



การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวชและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของสมุนไพร
น้ำคั้นกลางเถียง หญ้าตักแตนและว่านสะหรีกันไทร (วงศ์ผักปราบ)

COMPARATIVE PHARMACOGNOSTIC STUDIES AND ANTIOXIDANT
ACTIVITIES OF *Murdannia gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex*
(FAMILY COMMELINACEAE)

นางสาวสุรรัตน์ เขียวสอาด

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2554

RECEIVED	
BY <i>Am</i>	DATE 1/12/54

T652058



การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสมุนไพร
น้ำคั้นกลางเถียง หญ้าตักแตนและว่านสะหรีกันไทร (วงศ์ผักปราบ)

COMPARATIVE PHARMACOGNOSTIC STUDIES AND ANTIOXIDANT
ACTIVITIES OF *Murdannia gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex*
(FAMILY COMMELINACEAE)

นางสาวสุริรัตน์ เขียวสอาด

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2554

การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของสมุนไพร
น้ำคั้นกลางเถียง หน้้าตักแคนและว่านสะหรืกันไทร (วงศ์ผักปราบ)

นางสาวสุรรัตน์ เขียวสอาด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

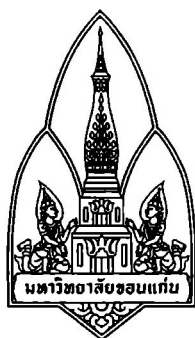
พ.ศ. 2554

**COMPARATIVE PHARMACOGNOSTIC STUDIES AND ANTIOXIDANT
ACTIVITIES OF *Murdannia gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex*
(FAMILY COMMELINACEAE)**

MISS SUREERUT KHAWSAART

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2011



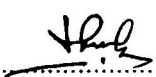
ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
หลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเกสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

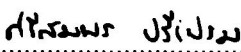
ชื่อวิทยานิพนธ์: การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของสมุนไพร
น้ำคั้นกลางเหียง หญ้าค้ำแดนและว่านสะหรักันไทร (วงศ์ผักปราบ)

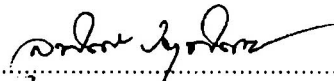
ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์: นางสาวสุริรัตน์ เขียวสอาด

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. วราภรณ์ ภูตะสุน	ประธานกรรมการ
	รศ. ดร. วรพล เองวานิช	กรรมการ
	ผศ. ดร. ศรีสมพร ปรีเปรม	กรรมการ
	ผศ. ดร. ทวีศักดิ์ ชิติเมธาโรจน์	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์:


.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ชิติเมธาโรจน์) อาจารย์ที่ปรึกษา


.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรีสมพร ปรีเปรม) อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม


.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ประสุตพัฒนา) อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ลำปาง แม่นมดachs)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย


.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วงศ์วิวัฒน์ ทศนิยมกุล)
คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

สุริรัตน์ เขียวสอาด. 2554. การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสมุนไพรนำค้ำ
กลางที่ยังงอกแต่นและว่านสะหรี่กันไทร (วงศ์ผักปราบ). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ. ดร. ทวีศักดิ์ ชิตเมธาโรจน์, ผศ. ดร. ศรีสมพร ปรีเปรม,
ผศ. ดร. สุพัตรา ปรสุพัฒนา

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลทางเภสัชเวทของพืชน้ำค้ำกลางที่ยัง (Murdannia gigantea) หย้าตักแต่น (M. macrocarpa) และว่านสะหรี่กันไทร (M. simplex) (วงศ์ผักปราบ) ด้วยวิธีศึกษาจุลลักษณะ (โดยวิธีทำให้ใส และวิธีพาราฟินในส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอก) ศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น (โดยวิธีหาปริมาณรวมของสารสกัดและวิธีทินเลเซอร์โครมาโทกราฟีในสารสกัดด้วยเมทานอล) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง (วิธี Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP และ TBARS) พบว่า

จุลลักษณะ โดยทั่วไปมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในกายวิภาคศาสตร์แผ่นใบ ซึ่งลักษณะที่สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยพืชกลุ่มนี้ ได้แก่ ขนขนาดใหญ่ (macro-hairs) สเตลโลเรงคิมา (sclerenchyma) ที่ขนานตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงและเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว (hypodermis)

ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมจากสารสกัดด้วยเมทานอลพบว่า พืชกลุ่มนี้มีสารองค์ประกอบหลักทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์และฟลาโวนอยด์ แต่จากผลการศึกษารังสีพบสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ ซึ่งเป็นรายงานการค้นพบครั้งแรกจากพืชสกุลนี้ ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างของโครมาโทแกรมประกอบด้วยเอทิลเอซีเตต กรดฟอร์มิก กรดแอซิดิกและน้ำ (125 : 11 : 11 : 13.5)

การศึกษากิจกรรมต้านออกซิเดชันพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ M.gigantea ให้ผลดีที่สุด กล่าวคือ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (มีค่าเทียบเท่ากับ ferulic acid 112.75 ± 3.05 ถึง 145.17 ± 2.97 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัด ในวิธี Folin-Ciocalteu) มีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ($IC_{50} = 181.82 \pm 4.57$ ถึง 399.93 ± 26.78 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด (FRAP value = 0.572 ± 0.017 ถึง 1.253 ± 0.026 Fe²⁺ ไมโครโมล/มิลลิกรัมของสารสกัด) กระนั้นสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินของ M. gigantea และสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดินของ M. simplex มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่า M. macrocarpa ในวิธี TBARS ($IC_{50} = 0.260 \pm 0.017$ ถึง 1.067 ± 0.040 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.347 ± 0.015 ถึง 0.473 ± 0.040 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินมีความสัมพันธ์กันสูงมากกว่าสารสกัดอื่นๆ (วิธี DPPH มีค่า r = 0.918, วิธี FRAP มีค่า r = 0.712 และ วิธี TBARS มีค่า r = 0.643)

Sureerut Khaewsart. 2011. **Comparative Pharmacognostic Studies and Antioxidant Activities of *Murdannia gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* (Family Commelinaceae).** Master of Science Thesis in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Asst. Prof. Dr. Thaweesak Thitimetharoch, Asst. Prof. Dr. Srisomporn Preeprem, Asst. Prof. Dr. Supatra Porasuphatana

ABSTRACT

The comparative pharmacognostic studies of *Murdannia gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* (Family Commelinaceae) were conducted by using microscopic methods (clearing and transverse section: inflorescence bract), phytochemical methods (% yield of extraction and thin layer chromatography: methanolic extract) and *In Vitro* antioxidant activities (Folin-Ciocalteu assay, DPPH assay, FRAP assay and TBARS assay).

Microscopic occurrences generally agree with the previous report of leaf anatomy. Macro-hairs, sclerenchyma along vascular bundle and hypodermis are diagnostic characters for the species.

Thin layer chromatograms of methanolic extract show major components of terpenoids and flavonoids; whereas a minor, alkaloid, is firstly reported in the genus. Solvent system of ethyl acetate : formic acid : acetic acid : water (125 : 11 : 11 : 13.5, v/v) is suitably separated for the chromatogram.

The results of antioxidant activities suggest that methanolic extract from underground part of *M. gigantea* show the highest performance: total phenolic content (from 112.75 ± 3.05 to 145.17 ± 2.97 mg ferulic acid/g extract, Folin-Ciocalteu assay), DPPH[•] radical scavenging capacity (IC_{50} = from 181.82 ± 4.57 to 399.93 ± 26.78 µg/ml) and the ability of ferric reducing-antioxidant power (FRAP assay: FRAP value = from 0.572 ± 0.017 to 1.253 ± 0.026 Fe²⁺ µmole/mg extract). Moreover, aqueous extract from both aerial vegetative part of *M. gigantea* and underground part of *M. simplex* are found to be higher inhibitory activity of lipid peroxidation than *M. macrocarpa* by TBARS assay (IC_{50} = from 0.260 ± 0.017 to 1.067 ± 0.040 mg/ml and from 0.347 ± 0.015 to 0.473 ± 0.040 mg/ml, respectively). The total phenolic content is highly correlated to antioxidant activities in methanolic extract of aerial vegetative part (DPPH assay: $r = 0.918$, FRAP assay: $r = 0.712$ and TBARS assay: $r = 0.643$).

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้แนวคิด ให้ความรู้ ให้คำปรึกษาการทำวิทยานิพนธ์ ปลุกฝังแนวคิดและจริยธรรมของการทำวิจัยตลอดจนการตรวจแก้ไขผลการวิจัยเพื่อเผยแพร่ผลงานทางวิชาการและวิทยานิพนธ์จนได้รูปเล่มฉบับสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรีสมพร ปรีเปรม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา ปรศุพัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือการทำวิทยานิพนธ์ในการศึกษาฤกษ์เคมีและฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

ขอขอบพระคุณ โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T652058 ที่มอบทุนสนับสนุนการศึกษาและจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่มอบทุนส่งเสริมในการทำวิจัยและเอื้อเพื่อสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ โครงการศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยแผ่นใบของพืชสกุลหญ้าปังกิ่ง (TRF-MRG 5080006) ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งประเทศไทย (สกว) ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์การวิจัย

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์กล้องจุลทรรศน์และกล้องถ่ายภาพดิจิทัล ในการศึกษาจุลลักษณะ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ส่งเสริมและสนับสนุนงบประมาณในการเผยแพร่ผลงานวิจัยระดับนานาชาติ

สุดท้าย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุรรัตน์ เขียวสอาด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
ลักษณะพื้นฐานวิทยาพืช	2
วัตถุประสงค์	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การศึกษาจุลลักษณะ	4
การทบทวนวรรณกรรม	4
วิธีดำเนินการศึกษา	5
ผลการศึกษาและอภิปรายผล	6
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	26
บทที่ 3 การศึกษาองค์ประกอบพฤกษเคมีเบื้องต้น	29
การทบทวนวรรณกรรม	29
วิธีดำเนินการศึกษา	34
ผลการศึกษาและอภิปรายผล	36
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	54
บทที่ 4 การศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและการต้านออกซิเดชัน	57
การทบทวนวรรณกรรม	57
วิธีดำเนินการศึกษา	60
ผลการศึกษา	64
สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	85
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาในภาพรวม	89
เอกสารอ้างอิง	91
ภาคผนวก	97
ประวัติผู้เขียน	105

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	แสดงรายละเอียดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจุลลักษณะและอ้างอิง
5	
ตารางที่ 2	แสดงการเปรียบเทียบลักษณะวินิจฉัยทางสัณฐานวิทยาของ <i>M. gigantean</i> , <i>M. macrocarpa</i> และ <i>M. simplex</i>
7	
ตารางที่ 3	ตารางเปรียบเทียบจุลลักษณะแผ่นใบประดับช่อดอกของ <i>M. gigantean</i> , <i>M. macrocarpa</i> และ <i>M. simplex</i>
14	
ตารางที่ 4	แสดงจุลลักษณะวินิจฉัยของแผ่นใบประดับช่อดอกที่สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยพืชกลุ่มนี้
27	
ตารางที่ 5	แสดงรายละเอียดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาพฤกษเคมีและอ้างอิง
35	
ตารางที่ 6	แสดงปริมาณร้อยละของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำที่ได้ค่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืชแต่ละชนิด
37	
ตารางที่ 7	แสดงค่า R_f ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทำละลาย I
43	
ตารางที่ 8	แสดงค่า R_f ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทำละลาย II
44	
ตารางที่ 9	แสดงค่า R_f ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทำละลาย III
45	
ตารางที่ 10	แสดงค่า R_f ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทำละลาย I
51	
ตารางที่ 11	แสดงค่า R_f ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทำละลาย II
52	
ตารางที่ 12	แสดงค่า R_f ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทำละลาย III
53	
ตารางที่ 13	แสดงรายละเอียดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและอ้างอิง
61	
ตารางที่ 14	เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิด โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD
66	
ตารางที่ 15	แสดงค่า IC ₅₀ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและใต้ดินในพืชแต่ละชนิด โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD
70	
ตารางที่ 16	แสดงค่า FRAP value (Fe ²⁺ μ mole/mg extract) ของสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินในพืชแต่ละชนิด โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD
75	

สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 17 แสดงความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิดเปอร้ออกซิเคชันในสมองหนู (IC ₅₀ , มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลจากส่วนเหนือดินและ ส่วนใต้ดินในพืชแต่ละชนิด โดยแสดงค่า Mean ± SD	79

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยา <i>Murdannia gigantea</i>	8
ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยา <i>Murdannia macrocarpa</i>	
ภาพที่ 3 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของ <i>Murdannia gigantea</i> ดอกขาวต้นเล็ก	20
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของ <i>Murdannia gigantea</i> ดอกขาวต้นใหญ่	21
ภาพที่ 5 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของ <i>Murdannia gigantea</i> ดอกขาว โคนกลีบดอกสีม่วง	22
ภาพที่ 6 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของ <i>Murdannia gigantea</i> ดอกม่วง	23
ภาพที่ 7 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของ <i>Murdannia macrocarpa</i>	24
ภาพที่ 8 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของ <i>Murdannia simplex</i>	25
ภาพที่ 9 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีในหุ้มปากกิ้ง	31
ภาพที่ 10 โครงสร้างของแอนโดรกราโฟไลด์	33
ภาพที่ 11 โครงสร้างของกรดเฟอรูลิก	33
ภาพที่ 12 โครงสร้างของรูทีน	34
ภาพที่ 13 โครงสร้างของไพเพอรีน	34
ภาพที่ 14 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ <i>Murdannia gigantea</i> [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm) และ <i>M. simplex</i> (Ms) ในระบบละลาย I โดยใช้ Ferulic acid (Fa), Piperine (Pr) และ Andrographolide (Al) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ	40
ภาพที่ 15 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ <i>Murdannia gigantea</i> [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm) และ <i>M. simplex</i> (Ms) ในระบบทำละลาย II โดยใช้ Ferulic acid (Fa) และ Rutin (Rt) เป็นสารมาตรฐาน เปรียบเทียบ	41
ภาพที่ 16 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ <i>Murdannia gigantea</i> [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm) และ <i>M. simplex</i> (Ms) ในระบบทำละลาย III โดยใช้ Ferulic acid (Fa) และ Andrographolide (Al) เป็นสาร มาตรฐานเปรียบเทียบ	42
ภาพที่ 17 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ <i>Murdannia gigantea</i> [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm) และ <i>M. simplex</i> (Ms) ในระบบทำละลาย I โดยใช้ Ferulic acid (Fa) และ Piperine (Pr) เป็นสารมาตรฐาน	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 18 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ <i>Murdannia gigantea</i> [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm) และ <i>M. simplex</i> (Ms) ในระบบทำละลาย II โดยใช้ Ferulic acid (Fa) และ Rutin (Rt) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ	49
ภาพที่ 19 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ <i>Murdannia gigantea</i> [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm) และ <i>M. simplex</i> (Ms) ในระบบทำละลาย III โดยใช้ Ferulic acid (Fa) และ Andrographolide (Al) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ	50
ภาพที่ 20 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ ferulic acid (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	65
ภาพที่ 21 แสดงค่า Mean $\pm$ SD (n = 4) เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ <i>Murdannia Gigantea</i> [ดอกขาวต้น ขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm3) และ <i>M. simplex</i> (Ms1 และ Ms2) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวทำละลายที่ใช้สกัด	67
ภาพที่ 22 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกระหว่างการสกัด <i>Murdannia gigantea</i> [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm3) และ <i>M. simplex</i> (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD (n = 4) และ * หมายความว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$	68
ภาพที่ 23 แสดงค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH [•] ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (% scavenging) ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและใต้ดินในพืช <i>Murdannia gigantea</i> [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และดอกม่วง: Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm3) และ <i>M. simplex</i> (Ms1 และ Ms2)	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 24 แสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและใต้ดินใน <i>Murdannia gigantea</i> [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm3) และ <i>M. simplex</i> (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD (n = 4) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวทำละลายที่ใช้สกัด	72
ภาพที่ 25 เปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัด <i>Murdannia bracteata</i> (Mb), <i>M. gigantea</i> [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง : Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm3) และ <i>M. simplex</i> (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) Mean $\pm$ SD	73
ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) สำหรับหาค่า FRAP value โดยใช้ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็นสารมาตรฐาน ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	74
ภาพที่ 27 แสดงค่า FRAP value (Fe^{2+} μ mole/mg extract) ของสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินในพืช <i>Murdannia gigantea</i> [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และดอกม่วง: Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm3) และ <i>M. simplex</i> (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD (n = 4) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวทำละลายที่ใช้สกัด	76
ภาพที่ 28 เปรียบเทียบค่า FRAP value (Fe^{2+} μ mole/mg extract) ของสารสกัด <i>Murdannia gigantea</i> [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm3) และ <i>M. simplex</i> (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD	77
ภาพที่ 29 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนู (IC_{50} , มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ <i>Murdannia gigantea</i> [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และดอกม่วง: Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm3) และ <i>M. simplex</i> (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD (n = 3) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวทำละลายที่ใช้สกัด	80

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 30 แสดงค่า IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนู เปรียบเทียบระหว่างสารสกัด <i>Murdannia gigantea</i> [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (w11) และ Mg (w12), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], <i>M. macrocarpa</i> (Mm3) และ <i>M. simplex</i> (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD	81
ภาพที่ 31 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	83
ภาพที่ 32 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH	84

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

B	คือ	Blue
Br	คือ	Brown
cu	คือ	Cutin
D	คือ	Dark
DPPH' RSA	คือ	DPPH' radical scavenging activity
G	คือ	Gray
Gr	คือ	Green
Fa	คือ	Ferulic acid
gh	คือ	Glandular micro-hair
hy	คือ	Hypodermis
L	คือ	Ligh
Mb	คือ	<i>M. bracteata</i>
Mg (pwm)	คือ	<i>M. gigantea</i> (purplish white flower / moderate plant population)
Mg (vm)	คือ	<i>M. gigantea</i> (violet flower / moderate plant population)
Mg (wl)	คือ	<i>M. gigantea</i> (white flower / larger plant population)
Mg (ws)	คือ	<i>M. gigantea</i> (white flower / smaller plant population)
Mm	คือ	<i>M. macrocarpa</i>
Ms	คือ	<i>M. simplex</i>
ne	คือ	Needle-like crystal
O	คือ	Orang
P	คือ	Pink
ph	คือ	Prickle-hairs
pm	คือ	Palisade mesophyll
Pr	คือ	Piperine
R	คือ	Red
rc	คือ	Raphide canal
S	คือ	strong
sc	คือ	Sclerenchyma
sm	คือ	Spongy mesophyll
st	คือ	Stoma
sty	คือ	Styloids

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

TPC	คือ	Total phenolic contents
uh	คือ	Uniseriate-hair
V	คือ	Violet
vb	คือ	Vascular bundle
W	คือ	Weak
Y	คือ	Yellow

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การศึกษาทางเภสัชเวท (pharmacognostic studies) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับยารักษาโรคที่มีต้นกำเนิดจากธรรมชาติ โดยเฉพาะพืชสมุนไพร ได้แก่ การศึกษาทางด้านพฤกษศาสตร์ พฤกษเคมี เภสัชวิทยาและวิทยาศาสตร์สาขาต่าง ๆ เกี่ยวกับสมุนไพรทั้งในส่วนของคุณสมบัติการวินิจฉัยสมุนไพรและผลยาตลอดจนการเตรียมการเก็บรักษาที่ได้จากธรรมชาติ (Trease, Evans, 1972; Evans, 1996) ทั้งนี้การศึกษาทางด้านเภสัชเวทในประเทศไทยยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับทรัพยากรในประเทศซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง

พืชหลายชนิดในสกุลน้ำค้างกลางเที่ยง (*Murdannia*) วงศ์ผักปราบ (Commelinaceae) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปคล้ายคลึงกันมาก การวินิจฉัยเพื่อระบุชนิดพันธุ์ของพืชกลุ่มนี้มีปัจจัยจำกัดในลักษณะจำแนกซึ่งใช้สัณฐานวิทยาส่วนดอก ผลและเมล็ดและมีปัจจัยจำกัดของฤดูกาลและเวลานานของดอก (Thitimetharoch et al, 2004) จากรายงานการศึกษาทางเภสัชเวทของพืชบางชนิดในสกุลเดียวกันนี้ ได้แก่ หญ้าปิกกิ่ง (*Murdannia bracteata*) ผักลิ้มหัวใหญ่ (*M. loriformis*) และกินกุ้งน้อย (*M. nudiflora*) โดยอาศัยลักษณะของโครมาโทแกรมและปฏิกิริยาเคมีตรวจสอบคุณสมบัติทางพฤกษเคมีเบื้องต้นพบว่ามีสารกลุ่มสเตียรอยด์ (steroids) ไตรเทอร์ปีน (triterpenes) แทนนิน (tannins) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นองค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการจำแนกชนิด (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550) โดยเฉพาะสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีรายงานว่าเป็นสารสำคัญหลักในการจัดจำแนก (chemical marker) พืชวงศ์นี้ (Martinez, 1985; Martinez, Swain, 1985)

นอกจากนี้ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและด้านการออกซิเดชันของพืชแต่ละชนิดในสภาพการณ์ต่าง ๆ นำมาใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการจำแนกชนิดได้เช่นกัน (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2551) ซึ่งมีรายงานการศึกษามากมายถึงความสัมพันธ์ในสมุนไพรที่มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันนั้นมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการบำบัดและรักษาโรคต่าง ๆ ที่เป็นผลสืบเนื่องมาจากสารอนุมูลอิสระ เช่น มะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด เบาหวาน การแก่ชรา (Slaga et al, 1995; Kaur, Kapoor, 2001; Willet, 2001; Knekt et al., 2002)

พืชกลุ่มนี้มีการนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้าน เช่น น้ำค้างกลางเที่ยง (*M. gigantea*) ในประเทศไทยใช้ส่วนรากแช่น้ำดื่มและอาบเป็นยาแก้ซางเด็ก (วงศ์สถิต ถั่วกุล และ พรหมจิต ศรีลัมพ์, 2541) ว่านสะหรีกันไทร (*M. simplex*) บนครอยสุเทพใช้ทั้งต้นผสมกับเครื่องยาสมุนไพรชนิดอื่นดัดคั้นแก้ไข้ (บันทึกข้อมูลจากตัวอย่างอ้างอิง Soradet Singhasathit 33 (BKF), Doi Suthep Chiang Mai, July 11, 1958) แต่ไม่ปรากฏรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชในสกุลเดียวกันนี้ เช่น *Murdannia bracteata* มีรายงานการศึกษาทางวิชาการอย่างกว้างขวาง ได้แก่ การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง (พิมลวรรณ ทัพพธรพิจาณ์, 2533; พิมลวรรณ ทัพพธรพิจาณ์, 2534) ฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (สาคร พรประเสริฐ และคณะ, 2544; Jirathariyakul et al., 1998) คุณสมบัติป้องกันการเกิดมะเร็ง (Vinitketkumnue et al., 1996;

Vinitketkumnuen et al., 1999; Intiyot et al., 2002) ฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Wang et al., 2007) ฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน (ธารินี สืบปาละ, 2551; Wang et al., 2007)

การศึกษครั้งนี้จึงเป็นการเพิ่มเติมข้อมูลการศึกษาทางเภสัชเวทและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของ *M. gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวินิจฉัย เป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับพืชที่มีอยู่ในท้องถิ่นและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในวิทยาศาสตร์สาขาอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไป ซึ่งจะให้เกิดการอนุรักษ์ทรัพยากรและองค์ความรู้ของคนในท้องถิ่นได้อย่างยั่งยืน และสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการจัดการความหลากหลายทางชีวภาพต่อไปในอนาคต

ลักษณะฐานวิทยาศาสตร์

น้ำค้างกลางเที่ยง (สุราษฎร์ธานี สตูลและปาดังบารุ) (*Murdannia gigantea* (Vahl) G. Brückn.) มีชื่อเรียกอื่นๆ ว่า หงอนพญานาค ไล่เอียน (อุบลราชธานี) ว่านมูก (หนองคาย) หญ้าหงอนเงือก (ลาว) เป็นไม้ล้มลุกมีอายุหลายปี รากมีลักษณะหนา ใบออกเป็นกระจุกปลายใบแหลมเรียวขอบใบเรียบ กาบใบไม่มีขน ก้านช่อดอกมีลักษณะเรียวาวตั้งตรงออกตรงปลายยอด ช่อดอกเป็นแบบจีนซินนัส (cincinnus) ดอกมีสีม่วงออกน้ำเงิน มีเมือก ก้านดอกยาว 5-8 มิลลิเมตร ผลเป็นแบบแคปซูลมีลักษณะกลมรีเหมือนไข่หรือรูปไข่ ขนาด 5-10 x 4-6 มิลลิเมตร ในหนึ่งห้องมี 2-3 เมล็ด เมล็ดมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูหรือสามเหลี่ยม เมล็ดมีสีน้ำตาลดำหรือสีเทา ออกดอกในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนมกราคม ดอกบานในช่วงเช้าถึงช่วงบ่ายของวัน พบทั่วไปในป่าทุ่งหญ้าขึ้นอยู่ใกล้กับระดับน้ำทะเลจนถึงสูงจากระดับน้ำทะเล 1,400 เมตร (Thitimetharoch et al., 2004)

หญ้าตักแตน (เลย) (*Murdannia macrocarpa* D.Y. Hong) มีชื่อเรียกอื่นๆ ว่า หงอนพญานาค ไล่เอียน (อุบลราชธานี) มีลักษณะทั่วไปคล้ายคลึงกับน้ำค้างกลางเที่ยง แต่แตกต่างกันตรงที่หญ้าตักแตนมีขนาดของผลและเมล็ดใหญ่กว่ามีจำนวนมากกว่าคือ มี 4 เมล็ดในหนึ่งห้องและก้านดอกยาว 9-12 มิลลิเมตร ซึ่งยาวกว่าน้ำค้างกลางเที่ยง ออกดอกในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงเดือนธันวาคม ดอกบานในช่วงสายของวันถึงช่วงบ่าย ในประเทศไทยพบมีการกระจายพันธุ์ที่ แม่ฮ่องสอน (แม่สะเรียง) เชียงใหม่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อุบลราชธานี ชัยภูมินครราชสีมาและพบในประเทศจีน สภาพนิเวศส่วนมากพบในบริเวณที่ปกคลุมด้วยหญ้าและชื้นแฉะ พื้นที่โล่งที่เป็นดินทรายและป่าสน สูงจากระดับน้ำทะเล 1,000-1,800 เมตร (Thitimetharoch et al., 2004)

ว่านสะหรีกันไทร (เชียงใหม่) (*Murdannia simplex* (Vahl) Brenan) มีลักษณะทางฐานวิทยาศาสตร์แตกต่างจากน้ำค้างกลางเที่ยงและหญ้าตักแตนตรงที่ช่อดอกออกทางด้านข้าง บริเวณกาบใบของว่านสะหรีกันไทรมีขน โคนกลีบดอกมีขนและผลมีขนาดเล็กกว่า ผลเป็นแบบแคปซูลรูปไข่ถึงรูปรี เมล็ดมีสีน้ำตาลถึงสีดำ มี 2 เมล็ดในหนึ่งห้อง ออกดอกในช่วงปลายฤดูฝน พบในบริเวณที่ลุ่ม ทุ่งหญ้าขึ้น อยู่ใกล้กับระดับน้ำทะเลจนถึงสูงจากระดับน้ำทะเล 2,700 เมตร มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย อินเดีย อินโดนีเซีย ลาว มาเลเซีย พม่า เวียดนาม จีน และอัฟกานิสถาน (Hong, De Filippis, 2000)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางเภสัชเวทของ *M. gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex* โดยศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอก (inflorescence bract) ศึกษาพฤษเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลองจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของพืชทั้ง 3 ชนิด

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางเภสัชเวทของพืช 3 ชนิด คือ *M. gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex* ด้วยวิธีทางกายวิภาคศาสตร์ (วิธีทำให้ใสและวิธีพาราฟิน) ในส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอก ศึกษาทางพฤษเคมีเบื้องต้น (หาปริมาณรวมของสารสกัดและวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี) ศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง (วิธี DPPH วิธี FRAP วิธี TBARS และ วิธี Folin-Ciocalteu) ของสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทราบลักษณะวินิจฉัยทางเภสัชเวทของพืชทั้ง 3 ชนิด
- ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป

บทที่ 2

การศึกษาจุลลักษณะ

การทบทวนวรรณกรรม

Tomlinson (1969) ศึกษาจุลลักษณะแผ่นใบ กาบใบและส่วนเนื้อเยื่อผิวหนังด้านนอกของลำต้นในพืชวงศ์ ผักปราบ (Family Commelinaceae) ซึ่งได้รวบรวมลักษณะวินิจฉัยทั่วไปที่ใช้ในการจำแนกของพืชวงศ์นี้ คือ เนื้อเยื่อผิวใบ (epidermis) ขน (hairs) ปากใบ (stomata) ชั้นใต้ชั้นเนื้อเยื่อผิว (hypodermis) พาเลิเซทเซลล์ (palisade) ซิลิกา (silica bodies) และผลึกแคลเซียมออกซาเลท (calcium oxalate crystals) โดยเฉพาะลักษณะ ปรากฏของขนจุ่มมีต่อม (glandular micro-hairs) และท่อเมือกที่มีการสะสมผลึกรูปเข็ม (raphide-canals) จัดเป็น จุลลักษณะเด่นของพืชวงศ์นี้และจุลลักษณะสำคัญที่ใช้จัดจำแนก ได้แก่ ขน จะปรากฏ 2 แบบ คือขนจุ่ม 3 เซลล์ และมีต่อม (3-celled glandular micro-hair) ซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้สามารถใช้นาฬิกาและ รูปร่างลักษณะของขนจุ่มในการจำแนกในระดับชนิดได้ ส่วนขนขนาดใหญ่ (macro-hair) สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่ามีความหลากหลายตั้งแต่ขนหลายเซลล์เรียงเป็นแถวเดี่ยว (unicellular hair) ขนแบบตะขอ (hooked-hairs) ขนปุ่ม (papillae) และขนหนาม (prickle-hairs) แต่อย่างไรก็ตามขนขนาดใหญ่จะเปลี่ยนตามสิ่งแวดล้อม ไม่สามารถใช้เป็นลักษณะจัดจำแนกได้

Faden, Inman (1996) ศึกษาทางวิทยาศาสตร์ของแผ่นใบสกุล *Murdannia* ในประเทศอัฟริกา 9 ชนิด ได้สรุปลักษณะเด่นของพืชสกุลนี้ คือมีเนื้อเยื่อผิวบาง (thin epidermis) การสะสมและลวดลายของคิวทิน (cutin patterned) มีความต่อเนื่องของเนื้อเยื่อชั้นรองผิว (hypodermis) บริเวณขอบใบมีกลุ่มเนื้อเยื่อสกลอเรจิมมาชัดเจน และจุลลักษณะวินิจฉัยทั่วไปไม่พบเส้นกลางใบชัดเจน เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวมีหนึ่งถึงหลายชั้นเรียงต่อเนื่องกันอยู่ ด้านบน พบชั้น พาเลิเซท (palisade) 1 หรือ 2 ชั้น มีท่อเมือก (raphide canals) อยู่ใต้ชั้นเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวใบ ด้านบน ปากใบเป็นชนิดที่มีเซลล์ข้างเซลล์คุม 6 เซลล์ (commelina type) พบทั้งด้านบนและด้านล่างของแผ่นใบ หรืออาจพบปากใบชนิดที่มีเซลล์ข้างเซลล์คุม 4 เซลล์ (tradesantia type) บริเวณขอบใบด้านบน

Thitimetharoch et al. (2004, 2005) ได้สรุปลักษณะเด่นของพืชสกุล *Murdannia* คือ รูปแบบลวดลายของคิวทิน ความต่อเนื่องของชั้นใต้ชั้นเนื้อเยื่อผิว พบกลุ่มเนื้อเยื่อสกลอเรจิมมาที่ขอบใบ การศึกษารังนี้ได้อธิบายงานการสะสมผลึกแคลเซียมออกซาเลทขนาดเล็ก (styloids) และแทนนินในชั้นเนื้อเยื่อมีโซฟิลเพิ่มเติมใน *Mrdannia japonica*

ธารินี สืบปาละ และคณะ (2551) รายงานการศึกษาเปรียบเทียบจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของพืช 3 ชนิด ในสกุล *Murdannia* คือ *M. bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora* ซึ่งสรุปว่าลักษณะลวดลายคิวทินที่เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบ ขนขนาดใหญ่และลักษณะของผลึกสามารถใช้เป็นจุลลักษณะวินิจฉัยในระดับสกุลได้ โดย *M. bracteata* และ *M. loriformis* มีการสะสมคิวทินลวดลายลักษณะร่างแห ส่วน *M. nudiflora* มีลวดลายตามยาว ลักษณะเป็นเส้นขนาน ขนขนาดใหญ่ที่เนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างจะพบเฉพาะใน *M. bracteata* และ *M. loriformis* แต่ขนหนามปลายแหลมพบเฉพาะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านบนของ *M. loriformis* เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบผลึกแบบ druse เฉพาะใน *M. loriformis* และ *M. nudiflora*

วิธีดำเนินการศึกษา

1. ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

(1) ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา เก็บส่วนใบประดับช่อดอกของต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจุลลักษณะและอ้างอิง

Samples	Color of flower /population	Locality	Collection date	Vouchers' no.
<i>M. gigantea</i>	white / larger plant	Phu Manorom temple, Mukdahan Province.	08/10/2008	SK, OC & TT 15
<i>M. gigantea</i>	white / larger plant	Soi Sawan waterfall, Ubonratchathani Province.	10/10/2008	SK, OC & TT 18
<i>M. gigantea</i>	white / larger plant	Pha Taem forest, Ubonratchathani Province.	22/08/2009	SK, OC & TT 70
<i>M. gigantea</i>	white / larger plant	Tup Phaya Suea waterfall, Khon Kaen Province.	27/06/2009	SK, OC & TT 41
<i>M. gigantea</i>	white / smaller plant	Ban Chom Manee, Nakhon Phanom Province.	09/08/2009	SK, OC & TT 58
<i>M. gigantea</i>	purplish white / moderate	Phu Rua forest, Loei Province.	27/07/2009	SK, OC & TT 54
<i>M. gigantea</i>	violet / moderate	Phu Phan forest, Sakon Nakhon Province.	20/08/2009	SK, OC & TT 66
<i>M. macrocarpa</i>	violet	Soi Sawan waterfall, Ubonratchathani Province.	10/10/2008	SK, OC & TT 19
<i>M. macrocarpa</i>	violet	Phu Kradueng forest, Loei Province.	07/12/2008	SK, OC & TT 27
<i>M. macrocarpa</i>	violet	Phu Kradueng forest, Loei Province.	29/10/2009	TT, OC & SK 1205
<i>M. simplex</i>	violet	Doi Suthep-Pui forest, Chiang Mai Province.	15/08/2009	SK, OC & TT 59

SK = Sureerut Khaewsaart, OC = Orasa Chaichumporn and TT = Thaweesak Thitimetharoch

(2) อุปกรณ์และเครื่องมือ

ใบมีดโกน เข็มเย็บ พู่กัน ขวดแก้วมีฝาปิดขนาด 5 มิลลิตร ชุดเครื่องมือ แก้ว สไลด์ กระชก ปิดสไลด์ ตะเกียงแอลกอฮอล์ งานเลี้ยงเชื้อ กล้องใส่สไลด์ กล้องจุลทรรศน์ (Olympus BH-2, Japan), กล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Olympus BX-51, Japan), Polarize, Objective micrometer (Olympus, Japan), Hot plate, Hot air oven, Microtome blades, Rotary microtome (Leica RM2035, Germany)

(3) สารเคมี

Paraffin wax, Glacial acetic acid, 95% Ethanol, Absolute Ethanol, Xylene, Mounting media (DePex), Fast-green (Sigma, Germany), Safranin O (Sigma, Germany), Celestine blue B (Sigma, Germany), Sodium hydroxide, Cholral hydrate, Clove oil, Chlorox, Propanol, Formalin, Gelatin, Phenol crystal, Glycerin, Methyl cellosolve (Ajax Finechem, Australia)

2. วิธีการทำให้ใส (Clearing method)

นำส่วนที่ต้องการศึกษามาตัดแล้ววางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อนำตาข่ายไนลอนมาวางทับทำการละลายแรงควัดและทำตัวอย่างให้ใสโดยสารละลายชุดลำดับเอทานอล (ethanol series) 5% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และสารละลายอิมัลชัน chloral hydrate แล้วทำการคั่งน้ำออกด้วยชุดลำดับเอทานอล ซ้อมด้วยสีเซเลสไทน์ บลู บี (celestine blue B) และซาฟรานิน (safranin) ทำการล้างสีด้วย 95% เอทานอล คั่งน้ำออกด้วยเอทานอล 100% เอทานอล 100% กับไซลีน (xylene) อัตราส่วน 1:1 และไซลีน (xylene) บริสุทธิ์ตามลำดับ (Johansen, 1940) นำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ได้ไปผนึกเป็นสไลด์ถาวรด้วยสารเคลือบสังเคราะห์ DePeX ตัวอย่างละ 5 สไลด์ ศึกษารายละเอียดจุลลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ (Johansen, 1940)

3. วิธีการพาราฟิน (Paraffin method)

เป็นการศึกษาภาคตัดขวาง โดยตัดตัวอย่างที่ต้องการศึกษาแช่ในน้ำยา FPA 70 % แล้วทำการดูดอากาศเพื่อให้ น้ำยาเข้าไปอยู่ในทุกส่วนของเซลล์ด้วยเครื่องดูดอากาศ (suction) คั่งน้ำออกจากตัวอย่างด้วยชุดลำดับเอทานอล และเข้าสู่กระบวนการนำพาราฟินเข้าสู่ตัวอย่างฝังชิ้นตัวอย่างในพาราฟินบริสุทธิ์ (embedding) แล้วนำตัวอย่างมาฝังลงบล็อกสำเร็จรูป คัดชิ้นตัวอย่างด้วยเครื่องไมโครโทมแบบใช้มือหมุน (rotary microtome) ยี่ห้อ Leica รุ่น RM2035 หน้า 12-20 ไมโครเมตร ชิ้นตัวอย่างที่ตัดเสร็จแล้วนำไปเข้าสู่กระบวนการติดริบบ่อนบนแผ่นสไลด์ ทำการย้อมสีซาฟรานิน (safranin) และสีฟาสต์กรีน (fast-green) ล้างสีส่วนเกินออกจากนั้นนำไปคั่งน้ำออกด้วยกระบวนการชุดลำดับเอทานอล นำไปผ่าน 100% เอทานอลกับไซลีน (xylene) อัตราส่วน 1:1 และไซลีน บริสุทธิ์ตามลำดับ (Johansen, 1940) นำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ได้ไปผนึกเป็นสไลด์ถาวรด้วยสารเคลือบสังเคราะห์ DePeX ตัวอย่างละ 5 สไลด์ ศึกษารายละเอียดจุลลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ (Johansen, 1940)

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชแต่ละชนิด

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่าง *Murdannia gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex* ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2552 พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนและแตกต่างกัน อีกทั้งยังพบลักษณะผันแปร (variation of characters) ของพืชกลุ่มนี้ (ตารางที่ 1 ภาพที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะวินิจฉัยทางสัณฐานวิทยาของ *M. gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex*

ลักษณะวินิจฉัย	<i>M. gigantea</i>	<i>M. macrocarpa</i>	<i>M. simplex</i>
ใบลักษณะเป็นเส้นยาว (Linear)	ขนาด 15-50 x 0.5-1 เซนติเมตร ผิวใบเกลี้ยง	ขนาด 30-70 x 0.8-1.5 เซนติเมตร ผิวใบเกลี้ยง	ขนาด 28-54 x 1.2-1.7 เซนติเมตร ผิวใบเกลี้ยง
ช่อดอก	ออกตรงกลางของกระจุกใบ	ออกตรงกลางของกระจุกใบ	ออกทางด้านข้างของ กระจุกใบ
กาบใบประดับช่อดอก	ไม่มีขน	ไม่มีขน	มีขน
ความยาวก้านดอกและ ผล (มิลลิเมตร)	5-6	11-14	4-6
สีดอกและสมมาตร ของดอก	กลุ่มดอกสีม่วง: ±สมมาตรด้านข้าง กลุ่มดอกสีขาวและสีขาวโคนม่วง: ± สมมาตรแนวรัศมี	กลุ่มดอกสีม่วง: ±สมมาตร ด้านข้าง	กลุ่มดอกสีม่วง: ±สมมาตร แนวรัศมี
ขนขนาดเล็กที่โคนกลีบ ดอก	ไม่พบในกลุ่มดอกสีม่วงและดอกสี ขาวแต่พบในกลุ่มดอกสีขาวโคน ม่วง	ไม่มี	มี
อับเรณู (Anther) อับเรณูที่เป็นหมัน (Antherode)	สีเทา สีเหลือง	สีเทา สีเหลือง	สีน้ำเงินเทา สีเหลือง
ความยาวผล (มิลลิเมตร)	5-10	12-20	4-6
จำนวนเมล็ดในแต่ละพู (เมล็ด)	2-3	4-5	1-2
ช่วงเวลาบานของดอก	กลุ่มดอกสีม่วงบานช่วง 11.00- 14.00 น. กลุ่มดอกสีขาวและสีขาวโคนม่วง บานช่วง 15.00 -18.00 น.	15.00 -18.00 น.	12.00 -18.00 น.
ฤดูกาลออกดอกและ ติดผล	กลุ่มดอกสีม่วง: ปลายฤดูฝนถึงฤดู หนาว (ตุลาคม - มกราคม) กลุ่มดอกสีขาวและสีขาวโคนม่วง: ฤดูฝน (มิถุนายน - ตุลาคม)	ปลายฤดูฝนถึงฤดูหนาว (กันยายน - มกราคม)	ฤดูฝนถึงฤดูหนาว (มิถุนายน - มกราคม)



ภาพที่ 1 ลักษณะพื้นฐานวิทยา *Murdannia gigantea* ก. ช่อดอกที่ออกตรงปลายยอด ข. ผิวกาบใบประดับช่อดอก
เกลี้ยง ค. ดอกสีม่วงมีสมมาตร ± แบบด้านข้าง ง. ดอกสีขาวมีสมมาตร ± แนวรัศมี จ. ดอกสีขาวโคนม่วง
มีสมมาตร ± แนวรัศมี และ ฉ. ลักษณะช่อดอกย่อย (cincinni) และผลแห้งแก่แล้วแตกกลางพู



ก

ง

ภาพที่ 2 ลักษณะฐานวิทยา *Murdannia macrocarpa* (ก. - ข.) และ *M. simplex* (ค. - ง.): ก. ช่อดอกย่อย (cincinni) มีสีขาวและขาวคล้ายขี้ตังแตน ข. ดอกสีม่วงมีขนาด $\pm$ แบบด้านข้าง ค. ช่อดอกออกทางด้านข้างของกระจุกใบ ง. ลักษณะดอก

2. จุลลักษณะแผ่นใบประดับช่อดอกของ *M. gigantea*

2.1 กลุ่มดอกสีขาวต้นขนาดเล็ก (ตารางที่ 3 ภาพที่ 3)

(1) วิธีทำให้ใส เนื้อเยื่อผิว (Epidermis) ทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทิน (cutin) สะสมเห็นชัดเจนเป็นลวดลายขนานตามยาว (striate) (ภาพที่ 3 ข) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 100-200 ไมครอน กว้าง 25-45 ไมครอน (ภาพที่ 3 ค) ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 65-130 ไมครอน กว้าง 27-40 ไมครอน (ภาพที่ 3 ข) ปากใบพบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์กระจายบริเวณใกล้ขอบใบในเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน และเรียงเป็นแนวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 3 ข) เซลล์ขนพบชนิดที่มีต่อม (glandular micro-hairs) 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบอกยาว 67-88 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและยาว 27-40 ไมครอนบนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 3 ข-ค) ไม่พบขนขนาดใหญ่ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง ขอบใบเซลล์มีรูปร่าง 5-6 เหลี่ยม พบขนหนาม 2-3 เซลล์ (prickle-hairs) เรียงเป็นแถวเดียว (ภาพที่ 3 ก) เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว (hypodermis) เมื่อมองจากด้านบนของแผ่นใบมีรูปร่าง 5-6 เหลี่ยม และชั้นถัดไปเป็นชั้นมีโซฟิลล์ (mesophyll) เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นรูปร่างกลมเรียงชิดกันของพาลิเซดเซลล์ พบผลึกรูปปริซึมและผลึกรูปเข็ม (ภาพที่ 3 ค) พบลักษณะท่อลำเลียงมีลวดลายเป็นแบบเกลียวเวียน

(2) วิธีพาราฟิน (ภาพที่ 3 จ-ข) จากภาคตัดขวาง เนื้อเยื่อผิวพบการสะสมคิวตินที่ผิวใบ ลักษณะรูปร่างเนื้อเยื่อผิวมีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้ามี 1 ชั้นเซลล์ ปากใบกระจายตัวบริเวณผิวแผ่นใบด้านล่าง เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวปรากฏเฉพาะด้านบนมี 3-4 (-5) ชั้นเซลล์ เรียงกันอย่างต่อเนื่องจากกลางใบถึงขอบใบและจะลดลงเหลือเพียง 1-3 ชั้นเซลล์ เมื่อใกล้บริเวณขอบใบ เนื้อเยื่อชั้นมีไซฟิลล์ประกอบด้วยชั้นแพลิสเซด (palisade) มีลักษณะเป็นรูปแท่งทรงกระบอกหรือรูปกรวย เรียงตัวต่อเนื่อง 1-2 ชั้นเซลล์ ทางด้านบนและล่างตรงกลางคือชั้นสpongiform มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ 4-5 ชั้นเซลล์ ตรงกลางของชั้นนี้พบท่อผลึก (raphide canal) เรียงตัวเป็นระเบียบอยู่ทางด้านล่างของแนวท่อลำเลียง ผลึกรูปแท่งและผลึกแคลเซียมออกซาเลตขนาดเล็ก (styloids) กระจายทั่วไปในชั้นนี้ พบกลุ่มเนื้อเยื่อสเคลอเรนคิมา (sclerenchyma) บริเวณขอบใบ 10-13 ชั้นเซลล์และตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงทางด้านล่างของแผ่นใบ 6-8 (-10) ชั้นเซลล์ มีเยื่อหุ้มสเคลอเรนคิมา (sclerenchyma bundle) 1 ชั้นเซลล์ ระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียงประกอบด้วยมัดท่อลำเลียง (vascular bundle) 2 ขนาด รูปไข่หรือรูปรีเรียงเป็นแถวเดียวขนานกับเนื้อเยื่อชั้นผิวมีมัดท่อลำเลียงขนาดใหญ่ 1 กลุ่ม สลับกับขนาดเล็ก 2 -3 กลุ่ม ประกอบด้วยไซเล็มมีเวสเซล 1-2 เซลล์ อยู่ด้านบนและโฟลเอ็มอยู่ทางด้านล่างของมัดท่อลำเลียงมีเยื่อหุ้มท่อลำเลียง 1 ชั้นเซลล์ มีเซลล์ไฟเบอร์แทรกเรียงตัวอยู่ด้านบนของไซเล็มและด้านล่างของโฟลเอ็ม

2.2 กลุ่มคอกกีชาวดินขนาดใหญ่

(1) วิธีทำให้ใส เนื้อเยื่อผิวทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวตินสะสมเห็นชัดเจนเป็นลวดลายขนานตามยาว (ภาพที่ 4 ข) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 180-350 ไมครอน กว้าง 25-45 ไมครอน (ภาพที่ 4 ค) ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 87-200 ไมครอน กว้าง 20-35 ไมครอน (ภาพที่ 4 ข) ปากใบพบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ กระจายตามแนวขอบใบในผิวใบด้านบน และเรียงเป็นแนวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างแนวเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 4 ข) เซลล์ขนพบชนิดที่มีต่อม 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบอกยาว 50-70 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและยาว 30-43 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 4 ข-ค) ไม่พบขนขนาดใหญ่ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง ขอบใบเซลล์มีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้า พบขนปุ่มและขนหนาม 2-3 เซลล์ เรียงเป็นแถวเดียว (ภาพที่ 4 ก) เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวเมื่อมองจากด้านบนของแผ่นใบมีรูปร่าง 4-6 เหลี่ยมและชั้นถัดไปเป็นชั้นมีไซฟิลล์เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นรูปร่างกลมเรียงชิดกันของพาลิเซดเซลล์ พบผลึกรูปปริซึมและผลึกรูปเข็ม (ภาพที่ 4 ฉ) ระบบท่อลำเลียงพบลักษณะท่อลำเลียงมีลวดลายเป็นแบบเกลียวเวียน

(2) วิธีพาราฟิน (ภาพที่ 4 จ-ข) จากภาคตัดขวาง เนื้อเยื่อผิวพบการสะสมคิวตินที่ผิวใบ ลักษณะรูปร่างเนื้อเยื่อผิวมีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้ามี 1 ชั้นเซลล์ ปากใบกระจายตัวบริเวณผิวแผ่นใบด้านล่าง เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวปรากฏเฉพาะด้านบนมี 3-4 (-5) ชั้นเซลล์ เรียงกันอย่างต่อเนื่องจากกลางใบถึงขอบใบและจะลดลงเหลือเพียง 1-3 ชั้นเซลล์ เมื่อใกล้บริเวณขอบใบ มีไซฟิลล์ประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นแพลิสเซดมีลักษณะเป็นรูปแท่งทรงกระบอก หรือรูปกรวยเรียงตัวต่อเนื่อง 1-2 ชั้นเซลล์ ทางด้านบนและล่างตรงกลางคือชั้นสpongiform มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ 4-5 ชั้นเซลล์ พบท่อผลึก ผลึกรูปแท่งและผลึกแคลเซียมออกซาเลตขนาดเล็กกระจายทั่วไปในชั้นนี้ พบกลุ่มเนื้อเยื่อสเคลอเรนคิมาบริเวณขอบใบ 10-13 ชั้นเซลล์ และตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงทาง ด้านล่างของแผ่นใบมี 6-8 (-10) ชั้นเซลล์ มีเยื่อหุ้มสเคลอเรนคิมา 1 ชั้นเซลล์ ระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียง ประกอบด้วยมัดท่อลำเลียง 2 ขนาด รูปไข่หรือรูปรีเรียงเป็นแถวเดียวขนานกับ เนื้อเยื่อชั้นผิว

มีมัดท่อลำเลียงขนาดใหญ่ 1 กลุ่ม สลับกับขนาดเล็ก 2-3 กลุ่ม ประกอบด้วยไขเล็มมีเวสเซล 1-2 เซลล์ อยู่ด้านบน และโฟลเอ็มอยู่ทางด้านล่างของมัดท่อลำเลียงมีเยื่อหุ้มท่อลำเลียง 1 ชั้นเซลล์ มีเซลล์ไฟเบอร์แทรกเรียงตัวอยู่ด้านบนของไขเล็มและด้านล่างของโฟลเอ็ม

2.3 กลุ่มคอกกิสขาวโคนกลีบคอกกิสม่วง

(1) วิธีทำให้โต เนื้อเยื่อผิวทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวตินสะสมเห็นชัดเจนเป็น ลวดลายขนานตามยาว (ภาพที่ 5 ข) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 130-275 ไมครอน กว้าง 22-38 ไมครอน (ภาพที่ 5 ง) ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 87-200 ไมครอน กว้าง 22-35 ไมครอน (ภาพที่ 5 ข-ค) ปากใบพบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ กระจายตัวบริเวณขอบใบ ของผิวใบด้านบนและเรียงเป็นแนวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างแนวเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 5 ข-ค) เซลล์ขนพบชนิดที่มีต่อม 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบองยาว 47-70 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบ ด้านบนและยาว 27-45 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 5 ข-ค) ไม่พบขนขนาดใหญ่ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบ ด้านบนและด้านล่าง ขอบใบเซลล์มีรูปร่างสี่เหลี่ยม พบขนปุ่ม ขนหนาม 2-3 เซลล์ เรียงเป็นแถวเดียว (ภาพที่ 5 ก) เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวเมื่อมองจากด้านบนของแผ่นใบมีรูปร่าง 4-6 เหลี่ยมและชั้นถัดไปเป็นชั้นมีซิฟิลล์เมื่อมอง จากด้านบนจะเห็นรูปร่างกลมเรียงชิดกันของพาลิเซดเซลล์ พบผลึกรูปปริซึม ระบบท่อลำเลียงพบลักษณะท่อ ลำเลียงมีลวดลายเป็นแบบเกลียวเวียน

(2) วิธีฟาราฟิน (ภาพที่ 5 จ-ช) จากภาคตัดขวาง เนื้อเยื่อผิวพบการสะสมคิวตินที่ผิว ใบ ลักษณะรูปร่างเนื้อเยื่อผิวเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้ามี 1 ชั้นเซลล์ เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวปรากฏเฉพาะด้านบนมี 3-4 (-5) ชั้นเซลล์ เรียงกันอย่างต่อเนื่องจากกลางใบถึงขอบใบและจะลดลงเหลือเพียง 1-3 ชั้นเซลล์ เมื่อใกล้บริเวณ ขอบใบ พบผลึกรูปแท่งและผลึกแคลเซียมออกซาเลตขนาดเล็กกระจายทั่วไป ชั้นมีซิฟิลล์ประกอบด้วย 2 ชั้น จากผิวแผ่นใบด้านบน คือชั้นแพลิสเดมีลักษณะเป็นรูปแท่งทรงกระบอกหรือรูปกรวยเรียงตัวต่อเนื่อง 1-2 ชั้น เซลล์ ทั้งด้านบนและด้านล่างตรงกลางคือชั้นสpongijiมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ 3-5 ชั้น เซลล์ พบท่อผลึกกระจายตัวตรงกลางทางด้านล่างของแนวท่อลำเลียง ผลึกรูปแท่งและผลึกแคลเซียมออกซาเลต ขนาดเล็กกระจายทั่วไปในชั้นนี้ พบกลุ่มเนื้อเยื่อสเคลอเรนคิมาบริเวณขอบใบ 11-13 ชั้นเซลล์ และปรากฏตาม แนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงทางด้านล่างของแผ่นใบ 4-7 (-8) ชั้นเซลล์ มีเยื่อหุ้มสเคลอเรนคิมา 1 ชั้นเซลล์ ระบบ เนื้อเยื่อท่อลำเลียงประกอบด้วยมัดท่อลำเลียง 2 ขนาด ขนาดใหญ่รูปรีหรือรูปไข่ ขนาดเล็กรูปกลมเรียงเป็นแถว เดียวขนานกับเนื้อเยื่อชั้นผิวมีขนาดใหญ่ 1 กลุ่ม สลับกับขนาดเล็ก 2 กลุ่ม ประกอบด้วยไขเล็มมีเวสเซล 3-5 เซลล์ มีเยื่อหุ้มท่อลำเลียง 1 ชั้นเซลล์ มีเซลล์ไฟเบอร์แทรกเรียงตัวอยู่ด้านบนของไขเล็มและด้านล่างของโฟลเอ็ม

2.4 กลุ่มคอกกิสม่วง

(1) วิธีทำให้โต เนื้อเยื่อผิวทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวตินสะสมเห็นชัดเจนเป็น ลวดลายขนานตามยาว (ภาพที่ 6 ข) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 115-270 ไมครอน กว้าง 25-40 ไมครอน (ภาพที่ 6 ค) ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 82-220 ไมครอน กว้าง 22-38 ไมครอน (ภาพที่ 6 ข) ปากใบพบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ กระจายตามแนวขอบใบใน ผิวใบด้านบนและเรียงเป็นแนวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างแนวท่อลำเลียงของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 6 ข) เซลล์ขนพบชนิดที่มีต่อม 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบองยาว 42-70 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน

และยาว 30-45 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 6 ค) ไม่พบขนขนาดใหญ่ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง ขอบใบเซลล์มีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้า พบขนปุ่ม ขนหนาม 2-3 เซลล์ เรียงเป็นแถวเดียว (ภาพที่ 6 ก) เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวเมื่อมองจากด้านบนของแผ่นใบมีรูปร่าง 4-6 เหลี่ยมและชั้นถัดไปเป็นชั้นมีซิฟิลล์เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นรูปร่างกลมเรียงชิดกันของ พาลิเซดเซลล์ พบผลึกรูปปริซึมและผลึกรูปเข็ม ระบบท่อลำเลียงพบลักษณะท่อลำเลียงมีลวดลายเป็นแบบเกลียวเวียน (ภาพที่ 6 ง)

(2) วิธีพาราฟิน (ภาพที่ 6 จ-ข) จากภาคตัดขวาง เนื้อเยื่อผิวพบการสะสมคิวทินที่ผิวใบ ลักษณะรูปร่างเนื้อเยื่อผิวมีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้า ปากใบกระจายตัวบริเวณผิวแผ่นใบด้านล่าง เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวปรากฏเฉพาะด้านบนมีเพียง 2-3 ชั้นเซลล์ เรียงกันอย่างต่อเนื่องจากกลางใบถึงขอบใบและจะลดลงเหลือเพียง 1 ชั้นเซลล์ เมื่อใกล้บริเวณขอบใบ ชั้นมีซิฟิลล์ประกอบด้วย 2 ชั้น จากผิวแผ่นใบด้านบน คือชั้นแพลิสเทมมีลักษณะเป็นรูปแท่งทรงกระบอกหรือรูปกรวยเรียงตัวต่อเนื่อง 1-2 ชั้นเซลล์ ทางด้านบนและถัดลงมา คือชั้นสปองจีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ 3-5 ชั้นเซลล์ พบท่อผลึก ผลึกรูปแท่งและผลึกแคลเซียมออกซาเลตขนาดเล็กกระจายทั่วไปในชั้นนี้ พบกลุ่มเนื้อเยื่อสเคลอเรนไคมาบริเวณขอบใบ 8-10 ชั้นเซลล์ และปรากฏตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงทางด้านล่างของแผ่นใบ 3-4 ชั้นเซลล์ มีเยื่อหุ้มสเคลอเรนไคมา 1 ชั้นเซลล์ ระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียงประกอบด้วยมัดท่อลำเลียง 2 ขนาด ขนาดใหญ่รูปรีหรือรูปไข่ ขนาดเล็กรูปกลม เรียงเป็นแถวเดียวขนานกับเนื้อเยื่อชั้นผิวมีขนาดใหญ่ 1 กลุ่ม สลับกับขนาดเล็ก 2 กลุ่ม ประกอบด้วยไซเล็มมีเวสเซล 1-2 เซลล์ มีเยื่อหุ้มท่อลำเลียง 1 ชั้นเซลล์ ไม่พบเซลล์ไฟเบอร์ที่เยื่อหุ้มท่อลำเลียง

3. จุลลักษณะแผ่นใบประดับช่อดอกของ *M. macrocarpa* (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 7)

(1) วิธีทำให้ใส เนื้อเยื่อผิวทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทินสะสมเห็นชัดเจนเป็นลวดลายขนานตามยาว (ภาพที่ 7 ข) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 157-300 ไมครอน กว้าง 15-35 ไมครอน (ภาพที่ 7 ค) ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 110-265 ไมครอน กว้าง 15-38 ไมครอน (ภาพที่ 7 ข) รูปร่างเซลล์ที่อยู่บริเวณแนวท่อลำเลียงจะมีขนาดแคบและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่ระหว่างแนวท่อลำเลียง ปากใบพบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ กระจายตามแนวขอบใบในผิวใบด้านบนและเรียงเป็นแนวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างแนวท่อลำเลียงของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 7 ข) เซลล์ขนพบขนจี้วที่มีต่อม 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบอกยาว 50-88 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและยาว 45-50 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง ไม่พบขนขนาดใหญ่ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง ขอบใบเซลล์มีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้า พบขนปุ่ม ขนหนาม 2-3 เซลล์ เรียงเป็นแถวเดียว (ภาพที่ 7 ก) เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวเมื่อมองจากด้านบนของแผ่นใบมีรูปร่าง 4-6 เหลี่ยมและชั้นถัดไปเป็นชั้นมีซิฟิลล์เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นรูปร่างกลมเรียงชิดกันของพาลิเซดเซลล์ พบผลึกรูปปริซึม ท่อลำเลียงมีลักษณะลวดลายเป็นแบบเกลียวเวียน

(2) วิธีพาราฟิน (ภาพที่ 7 จ-ข) จากภาคตัดขวาง เนื้อเยื่อผิวพบการสะสมคิวทินที่ผิวใบ ลักษณะรูปร่างเนื้อเยื่อผิวเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า พบผลึกที่ไม่สะท้อนแสงโพลาไรซ์บริเวณเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบ ปากใบ กระจายตัวบริเวณผิวแผ่นใบด้านล่าง เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวปรากฏด้านบนมี 2-3 ชั้นเซลล์ เรียงกันอย่างต่อเนื่องจากกลางใบถึงขอบใบและจะลดลงเหลือเพียง 1 ชั้นเซลล์เมื่อใกล้บริเวณขอบใบ ด้านล่างมีเพียง 1-2 ชั้นเซลล์ ตรงแนวเส้นกลางใบ ชั้นมีซิฟิลล์พบแพลิสเทมมีลักษณะเป็นรูปแท่งทรงกระบอกหรือรูปกรวยทั้งด้านบนและด้านล่าง มี 2-3 ชั้นเซลล์ ตรงกลางคือชั้นสปองจีมีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอนจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ

3-4 ชั้นเซลล์ พบท่อผลึก ผลึกรูปแท่งและผลึกแคลเซียมออกซาเลตขนาดเล็กกระจายทั่วไปในชั้นนี้ พบกลุ่มเนื้อเยื่อสเคลอเรนไคมาบริเวณขอบใบ 7-8 ชั้นเซลล์ และปรากฏตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงทางด้านล่างของแผ่นใบ 3-4 ชั้นเซลล์ มีเยื่อหุ้มสเคลอเรนไคมา 1 ชั้นเซลล์ ระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียงประกอบด้วยมัดท่อลำเลียง 2 ขนาด ขนาดใหญ่รูปรีหรือรูปไข่ ขนาดเล็กรูปกลมเรียงเป็นแถวเดียวขนานกับเนื้อเยื่อชั้นผิวมีขนาดใหญ่ 1 กลุ่ม สลับกับขนาดเล็ก 3 กลุ่ม ประกอบด้วยไซเล็มมีเวสเซล 1-2 เซลล์ มีเยื่อหุ้มท่อลำเลียง 2 ชั้นเซลล์ มีเซลล์ไฟเบอร์แทรกเรียงตัวอยู่ด้านบนของไซเล็มเพียงและด้านล่างของโฟลเอ็ม

4. จุดลักษณะแผ่นใบประดับข้อคอกของ *M. simplex* (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 8)

(1) วิธีทำให้ใส เนื้อเยื่อผิวทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทินสะสมเห็นชัดเจนเป็นลวดลายขนานตามยาว (striate) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 170-270 ไมครอน กว้าง 25-38 ไมครอน (ภาพที่ 8 ข) ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดยาว 80-220 ไมครอน กว้าง 22-38 ไมครอน (ภาพที่ 8 ค) ปากใบ พบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คู่ 6 เซลล์ กระจายตามแนวขอบใบในผิวใบด้านบนและเรียงเป็นแนวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างแนวท่อลำเลียงของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 8 ค) เซลล์ขน พบชนิดที่มีต่อม 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบองยาว 72-100 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน และยาว 62-95 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 8 ค-ง) พบขนขนาดใหญ่ 3-4 เซลล์ เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง (ภาพที่ 8 ข) ขอบใบเซลล์มีรูปร่าง 5-6 เหลี่ยม พบขนปุ่ม ขนหนาม 2-3 เซลล์ เรียงเป็นแถวเดียว (ภาพที่ 8 ก) เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวเมื่อนมองจากด้านบนของแผ่นใบมีรูปร่าง 4-6 เหลี่ยม และชั้นถัดไปเป็นชั้นมีซิฟิลล์เมื่อนมองจากด้านบนจะเห็นรูปร่างกลมเรียงชิดกันของพาลิเซดเซลล์ พบผลึกรูปปริซึมและผลึกรูปเข็ม (ภาพที่ 8 ง) ระบบท่อลำเลียงพบลักษณะท่อลำเลียงมีลวดลายเป็นแบบเกลียวเวียน

(2) วิธีพาราฟิน (ภาพที่ 8 จ-ช) จากภาคตัดขวาง เนื้อเยื่อผิวพบการสะสมคิวทินที่ผิวใบ ลักษณะรูปร่างเนื้อเยื่อผิวมีรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ปากใบกระจายตัวบริเวณผิวแผ่นใบด้านล่างและพบขนขนาดใหญ่ 3-4 เซลล์ ทั้งด้านบนและด้านล่าง เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว มี 1-2 (-3) ชั้นเซลล์ ทั้งด้านบนและด้านล่าง เรียงกันอย่างต่อเนื่องจากกลางใบถึงขอบใบและจะลดลงเหลือเพียง 1 ชั้นเซลล์ เมื่อใกล้บริเวณขอบใบ ส่วนตรงแนวเส้นกลางใบจะมี 3-4 ชั้นเซลล์ทั้งด้านบนและล่าง ชั้นมีซิฟิลล์ประกอบด้วย 2 ชั้น จากผิวแผ่นใบด้านบนคือชั้นแพลเลตมีลักษณะเป็นรูปกลมรีเรียงตัวต่อเนื่อง 1(-2) ชั้นเซลล์ ถัดลงมา คือชั้นสpongijimลักษณะเป็นรูปกลมจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ 2-3 ชั้นเซลล์ และพบท่อผลึก ผลึกรูปแท่งและผลึกแคลเซียมออกซาเลตขนาดเล็กกระจายทั่วไปในชั้นนี้ (ภาพที่ 8 ข) ไม่พบเซลล์สเคลอเรนไคมาตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงทางด้านล่างของแผ่นใบ ระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียงประกอบด้วยมัดท่อลำเลียง 2 ขนาด ขนาดใหญ่รูปรี หรือรูปไข่ ขนาดเล็กรูปกลมเรียงเป็นแถวเดียวขนานกับเนื้อเยื่อชั้นผิวมีขนาดใหญ่ 1 กลุ่มสลับกับขนาดเล็ก 3 (-4) กลุ่ม ประกอบด้วยไซเล็มมีเวสเซล 1-2 เซลล์ มีเยื่อหุ้มท่อลำเลียง 1 ชั้นเซลล์ ไม่มีเซลล์ไฟเบอร์ในเยื่อหุ้มท่อลำเลียง

ตารางที่ 3 ตารางเปรียบเทียบพฤกษลักษณะแผ่นใบประดับข้อดอกของ *M. gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex*

ลักษณะ	<i>M. gigantea</i>				<i>M. macrocarpa</i>	<i>M. simplex</i>
	ดอกขาวต้นเล็ก	ดอกขาวต้นใหญ่	ดอกขาวโคนม่วง	ดอกม่วง		
ระบบเนื้อเยื่อผิว 1. ผิวใบด้านบน - ลวดลายตามยาว - รูปร่างเซลล์ - ปากใบ	ลวดลายตามยาว	ลวดลายตามยาว	ลวดลายตามยาว	ลวดลายตามยาว	ลวดลายตามยาว	ลวดลายตามยาว
	สี่เหลี่ยมผืนผ้า	สี่เหลี่ยมผืนผ้า	สี่เหลี่ยมผืนผ้า	สี่เหลี่ยมผืนผ้า	สี่เหลี่ยมผืนผ้า	สี่เหลี่ยมผืนผ้า
	เซลล์ข้างเคียงเซลล์ มุม 6 เซลล์ กระจาย ตามแนวขอบใบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์ มุม 6 เซลล์ กระจาย ตามแนวขอบใบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์ มุม 6 เซลล์ กระจาย ตามแนวขอบใบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์มุม 6 เซลล์ กระจายตาม แนวขอบใบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์ มุม 6 เซลล์ กระจาย ตามแนวขอบใบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์ มุม 6 เซลล์ กระจาย ตามแนวขอบใบ
	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	พบ 3-4 เซลล์
- ขนขนาดใหญ่ - ขนขนาดเล็ก	พบจำนวนมาก	พบจำนวนมาก	พบจำนวนมาก	พบจำนวนมาก	พบจำนวนมาก	พบจำนวนมาก
	พบจำนวนมาก	พบจำนวนมาก	พบจำนวนมาก	พบจำนวนมาก	พบจำนวนมาก	พบจำนวนมาก

ตารางที่ 3 ตารางเปรียบเทียบชุดลักษณะแผ่นใบประดับช่อดอกของ *M. gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex* (ต่อ)

ลักษณะ	<i>M. gigantea</i>				<i>M. macrocarpa</i>	<i>M. simplex</i>
	ดอกขาวคั่นเล็ก	ดอกขาวคั่นใหญ่	ดอกขาวโคนม่วง	ดอกม่วง		
2. ผิวใบด้านล่าง - ลวดลายคิวทิน - รูปร่างเซลล์ - ปากใบ	ลวดลายตามยาว	ลวดลายตามยาว	ลวดลายตามยาว	ลวดลายตามยาว	ลวดลายตามยาว	ลวดลายตามยาว
	สี่เหลี่ยมผืนผ้า	สี่เหลี่ยมผืนผ้า	สี่เหลี่ยมผืนผ้า	สี่เหลี่ยมผืนผ้า	สี่เหลี่ยมผืนผ้า	สี่เหลี่ยมผืนผ้า
	เซลล์ข้างเคียงเซลล์ มุม 6 เซลล์ เรียงเป็น แถวอย่างเป็นระเบียบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์ มุม 6 เซลล์ เรียงเป็น แถวอย่างเป็นระเบียบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์ มุม 6 เซลล์ เรียงเป็น แถวอย่างเป็นระเบียบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์มุม 6 เซลล์ เรียงเป็นแถว อย่างเป็นระเบียบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์ มุม 6 เซลล์ เรียงเป็น แถวอย่างเป็นระเบียบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์ มุม 6 เซลล์ เรียงเป็น แถวอย่างเป็นระเบียบ
- ขนาดใหญ่	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	พบ 3-4 เซลล์
	พบจุ่มต่อม เซลล์ ปลายเป็นรูปกระบอก ยาว 27-40 ไมครอน	พบจุ่มต่อม เซลล์ ปลายเป็นรูปกระบอก ยาว 30-43 ไมครอน	พบจุ่มต่อม เซลล์ ปลายเป็นรูปกระบอก ยาว 27-45 ไมครอน	พบจุ่มต่อม เซลล์ปลาย เป็นรูปกระบอก ยาว 30-45 ไมครอน	พบจุ่มต่อม เซลล์ ปลาย เป็นรูปกระบอก ยาว 45-50 ไมครอน	พบจุ่มต่อม เซลล์ ปลายเป็นรูปกระบอก ยาว 62-95 ไมครอน

ตารางที่ 3 ตารางเปรียบเทียบพฤกษลักษณะแผ่นใบประดับช่อดอกของ *M. gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex* (ต่อ)

ลักษณะ	M. gigantea					M. macrocarpa	M. simplex
	ดอกขาวด้านเล็ก	ดอกขาวด้านใหญ่	ดอกขาวโคนม่วง	ดอกม่วง			
ขอบใบ							
1. รูปร่างเซลล์	5-6 เหลี่ยม	สี่เหลี่ยม	4-6 เหลี่ยม	สี่เหลี่ยม	สี่เหลี่ยม	5-6 เหลี่ยม	
2. ขนที่ขอบใบ	ขนหนาม 2-3 เซลล์	ขนหนาม 2-3 เซลล์	ขนหนาม 2-3 เซลล์	ขนหนาม 2-3 เซลล์	ขนหนาม 2-3 เซลล์	ขนหนาม 2-3 เซลล์	ขนหนาม 2-3 เซลล์
ระบบเนื้อเยื่อพื้นฐาน							
1. เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว							
- บริเวณขอบใบ							
- ผิวใบด้านบน	1-3 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1-3 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1-3 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1-2 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1-2 ชั้นเซลล์ 1 ชั้นเซลล์	
- ผิวใบด้านล่าง							
- บริเวณกลางใบ							
- ผิวใบด้านบน	3-5 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	3-5 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	3-5 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1 (-2) ชั้นเซลล์ ไม่พบ	2-3 ชั้นเซลล์ 1-2 ชั้นเซลล์	2-3 ชั้นเซลล์ 2-3 ชั้นเซลล์	
- ผิวใบด้านล่าง							

ตารางที่ 3 ตารางเปรียบเทียบคุณลักษณะแผ่นใบประดับช่อดอกของ *M. gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex* (ต่อ)

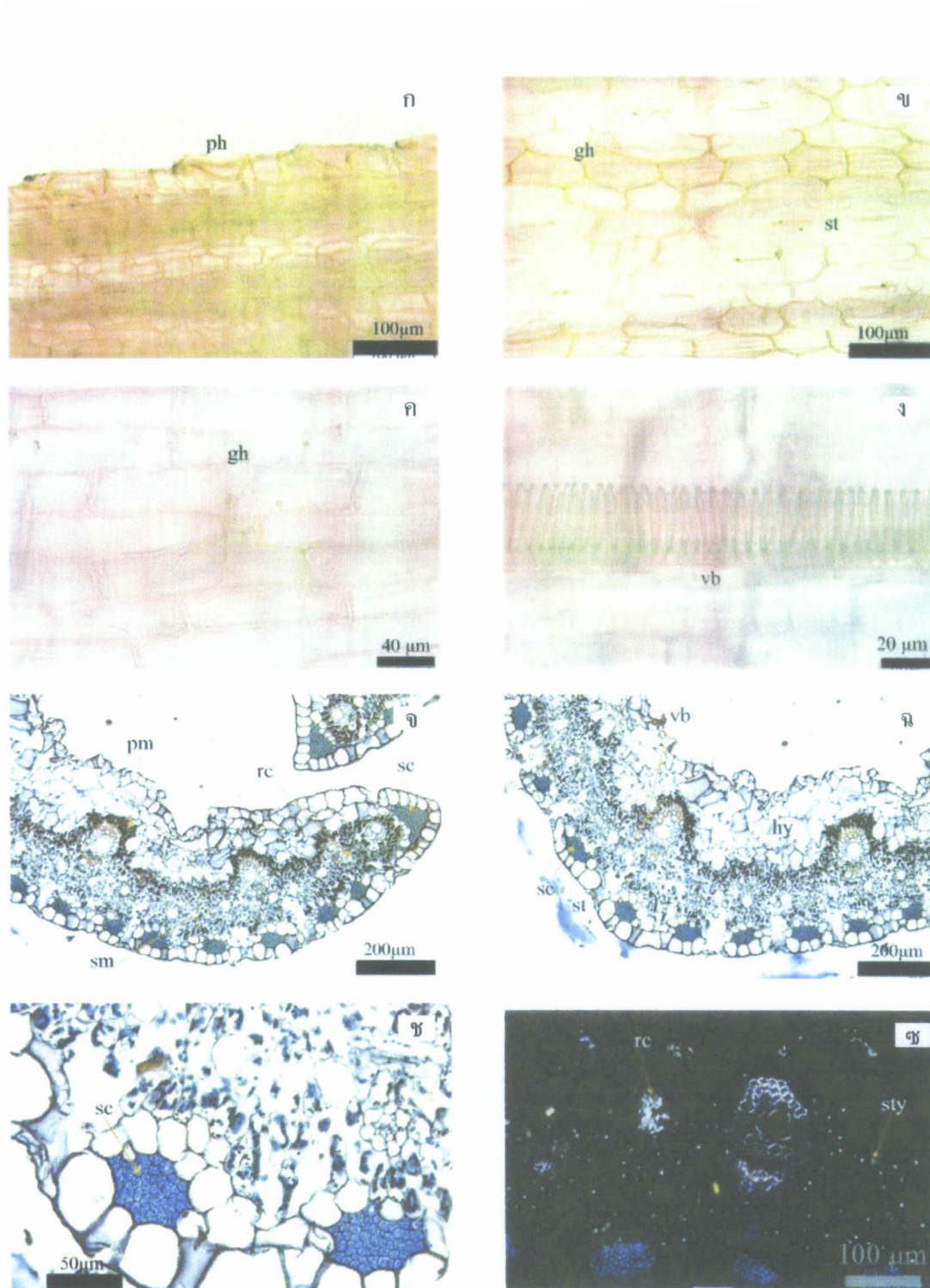
ลักษณะ	<i>M. gigantea</i>				<i>M. macrocarpa</i>	<i>M. simplex</i>
	ดอกขาวต้นเล็ก	ดอกขาวต้นใหญ่	ดอกขาวโคนม้วน	ดอกม่วง		
ระบบเนื้อเยื่อ พื้นฐาน 1. เนื้อเยื่อชั้นรอง จากผิว - บริเวณขอบใบ - ผิวใบด้านบน - ผิวใบด้านล่าง - บริเวณกลางใบ - ผิวใบด้านบน - ผิวใบด้านล่าง 2. เนื้อเยื่อชั้นมี ไซฟิลล์ - แพทเทต	1-3 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1-3 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1-3 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1-2 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1-2 ชั้นเซลล์ 1 ชั้นเซลล์
	3-5 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	3-5 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	3-5 ชั้นเซลล์ ไม่พบ	1 (-2) ชั้นเซลล์ ไม่พบ	2-3 ชั้นเซลล์ 1-2 ชั้นเซลล์	2-3 ชั้นเซลล์ 2-3 ชั้นเซลล์
	รูปแท่งทรงกระบอก และรูปกรวย 1-2 ชั้น ทั้งสองด้าน	รูปแท่งทรงกระบอก และรูปกรวย 1-2 ชั้น ทั้งสองด้าน	รูปแท่งทรงกระบอก และรูปกรวย 1-2 ชั้น ทั้งสองด้าน	รูปแท่งทรงกระบอก และรูปกรวย 1-2 ชั้น ทั้งสองด้าน	รูปแท่งทรงกระบอก และรูปกรวย 2-3 ชั้น ทั้งสองด้าน	รูปแท่งทรงกระบอก และรูปกรวย 1-2 ชั้น เฉพาะด้านบน

ตารางที่ 3 ตารางเปรียบเทียบพฤกษลักษณะแผ่นใบประดับข้อดอกของ *M. gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex* (ต่อ)

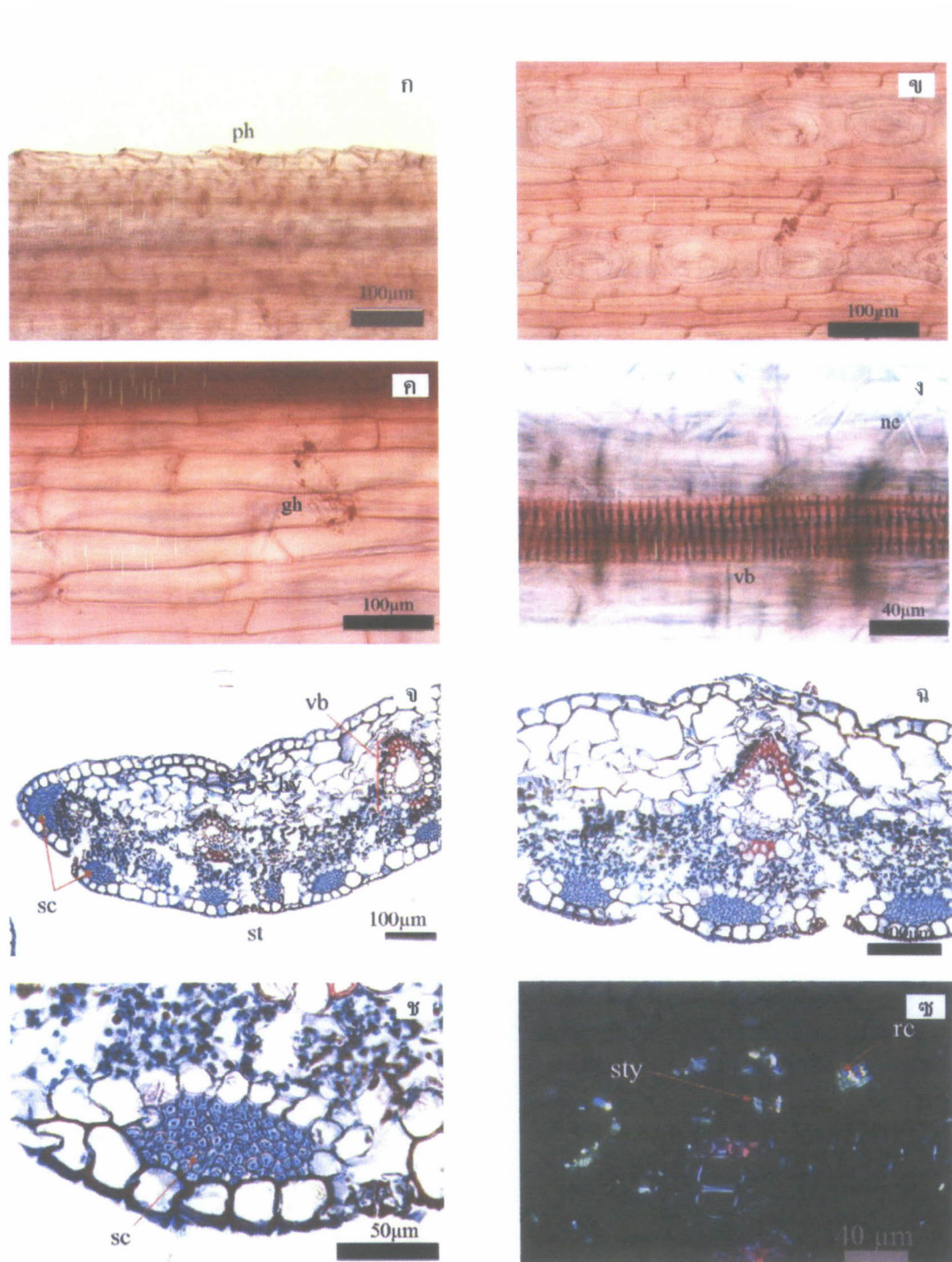
ลักษณะ	M. gigantea				M. macrocarpa	M. simplex
	ดอกขาวต้นเล็ก	ดอกขาวต้นใหญ่	ดอกขาวโคนม่วง	ดอกม่วง		
- สภาพจี - ท่อผลึก - ผลึกแคลเซียม ออกซาเลต ขนาดเล็ก	รูปร่าง ไม่แน่นอน พบ พบ	รูปร่าง ไม่แน่นอน พบ พบ	รูปร่าง ไม่แน่นอน พบ พบ	รูปร่าง ไม่แน่นอน พบ พบ	รูปร่าง ไม่แน่นอน พบ พบ	รูปร่าง ไม่แน่นอน พบ พบ
3. สกลอแรงคิม - บริเวณขอบใบ - ตามแนวกลุ่ม เนื้อเยื่อท่อลำเลียง ทางด้านล่างของ แผ่นใบประดับ ข้อดอก	10-13 ชั้นเซลล์ 6-8 (-10) ชั้นเซลล์ มีเยื่อหุ้ม 1 ชั้น	10-13 ชั้นเซลล์ 6-8 (-10) ชั้นเซลล์ มีเยื่อหุ้ม 1 ชั้น	11-13 ชั้นเซลล์ 6-8 (-10) ชั้นเซลล์ มีเยื่อหุ้ม 1 ชั้น	8-10 ชั้นเซลล์ 4-5 (-6) ชั้นเซลล์ มีเยื่อหุ้ม 1 ชั้น	7-8 ชั้นเซลล์ 1-3 (-4) ชั้นเซลล์ มีเยื่อหุ้ม 1 ชั้น	9-11 ชั้นเซลล์ ไม่พบ

ตารางที่ 3 ตารางเปรียบเทียบลักษณะแผ่นใบประดับช่อดอกของ *M. gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex* (ต่อ)

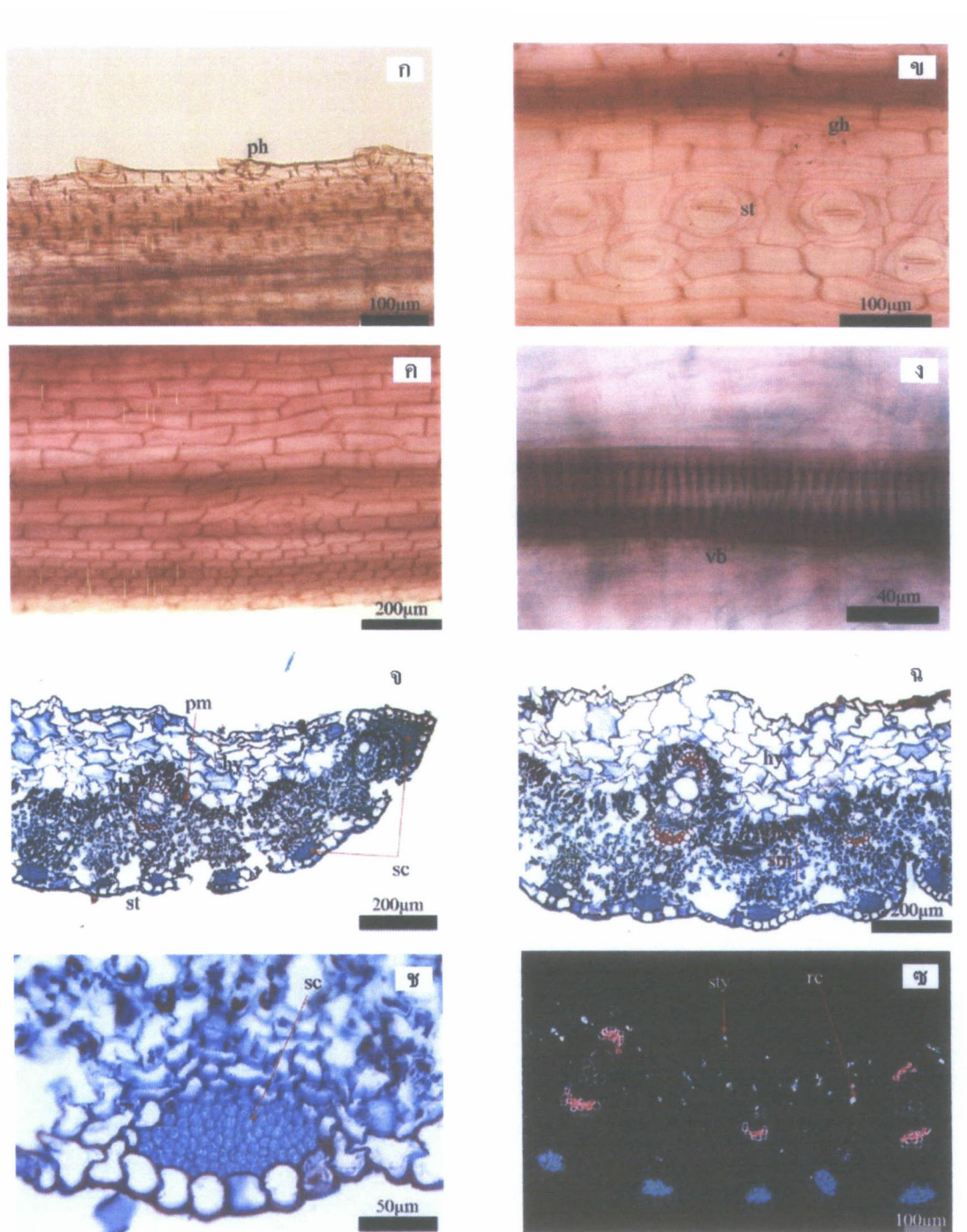
ลักษณะ	<i>M. gigantea</i>				<i>M. macrocarpa</i>	<i>M. simplex</i>
	ดอกขาวต้นเล็ก	ดอกขาวต้นใหญ่	ดอกขาวโคนม่วง	ดอกม่วง		
ระบบท่อลำเลียง						
1. มัดท่อลำเลียง 2 ขนาด	เรียงตัวแถวเดียว	เรียงตัวแถวเดียว	เรียงตัวแถวเดียว	เรียงตัวแถวเดียว	เรียงตัวแถวเดียว	เรียงตัวแถวเดียว
- ขนาดใหญ่	รูปรีหรือรูปไข่	รูปรีหรือรูปไข่	รูปรี	รูปรีหรือรูปไข่	รูปรีหรือรูปไข่	รูปรีหรือรูปไข่
- ขนาดเล็ก	รูปกลม	รูปกลม	รูปกลม	รูปกลม	รูปกลม	รูปกลม
2. เนื้อหุ้มท่อลำเลียง (ชั้นเซลล์)	1 ชั้น	1 ชั้น	1 ชั้น	1 ชั้น	1 ชั้น	1 ชั้น
- เซลล์ไฟเบอร์ที่ เนื้อหุ้มด้านบน และด้านล่าง เวสเซลล์	พบทั้ง 2 ด้าน	พบ 2 ด้าน	พบทั้ง 2 ด้าน	ไม่พบ	พบด้านล่าง	ไม่พบ



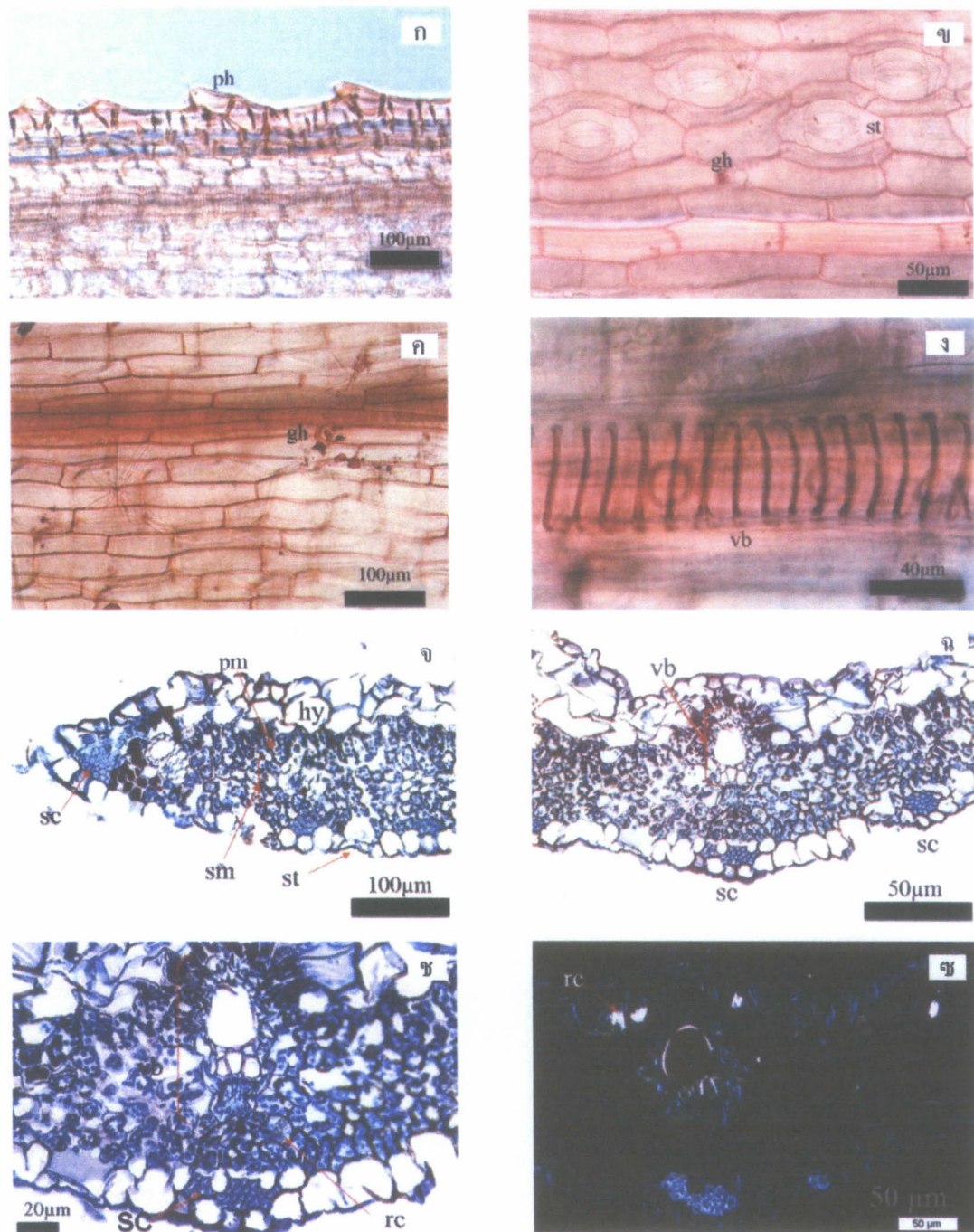
ภาพที่ 3 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของ *Murdannia gigantea* ดอกขาวต้นเล็ก ก. ขอบใบ
 ข. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอกด้านล่าง ค. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอกด้านบน ง. ลักษณะท่อ
 ลำเลียง จ. - ข. ลักษณะ โครงสร้างภาคตัดขวาง และ ข. ลักษณะผลึกภายใต้แสงโพลาไรซ์ (Glandular
 micro-hair = gh, Palisade mesophyll = pm, Prickle-hairs = ph, Raphide canal = rc, Sclerenchyma = sc,
 Spongy mesophyll = sm, Stoma = st, Styloids = sty และ Vascular bundle = vb)



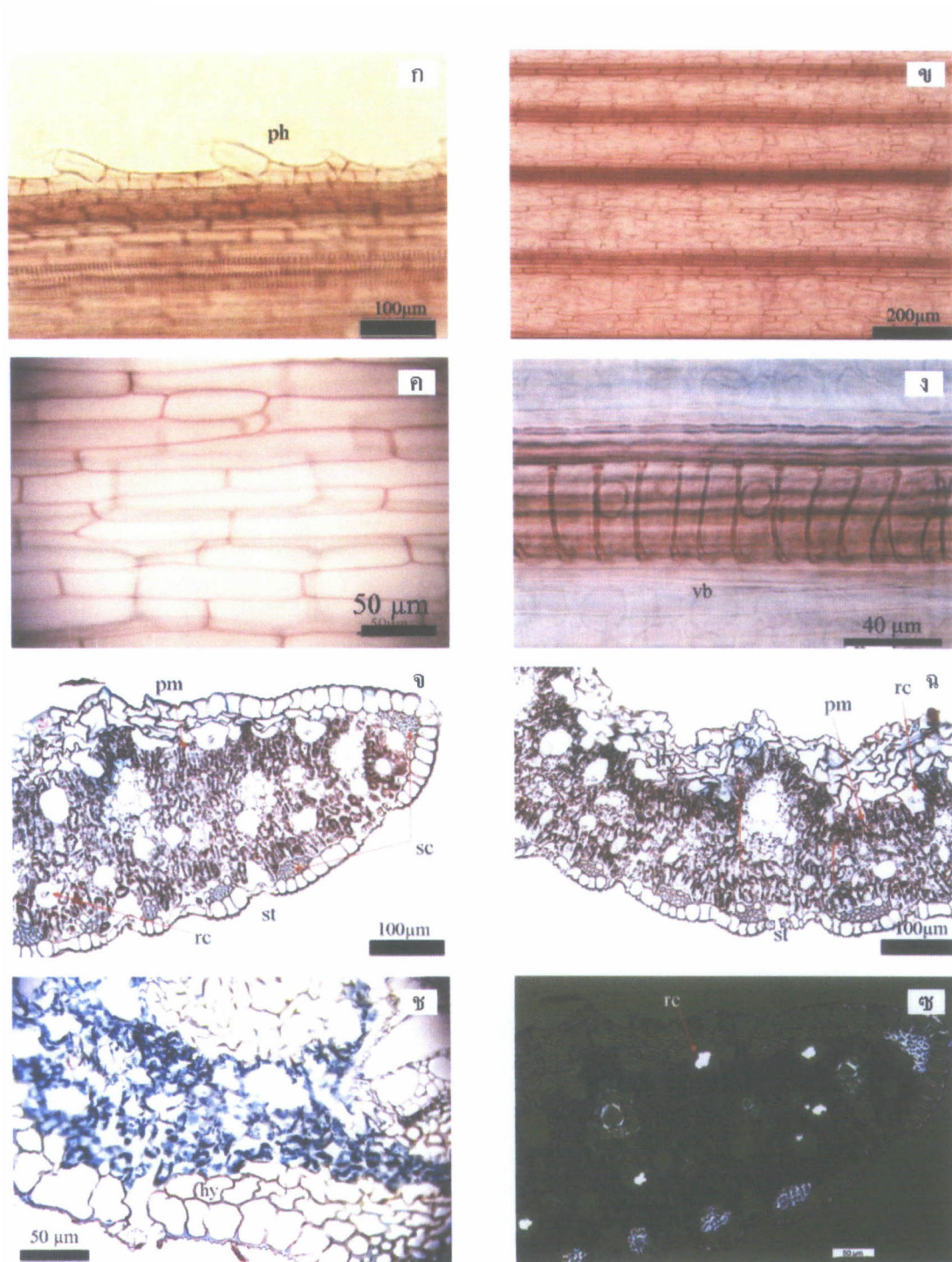
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบระดับข้อดอกของ *Murdannia gigantea* ดอกขาวต้นใหญ่ ก. ขอบใบ
 ข. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบระดับข้อดอกด้านล่าง ค. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบระดับข้อดอกด้านบน ง. ลักษณะท่อ
 ลำเลียงและผลิกรูปเข็ม จ. - ฉ. ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง และ ช. ลักษณะผลึกภายใต้แสง
 โฟลואไรซ์ (glandular micro-hair = gh, needle-like crystal = ne, palisade mesophyll = pm, prickle-hairs
 = ph, raphide canal = rc, sclerenchyma = sc, spongy mesophyll = sm, stoma = st, styloids = sty และ
 vascular bundle = vb)



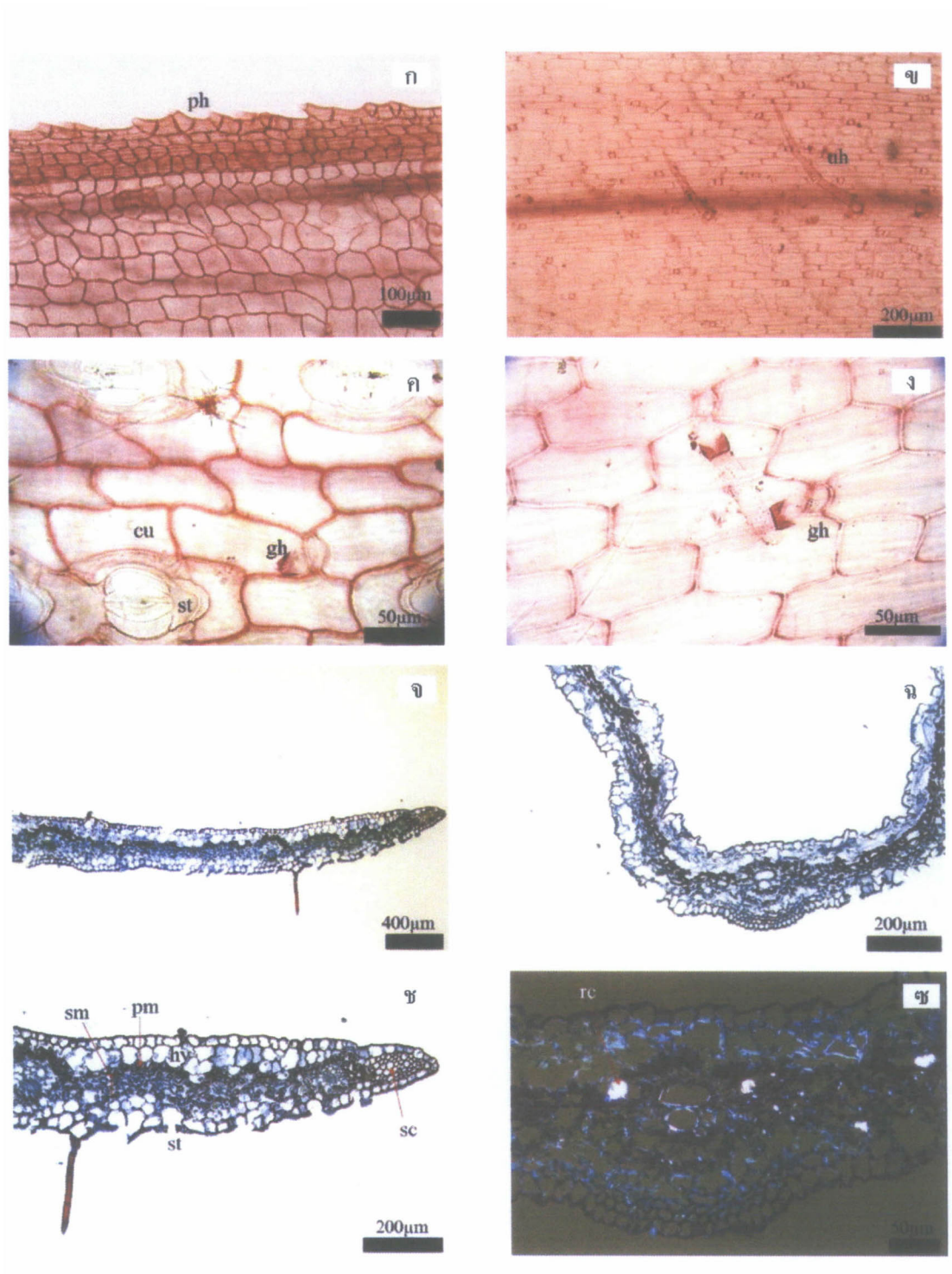
ภาพที่ 5 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของ *Murdannia gigantea* ดอกขาวโคนกลีบดอกสีม่วง
 ก. ขอบใบ ข. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอกด้านล่าง ค. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอกด้านบน
 ง. ลักษณะท่อลำเลียง จ. - ช. ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง และ ช. ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง
 ภายใต้แสงโพลาไรซ์ (glandular micro-hair = gh, hypodermis = hy, needle-like crystal = ne, palisade
 mesophyll = pm, prickly-hairs = ph, raphide canal = rc, sclerenchyma = sc, spongy mesophyll = sm,
 stoma = st, styloids = sty และ vascular bundle = vb)



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของ *Murdannia gigantea* ดอกม่วง ก. ขอบใบ ข. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอกด้านล่าง ค. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอกด้านบน ง. ท่อลำเลียง จ. - ฉ. ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง และ ช. ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางภายใต้แสงโพลาไรซ์ (glandular micro-hair = gh, hypodermis = hy, needle-like crystal = ne, palisade mesophyll = pm, prickly-hairs = ph, raphide canal = rc, sclerenchyma = sc, spongy mesophyll = sm, stoma = st, styloids = sty และ vascular bundle = vb)



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของ *Murdannia macrocarpa* ก. ขอบใบ ข. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอกด้านล่าง ค. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอกด้านบน ง. ลักษณะท่อลำเลียงและผลิกรูปเข็ม จ. - ช. ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง และ ช. ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางภายใต้แสงโพลาไรซ์ (palisade mesophyll = pm, prickles = ph, raphide canal = rc, sclerenchyma = sc, spongy mesophyll = sm, stoma = st, styloids = sty และ vascular bundle = vb)



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของ *Murdannia simplex* ก. ขอบใบ ข. - ค. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอกด้านล่าง ง. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอกด้านบน จ. - ช. ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางของแผ่นใบ และ ฌ. ลักษณะผลึกภายใต้แสงโพลาไรซ์ (cutin = cu, glandular micro-hair = gh, hypodermis = hy, palisade mesophyll = pm, prickly-hairs = ph, raphide canal = rc, sclerenchyma = sc, spongy mesophyll = sm, stoma = st, styloids = sty, uniseriate-hair = uh และ vascular bundle = vb)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การวินิจฉัยเพื่อระบุชนิดพันธุ์ของพืชกลุ่มนี้มีปัจจัยจำกัดในลักษณะจำแนก โดยใช้ฐานวิธานส่วนโครงสร้างของช่อดอก ดอก ผลและเมล็ด ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ในการสืบพันธุ์ (reproductive part) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยจำกัดของฤดูกาลและเวลาบานของดอกกล่าวคือ *M. gigantea* และ *M. macrocarpa* มีช่อดอกออกตรงกลางกระจุกใบ (terminal shoot) กาบใบประดับช่อดอก (inflorescence bract sheath) ไม่มีขน แต่แตกต่างตรงที่ *M. macrocarpa* มีความยาวก้านดอกมากกว่า ขนาดผลใหญ่กว่าและมีจำนวนเมล็ดมากกว่า (Thitimetharoch et al., 2004) ส่วน *M. simplex* มีช่อดอกออกทางด้านข้างของกระจุกใบ (lateral shoot) มีขนขนาดเล็กที่โคนกลีบดอก กาบใบประดับช่อดอกมีขนยาวเห็นชัดเจน อย่างไรก็ตามบางชนิดก็ยังคงพบว่ามี ความผันแปรทางลักษณะ (variation of characters) ได้แก่

M. gigantea พบความแตกต่างของลักษณะดังนี้

- สีดอก: สีม่วงอมน้ำเงิน สีขาว สีขาวโคนม่วง
- สมมาตรของดอก: โดยกลุ่มพืช (population) ที่มีดอกสีม่วงมีสมมาตร $\pm$ แบบด้านข้าง ($\pm$ bilateral symmetry) ส่วนกลุ่มที่มีดอกสีขาวและสีขาวโคนม่วงมีสมมาตร $\pm$ แนวรัศมี ($\pm$ actinomorphic symmetry)
- การปรากฏของขนขนาดเล็กที่โคนกลีบดอก: กลุ่มที่มีดอกสีม่วงและสีขาวไม่มีขนที่โคนกลีบดอก แต่กลุ่มที่มีดอกสีขาวโคนม่วงมีขนที่โคนกลีบดอก ซึ่งเป็นลักษณะที่พบใน *M. simplex* และอาจจะเป็นพันธุ์ผสม (hybrid population) ระหว่าง *M. gigantea* และ *M. simplex*

เมื่อนำส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอกจากพืชดังกล่าวไปทำการศึกษาจุลลักษณะด้วยวิธีทำให้ใส จะสามารถมองเห็นลักษณะเซลล์และรูปร่างของผิวแผ่นใบได้ชัดเจน ไม่ว่าจะเป็นลวดลายของคิวทิน รูปร่างเซลล์ ด้านบนของเนื้อเยื่อคิว เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว ลักษณะของเซลล์ขน ปากใบและสามารถมองเห็นเซลล์ลวดลายของท่อลำเลียง ซึ่งในพืชกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นแบบเกลียวเวียนและลักษณะของผลึกต่างๆ ส่วนเทคนิคการฟิโนสามารถมองเห็นรูปร่างและตำแหน่งของเซลล์ต่างๆ ในภาคตัดขวางของแผ่นใบประดับช่อดอก ไม่ว่าจะเป็นรูปร่างของผิวแผ่นใบประดับช่อดอก รูปร่างและความต่อเนื่องของเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวและมีไซฟิลล์ ตำแหน่งและจำนวนของระบบท่อลำเลียง ตำแหน่งท่อผลึกรูปเข็ม การเรียงตัวของเซลล์สเคอเรนคิมา ซึ่งจะเห็นได้ว่าการศึกษาลักษณะด้วยเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้น สามารถอธิบายได้ถึงรูปร่างและตำแหน่งของเซลล์พืชได้ค่อนข้างครอบคลุมและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อพืชชนิดอื่นๆ ต่อไปได้

โดยการศึกษาครั้งนี้พบจุลลักษณะที่ปรากฏทั่วไป คือมีการสะสมของคิวทินที่เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอก เนื้อเยื่อผิวใบมีรูปร่างเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ปากใบเป็นชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียง 6 เซลล์ ขนจิมิต่อม 3 เซลล์ และเซลล์ปลายเป็นรูปกระบอกซึ่งปรากฏทั้งด้านบนและด้านล่างของเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบเหมือนกันในพืชทุกชนิดคล้ายกับที่พบในแผ่นใบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tomlinson (1966) Faden และ Inman (1996) และ ธารินี สืบปาละ (2551) ผลึกแคลเซียมออกซาเลตรูปปรีซึม หรือหลายเหลี่ยม (Styloids) ในชั้นมีไซฟิลล์ พบกลุ่มเนื้อเยื่อสเคอเรนคิมาที่ขอบใบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Thitimetharoch et al. (2004) และ ธารินี สืบปาละ และคณะ (2551) ส่วนขนขนาดใหญ่ 3-4 เซลล์ พบเฉพาะใน *M. simplex* เท่านั้น สำหรับลักษณะขนจิว 3 เซลล์มีต่อมซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถใช้จำแนกชนิดได้ตามการศึกษาของ Tomlinson (1966) จากการศึกษาครั้งนี้

พบลักษณะขนจืด 3 เซลล์ มีต่อมคล้ายกันโดยมีลักษณะเด่น คือเซลล์ที่ฐานต้นแทรกอยู่ในชั้นเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบ เซลล์ที่อยู่กลางมีลักษณะพอง หรือรี และเซลล์ปลายเป็นรูปกระบอกคล้ายกับที่พบใน *M. bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora* (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2551)

สำหรับจุดลักษณะของแผ่นใบประดับช่อดอกที่สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยพืชกลุ่มนี้ ได้แก่ ขนขนาดใหญ่ (macro-hairs) พบเฉพาะใน *M. simplex* ขนาดของขนจืดที่ปรากฏบนผิวใบด้านล่าง โดย *M. gigantea* มีเซลล์ปลายยาวประมาณ 27-45 ไมโครเมตร *M. macrocarpa* ยาวประมาณ 45-50 ไมโครเมตร และ *M. simplex* ยาวประมาณ 62-95 ไมโครเมตร จำนวนชั้นของเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวที่ปรากฏเฉพาะด้านบนพบใน *M. gigantea* (บริเวณขอบใบกลุ่มดอกสีม่วงมี 1 ชั้นเซลล์ กลุ่มดอกขาว มี 1-3 ชั้นเซลล์ กลางใบกลุ่มดอกสีม่วง มี 1 (-2) ชั้นเซลล์ กลุ่มดอกขาว มี 3-5 ชั้นเซลล์) ส่วนที่ปรากฏทั้งสองด้านพบใน *M. macrocarpa* (ด้านบนบริเวณขอบใบมี 1-2 ชั้นเซลล์ กลางใบมี 2-3 ชั้นเซลล์ ด้านล่างพบเฉพาะบริเวณกลางใบมี 1-2 ชั้นเซลล์) และ *M. simplex* (บริเวณขอบใบมี 1-2 ชั้นเซลล์ กลางใบมี 2-3 ชั้นเซลล์ ทั้งด้านบนและด้านล่าง) และสเคลอเรอมาทางด้านล่างของแผ่นใบตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงพบเฉพาะใน *M. gigantea* [กลุ่มดอกสีม่วง มี 4-5 (-6) ชั้น กลุ่มดอกขาว มี 6-8 (-10) ชั้น] และ *M. macrocarpa* (มี 1-3 (-4) ชั้น) ดังตารางที่ 4 ซึ่งใน *M. gigantea* ที่พบว่ามี ความผันแปรทางลักษณะพื้นฐานวิทยา (variation of characters) เห็นความแตกต่างของจุดลักษณะของแผ่นใบประดับช่อดอก แต่ไม่ชัดเจนและภาพรวมสอดคล้องกับผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยา

ตารางที่ 4 แสดงจุดลักษณะวินิจฉัยของแผ่นใบประดับช่อดอกที่สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยพืชกลุ่มนี้

ลักษณะ	<i>M. gigantea</i>				<i>M. macrocarpa</i>	<i>M. simplex</i>
	ดอกขาว ต้นเล็ก	ดอกขาว ต้นใหญ่	ดอกขาว โคนม่วง	ดอกม่วง		
ขนขนาดใหญ่ 3-4 เซลล์ ที่ผิวใบ ด้านบนและด้านล่าง	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	พบ
1. เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว						
- บริเวณขอบใบ						
- ผิวใบด้านบน (ชั้นเซลล์)	1-3	1-3	1-3	1	1-2	1-2
- ผิวใบด้านล่าง (ชั้นเซลล์)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	1
- บริเวณกลางใบ						
- ผิวใบด้านบน (ชั้นเซลล์)	3-5	3-5	3-5	1 (-2)	2-3	2-3
- ผิวใบด้านล่าง (ชั้นเซลล์)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	1-2	2-3
สเคลอเรอมาทางด้านล่างของแผ่น ใบประดับช่อดอกตามแนวกลุ่มเนื้อ เยื่อท่อลำเลียง (ชั้นเซลล์)	6-8 (-10)	6-8 (-10)	6-8 (-10)	4-5 (-6)	1-3 (-4)	ไม่พบ

รูปวิธาน (key) จุดลักษณะเฉพาะที่แยกพืชทั้ง 3 ชนิดนี้คือ

- 1ก. มีขนขนาดใหญ่ที่ผิวแผ่นใบประดับช่อดอกทั้งด้านบนและล่าง ไม่พบสเคลอเรงคิตาตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงทางด้านล่างแผ่นใบประดับช่อดอก*M. simplex*
- 1ข. ไม่ปรากฏขนขนาดใหญ่ที่ผิวแผ่นใบประดับช่อดอกทั้งด้านบนและล่าง พบสเคลอเรงคิตาตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงทางด้านล่างแผ่นใบประดับช่อดอก
- 2ก. มีสเคลอเรงคิตาตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงทางด้านล่างของแผ่นใบ 1 - 3(-4) ชั้น เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวปรากฏทั้งสองด้าน ด้านบนเรียงตัวต่อเนื่องจากกลางใบถึงขอบใบ [บริเวณขอบใบมี 1-2 ชั้นเซลล์ กลางใบมี 2 -3 ชั้นเซลล์] แต่ด้านล่างพบเฉพาะบริเวณกลางใบ [มี 1-2 ชั้น] *M. macrocarpa*
- 2ข. มีสเคลอเรงคิตาตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อท่อลำเลียงทางด้านล่างของแผ่นใบ 4 - 8(-10) ชั้น เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวปรากฏเฉพาะด้านบนเรียงตัวต่อเนื่องจากกลางใบถึงขอบใบ [ขอบใบมี 1 -3 ชั้น กลางใบมี 1-5 ชั้นเซลล์]*M. gigantea*

แต่อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในพืชชนิดเดียวกันที่มีความแตกต่างของสถานถิ่นที่อยู่ตามการแพร่กระจายพันธุ์เพื่อจะหาลักษณะคงที่ (consistent character) ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวแทนลักษณะสำคัญสำหรับจำแนกได้ เนื่องจากหลายลักษณะที่สังเกตรวมมีอิทธิพลต่อลักษณะภายนอก ดังนั้นลักษณะที่ดีสำหรับใช้จำแนกควรเป็นลักษณะปรากฏอันเกิดจากพันธุกรรม และยังสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน หรือใช้เปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ เช่น การศึกษาภายนอกในส่วนที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์ (vegetative morphology) การศึกษาลักษณะดอกและช่อดอก (flowerland inflorescence morphology) การศึกษาลักษณะผลและเมล็ด (fruits and seeds morphology) การศึกษาละอองเกสร (pollen morphology) การศึกษาองค์ประกอบเคมี (chemotaxonomic) และการศึกษาวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic) ต่อไป

บทที่ 3

การศึกษาองค์ประกอบพฤษเคมีเบื้องต้น

นอกจากลักษณะภายนอกและจุลลักษณะแล้ว การศึกษาทางพฤษเคมียังสามารถใช้กำหนดเอกลักษณ์ของสมุนไพรได้เช่นกัน โดยเฉพาะวิธีThin Layer Chromatography (TLC) เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพร เนื่องจากทำได้ง่ายสะดวก รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเทียบกับสารมาตรฐานได้ โดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีของสารสำคัญในพืชกับสารตรวจสอบ หรือการใช้สีที่ปรากฏ หรือค่า R_f ของสารบนแผ่น TLC เพื่อเป็นตัวระบุเอกลักษณ์ของพืชชนิดนั้นๆ สำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบพืช 3 ชนิดในสกุลเดียวกันที่มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกัน และพืชชนิดเดียวกันแต่มีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดของสารที่ตรวจสอบจึงเป็นการศึกษาเบื้องต้น (screening) และทำการบันทึกไว้เป็นข้อมูลเอกลักษณ์เบื้องต้นโดยละเอียดเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม

1. องค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุล *Murdannia*

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่า การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชในสกุลนี้ยังมีการศึกษาน้อยมาก ได้แก่ *Murdannia bracteata* พบสารสำคัญ คือไฟโตสเตอรอลกลูโคไซด์ (phytosterol glucoside) (Jirathariyakul et al., 1996) กลัยโคสฟิงโกลิปิด (glycosphingolipid) (Jirathariyakul et al., 1998) สารกลุ่มสเตียรอยด์ ไตรเทอร์ปีน แทนนิน ฟลาโวนอยด์ (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550) และสารกลุ่ม hydroxybutaeanolide ได้แก่ แบลกทานโนไลด์เอ (bracteanolide A) แบลกทานโนไลด์บี (bracteanolide B) (+)-(R)-p-hydroxyphenyllactic acid ไอโซไวเทกซิน (isovitexin) (Wang et al., 2007) ส่วน *M. loriformis* และ *M. nudiflora* พบสารกลุ่มสเตียรอยด์ ไตรเทอร์ปีน แทนนินและฟลาโวนอยด์ (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551) และจากการทบทวนองค์ประกอบเคมีของพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันนี้ พบว่า

Cannon et al. (1979) รายงานไม่พบสาร alkaloids จากส่วนใบและลำต้นใน *Forrestia griffithii* Clarke และ *Pollia sorzogonensis* Endl.

Hegnauer (1963, 1986) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพืชวงศ์ Commelinaceae โดยรายงานไม่พบสาร saponins และ alkaloids ในพืชวงศ์นี้ ส่วนองค์ประกอบหลักที่พบโดยทั่วไปคือ flavonols, glycoflavones และ phenolic acid

Said (1986) รายงานไม่พบสาร alkaloids, steroid, triterpenoid และ saponin จากส่วนใบของ *Forrestia gracilis* และ *Forrestia marginata* แต่พบสารกลุ่ม steroid และ triterpenoid ในสารสกัดที่ได้จากส่วนเปลือกต้นของ *Forrestia gracilis*

Paola et al. (2006) รายงานพบสารจำพวก alcaloides, esteroides และ lactonas sesquiterpénicas ในสารสกัดด้วยเมทานอลจาก *Commelina repens*

Yang et al. (2007) ได้ทำการทบทวนรายงานการศึกษาองค์ประกอบเคมีของพืชสกุล *Commelina* คือ *C. undulate* R.Br. (Sharma, Tandon, 1982) *C. benghalensis* Linn (Stirton, Harborne, 1980; Batanical Institute of Jiangsu Province, 1991) และ *C. communis* Linn. (Goto et al., 1983; Tamura et al., 1986; Kim et al., 1999) ซึ่งพืชทั้ง 3 ชนิดพบสารจำพวก Steroids, terpenoids, iridoids และ flavonols

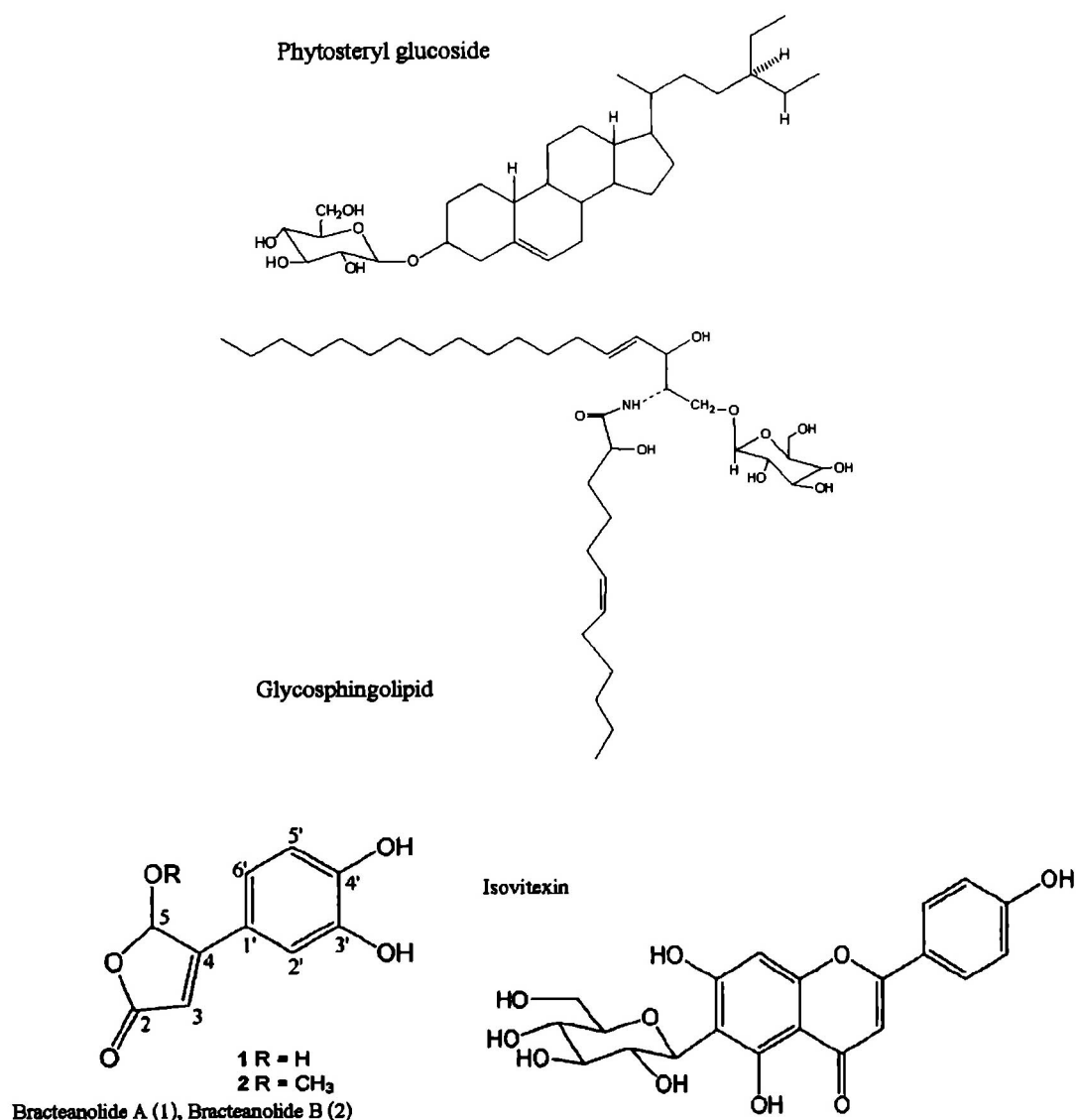
Mamyrbékova-Békro et al. (2008) รายงานการศึกษาองค์ประกอบเคมีเบื้องต้นของสารสกัดด้วย 70 % เมทานอลจากส่วนรากของ *Palisota hirsute* (Thunb.) K. Schum. พบสารจำพวก polyphenols, flavonoids, tannins, coumarins, reducing sugar, proteins และ alkaloids

Parivuguna et al. (2008) รายงานพบสารในกลุ่ม flavonoids, saponins, tannins, phenolic compounds, cardiac glycoside และ terpenoids แต่ไม่พบ alkaloids และ oil ในสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใบของ *Rheo discolor* Hance. ส่วนสารสกัดด้วยน้ำพบเฉพาะสารในกลุ่ม saponins

นอกจากลักษณะสัณฐานวิทยา (morphological) ที่ถูกนำมาใช้เป็นลักษณะจัดจำแนกชนิดของพืชแล้วการศึกษานุกรมวิธานเชิงเคมี (chemotaxonomy) ที่ศึกษาเกี่ยวกับสารเคมีที่พืชสร้างขึ้นมา ซึ่งสารบางชนิดจะพบในพืชที่แตกต่างกันยังถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกเพื่อเพิ่มความถูกต้อง

สำหรับพืชวงศ์ Commelinaceae สามารถนำเอาองค์ความรู้ทางด้านการศึกษานุกรมวิธานเชิงเคมีมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดพืชวงศ์นี้ได้ โดยเฉพาะสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Martinez, 1985; Martinez, Swain, 1985) ที่พบมากในพืชวงศ์นี้ได้แก่ flavone c-glycosides พบถึงร้อยละ 78 ของพืชทั้งหมด สาร flavonol o-glycoside พบร้อยละ 28 สาร quercetin ส่วนมากจะปรากฏเฉพาะในส่วน aglycone ส่วนสาร 6-hydroxyluteolin จะพบมากในสกุล *Tradescantia* สำหรับสาร tricin จะพบในส่วนสปอร์ของพืชซึ่งน้อยมากพบเพียงร้อยละ 5 ของพืชทั้งหมด (ศึกษาพืชจำนวน 152 ชนิด) (Martinez, Swain, 1985)

Stirton, Harborne (1980) ทำการสำรวจสารกลุ่ม anthocynins ในใบและดอกของพืชวงศ์ Commelinaceae จำนวน 10 สกุล 28 ชนิด พบว่าสาร cyanidin 3,7.3'-triglucoside และ acylated เป็นสารสำคัญหลักของสารในกลุ่ม anthocyanins และสาร delphinidin triglucoside พบได้เฉพาะในพืชสกุล *Gibasis* ขณะที่สาร p-coumaroyl-delphinidin 3,5-diglucoside พบได้เฉพาะในสกุล *Commelina* นอกจากนี้สามารถใช้ acylated glucoside เป็น chemical marker ในการแยกพืชวงศ์นี้จากพืชวงศ์อื่นๆ ในกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวด้วยกัน



ภาพที่ 9 โครงสร้างองค์ประกอบทางเคมีในหญ้าปักกิ่ง (*Murdannia bracteata*)

(Jirathariyakul et al., 1996; 1998; Wang et al., 2007)

2. ระบบทำละลายที่ใช้แยกสารโดยเทคนิคThin Layer Chromatography ในพืชสกุล *Murdannia*

การศึกษากการแยกสารองค์ประกอบทางเคมีโดยเทคนิคThin Layer Chromatography (thin-layer chromatography, TLC) มีรายงานว่าระบบชุดทำละลาย (solvent system) ที่เหมาะสมและแสดงความแตกต่างของโครมาโทแกรม (chromatogram) ได้อย่างชัดเจนสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการวินิจฉัยพืชในสกุลนี้ ได้แก่ ชุดทำละลายที่ประกอบด้วย เอทิลแอซิเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซิดิก : น้ำ (ethyl acetate : formic acid : acetic acid : water) อัตราส่วน 125 : 11 : 11 : 13.5 ในการเปรียบเทียบ *M. bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora* (ธารินี สืบปาละ, 2551) ระบบชุดทำละลายประกอบด้วย เฮกเซน : เอทิลแอซิเตต : เมทานอล : กรดแอซิดิก : น้ำ (hexane : ethyl acetate : methanol : acetic acid : water) อัตราส่วน 35 : 15 : 2.5 : 0.25

เอทิลแอซีเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซิดิก : น้ำ อัตราส่วน 40 : 3.4 : 3.4 : 4.2 และ เอทิลแอซีเตต : กรดฟอร์มิก : น้ำ : เมทานอล อัตราส่วน 30 : 6 : 6 : 3 ในการแยกสารองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดิน (aerial parts) ของ *M. japonica*, *M. spectabilis* และ *M. vaginata* (Chaichumporn et al., 2008)

3. การพิสูจน์กลุ่มสารด้วยน้ำยาพ่นหรือชุบ (Spray or dip reagents)

(1) Dragendorff's spray reagent ใช้ทดสอบแอลคาลอยด์ ซึ่งสารกลุ่มแอลคาลอยด์จะดูดกลืนแสงที่ UV-254 นาโนเมตรและสะท้อนแสงสีน้ำเงินหรือเหลืองที่ UV-365 นาโนเมตร เมื่อตรวจสอบด้วย dragendorff's spray reagent โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำระหว่างไนโตรเจนในโมเลกุลของแอลคาลอยด์กับน้ำยาที่มีโลหะหนัก โดยแอลคาลอยด์ในรูปอิสระจะได้สีส้ม (Wagner et al., 1984) แต่สารบางชนิดก็อาจให้ false positive กับน้ำยานี้ได้ เช่น พวกที่มี conjugated carbonyl group (Ketone, aldehyde, lactone) ซึ่งจะเกิด false positive ได้ประมาณ 9% ในทางตรงกันข้ามอาจเกิดปรากฏการณ์ false negative ได้ คือ แอลคาลอยด์บางชนิดซึ่งมีไนโตรเจนอยู่นอกวง (พวกเอมีน หรือ โปรโตแอลคาลอยด์) และพวก purines มักไม่เกิดตะกอนกับน้ำยาทดสอบดังกล่าว (เอนอร์ โสมนะพันธ์ และคณะ, 2533)

(2) Anisaldehyde-sulphuric acid ใช้ตรวจสอบสารในกลุ่ม essential oils ซึ่งสารกลุ่ม essential oils จะดูดกลืนแสงที่ UV-254 นาโนเมตร คือจะปรากฏแถบสีด้านบนพื้นสีเขียวและจะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีน้ำเงินที่ UV-365 นาโนเมตร ภายหลังจากการตรวจสอบด้วย anisaldehyde-sulphuric acid เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏสี น้ำเงินเข้ม เขียว แดง น้ำตาลและสารในกลุ่ม essential oils บางชนิดเมื่อสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีน้ำเงิน เขียว แดง น้ำตาล เช่น สารกลุ่ม terpene เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏสีม่วงแดง ม่วงน้ำเงิน น้ำตาล สีเทาจากน้ำเงิน ภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร menthol จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดง cineole จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเขียว น้ำตาล menthyl acetate จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีฟ้าแดง menthone จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลือง-น้ำตาล เป็นต้น (Wagner et al., 1984) สารในกลุ่ม triterpenoids เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏแถบสีน้ำตาล ม่วง ส้ม เทา และภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลือง แดง น้ำตาล ส้ม น้ำเงิน เทา (Martelanc et al., 2009)

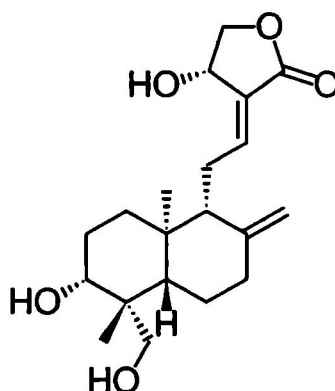
(3) Sulphuric acid สารในกลุ่ม essential oils เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏแถบสีเหลือง และ ม่วงแดง สารในกลุ่ม glycosides จะปรากฏแถบสีน้ำตาล สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จะปรากฏแถบสีเหลืองเขียวและสะท้อนแสงสีเหลืองเขียว เหลืองน้ำตาล น้ำเงิน ที่ UV-365 นาโนเมตร (Wagner et al., 1984) สารกลุ่ม terpenoids เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏแถบสีแดง ม่วงแดง น้ำตาลแดง เหลือง น้ำเงิน (Coscia, 1987; Harborne, 1984; Macek, 1972)

(4) 1% Aluminum chloride ตรวจสอบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จะดูดกลืนแสงที่ UV-254 นาโนเมตร เมื่อตรวจสอบด้วย 1% อลูมิเนียมคลอไรด์ โลหะหนักอลูมิเนียมคลอไรด์ที่มีประจุบวกจะทำปฏิกิริยากับกลุ่มไฮดรอกซิลที่มีประจุลบของฟลาโวนอยด์ โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และกลุ่มไฮดรอกซิลตรงตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 (Harborne, 1984; Macek, 1972) ทำให้เกิดสีเหลือง เหลืองเขียว น้ำตาลและภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีน้ำตาล น้ำเงิน เหลือง เหลืองเขียวและฟ้าขาว (Griffiths and Smith, 1972; Macek, 1972; Cooper and Rao, 1992; DeRijke et al., 2006)

(5) สารละลาย DPPH เป็นการตรวจสอบสารที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] โดยสารที่มีความสามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH[•] จะทำให้ความเข้มของสีสารละลาย DPPH ลดลงเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองอ่อน (Bondet et al., 1997)

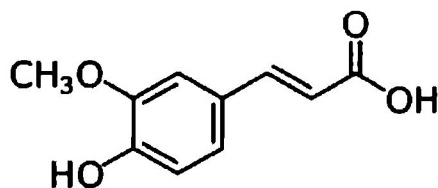
4. สารมาตรฐานเปรียบเทียบ

แอนโดกราฟีโฟไลด์ (andrographolide) มีลักษณะโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 10 เป็นสารกลุ่ม lactone diterpenoid ซึ่งได้นำมาใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากมีรายงานพบสารในกลุ่ม terpenoids ในพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน (Parivuguna et al., 2008)



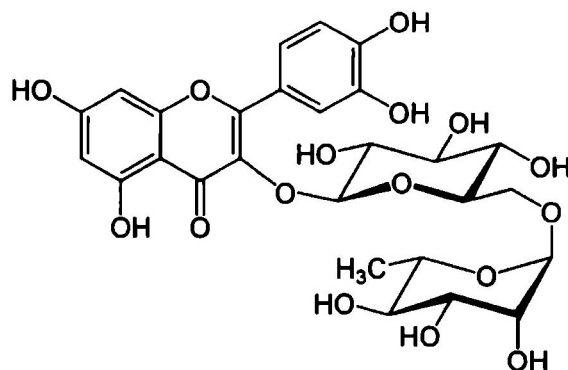
ภาพที่ 10 โครงสร้างของแอนโดกราฟีโฟไลด์ (Andrographolide, n.d)

กรดเฟอร์รูลิก (ferulic acid) มีลักษณะโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 11 เป็นสารกลุ่ม โพลีฟีนอล (polyphenol) ในสารประกอบประเภทฟีนอลิก (phenolic compound) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาวละลายน้ำได้ มีรายงานการศึกษาพบสารกลุ่มนี้ใน *Palisota hirsute* (Mamyrbékova-Békro et al., 2008) จึงได้นำมาใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ



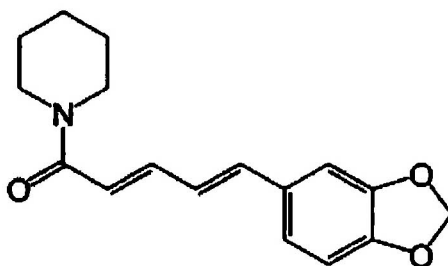
ภาพที่ 11 โครงสร้างของกรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid, n.d)

รูทีน (rutin) มีลักษณะโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 12 เป็นสารพฤษเคมีในกลุ่มของ flavonol glycoside มีรายงานว่าสารกลุ่มนี้พบได้ในพืชวงศ์ Commelinaceae (Martinez, Swain, 1985) และมีโครงสร้างใกล้เคียงกับ ไอโซไวเทกซิน (isovitexin) ที่สกัดได้จาก *Murdannia bracteata* (Wang et al., 2007) ด้วยเหตุนี้จึงได้นำรูทีนมาใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ



ภาพที่ 12 โครงสร้างของรูทีน (Rutin, n.d)

ไพเพอร์รีน (piperine) ลักษณะโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 13 เป็นสารกลุ่ม true alkaloids เป็นแอลคาลอยด์ที่มีชีวิตสังเคราะห์มาจากกรดอมิโน หรืออนุพันธ์ของกรดอะมิโนและมีไนโตรเจนอยู่ใน heterocyclic ring ซึ่งพบได้ในพืช จึงได้นำมาใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบในการตรวจสอบสารกลุ่ม alkaloids



ภาพที่ 13 โครงสร้างของไพเพอร์รีน (Piperine, n.d)

วิธีดำเนินการศึกษา

สำหรับการศึกษานี้ทำการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบเคมีเบื้องต้นของพืช 3 ชนิด ด้วยวิธี ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (thin-layer chromatography; TLC) และการหาปริมาณรวมของสารสกัด

1. ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา อุปกรณ์และสารเคมี

(1) ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบเคมีเบื้องต้น คือส่วนเหนือดิน ที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์และส่วนใต้ดินของ *Murdannia gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex* รายละเอียด แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงรายละเอียดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาพฤกษเคมีและอ้างอิง

Samples	Code	Color of flower /population	Locality	Collection date	Vouchers' no.
<i>M. gigantea</i>	Mg (wl)	white / larger plant	Tup Phaya Suea waterfall, Khon Kaen Province.	27/06/2009	SK, OC & TT 41
<i>M. gigantea</i>	Mg (ws)	white / smaller plant	Ban Chom Manee, Nakhon Phanom Province.	09/08/2009	SK, OC & TT 58
<i>M. gigantea</i>	Mg (pwm)	purplish white / moderate	Phu Rua forest, Loei Province.	27/07/2009	SK, OC & TT 54
<i>M. gigantea</i>	Mg (vm)	violet / moderate	Phu Phan forest, Sakon Nakhon Province.	20/08/2009	SK, OC & TT 66
<i>M. macrocarpa</i>	Mm	violet	Phu Kradueng forest, Loei Province.	29/10/2009	TT, OC & SK 1205
<i>M. simplex</i>	Ms	violet	Doi Suthep-Pui forest, Chiang Mai Province.	15/08/2009	SK, OC & TT 59

SK = Sureerut Khaewsart, OC = Orasa Chaichumporn and TT = Thaweesak Thitimetharoach

(2) อุปกรณ์และเครื่องมือ

Hot air oven, Automatic TLC sampler (Version 2.13 CAMAG, Switzerland), TLC tank (CAMAG, Switzerland), แผ่น TLC สำเร็จรูป Aluminum sheet 60 F254 เครื่องปั่นบด เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) เครื่องระเหยแห้ง (Evaporator) และเครื่องแก้วสำหรับทดลอง

(3) สารเคมี

Chloroform, Ethyl acetate, Methanol, Ethanol, Formic acid, Acetic acid, Hexane, Anisaldehyde spraying reagent, Ethanolic 10% H_2SO_4 , Ethanolic 1% $AlCl_3$ reagent, Andrographolide, Ferulic acid, Rutin และ Piperine

2. การหาปริมาณรวมของสารสกัด (% Yield)

โดยนำส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของพืชทั้ง 3 ชนิด มาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-4 วัน หลังจากนั้นทำการบด นำผงตัวอย่างมาชั่งอย่างละ 5 กรัม ทำการสกัดด้วยเมทานอลและน้ำอย่างละ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองเอาตะกอนออก นำส่วนที่เป็นของเหลวที่สกัดด้วยน้ำมาระเหยเอาน้ำออกด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (lyophilizer) ส่วนของเหลวที่สกัดด้วยเมทานอลนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการชั่งสารสกัดแล้วหาปริมาณสุทธิของสารสกัดคิดเป็นร้อยละของพืชแต่ละชนิดทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย (Jirawongse, 2000) นำสารสกัดที่ได้เก็บในหม้อดูดความชื้นเพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อไป

3. วิธีthin layer chromatography (Thin-layer chromatography; TLC)

คัดแปลงวิธีจาก ธารินี สืบปาละ และคณะ (2550), Macek (1972) และ Fried and Sherma (1986) โดยนำตัวอย่างบดเป็นผง 1 กรัม ของพืชแต่ละชนิดมาสกัดด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร เขย่า 15 นาที จากนั้น นำสารสกัดแต่ละชนิดและสารมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร มาหยดบนแผ่น TLC Silica Gel F254 ขนาด 10 x 20 ด้วยเครื่อง automatic TLC sampler ที่ความเร็ว 5 วินาที/ไมโครลิตร ความยาวสารที่หยด 0.7 มิลลิเมตร จากนั้นนำ แผ่น TLC ที่หยดแล้วมาใส่ใน tank ที่มีระบบทำละลาย (mobile phase) 3 ชุด ได้แก่

ระบบทำละลาย I ประกอบด้วย เฮกเซน : เอทิลแอซีเตต : เมทานอล : กรดแอซิดิก (hexane : ethyl acetate : acetic acid) อัตราส่วน 70 : 30 : 5 : 0.5 โดยใช้กรดเฟอร์รูลิก (ferulic acid, Fa) ไพเปอร์รีน (piperine, Pr), และแอนโดกราฟีโฟไลด์ (andrographolide, Al) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล เป้าด้วยลมร้อน 10 นาที แล้วบันทึกภาพและคำนวณหา R_f จากนั้นสังเกตภายใต้ แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet light, UV) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร ตรวจสอบด้วย dragendorff's reagent โดยใช้สารไพเปอร์รีนเป็นสารมาตรฐาน บันทึกภาพและคำนวณหา R_f

ระบบทำละลาย II ประกอบด้วย เอทิลแอซีเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซิดิก : น้ำ (ethyl acetate : formic acid : acetic acid : water) อัตราส่วน 125 : 11 : 11 : 13.5 โดยใช้กรดเฟอร์รูลิกและรูทีน (rutin, Rt) เป็น สารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล เป้าด้วยลมร้อน 10 นาที ตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ (aluminum chloride) ในเอทานอล โดยใช้รูทีนเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ เป้าด้วยลม ร้อน 10 นาที จากนั้นสังเกตภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร และตรวจสอบ ด้วย 0.5 มิลลิโมลลาร์ DPPH ในเมทานอล บันทึกภาพและคำนวณหา R_f

ระบบทำละลาย III ประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม : เอทิลแอซีเตต : เมทานอล : กรดฟอร์มิก : น้ำ (chloroform : ethyl acetate : methanol : formic acid : water) อัตราส่วน 45 : 12.5 : 7.5 : 1.25 : 1.25 โดยใช้กรดเฟอร์ รูลิกและแอนโดกราฟีโฟไลด์เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอลเป่า ด้วยลมร้อน 10 นาที แล้วบันทึกภาพและคำนวณหา R_f จากนั้นสังเกตภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาว คลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร ตรวจสอบด้วย Anisaldehyde-sulphuric acid บันทึกภาพและคำนวณหา R_f

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. การหาปริมาณรวมของสารสกัด (% Yield)

พบว่าปริมาณร้อยละของสารที่สกัดด้วยเมทานอลและสารสกัดด้วยน้ำของ *M. gigantea* [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm) และ *M. simplex* (Ms) พืชดังกล่าวมีปริมาณที่ ใกล้เคียงกัน และสารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณสารสกัดมากกว่าทั้งส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน โดยมีรายละเอียดดัง ตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณร้อยละของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำที่ได้ต่อน้ำหนักแห้งของตัวอย่างพืชแต่ละชนิด

ตัวอย่างที่ใช้ ศึกษา	สารสกัดด้วยเมทานอล		สารสกัดด้วยน้ำ	
	ส่วนเหนือดิน	ส่วนใต้ดิน	ส่วนเหนือดิน	ส่วนใต้ดิน
Mg (wl)	4.3 ± 0.24	3.7 ± 0.13	8.9 ± 0.46	6.1 ± 0.38
Mg (ws)	5.9 ± 0.31	4.2 ± 0.23	7.6 ± 0.34	5.9 ± 0.24
Mg (pwm)	4.5 ± 0.27	4.1 ± 0.18	6.8 ± 0.29	5.1 ± 0.21
Mg (vm)	7.0 ± 0.43	4.3 ± 0.22	7.8 ± 0.32	6.2 ± 0.34
Mm	6.3 ± 0.33	4.0 ± 0.21	8.1 ± 0.44	4.2 ± 0.18
Ms	4.6 ± 0.23	4.1 ± 0.20	8.4 ± 0.47	6.2 ± 0.34

2. โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดิน

(1) ลักษณะ โครมาโทแกรมในระบบทำละลาย I (ภาพที่ 14, ตารางที่ 7)

จากผลการทดลองพบว่าภายใต้แสง UV - 366 นาโนเมตร สารสกัดพืชแต่ละชนิดจะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.98, 0.73, 0.46 และ 0.41 เหมือนกัน แต่แตกต่างกันที่ใน Ms จะไม่ปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.73 ใน Mg (vm) พบแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.14 ส่วนสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิกจะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.55

เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล จะปรากฏแถบสีชมพูของสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิกและแถบสีน้ำตาลม่วงของสารมาตรฐานแอนโดรกราโฟไลด์ ที่ค่า R_f ประมาณ 0.55 และ 0.39 ตามลำดับและจะเห็นแถบสีที่ค่า R_f ต่าง ๆ ของสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดคล้ายคลึงกัน แต่จะพบแถบสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.73 ใน Mg (pwm) และ Mm ส่วนที่ค่า R_f ประมาณ 0.52 พบเฉพาะใน Mm แถบสีน้ำตาลม่วงที่ค่า R_f ประมาณ 0.33 จะปรากฏชัดเจนใน Mg (pwm), Mg (vm) และ Mm สำหรับแถบสีเหลืองอมน้ำตาลที่ค่า R_f ประมาณ 0.16, 0.08 พบเฉพาะใน Mg (wl)

เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV - 366 นาโนเมตร ภายหลังสเปรย์ด้วย 10 % กรดกำมะถันในเอทานอลจะเห็นแถบสะท้อนแสงสีแดง ม่วง ชมพูของพืชแต่ละชนิดที่ค่า R_f ต่าง ๆ ของแถบสารในแต่ละสีใกล้เคียงกัน แต่จะพบแถบสะท้อนแสงสีแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.52 เฉพาะใน Mm แถบสะท้อนแสงสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.16 และ 0.08 ใน Mg (wl) แถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.14 ใน Mg (vm) และแถบสะท้อนแสงสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.05 ใน Ms

เมื่อตรวจสอบด้วย dragendorff's reagent จะพบแถบสีส้มของสารมาตรฐานไปเปอร์รีนที่ค่า R_f ประมาณ 0.92 และจะพบแถบสีส้มในสารสกัดแต่ละชนิดที่ค่า R_f ประมาณ 0.06 แต่ที่ 0.17 และ 0.09 จะพบเฉพาะใน Mm

(2) ลักษณะ โครมาโทแกรมในระบบทำละลาย II (ภาพที่ 15, ตารางที่ 8)

จากผลการทดลองพบว่าภายใต้แสง UV-254 นาโนเมตร จะพบแถบดูดกลืนแสงที่ค่า R_f ประมาณ 0.52 ของสารมาตรฐานรูทีน ส่วนสารสกัดแต่ละชนิดจะพบแถบดูดกลืนแสงแตกต่างกัน คือที่ค่า R_f

ประมาณ 0.87 จะพบเฉพาะใน Mg (wl), 0.39 พบใน Mg (vm) และ 0.23 ใน Mg (pwm) เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร ที่ค่า R_f ดังกล่าวจะปรากฏแถบดูดกลืนแสงและสารสกัดพืชแต่ละชนิดยังปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.98 แถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ต่างๆ ใกล้เคียงกัน แต่ที่ต่างกัน คือจะพบแถบสะท้อนแสงสีฟ้าเขียวชัดเจนที่ค่า R_f ประมาณ 0.16 และ 0.11 เฉพาะใน Mg (vm) และ Mm แต่ที่ค่า R_f ประมาณ 0.57 พบแถบหนาเฉพาะใน Mg (vm)

เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล จะปรากฏแถบสีเหลืองของสารมาตรฐานรูทีน แถบสีชมพูอมม่วงของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ส่วนสารสกัดของพืชแต่ละชนิดจะพบแถบสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.23 ใน Ms และจะเห็นแถบสีเหลืองในพืชแต่ละชนิดที่ค่า R_f ต่างๆ แตกต่างกัน ซึ่งเป็นค่า R_f เดียวกันกับแถบดูดกลืนแสงเมื่อสังเกตภายใต้แสง UV-254 นาโนเมตร

เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV - 366 นาโนเมตร ภายหลังจากสเปรย์ด้วย 10 % กรดกำมะถันในเอทานอลจะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเขียวของสารมาตรฐานรูทีน แถบสะท้อนแสงสีฟ้าขาวของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกที่ค่า R_f ประมาณ 0.96 และแถบสะท้อนแสงสีแดง สีชมพูของพืชแต่ละชนิดที่ค่า R_f ต่างๆ ใกล้เคียงกัน แต่แถบสะท้อนแสงสีเขียวและสีฟ้าจะพบแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด คือจะพบแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.26 เฉพาะใน Mg (ws) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.16 และ 0.11 ใน Mm แถบสะท้อนแสงสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.87 ใน Mg (wl) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.39 ใน Mg (vm) และพบแถบสะท้อนแสงสีเขียวอมฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.65 ใน Mm

เมื่อตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอลและสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเขียวของสารมาตรฐานรูทีน แถบสะท้อนแสงสีฟ้าของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะพบแถบสะท้อนแสงสีเขียวและสีฟ้าแตกต่างกัน คือ Mg (ws) จะพบแถบหนาสะท้อนแสงสีเขียวอมฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.57 Mg (wl) จะพบแถบสะท้อนแสงสีเขียวอมฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.93 และ 0.87 Mg (pwm) จะพบแถบสะท้อนแสงสีเหลืองเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.23 และ Mm พบแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.16 และ 0.11

เมื่อตรวจสอบด้วย DPPH จะพบแถบสีเหลืองของสารมาตรฐานรูทีนและแถบสีเหลืองในสารสกัดพืชแต่ละชนิด ซึ่งจะพบมากใน Mg (wl) และ Mg (ws)

(3) ลักษณะโครมาโทแกรมในระบบทำละลาย III (ภาพที่ 16, ตารางที่ 9)

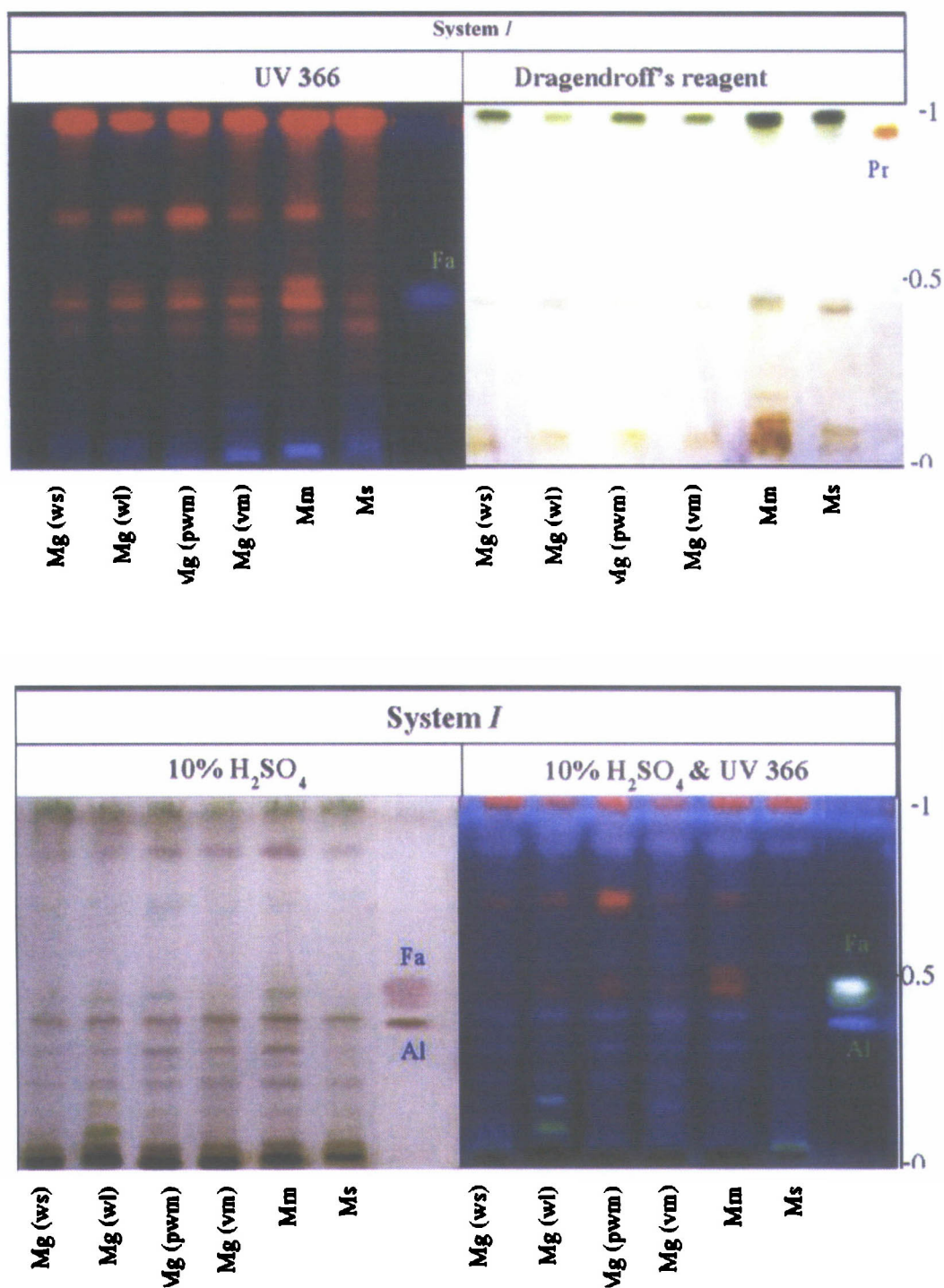
จากผลการทดลองพบว่าภายใต้แสง UV-254 นาโนเมตร จะพบแถบดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกและแอนโดกราฟีโฟไลด์ ที่ค่า R_f ประมาณ 0.18 และ 0.08 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดพืชแต่ละชนิดจะพบแถบดูดกลืนแสงที่ค่า R_f ต่าง ๆ ใกล้เคียงกันแต่ที่แตกต่างกัน คือจะพบแถบดูดกลืนแสงที่ค่า R_f ประมาณ 0.13 เฉพาะใน Mg (pwm) และ Mm และจะไม่พบแถบดูดกลืนแสงที่ค่า R_f ประมาณ 0.83 และ 0.22 ใน Mg (vm) และ Ms

เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร จะพบแถบสะท้อนแสงสีแดงที่ค่า R_f ต่างๆ ใกล้เคียงกันแต่ที่แตกต่างกัน คือจะพบแถบสะท้อนแสงสีแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.89 พบเฉพาะใน Mg (vm) และ Ms และที่ค่า R_f ประมาณ 0.46 พบเฉพาะใน Mm

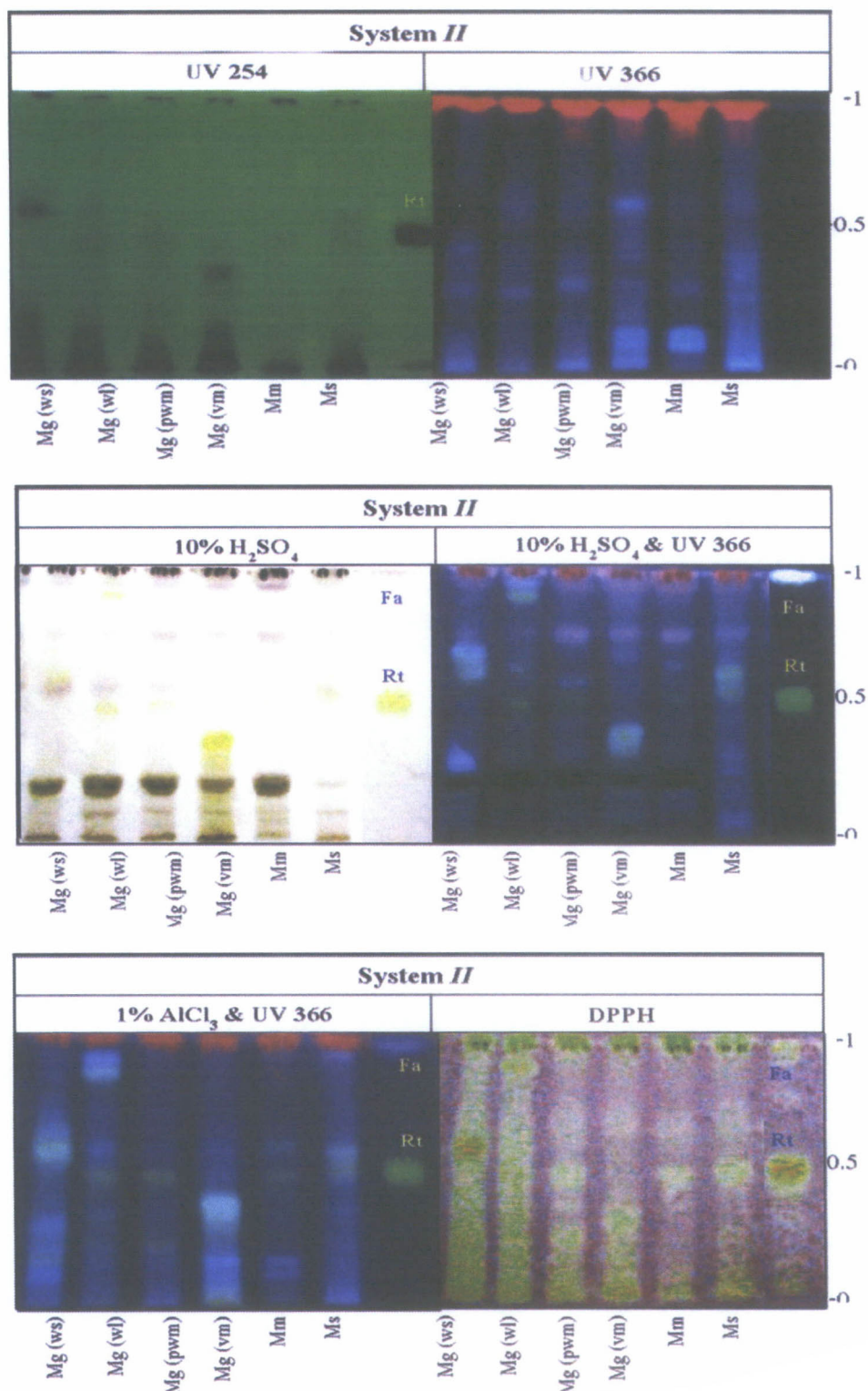
เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล จะพบแถบสีม่วงอมชมพูของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิกและแถบสีน้ำตาลของแอนโดกราฟโฟไลด์ ส่วนสารสกัดพืชแต่ละชนิดจะปรากฏแถบสีเขียวและแถบสีม่วงที่ค่า R_f ต่างๆ ใกล้เคียงกัน แต่ที่แตกต่างกัน คือจะไม่พบแถบสีเขียวใน Mg (vm) และ Ms ที่ค่า R_f ประมาณ 0.83 และพบแถบสีเขียวใน Mm ที่ค่า R_f ประมาณ 0.46 และ 0.11

เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV - 366 นาโนเมตร ภายหลังสเปรย์ด้วย 10 % กรดกำมะถันในเอทานอลจะพบแถบสะท้อนแสงสีเขียวขาวของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก และฟ้าขาวของแอนโดกราฟโฟไลด์ ส่วนสารสกัดพืชแต่ละชนิดจะพบแถบสะท้อนแสงสีแดง สีส้มแดง สีม่วงอมชมพูที่ค่า R_f ต่างๆ ใกล้เคียงกัน แต่ที่แตกต่างกัน คือจะพบแถบสะท้อนแสงสีแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.87 เฉพาะใน Ms แถบสะท้อนแสงสีส้มแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.46 เฉพาะใน Mm แถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.15 พบเฉพาะใน Mg (wl)

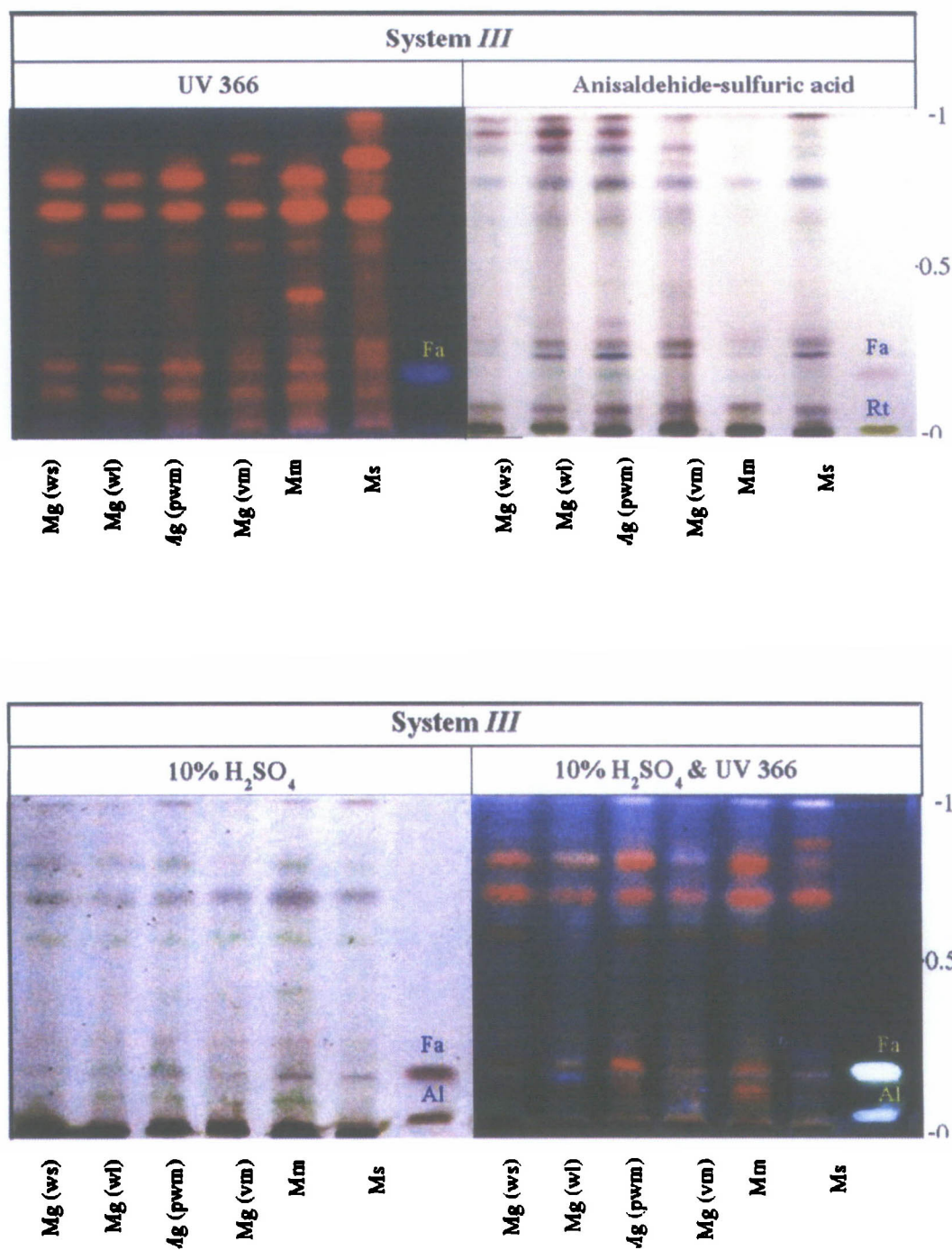
เมื่อตรวจสอบด้วย anisaldehyde-sulfuric acid จะพบแถบสีชมพูของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก แถบสีเหลืองของสารมาตรฐานรูทีนและแถบสีน้ำเงิน และม่วง ที่ค่า R_f ต่างๆ ใกล้เคียงกันในพืชแต่ละชนิด แต่ที่ค่า R_f ประมาณ 0.95 จะพบใน Mg (ws), Mg (wl) และ Mg (pwm) แถบสีน้ำเงินแต่ที่ค่า R_f ประมาณ 0.25 พบเฉพาะใน Mg (pwm)



ภาพที่ 14 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ *Murdannia gigantea* [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm) และ *M. simplex* (Ms) ในระบบทำละลาย / โดยใช้ Ferulic acid (Fa), Piperine (Pr) และ Andrographolide (Al) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ



ภาพที่ 15 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ *Murdannia gigantea* [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm) และ *M. simplex* (Ms) ในระบบท่าละลาย II โดยใช้ Ferulic acid (Fa) และ Rutin (Rt) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ



ภาพที่ 16 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ *Murdannia gigantea* [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm) และ *M. simplex* (Ms) ในระบบ ทำละลาย III โดยใช้ Ferulic acid (Fa) และ Andrographolide (Al) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ

ตารางที่ 7 แสดงค่า n_D ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทำลาย I

n_D	UV 254						UV 366						10% H ₂ SO ₄						10% H ₂ SO ₄ & UV 366					
	Mg (w)	Mg (w)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms	Mg (w)	Mg (w)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms	Mg (w)	Mg (w)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms	Mg (w)	Mg (w)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms
0.98	D	D	D	D	D	D	R	R	R	R	R	R	Gr	Gr	Gr	Gr	Gr	Gr	R	R	R	R	R	R
0.88													V	V	V	V	V	V	B	B	B	B	B	B
0.73	D	D	D	D	D	D	R	R	R	R	R				Gr		Gr		R	R	R	R	R	R
0.52							R	R	R	R	R												R	
0.48	D	D	D	D	D	D							Gr	Gr	Gr		Gr		R	R	R	R	R	
0.46							R	R	R	R	R	R												
0.41	D	D	D	D	D	D	R	R	R	R	R	R	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br
0.33													V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	B	B	B	B		
0.26	D	D	D			D																		
0.23													V	V	V	V	V	V	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br	V-Br
0.16													Y-BR						Gr-B					
0.14																						B		
0.08													Y-BR						Gr					
0.05	D	D	D	D	D	D	B	B			B		V	V	V	V	V	V						Gr
0	D	D	D	D	D	D	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R	Br-D	Br-D	Br-D	Br-D	Br-D	Br-D	D	D	D	D	D	D

B: blue, Br: brown, D: dark, G: gray, Gr: green, L: light, O: orang, P: pink, R: red, S: strong, W: weak, V: violet, Y: yellow.

ตารางที่ 8 แสดงค่า n ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทำลาย II

R_f	10% H_2SO_4						10% H_2SO_4 & UV 366						1% $AlCl_3$ & UV 366					
	Mg (w)	Mg (v)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Mn	Mg (w)	Mg (v)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Mn	Mg (w)	Mg (v)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Mn
0.98	Gr-D	Gr-D	Gr-D	Gr-D	Gr-D	Gr-D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
0.93	V	V	V	V	V	V	P-V	P-V	P-V	P-V	P-V	P-V	Gr-B	Gr-B				
0.87		Y							Gr				Gr-B					
0.76	V	V	V	V	V	V	P-V	P-V	P-V	P-V	P-V	P-V						
0.72																		
0.68							Gr-B											
0.65												Gr-B						
0.60							Gr					Gr						
0.57	V	V	V		V	V	P-V	P-V	P-V				Gr-B	B-Br		B-Br		Gr-Y
0.51		Y	Y	Y		Y	Gr	Gr	Gr		Gr		Y-Gr	Y-Gr	Y-Gr	Y-Gr	Y-Gr	Y-Gr
0.39				Y						Gr						Gr-B		
0.34													B-Gr	Y-B	B-Br	Gr-B		
0.26							B											
0.23	G-D (S)	G-D (S)	G-D (S)	G-D (S)	G (W)	G (W)	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R			Y-Gr			
0.16											B		Gr-B			Gr-B	B	
0.11		Br	Br	Br	Br	Br					B		B-Gr				B	
0.70						Br												
0.00	Br	Br	Br	Br	V-Br	V-Br	Br	Br	Br	Br	Br	Br	B-Br	B-Br	B-Br	Gr-Br	B-Br	B-Br

ตารางที่ 9 แสดงค่า R_f ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทำละลาย III

R _f	10% H ₂ SO ₄						10% H ₂ SO ₄ & UV 366						Anisaldehyde-sulfuric acid					
	Mg (w)	Mg (w)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms	Mg (w)	Mg (w)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms	Mg (w)	Mg (w)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms
0.99	Br-P		Br-P		Br-P	Br-P	Br-O	Br	Br-O	Br	Br-O	Br-O	V-R	V-R	V-R	V-R		V-R
0.95													V-R	V-R	V-R			
0.90													Gr-Br	V-Gr	V-Gr	V-R		Gr
0.87												R						
0.85													Br	Br	Br	Br		
0.83	Gr	Gr	Gr		Gr		R	O-P	R		R							
0.79													B	B	B	B	B	B
0.73	Gr-B	Gr-B	Gr-B	Br	B	B	R-V	R-V	R-V	R-V	R-V	R-V	V-P	V-P	V-P	V-P		V-P
0.71																		
0.67														Gr	Gr	Gr		
0.61	Gr	Gr	Gr	Gr	Gr	Gr	O-R	O-R	O-R	O-R	O-R	O-R						
0.46				Gr	Gr						O-R							
0.35														V	V			
0.28													Br	V-Br	V-Br	V-Br	P	V-Br
0.25													V	V	B	V	V-P	V
0.22			Gr				P-O	R			R							
0.19																Gr		
0.17	V	V	V	V	V	V	V-P	V-P	V-P	V-P	V-P	V-P						
0.15								B										
0.13																		
0.11					Gr		R-V	R			R							
0.08													V	V	V	V	V	V
0.00	Br	Br	V	Br	V	V	Br	Br	V	Br	V	V	Br-D	Br-D	Br-D	Br-D	Br-D	Br-D

3. โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดิน

(1) ลักษณะ โครมาโทแกรมในระบบตัวทำละลาย I (ภาพที่ 17, ตารางที่ 10)

จากผลการทดลองพบว่าภายใต้แสง UV - 366 นาโนเมตร สารสกัดพืชแต่ละชนิดจะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.97, 0.44 และ 0.03 เหมือนกัน แต่ที่แตกต่างกัน คือใน Ms จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.25 และ 0.21 ใน Mg (vm) และ Mm พบแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.15 และแถบสะท้อนแสงสีฟ้าขาวที่ค่า R_f ประมาณ 0.07

เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอลจะปรากฏแถบสีชมพูของสารมาตรฐาน กรดเฟอร์รูลิกที่ค่า R_f ประมาณ 0.55 และจะเห็นแถบสีที่ค่า R_f ต่างๆ ของสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดคล้ายคลึงกัน คือจะพบแถบสีน้ำตาลแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.97 แถบสีม่วงน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.89 แถบสีน้ำตาลที่ค่า R_f ประมาณ 0.37 และ 0.15 แต่แถบสีน้ำตาลแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.86 จะพบเฉพาะใน Mg (ws), Mg (wl) และ Mg (pwm) และแถบสีชมพูม่วงที่ค่า 0.25 จะพบเฉพาะใน Mg (vm) และ Mm

เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV - 366 นาโนเมตร ภายหลังจากสเปรย์ด้วย 10 % กรดกำมะถันในเอทานอลจะเห็นแถบสะท้อนแสงสีชมพูแดงของพืชแต่ละชนิดที่ค่า R_f ต่างๆ ของแถบสารในแต่ละสีใกล้เคียงกัน แต่จะพบแถบสะท้อนแสงสีแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.25 เฉพาะใน Mg (pwm), Mg (vm) และ Mm แถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.21 เฉพาะใน Ms และแถบสะท้อนแสงสีฟ้าขาวที่ค่า R_f ประมาณ 0.07 ใน Mg (vm) และ Mm

เมื่อตรวจสอบด้วย Dragendorff's reagent จะพบแถบสีส้มของสารมาตรฐาน ไปเปอร์รีนที่ค่า R_f ประมาณ 0.92 และจะพบแถบสีส้มที่ค่า R_f ประมาณ 0.03 ใน Mg (ws), Mg (wl), Mg (pwm), Mg (vm) และ Mm

(2) ลักษณะ โครมาโทแกรมในระบบทำละลาย II (ภาพที่ 18, ตารางที่ 11)

จากผลการทดลองพบว่าภายใต้แสง UV-254 นาโนเมตร จะพบแถบสะท้อนแสงสีม่วงอมน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.2 ใน Mg (ws), Mg (wl) และ Mg (pwm) แถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.12 ใน Mg (vm) และ Mm เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร ที่ค่า R_f ดังกล่าวจะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีน้ำเงินและสีฟ้าขาวตามลำดับ ส่วนแถบสะท้อนแสงสีเหลืองเขียวที่ค่า R_f 0.46 พบใน Mg (ws) และ Mg (wl) แถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.61 พบใน Mg (vm) แถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.95, 0.76, 0.37 และ 0.29 พบใน Ms

เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล จะปรากฏแถบสีเหลืองของสารมาตรฐานรูทีนแถบสีชมพูอมม่วงของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูลิก ส่วนสารสกัดของพืชแต่ละชนิดจะพบแถบสีม่วงแดง สีม่วงและสีน้ำตาลที่ค่า R_f ต่าง ๆ ใกล้เคียงกัน แต่จะไม่พบแถบสีน้ำตาลค้ำหนาทึบที่ค่า R_f ประมาณ 0.05 ใน Ms และ Mb2 และจะเห็นแถบสีม่วงน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.76 พบใน Ms ที่ค่า R_f ประมาณ 0.46 พบใน Mg (wl) และที่ค่า R_f ประมาณ 0.39 พบใน Mg (wl), Mg (pwm) และ Mg (vm) แถบสีชมพูน้ำตาลที่ค่า R_f ประมาณ 0.54 พบใน Mg (pwm)

เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV - 366 นาโนเมตร ภายหลังจากสเปรย์ด้วย 10 % กรดกำมะถันในเอทานอลจะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเขียวของสารมาตรฐานรูทีน แถบสะท้อนแสงสีฟ้าขาวของสารมาตรฐาน

กรดเฟอร์รูสิกและแถบสะท้อนแสงสีส้มแดง สัมชมพู สีน้ำตาลส้มของพืชแต่ละชนิดที่ค่า R_f ต่างๆ ใกล้เคียงกัน แต่ที่แตกต่างกัน คือจะพบแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.95 ใน Ms ที่ค่า R_f ประมาณ 0.61 ใน Mg (vm) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.55 ใน Mg (vm) และ Mm และที่ค่า R_f ประมาณ 0.29 ใน Ms แถบสะท้อนแสงสีฟ้าขาวที่ค่า R_f ประมาณ 0.95 ใน Mm แถบสะท้อนแสงสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.73

เมื่อตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอลและสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเขียวเหลืองของสารมาตรฐานรูทีน ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะพบแถบสะท้อนแสงสีเหลืองเขียวและสีฟ้าแตกต่างกัน คือจะพบแถบหนาสีสะท้อนแสงสีฟ้าขาวที่ค่า R_f ประมาณ 0.12 เฉพาะใน Mg (vm) และ Mm แถบสะท้อนแสงสีฟ้าขาวที่ค่า R_f ประมาณ 0.95 ใน Ms

เมื่อตรวจสอบด้วยสารละลาย DPPH จะพบแถบสีเหลืองของสารมาตรฐานรูทีนและแถบสีเหลืองในสารสกัดทุกชนิด

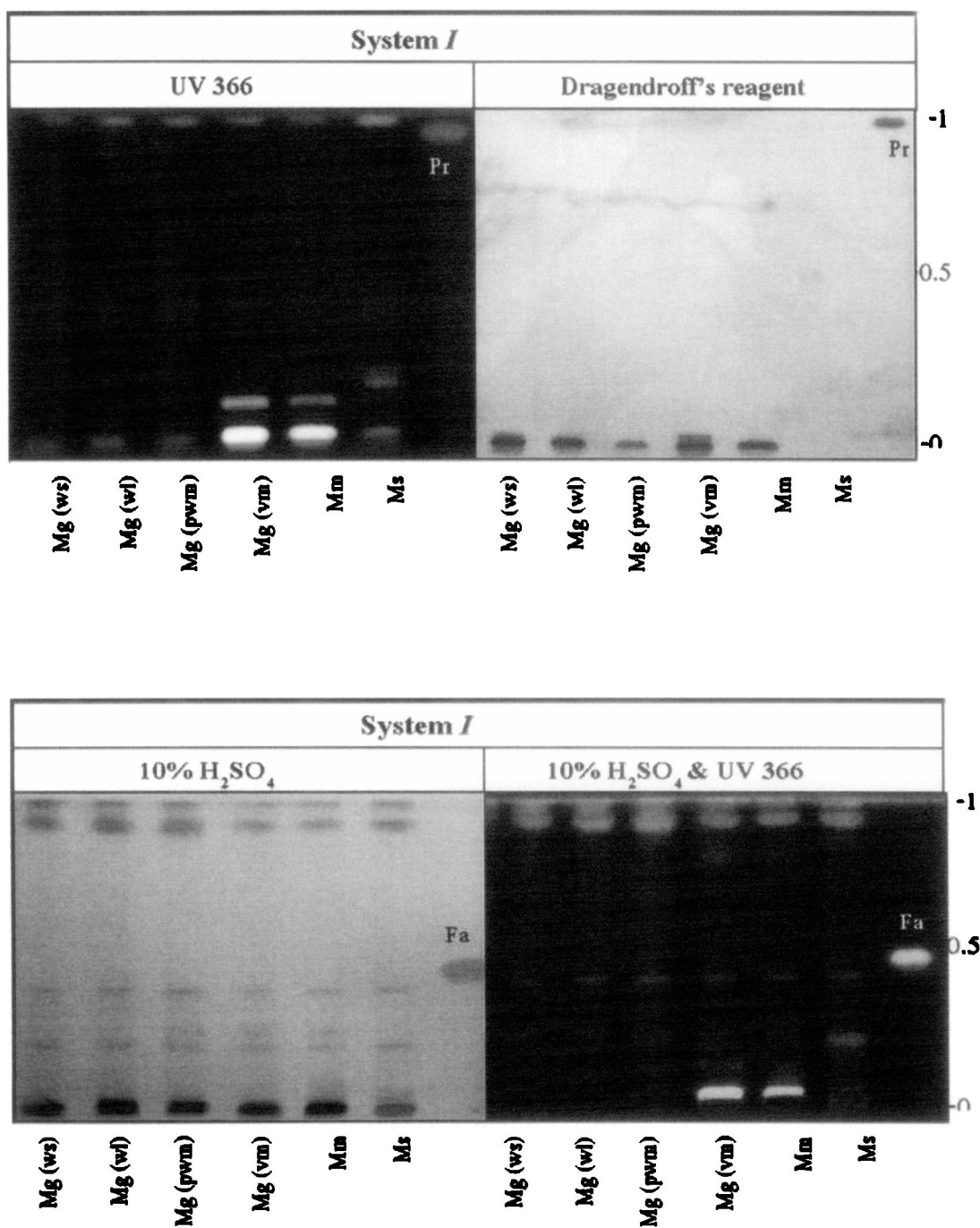
(3) ลักษณะโครมาโทแกรมในระบบตัวทำละลายชุด III (ภาพที่ 19, ตารางที่ 12)

จากผลการทดลองพบว่าภายใต้แสง UV-254 นาโนเมตร จะพบแถบดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูสิกและแอนโดกราฟีโฟไลด์ที่ค่า R_f ประมาณ 0.18 และ 0.08 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดพืชแต่ละชนิดจะพบแถบดูดกลืนแสงที่ค่า R_f ณ จุดเริ่มต้น เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร จะพบแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ดังกล่าว และที่ค่า R_f ประมาณ 0.75

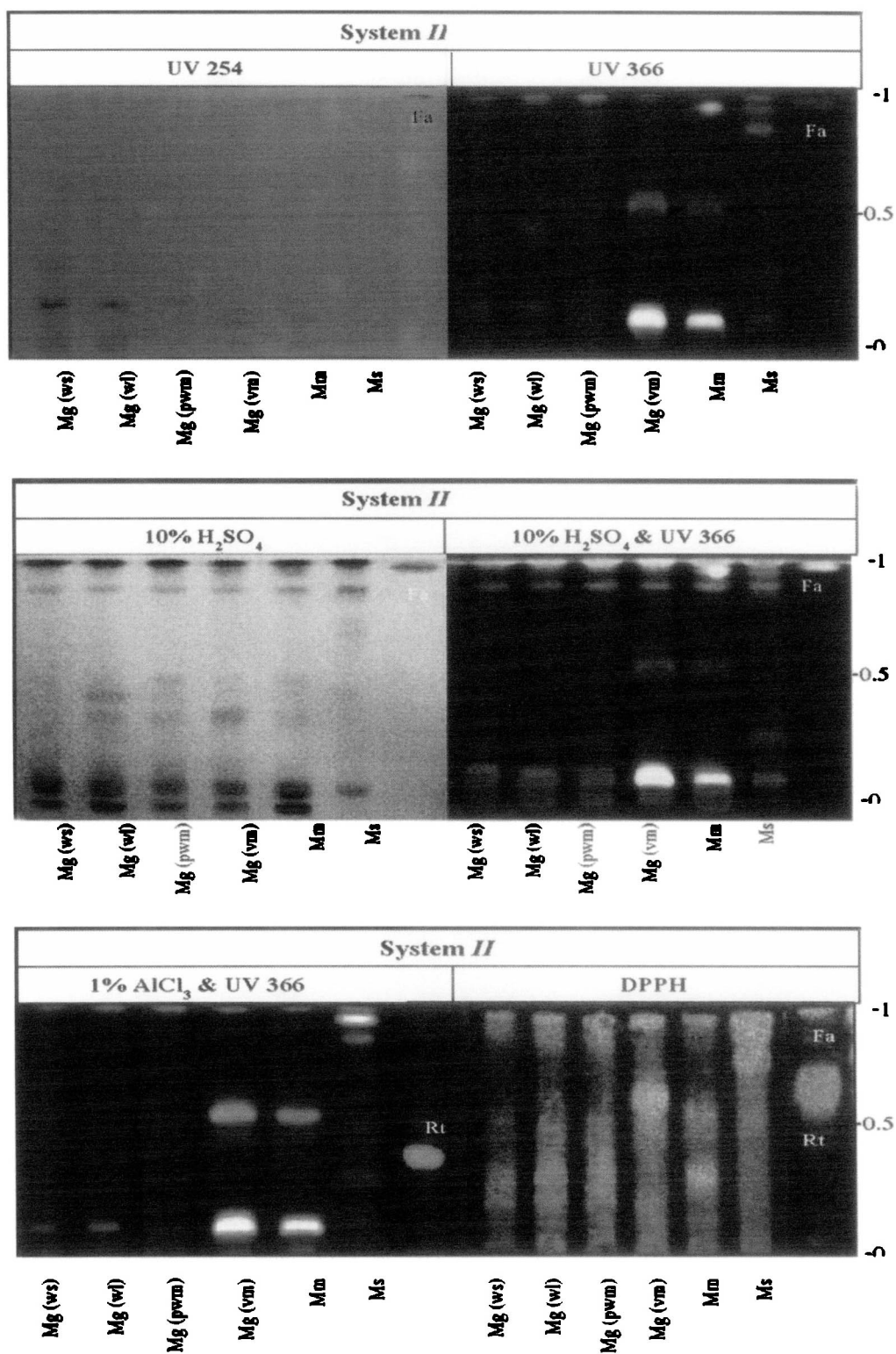
เมื่อตรวจสอบด้วย anisaldehyde-sulfuric acid จะพบแถบสีม่วงอมชมพูของสารมาตรฐานกรดเฟอร์รูสิกและแถบสีม่วงแดงของแอนโดกราฟีโฟไลด์ ส่วนสารสกัดพืชแต่ละชนิดจะปรากฏแถบสีม่วงที่ค่า R_f ประมาณ 0.72 และ 0.34 เหมือนกัน แต่ที่แตกต่างกัน คือจะพบแถบสีม่วงแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.68 เฉพาะใน Mg (ws), Mg (wl) และ Mg (pwm)

เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล พืชแต่ละชนิดจะปรากฏแถบสีม่วง น้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.72 แถบสีน้ำตาล 0.34 เหมือนกัน แต่ที่แตกต่างกัน คือจะพบแถบสีน้ำตาลที่ค่า R_f ประมาณ 0.68 เฉพาะใน Mg (ws), Mg (wl) และ Mg (pwm)

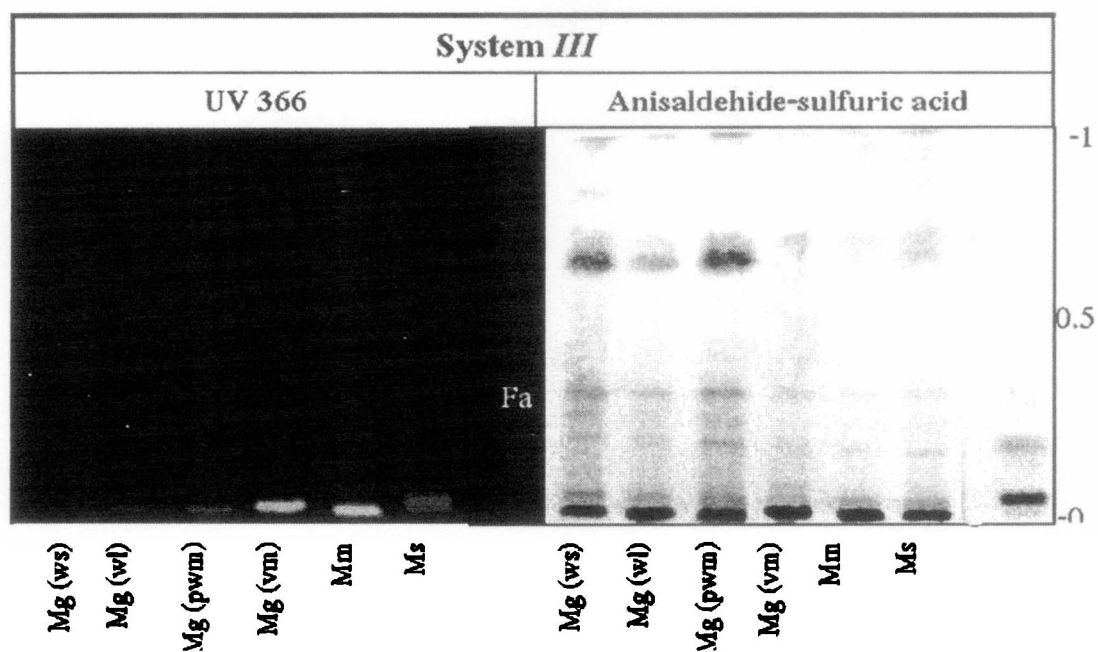
เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV - 366 นาโนเมตร ภายหลังสเปรย์ด้วย 10 % กรดกำมะถันในเอทานอลจะพบแถบสะท้อนแสงสีม่วงอมชมพูที่ค่า R_f ต่างๆ ใกล้เคียงกัน ในพืชแต่ละชนิด แต่ที่แตกต่างกัน คือจะพบแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.55 เฉพาะใน Ms แถบสะท้อนแสงสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.47 เฉพาะใน Mg (vm)



ภาพที่ 17 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ *Murdannia gigantea* [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm) และ *M. simplex* (Ms) ในระบบทำละลาย / โดยใช้ Ferulic acid (Fa) และ Piperine (Pr) เป็นสารมาตรฐาน



ภาพที่ 18 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ *Murdannia gigantea* [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm) และ *M. simplex* (Ms) ในระบบ ทำละลาย II โดยใช้ Ferulic acid (Fa) และ Rutin (Rt) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ



ภาพที่ 19 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ *Murdannia gigantea* [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm) และ *M. simplex* (Ms) ในระบบทำละลาย III โดยใช้ Ferulic acid (Fa) และ Andrographolide (Al) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ

ตารางที่ 10 แสดงค่า R_f ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทาละลาย I

R_f	UV 366						10 % H_2SO_4						10 % H_2SO_4 & UV 366					
	Mg (ws)	Mg (wl)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms	Mg (ws)	Mg (wl)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms	Mg (ws)	Mg (wl)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms
0.97	B	B	B	B	B	B	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R	P-R	P-R	P-R	P-R	P-R	P-R
0.89							V-B	V-B	V-B	V-B	V-B	V-B	P-R	P-R	P-R	P-R	P-R	P-R
0.86							Br-R	Br-R	Br-R									
0.44	B	B	B	B	B	B												
0.37							Br	Br	Br	Br	Br	Br	P-R	P-R	P-R	P-R	P-R	P-R
0.36																		
0.27																		
0.25						B				P-V	P-V				R	R	R	
0.21						B							P-R	P-R	P-R	P-R	P-R	B
0.15				B	B		Br	Br	Br	Br	Br	Br				B		Br
0.07				B-L	B-L											B-L	B-L	
0.03	B	B	B	B	B	B	Br-D	Br-D	Br-D	Br-D	Br-D	Br-O	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R	Br-B

B: blue, Br: brown, D: dark, F: faint, G: gray, Gr: green, L: light, O: orang, P: pink, R: red, S: strong, W: weak, V: violet, Y: yellow.

ตารางที่ 11 แสดงค่า n_D ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทำละลาย II

R_f	UV 366						10% H_2SO_4						10% H_2SO_4 & UV 366						1% $AlCl_3$ & UV 366					
	Mg (wl)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms		Mg (ws)	Mg (wl)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms	Mg (ws)	Mg (wl)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms	Mg (ws)	Mg (wl)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms
0.98	B	B	B	B	B		V-R	V-R	V-R	V-R	V-R	V-R	O-R	O-R	O-R	O-R	O-R	O-R	Gr-B	Gr-B	Gr-B	Gr-B	Gr-B	Gr-B
0.95				Gr	B													B						B-L
0.88							V	V	V	V	V	V	O-P	O-P	O-P	O-P	O-P	O-P						
0.76												V-B												
0.73					B																			
0.65																								Y-Gr
0.61			B													B						B		
0.55			B	B												B	B					B	B	
0.54															P-Br									
0.49																			B	B	B	B	B	B
0.46	Y-Gr							Y-B			Br													
0.39								V-B	V-B	V-B	Br													
0.37					B														Y-B	Y-B	Y-B	Y-B	Y-B	
0.29					B													B						B
0.19	B	B																						
0.14		B	B-L (S)	B-L (S)	B								Gr	Gr	Br-O	B-L						B-L		Y-Gr
0.12							Br (S)	Br (S)	Br	Br	Br	Br	Br-O	Br-O	Br-O	B-L	B-L	Br-O	B	B	B	B-L	B-L	B
0.05							Br (S)	Br (S)	Br	Br	Br (S)		Br-O	Br-O	Br-O	Br-O	Br-O					B	B	

ตารางที่ 12 แสดงค่า n_d ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิด ในระบบทำลาย III

R_f	UV 366					Anisaldehyde-sulfuric acid					Anisaldehyde-sulfuric acid & UV 366				
	Mg (ws)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms	Mg (wl)	Mg (ws)	Mg (pwm)	Mg (vm)	Mm	Ms	Mg (wl)	Mg (ws)	Mg (pwm)	Mg (vm)
0.82	B	B	B	B	B	G	G	G							
0.73						V-B	V-B	V-B	V-B	V-B	V-B				
0.70						V-R	V-R	V-R				R-O	R-O	R-O	
0.39						Br	Br	Br	Br	Br	Br				
0.32	B	B				G						R-O	R-O	R-O	
0.25	B	B				V-B	V-B	V-B							
0.20	B	B	B	B	B				Br	Br	Br				
0.16									V-B						
0.05					B	V-B	V-B	V-B	V-B	V-B	V-B				B
0.00	B	B	B	B	B	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

ผลการศึกษาเปรียบเทียบขององค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ *M. gigantea* [Mg (wl), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm) และ *M. simplex* (Ms) ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาเดียวกัน พบว่าปริมาณร้อยละของสารที่สกัดด้วยเมทานอลและสารสกัดด้วยน้ำของ พืชแต่ละชนิดมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่สารสกัดด้วยน้ำจะให้ปริมาณสารสกัดมากกว่าทั้งจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินและจากการศึกษาลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดดังกล่าวพบว่า

1. ผลการศึกษาเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดิน

พืชกลุ่มนี้มีสารองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (triterpenoids) ดังแสดงในภาพที่ 16 และตารางที่ 9 เมื่อแยกด้วยระบบตัวทำละลาย III จะปรากฏแถบสารสีม่วง ม่วงแดง น้ำตาล ที่ค่า R_f ต่างๆ คล้ายกันในพืชแต่ละชนิด [สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ เมื่อตรวจสอบด้วย 10% H_2SO_4 จะปรากฏแถบสีม่วง ม่วงแดง น้ำตาลแดง เหลือง น้ำเงิน (Coscia, 1987; Harborne, 1984; Macek, 1972) ตรวจสอบด้วย anisaldehyde-sulfuric acid จะปรากฏแถบสีน้ำตาล ม่วง ส้ม เทา (Martelanc et al., 2009)] สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ดังแสดงในภาพที่ 15 และตารางที่ 8 เมื่อแยกด้วยระบบตัวทำละลาย II โดยใช้กรดเฟอรูลิกและรูทีนเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์สังเคราะห์จะปรากฏแถบสีเหลือง บางชนิดไม่ปรากฏสีและภายใต้แสง UV-366 จะปรากฏแถบแสงสะท้อนสีเหลือง เขียว น้ำเงิน (Griffiths, Smith, 1972; Macek, 1972; Cooper, Rao, 1992; DeRijke et al., 2006) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการศึกษาพืชสกุลเดียวกันในก่อนหน้านี (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2551; Chaichumporn et al., 2008; Kaewsaart et al., 2008) แต่ผลการศึกษาครั้งนี้พบสารในกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นรายงานครั้งแรกในพืชสกุลนี้ ดังแสดงในภาพที่ 14 เมื่อแยกด้วยระบบตัวทำละลาย I โดยใช้ไพเพอรีน (piperine) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วย dragendorff's reagent สังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏแถบสีส้ม (Wagner et al., 1984) ซึ่งพบในพืชทุกชนิด

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของระบบทำละลายในการแยกความแตกต่างโครมาโทแกรม จะเห็นว่าระบบทำละลายที่สามารถแสดงความแตกต่างของโครมาโทแกรมได้เป็นอย่างดี คือระบบทำละลายที่ II เป็นระบบทำละลายที่เหมาะสมที่จะแยกสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (ภาพที่ 15, ตารางที่ 8) โดยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่แยกได้ในพืชดังกล่าวมีความแตกต่างกับสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบในพืชสกุลเดียวกัน และต่างสกุลในวงศ์เดียวกันนี้ ได้แก่ *M. bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora* (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550) *M. japonica*, *M. spectabilis* และ *M. vaginata* (Chaichumporn et al., 2008) *Cyanotis arachnoidea*, *C. axillaris*, *C. thwaitesii* และ *C. vaga* (Kaewsaart et al., 2008) สนับสนุนรายงานการวิจัยอนุกรมเชิงเคมีของพืชวงศ์ Commelinaceae ทั้งหมดที่ผ่านมาที่ใช้สารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นสารสำคัญในการจัดจำแนกชนิด (Stirton, Harborne, 1980; Martinez, 1985; Martinez, Swain, 1985; Martinez MADP, Martinez AJ, 1993; ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2551; Chaichumporn et al., 2008; Kaewsaart et al., 2008) ดังนั้นจึงสามารถใช้สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ในการจัดจำแนกพืชกลุ่มนี้ได้โดยเฉพาะ *M. gigantea* ดอกสีม่วงที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปคล้ายคลึงกับ *M. macrocarpa* ซึ่งการจำแนกที่อนุกรมพันธุมีปัจจัยจำกัด โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนโครงสร้างช่อดอก ดอก ผลและเมล็ด อันเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์ (Reproductive part) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยจำกัดของฤดูกาลและเวลาบานของดอก (Thitimetharoch et al., 2004) แต่การศึกษานี้ยังแสดงความแตกต่างโครมาโทแกรมของ

สารสกัดดังกล่าวได้อย่างชัดเจน เมื่อตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์และสังเกตภายใต้แสง UV - 366 นาโนเมตร โดย *M. Macrocarpa* จะพบแถบสะท้อนแสงสีฟ้าชัดเจนที่ค่า R_f ประมาณ 0.16 และ 0.11 ซึ่งต่างจาก *M. gigantea* และ *M. simplex* จึงอาจสรุปได้ว่าสามารถใช้วิธีThin layer chromatography ในการแยกชนิดของพืชกลุ่มนี้ ซึ่งสนับสนุนข้อมูลการจัดจำแนกพืชในสกุล *Murdannea* ที่จำแนก *M. macrocarpa* ออกจาก *M. gigantea* (Hong, De Filippis, 2000; Thitimetharoch et al., 2004)

นอกจากนี้ยังพบว่าใน *M. gigantea* ซึ่งมีลักษณะผันแปรทางถิ่นฐานวิทยาแตกต่างกันยังแสดงโครมาโทแกรมที่แตกต่างกันด้วย กล่าวคือ กลุ่มคอกกีสาวต้นขนาดเล็ก [Mg (ws)] จะพบแถบหนาสสะท้อนแสงสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.57 ส่วนกลุ่มคอกกีสาวต้นขนาดใหญ่ [Mg (wl)] และกลุ่มคอกกีสาวโคนม่วง [Mg (pwm)] จะปรากฏแถบสะท้อนแสงคล้ายคลึงกัน แต่ต่างกันตรงที่ Mg (wl) พบแถบสะท้อนแสงสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.93 และ 0.87 ส่วนกลุ่มคอกกีสาว [Mg (vm)] จะพบแถบหนาสสะท้อนแสงสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.39 และความแตกต่างของแถบสารที่ปรากฏเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็น chemical marker ของพืชแต่ละชนิดได้ ซึ่งแสดงให้เห็นโอกาสในการจำแนกพืชกลุ่มนี้ระดับสายพันธุ์ (variety)

เมื่อนำโครมาโทแกรมของพืชแต่ละชนิดที่แยกในระบบตัวทำละลายที่ II ไปตรวจสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] โดยสารที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] จะเปลี่ยนสีม่วงของสารละลาย DPPH ไปเป็นสีเหลือง จากผลการทดสอบจะสังเกตพบแถบสารสีเหลืองมากใน Mg (ws), Mg (wl) และ Mb1 (ภาพที่ 15) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของพืชกลุ่มนี้

สำหรับระบบชุดทำละลายที่ I และ III แสดงโครมาโทแกรมของพืชแต่ละชนิดคล้ายคลึงกัน และพบแถบสีม่วงที่ค่า R_f ประมาณ 0.88, 0.33 และ 0.23 (ภาพที่ 14: ระบบทำละลายที่ I ตรวจสอบด้วย H_2SO_4) พบแถบสีน้ำเงินและสีม่วงที่ค่า R_f ประมาณ 0.79 และ 0.08 (ภาพที่ 16: ระบบทำละลายที่ III ตรวจสอบด้วย anisaldehyde-sulfuric acid) เป็นสารประกอบหลัก (main compound) ของพืชกลุ่มนี้ ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นสารในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์เช่นเดียวกับที่พบใน *Murdannia bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora* (ธารินี สืบปาละและคณะ, 2550; 2007) จึงอาจนำมาใช้เป็น chemical marker ของพืชสกุลนี้ได้

2. ผลการศึกษาเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดิน

ผลการศึกษาพบว่า พืชกลุ่มนี้มีสารองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ โดยจะปรากฏแถบสารที่ค่า R_f ต่างๆ คล้ายกันในพืชแต่ละชนิด (ภาพที่ 17, 19 และ ตารางที่ 10, 12 : แยกด้วยระบบตัวทำละลาย I ตรวจสอบด้วย 10% H_2SO_4 จะปรากฏแถบสีม่วง น้ำตาล แยกด้วยระบบตัวทำละลาย III ตรวจสอบด้วย anisaldehyde-sulfuric acid จะปรากฏแถบสีม่วง สีน้ำตาล) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (ภาพที่ 18, ตารางที่ 11: แยกด้วยระบบตัวทำละลาย II ตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ สังเกตภายใต้แสง UV-366 จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลือง เขียว น้ำเงิน โดยใช้กรดเฟอร์ริกและรูทีนเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ) และสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ซึ่งพบเฉพาะใน *M. gigantea* และ *M. macrocarpa* แตกต่างจากส่วนเหนือดินที่พบในพืชทุกชนิด (ภาพที่ 17: แยกด้วยระบบทำละลาย I ตรวจสอบด้วย dragendorff's reagent สังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏแถบสีส้มโดยใช้ไปเปอร์รีนเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ) ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าพืชชนิดเดียวกันแต่ส่วนที่นำมาใช้ศึกษาแตกต่างกันจะพบองค์ประกอบทางเคมีในส่วนต่างๆ แตกต่างกัน ได้ เช่น Said (1986) รายงานไม่พบ

สาร alkaloids steroid triterpenoid และ saponin จากส่วนใบของ *Forrestia gracilis* แต่พบสารกลุ่ม steroid triterpenoid ในสารสกัดที่ได้จากส่วนเปลือก (bark) แสดงให้เห็นว่าพืชมีการสะสมสารเคมีในส่วนต่าง ๆ แตกต่าง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของระบบทำละลายในการแยกความแตกต่างโครมาโทแกรมจะเห็นว่าระบบทำละลายที่ II สามารถแสดงความแตกต่างของโครมาโทแกรมระหว่างพืชแต่ละชนิดและยังแสดงความแตกต่างในพืชที่มีลักษณะค้นแปรทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันได้เป็นอย่างดี ซึ่งสนับสนุนผลการศึกษาโครมาโทแกรมจากส่วนเหนือดิน กล่าวคือ เมื่อทำการตรวจสอบด้วยกรดกำมะถันสารสกัดของพืชแต่ละชนิดจะพบแถบสีม่วงแดง สีม่วงและสีน้ำตาลที่ค่า R_f ต่างๆ ใกล้เคียงกัน แต่ที่แตกต่างกัน คือ ไม่พบแถบสีน้ำตาลดำหนาที่ค่า R_f ประมาณ 0.05 ใน Ms และ Mb2 และจะเห็นแถบสีม่วงน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.76 ใน Ms ที่ค่า R_f ประมาณ 0.46 ใน Mg (wl) และที่ค่า R_f ประมาณ 0.39 ใน Mg (wl), Mg (pwm) และ Mg (vm) แถบสีชมพูน้ำตาลที่ค่า R_f ประมาณ 0.54 ใน Mg (pwm) (ภาพที่ 18, ตารางที่ 11) ซึ่งกลุ่มสารที่ปรากฏน่าจะเป็นคนละชนิดกับที่พบในส่วนเหนือดิน คือ ไม่พบกลุ่มสารที่ทำปฏิกิริยากับกรดกำมะถันแล้วปรากฏแถบสีเหลืองหรือกลุ่มสารที่สะท้อนแสงสีเหลืองเขียวเมื่อตรวจสอบ 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ ที่ค่า R_f เดียวกันกับที่พบในส่วนเหนือดิน

เมื่อนำโครมาโตแกรมของพืชแต่ละชนิดที่แยกในระบบตัวทำละลายที่ II ไปตรวจสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] โดยสารที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] จะเปลี่ยนสีม่วงของสารละลาย DPPH[•] ไปเป็นสีเหลือง จากผลการทดสอบพบแถบสารสีเหลืองในพืชทุกชนิด (ภาพที่ 18) โดย *M. gigantea* กลุ่มดอกสีขาวและสีขาวโคนม่วงจะพบแถบสารสีเหลืองหนาที่ค่า R_f ต่างๆ คล้ายคลึงกัน (R_f = 0.31 และ 0.20) ซึ่งแตกต่างกับ *M. gigantea* กลุ่มดอกสีม่วง (R_f = 0.63) *M. macrocarpa* (R_f = 0.57 และ 0.31) และ *M. simplex* (R_f = 0.91 และ 0.77) และคาดว่าเป็นสารคนละชนิดกับที่พบในส่วนเหนือดิน

อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ยังเป็นการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น แต่ยังแสดงให้เห็นว่าพืชสกุลนี้มีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีความหลากหลายและแตกต่างกันในแต่ละชนิด ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับอนุกรมวิธานทางเคมีเชิงลึกต่อไปได้ เช่น การแยกสกัดและตรวจสอบเอกลักษณ์หาสารสำคัญกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่อยู่ในพืชแต่ละชนิดโดยเฉพาะสารที่แตกต่างกันสามารถนำมาใช้เป็น chemical marker ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชแต่ละชนิดในขั้นต่อไป

บทที่ 4

การศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและการต้านออกซิเดชัน

การทบทวนวรรณกรรม

สาเหตุของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในร่างกายเกิดได้ทั้งจากอนุมูลอิสระ (free radicals) และอนุภาคว่องไวออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นโมเลกุล หรือ อะตอมที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) โคจรรอบวงนอกสุดของออร์บิทัล (orbital) จึงทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรต่ำและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ (โอภา วัชรคุปต์, 2549) การเกิดปฏิกิริยาสามารถเกิดได้หลากหลายชนิด ไม่มีความจำเพาะอีกทั้งกระทำตัวคล้ายเป็น secondary messengers ชักนำมาซึ่งกระบวนการต่างๆ ในระดับโมเลกุล (Paeck et al., 1991) ส่วน ROS หมายถึง โมเลกุลที่ว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทั้งที่เป็นอนุมูลอิสระและที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระของออกซิเจน ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ในร่างกาย ตัวอย่างเช่น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, O_2^-) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) อนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical, $HO^\bullet$) ซิงเกิลออกซิเจน (singlet oxygen, 1O_2) อนุมูลลิพิดเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxy radical, $LOO^\bullet$) อนุมูลอัลคิลเปอร์ออกไซด์ (alkylperoxy radical, $LO^\bullet$) (Halliwell et al., 1995) เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวภาพหลายอย่างในร่างกายในภาวะปกติร่างกายจะสร้างอนุมูลอิสระในอัตราที่เป็นปกติและเป็นไปในแนวทางที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย แต่ในภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมามากเกินความสามารถของกระบวนการต้านออกซิเดชัน หรือการลดลงของสารต้านออกซิเดชันทำให้เกิดภาวะไม่สมดุลระหว่างสารต้านออกซิเดชันและสารอนุมูลอิสระก่อให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์และก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ มากมาย เช่น โรคเกี่ยวกับระบบหัวใจและหลอดเลือด มะเร็ง โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท โรคเบาหวาน การอักเสบและการแก่ชรา (โอภา วัชรคุปต์, 2549; Aruoma, 1994)

สารต้านออกซิเดชันมีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันเนื้อเยื่อจากการทำลายของอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิดขึ้นตลอดเวลาในกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย (Gutteridge, Halliwell, 2000) จึงจำเป็นที่เรจะต้องได้รับสารต้านออกซิเดชันจากภายนอก เป็นที่ทราบกันดีว่าพืชเป็นแหล่งของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและสารจำพวกฟีนอล (phenolic compounds) เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่พบมากในพืช ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ได้แก่ สารจำพวก flavonoids ที่มี catechol เป็นองค์ประกอบ stilbenes และ tannins ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxy group กลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือเมื่อมีอนุมูลอิสระมาคิงอิเล็กตรอนไป แต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป (Pietta, 2000) โดยทำหน้าที่จับหรือฟอร์มพันธะโคออร์ดิเนตกับโลหะหนัก (chelating agent) เช่น ทองแดงและเหล็ก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างรวมทั้งปฏิกิริยาถูกไข่ของอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาถูกไข่ (chain breaking antioxidant) ในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระ เช่น lipid alkoxyl และ peroxy radicals เป็นต้น โดยทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลเหล่านั้น ซึ่งฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารในกลุ่มของกรดฟีนอลิกและเอสเทอร์ของกรดฟีนอลิกจะขึ้นกับจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุล (โอภา วัชรคุปต์, 2549)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกกับความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระในพืชด้วยวิธี FRAP และ TEAC พบว่ามีความสัมพันธ์กันในเชิงบวก กล่าวคือถ้ามีสารประกอบฟีนอลิกสูงก็จะมีค่าความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระสูงและถ้ามีสารประกอบฟีนอลิกต่ำก็มีค่าความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระต่ำไปด้วย (นันท์นภัส เต็มวงศ์, 2551; Krpan et al., 2009)

1.ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชสกุล *Murdannia*

M. bracteata (หญ้าปากกิ้ง) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 74.61 ± 6.36 และ 55.78 ± 2.35 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัด เทียบกับ ferulic acid เมื่อสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินตามลำดับ โดยสารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ต่ำกว่าสารสกัดด้วยน้ำ คือมีค่า $EC_{50} = 246.90 \pm 16.75$ และ 620.97 ± 63.39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับค่าความสามารถในการเป็น Reducing agent เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี FRAP (0.66 และ 0.48 mmole Fe²⁺ / mg extract) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิตเปอร์ออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ต่ำกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล ($EC_{50} = 1.51 \pm 0.076$ และ 2.00 ± 0.090 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ) (ชาวินี สืบปาละ และคณะ, 2551) นอกจากนี้ สารแบลคทาโนไลด์เอ สารแบลคทาโนไลด์บีและไอโซเวทกซินที่สกัดได้จากสมุนไพรหญ้าปากกิ้งสามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) และสารแบลคทาโนไลด์เอสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนตริก ออกไซด์ซินเทส (inducible nitric oxide synthase, iNOS) จากเซลล์แมกโครฟาจ (macrophages) เมื่อกระตุ้นด้วยสารลิโปโพลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides) ซึ่ง iNOS เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตไนตริกออกไซด์ในสภาวะการอักเสบ (Wang et al., 2007)

M. loriformis (ผักลิ้มหัวใหญ่) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 37.95 ± 4.16 และ 56.26 ± 2.27 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัด เทียบกับ ferulic acid เมื่อสกัดด้วยเมทานอลและน้ำตามลำดับ โดยสารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ต่ำกว่าสารสกัดด้วยน้ำ คือมีค่า $EC_{50} = 408.80 \pm 18.01$ และ 427.12 ± 89.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับค่าความสามารถในการเป็น reducing agent เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี FRAP (0.57 และ 0.43 mmole Fe²⁺ / mg extract) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิตเปอร์ออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ต่ำกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล ($EC_{50} = 1.61 \pm 0.071$ และ 2.27 ± 0.149 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร ตามลำดับ) (ชาวินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551)

M. nudiflora (กินกุ่มน้อย) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก 16.31 ± 1.68 และ 37.91 ± 1.80 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัด เทียบกับ ferulic acid เมื่อสกัดด้วยเมทานอลและน้ำตามลำดับ โดยสารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ต่ำกว่าสารสกัดด้วยน้ำ คือมีค่า $EC_{50} = 804.16 \pm 55.84$ และ 1124.68 ± 42.09 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับค่าความสามารถในการเป็น reducing agent เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี FRAP (0.46 และ 0.35 mmole Fe²⁺ / mg extract) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิตเปอร์ออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ต่ำกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล ($EC_{50} = 1.09 \pm 0.065$ และ 2.37 ± 0.220 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) (ชาวินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551)

2. การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง

การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันมี 2 กลไก คือการวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (electron transfer, ET หรือ SET) เป็นการวิเคราะห์หาความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไป

วิธีวัดสารอื่น ยกตัวอย่างแบบการทดลองในกลไกนี้ ได้แก่ วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) และการหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก (Folin-Ciocalteu) และการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer, HAT) เป็นการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชัน ในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการให้อะตอมไฮโดรเจน ยกตัวอย่างแบบการทดลองในกลไกนี้ ได้แก่ การยับยั้ง ลิพิดเปอร์ออกซิเดชันด้วยวิธี thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) (โอภา วัชรคุปต์, 2549) โดยหลักการของแต่ละวิธีมีรายละเอียดดังนี้

DPPH assay อนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร เมื่อละลายในเมทานอลจะมีสีม่วงเข้มและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร สารต้านออกซิเดชันที่มีความสามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH[•] จะทำให้ความเข้มของสีสารละลาย DPPH ลดลงแล้วเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองอ่อนมีผลทำให้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ลดลง (Bondet et al., 1997) ข้อดีของการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH assay คือเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก และใช้เวลาน้อยและสามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องสเปกโทโฟโตมิเตอร์ หรือเครื่องไมโครเพลทรีดเคอร์ (microplate reader) ได้ ซึ่งทำให้ประหยัดสารเคมีสะดวกและรวดเร็ว ส่วนข้อเสีย คืออนุมูลอิสระ DPPH[•] มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนกับอนุมูลที่เกิดขึ้นในร่างกาย จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลอิสระที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH[•] ที่อิเล็กตรอนเดี่ยวจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วงซึ่งอยู่ภายในสุดของโครงสร้างและหมู่ไนโตรทำให้สารต้านออกซิเดชันที่มีฤทธิ์แรง แต่มีโมเลกุลขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากำจัดอนุมูลอิสระ หรือเกิดขึ้นช้ากว่าความเป็นจริงทั้งที่สารต้านออกซิเดชันมีฤทธิ์ดีในการกำจัดอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถพิสูจน์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันที่ดีที่สุดจำเป็นต้องมีวิธีวัดวิธีอื่นมาสนับสนุน (โอภา วัชรคุปต์, 2549)

FRAP assay เป็นการทดสอบโดยตรงเพื่อวัดความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน รวมทั้งหมด (total antioxidant capacity) โดยอาศัยหลักการที่ว่าสารต้านออกซิเดชันในร่างกายทำหน้าที่โดยการให้อิเล็กตรอน ซึ่งจัดเป็นสารรีดิวซ์และมีคุณสมบัติเป็นสารจับโลหะ หลักการการทดสอบของวิธีนี้ คือภายใต้สภาวะความเป็นกรดสารประกอบเชิงซ้อนของ Ferric tripyridyl triazine (Fe^{3+} - TPTZ) จะถูกรีดิวซ์ได้เป็น ferrous tripyridyl triazine (Fe^{2+} - TPTZ) ซึ่งให้สารละลายสีน้ำเงินและสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ดังนั้นสารใดให้อิเล็กตรอนเพื่อเปลี่ยน Fe^{3+} - TPTZ ไปเป็น Fe^{2+} - TPTZ ได้จะมีค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้นแสดงว่าสารนั้นมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยการรีดิวซ์เหล็ก Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} (Benzie, Strain, 1996) สำหรับข้อดีของวิธีนี้ คือเป็นวิธีที่ง่ายใช้เวลาไม่แพงและไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ สามารถประยุกต์ใช้กับเครื่องไมโครเพลทรีดเคอร์ได้ ส่วนข้อเสีย คือไม่สามารถวัดสารต้านออกซิเดชันที่กำจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจนได้และปฏิกิริยาเกิดที่ pH ต่ำ ซึ่งความเป็นกรดจะลดค่าความต่างศักย์ในการแตกตัวของอามอนิอัมทำให้เร่งการส่งผ่านอิเล็กตรอนและเพิ่มค่าความต่างศักย์รีด็อกซ์ (โอภา วัชรคุปต์, 2549)

Folin-Ciocalteu assay การหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกที่มีความสามารถเป็นสารรีดิวซ์ หรือมีคุณสมบัติเป็น metal chelators ในกลไกการทดลองเป็นแบบปฏิกิริยารีดอกซ์ ซึ่งถูกพัฒนามาจากการวิเคราะห์ปริมาณสาร tyrosine (Folin, Ciocalteu, 1927) โดยใช้ molybdotungstate reagent ไปทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอลิก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยามีสีน้ำเงิน ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง

745-750 นาโนเมตร (Singleton, Rossi, 1965) โดยใช้ ferulic acid เป็นสารมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิก (Velioglu et al., 1998) ข้อดี เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก มีการรบกวนของสารที่มีสีในตัวอย่างได้น้อยที่การดูดกลืนแสงของความยาวคลื่นที่ยาวและสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติหลากหลายชนิดและเป็นวิธีมาตรฐานที่ยอมรับในการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันจากอาหารทั่วไป ข้อเสีย คือมีสารบางกลุ่มที่ทำให้ค่าที่วัดได้ผิดพลาด เช่น น้ำตาล เอมีน ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ วิตามินซี สารกลุ่ม enediols และ reductones กรดอินทรีย์และ Fe (II) สามารถทำปฏิกิริยากับ folin-ciocalteu reagent ได้สีน้ำเงินทำให้ค่าที่วัดได้มากกว่าความเป็นจริงและไม่สามารถทดสอบสารต้านออกซิเดชันที่ละลายในไขมันได้ เนื่องจากวิธีนี้ถูกพัฒนาเพื่อวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันที่มีขั้ว หรือ สามารถละลายได้ในเฟสน้ำ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่จัดเป็นวิธีการวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยตรง แต่เป็นการวัดระดับสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเป็นสารต้านออกซิเดชัน

TBARS assay หลักการ คือ ปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) เป็นกระบวนการทำลาย polyunsaturated fatty acid (PUFA) โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันเริ่มต้นโดยอนุมูลอิสระไปดั่งอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวทำให้โมเลกุลของไขมันเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระของไขมัน คือ lipid radical (L) แล้วทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับออกซิเจนเป็น lipid peroxy radical ($LO_2^{\cdot}$) ซึ่งจะไปดั่งอะตอมไฮโดรเจนจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดอื่นๆ สุดท้ายทำให้เกิด linoleic acid hydroperoxide (LOOH) ที่มีผลทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆ เช่น มาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) แล้วได้ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) มีสีชมพูและดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ซึ่งการตรวจวัด TBARS นั้นจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเกิดสถานะลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน สำหรับการประเมินสถานะการเกิดปฏิกิริยานี้ทำได้โดยนำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาทำปฏิกิริยากับ TBA ภายใต้สภาวะกรด ($pH \leq 3$) ที่อุณหภูมิสูงได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน TBARS และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Okawa et al., 1979)

วิธีดำเนินการศึกษา

1. ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา อุปกรณ์และสารเคมี

(1) ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ส่วนเหนือดินที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์และส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิดที่เก็บในช่วงฤดูกาลออกดอกติดผลรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 13 แสดงรายละเอียดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและอ้างอิง

Samples	Code	Color of flower/ population	Locality	Collection date	Vouchers' no.
<i>M. gigantea</i>	Mg (wl1)	white / larger plant	Pha Taem forest, Ubonratchathani Province.	22/08/2009	SK, OC & TT 70
<i>M. gigantea</i>	Mg (wl2)	white / larger plant	Tup Phaya Suea waterfall, Khon Kaen Province.	27/06/2009	SK, OC & TT 41
<i>M. gigantea</i>	Mg (ws)	white / smaller plant	Ban Chom Manee, Nakhon Phanom Province.	09/08/2009	SK, OC & TT 58
<i>M. gigantea</i>	Mg (pwm)	purplish white / moderate	Phu Rua forest, Loei Province.	27/07/2009	SK, OC & TT 54
<i>M. gigantea</i>	Mg (vm)	violet / moderate	Phu Phan forest, Sakon Nakhon Province.	20/08/2009	SK, OC & TT 66
<i>M. macrocarpa</i>	Mm	violet	Phu Kradueng forest, Loei Province.	29/10/2009	TT, OC & SK 1205
<i>M. simplex</i>	Ms1	violet	Doi Suthep-Pui forest, Chiang Mai Province.	15/08/2009	SK, OC & TT 59
<i>M. simplex</i>	Ms2	violet	Doi Inthanon forest, Chiang Mai Province.	15/10/2009	TT, OC & SK 1194

SK = Sureerut Khaewsart, OC = Orasa Chaichumporn and TT = Thaweesak Thitimetharoach

(2) อุปกรณ์และเครื่องมือ

Evaporator (EYEL, Japan), Lyophilizer (Flexi-Dry, USA), 96-well microtiter plate, Microplate reader (Bio-Rad, Model 680), Autopipette ขนาด 20, 100 และ 1000 ไมโครลิตร, Centrifuge, Homogenizer, Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, Water bath (PolyScience, Switzerland)

(3) สารเคมี

Ferulic acid, DPPH (2,2 – Diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich, Germany), 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Germany), Ferric chloride, Ferrous sulfate (Aldrich, Germany), Sodium dodecyl sulfate (SDS), 2- Thiobarbituric acid (TBA), Butylated hydroxytoluene (BHT) (Fluka, Switzerland), Ethylene diaminetetra acetic (EDTA), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma-Aldrich, Germany), Ascorbic acid (AJAX CHEMICALS, Australia)

2. ขั้นตอนการศึกษา

(1) การเตรียมสารสกัด

นำส่วนเหนือดินที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์และส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิดที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน (ตารางที่ 13) มา 5 กรัม สกัดด้วยเมทานอลและน้ำอย่างละ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่า 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมารองส่วนที่เป็นของเหลวที่สกัดด้วยน้ำมาระเหยเห้าน้ำออกด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) ส่วนของเหลวที่สกัดด้วยเมทานอลนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เก็บในหม้อสุญญากาศ

(2) การหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก (Folin-Ciocalteu assay)

การหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกที่มีความสามารถเป็นสารรีดิวซ์ หรือมีคุณสมบัติเป็น metal chelators ในกลไกการทดลองเป็นแบบปฏิกิริยารีดอกซ์ วิธีการทดลองดัดแปลงจาก Singleton, Rossi (1965) ทำการละลายสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิด ด้วยเมทานอลและน้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการเตรียมสารมาตรฐานฟีนอลิก ferulic acid ในน้ำและเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (ความเข้มข้นตั้งแต่ 15-250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เจือจางสารละลาย folin-ciocalteu reagent (1:10 ด้วยน้ำ)

ทำการทดลองโดยเติม 200 ไมโครลิตร ของสารสกัดและ 200 ไมโครลิตร ของสารมาตรฐาน ferulic acid แต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดเติม 1.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย folin-ciocalteu reagent เขย่าให้เข้ากันรอให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์โดยทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 1.5 มิลลิลิตร ของ sodium carbonate (60 กรัม/ลิตร) ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที ดูดสารละลายในหลอดทดลอง 200 ไมโครลิตร ใส่ 96-well plate นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเคอร์ บันทึกผลทำการทดลองของการทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง ใช้ น้ำและเมทานอลเป็นตัวอย่างควบคุม สร้างกราฟมาตรฐานของ ferulic acid และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดของสารสกัดนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ferulic acid การหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด เทียบกับ ferulic acid (ferulic acid equivalents, FA) หน่วย มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัด คำนวณได้จากสมการ

$$C = c * V/m$$

เมื่อ C คือ ปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด (มิลลิกรัม/กรัม ของสารสกัด)

c คือ ความเข้มข้นของ ferulic acid ที่ได้จากการกราฟของสารสกัด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

V คือ ปริมาตรของสารสกัด (มิลลิลิตร)

m คือ น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)

(3) การทดสอบฤทธิ์ในการจับกับสารอนุมูลอิสระที่เสถียร (DPPH assay)

การทดสอบฤทธิ์ในการจับกับสารอนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH[•] สารใดก็ตามที่มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH[•] นี้ได้จะส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ลดลง วิธีการทดสอบดัดแปลงจาก Saánchez-Moreno et al. (1999) และ Li et al. (2005) โดยทำการละลายสารสกัดของพืชแต่ละชนิด ด้วยเมทานอลและน้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 78.125 ถึง 5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย DPPH ละลายในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ดูดสารสกัด 50 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงใน 96-well plate ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเคอร์ สำหรับสารต้านออกซิเจนที่ใช้เปรียบเทียบกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระคือ trolox และรายงานค่าเป็น IC₅₀ ที่คำนวณได้จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟระหว่างความเข้มข้นและ % Scavenging

$$\% \text{ Scavenging} = \{[(D-C) - (T-(C+B))]/(D-C)\} * 100$$

เมื่อ B คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ + เมทานอล

C คือ ค่าดูดกลืนแสงของเมทานอล

D คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

T คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH + สารสกัด

(4) การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด (Ferric reducing antioxidant power, FRAP assay)

วิธีการดัดแปลงจาก Benzie, Strain et al. (1996) ทำการละลายสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิด ด้วยเมทานอลและน้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ได้ทดลองทำการศึกษามาก่อนแล้วพบว่าไม่มีผลรบกวนจากสีของสารสกัดน้อย เตรียมสารละลาย FRAP reagent [acetate buffer (300 มิลลิโมลาร์) : TPTZ (10 มิลลิโมลาร์ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl) : FeCl_3 (20 มิลลิโมลาร์) ในอัตราส่วน 10 : 1 : 1] ทำการทดลองโดยดูดสารละลาย FRAP reagent 150 ไมโครลิตรและดูดสารสกัด 50 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นลงใน 96-well plate ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ แล้วบันทึกผลคำนวณค่าความสัมพันธ์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด โดยนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดเทียบกับสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ความเข้มข้นตั้งแต่ 15 ถึง 250 μM) ซึ่งจะได้นหน่วยเป็น μM จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณให้ได้หน่วยเป็น $\mu\text{mole/mg extract}$

(5) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิเคปเปอร์ออกซิเดชัน (TBARS Assay)

ทำการแยกสมองหนูซึ่งสมองหนูที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ได้จากซากหนูเมาท์ที่ถูกกำจัดซากในโครงการทดลองทางวิทยาศาสตร์การแพทย์อื่นๆ เลือกเฉพาะซากหนูที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุมโดยนำส่วนหัวมาตัดแยกเอาเฉพาะเนื้อเยื่อสมองส่วนหน้า (cerebrum) ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดล้างด้วย ice cold normal saline ซับให้แห้งและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดลอง

บดสมองหนูเป็นเนื้อเดียวกันกับ 5 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer (pH 7.4) ด้วยเครื่องปั่นบด (homogenizer) วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี lowry ในการวัดความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิเคปเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัดจะวัดปริมาณสารประกอบเชิงซ้อน thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) วิธีทดลองดัดแปลงจาก Mahakunakorn et al. (2004) และ Buege, Aust (1978) วิธีการทดลองทำการเติม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายสมองหนูบด 0.9 มิลลิลิตร phosphate buffer (50 มิลลิโมลาร์, pH 7.4) 0.5 มิลลิลิตร FeSO_4 (0.01 มิลลิโมลาร์) 0.5 มิลลิลิตร ascorbic acid (0.1 มิลลิโมลาร์) และเติม 0.1 มิลลิลิตร ของสารสกัดที่ต้องการทดสอบแต่ละความเข้มข้น (ความเข้มข้นตั้งแต่ 156 ถึง 5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ลงไปในหลอดทดลองตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 45 นาที เติม 50 ไมโครลิตร butylated hydroxytoluene (BHT) (0.1 มิลลิโมลาร์) เพื่อหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เติม 0.5 มิลลิลิตร EDTA (5 มิลลิโมลาร์) เพื่อลดผลรบกวนจากโลหะอื่นๆ และตกตะกอนโปรตีนด้วย 0.5 มิลลิลิตร 35 % perchloric acid นำไปปั่นเหวี่ยง 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสมาเติมด้วย 0.5 มิลลิลิตร 0.6% thiobarbituric acid ละลายในกรดอะซิติก จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำสารที่ได้มาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร บันทึกผลโดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 1 ถึง 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ใช้น้ำและเมทานอลเป็นตัวอย่งควบคุม คำนวณหาความสามารถของสารสกัดแต่ละชนิดและสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน trolox ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาฟิเคปเปอร์ออกซิเดชัน (% inhibition) จากนั้นนำค่า % inhibition และความเข้มข้นของสารสกัดไปสร้างกราฟแล้วหาค่า IC_{50} (mg/ml) จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

วิธีคำนวณการหาความสามารถของสารสกัดแต่ละชนิดในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาฟีดเพอร์ออกซิเดชัน (% inhibition) คำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(OD_{\text{Blank}} - OD_{\text{Test}}) / OD_{\text{Blank}}] * 100$$

เมื่อ OD_{Blank} คือ ค่าดูดกลืนแสงของน้ำหรือเมทานอล

OD_{Test} คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัด ที่นำมาศึกษา

(6) การวิเคราะห์ด้วยสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวนทางเดียว (analysis of variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS (statistical package for social science, SPSS/PC+) version 10.1 โดยใช้วิธี Duncan's เปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและการต้านกระบวนการออกซิเดชันของพืชแต่ละชนิด ใช้วิธี T-Test ในการเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลและเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน และใช้วิธี Pearson's correlation coefficient ในการหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและการต้านการออกซิเดชัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (กำหนดระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$)

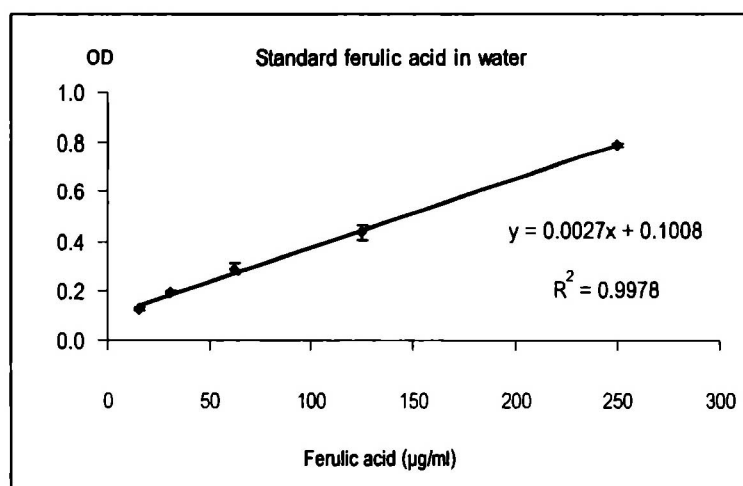
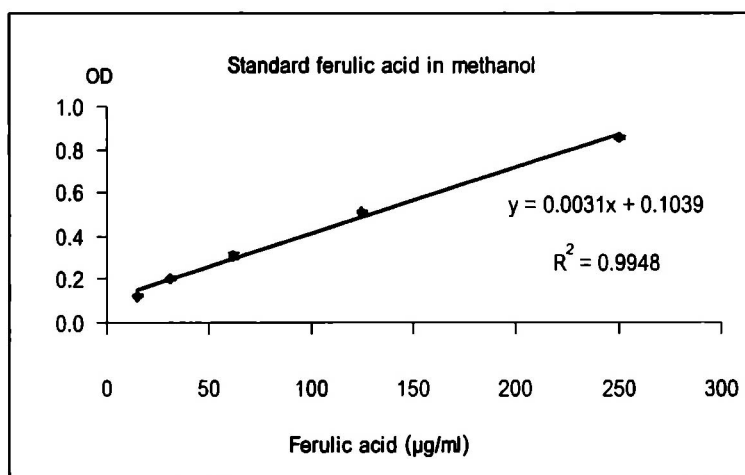
ผลการศึกษา

1. การหาค่าปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก (Folin-Ciocalteu assay)

ผลการศึกษาในการหาปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic contents, TPC) ในสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ *Murdannia gigantea* [Mg (wl1), Mg (wl2), Mg (ws), Mg (pwm) และ Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm) และ *M. simplex* (Ms2 และ Ms1) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 13 และภาพที่ 1 ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยใช้สารมาตรฐาน ferulic acid เป็นสารมาตรฐาน เปรียบเทียบและกราฟมาตรฐานของ ferulic acid แสดงในภาพที่ 20 พบว่าโดยทั่วไปแล้วสารสกัดจาก *M. gigantea* มี TPC มากที่สุดรองลงมาเป็น *M. simplex* และ *M. macrocarpa* ตามลำดับ (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 21-22) โดยพบว่า

- ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 22)
 - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าตั้งแต่ 31.71 ± 0.90 ถึง 115.90 ± 1.23 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัดเทียบกับ Ferulic acid โดยสารสกัด Mg (ws) มีค่าสูงสุดรองลงมาเป็น Mg (vm) > Mg (pwm) > Ms2 > Mg (wl2) > Mg (wl1) > Ms1 > Mm ตามลำดับ
 - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกันและมีค่าตั้งแต่ 14.94 ± 0.45 ถึง 102.31 ± 0.53 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัดเทียบกับ ferulic acid โดยสารสกัด Mg (ws) มีค่าสูงสุดรองลงมาเป็น Mg (wl2) > Ms2 > Mg (pwm) > Mg (vm) > Mg (wl1) > Ms1 > Mm ตามลำดับ

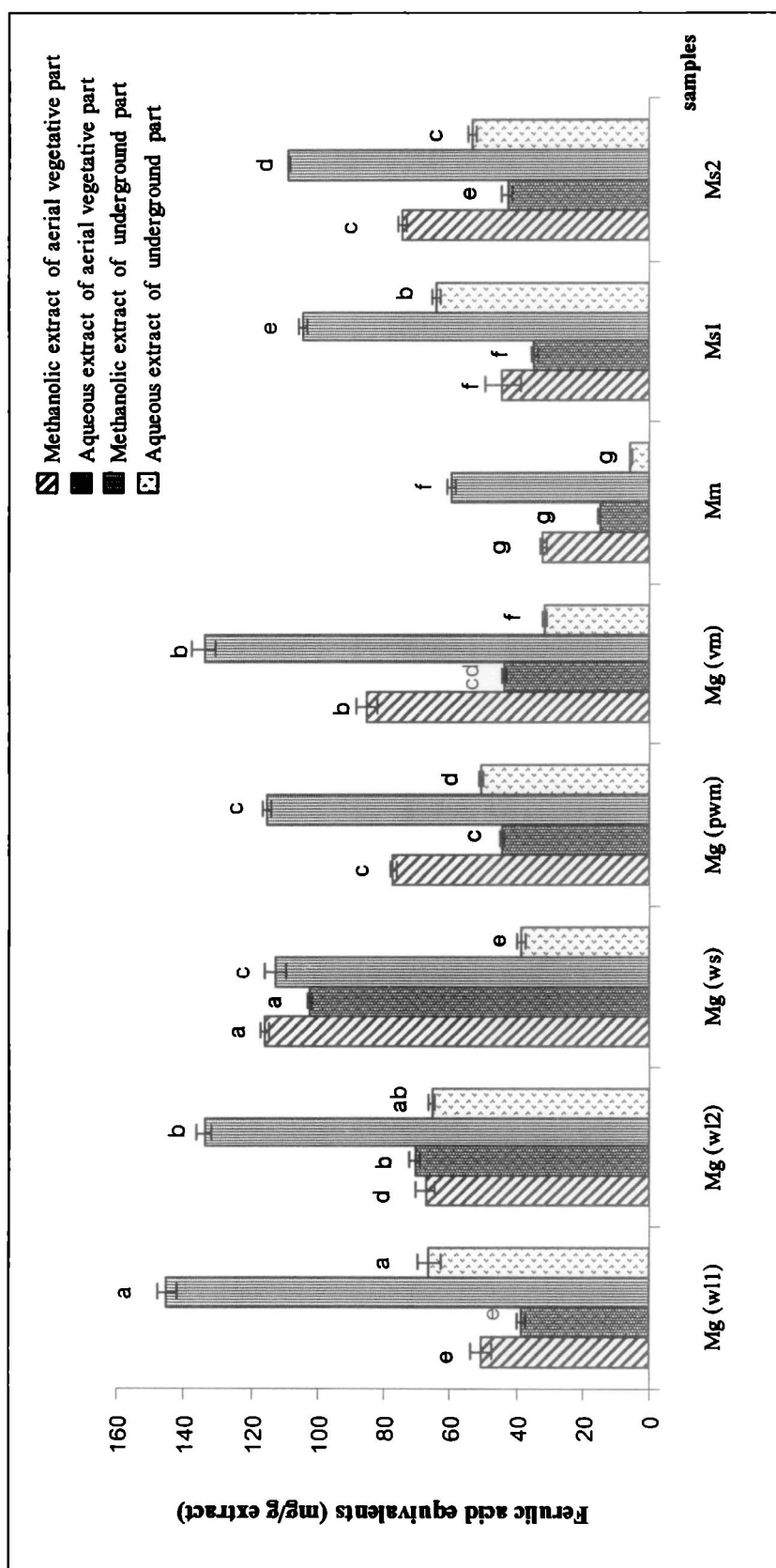
- ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 14 และ ภาพที่ 22)
 - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าตั้งแต่ 57.75 ± 2.69 ถึง 145.17 ± 2.97 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัดเทียบกับ ferulic acid โดยสารสกัด Mg (wl1) มีค่าสูงสุดรองลงมาเป็น Mg (vm) > Mg (wl2) > Mg (pwm) > Mg (ws) > Ms2 > Ms1 > Mm ตามลำดับ
 - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าตั้งแต่ 5.46 ± 0.30 ถึง 66.44 ± 3.43 มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัดเทียบกับ ferulic acid โดยสารสกัด Mg (wl1) มีค่าสูงสุดรองลงมาเป็น Mg (wl2) > Ms1 > Mg (pwm) > Ms2 > Mg (ws) > Mg (vm) > Mm ตามลำดับ



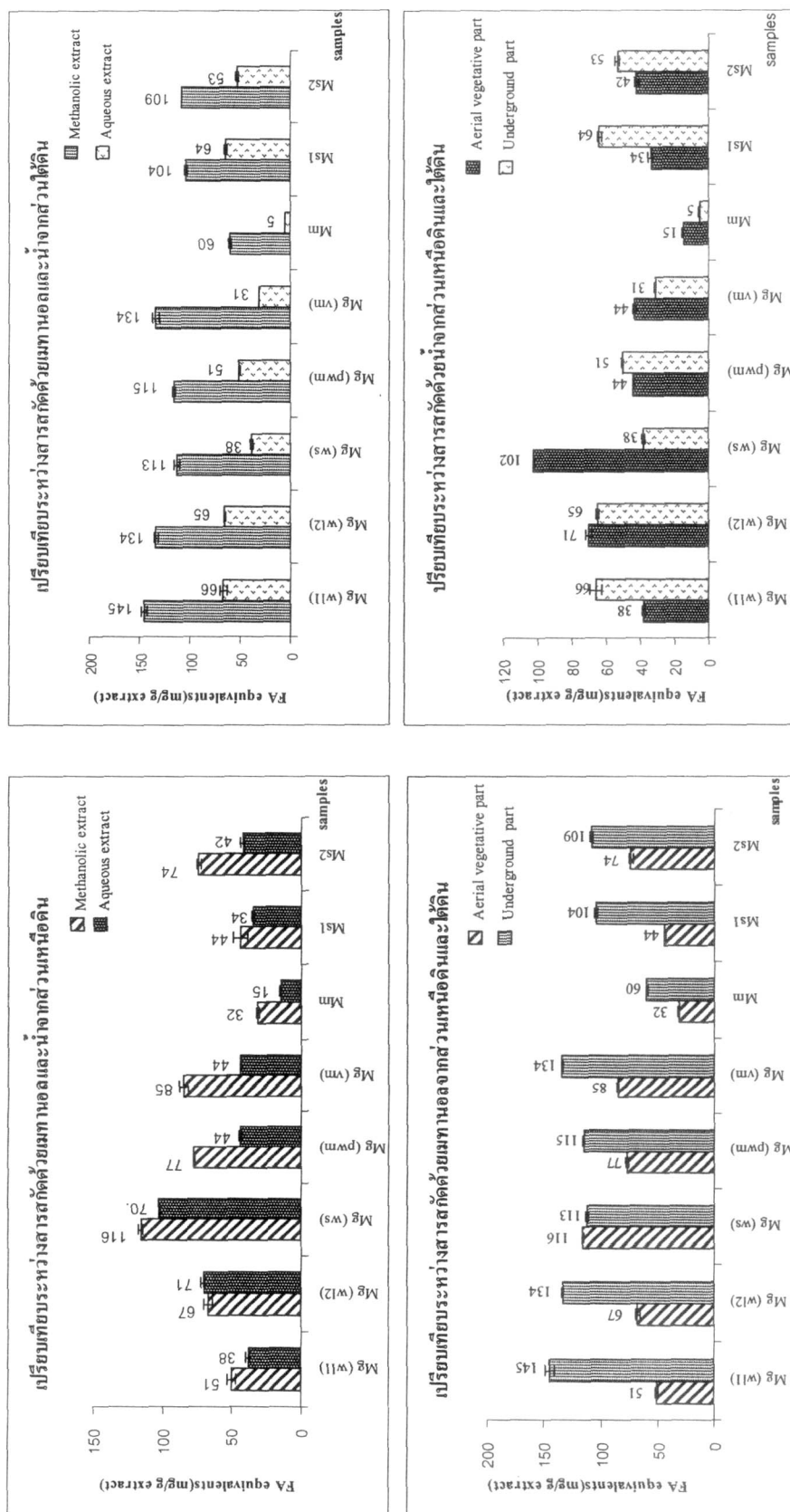
ภาพที่ 20 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของ ferulic acid (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่ค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิด โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD (n = 4)

Samples	Aerial vegetative part		Underground part	
	Methanolic extract	Aqueous extract	Methanolic extract	Aqueous extract
Mg (wl1)	50.52 $\pm$ 3.34	38.28 $\pm$ 1.20	145.17 $\pm$ 2.97	66.44 $\pm$ 3.43
Mg (wl2)	67.44 $\pm$ 2.97	70.64 $\pm$ 1.66	133.90 $\pm$ 2.13	65.40 $\pm$ 0.92
Mg (ws)	115.90 $\pm$ 1.23	102.31 $\pm$ 0.53	112.75 $\pm$ 3.05	38.21 $\pm$ 1.18
Mg (pwm)	77.17 $\pm$ 0.78	44.00 $\pm$ 0.87	115.15 $\pm$ 1.46	50.81 $\pm$ 0.63
Mg (vm)	85.09 $\pm$ 3.34	43.69 $\pm$ 0.70	134.01 $\pm$ 3.31	31.33 $\pm$ 0.42
Mm	31.71 $\pm$ 0.90	14.94 $\pm$ 0.45	59.52 $\pm$ 1.29	5.46 $\pm$ 0.30
Ms1	44.00 $\pm$ 5.32	34.25 $\pm$ 1.05	104.23 $\pm$ 1.29	63.94 $\pm$ 1.10
Ms2	74.11 $\pm$ 1.30	53.17 $\pm$ 1.60	108.51 $\pm$ 0.57	42.27 $\pm$ 1.20



ภาพที่ 21 แสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ *Murdannia Gigantea* [ดอกขาวต้น ขนาดใหญ่: Mg (w11) และ Mg (w12), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนมวง: Mg (pwm) และ ดอกมวง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวทำละลายที่ใช้สกัด



ภาพที่ 22 เปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกระหว่างการสกัด *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (w12), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$)

และ * หมายความว่า มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

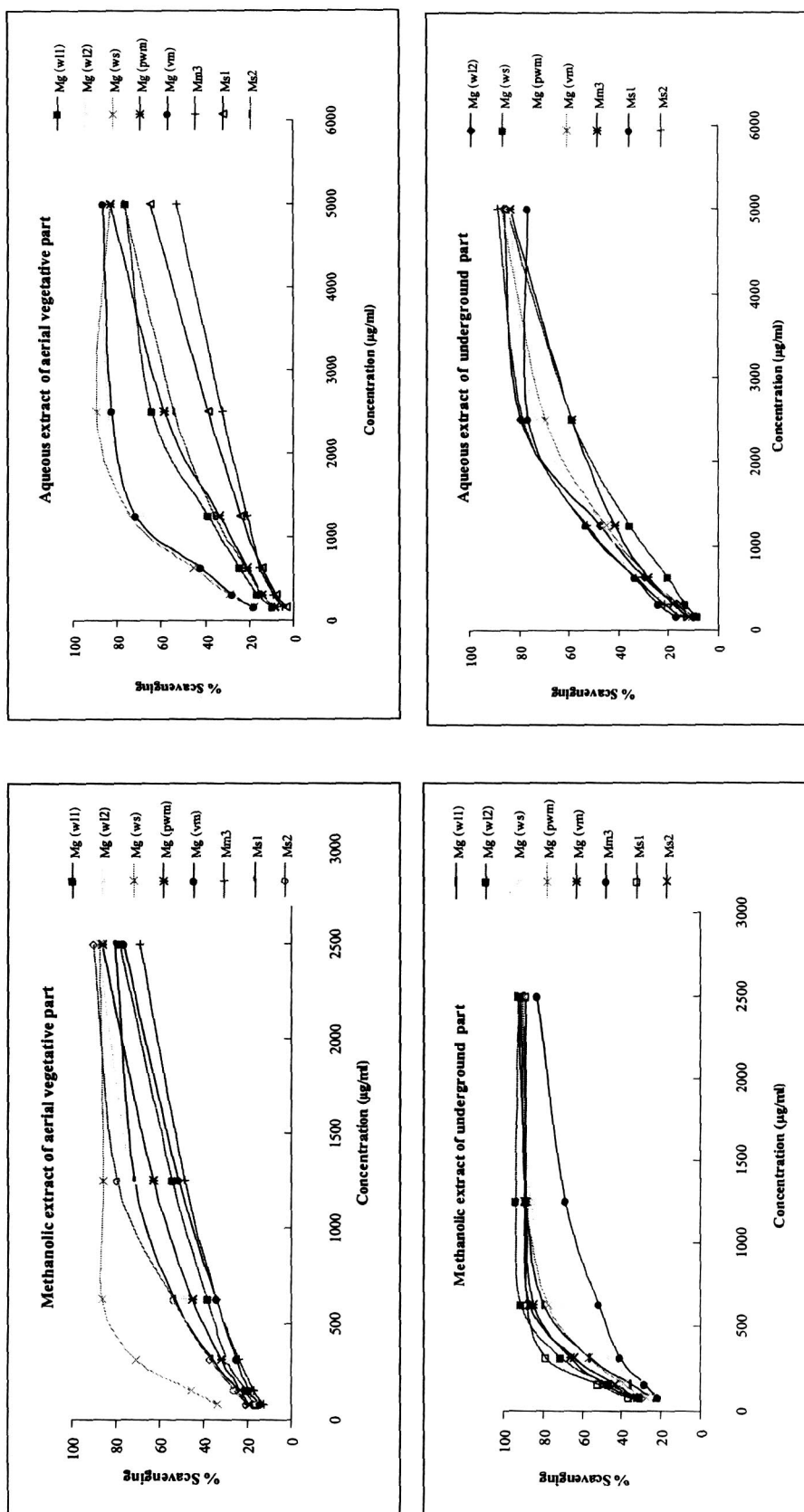
2. การทดสอบฤทธิ์ในการจับกับสารอนุมูลอิสระที่เสถียร (DPPH assay)

การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ (free radical scavenging activity) ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของพืชทั้ง 4 ชนิด และสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน คือ trolox โดยทำการทดสอบกับอนุมูลอิสระที่เสถียรคือ DPPH[•] ซึ่งเป็นวิธีที่วัดความสามารถของสารทดสอบในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH[•] ให้กลายเป็นสารที่เสถียรและไม่เป็นอนุมูลอิสระต่อไป กล่าวคืออนุมูลอิสระ DPPH[•] เมื่อละลายในเมทานอลจะมีสีม่วงเข้ม แต่เมื่อได้รับอิเล็กตรอนแล้วจะกลายเป็นสีเหลืองอ่อนทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลง จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำของพืชดังกล่าวทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH[•] เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าสามารถลดค่าการดูดกลืนแสงลงได้ตามความเข้มข้น (ภาพที่ 23) และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณค่า IC₅₀ (ตารางที่ 15) พบว่าโดยทั่วไปแล้วสารสกัดจาก *M. gigantea* มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีสุดรองลงมาเป็น *M. simplex* และ *M. macrocarpa* ตามลำดับ (ภาพที่ 24) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วน trolox มีค่า IC₅₀ = 18 ± 0.27 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของพืชดังกล่าวพบว่า

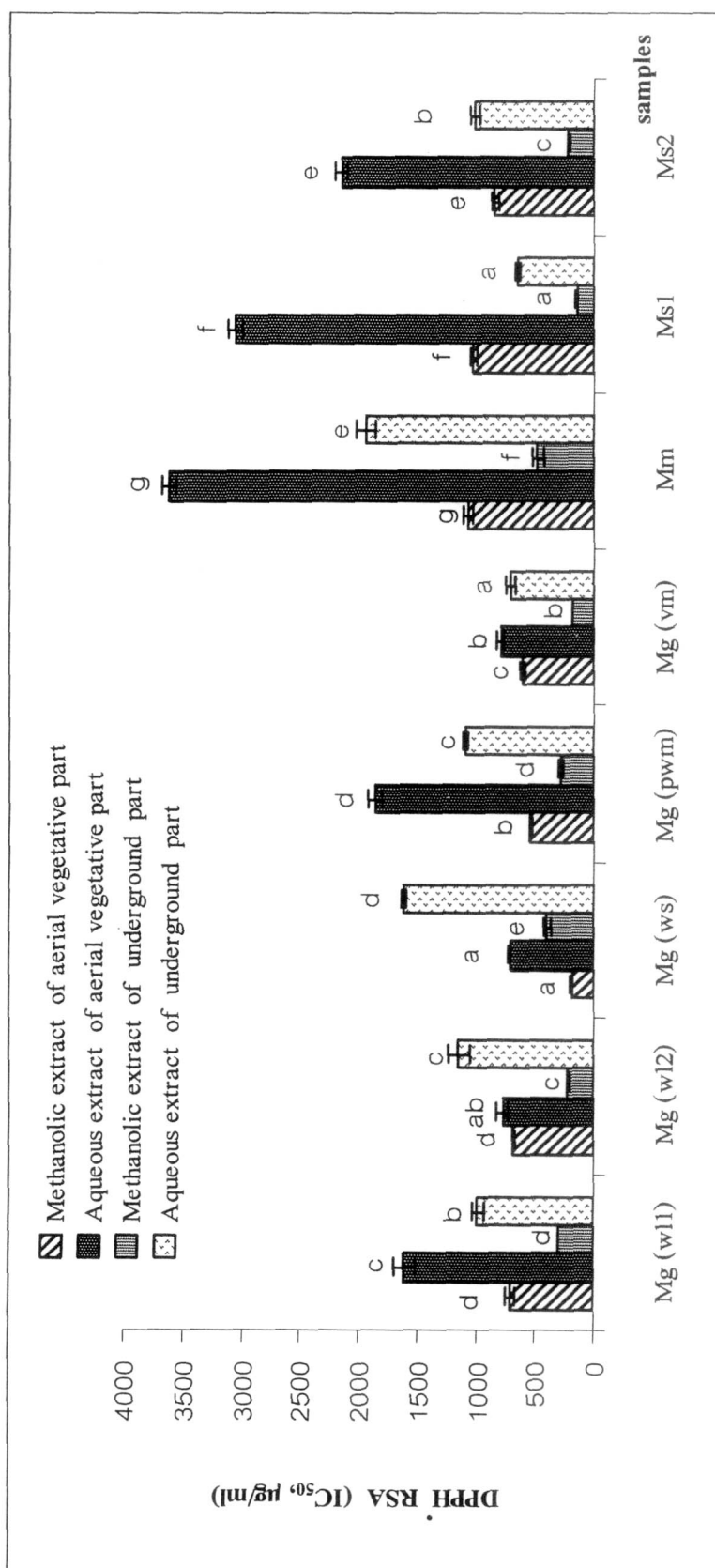
- ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 15 และ ภาพที่ 25)
 - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC₅₀ ตั้งแต่ 188.96 ± 8.78 ถึง 1068.40 ± 46.36 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดย Mg (ws) มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ > Mg (pwm) > Mg (vm) > Mg (wl2) > Mg (wl1) > Ms2 > Ms1 > Mm ตามลำดับ
 - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC₅₀ ตั้งแต่ 710.49 ± 12.77 ถึง 3623.36 ± 59.39 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดย Mg (ws) มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ > Mg (wl2) > Mg (vm) > Mg (wl1) > Mg (pwm) > Ms2 > Ms1 > Mm ตามลำดับ
- ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 15 และ ภาพที่ 25)
 - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC₅₀ ตั้งแต่ 149.72 ± 10.04 ถึง 827.2 ± 17.4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยสารสกัด Ms1 มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ > Mg (vm) > Mg (wl2) > Ms2 > Mg (pwm) > Mg (wl1) > Mg (ws) > Mm ตามลำดับ
 - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC₅₀ ตั้งแต่ 647.34 ± 28.86 ถึง 1939.23 ± 79.73 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยสารสกัด Ms1 มีความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ > Mg (vm) > Mg (wl1) > Ms2 > Mg (pwm) > Mg (wl2) > Mg (ws) > Mm ตามลำดับ

ตารางที่ 15 แสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและใต้ดินในพืชแต่ละชนิด โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD (n = 4)

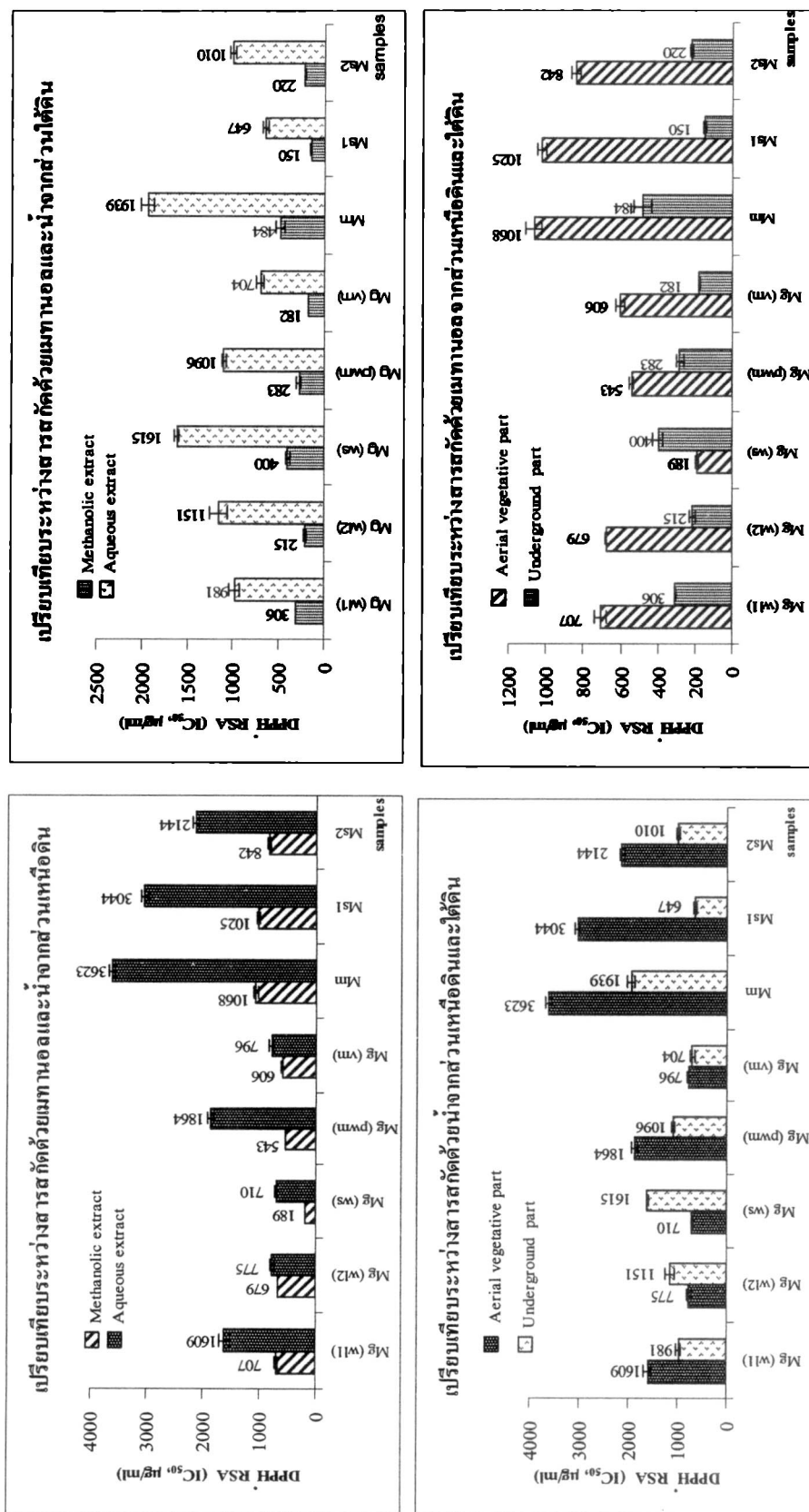
Samples	Aerial vegetative part		Underground part	
	Methanolic extract	Aqueous extract	Methanolic extract	Aqueous extract
Mg (wl1)	706.71 $\pm$ 33.06	1608.67 $\pm$ 84.12	306.35 $\pm$ 2.13	980.51 $\pm$ 53.40
Mg (wl2)	679.19 $\pm$ 5.89	775.27 $\pm$ 44.80	214.82 $\pm$ 16.3	1151.05 $\pm$ 91.01
Mg (ws)	188.96 $\pm$ 8.78	710.49 $\pm$ 12.77	399.93 $\pm$ 26.78	1614.93 $\pm$ 22.18
Mg (pwm)	543.40 $\pm$ 9.66	1863.73 $\pm$ 64.81	282.97 $\pm$ 20.25	1095.99 $\pm$ 23.89
Mg (vm)	606.30 $\pm$ 22.36	796.33 $\pm$ 29.26	181.82 $\pm$ 4.57	703.92 $\pm$ 38.25
Mm	1068.40 $\pm$ 46.36	3623.36 $\pm$ 59.39	483.59 $\pm$ 49.8	1939.23 $\pm$ 79.73
Ms1	1024.56 $\pm$ 26.1	3044.26 $\pm$ 58.55	149.72 $\pm$ 10.04	647.34 $\pm$ 28.86
Ms2	842.00 $\pm$ 27.24	2143.51 $\pm$ 50.27	219.85 $\pm$ 8.87	1009.69 $\pm$ 30.90



ภาพที่ 23 แสดงค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (% scavenging) ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและใต้ดินในพืช *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (w11) และ Mg (w12), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2)



ภาพที่ 24 แสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH $\cdot$ ของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและใต้ดิน ใน *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (w11) และ Mg (w12), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาว โคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวอย่างที่ใช้สกัด

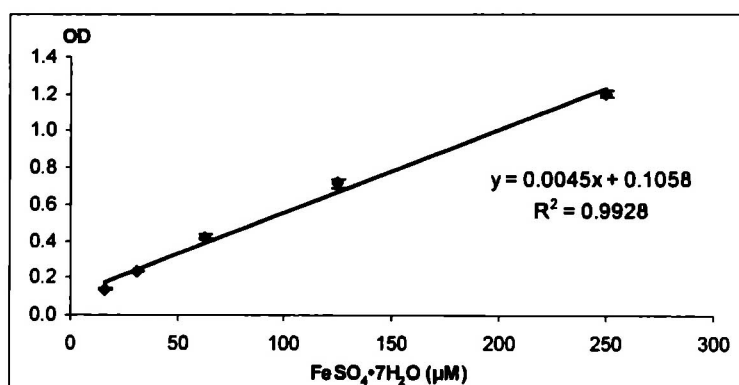


ภาพที่ 25 เปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัด *Murdannia bracteata* (Mb), *M. gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (w11) และ Mg (w12), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง : Mg (pwm) และ ดอกม่วง : Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า IC₅₀ (ไม่ทราบ/มิลลิกรัม) Mean ± SD (n = 4)

3. การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด (FRAP assay)

วิธี FRAP assay เป็นการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด โดยดูความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของสารทดสอบ (reducing activity) สำหรับการทดลองครั้งนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อน Fe^{III} -TPTZ เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันจะเปลี่ยนเป็น Fe^{II} -TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้มและมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดเทียบกับสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ภาพที่ 26) จากผลการทดลองสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำทั้งจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของพืชทั้ง 4 ชนิด สามารถรีดิวซ์โลหะเหล็ก Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} โดยพบว่า

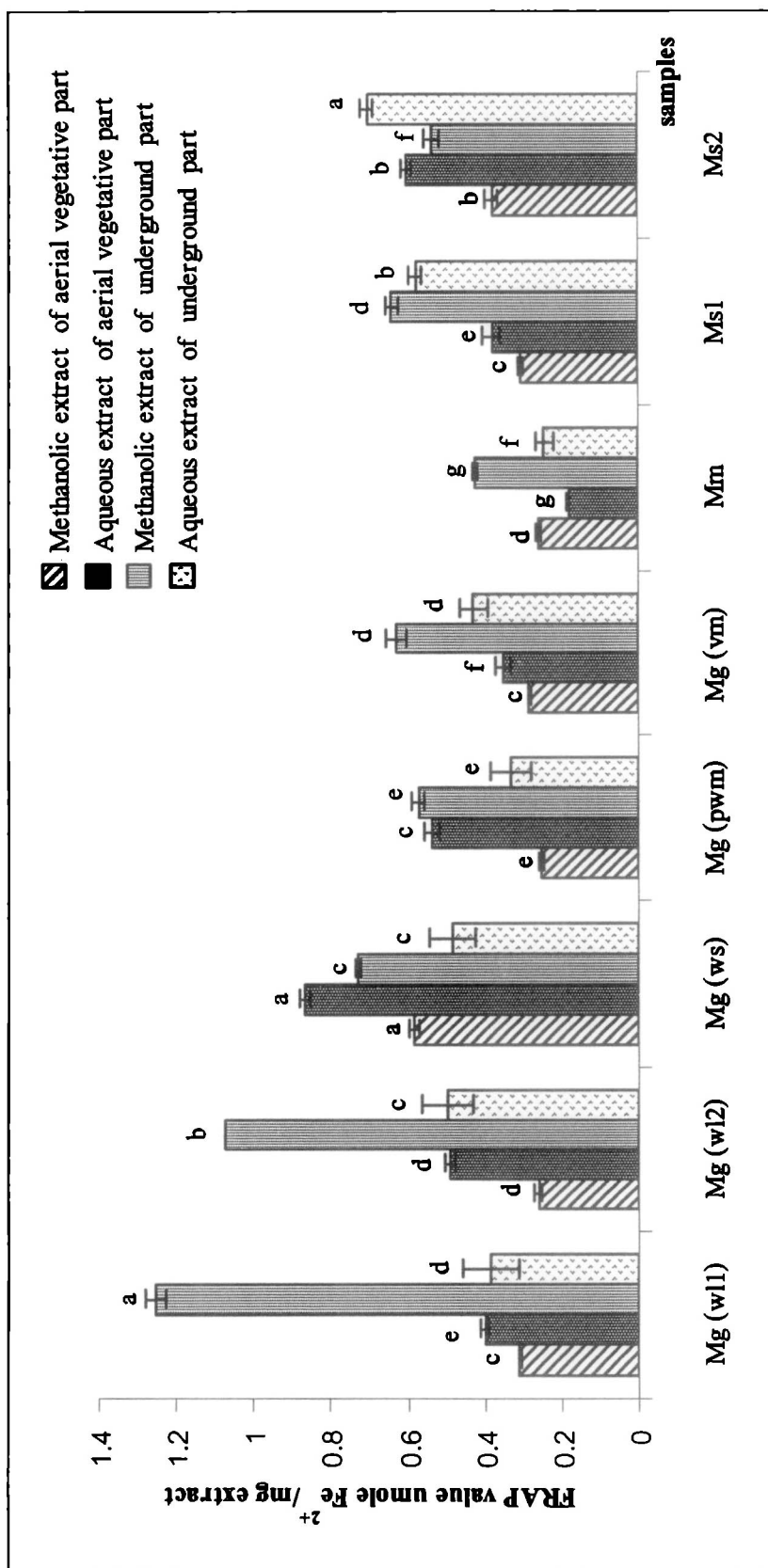
- ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 16 และ ภาพที่ 27 - 28)
 - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่าความเป็น reducing agent แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.253 ± 0.006 ถึง $0.752 \pm 0.016 \mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$ โดย $\text{Mg (ws)} > \text{Ms2} > \text{Mg (wl1)} > \text{Ms1} > \text{Mg (vm)} > \text{Mg (wl2)} > \text{Mm} > \text{Mg (pwm)}$ ตามลำดับ
 - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีค่าความเป็น reducing agent แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.181 ± 0.005 ถึง $0.871 \pm 0.012 \mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$ โดย $\text{Mg (ws)} > \text{Ms2} > \text{Mg (pwm)} > \text{Mg (wl2)} > \text{Mg (wl1)} > \text{Ms1} > \text{Mg (vm)} > \text{Mm}$ ตามลำดับ
- ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 16 และ ภาพที่ 27 - 28)
 - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่าความเป็น reducing agent แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.284 ± 0.004 ถึง $1.253 \pm 0.026 \mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$ โดย $\text{Mg (wl1)} > \text{Mg (wl2)} > \text{Mg (ws)} > \text{Ms1} > \text{Mg (vm)} > \text{Mg (pwm)} > \text{Ms2} > \text{Mm}$ ตามลำดับ
 - สารสกัดด้วยน้ำพืชแต่ละชนิดมีค่าความเป็น reducing agent แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.243 ± 0.025 ถึง $0.705 \pm 0.015 \mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$ โดย $\text{Ms2} > \text{Ms1} > \text{Mg (wl2)} > \text{Mg (ws)} > \text{Mg (vm)} > \text{Mg (wl1)} > \text{Mg (pwm)} > \text{Mm}$ ตามลำดับ



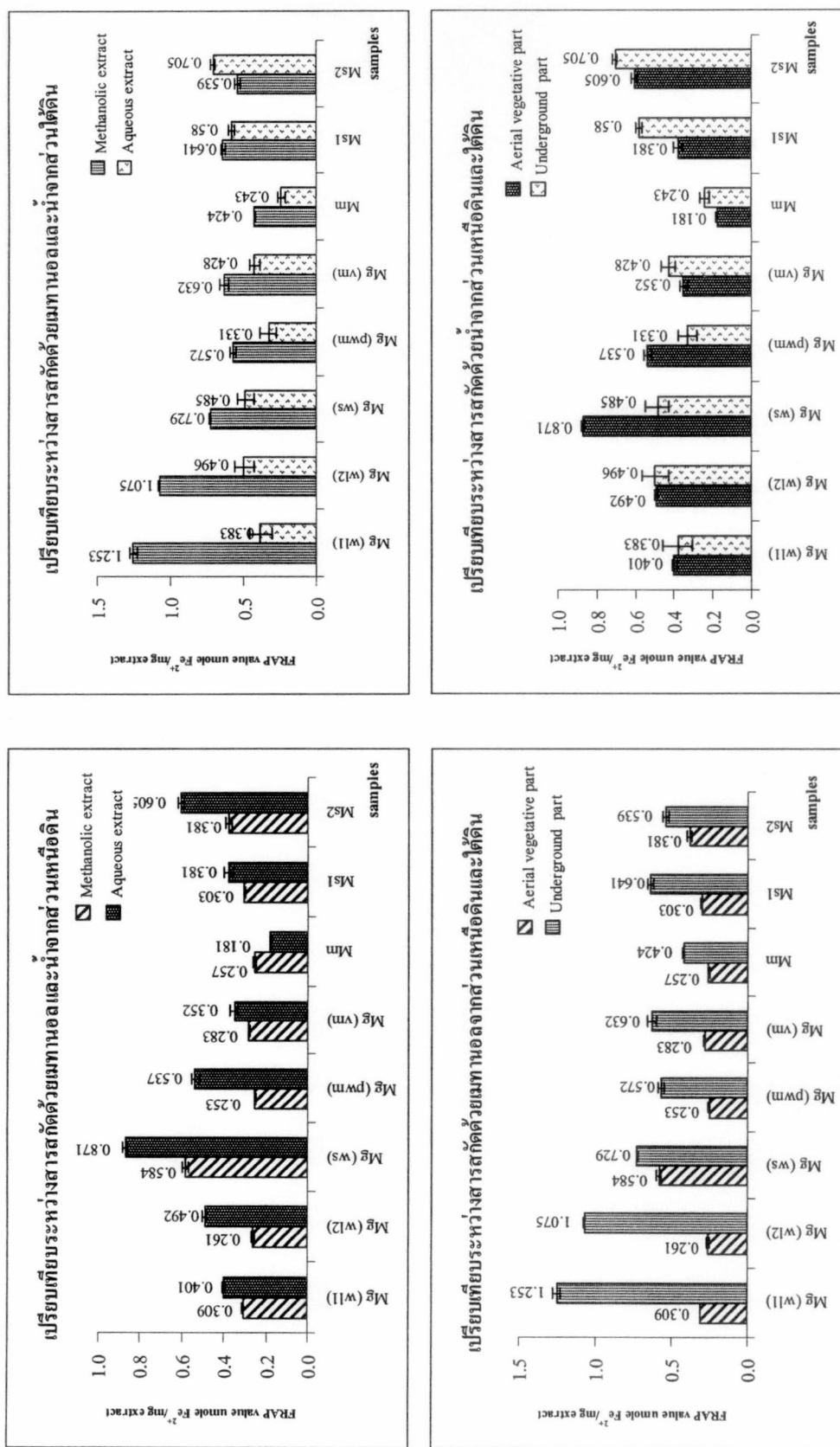
ภาพที่ 26 กราฟมาตรฐาน (calibration curve) สำหรับหาค่า FRAP value โดยใช้ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เป็นสารมาตรฐาน ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ตารางที่ 16 แสดงค่า FRAP value (Fe^{2+} $\mu\text{mole/mg extract}$) ของสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลจากส่วนเหนือดิน และส่วนใต้ดินในพืชแต่ละชนิด โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD (n = 4)

Samples	Aerial vegetative part		Underground part	
	Methanolic extract	Aqueous extract	Methanolic extract	Aqueous extract
Mg (wl1)	0.309 $\pm$ 0.002	0.401 $\pm$ 0.010	1.253 $\pm$ 0.026	0.383 $\pm$ 0.073
Mg (wl2)	0.261 $\pm$ 0.009	0.492 $\pm$ 0.012	1.075 $\pm$ 0.002	0.496 $\pm$ 0.067
Mg (ws)	0.584 $\pm$ 0.014	0.871 $\pm$ 0.012	0.729 $\pm$ 0.005	0.485 $\pm$ 0.060
Mg (pwm)	0.253 $\pm$ 0.006	0.537 $\pm$ 0.020	0.572 $\pm$ 0.017	0.331 $\pm$ 0.052
Mg (vm)	0.283 $\pm$ 0.005	0.352 $\pm$ 0.018	0.632 $\pm$ 0.028	0.428 $\pm$ 0.036
Mm	0.257 $\pm$ 0.257	0.181 $\pm$ 0.005	0.424 $\pm$ 0.004	0.243 $\pm$ 0.025
Ms1	0.303 $\pm$ 0.303	0.381 $\pm$ 0.023	0.641 $\pm$ 0.017	0.580 $\pm$ 0.019
Ms2	0.381 $\pm$ 0.381	0.605 $\pm$ 0.014	0.539 $\pm$ 0.020	0.705 $\pm$ 0.015



ภาพที่ 27 แสดงค่า FRAP value (Fe^{2+} $\mu\text{mole/mg extract}$) ของสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินในพืช *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (w11) และ Mg (w12), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนมวง: Mg (pwm) และดอกมวง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวอย่างที่ใช้สกัด



ภาพที่ 28 เปรียบเทียบค่า FRAP value (Fe^{2+} $\mu\text{mole/mg extract}$) ของสารสกัด *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (w11) และ Mg (w12), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD (n = 4)

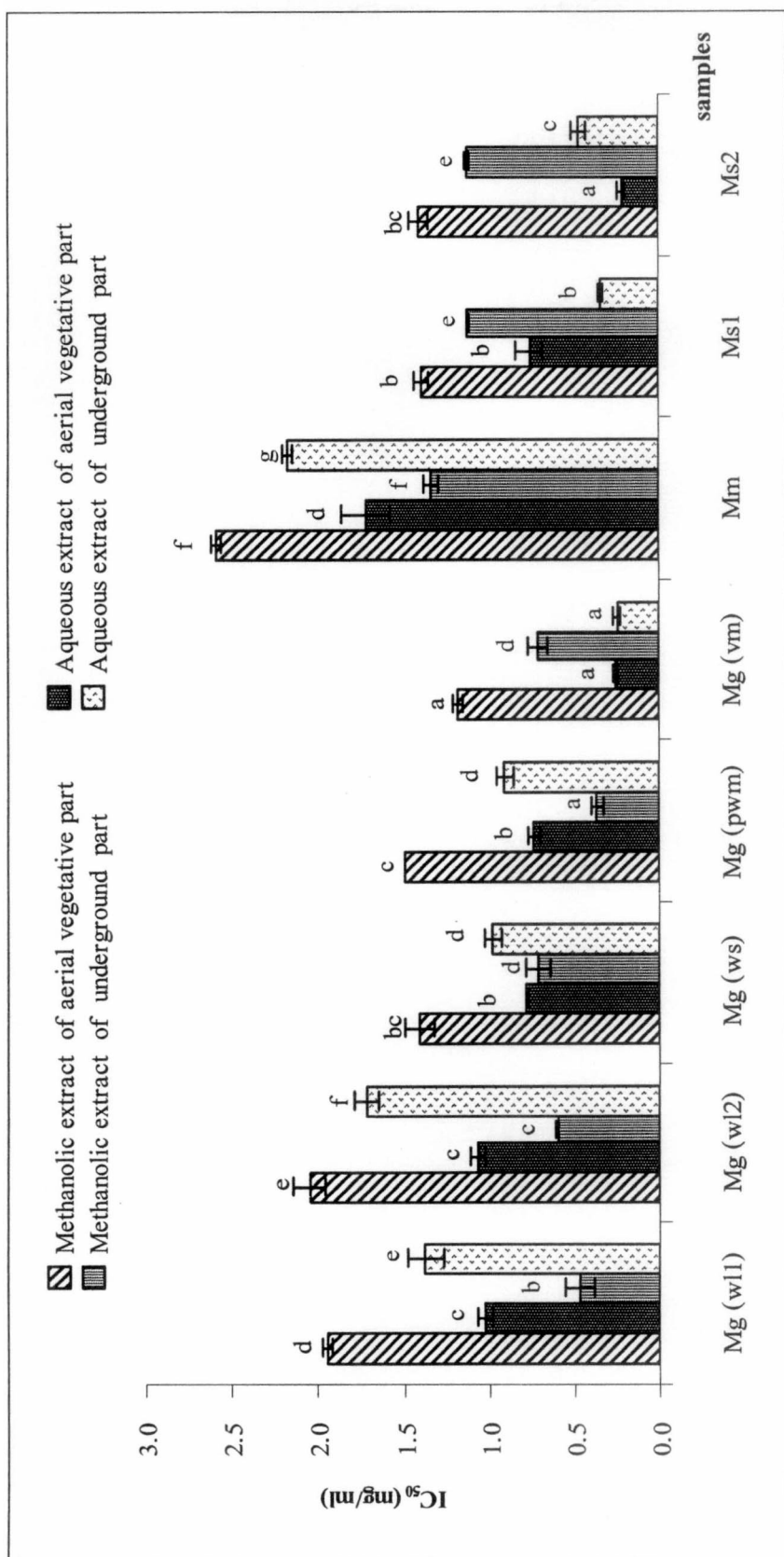
4. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS

วิธี TBARS เป็นการวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน การทดลองครั้งนี้ใช้ Fe^{2+} -ascorbate เหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในสมองหนู ซึ่งสาร MDA ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ TBA ที่อุณหภูมิสูงแล้วให้สาร TBARS ที่มีสีชมพู ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้จะทำให้เกิด MDA ลดลงและพบค่าดูดกลืนแสงลดลง จากการทดลองพบว่าสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน trolox สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันตามความเข้มข้นมีค่า IC_{50} 0.287 ± 0.022 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับค่า IC_{50} ของสารสกัดพืชแต่ละชนิด พบว่า

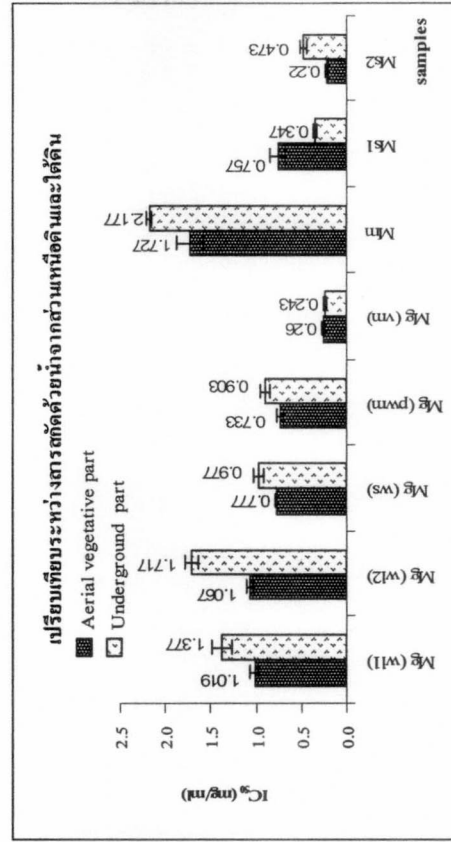
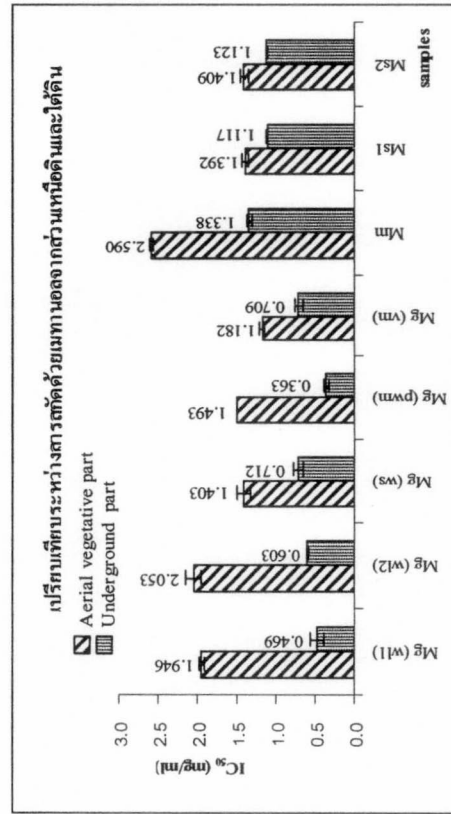
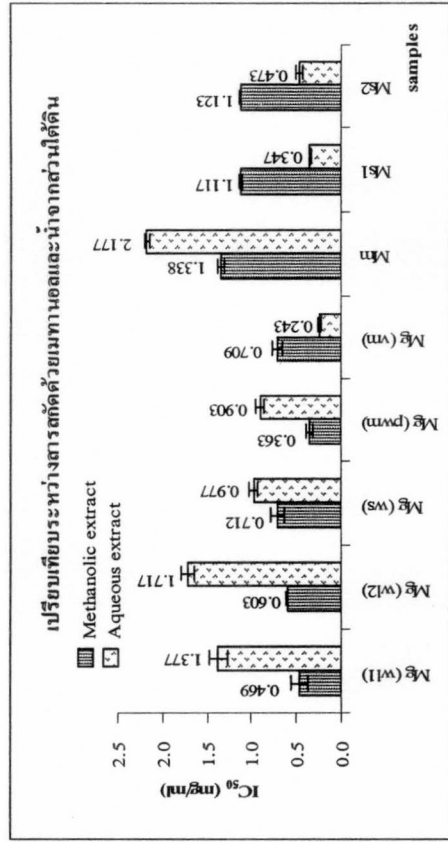
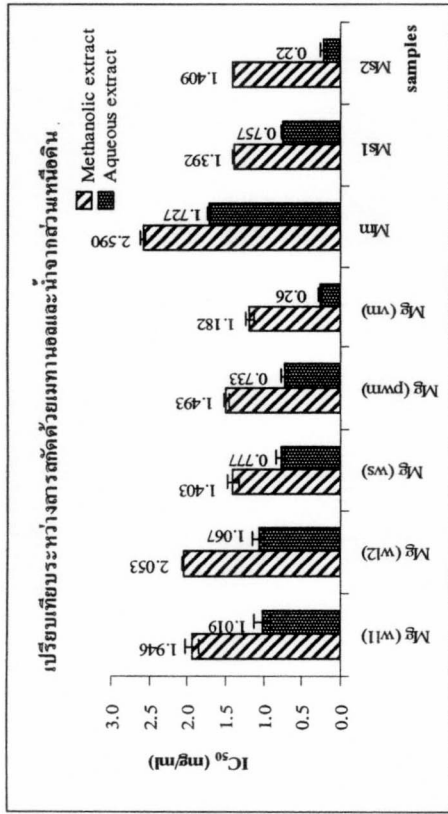
- ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 17 และ ภาพที่ 29-30)
 - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 1.182 ± 0.026 ถึง 2.590 ± 0.026 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย $\text{Mg (vm)} > \text{Ms1} > \text{Mg (ws)} > \text{Ms2} > \text{Mg (pwm)} > \text{Mg (wl1)} > \text{Mg (wl2)} > \text{Mm}$ ตามลำดับ
 - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 0.22 ± 0.026 ถึง 2.861 ± 0.08 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย $\text{Mm} > \text{Mg (wl2)} > \text{Mg (wl1)} > \text{Mg (ws)} > \text{Ms1} > \text{Mg (pwm)} > \text{Mg (vm)} > \text{Ms2}$ ตามลำดับ
- ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 17 และ ภาพที่ 29-30)
 - สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 0.363 ± 0.037 ถึง 1.338 ± 0.039 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย $\text{Mg (pwm)} > \text{Mg (wl1)} > \text{Mg (wl2)} > \text{Mg (vm)} > \text{Mg (ws)} > \text{Ms1} > \text{Ms2} > \text{Mm}$ ตามลำดับ
 - สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันแตกต่างกันและมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ 0.243 ± 0.021 ถึง 2.177 ± 0.023 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย $\text{Mg (vm)} > \text{Ms1} > \text{Ms2} > \text{Mg (pwm)} > \text{Mg (ws)} > \text{Mg (wl1)} > \text{Mg (wl2)} > \text{Mm}$ ตามลำดับ

ตารางที่ 17 แสดงความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟีดแบ็คออกซิเดชันในสมองหนู (IC_{50} , มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยน้ำและเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินในพืชแต่ละชนิด โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD (n = 3)

Samples	Aerial vegetative part		Underground part	
	Methanolic extract	Aqueous extract	Methanolic extract	Aqueous extract
Mg (wl1)	1.946 $\pm$ 0.031	1.019 $\pm$ 0.044	0.469 $\pm$ 0.087	1.377 $\pm$ 0.105
Mg (wl2)	2.053 $\pm$ 0.093	1.067 $\pm$ 0.040	0.603 $\pm$ 0.012	1.717 $\pm$ 0.074
Mg (ws)	1.403 $\pm$ 0.087	0.777 $\pm$ 0.006	0.712 $\pm$ 0.069	0.977 $\pm$ 0.051
Mg (pwm)	1.493 $\pm$ 0.002	0.733 $\pm$ 0.035	0.363 $\pm$ 0.037	0.903 $\pm$ 0.049
Mg (vm)	1.182 $\pm$ 0.026	0.260 $\pm$ 0.017	0.709 $\pm$ 0.054	0.243 $\pm$ 0.021
Mm	2.590 $\pm$ 0.026	1.727 $\pm$ 0.142	1.338 $\pm$ 0.039	2.177 $\pm$ 0.023
Ms1	1.392 $\pm$ 0.038	0.757 $\pm$ 0.081	1.117 $\pm$ 0.012	0.347 $\pm$ 0.015
Ms2	1.409 $\pm$ 0.053	0.220 $\pm$ 0.026	1.123 $\pm$ 0.011	0.473 $\pm$ 0.040



ภาพที่ 29 ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิตโอโรออกซิเดชันในสมอหนู (IC_{50} มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของสารสกัดด้วยทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า $Mean \pm SD$ ($n = 3$) และตัวอักษรบนภาพที่แตกต่างกันหมายความว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เปรียบเทียบในแต่ละตัวอย่างที่ใช้สกัด



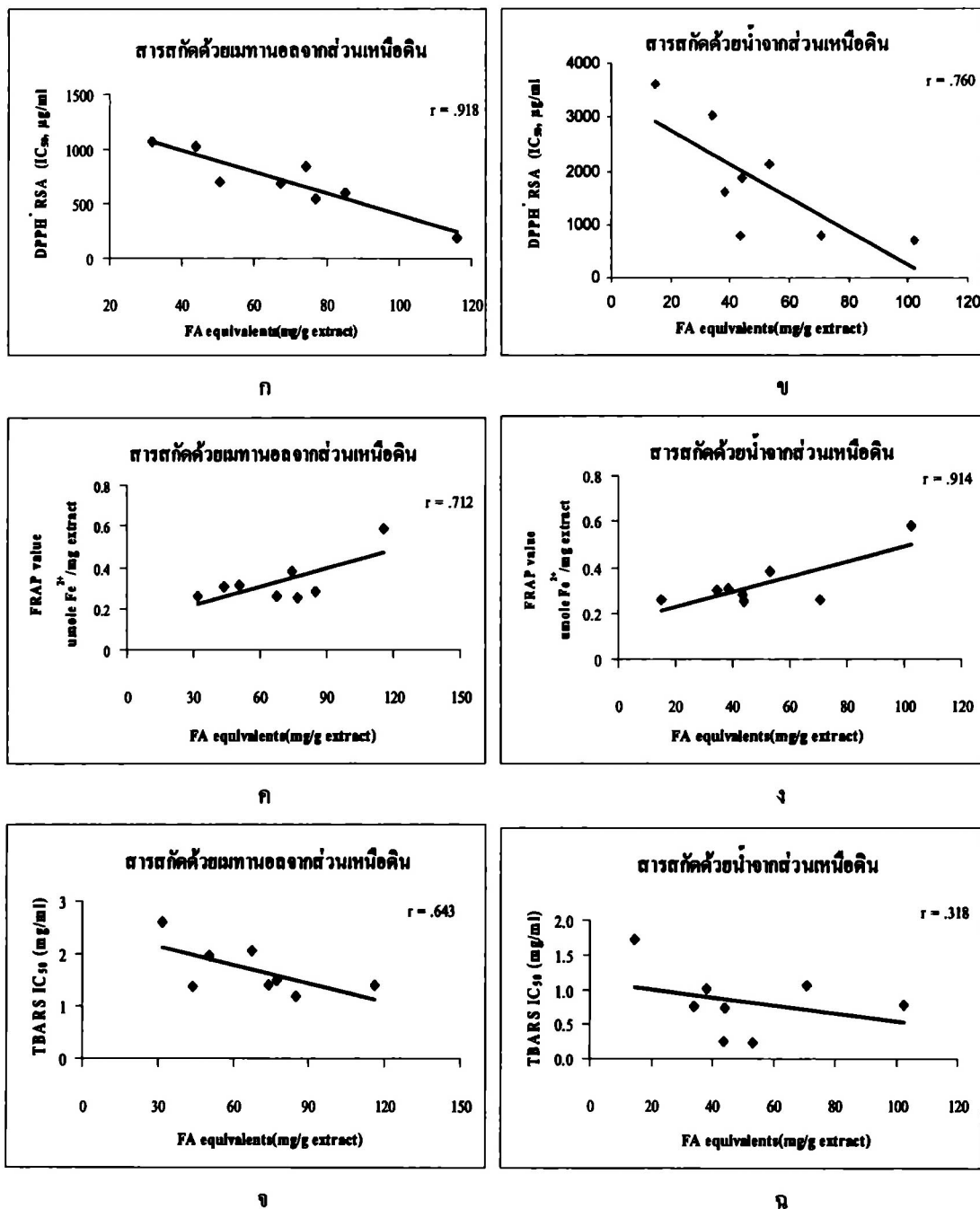
ภาพที่ 30 แสดงค่า IC₅₀ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาผลิตเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนู เปรียบเทียบระหว่างสารสกัด *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (w11) และ Mg (w12), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms1 และ Ms2) โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD (n = 3)

5. ผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

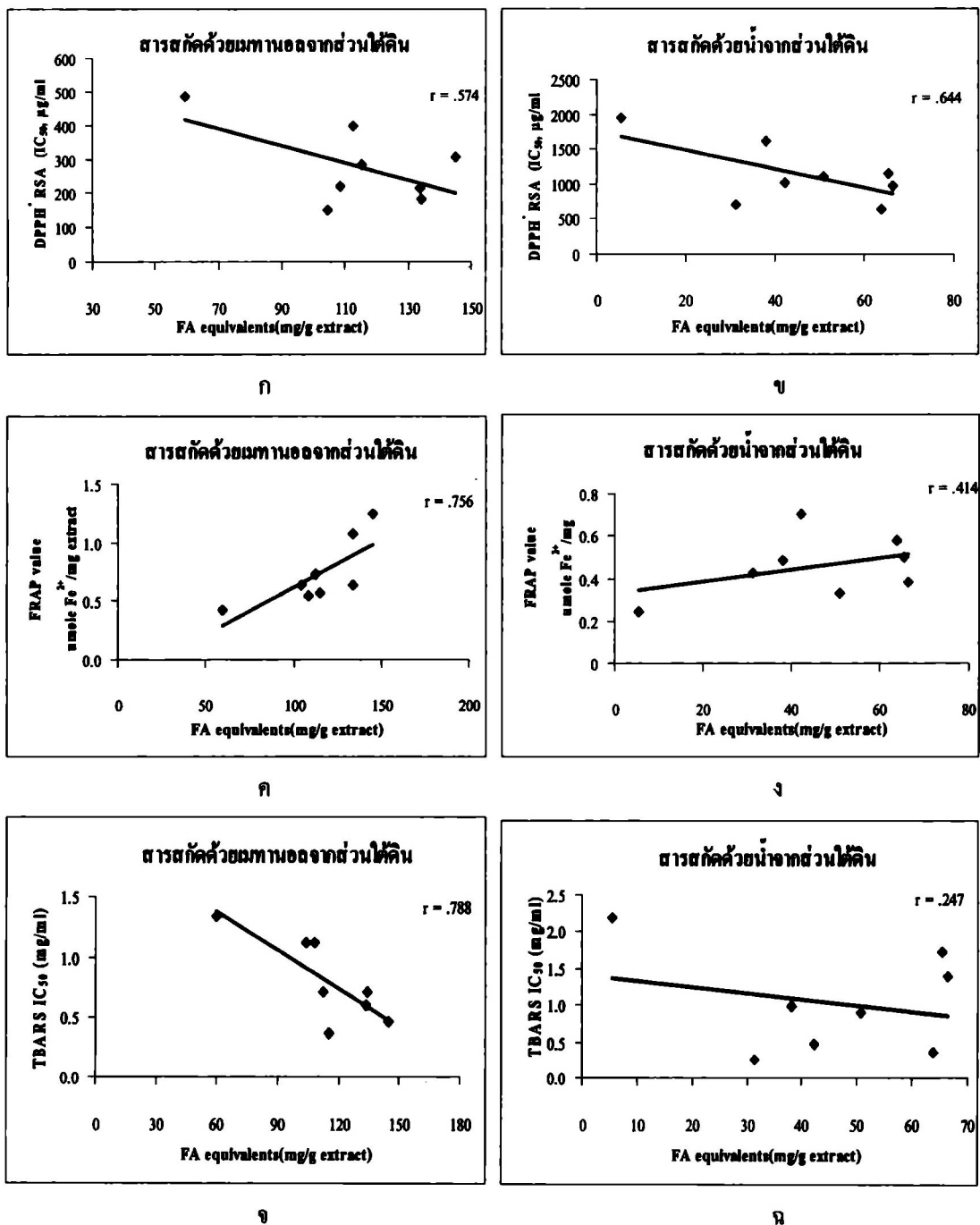
การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกกับค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.918 (ภาพที่ 31 ก) สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.760 (ภาพที่ 31 ข) สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.574 (ภาพที่ 32 ก) สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.644 (ภาพที่ 32 ข) ซึ่งมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) คือถ้ามีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกสูงจะมีค่า IC_{50} ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำ ซึ่งค่า IC_{50} ที่ต่ำหมายความว่ามีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ดี

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และค่าความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์ทดสอบด้วยวิธี FRAP พบว่าสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินและสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และค่ามีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.914, 0.756 และ 0.712 ตามลำดับ (ภาพที่ 31 ง และ ภาพที่ 32 ค) คือถ้าตัวอย่างที่ใช้ศึกษามีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกสูง จะพบว่ามีค่าความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์สูงด้วยส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดิน พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.414 ตามลำดับ (ภาพที่ 31 ค และ ภาพที่ 32 ง)

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก และค่าความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันทดสอบด้วยวิธี TBARS พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันเท่ากับ 0.643 และ 0.788 (ภาพที่ 32 จ) คือถ้ามีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกสูงจะมีค่า IC_{50} ของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันต่ำ ซึ่งค่า IC_{50} ที่ต่ำหมายความว่ามีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันที่ดี ส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) (ภาพที่ 31 จ-ฉ และ 32 ฉ)



ภาพที่ 31 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ก. และ ข.), FRAP (ค. และ ง.) และ TBARS (จ. และ ฉ.) จากส่วนเหนือดินเมื่อทำการสกัดด้วยเมทานอล (ก., ค. และ จ.) และ น้ำ (ข., ง. และ ฉ.)



ภาพที่ 32 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ก. และ ข.), FRAP (ค. และ ง.) และ TBARS (จ. และ ฉ.) จากส่วนใต้ดินเมื่อทำการสกัดด้วยเมทานอล (ก., ค. และ จ.) และ น้ำ (ข., ง. และ ฉ.)

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินระหว่าง *Murdannia gigantea* [ดอกขาวต้นขนาดใหญ่: Mg (w11) และ Mg (w12), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], *M. macrocarpa* (Mm3) และ *M. simplex* (Ms2 และ Ms1) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 13 โดยศึกษาในแบบจำลองในหลอดทดลอง (*In Vitro*) ซึ่งกลไกของแบบจำลองครอบคลุมในการวิเคราะห์ทั้งในแบบการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transfer, SET) ด้วย Folin-Ciocalteu assay, DPPH assay และ FRAP assay และการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer, HAT) ด้วย TBARS assay โดยใช้ค่า IC₅₀ ในการประเมินผลของสารสกัด

1. ผลการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างชนิด

วิธี Folin-Ciocalteu จากการทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิก (total phenolic contents, TPC) ระหว่างพืชแต่ละชนิด (ตารางที่ 14 และภาพที่ 21) ในภาพรวมแล้ว สารสกัด *M. gigantea* จะมีค่า TPC สูงที่สุดรองลงมา คือ *M. simplex* และ *M. macrocarpa* ตามลำดับ ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการศึกษานั้นมีผลต่อค่า TPC จากการศึกษากลับพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลมีค่า TPC มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 22) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของพืชสกุลเดียวกันในก่อนหน้านี้ (ชารินี สิบปาละ และคณะ, 2550; 2551) อาจเป็นไปได้ว่าความมีขั้วของตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันทำให้ได้กลุ่มสารที่ละลายออกมามันต่างกันด้วย (Choi et al, 2007) เช่น สารจำพวก flavonoids ที่มี catechol เป็นองค์ประกอบ stilbenes และ tannins ซึ่งโครงสร้างหลักประกอบด้วย aromatic ring แทนที่ด้วย hydroxy group จะละลายในตัวทำละลายจำพวก alcohol ได้ดี (Pietta, 2000) เป็นต้น

เมื่อเปรียบเทียบส่วนของพืชที่นำมาใช้ศึกษาพบว่าในสารสกัดด้วยเมทานอลส่วนใต้ดินจะมีค่า TPC มากกว่าส่วนเหนือดินมีเพียงบางตัวอย่างของ *M. gigantea* เท่านั้นที่พบว่าส่วนเหนือดินมีค่า TPC มากกว่า ได้แก่ Mg (ws) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำพบว่าส่วนใต้ดินมีค่า TPC มากกว่าส่วนเหนือดินพบในบางตัวอย่างของ *M. gigantea* ได้แก่ Mg (w11), Mg (wpm) และ *M. simplex* ส่วน *M. macrocarpa* และบางตัวอย่างของ *M. gigantea* ได้แก่ Mg (w12), Mg (ws) และ Mg (vm) พบว่าส่วนเหนือดินจะมีค่า TPC มากกว่าส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 14 และภาพที่ 22) ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าพืชแต่ละชนิดจะมีค่า TPC ที่สกัดได้จากส่วนต่างๆ แตกต่างกัน เช่น เหียง จะพบค่า TPC ในสารสกัดจากลำต้นมากกว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนใบ ส่วนเอนฮ้าและแมงลักการากจะมีมากกว่าลำต้น เป็นต้น (ระวีวรรณ แก้วอมดวงค์, 2549) แสดงให้เห็นว่าพืชแต่ละชนิดจะมีการสะสมสารกลุ่มฟีนอลิกในส่วนต่างๆ เช่น ราก ลำต้น ใบ แตกต่างกันไป

วิธี DPPH จากการประเมินค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] (DPPH[•] radical scavenging activity, DPPH[•] RSA) พบว่า ในภาพรวมแล้วสารสกัดจาก *M. gigantea* โดยเฉพาะ Mg (ws) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีที่สุดรองลงมาเป็น *M. simplex* และ *M. macrocarpa* ตามลำดับ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 24) และเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ Mg (ws) มีค่า DPPH[•] RSA ต่ำกว่าประมาณ 10 เท่า อาจเนื่องมาจากการศึกษาครั้งนี้ใช้สารสกัดหยาบซึ่งยัง

ไม่ทราบปริมาณสารที่ออกฤทธิ์แน่นอน แต่เมื่อเทียบกับรายงานผลการศึกษาของพืชต่างชนิดในสกุลเดียวกันในก่อนหน้านี้ พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีค่า DPPH' RSA ต่ำกว่าประมาณ 1.4, 2.3 และ 4.5 เท่าของ *M. bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora* ตามลำดับ (ชาวินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551) ซึ่งมีรายงานการศึกษาว่าตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดและส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการศึกษานั้นมีผลต่อค่า DPPH' RSA (ชาวินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551, Othman, et al, 2007) และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลมีค่า DPPH' RSA ต่ำกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 25) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของพืชต่างชนิดในสกุลเดียวกันในก่อนหน้านี้ (ชาวินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551)

เมื่อเปรียบเทียบส่วนของพืชที่นำมาใช้ศึกษา พบว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนใต้ดินมีค่า DPPH' RSA ต่ำกว่าส่วนเหนือดินทั้งที่สกัดด้วยเมทานอลและน้ำซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อาจเป็นไปได้ว่ากลุ่มสารที่ถูกสกัดด้วยเมทานอลและกลุ่มสารที่สกัดได้จากส่วนรากมีโครงสร้างและพันธะของสาร ที่เอื้อต่อการให้อิเล็กตรอนได้ง่ายกว่า ซึ่งเมื่อพิจารณาที่โครงสร้างของอนุมูลอิสระ DPPH' จะเห็นว่ามิอีเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระนั้นถูกบดบังด้วยวงแหวนเบนซีน 3 วงและหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีขนาดใหญ่เข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ยากและช้ากว่าสารที่มีขนาดเล็ก (Huang et al., 2005) แต่มีบางตัวอย่างของสารสกัด *M. gigantea* ที่พบว่าส่วนเหนือดินมีค่า DPPH' RSA ต่ำกว่าส่วนใต้ดิน ได้แก่ Mg (ws) (สกัดด้วยเมทานอล ภาพที่ 25) Mg (wl2) และ Mg (ws) (สกัดด้วยน้ำ ภาพที่ 25)

วิธี FRAP สำหรับการวัดความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) โดยวัดความสามารถของสารสกัดในการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้แก่เหล็ก Fe^{3+} เป็นการเลียนแบบคุณสมบัติประการหนึ่งของสารต้านออกซิเดชันจากการทดลอง จะเห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินนั้นเป็นสารรีดิวซ์ที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับสารสกัดชนิดอื่น (ตารางที่ 16 และภาพที่ 27) เมื่อเปรียบเทียบค่า FRAP value ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 16 และภาพที่ 28) ซึ่งเป็นกลุ่มของสารสกัดที่มีความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์ได้ดีที่สุดพบว่า *M. gigantea* มีความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์สูงสุดรองลงมาเป็น *M. simplex* และ *M. macrocarpa* ตามลำดับและสอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH' อย่างไรก็ตามค่าที่วัดด้วยวิธี FRAP และวิธี DPPH' มีความสอดคล้องกันเพียงบางตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งตัวอย่างที่มีฤทธิ์สูงหรือต่ำเมื่อวัดด้วยวิธี DPPH' นั้นยังมีความสามารถในการออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับเมื่อวัดด้วยวิธี FRAP (ตารางที่ 16 และภาพที่ 28) เนื่องจากวิธี FRAP เป็นวิธีทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมดของสารสกัด โดยวัดความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งแสดงถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัด โดยการเป็นตัวรีดิวซ์เพื่อเปลี่ยน Fe^{3+} -TPTZ ไปเป็น Fe^{2+} -TPTZ (Benzie, Strain, 1996)

วิธี TBARS จากการประเมินความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันในแบบจำลองการศึกษาใช้สมองหนูเป็นแหล่งไขมันซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวัดสาร malondialdehyde ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของภาวะที่ไขมันถูกออกซิไดส์เกินสมดุล จากการทดลองสารสกัดด้วยน้ำทั้งจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ *M. gigantea* และ *M. simplex* สามารถด้านการเกิดปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่า *M. macrocarpa* (ตารางที่ 17 และภาพที่ 29) อาจเนื่องมาจากสารสกัดด้วยน้ำของพืชดังกล่าวมีกลุ่มสารที่มีความสามารถในการให้โปรตอนได้ดีแก่อนุมูล $LOO^{\cdot}$ ที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาถูกไลพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Bravo, 1998) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของพืชต่างชนิดในสกุลเดียวกันในก่อนหน้านี้ โดย

พบว่าสารสกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550; 2551) และเมื่อเปรียบเทียบส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการสกัด พบว่าส่วนได้ดินมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 17 และภาพที่ 30) แต่อย่างไรก็ตามสารประกอบเชิงซ้อน TBARS ที่เกิดจาก TBA เป็นปฏิกิริยาที่ไม่เฉพาะเจาะจงกับ malondialdehyde เพราะสารหลายชนิด เช่น น้ำตาลสามารถทำปฏิกิริยากับกรดชนิดนี้ได้ แต่เนื่องจากวิธีนี้ทำได้ง่ายสะดวกอีกทั้งยังเป็นผลผลิตส่วนใหญ่ของปฏิกิริยาและไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาสูง จึงยังคงเป็นวิธีที่นิยมใช้วัดภาวะลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในร่างกาย จัดเป็นวิธีที่มีความใกล้เคียงกับปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายมากกว่า 3 วิธีข้างต้น (โอภา ชัชระอุปต์ และ มาลีรักษ์ อัคร์สินทอง, 2549)

เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง TPC กับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพบว่า TPC มีความสัมพันธ์กับผลการศึกษาคด้วยวิธี DPPH และ FRAP มากกว่าการศึกษาด้วยวิธี TBARS สารสกัดด้วยเมทานอลมีความสัมพันธ์กันมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำและสารสกัดจากส่วนเหนือดินมีความสัมพันธ์กันมากกว่าสารสกัดจากส่วนได้ดิน (ภาพที่ 31-32) และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินในพืชแต่ละชนิด พบว่าส่วนใหญ่จะแปรผันตรงกับปริมาณฟีนอลิก (ทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP) เช่น Mg (ws), Mm เป็นต้น แต่บางตัวอย่างกลับพบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทั้งที่มีปริมาณสารฟีนอลิกต่ำกว่า เช่น Ms1 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่า Mg (vm) (ตารางที่ 13) จึงอาจเป็นไปได้ว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชกลุ่มนี้ ไม่ได้จำกัดอยู่ที่สารประกอบฟีนอลิกเท่านั้น ซึ่งจากการศึกษาพฤษเคมีเบื้องต้นในบทที่ผ่านมาจะเห็นว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนได้ดินมีสารประกอบหลักแตกต่างกันและพืชกลุ่มนี้มีสารประกอบหลัก ได้แก่ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์ แอลคาลอยด์ (ภาพที่ 14-19) และสารกลุ่มสารโพลีแซคคาไรด์ซึ่งสารเหล่านี้สามารถแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันได้เช่นกัน ดังนั้นการที่จะทราบว่าสารใดเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แน่ชัดจึงควรทำการศึกษาโดยการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์นี้ต่อไป

2. ผลการศึกษาเปรียบเทียบพืชชนิดเดียวกันเก็บได้จากสถานที่แตกต่างกันและพบว่ามีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา

Murdannia gigantea [ดอกขาวต้นขนาดเล็กใหญ่: Mg (wl1) และ Mg (wl2), ดอกขาวต้นขนาดเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวโคนม้วน: Mg (pwm) และ ดอกม้วน: Mg (vm)] (ตารางที่ 13) จากการศึกษาพบว่า ในสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินสามารถแบ่งกลุ่มพืชออกได้เป็น 4 กลุ่ม ตามความสามารถในการต้านออกซิเดชันเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และ วิธี DPPH ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยาและสามารถนำไปใช้สนับสนุนการจัดจำแนกพืชกลุ่มนี้ในระดับสายพันธุ์ได้ กล่าวคือ เมื่อทำการทดสอบด้วย

วิธี Folin-Ciocalteu กลุ่มพืช (population) ที่มีดอกสีขาวต้นเล็กมีปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกสูงที่สุดรองลงมา คือ กลุ่มดอกสีม่วง กลุ่มดอกสีขาวโคนกลีบดอกสีม่วงและกลุ่มดอกสีขาวต้นใหญ่ตามลำดับ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 21-22)

วิธี DPPH' กลุ่มดอกสีขาวต้นเล็กมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH' ได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นกลุ่มดอกสีขาวโคนกลีบดอกสีม่วง กลุ่มดอกสีม่วงและกลุ่มดอกสีขาวต้นใหญ่ ตามลำดับ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 24-25)

3. ผลการศึกษาเปรียบเทียบพืชชนิดเดียวกันที่เก็บได้จากสถานที่แตกต่างกัน แต่ไม่พบลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา

M. simplex พบว่าตัวอย่างทั้ง 2 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษารั้วนี้แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทำการสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินเมื่อทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu (ตารางที่ 14 และภาพที่ 22) และวิธี DPPH (ตารางที่ 15 และภาพที่ 25) แต่ผลการทดสอบด้วยวิธี FRAP (ตารางที่ 16 และภาพที่ 28) และวิธี TBARS (ตารางที่ 17 และภาพที่ 30) พบว่า มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อาจเป็นไปได้ว่าสภาพการเจริญเติบโตของพืชที่อยู่ในพื้นที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารสำคัญอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันทำให้ผลการศึกษาที่ได้มันแตกต่างกันไปในแต่ละวิธี ซึ่งมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการกระจายพันธุ์และสภาพแวดล้อมว่ามีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของพืช โดย Qiu et al. (2007) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ *Notopterygium incisum* Ting ex H.T. Chang (Qianghuo) วงศ์ Apiaceae จากส่วนรากและลำต้นได้ค้นที่ได้จากสถานที่แตกต่างกันทั้งสภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิประเทศ ได้แก่ Sichuan, Ningxia, Inner Mongolia, Hunan และ Gansu พบว่าความแตกต่างของสถานที่สภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิประเทศ มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ นอกจากนี้ Javanmardi et al. (2003) รายงานการศึกษาปริมาณฟีนอลิกซึ่งทำการทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) จากเมล็ด *Ocimum basilicum* L. จำนวน 23 ตัวอย่าง ที่ได้จากสวนในบ้าน ฟาร์มปลูกและตลาดในประเทศอิหร่านพบว่าปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันแตกต่างกันในบางตัวอย่าง

ดังนั้นนอกจากตัวทำละลายที่ใช้และส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการสกัดแล้ว ลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา การกระจายพันธุ์และสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตของพืชจึงเป็นอีกปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่อไปในอนาคต จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าพืชทั้ง 3 ชนิดเป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติอีกแหล่งทางเลือกโดยเฉพาะ *M. gigantea* และ *M. simplex* ที่มีการใช้ประโยชน์เป็นยาพื้นบ้านมาช้านานแต่ยังไม่ปรากฏรายงานการศึกษาวิจัยทางเภสัชวิทยา จากข้อมูลการศึกษาข้างต้นจะเห็นว่าพืชกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีเมื่อเทียบกับพืชในสกุลเดียวกัน เช่น *M. bracteata* เป็นพืชที่มีรายงานการศึกษาวิจัยในก่อนหน้านี้นี้และมีการใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายมีจำหน่ายในรูปแบบต่างๆ ตามท้องตลาด การศึกษานี้จึงเป็นการเพิ่มเติมข้อมูลทางเภสัชวิทยาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชกลุ่มนี้และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามการศึกษารั้วนี้เป็นเพียงการศึกษาความสามารถด้านออกซิเดชันแค่ในหลอดทดลองซึ่งเป็นเพียงปฏิกิริยาเคมีเท่านั้นยังคงต้องการศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาในภาพรวม

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง *Murdannia gigantea*, *M. macrocarpa* และ *M. simplex* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกันและจากการศึกษาและเก็บตัวอย่างภาคสนามยังพบว่ามี ความผันแปรทางลักษณะ (variation of characters) ใน *M. gigantea* ได้แก่ สีดอก ขนาดต้น สมมาตรของดอก และการปรากฏของขนขนาดเล็กที่โคนกลีบดอก ซึ่งได้นำพืชรังกล่าวมาทำการศึกษาทางเภสัชเวท โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบจุดลักษณะส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอก การศึกษาองค์ประกอบเคมีเบื้องต้นและศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การศึกษาทางจุลลักษณะสามารถนำมาใช้แยกพืชทั้ง 3 ชนิด ได้อย่างชัดเจนอีกทั้งยังสามารถแยกความแตกต่างในพืชที่พบว่ามี ความผันแปรทางลักษณะคือ *M. gigantea* ได้แก่ กลุ่มดอกสีขาว ต้นขนาดเล็ก กลุ่มดอกสีขาว ต้นขนาดใหญ่ กลุ่มดอกสีขาว โคนม่วงและกลุ่มดอกสีม่วง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยา โดยจุดลักษณะเด่นของพืชสกุล *Murdannia* คือ การสะสมคิวทิน ปากใบชนิด 6 เซลล์ การปรากฏของขนจี้ 3 เซลล์ และมีต่อม พบกลุ่มเนื้อเยื่อสกลอรงคิมาที่ขอบแผ่นใบประดับช่อดอก และมีการสะสมผลิตภัณฑ์เคมีออกซาเลตขนาดเล็กในชั้นเนื้อเยื่อมิโซฟิล โดยรูปวิธาน (key) จุดลักษณะเฉพาะที่แยกพืชทั้ง 3 ชนิดนี้คือ

- 1ก. มีขนขนาดใหญ่ที่ผิวแผ่นใบประดับช่อดอกทั้งด้านบนและล่าง ไม่พบสกลอรงคิมาตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อทอลเลียงทางด้านล่างแผ่นใบประดับช่อดอก *M. simplex*
- 1ข. ไม่ปรากฏขนขนาดใหญ่ที่ผิวแผ่นใบประดับช่อดอกทั้งด้านบนและล่าง พบสกลอรงคิมาตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อทอลเลียงทางด้านล่างแผ่นใบประดับช่อดอก
 - 2ก. มีสกลอรงคิมาตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อทอลเลียงทางด้านล่างของแผ่นใบ 1 - 3(-4) ชั้น เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวปรากฏทั้งสองด้าน ด้านบนเรียงตัวต่อเนื่องจากกลางใบถึงขอบใบ [บริเวณขอบใบมี 1-2 ชั้นเซลล์ กลางใบมี 2 -3 ชั้นเซลล์] แต่ด้านล่างพบเฉพาะบริเวณกลางใบ [มี 1-2 ชั้น] *M. macrocarpa*
 - 2ข. มีสกลอรงคิมาตามแนวกลุ่มเนื้อเยื่อทอลเลียงทางด้านล่างของแผ่นใบ 4 - 8(-10) ชั้น เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวปรากฏเฉพาะด้านบนเรียงตัวต่อเนื่องจากกลางใบถึงขอบใบ [ขอบใบมี 1 -3 ชั้น กลางใบมี 1-5 ชั้นเซลล์] *M. gigantea*

การศึกษาองค์ประกอบเคมีเบื้องต้นพบว่า พืชกลุ่มนี้มีสารองค์ประกอบหลักทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์และกลุ่มฟีนอลิก แต่ผลการศึกษาครั้งนี้พบสารในกลุ่มแอลคาลอยด์เป็นรายงานครั้งแรกในพืชสกุลนี้ ซึ่งโครมาโทแกรมที่แยกภายใต้ระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วยเอทิลแอสซิเตต กรดฟอร์มิก กรดแอสซิดิกและน้ำ (125 : 11 : 11 : 13.5) โดยใช้ stationary phase เป็น silica gel สามารถแสดงความแตกต่างของพืชทุกชนิดได้ดีที่สุดทั้งในสารสกัดที่ได้จากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน และยังพบว่าโครมาโทแกรมสามารถแยกความแตกต่างในกลุ่มพืชที่มีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยาได้ (*M. gigantea*) ซึ่งสารส่วนใหญ่ที่แยกออก

มาได้ในระบบทำลายนี้ คือ สารกลุ่ม flavonoids อาจสรุปได้ว่าสารกลุ่มนี้สามารถนำมาใช้จัดจำแนก (chemical marker) พืชสกุลนี้ได้

การศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและการต้านออกซิเดชัน โดยการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการศึกษาความสามารถของสารสกัดพืชออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มการให้อิเล็กตรอน ด้วยวิธี DPPH, FRAP และ Folin-Ciocalteu และกลุ่มการให้ไฮโดรเจนอะตอมด้วยวิธี TBARS พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของพืชกลุ่มนี้ในวิธี Folin-Ciocalteu, DPPH และ FRAP มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ($p < 0.05$) แต่สารสกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิเคปเปอร์ออกซิเดชันได้ดี (วิธี TBARS) ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่าและยังพบว่าสารสกัดที่ได้จากส่วนใต้ดินมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่าส่วนเหนือดิน โดยสารสกัดของ *M. gigantea* และ *M. simplex* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่า *M. macrocarpa* เช่นเดียวกับผลการหาค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันทั้งหมดและการทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิเคปเปอร์ออกซิเดชันซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีกว่า ซึ่งความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมและความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิเคปเปอร์ออกซิเดชันของพืชกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิกโดยส่วนใหญ่จะแปรผันตรงกับปริมาณฟีนอลิก แต่มีบางตัวอย่างที่พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีทั้งที่มีปริมาณสารฟีนอลิกต่ำ จึงอาจเป็นไปได้ว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชกลุ่มนี้ไม่ได้จำกัดอยู่ที่สารประกอบฟีนอลิกเท่านั้น ซึ่งจากการศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นจะเห็นว่าพืชแต่ละชนิดมีสารประกอบหลักแตกต่างกัน และส่วนของพืชที่แตกต่างกันยังมีการสะสมสารแตกต่างกันด้วย ดังนั้นการที่จะทราบว่าสารใดเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แน่ชัด จึงควรทำการศึกษาโดยการแยกให้ได้สารบริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์นี้ต่อไป นอกจากนี้พบว่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชันยังสามารถแยกความแตกต่างในกลุ่มพืชที่มีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยาได้ (*M. gigantea*) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในวิธีข้างต้น แสดงให้เห็นโอกาสในการจำแนกพืชชนิดนี้ในระดับสายพันธุ์ (variety) และพืชกลุ่มนี้ยังสามารถนำมาเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติอีกหนทางเลือก สามารถนำไปพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพต่อไปได้

สรุปได้ว่าการศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอก การศึกษาองค์ประกอบเคมีเบื้องต้น และศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งใน *Murdannia gigantea* และ *M. macrocarpa* จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยากลายกันมาก อาจทำให้มีผู้เข้าใจผิดได้ง่าย ดังนั้นจึงควรใช้การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางเภสัชเวทร่วมด้วย ซึ่งจะสามารถแยกความแตกต่างของพืชดังกล่าวได้อย่างชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

- ธารินี สืบปาละ, สุพัตรา ปรศุพัฒนา, ศรีสมพร ปรีเปรม, ทวีศักดิ์ ชิตเมธาโรจน์. การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชเวทของพืช 3 ชนิด ในสกุล *Murdannia* (วงศ์วงศ์ผักปราบ). วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2007; 3(2): 43-52.
- _____. การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของพืช 3 ชนิด ในสกุล *Murdannia* (วงศ์ *Commelinaceae*). วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น (บัณฑิตศึกษา) 2550; 7(2): 98-110.
- _____. ธารินี สืบปาละ, สุพัตรา ปรศุพัฒนา, ศรีสมพร ปรีเปรม, ทวีศักดิ์ ชิตเมธาโรจน์. การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง ผักลิ้มผัวใหญ่และกินกุ่มน้อย (วงศ์ผักปราบ) ในประเทศไทย. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2551.
- นันทน์ภัส เตมวงศ์. ความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกกับความสามารถรวมในการต้านอนุมูลอิสระในพืช. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์ 2551; 8(2).
- หิมลวรรณ ทัญทุพพิจารณ, เพียงจิต สัตตคุนศย์, พรรณี พิเดช. พืชเรื้อรังของหญ้าปักกิ่งในหนูขาว. สารศิริราช 2534; 43: 529-533.
- หิมลวรรณ ทัญทุพพิจารณ, วิธลา งามนัฐจินดา, พรรณี พิเดช. การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของหญ้าปักกิ่งในหนูขาว. สารศิริราช 2533; 43: 458-563.
- ระวีวรรณ แก้วอมดวงค์, ทรงพร จิ่งมันคง. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และปริมาณสารฟีนอลรวมของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2549; 8(2).
- วงศ์สถิต ฉั่วกุล, พร้อมจิต ศรีลัมพ์. สมุนไพรพื้นบ้านอุบลราชธานี (2). วารสารสมุนไพร 2541; 5(1): 21-52.
- สาคร พรประเสริฐ, ขนิษฐา พันธุวี, อุษณีย์ วินิจเขตคำนวน. ฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์และความเป็นพิษของหญ้าปักกิ่งต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว. เชียงใหม่เวชสาร 2544; 40(4): 195-203.
- เอมอร โสมนะพันธ์, นพมาศ สรรพคุณ, วิมา จิรจฉายกุล, อ้อมบุญ ถ้วนรัตน์. ยาจากสมุนไพร. นครปฐม: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; [ม.ป.ป.].
- โอภา ชัชระกุลป์, มาลีรักษ์ อัดต์สินทอง. สารต้านอนุมูลอิสระ. นนทบุรี: พี. เอส. พรินท์; 2549.
- Aruoma OI. Nutrition and Health Aspects of Free Radicals and Antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 1994; 32(7): 671-683.
- Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma as A Measure of Plasma as A Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 1996; 239: 70-76.
- Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Ingenta Connect Publication: Nutrition Reviews* 1998; 56: 317-33.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity Using The DPPH Free Radical Method. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 1997; 30: 609-651.

- Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods Enzymol** 1978; 52: 302-310.
- Cannon JR, Dampawan P, Lojanapiwatna V, Phuriyakorn B, Sinchai W, Sirirugsa P, Suvatabhandhu K, Wiriyaichitra PA. **Contribution to The Thai Phytochemical Survey**. [n.p.]; 1979.
- Chaichumporn O, Preeprame S, Thitimetharoch T. Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae). **The 3rd Sino-Thai Conference on Traditional Medicine and Natural Products**; 30-31 October 2008; Nanning, Guangxi, China; 2008:145-146.
- Choi Y, Jeong HS, Lee J. Antioxidant activity of Methanolic Extracts from Some Grains Consumed in Korea. **Food Chemistry** 2007; 103: 130-138.
- Cooper JE, Rao JR. Localized Changes in Flavonoid Biosynthesis in Roots of *Lotus pedunculatus* after Infection by *Rhizobium loti*. **Plant Physiology** 1992; (100): 444-450.
- Coscia CJ. **CRC Handbook of Chromatography Terpinoids**. Vol. I. Boca Raton, FL: CRC Press; 1987.
- De Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UATH. Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. **Journal of Chromatography** 2006; (1112): 31-63.
- Evans WC. **Trease and Evans Pharmacognosy**. 14th ed. London: WB Saunders; 1996.
- Faden RB, Inman KE. Leaf Anatomy of the African Genera Commelinaceae : *Anthericopsis* and *Murdannia*. In Maesen, L. J. G. **The Biodiversity of African Plants**. Netherland: Kluwer Academic Publishers 1996: 464-471.
- Folin O, Ciocalteu V. On tyrosine and Tryptophane Determination in Proteins. **Journal of Biological Chemistry** 1927; 27: 627-650.
- Fried B, Sherma J. **Thin-layer Chromatography: Techniques and Application**. 2nd rev. ed. New York: Marcel Dekker; 1980.
- Griffiths LA, Smith GE. Metabolism of Apigenin and Related Compounds In the Rat: Metabolite Formation In Vivo and By The Intestinal In Vivo. **Biochemical Journal** 1972; 128: 901-911.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants in The Year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences** 2000; 899: 136-147.
- Halliwell B, Gutteridge JM. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd ed. New York: Oxford University; 1999.
- Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free Radicals and Antioxidants in Food and *In Vivo*: What they Do and How they Work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 1995; 35: 7-20.
- Harborne JB. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern techniques of Plants Analysis**. 2nd ed. London: Chapman and Hall; 1984.

- Hasan RS, Hossain MM, Akter R, Jamila M, Ehsanul Hoque Mazumder Md, Rahman S. DPPH Free Radical Scavenging Activity of some Bangladeshi Medicinal Plants. **Journal of Medicinal Plants Research** 2009; 3(11): 875-879.
- Hegnauer R. The Taxonomic Significance of Alkaloids. In Swain T. **Chemical Plant Taxonomy**. San Diego: Academic; 1963.
- Hegnauer R. Chemical Characters and Classification of The Rutales. In Waterman, P.G. and Grundon, M.F. (Eds). **Chemistry and Chemical Taxonomy of The Rutales**. San Diego: Academic Press; 1983: 401-440.
- Hong DY, De Filippis RA. Commelinaceae [Electronic version]. **Flora of China** 2000; 24:19-39.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry** 2005; 53: 1841-1856.
- Intiyot Y, Kinouchi T, Kataoka K, Arimochi H, Kuwahara T, Vinitketkumnue U, Ohnishi Y. Antimutagenicity of *Murdannia loriformis* in the Salmonella Mutation Assay and its Inhibitory Effects on Azoxymethane-induced DAN Methylation and Aberrant crypt Focus Formation in Male F344 Rats. **Journal of Medical Investigation** 2002; 49(1-2): 25-34.
- Javanmardia J, Stushnoff C, Lockeb E, Vivancob JM. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry** 2003; 83: 547-550.
- Jiratchariyakul W, Mongkarni P, Okabe H, Frahm AW. Cytotoxic Glycosphingolipid from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao & Kammathy. **Thai Journal of Pharmaceutical Sciences** 1998; 5(20): 10-20.
- Jiratchariyakul W, Okabe H, Frahm AW. A steroidal Glucoside from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy. **Thai Journal of Phytopharmacy** 1996; 3(1): 31-39.
- Jirawongse VA. **Thai Herbal Pharmacopoeia**. Vol. II. Bangkok, Thailand: Phachachon; 2000.
- Johansen DA. **Plant Microtechnique**. New York, USA: McGraw - Hill Book; 1940.
- Kaewsart S, Preeprame S, Thitimetharoch T. **Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Four *Cyanotis* species (Family Commelinaceae)**. The 3rd Sino-Thai Conference on Traditional Medicine and Natural Products; 29 - 31 October 2008; Nanning, Guangxi, China; 2008: 145-146.
- Katerina S. Miniolia and Constantinos A. Comparison of Different Tests Used In Mapping The Greek Virgin Olive Oil Production for The Determination of Its Total Antioxidant Capacity. **Grasas y Aceites** 2010; 61(1): 45-51.
- Kaur C, Kapoor HC. Antioxidant in Fruits and Vegetables the Millennium's Health. Int. **Journal of Food Science and Technology** 2001: 703-725.

- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromata A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **American Journal of Clinical Nutrition** 2002; 76: 560-568.
- Krpan M, Marković K, Šarić G, Skoko B, Hruškar M, Vahčić N. Antioxidant Activities and Total Phenolics of Acacia Honey. **Czech Journal Food Science** 2009; 27(Special Issue).
- Larson RA. The antioxidants of higher plants. **Phytochem** 1988; 27(4): 969-978.
- Li G, Min BS, Zheng C, Lee J, Oh SR, Ahn KS, Lee HK. Neuroprotective and Free Radical Scavenging Activities of Phenolic Compounds from *Hovenia dulcis*. **Archives of Pharmacol Research** 2005; 8(7): 804-809.
- Macek K. **Pharmaceutical Applications of Thin-layer and Paper Chromatography**. London: Elsevier Publishing; 1972.
- Mahakunakorn P, Tohhdam M, Murakami Y, Matsumoyo K, Watanabe H. Antioxidant and Free Radical-Scavenging Activity of Choto-san and Its Related Constituents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 2004; 27(1): 38-46.
- Maiza-Benabdesselam F, Khentache S, Bougoffa K, Chibane M, Adach S, Chapeleur Y, Max H, Laurain-Mattar D. Antioxidant Activities of Alkaloid Extracts of Two Algerian species of *Fumaria* : *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii*. **Records of natural products** 2007; 1(2-3): 28-35.
- Mamyrbékova-Békro JA, Konan KM, Békro Y-A, Djié Bi MG, Zomi Bi TJ, Mambo V. Boua BB. Phytocompounds of the Extracts of Four Medicinal Plants of Côte D'ivoire and Assessment of their Potential Antioxidant by Thin Layer Chromatography. **European Journal of Scientific Research** 2008; 24(2): 219-228.
- Martinez MAD-P. Flavonoid Relationships between The Commelinaceae and Related Families. **Biochemical Systematics and Ecology** 1985; 13(3), 253-256.
- Martinez MAD-P, Swain T. Flavonoids and Chemotaxonomy of The Commelinaceae. **Biochemical Systematics and Ecology** 1985; (13)4, 391-402.
- Martinez MAD-P, Martinez AJ. Flavonoid Distribution in Tradescantia. **Biochemical Systematics and Ecology** 1993; 21(2); 255-265.
- Mitja Martelanc M, Vovk I, Simonovska B. Separation and Identification of Some Common Isomeric Plant Triterpenoids by Thin-layer Chromatography and High-performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography A** 2009; 1216: 6662-6670.
- Okawa H, Ohisshi N, Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Analyst Biochemical** 1979; 95: 351-358.
- Othman a, Ismail A, Ghani NA, Adenan I. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Cocoa Beans. **Food Chemistry** 2007; 100: 1523-1530.

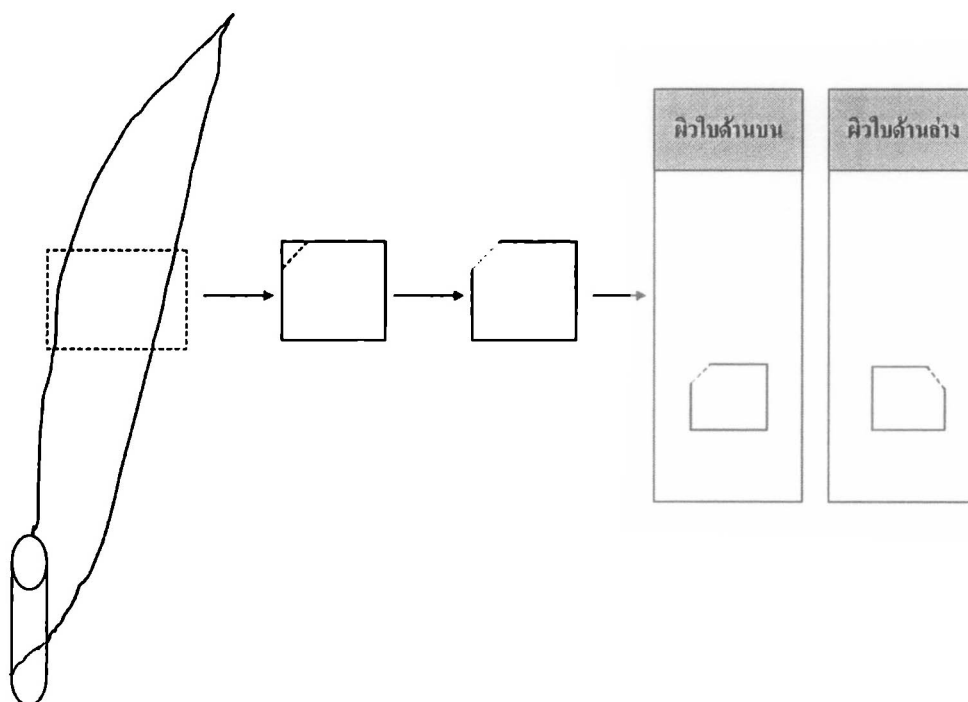
- Paola OV, Mónica VE, Omar MA. Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province. **Lyonia** 2006; 10(2): 65-71.
- Parivuguna V, Gnanaprabhal R, Dhanabalan R, Doss A. Antimicrobial Properties and Phytochemical Constituents of *Rheo discolor* Hance. **Ethnobotanical Leaflets** 2008; 12: 841-845.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. **Journal natural products** 2000; 63: 1035-1042.
- Qiu Y, Lu X, Pang T, Zhu S, Kong H, Xu G. Study of Traditional Chinese Medicine Volatile Oils from Different Geographical Origins by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography -Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC × GC–TOFMS) in Combination with Multivariate Analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 2007; 43(5): 1721-1727.
- Saánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. Free Radical Scavenging Capacity and Inhibition of Lipid Oxidation of Wines, Grape Juices and Related Polyphenolic Constituents. **Food Research International** 1999; 32: 407-412.
- Said IM, Din LD, Samsudin MW, Yusoff N, Latiff A, Ali RM, Hamid A, Hadi A. A Phytochemical Survey of Sayap-Kinabalu Park, Sabah. **Asean Review of Biodiversity and Environmental Conservation** 1998; Article VI, July.
- Singleton VI, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolic with Phosphomolybdic- Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture** 1965; 16: 144-158.
- Slaga TJ, Hanausek M, Morizot D, Walaszek Z. The Importance of Animal Models in Understanding Human Carcinogenesis and Its Chemoprevention. **Bulletin du Cancer** 1995; 47: 438-444.
- Stirton JZ, Harborne JB. Two distinctive anthocyanin patterns in the Commelinaceae. **Biochemical Systematics and Ecology** 1980; 8(3): 285-287.
- Tepe B, Sokmen M, Akput HA, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. **Journal Food Eng** 2005; 66: 447-454.
- Thitimetharoch T, Chantaranothai P, Thammathaworn A, Faden RB. **Taxonomic Studies of the Family Commelinaceae in Thailand**. [A Thesis for The Degree of Doctor of Philosophy], Khon Kaen: Khon Kaen university; 2004.
- Thitimetharoch T, Chantaranothai P, Thammathaworn A, Faden RB, Thammathaworn A. **Leaf Anatomical Studies of the Family Commelinaceae in Thailand**. In: 13th Flora of Thailand Meeting: 11-15 July 2005, Trinity College, Dublin (TCD) Ireland; Enterprise Ireland; 2005.
- Tomlinson PB. **Anatomy of the Monocotyledons III (Commelinales – Zingiberales)**. The Oxford: Clarendon Press; 1969.
- Trease GE, Evans WC. **Pharmacognosy**, 10th ed. London: Baillière Tindall; 1972.

- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables and Grain Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 1998; 46: 4113-4117.
- Vinitketkumnuen U, Charoenkunathum W, Kongtawelert P, Lertprasertsuk N, Picha P, Matsushima T. Antimutagenicity and DT-diaphorase Inducer Activity of Thai Medicinal Plant, *Murdannia loriformis*. **Herbs Spices Medicinal Plants** 1996; 4: 45-52.
- Vinitketkumnuen U, Chewonarin T, Dhumtanom P, Lertprasertsuk N, Wilda CP. Aflatoxin-albumin Adducts Formation after Single and Multiple Dose of Aflatoxin B1 in Rats Treated with Thai Medicinal Plants. **Mutation Research** 1999; 428: 345-351.
- Wang GJ, Chen SM, Chen WC, Chang YM, Lee TH. Selective Inducible Nitric Oxide Synthase Suppression by New Bracteanolides from *Murdannia bracteata*. **Journal of Ethnopharmacology** 2007; 112: 221-227.
- Wagner H, Bladt S. **Plant Drug Analysis : A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2nd ed. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1984.
- Willet WC. **Eat, Drink, and be Healtys The Har Vard Medical School Guide to Healthy Eating**. New York: Simon and Schuster; 2001.
- Yang Q, Ye G, Zhao WM. Chemical Constituents of *Commelina communis* Linn. **Biochemical Systematics and Ecology** 2007; 35: 621-623.

ภาคผนวก

วิธีการตัดชิ้นตัวอย่างในการศึกษาจุลลักษณะด้วยวิธีทำให้ใส

เนื่องจากในการศึกษาดังวิธีนี้ ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษาจะต้องผ่านขั้นตอนต่าง ๆ จนตัวอย่างใส แล้วจึงนำไปย้อมสี จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ได้ไปพ่นเป็นสไลด์ถาวร ซึ่งในขั้นตอนสุดท้ายนี้จะเกิดความสับสนในการที่จะระบุว่าชิ้นเนื้อด้านใดเป็นด้านบนหรือด้านล่าง เนื่องจากเมื่อผ่านขั้นตอนการต่าง ๆ แล้วเนื้อเยื่อแผ่นใบทั้งสองด้านจะมีความคล้ายคลึงกันมากการแยกด้วยตาเปล่าอาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ ดังนั้นการตัดเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคช่วยจำตั้งแต่เริ่มต้นก่อนที่จะนำมาผ่านขั้นตอนต่าง ๆ นั้นจะสามารถช่วยให้การนำชิ้นตัวอย่างมาพ่นเป็นสไลด์ถาวรทำได้สะดวกรวดเร็วขึ้นและยังช่วยให้เกิดความถูกต้องแม่นยำ เมื่อนำตัวอย่างสไลด์ไปศึกษารายละเอียดจุลลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยอาศัยเทคนิคในการตัดตัวอย่างดังนี้



ผลงานทางวิชาการ

1. ผลงานที่นำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1. Kaewsaart S, Preeprame S, Thitimetharoch T. **Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Four Cyanotis species (Family Commelinaceae).** ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ The 3rd Sino-Thai Conference on Traditional Medicine and Natural Products; 29 - 31 Oct 2008; Guangxi Traditional Chinese Medical (TCM) University. Nanning, ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน
2. Kaewsaart S, Porasuphatana S, Thitimetharoch T. **Total Phenolic Content and DPPH[•] Radical Scavenging Activity from Aerial Vegetative Part of *Murdannia bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* (Family Commelinaceae).** ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Flore du Combodge, du Laos et du Vietnam; 6-8 December 2010 – Hanoi, Vietnam, ประเทศเวียดนาม
3. Kaewsaart S, Chaichomporn O, Porasuphatana S, Thitimetharoch T. **Total Phenolic Content and DPPH[•] Radical Scavenging Activity in the Genus *Murdannia* (Family Commelinaceae).** ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ XVIII International Botanical Congress 23-30 July 2011, Melbourne Australia.

**The 3rd Sino-Thai International Conference
on Traditional Medicine and Natural Health Products**
第三届中国传统医药和天然药物研究国际学术研讨会

PROCEEDING

论文集

*Hosted by
Guangxi Traditional Chinese Medical University
Khon Kaen University, Thailand*

主办单位:

广西中医学院
泰国孔敬大学

OCTOBER 29-31, NANNING, GUANGXI, P.R. CHINA
中国·广西·南宁 2008年10月29-31日

Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Four *Cyanotis* species (Family Commelinaceae)

Sureerut Kaewsaart¹, Srisomporn Preeprame², Thaweesak Thitimetharoch^{2*}

¹ Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

* Correspondence author, E-mail: thathi@kku.ac.th



Abstract: Thin layer chromatograms of *Cyanotis arachnoidea*, *C. axillaris*, *C. thwaitesii* and *C. vaga* are useful for identification. The patterns of *Cyanotis arachnoidea* generally similar to *C. thwaitesii* and *C. vaga*, whereas *C. axillaris* is different. The best chromatographic system is shown to be solvent system of ethyl acetate - formic acid - water (32.5 : 7.5 : 10, v/v).

Introduction

Asian herbs from genus *Cyanotis* (Family Commelinaceae) have been used as medicines such as Indian *C. axillaris* for typanitis (Malabar Coast) and acites (Behar)¹. Moreover Philippine *C. vaga* for breast cancer². Eight taxa of the genus *Cyanotis* were enumerated for the Flora of Thailand³. The general occurrences of some species are similar. They are difficult for the distinguishing, especially from sterile parts.

Flavonoids were the major compounds for Family Commelinaceae⁴. Thin Layer chromatograms of three *Murdannia* species (Family Commelinaceae) were valuable for the diagnosis⁵. The aim of this preliminary study is to apply TLC study for the identification.

Materials and Methods

The whole plants of four species in genus *Cyanotis* (Family Commelinaceae): *C. arachnoidea* Wight, *C. axillaris* (L.) Sweet, *C. thwaitesii* Hook. and *C. vaga* (Lour.) Schult. f., were collected for voucher specimens and experimental materials. The vouchers were deposited at Herbal Herbarium, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen and Forest Herbarium Bangkok (BKF), Bangkok, Thailand. Solvent systems [systems I: ethyl acetate - formic acid - water - methanol (30 : 6 : 6 : 3, v/v), systems II: ethyl acetate - formic acid - water (32.5 : 7.5 : 10, v/v), systems III: ethyl acetate - formic acid - acetic acid - water (40 : 3.4 : 3.4 : 4.2, v/v)] were modified for methanol extraction of the samples and standard markers (quercetin and ferulic acid) on silica gel 60 F254. The chromatograms were investigated by using 10% sulfuric acid in ethanol and ultraviolet light 254 nm and 366 nm^{6,7}, in respectively.

Results

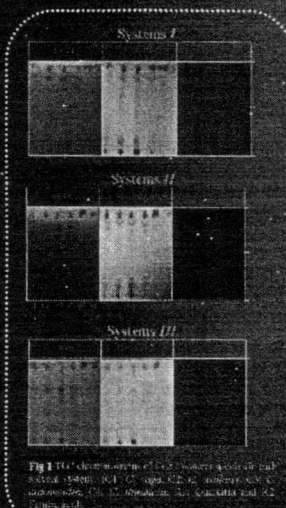


Fig. 1. TLC chromatograms of *C. arachnoidea* (1), *C. axillaris* (2), *C. thwaitesii* (3) and *C. vaga* (4) using three solvent systems (I, II, III).

Table 1. Data of TLC chromatograms of four *Cyanotis* species using three solvent systems (I, II, III). The table shows the Rf values for various compounds (Quercetin, Ferulic acid, and others) across the three systems for each species.

Compound	System I				System II				System III			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Quercetin	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Ferulic acid	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Discussion & Conclusion

The solvent systems are preliminarily modified for the separation. Flavonoids are main chemical constituents. The chromatograms show the different occurrences among four *Cyanotis* species. In general, the contents in each sample display stronger polarity than the markers, whereas the *Murdannia* species are weaker polarity⁵. The samples are well separated in solvent system II [ethyl acetate - formic acid - water (32.5 : 7.5 : 10, v/v)]. However, the suitable systems need to be performed for valuable identification and future researches.

Acknowledgements

We would like to thank Graduate School, Center for Research and Development of Herbal Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University and Thailand Research Fund (TRF-MRG-S080006) for their supports.

References

- Blatter E, Caus JE, Muester KS. *Indian Medicinal Plants*. 2nd ed. Lalit Mohan Das Co, Allahabad, India, 1935; 2538-2541.
- Gilman JC, Quinn ML. *Phytochemicals: A Review of Plants used against cancer*. In: *Encyclopedia of Cancer*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, 1995; 499-502.
- Martinez MDP, Swain J. Flavonoids and Chemoprevention of The Commelinaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1995; 13(1), 391-402.
- Rijkse JD, Oude P, Nieuwen WMA, Anese F, Gieseler G and Brinkman UAT. Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 2006; 1112, 31-63.
- Silphachai T, Pongpattana S, Preeprame S, Thitimetharoch T. Comparative Pharmacological and Anti-cancer Activity Studies of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae) KRU. *Research Journal (graduate studies)*, 2007; 7(2), 98-110.
- Silphachai T, Pongpattana S, Preeprame S, Thitimetharoch T. Comparative Studies among *Murdannia laevis*, *M. longifolia* and *M. nudiflora* (Comelinaceae) in Thailand. Master of Science Thesis in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Graduate School, Khon Kaen University, 2006; 114.
- Thitimetharoch T, Chantaramthai P, Thaweesak Thitimetharoch. Taxonomic Studies of the Family Commelinaceae in Thailand. Ph.D. Philosophy Thesis in Biology, Graduate School, Khon Kaen University, 2001; 212.



Institute of Ecology and
Biological Resources



Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Ministère des Affaires
Étrangères et Européennes



Sud Expert Plantes



Muséum national
d'histoire naturelle

PROGRAMME

2^e Symposium de la
« Flore du Cambodge, du Laos et du Vietnam »

2nd Symposium of the
« Flore du Cambodge, du Laos et du Vietnam »

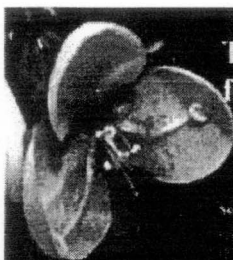


CRITICAL ECOSYSTEM
PARTNERSHIP FUND

2010
International Year of Biodiversity



Institut de recherche
pour le développement



Total Phenolic Content and DPPH[•] Radical Scavenging Activity from Aerial Vegetative Part of *Murdannia bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* (Family Commelinaceae)

Satereet Khamsorn¹, Supatta Petchaphadana², Eudon B. Robert³, Thiraveek Uthairachon⁴

¹Pharmacology Research Center, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

²Faculty of Pharmaceutical Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand

⁴Department of Botany, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, 50200, Thailand



Introduction

Murdannia is a genus of plants in the family Commelinaceae. It is a small, herbaceous plant with large, rounded, overlapping bracts and small flowers. The plant is native to Southeast Asia and is commonly found in wetland areas. It has been used in traditional medicine for various purposes, including treating skin diseases and as a diuretic.

The present study was conducted to investigate the total phenolic content (TPC) and DPPH[•] radical scavenging activity (RSA) of the aerial vegetative part of *M. bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa*, and *M. simplex*. The results of the study are presented in the following sections.

Materials and Methods

The aerial vegetative parts of the four *Murdannia* species were collected from their natural habitats in Chiang Mai, Thailand. The plants were identified by a local expert and then dried in the shade for 72 hours. The dried plant material was then ground into a fine powder and stored in airtight containers until use. The TPC and DPPH[•] RSA were determined using standard methods. The TPC was determined using the Folin-Ciocalteu assay, and the DPPH[•] RSA was determined using the DPPH[•] assay. The results of the TPC and DPPH[•] RSA are presented in the following sections.

The DPPH[•] RSA was determined using the DPPH[•] assay. The DPPH[•] radical is a stable free radical that can be scavenged by antioxidants. The scavenging activity of the plant extracts was determined by measuring the decrease in absorbance of the DPPH[•] solution after treatment with the extract. The results of the DPPH[•] RSA are presented in the following sections.

The results of the TPC and DPPH[•] RSA are presented in the following sections. The TPC of the plant extracts was determined using the Folin-Ciocalteu assay. The results of the TPC are presented in the following sections. The DPPH[•] RSA of the plant extracts was determined using the DPPH[•] assay. The results of the DPPH[•] RSA are presented in the following sections.

Acknowledgements

The present study was funded by the Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. The authors would like to thank the local expert who identified the plants and the local government who provided the land for the study. The authors would also like to thank the local community who provided the plant material for the study.

References

1. Khamsorn S, Petchaphadana S, Robert EB, Uthairachon T. Total phenolic content and DPPH[•] radical scavenging activity of the aerial vegetative part of *Murdannia bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* (Family Commelinaceae). *Journal of Pharmaceutical Research* 2014; 3(1): 1-10.
2. Khamsorn S, Petchaphadana S, Robert EB, Uthairachon T. Total phenolic content and DPPH[•] radical scavenging activity of the aerial vegetative part of *Murdannia bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* (Family Commelinaceae). *Journal of Pharmaceutical Research* 2014; 3(1): 1-10.
3. Khamsorn S, Petchaphadana S, Robert EB, Uthairachon T. Total phenolic content and DPPH[•] radical scavenging activity of the aerial vegetative part of *Murdannia bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* (Family Commelinaceae). *Journal of Pharmaceutical Research* 2014; 3(1): 1-10.
4. Khamsorn S, Petchaphadana S, Robert EB, Uthairachon T. Total phenolic content and DPPH[•] radical scavenging activity of the aerial vegetative part of *Murdannia bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* (Family Commelinaceae). *Journal of Pharmaceutical Research* 2014; 3(1): 1-10.

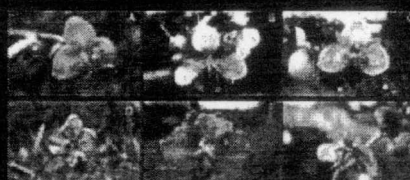


Figure 1 *Murdannia bracteata* (A), *M. gigantea* (B-D), *M. macrocarpa* (E) and *M. simplex* (F)

Total phenolic content (TPC) and DPPH[•] radical scavenging activities (DPPH[•] RSA) between methanolic and aqueous extracts from aerial vegetative part of *Murdannia bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* are evaluated by Folin-Ciocalteu assay and DPPH[•] assay. TPC of all species is established to correspond to DPPH[•] radical scavenging capacity. *Murdannia gigantea* generally exhibits the highest TPC and the strongest DPPH[•] scavenging capacity, followed by *M. simplex* and *M. macrocarpa* respectively. Extracting solvents variation of the species and environmental factors may be influenced on the difference.

Table 1 Details of the samples

Sl. No.	Species	Part	Source	TPC (mg/g)	DPPH [•] RSA (IC ₅₀)
1	<i>M. bracteata</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
2	<i>M. gigantea</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
3	<i>M. macrocarpa</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
4	<i>M. simplex</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
5	<i>M. bracteata</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
6	<i>M. gigantea</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
7	<i>M. macrocarpa</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
8	<i>M. simplex</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
9	<i>M. bracteata</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
10	<i>M. gigantea</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
11	<i>M. macrocarpa</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
12	<i>M. simplex</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
13	<i>M. bracteata</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
14	<i>M. gigantea</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
15	<i>M. macrocarpa</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
16	<i>M. simplex</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
17	<i>M. bracteata</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
18	<i>M. gigantea</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
19	<i>M. macrocarpa</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000
20	<i>M. simplex</i>	Whole plant	Ph. Chulalongkornrajavidyalaya	10.00000	10.00000

Results

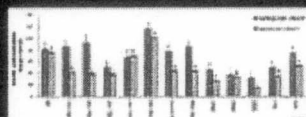


Figure 2 Comparative TPC of the samples in different extracting solvents are measured by means $\pm$ SD ($n = 3$). The vertical bars represent standard error of the mean. Means marked with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

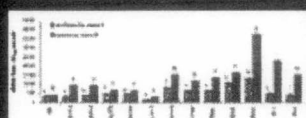


Figure 3 Comparative DPPH RSA of the samples in different extracting solvents are measured by means $\pm$ SD ($n = 3$). The vertical bars represent standard error of the mean. Means marked with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

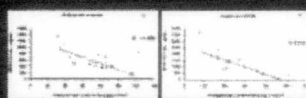


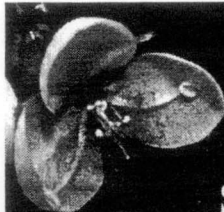
Figure 4 Correlation between TPC and DPPH RSA of the plants in methanolic extract (A) and aqueous extract (B) of the plants.

Discussion & Conclusion

The results of the TPC and DPPH[•] RSA are presented in the following sections. The TPC of the plant extracts was determined using the Folin-Ciocalteu assay. The results of the TPC are presented in the following sections. The DPPH[•] RSA of the plant extracts was determined using the DPPH[•] assay. The results of the DPPH[•] RSA are presented in the following sections.

The results of the TPC and DPPH[•] RSA are presented in the following sections. The TPC of the plant extracts was determined using the Folin-Ciocalteu assay. The results of the TPC are presented in the following sections. The DPPH[•] RSA of the plant extracts was determined using the DPPH[•] assay. The results of the DPPH[•] RSA are presented in the following sections.

The results of the TPC and DPPH[•] RSA are presented in the following sections. The TPC of the plant extracts was determined using the Folin-Ciocalteu assay. The results of the TPC are presented in the following sections. The DPPH[•] RSA of the plant extracts was determined using the DPPH[•] assay. The results of the DPPH[•] RSA are presented in the following sections.



Total Phenolic Content and DPPH[•] Radical Scavenging Activity in the Genus *Murdannia* (Family Commelinaceae)

Sureerat Khawwuan¹, Orasa Chaichumporn², Supatra Pomsuplatana², Robert B. Faden³, Thaweesak Thitimettharoch^{2*}

¹ Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

³ Department of Botany, Smithsonian Institution, PO Box 37012, Washington DC, 20013-7012, U.S.A.

* Correspondence author. E-mail: thathi@kku.ac.th

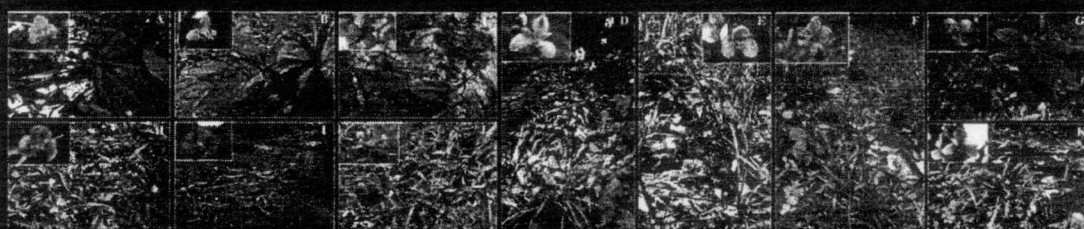


Figure 1. *Murdannia bracteata* (A), *M. discreta* (B), *M. edulis* (C), *M. gigantea* (D–F), *M. japonica* (G), *M. loriformis* (H), *M. macrocarpa* (I), *M. nudiflora* (J) and *M. simplex* (K).

Abstract

Methanolic and aqueous extracts of aerial vegetative parts of nine *Murdannia* species (23 samples) *M. bracteata*, *M. discreta*, *M. edulis*, *M. japonica*, *M. gigantea*, *M. loriformis*, *M. macrocarpa*, *M. nudiflora* and *M. simplex* (Family Commelinaceae), all from Thailand, are evaluated by Folin-Ciocalteu assay and DPPH[•] assay. Samples from different locations display significantly different results as well as morphological differences. Methanolic extracts generally show higher values for both total phenolic content (TPC) and DPPH[•] radical scavenging activity (DPPH[•] RSA). *Murdannia gigantea* exhibits the highest TPC, whereas *M. edulis* has the strongest DPPH[•] scavenging capacity. TPC of all species is demonstrated to correspond to DPPH[•] radical scavenging capacity (correlation between IC_{50} values: $R^2 = 0.4607$ in methanolic extract, $R^2 = 0.4869$ in aqueous extract). Extracting solvents, variation among the species and environmental factors may be influenced on the observed differences.

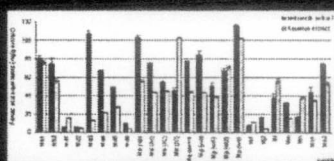


Figure 2. Comparative TPC of the samples in different extracting solvents are measured by means $\pm$ SD ($n = 4$). The vertical bars represent standard error of the mean.

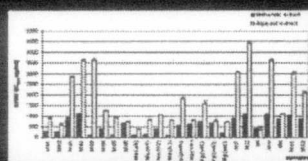


Figure 3. Comparative DPPH RSA of the samples in different extracting solvents are measured by means $\pm$ SD ($n = 4$). The vertical bars represent standard error of the mean.

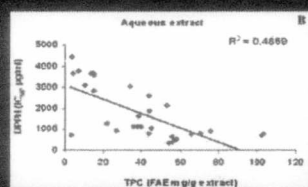
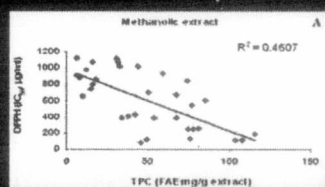


Figure 4. Correlation between TPC and DPPH RSA in methanolic extract (A) and aqueous extract (B) of the plants.

Acknowledgements

This project was funded by the TRF-BOT/TC Special Program for Biodiversity Research and Training grant (TRF-BOT/TC-5048 and TRF-BOT/TC-5050). We would like to thank to Center for Research and Development of Herbal Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, and Thailand Research Fund (TRF-BOT/TC-5048/5050) for their facilities. The presentation was financially supported by Khon Kaen University.

Selected References

1. H. G. Allen, H. S. Thomas, C. Lee, J. C. B. R., M. K. S. and Lee, B. K. 2005. Nonpreoxidative and Total Radical Scavenging Activity of Phenolic Compounds from *Thaunus edulis*. *Archives of Pharmaceutical Research* 30: 7, 901-909.
2. Othman, A., Al-Jarrah, A., Al-Jarrah, A. and Al-Jarrah, A. 2007. Antioxidant, Cytotoxic and Antibacterial Activity of *Thaunus edulis*. *Food Chemistry* 103: 1531-1536.
3. Sanchez-Moreno, J., Llorca, J. A. and Garcia-Alonso, J. 1999. Free Radical Scavenging Capacity and Inhibition of Lipid Oxidation of Various Green Herbs and Spices. *Food Research International* 32: 337-342.
4. Sangthana, V. and Rattan, J. A. 1995. Antimicrobial Activity of *Thaunus edulis* (Thaunaceae) and *Thaunus edulis* (Thaunaceae). *American Journal of Botany and Virology* 16: 144-147.
5. Sangthana, V., Pongvongkarn, S., Pongvongkarn, S. and Thitimettharoch, T. 2004. Comparing Pharmacological and Antibacterial Activity Models in *Thaunus edulis* (Commelinaceae). *KU Research Journal (Graduate studies)* 5(2): 98-110.
6. Sangthana, V., Pongvongkarn, S., Pongvongkarn, S. and Thitimettharoch, T. 2008. Comparative Studies among *Murdannia bracteata*, *M. loriformis* and *M. nudiflora* (Commelinaceae) in Thailand. *Ministry of Science, Technology and Innovation, Thailand*.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล (ไทย) นางสาวสุรรีรัตน์ เขียวสอาด
(อังกฤษ) Miss. Sureerut Khaewsart

ประวัติการศึกษา

2531-2537	ประถมศึกษา ร.ร. บ้านด้องศรีบัวบาน อ.ธาตุพนม จ.นครพนม
2537-2540	มัธยมศึกษาตอนต้น ร.ร. ธาตุพนม อ.ธาตุพนม จ.นครพนม
2540-2543	มัธยมศึกษาตอนปลาย ร.ร. ธาตุพนม อ.ธาตุพนม จ.นครพนม
2543-2545	ประกาศนียบัตรพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
2547-2549	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาสุขภาพ (เกียรตินิยมอันดับ 2) มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ประวัติการฝึกงานหรือประสบการณ์การทำงาน (นับรวมตั้งแต่เริ่มทำงาน/ฝึกงาน จนถึงปัจจุบัน)

ตำแหน่ง เจ้าหน้าที่งานวิทยาศาสตร์การแพทย์ หน้าที่ความรับผิดชอบ ทำการตรวจวิเคราะห์รวบรวมข้อมูลและบันทึกผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการและจัดทำสถิติการใช้บริการ หน่วยงาน หน่วยบริการสุขภาพปฐมภูมิ ที่อยู่ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ระยะเวลาทำงาน 1 ปี 9 เดือน จาก 1 เมษายน 2545 ถึง 31 มกราคม 2547

ตำแหน่ง ผู้ช่วยวิจัย ห้องปฏิบัติการเส้นผม หน้าที่ความรับผิดชอบ ประสานงานระหว่างผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทำการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการรวบรวมข้อมูลบันทึกผลและสรุปผลในโครงการวิจัยต่างๆ ที่ได้รับมอบหมาย หน่วยงาน ภาควิชาดงวิชา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อยู่ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ระยะเวลาทำงาน 2 ปี 8 เดือน จาก 1 กุมภาพันธ์ 2547 ถึง 31 ตุลาคม 2549

ตำแหน่ง ผู้ช่วยวิจัย ในโครงการการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

- 2551 ศึกษาในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ (เขื่อนน้ำพรม) จังหวัดชัยภูมิ
- 2552 ศึกษาในพื้นที่ป่าน้ำพอง อำเภออุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น
- 2553 ศึกษาในพื้นที่เขื่อนห้วยกุ่ม จังหวัดชัยภูมิ

