A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity." *British Journal of Cancer*. 56 : 279-285.
- Uzun, A. Yesiloglu, T. Aka-kacar, Y. Tuzcu, O. and Gulsen, O. 2009. "Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs)." *Scientia Horticulturae*. 121 : 306-312.
- Varsha, K.K. Devendra, L. Shilpa, G. Priya, S. Pandey, A. and Nampoothiri, K.M. 2015. "2,4-Di-*tert*-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus* sp." *International Journal of Food Microbiology*. 211 : 44-50.

- Viszwapriya, D. Prithika, U. Deebika, S. Balamurugan, K. and Pandian, S.K. 2016. "In vitro and in vivo antibiofilm potential of 2,4-Di-tert-butylphenol from seaweed surface associated bacterium *Bacillus subtilis* against group A *Streptococcus*." *Microbiological Research*. 191 : 19-31.
- Vizetto-Duarte, C. Custódio, L. Gangadhar, K.N. Lago, J.H. Dias, C. Matos, A.M. Neng, N. Nogueira, J.M. Barreira, L. Albericio, F. Rauter, A.P. and Varela, J. 2016. "Isololiolide, a carotenoid metabolite isolated from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*, is cytotoxic and able to induce apoptosis in hepatocarcinoma cells through caspase-3 activation, decreased Bcl-2 levels, increased p53 expression and PARP cleavage." *Phytomedicine*. 23(5) : 550-557.
- Wagner, H. and Bladt, S. 1996. *Plant drug analysis : A thin layer chromatography atlas*. 2nd ed. Berlin : Springer-Verlag.
- Wang, H. Wang, F. Tao, X. and Cheng, H. 2012. "Ammonia-containing dimethyl sulfoxide : An improved solvent for the dissolution of formazan crystals in the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay." *Analytical Biochemistry*. 421 : 324-326.
- Wang, H.Q. Zhu, H.J. Zhang, L.Y. Xue, W.J. and Yuan, B. 2014. "Identification of antialgal compounds from the aquatic plant *Elodea nuttallii*." *Allelopathy Journal*. 34(2) : 207-214.
- Wang, W. Li, N. Luo, M. Zu, Y. and Efferth, T. 2012. "Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components." *Molecules*. 17(3) : 2704-2713.
- Wang, W. Wu, N. Zu, Y.G. and Fu, Y.J. 2008. "Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components." *Food Chemistry*. 108(3) : 1019-1022.
- Wijarat, P. Keeratinijakal, V. Toojinda, T. Vanavichit, A. and Tragoonrung, S. 2012. "Genetic evaluation of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees revealed by SSR, AFLP and RAPD markers." *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(14) : 2777-2788.
- Wilkinson, J.M. 2005. "Methods for testing the antimicrobial activity of extracts." 157-172. In Ahmag, I. Aqil, F. and Owais, M. (Eds.) *Modern phytomedicine Turning medicinal plants into drugs*. Weinheim : Wiley-VCH.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Xu, J. Li, A. Wang, X. Qi, J. Zhang, L. Zhang, G. Su, J. and Tao, A. 2013. "Genetic diversity and phylogenetic relationship of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) accessions evaluated by SRAP and ISSR." *Biochemical Systematics and Ecology*. 49 : 94-100.
- Xu, Y.H. Wang, S.J. Chen, X.L. Shi, J.Q. Du, Y.Z. and Zhang, L.X. 2010. "Establishment of optimization conditions of SRAP-PCR system in ginseng." *Agricultural Science & Technology-Hunan*. 11(4) : 56-58.
- Yadav, R.D. Katakya, J.C.S. and Mathur, R.K. 1998. "Phytoconstituents of *Phlogacanthus tubiflorus* Nees (Acanthaceae) : phlogacanthin, a new diterpene lactone (andrographolide) isolated from the root wood." *Indian Journal of Chemistry-Section B : Organic and Medicinal Chemistry*. 37(11) : 1214-1216.
- Yadav, R.D. Katakya, J.C.S. and Mathur, R.K. 1999. "Isolation of a new diterpene lactone glucoside from *Phlogacanthus guttatus* Nees (Acanthaceae)." *Indian Journal of Chemistry-Section B : Organic and Medicinal Chemistry*. 38(2) : 248-250.
- Yang, M. Han, Y. Xu, L. Zhao, J. and Liu, Y. 2012. "Comparative analysis of genetic diversity of lotus (*Nelumbo*) using SSR and SRAP markers." *Scientia Horticulturae*. 142 : 185-195.
- Yang, X. Kang, M.C. Lee, K.W. Kang, S.M. Lee, W.W. and Jeon, Y.J. 2011. "Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassum ringgoldianum* subsp. *coreanum*." *Algae*. 26(2) : 201-208.
- Yin, Y. Liu, Y. Li, H. Zhao, S. Wang, S. Liu, Y. Wu, D. and Xu, F. 2014. "Genetic diversity of *Pleurotus pulmonarius* revealed by RAPD, ISSR, and SRAP fingerprinting." *Current Microbiology*. 68(3) : 397-403.
- Yoon, M.A. Jeong, T.S. Park, D.S. Xu, M.Z. Oh, H.W. Song, K.B. Lee, W.S. and Park, H.Y. 2006. "Antioxidant Effects of Quinoline Alkaloids and 2,4-Di-*tert*-butylphenol Isolated from *Scolopendra subspinipes*." *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29(4) : 735-739.
- Youn, U.J. Miklossy, G. Chai, X. Wongwiwatthanakit, S. Toyama, O. Songsak, T. Turkson, J. and Chang, L.C. 2014. "Bioactive sesquiterpene lactones and other compounds isolated from *Vernonia cinerea*." *Fitoterapia*. 93 : 194-

- Yuan, X.H. Li, B.G. Zhang, X.Y. Qi, H.Y. Zhou, M. and Zhang, G.L. 2005. "Two diterpenes and three diterpene glucosides from *Phlogacanthus curviflorus*." *Journal of Natural Products*. 68(1) : 86-89.
- Zajdel, S.M. Graikou, K. Głowniak, K. and Chinou, I. 2012. "Chemical analysis of *Penstemon campanulatus* (Cav.) Willd.—Antimicrobial activities." *Fitoterapia*. 83(2) : 373-376.
- Zhang, M. and Bai, X.J. 2013. "Genetic diversity of the Arctic fox using SRAP markers." *Genetics and Molecular Research*. 12(4) : 6176-6183.
- Zhao, J. Evangelopoulos, D. Bhakta, S. Gray, A.I. and Seidel, V. 2014. "Antitubercular activity of *Arctium lappa* and *Tussilago farfara* extracts and constituents." *Journal of Ethnopharmacology*. 155(1) : 796-800.
- Zhou, J.J. Xie, G. and Yan, X. 2011. *Encyclopedia of traditional Chinese medicines-Molecular structures, pharmacological activities, natural sources and applications traditional Chinese medicines : Isolated compounds N-S*. Vol. 4. Berlin : Springer-Verlag.
- Zhu, Z.H. Li, H.Y. Qin, Y. and Wang, R.X. 2014. "Genetic diversity and population structure in *Harpadon nehereus* based on sequence-related amplified polymorphism markers." *Genetics and Molecular Research*. 13(3) : 5974-5981.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างดีปลากิ่งที่ใช้ในศึกษามีจำนวน 24 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่ซื้อจากร้านจำหน่ายต้นไม้จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ PP06, PP10-PP13 และ PP24 ตัวอย่างที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากสถานที่ต่างๆ จำนวน 18 ตัวอย่าง มีรายนามผู้อนุเคราะห์แสดงดังตารางภาคผนวกที่ ก-1

ตารางภาคผนวกที่ ก-1 รายนามผู้อนุเคราะห์ตัวอย่างดีปลากิ่ง

รหัส	ผู้อนุเคราะห์
PP01	คุณวินัย สมประสงค์
PP02	เจ้าหน้าที่ภายในศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
PP03	คุณวนิดา เบ้าทอง และคุณนิคม เบ้าทอง
PP04	คุณสมร หลานวงศ์, คุณวนิดา เบ้าทอง และคุณนิคม เบ้าทอง
PP05	คุณบุญช่วย หลอดเข็ม
PP07	คุณสุข สีดาพาลี
PP08	คุณวิโรจน์ จันทวงศ์ และคุณวิภาภรณ์ จันทวงศ์
PP09	คุณกัญชพร ต้นแก้ว
PP14	เจ้าหน้าที่ภายในศูนย์กิจกรรมธรรมชาติมาบเื้อง
PP15	อาจารย์ภายในคณะคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร
PP16	คุณวินัย สมประสงค์
PP17	คุณวินัย สมประสงค์
PP18	คุณพัชรินทร์ สนิทวงศ์ ณ อยุธยา
PP19	คุณวินัย สมประสงค์
PP20	คุณพิทยุทธ สีดาพาลี
PP21	คุณนิตยา ตูลา
PP22	คุณวินัย สมประสงค์
PP23	คุณบุษบา บัวเขียว

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. 2X CTAB

เตรียมสารละลาย 2X CTAB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเตรียมน้ำกลั่น สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ และสารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0 พร้อมกับกระบอกตวง ขวดแก้ว และปีกเกอร์พร้อม Magnetic bar นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ Autoclave ไว้ก่อนล่วงหน้า จากนั้นผสมสาร CTAB 2 กรัม Polyvinylpyrrolidone (PVP) 1 กรัม ลงในปีกเกอร์ที่เตรียมไว้ ละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ ปริมาตร 28 มิลลิลิตร และสารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องกวนสารละลายช่วย โดยค่อยๆ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงไป ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดแก้วปลอดเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

2. Acetate buffer

เตรียมสารละลาย Acetate buffer (pH 3.6) 300 มิลลิโมลาร์ โดยเตรียม Solution A กรดอะซิติก 0.2 โมลาร์ และเตรียม Solution B สารละลายโซเดียมอะซิเตท 0.2 โมลาร์ ผสม Solution A 185 มิลลิลิตร กับ Solution B 15 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ Autoclave

3. Anisaldehyde reagent

เตรียมสารละลาย Anisaldehyde reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยผสมเอทานอล 90 มิลลิลิตร *p*-Anisaldehyde 2 มิลลิลิตร กรดซัลฟิวริก 3 มิลลิลิตร และน้ำ 5 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน

4. Benedict's solution

เตรียมสารละลาย Benedict's solution ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยเตรียมเป็น Solution A ละลายคอปเปอร์(II)ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต 17.3 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร และเตรียม Solution B ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 100 กรัม และโซเดียมซเตรทโตไฮเดรต 173 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร จากนั้นผสม Solution A และ B เข้าด้วยกัน โดยค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงใน Solution B และมีการกวนอย่างต่อเนื่อง แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

5. dNTP

เตรียม dNTP ความเข้มข้น 1.25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยผสมสารละลาย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ สารละ 1.25 ไมโครลิตร กับ Nuclease-free water ปริมาตร 95 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. Dragendorff's reagent

เตรียมสารละลาย Dragendorff's reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยละลายบิสมัทไนเตรท 8 กรัม ในกรดไนตริก 30 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ลงในสารละลายบิสมัทไนเตรท แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

7. Dragendorff's spray reagent

เตรียมสารละลาย Dragendorff's spray reagent ปริมาตร 400 มิลลิลิตร โดยเตรียม Solution A โดยละลายบิสมัทไนเตรท 0.6 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริก 20 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร และเตรียม Solution B โดยละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 6 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นรวม Solution A และ B เข้าด้วยกัน เติมกรดไฮโดรคลอริก 7 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 400 มิลลิลิตร

8. Fehling's solution

เตรียมสารละลาย Fehling's solution ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยเตรียม Solution A โดยละลายคอปเปอร์(II)ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต 17.32 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 250 มิลลิลิตร และเตรียม Solution B โดยละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 85.5 ในน้ำอุ่น และละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 30 กรัม ในน้ำกลั่น ผสมเข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 250 มิลลิลิตร เมื่อต้องการใช้งานผสม Solution A และ B เข้าด้วยกันในอัตราส่วน 1 : 1

9. Gelatin solution

เตรียมสารละลาย Gelatin solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยละลายเจลาติน 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนปานกลางจนเจลาตินละลายหมด

10. Gelatin salt solution

เตรียมสารละลาย Gelatin salt solution โดยผสม Gelatin solution กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ ในอัตราส่วน 1 : 1

11. Mayer's reagent

เตรียมสารละลาย Mayer's reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ 1.36 กรัม ในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร และละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 5 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเมอร์คิวริกคลอไรด์ลงในสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

12. Sodium picrate paper

เตรียม Sodium picrate paper โดยละลายกรดพิคริกด้วยน้ำกลั่นจนอิ่มตัว แล้วนำสารละลายกรดพิคริกอิ่มตัว มาปรับ pH ด้วยโซเดียมโบคาร์บอเนตจนเป็นกลาง วัดด้วย Universal indicator จากนั้นกรอง แล้วนำกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 ที่เตรียมไว้ขนาด 1×5 เซนติเมตร จุ่มลงในสารละลายดังกล่าว และทิ้งไว้ให้แห้ง

13. Tris-borate EDTA (TBE) buffer

เตรียมสารละลาย TBE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยละลาย Tris 10.781 กรัม EDTA 0.9305 กรัม และกรดบอริก 6.138 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน โดยค่อยๆ ละลายจนเกือบจะครบ 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนครบ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดย Autoclave และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

14. Tris-EDTA (TE) buffer

เตรียมสารละลาย TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยผสมสารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์ pH 8 ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร กับสารละลาย EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปฆ่าเชื้อโดย Autoclave แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

15. Wagner's reagent

เตรียมสารละลาย Wagner's reagent ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม ในน้ำกลั่น จากนั้นค่อยๆ เติมไอโอดีน 1.27 กรัม ลงไปจนละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

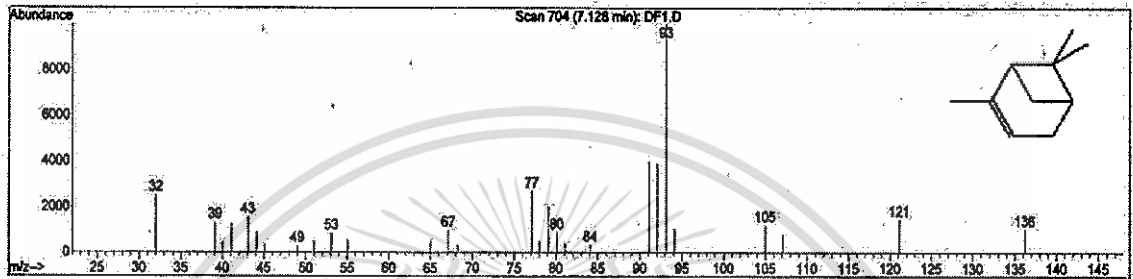
16. อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์

เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 เสริมด้วย FBS 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเตรียม FBS โดยทำการ Heat inactivate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนใช้เพียงครั้งเดียว จากนั้นผสม FBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับสารละลายเจนนามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

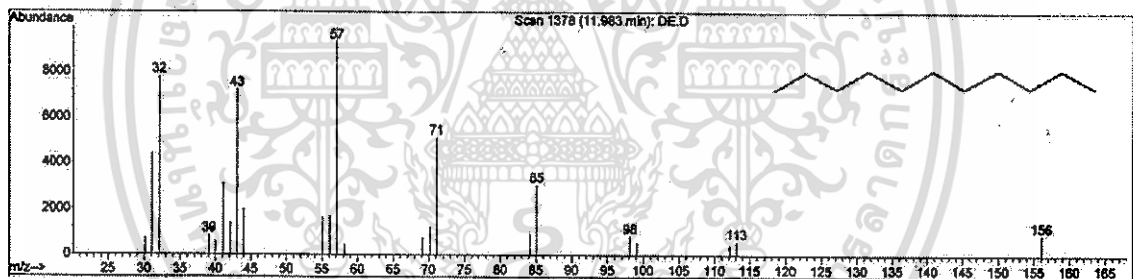
ภาคผนวก ค

Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมี

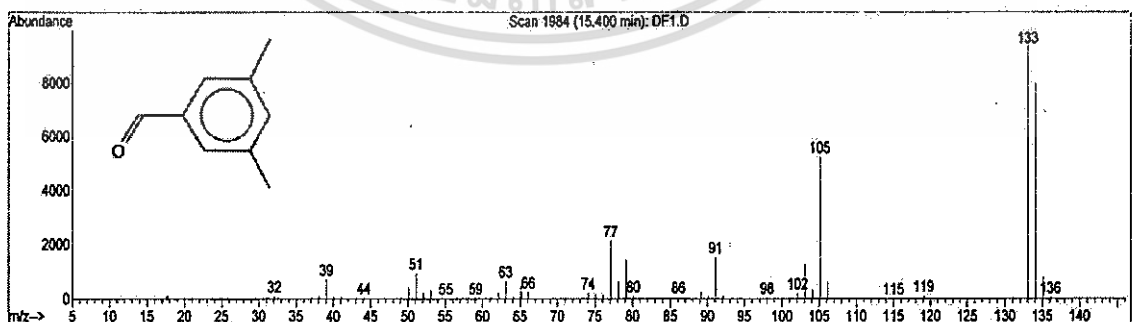
Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมี ของสารที่วิเคราะห์พบในสารสกัดต่างๆ ด้วยเทคนิค GC/MS เรียงตาม Retention time ดังนี้



รูปภาคผนวกที่ ค-1 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ α -Pinene

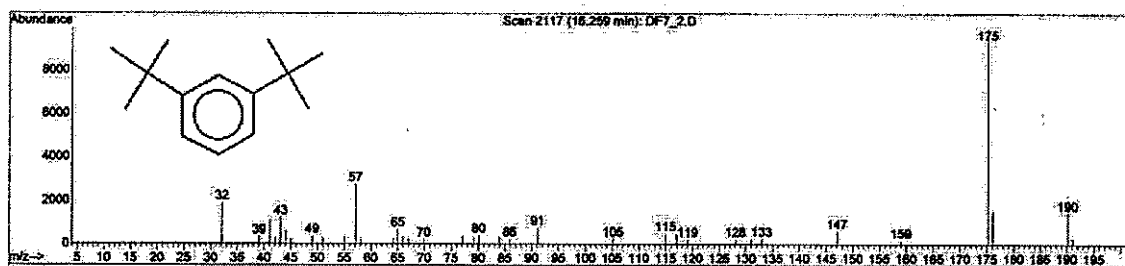


รูปภาคผนวกที่ ค-2 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Undecane

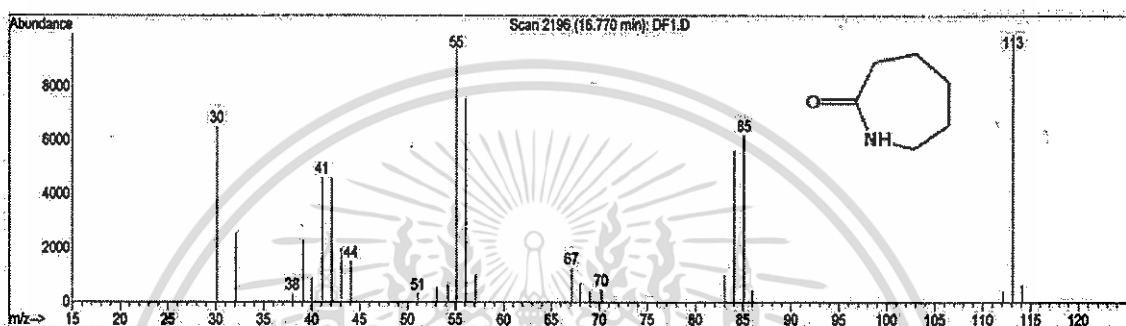


รูปภาคผนวกที่ ค-3 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 3,5-Dimethylbenzaldehyde

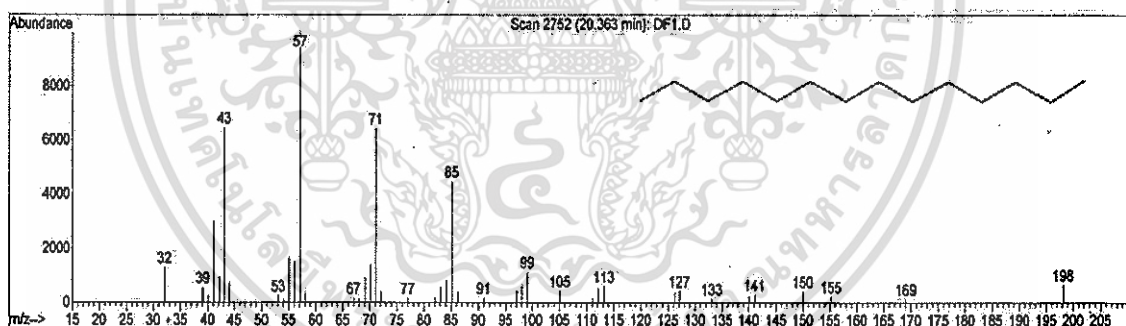
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



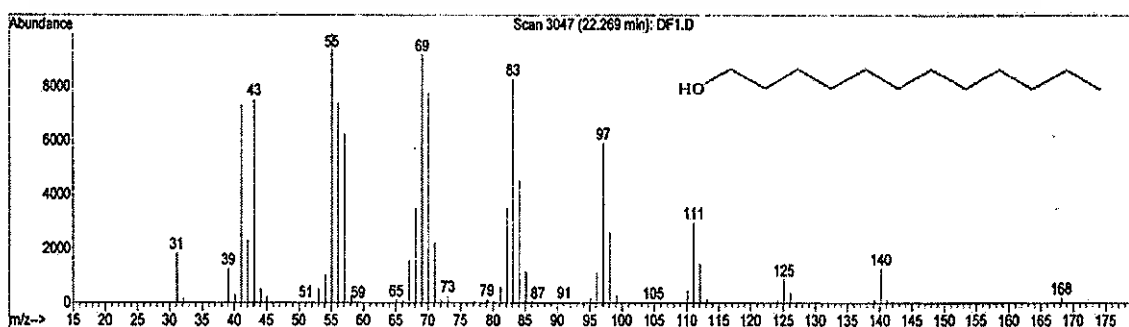
รูปภาพผนวกที่ ค-4 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 1,3-Di-tert-butylbenzene



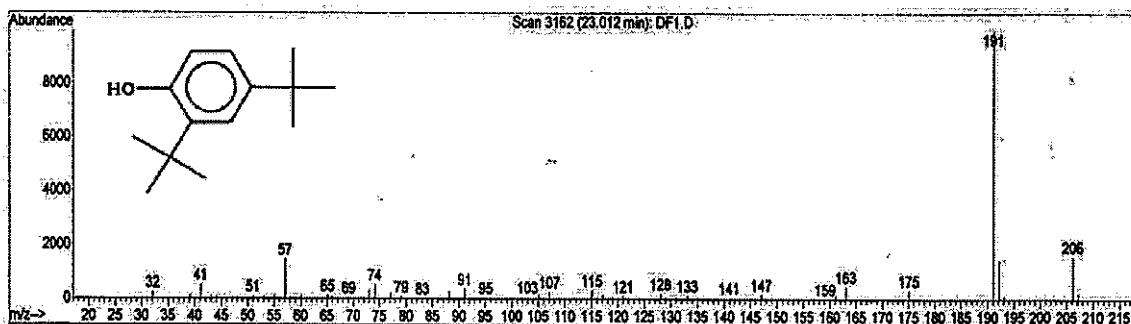
รูปภาพผนวกที่ ค-5 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Caprolactam



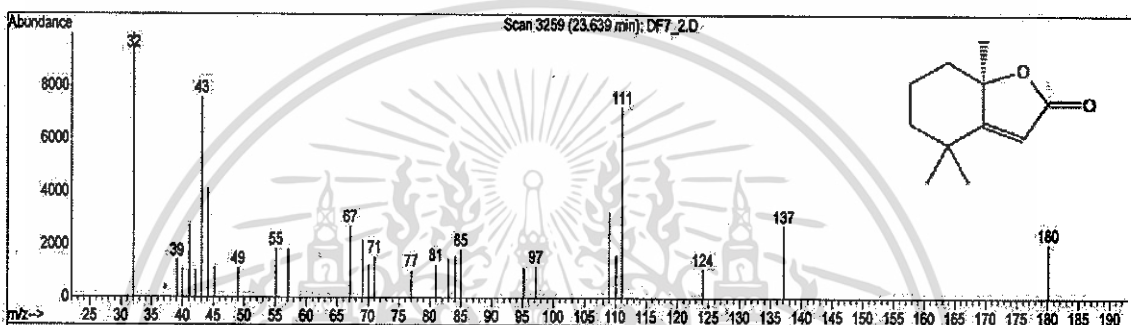
รูปภาพผนวกที่ ค-6 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Tetradecane



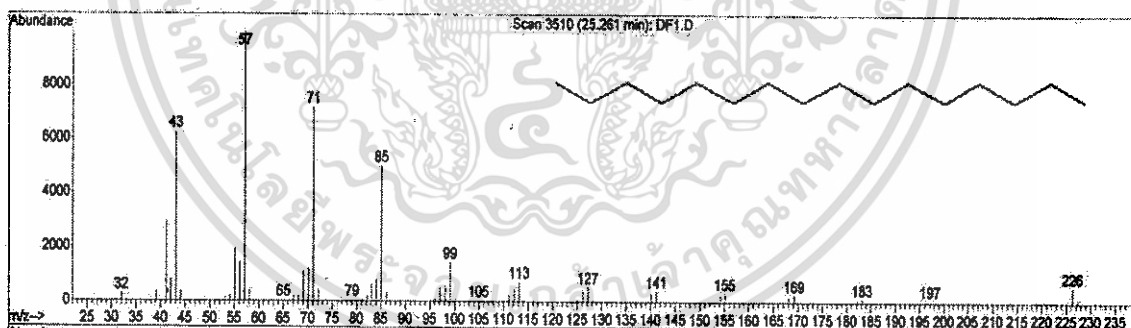
เอกสารนี้เป็นรูปภาพผนวกที่ ค-7 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 1-Dodecanol การันการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



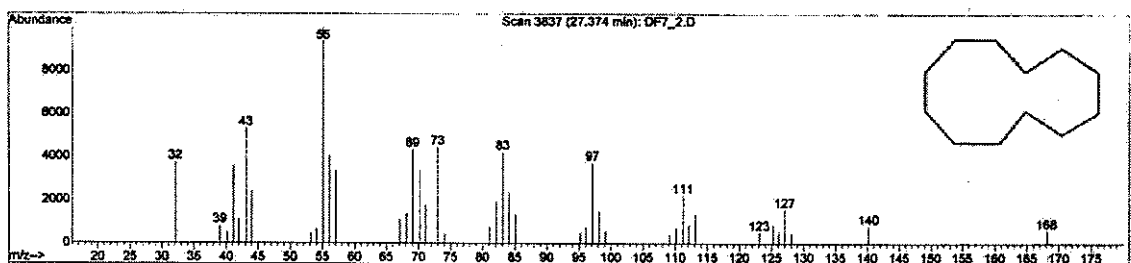
รูปภาคผนวกที่ ค-8 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 2,4-Di-tert-butylphenol



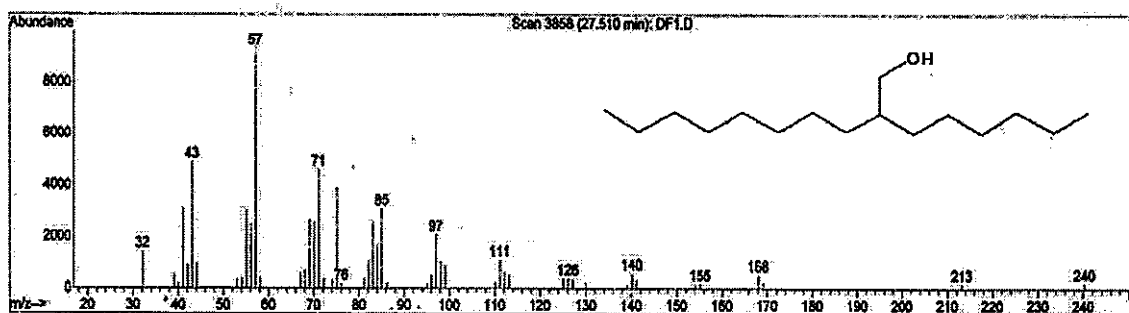
รูปภาคผนวกที่ ค-9 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Dihydroactinidiolide



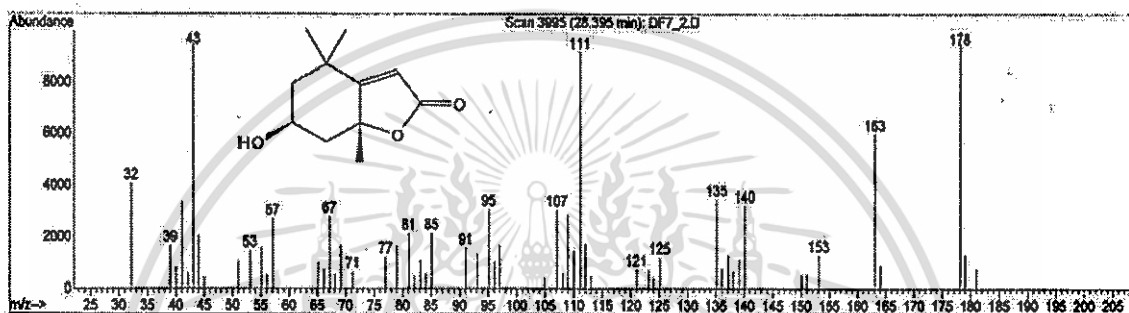
รูปภาคผนวกที่ ค-10 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Hexadecane



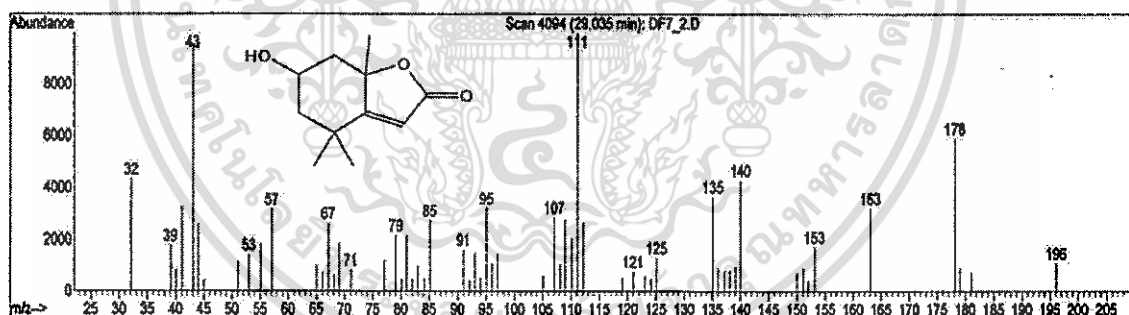
เอกสารนี้เป็นรูปภาคผนวกที่ ค-11 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Cyclododecane การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



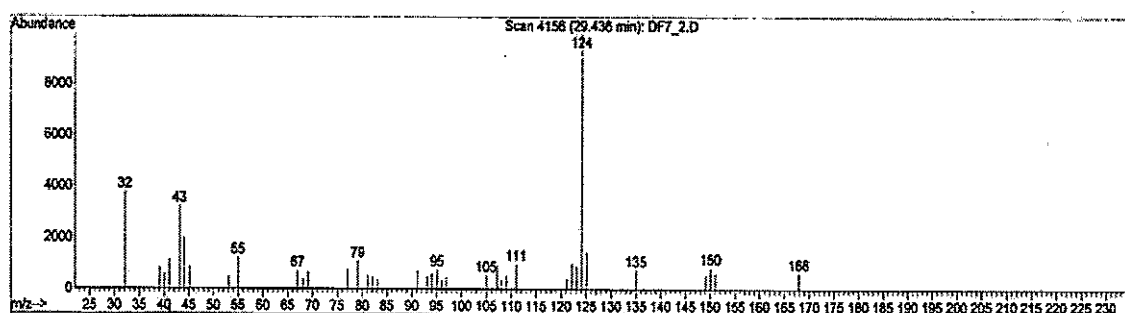
รูปภาคผนวกที่ ค-12 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 2-Hexyl-1-decanol



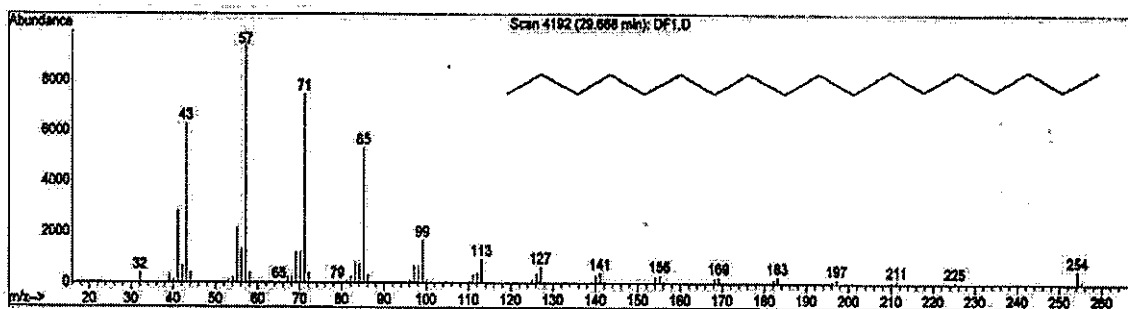
รูปภาคผนวกที่ ค-13 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Isololiolide



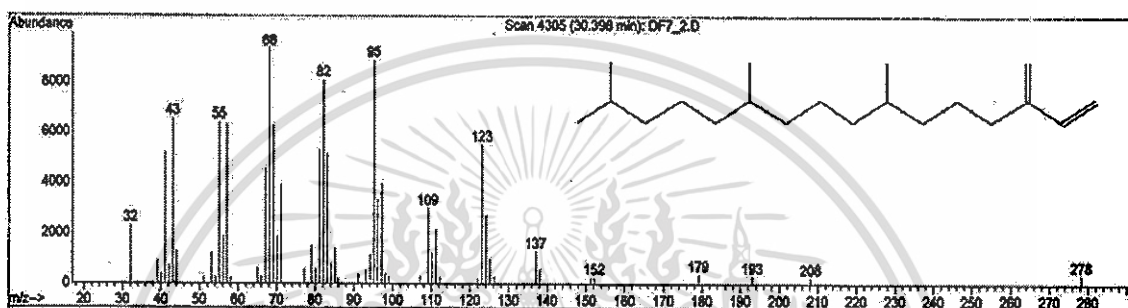
รูปภาคผนวกที่ ค-14 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Loliolide



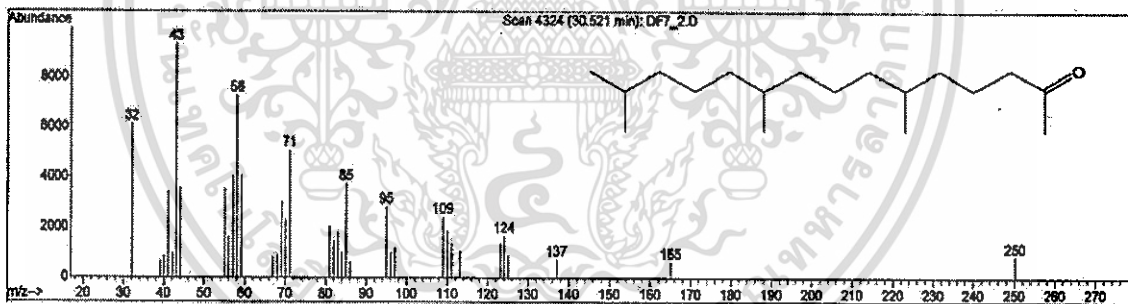
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



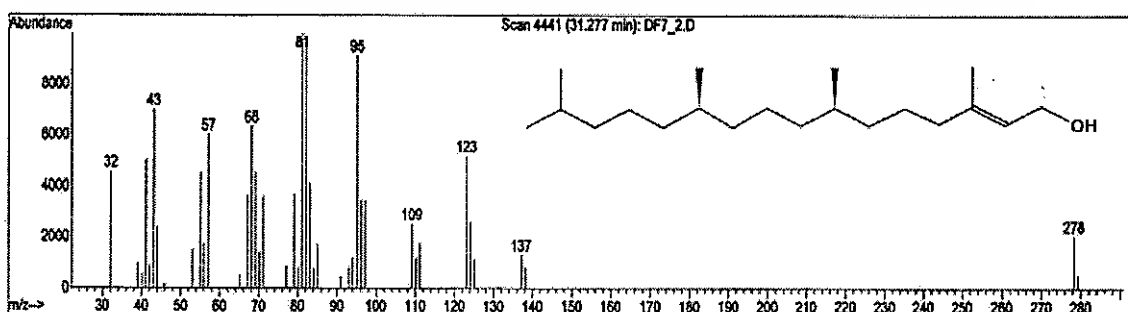
รูปภาคผนวกที่ ค-16 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Octadecane



รูปภาคผนวกที่ ค-17 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Neophytadiene

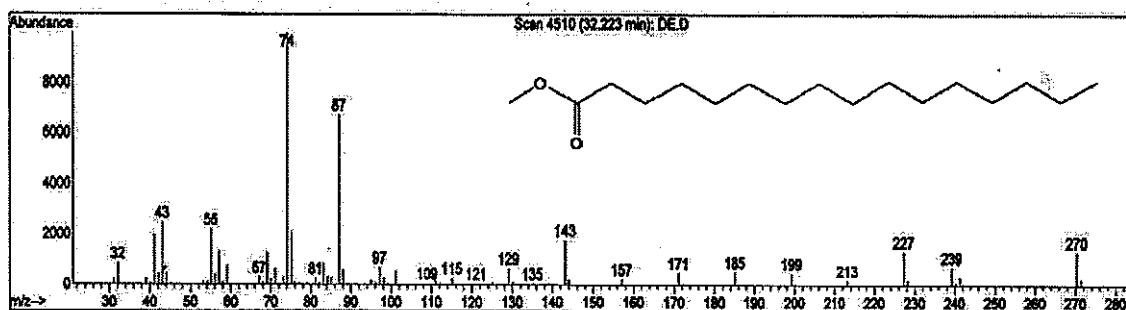


รูปภาคผนวกที่ ค-18 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ 6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone

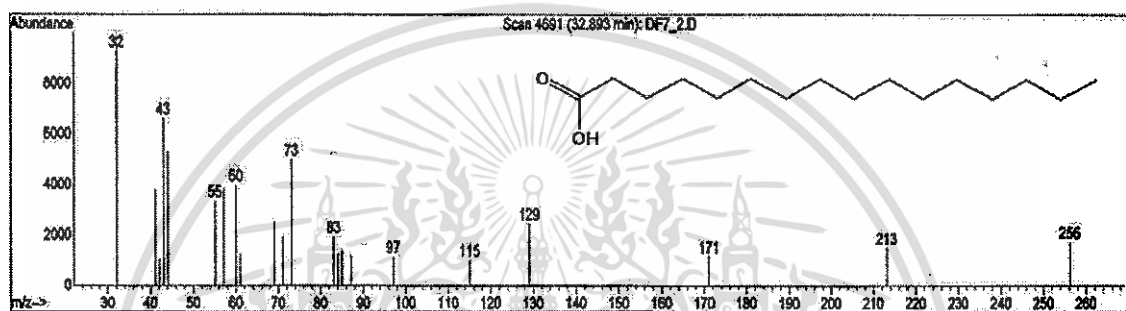


รูปภาคผนวกที่ ค-19 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Phytol

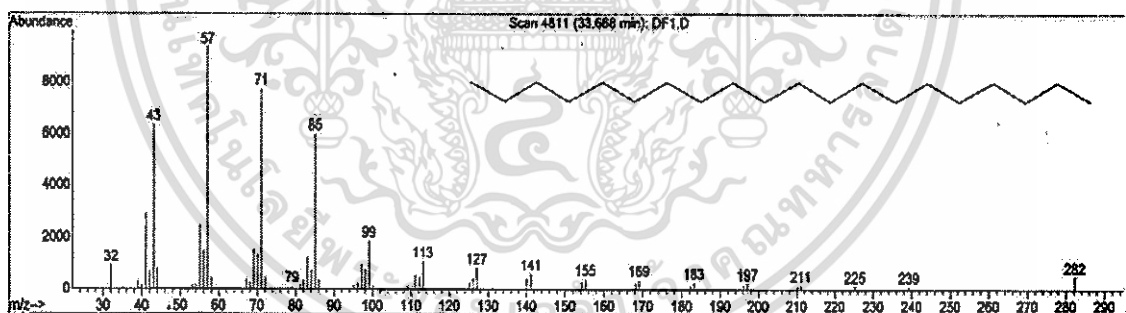
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



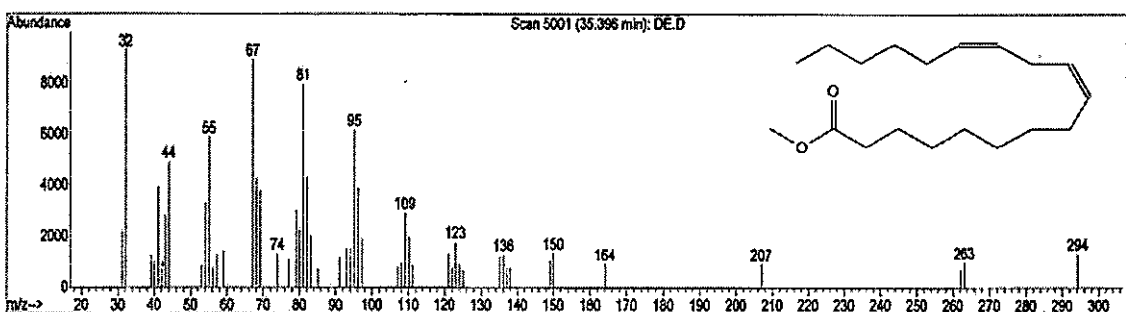
รูปภาคผนวกที่ ค-20 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Methyl palmitate



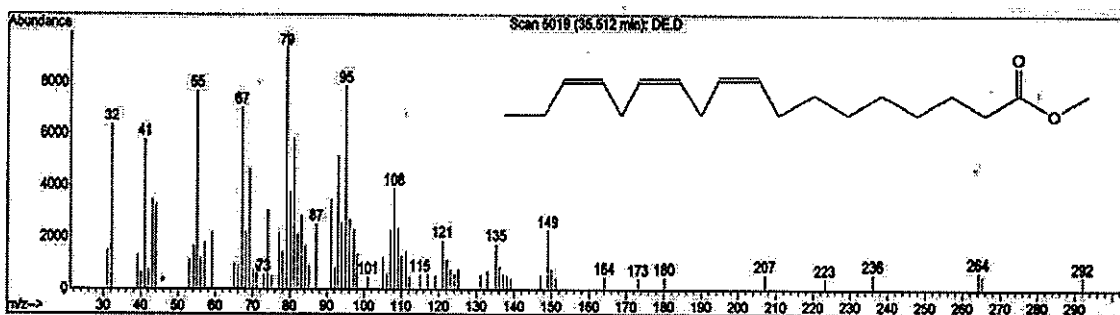
รูปภาคผนวกที่ ค-21 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Palmitic acid



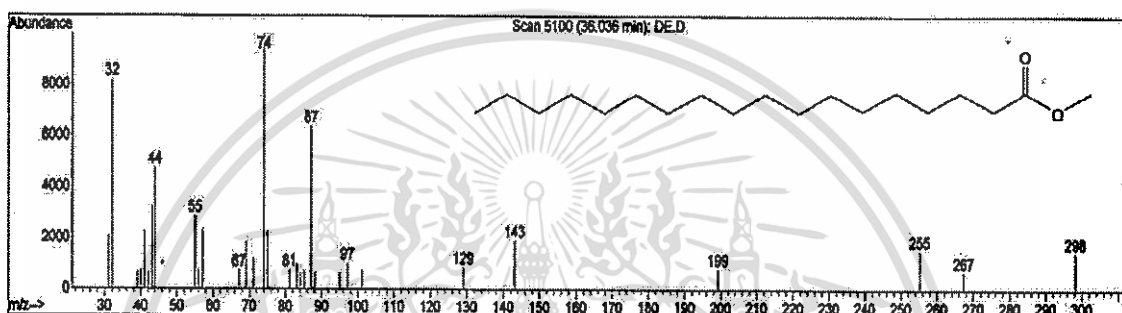
รูปภาคผนวกที่ ค-22 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Eicosane



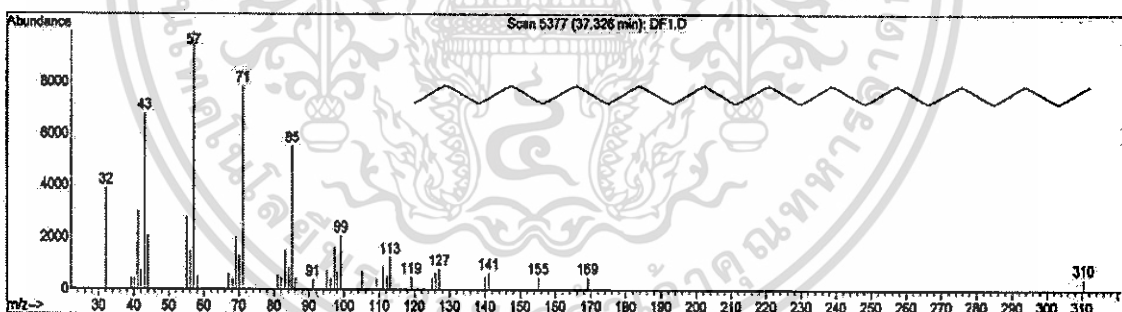
รูปภาคผนวกที่ ค-23 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Methyl linoleate



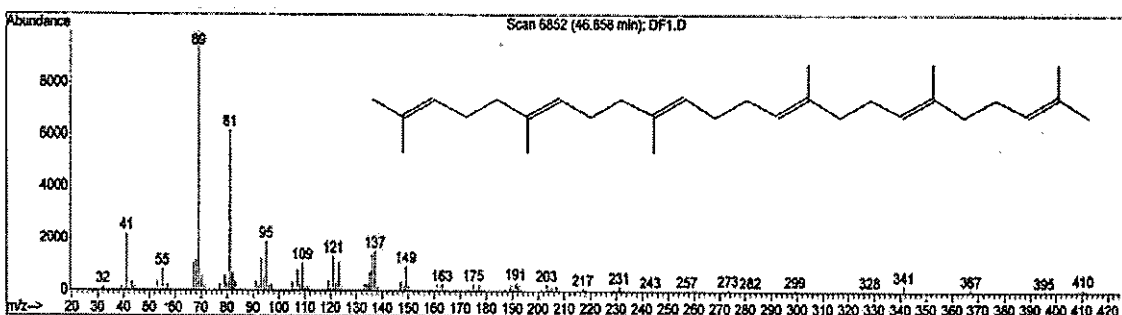
รูปภาพผนวกที่ ค-24 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Methyl linolenate



รูปภาพผนวกที่ ค-25 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Methyl stearate



รูปภาพผนวกที่ ค-26 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Docosane



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ ค-27 Mass spectrum และสูตรโครงสร้างทางเคมีของ Squalene
 ไม่ว่าจะตีพิมพ์หรือใช้ในรูปแบบใดก็ตาม กรุณาแจ้งให้ทราบก่อนการนำออกจำหน่าย
 ไม่ว่าจะตีพิมพ์หรือใช้ในรูปแบบใดก็ตาม กรุณาแจ้งให้ทราบก่อนการนำออกจำหน่าย
 ไม่ว่าจะตีพิมพ์หรือใช้ในรูปแบบใดก็ตาม กรุณาแจ้งให้ทราบก่อนการนำออกจำหน่าย

ภาคผนวก ง

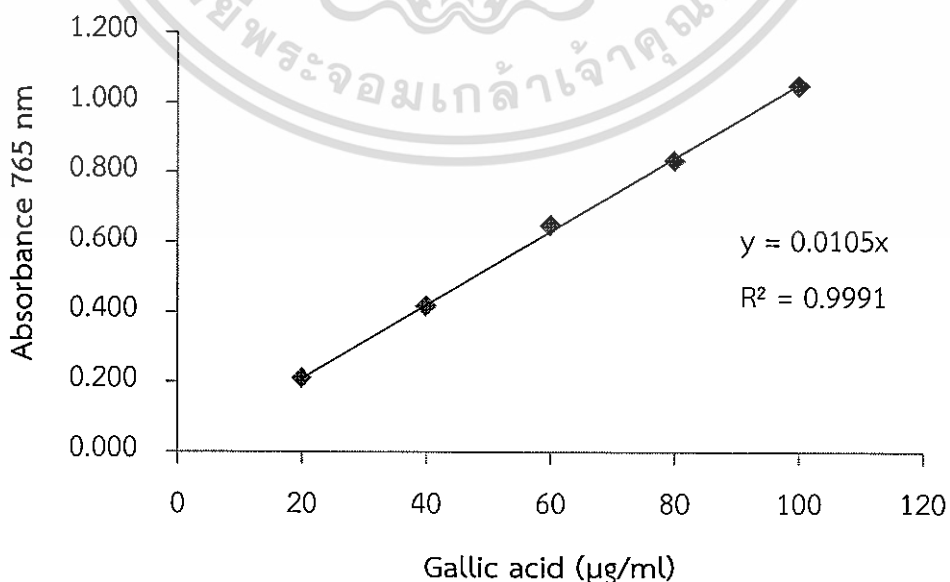
การคำนวณเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ

1. การคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ ง-1 ที่วิเคราะห์ตามวิธี Folin-Ciocalteu (หัวข้อที่ 3.7.4) ได้กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกดังรูปภาคผนวกที่ ง-1

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 สารมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
20	0.213	0.215	0.208	0.212
40	0.426	0.427	0.403	0.419
60	0.661	0.648	0.639	0.649
80	0.815	0.855	0.831	0.834
100	1.039	1.075	1.031	1.048



จากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (รูปภาคผนวกที่ ง-1) ได้สมการของสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 0.0105x \quad (ง-1)$$

y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแกลลิก ($\mu\text{g/ml}$)

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สารสกัดเมทานอลจากใบตึปลาทั้งความเข้มข้น 1 mg/ml นำมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกตามวิธี Folin-Ciocalteu (หัวข้อที่ 3.7.4) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.297

หาค่า x จากสมการที่ ง-1 $x = y/0.0105$ (ง-2)

จากนั้นแทนค่า y ในสมการที่ ง-2 $x = 0.297/0.0105$

$$x = 28.29 \mu\text{gGAE/ml}$$

นำค่า x ที่ได้ หารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบ ซึ่งในตัวอย่างนี้ใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย $\mu\text{gGAE/mg extract}$ หรือเท่ากับ mgGAE/g extract

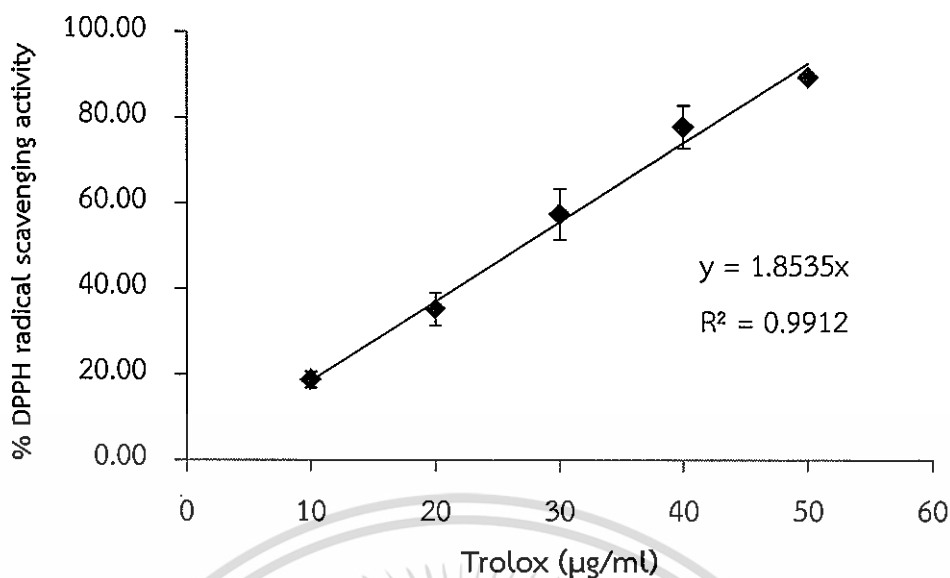
ดังนั้น สารสกัดเมทานอลจากใบตึปลาทั้ง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 28.29 mgGAE/g extract ทำเช่นนี้ในแต่ละซ้ำ แล้วนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และในสารสกัดตัวอย่างอื่นๆ ก็คำนวณเช่นเดียวกัน

2. การคำนวณความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

สร้างกราฟมาตรฐานโทรลล็อกซ์สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH จากค่าเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ ดังตารางภาคผนวกที่ ง-2 ได้กราฟมาตรฐานโทรลล็อกซ์ดังรูปภาคผนวกที่ ง-2

ตารางภาคผนวกที่ ง-2 สารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

ความเข้มข้นของ สารมาตรฐานโทรลล็อกซ์ ($\mu\text{g/ml}$)	เปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH			ค่าเฉลี่ย \pm SD
	1	2	3	
10	16.13	20.21	19.86	18.73 \pm 1.85
20	30.02	39.17	36.38	35.19 \pm 3.83
30	57.88	64.35	49.76	57.33 \pm 5.97
40	75.65	84.70	72.96	77.77 \pm 5.02
50	89.06	88.48	90.81	89.45 \pm 0.99



รูปภาคผนวกที่ ง-2 กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

จากกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ (รูปภาคผนวกที่ ง-2) ได้สมการของสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 1.8535x$$

(ง-3)

y คือ เปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (µg/ml)

ตัวอย่างการคำนวณความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH

สารสกัดเมทานอลจากใบติปลากั้งความเข้มข้น 2 mg/ml (2000 µg/ml) นำมาศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH (หัวข้อที่ 3.7.5.1) คำนวณเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH เฉลี่ยได้เท่ากับ 79.65 ± 4.62 เปอร์เซ็นต์

หาค่า x จากสมการที่ ง-3

$$x = y/1.8535$$

(ง-4)

จากนั้นแทนค่า y ในสมการที่ ง-4

$$x = 79.65/1.8535$$

$$x = 42.97 \mu\text{gTE/ml}$$

นำค่า x ที่ได้ หารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบ ซึ่งในตัวอย่างนี้ใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 2 mg/ml ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย µgTE/mg extract หรือเท่ากับ mgTE/g extract

ดังนั้น สารสกัดเมทานอลจากใบติปลากั้งมีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 21.49 mgTE/g extract ทำเช่นนี้ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด แล้วนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และในสารสกัดตัวอย่างอื่นๆ ก็คำนวณเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังสามารถหาค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ได้จากสมการของสารมาตรฐานดังกล่าว โดยแทนค่า y เท่ากับ 50 เปอร์เซนต์

แทนค่า y ในสมการที่ ง-4

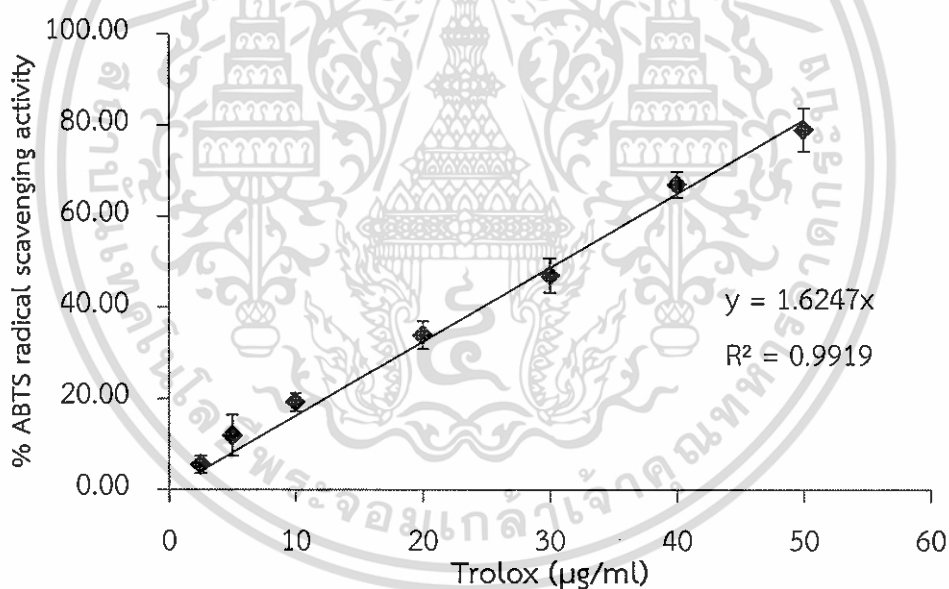
$$x = 50/1.8535$$

$$x = 26.96 \mu\text{g/ml}$$

ค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากการคำนวณ เท่ากับ $26.96 \mu\text{g/ml}$ ส่วนค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 5.0 เท่ากับ $26.86 \mu\text{g/ml}$ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันมาก ซึ่งในบทที่ 4 ได้รายงานค่า IC_{50} ของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ที่ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 5.0

3. การคำนวณความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS

สร้างกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS จากค่าเปอร์เซนต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS กับความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ ได้กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ดังรูปภาคผนวกที่ ง-3



รูปภาคผนวกที่ ง-3 กราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS

จากกราฟมาตรฐานโทรล็อกซ์ (รูปภาคผนวกที่ ง-3) ได้สมการของสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 1.6247x \quad (\text{ง-5})$$

y คือ เปอร์เซนต์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ ABTS

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ ($\mu\text{g/ml}$)

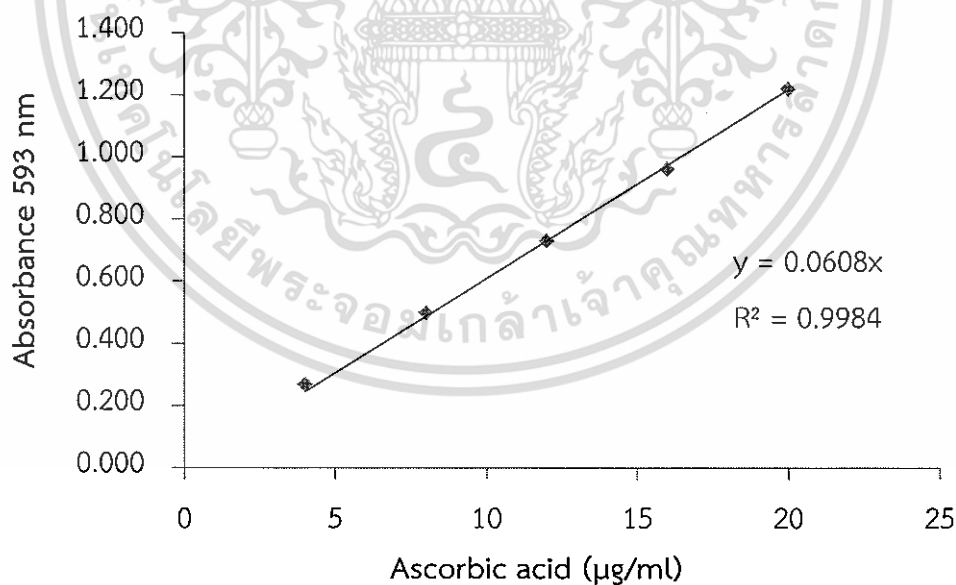
วิธีการคำนวณเช่นเดียวกันกับการคำนวณความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ DPPH เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากทางสถาบันฯ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การคำนวณความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP

สร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคผนวกที่ ง-3 ที่วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี FRAP (หัวข้อที่ 3.7.5.3) ได้กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกดังรูปภาคผนวกที่ ง-4

ตารางภาคผนวกที่ ง-3 สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP

ความเข้มข้นของสาร มาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ($\mu\text{g/ml}$)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	
4	0.271	0.269	0.263	0.268
8	0.498	0.495	0.501	0.498
12	0.745	0.732	0.712	0.730
16	0.939	0.96	0.983	0.961
20	1.12	1.278	1.256	1.218



รูปภาคผนวกที่ ง-4 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP

จากกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (รูปภาคผนวกที่ ง-4) ได้สมการของสารมาตรฐานดังนี้

$$y = 0.0608x \quad (\text{ง-6})$$

y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร

x คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ($\mu\text{g/ml}$)

ตัวอย่างการคำนวณความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ ในวิธี FRAP

สารสกัดเมทานอลจากใบตึปลาทั้งที่ความเข้มข้น 1 mg/ml นำมาศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระตามวิธี FRAP (หัวข้อที่ 3.7.5.3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.455

หาค่า x จากสมการที่ ง-6 $x = y/0.0608$ (ง-7)

จากนั้นแทนค่า y ในสมการที่ ง-7 $x = 0.455/0.0608$

$$x = 7.48 \mu\text{gAAE/ml}$$

นำค่า x ที่ได้ หารด้วยความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบ ซึ่งในตัวอย่างนี้ใช้สารสกัดที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ค่าที่ได้จะอยู่ในหน่วย $\mu\text{gAAE/mg extract}$ หรือเท่ากับ mgAAE/g extract

ดังนั้น สารสกัดเมทานอลจากใบตึปลาทั้งมีความสามารถในการรีดิวซ์ Fe^{3+} -TPTZ เท่ากับ 7.48 mgAAE/g extract ทำเช่นนี้ในแต่ละซ้ำ แล้วนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และในสารสกัดตัวอย่างอื่นๆ ก็คำนวณเช่นเดียวกัน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายพฤษวรรษ หลอดเข็ม
วัน เดือน ปีเกิด	26 พฤศจิกายน 2535
ที่อยู่ปัจจุบัน	1132 (14/30 หมู่ 3) แขวงหนองแขม เขตหนองแขม กรุงเทพฯ 10160
ประวัติการศึกษา	(2556) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ เกรตเฉลี่ย 3.85 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2559) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษาของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	1. พฤษวรรษ หลอดเข็ม, สุพิตรา โพธิ์เอี่ยม และวินัย สมประสงค์. 2558. “การหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาในเทคนิคเอสอาร์เอพีสำหรับดีปลากิ่ง (<i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> T. Anderson)” หน้า 243-248. ใน การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19. ขอนแก่น : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2. Lordkhem, P., Poeaim, S. and Charoenying, P. 2015. “Phytochemical screening, antioxidant and anticancer activities of <i>Phlogacanthus pulcherrimus</i> leaves” 568-574. In The 27 th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Bangkok : Chulalongkorn University.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ผลงานทางวิชาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เรื่อง

การหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาในเทคนิคเอสอาร์เอพีสำหรับตีปลากั้ง
(*Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาในเทคนิคเอสอาร์เอพีสำหรับตีปลากิ่ง (*Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson)

Optimization of SRAP Reaction for *Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson

พฤษวรรช หลอดเข็ม¹ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม^{1*} และ วินัย สมประสงค์²
Prussawat LORDKHEM¹, Supattra POEAIM^{1*} and Winai SOMPRASONG²

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

²กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520; ²Plant Variety Protection Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900

*Corresponding author; e-mail: poeaim@hotmail.com

บทคัดย่อ ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมขององค์ประกอบที่สำคัญ 5 ชนิด (MgCl₂, dNTP, เอสอาร์เอพีไพรเมอร์, Taq DNA polymerase และดีเอ็นเอต้นแบบ) ในเทคนิคเอสอาร์เอพีสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตีปลากิ่ง (*Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson) โดยปรับความเข้มข้นของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสารละ 4 ความเข้มข้น พบว่าในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมประกอบด้วย 1xStandard Taq reaction buffer, MgCl₂ 3.0 มิลลิโมลาร์, dNTP 200 ไมโครโมลาร์, ไพร์เมอร์ 0.8 ไมโครโมลาร์, Taq DNA polymerase 1 ยูนิต และดีเอ็นเอต้นแบบ 40 นาโนกรัม ซึ่งจะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ง่ายต่อการนับ มีความเสถียรที่สามารถทำซ้ำได้ เหมาะสำหรับนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตีปลากิ่ง และประยุกต์ใช้กับพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees อื่นๆ ได้

ABSTRACT Five components (MgCl₂, dNTP, SRAP primer, Taq DNA polymerase and DNA template) were used to optimize in sequence-related amplified polymorphism (SRAP) reaction for *Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson, each at four concentrations. The most optimal reaction was the twenty five microliters of reaction consisted of 1xStandard Taq reaction buffer, 3.0 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 0.8 μM primers, 1.0 U Taq DNA polymerase and 40 ng DNA templates. Clear fragments with easily recordable, stable and reproducible DNA bands were produced. It was suitable for research on genetic diversity of *Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson and could also be applied to other plants in genus *Phlogacanthus* Nees.

คำสำคัญ: ตีปลากิ่ง เทคนิคเอสอาร์เอพี สภาวะที่เหมาะสม

Keywords: *Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson, SRAP, Optimization

บทนำ

ดีปลากั้ง (*Phlogacanthus pulcherrimus* T. Anderson) จัดอยู่ในวงศ์ Acanthaceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม ถือได้ว่าเป็นผักพื้นบ้านชนิดหนึ่ง นิยมนำใบสดและยอดอ่อนมารับประทานเป็นผักเคียง มีสรรพคุณแก้เบาหวาน [1-4] พบในหลายจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ เช่น แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ และตาก เป็นต้น [2, 4] จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีปลากั้งในประเทศไทย โดยเลือกใช้เทคนิคเอสอาร์เอพี (Sequence-related amplified polymorphism: SRAP) มาใช้ในงานวิจัยนี้

เทคนิคเอสอาร์เอพีพัฒนาขึ้นโดย Li และ Quiros (2001) [5] เพื่อลดความยุ่งยากของขั้นตอนต่างๆ ในเทคนิคเอเอฟแอลพี (Amplified fragment length polymorphism: AFLP) และสามารถทำซ้ำได้ เมื่อเทียบกับเทคนิคอาร์เอพีดี (Random amplified polymorphic DNA: RAPD) ซึ่งเทคนิคเอสอาร์เอพีสามารถประยุกต์ใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม (Genetic map) การติดตามยีน (Gene tagging) การโคลนยีน (Gene cloning) และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เป็นต้น [6] แม้ว่าเทคนิคเอสอาร์เอพีจะใช้ได้ดีในพืชหลายชนิด แต่พืชแต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แม่นยำและน่าเชื่อถือ [7] งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคเอสอาร์เอพีเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีปลากั้งต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างดีปลากั้งที่ใช้ในงานวิจัยได้รับการระบุชนิดโดย คุณวินัย สมประสงค์ หัวหน้ากลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร มีจำนวน 10 ตัวอย่าง จากพื้นที่และจังหวัดต่างๆ ดังนี้ เชียงใหม่ (PP01, PP05) ศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ฉะเชิงเทรา (PP02) หนองบัวลำภู (PP03, PP04) นครราชสีมา (PP06) สุรินทร์ (PP07) ร้อยเอ็ด (PP08) อุบลราชธานี (PP09) และกรุงเทพฯ (PP10) นอกจากนี้ยังมีพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees ชนิดอื่น ได้แก่ ห้อมแดง (*P. vitellinus* T. Anderson: PHV) ห้อมคราม (*P. pedunculatus* Imlay: PPE) ห้อมขาว (*P. paniculatus* (T. Anderson) Imlay: PPA) และห้อมใต้ลายจุด (*P. rectiflorus* Imlay: PRE)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบสดด้วยวิธี CTAB ตัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1987) [8] ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และเทคนิคอิมัลชันโพรไฟร์ซิสบนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี โดยเอสอาร์เอพีไพรเมอร์ (1st BASE Custom Oligos, Singapore) ที่ใช้ในการศึกษามี Forward primer จำนวน 5 เส้น (Me1-5) และ Reverse primer จำนวน 6 เส้น (Em1-6) สามารถจับคู่ระหว่าง Forward และ Reverse primer ได้ทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ [5] ในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายประกอบด้วย 1X Standard *Taq* reaction buffer (New England BioLabs, USA), $MgCl_2$ (Vivantis, Malaysia) 2.5 มิลลิโมลาร์, *Taq* DNA polymerase (New England BioLabs, USA) 1 ยูนิต, dNTP (Vivantis, Malaysia) 200 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ 0.8 ไมโครโมลาร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ 30 นาโนกรัม ปรับปริมาตรด้วย Nuclease-free water ใช้เป็นปฏิกิริยาพื้นฐาน [9] โดยทำการปรับความเข้มข้นของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยาแสดงดังตารางที่ 1 ทีละสาร

มีขั้นตอนของปฏิกิริยา คือ Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามด้วย 5 รอบ ของ Denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 35 องศาเซลเซียส 1 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ Denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 50 องศาเซลเซียส 1 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ Final extension 72 องศาเซลเซียส 7 นาที [5] ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองรุ่น Master cycler ep Gradient 5 (Eppendorf, Germany) ตรวจผลผลิตด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสรุ่น Mupid-exU (Advance, Japan) บนเจลอะกาโรส (Vivantis, Malaysia) 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานคือ VC 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Malaysia) ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายรูปโดยชุดถ่ายรูปรุ่น InGenius (Syngene, UK)

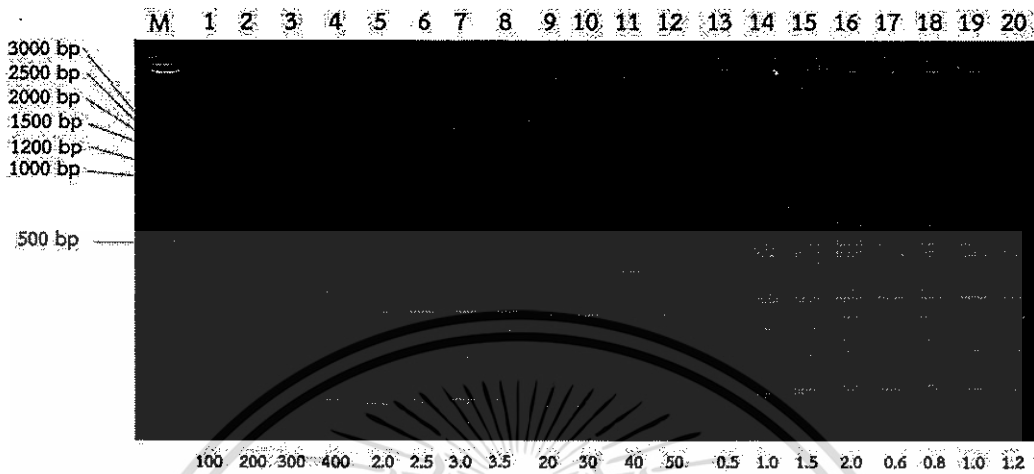
ตารางที่ 1 ความเข้มข้นสุดท้ายของสารเคมีในปฏิกิริยาที่ปรับเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้ายในปฏิกิริยา			
	1	2	3	4
MgCl ₂ (มิลลิโมลาร์)	2.0	2.5	3.0	3.5
dNTP (ไมโครโมลาร์)	100	200	300	400
เอสอาร์เอพีไพรเมอร์ (ไมโครโมลาร์)	0.6	0.8	1.0	1.2
Taq DNA polymerase (ยูนิตต่อ 25 ไมโครลิตร)	0.5	1.0	1.5	2.0
ดีเอ็นเอต้นแบบ (นาโนกรัมต่อ 25 ไมโครลิตร)	20	30	40	50

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

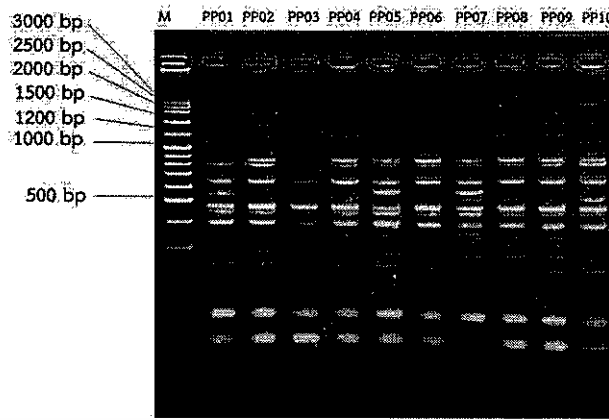
สารเคมีของปฏิกิริยาที่ใช้อาร์ในเทคนิคเอสอาร์เอพีที่ปรับหาความเข้มข้นที่เหมาะสม ได้แก่ MgCl₂, dNTP, เอสอาร์เอพีไพรเมอร์, Taq DNA polymerase และดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งสารแต่ละชนิดล้วนมีความสำคัญต่อปฏิกิริยาที่ใช้อาร์ โดยในการปรับหาความเข้มข้นที่เหมาะสมจะใช้ไพรเมอร์ Me1/Em1 และตัวอย่าง PP01 แสดงผลดังรูปที่ 1 พบว่าความเข้มข้นของ MgCl₂ 3.0 มิลลิโมลาร์ แสดงแถบของดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด สังเกตจากแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 600 คู่เบส เมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นอื่นๆ ซึ่ง MgCl₂ นั้นไม่เพียงมีส่วนช่วยให้เอนไซม์ Taq DNA polymerase ทำงาน แต่ยังมีส่วนช่วยให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างจำเพาะ หากเติมในปริมาณมากจะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ ถ้าหากเติมในปริมาณน้อยก็จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ [7] ความเข้มข้นของ dNTP พบว่าที่ความเข้มข้น 200, 300 และ 400 ไมโครโมลาร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส ชัดเจนไม่ชัดเจน จึงควรเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของเอสอาร์เอพีไพรเมอร์ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.8, 1.0 และ 1.2 ไมโครโมลาร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนไพรเมอร์ 0.6 ไมโครโมลาร์ ให้ผลแถบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน จึงเลือกใช้เอสอาร์เอพีไพรเมอร์ ที่ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ Taq DNA polymerase พบว่าปริมาณ 1.0, 1.5 และ 2.0 ยูนิต ให้แถบดีเอ็นเอที่มีจำนวนแถบเท่ากัน แต่ความเข้มของแถบดีเอ็นเอมีความแตกต่างกัน ขณะที่ปริมาณเอนไซม์ 0.5 ยูนิต เกิดจำนวนแถบดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย จึงเลือกใช้เพียง 1.0 ยูนิต เพื่อเป็นการประหยัดและลดต้นทุน เช่นเดียวกับ dNTP และเอสอาร์เอพีไพรเมอร์ที่เลือกความเข้มข้นที่ต่ำกว่า สำหรับดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่าแต่ละความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบให้จำนวนแถบไม่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด โดยดีเอ็นเอปริมาณ 40 นาโนกรัม ให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ค่อนข้างชัดเจนกว่าที่ใช้ดีเอ็นเอปริมาณ 20, 30 และ 50 นาโนกรัม จากผลการทดลองพบว่าปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบนี้ มีผลต่อปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อย

ส่วนความเข้มข้นของ $MgCl_2$, dNTP, เอสอาร์เอพีไพรเมอร์ และ *Taq* DNA polymerase จะมีผลต่อแถบ ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับกับการศึกษาใน *Lonicera caerulea* L. [10] นอกจากนี้ผลการทดลองดังกล่าวยังสามารถยืนยันได้อีกว่าเทคนิคเอสอาร์เอพีสามารถทำซ้ำแล้วให้ผลที่เหมือนเดิม

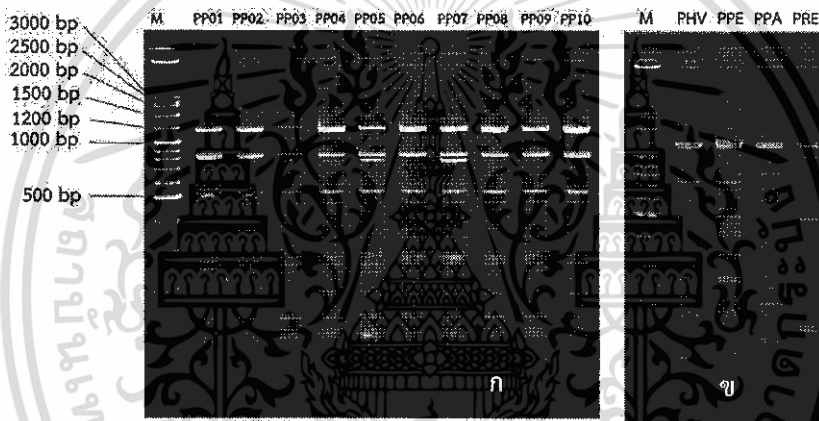


รูปที่ 1 ผลผลิตพีซีอาร์จากการปรับความเข้มข้นของสารเคมีในปฏิกิริยาของเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ Me1/Em1; M คือ VC 100 bp plus DNA Ladder แถวที่ 1-4, 5-8, 9-12, 13-16 และ 17-20 ปรับความเข้มข้นของ dNTP, $MgCl_2$, ดีเอ็นเอต้นแบบ, *Taq* DNA polymerase และไพรเมอร์ ตามลำดับ

เมื่อนำความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละสารรวมเข้าในปฏิกิริยาเดียวกัน ได้แก่ 1X Standard *Taq* reaction buffer, $MgCl_2$ 3.0 มิลลิโมลาร์, dNTP 200 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ 0.8 ไมโครโมลาร์, *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต และดีเอ็นเอต้นแบบ 40 นาโนกรัม ปรับปริมาตรด้วย Nuclease-free water ให้ครบ 25 ไมโครลิตร พบว่าแถบดีเอ็นเอยังคงมีความชัดเจน จากนั้นนำไปใช้กับไพรเมอร์ทั้ง 30 คู่ไพรเมอร์ เพื่อคัดเลือกหาคู่ไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (Polymorphic band) พบว่าสามารถคัดเลือกได้จำนวน 7 คู่ไพรเมอร์ ดังตัวอย่างของไพรเมอร์ Me5/Em1 ในรูปที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างที่ขนาดขึ้น ดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบส ในตัวอย่าง PP01, PP05 และ PP07 และที่ขนาดขึ้นดีเอ็นเอตั้งแต่ 900 คู่เบส ขึ้นไปในหลายตัวอย่าง และตัวอย่างของไพรเมอร์ Me3/Em3 ในรูปที่ 3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างที่ขนาดขึ้นดีเอ็นเอประมาณ 800 คู่เบส ในตัวอย่าง PP05 และ PP07 นอกจากนี้ได้นำสภาวะดังกล่าวมาใช้กับพืชในสกุล *Phlogacanthus* Nees ชนิดอื่น ได้แก่ ห้อมแดง (PHV) ห้อมคราม (PPE) ห้อมขาว (PPA) และห้อมใต้ลายจุด (PRE) พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพืชแต่ละชนิดอย่างชัดเจน ดังรูปที่ 3x ดังนั้นสภาวะดังกล่าวยังสามารถใช้ร่วมกับพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees ชนิดอื่นๆ อีกด้วย แต่สภาวะที่เหมาะสมนี้ต่างจากสภาวะที่เหมาะสมของการศึกษาใน *Lonicera caerulea* L. [10], พืชสกุล *Linum* [7], *Ziziphus* [11] และ *Cymbidium* [12] เนื่องจากจีโนมของพืชแต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกัน



รูปที่ 2 ผลผลิตพีซีอาร์จากเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ Me5/Em1 กับดีปลากิ่งจำนวน 10 ตัวอย่าง; M คือ VC 100 bp plus DNA Ladder



รูปที่ 3 ผลผลิตพีซีอาร์จากเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ Me3/Em3 กับดีปลากิ่งจำนวน 10 ตัวอย่าง (ก) และพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees (ข); M คือ VC 100 bp plus DNA Ladder

สรุปผลการวิจัย

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาในเทคนิคเอสอาร์เอพี โดยปรับหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ $MgCl_2$, dNTP, เอสอาร์เอพีไพรเมอร์, *Taq* DNA polymerase และดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่าในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมประกอบด้วย 1X Standard *Taq* reaction buffer, $MgCl_2$ 3.0 มิลลิโมลาร์, dNTP 200 ไมโครโมลาร์, ไพรเมอร์ 0.8 ไมโครโมลาร์, *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต และดีเอ็นเอต้นแบบ 40 นาโนกรัม เป็นปฏิกิริยาที่มีความเหมาะสม และยังพบว่าเทคนิคเอสอาร์เอพีมีความเสถียร สามารถทำซ้ำและให้แถบเช่นเดิม สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวเมื่อเปลี่ยนคู่ไพรเมอร์อื่นยังคงเกิดแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน เหมาะสำหรับนำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีปลากิ่ง และประยุกต์ใช้กับพืชสกุล *Phlogacanthus* Nees ชนิดอื่นได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคุณวินัย สมประสงค์ คุณวนิดา เป้าทอง คุณบุญช่วย หลอดเข็ม คุณสุข สีดาวพาลี คุณวิโรจน์ จันทวงศ์ คุณกัญชพร ตันแก้ว และเจ้าหน้าที่จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาเขาหินซ้อนอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] พรรณีย์ วิชชาชู. ศูนย์รวบรวมและอนุรักษ์พันธุกรรมพืชพรรณไทย. น.ส.พ. กสิกร 2553; 83(1): 85-94.
- [2] ประทีป ปัญญาดี. ความหลากหลายของพืชในสวนครัวของชุมชนไทยใหญ่ ในอำเภอปางมะผ้า จังหวัดแม่ฮ่องสอน [วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา] เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2555.
- [3] วินัย สมประสงค์, ปราโมทย์ ไตรบุญ, ยุพดี เผ่าพันธุ์, นพรัตน์ ทูลมาลัย และภัทธรวีร์ พรหมนัส. ความหลากหลายและการใช้ประโยชน์พืชสกุลหอมช้าง (*Phlogacanthus* Nees) ในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 2554; 42 (พิเศษ 2): 656-58.
- [4] วินัย สมประสงค์, จารุวรรณ จาติเสถียร, พงษ์ศักดิ์ พลตรี, กาญจนา พฤษพันธ์, วิลาสินี จิตต์บรรจง, บดินทร สอนสุภาพ, และคณะ. การศึกษาอนุกรมวิธาน และการใช้ประโยชน์ของพืชวงศ์เหงือกปลาหมอในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย [อินเทอร์เน็ต]. 2555 [เข้าถึงเมื่อ 3 พ.ย. 57] เข้าถึงได้จาก: http://www.doa.go.th/research/files/2270_2555.pdf.
- [5] Li G, Quiros CF. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. Theor App Genet 2001;103:455-61.
- [6] Li G, McVetty PBE, Quiros CF. SRAP Molecular marker technology in plant science. In: Anderson SB, editor. Plant Breeding from Laboratories to Fields. Intech 2013;23-44.
- [7] Li D, Zhou Y, Leng C, Su Y and Li M. Optimization of SRAP-PCR reaction system in flax. J Northeast Agric Eniv 2009;16:17-22.
- [8] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. Phytochem Bull 1987;9:11-15.
- [9] Ding G, Zhang D, Ding X, Zhou Q, Zhang W, Li X. Genetic variation and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* based on SRAP analysis. Plant Syst Evol 2008;276:149-56.
- [10] Sun F, Huo J, Qin D. Establishment and optimization of SRAP amplification system in *Lonicera caerulea* L. J Northeast Agric Eniv 2011;18:26-31.
- [11] Li L, Peng JY, Huang RH, Bai RX, Zheng BQ. The orthogonal optimization of SRAP amplification system in Chinese jujube. Acta Hort 2009;840:143-8.
- [12] Ye LX, Jiang Y, Li P, Wang HE, He JR, Liu F, et al. Establishment and optimization of SRAP-PCR reaction system of Chinese cymbidium. Southwest China J Agric Sci 2010;23:1648-51.

เรื่อง

Phytochemical screening, antioxidant and anticancer activities
of *Phlogacanthus pulcherrimus* leaves

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phytochemical screening, antioxidant and anticancer activities of *Phlogacanthus pulcherrimus* leaves

Prussawat Lordkhem¹, Supattra Poeaim^{1*} and Patchanee Charoenying²

¹Department of Biology, ²Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand

*e-mail: poeaim@hotmail.com

Abstract

Phlogacanthus pulcherrimus (Acanthaceae) is widely distributed in northern and northeastern of Thailand. It has been used as an indigenous vegetable and herbal medicine for the treatment of hyperglycemia. The aim of this study was to investigate phytochemicals, antioxidant and anticancer activities of methanolic extract of *P. pulcherrimus* leaves. Phytochemical screening revealed the presence of carbohydrates, alkaloids, phenolic compounds, coumarins and probably triterpenes, diterpenes or sterols. The extract showed total phenolic content of 27.55 ± 0.90 mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract by Folin-Ciocalteu method. Antioxidant activities were measured using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity, the result showed that the methanolic extract had antioxidant capacity with 24.02 ± 1.59 and 33.42 ± 3.10 mg trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)/g extract, respectively. Anticancer activity was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The methanolic extract, concentration at 1000 $\mu\text{g/ml}$, exhibited antiproliferative activity against cancer cell lines (HT-29, KB and HepG2 with 97.01 ± 0.77 , 96.84 ± 2.00 and 91.39 ± 1.54 %, respectively) and also normal cell line (Vero with 90.42 ± 1.10 %). It is suggested that *P. pulcherrimus* has antioxidant and anticancer properties. Therefore, we should be further investigated biologically active compounds for applied to pharmaceutical products.

Keywords: *Phlogacanthus pulcherrimus*, phytochemical screening, antioxidant, anticancer

Introduction

Phlogacanthus pulcherrimus T. Anderson belongs to Acanthaceae family. It is commonly known as Dee Pla Kang and widely distributed in northern and northeastern of Thailand such as Chiang Mai and Tak (Somprasong et al., 2012). *P. pulcherrimus* is a shrub which grows to approximately 2 m high. It has inflorescences in the terminal panicle and tubular purple or mauve flowers. Leaves are edible and they have a slightly bitter and sweet taste (Somprasong, 2014) as well as contain fiber, protein, fat, carbohydrate, sodium, potassium, magnesium, calcium, chromium and iron (Jongrungruangchok et al. 2014). It has been used as an indigenous vegetable and herbal medicine for the treatment of hyperglycemia and diuretics (Wichachoo, 2010; Jongrungruangchok et al. 2014). However, there are no reports about biological activity of *P. pulcherrimus* but there are reports in other *Phlogacanthus* plants. For instance, *P. thyrsiflorus* exhibited analgesic (Mukherjee et al., 2009), antimicrobial (Singh and Singh, 2010; Ahmed et al., 2012; Devi et al., 2012), antioxidant (Chanu et al., 2012; Tassa et al., 2012; Das et al., 2015), antihyperglycemic (Chakravarty and Kalita, 2012) and cytotoxic activities (Tiwary et al., 2015). *P. curviflorus* has antioxidant activity (Seal and Chaudhuri, 2015). Including, *P. turgidus* showed cytotoxic activity (Thu et al., 2010). Therefore, the present study was initiated with the aim of investigating the phytochemicals, antioxidant and anticancer activities of the *P. pulcherrimus* leaves methanolic extract.

Materials and methods

Plant material

P. pulcherrimus leaves were collected from Non Mueang, Na Klang District, Nong Bua Lamphu Province, Thailand in April 2014 and were authenticated, comparing with herbarium specimen in Bangkok herbarium, by Winai Somprasong, Plant Variety Protection Division, Department of Agriculture, Bangkok.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

November 17-20, 2015 Mandarin Hotel Bangkok by Centre Point, Bangkok, Thailand

Preparation of plant extract

The fresh leaves were cut into small pieces, dried in hot air oven (50°C) and then ground to coarse powder. The coarse powder was macerated with methanol in shaking condition for 7 days at room temperature. The extract was filtered through Whatman filter paper (No. 1), concentrated using a rotary evaporator to dryness and stored in refrigerator until use.

Phytochemical screening

The phytochemical screening of methanolic extract was carried out for carbohydrates (Evans, 2002), alkaloids (Farnsworth, 1966; Houghton and Raman, 1998), tannins and phenolic compounds (Farnsworth, 1966; Evans, 2002), coumarins (lactone glycosides), anthraquinone glycosides (Wagner and Bladt, 1996), saponins (Farnsworth, 1966; Santos et al., 1997) and cyanogenic glycosides (Harborne, 1998).

Determination of total phenolic content

Total phenolic content of extract was determined using Folin-Ciocalteu method (Armania et al., 2013). An aliquot of 0.5 ml of methanolic extract was mixed with 2.5 ml of 10% Folin-Ciocalteu solution. After 5 min, 2.0 ml of 7.5% sodium carbonate solution was added and then incubated for 1 h at 40°C. The absorbance was measured at 765 nm using UV-Visible spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Japan). The standard curve was constructed using gallic acid (20-100 µg/ml). The result was expressed as mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract.

Determination of antioxidant activity

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

The DPPH scavenging activity of extract was determined according to the method of Armania et al. (2013) with a slight modification. The 50 µl of methanolic extract was mixed with 0.1 mM DPPH methanolic solution in a 96-well plate. The mixture was kept in the dark for 30 min at room temperature before measured at 492 nm using a microplate reader (Anthos MultiRead 400, Biochrom, UK). The standard curve was constructed using trolox (10-50 µg/ml). The percentage of DPPH radical scavenging activity was calculated by the following equation (1) and expressed as mg trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)/g extract.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{Sample}})}{\text{Abs}_{\text{Control}}} \right] \times 100 \quad (1)$$

When $\text{Abs}_{\text{Control}}$ is absorbance value of DPPH solution + methanol, $\text{Abs}_{\text{Sample}}$ is absorbance value of DPPH solution + extract.

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity

The ABTS scavenging activity of extract was conducted according to the method of Armania et al. (2013). $\text{ABTS}^{\cdot+}$ solution was prepared by reacting 7 mM ABTS solution with 2.45 mM potassium persulfate, 1:1 v/v, and allowing in the dark for 16 h at room temperature. The 1.8 ml $\text{ABTS}^{\cdot+}$ solution, diluted with methanol to absorbance of 0.700 ± 0.020 at 734 nm, was mixed with 0.2 ml of methanolic extract. After 6 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 734 nm using a UV-Visible spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Japan). The standard curve was constructed using trolox (10-50 µg/ml). The percentage of ABTS radical scavenging activity was calculated by the following equation (2) and expressed as mgTEAC/g extract.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{Sample}})}{\text{Abs}_{\text{Control}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

When $\text{Abs}_{\text{Control}}$ is absorbance value of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ solution + methanol, $\text{Abs}_{\text{Sample}}$ is absorbance value of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ solution + extract.

Determination of anticancer activity

Cell culture

The HT-29 (Human colon adenocarcinoma cell line), HepG2 (Human hepatoma cell line) and Vero (African green monkey kidney cell line) were obtained from Dr. Porntipa Picha, Research Division, National Cancer Institute, Bangkok. The KB (Human mouth epidermal carcinoma cell line) was obtained from Scientific Instruments Centre, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok. The cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1640 (RPMI 1640) medium with 10% v/v fetal bovine serum (FBS) and 0.05 µg/ml gentamicin in a humidified incubator containing 5% CO₂ at 37°C.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

The MTT assay proposed by Mosmann (1983) was modified and used to determine antiproliferative activity of extract. Briefly, the cells were trypsinized from T-25 flask and diluted with RPMI 1640 medium with 5% v/v FBS. 100 µl of cells were seeded in each well of 96-well plates at density of 1.5×10^5 cells/ml (HepG2 and HT-29) and 1.8×10^5 cells/ml (KB and Vero). After 24 h of incubation at 37°C, cells were treated with methanolic extract at 62.5-1000 µg/ml (final concentration in each well) and incubated for 20 h at 37°C. The MTT solution (2 mg/ml in phosphate buffer saline) were added in each well and further incubated for 4 h at 37°C. The supernatant were removed from each well and replaced with 100 µl dimethyl sulfoxide: absolute ethanol, 1:1 v/v, to solubilized formazan crystals. The absorbance was measured at 570 nm using a microplate reader (Anthos MultiRead 400, Biochrom, UK). The percentage of inhibition of cell growth was calculated by the following equation (3). The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was estimated using GraphPad Prism 5 software.

$$\text{Inhibition of cell growth (\%)} = \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{Sample}})}{\text{Abs}_{\text{Control}}} \right] \times 100 \quad (3)$$

When Abs_{Control} is absorbance value of cells + medium, Abs_{Sample} is absorbance value of cells + extract.

Results and discussion

Phytochemical screening

The results of phytochemical screening showed the presence of carbohydrates, alkaloids and coumarins (Table 1). For tannins and phenolic compounds test, precipitation with 1% ferric chloride, gelatin and gelatin salt solution is indicative of the presence of tannins and phenolic compounds whereas precipitation only with 1% ferric chloride solution is indicative of the presence of phenolic compounds (Farnsworth, 1966; Evans, 2002). For investigation of saponins, if froth test is negative and hemolysis test is positive, the interpretation is saponins absence, free triterpenes, diterpenes, sterols or related polycyclic substances presence (Farnsworth, 1966).

Table 1: Phytochemical screening of methanolic extract of *P. pulcherrimus* leaves

Test group	Tests/Reagents	Methanolic extract
Carbohydrates	Molisch' test	+
	Benedict's test	+
	Fehling's test	+
Alkaloids	Dragendorff's reagent	+
	Mayer's reagent	+
	Wagner's reagent	+
	Dragendorff's spray reagent	+
Tannins and phenolic compounds	1% Ferric chloride solution	+
	Gelatin solution	-
	Gelatin salt solution	-
Coumarins	Potassium hydroxide reagent	+
Anthraquinone glycosides	Potassium hydroxide reagent	-
Saponins	Froth test	-
	Hemolysis test	+
Cyanogenic glycosides	Guignard's test	-

+: presence; -: absence

Total phenolic content and antioxidant activity

The methanolic extract of *P. pulcherrimus* leaves showed lower total phenolic content of 27.55 ± 0.90 mgGAE/g extract as compare to methanolic extract of *P. thyrsiflorus* and *P. curviflorus* leaves that they showed total phenolic content of 48.75 ± 1.43 and 40.34 ± 0.39 mgGAE/g extract,

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

November 17-20, 2015 Mandarin Hotel Bangkok by Centre Point, Bangkok, Thailand

respectively (Chanu et al., 2012; Seal and Chaudhuri, 2015). The result suggested that the total phenolic content varied from each plant. Antioxidant activities of methanolic extract of *P. pulcherrimus* leaves were measured using DPPH and ABTS radical scavenging activity which it exhibited antioxidant capacity of 24.02 ± 1.59 and 33.42 ± 3.10 mgTEAC/g extract, respectively. On the other hand, Chanu et al. (2012) reported that methanolic extract of *P. thyrsiflorus* leaves determined by using DPPH radical scavenging activity performed antioxidant capacity of 61.07 ± 0.61 mgTEAC/g extract that was higher than this study. It demonstrated that antioxidant activities are contributed by phenolic compounds of extract. The extracts containing high levels of phenolic content generally exhibit high antioxidant activities (Chanu et al., 2012).

Anticancer activity

Antiproliferative activity of methanolic extract of *P. pulcherrimus* leaves as determined using MTT assay is showed in Fig 1 and Table 2. The morphological changes were observed with phase contrast microscope (Fig 2). The control cells remained a normal shape and were attached to the culture surface. On the other hand, cells treated with 1000 $\mu\text{g/ml}$ of extract were irregular, round shape and detached from the culture surface. The methanolic extract of *P. pulcherrimus* leaves exhibited antiproliferative activity against three cancer cell lines, HepG2, HT-29 and KB. Our result was supported with findings of Thu et al. (2010) who reported the methanolic extract of *P. turgidus* displayed cytotoxic activity against HepG2. In contrast, the ethanolic extract from leaves of *P. thyrsiflorus* at 50 $\mu\text{g/ml}$ concentration showed no cytotoxic activity for HepG2 (Tiary et al., 2015). Moreover, both methanolic extract of *P. turgidus* and ethanolic extract *P. thyrsiflorus* leaves have an effect on MCF-7; Human breast cancer cell line (Thu et al., 2010; Tiary et al., 2015). However, it also has an effect against normal cell lines, Vero with IC_{50} value 84.27 $\mu\text{g/ml}$, so it should be additionally investigated before use in cancer treatment.

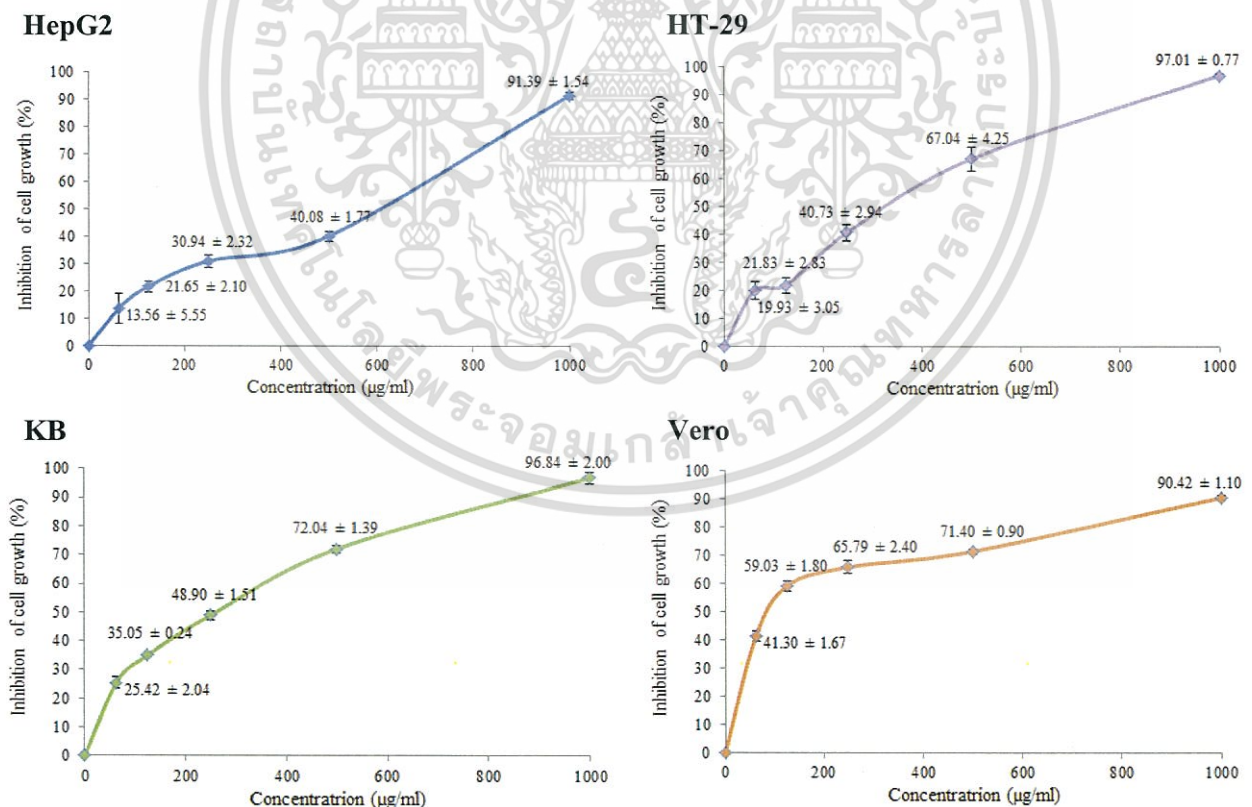


Fig 1: Cytotoxic effect of methanolic extract of *P. pulcherrimus* leaves on HepG2, HT-29, KB and Vero cell lines. Data are shown as mean \pm standard deviation (SD).

Table 2: Cytotoxic activity of methanolic extract of *P. pulcherrimus* leaves

Type	Cell lines	IC ₅₀ (µg/ml)
Cancer cell line	HepG2	642.04
	HT-29	308.00
	KB	259.88
Normal cell line	Vero	84.27

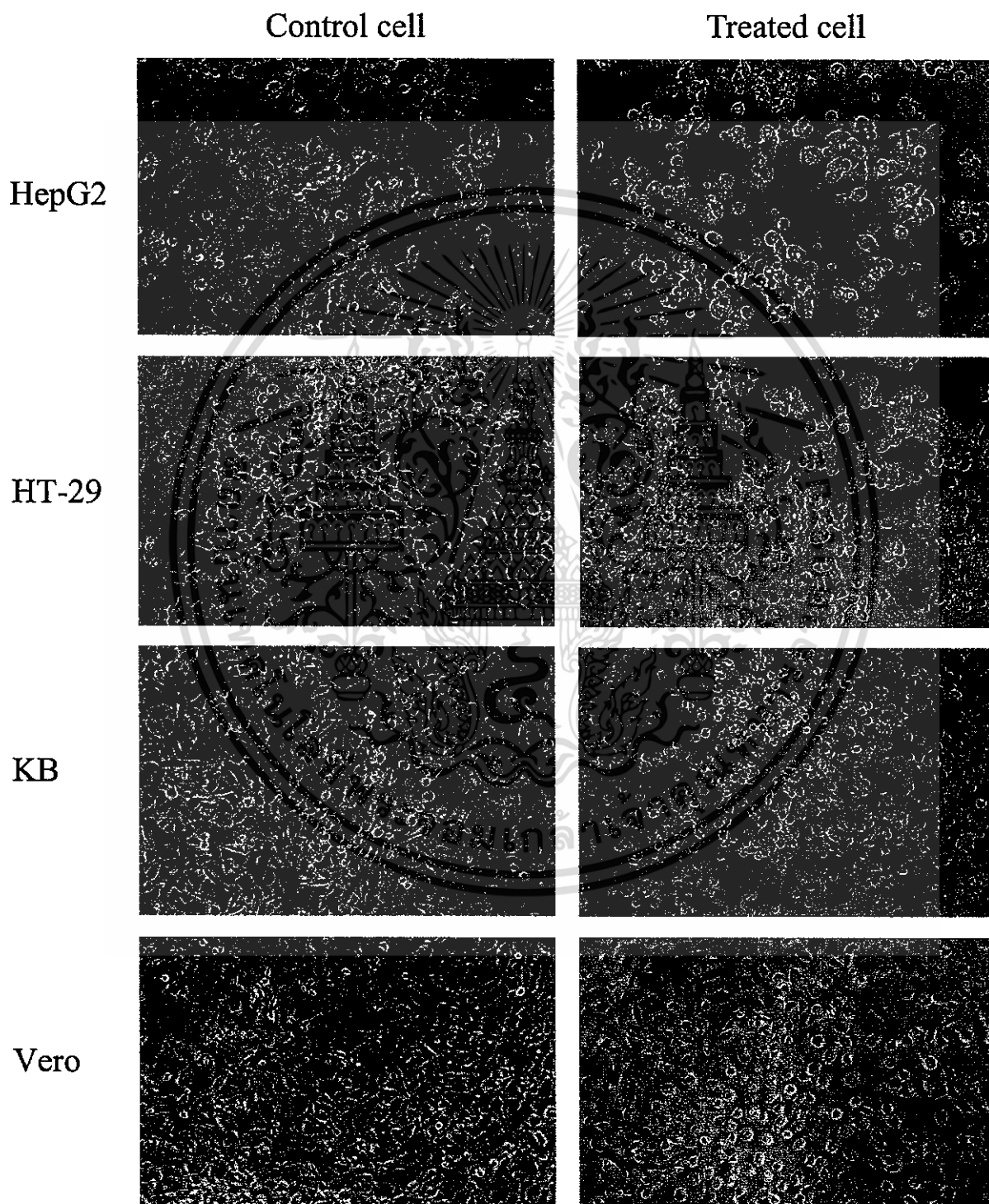


Fig 2: Morphological changes were observed under phase contrast microscope (100X magnification). Left: the control cells; Right: the cells were treated with methanolic extract of *P. pulcherrimus* leaves at 1000 µg/ml for 20 h.

เนื้อหาในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Conclusions

This is perhaps the first study of phytochemical screening, antioxidant and anticancer activities of *P. pulcherrimus* leaves. In our study, the methanolic extract of *P. pulcherrimus* leaves exhibited antioxidant and cytotoxic activities. These activities could be due to synergistic effect of phytochemicals including alkaloids, phenolic compounds, coumarins and probably triterpenes, diterpenes or sterols. Therefore, we should further investigations on identification of biologically active compounds for applications to pharmaceutical products.

Acknowledgements

Authors are thankful to Wanida Baothong for *P. pulcherrimus* leaves sample, Winai Somprasong for authentication of plant and also Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang grant for Master's degree study.

References

- Ahmed, S., Borah, M. and Das, S. 2012. A comparative study of antibacterial activity of the ethanolic extracts of *Phlogacanthus thyrsoiflorus*, *Hottuynia cordata*, *Curcuma caesia* and *Syzygium jumbos*. International Research Journal of Pharmacy. 3(9): 282-285.
- Armania, N., Yazan, L.S., Musa, S.N., Ismail, I.S., Foo, J.B., Chan, K.W., Noreen, H., Hisyam, A.H., Zulfahmi, S. and Ismail, M. 2013. *Dillenia suffruticosa* exhibited antioxidant and cytotoxic activity through induction of apoptosis and G₂/M cell cycle arrest. Journal of Ethnopharmacology. 146(2): 525-535.
- Chakravarty, S. and Kalita, J.C. 2012. Antihyperglycaemic effect of flower of *Phlogacanthus thyrsoiflorus* Nees on streptozotocin induced diabetic mice. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(3): S1357-S1361.
- Chanu, K.V., Ali, M.A. and Kataria, M. 2012. Antioxidant activities of two medicinal vegetables: *Parkia javanica* and *Phlogacanthus thyrsoiflorus*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 4(1): 102-106.
- Das, B.K., Al-Amin, M.M., Chowdhury, N.N., Majumder, M.F.U., Uddin, M.N. and Pavel, M.A.M. 2015. Analgesic, anti-inflammatory and anti-oxidant activities of *Phlogacanthus thyrsoiflorus* leaves. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology. 26(2): 153-159.
- Devi, J., Kotoky, J. and Sarma, T.C. 2012. Application of leaf extracts of *Phlogacanthus thyrsoiflorus* Nees against some fungi pathogenic to onion (*Allium cepa* L.). The Ecoscan: Special issue. 1: 393-396.
- Evans, W.C. 2002. Trease and Evans Pharmacognosy. 15th ed. Edinburgh: W.B. Saunders.
- Farnsworth, N.R. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. Journal of Pharmaceutical Sciences. 55(3): 225-276.
- Harborne, J.B. 1998. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 3rd ed. London: Chapman & Hall.
- Houghton, P.J. and Raman, A. 1998. Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. London: Chapman & Hall.
- Jongrungruangchok, S., Songsak, T. and Wongwiwatthananukit, S. 2014. Evaluation of nutrient and mineral content of the leaves of *Phlogacanthus pulcherrimus* cultivated in Thailand. Bulletin of Health, Science and Technology. 12(1): 22-26.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 65: 55-63.
- Mukherjee, A., Chaliha, M. and Das, S. 2009. Study of analgesic activity of ethanol extract of *Phlogacanthus thyrsoiflorus* on experimental animal models. A Journal of the Bangladesh Pharmacological Society. 4: 147-149.
- Santos, W.R., Bernado, R.R., Pecanha, L.M.T., Palatnik, M., Parente, J.P. and De Souza, C.B.P. 1997. Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*. Vaccine. 15(9): 1024-1029.
- Seal, T. and Chaudhuri, K. 2015. Antioxidant activities of some wild edible plants of Meghalaya state in India and effect of solvent extraction system. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 7(9): 446-450.

เอกสารเรียนการสอน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Singh, S.A. and Singh, N.R. 2010. Antimicrobial activity of *Cassia didymobotrya* and *Phlogacanthus thysiflorus*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2(4): 304-308.
- Somprasong, W., Chartisathian, J., Pholtree, P., Pruesapan, K., Chitbunchong, W., Sonsupab, B., Inthachup, P., Phrmat, P. and Chumngoen, C. 2012. Taxonomic study and utilization of the family Acanthaceae in north, central and northeastern Thailand. [Online]. Available: http://www.doa.go.th/research/files/2270_2555.pdf.
- Somprasong, W. 2014. Taxonomic revision of the subtribe Barlerinae and Andrographinae (Acanthaceae) in Thailand. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy (Botany), Graduate school, Kasetsart University.
- Tassa, B.D., Gogoi, G. and Das, S. 2012. A comparative study of the hypolipidaemic and antioxidant activities of ethanolic extracts of leaves of *Phlogacanthus thysiflorus*, *Oxalis cornicular* L. and *Fragaria vesca* in albino rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*. 2(1): 12-17.
- Thu, N.B., Trung, T.N., Ha, D.T., Khoi, M.N., Hung, T.V., Hien, T.T., Namhui, Y. and Bae, K.H. 2010. Screening of Vietnamese medicinal plants for cytotoxic activity. *Natural Product Sciences*. 16(1): 43-49.
- Tiwary, B.K., Bihani, S., Kumar, A., Chakraborty R. and Ghosh, R. 2015. The *in vitro* cytotoxic activity of ethno-pharmacological important plants of Darjeeling district of West Bengal against different human cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15: 22.
- Wagner, H. and Bladt, S. 1996. *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag.
- Wichachoo, P. 2010. Thai native plants conservation centre. *Kasikorn Magazine*. 83(1): 85-94.