



การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชวิทยาและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพร
ไผ่เถื่อนป่า ว่านข้าวเหนียวและสร้อยกุหลาบ (วงศ์ผักปราบ)
COMPARATIVE PHARMACOGNOSTIC STUDIES AND ANTIOXIDANT
ACTIVITIES OF *Murdannia discreta*, *M. edulis* AND *M. japonica*
(FAMILY COMMELINACEAE)

นพธำพรช ชื่นชมพร

จิตพนัสนันท์ปัญญาวิทย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2554

RECEIVED	
BY <i>Q776</i>	DATE <i>4/10/54</i>

T652059



การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสมุนไพร
ไค้เดือนป่า ว่านข้าวเหนียวและโกฐทู้งนา (วงศ์ผักปราบ)
**COMPARATIVE PHARMACOGNOSTIC STUDIES AND ANTIOXIDANT
ACTIVITIES OF *Murdannia discreta*, *M. edulis* AND *M. japonica*
(FAMILY COMMELINACEAE)**

นางสาวอรษา ชัยชุมพร

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2554

**การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของสมุนไพร
ไค้เดือนป่า ว่านข้าวเหนียวและโกฐทู้งนา (วงศ์ผักปราบ)**

นางสาวอรษา ชัยชุมพร

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น**

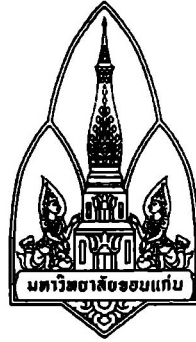
พ.ศ. 2554

**COMPARATIVE PHARMACOGNOSTIC STUDIES AND ANTIOXIDANT
ACTIVITIES OF *Murdannia discreta*, *M. edulis* AND *M. japonica*
(FAMILY COMMELINACEAE)**

MISS ORASA CHAICHUMPORN

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

2011



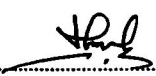
ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
หลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ชื่อวิทยานิพนธ์: การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของสมุนไพร ใก่เถื่อนป่า
ว่านข้าวเหนียว และ โกงทูงนา (วงศ์ผักปราบ)

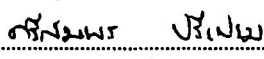
ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์: นางสาวอรษา ชัยชุมพร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. วรากรณ์ ภูตะสุน	ประธานกรรมการ
	รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. วรพล เสงวนิช	กรรมการ
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรีสมพร ปรีเปรม	กรรมการ
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์	กรรมการ

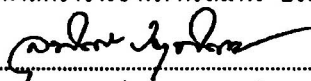
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์:


.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์)

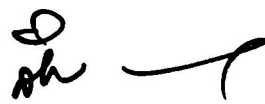
อาจารย์ที่ปรึกษา


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

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม


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

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม


.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ลำปาง แม่นมาตย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย


.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. วงศ์วิวัฒน์ ทศนิยกุล)

คณบดีคณะเภสัชศาสตร์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

อรษา ชัยชุมพร. 2554. การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของสมุนไพร ไก่เถื่อนป่า
ว่านข้าวเหนียว และโกฐหุงนาง (วงศ์ผักปราบ). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
เภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ผศ. ดร. ทวีศักดิ์ ชิตเมธาโรจน์, ผศ. ดร. ศรีสมพร ปรีเปรม,
ผศ. ดร. สุพัตรา ปรศุพัฒนา

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลทางเภสัชเวทและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของพืชสมุนไพร ไก่เถื่อนป่า (*Murdannia discretata*) ว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) และโกฐหุงนาง (*M. japonica*) (วงศ์ผักปราบ) ด้วยวิธีศึกษาจุล
ลักษณะวินิจฉัยแผ่นใบประดับช่อดอก (วิธีทำตัวอย่างให้ใสและวิธีพาราฟิน) การศึกษาทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (วิธี
หาปริมาณรวมของสารสกัดและทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีในสารสกัดด้วยเมทานอล) และฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน
ในหลอดทดลอง (วิธี DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu และ TBARS) พบว่า

จุลลักษณะ โดยทั่วไปมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในกายวิภาคศาสตร์แผ่นใบ ซึ่ง
ลักษณะที่สามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยพืชกลุ่มนี้ ได้แก่ การปรากฏของขนขนาดใหญ่ ความต่อเนื่องของเนื้อเยื่อ
ชั้นรองจากผิว ลักษณะของเซลล์ในชั้นมีโซฟิลล์ การปรากฏของเนื้อเยื่อคอลเลงคิมาและการสะสมสารแทนนินใน
ชั้นมีโซฟิลล์

ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมจากสารสกัดด้วยเมทานอลสามารถพบสารองค์ประกอบหลักทางเคมีเบื้องต้น
ได้แก่ สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์และฟลาโวนอยด์ และยังแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของตัวอย่างพืชที่ใช้ทดสอบ
โดยในระบบทำละลายที่ประกอบด้วย เอทิลแอลกอฮอล์ : กรดฟอร์มิก : กรดแอซิติค : น้ำ (125 : 11 : 11 : 13.5)
สามารถใช้แยกองค์ประกอบทางเคมีและใช้จำแนกตัวอย่างพืชทั้ง 3 ชนิด ได้ดีที่สุด

การศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลจากตัวอย่างของพืชว่าน
ข้าวเหนียว (*M. edulis*) ในส่วนเหนือดิน มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] สูงที่สุด [$IC_{50} = 78.858 \pm 3.069$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร] และในส่วนใต้ดิน มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด [มีค่าเทียบเท่า
กับ ferulic acid 166.017 ± 4.561 มิลลิกรัม/กรัม ของสารสกัด ในวิธี Folin-Ciocalteu] ขณะที่สารสกัดด้วยเมทา
นอลจากส่วนใต้ดินของโกฐหุงนาง (*M. japonica*) มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมดสูง
ที่สุด [FRAP value; $IC_{50} = 0.642 \pm 0.011 \mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$] อย่างไรก็ตามการศึกษาด้วยวิธี TBARS พบว่า
สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินของไก่เถื่อนป่า (*M. discretata*) [$IC_{50} = 0.45 \pm 0.007$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร] และ
ว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) [$IC_{50} = 0.72 \pm 0.018$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร] สามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน
ออกซิเดชันได้ดี ซึ่งมีค่าความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ด้านออกซิเดชันที่สูงทั้งในสารสกัด
ด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดิน (ด้วยวิธี DPPH มีค่า $R = 0.836$) และสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดิน (ด้วยวิธี
FRAP มีค่า $R = 0.867$)

Orasa Chaichumporn. 2011. **Comparative Pharmacognostic Studies and Antioxidant Activities of *Murdannia discreta*, *M. edulis* and *M. japonica* (Family Commelinaceae).** Master of Science Thesis in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

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

ABSTRACT

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

Microscopic occurrences generally agree with the previous reports of leaf anatomy. Macro-hairs, Hypodermis, Mesophyll, Collenchyma and Tannin are useful characters for the diagnosis.

Thin-layer chromatograms of methanolic extract show major components of terpenoids and flavonoids and the difference among the samples. Solvent system of ethyl acetate: formic acid: water (125 : 11 : 11 : 13.5, v/v) is suitable for the separation and determination.

The results antioxidant activity, *In Vitro*, suggest that aerial vegetative part of *M. edulis* in methanolic extract showed the highest DPPH[•] radical scavenging activity [$IC_{50} = 78.858 \pm 3.069 \mu\text{g/ml}$]; and underground part has the highest of total phenolic contents [$166.017 \pm 4.561 \text{ mg ferulic acid /g extract}$, Folin-Ciocalteu], whereas the highest ability of ferric reducing-antioxidant power [FRAP value; $IC_{50} = 0.642 \pm 0.011 \mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$] are found in methanolic extract from underground part of *M. japonica*. However, higher inhibitory activity of lipid peroxidation in aqueous extract from aerial vegetative part of both *M. discreta* [$IC_{50} = 0.45 \pm 0.007 \mu\text{g/ml}$] and *M. edulis* [$IC_{50} = 0.72 \pm 0.018 \mu\text{g/ml}$] are evaluated by TBARS assay. The total phenolic content is highly correlated to antioxidant activity in both methanolic extract of aerial vegetative part (DPPH assay: $R = 0.836$) and aqueous extract of underground part (FRAP assay: $R = 0.867$).

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ชิตเมธาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้แนวคิด ให้ความรู้ ให้คำปรึกษาการทำวิทยานิพนธ์ ปลุกฝังแนวคิด และจริยธรรมของการทำวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขผลการวิจัยเพื่อเผยแพร่ผลงานทางวิชาการและวิทยานิพนธ์จนได้รูปเล่มฉบับสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรีสมพร ปรีเปรม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ปรศุพัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือการทำวิทยานิพนธ์ ในการศึกษาพหุขเคมีเบื้องต้น และการศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพภายในประเทศไทย (BRT, T652059) ที่ได้มอบทุนอุดหนุนและส่งเสริมในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนเผยแพร่ผลงานวิชาการ

ขอขอบพระคุณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่มอบทุนส่งเสริมในการทำวิจัย และเอื้อเพื่ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนเผยแพร่ผลงานวิชาการ

ขอขอบพระคุณภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์กล้องจุลทรรศน์และกล้องถ่ายภาพดิจิทัล ในการศึกษาจุลลักษณะ

สุดท้ายผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และขอขอบคุณน้องชาย ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

อรณา ชัยชุมพร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ช
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 การศึกษาจุลลักษณะส่วนแผ่นใบประดับช่อดอก	5
2.1 การทบทวนวรรณกรรม	5
2.2 วิธีดำเนินการศึกษา	6
2.3 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	8
2.4 วิจัยผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	19
2.5 สรุปผลการศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอก	21
บทที่ 3 การศึกษาองค์ประกอบพฤกษเคมีเบื้องต้น	22
3.1 การทบทวนวรรณกรรม	22
3.2 วิธีดำเนินการศึกษา	26
3.3 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	28
3.4 วิจัยผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	43
3.5 สรุปผลการศึกษาองค์ประกอบพฤกษเคมีเบื้องต้น	46
บทที่ 4 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	47
4.1 การทบทวนวรรณกรรม	47
4.2 วิธีดำเนินการศึกษา	53
4.3 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	57
4.4 วิจัยผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	79
4.5 สรุปผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	83

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาในภาพรวม	85
เอกสารอ้างอิง	87
ภาคผนวก	91
ประวัติผู้เขียน	96

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและอ้างอิง	7
ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะวินิจฉัยไ้เถื่อนป่า ว่านข้าวเหนียวและโกฐทุ่งนา	9
ตารางที่ 3 ตารางเปรียบเทียบจุดลักษณะแผ่นใบระดับข้อดอกของไ้เถื่อนป่า (<i>M. discreta</i>) ว่านข้าวเหนียว (<i>M. edulis</i>) และ โกฐทุ่งนา (<i>M. japonica</i>)	13
ตารางที่ 4 จุดลักษณะวินิจฉัยของเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบระดับข้อดอกของไ้เถื่อนป่า (<i>M. discreta</i>) ว่านข้าวเหนียว (<i>M. edulis</i>) และ โกฐทุ่งนา (<i>M. japonica</i>)	20
ตารางที่ 5 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและอ้างอิง	27
ตารางที่ 6 ปริมาณร้อยละของสารที่สกัดด้วยเมทานอลและสกัดด้วยน้ำของตัวอย่างที่ใช้ศึกษา	29
ตารางที่ 7 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐทุ่งนา (Mj) และ ไ้เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 1	38
ตารางที่ 8 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐทุ่งนา (Mj) และ ไ้เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 2	39
ตารางที่ 9 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐทุ่งนา (Mj) และ ไ้เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 3	40
ตารางที่ 10 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐทุ่งนา (Mj) และ ไ้เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 1	41
ตารางที่ 11 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐทุ่งนา (Mj) และ ไ้เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 2	42
ตารางที่ 12 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐทุ่งนา (Mj) และ ไ้เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 3	43
ตารางที่ 13 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและอ้างอิง	53
ตารางที่ 14 ค่าของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด ด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดิน	78
ตารางที่ 15 ค่าของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด ด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนใต้ดิน	79

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของว่านข้าวเหนียว	2
ภาพที่ 2 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของโกฐหุ่งนา	3
ภาพที่ 3 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของไก่อ่อนป่า	3
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา	9
ภาพที่ 5 แสดงจุลลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของไก่อ่อนป่า	16
ภาพที่ 6 แสดงจุลลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของว่านข้าวเหนียว	17
ภาพที่ 7 แสดงจุลลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับช่อดอกของโกฐหุ่งนา	18
ภาพที่ 8 โครงสร้างองค์ประกอบเคมีในหญ้าปักกิ่ง	24
ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของแอนโดรกราฟีโฟไลด์	25
ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดเฟรูลิก	25
ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของรูติน	26
ภาพที่ 12 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไฟเบอร์ริน	26
ภาพที่ 13 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐหุ่งนา (Mj) และไก่อ่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 1	32
ภาพที่ 14 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐหุ่งนา (Mj) และไก่อ่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 2	33
ภาพที่ 15 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐหุ่งนา (Mj) และไก่อ่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 3	34
ภาพที่ 16 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐหุ่งนา (Mj) และไก่อ่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 1	35
ภาพที่ 17 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐหุ่งนา (Mj) และไก่อ่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 2	36
ภาพที่ 18 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐหุ่งนา (Mj) และไก่อ่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 3	37
ภาพที่ 19 ปฏิกริยาการเกิด Thiobarbituric Reactive Substances (TBARS)	49
ภาพที่ 20 โครงสร้างของอนุพลีอิสระ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH [•])	50
ภาพที่ 21 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นใน FRAP assay	51
ภาพที่ 22 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) สำหรับหาค่า FRAP value โดยใช้ FeSO ₄ ·7H ₂ O เป็นสารมาตรฐานที่ค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	55
ภาพที่ 23 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ของ Ferulic acid (ไม่โครกรัม/มิลลิลิตร) ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	56

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 24 แสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> และ <i>M. discreta</i> โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) เปรียบเทียบระหว่างชนิด A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน	59
ภาพที่ 25 แสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> และ <i>M. discreta</i> เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน	60
ภาพที่ 26 แสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH [•] ของสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> และ <i>M. discreta</i> เปรียบเทียบระหว่างส่วนเหนือดินและใต้ดิน โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) A. สกัดด้วยเมทานอล B. สกัดด้วยน้ำ	61
ภาพที่ 27 ค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) ของค่า FRAP value ($\mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$) ของสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> และ <i>M. discreta</i> เปรียบเทียบระหว่างชนิด A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน	63
ภาพที่ 28 ค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) ของค่า FRAP value ($\mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$) ของสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> และ <i>M. discreta</i> เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน	64
ภาพที่ 29 ค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) ของค่า FRAP value ($\mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$) เปรียบเทียบระหว่างสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> และ <i>M. discreta</i> เปรียบเทียบระหว่างส่วนเหนือดินและใต้ดิน A. สกัดด้วยเมทานอล B. สกัดด้วยน้ำ	65
ภาพที่ 30 แสดงค่าเปรียบเทียบปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> และ <i>M. discreta</i> โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) เปรียบเทียบระหว่างชนิด A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน	67
ภาพที่ 31 แสดงค่าเปรียบเทียบปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> และ <i>M. discreta</i> โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน	68
ภาพที่ 32 แสดงค่าเปรียบเทียบปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> , <i>M. discreta</i> และ <i>M. bracteata</i> โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) เปรียบเทียบระหว่างส่วนเหนือดินและใต้ดิน A. สกัดด้วยเมทานอล B. สกัดด้วยน้ำ	69
ภาพที่ 33 IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิเคปเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนูของสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> , <i>M. discreta</i> และ <i>M. bracteata</i> โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 3$) เปรียบเทียบระหว่างชนิด A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน	71

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 34 IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนูของสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> และ <i>M. discreta</i> โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 3$) เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน	72
ภาพที่ 35 IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนูของสารสกัด <i>Murdannia edulis</i> , <i>M. japonica</i> และ <i>M. discreta</i> โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) เปรียบเทียบระหว่างส่วนเหนือดินและใต้ดิน A. สกัดด้วยเมทานอล B. สกัดด้วยน้ำ	73
ภาพที่ 36 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (A. และ B.) วิธี FRAP (C. และ D.) วิธี TBAR (E. และ F.) จากสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดิน	75
ภาพที่ 37 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (A. และ B.) วิธี FRAP (C. และ D.) วิธี TBAR (E. และ F.) จากสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนใต้ดิน	76

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

Al	=	Andrographolide
col	=	Collenchyma
cu	=	Cutin
Fa	=	Ferulic acid
gh	=	Glandular micro-hair
hy	=	Hypodermis
Me (h)	=	<i>M. edulis</i>
Me (ab)	=	<i>M. edulis</i>
Md	=	<i>M. discreta</i>
Mj	=	<i>M. japonica</i>
pm	=	Palisade mesophyll
ph	=	Prickle-hairs
Pr	=	Piperine
rc	=	Raphide canal
Rt	=	Rutin
sc	=	Sclerenchyma
sm	=	Spongy mesophyll
sty	=	Styloids
ta	=	Tannin
uh	=	Uniseriate-hair
vb	=	Vascular bundles

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สมุนไพรว่านข้าวเหนียว (*Murdannia edulis*) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว วงศ์ผักปราชญ์ (Commelinaceae) มีลักษณะพื้นฐานวิทยาทั่วไป คือ ลำต้นหลักมีใบขนาดใหญ่แผ่แบนเป็นกระจุกลักษณะแบบกุหลาบ (Rosette form) และมีก้านชูช่อดอกออกด้านข้างของลำต้น (Lateral flowering shoots) ซึ่งคล้ายคลึงกับพืชอีก 2 ชนิด คือ ไก่เถื่อนป่า (*M. discreta*) และ โกฐหุงนางา (*M. japonica*) การจำแนกเพื่อระบุชนิดพันธุ์ของพืชกลุ่มนี้ มีปัจจัยจำกัดโดยใช้โครงสร้างสืบพันธุ์ (Reproductive part) ได้แก่ โครงสร้างช่อดอก ดอก ผลและเมล็ด (Thitimetharoch et al., 2004) ต้องรอในบางฤดูกาล นอกจากนี้พืชกลุ่มนี้ยังมีการนำมาใช้ทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน คือ รักษาบาดแผล (Perry and Metzger, 1980; Jain and DeFillipps, 1991; Kirtikar et al., 1994; Thitimetharoch and Yongvanit, 2004)

การศึกษาทางเภสัชเวท (Pharmacognostic) เป็นการศึกษาเกี่ยวกับยารักษาโรคที่มีต้นกำเนิดจากธรรมชาติ โดยเฉพาะพืช ตั้งแต่การศึกษาถึงแหล่งกำเนิด ประวัติความเป็นมา การเพาะปลูก การแพร่พันธุ์ การเก็บรวบรวม การคัดเลือก การตรวจสอบเอกลักษณ์ การเก็บรักษา และสารประกอบสำคัญ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับหลายแขนงวิชา เช่น พฤกษศาสตร์ (Botany) กายภาพ (Physics) เคมี (Chemistry) พฤกษเคมี (Phytochemistry) เภสัชวิทยา (Pharmacology) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture) และการศึกษาด้านพันธุกรรม (Genetic) (Trease and Evans, 1972; Evans, 1996) ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการวินิจฉัยและจำแนกชนิดพืชสมุนไพรกลุ่มนี้ได้ จากรายงานผลการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชเวทของสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง (*M. bracteata*) ผักลิ้มหัวใหญ่ (*M. loriformis*) และกินกุ้งน้อย (*M. nudiflora*) พบว่า สามารถใช้ลักษณะเนื้อเยื่อพืชลักษณะโครมาโทแกรม และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและการต้านออกซิเดชัน เป็นข้อมูลสนับสนุนการจำแนกชนิดได้ (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2551) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันนั้นมีบทบาทสำคัญในการรักษาบาดแผล (Pattanayak and Sunita, 2008) โดยการรักษาภาวะการอักเสบ ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) (โอภา วัชรคุปต์, 2549) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากโครงสร้างที่ไม่ได้ใช้ในการสืบพันธุ์ (Vegetative part) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวินิจฉัยชนิดพืชสมุนไพรกลุ่มนี้ และเป็นการเพิ่มข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชเวทสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในวิทยาศาสตร์สาขาอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไป

การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวท (Pharmacognostic Studies) ของสมุนไพรไก่เถื่อนป่า ว่านข้าวเหนียวและโกฐหุงนางา โดยการศึกษาจุดลักษณะส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอก (Inflorescent bract) ด้วยวิธีการทางกายวิภาคศาสตร์ของพืช การศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น ด้วยวิธีหาปริมาณรวมของสารสกัด (%Yield) และวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography, TLC) จากส่วนเหนือดินและใต้ดิน นอกจากนี้ยังสนใจศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) วิธี Ferric reducing

antioxidant power (FRAP) วิธี Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Folin-Ciocalteu)

1.1.1 ลักษณะพื้นฐานวิทยาทั่วไป

1.1.1.1 ว่านข้าวเหนียว

Thitimetharoch et al. (2004) รายงานลักษณะพื้นฐานวิทยาของว่านข้าวเหนียว (นครราชสีมา) มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Murdannia edulis* (Stokes) R.B. Faden ชื่ออื่นคือ ใต้เต้ (ขอนแก่น) เป็นไม้ล้มลุกมีอายุหลายปี ลำต้นหลักมีใบขนาดใหญ่แผ่แบนเป็นกระจุกลักษณะแบบกุหลาบ (Rosette form) มีรากสะสมอาหารเป็นกระเปาะที่ปลายราก (Distal tuber) และใบที่โคนต้นมีลักษณะเรียวยาวเรียงตัวเป็นรัศมีออกจากจุดเดียวกัน ขอบใบของผิวใบด้านบนมีขนละเอียดหนาแน่น ส่วนผิวใบด้านล่างเกลี้ยงไม่มีขนจนถึงมีขนสั้นนุ่มหนาแน่น ก้านช่อดอกออกด้านข้างของลำต้น (Lateral flowering shoots) มีใบประดับช่อดอกมีขนาดเล็ก เป็นติ่งยื่น (Appendage) 2-4 ใบ ขนาด 1-3 x 0.4 – 0.5 เซนติเมตร ช่อดอกเป็นแบบซี่นินนิ (Cincinni) ขนาด 2-3 เซนติเมตร ดอกมีสีขาวหรือสีค่อนข้างแดงอมม่วงถึงสีม่วง เกสรตัวผู้ที่สืบพันธุ์ได้มี 3 อัน ผลเป็นแบบแคปซูลมีลักษณะรูปรี-รูปไข่ การกระจายพันธุ์ พบที่เชิงโหม่น นครสวรรค์ เพชรบูรณ์ เลข สกลนคร ขอนแก่น ชัยภูมิ นครราชสีมา อุบลราชธานี กาญจนบุรี และสภาพนิเวศน์ พบที่บริเวณหนองน้ำ ป่าเบญจพรรณ ป่าสน ป่าไผ่ พบบนพื้นที่ระดับน้ำทะเล 40-1,300 เมตร ออกดอกในช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคม ดอกบานช่วงเวลากลางถึงเย็น



ภาพที่ 1 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของว่านข้าวเหนียว (*Murdannia edulis*)

1.1.1.2 โกร่งงูนา

Thitimetharoch et al. (2004) รายงานลักษณะพื้นฐานวิทยาของโกร่งงูนา มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Murdannia japonica* (Thumb.) Feden ชื่ออื่นคือ ผักปลาบคอย (เชียงใหม่) หว่านคองลิง (กาญจนบุรี) หว่านจิงลิง (นครสวรรค์) โดยมีลักษณะพื้นฐานวิทยาทั่วไปคล้ายคลึงกับพืช 2 ชนิด ดังกล่าว แต่แตกต่างตรงที่โกร่งงูนามีใบประดับช่อดอกจำนวนมาก ประมาณ 5-10 ใบ ไม่มีรากสะสมอาหารแบบกระเปาะ การกระจายพันธุ์ พบทั่วไปในประเทศไทย และสภาพนิเวศน์ พบที่บริเวณที่มีป่าเขียวตลอดปี และบริเวณที่ขึ้นในป่าเบญจพรรณหรือป่าไผ่ บนพื้นที่ระดับน้ำทะเล 50-1,000 เมตร ออกดอกในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม ดอกบานช่วงเวลากลางถึงเย็น



ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโกฐหุงนาง (*Murdannia japonica*)

1.1.1.3 ไก่เดือนป่า

Craib (1912 cited in Thitithetharoch et al., 2004) รายงานลักษณะสัณฐานวิทยาของไก่เดือนป่า มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Murdannia discreta* (Craib) T. Thitithetharoch & Faden (in press) โดยมีลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไปคล้ายคลึงกับว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) แต่แตกต่างกันที่ไก่เดือนป่ามีแผ่นใบประดับช่อดอกชัดเจนและมีใบประดับช่อดอก ประมาณ 3-4 ใบ การกระจายพันธุ์ พบที่เชียงใหม่ เลข อุบลราชธานี สกลนคร และสภาพนิเวศน์ พบบริเวณที่ขึ้นในป่าเบญจพรรณ บนพื้นที่ระดับน้ำทะเล 300-800 เมตร ออกดอกในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงมกราคม ดอกบานช่วงเวลากลางวันถึงเย็น



ภาพที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของไก่เดือนป่า (*Murdannia discreta*)

1.1.2 การใช้ประโยชน์

ว่านข้าวเหนียว มีการใช้เป็นยาสมุนไพร ยาห้ามเลือด ยาบำรุงกำลัง ยาปลูกกำหนด รักษาอาการหลังไม่ถึงจุดสุดยอด อาการกลืนปีศาจไม่อยู่ อาการหอบหืด อาการเสียท้อง ปวดศีรษะ เวียนศีรษะ อาการชักของเด็กทารก อาการตัวเหลือง อาการเจ็บปวดในไต โรคจิตติคังทวาร ภาวะหูหนวก แก้ไข้และรักษาพิษที่เกิดจากงูกัด (Jain and DeFillips, 1991; Chopra et al., 1956; Kirtikar and An, 1994; Wiart, 2000)

โกฐหุงนาง มีการนำมาใช้เป็นอาหาร โดยใช้ยอดอ่อนรับประทานเป็นผักจิ้มน้ำพริก (Thitimetharoch et al., 2004) และมีสรรพคุณช่วยรักษาบาดแผลไฟลวก แผลพุพองและมีการนำลำต้นของพืชมาใช้เป็นยาเหน็บ กระตุ้นการบีบรัดของมดลูก (Perry and Metzger, 1980)

ไถ่เดือนป่า ในจังหวัดอุบลราชธานีมีการนำรากสด หรือใบสดของมาช่วยรักษาบาดแผล (Thitimetharoch and Yongvanit, 2004)

1.1.3 คุณลักษณะทางเภสัชวิทยา

สารสกัดโกฐหุงนาง (*Murdannia japonica*) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง 6 ชนิดในหลอดทดลอง คือ เซลล์มะเร็งรังไข่ของหนู (Caov-3) เซลล์เยื่อบุผิวไตของลิง (Vero) เซลล์เยื่อบุผิวไตของวัว (MDBK) เซลล์ตับของหนู (HepG2) เซลล์มะเร็งที่เกิดจากเนื้อเยื่อต่อมของหนู (NCI-H23) และเซลล์มะเร็งเต้านมของหนู (T-47D) (Tan et al., 2003)

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของพืชสมุนไพรไถ่เดือนป่า ว่านข้าวเหนียวและโกฐหุงนาง โดยศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอก (Inflorescent bract) พฤษเคมีเบื้องต้น ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในหลอดทดลอง จากส่วนเหนือดินและใต้ดิน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวท (Pharmacognostic studies) ของพืช 3 ชนิด คือ สมุนไพรไถ่เดือนป่า (*Murdannia discretata*) ว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) และโกฐหุงนาง (*M. japonica*) ที่ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดขอนแก่น จังหวัดชัยภูมิ จังหวัดเลย จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดสกลนคร และจังหวัดนครพนม ด้วยวิธีทางกายวิภาคศาสตร์ (วิธีทำให้ใสและวิธีพาราฟิน) ส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอก และศึกษาเปรียบเทียบพฤษเคมีเบื้องต้น (วิธีหาปริมาณรวมของสารสกัดและวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี) และฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในหลอดทดลอง (วิธี DPPH, วิธี FRAP, วิธี TBARS และวิธี Folin-Ciocalteu) จากส่วนเหนือดินและใต้ดิน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบลักษณะวินิจฉัยเปรียบเทียบทางเภสัชเวท องค์ประกอบทางพฤษเคมีเบื้องต้นและฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของพืชทั้ง 3 ชนิด

1.4.2 ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องต่อไป

บทที่ 2

การศึกษาจุลลักษณะส่วนแผ่นใบประดับช่อดอก

การวินิจฉัยพืชสมุนไพร อาศัยหลักการทางอนุกรมวิธานพืช (Taxonomy) ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ที่ใช้ลักษณะภายนอกเป็นเกณฑ์เพื่อระบุชนิดพันธุ์ของพืช นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเทคนิคอื่นๆ เพื่อสนับสนุนและเพิ่มความถูกต้องในการระบุชนิดพันธุ์ของพืชให้มากที่สุด สำหรับการศึกษาครั้งนี้จึงนำวิธีการตรวจสอบทางด้านจุลลักษณะ (Microscopic Method) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งในการตรวจสอบทางเภสัชเวท (Pharmacognostic Method) เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพร มาใช้สำหรับศึกษาเปรียบเทียบเพื่อระบุชนิดพืชในสกุล *Murdannia* บางชนิดที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก โดยเฉพาะส่วนสัณฐานวิทยาในส่วนที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์ (Vegetative part) ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ ใบเดี่ยวรูปไข่แกว่งยาวและใบรูปหอกยาวโดยการศึกษาค้นคว้าเลือกศึกษาจุลลักษณะแผ่นใบประดับช่อดอก ด้วยวิธีทำให้ใส (Clearing method) และวิธีพาราฟิน (Paraffin method)

2.1 การทบทวนวรรณกรรม

Tomlinson (1969) ศึกษาทางวิทยาศาสตร์แผ่นใบและก้านใบพืชวงศ์ผักปราชญ์ (Family Commelinaceae) พบลักษณะเด่นของพืชวงศ์นี้ คือ ลักษณะปรากฏของขนจี้มีต่อม (Glandular micro-hairs) และท่อเมือกที่มีการสะสมผลึกรูปเข็ม (Raphide-canal) และได้รวบรวมลักษณะวินิจฉัยทั่วไปที่ใช้ในการจำแนกของพืชวงศ์นี้คือ เนื้อเยื่อผิวใบ (Epidermis) ขน (Hair) ปากใบ (Stomata) ชั้นใต้ชั้นเนื้อเยื่อผิว (Hypodermis) แพลลิสาด (Palisade) ซิลิกา (Silica bodies) และผลึกแคลเซียมออกซาเลต (Calcium oxalate crystals) และลักษณะสำคัญที่ใช้จัดจำแนกชนิดได้แก่ ขน จะปรากฏ 2 แบบ คือ ขนจี้ 3 เซลล์ และมีต่อม (3-celled glandular micro-hair) ซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า สามารถใช้ขนาดและรูปร่างลักษณะในการจัดจำแนกระดับชนิดได้ ทั้งนี้เพราะสิ่งแวดล้อมมีผลต่อลักษณะปรากฏของขนจี้เล็กน้อย ส่วนขนขนาดใหญ่ สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Macro-hair) มีความหลากหลายตั้งแต่ขนหลายเซลล์เรียงเป็นแถวเดี่ยว (Unicellular hair) ขนแบบตะขอ (Hooked-hairs) ขนปุ่ม (Papillae) และขนหนาม (Prickle-hairs) แต่ขนขนาดใหญ่จะเปลี่ยนตามสิ่งแวดล้อม

Faden and Inman (1996) ศึกษาทางวิทยาศาสตร์ของแผ่นใบสกุล *Murdannia* ในประเทศอัฟริกา โดยทำการศึกษาศัลยศาสตร์ของ *Murdannia* 9 ชนิด พบลักษณะเด่นของพืชสกุลนี้คือ เนื้อเยื่อผิวบาง (Thin epidermis) การสะสมและลวดลายของคิวทิน (Cutin patterned) มีความต่อเนื่องของเนื้อเยื่อชั้นรองผิว (Continuous hypodermis) และบริเวณขอบใบมีกลุ่มเนื้อเยื่อสเกลอเรนคิมา (Sclerenchyma) ชัดเจน และจุลลักษณะทั่วไปคือ ไม่พบเส้นกลางใบชัดเจน มีเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวหนึ่งถึงหลายชั้น เรียงต่อเนื่องกันอยู่ด้านบน พบชั้นแพลลิสาด (Palisade) 1 หรือ 2 ชั้น ด้านบนมีท่อผลึก (Raphide canals) อยู่ชั้นมีโซฟิลล์ (Mesophyll) ได้ชั้นเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวด้านบน ปากใบเป็นชนิดที่มีเซลล์ข้างเซลล์เคียงเซลล์คู่ 6 เซลล์ (Commelina type) พบทั้งด้านบนและด้านล่างของแผ่นใบ หรืออาจพบปากใบชนิดที่มีเซลล์ข้างเซลล์เคียงเซลล์คู่ 4 เซลล์ (Tradescantia type) บริเวณขอบใบด้านบน

Thitimetharoch et al. (2004, 2005) ศึกษาทางวิทยาศาสตร์ของแผ่นใบ *Murdannia japonica* พบลักษณะเด่นทั่วไปสอดคล้องกับ Faden and Inman (1996) แต่มีรายงานเพิ่มเติมในลักษณะผลึกแคลเซียมออกซาเลตขนาดเล็ก (Styloids) และการสะสมแทนนิน (Tannin) ในชั้นเนื้อเยื่อมีโซฟิลล์ (Mesophyll)

วิณา จิรจรรย์ชากุล และคณะ (2532) ได้ศึกษาจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของหญ้าปักกิ่ง พบว่า ผิวแผ่นใบด้านบนเมื่อมองจากด้านบน มีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้า ด้านองศาข้างจะเป็นรูปร่างหลายเหลี่ยม ที่ผิวใบมีลวดลายคิวทินปกคลุมชัดเจน ภายในเซลล์พบผลึกรูปเข็ม พบเซลล์ขนแถวเดียว และขนจั่ว ไม่พบปากใบ ผิวใบด้านล่างเมื่อมองจากด้านบนมีรูปร่างหลายเหลี่ยม ลวดลายคิวทินสะสมเห็นชัดเจน พบปากใบชนิดพาราไซติก พบขนใบขนาดเล็ก และมัดเซลล์ท่อลำเลียง ภาคตัดขวางของใบ ประกอบด้วย เซลล์พารงคิมขนาดใหญ่ เรียงต่อกัน 2-3 แถว ส่วนผิวใบด้านล่างจะมี 3-4 แถว เซลล์ทั้งสองด้านไม่มีคลอโรพลาสต์ ส่วนกลางใบมีเซลล์พารงคิม มีคลอโรพลาสต์ และพบท่อมัดลำเลียง พบผลึกรูปเข็มกระจายทั่วแผ่นใบ

ธารณี สืบปาละ และคณะ (2550, 2551) ศึกษาเปรียบเทียบจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของพืช 3 ชนิดในสกุล *Murdannia* วงศ์ผักปราช (Commelinaceae) คือ สมุนไพรหญ้าปักกิ่ง (*M. bracteata*) ผักลิ้มผิวใหญ่ (*M. loriiformis*) และกินกึ่งน้อย (*M. nudiflora*) พบว่า ลักษณะปรากฏของลวดลายคิวทิน ขนขนาดใหญ่และรูปร่างผลึก สามารถใช้แยกจุลลักษณะวินิจฉัยระดับสกุลได้ ซึ่งหญ้าปักกิ่งและผักลิ้มผิวใหญ่มีการสะสมลวดลายคิวทินลักษณะร่างแห ส่วนกินกึ่งน้อยมีลวดลายตามยาวลักษณะเป็นเส้นขนาน ขนขนาดใหญ่ที่เนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างจะพบเฉพาะในหญ้าปักกิ่งและผักลิ้มผิวใหญ่ แต่ขนหามปลายแหลมพบเฉพาะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านบนของผักลิ้มผิวใหญ่เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบผลึกแบบ Druse โดยพบในผักลิ้มผิวใหญ่และกินกึ่งน้อย

2.2 วิธีดำเนินการศึกษา

2.2.1 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

2.2.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ สมุนไพรไก่เถื่อนป่า (*Murdannia discreta*) วานข้าวเหนียว (*M. edulis*) และโกฐหุงนาง (*M. japonica*) โดยทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างพรรณพืชในประเทศไทยในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดขอนแก่น จังหวัดชัยภูมิ จังหวัดเลย จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดกาฬสินธุ์ จังหวัดสกลนคร และจังหวัดนครพนม พร้อมเลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์สำหรับจัดทำเป็นตัวอย่างแห้งมาตรฐานอ้างอิง ซึ่งเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (PS-KKU) และที่หอพรรณไม้ กรมป่าไม้ (BKF) และเลือกส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอกสำหรับการศึกษาเปรียบเทียบจุลลักษณะ ด้วยวิธีทำให้ใสและวิธีพาราฟิน โดยตัวอย่างที่ใช้ศึกษาและอ้างอิง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและอ้างอิง

Samples	Code	Locality (Thailand)	Habitat	Collection Date	Voucher's no.
<i>M. edulis</i>	Me (h)	Phu Manorum Temple, Mukdahan Province	Dried places in Deciduous forest (DF)	08/10/2008	OC, SK & TT 10
<i>M. edulis</i>	Me (h)	Ubonrat Dam, Khon Kaen Province	Dried places in DF	01/04/2009	OC, SK & TT 32
<i>M. edulis</i>	Me (ab)	Ubonrat Dam, Khon Kaen Province	Dried places in DF	01/04/2009	OC, SK & TT 33
<i>M. japonica</i>	Mj	Chulabhorn Dam, Chaiyaphum Province	Dried places in DF	09/10/2008	OC, SK & TT15
<i>M. japonica</i>	Mj	Tup Phaya Suea waterfall, Khon Kaen Province	Gallery forest in DF	25/06/2009	OC, SK & TT 37
<i>M. discreta</i>	Md	Phu Rua forest, Loei Province	Gallery forest in Mountain forest	28/07/2009	OC, SK & TT 55
<i>M. discreta</i>	Md	Doi Suthep-Pui forest, Chiang Mai Province	Dried places in DF	15/08/2009	OC, SK & TT 62
<i>M. discreta</i>	Md	Pha Taem forest, Ubon Ratchathani Province	Dried places in DF	22/08/2009	OC, SK & TT 71
<i>M. discreta</i>	Md	Phu Kradung forest, Loei Province	Wet places in DF	30/10/2009	TT, OC & SK 1200

OC = Orasa Chaichumporn, SK = Sureerut Khaewsart, TT= Thaweesak Thitimetharoch

2.2.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

Beaker ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร, Cylinder ขนาด 10, 25 และ 100 มิลลิลิตร, Petridis, Slide, Cover slide, ใบมีดโกน, เข็มเย็บ, พู่กัน, ขวดแก้วมีฝาปิดขนาด 5 มิลลิลิตร, ตะเกียงแอลกอฮอล์, Hot plate, Hot air oven, Water bath, Microtome (Leica RM 2035, Germany), กล้องจุลทรรศน์ (Olympus BX-51, Japan), และกล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Olympus DP-25, Japan), Polarize

2.2.1.3 สารเคมี

Safranin O (Sigma, Germany), Celestine Blue B (Sigma, Germany), Fast-green (Sigma, Germany), Formalin, Glacial acetic acid, Paraffin (Kendall, USA), Gelatin, Phenol crystal, Glycerin, Methyl cellosolve (Ajax Finechem, Australia), Clove oil, Xylene, Sodium carbonate (Ajax Finechem, Australia), Chloral hydrate, Absolute Ethanol (Merck, Germany), 95% Ethanol, Mounting media (DePeX)

2.2.2 การศึกษาจุลลักษณะของแผ่นใบประดับข้อดอก

2.2.2.1 วิธีการทำตัวอย่างให้ใส (Clearing method) นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาตัดแล้ววางบนจานเพาะเชื้อ นำตาข่ายไนลอนมาวางทับ ทำการละลายแรงควิดูและทำตัวอย่างให้ใส โดยแช่ในชุดลำดับเอทานอล (Ethanol series) และ 5% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ในสารละลายอิมิดัลไฮเดรต (Chloral hydrate) แล้วทำการคั่งน้ำออกโดยชุดลำดับเอทานอล (Ethanol series) ข้อมด้วยสีเซเลสตีน บลู บี (Celestine blue B) ผสมกับซาฟรานิน (Safranin) ทำการล้างสีคลด้วย 95% เอทานอล (Ethanol) คั่งน้ำออก (Dehydration) ด้วย 100% เอทานอล (Ethanol) เอทานอล (Ethanol) กับไซลีน (Xylene) อัตราส่วน 1 : 1 และไซลีน (Xylene) บริสุทธิ์ตามลำดับ (Johansen, 1940) จากนั้นนำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ได้ไปผนึกเป็นสไลด์ถาวรด้วยสารเคลือบสังเคราะห์ DePeX ศึกษารายละเอียดจุลลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพระบบดิจิทัล

2.2.2.2 วิธีพาราฟิน (Paraffin method) เป็นการศึกษาภาคตัดขวาง โดยตัดตัวอย่างที่ต้องการศึกษาแช่ในน้ำยา FAA 70% แล้วทำการดูดอากาศเพื่อให้น้ำยาเข้าไปอยู่ในทุกส่วนของเซลล์ด้วยเครื่องดูดอากาศ (Suction) จากนั้นทำการคั่งน้ำออก (Dehydration) จากตัวอย่างด้วยชุดลำดับเอทานอล (Ethanol series) แล้วเข้าสู่กระบวนการนำพาราฟินเข้าสู่ตัวอย่างฝังชิ้นตัวอย่างในพาราฟินบริสุทธิ์ (Embedding) จากนั้นทำการนำตัวอย่างมาฝังลงบล็อกสำเร็จรูป แล้วตัดชิ้นตัวอย่างด้วยเครื่องมือโครโทมแบบใช้มือหมุน (Rotary microtome) ยี่ห้อ Leica รุ่น RM 2035 หนา 10-15 ไมโครเมตร ชิ้นตัวอย่างที่ตัดเสร็จแล้วนำไปเข้าสู่กระบวนการติดริบบ่อนบนแผ่นสไลด์ ทำการข้อมด้วยสีซาฟรานิน (Safranin) และฟาสต์กรีน (Fast-green) ล้างสีส่วนเกินออก จากนั้นนำไปคั่งน้ำออก (Dehydration) ด้วยกระบวนการชุดลำดับเอทานอล (Ethanol series) แล้วนำไปผ่าน 100% เอทานอล (Ethanol) กับไซลีน (Xylene) อัตราส่วน 1:1 และไซลีน (Xylene) บริสุทธิ์ตามลำดับ (Johansen, 1940) จากนั้นนำชิ้นส่วนตัวอย่างที่ได้ไปผนึกเป็นสไลด์ถาวรด้วยสารเคลือบสังเคราะห์ DePex ศึกษารายละเอียดจุลลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพระบบดิจิทัล

2.3 ผลการศึกษาและอภิปรายผล

2.3.1 ผลการศึกษาวิจัยภาคสนาม

จากการสำรวจศึกษาและเก็บตัวอย่างภาคสนาม ไม้เถื่อนป่า (*Murdannia discreta*) ว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) และ โกฐหุงนาง (*M. japonica*) ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2552 มีรายละเอียดเปรียบเทียบลักษณะวินิจฉัยพืชดังกล่าวแสดงไว้ในตารางที่ 2 และภาพที่ 4

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะวินิจฉัยไถ่เถื่อนป่า ว่านข้าวเหนียวและโกฐทุ่งนา

ลักษณะวินิจฉัย	ไถ่เถื่อนป่า	ว่านข้าวเหนียว	โกฐทุ่งนา
รากสะสมอาหาร	อาจพบมีกระเปาะที่ปลายราก (Distal tuber) และมีติเหลี่ยม	มีกระเปาะที่ปลายราก (Distal tuber) และมีติเหลี่ยม	ไม่มีกระเปาะที่ปลายราก และมีติสีขาว
การปรากฏของขนที่ผิวแผ่นใบด้านล่าง	เกลี้ยง	มีทั้งกลุ่ม (Population) ที่มีขน [Me (h)] และเกลี้ยง [Me (ab)]	เกลี้ยง
ช่อดอก	มีใบประดับช่อดอกชัดเจน 3-4 ใบ	ใบประดับช่อดอกมีขนาดเล็ก เป็นติ่งยื่น (Appendage) 2-4 ใบ	มีใบประดับช่อดอกชัดเจน 5-10 ใบ
สีดอก	ขาว	ม่วง	ขาว
แหล่งที่พบในธรรมชาติ	ป่าผลัดใบและป่าริมห้วยในป่าผลัดใบ	ป่าผลัดใบ	ป่าดงดิบและป่าริมห้วยในป่าผลัดใบ



ก.



ข.



ค.



ง.



จ.



ฉ.

ภาพที่ 4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา : ไถ่เถื่อนป่า (ก-ข) : ก. ลักษณะต้นและช่อดอก ข. ลักษณะของราก, ว่านข้าวเหนียว (ค-ง) : ค. ลักษณะใบประดับช่อดอกที่มีขนาดเล็ก เป็นติ่งยื่น ง. ลักษณะของราก, โกฐทุ่งนา (จ-ฉ) : จ.ลักษณะต้นและช่อดอก ฉ. ลักษณะของราก

ตะมุน ไพร ไก่เดือนป่า (*Murdannia discreta*) เดิมทีชนิดนี้มีรายงานพบเป็นพืชเฉพาะถิ่น (Endemic species) บริเวณคอกยสุเทพ-บุย จังหวัดเชียงใหม่ โดยมีขึ้นตัวอย่างอ้างอิงทางอนุกรมวิธานที่ไม่สมบูรณ์และมีเพียงหมายเลขเดียวเท่านั้น (Craib, 1912 cited in Thitimetharoch et al., 2004) จากการสำรวจและศึกษาภาคสนามที่ต้องใช้ความละเอียดในการสังเกต ทำให้พบตัวอย่างเพิ่มเติมของพืชชนิดนี้ในพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติบางแห่งทั้งในและต่างประเทศที่ถูกระบุชื่อซึ่งเข้าใจผิด (Misidentification) ว่าเป็นว่านข้าวเหนียว (*Murdannia edulis*) หรือ โกรฐธุงนา (*Murdannia japonica*) ทำให้พบการกระจายพันธุ์ที่มีขอบเขตกว้างขึ้นในป่าผลัดใบของภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

การศึกษารังนี้ จึงสามารถเพิ่มเติมข้อมูลในเรื่องของเขตการกระจายพันธุ์และยังสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นตัวอย่างอ้างอิงของพืชชนิดนี้อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบลักษณะผันแปร (Variation of characters) ของว่านข้าวเหนียว (*Murdannia edulis*) คือ การปรากฏของขนที่ผิวแผ่นใบด้านล่างมีทั้งกลุ่ม (Population) ที่มีขนและเกลี้ยง

2.3.2 ผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2.3.2.1 ไก่เดือนป่า (ตารางที่ 3, ภาพที่ 5)

1) วิธีทำให้สี เนื้อเยื่อผิว (Epidermis) ทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทิน (Cutin) สะสมเห็นชัดเจนลักษณะเป็นลวดลายร่างแห (Reticulate) (ภาพที่ 5-ข-ค) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีขนาดยาว 130- 240 ไมครอน และกว้าง 50-70 ไมครอน (ภาพที่ 5-ข) ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม (Isodiametric) มีขนาดยาว 160-240 ไมครอน และกว้าง 40-80 ไมครอน (ภาพที่ 5-ง) รูปร่างเซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่าและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบ ปากใบ (Stomata) พบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คู่ 6 เซลล์ (6-celled stomata) กระจายบริเวณใกล้ขอบเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน (ภาพที่ 5-ง) และเรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง เซลล์ขน พบชนิดที่มีต่อม (Glandular micro-hairs) 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบอกยาว 75-122.5 ไมครอน บนเนื้อผิวด้านบน (ภาพที่ 5-ค) และล่างยาว 75-137.5 ไมครอน พบขนขนาดใหญ่ (Macro hairs) 3-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดี่ยว (Uniseriate hairs) เป็นแนว 2-3 แถว ขนานขอบใบบนเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน (ภาพที่ 5-ข) ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างพบ ขน 3-4 เซลล์เรียงเป็นแถวเดี่ยว (ภาพที่ 5-ค) ขอบใบ (Margin) เซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม พบขนหนาม 1-2 เซลล์และขนปุ่ม (ภาพที่ 5-ก) เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว (Hypodermis) เมื่อมองจากด้านบนของแผ่นใบมีรูปร่าง 5-7 เหลี่ยม และชั้นถัดไปเป็นชั้นมีโซฟิลล์ (Mesophyll) เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นรูปร่างกลมเรียงชิดกันของแพลลิสาด (Palisade) พบผลึกรูปปริซึม (Prismatic crystal) และผลึกรูปเข็ม (Needle-like crystal) ในแผ่นใบระดับข้อคอก ระบบท่อลำเลียง (Vascular bundle) พบลักษณะท่อลำเลียงมีลวดลายเป็นแบบเกลียวเวียน (Spiral) และแบบวงแหวน (Annular) และพบกลุ่มเนื้อเยื่อสเคลอเรนคิมา (Sclerenchyma) ตลอดแนวบริเวณใกล้ขอบใบ (Submarginal) (ภาพที่ 5-ก)

2) วิธีพาราฟิน จากภาคตัดขวางเนื้อเยื่อผิว พบการสะสมคิวทินที่ผิวใบ ลักษณะรูปร่างเนื้อเยื่อผิวมีรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ปากใบกระจายตัวบริเวณผิวแผ่นใบด้านล่าง พบขนยาวที่มีต่อม 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบอกทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว ปรากฏทั้ง 2 ด้าน โดยชั้นรองผิวแผ่นใบ

ด้านบนมี 1-2 ชั้นเซลล์ ค่อนข้างบางบริเวณเส้นกลางใบ ถึงบริเวณใกล้ขอบใบ ส่วนชั้นรองผิวแผ่นใบด้านล่างปรากฏ 2-3 ชั้นเซลล์มีเฉพาะบนเส้นกลางใบ (ภาพที่ 5-จ, ข) พบผลึกปริซึม ท่อผลึกรูปเข็มกระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณชั้นรองผิวแผ่นใบทั้งด้านบนและด้านล่าง (ภาพที่ 5-จ, ข) ชั้นมีโซฟิลล์ ประกอบด้วย 2 ชั้น จากผิวแผ่นใบด้านบนคือชั้นแพลลิสเซด มีลักษณะเป็นรูปแท่งทรงกระบอกและรูปโคน เรียงตัวต่อเนื่อง 1-2 ชั้นเซลล์ และถัดลงมาคือชั้นสปองจี (Spongy) มีลักษณะเป็นรูปกลมจัดเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ 3-4 ชั้นเซลล์ (ภาพที่ 5-จ-ฉ) พบผลึกปริซึม ท่อผลึกรูปเข็มกระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณชั้นแพลลิสเซดและชั้นสปองจี (ภาพที่ 5-จ-ข) พบเซลล์คอลเลงคิมา (Collenchyma) 3-4 ชั้นเซลล์ ที่บริเวณด้านล่างของท่อลำเลียงซึ่งปรากฏเฉพาะผิวแผ่นใบด้านล่าง (ภาพที่ 5-จ) พบแทนนินในชั้นมีโซฟิลล์ (ภาพที่ 5-จ, ข) ขอบใบ มีรูปร่างปลายมนและปรากฏกลุ่มเนื้อเยื่อสเคลอเรนคิมาบริเวณใกล้ขอบใบ (ภาพที่ 5-ข) ระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียง (Vascular bundle) โดยมีเยื่อหุ้มท่อลำเลียง (Bundle sheath) 1-2 ชั้นเซลล์ ล้อมรอบอยู่ประกอบด้วยไซเล็ม (Xylem) อยู่ด้านบน และโฟลเอ็ม (Phloem) อยู่ด้านล่าง (ภาพที่ 5-จ)

2.3.2.2 วุ้นข้าวเหนียว (ตารางที่ 3, ภาพที่ 6)

1) วิธีทำให้ใส เนื้อเยื่อผิว (Eplidermis) ด้านบนมีคิวทิน (Cutin) สะสมบางเป็นลวดลายขนานตามยาว (Striate) (ภาพที่ 6-ค) ส่วนด้านล่างมีคิวทิน (Cutin) สะสมหนาลักษณะเป็นร่างแห (Reticulate) และลวดลายตามยาว (Striate) (ภาพที่ 6-ง) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดยาว 70-110 ไมครอน กว้าง 40-60 ไมครอน (ภาพที่ 6-ค) ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม (Isodiametric) ขนาดยาว 110-150 ไมครอน กว้าง 40-60 ไมครอน (ภาพที่ 6-ง) รูปร่างเซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่า และยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบ ปากใบ (Stomata) พบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ (6-celled stomata) กระจายบริเวณใกล้ขอบเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน และเรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 6-ง) เซลล์ขน พบขนจี้ที่มีต่อม (Glandular micro-hairs) 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบอกยาว 75-112.5 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน (ภาพที่ 6-ค) และบนเนื้อผิวด้านล่างยาว 87.5-115 ไมครอน พบขนขนาดใหญ่ (Macro hairs) 3-6 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว (Uniseriate hairs) กระจายทั่วไปเฉพาะบนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง [แต่ไม่พบใน Me (ab)] (ภาพที่ 6-จ) ขอบใบ (Margin) เซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม พบขนหนาม 1-3 เซลล์และขนปุ่ม (ภาพที่ 6-ข) และขนขนาดใหญ่ 3-9 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว [แต่ไม่พบใน Me (ab)] (ภาพที่ 6-ก) เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว (Hypodermis) เมื่อมองจากด้านบนของแผ่นใบมีรูปร่าง 5-7 เหลี่ยม และชั้นถัดไปเป็นชั้นมีโซฟิลล์ (Mesophyll) เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นรูปร่างกลมเรียงชิดกันของเซลล์ พบผลึกรูปปริซึม (Prismatic crystal) และผลึกรูปเข็ม (Needle-like crystal) ในแผ่นใบ ปะคับข้อคอก ระบบท่อลำเลียง (Vascular bundle) พบลักษณะท่อลำเลียงมีลวดลายเป็นแบบเกลียวเวียน (Spiral) และพบกลุ่มเนื้อเยื่อสเคลอเรนคิมา (Sclerenchyma) คลอดแนวบริเวณใกล้ขอบใบ (Submarginal)

2) วิธีพาราฟิน จากภาคตัดขวางเนื้อเยื่อผิว พบการสะสมคิวทินที่ผิวใบ ลักษณะรูปร่างเนื้อเยื่อผิวมีรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ปากใบกระจายตัวบริเวณผิวแผ่นใบด้านล่าง พบขนจี้ที่มีต่อม 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบอกทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง พบขนขนาดใหญ่ 2-4 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียวที่ผิวใบด้านล่าง เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว ปรากฏทั้ง 2 ด้าน โดยชั้นรองผิวแผ่นใบด้านบน ปรากฏ 1 ชั้นเซลล์ มีเฉพาะบริเวณเส้นกลางใบ และชั้นรองผิวแผ่นใบด้านล่างปรากฏ 1-2 ชั้นเซลล์ มีเฉพาะบริเวณเส้นกลางใบ (ภาพที่ 6-ฉ, ข) พบผลึก

ปริซึม ท่อผลึกรูปเข็มกระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณชั้นรองผิวแผ่นใบทั้งด้านบนและด้านล่าง (ภาพที่ 6-ข) ชั้นมีโซฟิลล์ จากผิวแผ่นใบด้านบนพบชั้นสปองจี (Spongy) มีลักษณะเป็นรูปกลมจัดเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ 3-4(-5) ชั้นเซลล์ แต่ไม่พบชั้นแพลิวเซด (ภาพที่ 6-ฉ) พบผลึกปริซึม ท่อผลึกรูปเข็มกระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณชั้นมีโซฟิลล์ (ภาพที่ 6-ข) ขอบใบ มีรูปร่างปลายมนและปรากฏกลุ่มเนื้อเยื่อสเคลอเรนไคมาบริเวณใกล้ขอบใบแต่ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 6-ข) ระบบเนื้อเยื่อท่อลำเลียง (Vascular bundle) โดยมีเยื่อหุ้มท่อลำเลียง (Bundle sheath) 1-2 ชั้น เซลล์ ล้อมรอบอยู่ประกอบด้วยไซเล็ม (Xylem) อยู่ด้านบนและโฟลเอ็ม (Phloem) อยู่ด้านล่าง (ภาพที่ 6-ฉ, ช)

2.3.2.2 โครงพุ่มนา (ตารางที่ 3, ภาพที่ 7)

1) วิธีทำให้ใส เนื้อเยื่อผิว (Epidermis) ทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทิน (Cutin) สะสม เห็นชัดเจนลักษณะเป็นลวดลายร่างแห (Reticulate) (ภาพที่ 7-ข, ค) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า มีขนาดยาว 170-250 ไมครอน และกว้าง 40-60 ไมครอน (ภาพที่ 7-ข) ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม (Isodiametric) มีขนาดยาว 120-170 ไมครอน และกว้าง 40-60 ไมครอน (ภาพที่ 7-ค) รูปร่างเซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่าและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบ ปากใบ (Stomata) พบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ (6-celled stomata) กระจายบริเวณใกล้ขอบเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน และเรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง (ภาพที่ 7-ค) เซลล์ขน พบชนิดที่มีต่อม (Glandular micro-hairs) 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบองยาว 77.5-135 ไมครอน บนเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน (ภาพที่ 7-ข) และบนเนื้อผิวด้านล่างยาว 80-137.5 ไมครอน (ภาพที่ 7-ค) ขอบใบ (Margin) เซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม พบขนหนาม 1-2 เซลล์และขนปุ่ม (ภาพที่ 7-ก) เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว (Hypodermis) เมื่อมองจากด้านบนของแผ่นใบมีรูปร่าง 5-7 เหลี่ยม และชั้นถัดไปเป็นชั้นมีโซฟิลล์ (Mesophyll) เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นรูปร่างกลมเรียงชิดกันของพาลิเซดเซลล์ (Palisade) พบผลึกรูปปริซึม (Prismatic crystal) และผลึกรูปเข็ม (Needle-like crystal) ระบบท่อลำเลียง (Vascular bundle) พบลักษณะท่อลำเลียงมีลวดลายเป็นแบบเกลียวเวียน (Spiral) และพบกลุ่มเนื้อเยื่อสเคลอเรนไคมา (Sclerenchyma) ตลอดแนวบริเวณใกล้ขอบใบ (Submarginal)

2) วิธีพาราฟิน จากภาคตัดขวางเนื้อเยื่อผิว พบการสะสมคิวทินที่ผิวใบ ลักษณะรูปร่างเนื้อเยื่อผิวมีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้า ปากใบกระจายตัวบริเวณผิวแผ่นใบด้านล่าง พบชนิดที่มีต่อม 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบองทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง ไม่พบขนขนาดใหญ่ทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว ปรากฏทั้ง 2 ด้าน โดยชั้นรองผิวแผ่นใบด้านบนมี 1-2 ชั้นเซลล์ ค่อนข้างบริเวณเส้นกลางใบ ถึงบริเวณใกล้ขอบใบ ส่วนชั้นรองผิวแผ่นใบด้านล่างปรากฏ 2-3 ชั้นเซลล์ ค่อนข้างบริเวณเส้นกลางใบ ถึงบริเวณใกล้ขอบใบ (ภาพที่ 7-ง, ช) พบผลึกปริซึม ท่อผลึกรูปเข็มกระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณชั้นรองผิวแผ่นใบทั้งด้านบนและด้านล่าง (ภาพที่ 7-ข) ชั้นมีโซฟิลล์ ประกอบด้วย 2 ชั้น จากผิวแผ่นใบด้านบนคือชั้นแพลิวเซด มีลักษณะเป็นรูปกรวย (Cone shape) เรียงตัวต่อเนื่อง 2-3 ชั้นเซลล์ และถัดลงมาคือชั้นสปองจี (Spongy) มีลักษณะเป็นรูปกลมจัดเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ 3-4 ชั้นเซลล์ (ภาพที่ 7-ง-จ) พบผลึกปริซึม ท่อผลึกรูปเข็มกระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณชั้นแพลิวเซดและชั้นสปองจี (ภาพที่ 7-ช) พบเซลล์คอลเลงคิมา (Collenchyma) 2-3 ชั้นเซลล์ ที่บริเวณด้านล่างของท่อลำเลียงซึ่งปรากฏเฉพาะผิวแผ่นใบด้านล่าง (ภาพที่ 7-จ) พบแทนนินในชั้นมีโซฟิลล์ (ภาพที่ 7-ง-จ) ขอบใบ มีรูปร่างปลายมนและปรากฏกลุ่มเนื้อเยื่อสเคลอเรนไคมาบริเวณใกล้ขอบใบ (ภาพที่ 7-ฉ) ระบบเนื้อเยื่อท่อ

ลำเลียง (Vascular bundle) โดยมีเยื่อหุ้มท่อลำเลียง (Bundle sheath) 1-2 ชั้นเซลล์ ล้อมรอบอยู่ประกอบด้วยไซเล็ม (Xylem) อยู่ด้านบน และโฟลเอ็ม (Phloem) อยู่ด้านล่าง (ภาพที่ 7-ง)

ตารางที่ 3 ตารางเปรียบเทียบจุดลักษณะแผ่นใบระดับข้อคอกของไค้เดือนป่า (*M. discreta*) ว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) และ ไกรท่งนา (*M. japonica*)

ลักษณะ	ไค้เดือนป่า	ว่านข้าวเหนียว	ไกรท่งนา
ระบบเนื้อเยื่อผิว			
ผิวใบด้านบน ลักษณะผิว	ระสมหนา ผิวเรียบ	ระสมบาง ผิวเรียบ	ระสมหนา ผิวเรียบ
รูปร่างเซลล์	รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า แต่จะมีรูปร่างเล็กและยาวกว่าบนแนวท่อลำเลียง	รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า แต่จะมีรูปร่างเล็กและยาวกว่า บนแนวท่อลำเลียง	รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า แต่จะมีรูปร่างเล็กและยาวกว่าบนแนวท่อลำเลียง
ปากใบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ กระจายตัวบริเวณใกล้ขอบใบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ กระจายตัวบริเวณใกล้ขอบใบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ กระจายตัวบริเวณใกล้ขอบใบ
ขนขนาดใหญ่	ขน 3-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว	ไม่พบ	ไม่พบ
ขนขนาดเล็ก	ขนจี้มีค่อม ปลายเซลล์เป็นรูปกระบอกยาว 75-122.5 ไมครอน	ขนจี้มีค่อม ปลายเซลล์เป็นรูปกระบอกยาว 75-112.5 ไมครอน	ขนจี้มีค่อม ปลายเซลล์เป็นรูปกระบอกยาว 77.5-135 ไมครอน
ผิวใบด้านล่าง ลักษณะผิว	ระสมหนา ผิวเรียบ	ระสมหนา ผิวเรียบและคาว	ระสมหนา ผิวเรียบ
รูปร่างเซลล์	รูปหลายเหลี่ยม ก่อนข้างกลม แต่จะมีรูปร่างเล็กและยาวกว่าบนแนวท่อลำเลียง	รูปหลายเหลี่ยม ก่อนข้างกลม แต่จะมีรูปร่างเล็กและยาวกว่าบนแนวท่อลำเลียง	รูปหลายเหลี่ยม ก่อนข้างกลม แต่จะมีรูปร่างเล็กและยาวกว่าบนแนวท่อลำเลียง
ปากใบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ เรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ เรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบ	เซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ เรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบ
ขนขนาดใหญ่	ขน 3-4 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว	ขน 3-6 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว [แต่ไม่พบใน Me (ab)]	ไม่พบ
ขนขนาดเล็ก	ขนจี้มีค่อม ปลายเซลล์เป็นรูปกระบอกยาว 75-137.5 ไมครอน	ขนจี้มีค่อม ปลายเซลล์เป็นรูปกระบอกยาว 87.5-115 ไมครอน	ขนจี้มีค่อม ปลายเซลล์เป็นรูปกระบอกยาว 80-137.5 ไมครอน

ตารางที่ 3 ตารางเปรียบเทียบจุดลักษณะแผ่นใบระดับข้อคอกของไก่อ่อนป่า (*M. discreta*) วานข้าวเหนียว (*M. edulis*) และ ไกรทุ่งนา (*M. japonica*) (ต่อ)

ลักษณะ	ไก่อ่อนป่า	วานข้าวเหนียว	ไกรทุ่งนา
ระบบใบยึดพื้นฐาน			
เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว			
ใบ			
ด้านบน	1-2 ชั้นเซลล์ ค่อนข้างบริเวณเส้นกลางใบ ถึงบริเวณใกล้ขอบใบ	1 ชั้นเซลล์ มีเฉพาะบริเวณเส้นกลางใบ	1-2 ชั้นเซลล์ ค่อนข้างบริเวณเส้นกลางใบ ถึงบริเวณใกล้ขอบใบ
ด้านล่าง	2-3 ชั้นเซลล์ มีเฉพาะบริเวณเส้นกลางใบ	1-2 ชั้นเซลล์ มีเฉพาะบริเวณเส้นกลางใบ	2-3 ชั้นเซลล์ ค่อนข้างบริเวณเส้นกลางใบ ถึงบริเวณใกล้ขอบใบ
ท่อน้ำ	พบที่ชั้นมีไซโตลัสทั้งสองด้าน	พบที่ชั้นมีไซโตลัสทั้งสองด้าน	พบที่ชั้นมีไซโตลัสทั้งสองด้าน
แพทเทิร์น	เรียงตัว 1-2 ชั้น	ไม่พบ	เรียงตัว 2-3 ชั้นเซลล์
สปองจี	รูปร่างวงกลม กระจัดกระจาย 3-4 ชั้น	รูปร่างวงกลม กระจัดกระจาย 3-4 (-5) ชั้นเซลล์	รูปร่างวงกลม กระจัดกระจาย 3-4 ชั้นเซลล์
คอลเลกทิมา	3-4 ชั้น ที่ผิวแผ่นใบด้านล่าง บริเวณท่อน้ำเลี้ยง	ไม่พบที่ผิวแผ่นใบด้านล่าง บริเวณท่อน้ำเลี้ยง	2-3 ชั้นเซลล์ ที่ผิวแผ่นใบด้านล่าง บริเวณท่อน้ำเลี้ยง
สเคลอเรนคิมา	พบบริเวณใกล้ขอบใบ	พบบริเวณใกล้ขอบใบ	พบบริเวณใกล้ขอบใบ
การสะสมสาร			
ผลึกปริซึมขนาดเล็ก (Styloids)	พบ	พบ	พบ
แทนนิน	พบ	ไม่พบ	พบ
ระบบท่อเลี้ยง			
เยื่อหุ้มท่อน้ำเลี้ยง (ชั้น)	1-2	1-2	1-2
ขอบใบ			
รูปร่างปลายขอบใบ ขนาดใหญ่	ปลายมน ขนหนามและขนปุย	ปลายมน ขนหนาม ขนปุยและขน 3-9 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว [แต่ไม่พบใน Me (ab)]	ปลายมน ขนหนามและขนปุย

คำอธิบายประกอบภาพ

col = Collenchyma

cu = Cutin

gh = Glandular micro-hair

hy = Hypodermis

ph = Prickle-hairs

pm = Palisade mesophyll

rc = Raphide canal

s = Stoma

sc = Sclerenchyma

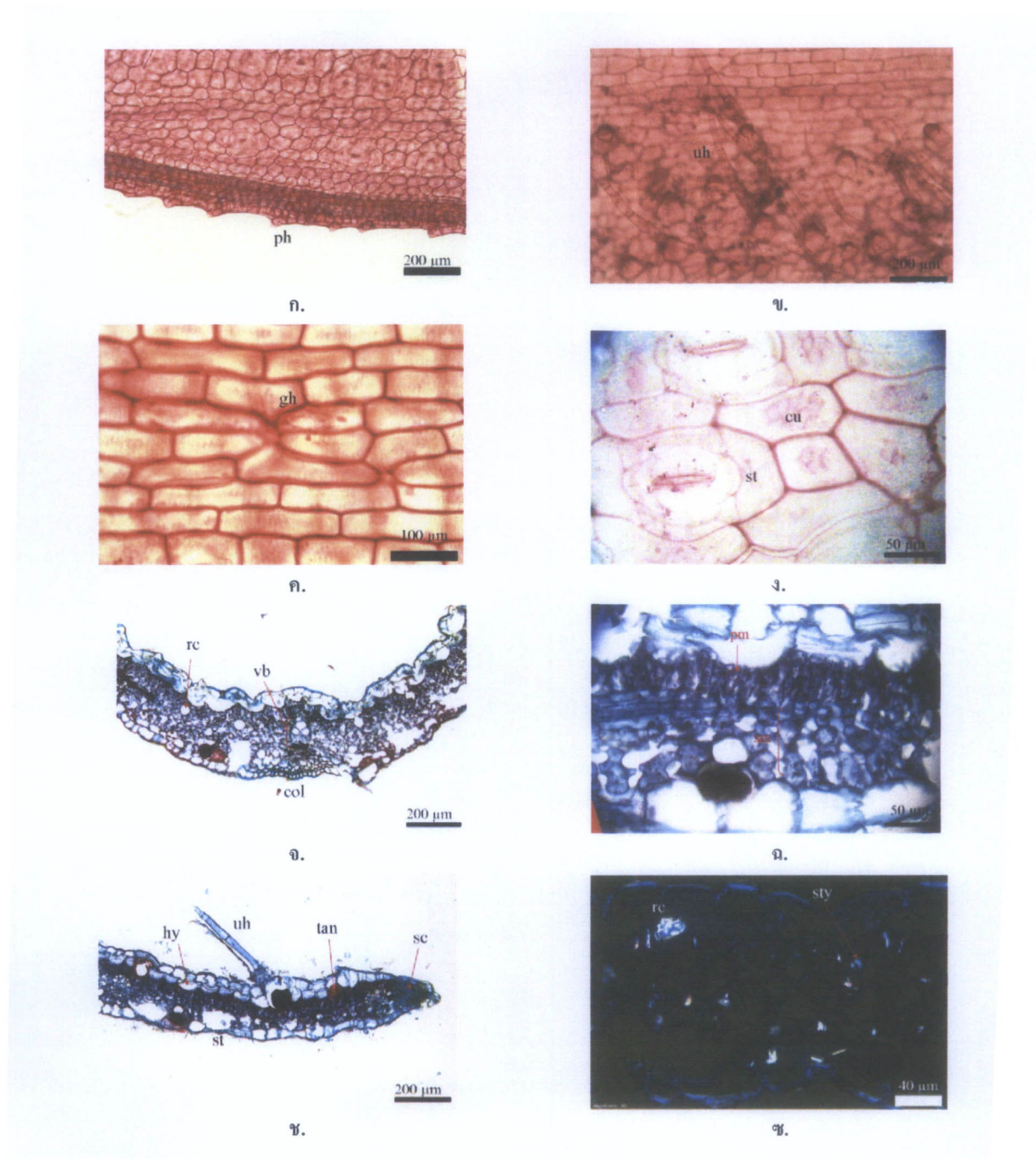
sm = Spongy mesophyll

sty = Styloids

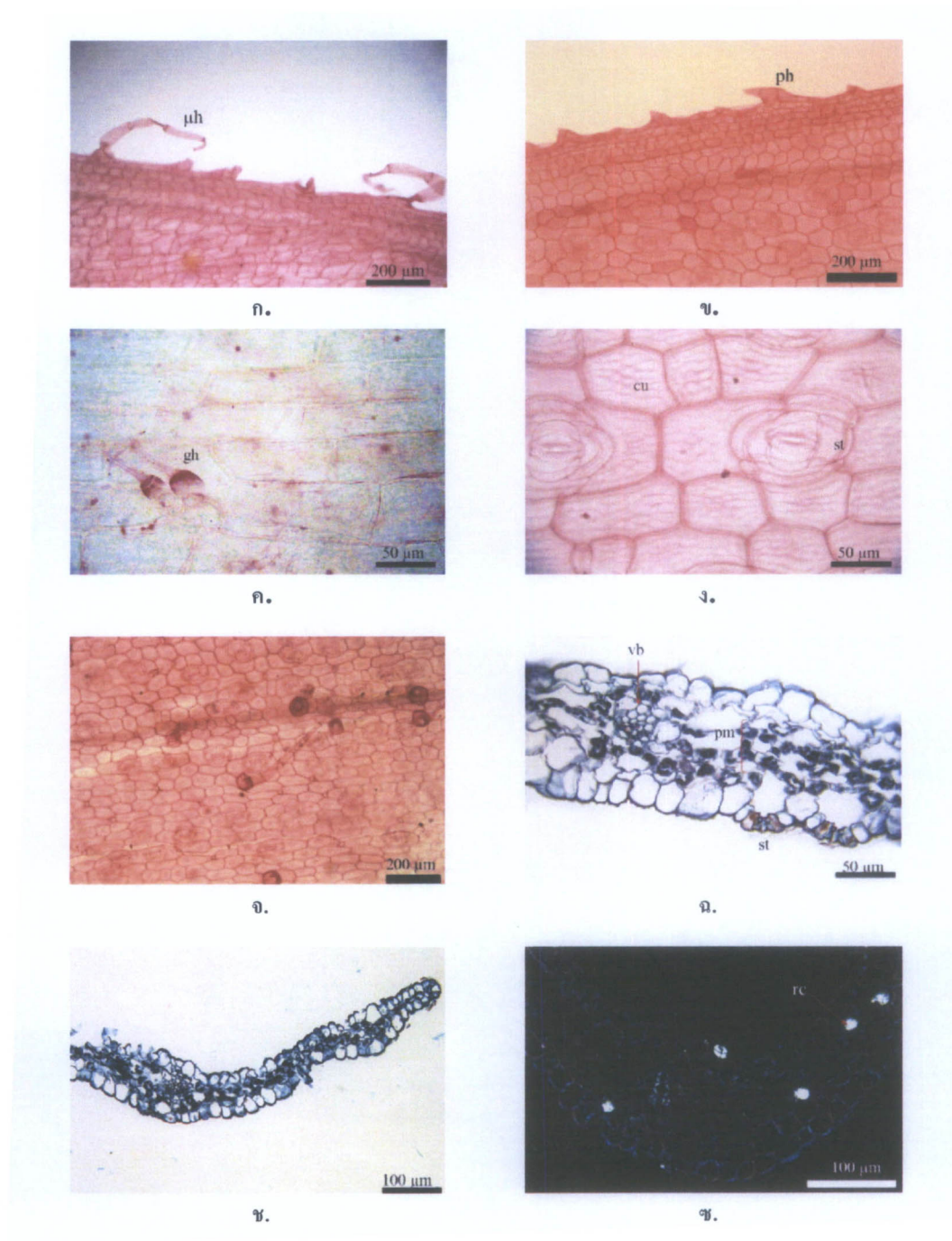
ta = Tannin

uh = Uniseriate-hair

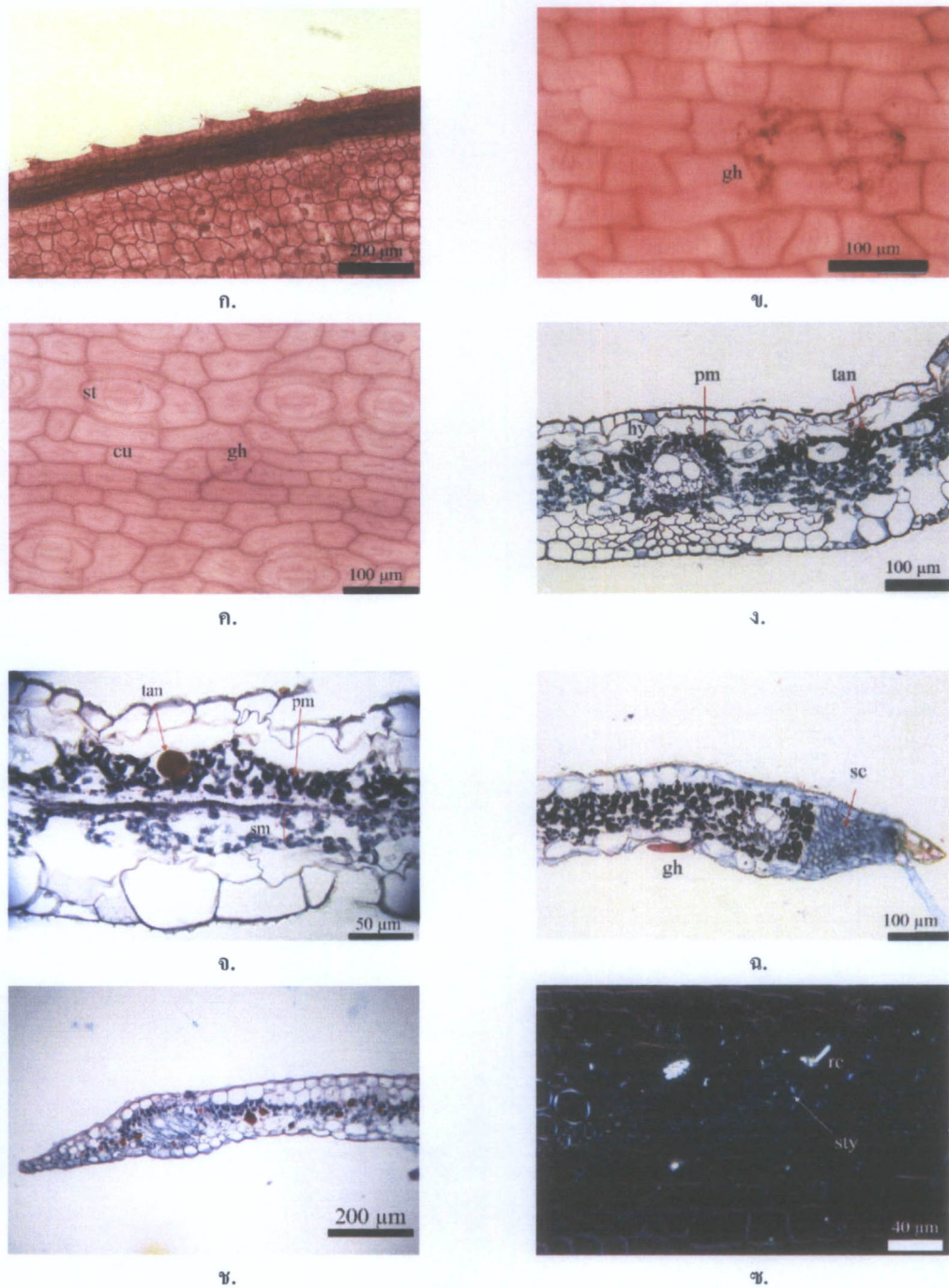
vb = Vascular bundles



ภาพที่ 5 แสดงจุดลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับข้อดอกของไก่อื่นป่า (*Murdannia discretia*) (ก) บริเวณขอบแผ่นใบประดับพบขนหนาม (ข) เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับด้านบน พบขนขนาดใหญ่เป็นแนว 2-3 แถวขนานกับขอบใบ (ค) เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับด้านบน พบลวดลายคิวทินแบบร่างแหและขนจี้มีต่อม (ง) เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับด้านล่าง พบลวดลายคิวทินแบบร่างแหและปากใบเรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบ (จ-ข) โครงสร้างภาคตัดขวางของแผ่นใบประดับ



ภาพที่ 6 แสดงจุดลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบประดับข้อคอกของว่านข้าวเหนียว (*Murdannia edulis*) (ก) บริเวณขอบแผ่นใบประดับพบขนขนาดใหญ่ (ข) บริเวณขอบแผ่นใบประดับพบขนหนาม (ค) เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับด้านบน พบลวดลายคิวตินแบบตามยาวและขนจี้มีค่อม (ง) เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับด้านล่าง พบลวดลายคิวตินแบบร่างแหและตามยาวและปากใบ (จ) เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับด้านล่าง พบลวดลายคิวตินและขนขนาดใหญ่ (ฉ-ช) โครงสร้างภาคตัดขวางของแผ่นใบประดับ



ภาพที่ 7 แสดงจุลลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบในระดับข้อคอกของโกฐจุ่งนา (*Murdannia japonica*) (ก) บริเวณขอบแผ่นใบ
 ระดับ พบนพนาม (ข) เนื้อเยื่อ ผิวแผ่นใบระดับค้ำบน พบสลายควินแบบร่างแหและขนจี้มีด้อม
 (ค) เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบระดับค้ำล่าง พบสลายควินแบบร่างแห ปากใบและขนจี้มีด้อม
 (ง-จ) โครงสร้างภาคตัดขวางของแผ่นใบระดับ

2.4 วิจารณ์ผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอกของพืชทั้ง 3 ชนิด ในสกุล *Murdannia* คือ ไก่เถื่อนป่า (*M. discreta*) ว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) และโกฐทุ่งนา (*M. japonica*) โดยใช้เทคนิคทำให้ใสและเทคนิคพาราฟิน (ภาคตัดตามขวาง) โดยเทคนิคทำให้ใสสามารถมองเห็นรูปร่างเซลล์ด้านบนและด้านล่างของเนื้อเยื่อผิว เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว และแฟลชีเซลล์ และสามารถมองเห็นเซลล์ลวดลายของท่อลำเลียง ซึ่งในพืชสกุลนี้มีลักษณะเป็นแบบเกลียวเวียน และแบบวงแหวน ลักษณะผลึกแคลเซียมออกซาเลทต่างๆ นอกจากนี้ยังพบสเคอเร็คมาบริเวณใกล้ขอบใบติดติ้มน้ำเนื้อเยื่อของแผ่นใบประดับช่อดอก ส่วนเทคนิคพาราฟิน (การศึกษาภาคตัดขวาง) พบว่า ใบประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่สำคัญ คือ เนื้อเยื่อผิว เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว และมีไซฟิลล์ (แฟลชีเซลล์และสปองจี) ตำแหน่งและจำนวนของระบบท่อลำเลียง ตำแหน่งท่อผลึกรูปเข็ม แทนนินและ Styloids และตำแหน่งของสเคอเร็คมาและคอลเลงคิมในแผ่นใบประดับช่อดอก

การศึกษาค้นคว้าพบจุลลักษณะทั่วไป ได้แก่ การสะสมของคิวทินที่เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบ ลักษณะเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนมีรูปร่างเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ส่วนเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยม ปากใบเป็นชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ (*Commelina* type) พบทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่างของแผ่นใบประดับช่อดอก พบขนจุ่มมีต่อมเซลล์ปลายเป็นรูปกระบอกปรากฏทั้งสองด้านของเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบประดับช่อดอก ความต่อเนื่องของเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว และความต่อเนื่องของสเคอเร็คมาบริเวณใกล้ขอบใบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tomlinson (1966), Faden and Inman (1996), Thitimetharoch et al. (2004), วิภา จิรจรรย์ยาภู และคณะ (2532) และ ธารินี สืบปาละ และคณะ (2550, 2551) และพบผลึกแคลเซียมออกซาเลท (Calcium oxalate crystals) รูปปริซึมหรือหลายเหลี่ยมเรียกว่า Styloids ในชั้นมีไซฟิลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Thitimetharoch et al. (2004) และ ธารินี สืบปาละ และคณะ (2550, 2551) นอกจากนี้ยังพบการสะสมแทนนินในชั้นเนื้อเยื่อมีไซฟิลล์ของโกฐทุ่งนา (*Murdannia japonica*) และไก่เถื่อนป่า (*M. discreta*) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Thitimetharoch et al. (2004) สำหรับลักษณะขนจุ่ม 3 เซลล์ มีต่อมซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถใช้จำแนกชนิดได้ตามการศึกษาของ Tomlinson (1966) จากการศึกษาพืช 3 ชนิดในสกุล *Murdannia* มีลักษณะขนจุ่ม 3 เซลล์ มีต่อมคล้ายกัน โดยมีลักษณะเด่นคือ เซลล์ที่ฐานตั้งแทรกอยู่ในชั้นเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบ เซลล์ที่อยู่กลางมีลักษณะพองรี และเซลล์ปลายเป็นรูปทรงกระบอก

การศึกษาค้นคว้า พบจุลลักษณะวินิจฉัยของพืชชนิดเดียวกันที่มีลักษณะผันแปร (Variation of characters) ได้แก่ ว่านข้าวเหนียว พบขนขนาดใหญ่ 3-6 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียวที่เนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างพบเฉพาะในกลุ่มหลังแผ่นใบมีขน [Me (h)] ส่วนกลุ่มหลังแผ่นใบไม่มีขน [Me (ab)] ไม่พบขนขนาดใหญ่ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง และพบขนขนาดใหญ่ 3-9 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียวที่ขอบใบเฉพาะในกลุ่มหลังแผ่นใบมีขน [Me (h)] (ตารางที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tomlinson (1966) ที่พบว่า การปรากฏของขนขนาดใหญ่จะผันแปรตามสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 4 จุดลักษณะวินิจฉัยของเนื้อเยื่อผิวหนังในระดับข้อคอกของไก่เถื่อนป่า (*M. discreta*) ว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) และ ไก่ทุ่งนา (*M. japonica*)

จุดลักษณะวินิจฉัย	ไก่เถื่อนป่า	ว่านข้าวเหนียว	ไก่ทุ่งนา
ลักษณะผิวหนัง - ผิวหนังด้านบน - ผิวหนังด้านล่าง	ร่างแห ร่างแห	คามขาว ร่างแหและคามขาว	ร่างแห ร่างแห
ขนขนาดใหญ่ - ผิวหนังด้านบน - ผิวหนังด้านล่าง - ขอบใบ	ขน 3-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว ขน 3-4 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว ไม่พบ	ไม่พบ ขน 3-6 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว [แต่ไม่พบใน กลุ่มหลังแผ่นใบ ไม่มีขน, Me (ab)] ขน 3-9 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว [แต่ไม่พบใน กลุ่มหลังแผ่นใบ ไม่มีขน, Me (ab)]	ไม่พบ ไม่พบ ไม่พบ
เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวหนังด้านบน	1-2 ชั้นเซลล์ ต่อเนื่องจากบริเวณเส้นกลางใบ ถึงบริเวณใกล้ขอบใบ	1 ชั้นเซลล์มีเฉพาะบริเวณเส้นกลางใบ	1-2 ชั้นเซลล์ ต่อเนื่องจากบริเวณเส้นกลางใบ ถึงบริเวณใกล้ขอบใบ
เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวหนังด้านล่าง	2-3 ชั้นเซลล์มีเฉพาะบริเวณเส้นกลางใบ	1-2 ชั้นเซลล์มีเฉพาะบริเวณเส้นกลางใบ	2-3 ชั้นเซลล์ ต่อเนื่องจากบริเวณเส้นกลางใบ ถึงบริเวณใกล้ขอบใบ
ชั้นมีโซฟิลล์ แฟลชีเซด สปองจี	เรียงตัว 1-2 ชั้นเซลล์ รูปร่างวงกลม กระจัดกระจาย 3-4 ชั้นเซลล์	ไม่พบ รูปร่างวงกลม กระจัดกระจาย 3-4 (-5) ชั้นเซลล์	เรียงตัว 2-3 ชั้นเซลล์ รูปร่างวงกลม กระจัดกระจาย 3-4 ชั้นเซลล์
คอลเลจิม่า	3-4 ชั้นเซลล์ ที่ผิวหนังด้านล่างบริเวณท้องถึง	ไม่พบ	2-3 ชั้นเซลล์ ที่ผิวหนังด้านล่างบริเวณท้องถึง
การสะสมสารแทนนิน	พบ	ไม่พบ	พบ

2.5 สรุปผลการศึกษาลักษณะวินิจฉัยส่วนของแผ่นใบประดับช่อดอก

การศึกษารั้วนี้พบจุลลักษณะวินิจฉัยของพืชทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ การปรากฏของขนขนาดใหญ่ ความต่อเนื่องของเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิว ลักษณะของเซลล์ในชั้นมิโซฟิลล์ การปรากฏของเนื้อเยื่อคอลเลงคิมา และการสะสมสารแทนนินในชั้นมิโซฟิลล์ (ตารางที่ 4) โดยสามารถจัดทำรูปวิธานของพืชทั้ง 3 ชนิด ได้ดังนี้

1ก พบขนขนาดใหญ่ที่ผิวแผ่นใบประดับเฉพาะด้านล่าง หรือทั้งด้านบนและด้านล่าง

2ก พบขนขนาดใหญ่ที่ผิวแผ่นใบประดับทั้งด้านบนและด้านล่าง เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวด้านบนต่อเนื่องจากบริเวณเส้นกลางใบ ถึงบริเวณใกล้ขอบใบ ชั้นแพลิสเซดเรียงตัว 1-2 ชั้น เซลล์ ชั้นคอลเลงคิมา 3-4 ชั้น เซลล์ ที่ผิวแผ่นใบด้านล่างบริเวณท้องลำเลียง และพบการสะสมสารแทนนินในชั้นมิโซฟิลล์*M. discreta*

2ข พบขนขนาดใหญ่เฉพาะที่ผิวแผ่นใบประดับด้านล่างและขอบใบ เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวพบเฉพาะบริเวณเส้นกลางใบ ไม่พบชั้นแพลิสเซด ไม่พบคอลเลงคิมา และไม่พบการสะสมสารแทนนิน.....*M. edulis*

1ข ไม่พบขนขนาดใหญ่ที่ผิวแผ่นใบประดับทั้งด้านบนและด้านล่าง.....*M. japonica*

ซึ่งสามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ประกอบการจัดจำแนกชนิดของพืชร่วมกับการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยา ซึ่งมีปัจจัยจำกัดโดยใช้โครงสร้างสืบพันธุ์ (Reproductive part) ได้แก่ โครงสร้างช่อดอก ดอก ผลและเมล็ด (Thitimetharoch et al., 2004) ต้องรอในบางฤดูกาล นอกจากนี้ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการใช้เปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ เช่น การศึกษาลักษณะดอกและช่อดอก (Flowerland inflorescence morphology) การศึกษาลักษณะผลและเมล็ด (Fruits and seeds morphology) และการศึกษาองค์ประกอบเคมี (Chemotaxonomic) ต่อไป

บทที่ 3

การศึกษาองค์ประกอบพฤษเคมีเบื้องต้น

นอกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและจุลลักษณะแล้ว การศึกษาทางพฤษเคมียังสามารถนำมาใช้กำหนดเอกลักษณ์ของสมุนไพรได้ด้วยโดยเฉพาะวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography; TLC) ซึ่งเป็นวิธีการจัดจำแนก (Identify) สาร ด้วยการเปรียบเทียบสารตรวจสอบกับสารมาตรฐาน โดยสังเกตจากสีของ Spot ที่ปรากฏหรือค่า R_f ของสารบนแผ่น TLC เพื่อเป็นตัวระบุเอกลักษณ์ของพืชชนิดนั้นๆ สำหรับการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาเปรียบเทียบพืช 3 ชนิดในสกุลเดียวกันที่มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกัน แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดของสารที่ตรวจสอบ จึงเป็นการศึกษาเบื้องต้น (Screening) และทำการบันทึกไว้เป็นข้อมูลเอกลักษณ์เบื้องต้นโดยละเอียดเพื่อการศึกษาต่อไป

3.1 การทบทวนวรรณกรรม

3.1.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชวงศ์ผักปราบ (Commelinaceae) มีรายละเอียดดังนี้ (แสดงดังภาพที่ 8)

จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีของพืชสกุล *Murdannia* พบสารไฟโตสเตอรอล กลูโคไซด์ (Phytosteryl glucoside) จากการแยกสารสำคัญของสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง (*M. bracteata*) (Jiratchariyakul et al., 1996) ต่อมา พบว่าสารสกัดสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง (*M. bracteata*) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยที่สารกลัยโคสฟิงโกไลปิดส์ (Glycosphinglipid) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (Direct Cytotoxicity) ต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (ATCC HTB20) และเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (SW260) เมื่อใช้ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะทำให้เซลล์มะเร็งในหลอดทดลองตายร้อยละ 50 (Jiratchariyakul et al., 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบสารในกลุ่มไฮดรอกซีบูตาโนลด์ (Hydroxybutanolide) คือ สารแบลกทานโนลด์ เอ (Bracteanolide A), สารแบลกทานโนลด์ บี (Bracteanolide B) และสารไอโซไวเทกซิน (Isovitexin) สามารถยับยั้งไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO[•]) (Wang et al., 2007)

นอกจากนี้ ยังมีการนำความรู้ทางด้านการศึกษานุกรมวิธานเชิงเคมี (Chemotaxonomy) มาใช้ในการจัดจำแนกพืชเพื่อเพิ่มความถูกต้อง สำหรับพืชวงศ์ Commelinaceae จากที่ทบทวนรายงานการวิจัยพบว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ถูกนำมาใช้เป็นสารสำคัญหลักในการจัดจำแนก (Chemical marker) (Martinez, 1985) พืชวงศ์นี้ โดย Martinez and Swain (1985) ศึกษาสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ในการจัดจำแนกพืชวงศ์ Commelinaceae จำนวน 152 ชนิด พบสารสำคัญหลัก Flavone C-glycosides ถึงร้อยละ 78 ของพืชทั้งหมด สาร Flavonol O - glycosides ร้อยละ 28 ของพืชทั้งหมด สาร Quercetin ส่วนมากจะปรากฏเฉพาะในส่วน Aglycone ส่วนสาร 6 - Hydroxyluteolin จะพบมากในสกุล *Tradescantia* สำหรับสาร Tricin ส่วนมากจะพบในส่วนสปอร์ของพืชซึ่งน้อยมากพบเพียงร้อยละ 5 ของพืชทั้งหมด นอกจากนี้ Yang et al. (2007) ทำการทบทวนรายงานการศึกษาค้นคว้าองค์ประกอบเคมีของพืชสกุล *Commelina* คือ *C. undulate*, *C. benghalensis* และ *C.*

communis ได้พบสารจำพวก สเตียรอยด์ (Steroids) เทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) อิริไดอยด์ (Iridoids) และ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) และโมเลกุลอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (Phenolic acids)

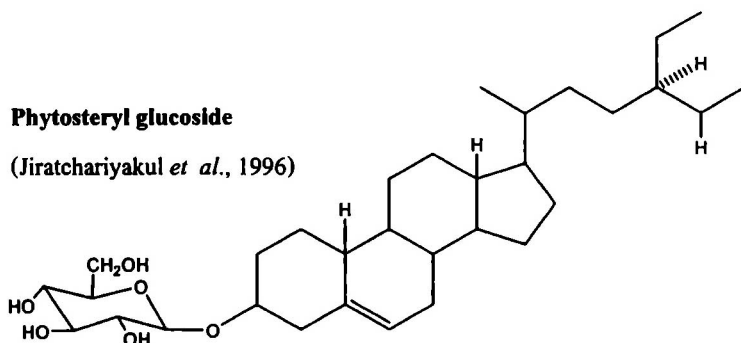
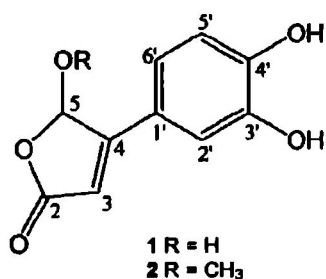
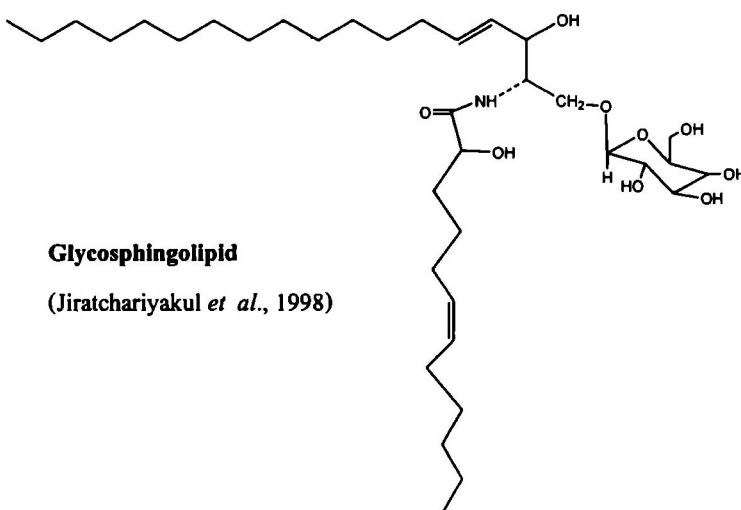
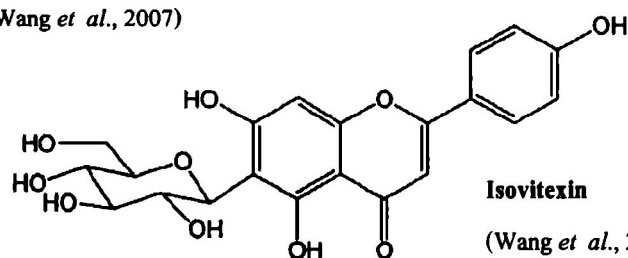
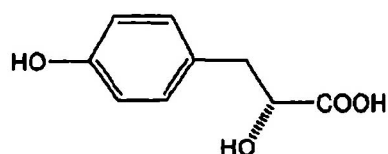
Said I.M. et al. (1998) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพืชวงศ์ Commelinaceae คือ *Forrestia gracilis* จากเปลือกต้น พบสาร Steroid และ Terpenoids

Parivuguna et al. (2008) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ *Rheo discolor* พบสารจำพวก Alkaloids, Flavonoids, Saponin, Tannins, Phenolic compound, Cardiac glycoside และ Terpenoids

ธารินี สืบปละ และคณะ (2550) รายงานผลการศึกษาว่าโครมาโทแกรม (Chromatograms) ของ สมุนไพรหูก้าง (*Murdannia bracteata*) ผักลิ้นหูก้าง (*M. loriformis*) และกินกุ่มน้อย (*M. nudiflora*) ที่แยกด้วยวิธีThin-layer chromatography (Thin-layer chromatography, TLC) ในระบบชุดตัวทำละลาย (Mobile phase) ที่ประกอบด้วยเอทิลแอซิเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซติก : น้ำ (Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water) อัตราส่วน 125 : 11 : 11 : 13.5 สามารถใช้จัดจำแนกพืชได้ โดยที่พืชทั้ง 3 ชนิด มีองค์ประกอบพื้นฐานทางเคมีเบื้องต้นคล้ายกันคือ สเตียรอยด์ (Steroid) ไครเทอร์ปีน (Triterpene) แลคโตน (Lactone) แทนนิน (Tannin) และฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

Chaichumporn et al. (2008) รายงานผลการศึกษาว่าโครมาโทแกรม (Chromatograms) ของ *Murdannia japonica*, *M. spectabilis* และ *M. vaginata* ที่แยกด้วยวิธีThin-layer chromatography (Thin-layer chromatography, TLC) ในระบบชุดตัวทำละลาย (Mobile phase) ที่ประกอบด้วย เอทิลแอซิเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซติก : น้ำ (Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water) อัตราส่วน 40 : 3.4 : 3.4 : 4.2, เอทิลแอซิเตต : กรดฟอร์มิก : น้ำ : เมทานอล (Ethyl acetate : Formic acid : Water : Methanol) อัตราส่วน 30 : 6 : 6 : 3, เฮกเซน : เอทิลแอซิเตต : เมทานอล : กรดอะซิติก : น้ำ (Hexane : Ethyl acetate : Methanol : Acetic acid : Water) อัตราส่วน 35 : 15 : 2.5 : 0.25 สามารถใช้จัดจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดได้

Kaewsart et al. (2008) รายงานผลการศึกษาว่าโครมาโทแกรม (Chromatograms) ของ *Cyanotis arachnoidea*, *C. axillaris*, *C. thwaitesii* และ *C. vaga* ที่แยกด้วยวิธีThin-layer chromatography (Thin-layer chromatography, TLC) ในระบบชุดตัวทำละลาย (Mobile phase) ที่ประกอบด้วย เอทิลแอซิเตต : กรดฟอร์มิก : น้ำ (Ethyl acetate : Formic acid : Water) อัตราส่วน 32.5 : 7.5 : 10 สามารถใช้จัดจำแนกพืชทั้ง 4 ชนิดได้

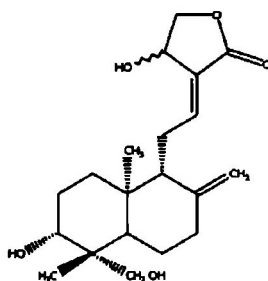
Phytosteryl glucoside(Jiratchariyakul *et al.*, 1996)**Glycosphingolipid**(Jiratchariyakul *et al.*, 1998)**Bracteanolide A (1)****Bracteanolide B (2)**(Wang *et al.*, 2007)**(+)-(R)-p-hydroxyphenyllactic acid**(Wang *et al.*, 2007)**Isovitexin**(Wang *et al.*, 2007)

ภาพที่ 8 โครงสร้างองค์ประกอบเคมีในหญ้าปากกิ้ง (*Murdannia bracteata*)

(Jiratchariyakul *et al.*, 1996, 1998; Wang *et al.*, 2007)

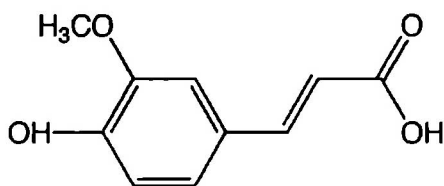
3.1.2 สารมาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

3.1.2.1 แอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide) เป็นสารในกลุ่ม Diterpenoid lactone ซึ่งมีรายงานผลการศึกษาว่าพืชวงศ์ผักปราบ (Commelinaceae) มีสารในกลุ่ม Terpenoid (Yang et al., 2007; Said I.M. et al., 1998; Parivuguna et al., 2008) จึงได้นำมาเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบในการศึกษาครั้งนี้ แสดงดังภาพที่



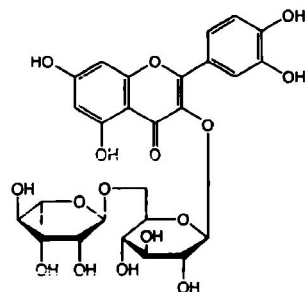
ภาพที่ 9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของแอนโดรกราโฟไลด์ (Andrographolide)

3.1.2.2 กรดเฟรูลิก (Ferulic acid) เป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenol) ในสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) ที่มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxy group) รวมอยู่ในโมเลกุลมีลักษณะเป็นผลึกสีขาวละลายน้ำได้ โครงสร้างในธรรมชาติส่วนใหญ่อยู่ในรูปกรดเฟรูลิกชนิดทรานส์ (trans-ferulic acid) ซึ่งมีรายงานผลการศึกษาว่าพืชวงศ์ผักปราบ (Commelinaceae) มีกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) (Parivuguna et al., 2008) จึงได้นำมาเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบในการศึกษาครั้งนี้ แสดงดังภาพที่ 10



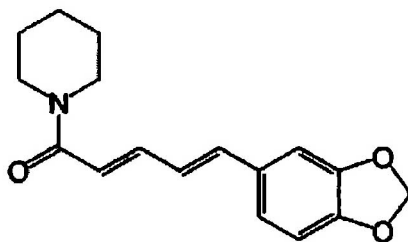
ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดเฟรูลิก (Ferulic acid)

3.1.2.3 รุทีน (Rutin) เป็นสารในกลุ่ม Flavonol glycosides ระหว่าง Flavonol quercetin และ Disaccharide rutinose ซึ่งมีรายงานผลการศึกษาว่าพืชวงศ์ผักปราบ (Commelinaceae) พบสารในกลุ่มนี้ (Martinez and Swain, 1985) นอกจากนี้ยังพบว่าสารมาตรฐานชนิดนี้ยังมีสูตรโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกับ Isoviteixin ที่มีรายงานผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในสารสกัดหยาบบักกิ้ง (Wang et al., 2007) จึงได้นำมาเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบในการศึกษาครั้งนี้ แสดงดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของรูติน (Rutin)

3.1.2.4 ไพเพอรีน (Piperine) เป็นสารในกลุ่มแอลคาลอยด์ ซึ่งมีรายงานผลการศึกษาว่าพืชวงศ์ผักปราช (Commelinaceae) พบสารในกลุ่มนี้ (Parivuguna et al., 2008) จึงได้นำมาเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบกับในการศึกษานี้ แสดงดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไพเพอรีน (Piperine)

3.2 วิธีดำเนินการศึกษา

สำหรับการศึกษานี้ทำการศึกษเปรียบเทียบขององค์ประกอบเคมีเบื้องต้นจากส่วนเหนือดินและใต้ดินของพืช 3 ชนิด ด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography; TLC) วิธีการทดลองคัดแปลงมาจาก ชารินี สืบปาละ และคณะ (2551), Stahl, E. (1969), Fricd and Sherma (1980), Chaichumporn et al. (2008) และ Kaewsaart et al. (2008)

3.2.1 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษาเปรียบเทียบขององค์ประกอบเคมีเบื้องต้น ด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี คือ ไก่เถื่อนป่า (*Murdannia discreta*) วานข้าวเหนียว (*M. edulis*) และ โกงทูงนา (*M. japonica*) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและอ้างอิง

Samples	Code	Hairy on lower surface of leaves	Locality (Thailand)	Habitat	Collection Date	Voucher's no.
<i>M. edulis</i>	Me (h)	present	Ubonrat Dam, Khon Kaen Province	Dried places in DF	01/04/2009	OC, SK.& TT 32
<i>M. edulis</i>	Me (ab)	absent	Ubonrat Dam, Khon Kaen Province	Dried places in DF	01/04/2009	OC, SK & TT33
<i>M. japonica</i>	Mj	absent	Tup Phaya Suea waterfall, Khon Kaen Province	Gallery forest in DF	25/06/2009	OC, SK & TT37
<i>M. discreta</i>	Md	absent	Phu Rua forest, Loei Province	Gallery forest in Mountain forest	28/07/2009	OC, SK & TT 55

OC = Orasa Chaichumporn, SK = Sureerut Khaewsart, TT= Thaweesak Thitimetharoch

3.2.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

Hot air oven, เครื่องปั่น, Lyophilizer (Flexi-Dry, USA), TLC Scanner (Version 2.13 CAMAG, Switzerland), แผ่น TLC ทำรีจรูป Aluminum sheet 60 F₂₅₄ (Merck, Germany), TLC tank (CAMAG, Switzerland), เครื่องแก้วสำหรับทดลอง กระดาษกรองและโครีเป่าผม

3.2.1.3 สารเคมี

Chloroform, Ethyl acetate, Methanol, Ethanol, Formic acid, Acetic acid, Hexane, Ethanolic 10% H₂SO₄, Ethanolic 1% AlCl₃ (w/v) reagent, Dragendroff (w/v)'s reagent, Anisaldehyde Spraying reagent, Ferulic acid, Rutin, Andrographolide และ Piperine

3.2.2 วิธีหาปริมาณรวมของสารสกัด (% Yield)

ทำการเตรียมสารสกัดโดยนำส่วนเหนือดินและใต้ดินของพืชทั้ง 3 ชนิดมาล้างแล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน และทำการบด แล้วนำผงตัวอย่างที่บดมาชั่งอย่างละ 5 กรัม โดยทำการสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ อย่างละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองเอาตะกอนออก นำส่วนที่เป็นของเหลวที่สกัดด้วยน้ำมาระเหยเอาน้ำออกด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Lyophilizer) ส่วนของเหลวที่สกัดด้วยเมทานอลนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการชั่งสารสกัดแล้วหาปริมาณสุทธิต่อของสารสกัดคิดเป็น

ร้อยละของพืชแต่ละชนิด ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้รายงานผล (Jirawongse, 2000) และนำสารสกัดที่ได้ไปเก็บที่ตู้ดูดความชื้น เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต่อไป

3.2.3 วิธีthin layer chromatography (TLC)

นำตัวอย่างบดเป็นผง 1 กรัม ของพืชแต่ละชนิดมาสกัดด้วยเมทานอล 10 มิลลิลิตร 15 นาที จากนั้นนำสารสกัดแต่ละชนิดและสารมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร มาหยกบนแผ่น TLC Silica Gel F₂₅₄ ขนาด 10 cm x 10 cm ด้วยเครื่อง Automatic TLC sampler ที่ความเร็ว 5 วินาที/ไมโครลิตร ความยาวสารที่หยด 0.7 มิลลิเมตร จากนั้นนำแผ่น TLC ที่หยดแล้วมาใส่ใน Tank ที่มีระบบทำละลาย (Mobile phase) 3 ชุด ได้แก่

ระบบทำละลายชุดที่ 1 ประกอบด้วย เฮกเซน : เอทิลแอซีเตต : เมทานอล : กรดแอซีติก (Hexane : Ethyl acetate : Acetic acid) อัตราส่วน 70 : 30 : 5 : 0.5 ตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล โดยใช้ กรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid, Fa) และ Andrographolide (Al) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ นำไปเป่าลมร้อน 10 นาที แล้วบันทึกภาพและคำนวณหาค่า R_f จากนั้นสังเกตภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light, UV) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร ตรวจสอบด้วย Dragendroff 's reagent โดยใช้ Piperine (Pr) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ นำไปเป่าลมร้อน 10 นาที แล้วบันทึกภาพและคำนวณหาค่า R_f

ระบบทำละลายชุดที่ 2 ประกอบด้วย เอทิลแอซีเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซีติก : น้ำ (Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water) อัตราส่วน 125 : 11 : 11 : 13.5 ตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล โดยใช้กรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid, Fa) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ นำไปเป่าลมร้อน 10 นาที แล้วบันทึกภาพและคำนวณหาค่า R_f ตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride) ในเอทานอล โดยใช้รูทีน (Rutin, Ri) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ นำไปเป่าลมร้อน 10 นาที แล้วบันทึกภาพและคำนวณหาค่า R_f จากนั้นสังเกตภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light, UV) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร แล้วบันทึกภาพและคำนวณหาค่า R_f และตรวจสอบด้วย 0.5 mM DPPH ในเมทานอล

ระบบทำละลายชุดที่ 3 ซึ่งประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม : เอทิลแอซีเตต : เมทานอล : กรดฟอร์มิก : น้ำ (Chloroform : Ethyl acetate : Methanol : Formic acid : Water) อัตราส่วน 45 : 12.5 : 7.5 : 1.25 : 1.25 โดยใช้ กรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid, Fa) และ Andrographolide (Al) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล นำไปเป่าลมร้อน 10 นาที แล้วบันทึกภาพและคำนวณหาค่า R_f จากนั้นสังเกตภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light, UV) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร แล้วบันทึกภาพและคำนวณหาค่า R_f ตรวจสอบด้วย Anisaldehyde-sulphuric acid บันทึกภาพและคำนวณหาค่า R_f

3.3 ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.3.1 วิธีหาปริมาณรวมของสารสกัด (% Yield)

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดิน พบว่า Md มีปริมาณรวมของสารสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ Me (h), Me (ab) และ Mj ตามลำดับ ส่วนสารสกัดด้วยน้ำ พบว่า Me (h) มีปริมาณรวมของสารสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ Me (ab), Mj และ Md และเปรียบเทียบสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดิน

พบว่า Mj มีปริมาณรวมของสารสกัดมากที่สุดรองลงมาคือ Md, Me (h) และ Me (ab) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำ พบว่า Me (ab) มีปริมาณรวมของสารสกัดมากที่สุด รองลงมาคือ Md, Me (h) และ Mj (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ปริมาณร้อยละของสารที่สกัดด้วยเมทานอลและสกัดด้วยน้ำของตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา	ปริมาณสารสกัดด้วยเมทานอล (ร้อยละ)		ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (ร้อยละ)	
	ส่วนเหนือดิน	ส่วนใต้ดิน	ส่วนเหนือดิน	ส่วนใต้ดิน
Me (h)	9.48±0.002	2.78±0.005	8.34±0.006	6.86±0.02
Me (ab)	8.29±0.0002	2.66±0.04	7.05±0.01	7.95±0.006
Mj	3.64±0.004	8.32±0.002	6.89±0.003	5.81±0.001
Md	10.22±0.005	3.06±0.001	6.87±0.01	7.20±0.041

Mean ± SD (n=3)

3.3.2 วิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin-layer chromatography; TLC)

3.3.2.1 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดิน

1) โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดิน ในระบบทำละลาย ชุดที่ 1 (ภาพที่ 13, ตารางที่ 7)

เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร พืชทุกชนิดจะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีคล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่างคือ แถบสะท้อนแสงสีฟ้าขาว ที่ค่า R_f ประมาณ 0.61 และ 0.82 ในสารสกัด Mj และแถบสะท้อนแสงสีแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.45 ในสารสกัดว่านข้าวเหนียว Me (h)

เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล ปรากฏแถบสีชมพู ของสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิก (Fa) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.46 และสีน้ำตาลม่วงของสารมาตรฐาน Andrographolide (Al) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.38 พืชทุกชนิดจะปรากฏแถบสีคล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่างคือ จะปรากฏแถบสีเขียว ที่ค่า R_f ประมาณ 0.70 ในสารสกัด Me (h), Me (ab) และ Mj แถบสีม่วงน้ำตาล ที่ค่า R_f ประมาณ 0.3 ในสารสกัดพืชทุกชนิด ยกเว้น Me (ab) แถบสีน้ำตาลเหลือง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.15 ในสารสกัด Mj และ Md

เมื่อตรวจสอบด้วย Dragendroff's reagent ปรากฏแถบสีส้ม ของสารมาตรฐาน Piperine (Pr) แต่พบว่า ไม่ปรากฏแถบสีในสารกลุ่มแอลคาลอยด์ในพืชกลุ่มนี้

2) โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดิน ในระบบทำละลาย ชุดที่ 2 (ภาพที่ 14, ตารางที่ 8)

เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 254 นาโนเมตร พืชทั้ง 3 ชนิด จะปรากฏการดูดกลืนแสงที่ค่า R_f ประมาณ 0.97 คล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่างคือ จะปรากฏการดูดกลืนแสงที่ค่า R_f ประมาณ 0.57 ในสารสกัด Me (h), Me (ab), Mj และ Md และปรากฏการดูดกลืนแสงที่ค่า R_f ประมาณ 0.14 และ 0.25 ในสารสกัด Me (h) และ Me (ab)

เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล ปรากฏแถบสีชมพูของสารมาตรฐาน กรดเฟอร์ูลิก (Fa) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.97 และแถบสีเหลืองของสารมาตรฐานรูทีน (Rt) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.35 พืชทุกชนิดจะปรากฏแถบสีคล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่างคือ ไม่ปรากฏแถบสีม่วง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.75 ในสารสกัด Me (ab) ปรากฏแถบสีม่วงจางที่ค่า R_f ประมาณ 0.57 ในพืชทุกชนิด และแถบสีน้ำตาลที่ค่า R_f ประมาณ 0.14 ในสารสกัด Me (h), Me (ab) และ Md

เมื่อตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล แล้วสังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น ประมาณ 366 นาโนเมตร ปรากฏแถบสะท้อนแสงสีน้ำเงินของสารมาตรฐานกรดเฟอร์ูลิก (Fa) และแถบสะท้อนแสงสีเหลืองของสารมาตรฐานรูทีน (Rt) สารสกัดของพืชทั้ง 4 ชนิด จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดงที่ค่า R_f ประมาณ 0.97 แต่ที่แตกต่าง คือ ปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลือง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.32 ในสารสกัด Me (h) และ Me (ab) แต่เพิ่มแถบสะท้อนแสงสีชมพูแดง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.80 ในสารสกัด Me (h) แถบสะท้อนแสงสีน้ำเงิน ที่ค่า R_f ประมาณ 0.21 ในสารสกัด Mj และแถบสะท้อนแสงสีน้ำตาล ที่ค่า R_f ประมาณ 0.29 ในสารสกัด Md

เมื่อตรวจสอบด้วย DPPH จะปรากฏแถบสีเหลืองเขียวและเหลืองที่ค่า R_f ต่าง ๆ ในสารมาตรฐานและพืชทุกชนิด โดยเฉพาะในสารสกัด Me (h) และ Me (ab)

3) โคโรมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดิน ในระบบทำละลาย ชุดที่ 3 (ภาพที่ 15, ตารางที่ 9)

เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร พืชทั้ง 3 ชนิด จะปรากฏแถบสะท้อนสีแดง ที่ค่า R_f ต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่างคือ ปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.97 ในสารสกัด Me (ab) และปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดงเพิ่ม ที่ค่า R_f ประมาณ 0.86 แถบสะท้อนแสงสีแดง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.45 ในสารสกัด Mj และ Md แต่พบแถบสะท้อนแสงสีชมพูเพิ่ม ในสารสกัด Mj

เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล ปรากฏแถบสีชมพูของสารมาตรฐานกรดเฟอร์ูลิก (Fa) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.17 และแถบสีน้ำตาลม่วงของสารมาตรฐาน Andrographolide (Al) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.07 พืชทุกชนิดจะปรากฏแถบสีน้ำตาล สีเขียว สีม่วง สีม่วงน้ำเงิน ที่ค่า R_f ต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน ในพืชทั้ง 3 ชนิด แต่ที่แตกต่างคือ ปรากฏแถบสีเขียว ประมาณ 0.86 ในสารสกัด Me (ab) และ ปรากฏแถบสีน้ำตาล ที่ค่า R_f ประมาณ 0.66 ในสารสกัด Me (ab) และ Md

เมื่อสังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร ภายหลังจากสเปรย์ด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล พืชทั้ง 3 ชนิด จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีที่ค่า R_f ต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่างคือ ปรากฏแถบสะท้อนแสงสีส้ม ที่ค่า R_f ประมาณ 0.86 ในสารสกัด Me (h) แถบสะท้อนแสงสีน้ำเงิน ที่ค่า R_f ประมาณ 0.93 ในสารสกัด Me (ab) แถบสะท้อนแสงสีชมพูจาง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.17 ในสารสกัด Mj และแถบสีขาวที่ค่า R_f ประมาณ 0.66 ในพืชทุกชนิด

เมื่อตรวจสอบด้วย Anisaldehyde-sulphuric acid ปรากฏแถบสีม่วงน้ำเงิน ของสารมาตรฐานกรดเฟอร์ูลิก (Fa) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.17 และแถบสีม่วงของสารมาตรฐาน Andrographolide (Al) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.07 พืชทั้ง 4 ชนิด จะปรากฏแถบสีม่วง สีม่วงน้ำเงินที่ค่า R_f ต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่าง คือ

ปรากฏแถบสีม่วง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.86 ในสารสกัด Me (h) แถบสีม่วงน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.31 ในสารสกัด Me (ab) และ Mj แต่พบแถบสีม่วงน้ำเงินเพิ่มในสารสกัด Mj ที่ค่า R_f ประมาณ 0.38

3.3.2.2 โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดิน

1) โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอล ในระบบทำละลายชุดที่ 1 (ภาพที่ 16, ตารางที่ 10)

เมื่อสังเกตรูปภาพได้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 254 นาโนเมตร จะปรากฏการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิก (Fa) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.46 ส่วนพืชทุกชนิด จะปรากฏการดูดกลืนแสงที่ค่า R_f ต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน

เมื่อสังเกตรูปภาพได้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร พืชทุกชนิดจะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน

เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล จะปรากฏแถบสีชมพูของสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิก (Fa) พืชทุกชนิดจะปรากฏแถบสีน้ำตาลแดงและน้ำเงินม่วง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.96, 0.88, 0.38 และ 0.19 คล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่างคือ ปรากฏแถบสีชมพูม่วง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.23 ในสารสกัด Me (h) และ Me (ab) แถบสีน้ำตาลจาง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.16 ในสารสกัด Md

เมื่อสังเกตรูปภาพได้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร ภายหลังจากสเปรย์ด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีฟ้า ของสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิก (Fa) พืชทุกชนิดจะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีที่ค่า R_f ต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่าง คือ จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีขาว ที่ค่า R_f ประมาณ 0.36 แถบสะท้อนแสงสีแดง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.23 ในสารสกัด Me (h) และ Me (ab) แถบสะท้อนแสงสีเขียวจาง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.04 ในสารสกัด Mj

เมื่อตรวจสอบด้วย Dragendorff's reagent จะปรากฏแถบสีส้ม ของสารมาตรฐาน Piperine ที่ค่า R_f ประมาณ 0.92 แต่พบว่า ไม่ปรากฏแถบสีใดๆ ของสารกลุ่มแอลคาลอยด์ในพืชกลุ่มนี้

2) โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอล ในระบบทำละลายชุดที่ 2 (ภาพที่ 17, ตารางที่ 11)

เมื่อสังเกตรูปภาพได้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 254 นาโนเมตร จะปรากฏการดูดกลืนแสงที่ค่า R_f ประมาณ 0.96 ของพืชทุกชนิด

เมื่อสังเกตรูปภาพได้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร ภายหลังจากสเปรย์ด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีฟ้า ของสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิก (Fa) ส่วนพืชทุกชนิดจะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีที่ค่า R_f ต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่าง คือ ปรากฏแถบสะท้อนแสงสีฟ้า ที่ R_f ประมาณ 0.27 ในสารสกัด Me (h) และ Me (ab) แต่เพิ่มแถบสะท้อนสีฟ้า ที่ R_f ประมาณ 0.38 ในสารสกัด Me (ab)

เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล ปรากฏแถบสีชมพูของสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิก (Fa) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.92 พืชทุกชนิดจะปรากฏแถบสีคล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่างคือ แถบสีเทา ที่ค่า R_f ประมาณ 0.38 และ 0.5 ในสารสกัด Md แถบสีม่วงชมพู ที่ค่า R_f ประมาณ 0.5 ในสารสกัด Me (h) และ Me (ab) แถบสีเทาที่ค่า R_f ประมาณ 0.5 ในสารสกัด Mj

เมื่อสังเกตรอยได้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร ภายหลังจากสเปรย์ด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีฟ้าขาว ของสารมาตรฐานกรดเฟอร์ูลิก (Fa) สารสกัดของพืชทุกชนิดดังกล่าว จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีส้มจาง สีขาว และสีน้ำตาลส้ม ที่ค่า R_f ต่างๆ คล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่างคือ จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเขียว ที่ค่า R_f ประมาณ 0.38 และ 0.5 ในสารสกัด Mj แถบสะท้อนแสงสีส้มจาง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.5 และ 0.35 ในสารสกัด Md แถบสะท้อนแสงสีน้ำเงิน ที่ค่า R_f ประมาณ 0.38 ในสารสกัด Me (h) และ Me (ab)

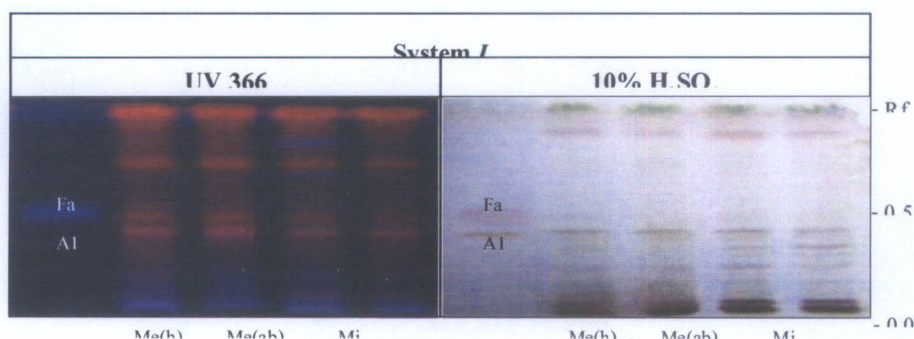
เมื่อตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล แล้วสังเกตรอยได้แสง UV ที่ความยาวคลื่น ประมาณ 366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสีเหลืองของสารมาตรฐานรูทีน (Rt) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.35 พืชทุกชนิด จะปรากฏแถบสีฟ้าขาวที่ค่า R_f ประมาณ 0.96 และ 0.88 คล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่าง คือ จะปรากฏแถบสีฟ้าขาวที่ค่า R_f ประมาณ 0.27 ในพืชทุกชนิด แถบสีฟ้าขาวที่ค่า R_f ประมาณ 0.81 ในพืชทุกชนิด ยกเว้น Me (h1) แถบสีฟ้าขาวที่ค่า R_f ประมาณ 0.50 เฉพาะในสารสกัด Mj แถบสีเหลือง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.12 และ 0.62 ในสารสกัด Md

เมื่อตรวจสอบด้วย DPPH จะปรากฏแถบสีเหลือง ในสารมาตรฐานและพืชทุกชนิด ที่ค่า R_f ต่าง ๆ โดยเฉพาะในสารสกัด Me (h) และ Me (ab)

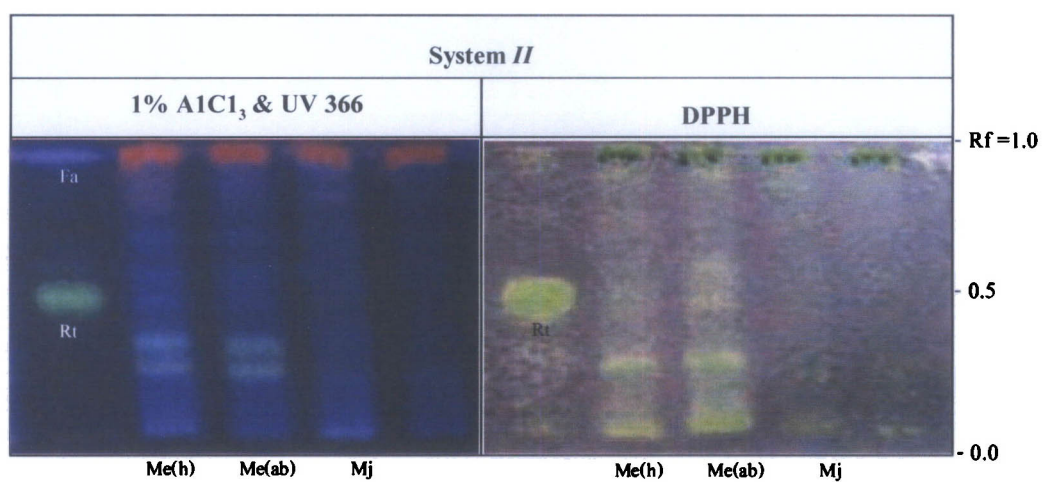
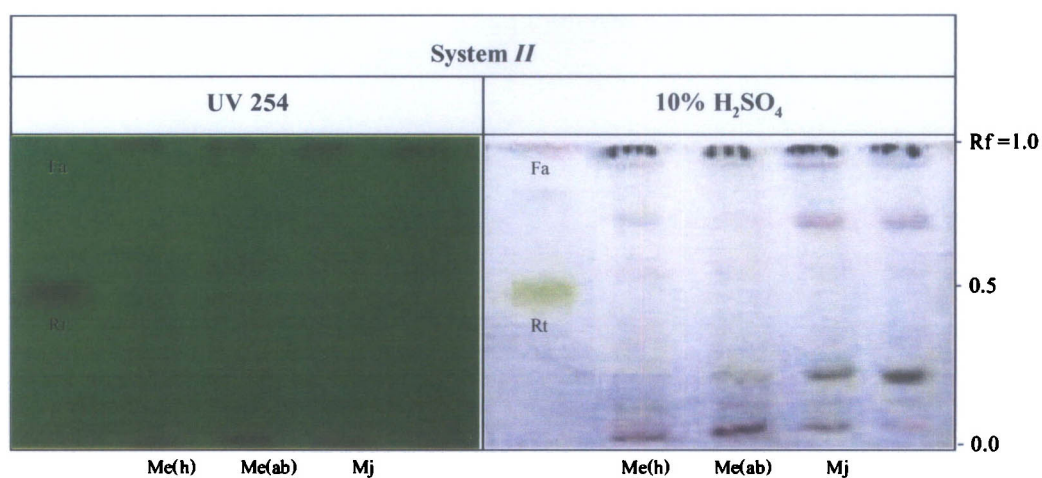
3) โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอล ในระบบทำละลายชุดที่ 3 (ภาพที่ 18, ตารางที่ 12)

เมื่อสังเกตรอยได้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร พืชทุกชนิด จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.95 คล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่างคือ แถบสะท้อนแสงสีน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.18 ในสารสกัด Me (h) และ Me (ab)

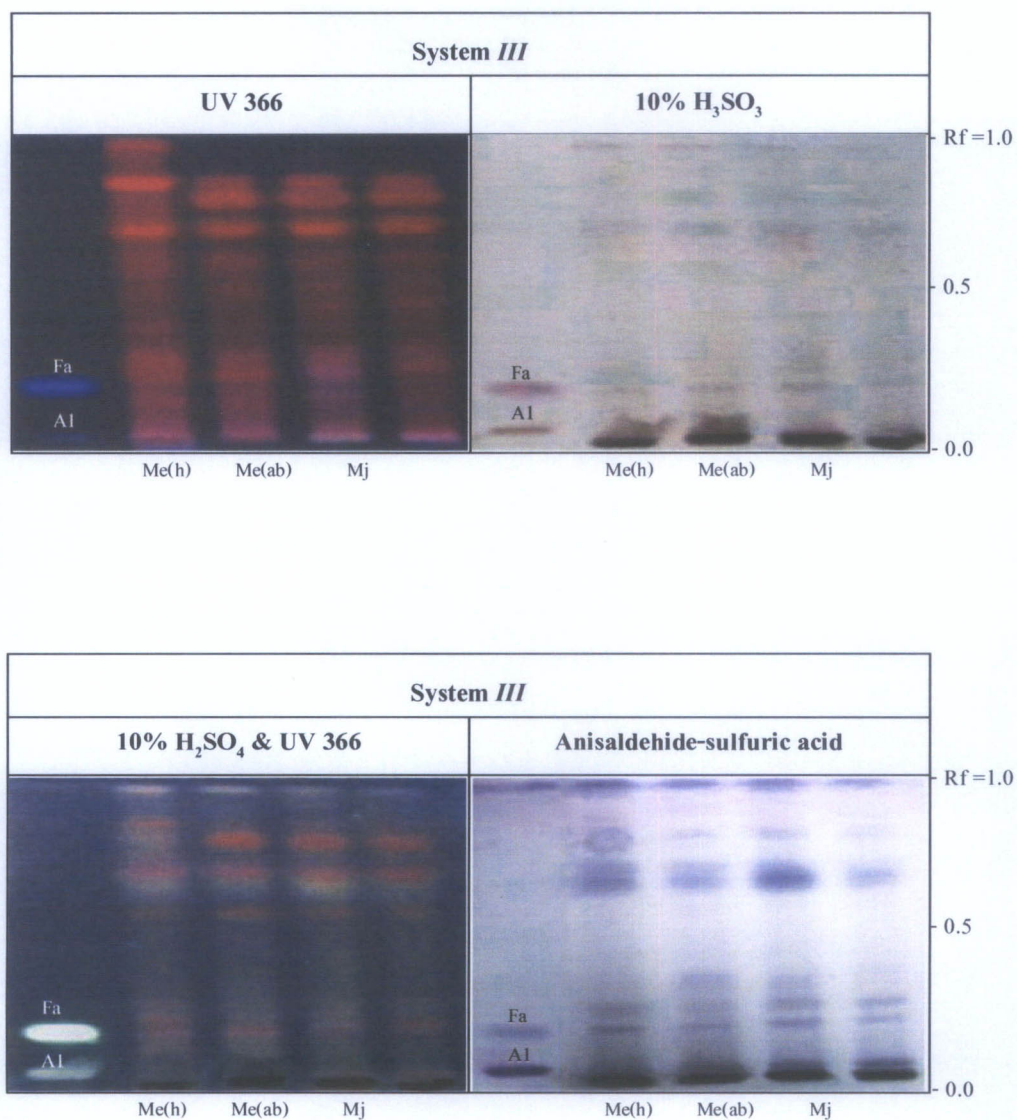
เมื่อตรวจสอบด้วย Anisaldehyde-sulphuric acid ปรากฏแถบสีม่วงอมชมพูของสารมาตรฐานกรดเฟอร์ูลิก (Fa) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.18 และแถบสีม่วงของสารมาตรฐาน Andrographolide (Al) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.08 พืชทุกชนิดจะปรากฏแถบสีน้ำตาลและสีม่วงน้ำเงิน ที่คล้ายคลึงกัน แต่ที่แตกต่างคือ จะปรากฏสีม่วงน้ำเงิน ที่ค่า R_f ประมาณ 0.82 เฉพาะในสารสกัด Mj แถบสีม่วงแดง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.68 ในสารสกัด Me (h), Me (ab) และ Mj แถบสีน้ำตาลที่ค่า R_f ประมาณ 0.41 เฉพาะในสารสกัด Mb2 และปรากฏแถบสีม่วงน้ำเงิน ในพืชเกือบทุกชนิด ที่ค่า R_f ประมาณ 0.18 ยกเว้น Md



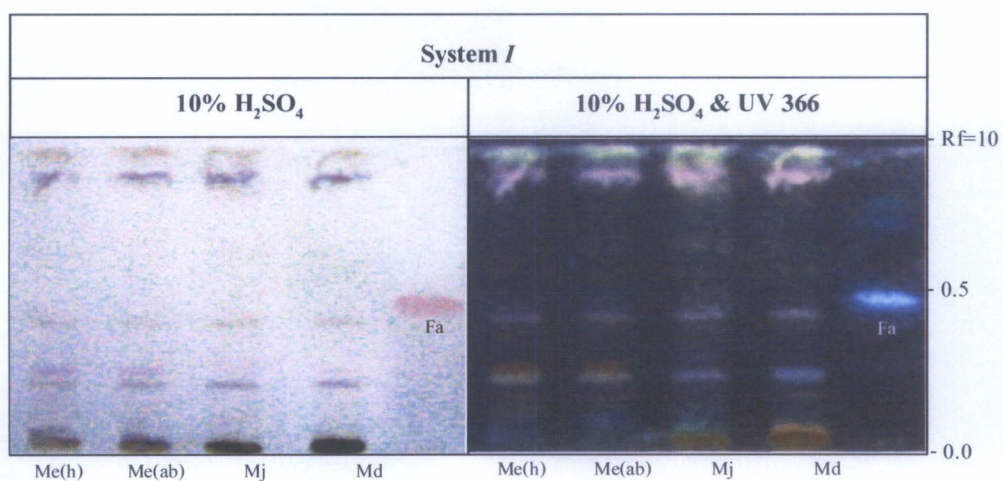
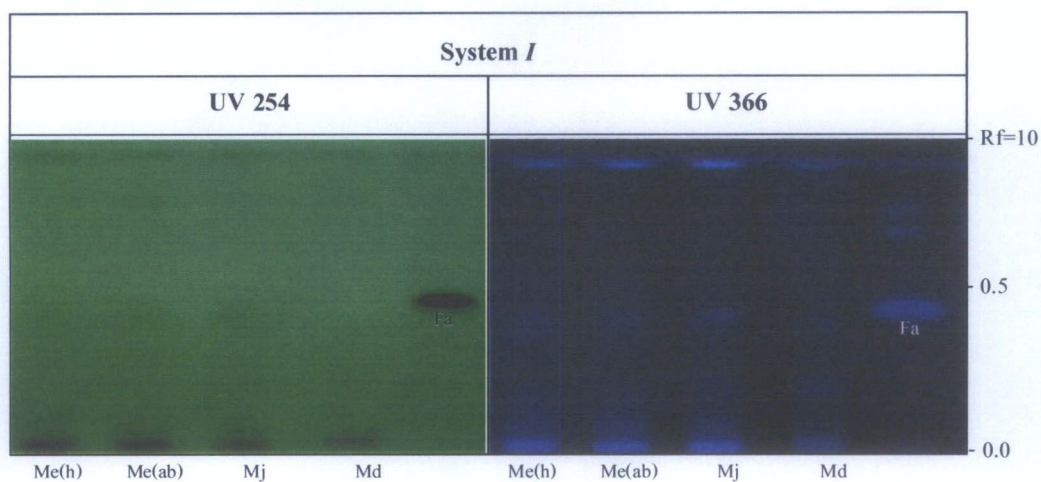
ภาพที่ 13 ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐหุ่งนา (Mj) และไถ่เลื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 1



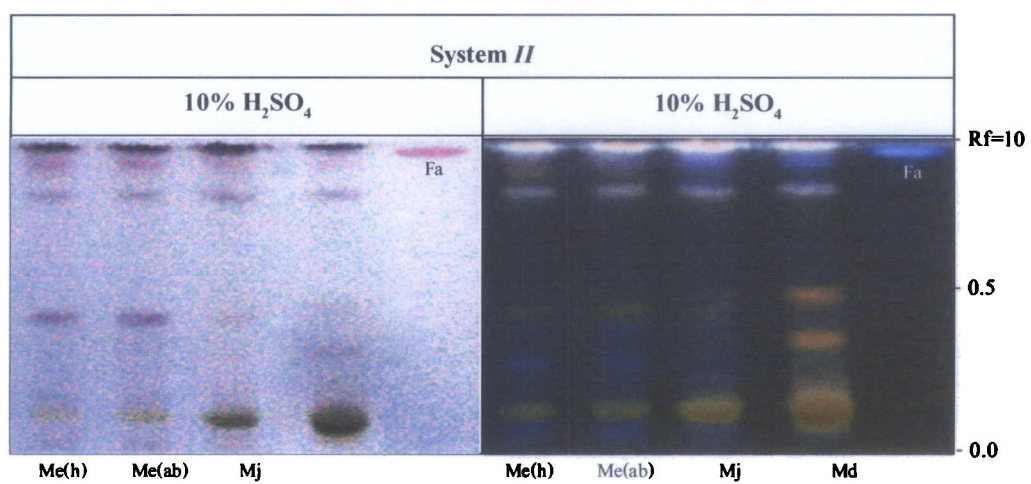
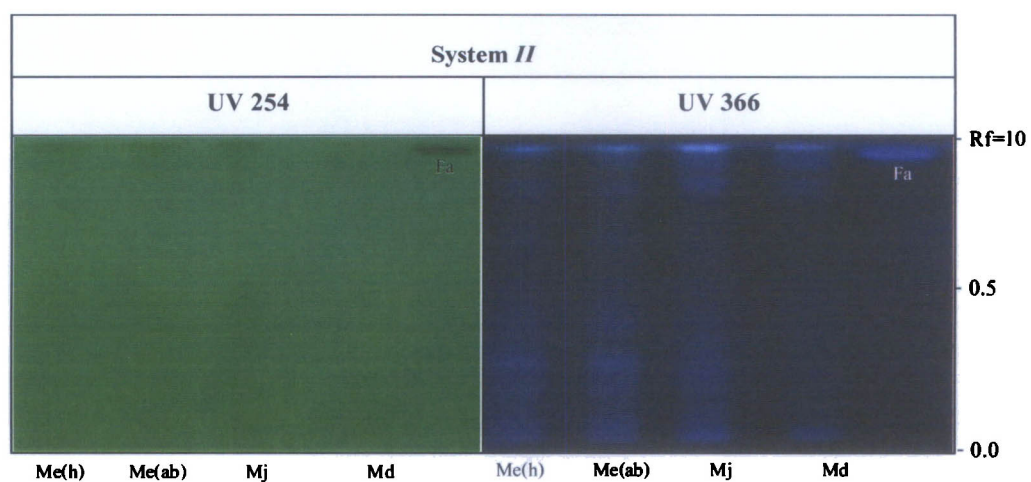
ภาพที่ 14 ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐหุ่งนา (Mj) และไก่เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 2



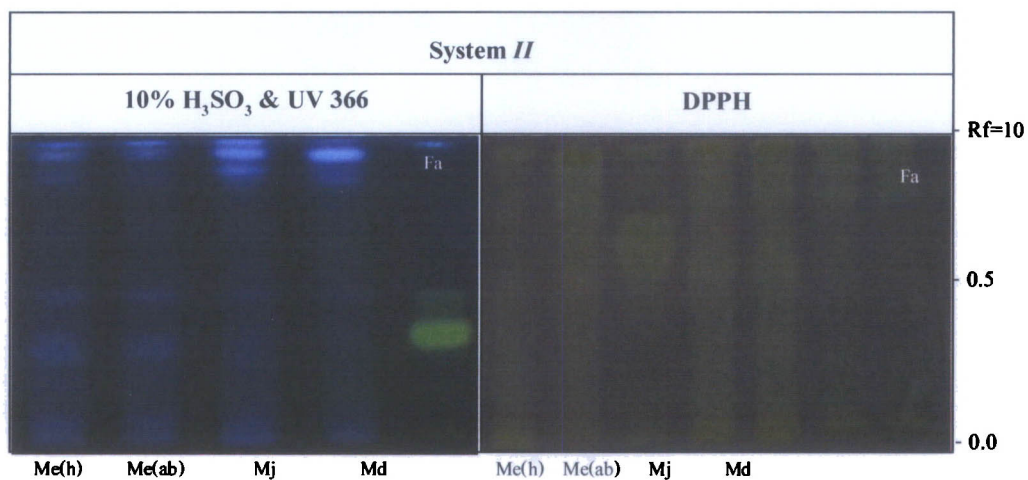
ภาพที่ 15 ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกงูท่งนา (Mj) และโก่เดือนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 3



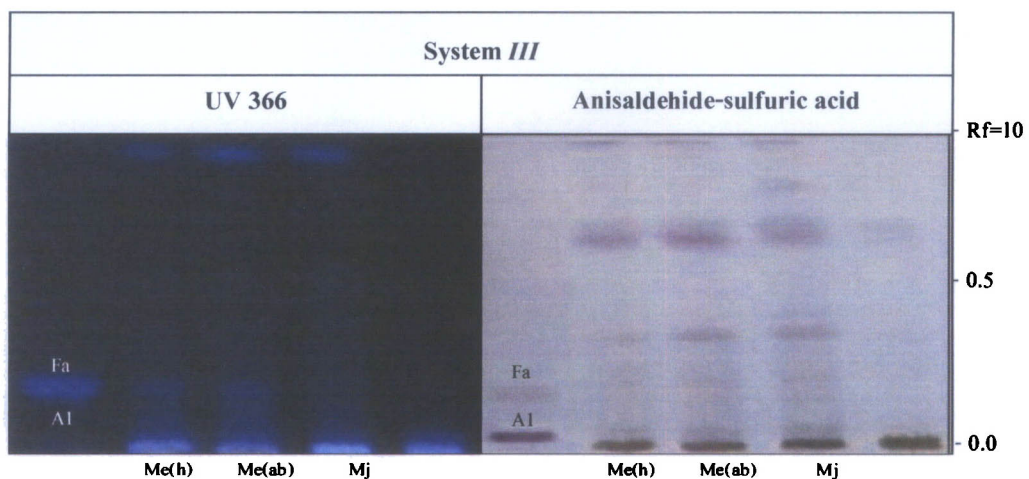
ภาพที่ 16 ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกงทูงนา (Mj) และไก่เดือนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 1



ภาพที่ 17 ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐหุ่งนา (Mj) และไก่เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 2



ภาพที่ 17 ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ ว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐหุ่งนา (Mj) และไถ่เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 2 (ต่อ)



ภาพที่ 18 ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐหุ่งนา (Mj) และไถ่เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 3

ตารางที่ 7 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐท่งนา (Mj) และไก่เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 1

System I								
Rf	UV366				10% H ₂ SO ₄			
	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md
0.97	R	R	R	R	Gr	Gr	Gr	Gr
0.85					V	V	V	V
0.82			LB					
0.70	R	R	R	R	GrF	GrF	GrF	
0.61			LB					
0.45	R							
0.36	R	R	R	R	VBr	VBr	VBr	VBr
0.30	R	R	R	R	VBr		VBr	VBr
0.21					V	V	V	V
0.15							BrY	BrY
0.06	B	B	B	B	V S	V S	V S	V S
0.00	D	D	D	D	D	D	D	D

Y: yellow, P: pink, Gr: green, O: orange, B: Blue, Br: brown, D: dark, G: grey, F: faint, R: red, S: Strong, V: violet, LB: light blue, W: white

ตารางที่ 8 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกร่งงูนา (Mj) และไถ่ถอนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 2

System II																
Rf	UV254				10% H ₂ SO ₄				1%AlCl ₃ & UV 366				DPPH			
	Me (b)	Me (ab)	Mj	Md	Me (b)	Me (ab)	Mj	Md	Me (b)	Me (ab)	Mj	Md	Me (b)	Me (ab)	Mj	Md
0.97	D	D	D	D	GD	GD	GD	GD	R	R	R	R	YGr	YGr	YGr	YGr
0.93					V	V	V	V			BW	BW				
0.80									PR		W				Y	
0.75					V		V	V	B	B	B					
0.68																
0.61																
0.57	D	D	D		VF	VF	VF	VF	B	B	B		Y	Y		
0.43									B	B	B		Y	Y		
0.32									Y	Y	B					
0.29												Br				
0.25	D	D				G	GD	GD	Y	Y			Y	Y		
0.21											B					
0.14	D	D			Br	Br		Br								
0.04													Y	Y	Y	
0.00	D	D	D	D	Br	Br	Br	Br	D	D	D	D	D	D	D	D

Y: yellow, P: pink, Gr: green, O: orange, B: Blue, Br: brown, D: dark, G: grey, F: faint, R: red, V: violet, LB: light blue, W: white

ตารางที่ 9 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐขันทอง (Mj) และ ไก่เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 3

System III																			
Rf	UV366					10% H ₂ SO ₄					10% H ₂ SO ₄ & UV366					Anisaldehyde-sulfuric acid			
	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md		Me (h)	Me (ab)	Mj	Md		Me (h)	Me (ab)	Mj	Md		Me (h)	Me (ab)	Mj	Md
0.97	R					Br	Br	Br	Br		OF	OF	OF	OF		V	V	V	V
0.93												BF							
0.86	R	R	R	R			Gr				O					V			
0.79	R	R	R	R		Gr	Gr	Gr	Gr		OF	R	OR	OR		VB	VB	VB	VB
0.76																			
0.69	R	R	R	R		VB	VB	VB	VB		OP	OP	OR	OR		VB	VB	VB	VB
0.66							Br		Br		W	W	W	W		V	V	V	V
0.59	R	R	R	R		Gr	Gr	Gr	Gr		O	O	O	O					
0.52	R	R	R	R															
0.45			R	R															
0.38	R																	VB	
0.31	R	R	RP	RF							OF		OF	OF			VB	VB	
0.24	R	R	VP	R							OF					VG	VG	VG	VG
0.17						V	V	V	V		O	O	PF	R		VB	VB	VB	VB
0.14			VP								PF	PF	PF	PF					
0.10	R	R	R	R															
0.03	RF	RF	PF	PF															
0.00	BrD	BrD	BrD	BrD		BrD	BrD	BrD	BrD		BrD	BrD	BrD	BrD		VB	D	D	D

Y: yellow, P: pink, Gr: green, O: orange, B: Blue, Br: brown, D: dark, G: grey, F: faint, R: red, V: violet, LB: light blue, W: white

ตารางที่ 10 ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกร่งงา (Mj) และไถ่เลื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 1

System I																
Rf	UV254				UV366				10% H ₂ SO ₄				10% H ₂ SO ₄ & UV366			
	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md
0.96	D	D	D	D	B	B	B	B	Br-R	Br-R	Br-R	Br-R	YW	YW	YW	YW
0.88									VB	VB	VB	VB	P	P	P	P
0.38									V-F	V-F	V-F	V-F	W	W	W	W
0.36																
0.23									P-V	P-V			R	R		
0.19	D	D	D	D	B	B	B	B	V	V	V	V	W	W	W	W
0.16												BrF				BrF
0.08																
0.04															GrF	Br
0.00	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	GrB	GrB	BrD	BrD

Y: yellow, P: pink, Gr: green, O: orange, B: Blue, Br: brown, D: dark, G: grey, F: faint, R: red, V: violet, LB: light blue, W: white

ตารางที่ 11 ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐขันทอง (Mj) และโกฐเดือนป่า (Md)
ในตัวอย่างละลายชุดที่ 2

System II																				
Rf	UV254				UV366				10% H ₂ SO ₄				10% H ₂ SO ₄ & UV366				1% AlCl ₃ & UV 366			
	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md
0.96	D	D	D	D	B	B	B	B	BrR	BrR	BrR	BrR	OF	OF	OF	OF	FW	BW	BW	BW
0.88					B	B	B	B	P	P	P	P	Br	BW	BW	BW	FW	BW	BW	BW
0.81					B	B	B	B	G	G	G	G	W	W	W	W	FW	BW	BW	BW
0.62																			B	Y
0.50												G				Gr			B	
0.42									VP	VP	G		Br	Br	Br	Br	B	B	B	B
0.38						B						G	B	B	Gr					
0.35																	OF			
0.27					B	B							BW	BW						
0.23													BW	BW	Gr		B	B	B	B
0.20																				
0.12									BrF	BrF	BrD	BrD	BrO	BrO	BrO	BrO				Y
0.00	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D				

Y: yellow, P: pink, Gr: green, O: orange, B: Blue, Br: brown, D: dark, G: grey, F: faint, R: red, V: violet, LB: light blue, W: white

ตารางที่ 12 ทินเลเซอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของว่านข้าวเหนียว (Me (h) และ Me (ab)) โกฐท่งนา (Mj) และไก่เถื่อนป่า (Md) ในตัวทำละลายชุดที่ 3

System III								
Rf	UV366				Anisaldehyde-sulfuric acid			
	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md	Me (h)	Me (ab)	Mj	Md
0.95	B	B	B		Br	Br	Br	Br
0.82							VB	
0.73					VB	VB	VB	VB
0.68					VR	VR	VR	
0.41								
0.36					Br	Br	Br	
0.18	B	B			VB	VB	VB	
0.09								
0.05					VB	VB	VB	
0.00	B	B	B	B	Br	Br	Br	Br

Y: yellow, P: pink, Gr: green, O: orange, B: Blue, Br: brown, D: dark, G: grey, F: faint, R: red, V: violet, LB: light blue, W: white

3.4 วิจัยการผลิตการศึกษาและข้อเสนอแนะ

3.4.1 ผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางพฤกษเคมี โดยวิธีหาปริมาณรวมของสารสกัด (% Yield)

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดจากส่วนเหนือดิน พบว่า โดยส่วนใหญ่สารสกัดด้วยเมทานอลจะมีปริมาณรวมของสารสกัดมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ส่วนใต้ดินพบว่า สารสกัดด้วยน้ำมีปริมาณรวมของสารสกัดมากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล เมื่อเปรียบเทียบส่วนเหนือดินและใต้ดิน พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินมีปริมาณรวมของสารสกัดมากกว่าส่วนใต้ดิน

3.4.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดิน

3.4.2.1 การเปรียบเทียบโครมาโตแกรมระหว่างชนิด

ผลการศึกษาเปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินระหว่างพืชต่างชนิด ได้แก่ *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* ซึ่งการตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอลและอะนิสาลดีไฮด์-กรดกำมะถัน สามารถตรวจหาสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ โดยการตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏแถบสีแดง น้ำตาลแดง น้ำตาลเหลือง เหลืองเขียว ส้ม ม่วง ม่วงแดง น้ำเงิน ม่วงน้ำเงิน น้ำเงินเทาและเทา (Coscia, 1984; Harborne, 1984; Macek, 1972; Wagner and Bladt, 1996) ตรวจสอบด้วยอะนิสาลดีไฮด์-กรดกำมะถัน เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏแถบสีน้ำเงิน เขียว แดง น้ำตาล ม่วงแดง ม่วงน้ำเงิน น้ำตาล เทา น้ำเงิน และสังเกตภายใต้แสง UV 366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีน้ำเงิน เขียว แดง น้ำตาล เขียวน้ำตาล ฟ้าแดง และเหลืองน้ำตาล (Stahl, 1969; Macek, 1972; Harborne, 1984; Wagner and Bladt, 1996) ผลการศึกษาพบว่า พืชกลุ่มนี้มีสารองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น

คล้ายกัน ได้แก่ สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ โดยจะปรากฏแถบสารที่ค่า R_f ต่าง ๆ (ภาพที่ 13, 15 และ ตารางที่ 7, 9 : แยกด้วยระบบทำละลายชุดที่ 1 และ 3 ตรวจสอบด้วย 10% H_2SO_4 จะปรากฏแถบสีม่วง และสีม่วงน้ำเงิน ตรวจสอบด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid จะปรากฏแถบสีม่วงน้ำเงิน และสีม่วง โดยใช้ Andrographolide (Al) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ) ตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล เพื่อตรวจสอบสารกลุ่ม Flavonoids เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏแถบสีเหลือง เหลืองเขียว น้ำตาล และภายใต้แสง UV 366 นาโนเมตร ปรากฏแถบแสงสะท้อนสีน้ำตาล น้ำเงิน เหลือง เหลืองเขียว และฟ้าขาว (Griffiths and Smith, 1972; Macek, 1972; Cooper and Rao, 1992; DeRijke et al., 2006) ผลการศึกษา พบสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (ภาพที่ 14 และ ตารางที่ 8 : แยกด้วยระบบทำละลายชุดที่ 2 ตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ ภายใต้แสง UV 366 จะปรากฏแถบแสงสะท้อนสีเหลือง น้ำตาล น้ำเงิน และฟ้าขาว โดยใช้กรดเฟอรริก (Fa) และรูทีน (Rt) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ) ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้มีสอดคล้องกับรายงานผลการศึกษาของพืชสกุลเดียวกันในก่อนหน้านี (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2551; Chaichumporn et al., 2008; Kaewsaart et al., 2008) และตรวจสอบด้วยสารละลาย DPPH เป็นการตรวจสอบสารที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH โดยสารที่มีความสามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH จะทำให้ความเข้มของสีสารละลาย DPPH เปลี่ยนจากสีม่วง เป็นสีเหลือง ผลการศึกษาครั้งนี้ พบแถบสารสีเหลืองมากใน Me (h) และ Me (ab) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของพืชกลุ่มนี้ (ภาพที่ 14 และ ตารางที่ 8 โดยใช้รูทีน (Rt) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ) ตรวจสอบด้วย Dragendorff's reagent เพื่อตรวจสอบสารกลุ่มแอลคาลอยด์ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏแถบสีส้ม (Wagner and Bladt, 1996) ผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าไม่ปรากฏสารกลุ่มแอลคาลอยด์ในสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* (แยกด้วยระบบทำละลายชุดที่ 1 ตรวจสอบด้วย Dragendorff's reagent สังเกตด้วยตาเปล่าจะปรากฏแถบสีส้มของสารมาตรฐาน Piperine (Pr))

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของระบบตัวทำละลาย ในการแยกความแตกต่างของ โครมาโทแกรมของสารสกัดดังกล่าวแล้ว พบว่าระบบตัวทำละลายชุดที่ 2 ประกอบไปด้วย เอทิลเอซิเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอสติก : น้ำ อัตราส่วน 125 : 11 : 11 : 13.5 เป็นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะแยกสารกลุ่ม Flavonoids และสามารถชี้แยกความแตกต่างของโครมาโทแกรมของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดนี้ได้ชัดเจน ซึ่งสนับสนุนการใช้วิธีThin Layer Chromatography ที่นิยมในการศึกษาเชิงคุณภาพที่ผ่านมาของสารกลุ่ม Flavonoids (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2551; Males and Saric, 2001; Onyilagha et al., 2003; Rijke et al., 2006) จากความแตกต่างของโครมาโทแกรมอย่างชัดเจนของสารกลุ่ม Flavonoids ในสารสกัดพืชทั้ง 3 ชนิด สนับสนุนรายงานการวิจัยอนุกรมเชิงเคมีของพืชวงศ์ Commelinaceae ทั้งหมดที่ผ่านมาที่ใช้สารกลุ่ม Flavonoids เป็นสารสำคัญในการจัดจำแนกชนิด (Stirton and Harborne, 1980; Martínez, 1985; Martínez and Swain, 1985) ดังนั้นอาจสามารถใช้สารกลุ่ม Flavonoids ในการจัดจำแนกพืชสกุลนี้ได้ โดยเฉพาะใกล้เดือนป่าที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไป คล้ายคลึงกับ โกฐหุงนางา ซึ่งการจำแนกเพื่อระบุชนิดพันธุ์ของพืชกลุ่มนี้ มีปัจจัยจำกัดโดยใช้โครงสร้างสืบพันธุ์ (Reproductive part) ได้แก่ โครงสร้างช่อดอก ดอก ผลและเมล็ด (Thitimetharoch et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยจำกัดของฤดูกาลและเวลานานของดอก (Thitimetharoch et al., 2004) แต่การศึกษาครั้งนี้แสดงความแตกต่างโครมาโทแกรมของสารสกัดดังกล่าวได้อย่างชัดเจน เมื่อตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์และสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร โดยจะพบแถบสะท้อนแสงสีเหลือง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.25 และ 0.32 ในสาร

สกัด *M. edulis* แลยสะท้อนแสงสีฟ้าขาว ที่ค่า R_f ประมาณ 0.21 ในสารสกัด *M. japonica* แลยสะท้อนแสงสีน้ำตาล ที่ค่า R_f ประมาณ 0.29 ในสารสกัด *M. discreta* ซึ่งสารกลุ่ม Flavonoids ที่แยกได้ในพืชดังกล่าวมีความแตกต่างกับสารกลุ่ม Flavonoids ที่พบในพืชสกุลเดียวกันและต่างสกุลในวงศ์เดียวกันก่อนหน้านี้ (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2551; Chaichumporn et al., 2008; Kaewsart et al., 2008)

สำหรับระบบชุดทำละลายที่ 1 และ 3 แสดงโครมาโทแกรมของพืชแต่ละชนิดคล้ายคลึงกัน โดยพบแถบสีม่วงที่ค่า R_f ประมาณ 0.85, 0.36, 0.21 และ 0.06 (ภาพที่ 13 : ระบบชุดทำละลายที่ 1 ตรวจสอบด้วย H_2SO_4) พบแถบสีม่วงที่ค่า R_f ประมาณ 0.79 และ 0.03 (ภาพที่ 15: ระบบชุดทำละลายที่ 3 ตรวจสอบด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid) เป็นสารประกอบหลัก (Main compound) ของพืชกลุ่มนี้ ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นสารในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์เช่นเดียวกับที่พบใน *Murdannia bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora* (ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2550) จึงอาจนำมาใช้เป็น Chemical marker ของพืชสกุลนี้ได้

3.4.2.2 การเปรียบเทียบพืชชนิดเดียวกันที่มีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา

Murdannia edulis [Me (h) และ Me (ab)] แสดงลักษณะโครมาโทแกรมที่แตกต่างกัน ดังนี้ในระบบทำละลายชุดที่ 1 (ภาพที่ 13) ภายหลังตรวจสอบด้วย 10% H_2SO_4 จะปรากฏแถบสีม่วงน้ำตาลที่ค่า R_f ประมาณ 0.30 ในสารสกัดกลุ่มหลังแผ่นใบมีขน [Me (h)] ในระบบทำละลายชุดที่ 2 (ภาพที่ 14) ภายหลังตรวจสอบด้วย 10% H_2SO_4 จะปรากฏแถบสีม่วง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.75 ในสารสกัดกลุ่มหลังแผ่นใบมีขน [Me (h)] แต่ไม่ปรากฏในสารสกัดกลุ่มหลังแผ่นใบไม่มีขน [Me (ab)] ตรวจสอบด้วย 1% อลูมิเนียมคลอไรด์และสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีชมพู ที่ค่า R_f ประมาณ 0.80 เฉพาะในสารสกัดกลุ่มหลังแผ่นใบมีขน [Me (h)] ในระบบทำละลายชุดที่ 3 (ภาพที่ 15) ภายหลังตรวจสอบด้วย 10% H_2SO_4 และสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีส้ม ที่ค่า R_f ประมาณ 0.86 เฉพาะในสารสกัดกลุ่มหลังแผ่นใบมีขน [Me (h)] และแถบสะท้อนแสงสีน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.93 เฉพาะในสารสกัดกลุ่มหลังแผ่นใบไม่มีขน [Me (ab)]

3.4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดิน

3.4.3.1 การเปรียบเทียบโครมาโทแกรมระหว่างชนิด

ผลการศึกษาเปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินระหว่างพืชต่างชนิด พบว่า พืชกลุ่มนี้มีสารองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นคล้ายกับส่วนเหนือดิน ได้แก่ สารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์โดยจะปรากฏแถบสารที่ค่า R_f ต่างๆ (ภาพที่ 16, 18 และตารางที่ 10, 12 : แยกด้วยระบบตัวทำละลายชุดที่ 1 และ 3 ตรวจสอบด้วย 10% H_2SO_4 จะปรากฏแถบสีม่วง สีม่วงน้ำเงิน ตรวจสอบด้วย Anisaldehyde-sulfuric acid จะปรากฏแถบสีน้ำเงิน สีม่วงและสีม่วงแดง โดยใช้ Andrographolide (Al) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ) สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (ภาพที่ 17 และ ตารางที่ 11 : แยกด้วยระบบตัวทำละลายชุดที่ 2 ตรวจสอบด้วย 1% อลูมิเนียมคลอไรด์ ภายใต้แสง UV 366 จะปรากฏแถบแสงสะท้อนสีเหลือง น้ำตาล น้ำเงิน และฟ้าขาว โดยใช้กรดเฟอร์ริก (Fa) และรูทีน (Rt) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ) และตรวจสอบด้วยสารละลาย DPPH พบแถบสารสีเหลืองมากใน Me (h) และ Me (ab) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของพืชกลุ่มนี้ (ภาพที่ 12 และ ตารางที่ 11 โดยใช้รูทีน (Rt) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ) นอกจากนี้ยัง

พบว่าผลการศึกษานี้ไม่ปรากฏสารกลุ่มแอลคาลอยด์ในพืชกลุ่มนี้ (แยกด้วยระบบทำละลายชุดที่ 1 ตรวจสอบด้วย Dragendorff's reagent ยังเกิดด้วยตาเปล่าจะปรากฏแถบสีส้มของสารมาตรฐาน Piperine (Pr))

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของระบบตัวทำละลาย ในการแยกความแตกต่างของโครมาโทแกรมของสารสกัดดังกล่าวแล้ว พบว่าระบบตัวทำละลายชุดที่ 2 เป็นระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่จะแยกสารกลุ่ม Flavonoids และสามารถให้แยกความแตกต่างของโครมาโทแกรมของสารสกัดทั้ง 3 ชนิดนี้ได้ชัดเจนเช่นเดียวกับส่วนเหนือดิน ซึ่งสารกลุ่ม Flavonoids ที่แยกได้จากส่วนใต้ดินดังกล่าวอาจมีความแตกต่างกับสารกลุ่ม Flavonoids ที่พบจากส่วนเหนือดิน

สำหรับระบบชุดทำละลายที่ 1 และ 3 แสดงโครมาโทแกรมของพืชแต่ละชนิดคล้ายคลึงกัน โดยพบแถบสีม่วงที่ค่า R_f ประมาณ 0.19 และแถบสีม่วงน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.88 (ภาพที่ 16: ตรวจสอบด้วย H_2SO_4) เป็นสารประกอบหลัก (Main compound) ของพืชกลุ่มนี้ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นสารในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ เช่นเดียวกับที่พบจากส่วนเหนือดินและในพืชสกุลเดียวกันก่อนหน้านี้ (ชาวินี สืบปาละ และคณะ, 2550) จึงอาจนำมาใช้เป็น Chemical marker ของพืชสกุลนี้

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดจากส่วนเหนือดินและใต้ดิน พบแถบสะท้อนแสงสีแดงในสารสกัดจากส่วนเหนือดินแต่ไม่ปรากฏในส่วนใต้ดิน ภายหลังจากการสังเกตภายใต้แสง UV 366 ซึ่งคาดว่าป็นกลุ่มสารที่แตกต่างกัน

3.4.3.2 การเปรียบเทียบพืชชนิดเดียวกันที่มีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา

Murdannia edulis [Me (h) และ Me (ab)] แสดงลักษณะโครมาโทแกรมที่แตกต่างกัน ดังนี้ในระบบชุดตัวทำละลายที่ 2 ภายหลังตรวจสอบด้วย UV 366 จะปรากฏแถบแสงสะท้อนสีน้ำเงิน ที่ค่า R_f ประมาณ 0.38 เฉพาะในสารสกัดกลุ่มหลังแผ่นใบไม่มีขน [Me (ab)] ซึ่งคาดว่าองค์ประกอบทางเคมีในพืชสามารถผันแปรได้ตามสภาพแวดล้อมซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.5 สรุปผลการศึกษาคู่ประกอบพฤษเคมีเบื้องต้น

การศึกษาคู่ประกอบพฤษเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีทีแอลซีโครมาโทกราฟีพบว่า โดยทั่วไปมีองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นคล้ายกันคือ สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ สามารถแยกสารสกัดด้วยเมทานอลของพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ได้อย่างชัดเจนในโครมาโทแกรมของระบบทำละลาย (Mobile phase) ที่ประกอบด้วย เอทิลเอซีเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซิดิก : น้ำ ด้วยอัตราส่วน 125 : 11 : 11 : 13.5 ทั้งจากส่วนเหนือดินและใต้ดิน ซึ่งสารส่วนใหญ่ที่ออกมาในระบบนี้คือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ อาจสรุปได้ว่าสารกลุ่มนี้สามารถใช้จัดจำแนก (Chemical marker) พืชสกุลนี้ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังเป็นการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น แต่ทำให้ทราบว่าสารกลุ่ม Flavonoids มีความหลากหลายในพืชสกุลนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษานุกรมวิธานทางเคมีเชิงลึกต่อไปได้ เช่น การแยกสกัดและตรวจสอบเอกลักษณ์หาสารสำคัญกลุ่ม Flavonoids ที่อยู่ในพืชแต่ละชนิด โดยเฉพาะสารที่แตกต่างกันสามารถนำมาใช้เป็น Chemical marker ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชแต่ละชนิดในขั้นต่อไป

บทที่ 4

การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

4.1 การทบทวนวรรณกรรม

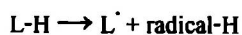
4.1.1 อนุมูลอิสระและการต้านออกซิเดชัน (Free Radicals and Antioxidant)

อนุมูลอิสระ (Free Radicals) คือ อะตอมหรือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ (Unpaired electron) อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุดของออร์บิทัล (Outer Orbital) ทำให้อะตอมหรือโมเลกุลเหล่านี้ไม่เสถียรและมีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูง โดยทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ ดึงหรือแย่งจับหรือให้อิเล็กตรอนกับโมเลกุลข้างเคียง เพื่อให้ตัวของมันเองเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain reaction) (โอภา วัชรคุปต์, 2549; Halliwell, Gutteridge, 1999)

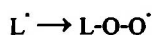
ปัจจัยที่มีผลให้เกิดอนุมูลอิสระนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 ปัจจัยคือ ปัจจัยภายในร่างกาย (Endogenous sources) เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ภายในเซลล์ และปัจจัยภายนอกในร่างกาย (Exogenous sources) เกิดจากมลพิษในอากาศ แสงแดด รังสีแกมมา ควันทันควันบุหรี่ ฝุ่นควันต่างๆ แอลกอฮอล์ การติดเชื้อโรคจากไวรัสหรือแบคทีเรีย การออกกำลังกายอย่างหักโหม รวมถึงอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว หรือ ผัก และผลไม้ที่ปนเปื้อนยาฆ่าแมลง และยาบางชนิดเช่น Paracetamol, Doxorubicin, Bleomycine, Adreamicine, Narcotic และ Anesthetizing gases เป็นต้น (Cadenas, 1989; Kohen et al., 2002)

อนุมูลอิสระต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากปัจจัยภายในร่างกาย สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เรียก อนุมูลอิสระกลุ่มนี้ว่า Reactive Oxygen Species (ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เรียกว่า Reactive Nitrogen Species (RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ เรียกว่า Reactive Chlorine Species (RCS) ทั้ง 3 กลุ่ม ล้วนมีผลต่อการทำปฏิกิริยาภายในระดับเซลล์ แต่ที่มีความสำคัญคือ Reactive Oxygen Species (ROS) เนื่องจากปฏิกิริยาภายในร่างกายส่วนใหญ่มีการใช้ออกซิเจน เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสฟอริเซชัน (Oxidative phosphorylation) ซึ่งเป็นแหล่งผลิตอนุมูลอิสระ (Radical) ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$) และเกิดในปฏิกิริยารีดอกซ์ โดยอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์เป็นสารตัวกลาง (Intermediate) ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียและเยื่อหุ้มเซลล์ จากกระบวนการดังกล่าวยังก่อให้เกิด Hydrogen Peroxide (H_2O_2) ซึ่งไม่เป็นอนุมูลอิสระ (Non radicals) ของออกซิเจน มีผลทำลาย Hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$) และ Hypochlorous acid ($HOCl$) และผลการเสื่อมสลายของฮีโมโพรตีน (Haem Protein) นอกจากนี้ปฏิกิริยารีดอกซ์ของไอออนโลหะในร่างกายเช่น เหล็ก (Fe^{2+}) และทองแดง (Cu^{2+}) เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยา Fenton reaction ดังสมการนี้ $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$ ทำให้เกิดอนุมูล Hydroxyl radical, ($HO^{\cdot}$) ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นในปฏิกิริยา Lipid peroxidation ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ คือ

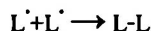
ขั้นที่ 1 ระยะเริ่มต้น (Initiation reaction) ดังสมการ



ขั้นที่ 2 ระยะแพร่กระจาย (Propagation reaction) ดังสมการ



ขั้นที่ 3 ระยะสิ้นสุด (Termination reaction) ดังสมการ



ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะเป็นแบบลูกโซ่ ซึ่งเริ่มจากอนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูล ก่อให้เกิด Lipid peroxidation เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลต่อกันก่อนจนกระทั่งอนุมูลอิสระของไขมันสามารถทำปฏิกิริยากันเองโดยใช้อิเล็กตรอนร่วมกันจึงจะสิ้นสุดปฏิกิริยา สามารถเกิดได้ง่ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้คุณสมบัติของมันเปลี่ยนไป มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์และ Receptor ที่อาศัยอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ จึงเป็นสาเหตุในการเกิดโรค Atherosclerosis (โสภา วัชรคุปต์, 2549; Halliwell, Gutteridge, 1999; Kohen et al., 2002)

อนุมูลอิสระอีกชนิดที่เกิดขึ้นในร่างกาย เช่น อนุมูลอิสระของไนโตรเจน (Reactive Nitrogen Species, RNS) เช่น อนุมูลไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide radical, NO[•]) และ Peroxynitrite (ONOOH) (โสภา วัชรคุปต์, 2549; Halliwell, Gutteridge, 1999) ซึ่งในภาวะปกติร่างกายจะสร้างอนุมูลอิสระในอัตราที่ปกติและใช้ประโยชน์ในขบวนการแบ่งตัวของเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต และในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อฆ่าเชื้อโรค และร่างกายยังสร้างระบบสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant defense system) แต่ถ้าวร่างกายเกิดภาวะที่มีความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านออกซิเดชัน โดยมีการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นมามากเกินความสามารถของกระบวนการต้านออกซิเดชันหรือการลดลงของสารต้านออกซิเดชันก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) ส่งผลให้เกิดการทำลายโครงสร้างสาย DNA การบาดเจ็บของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะโครงสร้างภายนอกเซลล์คือเยื่อหุ้มเซลล์ และมีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่างๆ มากมาย เช่น โรคเกี่ยวกับระบบหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease) มะเร็ง (Cancer) และการอักเสบ (Inflammatory) (Dalle et al., 2006) ซึ่งปกติในร่างกายของคนจะมีกลไกการทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นโดยอาศัยสารต้านออกซิเดชันทั้งที่เป็นเอนไซม์ (Endogenous Enzymatic antioxidants) เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase, SOD), คาตาเลส (Catalase), กลูตาไทโอนเปอร์ออกซิเดส (GPX) และสารต้านออกซิเดชันที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Endogenous non enzymatic antioxidants) เช่น กรดยูริก (Uric acid) ส่วนสารคีเลทโลหะ (Metal chelator) เป็นอีกกลไกหนึ่งในการทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เช่น ทรานเฟอร์ริน (Transferrin) (โสภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2549; Halliwell, Gutteridge, 1999) แต่เมื่อสารต้านออกซิเดชันในร่างกายก็มีปริมาณไม่มากพอที่จะป้องกันหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นตลอดเวลา จึงจำเป็นต้องอาศัยสารต้านออกซิเดชันจากภายนอก (Exogenous antioxidant) ได้แก่ การรับประทานอาหาร ซึ่งจะพบว่าผัก ผลไม้และพืชสมุนไพรต่าง ๆ ถือเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านออกซิเดชันไม่ใช่เอนไซม์ โดยพบสารที่แสดงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในพืชหลายชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) และวิตามินต่าง ๆ เช่น วิตามินอี (Bravo, 1998)

4.1.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในหลอดทดลอง (The *In Vitro* of the Antioxidant Activity Assay)

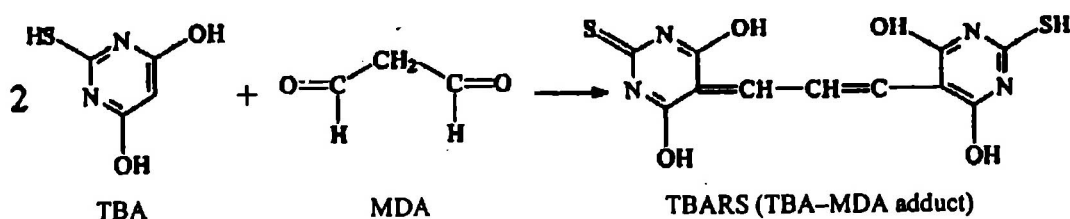
การวิเคราะห์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลไก คือ การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen Atom Transfer reaction, HAT) และการวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Single Electron Transfer reaction, SET)

4.1.2.1 การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen Atom Transfer reaction, HAT)

เป็นการวัดความสามารถของสารต้านออกซิเดชันในการขจัดอนุมูลอิสระโดยการให้อะตอมไฮโดรเจน ซึ่งใช้ความรู้พื้นฐานของ Competition Kinetics เป็นปฏิกิริยาระหว่างสารเคมี และไม่ขึ้นกับค่ากรด-ด่าง โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนใหญ่ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ใช้เวลาเป็นวินาทีถึงนาทีเท่านั้น (Phipps et al., 2007) ยกตัวอย่างแบบการทดลองในกลไกนี้คือ การยับยั้งปฏิกิริยาฟิเคเปอร์ออกซิเดชันด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) มีหลักการ ข้อดีและข้อเสียดังนี้

1) Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay

เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิเคเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation) ของสารสกัดตัวอย่าง ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นจากขบวนการ Oxidation เมื่ออนุมูลอิสระหรือ Reactive oxygen species, ROS ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acids; PUFA) ภายในผนังเซลล์ เกิดเป็น Lipid peroxide เป็นสารพิษ และเคลื่อนย้ายจากชั้นในของเยื่อหุ้มเซลล์ ขึ้นมาอยู่บริเวณผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ และเกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา Lipid peroxidation คือ สารกลุ่มไฮโดรคาร์บอน และสารอัลดีไฮด์ซึ่งก็คือ มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehydes, MDA) (Halliwell and Chirico, 2011) โดยวิเคราะห์บนพื้นฐาน Spectrophotometric method คือวัดสีผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาดังกล่าว คือ Malondialdehydes หรือ MDA ทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทริก (Thiobarbituric acid) ในสภาวะกรด (Apak et al., 2007) แล้วจะได้ Thiobarbituric Reactive Substances (TBARS) ซึ่งเป็นสารมีสีชมพู ดูดกลืนคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่น 532-535 นาโนเมตร ดังนั้นถ้าสารสกัดตัวอย่างใดที่ทดสอบมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจะลดการสร้าง TBARS ได้ ซึ่งจะทำให้สีชมพูจางลง และค่าดูดกลืนแสงลดลง (Antovich et al., 2002)

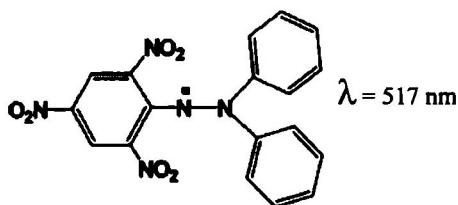


ภาพที่ 19 ปฏิกิริยาการเกิด Thiobarbituric Reactive Substances (TBARS)

ข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาสูง ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ Malondialdehydes (MDA) ไม่เป็นสารจำเพาะที่ได้จากการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (โสภา วัชรกุลป์, 2549) การวัด hydroxyl radicals ซึ่งสร้างจากปฏิกิริยา Fenton-reaction เป็นการวัดการบุกรุกของ Oxidative บนการตรวจสอบ Deoxyribose หรือ TBA ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็น Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยาดังกล่าว (Apak et al., 2007)

4.1.2.2 การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Electron Transfer reaction, ET) เป็นการหาความสามารถในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์สารอื่นได้แก่ โลหะและอนุมูล ซึ่งเป็นปฏิกิริยาขั้นแรกต่อประสิทธิภาพ ของ Deprotonation และ Ionization ของสารสกัดตัวอย่าง และต้องใช้เวลาในการทำให้การเกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ ดังนั้นในการหาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน จะคำนวณบนพื้นฐานของเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงในสารสกัดตัวอย่างหรือผลิตภัณฑ์มากกว่า (Phipps et al. 2007) ยกตัวอย่างแบบการทดลองในกลไกนี้คือ การหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic contents) โดยวิธี Folin-Ciocalteu การวัดความสามารถในการเป็นสารรีดิวซ์ เช่น วิธี Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) และวิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Huang et al., 2004; Prior et al., 2005) โดยมีหลักการ ข้อดี ข้อเสียของแต่ละวิธีดังนี้

1) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH) assay

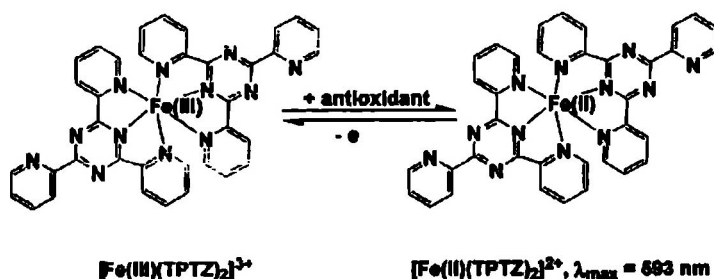


ภาพที่ 20 โครงสร้างของอนุมูลอิสระ 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Prior et al., 2005)

หลักการ คือ อนุมูล DPPH[•] เป็น อนุมูลอิสระที่มีความคงตัว มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 517 นาโนเมตรจะลดลง ปรากฏเป็นสีม่วงก่อนทำปฏิกิริยา หลังทำปฏิกิริยากับสารต้านออกซิเดชันจะให้อิเล็กตรอน ทำให้ DPPH อยู่ในสภาพไม่เป็นอนุมูลอิสระ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร จะลดลง (Schlesier et al., 2002)

ข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นวิธีง่าย ใช้เครื่องมือทั่วไป นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในย่านเดียวกัน ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ อนุมูล DPPH[•] มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดขึ้นในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้โครงสร้างทางเคมีของ DPPH[•] ที่แสดงจะเห็นว่าอิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงแหวนเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านออกซิเดชันที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่บางสารไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาจับอนุมูลได้ (Huang et al., 2004; Prior et al., 2005)

2) Ferric-Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay

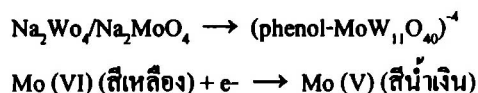


ภาพที่ 21 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นใน FRAP assay (Huang et al., 2005)

เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถโดยตรงในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด (Total antioxidant power) มีหลักการว่าสารต้านออกซิเดชันในร่างกายทำหน้าที่โดยการให้อิเล็กตรอนจึงจัดเป็นสารรีดิวซ์ ดังนั้นวิธีนี้จึงจัดเป็นการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์ หลักการทดสอบของวิธีนี้ คือภายใต้สภาวะความเป็นกรด สารประกอบเชิงซ้อน Ferric tripyridyl triazine ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-TPTZ}$) จะถูกรีดิวซ์ได้เป็น Ferrous ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-TPTZ}$) ซึ่งให้สารละลายสีน้ำเงิน และสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงนี้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ดังนั้นสารใดให้อิเล็กตรอนเพื่อเปลี่ยน $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-TPTZ}$ ไปเป็น $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-TPTZ}$ ได้ก็จะมีค่าการดูดกลืนแสงมากขึ้น ซึ่งแสดงว่าสารนั้นมีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} ซึ่งจัดเป็นคุณสมบัติหนึ่งของสารต้านออกซิเดชัน (Benzie, Strain, 1999; Huang et al., 2004; Prior et al., 2005) ข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ค่าใช้จ่ายไม่แพง ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ และสภาพแวดล้อมไม่มีผลต่อการทดลอง (Benzie, Strain, 1999) ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ ในการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันจากพืชจำพวกโพลีฟีนอล จะพบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จะเพิ่มขึ้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ ดังนั้นการวัดครั้งเดียวตามเวลาที่กำหนด อาจไม่ใช่ค่าเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ (Huang et al., 2004; Prior et al., 2005) นั่นคือปฏิกิริยาของการต้านออกซิเดชันสามารถมีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงและผันผวนขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ ซึ่งอาจทำให้ได้ผลการทดลองผิดพลาดได้ ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของสาร

3) Folin Ciocalteu (F-C) หรือ Total Phenolics Assay

เป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolics) ในพืชผัก ผลไม้ และเครื่องดื่มต่างๆ ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นในปี 1927 และกำเนิดจากการใช้สารองค์ประกอบทางเคมีสำหรับการวิเคราะห์ Tyrosine โดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาเนื่องจาก Molybdotungstate ion จากปฏิกิริยาของสารเคมี (reagent) ระหว่าง สาร Folin Ciocalteu กับ สารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) .ในสภาวะต่างเกิดผลลิพรีดของสาร Molybdato เป็นสารประกอบสีน้ำเงิน เป็นการติดตามการเปลี่ยนแปลงสีจากปฏิกิริยาของไอออน Mo (VI) ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ Mo(V) ซึ่งมีสีน้ำเงิน ดังสมการ (Ref. 8)



แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 745-750 นาโนเมตร (Prior et al., 2005) ผลการวิเคราะห์คำนวณเป็นค่าที่สัมพันธ์กับสารต้านอนุมูลมาตรฐานกรดเฟอร์ูลิก (Ferulic acid) (Velioglu et al., 1998)

ข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นวิธีที่ง่ายและแม่นยำ ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ ถ้าตัวอย่างมีสารรีดิวซ์จะรบกวนการวิเคราะห์ได้ อย่างเช่น Hydrazine, Hydroxyammonium chloride, Iron ammonium sulfate, Iron sulfate, Manganese sulfate, Potassium nitrite, Sodium cyanide, Sodium metabisulfate, Sodium phosphate, Sodium sulfite, และ tin chloride บางทีทำปฏิกิริยากับสาร Folin-Ciocalteu (F-C) ได้สารสีน้ำเงินเช่นเดียวกับสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) (Ref. 8) (Huang et al., 2004; Prior et al., 2005)

4.1.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของพืชสกุล *Murdannia* วงศ์ผักปราบ (Commelinaceae) มีรายละเอียดดังนี้

จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชสกุล *Murdannia* พบว่าสารในกลุ่มไฮดรอกซีบูตาโนไลด์ (Hydroxybutaeanolide) เป็นสารหนึ่งในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) จากสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง (*M. bracteata*) ได้แก่ สารแบลกทานโนไลด์ เอ (Bracteanolide A) และสารแบลกทานโนไลด์ บี (Bracteanolide B) ร่วมกับสารไอโซไวเทกซิน (Isovitexin) สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO[•]) ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารแบลกทานโนไลด์ เอ (Bracteanolide A) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (inducible Nitric oxide synthase, iNOS) จากเซลล์แมกโครฟาจ (Macrophages) ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารทำให้เกิดการอักเสบ (Pro-Inflammatory) คือ ลิโปไลแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharides, LPS) ซึ่งเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส เป็นเอนไซม์ที่ผลิตอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide, NO[•]) ในสภาวะการอักเสบ (Wang et al., 2007) ถ้ามีการผลิตอนุมูลอิสระไนตริกออกไซด์ปริมาณมากเกินไป มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเกี่ยวกับสารสื่อกลางของการอักเสบ (Inflammatory-Mediated) รวมถึงก่อให้เกิดสภาวะการติดเชื้อจากแบคทีเรียจนกระทั่งระบบไหลเวียนเลือดล้มเหลว (Septic shock) การทำลายโครงสร้างของดีเอ็นเอ (DNA Damage) และกลไกการเกิดมะเร็ง (Carcinogenesis) (Wang et al., 2007) นอกจากนี้ ชารินี สิบปาละ (2551) ได้รายงานผลการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง (*M. bracteata*) ผักลิ้มหัวใหญ่ (*M. loriformis*) และกินกุ่มน้อย (*M. nudiflora*) พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลของหญ้าปักกิ่งมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงสุดเมื่อศึกษาด้วยวิธี DPPH วิธี FRAP และมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุดเมื่อศึกษาด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของกินกุ่มน้อยมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา लिพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation) ได้สูงสุด เมื่อศึกษาด้วยวิธี TBARS

4.2 วิธีดำเนินการศึกษา

4.2.1 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา อุปกรณ์และสารเคมี

4.2.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ส่วนเหนือดินที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์และส่วนใต้ดินของพืชแต่ละชนิดที่เก็บในช่วงฤดูการออกดอกติดผล และเก็บในช่วงเวลาที่ดอกกำลังบาน รายละเอียดดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและอ้างอิง

Samples	Code	Locality (Thailand)	Habitat	Collection Date	Voucher's no.
<i>M. edulis</i>	Me (h1)	Phu Manorum Temple, Mukdahan Province	Dried places in DF	08/10/2008	OC, SK & TT 10
<i>M. edulis</i>	Me (h2)	Ubonrat Dam, Khon Kaen Province	Dried places in DF	01/04/2009	OC, SK & TT 32
<i>M. edulis</i>	Me (h3)	Kuchinarai District, Kalasin Province	Dried places in DF	21/8/2009	OC, SK & TT 1117
<i>M. edulis</i>	Me (ab)	Ubonrat Dam, Khon Kaen Province	Dried places in DF	01/04/2009	OC, SK & TT33
<i>M. japonica</i>	Mj1	Tup Phaya Suea waterfall, Khon Kaen Province	Gallery forest in DF	25/06/2009	OC, SK & TT37
<i>M. japonica</i>	Mj2	Phra That Doi Tung Temple, Chiang Rai Province	Mountain forest	13/10/2009	TT, OC & SK 1178
<i>M. discreta</i>	Md1	Phu Rua forest, Loei Province	Gallery forest in Mountain forest	28/07/2009	OC, SK & TT 55
<i>M. discreta</i>	Md2	Doi Suthep-Pui forest, Chiang Mai Province	Gallery forest in DF	15/08/2009	OC, SK & TT 60
<i>M. discreta</i>	Md3	Doi Suthep-Pui forest, Chiang Mai Province	Dried places in DF	15/08/2009	OC, SK & TT 62
<i>M. discreta</i>	Md4	Pha Taem forest, Ubon Ratchathani Province	Dried places in DF	22/8/2009	OC, SK & TT 71
<i>M. discreta</i>	Md5	Kuchinarai District, Kalasin Province	Dried places in DF	21/8/2009	TT, OC & SK 1112
<i>M. discreta</i>	Md6	Phu Kradung forest, Loei Province	Wet places in DF	30/10/2009	TT, OC & SK 1200

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

4.2.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

96-well microtiter plate, Autopipette ขนาด 20, 100 และ 1000 ไมโครลิตร, Balance (Mettler AE 200S, PJ 3000, Switzerland), Beaker ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร, Centrifuge (Servall® Biofuge Pice, Germany), Cylinder ขนาด 10, 25 และ 100 มิลลิลิตร, Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, Erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 150 มิลลิลิตร, Evaporator (EYEL, Japan), Homogenizer, Hot air oven (Sybron Thermolyne, U.S.A.), Lyophilizer (Flexi-Dry, USA), Microplate reader (Bio-Rad, Model 680), Shaker, Test tube 16 x 125 มิลลิลิตร และ Water bath (PolyScience, Switzerland)

4.2.1.3 สารเคมี

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

Switzerland), Folin-Ciocalteu reagent (MERK, Germany), Glacial acetic acid (AJAX CHEMICALS, Australia), Hydrochloric acid (HCl), Methanol (AJAX CHEMICALS, Australia), Perchloric acid (J.T. Baker, USA), Sodium carbonate (AJAX CHEMICALS, Australia), Sodium dodecyl sulfate (SDS), Sulfuric acid (BDH, England), Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma-Aldrich, Germany) และ Trichloroacetic acid (TCA) (Sigma-Aldrich, Germany)

4.2.2 ขั้นตอนการศึกษา

4.2.2.1 การเตรียมสารสกัด

นำส่วนเหนือดินที่ไม่ใช้ในการสืบพันธุ์ (Aerial vegetative part) และส่วนใต้ดิน (Underground part) ของพืชแต่ละชนิด (ตารางที่ 13) นำมาล้างแล้วผึ่งให้แห้งจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิทเสร็จแล้วนำไปบดให้ละเอียดเป็นผงนำมาชั่งอย่างละ 5 กรัม สกัดด้วยเมทานอลและน้ำอย่างละ 20 มิลลิลิตร โดยนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรอง แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) และเครื่องระเหยแห้ง (Evaporator) เก็บไว้ในหม้อสุญญากาศ

4.2.2.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

1) การทดสอบฤทธิ์ในการจับกับสารอนุมูลอิสระที่เสถียร (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)) วิธีการทดลองคัดแปลงมาจาก Schlesier et al. (2002) และ Li et al. (2005) ทำการละลายสารสกัดด้วยเมทานอล เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 78.125-5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย DPPH ละลายในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ตูตสารละลาย DPPH ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วตูดสารสกัด 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 – well plate ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ในที่มีประมาณ 20 นาที เสร็จแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader แล้วบันทึกผล สำหรับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ Trolox แล้วคำนวณหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH' (% Scavenging) ของสารสกัด

วิธีคำนวณความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH' (% Scavenging) ของสารสกัดสามารถคำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

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

เมื่อ A คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ + เมทานอล

B คือ ค่าดูดกลืนแสงของเมทานอล

C คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

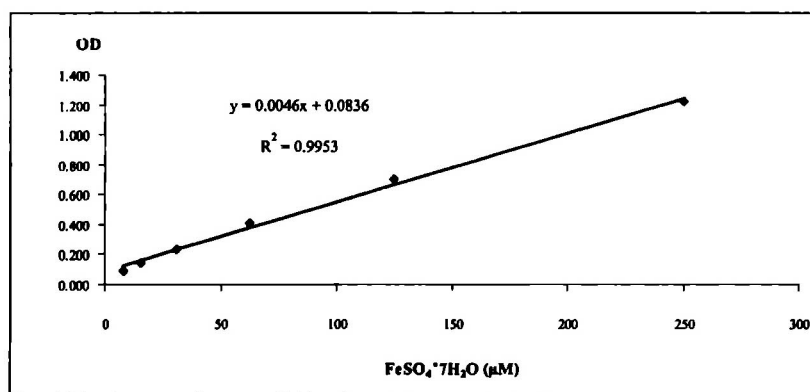
D คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH + สารสกัด

จากนั้นนำค่า % Scavenging และความเข้มข้นของสารสกัดไปสร้างกราฟ แล้วหาค่า IC_{50} (mg/ml) จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ และเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH' จากค่า IC_{50}

IC_{50} หมายถึง ความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ปริมาณของ DPPH'

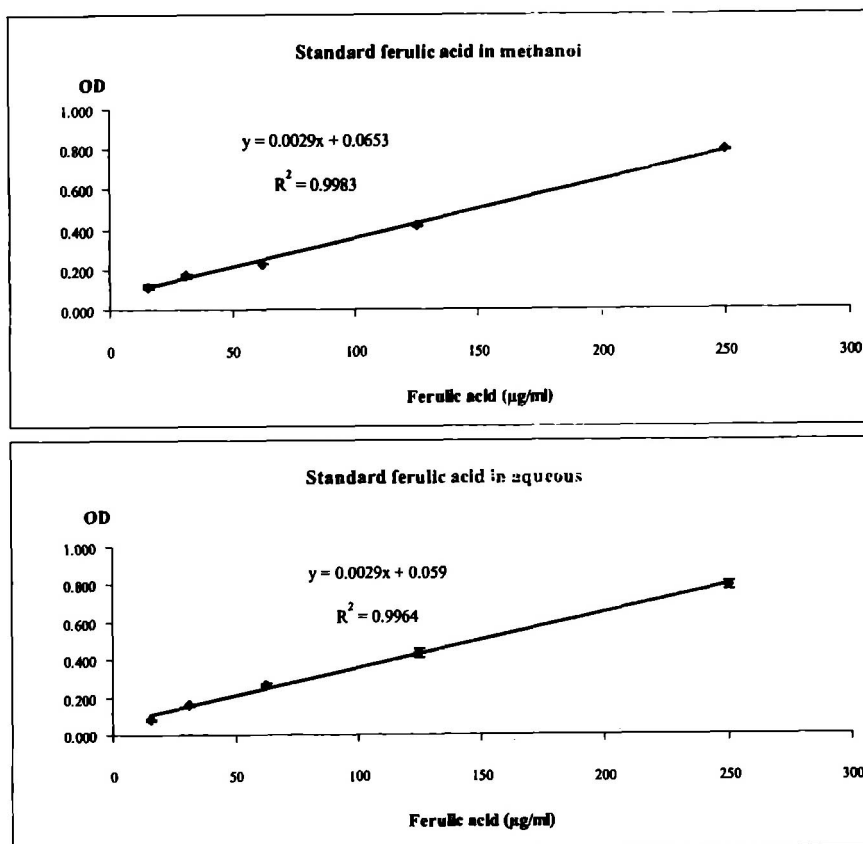
ลดลง 50%

2) การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด (Ferric reducing antioxidant power (FRAP)) วิธีการทดลองดัดแปลงมาจาก Benzie, Strain (1999) ทำการละลายสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการเตรียมสารละลาย FRAP reagent (Acetate buffer (300 มิลลิโมลาร์) : TPTZ (10 มิลลิโมลาร์ ใน 40 มิลลิโมลาร์ HCl) : FeCl_3 (20 มิลลิโมลาร์) อัตราส่วน 10 : 1 : 1) ทำการทดลองโดยดูดสารละลาย FRAP reagent 150 ไมโครลิตร และดูดสารสกัด 50 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นลงใน 96 – well plate ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader แล้วบันทึกผล และคำนวณหาความสัมพันธ์ของความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมดของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำในพืชแต่ละชนิด โดยนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดของสารสกัดไปเปรียบเทียบกับสมการเส้นตรงของกราฟของสารมาตรฐาน Ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Positive control) แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value



ภาพที่ 22 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) สำหรับหาค่า FRAP value โดยใช้ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เป็นสารมาตรฐาน ที่ค่าดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

3) การหาค่าปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก (Folin-Ciocalteu) วิธีการทดลองดัดแปลงมาจาก Singleton, Rossi (1965) ทำการเตรียมสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการเตรียมสารมาตรฐานฟีนอลิก Ferulic acid ในน้ำและเมทานอล ความเข้มข้น 31.125-250 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เจือจางสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent ลง 10 เท่า ทำการทดลองโดยเติม 200 ไมโครลิตร ของสารสกัด และ 200 ไมโครลิตร ของสารมาตรฐาน Ferulic acid แต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติม 1.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent เขย่าให้เข้ากันรอให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์โดยทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 1.5 มิลลิลิตร ของ โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) 60 กรัม/ลิตร ที่ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที ดูดสารละลายในหลอดทดลอง 200 ไมโครลิตร ใส่ 96 – well plate แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader แล้วบันทึกผล ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยใช้ น้ำและเมทานอลเป็นตัวอย่างควบคุม (Blank) แล้วคำนวณค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดของสารสกัดไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน Ferulic acid (Positive control)



ภาพที่ 23 กราฟมาตรฐาน (Calibration curve) ของ Ferulic acid (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่ค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

การหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดเทียบกับ Ferulic acid (Ferulic acid equivalents) หน่วย มิลลิกรัม/ กรัม ของสารสกัด คำนวณได้ตามสมการ

$$C = c * V/m$$

C = ปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด (มิลลิกรัม/กรัม ของสารสกัด)

c = ความเข้มข้นของ Ferulic acid ที่ได้จากกราฟของสารสกัด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

V = ปริมาตรของสารสกัด (มิลลิลิตร)

m = น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)

4) การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation) ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ขั้นแรกนำสมองหนูมาล้างด้วย Ice cold normal saline ทำให้สมองหนูเป็นเนื้อเดียวกันกับ 5 มิลลิโมลาร์ ของ Phosphate buffer (pH 7.4) (Okawa et al., 1979) วัดโปรตีน โดยวิธี Lowry ในการวัดความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid

peroxidation) ของสารสกัดจะวัดปริมาณ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) โดยใช้วิธีของ Mahakunakorn et al. (2004) และ Buege, Aust (1978) วิธีการทดลองโดยเติม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายสมองหนู (Protein content) 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 ของสารสกัดที่ต้องการทดสอบ แต่ละความเข้มข้นของหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 45 นาที เติม 50 ไมโครลิตร Butyl hydroxytoluene (BHT) (0.1 มิลลิโมลาร์) เพื่อหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เติม 0.5 มิลลิลิตร Ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA) (5 มิลลิโมลาร์) เพื่อลดผลกระทบจากโลหะอื่นๆ เติม 0.5 มิลลิลิตรของ 35% Perchloric acid เพื่อตกตะกอนโปรตีน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสมาเติม 0.5 มิลลิลิตรของ 0.6% Thiobarbituric acid ที่ละลายในกรดอะซิติก แล้วนำไปต้ม ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำสารที่ได้มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร แล้วบันทึกผล ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง การศึกษาครั้งนี้ใช้ Trolox เป็นสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน (Positive control) และใช้น้ำและเมทานอลเป็นตัวอย่างควบคุม (Blank) แล้วคำนวณหาความสามารถของสารสกัดและสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันเปอร์ออกซิเดชัน (% Inhibition)

วิธีคำนวณหาความสามารถของสารสกัดแต่ละชนิดและสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันเปอร์ออกซิเดชัน (% Inhibition) คำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_c - A_s) / A_c] * 100$$

เมื่อ A_c คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม

A_s คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารสกัดที่นำมาศึกษา

จากนั้นนำค่า % Inhibition และความเข้มข้นของสารสกัด ไปสร้างกราฟแล้วหาค่า IC_{50} (mg/ml) จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ

IC_{50} หมายถึง ความเข้มข้นของ Lipid peroxidation ที่ลดลง 50%

4.2.1.3 การวิเคราะห์ด้วยสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวนทางเดียว (Analysis of Variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for Social Science, SPSS/PC+) version 11.5 โดยใช้วิธี Duncan's Multiple Range Test, DMRT เปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกของพืชแต่ละชนิด เปรียบเทียบความสามารถระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำด้วยการทดสอบสองค่า (T-Test) และหาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านออกซิเดชันกับปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกด้วยการทดสอบ Pearson Correlation ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (กำหนดระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติ p -value < 0.05)

4.3 ผลการศึกษาและอภิปราย

4.3.1 การทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เสถียร 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH assay)

ในการทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระที่เสถียรของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิด และสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox โดยทำการทดสอบกับอนุมูลอิสระที่เสถียรคือ DPPH ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่

วัดความสามารถของสารทดสอบในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH[•] ให้กลายเป็นสารที่เสถียรและไม่เป็นอนุมูลอิสระต่อไป กล่าวคืออนุมูลอิสระ DPPH[•] เมื่อละลายในเมทานอลจะมีสีม่วงเข้มให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร แต่เมื่อได้รับอิเล็กตรอนแล้วจะกลายเป็นสารสีเหลืองอ่อนทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิด และสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ตามความเข้มข้น และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณค่า IC₅₀ (ตารางที่ 14 และ 15) พบว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีที่สุดคือ Trolox (IC₅₀ = 18.10 ± 0.09 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยพบว่า

4.3.1.1 ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 14, ภาพที่ 24 และ 25)

สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] แตกต่างกันได้ ซึ่งมีค่า IC₅₀ ตั้งแต่ 78.858 ± 3.069 – 1122.064 ± 27.215 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดย Me (h3) > Md3, Me (ab), Md5, Me (h1) > Md4 > Me (h2) > Md6 > Md1, Mj1 > Mj2 > Md2

สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] แตกต่างกันได้ ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 386.462 ± 11.438 - 4452.043 ± 27.530 โดย Me (ab) > Md6 > Me (h1), Me (h3) > Md5 > Me (h2) > Md4 > Md1 > Mj1 > Md2 > Md3 > Mj2

นอกจากนี้ สกัดด้วยเมทานอลของพืชทั้ง 4 ชนิด ยังมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีกว่าเมื่อสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05)

4.3.1.2 ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 15, ภาพที่ 24 และ 25)

สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] แตกต่างกันได้ ซึ่งมีค่า IC₅₀ ตั้งแต่ 134.292 ± 4.391 - 1137.744 ± 5.053 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดย Me (h1) > Me (ab) > Mj2 > Md4 > Me (h3) > Me (h2) > Mj1 > Md6 > Md2 > Md5 > Md1

สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] แตกต่างกันได้ ซึ่งมีค่า IC₅₀ ตั้งแต่ 416.480 ± 10.604 - 3147.963 ± 42.567 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดย Me (h1) > Md4 > Mj1 > Mj2, Md1 > Me (h3) > Md6 > Md2 > Md5 > Me (ab) > Me (h2)

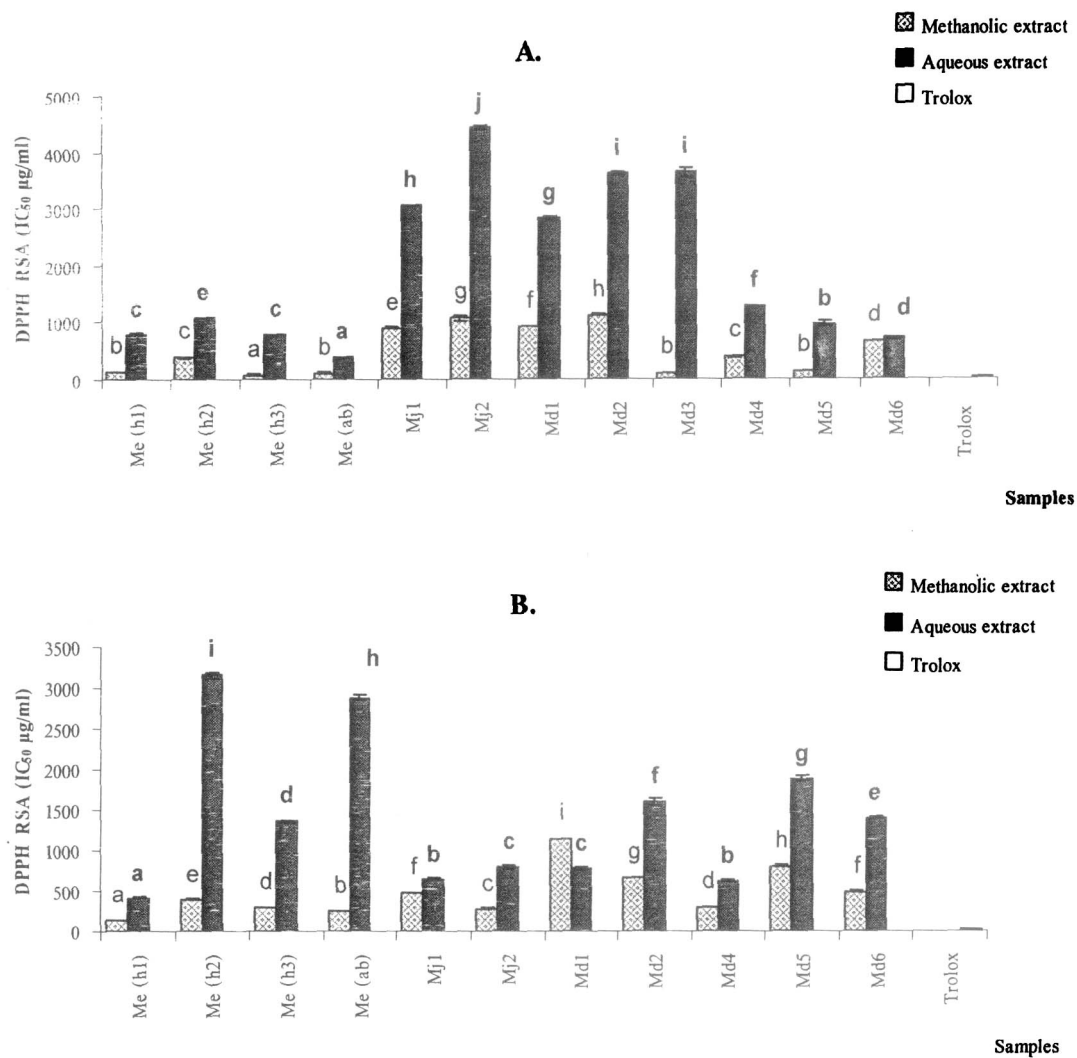
นอกจากนี้ สกัดด้วยเมทานอลของพืชทั้ง 3 ชนิด ยังมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีกว่าเมื่อสกัดด้วยน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ยกเว้น Md1

4.3.1.3 การเปรียบเทียบระหว่างส่วนเหนือดิน และส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 14 และ 15, ภาพที่ 26)

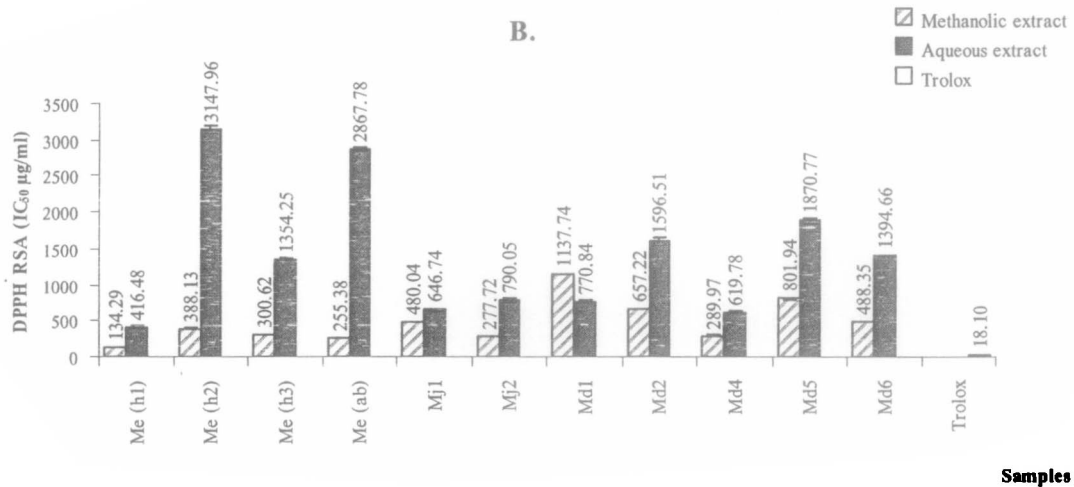
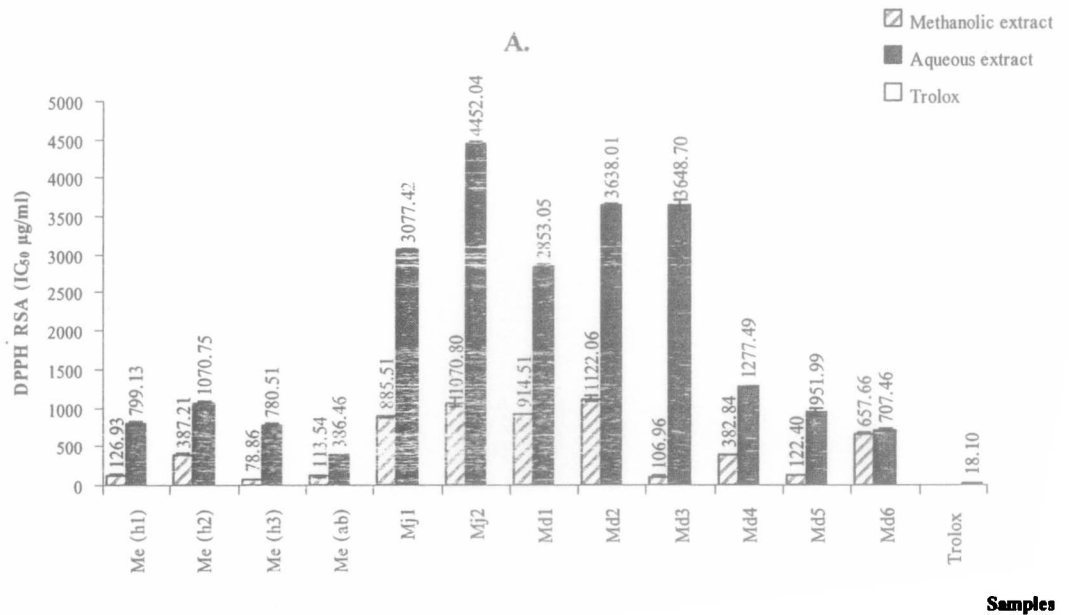
สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ Md4, Md 6, Mj1, Md2 และ Mj2 มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีกว่าส่วนเหนือดิน ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ยกเว้น Me (h1) และ Me (h2) ที่ไม่มีความแตกต่างระหว่างส่วนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value > 0.05) ส่วนสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ Me (h3), Me (ab), Md1 และ Md5 มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีกว่าส่วนใต้ดินซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05)

สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดินของ Me (h1), Mj1, Mj2, Md1, Md2 และ Md4 มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีกว่าส่วนเหนือดินซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05)

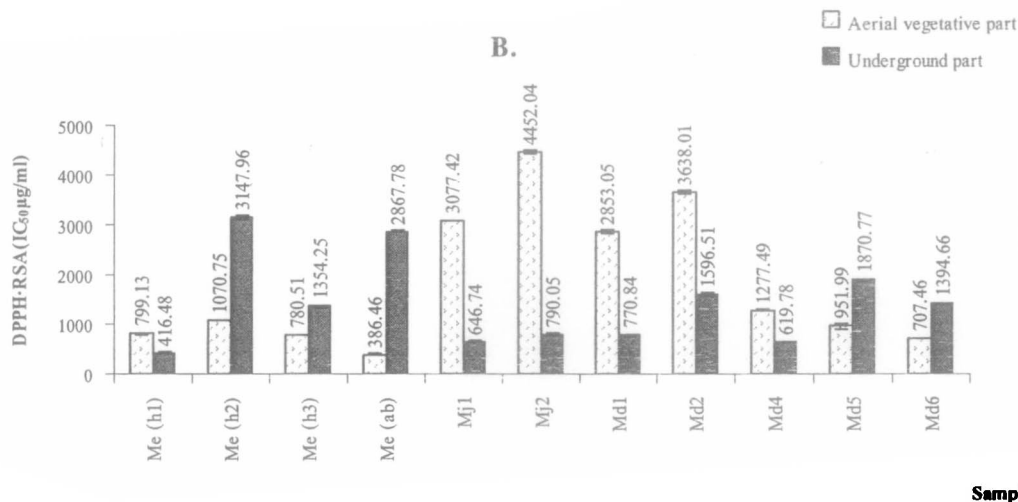
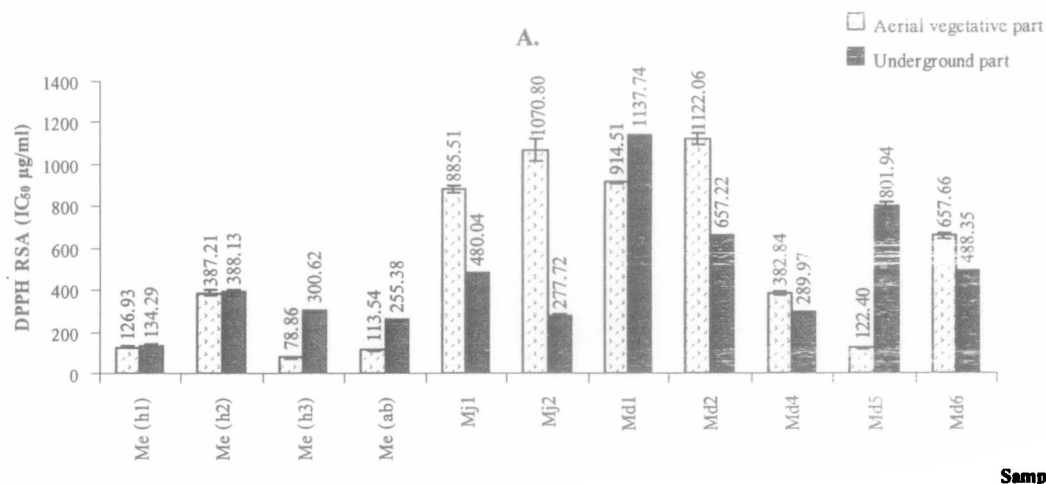
ส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินของ Me (h2), Me (h3), Me (ab), Md5 และ Md6 มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีกว่าส่วนใต้ดิน ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05)



ภาพที่ 24 แสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) เปรียบเทียบระหว่างชนิด A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน



ภาพที่ 25 แสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน



ภาพที่ 26 แสดงค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* เปรียบเทียบระหว่างส่วนเหนือดินและใต้ดิน โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) A. สกัดด้วยเมทานอล B. สกัดด้วยน้ำ

4.3.2 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด (Ferric reducing antioxidant power, FRAP assay)

วิธี FRAP เป็นการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด โดยหาความสามารถในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนของสารทดสอบ (Reducing activity) สำหรับการทดลองครั้งนี้ใช้สารประกอบเชิงซ้อน Fe^{III} -TPTZ เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชันจะเปลี่ยนเป็น Fe^{II} -TPTZ ซึ่งมีสีน้ำเงินเข้ม มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากผลการทดลองสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิด

สามารถรีดิวซ์โลหะเหล็ก Fe^{3+} ให้เป็น Fe^{2+} ซึ่งพบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิด แสดงคุณสมบัติเป็น Reducing agent ได้ โดยพบว่า

4.3.2.1 ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 14, ภาพที่ 27 และ 28)

สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิด มีค่า Reducing activity เป็นค่า FRAP value แตกต่างกัน ตั้งแต่ $0.165 \pm 0.003 - 0.762 \pm 0.006 \mu\text{mole } Fe^{2+}/\text{mg extract}$ โดย $Md3 > Me(ab) > Md5 > Me(h3) > Md4 > Me(h1) > Mj1, Me(h2) > Mj2 > Md2 > Md1 > Md6$

สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิด มีค่า Reducing activity เป็นค่า FRAP value แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าตั้งแต่ $0.191 \pm 0.003 - 0.656 \pm 0.023 \mu\text{mole } Fe^{2+}/\text{mg extract}$ โดย $Me(h3) > Me(h1) > Md5 > Me(ab) > Me(h2) > Md4 > Mj1, Md3 > Md2 > Md6 > Md1 > Mj2$

เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิด พบว่า ส่วนใหญ่สารที่สกัดด้วยน้ำจะมีค่า FRAP value สูงกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) ยกเว้นสารสกัดด้วยเมทานอลของ $Me(ab)$, $Mj2$, $Md3$ และ $Md5$ จะมีค่า FRAP value สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$)

4.3.2.2 ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 15, ภาพที่ 27 และ 28)

สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิด มีค่า Reducing activity เป็นค่า FRAP value แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าตั้งแต่ $0.156 \pm 0.002 - 0.642 \pm 0.011$ โดย $Mj2 > Md4 > Me(ab) > Me(h2), Me(h1) > Md2 > Me(h3) > Md6, Mj1 > Md5 > Md1$

สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิด มีค่า Reducing activity เป็นค่า FRAP value แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าตั้งแต่ $0.164 \pm 0.007 - 0.577 \pm 0.018$ โดย $Me(ab) > Me(h1) > Mj2 > Md5 > Mj1 > Me(h3) > Md1 > Md6 > Md2 > Me(h2) > Md4$

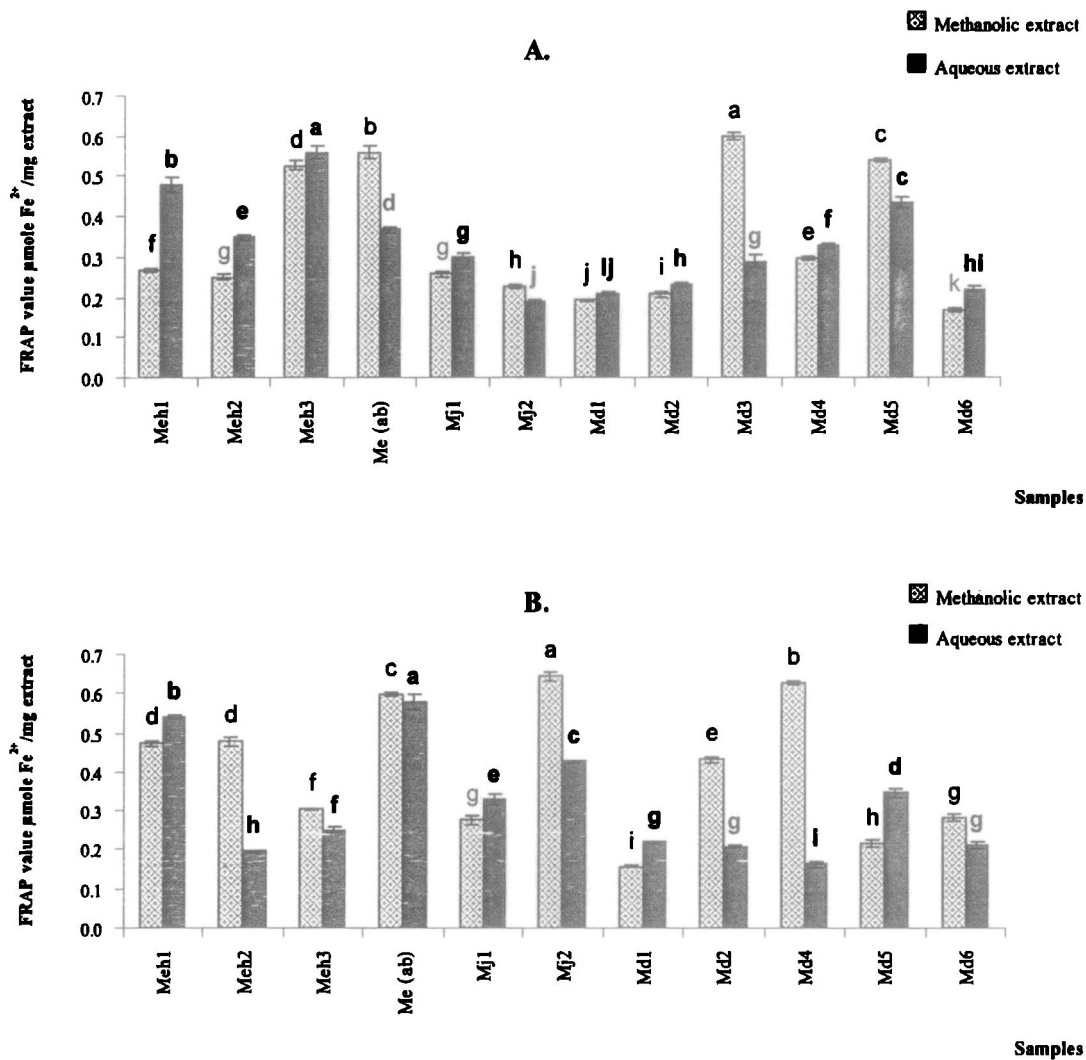
เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิด พบว่า ส่วนใหญ่สารที่สกัดด้วยเมทานอลจะมีค่า FRAP value สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) ยกเว้น $Me(ab)$ แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} > 0.05$) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของ $Me(h1)$, $Mj1$, $Md1$ และ $Md5$ จะมีค่า FRAP value สูงกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล ซึ่งมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$)

4.3.2.3 การเปรียบเทียบส่วนเหนือดิน และส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 29)

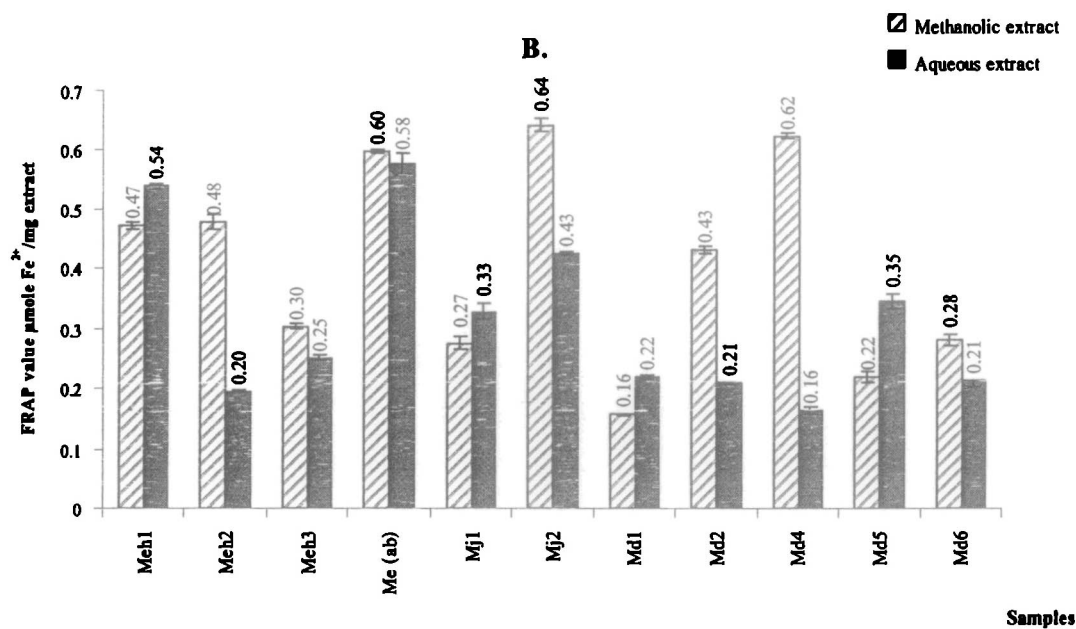
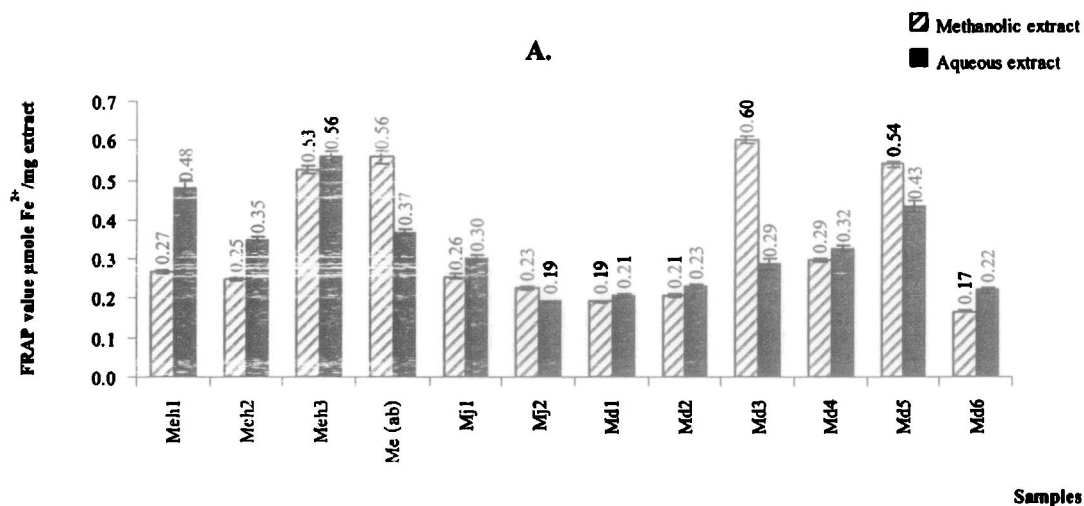
สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของพืชทั้ง 3 ชนิด จะมีค่า FRAP value สูงกว่าสารสกัดจากส่วนเหนือดิน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) ยกเว้นสารสกัดของ $Me(h3)$, $Md1$ และ $Md5$ ที่ส่วนเหนือดินมีค่า FRAP value สูงกว่าสารสกัดจากส่วนใต้ดิน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$)

สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดินของ $Me(h1)$, $Me(ab)$, $Mj1$, $Mj2$ และ $Md1$ จะมีค่า FRAP value สูงกว่าสารสกัดจากส่วนเหนือดิน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) ส่วนสารสกัดจากส่วนเหนือดินของ $Me(h2)$, $Me(h3)$, $Md2$, $Md4$ และ $Md5$ จะมีค่า FRAP value สูงกว่าสารสกัดจากส่วน

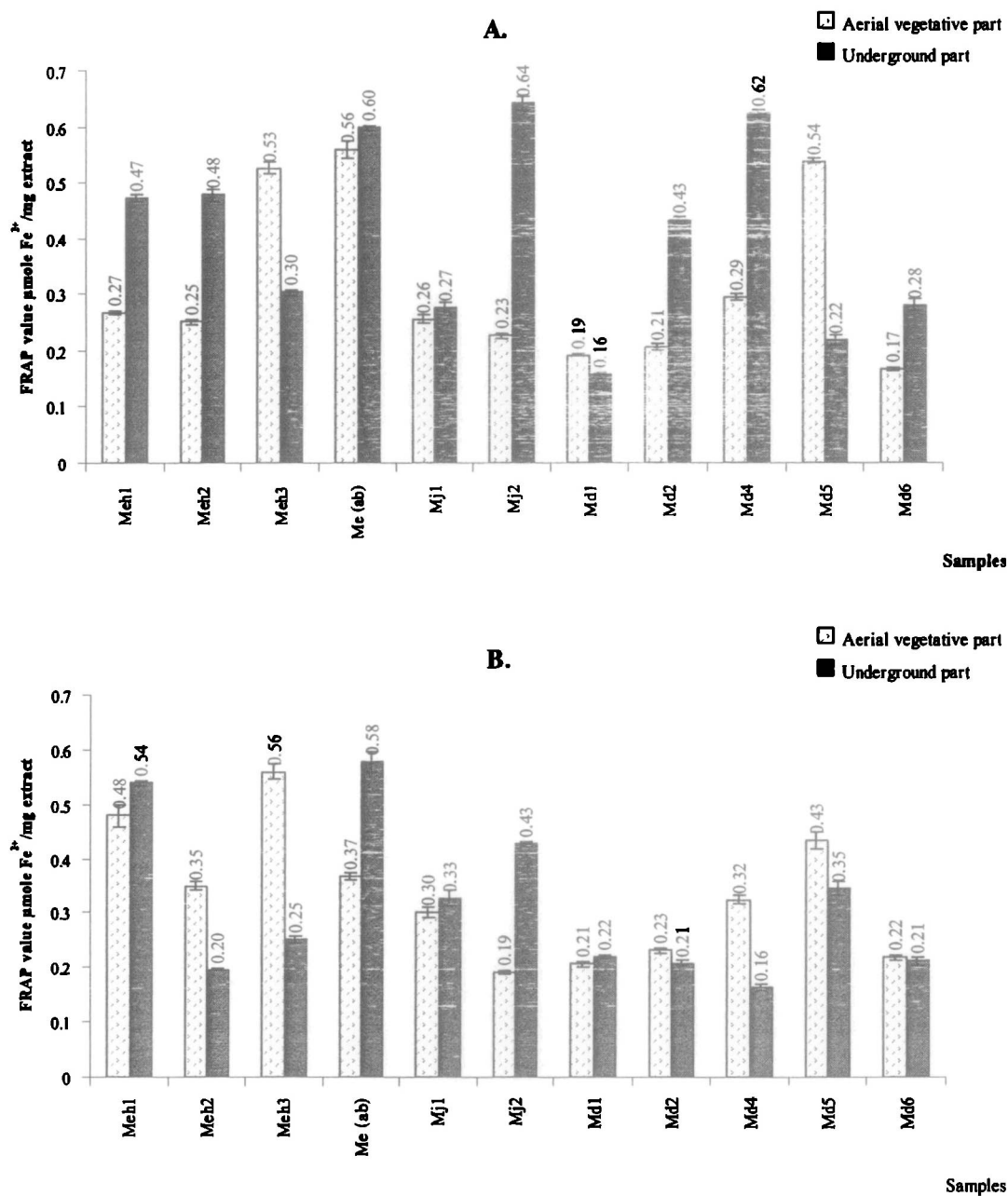
ได้คินซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -values < 0.05 ยกเว้น Md6 จะมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value > 0.05))



ภาพที่ 27 ค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) ของค่า FRAP value ($\mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$) ของสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* เปรียบเทียบระหว่างชนิด A. ส่วนเหนือคิน B. ส่วนใต้คิน



ภาพที่ 28 ค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) ของค่า FRAP value ($\mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$) ของสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน



ภาพที่ 29 ค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) ของค่า FRAP value ($\mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$) เปรียบเทียบระหว่างสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* เปรียบเทียบระหว่างส่วนเหนือดินและใต้ดิน
A. สกัดด้วยเมทานอล B. สกัดด้วยน้ำ

4.3.3 การหาค่าปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก (Folin-Ciocalteu assay)

4.3.3.1 ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 14, ภาพที่ 30 และ 31)

ผลการศึกษาในการหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก (Total phenolic content, TPC) ด้วยวิธีของ Folin-Ciocalteu ของสารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกัน โดยมีค่าตั้งแต่ 5.733 ± 0.105 - 107.914 ± 2.206 มิลลิกรัม/กรัม ของสารสกัด โดย $Md3 > Me(ab) > Me(h1) > Md4 > Me(h2) > Md5 > Me(h3) > Mj2 > Md6$, $Mj1 > Md1$, $Md2$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกัน โดยมีค่าตั้งแต่ 3.513 ± 0.080 - 103.448 ± 0.745 มิลลิกรัม/กรัม ของสารสกัด โดย $Me(h3) > Me(ab) > Me(h2) > Me(h1) > Md5 > Md4 > Md1 > Md3 > Mj1 > Md2$, $Mj2$, $Md6$

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดด้วยเมทานอลของ $Me(h1)$, $Me(h2)$, $Me(ab)$, $Mj2$, $Md2$, $Md3$, $Md4$, $Md5$ และ $Md6$ จะมีปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าเมื่อสกัดด้วยน้ำ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของ $Me(h3)$, $Mj1$ และ $Md1$ จะมีปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าเมื่อสกัดด้วยเมทานอล ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -values < 0.05)

4.3.3.2 ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 15, ภาพที่ 30 และ 31)

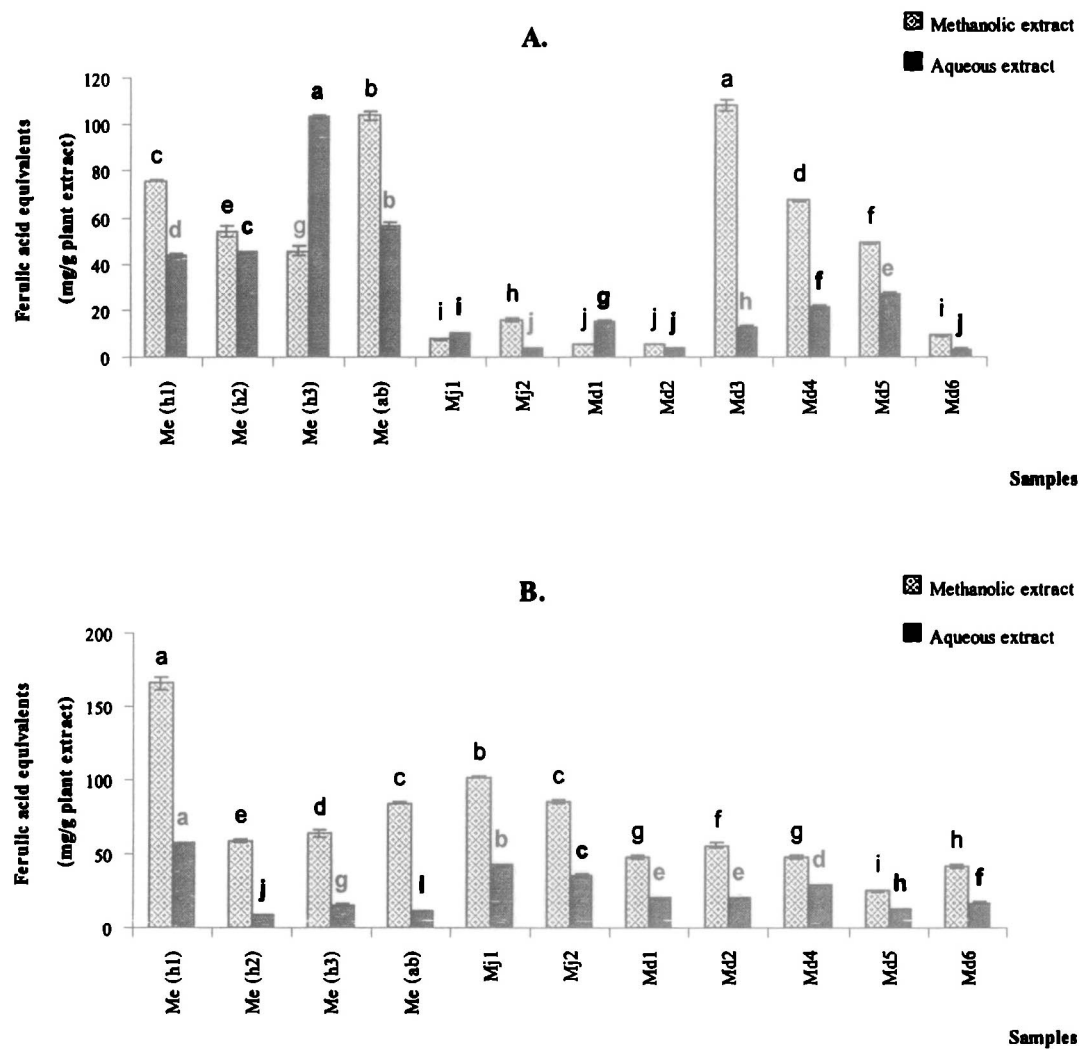
ผลการศึกษาในการหาปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิก (Total Phenolic Content, TPC) ด้วยวิธีของ Folin-Ciocalteu ของสารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกัน โดยมีค่าตั้งแต่ 24.379 ± 0.488 - 166.017 ± 4.561 มิลลิกรัม/กรัม ของสารสกัด โดย $Me(h1) > Mj1 > Mj2$, $Me(ab) > Me(h3) > Me(h2) > Md2 > Md1$, $Md4 > Md6 > Md5$ ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิดมีค่า TPC แตกต่างกัน โดยมีค่าตั้งแต่ 8.621 ± 0.172 - 57.069 ± 0.862 โดย $Me(h1) > Mj1 > Mj2 > Md4 > Md2$, $Md1 > Md6 > Me(h3) > Me(h3) > Md5 > Me(ab) > Me(h2)$

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำในพืชทั้ง 4 ชนิดพบว่าสารที่สกัดด้วยเมทานอลจะมีปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าเมื่อสกัดด้วยน้ำ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05)

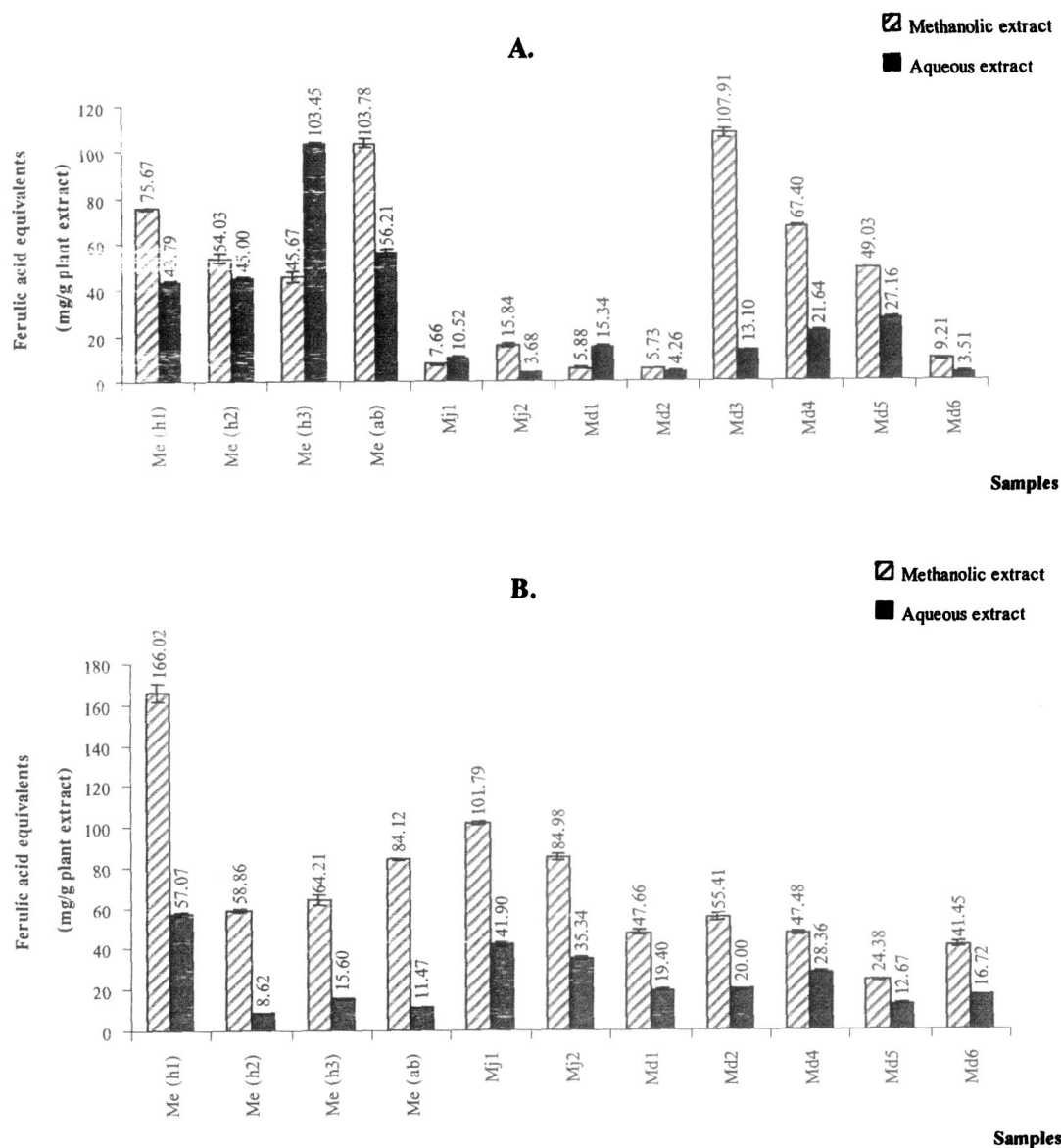
4.3.3.3 การเปรียบเทียบส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 14 และ 15, ภาพที่ 32)

สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ $Me(h1)$, $Me(h2)$, $Me(h3)$, $Mj1$, $Mj2$, $Md1$, $Md2$ และ $Md6$ มีปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าส่วนเหนือดินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ $Me(ab)$, $Md4$ และ $Md5$ มีปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าส่วนใต้ดินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05)

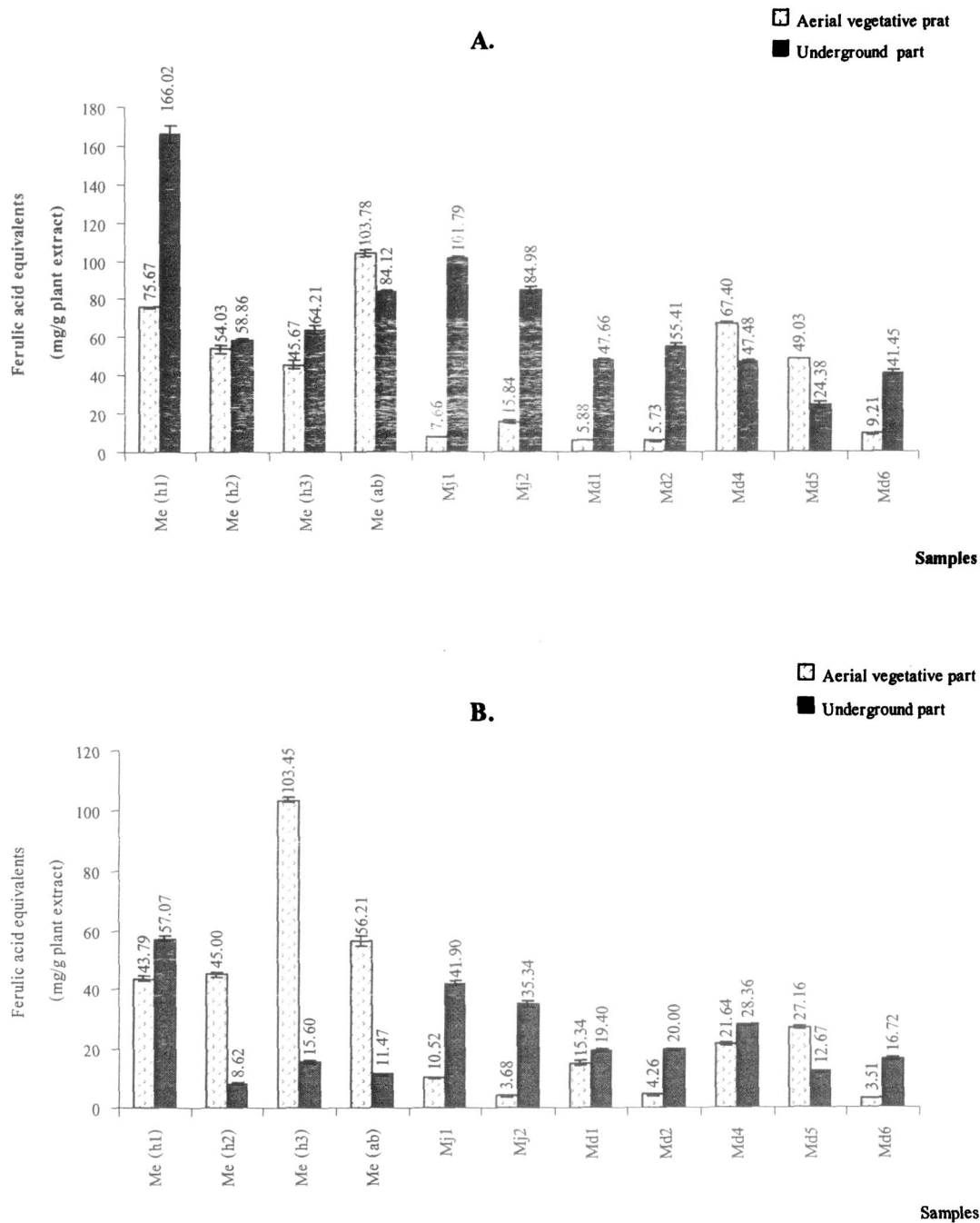
สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดินของ $Me(h1)$, $Mj1$, $Mj2$, $Md1$, $Md2$, $Md4$ และ $Md6$ มีปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าส่วนเหนือดินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินของ $Me(h2)$, $Me(h3)$, $Me(ab)$ และ $Md5$ มีปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่าส่วนใต้ดินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05)



ภาพที่ 30 แสดงค่าเปรียบเทียบปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) เปรียบเทียบระหว่างชนิด
A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน



ภาพที่ 31 แสดงค่าเปรียบเทียบปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน



ภาพที่ 32 แสดงค่าเปรียบเทียบปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica*, *M. discreta* และ *M. bracteata* โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) เปรียบเทียบระหว่างส่วนเหนือดินและใต้ดิน A. สกัดด้วยเมทานอล B. สกัดด้วยน้ำ

4.3.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี Thiobarbituric Acid

Reactive Substance (TBARS Assay)

วิธี TBARS เป็นการวัดปริมาณ Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน การทดลองครั้งนี้ใช้ Fe^{2+} -Ascorbate เหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในสมองหนู ซึ่งสาร MDA ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ TBA ที่อุณหภูมิสูงแล้วให้สาร TBARS ที่มีสีชมพู ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้จะทำให้การเกิด MDA ลดลงและพบค่าดูดกลืนแสงลดลง จากการทดลองพบว่าสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox สามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันตามความเข้มข้นมีค่า $\text{IC}_{50} = 0.290 \pm 0.004$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ตามความเข้มข้นเช่นเดียวกัน เมื่อนำไปคำนวณค่า IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) พบว่า

4.3.4.1 ส่วนเหนือดิน (ตารางที่ 14, ภาพที่ 33, 34)

สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิด จะมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ $4.09 \pm 0.001 - 17.96 \pm 0.502$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย $\text{Me (ab)} > \text{Md2} > \text{Md4} > \text{Me (h3)} > \text{Md1} > \text{Mj1, Mj2, Me (h1)} > \text{Me (h2)} > \text{Md6} > \text{Md5}$

สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิด จะมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ $0.45 \pm 0.007 - 4.72 \pm 0.018$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย $\text{Md2} > \text{Me (h1)} > \text{Md4, Me (ab)} > \text{Md6} > \text{Md1} > \text{Mj1} > \text{Md5} > \text{Me (h3)} > \text{Mj2} > \text{Me (h2)}$

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบสารที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเมทานอล พบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำของพืชทั้ง 4 ชนิดนั้นจะมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่า ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$)

4.3.4.2 ส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 15, ภาพที่ 33, 34)

สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ $1.69 \pm 0.017 - 11.02 \pm 0.463$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย $\text{Me (h2)} > \text{Me (h1), Mj2} > \text{Me (ab), Md4} > \text{Mj1} > \text{Md1} > \text{Me (h3)} > \text{Md5} > \text{Md2} > \text{Md6}$

สารสกัดด้วยน้ำของพืชแต่ละชนิด จะมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้แตกต่างกัน ซึ่งมีค่า IC_{50} ตั้งแต่ $1.40 \pm 0.046 - 6.68 \pm 0.23$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดย $\text{Me (ab), Md4} > \text{Me (h3)} > \text{Me (h1)} > \text{Md2} > \text{Mj1} > \text{Me (h2)} > \text{Md5} > \text{Md1} > \text{Md6} > \text{Mj2}$

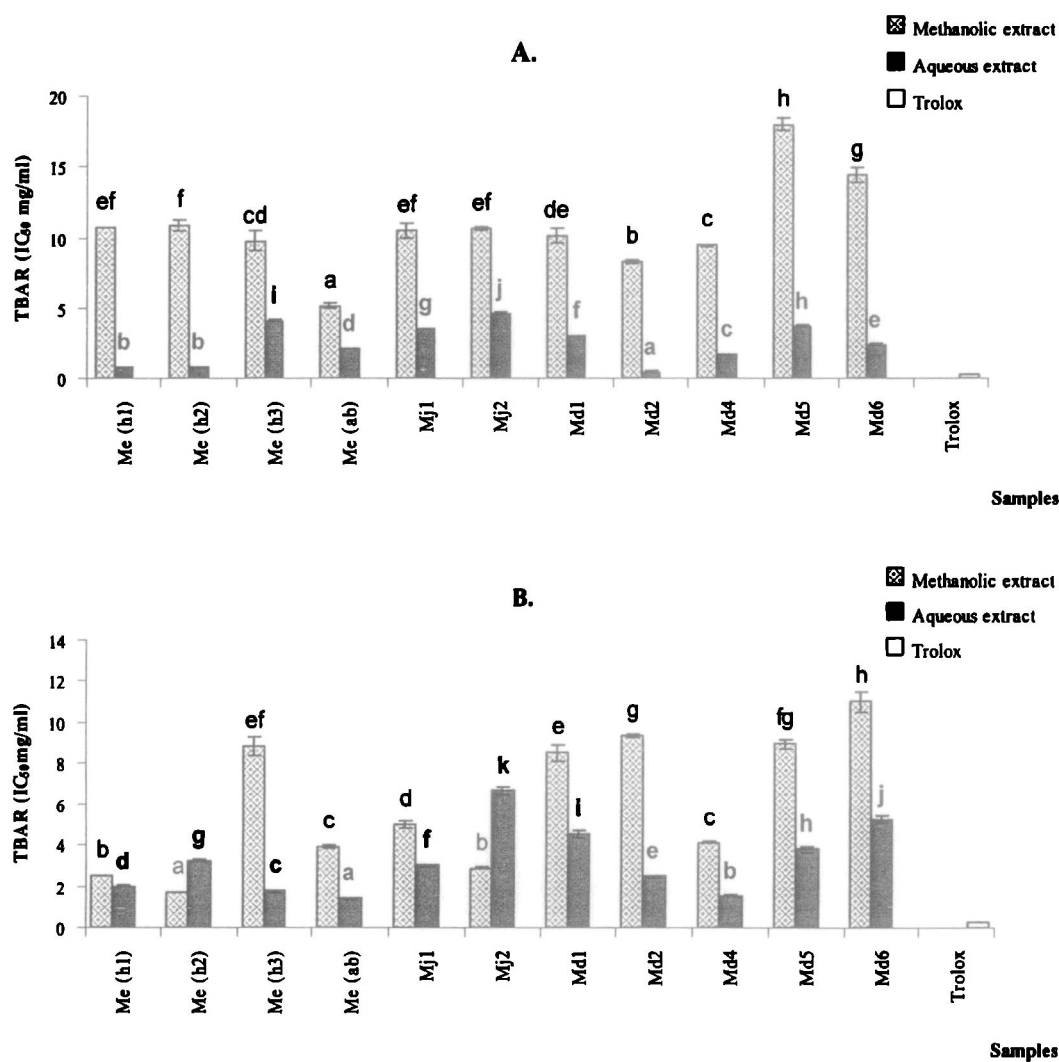
นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบสารที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเมทานอล พบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิดนั้นจะมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่า ยกเว้น Me (h) และ Mj2 ที่สารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$)

4.3.4.3 การเปรียบเทียบส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 14 และ 15, ภาพที่ 35)

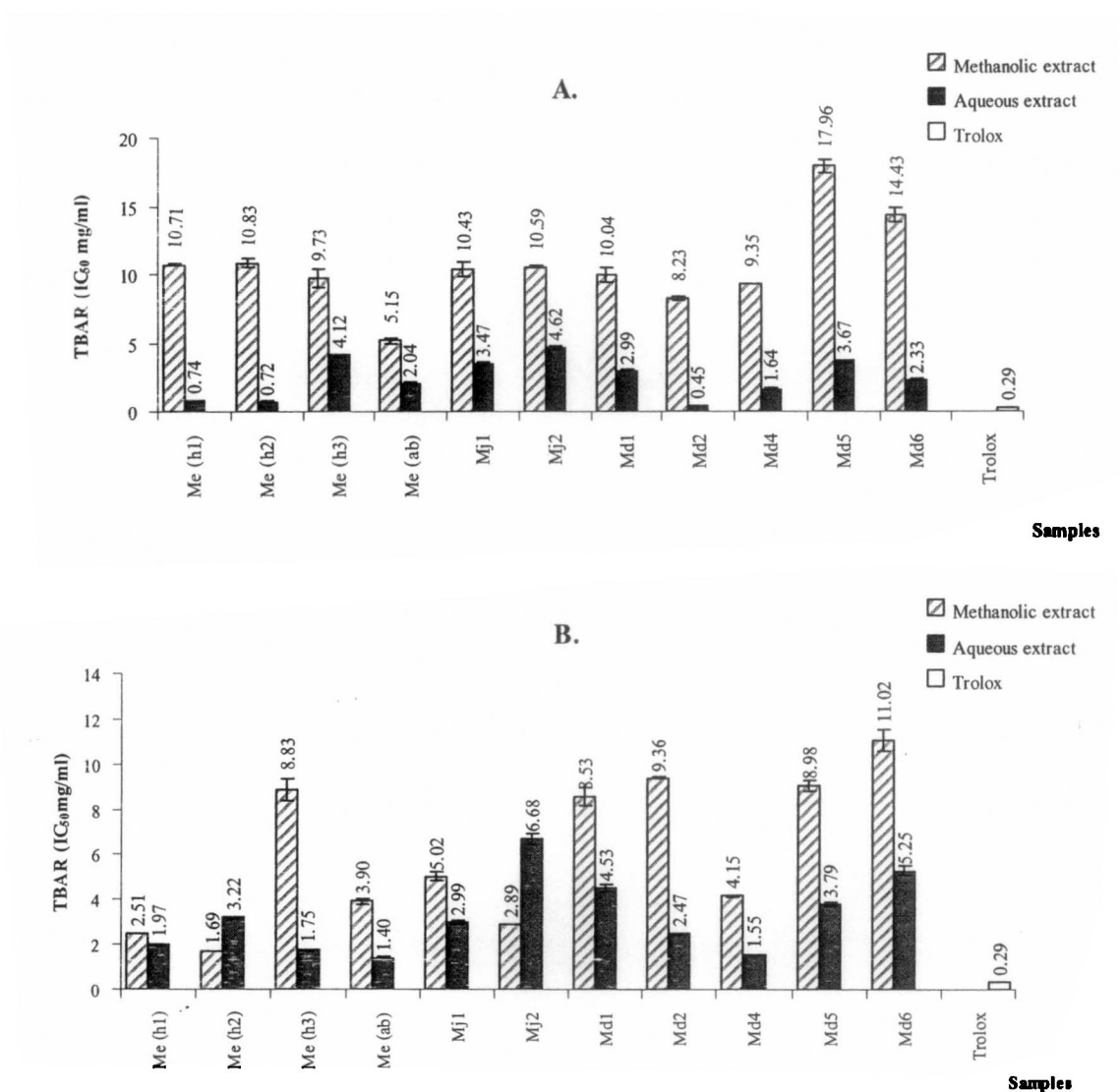
สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ $\text{Me (h1), Me (h2), Me (h3), Mj1, Mj2, Md2, Md4}$ และ Md5 มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าส่วนเหนือดินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$) ยกเว้น Me (h3) มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} > 0.05$) และสาร

สกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ Md2 มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าส่วนใต้ดิน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05)

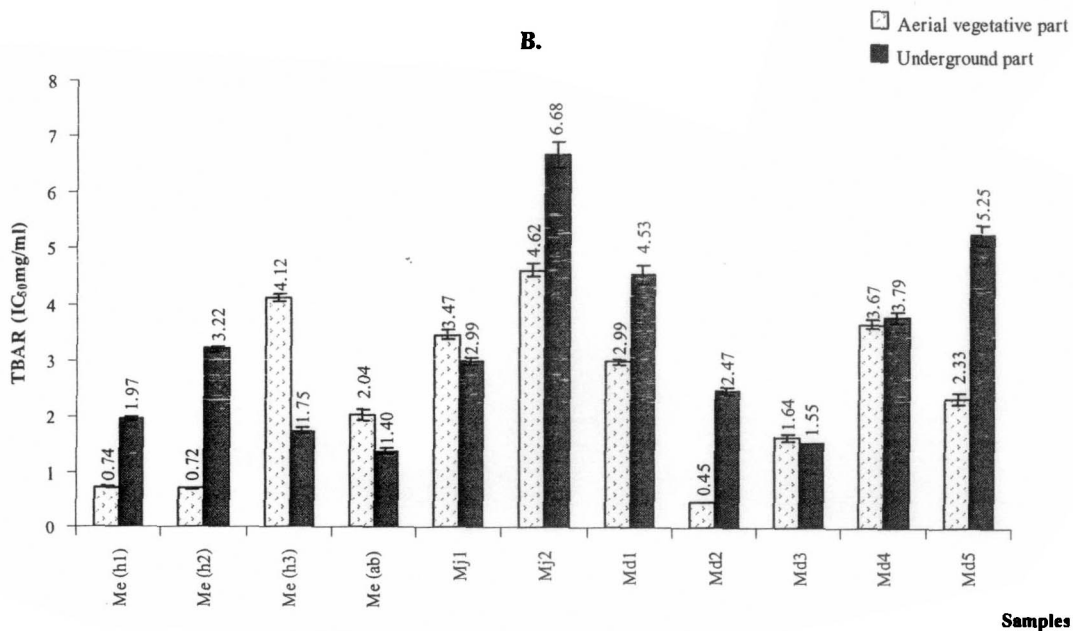
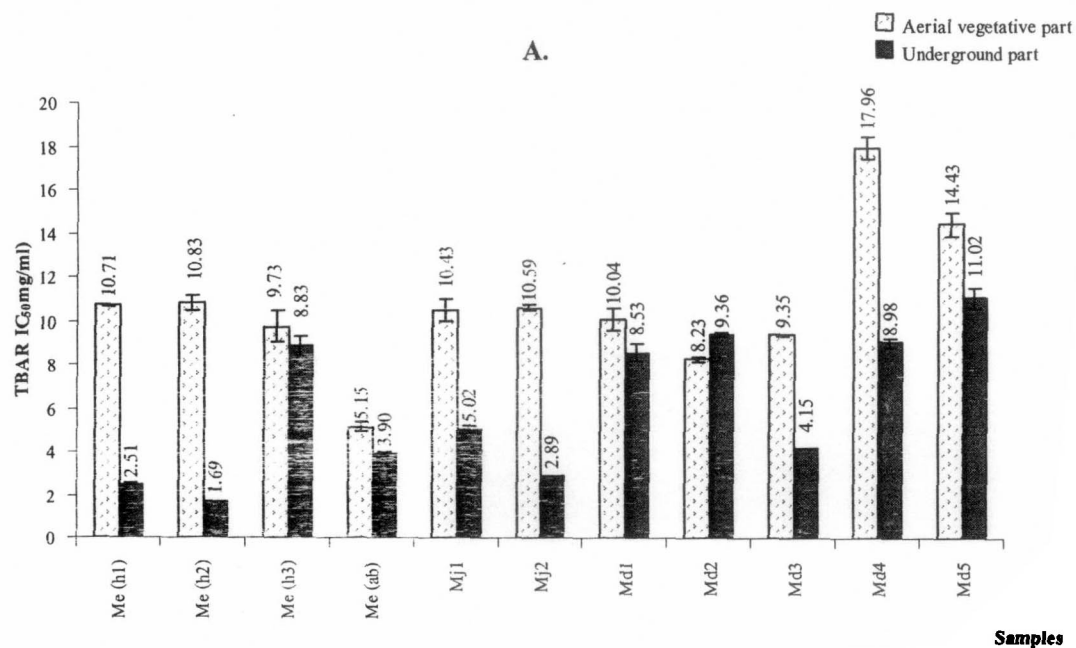
สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดินของ Me (h3), Me (ab) และ Mj1 มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าส่วนเหนือดินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value < 0.05) ยกเว้น Md4 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value > 0.05) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินของ Me (h1), Me (h2), Mj2, Md1, Md2 และ Md6 มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีกว่าส่วนใต้ดิน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้น Md5 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p -value > 0.05)



ภาพที่ 33 IC₅₀ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในสมอหนูของสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica*, *M. discreta* และ *M. bracteata* โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 3$)เปรียบเทียบระหว่างชนิด A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน



ภาพที่ 34 IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันในสมองหนูของสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 3$) เปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ A. ส่วนเหนือดิน B. ส่วนใต้ดิน



ภาพที่ 35 IC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนูของสารสกัด *Murdannia edulis*, *M. japonica* และ *M. discreta* โดยแสดงค่า Mean $\pm$ SD ($n = 4$) เปรียบเทียบระหว่างส่วนเหนือดินและใต้ดิน A. สกัดด้วยเมทานอล B. สกัดด้วยน้ำ

4.3.5 ผลการหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับฤทธิ์ต้านออกซิเจน

4.3.5.1 การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•]

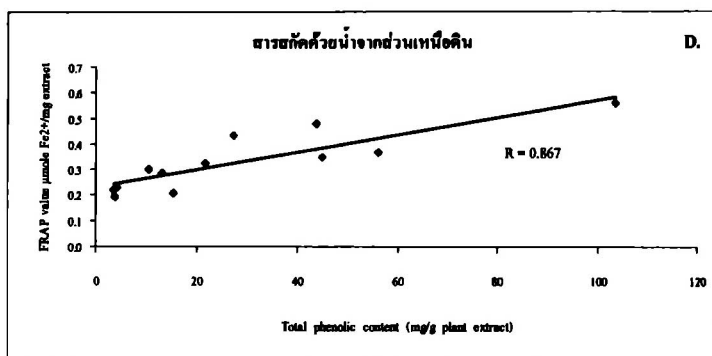
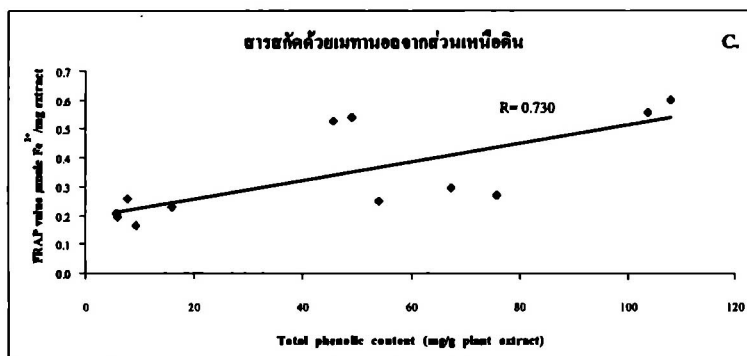
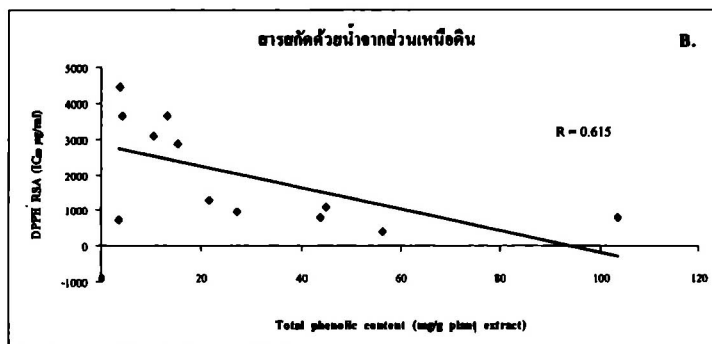
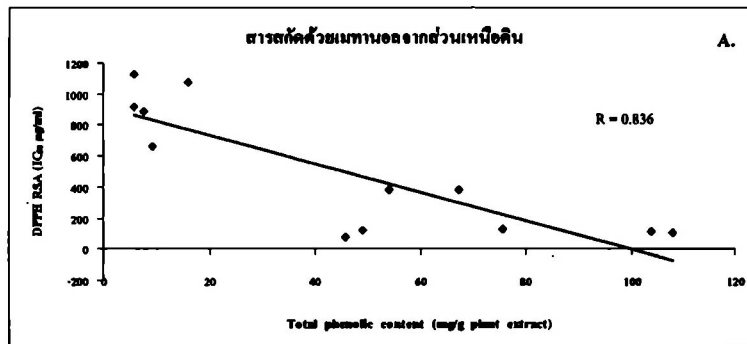
จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.836 (ภาพที่ 36, A.) สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.615 (ภาพที่ 36, B) สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.592 (ภาพที่ 37, A) สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.637 (ภาพที่ 37, B) โดยทั้งหมดมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p -value < 0.05) คือ ถ้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง จะมีค่า IC_{50} ต่ำ ซึ่ง ค่า IC_{50} ต่ำ หมายถึงว่า มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ที่ดี

4.3.5.2 การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์ ทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay

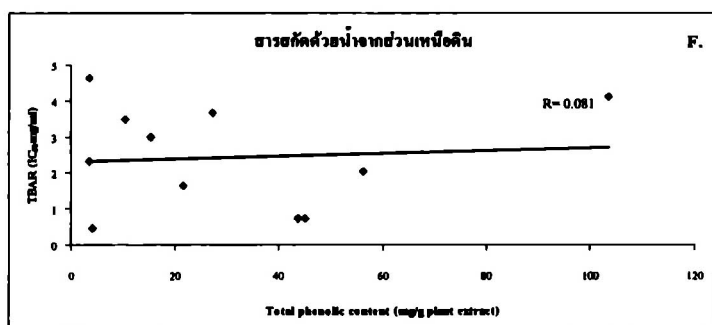
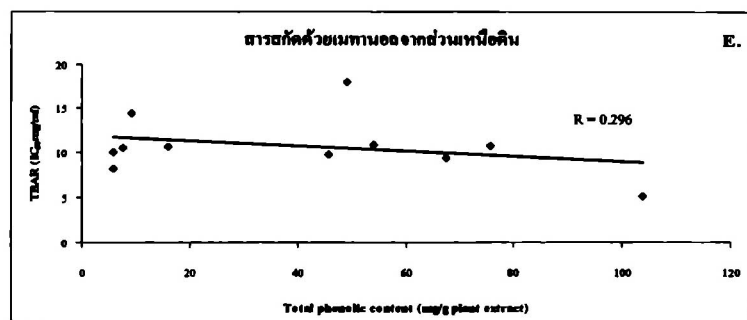
จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.730 (ภาพที่ 36, C.) และสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.867 (ภาพที่ 36, D.) โดยมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p -value < 0.05) ส่วนสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.418 (ภาพที่ 37, C.) และสารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.435 (ภาพที่ 37, D.) โดยมีความสัมพันธ์กันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p -value > 0.05) คือ ถ้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง จะมีความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์สูง

4.3.5.3 การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดกับความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ TBAR assay

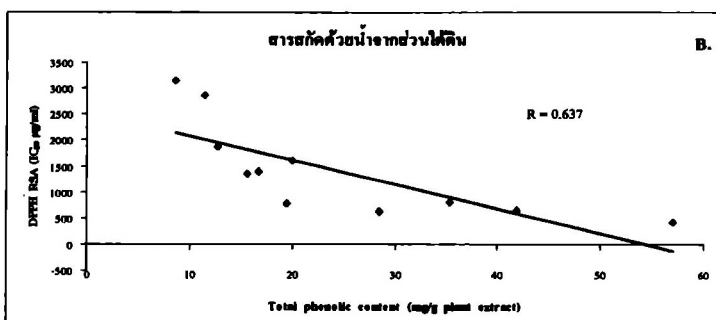
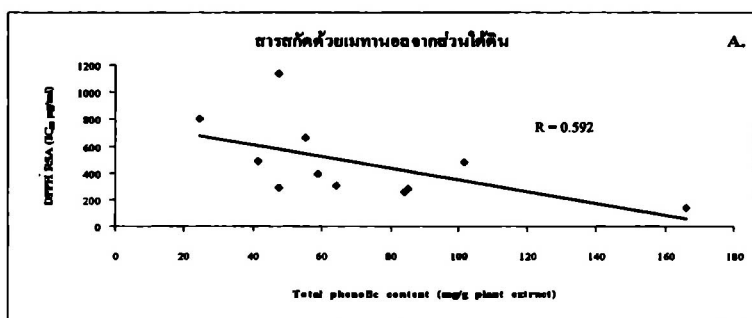
จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.296 (ภาพที่ 36, E.) สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.081 (ภาพที่ 36, F) สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.592 (ภาพที่ 37, E.) สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนใต้ดินมีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.010 (ภาพที่ 37, F.) โดยทั้งหมดมีความสัมพันธ์กันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p -value > 0.05) คือ ถ้ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง จะมีค่า IC_{50} ต่ำ ซึ่ง ค่า IC_{50} ต่ำ หมายถึงว่า มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดี



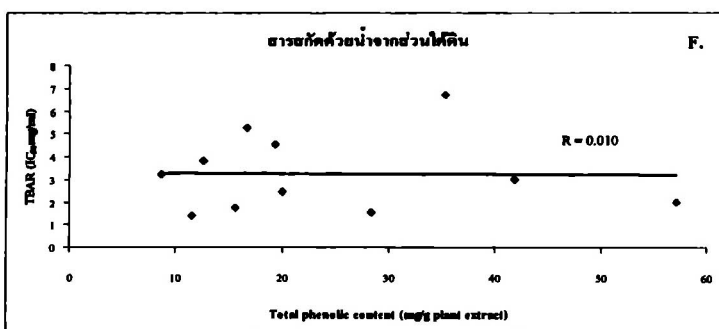
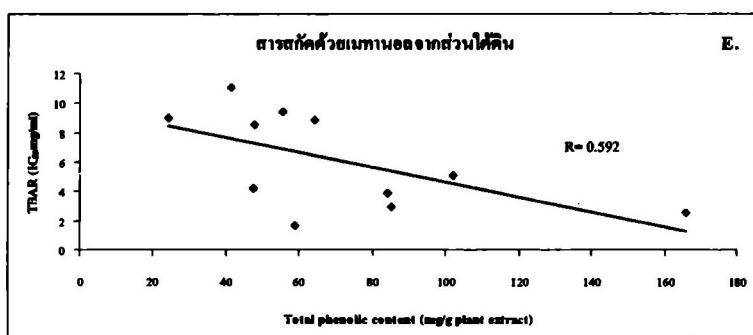
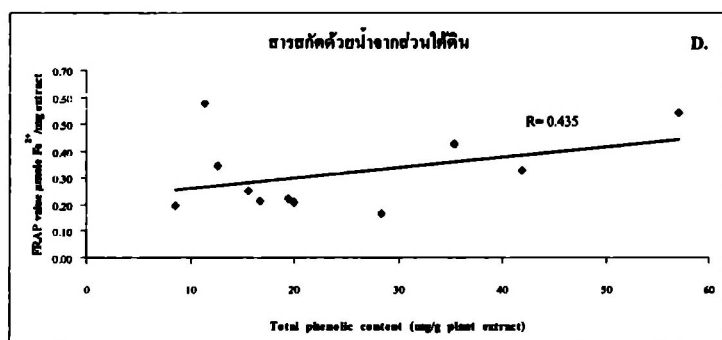
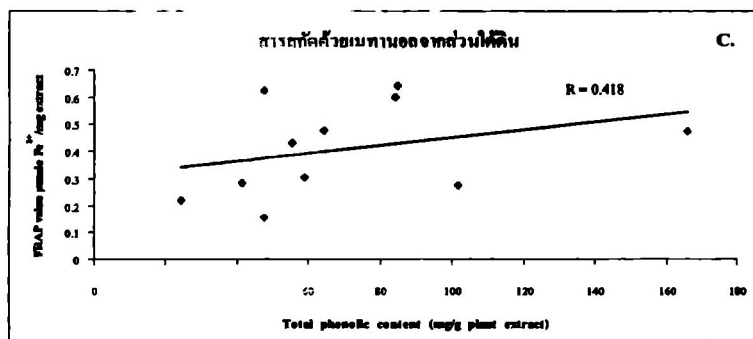
ภาพที่ 36 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (A. และ B.) วิธี FRAP (C. และ D.) วิธี TBAR (E. และ F.) จากสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดิน



ภาพที่ 36 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (A. และ B.) วิธี FRAP (C. และ D.) วิธี TBAR (E. และ F.) จากสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดิน (ต่อ)



ภาพที่ 37 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (A. และ B.) วิธี FRAP (C. และ D.) วิธี TBAR (E. และ F.) จากสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนใต้ดิน



ภาพที่ 37 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง 2 ตัวแปร ของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (A. และ B.) วิธี FRAP (C. และ D.) วิธี TBAR (E. และ F.) จากสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนใต้ดิน(ต่อ)

ตารางที่ 14 ค่าของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยเมทานอล
และน้ำจากส่วนเหนือดิน

ตัวอย่าง ศึกษา	Total phenolic contents (mg/g plant extract)		DPPH (IC ₅₀ µg/ml)		FRAP (µmole Fe ²⁺ /mg extract)		TBARS (IC ₅₀ mg/ml)	
	Methanolic extract	Aqueous extract	Methanolic extract	Aqueous extract	Methanolic extract	Aqueous extract	Methanolic extract	Aqueous extract
Mb	81.19±1.24	70.35±0.40	353.07±19.68	406.84±20.96	0.76±0.01	0.66±0.02	4.09±0.001	2.82±0.003
Me (h1)	75.67±0.40	43.79±0.63	126.94±6.34	799.13±16.17	0.27±0.003	0.48±0.02	10.71±0.05	0.74±0.01
Me (h2)	54.03±2.07	45.00±0.66	387.21±12.41	1070.75±7.26	0.25±0.01	0.35±0.01	10.83±0.35	0.72±0.02
Me (h3)	45.67±2.15	103.45±0.75	78.86±3.07	780.51±10.22	0.53±0.01	0.56±0.01	9.73±0.73	4.12±0.02
Me (ab)	103.78±1.72	56.21±1.62	113.54±5.41	386.46±11.44	0.56±0.02	0.37±0.01	5.15±0.23	2.04±0.09
Mj1	7.66±0.20	10.52±0.20	885.51±17.58	3077.42±9.82	0.26±0.01	0.30±0.01	10.43±0.51	3.47±0.08
Mj2	15.85±0.77	3.68±0.08	1070.80±54.58	4452.04±27.53	0.23±0.01	0.19±0.003	10.59±0.12	4.62±0.12
Md1	5.88±0.07	15.35±0.66	914.51±7.72	2853.05±33.14	0.19±0.003	0.21±0.004	10.05±0.53	2.99±0.05
Md2	5.73±0.11	4.26±0.11	1122.06±27.22	3638.01±30.26	0.21±0.01	0.23±0.004	8.23±0.11	0.45±0.01
Md3	107.91±2.21	13.10±0.28	106.96±3.93	3648.70±76.47	0.60±0.01	0.29±0.01	N/D	N/D
Md4	67.40±0.52	21.64±0.59	382.84±7.40	1277.49±12.63	0.29±0.01	0.33±0.01	9.35±0.04	1.64±0.07
Md5	49.03±0.20	27.16±0.59	122.40±4.04	951.99±46.52	0.54±0.01	0.43±0.02	17.96±0.50	3.67±0.08
Md6	9.21±0.28	3.51±0.08	657.66±11.19	707.46±8.26	0.17±0.003	0.22±0.01	14.43±0.52	2.33±0.01
Trolox			18.10±0.09				0.29±0.004	

N/D หมายถึง Not determined

ตารางที่ 15 ค่าของฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดด้วยเมทานอล และน้ำจากส่วนใต้ดิน

ตัวอย่าง ศึกษา	Total phenolic contents (mg/g plant extract)		DPPH (IC ₅₀ µg/ml)		FRAP (µmole Fe ²⁺ /mg extract)		TBARS (IC ₅₀ mg/ml)	
	Methanolic extract	Aqueous extract	Methanolic extract	Aqueous extract	Methanolic extract	Aqueous extract	Methanolic extract	Aqueous extract
Mb	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Me (h1)	166.02±4.56	57.07±0.86	134.29±4.39	416.48±10.60	0.47±0.01	0.54±0.01	2.51±0.02	1.97±0.03
Me (h2)	58.86±0.85	8.62±0.17	388.13±9.84	3147.96±42.57	0.48±0.01	0.20±0.002	1.69±0.02	3.22±0.04
Me (h3)	64.21±2.43	15.60±0.35	300.63±4.77	1354.25±20.32	0.30±0.004	0.25±0.01	8.83±0.47	1.75±0.04
Me (ab)	84.12±0.59	11.47±0.20	255.39±5.24	2867.78±32.89	0.60±0.01	0.58±0.02	3.90±0.09	1.46±0.05
Mj1	101.79±0.72	41.90±0.86	480.04±5.19	646.74±16.36	0.28±0.01	0.33±0.01	5.02±0.18	2.99±0.08
Mj2	84.98±1.60	35.35±1.07	277.72±9.42	790.05±23.73	0.64±0.01	0.43±0.004	2.89±0.01	6.68±0.23
Md1	47.66±1.14	19.40±0.45	1137.74±5.05	770.84±18.20	0.16±0.002	0.22±0.003	8.53±0.39	4.53±0.17
Md2	55.41±1.62	20.00±0.28	657.22±4.94	1596.51±48.65	0.43±0.01	0.21±0.001	9.36±0.06	2.47±0.06
Md3	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Md4	47.48±0.75	28.36±0.20	289.97±4.16	619.78±8.44	0.62±0.004	0.16±0.01	4.15±0.02	1.55±0.01
Md5	24.38±0.49	12.67±0.28	801.94±17.43	1870.77±35.65	0.22±0.01	0.35±0.01	8.98±0.25	3.79±0.09
Md6	41.45±16.72	16.72±0.33	488.35±3.26	1394.66±4.44	0.28±0.01	0.21±0.01	11.02±0.46	5.25±0.19
Trolox			18.10±0.09				0.29±0.004	

N/D หมายถึง Not determined

4.4 วิจัยรณผลการศึกษาและข้อเสนอนะ

การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่างพืช 3 ชนิด (สกุล *Murdannia*) คือ วานข้าวเหนียว [*M. edulis*; Me (h1), Me (h2), Me (h3) Me (ab)] โกงรูงนา [*M. japonica*; Mj1 และ Mj2] และไก่เถื่อนป่า [*M. discreta*; Md1, Md2, Md3, Md4, Md5 และ Md6] ซึ่งทำการสกัดส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินด้วยเมทานอลและน้ำ โดยการสกัดด้วยเมทานอลจะได้สารกลุ่มที่มีขั้วน้อยไปจนถึงมีขั้วมากซึ่งครอบคลุมเกือบทุกกลุ่มของสารสำคัญในพืช ส่วนสารสกัดด้วยน้ำนั้นจะเลียนแบบการประกอบอาหารซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายในการเตรียมและคนส่วนใหญ่จะนำพืชเหล่านี้มาบริโภคด้วยการใช้น้ำในการเตรียมอาหารหรือยารักษาโรค โดยสารส่วนใหญ่จะเป็นสารมีขั้วสูง การศึกษาครั้งนี้เป็นการจำลองแบบในหลอดทดลอง (*In Vitro*) โดยแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ กลไกการส่งผ่านอิเล็กตรอน (Single Electron Transfer, SET) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ DPPH assay, FRAP assay และ Folin-Ciocalteu assay และกลไกการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen Atom Transfer, HAT) ด้วยวิธีการวิเคราะห์ TBARS assay

4.6.1 การเปรียบเทียบระหว่างชนิด

วิธีวิเคราะห์ DPPH เป็นการศึกษาศามารถในการการเข้าจับหรือกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (Scavenge agent) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร จากผลการทดลอง (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 24) พบว่า ภาพ

โดยรวม ว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ Me (h3) [$IC_{50} = 78.858 \pm 3.069$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร] รองลงมา คือ ไม้เถื่อนป่า (*M. discreta*) และ โกรฐงูนา ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ Me (h3) กับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน Trolox สารสกัดดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าประมาณ 6 เท่า (ตารางที่ 13, ภาพที่ 19 และ 20) และเมื่อเปรียบเทียบส่วนเหนือดินของพืชทั้ง 3 ชนิดนี้กับรายงานผลการศึกษาในพืชสกุลเดียวกันก่อนหน้านี้ พบว่า มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ต่ำกว่า สมุนไพรรพำปากกิ้ง (*M. bracteata*) ผักถั่มหัวใหญ่ (*M. loriformis*) และกินกุ้งน้อย (*M. nudiflora*) (ธารินี, 2550; 2551) และการที่สารสกัดของพืชทุกชนิด มีฤทธิ์น้อยกว่า Trolox เป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้เป็นความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ (Crude extract) ที่ยังไม่ทราบถึงปริมาณสารออกฤทธิ์ที่แน่นอน จึงทำให้การประเมินค่าได้น้อย

เมื่อเปรียบเทียบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด พบว่า ส่วนใหญ่สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ยกเว้น ไม้เถื่อนป่าที่ได้จากส่วนใต้ดิน (*M. discreta*) [$MDI: IC_{50} = 1137.744 \pm 5.053$ ไมโครกรัม/มิลลิลิตร] (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 25) เนื่องจากสารสกัดด้วยเมทานอลเป็นสารละลายเดียวกันกับสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH[•] ซึ่งมีความคงตัวในสารละลายเมทานอล จึงทำให้ไม่มีปัญหาในเรื่องของการละลายของสารสกัดและในปฏิกิริยาการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] นอกจากนี้ เคยมีรายงานพบว่าสารกลุ่มพวกน้ำตาลจะไม่ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH[•] (Blois, 1958) ซึ่งสารสกัดด้วยน้ำจะได้สารที่มีขี้ผึ้งสูงรวมทั้งเป็นน้ำตาลส่วนมากด้วย ดังนั้นผลการสกัดสารด้วยเมทานอลจึงมีประสิทธิภาพในการจับอนุมูลอิสระ DPPH[•] ได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ

เมื่อเปรียบเทียบส่วนเหนือดินและใต้ดิน (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 26) พบว่า สารสกัดส่วนใหญ่จากส่วนใต้ดินมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] สูงกว่าเหนือดินทั้งในสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ แต่มีบางตัวอย่างที่พบว่าส่วนเหนือดินมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] สูงกว่าส่วนใต้ดิน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Jeong et al. (2008) ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH จากส่วนต่างๆ ได้แก่ ทั้งต้น (Whole plants) ส่วนเหนือดิน (Aerial parts) และส่วนใต้ดิน (Underground parts) ของ *Cirsium lineare*, *Cirsium chanroenicum*, *Cirsium setidens*, *Cirsium japonicum* var. *ussuriense*, *Cirsium nipponicum*, *Cirsium pendulum* and *Carduus crispus* ผลการศึกษาพบว่า ส่วนต่างๆ ของพืช มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดด้วยเมทานอลและส่วนใต้ดินมีกลุ่มสารที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้ดีกว่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารสำคัญที่อยู่ในสารสกัดด้วยเมทานอลและส่วนใต้ดินมีโครงสร้างและพันธะของสารที่เอื้อต่อการให้อิเล็กตรอนได้ง่ายกว่า

วิธีวิเคราะห์ FRAP เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้วัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อน Ferric Tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) เมื่อได้รับการถ่ายเทอิเล็กตรอนจากสารสกัดแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน Ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) ที่มีสีน้ำเงิน โดยวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว เป็นการวัดความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์ (Reducing agent) จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินมีความสามารถรวมในการเป็นสารรีดิวซ์สูง ได้แก่ โกรฐงูนา (*M. japonica*) [$Mj2: IC_{50} = 0.642 \pm 0.011$ μ mol Fe^{2+} /mg extract] มีความสามารถรวมในการเป็น

สารรีดิวซ์ที่สูงที่สุด รองมาคือ ไก่เถื่อนป่า (*M. discrete*) [$\text{Md4: IC}_{50} = 0.624 \pm 0.004 \mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$] และ วานข้าวเหนียว [*M. edulis*; $\text{Me (ab) : IC}_{50} = 0.60 \pm 0.005 \mu\text{mole Fe}^{2+}/\text{mg extract}$] ตามลำดับ (ตารางที่ 14 และ 15, ภาพที่ 27) อย่างไรก็ตามการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ FRAP assay ไม่สอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH assay เนื่องจาก วิธี FRAP เป็นการทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมดของสารสกัด โดยการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์ สารประกอบเชิงซ้อน Ferric tripyridyl triazine (Fe^{III} -TPTZ) เป็น Ferrous (Fe^{II} -TPTZ) (Benzie, Strain, 1999)

จากผลการทดลองพบว่า ค่า FRAP value (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 28) ของสารสกัดด้วยน้ำจาก ส่วนเหนือดินส่วนใหญ่มีค่า FRAP value สูงกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล ส่วนสารสกัดจากส่วนใต้ดินส่วนใหญ่พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลมีค่า FRAP value สูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำ อาจเนื่องจากสารสกัดมาจากตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่างกันจึงมีผลทำให้สารสกัดมีขั้วแตกต่างกันและคาดว่าจะมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีในสภาวะที่ต่างกันด้วย

เมื่อเปรียบเทียบส่วนต่าง ๆ ของพืชที่นำมาใช้ศึกษา พบว่า ส่วนใหญ่สารสกัดด้วยเมทานอลจาก ส่วนใต้ดินของพืชทั้ง 3 ชนิด จะมีค่า FRAP value สูงกว่าสารสกัดจากส่วนเหนือดิน และสารสกัดด้วยน้ำส่วนใหญ่เป็นสารสกัดจากส่วนเหนือดินจะมีค่า FRAP value สูงกว่าใต้ดิน (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 29)

วิธีวิเคราะห์ Folin-Ciocalteu assay เป็นวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic contents) โดยคิดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบจากปฏิกิริยาของไอออน [Mo (VI)] ซึ่งมีสีเหลือง เมื่อได้รับอิเล็กตรอนจากสารสกัดด้านออกซิเดชันแล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ [Mo (V)] ซึ่งมีสีน้ำเงิน จากผลการทดลองพบว่า ภาพโดยรวม วานข้าวเหนียว (*M. edulis*) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด [$\text{Me (h1): } 166.017 \pm 4.561$ มิลลิกรัม/กรัม ของสารสกัด จากส่วนใต้ดินในสกัดสารด้วยเมทานอล] รองลงมา คือ ไก่เถื่อนป่า (*M. discrete*) และ โกงทูงนา ตามลำดับ (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 30)

จากผลการทดลองยังพบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลของพืชทั้ง 3 ชนิด ส่วนใหญ่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 31) ยกเว้นบางตัวอย่างเช่น Me (h3) อาจเนื่องจากสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายต่างชนิดกันจะเป็นสารที่มีความเป็นขั้วต่างกัน จึงมีผลทำให้กลุ่มสารที่ละลายออกมามีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการศึกษาในพืชสกุลเดียวกันก่อนหน้านี้ (ชารินทร์ปีลาละ, 2550; 2551) ที่ทำการศึกษเปรียบเทียบสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ และรายงานการศึกษาของ Ardekani *et al.* (2010) ที่ทำการศึกษเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของเมล็ด *Phoenix dactylifera* L. ในตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ water, methanol:water (50:50, v/v), methanol, DMSO และ water:methanol:acetone:formic acid (20:40:40:0.1)

เมื่อเปรียบเทียบส่วนต่าง ๆ ของพืชที่นำมาใช้ศึกษาพบว่า ส่วนใหญ่สารสกัดจากส่วนใต้ดินมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าส่วนเหนือดินทั้งในการสกัดสารด้วยเมทานอลและน้ำ แต่มีบางตัวอย่าง เช่น Md3 , Me (ab) และ Me (h1) ที่พบว่าส่วนเหนือดินมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 32)

วิธีวิเคราะห์ TBAR assay เป็นวิธีวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาไลพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation) ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acids: PUFA) ของสารสกัด โดยใช้

สมองหนูมาเหนียวทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แล้วทำให้เกิดผลผลิตจากปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation) ได้สารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehydes, MDA) เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทริก (Thiobarbituric acid) ในสภาวะกรด จะได้สารที่มีสีคือ Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) จากการทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันของสารสกัด พบว่า สารสกัดด้วยน้ำทั้งจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ วุ้นข้าวเหนียว (*M. edulis*) และ ไก่เถื่อนป่า (*M. discreta*) สามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่า โกรทุ่งนา (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 33)

จากผลการทดลองพบว่า โดยส่วนใหญ่สารสกัดด้วยน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิด สามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าสกัดด้วยเมทานอล (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 34) อาจเนื่องมาจากสารสกัดด้วยน้ำมีกลุ่มสารที่มีความสามารถให้อะคอมไฮโดรเจนได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของพืชต่างชนิดในสกุลเดียวกันก่อนหน้านี้ (ชาวิณี สืบปาละ, 2550; 2551)

เมื่อเปรียบเทียบส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาใช้ศึกษาพบว่า ส่วนใหญ่สารสกัดด้วยเมทานอล จากส่วนใต้ดินมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าส่วนเหนือดิน ส่วนสารสกัดด้วยน้ำพบว่า ส่วนใหญ่สารสกัดจากส่วนเหนือดินมีความสามารถในการต้านปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้ดีกว่าส่วนใต้ดิน (ตารางที่ 13 และ 14, ภาพที่ 35) อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดด้วยน้ำและส่วนใต้ดินมีกลุ่มสารที่มีความสามารถให้อะคอมไฮโดรเจนได้ดีกว่า ซึ่งวิธีการศึกษานี้เป็นวิธีที่นิยมใช้วัดภาวะลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในร่างกาย และเป็นวิธีที่วัดความสามารถในการป้องกันเซลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์ (Protect against free radical) จัดเป็นวิธีการที่มีความใกล้เคียงกับปฏิกิริยาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายมากกว่า 3 วิธีข้างต้น (โอภา ชัชระคุปต์ และ มาลีรักษ์ อัคร์สินทอง, 2549)

4.4.2 การเปรียบเทียบพืชชนิดเดียวกันที่เก็บจากสถานที่แตกต่างกันแต่มีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา (ตารางที่ 14 และ 15)

เมื่อทำการเปรียบเทียบสารสกัดวุ้นข้าวเหนียว (*M. edulis*) พบว่า ตัวอย่างของสารสกัดมีค่าแตกต่างกันในทุกวิธีการศึกษา ได้แก่ กลุ่มหลังแผ่นใบมีขน [Me (h1), Me (h2) และ Me (h3)] และกลุ่มหลังแผ่นใบไม่มีขน [Me (ab)] ซึ่งมีสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไป

4.4.3 การเปรียบเทียบพืชชนิดเดียวกันที่เก็บจากสถานที่แตกต่างกันแต่ไม่มีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา (ตารางที่ 14 และ 15)

เมื่อทำการเปรียบเทียบสารสกัดวุ้นข้าวเหนียว (*M. edulis*; Me (h1), Me (h2) และ Me (h3)) โกรทุ่งนา (*M. japonica*; Mj1 และ Mj2) และ ไก่เถื่อนป่า (*M. discreta*; Md1, Md2, Md3, Md4, Md5 และ Md6) ผลการศึกษา พบว่า ตัวอย่างของสารสกัดมีค่าแตกต่างกัน ในทุกวิธีการศึกษา

อาจเป็นไปได้ว่า สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันมีผลต่อสภาพการเจริญเติบโตของพืช เช่น สภาพภูมิประเทศ สภาพภูมิอากาศ แร่ธาตุ และภัยแล้ง ทำให้มีผลต่อสร้างสารสำคัญของพืชได้แตกต่างกัน ซึ่งมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดย Ardekani et al. (2010) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ของเมล็ด *Phoenix dactylifera* L. ทั้งหมด 14 แห่ง ในประเทศ Iran ผลการศึกษาพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมีความแตกต่างกันในแต่ละสถานที่

4.4.4 เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิก (TPC) กับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ภาพที่ 36 และ 37)

ส่วนใหญ่ TPC มีความสัมพันธ์กับผลการศึกษาด้วยวิธี DPPH และ FRAP มากกว่าการศึกษาด้วยวิธี TBARS

สารสกัดจากส่วนเหนือดิน พบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลมีความสัมพันธ์กับ TPC มากกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ส่วนสารสกัดจากส่วนใต้ดิน พบว่า สารสกัดด้วยน้ำ มีความสัมพันธ์กับ TPC มากกว่าสารสกัดด้วยเมทานอล

เมื่อเปรียบเทียบส่วนเหนือดินกับใต้ดิน พบว่า ส่วนใหญ่สารสกัดจากส่วนเหนือดินมีความสัมพันธ์กับ TPC มากกว่าส่วนใต้ดิน

ซึ่งผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง TPC กับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน อาจจะพบว่ามีความสัมพันธ์ทั้งมากและน้อย ซึ่งการที่พบว่ามีสัมพันธ์กันน้อยทั้งนี้ เนื่องจากความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชกลุ่มนี้ไม่ได้จำกัดอยู่ที่สารประกอบฟีนอลิกเท่านั้น อาจเกิดจากสารต้านออกซิเดชันอื่นๆ เช่น น้ำมันหอมระเหย แคโรทีนอยด์ และวิตามิน (Javanmardi et al., 2003) ซึ่งจากผลการศึกษาพฤษเคมีเบื้องต้นในบทที่ 3 ในสารสกัดด้วยเมทานอล พบว่าพืชกลุ่มนี้มีองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นคล้ายกัน ได้แก่ สารในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์และฟลาโวนอยด์ และพบสารประกอบหลักที่แตกต่างกันในสารสกัดจากส่วนเหนือดินและใต้ดิน

4.5 สรุปผลการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สรุปจากผลการศึกษาข้างต้น พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำของพืชทุกชนิด มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยการศึกษาด้วยวิธีวิเคราะห์ DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu และ TBARS ซึ่งสามารถนำมาเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติได้ โดยผลการทดลองพบว่า สารสกัดด้วยเมทานอลมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีในวิธี DPPH และ Folin-Ciocalteu ส่วนสารสกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดีในวิธี FRAP และ TBARS เมื่อเปรียบเทียบส่วนของพืชที่นำมาใช้ศึกษา พบว่า สารสกัดจากส่วนใต้ดินมีฤทธิ์ดีกว่าส่วนเหนือดิน นอกจากนี้ ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และพบว่ามีปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ได้แก่ ชนิดตัวทำละลายที่ใช้และส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการสกัด ลักษณะผ่นแปรทางพันธุกรรม และสภาพแวดล้อม

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าพืชทั้ง 3 ชนิด สามารถนำมาเป็นแหล่งของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติอีกแหล่งทางเลือก โดยเฉพาะ ว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) และไก่เถื่อนป่า (*M. discreta*) นอกจากนี้ พืชทั้ง 3 ชนิดนี้ยังมีรายงานการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำมาใช้ทางพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน คือ รักษาบาดแผล ซึ่งมีรายงานการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันนั้นมีบทบาทสำคัญในการรักษาบาดแผล

โดยการรักษาภาวะการอักเสบซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาความสามารถด้านออกซิเดชันแคในหลอดทดลองซึ่งเป็นเพียงปฏิกิริยาเคมี เท่านั้น ซึ่งยังคงต้องการศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาในภาพรวม

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างพืชสมุนไพรไก่เถื่อนป่า (*M. discreta*) ว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) และโกฐจุฬารักษ์ *M. japonica* วงศ์ผักปราชญ์ (Commelinaceae) ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปคล้ายคลึงกัน โดยทำการศึกษาทางเภสัชเวท คือทำการศึกษาเปรียบเทียบด้วยจุลลักษณะ (Microscopic) และการศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical) นอกจากนี้ยังสนใจศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

การศึกษาทางจุลลักษณะสามารถนำมาใช้แยกพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยา โดยจุลลักษณะเด่นของพืชสกุล *Murdannia* คือ การสะสมของคิวทิน ปากใบเป็นชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ (Commelina type) ขนจิมมีตอม ความต่อเนื่องของเนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวและความต่อเนื่องของท่อเรงคิมบริเวณใกล้ขอบใบ โดยรูปวิธาน (Key) จุลลักษณะวินิจฉัยที่แยกพืชทั้ง 3 ชนิดนี้คือ

1ก พบขนขนาดใหญ่ที่ผิวแผ่นใบประดับเฉพาะด้านล่าง หรือทั้งด้านบนและด้านล่าง

2ก พบขนขนาดใหญ่ที่ผิวแผ่นใบประดับทั้งด้านบนและด้านล่าง เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวต่อเนื่องจากบริเวณเส้นกลางใบ ถึงบริเวณใกล้ขอบใบ ขันแฟลชีเซลล์เรียงตัว 1-2 ชั้นเซลล์ ขันคอลเลกคิม 3-4

ชั้นเซลล์ ที่ผิวแผ่นใบด้านล่างบริเวณท่อลำเลียง และพบการสะสมสารแทนนินในชั้นมีโซฟิลล์

.....*M. discreta*

2ข พบขนขนาดใหญ่เฉพาะที่ผิวแผ่นใบประดับด้านล่างและขอบใบ เนื้อเยื่อชั้นรองจากผิวพบ เฉพาะบริเวณเส้นกลางใบ ไม่พบชั้นแฟลชีเซลล์ ไม่พบคอลเลกคิม และไม่พบการสะสมสารแทน

นิน.....*M. edulis*

1ข ไม่พบขนขนาดใหญ่ที่ผิวแผ่นใบประดับทั้งด้านบนและด้านล่าง.....*M. japonica*

การศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้นด้วยวิธีทินเลเซอร์โครมาโทกราฟีพบว่าโดยทั่วไปมีองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นคล้ายกันคือ สารกลุ่มเทอร์ฟีนอยด์ และฟลาโวนอยด์ สามารถแยกสารสกัดด้วยเมทานอลของพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ได้อย่างชัดเจนในโครมาโทแกรมของระบบทำละลาย (Mobile phase) ที่ประกอบด้วย เอทิลเอซิเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซิดิก : น้ำ ด้วยอัตราส่วน 125 : 11 : 11 : 13.5 ทั้งจากส่วนเหนือดินและใต้ดิน ซึ่งสารส่วนใหญ่ที่ออกมาในระบบนี้คือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์อาจสรุปได้ว่าสารกลุ่มนี้สามารถใช้จัดจำแนก (Chemical marker) พืชสกุลนี้ได้

การศึกษาดัชนีออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการศึกษาความสามารถของสารสกัดของพืชเป็น 2 กลไก คือกลไกการให้อิเล็กตรอน ด้วยวิธี DPPH, FRAP และ Folin-Ciocalteu และกลไกการให้ไฮโดรเจนอะตอม ด้วยวิธี TBARS พบว่า ว่านข้าวเหนียว (*M. edulis*) ในสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH[•] สูงที่สุด และส่วนใต้ดินมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุด สารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของโกฐจุฬารักษ์ (*M. japonica*) มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งสูงสุด ส่วนการศึกษาด้วยวิธี TBARS

พบว่า สารสกัดด้วยน้ำจากส่วนเหนือดินของวุ้นข้าวเหนียว (*M. edulis*) และไถ่เถื่อนป่า (*M. discreta*) สามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาฟิสิกัลออกซิเดชันได้ดีกว่าโกฐทูงนา (*M. japonica*)

สารสกัดด้วยเมทานอลมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุดในวิธี DPPH และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดในวิธี Folin-Ciocalteu ส่วนสารสกัดด้วยน้ำ มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมดสูงที่สุดในวิธี FRAP และมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิสิกัลออกซิเดชันสูงที่สุดในวิธี TBARS เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนของพืชที่นำมาใช้ศึกษา พบว่า สารสกัดจากส่วนใต้ดินมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาฟิสิกัลออกซิเดชันสูงกว่าส่วนเหนือดิน

นอกจากนี้ ยังพบความสัมพันธ์ระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน อาจจะพบว่ามีความสัมพันธ์ทั้งมากและน้อย ซึ่งการที่พบว่ามีความสัมพันธ์กันน้อยทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชกลุ่มนี้ไม่ได้จำกัดอยู่ที่สารประกอบฟีนอลิกเท่านั้น อาจเกิดจากสารต้านออกซิเดชันอื่น ๆ และพบว่ามีปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ชนิดตัวทำละลายและส่วนของพืชที่นำมาใช้ในการสกัด ลักษณะผ่นแปรทางพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อม และพืชทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถนำมาเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติและสามารถนำไปพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพต่อไปได้

สรุปได้ว่าการศึกษาเปรียบเทียบทางจุลลักษณะ พฤกษเคมีเบื้องต้น และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด มีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรุปได้ว่า *M. discreta* และ *M. japonica* นอกจากจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและองค์ประกอบเคมีคล้ายกันมากอาจทำให้มีผู้เข้าใจผิดได้ง่าย ดังนั้นจึงควรใช้การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางเภสัชเวทร่วมด้วย ซึ่งจะสามารถแยกความแตกต่างของพืชดังกล่าวได้อย่างชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

- ธารินี สืบปาละ, ทวีศักดิ์ ชิตเมธาโรจน์, สุพัตรา ปรศุพัฒนา, ศรีสมพร ปรีเปรม. การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง ผักลิ้มผัวใหญ่ และกินहु่งน้อย (วงศ์ผักปราบ) ในประเทศไทย. [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ]. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2551.
- ธารินี สืบปาละ, สุพัตรา ปรศุพัฒนา, ศรีสมพร ปรีเปรม, ทวีศักดิ์ ชิตเมธาโรจน์. การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชวิทยาและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืช 3 ชนิด ในสกุล *Murdannia* (วงศ์ Commelinaceae). วารสารวิจัย มข. (บศ.) 2550; 7(2): 98-110.
- วิภา จิรจรรย์กุล, นพมาศ สรรพคุณ, เอมอร โสมะพันธุ์, ถนอมศรี วงศ์รัตนาศดิษฐ์. โครงการพัฒนาใช้สมุนไพรและยาไทยทางคลินิก ประจำปี 2532 การศึกษาหญ้าปักกิ่งด้านเภสัชวิทยาและองค์ประกอบเคมีเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล; 2532.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทนา บุญยรัตน์ มาลีรักษ์ อัคร์สินทอง. สารต้านอนุมูลอิสระ. นนทบุรี: พี. เอส. พรินท์; 2549.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robard, K. Method for testing antioxidant activity. *Analyst* 2002; 127: 183-198.
- Apak R, Guclu K, Demirata B, Ozyurek M, Celik SE, Bektasoglu B, Berker KI, Ozyurt D. REVIEW; Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 2007; 12: 1496-1547.
- Ardekani MRS, Khanavi M., Hajimahmoodi M., Jahangiri M., Hadjiakhoondi A. Comparison of Antioxidant Activity and Total Phenol Contents of some Date Seed Varieties from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2010; 9(2): 141-146.
- Benzie, IFF., Strain, J.J. Ferric Reducing/Antioxidant Power assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods in Enzymology* 1999; 299: 15-27.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52, 302-310.
- Cadenas E. Biochemistry of Oxygen Toxicity. *Annual Review of Biochemistry* 1989; 58: 79-110.
- Chaichumporn O, Preeprame S, Thitimetharoch, T. Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae). The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional medicine and Natural Products; 2008 October 30-31; Nanning, Guangxi. China; 2008. p.145-146.
- 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 Terpenoids**. Boca Raton, FL: CRC Press; 1987.
- Craib WG. Contributions to the flora of Stam. **Kew Bulletin** 1912; 10: 397-435.
- De Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.Th. Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. **Journal of Chromatography** 2006; (1112): 31-63.
- Evans WC. **Trease 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.G.J. **The Biodiversity of African Plants**. Netherland: Kluwer Academic Publishers; 1996.
- Fried B, Sherma J. **Thin-layer chromatography: Techniques and Application**. 2nd 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 Microflora *In Vivo*. **Biochemical Journal** 1972; 128: 901-911.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. The Importance of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Diseases. **Molecular Aspects of Medicine** 1985; 8(2): 89-193.
- Harborne JB. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern techniques of Plants Analysis**. 2nd ed. London: Chapman and Hall; 1984.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2005; 53: 184-1856.
- Jain SK, DeFilipps RA. **Medicinal Plants of India**. Algonac, Michigan USA: Reference Publications; 1991.
- Javanmardi J., Lockeb E., Vivancob J.M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry** 2003; 83: 547-550.
- Jeong D. M., Jung H. A., Choi J. S. Comparative Antioxidant Activity and HPLC Profiles of Some Selected Korean Thistles. **Arch Pharm Res** 2003; 31(1): 28-33.
- Jiratchariyakul W, Okabe H, Frahm AW. A steroidal Glucoside from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao & Kammathy. **Thai Journal of Phytopharmacy** 1996; 3(1): 31-39.
- Jiratchariyakul W, Mongkarndi P, Okabe H, Frahm AW. Cytotoxic Glycosphingolipid from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao & Kammathy. **Thai Journal of Pharmaceutical Science** 1998; 5(20): 10-20.
- Jirawongse VA. **Thai Herbal Pharmacopoeia**. Vol. II. Bangkok, Thailand: Prachachon; 2000.
- Johansen DA. **Plant Microtechnique**. New York, USA: McGraw – Hill; 1940.
- Kaewsart S, Preeprame S, Thitimetharoch T. **Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Four *Cyanotis* species (Family Commelinaceae)**. The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional medicine and Natural Products; 2008 October 30-31; Nanning, Guangxi, China; 2008.

- Kirtikar L-CKR, Basu BD, An IC. **Indian Medicinal Plants**. Vol. IV. Allahabad, India: Shiva Offset Press; 1994.
- Kohen R and Nyska A. INVITED REVIEW; Oxidation of biological system: Oxidative stress phenomena, Antioxidants, Redox reactions, and methods for their quantification. **Toxic Patho** 2002; 30(6): 620-650.
- Li G. et al. Neuroprotective and Free Radical Scavenging Activities of Phenolic Compounds from *Hovenia dulcis*. **Archives of Pharmacal Research** 2005; 28(7): 804-809.
- Macek K. **Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography**. London: Elsevier; 1972.
- Mahakunakorn, P., Tohdam, M., Murakami, Y., Matsumoto, K., Watanabe, H. Antioxidant and Free Radical-Scavenging Activity of Choto-san and Its Related Constituents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 2004; 27(1): 8-46.
- Martinez MAD-P. Flavonoids 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.
- Ohkawa, H., hishi, N., and Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analst. Biochem** 1979; 95, 351-358.
- Parivuguna V, Gnanaprabhal R, Dhanabalan R, Doss A. Antimicrobial Properties and Phytochemical Constituents of Rheo discolor Hance. **Ethnobotanical Leaflets**; 2008; 12: 841-845.
- Pattanayak SP, Sunita P. Wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcata* (L.f) Ettingsh. **Journal of Ethnopharmacology** 2008; 120(2): 241-247.
- Perry LM, Metzger I. **Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses**. London, England: The MIT Press Cambridge; 1980.
- Phipps SM, Sharaf MHM, Butterweck V. Assessing Antioxidant Activity in Botanicals and Other Dietary supplements. **Pharmacopeial Forum** 2007; 33(4): 810-814.
- Prior, R.L., Xianli, W., Karen, S. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 2005; 53: 4290-4302.
- Said IM, Din SL, A, Samsudin MW, Yusoff NI, Latiff A, Ali RM, Hadi AH. **A phytochemical survey of Sayap-Kinabula Park, Sabah**. Asean Review of Biodiversity and Enviornmental Conservation (ARBEC); 1998; 6.
- Schlesier, K., Harwart, M., Bohm, V., Bitsch R. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different *In Vitro* Methods. **Free Radical Research** 2002; 36(2):177-187.

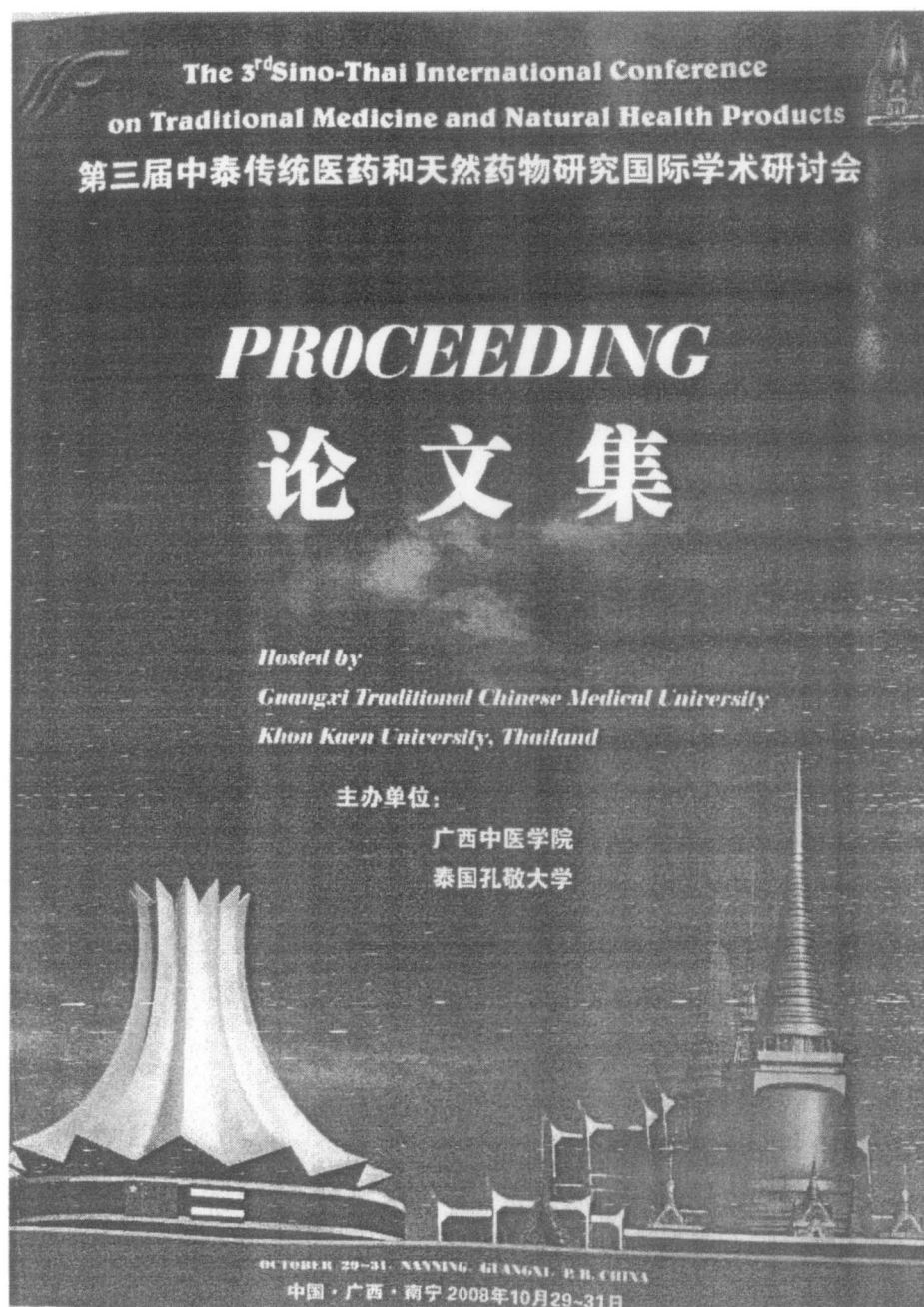
- Singleton VI, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture** 1965; 16: 144-158.
- Stahl E. **Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook**. 2nd ed. New York: Springer; 1969.
- Tan ML, Tengku Muhammad TS, Samian MR, Najimudin N, Sulaiman SF. Effect of *Murdania japonica* plant extracts on growth rates of certain cancer cell lines. **Journal of Tropical Medicinal Plants** 2003; 4(1): 57-62.
- Thitimetharoch T, Yongvanit S. **Ethnobotanical survey of Pha Taem nation Park, Ubon Ratchathani province, Thailand**. The 2nd Sino-Thai International Conference on Traditional medicine and Natural Products; 2007 December 2-6; Khon Kaen, Thailand, 2007; p. 55-63.
- Thitimetharoch T, Chantaranothai, P, Thammathaworn A, Faden RB. **Taxonomic Studies of the Family Commelinaceae in Thailand** [Ph.D. Philosophy Thesis in Biology]. Khon Kaen: The Graduate School, Khon Kaen University; 2004.
- Thitimetharoch T, Chantaranothai, P, Thammathaworn A, Faden RB. **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.
- Tomlinson PB. **Anatomy of the Monocotyledons III (Commelinales – Zingiberales)**. U.S.A.: Clarendon Press; 1969.
- Trease G.E, Evans WC. **Pharmacognosy**. 10th ed. London: Aberdeen University Press; 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.
- Wang, G.J., Chen, S.M., Chen, W.C., Chang, Y.M., Lee, T.H. Selective Inducible Nitric Oxide Synthase Suppression by New Bracteanolides from *Murdannia bracteata*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2007; 112: 211-227.
- Wagner H and Bladt S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2nd ed. New York: Springer; 1996.
- Wiat C. **Medicinal Plant of Southeast Asia**. Malaysia: Pelanduk Pub; 2000.
- Yang Q, Ye G, Zhao W-M. Chemical Constituents of *Commelina communis* Linn. **Biochemical Systematics and Ecology** 2007; 35: 621–623.

ภาคผนวก

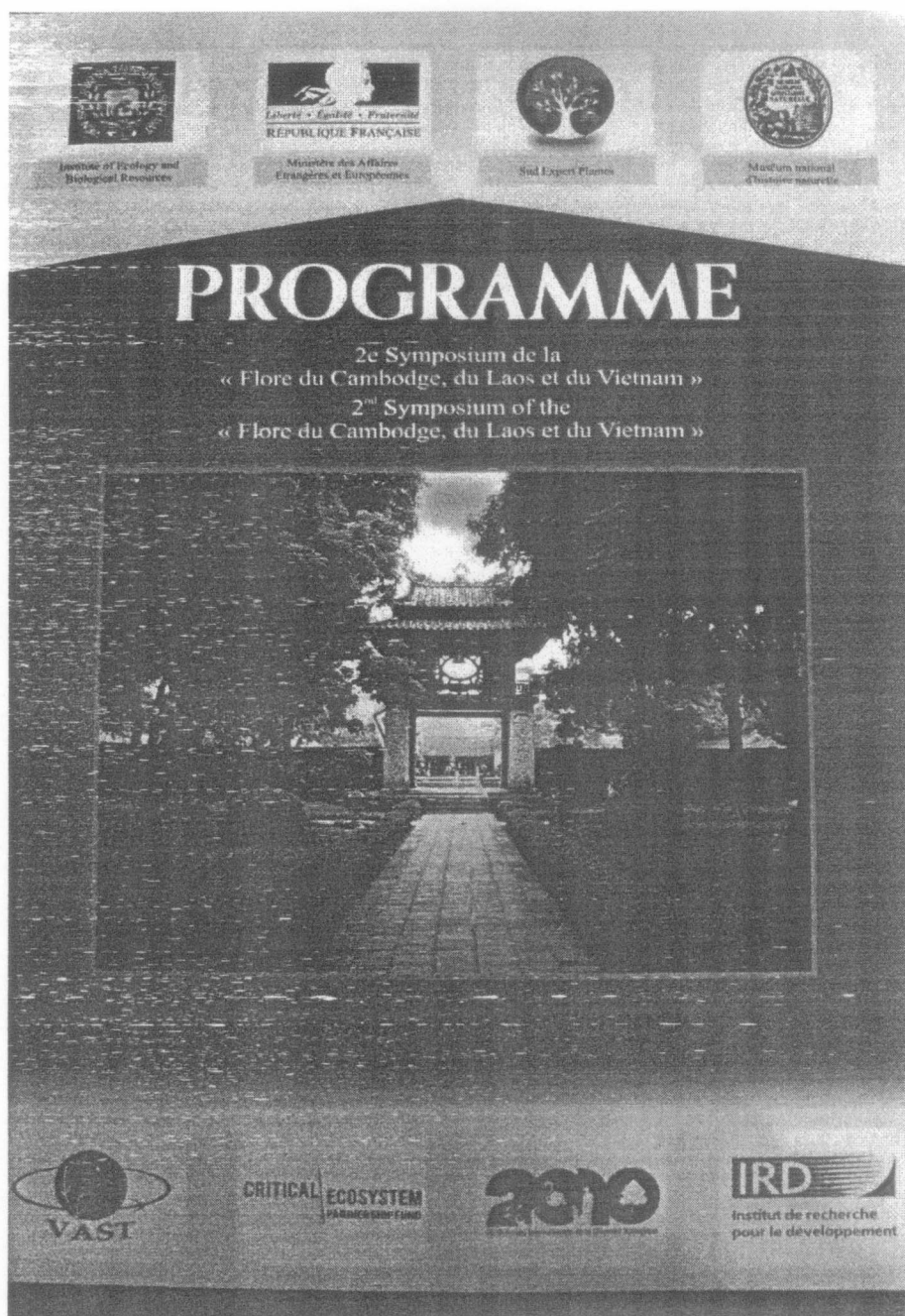
ผลงานทางวิชาการ

1. ผลงานที่นำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

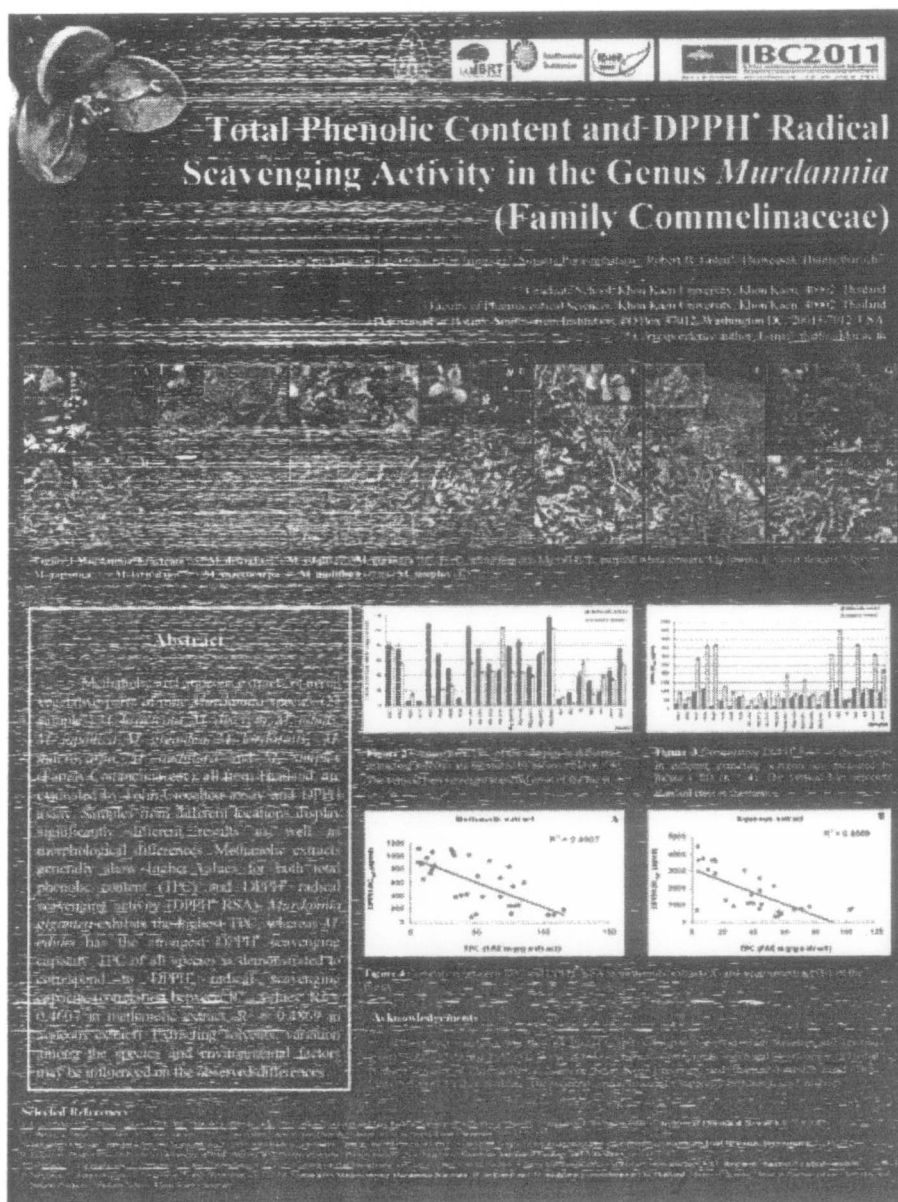
- 1.1 Chaichumporn O, Preeprame S, Thitimetharoch, T. Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae). **The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional medicine and Nateral Products**; 30-31 October 2008; Nanning, Guangxi, China;. p.145-146.
- 1.2 Chaichumporn O, Preeprame S, Faden RB, Thitimetharoch, T. DPPH[•] Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content from Aerial Vegetative Part of *Murdannia bracteata*, *M. discreta*, *M. edulis* and *M. japonica* (Family Commelinaceae). **2nd Symopsium of the 'Flore du Cambodge, du Laos et du Vietnam'**; 6-8 December 2010, Hanoi, Vietnam; p. 81.
- 1.3 Khaewsaart S, Chaichumporn O, Preeprame S, Faden RB, Thitimetharoch, T. Total Phenolic Content and DPPH[•] Radical Scavenging Activity in the Genus *Murdannia* (Family Commelinaceae). **XVIII International Botanical Congress 23-30 July 2011, Melbourne: Australia.**



- 1.1 Chaichumporn O, Preeprame S, Thitimetharoch, T. Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae). **The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional medicine and Nateral Products**; 2008 October 30-31; Nanning, Guangxi. China; 2008. p.145-146.



- 1.2 Chaichumporn O, Preeprame S, Faden RB, Thitimetharoch, T. DPPH[•] Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content from Aerial Vegetative Part of *Murdannia bracteata*, *M. discreta*, *M. edulis* and *M. japonica* (Family Commelinaceae). 2nd Symposium of the 'Flore du Cambodge, du Laos et du Vietnam'; 6-8 December 2010, Hanoi, Vietnam; p. 81.



1.3 Khaewsaart S, Chaichumporn O, Preeprame S, Faden RB, Thitithetharoch, T. Total Phenolic Content and DPPH[•] Radical Scavenging Activity in the Genus *Murdannia* (Family Commelinaceae). XVIII International Botanical Congress 23-30 July 2011, Melbourne: Australia.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นางสาวอรสา ชัยชุมพร
วัน เดือน ปี เกิด 25 มีนาคม พ.ศ. 2525
ภูมิลำเนา บ้านเลขที่ 84 หมู่ 2 ตำบลทรายมูล อำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก 26120
E-mail: Orasa_25@hotmail.com

ประวัติการศึกษา

- สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษา จากโรงเรียนบ้านองครักษ์ ในปี พ.ศ. 2537
- สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษา จากโรงเรียนองครักษ์ ในปี พ.ศ. 2543
- สำเร็จการศึกษาระดับประกาศนียบัตรพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ จากโรงเรียนพนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ในปี พ.ศ. 2545
- สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาสุขศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ในปี พ.ศ. 2547 (เกียรตินิยมอันดับ 2)
- สำเร็จการศึกษาลัทธิศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี พ.ศ. 2554

ประวัติการทำงาน

- เจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานประจำห้องปฏิบัติการฮิสโตเคมี ตำแหน่ง พนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล โรงพยาบาลศิริราช ระหว่างปี พ.ศ. 2545-2549
- ตำแหน่ง ผู้ช่วยวิจัย โครงการการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เชื้อพันธุ์พริก อำเภอกอนสาร จังหวัดชัยภูมิ โดยมี ผศ.ดร.ทวีศักดิ์ ชิตเมธาโรจน์ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย ในปี พ.ศ. 2551
- ตำแหน่ง ผู้ช่วยวิจัย โครงการการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี พื้นที่ป่าน้ำพอง อำเภออุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น โดยมี ผศ.ดร.ทวีศักดิ์ ชิตเมธาโรจน์ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย พ.ศ. 2552
- ตำแหน่ง ผู้ช่วยวิจัย โครงการการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เชื้อพันธุ์พริก อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ โดยมี ผศ.ดร.ทวีศักดิ์ ชิตเมธาโรจน์ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย ในปี พ.ศ. 2553
- ตำแหน่ง ผู้ช่วยวิจัย โครงการการศึกษาพฤกษศาสตร์พื้นบ้านในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เชื้อพันธุ์ลิ้นจี่ อำเภอสีรินทร จังหวัดอุบลราชธานี โดยมี ผศ.ดร.ทวีศักดิ์ ชิตเมธาโรจน์ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย ในปี พ.ศ. 2554

