



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลุ่

Factors affecting bioactive compounds and free radical scavenging activities of *Pluchea indica* leaf extract

หัวหน้าโครงการ

ภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์

โครงการวิจัยประเภท งบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๙ มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ปัจจัยที่มีผลต่อสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลู่

Factors affecting bioactive compounds and free radical scavenging activities of *Pluchea indica* leaf extract

หัวหน้าโครงการ

ภก.ผศ.ดร.บุญดิศย์ วงศ์ศักดิ์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กรกฎาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ทั้งในด้านการเก็บตัวอย่าง การใช้เครื่องมือวิจัยได้แก่ คุณอุดม วงศ์ศักดิ์ คุณกนกพร ก้อนทรัพย์ คุณณัฐสุดา อินสอน คุณกรวิชญ์ ช่องดารากุล คุณธนวัฒน์ บรรณวัฒน์ คุณชญชิต คุ่มอิน และได้รับความอนุเคราะห์ของห้องปฏิบัติการคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และศูนย์วิจัยคั้นคว่ำและพัฒนาอาหาร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้การประสานงานอย่างดี จนได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก งบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนจากรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 23/2559 จึงขอขอบคุณทุกท่านมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

ขลุ่ (*Pluchea indica* (L.) Less วงศ์ Asteraceae) ใช้เป็นยาพื้นบ้านและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในประเทศแถบร้อนและกึ่งร้อน ซึ่งในประเทศไทยใบขลุ่จัดเป็นสมุนไพรในสาธารณสุขมูลฐาน และยังมีนิยมนบริโภคเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเช่นในรูปแบบของชาสมุนไพร นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่อยู่จำนวนมาก อย่างไรก็ตามยังไม่ปรากฏรายงานเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบขลุ่ ในปีที่สองเป็นการศึกษาถึงพันธุกรรม ฤดูกาล และระยะเวลาการเจริญเติบโต ด้านพันธุกรรมได้พัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมและวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่จากแหล่งต่างๆและได้ขึ้นทะเบียนที่ธนาคารพันธุกรรมโลก (GenBank) เพื่อใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์สายพันธุ์ ด้านปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า ปัจจัยด้านฤดูกาลในการเก็บเกี่ยวไม่มีผลโดยตรงอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปัจจัยด้านระยะเวลาการเจริญเติบโตเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลโดยตรงกับคุณภาพของสารสกัด โดยใบอ่อนของขลุ่จากทุกตัวอย่างให้ผลทั้งปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากใบที่เจริญเติบโตเต็มที่อย่างมีนัยสำคัญ ด้านการนำสารสกัดใบขลุ่มาพัฒนาเป็นลูกอมเม็ดนี้่ได้ทำการทดสอบทั้งสิ้น 12 สูตรตำรับและประเมินคุณภาพในด้านความแปรปรวนของน้ำหนัก ขนาด เนื้อสัมผัส การละลาย และความคงตัว พบว่าในตำรับที่ตีควรวใส่ talcum และ HPMC ลงไปเป็นสารช่วยในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อให้ตำรับมีความคงตัวและไม่รบกวนการปลดปล่อยสารสำคัญ โดยตำรับที่พัฒนาขึ้นมีความคงตัวดีถึงแม้จะเก็บไว้ในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 75%RH เป็นเวลา 6 เดือน อย่างไรก็ตามในโครงการต่อไปควรทำการศึกษาถึงความพึงพอใจของผู้ใช้ผลิตภัณฑ์เพิ่มเติม

Abstract

Pluchea indica (L.) Less (Asteraceae) has been used as traditional medicine in many tropical and sub-tropical countries. The leaf powder and leaf extracts are popularly consumed as a food supplement in Thailand in herbal tea preparation. Although, the free radical activities of the plant were also extensively investigated, the factor affecting these biological activities have not been reported. Thus, the aims of this study in the second year were to explore the influence of genetic, season and maturity stage. DNA sequences and DNA fingerprints of *P. indica* from different areas in Thailand were evaluated. These data of ITS regions were registered and deposited in GenBank for conservation benefit. For bioactive constituent content and free radical scavenging activity, the seasonal parameter exhibited low effect, while stage of maturity demonstrated significant different between juvenile leaf extract and mature leaf extract. The juvenile leaf extract illustrated significant higher bioactive content and free radical scavenging activity than mature leaf extract for every samples. For product development, the extract was formulated to pastilles in 12 formulations. The weigh variation, thickness, texture property, dissolution, and stability study of the products were evaluated. The results indicated that talcum and HPMC should be added as excipient for enhancing product stability. The developed formulation expressed a good stability in accelerated condition at 40 degrees Celsius, and humidity 75% for six months. In further study, the product satisfaction should be investigated.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iii
สารบัญเรื่อง.....	iv
สารบัญตาราง.....	v
บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	13
วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	26
สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....	44
ผลผลิต.....	45
บรรณานุกรม.....	46
ภาคผนวก.....	52
ประวัติผู้วิจัยและคณะ.....	77

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. ตัวอย่างกลุ่มที่ใช้ในการทดลองพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม.....	15
ตารางที่ 2 สูตรตำรับยาอมเม็ดน้มน้ำ.....	25
ตารางที่ 3. ปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอของขลุ่จาก 15 จังหวัด.....	27
ตารางที่ 4. จำนวนแถบดีเอ็นเอ monomorphic, polymorphic ของตัวอย่างขลุ่ 15 จังหวัด โดยใช้เทคนิค ISSR จาก 5 primers.....	35
ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของสารสกัดที่ได้ ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดจากใบขลุ่ในแหล่งและฤดูกาลต่างๆ.....	36
ตารางที่ 6 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่ในแหล่งและฤดูกาลต่างๆ.....	37
ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของสารสกัดที่ได้ ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณสารสำคัญ ในส่วนของใบอ่อน ใบแก่ระยะก่อนออกดอก ใบแก่ระยะออกดอก ของสารสกัดจากใบขลุ่ในประเทศไทย.....	39
ตารางที่ 8 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนของใบอ่อน ใบแก่ระยะก่อนออกดอก ใบแก่ระยะออกดอก ของสารสกัดจากใบขลุ่ในประเทศไทย โดยวิธี DPPH, ABTS, และ FRAP assays.....	40
ตารางที่ 9 ลักษณะทางกายภาพของยาอมเม็ดน้มน้ำ.....	41
ตารางที่ 10 ปริมาณสารสำคัญในตำรับเมื่อผ่านการเก็บเพื่อทดสอบความคงตัว.....	43

บทนำ

1. เนื้อหาของเรื่องที่มีผู้เคยทำวิจัยมาก่อน

ความหมายและความสำคัญของภาวะความเครียดจากออกซิเจน

ภาวะความเครียดจากออกซิเจน (Oxidative stress) หมายถึง สภาวะที่ขาดความสมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้เกิดสารอนุมูลอิสระหรือเกิดการสร้างอนุมูลอิสระ (free radicals) มากเกินไป (1) ทำให้สารอนุมูลอิสระเหล่านี้เข้าไปทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ เนื้อเยื่อและทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการแตกหัก โมเลกุลถูกย่อยสลาย ดีเอ็นเอและโปรตีนเกิดการตาย ส่งผลให้ไขมันเปลี่ยนไปเป็น lipid peroxidation และโครงสร้างดีเอ็นเอแตกหักออกจากกัน ซึ่งจะมีอยู่ 3 pathway หลักที่จะทำให้เกิดภาวะความเครียดออกซิเจนได้ ได้แก่ reactive pathway, energetic pathway และ metabolic pathway (2-4)

Reactive pathway นั้นจะทำงานร่วมกับออกซิเดชันที่มีอยู่เป็นอย่างมากในกระบวนการยกตัวอย่างเช่น ในกรณีที่ไวรัส แบคทีเรียเข้าไปกระตุ้นแมคโครฟาจหรือเซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดการ ทำงาน หรือการออกซิไดซ์ไลโปโปรตีน สิ่งเหล่านี้จะทำให้เกิดการกระตุ้น superoxide radicals ($O_2^{\bullet-}$) ได้เป็นอย่างดีและส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase ขึ้นมา โดยที่เอนไซม์นี้จะอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์และทำหน้าที่ขนส่ง อิเล็กตรอนจาก NADPH เข้าไปยังไซโตโครมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แล้วจะดึงโมเลกุลของออกซิเจน ออกมา ออกซิเจนจะทำหน้าที่รีดิวซ์อิเล็กตรอนออก 1 ตัว ก่อให้เกิด superoxide anion อีกทั้งยังส่งผลต่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) หลังจากเกิดปฏิกิริยา dismutation ของ H_2O_2 เอนไซม์ myeloperoxidase และ chlorine (Cl^-) จะทำให้กระบวนการผลิต hydroxyl radicals เพิ่มมากขึ้นในสภาวะเป็นกรดและเกิดอนุมูล hypochlorite ซึ่ง hydroxyl radicals เป็น สารที่สามารถทำลายจุลชีพและเป็นสารออกซิไดซ์ได้ดี

Energetic pathway จะมีความเกี่ยวข้องกันกับ ATP ที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย เมื่อมีการผลิตพลังงานขึ้น มันจะสามารถก่อให้เกิด oxidative stress ได้เมื่อ quenching system มีการรั่วไหล และทำให้ไม่สามารถผลิตหรือผลิต ATP ออกมาได้มากเกินไป ทั้งนี้จะเกิดขึ้นในเมทริกซ์ที่อยู่ภายในไมโทคอนเดรียเมื่อโครงสร้างของเมทริกซ์นั้นมีความบวมพองและมีการขัดขวางการผลิตพลังงานขึ้น เซลล์ จะไม่มีการสร้างพลังงาน ATP ขึ้นมาได้ปกติและกระตุ้นให้เซลล์เกิดความแก่และตายแบบอะพอพโทซิส

Metabolic pathway เป็นวิธีหนึ่งที่มีความหลากหลายของปฏิกิริยา ซึ่งอาจจะมีการผลิต superoxide radicals ขึ้นมา โดยทั่วไปปฏิกิริยาจะมีการเปลี่ยนแปลงของ arachidonic ในพรอสตา แกลนดินหรือการสร้าง norepinephrine จากโดปามีน ในการสร้างกรดยูริกจากแซนทีนนั้น ROS (reactive oxygen species) ถูกสร้างขึ้นเมื่อเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยน hypoxanthine เป็น xanthine

และหลังจากขั้นตอนการเปลี่ยน xanthine ไปเป็นกรดยูริก ทำให้มีการสร้าง hydrogen peroxide และ superoxide radicals ออกมาตามลำดับ โดยที่ xanthine oxidase จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาคลายกับเอนไซม์ทั่วไป

ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นส่วนประกอบหนึ่งของสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญ ที่จะช่วยให้เกิดความสมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในส่วนต่างๆ ของร่างกาย โดยทั่วไปแล้วภาวะความเครียดออกซิเจนจะเกิดขึ้นเพียงชั่วคราวแต่จะยืดอายุการเจ็บป่วยขึ้น

ภาวะความเครียดจากออกซิเจนสามารถทำให้สารชีวโมเลกุลถูกทำลายได้ เช่น ลิพิด น้ำตาลไขมัน และดีเอ็นเอ เพราะการขาดความสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ (2)

การก่อให้เกิด Lipid peroxidation นั้น มาจากการที่อนุมูลอิสระเข้าไปจับกรดไขมันตรงหมู่ s side และทำการเคลื่อนย้ายไฮโดรเจนอะตอมออกจาก methylene carbon หลังจากนั้น lipid radical จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็น peroxy radical ซึ่งการเกิด lipid peroxidation นี้เป็นปฏิกิริยาที่รุนแรงมากในการทำลายไฮโดรเจนอะตอมและเกิดการถ่ายทอดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยที่ hydroxyl radicals ถือเป็นสารอนุมูลอิสระตัวหลักๆ ในปฏิกิริยาการเกิด lipid peroxidation ที่สามารถเข้าทำลายระบบสรีรวิทยาได้ (4)

น้ำตาลมีการสร้างออกซิเจนที่เป็นอนุมูลอิสระขึ้นในกระบวนการไกลเคชัน (glycation) ซึ่งสามารถทำลาย glycoxidative ได้ ขั้นตอนของเกิดปฏิกิริยาไกลโคซิเลชัน (glycosylation) คือ การเติมหมู่น้ำตาลไปยังอะตอมต่างๆ ทำให้โมเลกุลน้ำตาลเกิดการแตกหักกลายเป็นโมเลกุลเล็กๆ เป็น glycoaldehyde โดยที่สารตัวนี้สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เองและจะผลิต superoxide radical ออกมา ผลกระทบของการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่นี้จะทำให้อนุมูลอิสระสร้าง α และ β -dicarbonyls ซึ่งสารเหล่านี้ก็คือสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (5)

โปรตีนจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนต่างๆ ยกอย่างเช่น arginine, cysteine, histidine และ methionine กรดอะมิโนเหล่านี้จะมีความไวต่อการเกิดอนุมูลอิสระเป็นอย่างมาก อนุมูลอิสระจะเป็นตัวกลางที่ทำให้โปรตีนเกิดการแปรสภาพ ทำให้มีความไวต่อเอนไซม์ในกระบวนการโปรตีโอไลซิส (proteolysis) ปฏิกิริยาออกซิเดชันอาจจะทำให้โปรตีนเกิดการผลิต receptors, enzyme และ membrane transportors บกพร่องไป ซึ่ง peroxy radicals นี้จะเป็นสารอนุมูลอิสระที่มักเกิดขึ้นเป็นประจำในปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีน สารอนุมูลอิสระจะลบข้อมูลของโปรตีนและผลิต carbonyls หรือกรดอะมิโนอื่นๆ ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไป การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนจะส่งผลต่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ กลไกการส่งสัญญาณ ความไวต่อกระบวนการย่อยสลายโปรตีน และความเสถียรต่อความร้อน (6)

ดีเอ็นเอจะถูกทำลายได้นั้นขึ้นเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยอนุมูลอิสระทั้งในด้านโครงสร้างและสารเคมี เกิดลักษณะพิเศษแตกต่างกันไปของโครโมโซม เช่น การเรียงตัว การตัดออก การเชื่อมต่อกันระหว่างดีเอ็นเอและโปรตีน การเพิ่มหรือหายไปของนิวคลีโอไทด์ การผลิต base free

site การเปลี่ยนแปลงของเบส และการแตกหักของสายดีเอ็นเอ ซึ่งการเร่งปฏิกิริยาโดยอนุมูลอิสระนี้จะทำให้ดีเอ็นเอมีการผลิต hydroxyl radicals ออกมา ตัวอนุมูลอิสระนี้จะเข้าไปเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายในโมเลกุลของดีเอ็นเอ เช่น เบสไพริมิดีน เบสเพียวรีน และน้ำตาลดีออกซีไรโบสที่เป็นโครงสร้างหลักของดีเอ็นเอ

การที่โมเลกุลดังกล่าวมาข้างต้นนั้นถูกทำลายลงจะส่งผลร้ายให้เกิดโรคที่รุนแรงมากมาย เช่น อาการหายใจลำบากในผู้ใหญ่ ภาวะหายใจลำบาก โรคอัลไซเมอร์ โรคภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง โรคออทิสซึม โรคมะเร็ง ต้อกระจก โรคหัวใจ เช่น หลอดเลือดแดงตีบ และ สมอของขาดเลือด ความโรคชราที่มาพร้อมกับความแก่ โรคเบาหวาน ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากการเป็นโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง การอักเสบ การทำงานของตับ ระบบประสาทและไตผิดปกติ โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคอ้วน โรคพาคินสันและฮันติงตัน โรคหลอดเลือดอักเสบ โรคไตอักเสบเฉียบพลัน เกิดผื่นแดงคัน และเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (6-11)

สารต้านอนุมูลอิสระ

1. ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือ โมเลกุลหนึ่งที่มีความสำคัญในการลดการทำงานของ ROS, RNS หรือทั้งสองในกระบวนการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปลดไม่ให้สารอนุมูลอิสระทำงาน โดยการกำจัดสารอนุมูลอิสระก่อนที่จะเข้าไปจับกับสารชีวโมเลกุลและป้องกันไม่ให้ออกซิเจนเกิด reactive species ในร่างกายของเราจะได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากที่ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อ เช่น เอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการรับประทานอาหารเข้าไป ซึ่งเชื่อว่าจะสามารถควบคุมการทำงานของ ROS ได้ มีนักวิทยาศาสตร์บางท่านคาดว่า การขาดสมดุลระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับเข้าและสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายต้องการนั้น ส่งผลให้มนุษย์ป่วยเป็นโรคต่างๆ ได้ (12-14)

2. ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ชนิดที่เป็นเอนไซม์และชนิดที่ไม่เป็นเอนไซม์ สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดมาจากการผลิตขึ้นในเนื้อเยื่อ เช่น เอนไซม์ สารโมเลกุลเดี่ยว และเอนไซม์โคแฟกเตอร์ ในส่วนของสารต้านอนุมูลชนิดที่ไม่เป็นเอนไซม์นั้น อาจจะได้รับมาจากแหล่งอาหารต่างๆ ซึ่งโดยส่วนใหญ่ก็จะเป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอล (15)

2.1 สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่เป็นเอนไซม์

สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), Glutathione reductase (GRe), Glutathione S-transferase (GST) และ heme oxygenase 1 (HO-1)

SOD และ CAT มีความสามารถสูงในการเข้าทำปฏิกิริยากับ ROS โดยที่ SOD แบ่งถูกจะออกได้เป็น 3 ชนิดในร่างกาย ได้แก่ CuZn-SOD อยู่ในไซโตซอล, Mn-SOD อยู่ในไมโทคอนเดรีย และ SOD ที่อยู่ภายนอกเซลล์ SOD ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไม่ให้ออกซิเจนเกิด superoxide และ hydrogen peroxide และจะพบ SOD ได้มากในสิ่งมีชีวิตที่เป็นยูคาริโอตและโพรคาริโอต ส่วน CAT จะพบได้มากมายในร่างกาย ซึ่งจะทำงานได้ดีในตับ เซลล์เม็ดเลือดแดงและปอด ตามลำดับ CAT จะปกป้องเซลล์ด้วยการกระตุ้นไม่ให้ hydrogen peroxide เข้าไปเปลี่ยนออกซิเจนในโมเลกุลและไม่ให้ น้ำฟลูตออนุมูลอิสระออกมา อย่างไรก็ตาม CAT ก็สามารถเป็นสารประกอบที่มีพิษได้ เช่น แอลกอฮอล์ กรดฟอร์มิก ฟอร์มัลดีไฮด์ และฟีนอลในปฏิกิริยา peroxidation โดยที่ CAT ที่เป็นสารประกอบที่มีพิษนี้จะพบได้ในไมโทคอนเดรีย ที่เป็นแหล่งผลิตและเป็นเป้าหมายหลักของ ROS การที่ไมโท-คอนเดรียผลิต ROS และสารอนุมูลอิสระมากเกินไป ส่งผลให้ Mn-SOD แสดงออกมากขึ้น เมื่อเกิด oxidative stress มากจะทำให้ยีนเกิดการแสดงออกของ Mn-SOD เป็นกลไกในการป้องกันตัวเอง ทำให้ oxidative ทำลายไมโทคอนเดรียได้น้อยลง (16-17)

GPx และ GRe มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลาย H_2O_2 และกระบวนการขับสารพิษของ metabolic peroxide และ hydroperoxide ที่เกิดขึ้นภายในสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะร่วมมือกันผลิตกลูต้าไทโอนให้อยู่ในรูปปรีดีทซ์ กลายเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ GST มีหน้าที่เป็นเหนี่ยวกันในกระบวนการขับสารพิษของสาร alkylating และสารออกซิไดซ์ GPx GRe และ GST ได้มีรายงานออกมาถึงความสามารถในการลดแอลกอฮอล์เมื่อทดสอบในหนูและจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อทดสอบร่วมกับสารประกอบฟีนอลิก (18-19)

HO-1 มีความสำคัญในกระบวนการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย อย่างเช่น การนำเอาเหล็กกลับมาใช้ใหม่ในช่วงที่มีการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดงและการตอบสนองต่อความเครียด เช่นภาวะเลือดมีออกซิเจนน้อย HO-1 ก็มีส่วนร่วมในการต้านความเครียดของกระบวนการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย เช่นเดียวกัน รวมทั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ สารที่มีประโยชน์เหล่านี้คือ สารสื่อกลางที่เกิดจากการผลิตของ HO-1 และปรับปรุงให้เนื้อเยื่อของเซลล์ที่รอดตายและมีการพัฒนาให้มีความจำเพาะมากขึ้น นักวิทยาศาสตร์ส่วนใหญ่ต่างมุ่งให้ความสำคัญไปความหลากหลายของผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายและการเสื่อมสภาพโดย HO-1 ใน heme โดยเฉพาะอย่างยิ่ง carbonmonoxide และ biliverdin ที่จะแสดงออกในโมเลกุล biliverdin ถือเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านการอักเสบและมีศักยภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (20-23)

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระชนิดที่ไม่เป็นเอนไซม์

มนุษย์มีกลไกในการป้องกันสารต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากได้รับสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่เพียงพอที่ไม่เกี่ยวกับการอดอาหาร ในการเปลี่ยนแปลงบางจุดที่กรดยูริคถูกแทนที่ด้วยวิตามินซี (ascorbic acid) ซึ่งวิตามินซีเป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ในของเหลวของมนุษย์ มนุษย์ไม่สามารถสร้างวิตามินซีขึ้นมาเองได้ ดังนั้นจึงได้รับการรับประทานอาหารเท่านั้น นอกเหนือจาก

วิตามินซีแล้วสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ เช่น วิตามินอี แคโรทีนอยด์ และโพลีฟีนอล ต่างก็ได้รับมาจากแหล่งภายนอกต่างๆ และเป็นสารหลักที่มีส่วนช่วยให้มนุษย์มีสุขภาพที่ดี มีการคาดคะเนไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงการใช้ชีวิตประจำวัน รวมทั้งการปรับเปลี่ยนการรับประทานอาหารนั้น ส่งผลให้สารต้านอนุมูลอิสระเข้าไปกีดขวางการเกิดมะเร็งได้มากกว่า 2-3 ชนิดในมนุษย์ โดยสมมติแล้วการเกิดกลไกเพื่อป้องกันการเกิดโรค รวมทั้งการปรับปรุงเอนไซม์ให้ดีขึ้นในกระบวนการขับสารพิษและการยับยั้งไม่ให้เกิดการเข้าจับโมเลกุลโดยสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติ (24)

การวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระ

1. การวิเคราะห์ทางเคมี (chemical base assay)

DPPH radical scavenging assay (25, 26)

โมเลกุลของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl มีลักษณะเป็น stable free radicals ซึ่งวิธีนี้ถูกใช้อย่างกว้างขวางในการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH radicals มีลักษณะพิเศษคือ ละลายในเอทานอลจะมีสีม่วงและดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เมื่อสารละลาย DPPH เข้าทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระและเปลี่ยนให้อยู่ในรูปปรีดิซซ์ ทำให้จากสีม่วงของ DPPH radicals จะจางลง ดังนั้น การวิเคราะห์นี้จึงประเมินความสามารถของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH radicals อนึ่ง วิธี DPPH นี้ยังเป็นวิธีที่ง่ายต่อการวิเคราะห์ รวดเร็วและมีราคาถูกเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์อื่นๆ

ABTS radical scavenging assay หรือ TEAC assay (27, 28)

Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) คือ การตรวจวัดความสามารถในการยับยั้งของสารต้านอนุมูลอิสระจากค่าการดูดกลืนแสงของ 2, 2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulphonate) radicals (ABTS) ABTS ละลายในเอทานอลและน้ำ มีค่าการดูดกลืนแสงสูงถึง 734 นาโนเมตร โดยการทดลองนี้วิเคราะห์ความสามารถรวมของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการไม่มีสีของ ABTS radicals ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง ABTS ให้มีโครงสร้างที่ทำให้มองเห็นเป็นสี จากการเกิดออกซิเดชันของ ABTS และ potassium -persulfate การวิเคราะห์นี้สามารถประยุกต์เข้าได้กับสารประกอบ lipophilic และ hydrophilic สารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้ว จะทำการวิเคราะห์ได้หลังจากผ่านไป 120 นาที ที่มีการผสมเข้ากับสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ในขั้นตอนแรก trolox เป็นแอนาลอกของวิตามินอีที่สามารถละลายน้ำได้ โดยทั่วไปก็จะใช้ trolox ในการวัดเทียบค่ามาตรฐาน

Reducing power method (29, 30)

Reducing power method เป็นหลักการพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยารวมของการเปลี่ยนรูปจาก Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ในการทดลองนี้สารต้านอนุมูลอิสระจะอยู่

ในรูปสารเชิงซ้อนที่มีสีกับ potassium ferricyanide, trichloro acetic acid และ ferric chloride ซึ่งจะวิเคราะห์ได้ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร จะแสดงผลของสารรีดิวซ์ที่เข้าไปเปลี่ยน Fe^{3+} (ferric cyanide complex) เป็น Fe^{2+} (Perl's Prussian blue formation) ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเป็นสารรีดิวซ์ของตัวอย่าง

Ferric reducing antioxidant power assay (31, 32)

Ferric reducing antioxidant power assay เป็นเทคนิคที่ใช้วัดความสามารถรวมของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถรีดิวซ์เหล็ก ferric ได้ โดยพื้นฐานของการวิเคราะห์นี้คือการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างเหล็กและ TPTZ เกิดเป็นสารสีน้ำเงินเมื่ออยู่ในรูป ferrous ในสถานะที่เป็นกรด ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับค่า pH ในร่างกาย ข้อดีของการทดลองนี้คือ ง่าย และไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษ ซึ่งการเกิดปฏิกิริยารีดักชันนี้ สามารถวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ทางเซลล์ (cell base assay)

Cellular antioxidant activity (CAA) assay (33, 34)

dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) เป็นสารที่ถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายแล้วจะกลายเป็นสารเรืองแสง dichlorofluorescein (DCF) โดยอนุมูลอิสระ ที่จะใช้สำหรับทดสอบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์มนุษย์ วิธีการทดสอบนี้จะวิเคราะห์ความสามารถของสารที่จะทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันภายในเซลล์ โดยจะใช้สารเรืองแสงในการติดตาม DCFH-DA การวิเคราะห์นี้ก็จะเป็นการทดสอบหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติในระดับเซลล์ อนุมูลอิสระที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์หรืออยู่ภายในเซลล์สามารถเกิดออกซิไดซ์ DCFH-DA ได้ทันที โดย peroxy, peroxynitrite หรือ hydroxyl radicals เปลี่ยน DCFH-DA เป็น DCF ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่มีการกระตุ้นพลังงานที่ 480 นาโนเมตร และปลดปล่อยพลังงานที่ 526 นาโนเมตร เซลล์จะดูดซึม DCFH-DA ที่อยู่ในรูปสเตียร แต่จะเกิดการรั่วไหลอย่างรวดเร็วสังเกตได้หลังผ่านไป 1 ชั่วโมง การทดลองนี้ใช้เวลาในการทดสอบนานมากจึงควรหลีกเลี่ยง การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของสารเรืองแสงสามารถเกิดขึ้นได้หลายวิธี เช่น การเกิดปฏิกิริยาโดยตรงซึ่งก็จะเกี่ยวกับอนุมูลอิสระหรือ ROS หรือจะเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ที่จะเข้าไปลดระดับสารอนุมูลอิสระในเซลล์

Expression of antioxidant enzyme assay (35, 36)

CAA เป็นการทดสอบที่ใช้ประมาณความสามารถของสารประกอบหรือสารเชิงซ้อนที่จะทำหน้าที่เป็นสารรีดิวซ์การเกิดออกซิเดชันภายในเซลล์แต่ไม่สามารถบอกถึงกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระได้ ดังนั้น จึงค้นหาเอนไซม์บางตัวที่สามารถเข้าจับกับตัวเป้าหมาย ตัวอย่างเช่น ยับยั้ง NADPH oxidase ที่จะทำหน้าที่ในการผลิต superoxide หรือก่อให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น SOD และ CAT ส่งผลให้ระดับ superoxide/ H_2O_2 ลดลง เอนไซม์ที่

เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญของกลูตาไทโอน (GSH) นี้ยังช่วยปกป้องเซลล์ GRe และ GPx จะทำหน้าที่ควบคุมให้เกิดความสมดุลระหว่างกลูตาไทโอนในรูป รีดิวซ์ (GSH) และกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์ (GSSG) ในขั้นตอนการให้พลังงาน NADPH สัดส่วนของ GSH/GSSG จะถูกใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงดัชนีการเกิดภาวะความเครียดออกซิเดชัน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของต้นขลุ้

งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการยับยั้งหรือต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชสมุนไพรมีมากมาย ดังเช่น ขลุ้ (*Pluchea indica* Less) เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae (Compositae) ที่ได้รับความสนใจเป็นวงกว้างในการศึกษาหาฤทธิ์ต่อการต้านอนุมูลอิสระหรือต้านแบคทีเรีย ยกตัวอย่างเช่น Roslida AH (2008) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบและยับยั้งความปวดของสารสกัดใบขลุ้ที่สกัดด้วยเอทานอลในหนูขาว ในการทดสอบการต้านการอักเสบของสารสกัดใบขลุ้ เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 300 mg/kg หลังจากให้สารสกัดผ่านทางปากนาน 180 นาที พบว่าสามารถยับยั้งอาการบวมได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 87.9% สำหรับการทดสอบการยับยั้งความเจ็บปวด ได้ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับการทดสอบการยับยั้งการอักเสบ คือที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 300 mg/kg และหลังให้สารสกัดผ่านทางปากนาน 15 นาที พบว่า สามารถฤทธิ์ยับยั้งความเจ็บปวดได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 60.7% (37) ต่อมา Faridah A. และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากสารสกัดใบและรากของขลุ้ โดยใช้เมทานอลและเฮกเซนเป็นตัวทำละลาย แล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดใบที่ใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายมีความสามารถในการต้านอนุมูลได้ดีที่สุด มีค่า IC₅₀ อยู่ที่ 24.45±0.34 µg/ml และมีปริมาณฟีนอลิครวมสูงที่สุดคือ 573.53±6.3 mg GAE/ 100 g crude extract (38) และในปีเดียวกัน Noorzuraini A.R. S และคณะ (2011) ทำการทดสอบหาโพลีฟีนอลและฤทธิ์ต้านอนุมูลของผักพื้นบ้าน โดยทำการเปรียบเทียบฤทธิ์ของ-ผักที่นำมาทดสอบใน 2 ฤดู คือ ฤดูฝนและฤดูร้อน และใช้ acidified methanol (0.1% HCl) เป็นตัวทำละลาย พบว่า สารสกัดขลุ้ A ในฤดูฝนและฤดูร้อน มีปริมาณฟีนอลิครวมเท่ากับ 294±39 mg/Kg GAE fw และ 316±18 mg/Kg GAE fw ส่วนสารสกัดขลุ้ B ในฤดูฝนมีปริมาณฟีนอลิครวมเท่ากับ 62±2.5 mg/Kg GAE fw และในฤดูฝนมีเท่ากับ 97±27 mg/Kg GAE fw สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดขลุ้ A ทั้งในฤดูฝนและฤดูร้อน มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระได้ดี คือ กำจัด Fe²⁺ ไปได้เท่ากับ 0.851 mM Fe²⁺ และ 0.921 mM Fe²⁺ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดขลุ้ B ของทั้ง 2 ฤดู มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าสารสกัดขลุ้ A โดยที่สารสกัดขลุ้ B มีฤทธิ์ยับยั้ง Fe²⁺ เท่ากับ 0.101 mM Fe²⁺ และ 0.149 mM Fe²⁺ (39) และในปีต่อมา Srisook K. และคณะ (2012) ทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลุ้ที่สกัดด้วยการต้มน้ำแบบชาสมุนไพร จากการทดลองพบว่า สารสกัดขลุ้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี ด้วยวิธี DPPH และ Metal chelating มีค่า EC₅₀ เท่ากับ 23.8±0.1 µg/ml และ 4.2±0.1 µg/ml ตามลำดับ(40) อีกงานวิจัยหนึ่งที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มจำนวนและการย้ายของเซลล์มะเร็งโดยผ่านตัวเหนี่ยวนำ p53 ของสารสกัดใบและรากขลุ้ที่สกัดด้วยน้ำ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดรากและใบของขลุ้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน การย้ายและความอยู่รอดของเซลล์เนื้องอก (GBM8401 cell) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell)

โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 0.5 mg/ml และบ่มนาน 48 ชั่วโมง สารสกัดใบและรากขลุ้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนและความมีชีวิตรอดของเซลล์ทั้ง 2 ได้ มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งเท่ากับ 75% และ 70% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังทำการทดสอบหารสารเคมีในสารสกัดรากของขลุ้อีกด้วย พบว่า ในสารสกัดรากขลุ้มีปริมาณสารฟีนอลิครวมเท่ากับ 78.9 ± 0.6 mg GAE/g DW ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 40.4 ± 0.3 mg CE/g DW และปริมาณของสารโปรแอนโทไซยานินดินเท่ากับ 4.248 ± 0.068 mg CE/g DW Chunglung C. และคณะ (2012) รวมทั้ง ในปี ค.ศ. 2014 Widyamati PS. และคณะ ได้ทำการทดสอบความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระและทดสอบทางพิษเคมีของสารสกัดใบขลุ้ที่ใช้ตัวทำละลายหลายชนิด ได้แก่ น้ำ เมทานอล เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเฮกเซน จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดใบจากเมทานอลมีประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ด้วยวิธี DPPH และ FRAP ที่ความเข้มข้นของสารสกัดมีค่าเท่ากับ 794.9 mg GAE/g sample db (dry base) และ 2.14 mg GAE/g sample db สำหรับการทดสอบทางพิษเคมี พบว่า สารสกัดใบจากเมทานอลมีปริมาณฟีนอลิครวมและฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดเช่นกัน คือ 1185.2 mg GAE/g sample db และ 911.9 mg GAE/g sample db ตามลำดับ (41,42) เช่นเดียวกับกับ Suriyaphan O. (2014) ที่ทำการทดสอบหาปริมาณฟีนอลิครวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS, FRAP และ Lipid peroxidation ของสารสกัดใบขลุ้ที่สกัดด้วยน้ำ พบว่า สารสกัดใบขลุ้มีปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมเท่ากับ 0.831 ± 0.129 mg GAE/g fw และ 6.39 ± 0.27 mg/g fw ตามลำดับ และผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดใบขลุ้มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 96.4 ± 15.2 μ mole TE/g fw ตามมาด้วยวิธี ABTS ที่สารสกัดมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 3.75 ± 0.16 μ mole TE/g fw ส่วนฤทธิ์กำจัด Fe^{2+} พบว่าสามารถกำจัดอนุมูลได้ดีที่ความเข้มข้นเท่ากับ 81.1 ± 0.6 μ mole TE/g fw สำหรับฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระด้วยวิธี Lipid peroxidation นั้น พบว่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระไปได้ดี คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งได้ $98.5 \pm 0.4\%$ (43)

นอกจากการศึกษาหาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากขลุ้แล้วก็ยังมีอีกหลายงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาหาสารประกอบบริสุทธิ์ในขลุ้และนำเอาสารเหล่านั้นมาทดสอบฤทธิ์ต่างๆ อีกด้วย เช่น ในปี 2007 Chatterjee TK. และคณะ ได้ทำการทดสอบแยกจากสารสกัดรากขลุ้และนำที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านอะมีบา โดยสารประกอบบริสุทธิ์ที่ได้คือ R/J/3 ถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้ออะมีบา ก่อโรค ซึ่งก็คือ *E. histolytica* จากผลการทดลองพบว่า เมื่อให้ความเข้มข้นของสาร R/J/3 เท่ากับ 50 μ g/ml และบ่มนาน 2-4 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ของเชื้อมีการลดลงเมื่อเทียบกับตัวควบคุม โดยที่บ่มนาน 2 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ของเชื้อ *E. histolytica* ลดลงเหลือ 1×10^4 cell/ml เทียบกับตัวควบคุมที่มีอยู่ 5.8×10^4 cell/ml และเมื่อบ่มนาน 4 ชั่วโมง เชื้อมีการลดจำนวนลงเหลือ 0.3×10^4 cell/ml เมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 4.87×10^4 cell/ml (44) ในขณะเดียวกัน

Gomes A. (2007) ได้ศึกษาความสามารถในการต้านพิษจาก β -sitosterol และ stigmasterol ที่แยกได้จากสารสกัดรากขลุ่ยที่สกัดด้วยเมทานอล และนำมาทดสอบกับหนู (mice) เพศผู้ โดยใช้งู 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Dabodia russeil* และ *Naja kaouthia* พบว่า β -sitosterol และ stigmasterol สามารถต้านพิษได้อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในการทดสอบ Lethal activity, Hemorrhagic action, Defibrinogenation action, Edema และ PLA₂ activity สำหรับงู *D. russeil* และ การทดสอบ Lethal activity, Cardiotoxic activity, Respiratory activity และ PLA₂ activity สำหรับงู *N. kaouthia* (45) ต่อมาในปี ค.ศ. 2008 Ishibashi M. และคณะ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส MMP-2 และ MMP-9 ของสารประกอบทางเคมีที่แยกได้จากสารสกัดใบขลุ่ยที่สกัดด้วยเมทานอล ได้แก่ 1,3,4,5-tetra-*O*-caffeoylquinic acid (1), 3,4,5-tri-*O*-caffeoylquinic acid (2) และ Quercetin (3) ซึ่งผลการทดลองนี้จะวิเคราะห์ห่อออกมาเป็นค่า IC₅₀ โดยเทียบกับยา Phosphoramidon สำหรับการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนสและ Chlorhexidine สำหรับการทดสอบการยับยั้งการทำงานของ MMP-2 และ MMP-9 จากการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่า สารประกอบ 1-3 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ดี โดยที่สารประกอบ (1) มีค่า IC₅₀ อยู่ที่ 1.5±0.1 μ M ตามมาด้วย สารประกอบ (2) และ (3) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 6.3±0.4 μ M และ 15.9±1.8 μ M ตามลำดับ จะเห็นว่าสารประกอบ (1) และ (2) มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ได้ดีที่สุด จึงนำสารทั้ง 2 มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ MMP-2 และ MMP-9 พบว่า ในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของ MMP-2 นั้น สารประกอบ (1) สามารถยับยั้งการทำงานของ MMP-2 ได้ดีที่สุด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2.5±0.6 μ M และสารประกอบ (2) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 18.4±1.0 μ M และการทดสอบการยับยั้งของ MMP-9 ก็ให้ผลเช่นเดียวกันกับการทดสอบการยับยั้ง MMP-2 คือ สารประกอบ (1) ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 6.4±0.4 μ M และสารประกอบ (2) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 16.8±1.8 μ M (46) ในปีต่อมา Srisook k. และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารสกัดใบขลุ่ยในเซลล์แมคโครฟาจ RAW 264.7 โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย จากนั้นเอามาแยกให้ได้ส่วนสกัดโดยใช้ เฮกเซน เอทิลอะซิเตทและน้ำ แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์เทียบกับ aminoguanidine ซึ่งเป็นตัวควบคุมผลบวกจากการทดลองพบว่า ส่วนสกัดเอทิลอะซิเตท (EFPI) มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ได้ดีที่สุด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 19.11±2.58 μ g/ml ตามมาด้วยส่วนสกัดเฮกเซน (HFPI) และ ส่วนสกัดน้ำ (WFPI) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 26.08±2.80 μ g/ml และ 33.17±3.22 μ g/ml ตามลำดับ และค่า IC₅₀ ของ aminoguanidine เท่ากับ 20.66±2.80 μ g/ml จะเห็นได้ว่า EFPI มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดไนตริกออกไซด์ได้ดีเมื่อเทียบกับ amino guanidine ดังนั้น จึงนำเอา EFPI มาทดสอบการฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ iNOS, PGE₂ รวมถึงนำมาทดสอบการยับยั้งภาวะบวมน้ำโดยทำการทดสอบในหนู (rat) พบว่า EFPI สามารถยับยั้งการทำงานของ iNOS ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อความเข้มข้นของ EFPI อยู่ในช่วงระหว่าง 12.5-50 μ g/ml และผลทดสอบการยับยั้งการผลิตสาร PGE₂ พบว่า EFPI

สามารถลดการเกิด PGE2 ได้ที่ความเข้มข้นอยู่ในช่วงระหว่าง $6.25 \pm 50 \mu\text{g/ml}$ โดยเมื่อความเข้มข้นเท่ากับ $50 \mu\text{g/ml}$ สามารถลดการผลิตสาร PGE2 ได้ดีที่สุด ซึ่งลดการเกิดของสารไปได้ $59 \pm 4 \text{ pg/ml}$ สำหรับการทดสอบภาวะบวมน้ำโดยการฉีดสารเข้าทางหูของหนูโดยใช้ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 3 mg/ear และบ่มที่เวลาต่างๆ กันคือ 15, 30, 60 และ 120 นาที พบว่า หลังฉีดสารเข้าไปแล้ว 15 นาทีที่สามารถลดภาวะบวมน้ำ (ED) ได้ $8.3 \pm 7.53 \mu\text{m}$ มี %EI เท่ากับ 93.24 สำหรับการทดสอบภาวะบวมน้ำด้วยการฉีดสารคาราจีแนนเข้าทางอู้ง่าของหนู โดยที่ความเข้มข้นของ EFPI เป็น 150, 300 และ 600 mg/kg และบ่มที่เวลาต่างกัน คือ 1, 3 และ 5 ชั่วโมง พบว่า ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 600 mg/kg สามารถลดภาวะการบวมได้ดีที่สุดทั้ง 3 ช่วงเวลา (47) และในปี ค.ศ. 2014 Jun K. ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจากสารประกอบที่ได้จากส่วนสกัดของสารสกัดใบขลุ่ยที่สกัดด้วย 50% เมทานอล โดยใช้เอทิลอะซีเตทและน้ำในการแยกส่วนสกัดจากการทดลองพบว่า ส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์มอลเทสได้ดีกว่าส่วนสกัดน้ำ ดังนั้นจึงนำเอาส่วนสกัดเอทิลอะซีเตทมาทำการแยกสารประกอบด้วยวิธี Column chromatography ได้สารประกอบในกลุ่ม caffeoylquinic acid ออกมา 5 ชนิด ได้แก่ 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid (1), 4,5-di-O-caffeoylquinic ester (2), 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid methyl ester (3), 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid (4), 1,3,4,5-tetra-O-caffeoylquinic acid (5) แล้วนำสารเหล่านี้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเทสและแสดงผลการทดลองออกมาในค่า IC_{50} พบว่า สารประกอบ (1) มีความสามารถในการยับยั้งได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ $2 \mu\text{M}$ ตามมาด้วยสารประกอบ (5), (4), (2) และ (1) มีค่า IC_{50} เท่ากับ $11 \mu\text{M}$, $13 \mu\text{M}$, $208 \mu\text{M}$ และ $1166 \mu\text{M}$ ตามลำดับ (48)

2. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศไทยถือเป็นประเทศหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง พืชสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์จึงมีหลากหลายชนิด บางชนิดมีหลักฐานการใช้ประโยชน์ในเชิงพื้นบ้านมาอย่างยาวนาน และมีข้อมูลสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ จึงได้รับการส่งเสริมให้ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐาน เช่น ขมิ้นชัน ฟ้าทะลายโจร ชลู่ คุน และ มะระ เป็นต้น อย่างไรก็ตามพืชสมุนไพรบางชนิดที่ใช้ในงานสาธารณสุขมูลฐานและปัจจุบันมีการจำหน่ายอยู่ในท้องตลาดยังขาดการศึกษาข้อมูลด้านคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพร คุณภาพของสมุนไพรนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น แหล่งที่ปลูก พันธุกรรม สภาพอากาศ และระยะเวลาการเจริญเติบโต เป็นต้น และเมื่อนำสมุนไพรมาใช้เป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ ตัวชี้วัดคุณภาพที่สำคัญของสมุนไพรนั้นก็คือปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากจะเป็นสิ่งบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพและประสิทธิผลในการใช้สมุนไพร และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรได้อีกด้วย ในประเทศไทยสมุนไพรจำนวนหนึ่งได้ถูกกำหนดมาตรฐานไว้ใน Thai Herbal Pharmacopoeia ซึ่งอาศัยแนวทางตามองค์การอนามัยโลกแต่บางชนิดก็ยังไม่มีการระบุมาตรฐานวัตถุดิบไว้

กลุ่มพืชวิทยาศาสตร์ว่า *Pluchea indica* (L.) Less. อยู่ในวงศ์ Asteraceae เป็นสมุนไพรในสาธารณสุขมูลฐานต้นหนึ่งในตำรายาของไทยใช้ต้มกินเป็นยาขับปัสสาวะ แก้เบาหวาน แก้อักเสบ และเป็นยาอายุวัฒนะ พืชชนิดนี้พบได้ทั่วไปบริเวณป่าชายเลนและบริเวณน้ำกร่อย ชาวบ้านนำไปชโลมมาจิ้มน้ำพริกกินและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นของชุมชนเกษตรกรชายฝั่งทะเล เช่นในจังหวัดจันทบุรีสมุทรสงคราม และเพชรบุรี โดยทำออกมาในรูปแบบชาชงเพื่อออกจำหน่ายไปทั่วประเทศ ฐานข้อมูลของสำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพได้รายงานห่วงโซ่อุปทานของธุรกิจชาชลู่ว่า ในปี พ.ศ. 2555 มีมูลค่าชาใบชลู่รวมมากกว่าแปดล้านบาท จาก 5 กลุ่มเกษตรกรทั่วประเทศ และมีความสำคัญที่จะเติบโตขึ้นเรื่อยๆ อีกทั้งยังต้องการการสนับสนุนทางวิชาการด้านประสิทธิภาพและคุณภาพของวัตถุดิบ

จากข้อมูลเหล่านี้ในฐานะของนักวิชาการจึงเห็นช่องทางการเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรใบชลู่ โดยใช้วิธีการตามองค์ความรู้ปัจจุบันและเทคโนโลยีของเครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆจะช่วยให้ทราบถึงปริมาณสารสำคัญที่แน่นอนและทราบถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบชลู่ ซึ่งน่าจะแตกต่างกันไปตามปัจจัยแวดล้อมต่างๆดังกล่าวแล้วข้างต้น อีกทั้งพัฒนาใบชลู่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมมีคุณภาพดี โดยข้อมูลที่ได้มาจะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อให้เป็นประโยชน์ต่อผู้ผลิตและผู้บริโภคชาใบชลู่ เป็นแนวทางในการเลือกวัตถุดิบจากแหล่งปลูกที่มีคุณภาพ สายพันธุ์ดี เก็บเกี่ยวในฤดูกาลระยะเวลาการเจริญเติบโตที่เหมาะสม และการแปรรูปผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพ เพื่อเพิ่มมูลค่าและมูลค่าของผลิตภัณฑ์ใบชลู่ อีกทั้งการหาปริมาณสารสำคัญในใบชลู่ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการควบคุมคุณภาพสารสกัดและเตรียมสารสกัดมาตรฐานที่มีคุณภาพดีต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยในปีที่ 1 และ 2

1. เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งที่ปลูก พันธุ์กรรม ฤดูกาลเก็บเกี่ยว และช่วงการเจริญเติบโตที่ส่งผลให้ได้ใบชาที่มีสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด
2. เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดใบชา

ขอบเขตของการวิจัยและวิธีดำเนินการโดยสรุป

ปีที่ 1

1. เก็บใบชาโดยใช้ใบเพลสลาด (ใบที่ไม่อ่อนและแก่เกินไป) ปริมาณไม่น้อยกว่า ยี่สิบ กิโลกรัมแล้วนำมาสกัดด้วยน้ำร้อน
2. พิสูจน์เอกลักษณ์และพัฒนาวิธีวิเคราะห์ของสารสำคัญที่แยกได้โดยวิธี HPLC เพื่อใช้เป็น marker เปรียบเทียบปริมาณในสารสกัดต่างๆ
3. เก็บใบชาโดยใช้ใบเพลสลาด จากแหล่งต่างๆ แล้วนำมาสกัดด้วยน้ำร้อน
4. ระเหยแห้งสารสกัดแล้วเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณสาร total phenolics, total flavonoids, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและหาปริมาณสารสำคัญจากวิธี HPLC ที่ได้พัฒนามาแล้วข้างต้น
5. รวบรวมข้อมูลและสรุปผล

ปีที่ 2

1. พัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมและวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของใบชาจากแหล่งต่างๆ เพื่อใช้ในการอนุรักษ์และอ้างอิงสายพันธุ์ชาในประเทศไทย
2. เก็บตัวอย่างใบชาในฤดูกาลต่างๆ เพื่อให้ทราบฤดูกาลเก็บเกี่ยวใบชาที่ดีที่สุด
3. เก็บตัวอย่างใบชาในช่วงเวลาการเจริญเติบโตที่ต่างกัน สกัดสารแล้วเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณสาร total phenolics, total flavonoids ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารสำคัญ
4. พัฒนาสารสกัดใบชาเป็นผลิตภัณฑ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ได้ข้อมูลองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ เช่น ทราบปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ ทราบปริมาณ total phenolics และ total flavonoids ทราบสารสำคัญ วิธีวิเคราะห์สารและปริมาณสารสำคัญในใบขลุ่ ทราบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่ ทราบปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบขลุ่ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดมาตรฐานและอนุรักษ์พันธุกรรมของขลุ่ในประเทศไทย
2. สามารถเผยแพร่ผลงานในวารสารวิชาการ และเผยแพร่ในที่ประชุมวิชาการทั้งในหรือต่างประเทศ
3. สามารถถ่ายทอดความรู้ เทคนิคการวิเคราะห์และเสริมสร้างนักศึกษาระดับปริญญาตรีให้เป็นนักวิจัย
4. สามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกวัตถุดิบที่ดีเพื่อนำไปสู่การพัฒนาสารสกัดใบขลุ่เป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าผลผลิตของเกษตรกรในชุมชนที่มีการแปรรูปใบขลุ่

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างขลุ้จำนวน 15 จังหวัดของประเทศไทย และตัวอย่างเก็บเป็น herbarium specimen ไว้ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ตารางที่ 1. ตัวอย่างขลุ้ที่ใช้ในการทดลองพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม

ลำดับที่	จังหวัด	สถานที่เก็บ	วันที่เก็บ	Voucher No.
1	ภูเก็ต	ช. ร่วมใจอ่าวยนต์ ต. วิซิต อ.เมือง	06/07/59	JAM-001
2	สุราษฎร์ธานี	ต.สินปุน อ.พระแสง	19/08/59	JAM-002
3	นครราชสีมา	ต.ประโดก-โคกไผ่ อ.เมือง	03/08/59	JAM-003
4	ประจวบคีรีขันธ์	ต.ปากน้ำปราณ อ.ปราณบุรี	29/07/59	JAM-004
5	เพชรบุรี	1016 ต.ปึกเตียน อ.ท่ายาง	29/07/59	JAM-005
6	นนทบุรี	ต.บางกระสอ อ.เมือง	07/08/59	JAM-006
7	ราชบุรี	ทางหลวงสายเอเชียหมายเลข 2 ต.ดอนทราย อ.ปากท่อ	30/07/59	JAM-007
8	สงขลา	ถ.ลพบุรีราเมศวร์ ต.น้ำน้อย อ.หาดใหญ่	08/08/59	JAM-008
9	ฉะเชิงเทรา	ถ.สุขุมวิท ต.ท่าข้าม อ.บางปะกง	06/08/59	JAM-009
10	จันทบุรี	ต.บางกะไชย อ.แหลมสิงห์	26/08/59	JAM-010
11	ชลบุรี	ถ.ข้าวหลาม ต.บ้านปึก อ.เมืองชลบุรี	08/08/59	JAM-011
12	สมุทรสงคราม	ต.บางแก้ว อ.เมืองสมุทรสงคราม	29/08/59	JAM-012
13	สมุทรสาคร	ถ.ธนบุรี-ปากท่อ ต.บางกระเจ้า อ.เมือง	29/07/59	JAM-013
14	ระยอง	ถ.เฉลิมบูรพาชลทิศ ต.พังราด อ.แกลง	26/08/59	JAM-014
15	อุดรดิตต์	ต.ทุ่งยั้ง อ.ลับแล	02/08/59	JAM-015

2. การสกัดดีเอ็นเอโดยชุดเครื่องมือ DNeasy® Plant Mini Kit

(1) ใส่วัสดุบดพืชตัวอย่าง (≤ 100 mg wet weight หรือ ≤ 20 mg lyophilized tissue) ลงใน collection tube ขนาด 2 ml เติมบัฟเฟอร์ AP1 (Lysis buffer) 400 μ l ตามลงไป แล้วทำให้เซลล์แตกออก(disrupt) ด้วยเครื่อง TissueRuptor เป็นเวลาประมาณ 30 วินาทีด้วยความเร็วสูงสุด (full speed) แล้วย้ายสารไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube)

(2) เติมสารละลาย RNase A stock solution 4 μ l (100 mg/ml) ตามลงในเนื้อเยื่อพืชที่ถูกทำให้แตกออกแล้วทันที เพื่อให้เนื้อเยื่อเซลล์แตกและแยกออกจากกัน ไม่ให้มีการจับเป็นกลุ่มก้อน ถ้าหากมีกลุ่มก้อนของเนื้อเยื่อเกิดขึ้น จะทำให้ปริมาณของ DNA ที่จะสกัดนั้น มีปริมาณต่ำ

(3) นำสารผสมไปบ่ม (Incubate) เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

(4) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ P3 ปริมาตร 130 μ l ลงไปใน lysate จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเทคนิคปิเปต แล้วนำไปบ่ม (incubate) ต่อเป็นเวลา 5 นาทีบนน้ำแข็ง เพื่อช่วยในการตกตะกอนของสารจำพวกสารชะล้าง (detergent), โปรตีน (proteins) และโพลีแซ็กคาไรด์(polysaccharide)

(5) บั่นเหวี่ยง lysate เป็นเวลา 5 นาทีที่ $20,000 \times g$ ($14,000$ rpm)

(6) ปิเปต lysate ที่ได้ไปยัง QIAshredder Mini spin column ที่บรรจุอยู่ใน collection tube ขนาด 2 ml และนำไปบั่นเหวี่ยงต่ออีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที ที่ $20,000 \times g$ ($14,000$ rpm)

(7) วัดปริมาตรที่ได้ของเหลว (flow-through) จากขั้นตอนที่ 6 ย้ายไปใส่ลงในหลอดอันใหม่ ที่ปราศจากการรบกวนของเศษซากจากเซลล์

(8) เติมบัฟเฟอร์ AW1 ลงในส่วนใส (cleared lysate) ในปริมาตร 1.5 เท่าของ lysate แล้วผสมด้วยเทคนิคปิเปตทันที

(9) ปิเปตสารละลายผสมจากขั้นตอนที่ 8 มา 650 μ l รวมถึงตะกอนต่างๆใส่ลงใน DNeasy Mini spin column จากนั้นนำไปบั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาที ที่แรงเหวี่ยง $\geq 6000 \times g$ และทิ้งของเหลว (flow-through) ไป ซึ่งในของเหลวนั้นจะประกอบด้วยบัฟเฟอร์ AW1

(10) ทำซ้ำขั้นตอนที่ 9 ด้วยตัวอย่างที่เหลืออยู่ภายในหลอดเดิม ทิ้งของเหลว (flow-through) และ collection tube ไป

(11) วาง DNeasy Mini spin column ใส่ใน collection tube อันใหม่ขนาด 2 ml เติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 μ l แล้วบั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 1 นาทีที่ $\geq 6000 \times g$ ทิ้งของเหลว (flow-through) ไปและนำ collection tube กลับมาใช้ใหม่ในขั้นตอนที่ 12

(12) เติมบัฟเฟอร์ AW2 500 μ l ลงใน DNeasy Mini spin column แล้วนำไปบั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2 นาทีที่ $20,000 \times g$ ($14,000$ rpm)

(13) ย้าย DNeasy Mini spin column มาใส่บนหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 หรือ 2.0 ml แล้วปิเปตสารละลายบัฟเฟอร์ AE มา 50 μ l ใส่ลงบน membrane ของ DNeasy

จากนั้นนำไป incubate ต่อเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (15–25 องศาเซลเซียส) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงต่อเป็นเวลา 1 นาที ที่ $\geq 6000 \times g$ เพื่อชะล้างที่เหลื้อยู่ ซึ่งในขั้นนี้เปิดสารละลายบัฟเฟอร์ AE สามารถเลือกเติม 50, 100, 200 μl โดยการเติมแค่ 50 μl จะทำให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอสูงแต่ได้ปริมาตรรวมน้อย

(14) ทำซ้ำขั้นตอนที่ 13 อีกครั้ง โดยใช้หลอด microcentrifuge tube อันใหม่ในการชะล้างที่ สอง

3. การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยชุด Qubit[®] assays

(1) จัดเตรียมหลอดซึ่งบรรจุสารละลาย Standard A ปริมาตร 10 μl และ Standard B ปริมาตร 10 μl ไว้อย่างละหลอด และจัดเตรียมหลอดซึ่งบรรจุสารละลาย Sample ปริมาตร 1-20 μl

(2) เตรียมสารละลาย working solution โดยการผสม Qubit[®] reagent ปริมาตร 1xn μl กับ Qubit[®] Buffer ปริมาตร 199xn μl (n = จำนวน Standards รวมกับ จำนวน Samples)

(3) แบ่งสารละลาย working solution ออกเป็นสองส่วนหลักคือ ส่วนที่เป็น Standard (Standard A, Standard B) และส่วน Sample โดยให้แบ่งใส่ส่วน Standard อย่างละปริมาตร 190 μl และส่วน Sample ปริมาตร 199 μl

(4) ผสมให้เข้ากันโดยเทคนิคปิเปตหรือ vortex

(5) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที

(6) ใส่หลอดทดสอบเข้าไปในเครื่อง Qubit[®] Fluorometer แล้วอ่านค่าที่ได้ โดยวัดหลอดที่เป็น Standard A และ Standard B ก่อนแล้วค่อยวัด Samples ตามลำดับ

4. การตรวจสอบคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอโดยใช้ เทคนิค Gel electrophoresis

1) เตรียมอะกาโรสที่ความเข้มข้น 0.8% (หากเตรียมเจลสำหรับทำ PCR ใช้ 1% แต่หากเตรียมเพื่อทำ ISSR ใช้ 2%) โดยชั่งผงอะกาโรส 0.8

2) นำผงอะกาโรสในสารละลายบัฟเฟอร์ไปอุ่นในเครื่องไมโครเวฟ จนผงอะกาโรสละลายจนหมดและได้สารละลายที่ใส

3) เติมสี SYBR ใช้เป็น 1x ของปริมาตรสารละลายอะกาโรส

4) รอให้สารละลายอะกาโรสลดอุณหภูมิลง แล้วเทสารละลายลงถาดที่มีหวีอยู่ (โดยวางหวีให้ห่างจากขอบถาดประมาณ 1 เซนติเมตร)

หมายเหตุ ระวังการเกิดฟองอากาศขณะเทเจลลงในถาดรอจนเจลแข็งตัวดี

5) รอให้เนื้อเจลแข็งตัวและลดอุณหภูมิลง จากนั้นดึงหวีออก

- 6) แกะเจลออกจากถาดแล้วนำก้อนเจลไปวางในถังอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis tank) แล้วเทบัฟเฟอร์ TAE ให้ท่วมเจล 1-2 มิลลิเมตร
- 7) นำสารละลายดีเอ็นเอ 5 µl มาผสมสี Novel juice DNA staining dye, GeneDireX® 1 µl
- 8) เติมสารละลายดีเอ็นเอลงในหลุมอย่างระมัดระวัง (ระวังสารละลายดีเอ็นเอ กระจายออกจากหลุม) โดยช่องแรกเติมเป็น DNA Ladder
- 9) ผ่านกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 35 V เข้าสู่เจลโดยกำหนดเวลา 20 นาที (หากเตรียมเพื่อทำ ISSR ผ่านกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 75 V เข้าสู่เจลโดยกำหนดเวลา 45 นาที)

5. การพิสูจน์สายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่ยที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้เทคนิค PCR

- 1) เตรียมส่วนประกอบก่อนเข้าปฏิกิริยา PCR ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml โดยใส่ส่วนประกอบที่มีปริมาตรมาก่อน ซึ่งส่วนประกอบมีดังนี้ One PCR Plus 25.0 µl, ultrapure water 18.0 µl, DNA template 5.0 µl, 10 µM Forward primer 1.0 µl, 10 µM Reverse primer 1.0 µl

Forward primer (18sF) = 5'-GAA CCT TAT CGT TTA GAG GAA GG-3'

Reverse primer (26sR) = 5'-CCG CCA GAT TTT CAC GCT GGG C-3'

- 2) นำ PCR tube ไปใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler ซึ่งกำหนดสภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขึ้น denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขึ้น annealing 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ขึ้น extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1.5 นาที ขึ้น final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และกำหนดให้ขึ้น denaturation, annealing และ extension ทำซ้ำ 35 รอบ

- 3) ตรวจสอบคุณภาพของ PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis
- 4) ตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค capillary electrophoresis
- 5) นำลำดับดีเอ็นเอที่ถอดรหัสได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.2
- 6) นำผลผลิต PCR ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอโดยชุดเครื่องมือ DNeasy Plant Mini Kit (ดูในหัวข้อ การสกัดดีเอ็นเอโดยชุดเครื่องมือ DNeasy Plant Mini Kit โดยเริ่มทำตั้งแต่ข้อ 4.)

6. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของขลุ่ยด้วยเทคนิค ISSR

- 1) เตรียมส่วนประกอบก่อนเข้าปฏิกิริยา PCR ลงใน PCR tube ขนาด 0.2 ml โดยใส่ส่วนประกอบที่มีปริมาตรมาก่อน ซึ่งส่วนประกอบมีดังนี้ One PCR Plus 12.5 µl, ultrapure water 9.0 µl, DNA template 2.5 µl, ISSR primer 1.0 µl

ISSR primer 5 ชนิด ได้แก่

ISSR 1 = 5'-ACC ACC ACC ACC ACC ACC G-3'

ISSR 2 = 5'-GAG AGA GAG AGA GAG AGA C-3'

ISSR 3 = 5'-AGA GAG AGA GAG AGA GAG C-3'

ISSR 4 = 5'-ACA CAC ACA CAC ACA CAC G-3'

ISSR 8 = 5'-CGT CAC ACA CAC ACA CAC A-3'

2) นำ PCR tube ไปใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler ซึ่งกำหนดสภาวะดังนี้ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ชั้น denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ชั้น annealing 56,60 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที ชั้น extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1.0 นาที ชั้น final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และกำหนดให้ชั้น denaturation, annealing และ extension ทำซ้ำ 40 รอบ(39)

3) ตรวจสอบคุณภาพของผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยเทคนิค gel electrophoresis

4) นับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

5) วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยการใช้โปรแกรมบนเว็บไซต์ <http://genomes.urv.cat/UPGMA/>

7. การเปรียบเทียบฤดูกาลต่างๆ โดยจัดเตรียมตัวอย่างใบช่อดอกโดยใช้ใบเพศลวดของจังหวัดนนทบุรี อุดรดิตถ์ นครราชสีมา สุราษฎร์ธานี ในเดือนเมษายนเป็นตัวแทนสำหรับฤดูร้อน เดือนสิงหาคมเป็นตัวแทนของฤดูฝน และเดือนธันวาคมเป็นตัวแทนของฤดูหนาว อบแห้งใบช่อดอกที่ล้างสะอาดแล้วที่ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำใบช่อดอกมาสกัดด้วยน้ำร้อน (1:10 w/v) โดยต้มเป็นเวลา 15 นาที ระเหยแห้งสารสกัดแล้วเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณสาร total phenolics และ total flavonoids และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังต่อไปนี้

7.1 Total phenolics

7.1.1. Folin–Ciocalteu reagent

เตรียมได้โดยนำสารละลาย Folin–Ciocalteu มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน สารละลาย Folin– Ciocalteu 1 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

7.1.2. 7.5 % w/v Sodium bicarbonate solution

เตรียมโดยชั่ง Sodium bicarbonate 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

7.1.3. สารสกัดเข้มข้น 500 µg/ml

เตรียมจาก stock เข้มข้น 1000 µg/ml โดยชั่งสารสกัด 0.001 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นหรือ DMSO ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูตมา 500 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำหรือ DMSO 500 ไมโครลิตร ได้สารสกัดเข้มข้น 500 µg/ml

7.1.4. Gallic acid (Standard solution) 500 µg/ml

เตรียมจาก stock เข้มข้น 5000 µg/ml ที่ได้จากการชั่ง gallic acid 0.025 กรัม ละลาย ด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร แล้วดูตมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับเมทานอล 900 ไมโครลิตร ได้ Gallic acid ความเข้มข้น 500 µg/ml

ขั้นตอนทดสอบ เติมสารตามหลุมที่กำหนดดังนี้

หลุมที่ 1 = สารสกัด (500 µg/ml) 20 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลาย Folin–Ciocalteu 50 ไมโครลิตร และ 7.5% NaHCO₃ 80 ไมโครลิตร

หลุมที่ 2 = กรดแกลลิก (500-3.9 µg/ml) 20 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลาย Folin–Ciocalteu 50 ไมโครลิตร และ 7.5% NaHCO₃ 80 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปปมในที่มืด 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเป็นระยะ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืน สารที่ 765 นาโนเมตร และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิครวม

7.2 Total flavonoids

7.2.1. 2% Aluminium chloride

ชั่ง AlCl₃ 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

7.2.2. สารสกัดเข้มข้น 500 µg/ml

เจือจางจาก stock เข้มข้น 1000 µg/ml โดยปิเปตมา 500 ไมโครลิตร ละลายกับน้ำกลั่น หรือ DMSO 500 ไมโครลิตร

7.2.3. Quercetin 100 µg/ml

เตรียม Quercetin เข้มข้น 1000 µg/ml โดยชั่ง Quercetin 0.001 กรัม ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับเมทานอล 900 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นเป็น 100 µg/ml

ขั้นตอนทดสอบ

เตรียมสารตามหลุมที่กำหนดดังนี้

หลุมที่ 1 = สารสกัด (500 µg/ml) 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 2% AlCl₃ 100 ไมโครลิตร

หลุมที่ 2 = Quercetin (100 - 0.78 µg/ml) 100 ไมโครกรัม ผสมกับ 2% AlCl₃ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่ม 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเป็นระยะๆ แล้วนำไปค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตรวิเคราะห์ผลจากสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน

7.3. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบขลู่ โดยวิธี DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) และ FRAP (ferric reducing antioxidant power) ดังนี้

7.3.1 DPPH scavenging assay สารที่ต้องใช้และการเตรียมสาร

1). DPPH solution working

ชั่ง DPPH 0.003 กรัม ละลายกับเมทานอล 50 มิลลิลิตร

2). Ascorbic acid 50 µg/ml

เตรียมจาก stock เข้มข้น 1000 µg/ml โดยชั่ง Ascorbic acid มา 0.001 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตมา 50 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 950 ไมโครลิตร ได้ Ascorbic acid เข้มข้น 50 µg/ml

3). สารสกัด 1000 µg/ml

ชั่งสารสกัด 0.001 g ละลายด้วยน้ำกลั่นหรือ DMSO ปริมาตร 1000 ไมโครลิตร

4). สารสกัด 250 µg/ml

ปิเปตจาก stock 1000 µg/ml มา 250 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นหรือ DMSO 750 ไมโครลิตร

เตรียมสารตามที่กำหนด ดังนี้

หลุมที่ 1 = DPPH solution 100 ไมโครลิตร ผสมกับเมทานอล 100 ไมโครลิตร

หลุมที่ 2 = สารสกัด (125 - 0.976 µg/ml) 100 ไมโครลิตร ผสมกับ DPPH solution 100 ไมโครลิตร

หลุมที่ 3 = Ascorbic acid (25 - 0.3 µg/ml) 100 ไมโครลิตร ผสมกับ DPPH solution 100 ไมโครลิตร

บ่มนาน 20 นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำออกมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร

$$\%inhibition = (Abs. Control - Abs. Sample)/Abs. Control \times 100$$

ค่า IC₅₀ คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ 50% หาได้จากการพลอตกราฟระหว่างแกน y คือ %inhibition และ X คือ ความเข้มข้น จากนั้นคำนวณหาสมการเส้นตรง แล้วแทนค่าลงในสมการ

7.3.2 ABTS radical scavenging assay สารที่ใช้และการเตรียมสาร

1). ABTS solution working

Stock ABTS 1 มิลลิลิตร ผสมกับ เมทานอล 39 มิลลิลิตร

2). สารสกัด 50 µg/ml

เจือจางจาก 1000 µg/ml โดยปิเปตมา 50 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่นหรือ DMSO 950 ไมโครลิตร

3). Ascorbic acid 50 µg/ml

เตรียมจาก stock เข้มข้น 1000 µg/ml โดยชั่ง Ascorbic acid มา 0.001 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตมา 50 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 950 ไมโครลิตร ได้ Ascorbic acid เข้มข้น 50 µg/ml

ขั้นตอนการทดลอง

เตรียมสารตามที่กำหนดดังนี้

หลุมที่ 1 = ABTS solution 100 ไมโครลิตร ผสมกับ เมทานอล 100 ไมโครลิตร

หลุมที่ 2 = สารสกัด (25 – 0.19 µg/ml) 100 ไมโครลิตร ผสมกับ ABTS Solution 100 ไมโครลิตร

หลุมที่ 3 = Ascorbic acid (50 – 0.3 µg/ml) 100 ไมโครลิตร ผสมกับ ABTS solution 100 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในที่มืด นาน 6 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร

$$\%inhibition = (Abs. Control - Abs. Sample)/Abs. Control \times 100$$

ค่า IC₅₀ คือ ความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้ 50% หาได้จากการพลอตกราฟระหว่างแกน y คือ %inhibition และ X คือ ความเข้มข้น จากนั้นคำนวณหาสมการเส้นตรง แล้วแทนค่าลงในสมการ

7.3.3 Ferric reducing antioxidation power (FRAP) assay สารที่ต้องใช้และการเตรียมสาร

1). สารละลาย FRAP

เตรียมได้จากการผสม 300 mM acetate buffer pH. 3.6, 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl และ 20 mM FeCl₃ ในอัตราส่วน 10:1:1

2). Ferrous sulfate (FeSO₄·7H₂O) 500 µg/ml (Standard solution)

เตรียมความเข้มข้น 1000 µg/ml โดยชั่ง FeSO₄ มา 0.001 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตมา 500 ไมโครลิตร ละลายกับน้ำกลั่นอีก 500 ไมโครลิตร

3). สารสกัดเข้มข้น 250 µg/ml

เจือจางจาก stock เข้มข้น 1000 µg/ml ทำได้โดยปิเปตมา 250 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นหรือ DMSO 750 ไมโครลิตร

4). Ascorbic acid (Vitamin C) 50 µg/ml (positive control)

เตรียมวิตามินซีให้มีความเข้มข้นเป็น 1000 µg/ml โดยชั่งวิตามินซี 0.001 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตมา 50 ไมโครลิตร ละลายในน้ำกลั่น 950 ไมโครลิตร ได้ความเข้มข้น 50 µg/ml

ขั้นตอนทดสอบ

เตรียมสารตามหลุมที่กำหนดดังนี้

หลุมที่ 1 = สารสกัด (250 µg/ml) 50 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลาย FRAP 150 ไมโครลิตร

หลุมที่ 2 = FeSO₄ (500 – 0.78 µg/ml) 50 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลาย FRAP 150 ไมโครลิตร

หลุมที่ 3 = วิตามินซี (50 µg/ml) 50 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลาย FRAP 150 ไมโครลิตร

หลุมที่ 4 = น้ำกลั่นหรือ DMSO 50 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลาย FRAP 150 ไมโครลิตร

นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

การคำนวณสามารถหาได้จากสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดมาแทนลงในสมการ ผลที่ได้รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) with least significant difference (LSD) โดยโปรแกรม SPSS สำหรับ Windows® 16.0 ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95

8. เปรียบเทียบช่วงเวลาการเจริญเติบโตที่ต่างกัน

เก็บตัวอย่างใบขลุ้จากจังหวัดชลบุรี เพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงเวลาการเจริญเติบโตที่ต่างกันคือ ใบอ่อนขณะยังไม่ออกดอก ใบแก่ขณะออกดอก และใบแก่ขณะยังไม่ออกดอก สกัดสารแล้วเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณสาร total phenolics, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารสำคัญจากวิธี HPLC ที่ได้พัฒนาไว้แล้วในปีแรกของการวิจัยแล้ว จึงรวบรวมข้อมูลและสรุปผล ผลที่ได้รายงานเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) with least significant difference (LSD) โดยโปรแกรม SPSS สำหรับ Windows® 16.0 ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95

9 การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โดยตั้งตำรับยาอมเม็ดนิ่มจากสารสกัดขลุ้ (PLE pastilles)

การเตรียมตำรับยาอมเม็ดนิ่มสามารถทำได้โดย หลอมเจลาตินและน้ำตาล หลังจากนั้นก็เติมเจลาตินและสารสกัดขลุ้ (PLE) ผสมให้เข้ากัน เติมสารช่วยอื่น ๆ ในตำรับ ตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่งกลิ่นด้วย เทล่งแม่พิมพ์ รोजनเย็น แกะจากแม่พิมพ์ และนำยาอมเม็ดนิ่มไปประเมิน

9.1 ผลของปริมาณเจลาติน

9.1.1 ศึกษาปริมาณเจลาตินที่ส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพของยาอมเม็ดนิ่ม ที่ร้อยละ 10,15,20 และ 25 โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นนำไปประเมินผลตามข้อ 9.2

9.1.2 ผลของปริมาณทัลคัม (Talcum)

ศึกษาปริมาณทัลคัมที่ส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพของยาอมเม็ดนิ่ม ที่ร้อยละ 1, 2.5 และ 5 โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นนำไปประเมินผลตามข้อ 9.2

9.1.3 ผลของปริมาณไฮดรอกซีโพรพิลเมธิลเซลลูโลส (เอชพีเอ็มซี:HPMC)

ศึกษาปริมาณเอชพีเอ็มซีที่ส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพของยาอมเม็ดนิ่ม ที่ร้อยละ 5,10 และ 15 โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นนำไปประเมินผลตามข้อ 9.2

ตารางที่ 2 สูตรตำรับยาอมเม็ดนึ่ม

Ingredient	% w/w											
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
PLE	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Gelatin	10	15	20	25	20	20	20	20	20	20	20	20
Sucrose	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Glycerol	40	40	40	40	30	50	40	40	40	40	40	40
Talcum	-	-	-	-	-	-	1	2.5	5	1	1	1
HPMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	10	15
Sodium benzoate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Chocolate flavor	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs
Water qs to	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

9.2 การประเมินตำรับยาอมเม็ดนึ่ม

9.2.1 การประเมินน้ำหนัก (weight variation)

ซึ่งน้ำหนักยาอมเม็ดนึ่ม 20 เม็ด คำนวณหาค่าเฉลี่ย บันทึกผล mean±SD

9.2.2 การประเมินขนาด

วัดความกว้าง ความยาว และความสูงของ ยาอมเม็ดนึ่ม จำนวน 10 เม็ด โดยใช้ Thickness Gauge คำนวณหาค่าเฉลี่ย บันทึกผล mean±SD

9.2.3 การประเมินเนื้อสัมผัส (Texture property)

ประเมินยาอมเม็ดนึ่มสูตรละ 3 เม็ด โดยใช้เครื่อง texture analyzer (TA_XT plus, Stable micro system, UK) ขนาด cylindrical probe 2 มม. บันทึกแรงที่ใช้ในการทำให้ยาอมเม็ดนึ่มแตก

9.2.4 การทดสอบการละลาย (In vitro dissolution study)

ศึกษาการละลายโดยใช้ยาอมสูตรละ 3 เม็ดทดสอบด้วย dissolution apparatus II ใน SGF pH 1.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดการละลายของ 3-O-caffeoylquinic acid (3-CQ) โดยใช้ High performance liquid chromatography (HPLC)

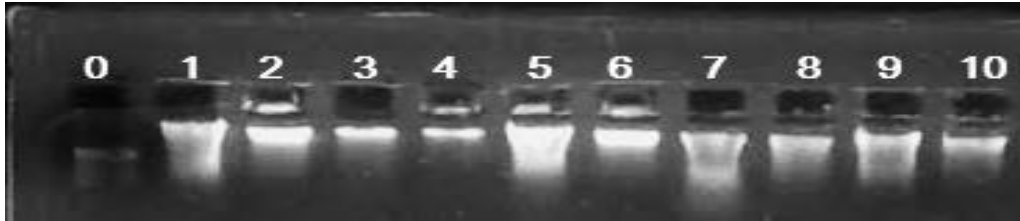
9.2.5 ความคงตัว (stability test)

ทดสอบความคงตัวที่ 40 องศาเซลเซียส 75% RH เป็นเวลา 6 เดือน หลังจากนั้นประเมินหาปริมาณสารสำคัญ

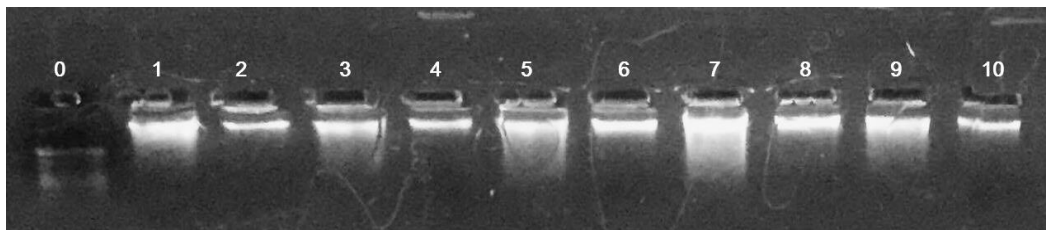
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การสกัดดีเอ็นเอ

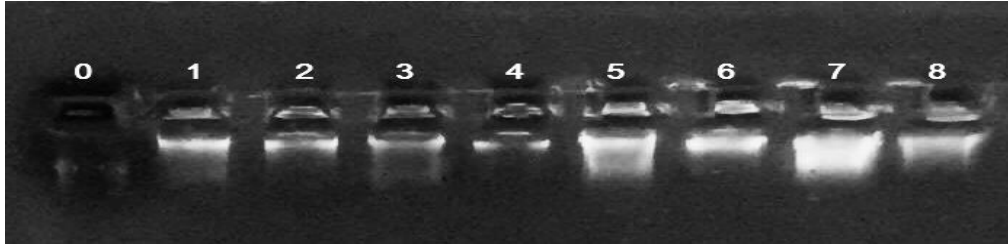
1.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยชุดเครื่องมือ DNeasy® Plant Mini Kit



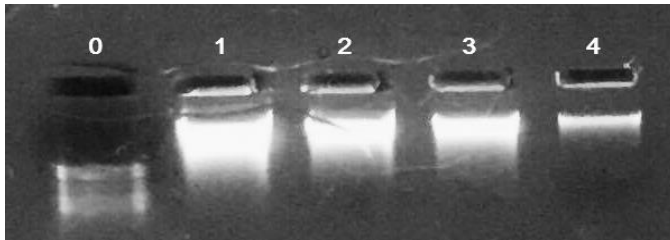
รูปที่ 1. ผลการทดสอบของดีเอ็นเอหลอดที่สกัดได้; 0=DNA Ladder, 1=นนทบุรี การชะครั้งที่1, 2=นนทบุรี การชะครั้งที่2, 3=ประจวบคีรีขันธ์ การชะครั้งที่1, 4=ประจวบคีรีขันธ์ การชะครั้งที่2, 5=ราชบุรี การชะครั้งที่1, 6=ราชบุรี การชะครั้งที่2, 7=เพชรบุรี การชะครั้งที่1, 8=เพชรบุรี การชะครั้งที่2, 9=สมุทรสาคร การชะครั้งที่1, 10=สมุทรสาคร การชะครั้งที่2



รูปที่ 2. ผลการทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้; 0=DNA Ladder, 1=ระยอง การชะครั้งที่1, 2=ระยอง การชะครั้งที่2, 3=สมุทรสงคราม การชะครั้งที่1, 4=สมุทรสงคราม การชะครั้งที่2, 5=ฉะเชิงเทรา การชะครั้งที่1, 6=ฉะเชิงเทรา การชะครั้งที่2, 7=ราชบุรี การชะครั้งที่1, 8=ราชบุรี การชะครั้งที่2, 9=จันทบุรี การชะครั้งที่1, 10=จันทบุรี การชะครั้งที่2



รูปที่ 3. ผลการทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้; 0=DNA Ladder, 1=สุราษฎร์ธานี การชะครั้งที่1, 2=สุราษฎร์ธานี การชะครั้งที่2, 3=อุตรดิตถ์ การชะครั้งที่1, 4=อุตรดิตถ์ การชะครั้งที่2, 5=ภูเก็ต การชะครั้งที่1, 6=ภูเก็ต การชะครั้งที่2, 7=นครราชสีมา การชะครั้งที่1, 8=นครราชสีมา การชะครั้งที่2



รูปที่ 4. ผลการทดสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้; 0=DNA Ladder, 1=สงขลา การชะครั้งที่1, 2=สงขลา การชะครั้งที่2, 3=ชลบุรีการชะครั้งที่1, 4=ชลบุรี การชะครั้งที่2

1.2 การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยชุด Qubit[®] assays

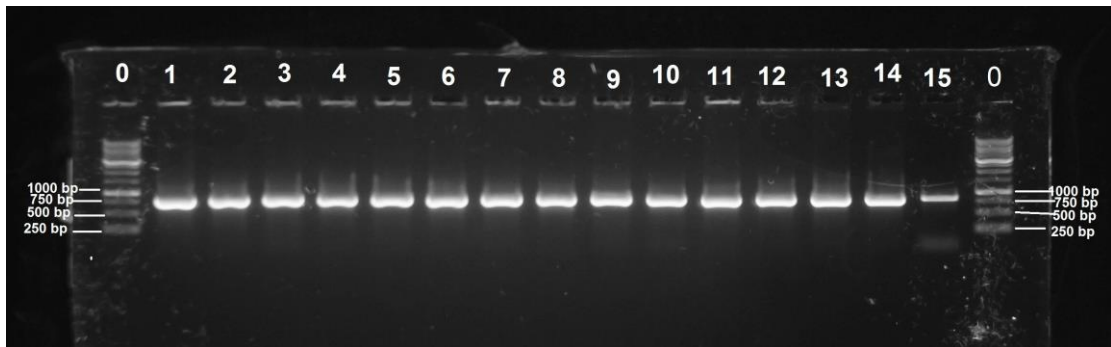
ตารางที่ 3. ปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอของขลุ่จาก 15 จังหวัด

ลำดับ	จังหวัด	ปริมาณดีเอ็นเอ($\mu\text{g/ml}$)	
		การชะครั้งที่ 1	การชะครั้งที่ 2
1	ประจวบคีรีขันธ์	18.4	14.0
2	ชลบุรี	25.1	4.29
3	นนทบุรี	25.8	23.3
4	ภูเก็ต	40.9	30.2
5	ราชบุรี	26.3	8.08
6	ระยอง	43.8	39.1

7	สมุทรสาคร	39.3	32.9
8	สมุทรสงคราม	24.2	14.7
9	สงขลา	25.5	19.8
10	จันทบุรี	25.4	21.1
11	นครราชสีมา	27.0	30.0
12	เพชรบุรี	45.8	39.6
13	สุราษฎร์ธานี	19.0	6.69
14	ฉะเชิงเทรา	22.0	21.4
15	อุตรดิตถ์	4.05	0.313

จากการทดสอบตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (genomics DNA) ที่สกัดได้จากกลุ่มทั้ง 15 จังหวัด ซึ่งมีตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ 13 จังหวัด คือ ประจวบคีรีขันธ์ ชลบุรี นนทบุรี ภูเก็ต ราชบุรี ระยอง สงขลา จันทบุรี นครราชสีมา เพชรบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรสงคราม และสมุทรสาคร ที่ถูกสกัดมาจากส่วนของดอกสดและยอดอ่อนสด ส่วนอีก 2 จังหวัดนั้น คือ อุตรดิตถ์ และสุราษฎร์ธานี ถูกสกัดมาจากส่วนของดอกแห้งและใบแห้งด้วยชุดเครื่องมือ DNeasy Plant Mini Kit[®] เมื่อนำไปวัดความเข้มข้นโดยใช้ Qubit assay[®] ผลที่ได้พบว่า ตัวอย่างจีโนมิกส์ดีเอ็นเอจากแต่ละจังหวัดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.313-45.8 ng/ μ l แต่มีแนวโน้มว่าความเข้มข้นจากการชะครั้งที่ 1 (ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 4.05-45.8 ng/ μ l) จะมีความเข้มข้นสูงกว่าการชะครั้งที่ 2 (ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.313-39.6 ng/ μ l) และจังหวัดที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ อุตรดิตถ์ และสุราษฎร์ธานี เนื่องจากเป็นตัวอย่างแห้ง

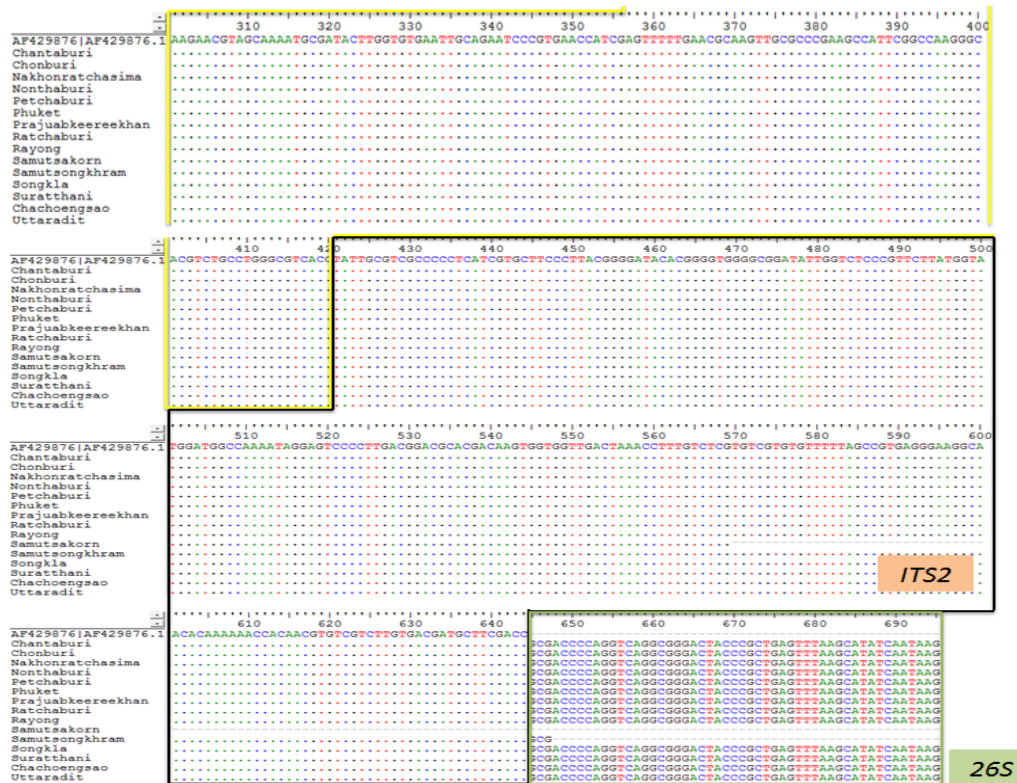
2. การพิสูจน์สายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่ยที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้เทคนิค PCR



รูปที่ 5. แถบดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS ของ *Pluchea indica* ทั้ง 15 จังหวัด

ผลการเพิ่มปริมาณลำดับเบสในตำแหน่ง ITS พบว่าลำดับดีเอ็นเอในตำแหน่ง ITS1 อยู่ในช่วงที่ 2-256 และตำแหน่ง ITS2 อยู่ในช่วงที่ 421-644 โดยการทดลองในครั้งนี้สามารถเพิ่มปริมาณลำดับเบสได้นอกจาก ITS ด้วย เนื่องจากมีการใช้ primer ที่จะเข้าจับบริเวณ 18S และ 26S จึงทำให้สามารถเพิ่มปริมาณลำดับเบสบริเวณ 18S และ 26S ได้บางส่วนโดยสามารถเพิ่มลำดับเบสบริเวณ 18S คือลำดับเบสในตำแหน่งที่ 1 และเพิ่มปริมาณลำดับเบสบริเวณ 26S ได้ 50 ลำดับเบสคือช่วงที่ 645-695 แต่มีตัวอย่างขลุ่ยจากจังหวัดสมุทรสาครที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณลำดับเบสในตำแหน่ง ITS2 ได้ครบถ้วนและตัวอย่างขลุ่ยจากจังหวัดสมุทรสงครามไม่สามารถเพิ่มปริมาณลำดับเบสบริเวณ 26S ได้





รูปที่ 6 การเปรียบเทียบลำดับเบสดีเอ็นเอของตัวอย่าง *Pluchea indica* ทั้ง 15 จังหวัด

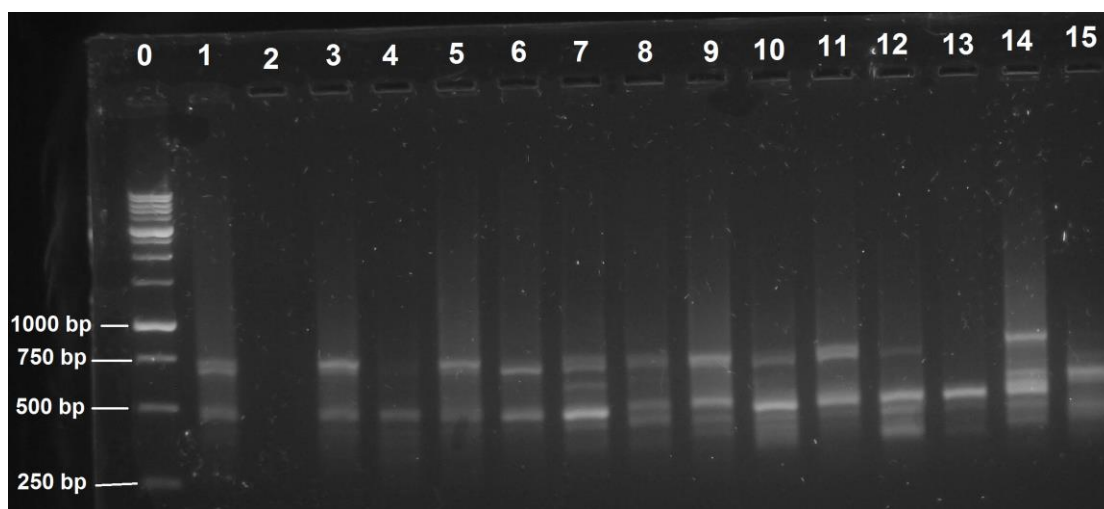
จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอของคลูที่ตำแหน่ง ITS ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.2 แสดงให้เห็นว่าลำดับเบสดีเอ็นเอของคลูทั้ง 15 จังหวัดนั้นเหมือนกันทั้งหมดทั้งตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสดีเอ็นเอของคลูที่นำมาอ้างอิงจากฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมของ DNA Data Bank of Japan (DDBJ) แต่อย่างไรก็ตามลำดับเบสดีเอ็นเอของจังหวัดสมุทรสาครนั้นไม่สามารถสังเคราะห์ได้ครบสมบูรณ์ของลำดับเบสดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS2

จากงานวิจัยของ Endashaw Bekele ในปี 2007 ศึกษาลำดับเบสในตำแหน่ง ITS เพื่อใช้อธิบายความสัมพันธ์ของพืชจำนวน 5 species ในสกุล *Guizotia* ซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกับขลุ่ย โดยใช้ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS ที่แตกต่างกันยืนยันสปีชีส์ของพืชที่เก็บมาและยังสามารถระบุได้ถึงระดับซับสปีชีส์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ลำดับเบสในตำแหน่ง ITS ที่แตกต่างกัน จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้(50) เมื่อทำการเพิ่มปริมาณลำดับเบสดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ด้วยเทคนิค PCR gel electrophoresis แล้วพบว่าแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างคลูที่เก็บมาทั้งหมด 15 จังหวัดนั้นขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกันทั้งหมด ที่ขนาด 750-1,000 bp เมื่อเทียบกับ marker จากการใช้ Forward primer (18sF) และ Reverse primer (26sR) ที่มีความจำเพาะในการเข้าจับกับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS นั้นหมายความว่าสารสกัดดีเอ็นเอที่สกัดมาได้จากตัวอย่างคลูทั้ง 15 จังหวัดนั้น มีแนวโน้มว่าจะเป็น *Pluchea indica* เหมือนกันทั้งหมด และเพื่อเป็นหลักฐานที่ยืนยันถึงการเป็นสารสกัดดีเอ็นเอของ *Pluchea indica* จึงมีการส่งสารไปทำ Capillary electrophoresis (CE) จนได้สายลำดับเบสดีเอ็นเอที่แสดงการเรียงของเบสแต่ละตัวออกมาของแต่ละ

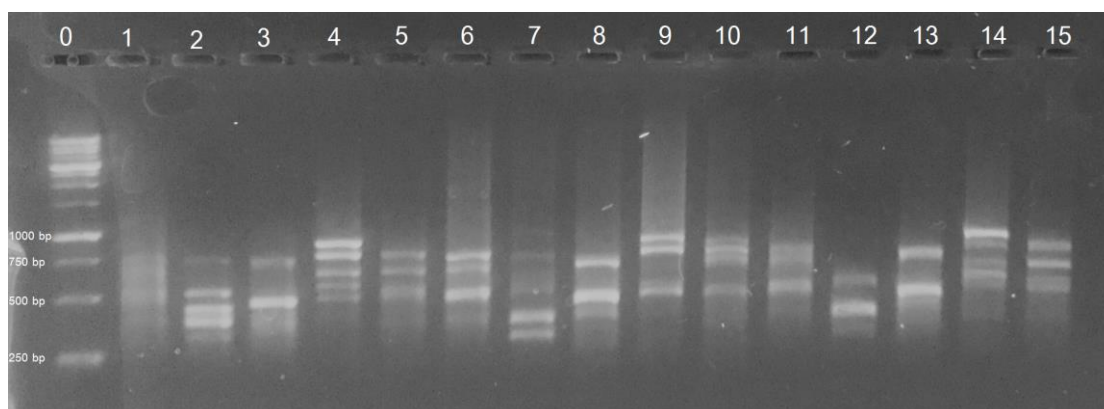
จังหวัดพร้อมกับยืนยันว่าเป็น *Pluchea indica* ซึ่งเป็นสายของ Forward primer 1 สาย และสายของ Reverse primer 1 สาย หลังจากนั้นนำสายลำดับเบสดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ที่ตำแหน่ง 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 และ 26S ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.2 และทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสดีเอ็นเอของ *Pluchea indica* ที่มีเลข Accession number AF429876 (51) โดยนำมาอ้างอิงจากฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรมของ DNA Data Bank of Japan (DDBJ) ซึ่งในระหว่างการวิเคราะห์นั้นพบว่าสายลำดับเบสดีเอ็นเอที่มีปัญหาคือตัวอย่างขลุ่จากจังหวัดสมุทรสาคร ฉะเชิงเทรา และอุตรดิตถ์ ซึ่งสายลำดับเบสดีเอ็นเอขลุ่ของจังหวัดสมุทรสาครนั้น ไม่สามารถรวมสาย Forward primer และ Reverse primer ได้อย่างสมบูรณ์ เพราะมีลำดับเบสดีเอ็นเอบางส่วนในตำแหน่ง ITS2 ไม่น่าเชื่อถือทำให้ต้องตัดลำดับเบสดีเอ็นเอบางส่วนนั้นออกไป ส่วนตัวอย่างขลุ่จากจังหวัดฉะเชิงเทราและอุตรดิตถ์นั้นพบปัญหาที่คล้ายคลึงกันคือลำดับเบสดีเอ็นเอที่สาย Forward primer จะมีบางส่วนในตำแหน่ง ITS2 ที่ไม่น่าเชื่อถือเมื่อเทียบกับลำดับเบสดีเอ็นเอที่นำมาอ้างอิง แต่เมื่อมาดูลำดับเบสดีเอ็นเอที่สาย Reverse primer แล้วพบว่ามีความน่าเชื่อถือเมื่อเทียบกับลำดับเบสดีเอ็นเอที่นำมาอ้างอิง จึงสามารถแก้ไขและรวมสายลำดับเบสเข้ากันได้ โดยเมื่อนำไปเทียบรวมกับจังหวัดอื่นๆก็พบว่าลำดับเบสดีเอ็นเอที่เหมือนกันช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือได้มากขึ้นทั้งลำดับเบสในตำแหน่ง 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 และ 26S ทำให้สามารถรวมสายลำดับเบสดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์

หลังจากที่ได้จีโนมิกส์ดีเอ็นเอแล้ว จึงนำมาพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยพิสูจน์ในตำแหน่ง ITS โดยมีการใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อขลุ่ โดยอ้างอิงจาก genbank ที่มี accession number LN607524 (51) ซึ่งเป็น primer ที่จะเข้าจับบริเวณ 18S และ 26S เพื่อเพิ่มปริมาณลำดับเบสในตำแหน่ง ITS และเมื่อนำลำดับเบสของ *Pluchea indica* ที่ตำแหน่ง ITS ที่ถอดรหัสได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Bioedit โดยมีการใช้ลำดับดีเอ็นเออ้างอิงจาก genbank ที่มี accession number AF429876 แล้วพบว่าตัวอย่างของขลุ่ที่มีอยู่ทั้ง 15 จังหวัดนั้นมีลำดับเบสเหมือนกับตัวเปรียบเทียบที่เลือกมาจาก Genbank ซึ่งได้มีการระบุถึงตำแหน่งเริ่มต้นของดีเอ็นเอบริเวณ ITS1, 5.8S และ ITS2 ไว้อย่างชัดเจน จึงสามารถยืนยันได้ว่าตัวอย่างขลุ่ที่เก็บมาทั้ง 15 จังหวัดคือ *Pluchea indica* จริงและได้ทำการฝากข้อมูลไว้ที่ DNA Data Bank of Japan (DDBJ)

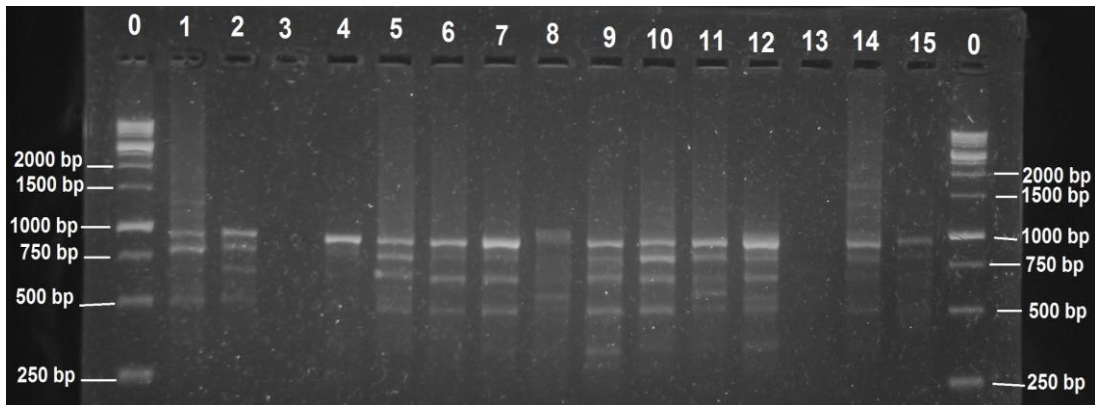
3. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของขลุ้ด้วยเทคนิค ISSR



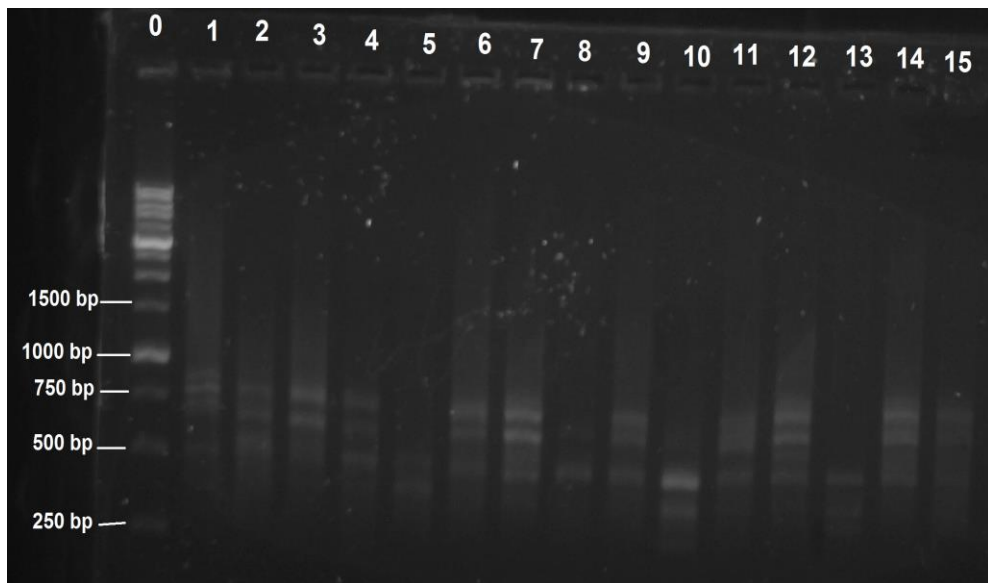
รูปที่ 7 แถบดีเอ็นเอของ *Pluchea indica* จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยการใช้ primer ISSR3; แถบที่ 0=DNA Ladder, 1= ภูเก็ต 2= สุราษฎร์ธานี 3= นครราชสีมา 4= ประจวบคีรีขันธ์ 5= เพชรบุรี 6 =นนทบุรี 7= ราชบุรี 8= สงขลา 9= ฉะเชิงเทรา 10= จันทบุรี 11= ชลบุรี 12= สมุทรสงคราม 13= สมุทรสาคร 14= ระยอง 15= อุตรดิตถ์



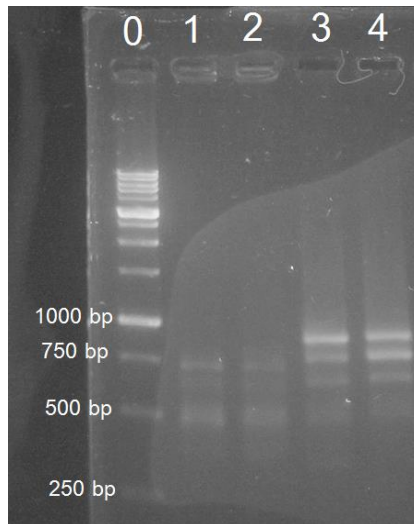
รูปที่ 8. แถบดีเอ็นเอของ *Pluchea indica* จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยการใช้ primer ISSR3 ของจังหวัดสุราษฎร์ธานี; แถบที่ 0= DNA Ladder, 1= สุราษฎร์ธานี ISSR1, 2= สุราษฎร์ธานี ISSR2, 3= สุราษฎร์ธานี ISSR3, 4= สุราษฎร์ธานี ISSR4, 5= สุราษฎร์ธานี ISSR8, 6= ภูเก็ต ISSR1, 7= ภูเก็ต ISSR2, 8= ภูเก็ต ISSR3, 9= ภูเก็ต ISSR4, 10= ภูเก็ต ISSR8, 11 โคราช ISSR1, 12= โคราช ISSR2, 13= โคราช ISSR3, 14= โคราช ISSR4, 15= โคราช ISSR8



รูปที่ 9. แถบดีเอ็นเอของ *Pluchea indica* จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยการใช้ primer ISSR4; แถบที่ 0=DNA Ladder, 1= ภูเก็ต 2= สุราษฎร์ธานี 3= นครราชสีมา 4= ประจวบคีรีขันธ์ 5=เพชรบุรี 6 =นนทบุรี 7 =ราชบุรี 8= สงขลา 9= ฉะเชิงเทรา 10= จันทบุรี 11= ชลบุรี 12= สมุทรสงคราม 13= สมุทรสาคร 14= ระยอง 15= อุตรดิตถ์

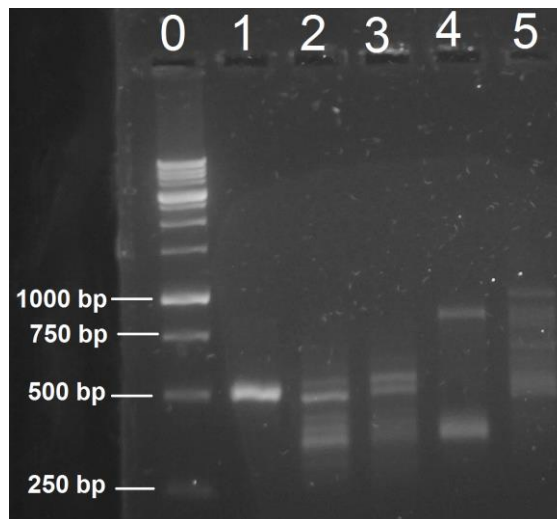


รูปที่ 10. แถบดีเอ็นเอของ *Pluchea indica* จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR โดยการใช้ primer ISSR8; แถบที่ 0=DNA Ladder, 1= ภูเก็ต 2= สุราษฎร์ธานี 3= นครราชสีมา 4= ประจวบคีรีขันธ์ 5= เพชรบุรี 6= นนทบุรี 7= ราชบุรี 8= สงขลา 9= ฉะเชิงเทรา 10= จันทบุรี 11= ชลบุรี 12= สมุทรสงคราม 13= สมุทรสาคร 14= ระยอง 15= อุตรดิตถ์



รูปที่ 11. แถบดีเอ็นเอของ *Pluchea indica* จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR

แถบที่ 0= DNA Ladder, 1= อูตรดิตถ์ ISSR1, 2= อูตรดิตถ์ ISSR1, 3= สมุทรสาคร ISSR4, 4= สมุทรสาคร ISSR4



รูปที่ 12. ISSR ของพังกาดอกช่อ (*Bruguiera hainesii* C.G.Roger)

แถบที่ 0= DNA Ladder, 1= พังกาดอกช่อ ISSR1, 2= พังกาดอกช่อ ISSR2, 3= พังกาดอกช่อ ISSR3, 4= พังกาดอกช่อ ISSR4, 5= พังกาดอกช่อ ISSR 8

ตารางที่ 4. จำนวนแถบดีเอ็นเอ monomorphic, polymorphic ของตัวอย่างขลุ้ 15 จังหวัดโดยใช้เทคนิค ISSR จาก 5 primer

Primer	ขนาดของแถบDNA (base pair)	จำนวน polymorphic	จำนวน monomorphic	จำนวนแถบ ทั้งหมด
ISSR3	250-750	9(100%)	0	9
ISSR4	250-1,500	8(89%)	1(11%)	9
ISSR8	250-1,000	6(86%)	1(14%)	7
รวม		23	2	25

ตัวอย่างขลุ้ที่เก็บมาจาก 15 จังหวัดได้นำมาวิเคราะห์หาความหลากหลายทางสายพันธุ์ด้วยเทคนิค ISSR โดยมีการใช้ primer จำนวน 5 ชนิดโดยคัดเลือกมาจากงานวิจัยของ Dogan Bekir (52) เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของขลุ้ทั้ง 15 ตัวอย่างพบว่า primer ทั้ง 5 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งประกอบไปด้วยแถบดีเอ็นเอทั้งชนิดที่เห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนและชนิดที่เห็นแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน จึงมีการให้คะแนนของการนับแถบดีเอ็นเอแบบ Binary เฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนเป็นหลัก ซึ่งจากการนับแถบดีเอ็นเอของ primer ทั้ง 5 ชนิด พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณโดย primer ISSR1 และ ISSR2 ไม่สามารถนำมานับจำนวนแถบดีเอ็นเอได้เนื่องจากแถบที่ได้ไม่ชัดเจน จึงคัด primer ISSR1 และ ISSR2 ออกจากการศึกษา แต่สำหรับ primer ISSR3, ISSR4 และ ISSR8 สามารถนับแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนดังนั้นการศึกษานี้จึงคัดเลือก primers 3 ชนิดนี้มาใช้ในการศึกษา

จำนวนแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมดมี 25 แถบ และให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic) เป็นจำนวน 23 แถบ มีขนาดอยู่ระหว่าง 250-1,500 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ marker ที่มีขนาดอยู่ระหว่าง 250-10,000 bp

4. ผลของฤดูกาลในการเก็บเกี่ยวใบขลุ่

ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบที่ได้ วิเคราะห์ปริมาณสาร total phenolics, total flavonoids ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของใบขลุ่จากจังหวัดต่างๆ ซึ่งเก็บในช่วงเวลาที่ต่างกันคือ เดือนเมษายน เป็นตัวแทนของฤดูร้อน เดือนสิงหาคมเป็นตัวแทนของฤดูฝน เดือนธันวาคมเป็นตัวแทนของฤดูหนาว ผลการทดลองพบว่า จากการศึกษาพบว่า ตัวอย่างจากจังหวัดอุดรดิตถ์ แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดในขณะที่จังหวัดนครราชสีมา แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำที่สุด ดังตารางที่ 5 สำหรับผลของฤดูกาลพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งด้านปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังตารางที่ 6 จากการศึกษาพบว่าการปลูกมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารสำคัญมากกว่า ฤดูกาลเก็บเกี่ยว โดยใบขลุ่ในภาคเหนือ พบว่ามีฤทธิ์มากกว่าในภาคอื่นอื่น อย่างไรก็ตามพืชบางชนิดพบว่า ฤดูกาลเก็บเกี่ยวมีผลต่อปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ยกตัวอย่างเช่น เมล็ดของมะรุม และ Strawberry เป็นต้น (53-54) เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองในการทดลองต่อไปอาจเพิ่มระยะเวลาการศึกษาเป็น 2 ถึง 3 ปีเพื่อดูแนวโน้มและความเป็นไปได้ของปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางชีวภาพ ว่ามีความเกี่ยวเนื่องกันอย่างไรอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของสารสกัดที่ได้ ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ของสารสกัดจากใบขลุ่ในแหล่งและฤดูกาลต่างๆ

จังหวัด/ฤดูกาล (เดือนที่เก็บเกี่ยว)		ร้อยละของสารสกัด (น้ำหนักแห้ง)*	ฟีนอลิกรวม (g GAE/100 g extract)*	ฟลาโวนอยด์รวม (g QE/100 g extract)*
นนทบุรี	ฤดูร้อน (เมษายน)	21.24 ± 0.01 ^a	13.45 ± 0.59 ^a	7.49 ± 0.54 ^a
	ฤดูฝน (สิงหาคม)	34.61 ± 0.73 ^b	16.86 ± 1.84 ^b	7.88 ± 0.68 ^a
	ฤดูหนาว (ธันวาคม)	32.47 ± 0.67 ^c	14.24 ± 1.45 ^{ab}	7.65 ± 0.94 ^a
เฉลี่ย		29.44 ± 7.18	14.85 ± 1.79	7.67 ± 0.19
อุดรดิตถ์	ฤดูร้อน (เมษายน)	32.50 ± 0.03 ^c	18.28 ± 0.73 ^b	10.26 ± 0.66 ^b
	ฤดูฝน (สิงหาคม)	35.43 ± 1.02 ^b	18.44 ± 1.66 ^b	11.78 ± 1.23 ^b
	ฤดูหนาว (ธันวาคม)	29.40 ± 0.36 ^d	18.15 ± 1.59 ^b	10.21 ± 0.66 ^b
เฉลี่ย		32.44 ± 3.02	18.29 ± 0.15	10.75 ± 0.89
นครราชสีมา	ฤดูร้อน (เมษายน)	29.00 ± 0.05 ^d	3.49 ± 0.32 ^c	2.23 ± 0.19 ^c
	ฤดูฝน (สิงหาคม)	29.37 ± 0.70 ^d	2.34 ± 0.15 ^c	2.24 ± 0.72 ^c
	ฤดูหนาว (ธันวาคม)	32.23 ± 0.96 ^c	3.27 ± 0.48 ^c	2.79 ± 0.40 ^c
เฉลี่ย		30.20 ± 1.77	3.03 ± 0.61	2.42 ± 0.32

สุราษฎร์ธานี	ฤดูร้อน (เมษายน)	26.80 ± 0.07 ^e	10.91 ± 0.36 ^d	5.70 ± 0.29 ^d
	ฤดูฝน (สิงหาคม)	25.17 ± 0.30 ^e	11.95 ± 1.71 ^{ad}	5.54 ± 1.11 ^d
	ฤดูหนาว (ธันวาคม)	27.47 ± 0.96 ^{de}	11.76 ± 1.06 ^d	5.84 ± 0.53 ^d
เฉลี่ย		26.48 ± 1.18	11.54 ± 0.55	5.69 ± 0.15

ตารางที่ 6 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบขลุ่ยในแหล่งและฤดูกาลต่างๆ

จังหวัด/ฤดูกาล (เดือนที่เก็บเกี่ยว)		DPPH assay IC ₅₀ (µg/ml)*	ABTS assay IC ₅₀ (µg/ml)*	FRAP assay (µg/ml of ascorbic acid equivalent/ 100 g extract)*
นนทบุรี	ฤดูร้อน (เมษายน)	4.82 ± 0.23 ^a	13.55 ± 0.59 ^a	8.67 ± 0.78 ^a
	ฤดูฝน (สิงหาคม)	5.34 ± 0.42 ^a	14.44 ± 0.53 ^a	8.33 ± 0.61 ^a
	ฤดูหนาว (ธันวาคม)	11.22 ± 0.75 ^b	15.71 ± 1.19 ^a	7.56 ± 0.66 ^a
เฉลี่ย		7.12 ± 3.55	14.57 ± 1.09	8.19 ± 0.57
อุตรดิตถ์	ฤดูร้อน (เมษายน)	3.45 ± 0.19 ^c	10.95 ± 0.50 ^b	13.21 ± 0.20 ^b
	ฤดูฝน (สิงหาคม)	4.14 ± 0.26 ^c	13.40 ± 0.67 ^a	11.26 ± 0.38 ^c
	ฤดูหนาว (ธันวาคม)	4.17 ± 0.65 ^{ad}	13.85 ± 1.09 ^a	9.57 ± 0.28 ^a
เฉลี่ย		3.92 ± 0.41	12.73 ± 1.56	11.35 ± 1.83
นครราชสีมา	ฤดูร้อน (เมษายน)	28.95 ± 2.55 ^e	25.64 ± 0.01 ^d	2.53 ± 0.16 ^d
	ฤดูฝน (สิงหาคม)	16.05 ± 1.16 ^f	23.88 ± 1.44 ^d	1.00 ± 0.37 ^e
	ฤดูหนาว (ธันวาคม)	69.51 ± 4.44 ^g	84.16 ± 4.9 ^e	1.53 ± 0.16 ^e
เฉลี่ย		38.17 ± 27.90	44.56 ± 34.30	1.69 ± 0.78
สุราษฎร์ธานี	ฤดูร้อน (เมษายน)	7.09 ± 0.05 ^d	15.47 ± 1.78 ^a	10.41 ± 0.15 ^c
	ฤดูฝน (สิงหาคม)	8.36 ± 0.78 ^d	19.37 ± 0.94 ^c	8.10 ± 0.85 ^a
	ฤดูหนาว (ธันวาคม)	15.13 ± 2.72 ^f	19.58 ± 0.84 ^c	6.91 ± 0.19 ^a
เฉลี่ย		10.19 ± 4.32	18.14 ± 2.31	8.47 ± 1.78

ผลที่ได้รายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) with least significant difference (LSD) โดยโปรแกรม SPSS สำหรับ Windows® 16.0 ค่าความเชื่อมั่นร้อยละ 95

5 เปรียบเทียบช่วงเวลาการเจริญเติบโตที่ต่างกัน

เก็บตัวอย่างใบขลุ้จากจังหวัดชลบุรี เพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ ในช่วงเวลาการเจริญเติบโตที่ต่างกันคือ ใบอ่อนขณะยังไม่ออกดอก ใบแก่ขณะออกดอก และใบแก่ขณะยังไม่ออกดอกให้ผลดังนี้

จากตัวอย่างใบขลุ้ทั้งหมดสารสกัดจากใบอ่อนขณะยังไม่ออกดอกของจังหวัดเพชรบุรีให้ร้อยละของสารสกัดที่ได้สูงกว่าจังหวัดอื่นๆคือ ร้อยละ 47.81 ในขณะที่ตัวอย่างใบแก่ขณะออกดอกจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ให้ร้อยละของสารสกัดที่ได้ต่ำกว่าจังหวัดอื่นๆคือ ร้อยละ 34.83 เมื่อพิจารณาถึงค่าของ total phenolics ตัวอย่างจากสกัดจากใบอ่อนให้ค่าสูงสุดในทุกจังหวัด ดังตารางที่ 7 ด้านฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่างๆ จากตัวอย่างใบขลุ้ทั้งหมดสารสกัดจาก เมื่อพิจารณาจาก DPPH Assay สารสกัดจากใบอ่อนในจังหวัดเพชรบุรีให้ค่า IC_{50} ต่ำที่สุดที่ 16.09 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งถือว่าให้ค่าการต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงมาก ในขณะที่กรดแอสคอบิก ให้ค่า IC_{50} ที่ 8.77 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ใบแก่ขณะยังไม่ออกดอกในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ให้ค่า IC_{50} มากที่สุดคือ 28.05 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อประเมินโดยวิธี ABTS assay พบว่าสารสกัดจากใบอ่อนในทุกจังหวัดยังคงแสดงฤทธิ์สูงมากที่สุด อีกทั้งตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ยังมีฤทธิ์ดีกว่ากรดแอสคอบิก (ตัวควบคุมบวก) ส่วนสำหรับ Ferric reducing antioxidant power assay (FRAP assay) สารสกัดจากใบอ่อนให้ค่า FRAP value สูงกว่าใบแก่ทั้งในสองระยะการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 8 ด้านปริมาณสารสำคัญของสารสกัดจากใบขลุ้จากการศึกษาของ M.A. Mohd Shukri และคณะพบว่าสารสำคัญในใบขลุ้ได้แก่อนุพันธ์ของสารกลุ่ม caffeoylquinic acid และ dicaffeoylquinic acid ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างทั้ง 7 แหล่งจากประเทศไทยไปทดสอบเปรียบเทียบกับเทคนิค LC-MS พบว่ามีสารสำคัญ ได้แก่ 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, 3,4-O-dicaffeoylquinic acid, 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, 4,5-O-dicaffeoylquinic acid เป็นองค์ประกอบ โดยเมื่อนำสารเหล่านี้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์ให้ถูกต้องเหมาะสมโดยเทคนิค HPLC สามารถหาปริมาณสารเหล่านี้ในสารสกัดจากแหล่งต่างๆ ได้ดังตารางที่ 7 โดยสารสกัดจากใบอ่อนมีสารกลุ่ม caffeoylquinic acid มากกว่าใบแก่ในทุกระยะ จากการศึกษาศึกษาพืชชนิดอื่นเช่น มันฝรั่งและฝรั่งพบว่าระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืชมีผลต่อปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (55-56) ซึ่งจากการทดลองของสารสกัดใบขลุ้สรุปได้ว่าสารสกัดจากใบอ่อนมีสารสำคัญและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากกว่าใบแก่ที่โตเต็มที่แล้วดังตารางที่ 7-8

ตารางที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของสารสกัดที่ได้ ปริมาณฟีนอลิกรวม และปริมาณสารสำคัญในส่วนของใบอ่อน(1) ใบแก่ระยะก่อนออกดอก(2) ใบแก่ระยะออกดอก (3) ของสารสกัดจากใบขลุในประเทศไทย

ระยะการเจริญเติบโต	ร้อยละของสารสกัดที่ได้ *	ฟีนอลิกรวม (g GAE.100g ⁻¹ extract) *	ร้อยละของอนุพันธ์ caffeoylquinic acid (% w/w) *					
			3 CQ	4 CQ	5 CQ	3,4 diCQ	3,5 diCQ	4,5 diCQ
1	45.18 ± 2.39 ^a	7.38 ± 0.23 ^a	3.38 ± 0.07 ^a	1.69 ± 0.10 ^a	0.72 ± 0.04 ^a	1.91 ± 0.08 ^a	6.32 ± 0.67 ^a	19.33 ± 1.06 ^a
2	42.40 ± 2.66 ^a	6.13 ± 0.10 ^b	1.03 ± 0.05 ^b	0.47 ± 0.03 ^b	0.19 ± 0.01 ^b	0.52 ± 0.03 ^b	1.00 ± 0.06 ^b	4.35 ± 0.25 ^b
3	38.22 ± 1.67 ^{ab}	5.81 ± 0.19 ^c	2.19 ± 0.13 ^c	0.93 ± 0.04 ^c	0.34 ± 0.02 ^c	0.81 ± 0.03 ^c	1.94 ± 0.10 ^c	7.84 ± 0.37 ^c
จากชลบุรี								
1	47.81 ± 3.97 ^a	8.09 ± 0.65 ^a	7.27 ± 0.50 ^a	3.07 ± 0.22 ^a	1.61 ± 0.01 ^a	2.14 ± 0.11 ^a	11.68 ± 0.04 ^a	28.28 ± 1.16 ^a
2	41.99 ± 2.11 ^b	5.70 ± 0.95 ^b	2.87 ± 0.42 ^b	0.84 ± 0.20 ^b	0.33 ± 0.06 ^b	0.76 ± 0.07 ^b	2.91 ± 0.25 ^b	7.99 ± 0.64 ^b
3	38.59 ± 1.75 ^b	6.28 ± 0.23 ^b	3.09 ± 0.03 ^b	0.85 ± 0.02 ^b	0.33 ± 0.03 ^b	0.80 ± 0.02 ^b	2.60 ± 0.04 ^c	9.35 ± 0.16 ^c
จากเพชรบุรี								
1	45.05 ± 2.91 ^a	7.98 ± 0.86 ^a	3.83 ± 0.26 ^a	1.98 ± 0.07 ^a	0.86 ± 0.06 ^a	1.85 ± 0.14 ^a	6.24 ± 0.88 ^a	21.53 ± 1.35 ^a
2	40.00 ± 2.04 ^b	5.09 ± 0.23 ^b	1.35 ± 0.33 ^b	0.72 ± 0.18 ^b	0.23 ± 0.06 ^b	0.62 ± 0.13 ^b	1.64 ± 0.34 ^b	5.59 ± 1.08 ^b
3	34.83 ± 2.41 ^c	6.20 ± 0.71 ^c	1.18 ± 0.16 ^b	0.59 ± 0.10 ^b	0.19 ± 0.02 ^b	0.49 ± 0.04 ^b	1.52 ± 0.12 ^b	4.94 ± 0.44 ^b
ประจวบคีรีขันธ์								

* แสดงเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3), CQ = *O*-caffeoylquinic acid.

ตารางที่ 8 แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในส่วนของใบอ่อน(1) ใบแก่ระยะก่อนออกดอก(2) ใบแก่ระยะออกดอก (3) ของสารสกัดจากใบขลุไธในประเทศไทยโดยวิธี DPPH, ABTS, and FRAP assays

ระยะการเจริญเติบโต	DPPH assay IC ₅₀ (μg.ml ⁻¹) *	ABTS assay IC ₅₀ (μg.ml ⁻¹) *	FRAP Assay (g FeSO ₄ equivalent. 100 g ⁻¹ extract) *
1	17.84 ± 0.27 ^a	9.11 ± 1.69 ^a	3.97 ± 0.35 ^a
2	21.74 ± 0.24 ^b	17.23 ± 3.50 ^b	2.30 ± 0.31 ^b
3	22.88 ± 2.22 ^b	16.77 ± 1.10 ^b	2.10 ± 0.21 ^b
จากชลบุรี			
1	16.09 ± 0.32 ^a	6.44 ± 2.30 ^a	3.84 ± 0.32 ^a
2	21.33 ± 1.10 ^b	13.42 ± 2.50 ^b	2.13 ± 0.45 ^b
3	21.59 ± 0.83 ^b	14.85 ± 2.20 ^b	2.76 ± 0.31 ^b
จากเพชรบุรี			
1	20.55 ± 0.15 ^a	6.22 ± 0.63 ^a	3.64 ± 0.77 ^a
2	28.05 ± 1.35 ^b	15.03 ± 1.81 ^b	1.78 ± 0.14 ^b
3	25.40 ± 0.40 ^c	14.60 ± 1.40 ^b	2.38 ± 0.13 ^c
ประจวบคีรีขันธ์			
Ascorbic acid	8.77 ± 0.14	7.26 ± 0.28	498.05 ± 52.73

* แสดงเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิต ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

6.การพัฒนาและทดสอบผลิตภัณฑ์

6.1 ลักษณะทางกายภาพของยาอมเม็ดนิ่ม

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของยาอมเม็ดนิ่ม เป็นยาอมสีน้ำตาล ทรงสี่เหลี่ยม ความยากง่ายในการแกะออกจากแม่พิมพ์ แตกต่างกันขึ้นกับปริมาณเจลาติน พบว่าสูตร F3-F12 สามารถแกะออกจากแม่พิมพ์ได้ง่าย ส่วน F1และ F2 (ปริมาณร้อยละเจลาติน 10 และ 15 โดยน้ำหนัก) ไม่สามารถแกะจากแม่พิมพ์ได้ เนื่องจากปริมาณเจลาตินต่ำเกินไป ทำให้ยาอมเม็ดนิ่มไม่สามารถคงรูปร่างได้ การประเมินน้ำหนักและขนาดของยาอมเม็ดนิ่มพบว่า สูตร F3-F12 มีน้ำหนักและขนาดอยู่ในเกณฑ์ ดังแสดงในตาราง 9

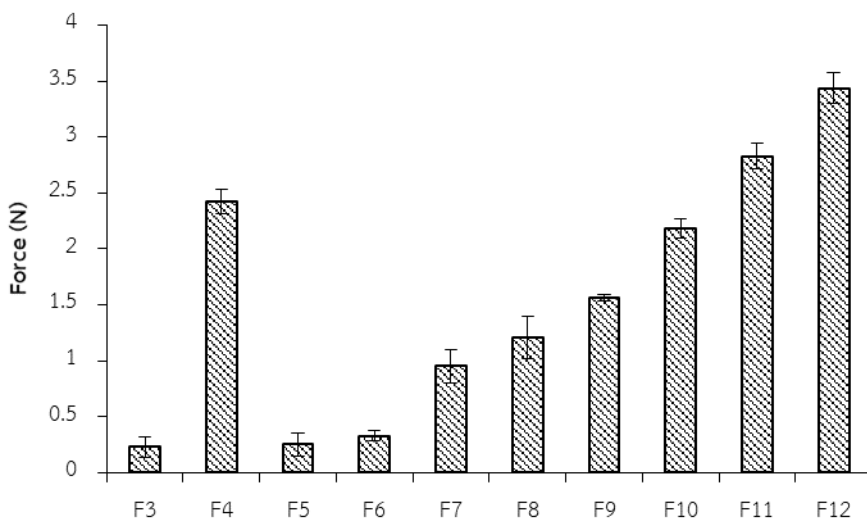
ตารางที่ 9 ลักษณะทางกายภาพของยาอมเม็ดนิ่ม

Formulations	Weight (g)	Size (mm)		
		Width	Length	Thickness
F3	1.0509±0.0385	9.571±0.145	9.453±0.393	9.634±0.155
F4	1.0946±0.0356	9.589±0.240	9.572±0.273	9.352±0.281
F5	1.0638±0.0313	9.510±0.274	9.610±0.207	9.469±0.237
F6	0.9817±0.0489	9.484±0.284	9.471±0.286	9.013±0.448
F7	1.0806±0.0419	9.531±0.225	9.472±0.253	9.419±0.218
F8	1.0912±0.0298	9.415±0.186	9.520±0.228	9.359±0.229
F9	1.1012±0.0416	9.497±0.152	9.513±0.177	9.469±0.226
F10	1.0659±0.0516	9.532±0.112	9.504±0.164	9.485±0.187
F11	1.0470±0.0318	9.547±0.107	9.413±0.133	9.516±0.229
F12	1.0728±0.0520	9.543±0.146	9.617±0.106	9.736±0.441

6.2 เนื้อสัมผัสยาอมเม็ดนิ่ม

เนื้อสัมผัสยาอมเม็ดนิ่มเป็นสมบัติสำคัญของยาอมที่ใช้ออมหรือเคี้ยวภายในช่องปาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งและผู้สูงอายุ ยาอมเม็ดนิ่มที่ดีควรคงรูปอยู่ได้แม้อยู่ในช่องปาก และไม่แข็งเกินไปจนไม่สามารถกัดได้ การประเมินเนื้อสัมผัสยาอมโดยใช้ Texture analyzer พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเจลาติน จะทำให้ความแข็งของเม็ดยาเพิ่มมากขึ้น สูตร F4 มีความแข็งของเม็ดยาสูงสุด และไม่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาต่อเนื่องจากมีความแข็งมากเกินไป ดังนั้นสูตร F3 ถูกเลือกเพื่อศึกษาผลของปริมาณ glycerol โดยผันแปรปริมาณ เป็นร้อยละ 30, 40 และ 50 ผลการศึกษาพบว่าปริมาณกลีเซอรอลไม่ส่งผลต่อเนื้อสัมผัสของยาอมเม็ดนิ่ม ซึ่งผลที่ได้แตกต่างกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาของ Nixon และ

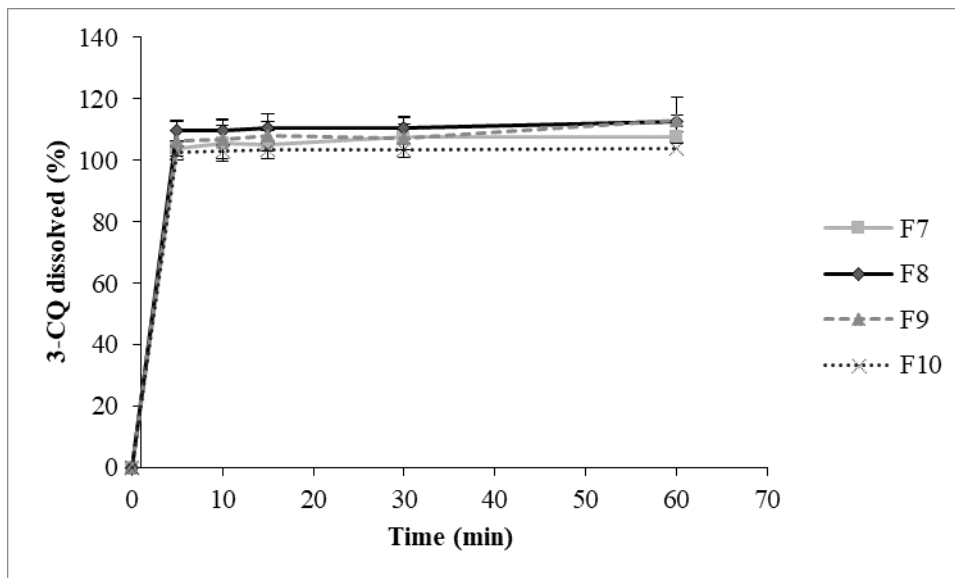
คณะ (57) และ การศึกษาของ Gekko และคณะ (58) อาจเนื่องมาจากปริมาณของกลีเซอรอลที่ไม่แตกต่างกันพอจนส่งผลต่อความแข็งของเจลเมื่อทดสอบด้วยเครื่อง Texture analyzer หากเตรียมในรูปสารละลายและทดสอบโดยใช้เครื่องมือที่ละเอียดอาจมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องยาอมเม็दनิมมีการยี้มเหลว จึงได้เติม talcum และ HPMC ลงในตำรับ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณ talcum ยาอมเม็दनิมจะมีความแข็งเพิ่มมากขึ้น และเมื่อเพิ่มปริมาณ HPMC จะส่งผลให้ยาอมเม็दनิมมีความแข็งเพิ่มมากขึ้นดังแสดงในรูปที่ 13 สูตร F11 และ 12 มีความแข็งมากเกินไปไม่เหมาะสมในการนำมาเตรียมตำรับ จึงได้เลือกสูตร F7,F8,F9, F12 ไปทดสอบการละลายของ 3-CQ ออกจากตำรับ จากรายงานการศึกษาพบว่า การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเจลาตินส่งผลให้เจลที่ได้มีความหนืดและการไหลที่ยากขึ้น (59,60) จากการศึกษาของ Chen และคณะ (61) พบว่าการผสมกันระหว่างเจลาตินและ HPMC จะทำให้เจลได้ดี (storage modulus (G') เพิ่มมากขึ้น) มีจุดหลอมเหลว (melting point) เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มี enthalpy สูงขึ้น ทำให้ตำรับที่ผสมพอลิเมอร์ 2 ชนิดนี้มีความคงตัวด้านการไหลต่ออุณหภูมิมากขึ้น แต่การเติมทัลคัมเป็นการลดปริมาณน้ำที่ใช้ในตำรับซึ่งทำให้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ในตำรับสูงขึ้นและส่งผลให้ตำรับมีความแข็งมากขึ้น



รูปที่ 13 ความแข็งของยาอมเม็दनิม

6.3 การศึกษาการละลายของยาอมเม็दनิม

การศึกษาการละลายของยาอมเม็दनิม สูตร F7, F8,F9, F10 พบว่าสูตร F7-F10 มีการปลดปล่อย 3-CQ ที่ 100 % ภายใน 10 นาที ซึ่งแสดงให้เห็นว่า talcum และ HPMC ไม่รบกวนการปลดปล่อยสารสำคัญออกจากตำรับ



รูปที่ 14 ร้อยละการละลายของ 3-CQ ที่เวลาต่าง ๆ ของสูตร F7, F8, F9 และ F10

6.4 ความคงตัว

จากการเก็บผ่านอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 75% RH เป็นเวลา 6 เดือน

ปริมาณ 3-CQ ในตำรับเมื่อผ่านการเก็บเพื่อทดสอบความคงตัว (ตาราง 10) พบว่าปริมาณสารสำคัญที่ตรวจพบมีค่าใกล้เคียงกับวันที่เตรียมผลิตภัณฑ์เสร็จใหม่ๆ เมื่อนำไปทดสอบความแข็ง การละลายของสารสำคัญแล้วพบว่ามีความแข็งและค่าการละลายใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ที่เตรียมเสร็จใหม่เช่นเดียวกัน สรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้พัฒนาขึ้นมีความคงตัวดีเมื่อเก็บผ่านเวลา 6 เดือน

ตารางที่ 10 ปริมาณ 3-CQ ในตำรับเมื่อผ่านการเก็บเพื่อทดสอบความคงตัว

Formulations	3-CQ content \pm S.D. (%)		
	Freshly prepared products	Long term stability testing	Accelerated stability testing
F7	99.84 \pm 0.21	99.82 \pm 0.34	99.54 \pm 0.41
F8	99.86 \pm 0.50	99.84 \pm 0.27	99.45 \pm 0.29
F9	101.13 \pm 0.50	99.93 \pm 0.55	99.96 \pm 0.64
F10	100.00 \pm 0.25	99.89 \pm 0.65	99.90 \pm 0.22

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมลักษณะของลำดับเบสในส่วน ITS ของขลุ่ยในเมืองไทยทั้ง 15 แหล่งไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของขลุ่ยจากแหล่งต่างๆโดยเทคนิคISSR พบว่ามีความต่างกัน ทั้งนี้แสดงว่าขลุ่ยอาจมีลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความหลากหลายไปในระดับต่ำกว่าชนิดของพืชได้แต่จากการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทั้งนี้ข้อมูลด้านพันธุกรรมได้นำขึ้นทะเบียนที่ธนาคารพันธุกรรมโลก (GenBank) เพื่อใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์สายพันธุ์ต่อไป ส่วนปัจจัยด้านฤดูกาลในการเก็บเกี่ยวพบว่าปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่มีผลสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปัจจัยด้านระยะเวลาเจริญเติบโตเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลโดยตรงกับคุณภาพของสารสกัด โดยใบอ่อนของขลุ่ยจากทุกตัวอย่างแสดงผลให้ทั้งปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดจากใบที่เจริญเติบโตเต็มที่อยู่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ด้านการนำสารสกัดใบขลุ่ยพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ได้พัฒนาเป็นลูกอมเม็ดนุ่มโดยการทดสอบทั้งสิ้น 12 สูตรตำรับและประเมินคุณภาพในด้านความแปรปรวนของน้ำหนัก ขนาด เนื้อสัมผัส การละลาย และความคงตัว พบว่าในตำรับที่ดีควรใส่ talcum และ HPMC ลงไปเพื่อให้ตำรับมีความคงตัวมากยิ่งขึ้น โดยตำรับที่พัฒนาขึ้นมีความคงตัวดีถึงแม้จะเก็บไว้ในสภาวะเร่งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 75%RH เป็นเวลา 6 เดือน ในการศึกษาต่อไปควรมีการวัดความพึงพอใจจากกลุ่มผู้บริโภคของผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นเพิ่มเติม

ผลผลิต (output) ที่ได้จากการรับทุน (ภาคผนวก)

1. บทความวิจัยได้ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ บนฐานข้อมูล ScienceDirect จำนวน 1 เรื่อง ได้แก่

Kongkiatpaiboon, S., Chewchinda, S., **Vongsak, B.** (2018). Optimization of extraction method and HPLC analysis of six caffeoylquinic acids in *Pluchea indica* leaves from different provenances in Thailand. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(2), 145-150.

และอยู่ระหว่างรอการตอบรับอีก 1 เรื่อง

2. บทความวิจัยได้นำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการที่มีผู้ทรงคุณวุฒิร่วมกลั่นกรอง และบทความ ฉบับสมบูรณ์ (Full Paper) ได้รับการตีพิมพ์ในรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Proceedings) จำนวน 2 เรื่อง ได้แก่

Vongsak, B., Nutsuda, I., and Jaisamut., S. (2017). Effect of *Pluchea indica* extracts from different habitats and seasons on free radical scavenging capacity. *Proceedings of the JSPS-NRCT Follow-Up Seminar 2017 and 33rd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences*. 169-172, the Berkeley Hotel Pratunam, Bangkok, Thailand.

Chongdarakul, K., Bunnawat, T., Koomhin, T., **Vongsak, B.** (2017). DNA fingerprint analysis of *Pluchea indica* (L.) Less. In Thailand. *Proceedings of the International Conference of Pharmaceutical Sciences and Medicines 2017*, Faculty of Sciences, Chonburi, Thailand

3. บทความวิจัยได้นำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติที่มีผู้ทรงคุณวุฒิร่วมกลั่นกรอง จำนวน 2 บทความ

Konsap, K., Kongkiatpaiboon, S., **Vongsak, B.** (2018). Comparison of free radical scavenging activity, anti alpha-glucosidase activity and bioactive compound contents from *Pluchea indica* leaf and flower extracts. The International Conference on Food and Applied Bioscience 2018, The Empress Chiang Mai Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Tubtimsri, S., **Vongsak, B.**, Weerapol, Y. (2016). The Products Development of Extracted *Pluchea Indica* by Gelatine-Based Pastilles. The 26th FAPA Congress 2016, Bangkok, Thailand.

บรรณานุกรม

- 1 Rahman, I., Biswas, S. K., Kode, A. (2006) Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *European Journal of Pharmacology*, 533(1-3), 222-239.
- 2 Cornelli, U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*, 27(2), 175-194.
- 3 Hung, Y.-C., Hong, M.-Y., & Huang, G. S. (2006). Cholesterol loading augments oxidative stress in macrophages. *FEBS Letters*, 580(3), 849-861.
- 4 Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715S-724S.
- 5 Benov, L., & Beema, A. F. (2003). Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(4), 429-433.
- 6 Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review*, 4(8), 118-126.
- 7 Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., & Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102-1115.
- 8 Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266(1-2), 37-56.
- 9 Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2), 219-236.
- 10 Jian-Ming Lü, P. H. L., Qizhi Yao, Changyi Chen. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840-860.
- 11 Singh, P. P., Chandra, A., Mahdi, F., Roy, A., & Sharma, P. (2010). Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 25(3), 225-243.
- 12 Azzi, A., Davies, K. J. A., & Kelly, F. (2004). Free radical biology - terminology and critical thinking. *FEBS Letters*, 558(1-3), 3-6.

- 13 Benzie, I. F. F. (2003). Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 136(1), 113-126.
- 14 Seifried, H. E., Anderson, D. E., Fisher, E. I., & Milner, J. A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9), 567-579.
- 15 Liu, R. H. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*, 134(12), 3479S-3485S.
- 16 Sunil, C., & Ignacimuthu, S. (2011). In vitro and in vivo antioxidant activity of *Symplocos cochinchinensis* S. Moore leaves containing phenolic compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 49(7), 1604-1609.
- 17 Eliza, J., Daisy, P., & Ignacimuthu, S. (2010). Antioxidant activity of costunolide and eremanthin isolated from *Costus speciosus* (Koen ex. Retz) Sm. *Chemico-Biological Interactions*, 188(3), 467-472.
- 18 Pandanaboina, S. C., Kondeti, S. R., Rajbanshi, S. L., Kunala, P. N., Pandanaboina, S., Pandanaboina, M. M., et al. (2012). Alterations in antioxidant enzyme activities and oxidative damage in alcoholic rat tissues: Protective role of *Thespesia populnea*. *Food Chemistry*, 132(1), 150-159.
- 19 Verma, A. R., Vijayakumar, M., Rao, C. V., & Mathela, C. S. (2010). In vitro and in vivo antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 704-709.
- 20 Tanaka, A., Hamada, N., Fujita, Y., Itoh, T., Nozawa, Y., Iinuma, M., et al. (2010). A novel kavalactone derivative protects against H₂O₂-induced PC12 cell death via Nrf2/ARE activation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18(9), 3133-3139.
- 21 Morse, D., Lin, L., Choi, A. M. K., & Ryter, S. W. (2009). Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(1), 1-12.
- 22 Ryter, S. W., Alam, J., & Choi, A. M. (2006). Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological Review*, 86(2), 583-650.
- 23 Szabo, M. E., Gallyas, E., Bak, I., Rakotovaio, A., Boucher, F., de Leiris, J., et al. (2004). Heme Oxygenase-1-Related Carbon Monoxide and Flavonoids in Ischemic/Reperfused Rat Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(10), 3727-3732.

- 24 Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229-254.
- 25 Hseu, Y.-C., Chang, W.-H., Chen, C.-S., Liao, J.-W., Huang, C.-J., Lu, F.-J., et al. (2008). Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 105-114.
- 26 Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- 27 Perez-Jimenez, J., & Saura-Calixto, F. (2005). Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 5036-5040.
- 28 Maisuthisakul, P., Pongsawatmanit, R., & Gordon, M. H. (2007). Characterization of the phytochemicals and antioxidant properties of extracts from Teaw (*Cratoxylum formosum* Dyer). *Food Chemistry*, 100(4), 1620-1629.
- 29 Qingming, Y., Xianhui, P., Weibao, K., Hong, Y., Yidan, S., Li, Z., et al. (2010). Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry*, 118(1), 84-89.
- 30 Fu, M., He, Z., Zhao, Y., Yang, J., & Mao, L. (2009). Antioxidant properties and involved compounds of daylily flowers in relation to maturity. *Food Chemistry*, 114(4), 1192-1197.
- 31 Griffin, S. P., & Bhagooli, R. (2004). Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302(2), 201-211.
- 32 Gliszczyńska-Świątło, A. (2006). Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chemistry*, 96(1), 131-136.
- 33 Royall, J. A., & Ischiropoulos, H. (1993). Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123 as Fluorescent Probes for Intracellular H₂O₂ in Cultured Endothelial Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 302(2), 348-355.
- 34 Wardman, P. (2008). Use of the Dichlorofluorescein Assay to Measure "Reactive Oxygen Species". *Radiation Research*, 170(3), 406-407.
- 35 Baroni, M. V., Di Paola Naranjo, R. D., García-Ferreya, C., Otaiza, S., & Wunderlin, D. A. (2012). How good antioxidant is the red wine? Comparison of some *in vitro* and

- in vivo* methods to assess the antioxidant capacity of Argentinean red wines. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), 1-7.
- 36 Olsvik, P. A., Kristensen, T., Waagbø, R., Rosseland, B. O., Tollefsen, K. E., Baeverfjord, G., et al. (2005). mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(3), 314-323.
- 37 Biswasa, R., Duttab, P. K., Acharib, B., Bandyopadhyaya, D., Mishraa, M., Pramanika, K. C., & Chatterjeea, T.K. (2007). Isolation of pure compound R/J/3 from *Pluchea indica* (L.) Less. and its anti-amoebic activities against *Entamoeba histolytica*. *Phytomedicine*, 14, 534–537.
- 38 Gomesa, A., Sahaa, A., Chatterjeea, I., & Chakravarty, A.K. (2007). Viper and cobra venom neutralization by b-sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae). *Phytomedicine*, 14, 637–643.
- 39 Roslida, A. H., Erazuliana, A. K., & Zuraini, A., (2008). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of the ethanolic extract of *Pluchea indica* (L) Less leaf. *Pharmacologyonline*, 2, 349-360
- 40 Ohtsuki, T., Yokosawa, E., Koyano, T., Preeprame, S., Kowithayakorn, T., Sakai, S., Toida, T., & Ishibashi, M. (2008). Quinic acid esters from *Pluchea indica* with collagenase, MMP-2 and MMP-9 inhibitory activities. *Phytotherapy research*, 22, 264–266
- 41 Mohd Shukri, M. A., Alan C., & Site Noorzuraini, A. R., (2011). Polyphenols and antioxidant activities of selected traditional vegetables. *Journal of tropical agriculture and food science*, 39(1), 69-83.
- 42 Noridayu, A. R., Hii, Y. F., Faridah, A., Khozirah, S., & Lajis, N. (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of *Pluchea indica* Less. *International Food Research Journal*, 18(3), 925-929
- 43 Srisook, K., Buapool D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., & Srisook, E. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(23), 4077-4081.
- 44 Cho, J. J., Cho, C., Kao C., Chen C., Tseng C., Lee, Y., Liao, L., & Hong, Y. (2012). Crude aqueous extracts of *Pluchea indica* (L.) Less. inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction of p53-dependent cell death. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 256.

- 45 Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, R., Srisook, E., & Srisook, K. (2013). Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 495–504.
- 46 Suriyaphan, O., (2014). Nutrition, health benefits and applications of *Pluchea indica* (L.) Less Leaves. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(4), 1-10.
- 47 Widyawati, P. S., Budianta, T. D. W., Kusuma, F. A., & Wijaya, E. L. (2014). Difference of solvent polarity to phytochemical content and antioxidant activity of *Pluchea indica* Less leaves extracts. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4), 850-855.
- 48 Arsiningtyasa, I. S., Gunawan-Puteri, Maria D.P.T., Eisuke K & Kawabataa, J. (2014). Identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Pluchea indica* (L.) Less., a traditional Indonesian herb: promotion of natural product use. *Natural Product Research*, 28(17), 1350–1353.
- 49 Mohd Shukri, M.A., Alan, C. & Site Noorzuraini, A.R. (2011). Polyphenols and antioxidant activities of selected traditional vegetables. *Journal of tropical agriculture and food science*, 39, 169-183.
- 50 Endashaw Bekele MG, Kifle Dagne ALJ, Ian Barnes, Neil Bradman MGT. (2006). Molecular phylogeny of genus *Guizotia* (Asteraceae) using DNA sequences derived from ITS. *Genet Resour Crop Evol.* 54:1419–27.
- 51 DNA Data Bank of Japan. *Pluchea indica* [Internet]. 2016 [cited: 2016/6/25]. Available from: <http://ddbj.nig.ac.jp/arsa/>
- 52 Dogan B., Duran, A. & Hakki, E. E. (2007). Phylogenetic analysis of *Jurinea* (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification. *Ann. Bot. Fennici* 44: 353-358.
- 53 Ferreyra RM, Viña SZ, Mugridge A, Chaves AR. (2007). Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar. *Selva. Sci Hortic.* 112(1):27-32.
- 54 Iqbal S, Bhangar MI. (2006). Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *J Food Compost Anal.*19(6-7):544-51.

- 55 Arun, K. B., Chandran, J., Dhanya, R., Krishna, P., Jayamurthy, P., & Nisha, P. (2015). A comparative evaluation of antioxidant and antidiabetic potential of peel from young and matured potato. *Food Bioscience*, 9, 36-46.
- 56 Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., & Okonogi, S. (2010). Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT Food Science and Technology*, 43, 1095-1103.
- 57 Nixon JR, Georgakopoulos PP, Carless JE. (1968). The effect of electrolytes on rigidity and diffusion in gelatin-glycerin gels. *The Journal of pharmacy and pharmacology*.20(7):521-7.
- 58 Gekko K, Li X, Makino S. (1992). Effects of Polyols and Sugars on the Sol-Gel Transition of Gelatin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 56(8):1279-84.
- 59 Gudmundsson M. (2002). Rheological Properties of Fish Gelatins. *Journal of Food Science*. 67(6):2172-6.
- 60 Haug IJ, Draget KI, Smidsrød O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*. 18(2):203-13.
- 61 Chen H-H, Lin C-H, Kang H-Y. (2009). Maturation effects in fish gelatin and HPMC composite gels. *Food Hydrocolloids*. 23(7):1756-61.

ภาคผนวก

ผลผลิต (output) ที่ได้จากการรับทุน	53-61
ข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ <i>Pluchea indica</i> ลงบนฐานข้อมูลของ Genbank	62-76
ประวัตินักวิจัยและคณะ	77-83

ผลผลิต (output) ที่ได้จากการรับทุน

1. บทความวิจัยได้ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ บนฐานข้อมูล ScienceDirect จำนวน 1 เรื่อง ได้แก่

Revista Brasileira de Farmacognosia 28 (2018) 145–150



Brazilian Journal
of Pharmacognosy

REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA

www.elsevier.com/locate/bjph



Original Article

Optimization of extraction method and HPLC analysis of six caffeoylquinic acids in *Pluchea indica* leaves from different provenances in Thailand



Sumet Kongkiatpaiboon^a, Savita Chewchinda^b, Boonyadist Vongsak^{c,*}

^a Drug Discovery and Development Center, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani, Thailand

^b Department of Food Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand

^c Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2017

Accepted 6 March 2018

Available online 24 March 2018

Keywords:

Caffeoylquinic acid

Standardization

Herbal products

Quantitative analysis

Method validation

ABSTRACT

Pluchea indica (L.) Less., Asteraceae, is a medicinal plant which contains a high amount of phenolic compounds such as caffeoylquinic acid derivatives. The leaves have been traditionally used as a nerve tonic and extensively as herbal tea. This study aimed to develop and validate an HPLC method to quantitatively analyze six caffeoylquinic acid derivatives, viz. 3-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid, 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, and 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid in *P. indica* leaf extract. HPLC was carried out in a Hypersil BDS C₁₈-column eluted with 0.5% acetic acid in water and methanol using gradient elution with a flow rate of 1 ml/min and detection at 326 nm. The method validation was performed to assure its linearity, precision, accuracy and limits of detection and quantitation. Several extraction techniques including maceration, decoction, digestion, Soxhlet extraction, and ultrasound extraction, were used to extract active constituents. The ultrasound extraction with 50% ethanol yielded the highest concentration of these caffeoylquinic acid derivatives in the *P. indica* leaf extract. Our developed HPLC method is simple and reliable for a routine analysis of the six caffeoylquinic acids in *P. indica* leaves and could potentially be applied to be used in commercial herbal products.

© 2018 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Pluchea indica (L.) Less., Asteraceae, is an evergreen shrub, commonly known as Indian camphorweed, Indian fleabane and Indian pluchea. It is widely distributed in India, Southern China, Southeast Asia, Australia and the Pacific Islands. It can be found abundantly in brackish marshes, mangrove forest and other saline habitats (eFloras, 2008). Young leaves and shoots are edible and consumed as salad or side-dish to rice. *P. indica* herbal tea has been commercially available in Thailand as a health-promoting drink (Office of Mangrove Resources Conservation, 2009). In Thai traditional medicine, leaves are used as a nerve tonic and for the treatment of inflammation. Whole plants are used for treating hemorrhoids, constipation, aphthous ulcer and gallstone (Srisook et al., 2012; Neamsuvan and Ruangrit, 2017). *Pluchea indica* leaves were found to possess various biological activities including antioxidant (Widyawati et al., 2014), anti-inflammatory (Buapool et al., 2013),

hypoglycemic and antihyperglycemic activities (Pramanik et al., 2006).

Previous phytochemical studies demonstrated that leaves of *P. indica* contain caffeoylquinic derivatives (Arsiningtyas et al., 2014), flavonol aglycones (quercetin, kaempferol, myricetin) (Andarwulan et al., 2010), and terpenoid (10S,11S-himachala-3(12)-4-diene) (Widyawati et al., 2013). An HPLC-PDA-MS study revealed that caffeoylquinic derivatives such as 3-*O*-caffeoylquinic acid, 4-*O*-caffeoylquinic acid, 5-*O*-caffeoylquinic acid, 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid and 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid are major compounds of *P. indica* leaves (Shukri et al., 2011). These derivatives also have been shown to possess antioxidant, anti-inflammatory activity, inhibiting HMG-CoA reductase and alpha-glucosidase enzyme (Xu et al., 2012; Vongsak et al., 2013; Chen et al., 2014; Arantes et al., 2016; Motaal et al., 2016). Thus, the six caffeoylquinic derivatives which are the major active compounds could be used as marker compounds for the quality assessment of *P. indica* leaves extract.

Several analytical methods including HPLC (Andarwulan et al., 2010), HPLC-PDA-MS² (Shukri et al., 2011), GC and GC-MS (Le et al., 2000) have been reported for the quantification of some

* Corresponding author.

E-mail: boonyadist@go.buu.ac.th (B. Vongsak).

<https://doi.org/10.1016/j.bjph.2018.03.002>

0102-695X/© 2018 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Conclusion

The HPLC method for the analysis of six caffeoylquinic acid derivatives content in *P. indica* leaves extract was developed and validated. From the results of validation parameters, the method was fast, precise and accurate. This proposed HPLC method could be applied for a routine analysis to ensure the quality of *P. indica* leaf extract and its nutritional products.

Authors' contributions

SK's contribution included HPLC analysis, analyzing the results, and preparing the paper. SC's contribution included analyzing the results and preparing the paper. BV's contribution included collecting samples, designing and performing laboratory work, analyzing the results, and preparing the paper. The authors have read the final manuscript and approved of the submission.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 23/2559) and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University. We thank Drug Discovery and Development Center, Thammasat University and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University for providing laboratory facilities. The authors also would like to thank Mr. Panupon Khumsupan, Institute of Molecular Plant Sciences, University of Edinburgh, for his kind proofreading of the manuscript.

References

- Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D.A., Bolling, B., Wijaya, H., 2010. Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chem.* 121, 1231–1235.
- Arantes, A.A., Falé, P.L., Costa, L.C.B., Pacheco, R., Ascensão, L., Serralheiro, M.L., 2016. Inhibition of HMG-CoA reductase activity and cholesterol permeation through Caco-2 cells by caffeoylquinic acids from *Vernonia condensata* leaves. *Rev. Bras. Farmacogn.* 26, 38–43.
- Arsiningtyas, I.S., Gunawan-Puteri, M.D., Kato, E., Kawabata, J., 2014. Identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Pluchea indica* (L.) Less., a traditional Indonesian herb: promotion of natural product use. *Nat. Prod. Commun.* 28, 1350–1353.
- Buapool, D., Mongkol, N., Chantimal, J., Roytrakul, S., Srisook, E., Srisook, K., 2013. Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *J. Ethnopharmacol.* 146, 495–504.
- Chen, J., Mangelinckx, S., Ma, L., Wang, Z., Li, W., De Kimpe, N., 2014. Caffeoylquinic acid derivatives isolated from the aerial parts of *Gynura divaricata* and their yeast α -glucosidase and PTP1B inhibitory activity. *Fitoterapia* 99, 1–6.
- Climatological Center, 2018. Thai Meteorological Department. Ministry of Digital Economy and Society, <http://www.tmd.go.th> (accessed January 2018).
- eFloras, 2008. Flora of China, <http://www.efloras.org> (accessed August 2017).
- ICH, 1996/2005. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. ICH, Geneva.
- Jaouadi, R., Cardoso, S.M., Silva, A.M.S., Ben Hadj Yahia, I., Boussaid, M., Zaouali, Y., 2018. Variation of phenolic constituents of Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoff. et Link. populations. *Biochem. Syst. Ecol.* 77, 10–15.
- Le, V.H., Nguyen, T.C., Nguyen, X.D., Ho, Q.T., Leciere, P., 2000. Constituents of leaf and root essential oil of *Pluchea indica* (L.) Less. from Vietnam. *J. Essent. Oil Bear PL.* 3, 21–28.
- Motaal, A.A., Ezzat, S.M., Tadros, M.G., ElAskary, H.I., 2016. In vivo anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from *Solidago virgaurea* in rats. *Pharm. Biol.* 54 (12), 2864–3287.
- Neamsuvan, O., Ruangrit, T., 2017. A survey of herbal weeds that are used to treat gastrointestinal disorders from southern Thailand: Krabi and Songkhla provinces. *J. Ethnopharmacol.* 196, 84–93.
- Office of Mangrove Resources Conservation, 2009. Plants in the Mangrove forest of Thailand. Department of Marine and Coastal Resources, Ministry of Natural Resources and Environment. House of the Agricultural Co-operative Federation of Thailand Limited, Nonthaburi, pp. 7–8.
- Pramanik, K.C., Bhattacharya, P., Biswas, R., Bandyopadhyay, D., Mishra, M., Chatterjee, T.K., 2006. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of leaf extract of *Pluchea indica* Less. *Orient. Pharm. Exp. Med.* 6, 232–236.
- Shukri, M.A.M., Alan, C., Noorzuraini, A.R.S., 2011. Polyphenols and antioxidant activities of selected traditional vegetables. *J. Trop. Agric. Food Sci.* 39, 69–83.
- Srisook, K., Buapool, D., Boonbai, R., Simmasut, P., Charoensuk, Y., Srisook, E., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea. *J. Med. Plants Res.* 6, 4077–4081.
- Vongsak, B., Gritsanapan, W., Wongkrajang, Y., Jantan, I., 2013. In vitro inhibitory effects of *Moringa oleifera* leaf extract and its major components on chemiluminescence and chemotactic activity of phagocytes. *Nat. Prod. Comm.* 8, 1559–1561.
- Vongsak, B., Mangmool, S., Gritsanapan, W., 2015. Antioxidant activity and induction of mRNA expressions of antioxidant enzymes in HEK-293 cells of *Moringa oleifera* leaf extract. *Planta Med.* 81, 1084–1089.
- Widiyati, P.S., Budiarta, T.D.W., Kusuma, F.A., Wijaya, E.L., 2014. Difference of solvent polarity to phytochemical content and antioxidant activity of *Pluchea indica* Less leaves extracts. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 6, 850–855.
- Widiyati, P.S., Wijaya, C.H., Hardjosworo, P.S., Sajuthi, D., 2013. Volatile compounds of *Pluchea indica* Less and *Ocimum basilicum* Linn essential oil and potency as antioxidant. *Hayati J. Biosci.* 2, 117–126.
- Xu, J.G., Hu, Q.P., Liu, Y., 2012. Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11625–11630.

2. บทความวิจัยได้นำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการที่มีผู้ทรงคุณวุฒิร่วมกลั่นกรอง และบทความฉบับสมบูรณ์ (Full Paper) ได้รับการตีพิมพ์ในรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Proceedings) จำนวน 2 เรื่องได้แก่

TJPS Vol.41 (Supplement Issue) 2017



Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)

The JSPS-NRCT Follow-Up Seminar 2017 and
33rd International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences



Effect of *Pluchea indica* extracts from different habitats and seasons on free radical scavenging capacity

Boonyadist Vongsak¹, Nutsuda Inson¹, Sunan Jaisamut¹

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Saensook, Muang, Chonburi, 20131, Thailand

* Corresponding author: Tel.-66(0)38102610; Fax.-66(0)38102610; E-mail address.boonyadist@go.buu.ac.th

Keywords: *Pluchea indica*, free radical scavenging, season, antioxidant, habitat

Introduction

Antioxidant complexes are created by the plant to defend the cell against the attack from dangerous chemical species as reactive oxygen species or free radicals. Antioxidants may mediate their effect by neutralizing free radical activity.¹ The ability to neutralize free radical activity is based on the properties of antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, peroxidase, and various chemical structures of phenolic compounds such as anthocyanins, flavonoids, catechins, and some vitamins such as A, C, and E.² The antioxidant efficiency of numerous polyphenols was investigated. A good correlation has been found between antioxidant capacity and polyphenols content in many medicinal plants such as tea (*Camellia sinensis* L.), onion (*Allium cepa* L.), artichokes (*Cynara scolymus* L.) and ginkgo (*Ginkgo biloba* L.).³

Pluchea indica (L.) Less (Asteraceae) is an evergreen tree, and widespread throughout the tropical and subtropical areas. Different parts of this plant have been traditionally used for medicinal purposes as an antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer agent. The leaves are used as antibacterial, anti-diabetic and cardiotoxic agents.^{4,5} Previous phytochemical studies demonstrated that the leaves of *P. indica* contain complex phenolic compounds, which are responsible for antioxidative and anti-diabetic activities. In Thailand, the leaves of these plants are used in the herbal tea preparation and consumed for promoting healthiness because these herbs are believed to be associated with antioxidant activities and have numerous beneficial effects.^{6,7} However, no data describe the effect of agroclimatic location and season on the antioxidant potential of *P. indica* leaves. Thus, the objective of the present study was to investigate free radical scavenging activity of *P. indica* leaf extracts, and the effects of agroclimatic conditions and seasons in Thailand.

Methods

Sample and extract preparation

The mature leaves of *Pluchea indica* were collected from Thailand as follow: Laplae District, Uttaradit Province; Muang District, Nonthaburi Province; Muang District Nakhon Ratchasima Province; Phrasaeng District, Surat Thani Province in December 2015, April and August 2016. The specimens were deposited at Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi, Thailand. The leaves were cleaned by tap water and a portion was dried in a hot air oven at 50 °C for 24 h. The dried sample were kept in sealed containers and protected from light until used. The dried leaves were boiled with distilled water (1:10, w/v) at 80 °C for 15 min and then filtered. The marc was re-extracted again in the same method. Each plant was done in triplicates. The combined extract from each plant was separately filtered through a Whatman No.1 filter paper. The filtrate was dried under reduced pressured at 50°C using a rotary vacuum evaporator. The crude extract was weighed and kept in a tight container protected from light at 0 °C.

Determination of contents of total phenolic and total flavonoids compounds

The content of total phenolic compounds was determined using Folin-Ciocalteu procedure calculated as mean \pm SD (n = 3) and expressed as grams of gallic acid equivalents (GAE) in 100 g of the extract, while total flavonoids were analyzed using aluminum chloride colorimetric method. The content of total flavonoids was calculated as mean \pm SD (n = 3) and expressed as grams of quercetin equivalents (QE) in 100 g of the extract.⁸

TJPS 2017, 41 (Supplement Issue): 169

Discussion

Overproduction of free radicals can be injurious to host cells and lead to numerous ailments. Thus, inhibition of free radicals is one of many pathways potentially taken in the management of various degenerative diseases.² From the present work, agroclimatic location has more effects than seasons on free radical scavenging activity of *P. indica* leaves. The activity of samples from Uttaradit province in the North region of Thailand was relatively higher than those from other regions. The environment of each plant habitat such as temperature, solar radiation and type of soil might be associated with the cause of different free radicals scavenging activity and chemical contents. It is supported by report of Anwar et al. (2005) described extensive variation in oil content of *M. oleifera* seeds from different agroclimatic locations due to variety in climatic constraints and natural soil texture.¹⁰ Ferreyra et al. (2007), showing that environmental temperature intensely alters antioxidant activity in strawberry.³ Yao et al. (2016) showed harvest seasons effects on bioactive composites and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*.¹

The samples from Nakhon Ratchasima province in the Northeast region which is normally drought habitat exhibited lower activity than other areas. A water deficit in the plants may change the oxidative balance of the cell to assist its alteration to drought conditions. This promotes oxidative stress in the plant and retains low levels of active oxygen species within the antioxidant system.¹ However, the effect of seasons in the present study displayed slightly different on its activity of the extracts. The influence of climate change may be the factor interfering the investigation.

It has been reported that polyphenols including flavonoids, phenolics and tannin possess antioxidant activity.⁴ It is possible that these constituents may be responsible for the free radical scavenging activity of the plant. The characterization of active markers is required for quality assurance and standardization of the extracts in further experiments.

Conclusion

From the present investigation, it could be concluded that agroclimatic habitats have profound influences on the free radicals scavenging activity of *P. indica* leaves. The hot water extract of *P. indica* leaves from Uttaradit contained high anti-oxidative properties and have potential to develop as antioxidant functional food and nutraceutical products. However, there is still a need to investigate the bioactive compounds of *P. indica* leaves.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 23/2559). The authors also would like to thank Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University for facility support.

References

1. Yao X-H, Zhang Z-B, Song P, Hao J-Y, Zhang D-Y, Zhang Y-F. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*. *Ind Crops Prod*. 2016;94:405-12.
2. Wang L, Ding L, Yu Z, Zhang T, Ma S, Liu J. Intracellular ROS scavenging and antioxidant enzyme regulating capacities of corn gluten meal-derived antioxidant peptides in HepG2 cells. *Food Res Int*. 2016;90:33-41.
3. Ferreyra RM, Viña SZ, Mugridge A, Chaves AR. Growth and ripening season effects on antioxidant capacity of strawberry cultivar Selva. *Sci Hort*. 2007;112(1):27-32.
4. Buapool D, Mongkol N, Chantimal J, Roytrakul S, Srisook E, Srisook K. Molecular mechanism of anti-inflammatory activity of *Pluchea indica* leaves in macrophages RAW 264.7 and its action in animal models of inflammation. *J Ethnopharmacol*. 2013;146(2):495-504.
5. Kao CL, Cho J, Lee YZ, Cheng YB, Chien CY, Hwang CF, et al. Ethanolic extracts of *Pluchea indica* induce apoptosis and antiproliferation effects in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Molecules*. 2015;20(6):11508-23.
6. Arsiningtyas IS, Gunawan-Puteri MD, Kato E, Kawabata J. Identification of alpha-glucosidase inhibitors from the leaves of *Pluchea indica* (L.) Less., a traditional Indonesian herb: promotion of natural product use. *Nat Prod Res*. 2014;28(17):1350-3.
7. Srisook K, Buapool D, Boonbai R, Panadda S, Charoensuk Y, Srisook E. Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea. *J Med Plant Res*. 2012;6(23):4077-408.
8. Vongsak B, Sithisarn P, Gritsanapan W. Bioactive contents and free radical scavenging activity of *Moringa oleifera* leaf extract under different storage conditions. *Ind Crops Prod*. 2013;49:419-21.
9. Vongsak B, Kongkiatpaiboon S, Jaisamut S, Machana S, Pattarapanich C. *In vitro* alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. *Rev Bras Farmacogn*. 2015;25(5):445-50.
10. Iqbal S, Bhangar MI. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *J Food Compost Anal*. 2006;19(6-7):544-51.

Chongdarakul, K., Bunnawat, T., Koomhin, T., **Vongsak, B.** (2017). DNA fingerprint analysis of *Pluchea indica* (L.) Less. In Thailand. *Proceedings of the International Conference of Pharmaceutical Sciences and Medicines 2017*, Faculty of Sciences, Chonburi, Thailand

International Conference of Pharmaceutical Sciences and Medicines 2017

DNA fingerprint analysis of *Pluchea indica* (L.) Less. In Thailand

Korawich Chongdarakul, Thanawat Bunnawat, Thunchanit koomhin, Boonyadist Vongsak*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Saensuk Municipality, Mueang District, Chonburi Province, Thailand, 20131.

*Corresponding author: boonyadist@go.buu.ac.th

Abstract

Pluchea indica (L.) Less. is a member of the family Asteraceae. It is found in a wide variety of habitats in Thailand. Fifteen samples from various habitats of *P. indica* were utilized for investigation. The purposes of this study were to analyze DNA sequences of internal transcribe spacer (ITS) regions and evaluated DNA fingerprint of *P. indica* evaluation by inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. ITS regions were amplified by specific *P. indica* primers, 18sF and 26sR. According to DNA sequences of ITS regions, all samples were *P. indica* subspecies indica. For analysis of ISSR, Three primers were chosen because of clear band pattern. These primers amplified 23 polymorphic bands, so ISSR technique could be used for DNA fingerprint analysis of *P. indica*. The similarity index and dendrogram were evaluated using unweighted pair group method arithmetic mean. The result showed that *P. indica* could be divided into two major groups. In further study, the number of primers should be increased and the correlation between secondary metabolite and genetic information of *P. indica* from different habitats should be investigated.

Keywords: DNA finger print, *Pluchea indica*, Thailand, ITS, ISSR

1. Introduction

Pluchea indica (L.) Less. (Asteraceae) is found in a variety of habitats in Thailand such as Chonburi, Chantaburi, Phuket, Songkhla *etc.* It is a traditional medical plant demonstrated anti-inflammatory, anti-hyperglycemic and hepatoprotective activities.^[1] The phenolic and flavonoid contents of *P. indica* from different altitude habitats were showed difference phenolic and flavonoid contents.^[2] The difference of active metabolites in plants, generally, influenced by genetic factor or environment. The purposes of this study were to examine *P. indica* from different habitats in 15 provinces, by DNA sequence analysis of ITS regions, and investigate DNA fingerprint using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers.

metabolite and genetic information of *P. indica* from different habitats should be investigated.

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 23/2559). The authors also would like to thank Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University for facility and partial financial support.

References

- [1] Roslida AH, Erazuliana AK, Zuraini A. Anti-Inflammatory and antinoceptive activities of the ethanolic extract of *Pluchea indica* (L.) LESS. leaf. Pharmacologyonline 2. 2008;349-60.
- [2] Yuliani, Soemarno, Yanuwiadi B, Leksono AS. Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Pluchea indica* Leaves Extracts from Some Altitude Habitats. International Journal of ChemTech Research. 2015;8(4):1618-25.
- [3] DNA Data Bank of Japan. *Pluchea indica*[Internet]. 2016[cited: 2016/6/25]. Available from: <http://ddbj.nig.ac.jp/arsa/>
- [4] Klinbantom R. ISSR ANALYSIS OF *Croton sublyratus* Kurz. IN THAILAND: Chulalongkorn University; 2004.
- [5] Keawduangdee N., Sae-tung A.. Genetic Relationships of Coconut Varieties. Advance science journal edition 12. 2555;1:108-20.
- [6] S. Garcia-Vallve, J. Palau and A. Romeu. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Molecular Biology and Evolution. 1999; 16(9):1125-34.
- [7] Dogan B., Duran, A. & Hakki, E. E. 2007: Phylogenetic analysis of *Jurinea* (*Asteraceae*) species from Turkey based on ISSR amplification. *Ann. Bot. Fennici* 44: 353-358.

metabolite and genetic information of *P. indica* from different habitats should be investigated.

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 23/2559). The authors also would like to thank Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University for facility and partial financial support.

References

- [1] Roslida AH, Erazuliana AK, Zuraini A. Anti-Inflammatory and antinoceptive activities of the ethanolic extract of *Pluchea indica* (L.) LESS. leaf. Pharmacologyonline 2. 2008;349-60.
- [2] Yuliani, Soemarno, Yanuwiadi B, Leksono AS. Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Pluchea indica* Leaves Extracts from Some Altitude Habitats. International Journal of ChemTech Research. 2015;8(4):1618-25.
- [3] DNA Data Bank of Japan. *Pluchea indica*[Internet]. 2016[cited: 2016/6/25]. Available from: <http://ddbj.nig.ac.jp/arsa/>
- [4] Klinbantom R. ISSR ANALYSIS OF *Croton sublyratus* Kurz. IN THAILAND: Chulalongkorn University; 2004.
- [5] Keawduangdee N., Sae-tung A.. Genetic Relationships of Coconut Varieties. Advance science journal edition 12. 2555;1:108-20.
- [6] S. Garcia-Vallve, J. Palau and A. Romeu. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Molecular Biology and Evolution. 1999; 16(9):1125-34.
- [7] Dogan B., Duran, A. & Hakki, E. E. 2007: Phylogenetic analysis of *Jurinea* (*Asteraceae*) species from Turkey based on ISSR amplification. *Ann. Bot. Fennici* 44: 353-358.

3. บทความวิจัยได้นำเสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติที่มีผู้ทรงคุณวุฒิร่วม
กลั่นกรอง จำนวน 2 บทความ

Konsap, K., Kongkiatpaiboon, S., **Vongsak, B.** (2018). Comparison of free radical scavenging activity, anti alpha-glucosidase activity and bioactive compound contents from *Pluchea indica* leaf and flower extracts. The International Conference on Food and Applied Bioscience 2018, The Empress Chiang Mai Hotel, Chiang Mai, Thailand.



The International Conference on Food and Applied Bioscience 2018

February 1-2, 2018 The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand

P-058

Comparison of Free Radical Scavenging Activity, Anti Alpha-Glucosidase Activity and Bioactive Compound Contents from *Pluchea indica* Leaf and Flower Extracts

Kanokporn Konsap¹, Sumet Kongkiatpaiboon² and Boonyadist Vongsak^{1*}

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

²Drug Discovery and Development Center, Thammasat University (Rangsit Campus), Pathum Thani 12121, Thailand


*Corresponding author. E-mail: boonyadist@go.buu.ac.th

Abstract


Pluchea indica (L.) Less (Asteraceae) is consumed as herbal tea for health-promotion and known in Thai as khloo. It is also used by the traditional healers in the treatment of inflammation, haemorrhoids, constipation, aphthous ulcer and diabetes. In the present study, aqueous extracts of leaves and flowers of *P. indica* from two habitats were investigated for in vitro antioxidant activity using ABTS, DPPH radical scavenging capacity, ferric reducing antioxidant power (FRAP), and alpha-glucosidase inhibition activity. The phenolic and bioactive compound contents of the extracts were also determined. The activity of the extracts showed a dose-dependent manner in all assays. The leaf extracts showed better free radical scavenging activity and alpha-glucosidase inhibition activity than the flower extracts. The contents of bioactive phenolic constituents, 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, 3,4-O-dicaffeoylquinic acid, 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid, of the extract was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detector at 326 nm, 25°C. The concentration of these compounds in the leaf extracts of *P. indica* exhibited in the range of 1.06 to 30.06 mg/g while the flower extracts were 0.97 to 20.88 mg/g extract. Thus, the results pointed that the leaf extracts of *P. indica* expressed higher biological activity and bioactive compound contents than flower extracts and could serve as a potential natural source of antioxidants.

Keywords: Alpha glucosidase, extract, free radical scavenging activity, *Pluchea indica*

Tubtimsri, S., Vongsak, B., Weerapol, Y. (2016). The Products Development of Extracted *Pluchea Indica* by Gelatine-Based Pastilles. The 26th FAPA Congress 2016, Bangkok, Thailand.



The products development of extracted *Pluchea indica* by gelatin-based pastilles



Sukkannika Tubtimsri^{1,2,*}, Boonyadist Wongsak¹ and Yotsanan Weerapol^{1,2}
¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Thailand
²Pharmaceutical Biopolymer Group (PBiG), Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Thailand
^{*}Corresponding author: sukkannika@go.buu.ac.th

INTRODUCTION: *Pluchea indica* (L.) Less (Asteraceae) have been used as a traditional medicine for several purposes such as antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, antidiabetic and anticancer agents (1, 2). The leaves, containing complex phenolic compounds (3) are ordinarily used as medicinal tea. However, the products derived from *Pluchea indica* leaves extracted (PLE) are not found. Therefore, the aim of this study was developed the gelatin-based pastilles containing PLE.

METHODS

- ◆ Preparation of pastilles
Gelatins were molten and added sucrose powder to mix and blend thoroughly. Then, glycerin and PLE were mix with molten base. Cool to less than 50 °C, added the chocolate flavor. The mixture was poured into the molds. All formulations were evaluated.
- ◆ The weight variation
- ◆ Thickness, Width and Length
- ◆ Texture analysis study: Texture property of directly pastilles was evaluated using texture analyzer (TA_XT plus, Stable micro system, UK). It was recommended to use a compression probe 2 mm cylindrical stainless. During evaluation, constant force was applied on the surface of self-supporting pastilles upon fracture it was withdrawn. Force required for fracture of pastilles was determined.
- ◆ *In vitro* dissolution study: *In vitro* dissolution test was carried out using USP dissolution apparatus II (DT 72X, Erweka, Germany) at 100 rpm and 37±0.5 °C. SGF pH 1.2 was used as dissolution medium. The phenolic compound; 3-O-caffeoylquinic acid (3CQ) was used as an active substance marker. The samples were analyzed by using HPLC and percentage 3CQ released was calculated.

RESULTS AND DISCUSSIONS

◆ Texture analysis study
Figure 2 presents the force required for fracture of different pastille formulations. The results found that the force required for fractured pastilles were increased when amount of gelatin increased while F4 showed more tough than F3, resulting from a more rigidity of pastilles. However, F4 showed toughness too much unsuitably for elderly or children thus F3 was selected to improve hardness by adding talcum. The effect of talcum amount demonstrated that the force required for fractured pastilles was increased as increasing amount of talcum. The results suggested the ability of talcum for increasing stiffness of pastilles. In previous reported, talcum was added into polymer for enhancement rheological behavior, resulting in a stiffness were more than (4, 5). From results above, F7, F8 and F9 were selected for dissolution study.

◆ *In vitro* dissolution study
The dissolution profiles of F7, F8 and F9 are shown in Figure 3. The cumulative 3CQ release from all formulations reached 100 % within 5 min. The results indicated that the dissolutions of F7, F8 and F9 were not interrupted by excipients in formulations.

Table 1 Formulation of PLE pastille

Ingredient	% w/w								
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
PLE	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Gelatin	10	15	20	25	20	20	20	20	20
Sucrose	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Glycerol	40	40	40	40	30	50	40	40	40
Talcum	-	-	-	-	-	-	1	2.5	5
Sodium benzoate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Chocolate flavor	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs	qs
Water qs to	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Table 2 Weight and size of PLE pastille

Formulations	Weight (g)	Width	Size (mm)	
			Length	Thickness
F3	1.0509±0.0385	9.571±0.145	9.453±0.393	9.634±0.155
F4	1.0946±0.0356	9.589±0.240	9.572±0.273	9.352±0.281
F5	1.0638±0.0313	9.510±0.274	9.610±0.207	9.469±0.237
F6	0.9817±0.0489	9.484±0.284	9.471±0.286	9.013±0.448
F7	1.0806±0.0419	9.531±0.225	9.472±0.253	9.419±0.218
F8	1.0912±0.0298	9.415±0.186	9.520±0.228	9.359±0.229
F9	1.1012±0.0416	9.497±0.152	9.513±0.177	9.469±0.226

Figure 1 Appearance of PLE pastille, F7

Figure 2 Force required for fracture of different pastille formulations (n=3)

Figure 3 3CQ dissolution profiles of F7, F8 and F9 (n=3)

CONCLUSIONS
In the present study, the pastilles containing PLE were studied. The results from above showed that the width, thickness and length of pastilles were within the limits. The dissolution profiles of F7, F8 and F9 were provided drug dissolution 100 % within 5 min. It can be concluded the possibility of the PLE pastille formulations and applied the knowledge obtained from this research for further development of pastille formulations.

REFERENCES

- Biswas R, Dutta PK, Achari B, Bandyopadhyay D, Mishra M, Pramanik KC, et al. Entamoeba histolytica. *Phytomedicine*. 2007;14(7-8):534-7.
- Buapool D, Mongkol N, Chantimal J, Roytrakul S, Srisook E, Srisook K. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013;146(2):495-504.
- Uchiyama T, Miyase T, Ueno A, Usamanghani K. *Phytochemistry*. 1991;30(2):655-7.
- Goel DC. *Polymer Engineering & Science*. 1980;20(3):198-201.
- Lapcik L, Jindrova P, Lapcikova B. *Proceedings of the 1st Conference*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009. p. 73-80.

ACKNOWLEDGMENTS: This work financially supported by the research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 23/2559). The author wish to thank the faculty of pharmacy, Silpakorn University and the faculty of pharmaceutical science, Burapha University. The authors are grateful to Akkaramanee Tunthaphalin and Panbika Setboonsrang for research assistant.

ข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ *Pluchea indica* ลงบนฐานข้อมูลของ Genbank

1. *Pluchea indica* : จันทบุรี

ACCESSION LC194195

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..569
/country="Thailand: Samutsakorn"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Samutsakorn"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..>569
/note="internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgttgatt gccatccag gttcccttg
121 gggtctcctg ggctcaaat caacacaaca acaaaccgg gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaaggct tatgcatgc caccagttc gcgatggtg gcatgacatg
241 tggctcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggtca cgcacgatg
301 aagaacgtag caaatgcga tacttggtg gaattgaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcggatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aataggagt ccccttgac gacgcacgac
541 aagtgggtg tgactaaacc tttgtctcg gtcgtgtgt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttg gacgatctc gaccgcgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//

2. *Pluchea indica* : ชลบุรี

ACCESSION [LC194196](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
/country="Thailand: Chonburi"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Chonburi"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 gggctctcctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccg gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaaggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcatcgatg
301 aagaacgtag caaaatgca tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattcgctcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcgatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtg tgactaaacc tttgtctcgt gtcgtgtgt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgaccc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag

//

3. *Pluchea indica* : นครราชสีมา

ACCESSION [LC194197](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
 /[country](#)="Thailand: Nakhonratchasima"
 /[db_xref](#)="taxon:175518"
 /[isolate](#)="Nakhonratchasima"
 /[mol_type](#)="genomic DNA"
 /[organism](#)="[Pluchea indica](#)"

[rRNA](#) <1
 /[product](#)="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
 /[note](#)="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
 /[product](#)="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
 /[note](#)="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
 /[product](#)="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggct tatgcatatc caccacgttc gcgatggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcacgatg
301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacgggggtg ggcggatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtgt tgactaaacc tttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//

4. *Pluchea indica* : นนทบุรี

ACCESSION [LC194198](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
/country="Thailand: Nonthaburi"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Nonthaburi"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccc gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcacgatg
301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattcgctcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcgatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtgt tgactaaacc tttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//

5. *Pluchea indica* : เพชรบุรี

ACCESSION [LC194199](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
/country="Thailand: Petchaburi"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Petchaburi"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccc gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcacgatg
301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattcgctcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcgatatt
481 ggtctcccg tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtg tgactaaacc tttgtctctg gtcgtgtgt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgac acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//

6. *Pluchea indica* : ญี่ถี่

ACCESSION [LC194200](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
/country="Thailand: Phuket"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Phuket"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttcctttg
121 ggtctcctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccc gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaaggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
241 tggcttctt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcatcgatg
301 aagaacgtag caaaatgca tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattcgctc cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcgatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtg tgactaaacc tttgtctct gtcgtgtgt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//

7. *Pluchea indica* : กระจ่างปศิธิ์พินธ์

ACCESSION [LC194201](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
/country="Thailand: Prajuabkeereekhan"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Prajuabkeereekhan"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 ggttctcctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcatcgatg
301 aagaacgtag caaaatgca tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacgggggtg ggcggatatt
481 ggtctcccg tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtgt tgactaaacc tttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//

8. *Pluchea indica* : ราชพฤกษ์

ACCESSION [LC194202](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
/country="Thailand: Ratchaburi"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Ratchaburi"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccc gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaaggctt tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcatcgatg
301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattcgctcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcggatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtgt tgactaaacc tttgtctcgt gtcgtgtgt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//

9. *Pluchea indica* : ฝรั่ง

ACCESSION [LC194203](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
/country="Thailand: Rayong"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Rayong"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccc gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcatcgatg
301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcggatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtgt tgactaaacc tttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg aggsaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//

10. *Pluchea indica* : สมุทรสาคร

ACCESSION [LC194204](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..569
/[country](#)="Thailand: Samutsakorn"
/[db_xref](#)="taxon:175518"
/[isolate](#)="Samutsakorn"
/[mol_type](#)="genomic DNA"
/[organism](#)="[Pluchea indica](#)"

[rRNA](#) <1
/[product](#)="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/[note](#)="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/[product](#)="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..>569
/[note](#)="internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccg gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaaggct tatgcatgc caccacgttc gcgatggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggtca cgcacgatg
301 aagaacgtag caaatgcga tacttggtgt gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcgatatt
481 ggtctccgt tcttatgta tggatggca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgtggt tgactaaacc tttgtctcg
```

11. *Pluchea indica* : สมุทรสงคราม

ACCESSION [LC194205](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..647
/country="Thailand: Samutsongkhram"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Samutsongkhram"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="[Pluchea indica](#)"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>647
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 gggctctcctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcatcgatg
301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcggatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtgt tgactaaacc tttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttggt acgatgcttc gaccgcg
```

//

12. *Pluchea indica* : สะงขลา

ACCESSION [LC194206](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
/country="Thailand: Songkla"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Songkhla"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 gggctctcctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccccc gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggct tatgcatgc caccacgttc gcatggtgt gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcatcgatg
301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgcc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattcgctcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacggggtgg ggcgatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtgt tgactaaacc tttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//

13. *Pluchea indica* : สุราษฎร์ธานี

ACCESSION [LC194207](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
/country="Thailand: Suratthani"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Suratthani"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggct tatgcatgac caccacgttc gcatggtgtg gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcatcgatg
301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattcgctcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacgggggtg ggcggatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtgt tgactaaacc tttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//

14. *Pluchea indica* : ฉะเชิงเทรา

ACCESSION [LC196166](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
/country="Thailand"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Chachoengsao"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 gggctctctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggct tatgcatatc caccacgttc gcatggtgtg gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcatcgatg
301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcct tacggggata cacgggggtg ggcggatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtgt tgactaaacc tttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//

15. *Pluchea indica* : อุดรดิตถ์

ACCESSION [LC196167](#)

FEATURES Location/Qualifiers

[source](#) 1..695
/country="Thailand"
/db_xref="taxon:175518"
/isolate="Uttaradit"
/mol_type="genomic DNA"
/organism="Pluchea indica"

[rRNA](#) <1
/product="18S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 2..256
/note="internal transcribed spacer 1"

[rRNA](#) 257..420
/product="5.8S ribosomal RNA"

[misc_RNA](#) 421..644
/note="internal transcribed spacer 2"

[rRNA](#) 645..>695
/product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gtcgaaacct gcatagcaga acgacccgag aacctgtaca aaccgtctgg tgtcataggg
61 gtcaggctta tgtttgaccg ttgtggtgcc ttgttgattt gccatccacg gttccctttg
121 ggttctcctg ggcgtcaaat caacacaaca acaaaccgac gcacggcatg tgccaaggag
181 aacttaactt aagaagggct tatgcatatc caccacgttc gcatggtgtg gcatgacatg
241 tggcttcttt gtaacaaaa acgactctcg gcaacggata tctcggctca cgcatcgatg
301 aagaacgtag caaaatgcga tacttgggtg gaattgcaga atcccgtgaa ccatcgagtt
361 tttgaacgca agttgcgccc gaagccattc ggccaagggc acgtctgcct gggcgtcacg
421 tattgcgtcg cccctcatc gtgcttcctt tacggggata cacggggtgg ggcggatatt
481 ggtctcccgt tcttatgta tggatggcca aaataggagt ccccttgacg gacgcacgac
541 aagtgggtgt tgactaaacc tttgtctcgt gtcgtgtgtt ttagccgtg agggaaggca
601 acacaaaaaa ccacaacgtg tcgtcttgat acgatgcttc gaccgacgacc ccaggtcagg
661 cgggactacc cgctgagttt aagcatatca ataag
```

//