



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

พืชสวน

พืชสวน

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรม สารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไพลและเครือญาติ

Genetic Diversity, Active Compounds and Antioxidant Activity in *Zingiber montanum*

(Koenig) Link ex Dietr. and Its Relatives

นามผู้วิจัย นางสาวเสาวลักษณ์ บัวอิน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ยิ่งยง ไพสุขสานติวัฒนา, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์เณรมาลย์ วงศ์ขาวจันทน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สรัญญา วัชรโรทัย, Dr. rer. nat)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์พูนพิภพ เกษมทรัพย์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรม สารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในโพลและเครือญาติ

Genetic Diversity, Active Compounds and Antioxidant Activity in *Zingiber montanum* (Koenig)

Link ex Dietr. and Its Relatives

โดย

นางสาวเสาวลักษณ์ บัวอิน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2552

เสาวลักษณ์ บัวอิน 2552: ความหลากหลายทางพันธุกรรม สารสำคัญและฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ
ในไพลและเครือญาติ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน ภาควิชา
พืชสวน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ยังยง ไพสุขสานติวัฒนา, Ph.D. 99 หน้า

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Zingiber* ทั้ง 51 ตัวอย่าง 14 ชนิด และความแปรปรวนทาง
พันธุกรรมของไพล (*Z. montanum* (Koenig) Link ex Dietr.) จาก 6 แหล่งของประเทศไทย หาโดยใช้เทคนิคทาง
โมเลกุลชนิดอาร์เอพีดี (RAPD) มีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด 28 ชนิด มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น
ทั้งหมด 611 แถบ มีจำนวน 607 แถบ ที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในพืชที่ศึกษา คิดเป็น 99.40
เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของ Jaccard มีค่าตั้งแต่ 0.119 ถึง 0.970 แสดงถึงระยะห่าง
ทางพันธุกรรมของพืชที่ศึกษาอยู่ในช่วงที่กว้าง สามารถจัดกลุ่มพืชที่ศึกษาออกเป็น 8 กลุ่มใหญ่และ 2 กลุ่มย่อย มี
ค่า goodness of fit (r) เท่ากับ 1 ค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของไพล ภายในแหล่งที่มาเดียวกัน มีค่าเท่ากับ
87 เปอร์เซ็นต์ และการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของไพลค่อนข้างสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของตัวอย่าง ความแปรปรวน
ทางพันธุกรรมของตัวอย่างจากทั้ง 6 แหล่งที่ศึกษามีค่าน้อย

จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าไพลโดยวิธีไมโครเวฟ พบว่าปริมาณน้ำมันหอมระเหยของไพล
จากภาคต่างๆ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไพลจากภาคตะวันตกมีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันหอมระเหย
สูงที่สุด เท่ากับ 1.107 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ไพลจากจังหวัดกาญจนบุรี มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงที่สุด เท่ากับ 2.1
เปอร์เซ็นต์ และไพลจากภาคตะวันออกมีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำมันหอมระเขยน้อยที่สุด เท่ากับ 0.495 เปอร์เซ็นต์ ผล
จากการวิเคราะห์สารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยของไพลโดยคอลัมน์ DB-5 MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยของไพล
มีสารสำคัญที่วิเคราะห์ ได้อย่างน้อย 15 ชนิด มีสารสำคัญหลัก 3 ชนิด คือ sabinene, terpinen-4-ol และ DMPBD
(*(E)*-1(3', 4'-dimethylphenyl) butadiene) ปริมาณของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยของไพลจากภาคต่างๆ ไม่
แตกต่างกัน จากการทดสอบหาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากเหง้าไพลโดยวิธี DPPH พบว่าเปอร์เซ็นต์
ของฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสารสกัดไพลจากภาคต่างๆ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไพลจาก
ภาคเหนือมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 80.88 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็น ภาคตะวันออก ภาคใต้ ภาค
ตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคกลาง มีค่า เท่ากับ 76.47, 72.51, 67.38, 66.66 และ 57.63 เปอร์เซ็นต์
ตามลำดับ อย่างไรก็ตามค่าของฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและสารสำคัญในไพลไม่มีความสัมพันธ์กัน จากการศึกษา
ในครั้งนี้สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ไพลที่มีคุณภาพและผลผลิตสูง

Saowaluck Bua-in 2009: Genetic Diversity, Active Compounds and Antioxidant Activity in *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr. and Its Relatives. Master of Science (Agriculture), Major Field: Horticulture, Department of Horticulture. Thesis Advisor: Associate Professor Yingyong Paisooksantivatana, Ph.D. 99 pages.

The genetic relatedness among 51 accessions, 14 species of the genus *Zingiber* and genetic variability of a clonally propagated species, *Zingiber montanum*, from Thailand were studied using random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles. Twenty eight random primers gave reproducible amplification banding patterns of 607 polymorphic bands out of 611 scored bands accounting for 99.40 % polymorphism across the genotypes. Jaccard's coefficient of similarity varies from 0.119 to 0.970, indicative of distant genetic relatedness among the genotype studied. UPGMA cluster revealed eight distinct clusters and two subclusters of *Zingiber*, with the high cophenetic correlation ($r=1.00$) value. Genetic variability in *Z. montanum* was exhibited by the collections from six regions of Thailand. The high molecular variance (87%) within collection regions of *Z. montanum* accessions was displayed by AMOVA and also explained the significant divergence among the samples from six collection regions.

Essential oils of *Z. montanum* rhizomes were obtained using a microwave extraction method. Samples collected from western Thailand contained the highest volume of essential oil (1.107 %w/v), the accession from Kanchanaburi province gave the highest volume (2.1% w/v), whereas those from the eastern part contained the lowest volume (0.495 %w/v). The constituents of the essential oil samples was determined by GC analysis. This technique identified at least 15 compounds in *Z. montanum* essential oils. The major constituents of the oil consisted of sabinene, terpinen-4-ol and DMPBD ((*E*)-1(3', 4'-dimethylphenyl)butadiene). No significant differences in essential oil components among original sources of rhizomes were found. The antioxidant activities of the ethanolic extracts were screened by DPPH assay. Samples from different sources showed significantly different DPPH scavenging activities ($p \leq 0.05$). The antioxidant activities of the rhizome extract obtained from the north showed the highest activity (80.88%), followed by those from the east (76.47%), south (72.51%), northeast (67.38%), west (66.66%) and central region (57.63%). However, there was no correlation between major components and antioxidant activity of *Z. montanum* rhizomes collected from various locations in Thailand. The results from this study indicate the potential to produce a *Z. montanum* rhizome rich in natural antioxidant for improving human nutrition by selecting suitable accessions for large-scale production in selected areas.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ยิ่งยง ไพสุขสานติวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักเป็นอย่างยิ่งที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้เป็นอย่างยิ่ง ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร.เหมอมาลย์ วงศ์ชาวจันทน์ และ รศ. ดร. สรัญญา วัชรโรทัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ขอขอบคุณ ศ. ชูพงษ์ สุขุมลนันทน์ ผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบและ รศ. ดร. สุรินทร์ ปิยโชคนากุล ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณเย็นจิต เรืองเรือง ผู้ช่วยนักวิจัยประจำห้องปฏิบัติการกลางภาควิชาพืชสวน ที่ให้คำปรึกษาและสอนวิธีการทดลอง การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ข้อมูล การปฏิบัติการเกี่ยวกับเครื่องหมายโมเลกุล

ขอขอบคุณ Prof. Kyung Ah Koo และเจ้าหน้าที่สถาบัน Biohealth Products Research Center (BPRC) มหาวิทยาลัย Inje ประเทศเกาหลีใต้ทุกท่าน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมืออุปกรณ์ ให้คำปรึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลด้านการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหย ขอขอบคุณ อาจารย์ธานี ศรีวงศ์ชัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์ผลด้านการใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนทุนสำหรับงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรมและให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อและคุณแม่

ขอบคุณ พี่ชาย และญาติพี่น้องทุกคนที่คอยห่วงใยและเป็นกำลังใจตลอดมา และขอขอบคุณ พี่ๆ ในห้องปฏิบัติการกลางภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการทำงาน ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจระหว่างทำการทดลองจนสำเร็จตามความมุ่งหมาย

เสาวลักษณ์ บัวอิน

มีนาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	18
อุปกรณ์	18
วิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	30
สรุป	70
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	72
ภาคผนวก	84
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	99

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่างพืชสกุล <i>Zingiber</i>	26
2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ 28 ชนิด ที่เลือกใช้ในการทดลอง	32
3 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 28 ชนิด เพอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่าง (polymorphic) ระหว่างสายพันธุ์ และค่า Polymorphic information contents (PICs) ของพืชสกุล <i>Zingiber</i> ทั้ง 51 ตัวอย่าง	34
4 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง <i>Z. officinale</i> จากแหล่งต่างๆ	43
5 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง <i>Z. spectabile</i> (SB103), <i>Z. barbatum</i> (SB104) และ <i>Z. idea</i> (SB105)	44
6 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง <i>Z. zerumbet</i> (SB37, SB70, SB114) และ <i>Z. ottensii</i> (SB56, SB134)	45
7 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง <i>Z. bladleyanum</i> (SB107), <i>Z. citriodorum</i> (SB115) และ <i>Z. parishii</i> (SB116)	45
8 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ เพอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่าง (polymorphic) ของไพล (<i>Z. montanum</i>) จากแหล่งต่างๆ	50
9 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างไพล (<i>Z. montanum</i>) หมายเลข SB82, SB63, SB66, SB71, SB73 และ SB74	52
10 ค่าความแปรปรวนทางโมเลกุล (Molecular variance, AMOVA) ของไพล (<i>Z. montanum</i>) ภายในและระหว่างแหล่งที่มา	54
11 เพอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากไพล (<i>Z. montanum</i>) ทั้ง 34 ตัวอย่าง	57
12 เพอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยเฉลี่ยจากไพล (<i>Z. montanum</i>) จากทั้ง 6 ภาคของประเทศไทย	58
13 ชนิดและปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของไพล (<i>Z. montanum</i>) เฉลี่ยแต่ละภาคของประเทศไทย	62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ terpinen-4-ol, DMPBD และ sabinene จากน้ำมันหอมระเหยของไพลของทั้ง 34 ตัวอย่าง	63
15	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ terpinen-4-ol, DMPBD และ sabinene จากน้ำมันหอมระเหยของไพลของทั้ง 6 ภาค ของประเทศไทย	64
16	เปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากไพล (<i>Z. montanum</i>) ทั้ง 34 ตัวอย่าง	67
17	แสดงเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ยของสารสกัดจากไพล (<i>Z. montanum</i>) จากทั้ง 6 ภาคของประเทศไทย	68
18	ค่าความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต่อปริมาณน้ำมันหอมระเหยและปริมาณองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของไพล	69
ตารางผนวกที่		
1	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชสกุล <i>Zingiber</i> ทั้ง 51 ตัวอย่าง	85
2	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพล	92
3	มาตรฐานน้ำมันไพลของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม	93

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ภาพตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเครื่องหมายอาร์เอพีดี ของพืชสกุล <i>Zingiber</i> 51 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ OPC6, M คือ 1 kb standard marker และลำดับ ที่ของตัวเลข คือ ลำดับที่ของตัวอย่างพืชตามตารางที่ 1	36
2 ภาพตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเครื่องหมายอาร์เอพีดี ของพืชสกุล <i>Zingiber</i> 51 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ OPD8, M คือ 1 kb standard marker และลำดับ ที่ของตัวเลข คือ ลำดับที่ของตัวอย่างพืชตามตารางที่ 1	37
3 ภาพตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเครื่องหมายอาร์เอพีดี ของพืชสกุล <i>Zingiber</i> 51 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ OPR10, M คือ 1 kb standard marker และลำดับ ที่ของตัวเลข คือ ลำดับที่ของตัวอย่างพืชตามตารางที่ 1	38
4 ภาพตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเครื่องหมายอาร์เอพีดี ของพืชสกุล <i>Zingiber</i> 51 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ OPT13, M คือ 1 kb standard marker และลำดับ ที่ของตัวเลข คือ ลำดับที่ของตัวอย่างพืชตามตารางที่ 1	39
5 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของพืชสกุล <i>Zingiber</i> ทั้ง 51 ตัวอย่าง จากการใช้ เทคนิคอาร์เอพีดี โดยวิธีคำนวณแบบ UPGMA	41
6 แสดงค่า Cophenetic correlation (r) จากการจัดกลุ่มพืชสกุล <i>Zingiber</i> ทั้ง 51 ตัวอย่างโดยโปรแกรม CPH และ MXCOMP	48
7 แสดงการจัดกลุ่มพืชสกุล <i>Zingiber</i> ทั้ง 51 ตัวอย่างแบบ Principal component analysis (PCA)	48
8 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของไพล (<i>Z. montanum</i>) ทั้ง 32 ตัวอย่าง จากการ ใช้เทคนิค RAPD โดยวิธีคำนวณแบบ UPGMA; NE, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ; S, ภาคใต้; C, ภาคกลาง; W, ภาคตะวันตก; E, ภาคตะวันออก และ N, ภาคเหนือ	51
9 Chromatogram แสดงองค์ประกอบทางเคมีของไพลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gas chromatography ของไพลหมายเลข SB22	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลด้วย Gas Chromatography	94
2 ช่อดอกของพืชสกุล <i>Zingiber</i> ที่ศึกษาในครั้งนี้ ; ก. <i>Z. montanum</i> , ข. <i>Z. zerumbet</i> , ค. <i>Z. ottensii</i> , ง. <i>Z. barbatum</i>	95
3 ช่อดอกของพืชสกุล <i>Zingiber</i> ที่ศึกษาในครั้งนี้ ; ก. <i>Z. idae</i> , ข. <i>Z. parishii</i> , ค. <i>Z. bradleyanum</i> , ง. <i>Z. rubens</i>	96
4 ช่อดอกของพืชสกุล <i>Zingiber</i> ที่ศึกษาในครั้งนี้ ; ก. <i>Zingiber</i> sp.1, ข. <i>Zingiber</i> sp.2	97
5 เหง้าขิงหยวกหรือขิงใหญ่ (<i>Zingiber officinale</i> Rosc.)	98
6 เหง้าขิงเล็กหรือขิงเผ็ด (<i>Zingiber officinale</i> Rosc.)	98

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

µg	=	microgram
A	=	Adenine
AFLP	=	Amplified fragment length polymorphism
AMOVA	=	Analysis of molecular variance
C	=	Cytosine
CTAB	=	Cetyl-trimethylammonium bromide
DMPBD	=	(<i>E</i>)-1-(3', 4'- dimethoxyphenyl) butadiene
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
DPPH	=	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EC ₅₀	=	Half maximal effective concentration
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
<i>et al.</i>	=	et. alli (Latin), other
G	=	Guanine
GC	=	Gas Chromatography
GC-MS	=	Gas Chromatography-mass spectrometry
HAT-RAPD	=	High Annealing Temperature RAPD
HCl	=	Hydrochloric acid
HPLC	=	High-performance liquid chromatography
ITS	=	Internal transcribed spacer
kb	=	Kilobase
ME	=	Microwave extraction
mg	=	milligram
MgCl ₂	=	Magnesium chloride
MHz	=	Megahertz
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
NaCl	=	Sodium chloride
ng	=	nanogram

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

NTSYS	=	Numerical taxonomy and multivariate analysis system
PCA	=	Principal component analysis
PCR	=	Polymerase chain reaction
PIC	=	Polymorphic information content
pmol	=	picomole
PVP	=	Polyvinyl pyrrolidone
RAPDs	=	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	=	Restriction fragment length polymorphism
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SFME	=	Solvent free microwave extraction
STS	=	Sequence tagged site
T	=	Thymine
TE	=	Tris-EDTA
UPGMA	=	Unweighted pair group method using arithmetic mean analysis
UV	=	Ultraviolet
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume

ความหลากหลายทางพันธุกรรม สารสำคัญและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไพลและ เครือญาติ

Genetic Diversity, Active Compounds and Antioxidant Activity in *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr. and Its Relatives

คำนำ

ในสังคมปัจจุบันมีกระแสด้านสุขภาพอนามัยสูงขึ้น ประชาชนกลับมาให้ความสนใจสมุนไพรและผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติมากขึ้น รวมทั้งรัฐบาลได้สนับสนุนให้มีการใช้สมุนไพรโดยกระทรวงสาธารณสุขได้จัดทำโครงการสมุนไพรกับสาธารณสุขมูลฐานขึ้น และยังมีนโยบายส่งเสริมการนำสมุนไพรที่มีอยู่ในประเทศมาแปรรูปและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆทั้งในรูปแบบของยา เครื่องสำอาง อาหารและเครื่องดื่ม ทั้งระดับชุมชนและระดับอุตสาหกรรม เพื่อส่งเสริมเศรษฐกิจของประเทศและส่งเสริมการส่งออก โดยต้องมีการควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบและการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ มีสมุนไพรของไทยถึง 107 ชนิด ที่มีศักยภาพในเชิงพาณิชย์ เช่น ไพล ขมิ้นชัน และบอระเพ็ด และหลายชนิดได้ผ่านการวิจัยและถูกกำหนดเป็นมาตรฐานแล้ว โดยจัดทำเป็น Monographs ใน Thai Herbal Pharmacopoea เช่น ฟ้าทะลายโจร ขมิ้นชัน และชุมเห็ดเทศ เป็นต้น (วันเฉลิม, 2545)

พืชสกุลขิง (*Zingiber*) วงศ์ Zingiberaceae ประกอบด้วยสมาชิกประมาณ 100 ถึง 150 ชนิด กระจายพันธุ์อยู่ในเขตร้อนชื้นและกึ่งร้อนของทวีปเอเชีย โดยมีศูนย์กลางความหลากหลายอยู่บริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และบางส่วนของประเทศจีน อินเดีย และศรีลังกา (Theilade, 1999; Wu and Larsen, 2000) มีการนำพืชในสกุลนี้มาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในด้านสมุนไพร เป็นยารักษาโรค ใช้เป็นเครื่องเทศปรุงแต่งอาหาร โดยเฉพาะขิง (*Zingiber officinale*) ไพล (*Zingiber montanum*) และ กะทือ (*Zingiber zerumbet*) ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ และมีกระแสด้านในการนำไพลและขิงมาใช้ในการอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ รวมทั้งมีการนำพืชในสกุลนี้บางชนิดมาใช้ในการจัดสวนตกแต่งสถานที่และตัดดอก เช่น กะทือช้าง (*Z. spectabile*) และขิงเจ้าหญิงเชียงใหม่ (*Z. niveum*) (ปราโมทย์และคณะ, 2548) เหง้าของพืชสกุลขิงมีส่วนประกอบเป็นน้ำมันหอมระเหย และสารประกอบประเภท curcuminoids และ diarylheptanoids บางชนิดที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ ได้ เช่น ด้านอาการอักเสบ (anti-inflammatory) และแก้อาการแพ้ต่างๆ ปัจจุบันมีการสกัดสารจากขิงและไพลไปทำยาชนิดต่างๆ เช่น ยาแก้ท้องอืด

ท้องเพื่อ ยาแก้เมาเรือ (ชาญยุทธ์ และคณะ, 2549) ซึ่งตลาดสมุนไพรในประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์ที่มาจากจึงเป็นจำนวนมากทั้งในรูปแบบของแคปซูล จึงแห้งป่น และชาจึง ส่วนในประเทศไทยมีองค์กรทั้งภาครัฐและเอกชน รวมทั้งชุมชนหลายแห่งได้จัดทำผลิตภัณฑ์จากจึงและไพลออกจำหน่าย แต่ส่วนใหญ่ยังไม่ได้การรับรองมาตรฐานจากสถาบันที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยถือเป็นจุดศูนย์กลางความหลากหลายของพืชสกุลจิง และมีการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวาง เป็นสาเหตุให้เกิดความสับสนในการจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ระหว่างชนิด มีการนำเอาข้อมูลทางโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวาง ซึ่งสามารถใช้ได้ในหลายระดับของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ดังนั้นการศึกษาในด้านนี้จึงเป็นประโยชน์ทั้งทางด้านอนุกรมวิธานและการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลจิงในประเทศไทย เพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ การนำมาใช้ประโยชน์ด้านสมุนไพรและการอนุรักษ์ต่อไป และด้วยสาเหตุที่พืชในสกุลจิงบางชนิด เช่น ไพล มีความสำคัญในวงการสมุนไพร แสดงให้เห็นถึงโอกาสของการผลิตเพื่อนำไปสู่การส่งออก การศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจึงเป็นสิ่งที่ต้องศึกษาค้นคว้าอย่างเร่งด่วน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพิสูจน์ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพืชในสกุล *Zingiber* เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์
2. เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพล (*Zingiber montanum*) จากแหล่งที่มาต่างกัน
3. ศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระและสารสำคัญบางชนิดของไพล (*Zingiber montanum*) จากแหล่งที่มาต่างกัน สำหรับเป็นข้อมูลเพื่อพัฒนาการใช้ประโยชน์ในอนาคต

การตรวจเอกสาร

พืชสกุลขิง (*Zingiber*) จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เผ่า (tribe) Zingibereae พืชในสกุลนี้แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม (sections) ตามลักษณะของช่อดอก (inflorescence) และละอองเรณู (pollen grain) คือ กลุ่ม *Zingiber* กลุ่ม *Dymczewichia* (Horan.) Benth. กลุ่ม *Cryptanthium* Horan. และกลุ่ม *Pleuranthesis* Benth. (Theilade and Maersk Moller, 1991)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชสกุลขิง มีลำต้นใต้ดิน เรียกว่า เหง้า (rhizome) แตะแขนงไปตามแนวระนาบ สามารถลงหัวได้ เหง้ามีกลิ่นเฉพาะ มีลำต้นเทียม (pseudostem) แทงขึ้นมาจากดิน ลำต้นเทียมสีเขียว สูง 0.5 ถึง 3.5 เมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับในแนวขนานกับการแตกของเหง้า โคนก้านใบพอง ลักษณะคล้ายมีนวม แผ่นใบเรียบ ใบรูปขอบขนาน รูปหอกหรือรูปแถบ เส้นใบ ปลายแยกเป็น 2 แฉก หรือ เรียบ ช่อดอกเป็นแท่งคล้ายกระบอก แทงจากเหง้าใต้ดิน มีน้อยมากที่ช่อดอกเกิดจากลำต้นเทียม หรือไม่มีก้านช่อดอก ช่อดอกตั้งตรงหรือทอดเลื้อยไปตามพื้นดิน ก้านช่อดอกมีกาบใบหุ้ม ใบประดับเรียงซ้อนเหลื่อมกันติดกันแน่น หรือปลายแยกออกจากกัน ส่วนมากมีสีเขียวหรือสีอื่นๆ มี 1 ถึงหลายดอกต่อใบประดับ ใบประดับย่อยไม่เป็นหลอด กลีบเลี้ยง 3 เป็นหลอดมีช่องเปิดด้านเดียว ที่ปลายแยกเป็น 3 กลีบ กลีบดอกเป็นหลอด ขาวเรียว ปลายแยกเป็น 3 กลีบ กลีบที่อยู่กลางสีขาวหรือสีครีม มีขนาดใหญ่กว่ากลีบที่อยู่ด้านข้าง เกสรเพศผู้เป็นหมันอันที่อยู่ด้านข้างเชื่อมติดกับปาก (labellum) ทำให้เกิดเป็น 3 พู พูตรงกลางป้านหรือเว้าเล็กน้อยที่ส่วนปลาย ก้านชูเกสรเพศผู้สั้น เชื่อมต่อกับส่วนที่หุ้มอยู่รอบเกสรเพศเมีย รังไข่ มี 3 ช่อง มีออวูล (ovule) จำนวนมากต่อช่อง placenta แบบรอบแกนร่วม ก้านชูเกสรเพศเมียยาวเรียว ยื่นยาวไปถึงช่องของอับเรณู ผลแบบแคปซูลแห้งแล้วแตก เมล็ดสีดำ มีเยื่อ (aril) หุ้ม

ไพล มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr. โดยมี *Z. cassumunar* Roxb. เป็นชื่อพ้องชื่อสามัญ คือ cassumunar ginger มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่นต่างๆ เช่น banglai (อินโดนีเซีย) bunglai หรือ bangle (มาเลเซีย) bolai (ลาว) สำหรับประเทศไทยมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น ปูเลย (เหนือ) ไพล (ทั่วไป) และว่านไพล (ภาคกลาง) เหง้าไพลมีเปลือกนอกสีเหลืองอ่อน เนื้อในเหง้ามีสีเหลืองเข้ม ถึงสีส้ม มีกลิ่นหอมฉุน จำเพาะ ลำต้นเทียมสูง 1.2 ถึง 1.8 เมตร ใบเดี่ยว เรียงสลับ กาบใบ เกือบแห้ง หรือมีขนใกล้ขอบใบ เส้นใบ แยกเป็นสองพู มีขน ขาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ใบ ยาวเรียว ยาว 20 ถึง 35 เซนติเมตร กว้าง 2 ถึง

4 เซนติเมตร ได้แผ่นใบมีขนนุ่ม ช่อดอกรูปกระสวย หรือรูปทรงกระบอกถึงรูปไข่ ยาว 10 ถึง 16 เซนติเมตร กว้าง 3 ถึง 3.5 เซนติเมตร ปลายช่อดอกแหลม ช่อดอกแทงตั้งตรงจากพื้นดิน ก้านช่อดอกยาว 20 ถึง 25 เซนติเมตร ใบประดับ รูปไข่ ยาว 3 ถึง 3.5 เซนติเมตร มีขนสั้นนุ่ม สีนํ้าตาลเข้ม ถึงสีเขียว ใบประดับย่อย ยาว 1 ถึง 1.5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง ยาว ประมาณ 1.2 เซนติเมตร กลีบดอก ยาวประมาณ 6 เซนติเมตร สีเหลืองซีด กลีบปากยาวประมาณ 6 เซนติเมตร สีเหลืองซีด กลีบกลาง ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร กลีบกว้าง ปลายแยกเป็น 2 พู กลีบด้านข้างรูปขอบขนาน ปลายมีจำนวน โครโมโซม 11 คู่ ($x=11 \ 2n=22$) (De Guzman and Siemonsma, 1999; Triboun, 2006)

การกระจายพันธุ์และนิเวศวิทยา

พืชสกุลจิง (*Zingiber*) กระจายพันธุ์อยู่ในเขตร้อนชื้นและเขตกึ่งร้อนของทวีปเอเชีย โดยมีศูนย์กลางความหลากหลายอยู่บริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ บางส่วนของประเทศ จีน อินเดีย และ ศรีลังกา (Theilade, 1999; Wu and Larsen, 2000) และบางส่วนของประเทศออสเตรเลียและญี่ปุ่น ซึ่งในประเทศญี่ปุ่นมีรายงาน เพียง 1 ชนิด คือ *Z. mioga* (Theilade and Maersk Moller, 1991) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานแล้ว 56 ชนิด (60 taxa) ในจำนวนนี้เป็นพืชถิ่นเดียวของประเทศ 19 ชนิด เป็นพืชที่มีรายงานครั้งแรก 15 taxa เป็นพืชชนิดใหม่ 10 taxa บางชนิดพบได้ยากมาก เช่น *Zingiber flavovirens*, *Z. idae* และ *Z. citriodorum* และมีรายงานเป็นชนิดใหม่ของโลก 9 ชนิด (Triboun *et al.*, 2005; Triboun, 2006) ในจำนวนนี้เป็นพืชปลูกเพื่อเป็นเครื่องเทศและสมุนไพรที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย 3 ชนิด คือ ไพล จิง และ ไพลคำ พืชในสกุลจิงกระจายพันธุ์ได้ทั่วประเทศ ในนิเวศของป่าหลายแบบตั้งแต่ความสูงจากระดับน้ำทะเลจนถึงที่ระดับ 2,000 เมตร และสามารถพบได้ในป่าที่เคยถูกบุกรุก สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีความชื้นสูง หรือได้ร่มไม้ และบางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีแสงแดดเต็มวันหรือแห้งแล้ง หรือบริเวณโศดหิน บางชนิดมีความจำเพาะต่อลักษณะถิ่นที่อยู่ เช่น จิงขน (*Z. idae*) ซึ่งพบได้ในป่าไผ่แบบผสมโกสุมเขินปน ในภาคตะวันตก บางชนิดมีการกระจายพันธุ์กว้าง เช่น กระทือ พบได้ในป่าดิบแล้ง ตั้งแต่ความสูงจากระดับน้ำทะเลจนถึงที่ระดับประมาณ 1,300 เมตร (ปราโมทย์และคณะ, 2548) สำหรับในประเทศไทยและมาเลเซียพืชสกุลนี้ส่วนใหญ่ออกดอกในฤดูฝนตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายนหรือเดือนตุลาคม ผลแก่ในเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมกราคม แต่มีบางชนิดที่ดอกบานเดือนเมษายนถึงเดือนพฤษภาคม (Holtum, 1950) สำหรับไพล (*Z. montanum*) เชื่อว่ามีแหล่งกำเนิดอยู่ที่ อินเดีย และปัจจุบันมีการปลูกอย่างแพร่หลายในเขตร้อนชื้นของเอเชีย และกลายเป็นพืชปลูกที่พบได้ทั่วไปตามบ้านเรือน

การจัดจำแนกพืชสกุลขิงและการศึกษาวิวัฒนาการ

Theilade (1999) รายงานว่า การจัดจำแนกและศึกษาพืชสกุล *Zingiber* เริ่มตั้งแต่สมัยของ Linnaeus ปี ค.ศ. 1753 ได้อธิบายลักษณะของพืชวงศ์ Zingiberaceae ไว้ในหนังสือ Species Plantarum 1753 และบรรยายการจัดในระดับสกุลในหนังสือ Genera Plantarum 1954 โดยระบุว่า พืชวงศ์ Zingiberaceae ประกอบด้วย 5 สกุล โดยที่พืชในสกุล *Amomum* ในขณะนั้นมี 4 ชนิด ซึ่ง 2 ชนิด ภายหลังเปลี่ยนเป็น สกุล *Zingiber* คือ *A. zingiber* (= *Zingiber officinale*) และ *A. zerumbet* (= *Z. zerumbet*) ในปี 1760 Boehmer ได้ตั้งชื่อสกุล *Zingiber* และตีพิมพ์เป็นครั้งแรก โดยมี *Zingiber officinale* Rosc. เป็น type specimen สำหรับในประเทศไทยเริ่มศึกษาพืชในสกุล *Zingiber* ในปี 1783-1792 โดย Koenig ได้บรรยายลักษณะของพืช ไว้ 2 ชนิด คือ *Z. montanum* และ *Z. spuriunum* สำหรับ *Z. montanum* ตีพิมพ์ครั้งแรกในชื่อ *A. montanum* (1783) ต่อมาในปี 1831 Dietrich ได้เปลี่ยนมาอยู่ในสกุล *Zingiber* และพืชชนิดนี้ยังมีชื่อซ้ำอีกชื่อหนึ่ง คือ *Z. cassumunar* Roxb. (1810) ในปี 1904 Schumann ได้จัดทำ Monograph ของพืชวงศ์ Zingiberaceae และแยกพืชในวงศ์นี้ ออกเป็น 3 เผ่า (tribe) คือ เผ่า Hedychieae เผ่า Globbeae และ เผ่า Ellettaria ซึ่งสกุล *Zingiber* อยู่ใน เผ่า Ellettaria และแยกสกุล *Zingiber* ออกเป็น 4 กลุ่ม (section) คือ กลุ่ม Dymzewishia (Horan.) Benth. มีช่อดอกเกิดจากเหง้าใต้ดิน กลุ่ม Pleuranthesis Benth. ไม่มีก้านช่อดอก ช่อดอกแทงออกมา จากด้านข้างหรือส่วนยอดของลำต้นเทียม กลุ่ม Lampugium Horan. ช่อดอกเกิดจากเหง้าและตั้งตรง และกลุ่ม Cryptanthium Horan. ช่อดอกเกิดจากเหง้าและทอดเลื้อย หรือช่อดอกสั้น ต่อมาในปี 1950 Holttum ได้จัดสกุล *Zingiber* ไว้ใน เผ่า Zingibereae สำหรับการศึกษาพืชสกุลนี้ในประเทศไทยที่มี รายงาน เช่น Theilade and Maersk Moller (1991) ศึกษาอนุกรมวิธานและลักษณะของละอองเรณู ในพืชสกุล *Zingiber* Boehm. ทั้งในประเทศไทยและทางตะวันตกของมาเลเซีย สามารถจัดกลุ่มพืช ในสกุลนี้ตามลักษณะของละอองเรณูได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ละอองเรณูแบบรูปกลมหรือกึ่งกลม ผิวสาก กันเป็นตาข่ายหรือเหมือนลายสมอง (cerebroid) ซึ่งประกอบด้วย กลุ่ม *Zingiber* และ *Dymzewishia* และละอองเรณูแบบรูปไข่ หรือรูปยาวรี ผิวของละอองเรณูมีลายเป็นเส้นยาวหรือเป็นเกลียว (spiro-striate) พบในกลุ่ม *Cryptanthium* และ Theilade (1999) ได้รายงานการศึกษาพืชสกุล *Zingiber* ใน ประเทศไทย และจัดทำรูปวิธานสำหรับจำแนก และบรรยายลักษณะพืชในสกุลนี้ ไว้ 26 ชนิด และ Triboun *et al.* (2005) รายงานการพบพืชในสกุลนี้ในประเทศไทย เพิ่มขึ้น 54 ชนิด อยู่ใน 3 กลุ่ม (sections) และได้ยุบรวมชื่อของบางชนิดรวมกัน รวมทั้งได้บรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ ลักษณะของละอองเรณูของพืชในสกุลนี้ไว้ด้วย สำหรับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการจัดจำแนกและ วิวัฒนาการของพืชสกุล *Zingiber* ที่มีรายงาน เช่น

Triboun *et al.* (2007) ได้ปรับชื่อของพืชสกุล *Zingiber* ที่ตรวจสอบลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการกระจายพันธุ์ใหม่สามชนิดแล้วพบลักษณะที่เหมือนกัน จึงทำการเปลี่ยนชื่อจาก *Zingiber teres* Tong & Y. M. Xia ไปเป็น *Z. smilesianum* Craib ส่วน *Z. xishuangbannaense* S. Q. Tong เปลี่ยนเป็น *Z. thorelii* Gagnep. และ *Z. cochinchinense* Gagnep. เปลี่ยนเป็น *Z. zerumbet* (L.) Sm.

Theilade and Mood (1999a, b) รายงานการค้นพบพืชสกุล *Zingiber* ชนิดใหม่ 6 ชนิด ที่หมู่เกาะบอร์เนียว ประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งมีการกระจายพันธุ์อยู่บริเวณป่าต่ำจนถึงป่าแบบทุดิยุมบินเขา หรือป่าแบบ montane และในปีเดียวกันนี้ได้รายงานการค้นพบพืชในสกุลนี้อีก 5 ชนิด ที่ซาบาร์หมู่เกาะบอร์เนียว และมีรายงานการค้นพบอีก 1 ชนิดที่ประเทศเวียดนาม คือ *Z. collinsii*

Roderos and Elias (2003) ใช้เทคนิค isozyme ในการจัดกลุ่มพืชสกุล *Zingiber* และ สกุล *Curcuma* บางชนิด สามารถจัดกลุ่มพืชในสกุล *Zingiber* อยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยสามารถจัด *Z. purpureum* ไปอยู่กลุ่มเดียวกับ *Z. officinale* ได้

จากข้อมูลการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าพืชในสกุล *Zingiber* ได้รับความสนใจในการศึกษามากขึ้นแล้วและยังมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง และมีการค้นพบชนิดใหม่อยู่เสมอ จึงเป็นแนวทางในการนำเอาทรัพยากรที่มีอยู่มาใช้ให้เกิดประโยชน์

เครื่องหมายโมเลกุลและการใช้ประโยชน์

เครื่องหมายโมเลกุลหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (molecular marker or DNA marker) คือลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซมซึ่งสามารถบ่งบอกตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบได้ ชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบสามารถแบ่งตามหลักการได้ 2 วิธีการ คือ วิธี RFLP (Restriction fragment length polymorphism) และวิธี PCR (Polymerase chain reaction) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยการทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ในการทำปฏิกิริยา เทคนิคนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ ประเภทที่มี primer จำเพาะเจาะจง เช่น STS (Sequence tagged site) และประเภทที่มี primer ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง เช่น RAPDs (Random amplified polymorphic DNA) และ AFLP (Amplified fragment length polymorphism) การใช้เครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker) เป็นการใช้ดีเอ็นเอเพื่อเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับของยีนหรือดีเอ็นเอ ถูกนำมาใช้ใน

การปรับปรุงพันธุ์พืชหลายๆด้าน เช่น นำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ (varietal identification) และสามารถนำมาใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ การนำ molecular marker มาใช้ในการทำแผนที่ทางพันธุกรรมและการหาตำแหน่งยีน ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม การศึกษาลักษณะทางปริมาณ และการทำพันธุวิศวกรรม (สุรินทร์, 2545; อภิชาติ, ม.ป.ป.) ตัวอย่างการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในกระบวนการตรวจสอบพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชในปัจจุบัน ได้แก่

Wahyuni *et al.* (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) ที่พบในอินโดนีเซีย 3 แบบ คือ แบบที่มีเหง้าขนาดเล็ก แบบที่มีเหง้าขนาดใหญ่และแบบที่เหง้าเป็นสีแดงทั้งหมด 28 ตัวอย่าง โดยวิธี AFLP พบว่าขิงที่มีเหง้าสีแดงมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับลักษณะเหง้าเล็กมากกว่าลักษณะเหง้าใหญ่ แต่ไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ของขิงลักษณะเหง้าเล็กกับลักษณะเหง้าใหญ่ออกจากกันได้

Techaprasan *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกพืชในสกุล *Boesenbergia* (Zingiberaceae) ที่พบในประเทศไทย 25 ตัวอย่างและพืชในสกุลใกล้เคียงอีก 4 ตัวอย่าง โดยใช้การวิเคราะห์ความต่างของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ โดยวิธี PCR-RFLP เมื่อใช้ยีน *matK*, *psbA-trnH* และ *petA-psbJ* ตัดสายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งพืชออกได้เป็น 3 กลุ่มซึ่งมีความแตกต่างกัน

Jiang *et al.* (2005) เปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอในนิวเคลียสที่ตำแหน่ง ITS (Internal transcribed spacer) และตำแหน่งของยีน *matK* ที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ ของพืชในสกุล *Zingiber* และขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) ที่มาจากแหล่งต่างกัน พบว่าพืชในสกุล *Zingiber* แต่ละชนิดที่ศึกษาไม่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมกันอย่างชัดเจน แต่ในขิงที่มาจากแหล่งต่างกันมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมกัน

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

อาร์เอฟดี (RAPD) เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคทาง PCR โดยที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับบริเวณใด (arbitrary primer) (สุรินทร์, 2545) หลักการของ อาร์เอฟดี คือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วยไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียงชนิดเดียว ซึ่งส่วนใหญ่ประมาณ 10 เบส (Williams *et al.*, 1990) เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสคู่สมกันโดยไม่จำเป็นต้องทราบว่าไพรเมอร์

จะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอส่วนโคโรโมโซมใด เทคนิค อาร์เอฟดีจึงเป็นเทคนิคที่สามารถศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยสุ่มตลอดทั้งจีโนม (Williams *et al.*, 1990; Ram *et al.* 2008) การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์ไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน (5'→3') จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงดังกล่าวได้ ความแตกต่างของแถบอาร์เอฟดีหรือ polymorphism ที่เกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่างอาจจะเกิดจาก 1) มีชิ้นส่วนขนาดใหญ่มาแทรกในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ 2) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นที่เกาะกับไพรเมอร์หายไปหนึ่งตำแหน่งหรือทั้งสองตำแหน่งทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจากบริเวณดังกล่าว 3) มีการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่เกาะของไพรเมอร์ ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่ได้จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ 4) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามาหรือหายไป ทำให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคอาร์เอฟดี แสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง homozygote และ heterozygote ได้ อย่างไรก็ตามเทคนิคอาร์เอฟดี เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากและสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว และยังเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งในปฏิกิริยาเดียวกัน นอกจากนี้ยังไม่สิ้นเปลืองแรงงานในการเตรียมตัวอย่างเนื่องจากใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยมาก (Williams *et al.*, 1990; Vanijajiva *et al.*, 2005; Nayak *et al.*, 2006; Bahieldin *et al.*, 2006) เทคนิคอาร์เอฟดี จึงถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกพืชสายพันธุ์ต่างๆ และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด เช่น

จรัสศรี (2545) ได้วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชกลุ่มกระเจียวโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดี และ HAT-RAPD สามารถจัดกลุ่มกระเจียวที่นำมาศึกษาได้เป็น 6 กลุ่ม สอดคล้องกับการศึกษาที่มีมาก่อน โดยที่ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มในการศึกษาทั้งหมด 16 ไพรเมอร์ โดยมี 9 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอของพืชที่ศึกษาได้

Rout *et al.* (1998) ตรวจสอบความเหมือนทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดี ในขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) ที่ขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเปรียบเทียบกับขยายพันธุ์โดยวิธีใช้เหง้าแบบปกติ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม และในต้นที่ขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม่มีความแตกต่างกันระหว่างต้น

Syamkumar *et al.* (2003) ศึกษาผลของการสกัดดีเอ็นเอจากเหง้าของขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) และขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) โดยวิธี CTAB Method และตรวจสอบผลโดยวิธีอาร์เอพีดี พบว่าไม่มีความแตกต่างจากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อน

Nayak *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) 16 สายพันธุ์โดยเปรียบเทียบ คาร์โบไฮเดรต 4C nuclear DNA และเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าพืชที่นำมาศึกษาทั้ง 16 สายพันธุ์มีความหลากหลายสูงเหมาะต่อการนำข้อมูลมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

Theerakulpisut *et al.* (2005) ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Zingiber* 20 ชนิด สกุล *Alpinia* 2 ชนิด และสกุล *Amomum* 1 ชนิด โดยเทคนิคอาร์เอพีดี สามารถจัดกลุ่มที่ศึกษาได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งส่วนมากสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Kitamura *et al.* (2007) เปรียบเทียบพืชในสกุล *Curcuma* จากเกาะ Yakushima ประเทศญี่ปุ่น กับ *Curcuma aeruginosa* และ *C. zedoaria* จากเกาะชวาประเทศอินโดนีเซีย โดยเทคนิคอาร์เอพีดี และใช้องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในการเปรียบเทียบ พบว่า *Curcuma* จากประเทศญี่ปุ่นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. aeruginosa* มากกว่า *C. zedoaria*

จากข้อมูลการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมีประโยชน์ในการจำแนกและศึกษาความหลากหลายของพืชทั้งในระดับชนิดและระดับที่สูงกว่า และผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดแยกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชที่ต้องการต่อไปได้

การขยายพันธุ์และการเขตกรรมของไพล

ไพลและพืชชนิดอื่นในสกุล *Zingiber* มีดอกเป็นท่อ และมีต่อมน้ำหวานที่ฐานของดอก แต่ยังมีรายงานเรื่องการเข้าถึงของแมลงที่เป็นตัวช่วยถ่ายละอองเกสรน้อยมาก ดอกของพืชในสกุลนี้จะบานช่วงเช้าและหุบช่วงเย็น หรือต่างกันไปในแต่ละชนิด มีกลีบปาก (labellum) สีต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่มีสีเหลือง ใช้ในการดึงดูดแมลงพาหะของการถ่ายละอองเกสรได้ เช่น Hymenoptera และผีเสื้อ ในพืชบางชนิดโครงสร้างของดอกส่งผลให้เกิด self-pollination หรือการผสมตัวเอง เช่น กะทือ (*Z. zerumbet*) และ ไพลดำ (*Z. ottensii*) ผลของพืชสกุลนี้สามารถดึงดูดนก ให้ช่วยกระจายพันธุ์ได้ (Theilade and Maersk Moller, 1991) แต่อย่างไรก็ตาม ส่วนใหญ่พืชในสกุล *Zingiber* ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยใช้เหง้า โดยตา (axillary bud) ที่ผิวของ

เหง้า จะเจริญไปเป็นลำต้นเทียมหรือช่อดอกได้ เหง้าสามารถเจริญต่อไปได้จากตาที่หุ้มด้วยเกล็ดใบ ซึ่งอยู่ใกล้กับโคนลำต้นเทียมและจะเจริญแบบนี้ไปเรื่อยๆ สำหรับไพล (*Z. montanum*) จะเจริญได้ดีในสภาพอากาศร้อนชื้น ดินร่วนปนเหนียว มีการระบายน้ำดี ไพลมีช่วงระยะเวลาในการปลูกที่เหมาะสม คือ เริ่มปลูกในฤดูฝนเดือนเมษายน ถึงพฤษภาคม โดยใช้ท่อนพันธุ์ที่มีอายุ ประมาณ 10 ถึง 12 เดือน ที่ไม่เป็นโรคหรือแมลงรบกวน หลังจากปลูก 8 เดือน ใบจะเริ่มเหี่ยว เมื่อมีอายุ 10 เดือนลำต้นและใบจะเริ่มเหี่ยวและพบลงกับพื้น ถือเป็นสิ้นสุดฤดูปลูกที่ 1 เดือนที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยว คือ เดือนมกราคมถึงมีนาคม จากรายงานของ ทรงเกียรติ (2537) กล่าวว่า อายุการเก็บเกี่ยวของไพลที่ปลูกจากเหง้าที่อายุต่างกัน ไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตน้ำมันไพลต่างกัน และที่ระยะปลูก 25x100 เซนติเมตร ให้ผลผลิตเหง้าเฉลี่ย เท่ากับ 1,159 กิโลกรัมต่อไร่ และการเก็บเกี่ยวไพลในฤดูที่ 2 หลังปลูกจะให้ปริมาณของผลผลิต สูงกว่าการเก็บเกี่ยวจากฤดูปลูกแรกถึง 4 เท่า สำหรับอายุการเก็บเกี่ยวที่ให้ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยของไพลสูงที่สุด คือ 16 เดือนหลังปลูก (Manochai *et al.*, 2007) สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับการเขตกรรมของไพล ที่เกี่ยวข้อง เช่น

วิเชียร (2545) ปลูกไพลโดยใช้เหง้าขนาด 1.5-3 x 2-6 เซนติเมตร ในแปลงปลูกขนาด 1x5 ตารางเมตร ระยะปลูก 75x75 เซนติเมตร เก็บเกี่ยวที่อายุ 9 เดือน ได้ผลผลิตเหง้าไพลมีน้ำหนักสด 4,599 กิโลกรัมต่อไร่ น้ำหนักแห้ง 1,660 กิโลกรัมต่อไร่ ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 3.49 เปอร์เซ็นต์

สมบัติ (2546) ปลูกไพลในแปลงขนาด 1x2 เมตร และให้อาหารเสริมเป็นมูลวัวแห้ง เก็บเกี่ยวที่อายุ 11 เดือนหลังปลูก จะให้ผลผลิตน้ำหนักไพล 10.35 กิโลกรัมต่อแปลง มากกว่าการปลูกแบบไม่ให้อาหารเสริม หรือให้อาหารเสริมเป็นแกลบดิบ และแกลบเผา

จากการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการปลูกและเก็บเกี่ยวผลผลิตจากไพลที่ระยะปลูกที่สอง หรือประมาณ 16 เดือนหลังปลูกและการให้ปุ๋ยแก่ไพล ทำให้ได้ผลผลิตที่สูงทั้งด้านผลผลิตเหง้าไพล และน้ำมันไพล

องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ส่วนประกอบที่สำคัญในเหง้าไพล คือ น้ำมันหอมระเหย (volatile oil) ซึ่งในเหง้าแห้งของไพลมีปริมาณน้ำมันหอมระเหย 0.5 เปอร์เซ็นต์ (De Guzman and Siemonsma, 1999) ส่วนในเหง้าสดมีปริมาณน้ำมันหอมระเหย 3.49 เปอร์เซ็นต์ (วิเชียร, 2545) องค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหย คือ terpinen-4-ol และสารพวก phenylbutenoids เช่น (*E*)-1-(3', 4'- dimethoxyphenyl)

butadiene (DMPBD) มีฤทธิ์ลดอาการปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ ปวดข้อ ด้านการอักเสบ แก้เคล็ดขัดยอก และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Jeenapongsa *et al.*, 2003; Jitoe *et al.*, 1992; Masuda *et al.*, 1995) สารทั้ง 2 ชนิดนี้ใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพของน้ำมันไพล (นิวัติ, 2545) ซึ่งมีราคา 3,500 – 4,000 บาท ต่อ กิโลกรัม ในปัจจุบันได้กำหนดมาตรฐานของน้ำมันหอมระเหยของไพลแล้ว คือ มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำมันไพล (Phlai oil) มาตรฐานเลขที่ มอก. 1679-2541 โดยคณะกรรมการวิชาการคณะที่ 861 (ศิริลักษณ์, 2545) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆในไพล ที่เคยมีรายงาน คือ ฤทธิ์ไล่แมลงหรือฆ่าแมลง (insecticide / insect repellent) ฤทธิ์คุมกำเนิด (spermicide) ฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) ฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ (วัลภา และ ศักดิ์ชัย, 2518; ศศิธร, 2532; Baker and Nabney, 1975) ฤทธิ์แก้อาการแพ้ (anti-allergic) (Tewtrakul and Subhadhirasakul, 2007) รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งได้ โดย Lee *et al.* (2007) รายงานว่า phenylbutenoid dimer ชนิด ($\pm$)-*trans*-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-[(*E*)-3,4-dimethoxystyryl]cyclohex-1-ene (PSC) ที่แยกได้จากสารสกัดไพล สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของเซลล์มะเร็งปอดได้ ทั้งนี้มียังรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดแยกสารประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาจากไพลและพืชสกุล *Zingiber* ชนิดอื่นๆ เช่น

สังวาล และสุภาณี (2546) ศึกษา น้ำมันระเหยง่ายจากพืช วงศ์ Zingiberaceae 6 ชนิด คือ ขิง ข่า เร่ว กระชาย ไพล และขมิ้นอ้อย ในการควบคุมแมลงหลังการเก็บเกี่ยวและองค์ประกอบทางเคมี พบว่า น้ำมันระเหยง่ายจากขิงและข่ามีฤทธิ์สัมผัสตายสูงต่อดังงวงข้าวแต่แสดงฤทธิ์ต่ำต่อมอดแป้งจากการสกัดน้ำมันระเหยง่ายจากเหง้า พบว่า ไพลมีน้ำมันหอมระเหยจากการสกัดโดยวิธี hydro-distillation เท่ากับ 0.3 เปอร์เซ็นต์

รุ่งฤดี (2550) ศึกษาเปรียบเทียบการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไพล 3 วิธี คือ วิธีการกลั่นด้วยความดันสูงกว่าบรรยากาศ ด้วยเครื่องกลั่นน้ำมันหอมระเหยขนาดเล็ก (Portable Steam Distillation Unit: PSDU) การกลั่นด้วยความดันต่ำกว่าบรรยากาศ ด้วยเครื่องกลั่นสุญญากาศ (Rotary Evaporator: RE) และการกลั่นที่ความดันบรรยากาศ ทำการทดลองด้วยวิธีการ 3 วิธี คือ การกลั่นด้วยไอน้ำ (Hydro Distillation: HD) การกลั่นด้วยไมโครเวฟ (Microwave Extraction: ME) และการกลั่นด้วยวิธีไมโครเวฟร่วมกับการใช้เครื่องอัลตราโซนิกช่วยสกัด (Ultrasonic-assisted Microwave Extraction: UME) ผลการทดลอง พบว่าการกลั่นที่ความดันบรรยากาศทั้ง 3 วิธี การกลั่นด้วยไมโครเวฟที่เวลา 40 นาที ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด เท่ากับ 1.0347% w/w องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำมันหอมระเหย คือ sabinene, γ -terpinene, α -terpinene และ DMPBD

Masuda *et al.* (1995) รายงานการพบสารต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบ ชนิดใหม่ 3 ชนิด จากสารสกัดไพล คือ cassumunarins A, B และ C และพบว่าสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระและยับยั้งการอักเสบได้ดีกว่า curcumin

Hiserodt *et al.* (1998) สกัดแยก 6-, 8-, และ 10- gingerol จากเหง้าของขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) โดยเทคนิค HPLC และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียชนิด *Mycobacterium avium* และ *M. tuberculosis* พบว่า 10- gingerol สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้สูงที่สุด

Jeenapongsa *et al.* (2003) ศึกษาฤทธิ์ต้านอาการอักเสบของ สาร (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene (DMPBD) จากเหง้าไพล (*Z. montanum*) พบว่าสาร DMPBD มีฤทธิ์ยับยั้งอาการบวมและอุณหภูมิอักเสบ บวม ในหนูได้ และยังพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงกว่ายาชนิดอื่นๆที่ใช้ในการรักษาอาการอักเสบชนิดนี้

Ma *et al.* (2004) สกัดแยกสารพวก diarylheptanoids ได้ชนิดใหม่ 7 ชนิด จากเหง้าขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) เช่น (3S,5S)-3,5-diacetoxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptane, (3R,5S)-3-acetoxy-5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptane, (3R,5S)-3,5-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptanes เป็นต้น

Chotjumlong (2005) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดไพล (*Z. cassumunar*) ต่อระดับของสารประกอบในของเหลวนอกเซลล์ในน้ำเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยและเซลล์เยื่อหุ้มจากช่องปาก โดยเลี้ยงเซลล์ในน้ำเลี้ยงและทดสอบสารสกัดไพลในตัวทำละลายต่างๆ โดยวัดระดับของไฮยาลูโรแนน (HA) โกลโคซามิโนไกลแคน (GAG) และเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรตีนเนส (MMP) พบว่าสารสกัดไพลสามารถยับยั้ง HA และ MMP ในเซลล์สร้างเส้นใยและพบผลตรงข้ามในเซลล์เยื่อหุ้มนำไปสู่การลดอาการบวมและการอักเสบของเนื้อเยื่อระหว่างการเกิดบาดแผลได้

Lu *et al.* (2005) สามารถแยกสารพวก phenylbuteniods จากเหง้าไพล (*Zingiber cassumunar*) โดยวิธี upright counter- current chromatography ได้สาร 2 ชนิด คือ (E)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-3-enyl acetate และ (E)-4-(3,4-dimethoxyphenyl)but-1,3-diene

Wohlmuth *et al.* (2005) เปรียบเทียบปริมาณและความเข้มข้นของ gingerol และ shogaols ในเหง้าของขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) ต้นที่เป็น diploid กับต้นที่เป็น tetraploid พบว่าปริมาณของสารทั้ง 2 ชนิด ในเหง้าขิงทั้ง 2 แบบไม่มีความแตกต่างกัน และสารพวก shogaols พบได้ในเหง้าแห้งเท่านั้น

Akiyama *et al.* (2006) สกัดได้สารชนิดใหม่และเขียนสูตรโครงสร้างจากไพลดำ (*Zingiber ottentii*) คือสารจำพวก terpenoids 4 ชนิด และ diarylheptanoid อีก 1 ชนิด โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

Jiang *et al.* (2005) พบว่าปริมาณของสารหอมระเหยหลัก (major volatile compounds) ในขิงที่มาจากแหล่งต่างกันมีปริมาณไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณของสารที่ไม่ใช่สารหอมระเหย (non volatile) แตกต่างกัน คือ ปริมาณของ 6-, 8- และ 10- gingerol ซึ่งได้ทำการทดลองโดยเทคนิค HPLC ส่วนในพืชสกุล *Zingiber* ชนิดอื่นๆเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของสารที่พบระหว่างชนิด พบว่าแตกต่างกันทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ และเมื่อนำข้อมูลมาเปรียบเทียบกับข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่าลักษณะของสารเคมีที่พบและลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชมีความสัมพันธ์กัน

Sabulal *et al.* (2006) สกัดแยกน้ำมันหอมระเหย จากเหง้าของ *Zingiber nimmonii* (J. Graham) Dalzell และหาองค์ประกอบสำคัญจากน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี GC และ GC-MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีส่วนประกอบหลักเป็นสารจำพวก caryophyllene และน้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพหลายชนิดทั้งที่มีผลกระทบต่อมนุษย์และพืช เช่น *Fusarium oxysporum* และ *Aspergillus niger*

Pithayanukul *et al.* (2007) รายงานว่าน้ำมันไพล (Plai oil) และเจลไพล 5% (plai oil gel) มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดแกรมบวก แบคทีเรียชนิดแกรมลบ รวมทั้งยีสต์และ dermatophytes บางชนิดได้ดี

จากรายงานการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าไพลและพืชชนิดอื่นๆในสกุล *Zingiber* ได้รับความสนใจศึกษาด้านองค์ประกอบและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และพืชในสกุลนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย

อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ โมเลกุลหรืออนุภาคที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่อุอยู่เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากการรับหรือขาดอิเล็กตรอนไปหนึ่งตัว ทำให้โมเลกุลนั้นไม่เสถียรและมีความว่องไวสูง (วัชรวิ, 2549) เกิดจากปฏิกิริยาเคมีต่างๆของร่างกาย ความไม่เสถียรของอนุมูลอิสระถือว่าเป็นอันตรายมากต่อร่างกายของเรา ก่อให้เกิดความผิดปกติต่างๆ สามารถออกฤทธิ์ทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมันชนิดไม่อิ่มตัวและเนื้อเยื่อต่างๆ ทำลายโครงสร้างของเซลล์ เป็นสาเหตุของการเกิดเซลล์มะเร็ง กระตุ้นให้เซลล์แก่ (aging) นำไปสู่ความเสื่อม สภาวะร่วงโรย (senescence) (สุพร, 2549) ถ้าระบบป้องกันของเซลล์สามารถควบคุมสมดุลของปริมาณอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตลอดจนระบบซ่อมแซมชีวโมเลกุลยังทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ อนุมูลอิสระจะไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย แต่ในปัจจุบันบรรยากาศโลกถูกทำลาย ก่อให้เกิดปัจจัยเสริมสภาวะออกซิเดชัน (oxidative stress) ต่อร่างกาย เช่น สภาวะเรือนกระจก (greenhouse effect) รังสีแกมมา รังสีเอกซ์เรย์ รวมถึงสารเคมีที่เข้าสู่ร่างกายพร้อมอาหาร (วัชรวิ, 2549) ปัจจัยเสริมเหล่านี้ส่งผลกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มปริมาณมากขึ้น และสร้างความเสียหายต่อเซลล์จนเกินขีดความสามารถที่เซลล์จะสามารถซ่อมแซมได้ นำไปสู่ภาวะเสื่อมก่อนวัยของอวัยวะและอาจเกิดโรคต่างๆตามมา (สุพร, 2549)

การศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระหรือที่รู้จักกันว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) นั้นจึงมีความสำคัญ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายของคนเรามีสองประเภท คือ ประเภทเอนไซม์ (enzymatic antioxidants) เช่น superoxide dismutase (SOD) glutathione peroxidase (GPx) และ catalase และไม่ใช่เอนไซม์ (non- enzymatic antioxidants) ได้แก่ วิตามินซี (vitamin C) วิตามินอี (vitamin E) แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) สารต้านอนุมูลอิสระพวกไทออล (thiol antioxidants) ได้แก่ glutathione thioredoxin และ lipoic acid เป็นต้น สารเหล่านี้มีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน นอกจากนี้ ผักและผลไม้ ยังเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่นๆอีกมากมายในการต้านการเกิดเซลล์มะเร็งอีกหลายชนิด รวมทั้งการรับประทานผักและผลไม้ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งได้ดีกว่าการรับประทานสารต้านอนุมูลอิสระโดยตรง (วัชรวิ, 2549) ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาหาสารต้านอนุมูลอิสระจากพืชชนิดต่างๆกันมาก และมีวิธีการในการศึกษาหลายวิธีแตกต่างกันทั้งในด้านเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ เวลา และชนิดของสารที่ใช้ทำปฏิกิริยากับสารที่จะทดสอบ (รัชยาพร และ นาดิศา, 2548) ดังตัวอย่าง เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Jitoe *et al.* (1992) ทำการตรวจวัดการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระจากเหง้าของพืชวงศ์ขิงในเขตร้อนชื้น 9 ชนิด คือ *Curcuma aeruginosa*, *C. domestica*, *C. heyneana*, *C. mangga*, *C. xanthorrhiza*, *Zingiber cassumunar*, *Phaeomeria speciosa*, *Alpinia galangal* และ *Amomum kepulaga* เปรียบเทียบกับปริมาณของสารเคอคิวมินอยด์ (curcuminoid) ที่ศึกษาแล้ว 3 ชนิด พบว่าความสามารถในการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากพืชในวงศ์ขิงสูงกว่าการคาดคะเนจากสารเคอคิวมินอยด์ที่ได้รับการศึกษามาก่อนหน้าทั้ง 3 ชนิด

Panphadung (2004) ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากสารสกัดเอธานอลในเหง้ากระชาย (*Boesenbergia pandurata*) โดยวิธี DPPH พบว่าความเข้มข้นที่กำจัดอนุมูลอิสระได้ 50% (EC_{50}) มีค่าเท่ากับ 67.7 ± 2.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเหง้ากระชายพบว่า pinocembrin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารชนิดอื่น เทียบกับสารมาตรฐาน caffeic acid มีค่า EC_{50} เท่ากับ 297 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบว่าเหง้ากระชายจากแหล่งต่างกัน 5 แหล่ง จะให้อัตราของสาร pinostrobin ซึ่งเป็นสารหลักในเหง้ากระชายที่ไม่แตกต่างกัน

Sacchetti *et al.* (2005) เปรียบเทียบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากพืชที่มีน้ำมันหอมระเหย 11 ชนิด พบว่ามีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระอยู่ที่ระหว่าง 59.6 ± 0.42 ถึง 64.3 ± 0.45 เปอร์เซ็นต์ มี 3 ชนิดที่มีค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงคือ *Cananga odorata* (75.5 ± 0.53 เปอร์เซ็นต์) *Rosmarinus officinalis* (81.1 ± 0.57 เปอร์เซ็นต์) และ *Curcuma longa* (72.4 ± 0.51 เปอร์เซ็นต์)

Zaeoung *et al.* (2005) ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากเหง้าของพืชวงศ์ขิง 5 ชนิด คือ *Alpinia galangal*, *Boesenbergia pandurata*, *Curcuma longa*, *Kaempferia galanga* และ *Zingiber officinale* โดยวิธี DPPH สารสกัดจาก *Curcuma longa* ใน 95% เมทานอล มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่า EC_{50} 9.7 $\mu\text{g/ml}$ และในการทดลองครั้งนี้พบว่าสาร curcumin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

Khan *et al.* (2006) ทำการตรวจแยกชนิดสารจำพวก diarylheptanoid ด้วยวิธี HPLC จากเหง้าของขิง (*Zingiber officinale*) ได้สารชนิดใหม่ คือ 3, 5 diacetoxy-7-(3, 4 dihydroxy phenyl)-1-(3, 4 dihydroxy phenyl) heptane และตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสารชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Vankar *et al.* (2006) พบว่าการเพิ่มความร้อนให้กับผงขิงและผงขมิ้นชัน ไม่ทำให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระลดลง แสดงว่าความร้อนที่ได้รับจากการปรุงอาหาร ไม่ทำให้สูญเสียคุณภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ

Elzaawely *et al.* (2007) ใช้วิธี DPPH และวิธี ทดสอบการฟอกสี บีต้า แคโรทีน (β – carotene bleaching assay) ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในดอกและเมล็ดของ *Alpinia zerumbet* รวมทั้งศึกษาองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย พบว่าการสกัดสารจากดอกและเมล็ดด้วย hexane มีฤทธิ์ยับยั้ง DPPH และมีประสิทธิภาพในการฟอกสีของ บีต้า แคโรทีน โดยสารสกัดจากดอกของ *A. zerumbet* มีฤทธิ์สูงกว่าสารสกัดจากเมล็ด

จากรายงานการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าพืชในวงศ์ Zingiberaceae มีส่วนประกอบในเหง้าเป็นน้ำมันหอมระเหยและสารสำคัญบางชนิดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ และวิธีที่ใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ คือ วิธี DPPH จึงสามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ในการศึกษากับพืชชนิดอื่นต่อไปได้

อุปกรณ์และวิธีการ

แหล่งที่มาและการเก็บตัวอย่าง

รวบรวมพืชสกุล *Zingiber* จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย แสดงในตารางที่ 1 นำมาปลูกในกระถางที่แปลงทดลองภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ เพื่อสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อน เก็บเกี่ยวเหง้าที่อายุ 8 เดือน นำมาสกัดเพื่อหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ น้ำมันหอมระเหยและสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย รวมทั้งศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

อุปกรณ์

1. microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Gemmy Industrial Corp รุ่น YCW - 01
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Hettich zentrifugen รุ่น Micro 22R
4. ชุดวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ยี่ห้อ TaKaRa รุ่น Mupid-exU
5. เครื่องวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation) ยี่ห้อ Syngene รุ่น G - Box
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ ยี่ห้อ Biometra รุ่น T1 thermocycler
7. เครื่อง laboratory blender ยี่ห้อ warning commercial รุ่น HGBTWT
8. เครื่อง UV-spectrophotometer ยี่ห้อ Hitachi รุ่น Hitachi model 100-60
9. เครื่องไมโครเวฟ ยี่ห้อ SHARP R-233 ให้กำลังไฟฟ้าสูงสุด 800 วัตต์ ความถี่คลื่นไมโครเวฟ 2,450 MHz

10. เครื่อง Gas chromatograph รุ่น GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

11. คอลัมน์ชนิด DB-5MS capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA)

วิธีการ

การทดลองที่ 1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Zingiber*

1.1 การเตรียมดีเอ็นเอจากใบอ่อน

วิธีการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงวิธีการมาจาก Doyle and Doyle (1987) โดยมีวิธีการดังนี้

1.1.1 นำใบอ่อนของพืชสกุล *Zingiber* ประมาณ 0.2- 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วย โตรเจนเหลว จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่บดได้ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer (2% CTAB, 1.4% NaCl, 1% PVP, 20mM EDTA (pH8), 100 mM Tris-HCl (pH 8), 0.1% sodium metabisulfite) 600 ไมโครลิตร และ 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 45-60 นาที

1.1.2 นำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายในหลอด เขย่าขึ้นลงเบา ๆ 200 ครั้ง

1.1.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

1.1.4 ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายในหลอด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที

1.1.5 เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล 600 ไมโครลิตร ประมาณ 3 ครั้ง

1.1.6 ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.1.7 เตรียม 1xTE Buffer (10mM Tris-HCl (pH8), 1mM EDTA (pH8)) 30 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ

1.1.8 เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.1.9 วิธีการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

วิธีการเรืองแสงร่วมกับ ethidium bromide โดยเตรียม agarose gel เข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และจัดอุปกรณ์สำหรับทำ electrophoresis แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยความต่างศักย์ 100 โวลต์ในแนวนอน 25 นาที แล้วย้อมสีด้วย ethidium bromide เข้มข้น 0.5 µg/ml นาน 20 นาที ฉายแสงในน้ำเปล่า 5 นาที แล้วนำไปส่องดูใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพ

1.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

1.2.1 ปฏิบัติ PCR สำหรับเทคนิคอาร์เอพีดี

1) เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ใส่ในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

- สารละลายดีเอ็นเอต้นแบบ ความเข้มข้น 25 ng/µl ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- อาร์เอพีดีไพรเมอร์ ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 10 pmol/µl ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- สารละลายเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 5 unit/µl (จากบริษัท Vivantis) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร
- สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับพีซีอาร์ (10xVi bufferA) ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

- สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 25 mM
ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

- น้ำกลั่น เติมให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

2) นำหลอดใส่ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาของขั้นตอนดังนี้

สภาพการเกิดปฏิกิริยา PCR

- (1) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
- (2) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที
- (3) อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
- (4) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 ทั้งหมด 40 รอบ

- (5) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
- (6) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3) เมื่อครบรอบสุดท้ายแล้ว นำหลอดออกจากเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ แล้วเติม TE Dye 3 ไมโครลิตร

1.2.2 วิธีการตรวจสอบผลของการทำปฏิกิริยา PCR

- 1) เตรียม agarose gel เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

- 2) หยอดผลผลิตของ PCR10 ไมโครลิตร ลงในช่อง agarose gel
- 3) ต่ออุปกรณ์ electrophoresis กับแหล่งกำเนิดที่ให้ความต่างศักย์ 50 โวลต์
- 4) ย้อมเจลด้วย ethidium bromide นาน 20 นาที
- 5) ส่องดูใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกภาพ เพื่อวิเคราะห์ผล

1.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอแต่ละไพรเมอร์ของตัวอย่างพืชที่ศึกษา บันทึกเป็นข้อมูลไบนารี (binary) โดยการเปรียบเทียบการเกิดแถบดีเอ็นเอบน agarose gel ของแต่ละไพรเมอร์ โดยให้คะแนนตำแหน่งที่เกิดแถบดีเอ็นเอเป็น 1 และตำแหน่งที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอเป็น 0

นำข้อมูลที่ได้มา วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) pc รุ่น 2.1 (Rohlf, 2000) โดยใช้โปรแกรม SIMQUAL คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard (1908) และนำข้อมูลที่ได้สร้าง dendrogram โดยวิธีการคำนวณแบบ UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Mean Analysis) ด้วยโปรแกรม SHAN หาค่า cophenetic correlation (r) เพื่อตรวจสอบค่า goodness of fit โดยใช้โปรแกรม CPH และ MXCOMP วิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบ Principal component analysis (PCA) โดยใช้โปรแกรม STAND, SIMINT, EIGEN และ PROJ คำนวณค่า bootstrap ของการจัดกลุ่มที่ได้ของข้อมูลโดยโปรแกรม Winboot (IRRI, 2007)

คำนวณหาค่า Polymorphic Information Content (PIC) จากสูตร

$$PIC = 2Pi(1-Pi) \text{ (Bhat, 2002)}$$

โดยที่ P_i คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i ซึ่ง P_i ประกอบด้วย P_a (absent allele) และ P_p (present allele) ค่า PIC เป็นค่าที่บอกถึงโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่เลือกแบบสุ่ม 2 ตัวอย่างที่มีรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

สำหรับการวิเคราะห์ค่า ความแปรปรวนทางโมเลกุล (molecular variance, AMOVA) คำนวณโดยโปรแกรม GENALEX 6 (Peakall and Smouse, 2006)

การทดลองที่ 2 การหาชนิดสารสำคัญในไพล

2.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไพล

การหาปริมาณน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการสกัดด้วยไมโครเวฟ (microwave extraction, ME) มีวิธีการดังนี้ คือ ชั่งน้ำหนักสดของเหง้า 100 กรัม ปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า ใส่ในหม้อกลั่นขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร นำหม้อกลั่นต่อกับเครื่องแก้วควบแน่น ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ภายในตู้เครื่องกลั่นไมโครเวฟ กลั่นเป็นเวลา 60 นาที ได้น้ำมันหอมระเหยแยกอยู่บนชั้นผิวน้ำ ทำการแยกน้ำมันออกจากน้ำ วัดปริมาตรของน้ำมันหอมระเหย และเก็บน้ำมันหอมระเหยที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การวิเคราะห์ชนิดของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยของไพล

องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของไพล คือ Terpinen-4-ol นำมาใช้เป็นสารมาตรฐานในการตรวจหาชนิดสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยของไพลในครั้งนี้ โดยนำน้ำมันหอมระเหยไปเจือจางด้วยเอธานอลบริสุทธิ์ 100% (1/100 v/v) ใช้สารละลายน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 2 ไมโครลิตรนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC -2010 Gas chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) แบบอัตโนมัติ เพื่อหาชนิดและปริมาณสารสำคัญ บันทึกผล และวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณองค์ประกอบที่สำคัญในพืช โดยที่เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้ออกมาสารมาตรฐาน, ข้อมูลในโปรแกรมของเครื่อง GC-2010 Gas chromatograph และข้อมูลจากการตรวจเอกสาร

การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC -2010 Gas chromatograph แบบ DB-5MS capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA) มีสภาวะดังนี้

- DB-5 column ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร
- สารที่ใช้บรรจุเป็น โพลีเอทธีลีนไกลคอล (PEG) หรือที่เรียกว่า Carbowax 20 M ที่มี ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร
- อุณหภูมิที่ช่องฉีดตัวอย่างและเครื่องตรวจสอบ 230 องศาเซลเซียส

- อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์ 50 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสุดท้ายของคอลัมน์ 220 องศาเซลเซียส อัตราการเปลี่ยนอุณหภูมิของคอลัมน์ 4 องศาเซลเซียส ต่อนาที

- ใช้ก๊าซ อีเลียมในการพาตัวอย่าง อัตราการไหล 1.2 มิลลิลิตร/นาที

- เครื่องตรวจสอบเป็นชนิด Flame Ionization

- ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ 2 ไมโครลิตร

- อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างที่ฉีดกับส่วนที่เหลื้อออกไป (split ratio) ไม่น้อยกว่า 1:10

การทดลองที่ 3 การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไพล

3.1 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างพืช

บดแห้งสดของไพลปริมาณ 1 กรัม ในไนโตรเจนเหลว จนละเอียด เติม 95% เอทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (200mg/ml) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ปรับปริมาตรให้ได้ 5 มิลลิลิตร เจือจางสารสกัดที่ได้ด้วย 95% เอทานอล กลั่นบริสุทธิ์ ขนาด 1 2 3 และ 4 เท่า เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

ดัดแปลงจากวิธีการของ Yamaguchi *et al.* (1998)

เตรียมสารละลาย DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ที่เตรียมใหม่ ทดสอบสารสกัดแต่ละความเข้มข้นโดยใช้ 3 ซ้ำ ดูดสารสกัดจากพืชซ้ำละ 0.5 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง เติมสารละลาย DPPH 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดแล้วเก็บในที่มืด 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดซับแสงด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ณ เวลา 0 นาที ของทุกตัวอย่าง บันทึกผล

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

หลักการของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH คือสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเข้าจับกับอนุมูลอิสระ DPPH มีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ดังนั้นถ้า

สารมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะลดการดูดกลืนแสงของ DPPH หาค่าเปอร์เซ็นต์ของการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากตัวอย่างพืชได้ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{517} \text{ control} - A_{517} \text{ sample}) / A_{517} \text{ control}] \times 100$$

โดยที่ $A_{517} \text{ control}$ คือค่าการดูดซับแสงของสารละลาย DPPH ใน 95% เอทานอล กลั่นบริสุทธิ์ และ $A_{517} \text{ sample}$ คือค่าการดูดซับแสงของสารสกัดจากพืช

ในการศึกษาครั้งนี้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในโพลคือที่ความเข้มข้นเจือจางเป็น 3 เท่า จากความเข้มข้นเดิมของสารสกัด จึงทำการทดสอบหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโพลที่ความเข้มข้น เจือจาง 3 เท่า ในทุกตัวอย่างตามวิธีที่กล่าวข้างต้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการศึกษาในครั้งนี้ การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณน้ำมันหอมระเหยและชนิดสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหย ใช้การทดลองซ้ำ 3 ครั้งต่อตัวอย่าง และรายงานผลในรูปของค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรม Duncan's new multiple range test (DMRT) และหาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับน้ำมันหอมระเหยโดยโปรแกรม Pearson product moment correlation coefficient

สถานที่ทำการวิจัย

1. แปลงทดลอง ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร
2. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร
3. ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหย สถาบัน Biohealth Products Research Center (BPRC) มหาวิทยาลัย Inje ประเทศเกาหลีใต้

ระยะเวลาวิจัย

เริ่มทำการทดลองเดือน พฤษภาคม 2550 สิ้นสุดการทดลองเดือนกันยายน 2551

ตารางที่ 1 ชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่างพืชสกุล *Zingiber*

ลำดับ	หมายเลข	ชื่อวิทยาศาสตร์	กลุ่ม	ภาค	แหล่งที่มา (อำเภอ/ จังหวัด)
1	SB2	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	บึงคล้า/ หนองคาย
2	SB81	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	หัวตะพาน/ อำนาจเจริญ
3 ^{***}	SB82	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เมือง/ อำนาจเจริญ
4	SB83	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ขานุมาน/ อำนาจเจริญ
5	SB84	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เสนางคนิคม/ อำนาจเจริญ
6	SB90	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	หนองสูง/ มุกดาหาร
7	SB91	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	นิคมคำสร้อย/ มุกดาหาร
8	SB92	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	คำชะอี/ มุกดาหาร
9	SB93	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ดงหลวง/ มุกดาหาร
10	SB94	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	หนองสูง/ มุกดาหาร
11	SB95	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	นิคมคำสร้อย/ มุกดาหาร

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ	หมายเลข	ชื่อวิทยาศาสตร์	กลุ่ม	ภาค	แหล่งที่มา (อำเภอ/ จังหวัด)
12	SB96	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	นิคมคำสร้อย/ มุกดาหาร
13	SB130	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ปากช่อง/ นครราชสีมา
14	SB3	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	กลาง	เมือง/ นครสวรรค์
15	SB4	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	กลาง	เมือง/ชัยนาท
16*	SB120	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	กลาง	กำแพงแสน/ นครปฐม
*,**	SB141	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	กลาง	สระโบสถ์/ ลพบุรี
17	SB5	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	เหนือ	เชียงดาว/ เชียงใหม่
18	SB111	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	เหนือ	เมือง/ แม่ฮ่องสอน
19	SB22	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออก	สระแก้ว
20	SB59	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันออก	ท่าใหม่/ จันทบุรี
21	SB31	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ใต้	จะนะ/สงขลา
22	SB32	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ใต้	นาทวี/สงขลา
23	SB63	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ใต้	กาญจนดิษฐ์/ สุราษฎร์ธานี
24	SB66	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ใต้	ปลายพระยา/ กระบี่
25	SB71	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ใต้	พนม/ สุราษฎร์ธานี

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ	หมายเลข	ชื่อ วิทยาศาสตร์	กลุ่ม	ภาค	แหล่งที่มา (อำเภอ/ จังหวัด)
26	SB73	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ใต้	ยะรัง/ปัตตานี
27	SB74	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ใต้	ห้วยยอด/ตรัง
28	SB78	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ใต้	นาทวี/สงขลา
29	SB80	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ใต้	จะนะ/สงขลา
30	SB97	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ใต้	บางกล่ำ/ สงขลา
31	SB133	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ใต้	ตากใบ/ นราธิวาส
**	SB58	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันตก	ศรีสวัสดิ์/ กาญจนบุรี
32	SB61	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันตก	ปากท่อ/ ราชบุรี
**	SB129	<i>Z. montanum</i>	Zingiber	ตะวันตก	ศรีสวัสดิ์/ กาญจนบุรี
33 ^{*,***}	SB39	<i>Z. officinale</i>	Dymczewiczia	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อุบลราชธานี
34 ^{*,***}	SB68	<i>Z. officinale</i>	Dymczewiczia	ใต้	ปลายพระยา/ กระบี่
35 ^{*,***}	SB85	<i>Z. officinale</i>	Dymczewiczia	ตะวันออกเฉียงเหนือ	เขียงคาน/เลย
36 ^{*,***}	SB110	<i>Z. officinale</i>	Dymczewiczia	เหนือ	เมือง/ แม่ฮ่องสอน
37 ^{*,***}	SB37	<i>Z. zerumbet</i>	Zingiber	ใต้	หาดใหญ่/ สงขลา
38 ^{*,***}	SB70	<i>Z. zerumbet</i>	Zingiber	ใต้	พนม/ สุราษฎร์ธานี
39 ^{*,***}	SB114	<i>Z. zerumbet</i>	Zingiber	ตะวันตก	แม่สอด/ตาก

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ	หมายเลข	ชื่อวิทยาศาสตร์	กลุ่ม	ภาค	แหล่งที่มา (อำเภอ/ จังหวัด)
40 ^{*,***}	SB56	<i>Z. ottensii</i>	Zingiber	ตะวันตก	ศรีสวัสดิ์/ กาญจนบุรี
41 ^{*,***}	SB134	<i>Z. ottensii</i>	Zingiber	ตะวันออกเฉียงเหนือ	ปากช่อง/ นครราชสีมา
42 ^{*,***}	SB24	<i>Zingiber</i> sp1	Unknown	ตะวันออกเฉียงเหนือ	สกลนคร
43 ^{*,***}	SB103	<i>Z. spectabile</i>	Zingiber	ใต้	พังงา
44 ^{*,***}	SB104	<i>Z. barbatum</i>	Cryptanthium	ตะวันตก	กาญจนบุรี
45 ^{*,***}	SB105	<i>Z. idae</i>	Zingiber	ตะวันตก	กาญจนบุรี
46 ^{*,***}	SB106	<i>Z. peninsulare</i>	Zingiber	ใต้	ภูเก็ต
47 ^{*,***}	SB107	<i>Z. bradleyanum</i>	Cryptanthium	เหนือ	เชียงใหม่
48 ^{*,***}	SB115	<i>Z. citriodorum</i>	Zingiber	ตะวันตก	แม่สอด/ตาก
49 ^{*,***}	SB116	<i>Z. parishii</i>	Zingiber	ตะวันตก	แม่สอด/ตาก
50 ^{*,***}	SB117	<i>Z. rubens</i>	Cryptanthium	ตะวันตก	แม่สอด/ตาก
51 ^{*,***}	SB118	<i>Zingiber</i> sp2	Unknown	ตะวันตก	แม่สอด/ตาก

หมายเหตุ *ไม่ได้ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

**ไม่ได้ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิคอาร์เอฟดี

***ไม่ได้ใช้ในการศึกษาน้ำมันหอมระเหย

ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Zingiber*

1.1 การเตรียมดีเอ็นเอจากใบอ่อน

จากวิธี CTAB พบว่าดีเอ็นเอที่ได้เมื่อนำไปแยกขนาดและตรวจสอบคุณภาพโดยวิธี electrophoresis ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและมีปริมาณเพียงพอต่อการทดลอง ประมาณ 12.5 ไมโครกรัม ต่อใบพืชที่บดละเอียด 0.5 กรัม สอดคล้องกับรายงานของ Mafra *et al.* (2008) ที่รายงานว่าเมื่อเปรียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอในผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง (*Glycine max*) พบว่าวิธี CTAB เป็นวิธีที่ทำได้เร็ว ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและปริมาณสูง มีดีเอ็นเอเสถียรภาพน้อยกว่าการสกัดโดยวิธีอื่นๆ และสามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในหลอดทดลองได้ดี และยังสอดคล้องกับ Moyo *et al.* (2008) ที่รายงานว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ใช้เนื้อเยื่อของพืชที่นำมาสกัดในปริมาณน้อย และได้ปริมาณดีเอ็นเอสูงและมีคุณภาพดี

1.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการทดสอบไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 140 ชนิด ที่มีสัดส่วนของ G+C ตั้งแต่ 60 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป เพื่อเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพล (*Z. montanum*) และไพลดำ (*Z. ottensii*) ได้ โดยวิธี PCR พบว่ามีไพรเมอร์ 60 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพลและไพลดำได้ และทำการเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณมาก และเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนมาใช้ในการศึกษาทั้งหมด 28 ชนิด (ตารางที่ 2)

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ที่ใช้สำหรับเทคนิคอาร์เอพีดี ในครั้งนี้ เมื่อใช้ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 50mM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และใช้อุณหภูมิของขั้นตอน annealing ในสภาพของปฏิกิริยา PCR ที่ 48 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของพืชสกุล *Zingiber* ได้ดี เกิดการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอปริมาณมาก สามารถเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน (major band) และแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบจาง (minor band) การเลือกสภาพของปฏิกิริยา PCR จึงเป็นสิ่งสำคัญในขั้นตอนการวิเคราะห์ของเทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อให้ได้ผลผลิตของปฏิกิริยาที่เหมาะสม (Um *et al.*, 2001) ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Harini *et al.* (2008) ที่ศึกษาถึงสภาพที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *Urginea indica* ในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี ได้รายงานว่าการใช้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่แตกต่าง

กันให้ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดีต่างกัน โดยที่ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่ำ จะให้ผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่ดี เพราะมีปริมาณของ $MgCl_2$ ไม่เพียงพอต่อปฏิกิริยาของ เอนไซม์ *Taq polymerase* โดยที่ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เท่ากับ 25 mM ต่อรอบ ในขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส และใช้จำนวนรอบของปฏิกิริยาเท่ากับ 40 รอบ ให้ผลของ ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอดีที่สุด

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ 28 ชนิด ที่เลือกใช้ในการทดลอง

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	สัดส่วนของ G+C (%)	ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	สัดส่วนของ G+C (%)
OPC6	GAACGGACTC	60	OPD13	GGGGTGACGA	70
OPC7	GTCCCGACGA	70	OPR2	CACAGCTGCC	70
OPC8	TGGACCGGTG	70	OPR5	GACCTAGTGG	60
OPC9	CTCACCGTCC	70	OPR9	TGAGCACGAG	60
OPC10	TGTCTGGGTG	60	OPR10	CCATTCCCCA	60
OPC12	TGTCATCCCC	60	OPR16	CTCTGCGCGT	70
OPC13	AAGCCTCGTC	60	OPT13	AGGACTGCCA	60
OPC14	TGCGTGCTTG	60	OPT14	AATGCCGCAG	60
OPD1	ACCGCGAAGG	70	OPT15	GGATGCCACT	60
OPD2	GGACCCAACC	70	OPT16	GGTGAACGCT	60
OPD3	GTCGCCGTCA	70	OPT17	CCAACGTCGT	60
OPD6	ACCTGAACGG	60	OPT18	GATGCCAGAC	60
OPD8	GTGTGCCCCA	70	OPT19	GTCCGTATGG	60
OPD11	AGCGCCATTG	60	OPT20	GACCAATGCC	60

1.2.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Zingiber* จากเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี electrophoresis เทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb DNA ladder) ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 611 แถบ จากไพรเมอร์ทั้ง 28 ชนิด ขนาดดีเอ็นเออยู่ระหว่างประมาณ 100 ถึง 3,600 คู่เบส มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band) ของแต่ละสายพันธุ์ ทั้งหมด 607 แถบ จากแถบดีเอ็นเอที่เกิดทั้งหมด คิดเป็น 99.40% โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 11 ถึง 31 แถบ เฉลี่ย 21.82 แถบ ต่อไพรเมอร์ (ตารางที่ 3) ตัวอย่างรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ OPC6 OPD8 OPR10 และ OPT13 (ภาพที่ 1-4 ตามลำดับ) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเทคนิคอาร์เอพีดี ทำให้เกิดความหลากหลายของรูปแบบแถบดีเอ็นเอระหว่างพืชในสกุล *Zingiber* ได้ดี สอดคล้องกับการทดลองของ Theerakulpisut *et al.* (2005) รายงานการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการหาความแปรผันทางพันธุกรรมของพืช สกุล *Zingiber* 20 ชนิด สกุล *Alpinia* 2 ชนิด และสกุล *Amomum* 1 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 24 ไพรเมอร์ พบว่า มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นรวมทั้งสิ้น 237 แถบ มีขนาดตั้งแต่ประมาณ 161 ถึง 2,230 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (100%) แสดงความแตกต่างระหว่างจีโนมของพืชที่ศึกษา

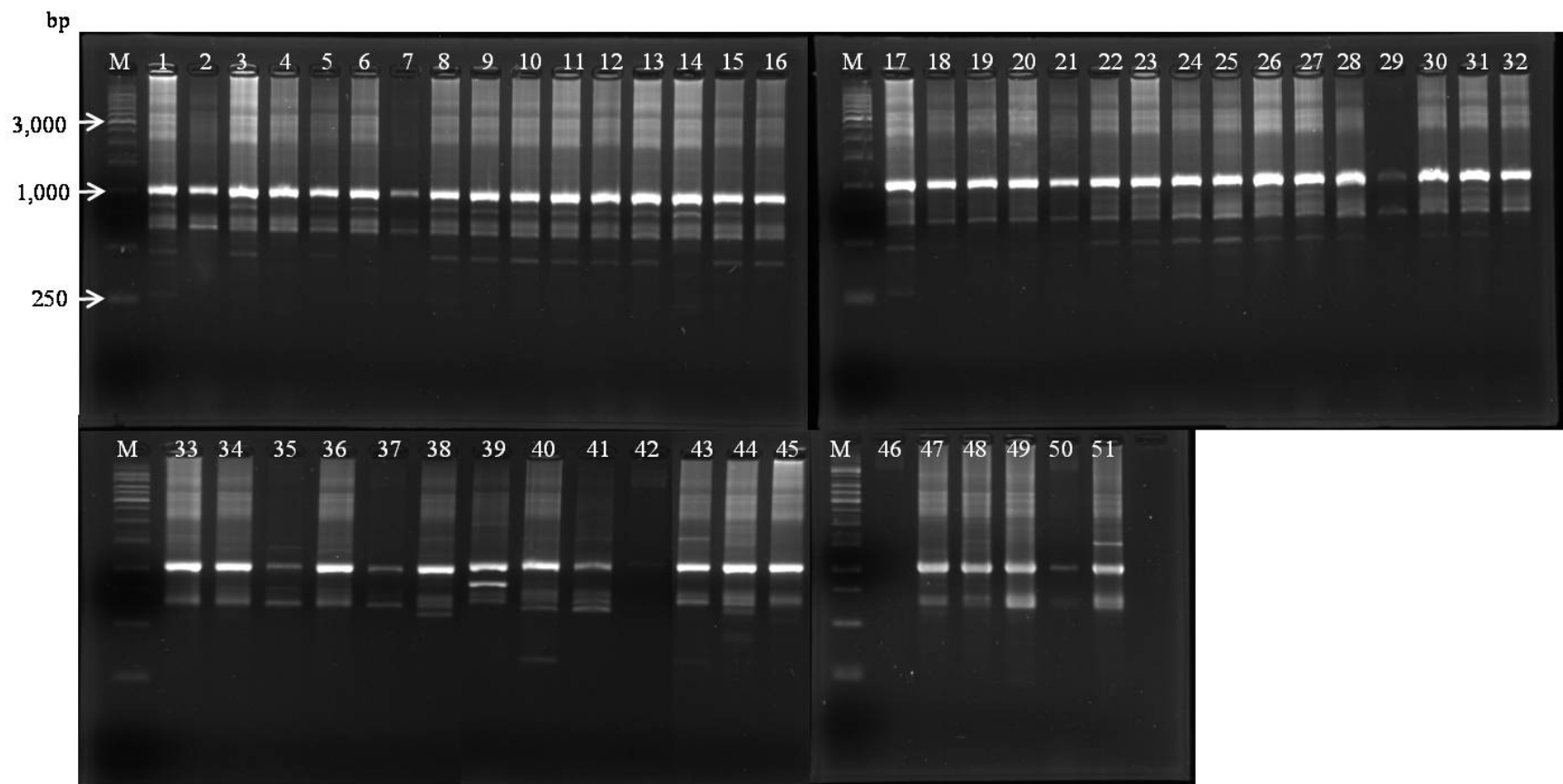
การวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตมีหลายแบบแตกต่างกันไปตามลักษณะของข้อมูลที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ การหาค่า Heterozygosity (H) หรือค่า Polymorphic information contents (PICs) เป็นข้อมูลที่บอกถึงโอกาสที่จะพบความหลากหลาย (polymorphism) ถ้ามีการเลือกสิ่งมีชีวิตนั้นๆ มาแบบสุ่ม จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้ค่า PICs อยู่ระหว่าง 0.21 จากไพรเมอร์ชนิด OPD1 ถึง 0.41 ในไพรเมอร์ชนิด OPT19 มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.31 (ตารางที่ 3) เนื่องจากเทคนิคอาร์เอพีดีเป็น Dominant markers จะมีค่า PICs ระหว่าง 0 – 0.5 (วิภา, ม.ป.ป.) ซึ่งค่า PIC ที่ได้นี้ แสดงว่าการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี มีโอกาสที่จะพบความหลากหลาย (polymorphism) ในพืชสกุล *Zingiber* ค่อนข้างสูง ผลที่ได้นี้นำไปในแนวทางเดียวกับการศึกษาของ Ram *et al.* (2008) ที่ศึกษาความหลากหลายระหว่างชนิดในพืชสกุล *Jatropha* 12 ชนิด โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ได้ค่า PICs เฉลี่ยเท่ากับ 0.44 แสดงถึงโอกาสที่จะพบความหลากหลายในพืชสกุลนี้สูงมาก ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช ทั้งระดับภายในชนิดและระหว่างชนิด ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ระบบการสืบพันธุ์ของพืช รูปแบบการจัดการของมนุษย์ และชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจสอบ สำหรับเทคนิคอาร์เอพีดี ความหลากหลายเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส เบสใดเบสหนึ่งในตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับ หรือเกิดจากการเพิ่มหรือขาดหายไปของลำดับชิ้นดีเอ็นเอตรงระหว่างตำแหน่งซึ่งไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะ (William *et al.*, 1990)

ตารางที่ 3 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 28 ชนิด เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่าง (polymorphic) ระหว่างสายพันธุ์ และค่า Polymorphic information contents (PICs) ของพืชสกุล *Zingiber* ทั้ง 51 ตัวอย่าง

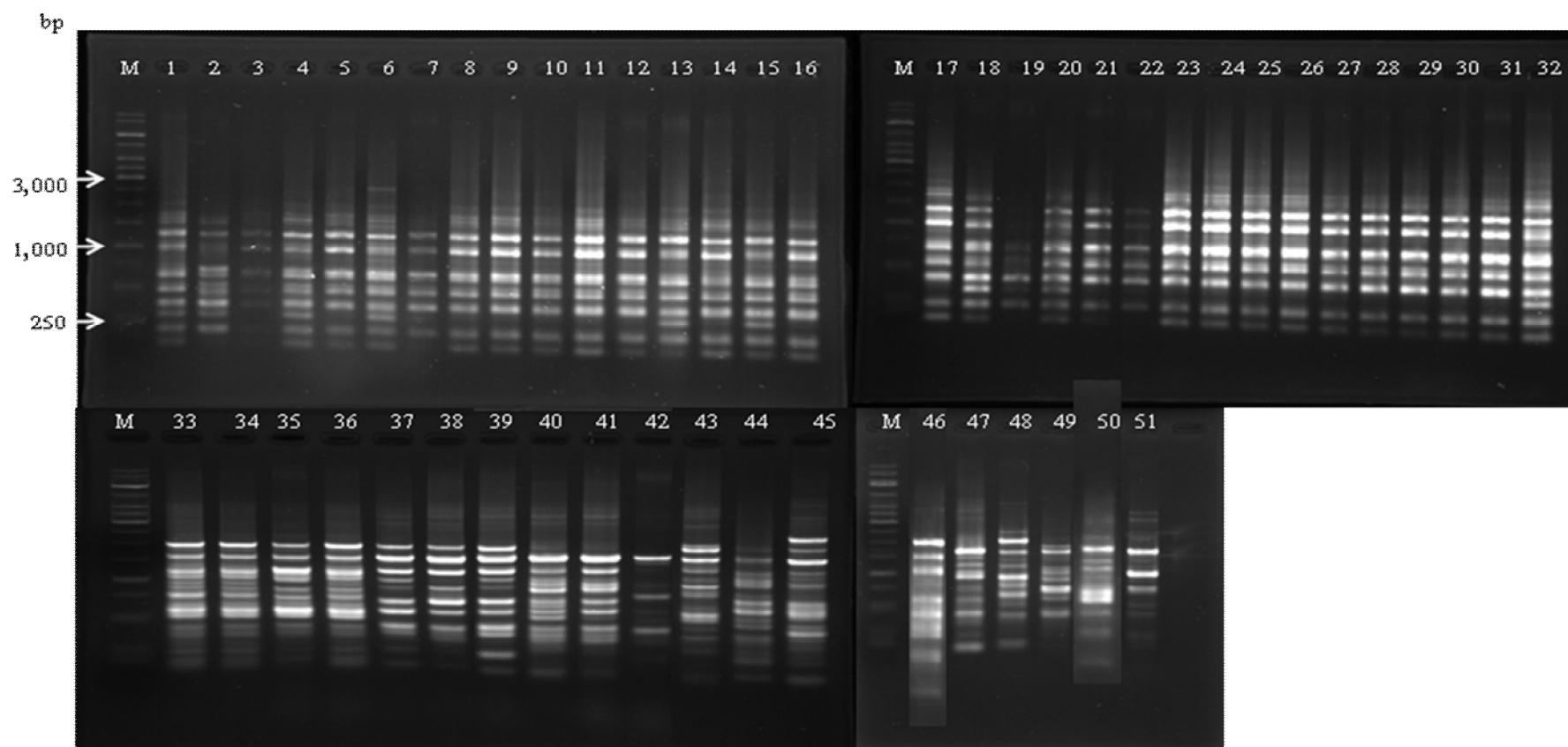
ชนิดไพรเมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ	แถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่าง (polymorphic) (%)	Polymorphic information content (PIC)
OPC6	11	100	0.25
OPC7	19	100	0.32
OPC8	21	100	0.37
OPC9	23	100	0.24
OPC10	23	100	0.33
OPC12	19	100	0.29
OPC13	29	100	0.30
OPC14	31	100	0.32
OPD1	20	100	0.15
OPD2	26	96.15	0.24
OPD3	23	95.65	0.39
OPD6	22	100	0.32
OPD8	23	100	0.28
OPD11	23	100	0.26
OPD13	21	100	0.28
OPR2	22	95.45	0.32
OPR5	25	100	0.35
OPR9	18	100	0.34
OPR10	15	100	0.32
OPR16	15	100	0.27
OPT13	22	100	0.35
OPT14	21	100	0.29
OPT15	24	100	0.32
OPT16	23	100	0.34
OPT17	20	100	0.39

ตารางที่ 3 (ต่อ)

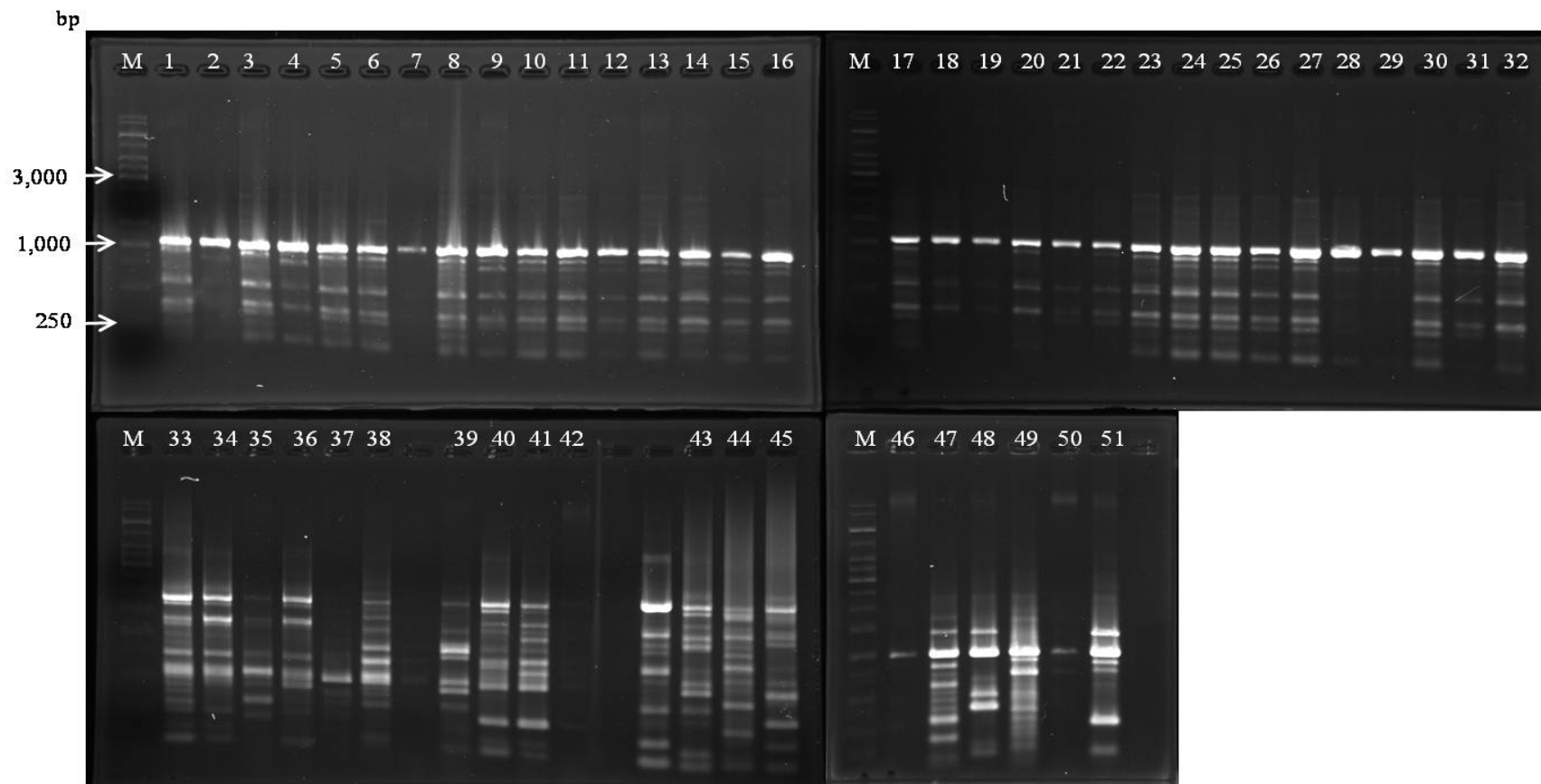
ชนิดไพรมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ	แถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่าง (polymorphic) (%)	Polymorphic information content (PIC)
OPT18	21	100	0.35
OPT19	22	100	0.41
OPT20	24	95.83	0.28
ค่าเฉลี่ย	21.82	99.40	0.31



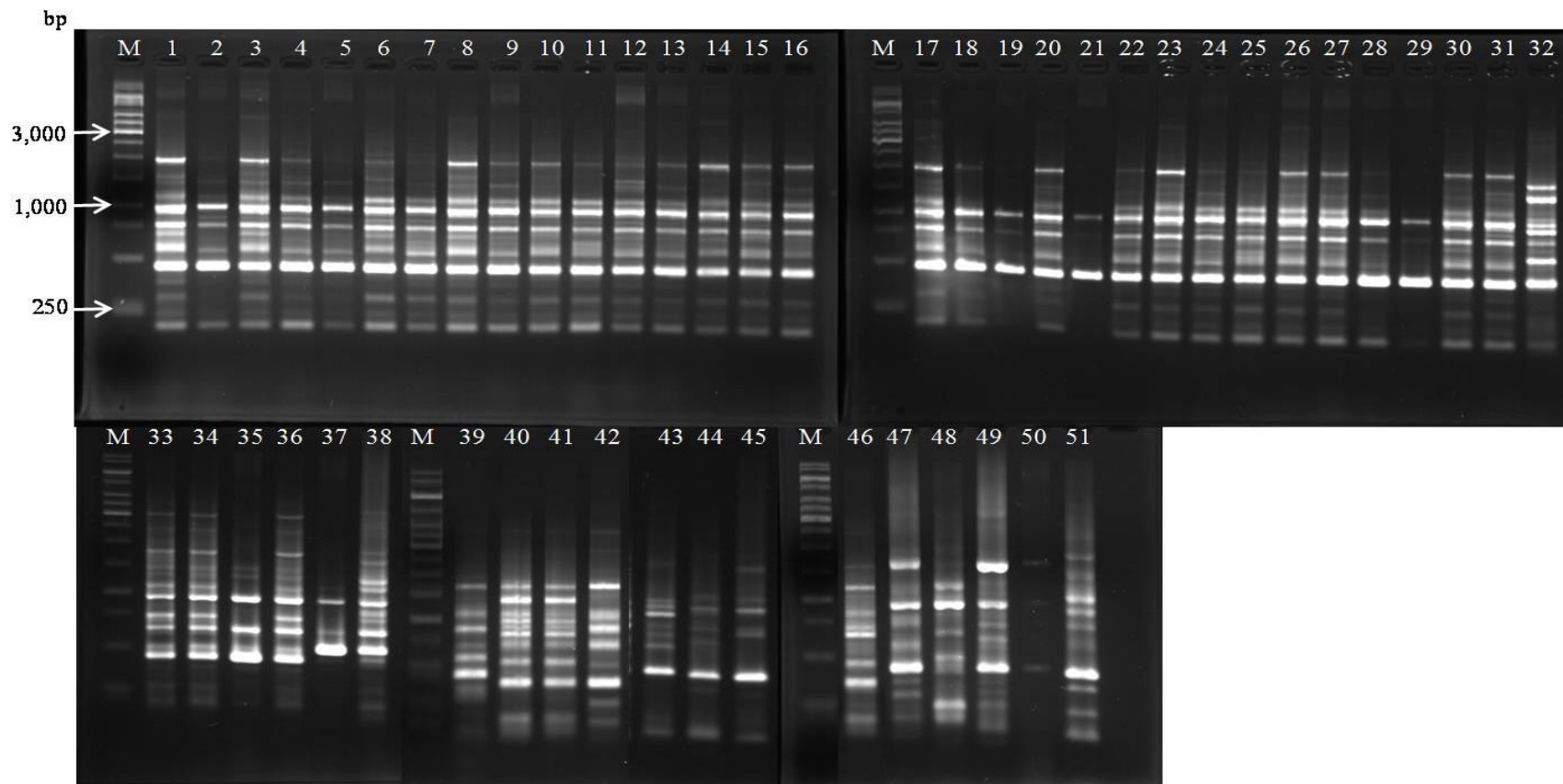
ภาพที่ 1 ภาพตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเครื่องหมายอาร์เอพีดี ของพืชสกุล *Zingiber* 51 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ OPC6, M คือ 1 kb standard marker และลำดับที่ของตัวเลข คือ ลำดับที่ของตัวอย่างพืชตามตารางที่ 1



ภาพที่ 2 ภาพตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเครื่องหมายอาร์เอพีดี ของพืชสกุล *Zingiber* 51 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ OPD8, M คือ 1 kb standard marker และลำดับที่ของตัวเลข คือ ลำดับที่ของตัวอย่างพืชตามตารางที่ 1



ภาพที่ 3 ภาพตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเครื่องหมายอาร์เอพีดี ของพืชสกุล *Zingiber* 51 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ OPR10, M คือ 1 kb standard marker และลำดับที่ของตัวเลข คือ ลำดับที่ของตัวอย่างพืชตามตารางที่ 1

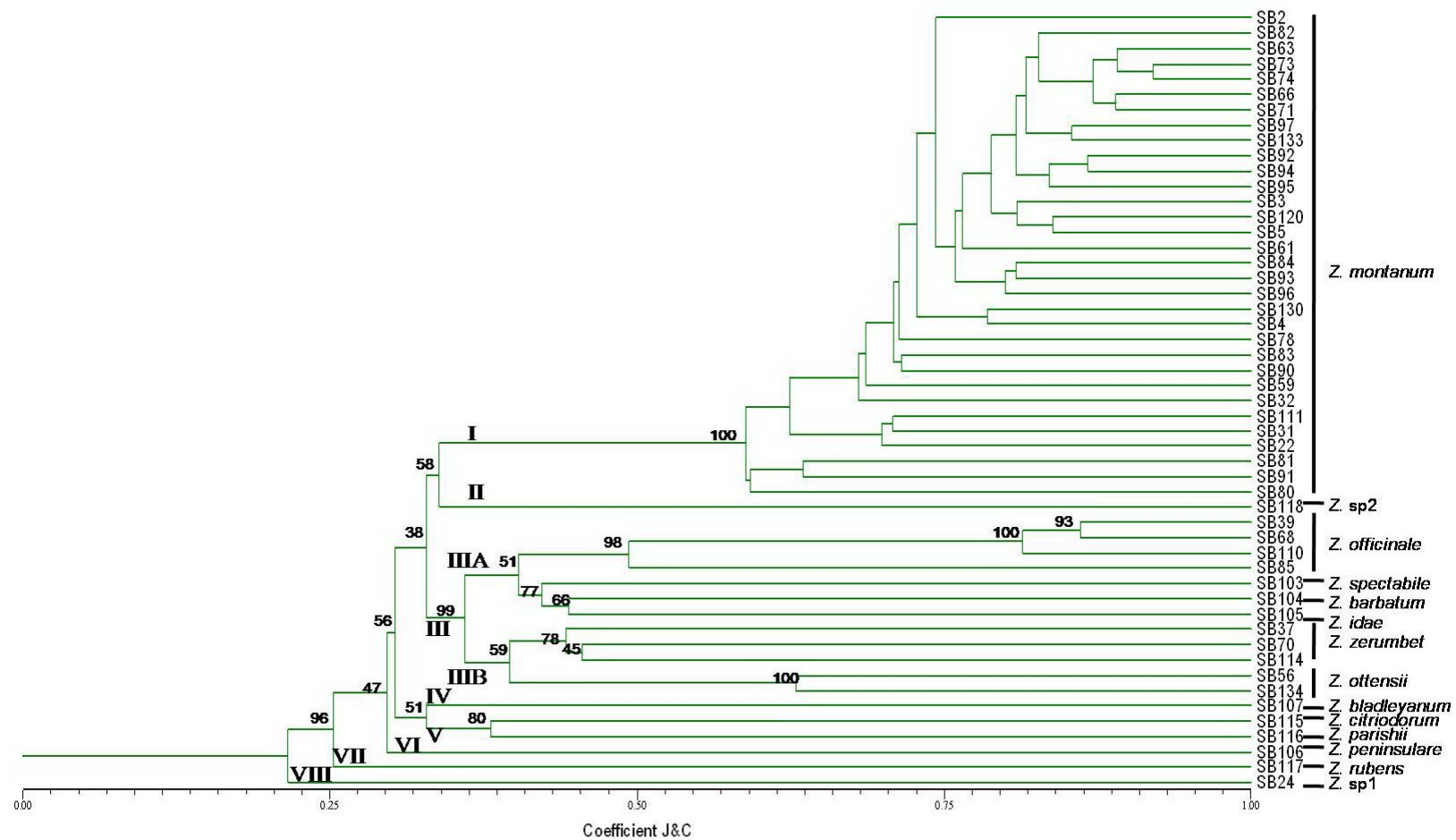


ภาพที่ 4 ภาพตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดเครื่องหมายอาร์เอพีดี ของพืชสกุล *Zingiber* 51 ตัวอย่าง จากการใช้ไพรเมอร์ OPT13, M คือ 1 kb standard marker และลำดับที่ของตัวเลข คือ ลำดับที่ของตัวอย่างพืชตามตารางที่ 1

1.2.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Zingiber*

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Zingiber* ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYS โดยปรับเปลี่ยนข้อมูลจากภาพรูปแบบของจีนดิเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ ทั้ง 28 ชนิด มากำหนดเป็นเลขสัญลักษณ์ “1” กรณีปรากฏแถบดิเอ็นเอ และเลขสัญลักษณ์ “0” กรณีไม่ปรากฏแถบดิเอ็นเอ จากนั้นใช้โปรแกรม SIMQUAL คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) โดยที่ความเหมือนทางพันธุกรรม (Genetic similarity) และระยะทางทางพันธุกรรม (Genetic distance) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละตัวอย่าง (individual sample) โดยที่ค่า Genetic distance = 1 - similarity ในครั้งนี้ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard (Jaccard's similarity coefficients) เพื่อหาความเหมือนทางพันธุกรรมของพืช ในสกุล *Zingiber* ทั้ง 51 ตัวอย่าง พบว่าพืชที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.119 ถึง 0.970 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของไพล (*Z. montanum*) หมายเลข SB91 และ SB32 มีค่าสูงที่สุด (0.970) (ตารางภาคผนวกที่ 1) และค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างไพลหมายเลข SB61 และ จิงขน (*Z. barbatum*) หมายเลข SB104 มีค่าน้อยที่สุด (0.119) (ตารางภาคผนวกที่ 1) แสดงให้เห็นว่าในพืชชนิดเดียวกันแต่มาจากต่างแหล่งมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยมาก ในขณะที่พืชต่างชนิดกันค่าของระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่าสูง แสดงให้เห็นว่าสามารถแยกชนิดพืชในสกุล *Zingiber* ออกจากกันได้อย่างชัดเจน ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของการศึกษาพืชในระดับสกุลส่วนใหญ่มีช่วงความกว้างมาก สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Vanijajiva *et al.* (2005) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการหาความสัมพันธ์ของพืชในสกุล *Boesenbergia* 11 ชนิด และสกุลใกล้เคียงคือ สกุล *Kaempferia* 6 ชนิด และสกุล *Scaphochlamys* 2 ชนิด ซึ่งทั้งหมดมาจากภาคใต้ของประเทศไทย พบว่ามีช่วงความกว้างของสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของพืชทั้ง 19 ตัวอย่าง ตั้งแต่ 0.367 ถึง 0.970 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายในสกุล *Boesenbergia* มีค่าตั้งแต่ 0.54 ถึง 0.853

นำข้อมูลที่ได้สร้าง dendrogram โดยวิธีการคำนวณแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม SHAN ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.34 สามารถแบ่งพืชทั้ง 51 ตัวอย่างออกเป็นกลุ่มได้ 8 กลุ่มใหญ่ และ 2 กลุ่มย่อย (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของพืชสกุล *Zingiber* ทั้ง 51 ตัวอย่าง จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี โดยวิธีคำนวณแบบ UPGMA

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพืชชนิดเดียว ได้แก่ ไพล (*Z. montanum*) (ภาพภาคผนวกที่ 2 ก) ซึ่งไพลสามารถแยกออกจากพืชชนิดอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน ที่ค่า bootstrab เท่ากับ 100 แสดงว่าไพลแต่ละตัวอย่างที่นำมาศึกษาสามารถจัดเข้าอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (อธิบายในหัวข้อที่ 1.2.3)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยชนิด *Zingiber* sp2 (ภาพภาคผนวกที่ 4 ข) เพียงชนิดเดียว ซึ่งแยกออกมาจากพืชชนิดอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน และมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ ไพล (*Z. montanum*) สูง มีค่า Bootstrab ที่แยกออกจากไพล เท่ากับ 58 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชชนิดนี้ เพราะมีลักษณะหลายลักษณะที่คล้ายคลึงกับไพลมาก (ปาริมาทย์, ดิตต่อส่วนตัว) มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเฉลี่ยกับไพลทุกตัวอย่าง เท่ากับ 0.338 และมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับ กะทือ หมายเลข SB37 สูงที่สุด เท่ากับ 0.385 แต่เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ยจากกะทือทุกตัวอย่าง มีค่าเท่ากับ 0.325 ซึ่งน้อยกว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนต่อไพล และมีสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับ *Z. sp1* น้อยที่สุด เท่ากับ 0.207 (ตารางภาคผนวกที่ 1)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยพืช 6 ชนิด สามารถแยกออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย

กลุ่มย่อยที่ 3A ประกอบด้วยพืช 4 ชนิด คือ *Z. officinale*, *Z. spectabile*, *Z. barbatum* (ภาพภาคผนวกที่ 2 ง) และ *Z. idae* (ภาพภาคผนวกที่ 3 ก) จากตารางภาคผนวกที่ 1 และภาพที่ 5 ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน เท่ากับ 0.348 สามารถแยก *Z. officinale* ออกจากพืชอีกสามชนิดได้ ค่า bootstrab เท่ากับ 51 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าในพืชทั้ง 4 ชนิดนี้ จึงมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพืชอีก 3 ชนิดน้อยกว่าค่าความใกล้ชิดของอีก 3 ชนิดด้วยกัน ซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ลักษณะของช่อดอก และลักษณะของละอองเรณู โดย Theilade and Maersk Moller (1991) ที่แยกออกไปอยู่ในกลุ่ม *Dymczewiczia* และผลที่ได้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Theerakulpisut *et al.* (2005) อีกด้วย และ Jatoi *et al.* (2008) รายงานการแยกพืชในสกุล *Zingiber* โดยใช้เทคนิค SSR พบว่า *Z. officinale* และ *Z. barbatum* มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน เท่ากับ 0.24 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับผลการศึกษาในครั้งนี้

ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายในชนิดเดียวกันของพืชที่มาจากต่างแหล่งกันมีค่าตั้งแต่ 0.470 ถึง 0.862 (ตารางที่ 4) โดยที่พืช หมายเลข SB85 (ภาพภาคผนวกที่ 6) มีความใกล้ชิดกับหมายเลขอื่นๆ น้อยที่สุด ซึ่งยืนยันจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เพราะว่าพืช หมายเลข SB85 มีลักษณะของเหง้าเล็กกว่าอีก 3 หมายเลข คือ หมายเลข SB39 SB68 และ SB110

(ภาพภาคผนวกที่ 5) ในทางการค้า เรียกขิง ลักษณะเหง้าเล็ก ว่า ขิงเล็กหรือขิงเผ็ด บางแห่งเรียกขิงดำ เหง้าจะเล็ก สั้น ข้อถี่ เนื้อมีสีเขียวน้ำตาล มีรสค่อนข้างเผ็ด ส่วนขิงอีก 3 ชนิด นั้นเรียกว่าขิงใหญ่ ขิงหยวก หรือขิงขาว เหง้าจะมีขนาดใหญ่และข้อห่าง เนื้อละเอียดไม่มีสีเขียวน้ำตาล รสเผ็ดน้อย (กรมวิชาการเกษตร, 2525)

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างขิง (*Z. officinale*) จากแหล่งต่างๆ

หมายเลข*	SB39	SB68	SB85	SB10
SB39	1.000			
SB68	0.862	1.000		
SB85	0.470	0.490	1.000	
SB110	0.799	0.830	0.519	1.000

* หมายเลขตามตารางที่ 1

ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของพืชในกลุ่ม 3A อีก 3 ชนิด คือ *Z. spectabile* (SB103), *Z. barbatum* (SB104) และ *Z. idae* (SB105) (ตารางที่ 5) ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง *Z. barbatum* และ *Z. idae* สูงกว่าค่าความเหมือนต่อ *Z. spectabile* ความสัมพันธ์ระหว่างพืชทั้ง 3 ชนิดนี้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยที่ลักษณะช่อดอกของ *Z. spectabile* จะเป็นช่อตั้งตรง ก้านช่อดอกจะยาวประมาณ 20 ถึง 40 เซนติเมตร ลำต้นเทียมสูง 2 ถึง 3.5 เมตร เป็นพืชขนาดใหญ่ ส่วน *Z. barbatum* เป็นพืชขนาดเล็ก มีช่อดอกตั้งตรง ก้านช่อดอกยาว 6 ถึง 9 เซนติเมตร ช่อดอกและลำต้นเทียมมีขนสีขาวปกคลุม จัดอยู่ในกลุ่ม *Cryptanthium* และ *Z. idae* จัดอยู่ในกลุ่ม *Zingiber* มีลักษณะของช่อดอกตั้งตรง มีขนปกคลุมทั่วทั้งต้น ลักษณะมีขนปกคลุมช่อดอกของ *Z. barbatum* และ *Z. idae* ทำให้พืชทั้งสองชนิดนี้มีความใกล้เคียงกันมาก แต่สามารถแยกออกจากกันได้ จากสีของ ดอก เพราะ *Z. barbatum* มีดอกสีเหลือง ส่วน *Z. idae* มีดอกสีขาว (Triboun, 2006)

ตารางที่ 5 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง *Z. spectabile* (SB103), *Z. barbatum* (SB104) และ *Z. idae* (SB105)

หมายเลข*	SB103	SB104	SB105
SB103	1.000		
Sb104	0.424	1.000	
SB105	0.421	0.445	1.000

* หมายเลขตามตารางที่ 1

กลุ่มย่อยที่ 3B ประกอบด้วย กะทือ (*Z. zerumbet*) (ภาพภาคผนวกที่ 2 ข) และ ไพลดำ (*Z. ottensii*) (ภาพภาคผนวกที่ 2 ค) ที่ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.366 สามารถแยกพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกันได้ มีค่าbootstrab เท่ากับ 59 เปอร์เซนต์ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมภายในและระหว่างชนิด(ตารางที่ 6) ผลที่ได้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา Triboun (2006) อธิบายไว้ว่า พืชทั้ง 2 ชนิดนี้ มีลักษณะของส่วนไม่สืบพันธุ์ (vegetative parts) คล้ายคลึงกันมาก และ *Z. ottensii* ยังมีส่วนสืบพันธุ์ (reproductive parts) คล้ายคลึงกับ *Z. spectabile* อีกด้วย ในการศึกษาในครั้งนี้จึงสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา นี้ เพราะสามารถจัดกลุ่มพืชอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และ Theerakulpisut *et al.* (2005) รายงานว่าเมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดี จัดกลุ่มพืชในสกุล *Zingiber* พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม ประมาณ 0.69 เมื่อพิจารณาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในระดับชนิด พบว่า *Z. zerumbet* แต่ละตัวอย่าง มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม อยู่ที่ 0.437 ถึง 0.455 และ *Z. ottensii* ทั้ง 2 หมายเลขมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.629

ตารางที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง *Z. zerumbet* (SB37 SB70 SB114) และ *Z. ottensii* (SB56 SB134)

หมายเลข*	SB37	SB70	SB114	SB56	SB134
SB37	1.000				
SB70	0.437	1.000			
SB114	0.447	0.455	1.000		
SB56	0.390	0.436	0.408	1.000	
SB134	0.343	0.401	0.403	0.629	1.000

* หมายเลขตามตารางที่ 1

กลุ่มที่ 4 และกลุ่มที่ 5 มีความใกล้ชิดกัน แยกกันที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.328 (ตารางที่ 7) ค่า bootstrab เท่ากับ 51 เปอร์เซนต์ สอดคล้องกับรายงานของ Theerakulpisut *et al.* (2005) โดยที่กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยพืช ชนิด *Z. bradleyanum* (SB107) (ภาพภาคผนวกที่ 3 ค) เพียงชนิดเดียว ซึ่งพืชชนิดนี้ทางสถาบันวิทยาจัดอยู่ในกลุ่ม Cryptanthium มีช่อดอกทอดเลื้อย มีขนาดเล็กเรียวแหลม มีรอยด่างสีขาวที่เส้นกลางใบ *Z. bradleyanum* แยกออกจากพืชในกลุ่มที่ 5 ได้อย่างชัดเจน พืชทั้ง 2 ชนิดในกลุ่มที่ 5 จัดอยู่ในกลุ่ม Zingiber คือ *Z. citriodorum* (SB115) และ *Z. parishii* (SB116) (ภาพภาคผนวกที่ 3 ข) ทั้งสองชนิดมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.381 ช่อดอกทั้ง 2 ชนิด แตงจากเหง้าใกล้ลำต้นเทียม ช่อดอกตั้งตรง และพืชทั้งสองชนิดนี้มาจากแหล่งใกล้เคียงกัน คือ จากจังหวัดตาก

ตารางที่ 7 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง *Z. bradleyanum* (SB107, *Z. citriodorum* (SB115) และ *Z. parishii* (SB116)

หมายเลข*	SB107	SB115	SB116
SB107	1.000		
SB115	0.333	1.000	
SB116	0.323	0.381	1.000

* หมายเลขตามตารางที่ 1

กลุ่มที่ 6 ถึง กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วย กลุ่มละ 1 ชนิด โดยกลุ่มที่ 6 คือ *Z. peninsulare* (SB106) มีลักษณะช่อดอกต่างจากชนิดอื่นๆ ตรงที่ช่อดอกจะทอดเลื้อย และมีก้านช่อดอกยาวประมาณ 15 เซนติเมตร มีแหล่งกระจายพันธุ์อยู่แถบภาคใต้และตะวันออกเฉียงใต้ ต่างจากชนิดอื่นที่ในการศึกษาในครั้งนี้ที่ส่วนใหญ่มาจากภาคตะวันตก ลักษณะของพืชจะเหมือนกับ *Z. newmanii* แต่มีขนาดต้นเล็กกว่า (ปราโมทย์ และคณะ, 2548; Triboun *et al.*, 2006) จากผลที่ได้ในครั้งนี้ พืชชนิดนี้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพืชตัวอย่างอื่นๆ ระหว่าง 0.216 ถึง 0.341 (ตารางภาคผนวกที่ 1) โดยที่มีความใกล้ชิดกับ ไพล (*Z. montanum*) หมายเลข SB78 สูงที่สุด ซึ่งไพล หมายเลข SB78 นี้ เป็นตัวอย่างจาก จังหวัด สงขลา และเป็นพืชในกลุ่ม *Zingiber* เหมือนกัน และมีความใกล้ชิดกับ *Zingiber* sp1 น้อยที่สุด

กลุ่มที่ 7 คือ *Z. rubens* (ภาพภาคผนวกที่ 3 ง) เป็นพืชในกลุ่ม *Cryptanthium* ช่อดอกทอดเลื้อย ก้านช่อดอกยาว แทะขึ้นจากเหง้าใกล้โคนของลำต้นเทียม มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับกะทือ (*Z. zerumbet*) หมายเลข SB114 น้อยที่สุด เท่ากับ 0.2 และมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไพล หมายเลข SB80 สูงที่สุด เท่ากับ 0.293 ซึ่งไม่ตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพราะไพลมีช่อดอกตั้งตรงและจัดอยู่ในกลุ่ม *Zingiber*

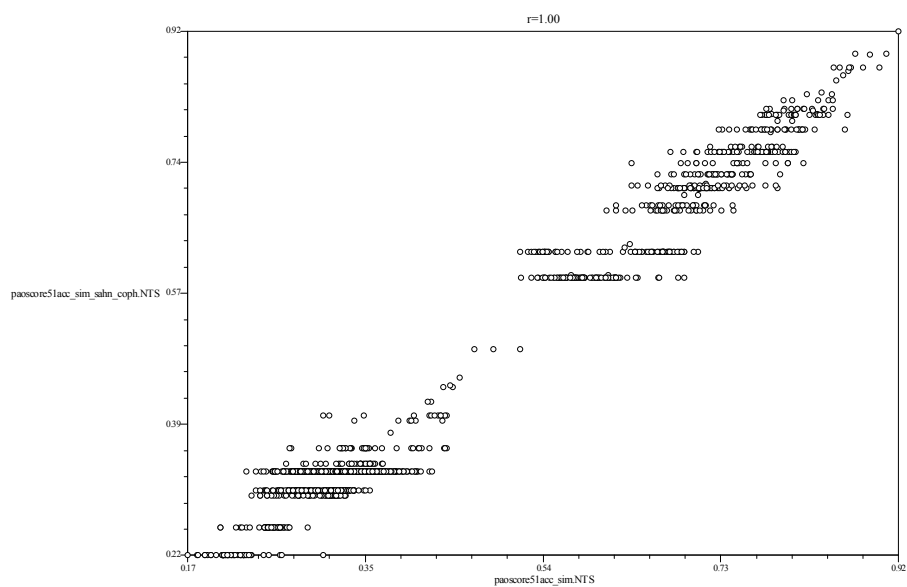
กลุ่มที่ 8 คือ *Z. sp1* (ภาพภาคผนวกที่ 4 ก) พืชชนิดนี้เป็นชนิดที่ค้นพบใหม่อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ ใช้ชื่อว่า *Z. isanensis* Triboun & Larsen (ปราโมทย์ และคณะ, 2548) เป็นพืชขนาดเล็ก พบบริเวณป่าผลัดใบทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ช่อดอกตั้งตรง ก้านช่อดอกยาว มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนต่อพืชชนิดอื่นอยู่ระหว่าง 0.165 (*Z. bradleyanum*, SB107) ถึง 0.310 (*Z. ottensii*, SB134) Triboun *et al.* (2006) รายงานว่า พืชชนิดนี้ต่างจากพืชชนิดอื่นในสกุล *Zingiber* เพราะมีลำต้นขนาดเล็กคล้ายกับพืชจำพวกหญ้า และมีกลิ่นเหมือนแมลงปีกแข็ง

จากการจัดกลุ่มข้างต้นโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ส่วนใหญ่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนั้นเทคนิคอาร์เอพีดี จึงสามารถใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Zingiber* ได้ ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชระหว่างชนิดมากกว่าภายในชนิดเดียวกัน สอดคล้องกับรายงานของ Silvestrini *et al.* (2008) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Coffea* 9 ชนิด พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างชนิดพืชมีค่ามากกว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายใน ชนิดเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ความหลากหลายภายในชนิดของ *C. canephora* และ

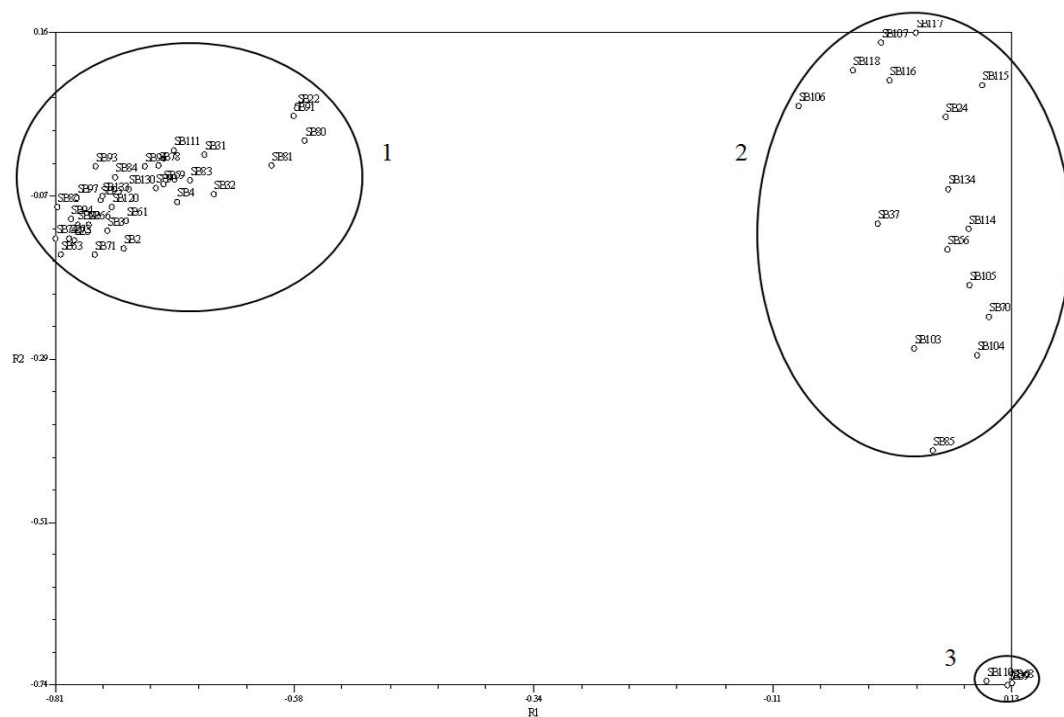
C. liberica ยังมีค่าสูง มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.414 และ 0.380 ตามลำดับ ผู้ศึกษาได้รายงานไว้ว่า เหตุที่ชนิด *C. canephora* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงเพราะว่าเป็นพืชแบบ diploid มีการผสมพันธุ์นอกกลุ่มได้ และใช้ตัวอย่างในการศึกษาจากหลายแหล่ง ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น จึงมีผลมาจากระบบการสืบพันธุ์ของพืชและแหล่งที่มาของพืช ผลที่ได้ในครั้งนี้จึงสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อน ซึ่ง Thielade และ Maersk Moller (1991) รายงานไว้ว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะระหว่างพืชสกุล *Zingiber* ในกลุ่ม *Zingiber*, *Chryphantium* และ *Dymczewiczia* มีความคาบเกี่ยวกันและบางครั้งแยกออกจากกันไม่ได้

จากการหาค่า cophenetic correlation (r) เพื่อตรวจสอบค่า goodness of fit โดยใช้โปรแกรม CPH และ MXCOMP ผลจากการจัดกลุ่มดังกล่าวได้ ค่า cophenetic correlation เท่ากับ 1 (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่า dendrogram ที่ได้แสดงการจัดกลุ่มอยู่ในเกณฑ์ดีมาก และสอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้ ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ พชรินทร์ และคณะ (2551) รายงานการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจัดกลุ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในเอเชีย ได้ค่า cophenetic correlation เท่ากับ 0.92 แสดงให้เห็นว่าเทคนิคอาร์เอพีดีสามารถจัดกลุ่มพืชที่ศึกษาได้ดี

เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มพืชในสกุล *Zingiber* ทั้ง 51 ตัวอย่าง แบบ Principal component analysis (PCA) สามารถจัดกลุ่มพืชที่ศึกษาทั้ง 51 ตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 7) กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ไพล (*Z. montanum*) ทุกหมายเลข เพียงชนิดเดียว ผลที่ได้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มแบบ UPGMA กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พืชทั้งหมด 13 ชนิด คือ *Z. zerumbet*, *Z. ottensii*, *Z. spectabile*, *Z. barbatum*, *Z. idea*, *Z. peninsulare*, *Z. bradleyanum*, *Z. citriodorum*, *Z. parishii*, *Z. rubens*, *Zingiber sp1*, *Zingiber sp2*. และ *Z. officinale* หมายเลข SB85 ในกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *Z. officinale* หมายเลข SB 39 SB68 และ SB 110 จากผลที่ได้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA เห็นได้ชัดว่า จิง (*Z. officinale*) แยกออกจากพืชชนิดอื่นได้ชัดเจน เพราะจากการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะของช่อดอกและละอองเรณู พืชชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม *Dymczewiczia* เพียงชนิดเดียว และจากการที่จิง หมายเลข SB85 แยกไปอยู่ในกลุ่มที่ 2 นั้นยืนยันได้ว่า จิง หมายเลขนี้มีระยะห่างทางพันธุกรรมต่อ จิงทั้ง 3 หมายเลขสูง



ภาพที่ 6 ค่า Cophenetic correlation (r) จากการจัดกลุ่มพืชสกุล Zingiber ทั้ง 51 ตัวอย่างโดยโปรแกรม CPH และ MXCOMP



ภาพที่ 7 การจัดกลุ่มพืชสกุล Zingiber ทั้ง 51 ตัวอย่างแบบ Principal component analysis (PCA)

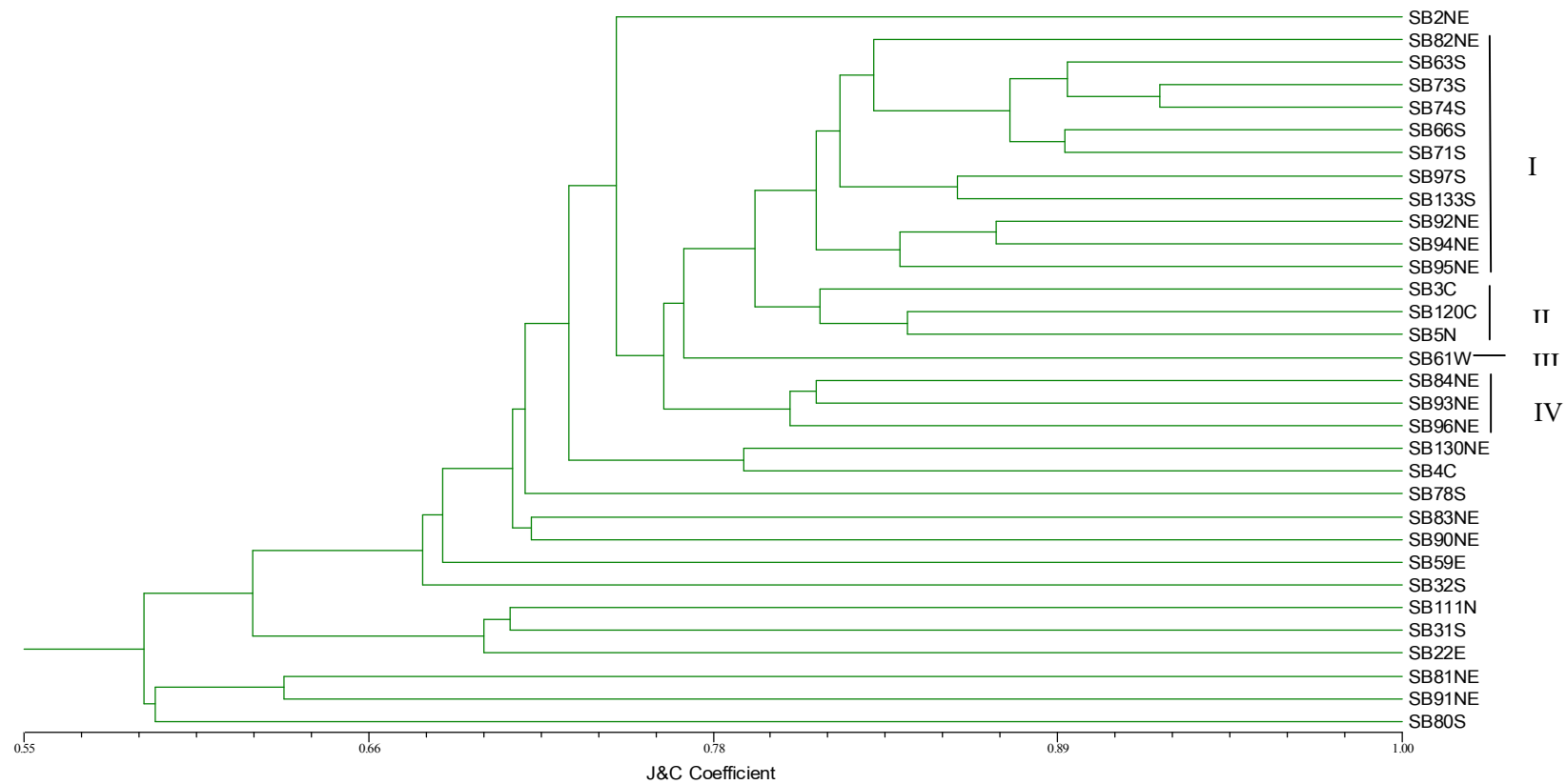
1.2.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพล (*Z. montanum*)

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพล (*Z. montanum*) ทั้ง 32 ตัวอย่าง จาก 6 แหล่ง ทั่วประเทศไทย โดยเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 28 ไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR พบว่าได้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 362 แถบ มีจำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 6 ถึง 18 แถบ เฉลี่ย 12.93 แถบ ต่อไพรเมอร์ มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band) ของแต่ละสายพันธุ์ ทั้งหมด 274 แถบ จากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด มีค่าความหลากหลายตั้งแต่ 37.50 เปอร์เซ็นต์ในไพรเมอร์ชนิด OPC12 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ในไพรเมอร์ชนิด OPC13 เฉลี่ยเป็น 73.86 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8) จากค่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอนี้แสดงว่าไพลที่ศึกษามีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดในช่วงที่กว้างผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Nayak *et al.* (2006) ที่รายงานว่าค่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอภายในชนิดของ *Curcuma longa* 17 สายพันธุ์ เมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษา อยู่ระหว่าง 33.60 ถึง 98.60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้เป็นความแตกต่างที่เกิดในระดับจีโนไทป์ (genotype)

ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Jaccard ในไพล ทั้ง 32 ตัวอย่าง พบว่าไพลที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.590 ถึง 0.920 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างไพล หมายเลข SB73 และ SB74 มีค่าสูงที่สุด ค่าที่ได้สอดคล้องกับแหล่งที่มาของไพล เพราะไพล หมายเลข SB73 และ SB74 มาจากแหล่งภาคใต้เหมือนกัน แสดงว่าแหล่งที่มาของพืชมีผลต่อค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืช อาจเนื่องมาจากไพลส่วนใหญ่ปลูกโดยการแยกเหง้า ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ทำให้มีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่สูงกว่าพืชที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไพลมีความไม่แน่นอนของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศอีกด้วย และค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างไพลหมายเลข SB2 และ หมายเลข SB31 มีค่าน้อยที่สุด (ตารางภาคผนวกที่ 1) พืชที่มีการขยายพันธุ์แบบนี้ส่วนใหญ่เกิดความแตกต่างทางพันธุกรรมได้เนื่องจากเกิดการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของแหล่งปลูก ผลที่ได้ค่อนข้างแตกต่างจากการศึกษาของ Manochai (2007b) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพลจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทยโดยเทคนิค AFLP พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.72 ถึง 0.97 จากการจัดกลุ่มไพล ทั้ง 32 ตัวอย่างโดยวิธี UPGMA พบว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.810 สามารถแบ่งกลุ่มของไพล ได้เป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 8 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่าง (polymorphic) ของไฟล (Z. montanum) จากแหล่งต่างๆ

ชนิดไฟรเมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิด ความแตกต่าง	เปอร์เซ็นต์ ความแตกต่าง	ชนิดไฟรเมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิด ความแตกต่าง	เปอร์เซ็นต์ ความแตกต่าง
OPC6	6	4	66.67	OPD13	12	10	83.83
OPC7	11	8	72.73	OPR2	15	13	86.67
OPC8	14	6	42.86	OPR5	17	15	88.24
OPC9	8	4	50.00	OPR9	14	13	92.86
OPC10	13	12	92.31	OPR10	14	13	92.86
OPC12	8	3	37.50	OPR16	8	7	87.50
OPC13	15	15	100	OPT13	11	10	90.91
OPC14	18	16	88.89	OPT14	15	13	86.67
OPD1	6	4	66.67	OPT15	13	6	46.15
OPD2	11	7	63.64	OPT16	17	8	47.06
OPD3	14	10	71.43	OPT17	15	10	66.67
OPD6	15	13	86.67	OPT18	17	16	94.12
OPD8	11	5	45.45	OPT19	15	13	86.67
OPD11	12	8	66.67	OPT20	14	10	71.43
เฉลี่ย					12.93	9.79	73.86



ภาพที่ 8 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของไพล (*Z. montanum*) ทั้ง 32 ตัวอย่าง จากการใช้เทคนิค RAPD โดยวิธีคำนวณแบบ UPGMA; NE, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ; S, ภาคใต้; C, ภาคกลาง; W, ภาคตะวันตก; E, ภาคตะวันออก และ N, ภาคเหนือ

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างไฟลที่มาจากแหล่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ สามารถแบ่งออกได้อีกเป็น 3 กลุ่มย่อย ดังนี้

กลุ่มย่อยที่ 1A ประกอบด้วยหมายเลข SB82 จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและตัวอย่างที่มาจากภาคใต้อีก 5 ตัวอย่างคือ SB63 SB66 SB71 SB73 และ SB74 โดยที่หมายเลข SB82 แยกออกมาจากอีก 5 ตัวอย่าง ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน เท่ากับ 0.828 (ตารางที่ 9) ไฟลจากภาคใต้ทั้ง 5 หมายเลข มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันสูง โดยหมายเลข SB73 มีความใกล้ชิดกับหมายเลข SB74 ที่ 0.921 ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมที่สูงที่สุด

ตารางที่ 9 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างไฟล (*Z. montanum*) หมายเลข SB82 SB63 SB66 SB71 SB73 และ SB74

หมายเลข*	SB82	SB63	SB66	SB71	SB73	SB74
SB82	1.000					
SB63	0.846	1.000				
SB66	0.807	0.852	1.000			
SB71	0.798	0.870	0.890	1.000		
SB73	0.835	0.874	0.900	0.883	1.000	
SB74	0.851	0.907	0.868	0.858	0.921	1.000

* หมายเลขตามตารางที่ 1

กลุ่มย่อยที่ 1B ประกอบด้วย 2 ตัวอย่าง คือ SB97 และ SB133 มาจากภาคใต้ทั้ง 2 ตัวอย่าง มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน เท่ากับ 0.855 (ตารางภาคผนวกที่ 1)

กลุ่มย่อยที่ 1C ประกอบด้วย 3 ตัวอย่าง คือ SB92 SB94 และ SB95 มาจากจังหวัดมุกดาหาร ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทั้ง 3 ตัวอย่าง มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเฉลี่ย เท่ากับ 0.848 (ตารางภาคผนวกที่ 1)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 3 ตัวอย่าง คือ SB3 SB120 และ SB5 โดยที่ SB3 และ SB120 มาจากภาคกลาง ส่วน SB5 มาจากภาคเหนือ โดยที่ SB3 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเฉลี่ย ต่อ SB120 และ SB5 เท่ากับ 0.810 (ตารางภาคผนวกที่ 1)

กลุ่มที่ 3 มีเพียง SB 61 จากภาคตะวันตก เพียงตัวอย่างเดียว มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเฉลี่ย ต่อไฟลตัวอย่างอื่นๆ เฉลี่ย เท่ากับ 0.714 (ตารางภาคผนวกที่ 1)

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย 3 ตัวอย่าง คือ SB84 SB93 และ SB96 โดยที่ ทั้ง 3 ตัวอย่างมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเฉลี่ย เท่ากับ 0.803 (ตารางภาคผนวกที่ 1)

ส่วนไฟลตัวอย่างอื่นๆ ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ ส่วนใหญ่จะแยกออกเป็นหมายเลขเดียว ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงให้เห็นว่าตัวอย่างไฟลที่มาจากภาคเดียวกัน มีบางส่วนที่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ แสดงว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชค่อนข้างมีความสัมพันธ์กับการกระจายพันธุ์ทางด้านภูมิศาสตร์ (Mamuris *et al.*, 1998) และจากผลที่ได้เห็นได้ชัดว่าไฟลจากภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมต่อกันสูง ต่างจาก Manochai (2007b) ที่รายงานว่าไฟลจากภาคใต้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับตัวอย่างจากภาคกลางสูงที่สุด ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางโมเลกุล (Molecular variance, AMOVA) คำนวณโดยโปรแกรม GENALEX 6 ร่วมด้วย พบว่าเมื่อพิจารณาตัวอย่างไฟลภายในภาคเดียวกันได้ค่า Molecular variance เท่ากับ 87 เปอร์เซนต์ ซึ่งให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายพันธุ์หรือมีการนำพืชจากแหล่งอื่นมาปลูกในพื้นที่เดียวกัน และค่า Molecular variance ระหว่างทั้ง 6 ภาค มีค่าเท่ากับ 13 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 10) ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Jatoti *et al.* (2008) ที่รายงานว่า เมื่อหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชิง (*Z. officinale*) จากแหล่งต่างกันในประเทศพม่า พบว่าค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในแหล่งที่มาเดียวกันสูงกว่าระหว่างแหล่งที่มาของชิง

ตารางที่ 10 ค่าความแปรปรวนทางโมเลกุล (Molecular variance, AMOVA) ของไฟล
(*Z. montanum*) ภายในและระหว่างแหล่งที่มา

ภาค	df	Estimate Variances	% of molecular variance	F- value	P- value
ระหว่างภาค	5	7.22	13%	1.35	0.02
ภายในภาค	27	46.34	87%		
รวม	32				

การทดลองที่ 2 การหาชนิดสารสำคัญในไพล

2.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไพล

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชโดยวิธีไมโครเวฟ (Microwave extraction, ME) และวิธีไมโครเวฟร่วมกับการกลั่นแห้ง (Solvent free microwave extraction, SFME) เริ่มมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งในระดับห้องทดลองและระดับอุตสาหกรรม เพราะว่ามีระบบในการสกัดตัวอย่างที่ดี สามารถสกัดจากตัวอย่างพืชโดยตรงไม่จำเป็นต้องใช้น้ำหรือตัวทำละลายอื่นๆ โดยอาศัยน้ำภายในเนื้อเยื่อของพืช และมีระบบการให้ความร้อนที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและคงที่ภายในบริเวณที่กำหนด ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพดี (Ramanadhan, 2005) และใช้เวลาในการสกัดน้อยเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ (Lucchesi *et al.*, 2004) สำหรับผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไพลในครั้งนี้ เมื่อใช้ไพลสด 100 กรัม ปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า ใส่ในหม้อกลั่นขนาด 1 ลิตร ใช้น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตรเป็นตัวทำละลาย สกัดโดยวิธีไมโครเวฟ พบว่าใช้เวลาโดยเฉลี่ย 8 นาที ทำใหตัวอย่างสกัดออกมาเป็นหยดน้ำหยดแรก หลังจากนั้นสกัดต่อเนื่องเป็นเวลา 60 นาที ได้น้ำมันหอมระเหยไม่มีสีถึงสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นค่อนข้างจืด ไม่มีกลิ่นไหม้ปะปน ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้ (ตารางที่ 13) ไพลตัวอย่างจากภาคตะวันตก หมายเลข SB58 จากจังหวัดกาญจนบุรี มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยสูงที่สุด เท่ากับ 2.1 เปอร์เซ็นต์ และไพลจากภาคใต้หมายเลข SB71 SB73 SB74 มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยน้อยที่สุด เท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ค่าที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของรุ่งฤดี (2550) กล่าวว่า การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไพลโดยวิธีไมโครเวฟ เมื่อทดสอบเปรียบเทียบกับ การสกัดโดยวิธีอื่นๆ คือ การกลั่นด้วยไอน้ำ (hydro distillation) และวิธีไมโครเวฟร่วมกับการใช้เครื่องอัลตราโซนิกช่วยสกัด (ultrasonic-assisted microwave extraction) ที่ความดันบรรยากาศ และใช้เวลา 40 นาที การสกัดโดยวิธีไมโครเวฟได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด เท่ากับ 1.0374 เปอร์เซ็นต์ และเวลาในการสกัดที่ 40 50 และ 60 นาที ได้ปริมาณน้ำมันไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีไมโครเวฟ ทำให้ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงและใช้เวลาในการสกัดน้อย ทำให้สามารถสกัดได้ปริมาณมากขึ้น

จากตารางที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยของไพล ภาคต่างๆ พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยของไพลจากทั้ง 6 ภาคของประเทศไทยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.5$) โดยที่ปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากภาคตะวันตกมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 1.107 ± 0.806 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ยของภาคตะวันออกมีค่าน้อยที่สุด เท่ากับ 0.495 ± 0.431 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้นี้มีค่าใกล้เคียงกับ Manochai *et al.* (2007) รายงานว่าไพลที่ปลูกที่จังหวัด

นครปฐม และเก็บเกี่ยวที่อายุ 8 เดือนมีปริมาณน้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 6.32 มิลลิกรัมต่อกรัม และไพลอายุ 16 เดือนให้ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยสูงที่สุด จะเห็นว่าเมื่อเทียบปริมาณในหน่วยเดียวกันไพลจากภาคกลางในการศึกษาในครั้งนี้ที่มีปริมาณน้ำมันหอม เท่ากับ 0.574 ± 0.193 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามค่าที่ได้นี้น้อยกว่ารายงานของ วิเชียร (2545) รายงานว่า ไพลที่อายุ 18 เดือน ปลุกที่จังหวัดขอนแก่น มีปริมาณน้ำมันหอมระเหย 3.49 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า ความหลากหลายของปริมาณน้ำมันหอมระเหยในพืชขึ้นอยู่กับอายุพืชและแหล่งที่ปลูก เหตุที่อายุ ของเหง้าไพลมีผลต่อปริมาณน้ำมันหอมระเหยเพราะว่าไพลมีช่วงการพักตัว ในช่วงอายุการปลูกฤดู แรก หรือประมาณ 8 เดือนหลังปลูก อยู่ในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคม โดยที่ไพลเริ่ม สะสมอาหารและน้ำมันหอมระเหยไว้ในเหง้าก่อนที่ส่วนเหนือดินจะเหี่ยวและยุบลง ทำให้เหง้าไพล ในช่วงนี้มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงกว่าช่วงก่อนหน้าที่จะพักตัว และเมื่อถึงฤดูปลูกที่สอง ไพล เริ่มมีการสะสมอาหารต่ออีก ทำให้ไพลในช่วงฤดูปลูกที่สองมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงกว่าฤดู ปลูกแรก รูปแบบการเจริญและการพักตัวของไพลแบบนี้เหมือนกับ ขมิ้น (*Curcuma longa* L.) (Mathai, 1978)

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เมื่อนำไพลจากต่างแหล่งมาปลูกที่เดียวกัน พบว่าปริมาณ น้ำมันหอมระเหยที่ได้แตกต่างกัน ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาที่มีมาก่อน เช่น Garg *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายของปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้น (*Curcuma longa* L.) 27 ตัวอย่าง ที่ นำมาปลูกในสภาพภูมิอากาศเดียวกันทางภาคเหนือของอินเดีย ในเมือง Lucknow พบว่าปริมาณ น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าขมิ้นมีความแตกต่างกัน สามารถจัดกลุ่มขมิ้นที่ศึกษาออกได้เป็น 2 กลุ่ม และ Singh *et al.* (2008) รายงานว่าเมื่อนำพืชชนิด *Dracocephalum heterophyllum* Benth. จาก แหล่งเดิมในป่า 3 แหล่ง มาปลูกในสภาพโรงเรือน แล้วศึกษาปริมาณน้ำมันหอมระเหย พบว่าพืช จากทั้ง 3 แหล่งยังแสดงความแตกต่างของปริมาณน้ำมันหอมระเหยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Gil *et al.* (2007) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิด ของ *Aloysia citriodora* โดยใช้ลักษณะของปริมาณน้ำมันหอมระเหย พบว่าปริมาณของน้ำมันหอม ระเหยที่ได้จากพืชแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สามารถคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงไว้เพื่อการทดสอบปลูกเป็นพันธุ์ทางการค้าต่อไป และ Gil *et al.* (2000) ศึกษาในดาวเรืองเล็ก (*Tagetes minuta*) ที่นำมาจากป่าในประเทศอาร์เจนตินา 6 ตัวอย่าง แล้วนำมา ปลูกในแหล่งเดียวกัน พบว่าสภาพแวดล้อมมีผลต่อปริมาณของน้ำมันหอมระเหยน้อยกว่าการมีผล ต่อชีวมวล และยังพบว่าปริมาณของน้ำมันหอมระเหยจากทั้ง 6 ตัวอย่าง มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ จากผลที่ได้และจากรายงานเบื้องต้นนี้ชี้ให้เห็นว่าไพลที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มี ความหลากหลายทางพันธุกรรมเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำมันหอมระเหย และสอดคล้องกับผลของ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพลจากเทคนิคอาร์เอพีดี ที่ได้กล่าวไว้แล้ว สามารถนำผลที่ได้มาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ของไพลเพื่อใช้ในการปลูกเพื่อการค้าต่อไปได้

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากไพล (*Z. montanum*) ทั้ง 34 ตัวอย่าง

ภาค	หมายเลข	น้ำมันหอมระเหย (%v /w)	ภาค	หมายเลข	น้ำมันหอมระเหย (%v /w)
ตะวันออก	SB2	0.643 ^{c-j} ± 0.218	ตะวันออก	SB22	0.800 ^{g-k} ± 000
เฉียงเหนือ	SB81	0.565 ^{c-i} ± 0.191		SB59	0.190 ^{abc} ± 000
	SB83	0.600 ^{d-j} ± 000	ใต้	SB31	0.550 ^{b-i} ± 000
	SB84	0.250 ^{a-d} ± 000		SB32	0.850 ^{h-k} ± 000
	SB90	0.520 ^{b-i} ± 0.036		SB63	0.617 ^{d-j} ± 0.153
	SB91	0.960 ^{jk} ± 0.198		SB66	0.873 ^{ijk} ± 0.110
	SB92	0.615 ^{d-j} ± 0.375		SB71	0.100 ^a ± 000
	SB93	0.830 ^{g-k} ± 0.128		SB73	0.100 ^a ± 000
	SB94	0.525 ^{b-i} ± 0.106		SB74	0.100 ^a ± 000
	SB95	0.675 ^{e-j} ± 0.247		SB78	0.400 ^{a-f} ± 000
	SB96	0.550 ^{b-i} ± 0.180		SB80	0.765 ^{f-k} ± 0.163
	SB130	0.600 ^{d-j} ± 0.354		SB97	0.457 ^{a-g} ± 0.110
กลาง	SB3	0.520 ^{b-i} ± 0.226		SB133	0.480 ^{b-h} ± 000
	SB4	0.600 ^{d-j} ± 0.311	ตะวันตก	SB58	2.100 ^m ± 000
	SB120	0.660 ^{e-j} ± 0.144		SB61	1.075 ^k ± 0.318
	SB141	0.370 ^{a-e} ± 000		SB129	0.180 ^{ab} ± 000
เหนือ	SB5	0.523 ^{b-i} ± 0.204			
	SB111	1.650 ^l ± 0.212			
F-test		*			

*ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์น้ำมันหอมระเหยเฉลี่ยของไพล (*Z. montanum*) จากทั้ง 6 ภาคของประเทศไทย

ภาค (จำนวนตัวอย่าง)	น้ำมันหอมระเหย (%v/w)
ตะวันออกเฉียงเหนือ (12)	$0.638^{ab} \pm 0.217$
กลาง (4)	$0.574^{ab} \pm 0.193$
เหนือ (2)	$0.974^{bc} \pm 0.643$
ตะวันออก 2)	$0.495^a \pm 0.431$
ใต้ (11)	$0.579^{ab} \pm 0.259$
ตะวันตก (3)	$1.107^c \pm 0.806$
F - test	*
CV	53.98%

*ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มี ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.2 การวิเคราะห์ชนิดของสารสำคัญในน้ำมันหอมระเหยจากไพล

รูป chromatogram แสดงองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของไพลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-2010 Gas chromatograph แสดงในภาพที่ 9 ชนิดและปริมาณองค์ประกอบทางเคมี ในน้ำมันหอมระเหย (แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์) ของไพลเฉลี่ยแต่ละภาค แสดงในตารางที่ 13 ผลที่ได้พบองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของไพลอย่างน้อยที่สุด 15 ชนิด (ตารางที่ 13) พบจำนวนชนิด น้อยกว่าจากรายงานของฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ รุ่งฤดี (2550) ที่รายงานว่าองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากไพลมีประมาณ 24 ชนิด (ภาพภาคผนวกที่ 1, ตารางภาคผนวกที่ 2) องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารจำพวก monoterpene มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{10}H_{16}$, $C_{10}H_{14}$ และ $C_{10}H_{18}O$ เปอร์เซ็นต์ของปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหย คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟของ chromatogram พบว่าองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของไพลมี 3 ชนิด คือ sabinene, terpinen-4-ol และ DMPBD ((*E*)-1(3', 4'-dimethylphenyl) butadiene) อย่างไรก็ตามปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยในไพลจากต่างแหล่งกันมีปริมาณไม่แตกต่างกัน

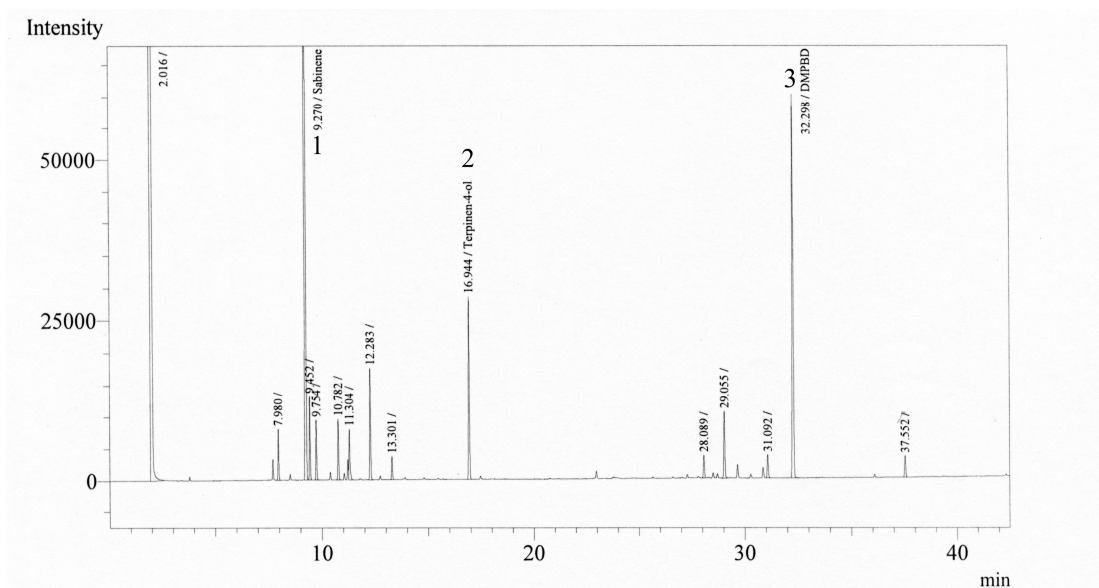
จากตารางที่ 14 และ 15 ปริมาณขององค์ประกอบหลักทั้ง 3 ชนิดในน้ำมันหอมระเหยของไพลมีเปอร์เซ็นต์สูง แต่มีช่วงของความต่างในแต่ละตัวอย่างค่อนข้างแคบ และมี 3 ตัวอย่างที่ไม่สามารถหาปริมาณขององค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยได้ คือ หมายเลข SB71 SB73 และ SB74

สำหรับปริมาณของ sabinene พบว่าไพลจากภาคตะวันตกมีปริมาณสูงที่สุด เฉลี่ยเท่ากับ 47.54 ± 11.82 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ไพลหมายเลข SB61 จากจังหวัดราชบุรี มีปริมาณของ sabinene สูงที่สุด เท่ากับ 59.77 ± 5.81 เปอร์เซ็นต์ และไพลตัวอย่างจากภาคเหนือมีปริมาณ sabinene น้อยที่สุด เฉลี่ยเท่ากับ 33.99 ± 2.77 เปอร์เซ็นต์ แต่ไพลหมายเลข SB133 จากจังหวัดนราธิวาสซึ่งเป็นตัวอย่างจากภาคใต้มีปริมาณของ sabinene น้อยที่สุด เท่ากับ 29.14 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของ sabinene จากไพลที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ส่วนใหญ่มีค่าอยู่ในช่วงเดียวกับปริมาณของ sabinene จากมาตรฐานน้ำมันไพลของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ตามรายงานของ รุ่งฤดี (2550) (ภาพภาคผนวกที่ 2) มีไพล 5 ตัวอย่างที่มีปริมาณของ sabinene สูงกว่าค่ามาตรฐาน คือ หมายเลข SB81 SB93 SB32 SB58 และ SB61 มีปริมาณ เท่ากับ 49.10, 50.32, 59.70, 58.17 และ 59.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไพลจากภาคตะวันตกทั้ง 3 ตัวอย่างที่ศึกษาแสดงค่าของ sabinene สูงกว่าค่ามาตรฐาน (ตารางที่ 15)

จากตารางที่ 15 ปริมาณของ terpinene-4-ol ในน้ำมันหอมระเหยของไพลหมายเลข SB111 จากจังหวัดแม่ฮ่องสอนมีปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 35.21 ± 8.61 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ไพลหมายเลข SB95 และ SB96 จากจังหวัดมุกดาหาร มีปริมาณ เท่ากับ 32.89 ± 2.31 และ 31.16 ± 0.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไพลหมายเลข SB32 จากจังหวัดสงขลา มีปริมาณของ terpinene-4-ol น้อยที่สุด เท่ากับ 6.66 เปอร์เซ็นต์ จากผลในตารางที่ 15 พบว่าไพลจากภาคเหนือมีปริมาณ terpinene-4-ol เฉลี่ยสูงที่สุด เท่ากับ 24.36 ± 4.90 เปอร์เซ็นต์ และไพลจากภาคตะวันออกมีปริมาณเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 11.50 ± 2.45 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามปริมาณของ terpinene-4-ol เฉลี่ยของแต่ละภาคไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่าที่ได้นี้ ส่วนใหญ่มีค่าน้อยกว่าปริมาณมาตรฐานน้ำมันไพล ตามภาพภาคผนวกที่ 2 และส่วนใหญ่มีค่าน้อยกว่าปริมาณ terpinene-4-ol ที่ได้จากน้ำมันหอมระเหยของไพลที่กลั่นโดยวิธีไมโครเวฟ ตามรายงานของ รุ่งฤดี (2550) ที่รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากไพลมีปริมาณของ terpinene-4-ol เท่ากับ 33.34 เปอร์เซ็นต์ แต่มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Manochai *et al.* (2007) ที่รายงานว่าไพลอายุ 8 เดือน มีปริมาณของ terpinene-4-ol เท่ากับ 17.25 เปอร์เซ็นต์ และไพลที่อายุต่างกันมีปริมาณของ terpinene-4-ol ไม่แตกต่างกัน นั่นแสดงว่าปริมาณของ terpinene-4-ol ในน้ำมันหอมระเหยของไพลไม่ขึ้นกับอายุของไพล แต่ปริมาณที่ต่างกันอาจขึ้นอยู่กับชนิดของท่อน

พันธุ์ ซึ่งสารชนิด terpinen-4-ol ในไพลมีรายงานว่า มีฤทธิ์ต้านอาการอักเสบ (anti-inflammatory) (ธนาพร และ อรพินท์, 2547) ดังนั้นจึงใช้ปริมาณของ terpinen-4-ol เป็นเกณฑ์กำหนดมาตรฐานของน้ำมันไพล จึงสามารถคัดเลือกใช้ตัวอย่างไพลที่ให้ปริมาณของ terpinen-4-ol สูงในการนำมาขยายพันธุ์เพื่อการค้าต่อไปได้

ปริมาณของ DMPBD ในน้ำมันหอมระเหยของไพลมีค่าอยู่ระหว่าง 10.02 เปอร์เซ็นต์ ในไพลหมายเลข SB111 ถึง 44.22 เปอร์เซ็นต์ ในไพลหมายเลข SB129 ค่าปริมาณ DMPBD ในน้ำมันหอมระเหยของไพลจากภาคต่างๆมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยที่ไพลจากภาคตะวันออกมีค่าเฉลี่ย สูงที่สุด รองลงมาเป็นไพลจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้ ภาคตะวันตก และภาคกลางมีปริมาณน้อยที่สุด เท่ากับ 27.54 ± 5.24 , 21.49 ± 4.72 , 21.24 ± 1.50 , 20.40 ± 1.52 , 19.66 ± 8.21 และ 18.52 ± 2.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่าที่ได้สูงกว่าค่ามาตรฐานน้ำมันไพลของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (วว.) ที่รายงานว่ามีปริมาณของ DMPBD มาตรฐาน อยู่ในช่วง 0.50 ถึง 5.88 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ไม่รายงานค่ามาตรฐานของ DMPBD ผลที่ได้นี้ยังสูงกว่ารายงานของ วิเชียร (2545) แต่มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Manochai *et al.* (2007) สาร DMPBD มีฤทธิ์คล้ายกับ terpinen-4-ol คือ ด้านอาการอักเสบของกล้ามเนื้อ Jeenapongsa *et al.* (2003) รายงานว่าสารชนิดนี้สามารถลดอาการบวมของอุ้งเท้าหนูได้ แต่อย่างไรก็ตามสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกำหนดค่ามาตรฐานของ DMPBD ไว้ไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้เป็นอันตรายเนื่องจากเป็นสารก่อกลายพันธุ์ได้ (วิเชียร, 2545)



ภาพที่ 9 Chromatogram แสดงองค์ประกอบทางเคมีของไฟลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Gas chromatography ของไฟลหมายเลข SB22

1 หมายถึง sabinene

2 หมายถึง terpinen-4-ol

3 หมายถึง DMPBD ((E)-1(3', 4'-dimethylphenyl) butadiene)

ตารางที่ 13 ชนิดและปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของไพล (*Z. montanum*) เฉลี่ยแต่ละภาคของประเทศไทย

ชนิดองค์ประกอบทางเคมี	สูตร โมเลกุล	พื้นที่ใต้กราฟ (%)					
		ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ภาคกลาง	ภาคเหนือ	ภาคตะวันออก	ภาคใต้	ภาคตะวันตก
α -thujene	C ₁₀ H ₁₆	0.72 ± 0.04	0.89 ± 0.14	0.53 ± 0.53	tr	0.75 ± 0.03	0.39 ± 0.39
α -pinene	C ₁₀ H ₁₆	1.11 ± 0.05	1.18 ± 0.06	1.13 ± 0.17	0.78 ± 0.78	0.94 ± 0.04	1.37 ± 0.08
sabinene	C ₁₀ H ₁₆	38.52 ± 2.20	42.17 ± 4.44	33.99 ± 2.77	38.20 ± 9.99	36.25 ± 2.80	47.54 ± 11.82
β -mycrene	C ₁₀ H ₁₆	2.23 ± 0.08	2.46 ± 0.13	2.20 ± 0.20	1.76 ± 0.46	2.12 ± 0.06	2.21 ± 0.55
α -terpinene	C ₁₀ H ₁₆	1.53 ± 0.05	1.70 ± 0.05	1.47 ± 0.09	1.31 ± 0.32	1.46 ± 0.04	1.52 ± 0.31
ρ -cymene	C ₁₀ H ₁₄	2.49 ± 0.19	2.88 ± 0.43	2.59 ± 0.51	1.32 ± 0.35	2.51 ± 0.23	2.01 ± 0.14
β -phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	1.10 ± 0.12	1.15 ± 0.18	1.36 ± 0.37	tr	1.19 ± 0.23	tr
γ -terpinene	C ₁₀ H ₁₆	1.46 ± 0.15	1.15 ± 0.06	1.34 ± 0.36	1.55 ± 0.38	1.38 ± 0.20	0.85 ± 0.02
sabinene hydrate	C ₁₀ H ₁₈ O	5.22 ± 0.39	5.81 ± 0.86	5.55 ± 0.93	2.70 ± 0.55	5.39 ± 0.52	4.57 ± 0.80
terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	1.11 ± 0.07	1.34 ± 0.12	1.12 ± 0.17	0.41 ± 0.41	1.89 ± 0.76	0.98 ± 0.20
terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	19.98 ± 1.74	17.76 ± 2.30	24.36 ± 4.90	11.50 ± 2.45	22.03 ± 2.83	15.54 ± 3.28
terpinyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	2.00 ± 0.57	1.72 ± 0.50	1.74 ± 0.84	2.93 ± 1.19	2.78 ± 0.81	1.62 ± 0.90
β -sesquiphellandrene	C ₁₅ H ₂₄	1.18 ± 0.41	1.03 ± 0.30	1.26 ± 0.19	1.45 ± 0.54	1.13 ± 0.23	1.48 ± 0.60
DMPBD	-	21.24 ± 1.50	18.52 ± 2.49	21.49 ± 4.72	27.54 ± 5.24	20.40 ± 1.52	19.66 ± 8.21
Unknown	-	1.12 ± 0.42	1.189 ± 0.67	2.18 ± 0.94	1.34 ± 0.52	1.51 ± 0.62	1.99 ± 1.63
orther	-	2.87 ± 1.78	1.32 ± 0.72	tr	8.02 ± 6.03	3.55 ± 2.32	tr

tr หมายถึง มีปริมาณน้อยมากไม่สามารถตรวจหาค่าได้

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ terpinen-4-ol, DMPBD และ sabinene จากน้ำมันหอมระเหยของไพลของทั้ง 34 ตัวอย่าง

ภาค	หมายเลข	พื้นที่ใต้กราฟ(%)		
		terpinen-4-ol	DMPBD	sabinene
ตะวันออกเฉียงเหนือ	SB2	9.93 ± 7.18	21.04 ± 7.73	52.07 ± 11.30
	SB81	12.12 ± 5.95	18.93 ± 5.16	49.10 ± 5.85
	SB83	10.94 ± 0.00	22.05 ± 0.00	37.65 ± 0.00
	SB84	17.81 ± 0.00	28.14 ± 0.00	33.76 ± 0.00
	SB90	17.26 ± 3.81	37.05 ± 1.51	29.40 ± 5.51
	SB91	25.77 ± 6.88	12.83 ± 0.84	36.47 ± 5.62
	SB92	25.91 ± 16.13	17.83 ± 2.12	34.45 ± 10.79
	SB93	16.05 ± 3.44	17.03 ± 4.27	50.32 ± 5.50
	SB94	21.23 ± 2.35	20.60 ± 6.08	37.41 ± 0.47
	SB95	32.89 ± 2.31	13.40 ± 3.75	24.86 ± 2.25
	SB96	31.16 ± 0.93	22.27 ± 8.39	25.23 ± 6.23
	SB130	18.82 ± 8.41	22.67 ± 3.59	41.95 ± 13.41
กลาง	SB3	14.49 ± 6.52	17.44 ± 4.08	45.64 ± 13.59
	SB4	10.89 ± 1.81	27.40 ± 7.18	47.09 ± 9.91
	SB120	21.19 ± 0.49	13.72 ± 4.94	42.33 ± 2.10
	SB141	27.74 ± 0.00	17.36 ± 0.00	24.89 ± 0.00
เหนือ	SB5	17.13 ± 2.55	29.13 ± 0.83	35.74 ± 6.87
	SB111	35.21 ± 8.61	10.02 ± 2.52	31.37 ± 6.00
ตะวันออก	SB22	9.61 ± 3.83	25.53 ± 11.85	46.71 ± 12.77
	SB59	15.27 ± 0.00	31.56 ± 0.00	21.17 ± 0.00
ใต้	SB31	11.69 ± 0.00	27.38 ± 0.00	40.57 ± 0.00
	SB32	6.66 ± 0.00	15.67 ± 0.00	59.70 ± 0.00
	SB63	35.00 ± 9.78	14.51 ± 3.68	28.52 ± 8.31
	SB66	17.17 ± 1.24	20.43 ± 6.11	43.06 ± 3.62
	SB71	0	0	0

ตารางที่ 14 (ต่อ)

ภาค	หมายเลข	พื้นที่ใต้กราฟ(%)		
		terpinen-4-ol	DMPBD	sabinene
ใต้	SB73	0	0	0
	SB74	0	0	0
	SB78	10.21 ± 0.00	30.23 ± 0.00	32.60 ± 0.00
	SB80	18.69 ± 0.00	24.97 ± 0.00	38.82 ± 0.00
	SB97	25.86 ± 8.09	21.35 ± 3.05	30.63 ± 10.26
	SB133	27.09 ± 0.00	18.51 ± 0.00	29.14 ± 0.00
ตะวันตก	SB58	15.50 ± 0.00	12.47 ± 0.00	58.17 ± 0.00
	SB61	11.42 ± 5.20	10.97 ± 1.94	59.77 ± 5.81
	SB129	23.82 ± 0.00	44.22 ± 0.00	12.47 ± 0.00

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ terpinen-4-ol, DMPBD และ sabinene จากน้ำมันหอมระเหยของไพลของทั้ง 6 ภาค ของประเทศไทย

ภาค (จำนวนตัวอย่าง)	พื้นที่ใต้กราฟ(%)		
	terpinen-4-ol	DMPBD	sabinene
ตะวันออกเฉียงเหนือ (12)	19.98 ± 1.74	21.24 ± 1.50	38.52 ± 2.20
กลาง (4)	17.76 ± 2.30	18.52 ± 2.49	42.17 ± 4.44
เหนือ (2)	24.36 ± 4.90	21.49 ± 4.72	33.99 ± 2.77
ตะวันออก (2)	11.50 ± 2.45	27.54 ± 5.24	38.20 ± 9.99
ใต้ (11)	22.03 ± 2.83	20.40 ± 1.52	36.25 ± 2.80
ตะวันตก (3)	15.54 ± 3.28	19.66 ± 8.21	47.54 ± 11.82
F-test	ns	ns	ns
CV	46.16%	38.87%	30.82%

การทดลองที่ 3 การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไพล

1.3 การเตรียมสารสกัดจากตัวอย่างพืช

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ใช้สารสกัดไพลปริมาณ 200 มิลลิกรัม ต่อ 95% เอทานอล 1 มิลลิลิตร แล้วเจือจางสารสกัดที่ได้ด้วย 95% เอทานอล ขนาด 1 2 3 และ 4 เท่า ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็นไปตามกราฟมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ ที่ความเข้มข้นเจือจาง 3 เท่า

3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH มีการใช้อย่างแพร่หลายทั้งในสารสกัดจากพืช และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (Molyneux, 2004) เพราะเป็นวิธีที่ค่อนข้างคงที่ ไม่ยุ่งยาก และสามารถทดสอบได้อย่างรวดเร็ว (Brand-William *et al.*, 1995; Villa-no *et al.*, 2007) การทำปฏิกิริยาของวิธี DPPH คือ ถ้าสารสกัดที่ต้องการทดสอบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะเปลี่ยนสีของสารละลาย DPPH จากสีม่วงไปเป็นสีเหลือง และลดการดูดกลืนแสง UV ของสารละลาย DPPH เมื่อวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น เท่ากับ 517 นาโนเมตร (Blois, 1958)

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไพล (*Z. montanum*) ที่อายุเห้ง 8 เดือนทั้ง 34 ตัวอย่างจาก 6 ภาค ของประเทศไทยตามตารางที่ 1 พบว่าสารสกัดไพลจากตัวอย่างที่ศึกษาสามารถลดการดูดกลืนแสงของ DPPH ได้ดี ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ DPPH (% Scavenging) (ตารางที่ 16) ผลการศึกษาในครั้งนี้เปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยเฉลี่ยของไพลจากทั้ง 6 ภาค มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.5$) มีค่าอยู่ระหว่าง 57.63 เปอร์เซ็นต์ ในไพลตัวอย่างจากภาคกลาง (โดยไพลหมายเลข SB120 จากจังหวัดนครปฐม มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด เท่ากับ 24.64 ± 9.95 เปอร์เซ็นต์) ถึง 80.88 เปอร์เซ็นต์ ในไพลตัวอย่างจากภาคเหนือ (โดยไพลหมายเลข SB111 จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เท่ากับ 87.55 ± 0.81 เปอร์เซ็นต์) ส่วนค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ยของไพลจากภาคตะวันตก (66.66 ± 11.30 เปอร์เซ็นต์) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (66.13 ± 14.09 เปอร์เซ็นต์) และภาคใต้ (72.51 ± 13.94 เปอร์เซ็นต์) มีค่าไม่แตกต่างกัน และค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ยของไพลจากภาคเหนือ (80.88 ± 12.08 เปอร์เซ็นต์) ไม่แตกต่างจากภาคตะวันออก (76.47 ± 16.85 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 17) จากค่าของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ

Manochai (2007a) ที่ทดสอบฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของไหลที่อายุต่างๆ พบว่าสารสกัดจากเหง้าไหลที่อายุ 8 เดือนมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 62.44 เปอร์เซ็นต์ ไพลที่อายุ 22 เดือนมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เท่ากับ 78.72 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้นี้แสดงว่าไหลจากต่างแหล่งกันเมื่อนำมาปลูกในสภาพแวดล้อมเดียวกันเมื่อเก็บเกี่ยวที่อายุเท่ากัน ยังแสดงค่าของฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระต่างกัน จากรายงานของ Venskutonis *et al.* (2006) ที่ศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระจากใบของราสเบอร์รี่ (*Rubus idaeus*) ที่ได้จากแหล่งต่างๆ ใน Lithuania และพบว่า สารสกัดจากใบราสเบอร์รี่จากแหล่งต่างกันมีค่าของฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงที่กว้างเช่นเดียวกัน มีค่าตั้งแต่ 20.50 ถึง 82.50 เปอร์เซ็นต์ และค่าของฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของ platte wheat ที่ปลูกในแหล่งต่างกันใน Colorado ที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Yu and Zhou, 2004) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ไพลที่นำมาทดสอบฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระแต่ละตัวอย่างมีลักษณะทางจีโนไทป์ที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และปัจจัยทางสภาพแวดล้อมจึงมีผลต่อปริมาณของฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระในไหล

สารต้านอนุมูลอิสระในพืชเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มี ความสำคัญต่อพลังงานภายในพืช แต่สำคัญต่อพืชในลักษณะใดลักษณะหนึ่ง เช่น เป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเพื่อความอยู่รอด เช่น ไซยับยังการรุกรานจากแมลงหรือสัตว์ (allelopathy) หรือมีความสำคัญทางนิเวศวิทยา เช่น flavonoids จำพวก anthocyanin ช่วยในการดึงดูดพาหะในการผสมพันธุ์ของพืช เป็นต้น และสารทุติยภูมิบางชนิด เช่น เบต้าแคโรทีน (β -carotene) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นำมาใช้อย่างกว้างขวาง สำหรับไหล Masuda และ Jitoe (1995) รายงานว่ามี complex cucurminoids 3 ชนิด คือ cassumunins A B และ C ที่แสดงฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารทั้ง 3 ชนิดนี้ พบได้ในเหง้าของไหล ดังนั้นกระบวนการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระภายในพืชจึงเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิ ซึ่งขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างและสภาพแวดล้อมของพืชนั้น ดังนั้นการคัดเลือกพืชที่ง่ายต่อการเพาะปลูก สามารถเจริญได้ในหลายสภาพแวดล้อมและมีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงที่กว้าง สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติได้ดี

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากไพล (*Z. montanum*) ทั้ง 34 ตัวอย่าง

ภาค	หมายเลข	ฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระของสารสกัด (%)	ภาค	หมายเลข	ฤทธิ์ต้านอนุมูล อิสระของสารสกัด (%)
ตะวันออก	SB2	68.85 ^{b-h} ± 15.83	ตะวันออก	SB22	86.99 ^{gh} ± 12.30
เฉียงเหนือ	SB81	66.86 ^{b-h} ± 12.69		SB59	65.94 ^{b-h} ± 15.04
	SB83	61.11 ^{b-e} ± 11.53	ใต้	SB31	62.44 ^{b-g} ± 15.27
	SB84	45.20 ^b ± 12.96		SB32	68.31 ^{b-h} ± 31.96
	SB90	73.21 ^{c-h} ± 11.22		SB63	81.79 ^{e-h} ± 9.43
	SB91	78.62 ^{d-h} ± 8.19		SB66	81.32 ^{e-h} ± 7.77
	SB92	53.60 ^{bcd} ± 8.14		SB71	80.04 ^{e-h} ± 10.10
	SB93	67.26 ^{b-h} ± 19.93		SB73	58.56 ^{b-e} ± 9.20
	SB94	62.34 ^{d-h} ± 10.75		SB74	80.51 ^{e-h} ± 3.43
	SB95	68.07 ^{c-h} ± 8.66		SB78	79.55 ^{e-h} ± 17.79
	SB96	71.65 ^{c-h} ± 17.01		SB80	69.49 ^{b-h} ± 4.75
	SB130	70.48 ^{c-h} ± 6.30		SB97	70.87 ^{c-h} ± 6.28
กลาง	SB3	61.93 ^{b-f} ± 16.67		SB133	64.75 ^{b-h} ± 6.85
	SB4	90.25 ^b ± 1.61	ตะวันตก	SB58	70.84 ^{c-h} ± 5.99
	SB120	24.64 ^a ± 9.95		SB61	71.58 ^{c-h} ± 8.98
	SB141	51.73 ^{bc} ± 17.57		SB129	57.56 ^{b-e} ± 14.40
เหนือ	SB5	74.20 ^{c-h} ± 15.18			
	SB111	87.55 ^{gh} ± 0.81			
F-test		*			

*ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ยของสารสกัดจากไพล (*Z. montanum*) จากทั้ง 6 ภาคของประเทศไทย

ภาค (จำนวนตัวอย่าง)	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด (%)
ตะวันออกเฉียงเหนือ (12)	66.13 ^{ab} ± 14.09
กลาง (4)	57.63 ^a ± 27.60
เหนือ (2)	80.88 ^b ± 12.08
ตะวันออก (2)	76.47 ^b ± 16.85
ใต้ (11)	72.51 ^{ab} ± 13.94
ตะวันตก (3)	66.66 ^{ab} ± 11.30
F - test	*
CV	23.85%

*ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยอักษรที่เหมือนกันในแนวดังนี้ไม่มี ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4. การหาค่าความสัมพันธ์

การหาค่าความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณน้ำมันหอมระเหยและปริมาณองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของไพล (ตารางที่ 18) พบว่าเปอร์เซ็นต์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำมันหอมระเหยและปริมาณของ DMPBD และมีความสัมพันธ์ทางลบอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับปริมาณของ terpinen-4-ol แสดงว่าไพลตัวอย่างที่มี terpinen-4-ol สูง จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำ และค่าของ sabinene มีความสัมพันธ์ทางลบกับค่าปริมาณ terpinen-4-ol และ DMPBD เนื่องจาก terpinen-4-ol และ DMPBD เป็นสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีววิทยาในไพลและเป็นสารที่กำหนดมาตรฐานของน้ำมันไพล ในการคัดเลือกพันธุ์ที่ดีจึงต้องเลือกจากปริมาณของสารทั้ง 2 ชนิดนี้

ตารางที่ 18 ค่าความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต่อปริมาณน้ำมันหอมระเหยและปริมาณองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของไพล

	ฤทธิ์ต้าน อนุมูล อิสระ	ปริมาณน้ำมัน หอมระเหย	Sabinene	Terpinen-4-ol	DMPBD
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	1.00				
ปริมาณน้ำมันหอมระเหย	0.00	1.00			
Sabinene	0.143	0.011	1.00		
Terpinen-4-ol	-0.329 ^{**}	-0.060	-0.625 ^{**}	1.00	
DMPBD	0.126	-0.143	-0.059	-0.249	1.00

^{1)**} ความสัมพันธ์แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (2-tailed)

สรุป

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Zingiber*

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Zingiber* 51 ตัวอย่างโดยเทคนิคอาร์เอฟดีโดยใช้ไพรเมอร์ 28 ชนิด สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 611 แถบ มีความคมชัดของแถบดีเอ็นเอสูง มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง ทั้งหมด 607 แถบ คิดเป็น 99.40% และมีค่า PICs เฉลี่ยเท่ากับ 0.31 จากการคำนวณโดยโปรแกรม NTSYS พบว่าพืชที่ศึกษามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.119 ถึง 0.970 และสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ 8 กลุ่มใหญ่ และ 2 กลุ่มย่อย ส่วนใหญ่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการจัดกลุ่ม ได้ค่า cophenetic correlation เท่ากับ 1 แสดงให้เห็นว่าเทคนิคอาร์เอฟดีสามารถจัดกลุ่มพืชที่ศึกษาได้ดีมาก และสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยวิธี PCA

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไพล (*Z. montanum*)

การวิเคราะห์ความหลากหลายภายในชนิดของไพล 31 ตัวอย่าง พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดความแตกต่าง 73.86 เบอ์เซ็นต์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 0.590 ถึง 0.920 สามารถแบ่งกลุ่มไพลออกได้เป็น 4 กลุ่ม มีบางส่วนสอดคล้องกับแหล่งที่มาของตัวอย่าง และมีบางตัวอย่างไม่สามารถจัดกลุ่มได้ เมื่อพิจารณาตัวอย่างไพลภายในภาคเดียวกัน ได้ค่า Molecular variance เท่ากับ 87 เบอ์เซ็นต์ และค่า Molecular variance ระหว่างทั้ง 6 ภาค เท่ากับ 13 เบอ์เซ็นต์

3. ปริมาณน้ำมันหอมระเหยในไพล (*Z. montanum*)

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยของไพล จากทั้ง 6 ภาค ของประเทศไทยเมื่อนำมาปลูกในแหล่งเดียวกันที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากภาคตะวันตกมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 1.107 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณน้ำมันหอมระเหยในไพลจากภาคตะวันออกมีค่าน้อยที่สุด เท่ากับ 0.495 เปอร์เซ็นต์ โดยไพลหมายเลข SB58 จากจังหวัดกาญจนบุรี มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงที่สุด เท่ากับ 2.1 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นไพลหมายเลข SB111, SB61 SB91 และ SB66 มีปริมาณน้ำมันหอมระเหย เท่ากับ 1.650, 1.075, 0.960 และ 0.873 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อนำมาปลูกเพื่อการค้าจึงควรใช้พันธุ์จากหมายเลขที่ให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงเหล่านี้

4. ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของไพล (*Z. montanum*)

องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของไพลมีอย่างน้อย 15 ชนิด มีองค์ประกอบหลัก 3 ชนิด คือ sabinene, terpinen-4-ol และ DMPBD ((*E*)-1(3', 4'-dimethylphenyl) butadiene) ปริมาณขององค์ประกอบหลักทั้ง 3 ชนิดนี้มีเปอร์เซ็นต์สูง แต่มีช่วงของความต่างในแต่ละตัวอย่างค่อนข้างแคบ และปริมาณขององค์ประกอบหลักทั้ง 3 ชนิด มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติในไพลจากทั้ง 6 ภาคของประเทศไทย

สำหรับปริมาณของ terpinen-4-ol และ DMPBD ที่ใช้เป็นตัวกำหนดมาตรฐานของน้ำมันไพล ไพลหมายเลข SB111 จากจังหวัดแม่ฮ่องสอน ให้ปริมาณ terpinen-4-ol สูงที่สุด เท่ากับ 35.21 เปอร์เซ็นต์ และไพลหมายเลข SB111 มีปริมาณ DMPBD ต่ำ จึงเหมาะต่อการคัดเลือกไพลหมายเลขนี้มาใช้ขยายพันธุ์ต่อไป เนื่องจาก น้ำมันหอมระเหยของไพลที่มีคุณภาพดี ต้องมีเปอร์เซ็นต์ของ terpinen-4-ol สูงและ DMPBD ต่ำ

5. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากไพล (*Z. montanum*)

ไพล ทั้ง 34 ตัวอย่าง จาก 6 ภาค ของประเทศไทยสามารถลดการดูดกลืนแสงของ DPPH ได้ดี ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากเหง้ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ไพลตัวอย่างจากภาคกลางมีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด เท่ากับ 57.63 เปอร์เซ็นต์ ไพลตัวอย่างจากภาคเหนือมีค่าเฉลี่ยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ 80.88 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ไพลหมายเลข SB4 จากจังหวัดชัยนาท มีเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากเหง้าสูงที่สุด เท่ากับ 90.25 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นไพลหมายเลข SB111, SB22, SB63 และ SB66 โดยมีเปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 87.55, 86.99, 81.79 และ 81.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อนำมาปลูกเพื่อการค้าเพื่อใช้ในแง่ของการสกัดเอาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงควรใช้พันธุ์จากหมายเลขที่ให้เปอร์เซ็นต์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงเหล่านี้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2525. เอกสารวิชาการ เล่มที่ 6 จิง. งานทะเบียนและประมวลสถิติ กอง
แผนงาน, กรุงเทพฯ.

จรัสศรี แก่นเมือง. 2545. การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชกลุ่มกระเจียวโดย
เทคนิคอาร์เอพีดี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ชาญยุทธ์ ภาณุทัต, นรินทร์ สมบูรณ์สาร, นุชนาถ จอมไธสง และ พัฒนา นรมาศ. 2549.
เอกสารเผยแพร่ที่ 192 กรมส่งเสริมการเกษตร. กองเกษตรสัมพันธ์ กรมส่งเสริม
การเกษตร. แหล่งที่มา <http://www.doae.go.th/library/html/detail/jinsen/kingg.htm>, 7
กันยายน 2549.

ทรงเกียรติ วิสุทธิพิทักษ์กุล. 2537. อิทธิพลของอายุการเก็บเกี่ยวที่มีต่อผลผลิตไพล รายงานฉบับ
ที่ 10. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

นิวัติ แก้วประดับ. 2545. ศักยภาพสมุนไพรในภาคใต้กับการสร้างงานให้ชุมชน. น. 1- 7.
ใน การพัฒนาคุณภาพวัตถุดิบสมุนไพร ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะ
เภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 1- 7.

ชนาพร พูนสุขเจริญ และ อรพินท์ เจียรถาวร. 2547. การสกัดสารออกฤทธิ์จากไพลโดยใช้น้ำร้อน
ขุดยั้งเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดทั่วไป, ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 30. สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย ในพระบรม
ราชูปถัมภ์, กรุงเทพฯ.

ปราโมทย์ ไตรบุญ ประนอม จันทรโนทัย และ ไคร์ ลาร์เซน. 2548. ชีวภูมิศาสตร์และ
ความหลากหลายทางชีวภาพของพืชสกุลจิงในประเทศไทย. วารสารวิจัย มข. ฉบับ
บัณฑิตศึกษา 5 (1): 23- 32.

พัชรินทร์ ตัญญา, สนธิชัย จันทน์เปรม, สมบัติ ชินวงศ์ และ พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2551. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์สับดูต้าในเอเชียจากการประเมินโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ RAPD. วารสารวิชาการเกษตร 26 (1): 36-47.

รุ่งฤดี พรสกุลเลิศชัย. 2550. การศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไพลโดยใช้วิธีไมโครเวฟ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัชยาพร อโนราช และ นาถธิดา วีระปรียากร. 2548. วิธีทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในหลอดทดลอง. ว. วิทย. มข. 33(1-2): 13-18.

วิเชียร เองวนิช. 2545. ลักษณะทางสัณฐาน กายวิภาค สรีรวิทยา ผลผลิตและคุณภาพของไพล (*Zingiber spp.*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วัชร ชาญยิ่ง. 2549. อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระในกลไกของการเกิดมะเร็ง. ว. วิทย. มข 34(3): 199-208.

วิภา หงษ์ตระกูล. ม.ม.ป.. การวิเคราะห์ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายและการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์. (เอกสารไม่ตีพิมพ์)

วันเฉลิม จัทรากุล. 2545. สมุนไพรไทย "ธุรกิจหมื่นล้าน". นานอนอิงค์, กรุงเทพฯ.

วัลภา อนันตสานต์ และ ศักดิ์ชัย อัญญคุณ. 2518. การศึกษาผลของน้ำคั้นไพลในการออกฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่. เชียงใหม่เวชสาร 14 (3): 249-57.

สิริลักษณ์ มาลานิชม. 2545. น้ำมันหอมระเหยสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย. สมอ สาร 28 (235): 3-6.

สังวาล สมบูรณ์ และ สุภาณี พิมพ์สมาน. 2546. ศักยภาพของการใช้น้ำมันระเหยง่ายจากพืชตระกูล Zingiberaceae ในการควบคุมมอดแป้ง (*Tribolium castaneum* Herbst) และด้วงงวงข้าว (*Sitophilus oryzae* L.). ว. วิทยาศาสตร์เกษตร 34 (4-6): 183-186.

สมบัติ ประภาวชิรา. 2546. รายงานการวิจัยเรื่อง การศึกษาเขตกรรมเพื่อพัฒนาผลผลิตและคุณภาพของไพล. สถาบันวิจัยวลัยรุกขเวช มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

สุพร นุชคำรงค์. 2549. อนุมูลอิสระ: คุณและโทษต่อมนุษย์. ว. วิทย. มข. 34 (2): 97-102.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศศิธร วสุวัต. 2532. การวิจัยและพัฒนาการรักษาอาการอักเสบชนิดใหม่จากไพล รายงานฉบับที่ 2. 75 หน้า.

อภิชาติ วรรณวิจิตร. ม.ป.ป. คู่มือการสอน วิชา 003579 **Molecular Biology in Crop Improvement** ชีวโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืช. (เอกสารไม่ตีพิมพ์)

Akiyama, K., H. Kikuzaki, T. Aoki, A. Okuda, N.H. Lajis and N. Nakatani. 2006. Terpenoids and a diarylheptanoid from *Zingiber ottensii*. **J. Nat. Prod.** 69: 1637-1640.

Bahieldin, A., I. A. Ahmed, Gh. A. Gad El-Karim, H. F. Eissa, H. T. Mahfouz and O.M. Saleh. 2006. DGGE-RAPD analysis as a useful tool for cultivar identification. **African Journal of Biotechnology** 5 (8): 566-569.

Baker, D.M. and J. Nabney. 1975. Identification of a novel constituent of the essential oil of *Zingiber cassumunar*. **Int. Flavours Food Addit.** 6: 136.

Bhat, K.V. 2002. Molecular data analysis. In **Proceedings of the short-term training course on molecular marker application in plant breeding**. ICAR, New Delhi.

Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature** 181: 1199-1200.

- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** 28: 25-30.
- Chotjumlong, P. 2005. **Effect of Plai (*Zingiber cassumunar* Roxb.) extraction on the levels of hyaluronan, glycosaminoglycan and matrixmetalloproteinases from oral fibroblast and epithelial cells.** M.S. thesis, Chiang Mai University.
- De Guzman, C.C. and J.S. Siemonsma (Editors). 1999. **Plant Resources of South-East Asia No. 13.** Spices. Blackhuys, Publishers, Leiden, the Netherlands.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.** 19: 11-15.
- Elzaawely, A. A., T. D. Xuan, H. Koyama and S. Tawata. 2007. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. & R. M. Sm.. **Food Chem.** 104: 1648-1653.
- Garg, S.N., R.P. Bansal, M.M. Guptam and S. Kumar. 1999. Variation in the rhizome essential oil and curcumin contents and oil quality in the land races of turmeric *Curcuma longa* of North Indian plains. **Flavour Fragrance J.** 14 (5): 315-318.
- Gil, A., C.M. Ghersa and S. Leicach. 2000. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. **Biochem. Sys. Ecol.** 28: 261-274.
- _____, C.M. Van Baren, P.M. Di Leo Lira and A.L. Bandoni. 2007. Identification of the genotype from the content and composition of the essential oil of lemon verbena (*Aloysia citriodorum* Palau). **J. Agric. Food Chem.** 55 (21): 8664-8669.
- Harini, S.S., M.N. S. Kameshwari and N. Sathyanarayana. 2008. Optimization of DNA isolation and PCR-RAPD method for molecular analysis of *Urginea indica* Kunth.. **International Journal of Integrative Biology** 2 (2): 138-144.

- Hiserodt, R.D., S.G. Franzblau and R.T. Rosen. 1998. Isolation of 6-, 8-, and 10- gingerol from ginger rhizome by HPLC and preliminary evaluation of inhibition of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Agric. Food Chem.** 46: 2504-2508.
- Holtum, R.E. 1950. Zingiberaceae. Hedychieae. Zingiber. **The Garden Bulletin Singapore** 13 (1-21): 38-65.
- IRRI. 2007. **Winboot**. International Rice Research Institute. Laguna, Philippines.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherche sur la distribution flore. **Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.** 44:223-270.
- Jatoi, S. A., Kikuchi, A., Mimura, M., San-San-Yi and N. Watanabe. 2008. Relationship of *Zingiber* species, and genetic variability assessment in ginger (*Zingiber officinale*) accessions from *ex-situ* genebank, on-farm and rural markets. **Breed. Sci.** 58:261-270.
- Jeenapongsa R, K. Yoovathaworn and K. M. Sriwatanakul. 2003. Anti-inflammatory activity of (E)-1-(3,4-dimethoxyphenyl) butadiene from *Zingiber cassumunar* Roxb. **J. Ethnopharmacology** 87; 143-148.
- Jiang, H., X. Zhang, J.K. Hyun, P. Mc. Steven, N. T. Barbara and R.G. David. 2005. Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medicinal *Zingiber* species: Tools for authentication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Phytochemistry** 67:232-244.
- Jitoe, A., T. Masuda, I.G.P. Tengah, N. Dewa, I.W. Suprpta, T. Gara and N. Nakatanit. 1992. Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained Curcuminoids. **J. Agric. Food Chem.** 40: 1337-1340.

- Khan, M.S., S. Khanam, M. Deepak and B.G. Shivananda. 2006. Antioxidant activity of a new diarylheptanoid from *Zingiber officinale*. **Pharmacognosy Magazine** 2 (8): 254-257.
- Kitamura, C., T. Nagao, M. S. Prana, A. Agusta, K. Ohashi and H. Shibuya. 2007. Comparison of *Curcuma* sp. in Yakushima with *C. aeruginosa* and *C. zedoaria* in Java by trnK gene sequence, RAPD and essential oil component. **J. Nat. Med.** 61: 239-243.
- Lee, J. W., H. Y. Min, A. R. Han, H. J. Chung, E. J. Park, H. J. Park, J. Y. Hong, E. Y. Seo and S. K. Lee. 2007. Growth inhibition and induction of G1 phase cell cycle arrest in human lung cells by a phenylbutenoid dimer isolate from *Zingiber montanum*. **Biol. Pharm. Bull.** 30 (8): 1561-1564.
- Lu, Y., C. Sun, Y. Wang and Y. Pan. 2005. Preparative isolation and purification of two phenylbutenoids from the rhizomes of *Zingiber cassumunar* by upright counter-current chromatography. **Journal of Chromatography** 1089: 258-262.
- Lucchesi, M.E., F. Chemat and J. Smadja. 2004. An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices. **Flavour and Fragrance J.** 19(2): 134-138.
- Ma, J., X. Jin, L. Yang and Z.L. Liu. 2004. Diarylheptanoids from the rhizomes of *Zingiber officinale*. **Phytochemistry** 65: 1137-1143.
- Mafra, I., S. A. Silva, E. J. M. O. Moreira, C. S. F. da Silva, M. Beatriz and P. P. Oliveira. 2008. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products. **Food Control** 19: 1183-1190.
- Mamuris, Z., A.P. Apostolidis, A.J. Theodorou and C. Triantaphyllidis. 1998. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet (*Mullus barbatus*). **Marine Biology** (132): 171-178.

- Manochai, B. 2007a. **Effect of environment on biological activity of cassumunar ginger (*Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr.)**. Ph. D. thesis, Kasetsart university.
- _____. 2007b. **Genetic diversity of Cassumunar Ginger (*Z. montanum* (Koenig) Link ex Dietr.) based on AFLP marker**. Doctoral special problem, Kasetsart university.
- _____, Paisooksantivatana, Y., Kim, M. J. and J. H. Hong. 2007. Antioxidant activity and total volatile oil content of cassumunar ginger (*Zingiber montanum* Roxb.) at various rhizome ages. **Food Sci. Biotechnol.** 16 (2): 290-293.
- Masuda, T. and, A. Jitoe. 1995. Phenylbutanoid monomers from the rhizome of *Zingiber cassumunar*. **Phytochemistry** 39 (2): 459-461.
- _____, A. Jitoe and T. J. Mabry. 1995. Isolation and structural determination of cassumunarins A, B, and C: new anti-inflammatory antioxidants from tropical ginger, *Zingiber cassumunar*. **Journal of the American Oil Chemists' Society** 72: 1053-1057.
- Mathai, C.K. 1978. The pattern of rhizome yield and their accumulations of commercially important chemical constituents in tumeric (*Curcuma* sp.) during growth and development. **Pl. Food for Human Nutrition** 28(3): 219-225.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 26(2): 211-219.
- Moyo, M., S. O. Amoo, M. W. Bairu, J. F. Finnie and J. Van Staden. 2008. Optimising DNA isolation for medicinal plants. **South African Journal of Botany** 74: 771-775.
- Nayak, S, P.K. Naik, L.K. Acharya and A.K. Pattnaik. 2006. Detection and evaluation of genetic variation in 17 promising cultivars of turmeric (*Curcuma longa* L.) using 4C nuclear DNA content and RAPD markers. **Cytologia** 71(1):49-55.

- Panphadung, P. 2004. **Antioxidant activity and quality control by HPLC method of constituents from *Boesenbergia pandurata* rhizomes.** M. S. Thesis, Prince of Songkla University.
- Peakall, R. and P. E. Smouse. 2006. GENELEX 6: genetic analysis in excel population genetic software for teaching and research. **Mol. Ecol. Notes.** 6: 288-295.
- Pithayanukul, P., J. Tubprasert and M. Wuthi-U domlert. 2007. *In vitro* antimicrobial activity of *Zingiber cassumuna* (Plai) oil and a 5% Plai oil gl. **Phytother. Res.** 21: 164-169.
- Ram, S. G., K. T. Parthiban, R. S. Kumar, V. Thiruvengadam and M. Paramathma. 2008. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. **Genet. Resour. Crop Evol.** 55: 803-809.
- Ramanadhan, B. 2005. **Microwave extraction of essential oils (from black pepper and coriander) at 2.46 GHz.** M. S. thesis, University of Saskatoon, Canada.
- Roderos, R. R. and E. E. Elias. 2003. Isoenzyme analysis in some *Zingiber* species, pp. 156-165. *In* P. Chantaranothai, K. Larsen, P. Sirirugsa and D. Simpson, eds. **Proceedings of the 3rd Symposium on the Family Zingiber, Applied Taxonomic Research Center 3. ed.** Khon Kean University, Khon Kean, Thailand.
- Rohlf, F.J. 2000. **NTSYSpc 2.1 Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** Exeter Software, Setauket, NY.
- Rout , G.R., P. Das, S. Goel and S.N. Raina. 1998. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 39: 23-27.

- Sabulal, B., M. Dan, A. John, R. Kurup, N. S. Pradeep, R. K. Valsamma and V. George. 2006. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry** 67: 2469-2473.
- Sacchetti, G., S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice and R. Bruni. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oil of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. **Food Chem.** 91: 621-632.
- Silvestrini, M., M.P. Maluf, M.B. Silvarolla, O. Guerreiro-Filho, H.P. Medina-Filho, M.M. T. Vanini, A.S. Oliveira, C. de Gaspari-Pezzopane and L.C. Fazuoli. 2008. Genetic diversity of a *Coffea* germplasm collection assessed by RAPD markers. **Genet. Resour. Crop Evol.** 55: 901–910.
- Singh, N., V.K. Kaul, N.W. Meqeji, V. Singh and P.S. Ahuja. 2008. Essential oil composition of three accessions of *Dracocephalum heterophyllum* Benth. cultivated at Palampur, India. **Nat. Prod. Res.** 22(11): 927-36.
- Syamkumar, S., B. Lowarence and B. Sasikumar. 2003. Isolation and amplification of DNA from rhizomes of turmeric and ginger. **Plant Mol. Biolo. Rept.** 21: 171a-171e.
- Techaprasan, J., C. Ngamriabsakul, S. Klinbunga, S. Chusacultachai and T. Jenjittikul. 2006. Genetic variation and species identification of Thai *Boesenbergia* (Zingiberaceae) analyzed by chloroplast DNA polymorphism. **J. Biochem. Mol. Biol.** 39(4): 361-370.
- Tewtrakul, S. and S. Subhadhirasakul. 2007. Anti-allergic activity of some selected plants in the Zingiberaceae family. **Journal of Ethnopharmacology** 109: 535-538.
- Theerakulpisut, P., P. Chantaranonthai, D. Thong-a-ram, J. Khampila, P. Triboun and W. Mahakham. 2005. Genetic variation of the genus *Zingiber* (Zingiberaceae) in Thailand detected by RAPD markers. **The 31st Congress on Science and Technology of**

Thailand, 18 – 20 October 2005. Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakornratchasima. p.67.

Theilade, I. and M. L. Maersk Moller. 1991. **Taxonomic and palynological studies on**

Zingiber Boehm. In Thailand and west Malaysia. Cand. Scient. Thesis. University of Aarhus, Denmark.

_____. 1999. A synopsis of the genus *Zingiber* (Zingiberaceae) in Thailand. **Nord. J. Bot.** 19 (4): 389-410.

_____. and J. Mood. 1999a. A new species of *Zingiber* (Zingiberaceae) from Vietnam. **Nord. J. Bot.** 19 (5): 525-527.

_____. 1999b. Six new species of *Zingiber* (Zingiberaceae) from Borneo. **Nord. J. Bot.** 19 (5): 513-524.

Triboun, P., P. Chantaranothai and K. Larsen. 2005. The genus *Zingiber* Miller in Thailand, *In* **13th Flora of Thailand meeting 13. ed.** Dublin, Ireland.

_____. 2006. **Biogeography and biodiversity of the genus *Zingiber* in Thailand.** Ph.D. thesis, Khon Kaen University.

_____, P. Chantaranothai and K. Larsen. 2007. Taxonomic changes regarding three species of *Zingiber* (Zingiberaceae) from Thailand. **Acta Phytotaxonomica Sinica** 45 (3): 403-404.

Um, J.Y., H.S. Chung, M.S. Kim, H.J. Na, H.J. Kwon, J.J. Kim, K.M. Lee, S.J. Lee, J.P. Lim, K.R. Do, W.J Hwang, Y.S. Lyu, N.H. An and H.M. Kim. 2001. Molecular authentication of *Panax ginseng* species by RAPD and PCR-RFLP. **Biol. Pharm. Bull.** 24 (8): 872-875.

- Vanijajiva, O., P. Sirirugsa and W. Suvachittanont. 2005. Confirmation of relationships among *Boesenbergia* (Zingiberaceae) and related genera by RAPD. **Biochemical Systematics and Ecology** 33:159–170.
- ankar, P. S., V. Tiwari, R. Shanker and J. Srivastava. 2006. Change in antioxidant activity of spices- tumeric and ginger on heat treatment. **Electron. J. Environ. Aggric. Food Chem.** 5 (2): 1313-1317.
- Venskutonis, P.R., A. Dvaranauskaite and J. Labokas. 2006. Radical scavenging activity and composition of raspberry (*Rubus idaeus*) leaves from different locations in Lithuania. **Fitoterapia** 78: 162–165.
- Villa~no, D., M.S. Fern'andez-Pach'on, M.L. Moy'a, A.M. Troncoso and M.C. Garc'ia-Parrill. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta** 71: 230–235.
- Wahyuni, S., D.H. Xu, N. Bermawie, H. Tsunematsu and T. Ban. 2003. Genetic relationships among ginger accessions based on AFLP marker. **Journal Bioteknologi Pertanian** 8(2): 60-68.
- Williams, J.G.K., K.J. Kubelik, K.J., Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucl. Acids Res.** 18: 6531–6535.
- Wohlmuth, H., N.L. David, K.S. Mike and P.M. Stephen. 2005. Gingerol content of diploid and tetraploid clones of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **J. Agric. Food Chem.** 53: 5772-5778.
- Wu, T.L. and K. Larsen. 2000. Zingiberaceae, p. 322-377. *In*: **Z.Y. Wu and P.H. Raven (eds.). Flora of China.** Vol. 24. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.

- Yamaguchi, T., H. Takamura, T. Matoba and J. Terao. 1998. HPLC method for evaluation of the free radical- scavenging activity of foods by 1, 1- diphenyl-2- picrylhydrazyl. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62: 1201-1204.
- Yu, L. and K. Zhou. 2004. Antioxidant properties of bran extracts from 'Platte' wheat grown at different locations. **Food Chem.** 90: 311–316.
- Zaeoung, S., A. Plubrukarn and N. Keawpradub. 2005. Cytotoxic and free radical scavenging activities of Zingiberaceous rhizomes. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 27(4): 799-812.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชสกุล *Zingiber* ทั้ง 51 ตัวอย่าง

หมายเลข	SB2	SB81	SB82	SB83	SB84	SB90	SB91	SB92	SB93	SB94	SB95	SB96	SB130	SB3	SB4	SB120
SB2	1.000															
SB81	0.600	1.000														
SB82	0.803	0.621	1.000													
SB83	0.688	0.686	0.719	1.000												
SB84	0.706	0.665	0.793	0.792	1.000											
SB90	0.686	0.595	0.728	0.716	0.759	1.000										
SB91	0.519	0.635	0.585	0.581	0.604	0.575	1.000									
SB92	0.778	0.587	0.833	0.711	0.784	0.731	0.561	1.000								
SB93	0.689	0.619	0.779	0.741	0.809	0.722	0.625	0.804	1.000							
SB94	0.749	0.601	0.836	0.685	0.764	0.716	0.580	0.868	0.806	1.000						
SB95	0.697	0.599	0.792	0.693	0.787	0.725	0.574	0.823	0.789	0.850	1.000					
SB96	0.637	0.619	0.730	0.740	0.792	0.721	0.621	0.777	0.808	0.773	0.767	1.000				
SB130	0.723	0.643	0.738	0.750	0.795	0.725	0.565	0.763	0.762	0.742	0.758	0.744	1.000			
SB3	0.790	0.579	0.801	0.711	0.730	0.710	0.555	0.831	0.717	0.801	0.762	0.705	0.725	1.000		
SB4	0.708	0.599	0.693	0.667	0.665	0.682	0.560	0.710	0.679	0.733	0.704	0.682	0.785	0.754	1.000	
SB120	0.755	0.650	0.777	0.717	0.742	0.694	0.577	0.807	0.745	0.792	0.764	0.734	0.743	0.786	0.744	1.000

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	SB2	SB81	SB82	SB83	SB84	SB90	SB91	SB92	SB93	SB94	SB95	SB96	SB130	SB3	SB4	SB120
SB5	0.819	0.585	0.814	0.703	0.703	0.722	0.687	0.544	0.822	0.741	0.819	0.748	0.692	0.717	0.834	0.740
SB111	0.641	0.641	0.677	0.671	0.671	0.686	0.664	0.587	0.628	0.657	0.658	0.660	0.653	0.676	0.648	0.689
SB22	0.527	0.624	0.556	0.583	0.583	0.549	0.538	0.545	0.519	0.544	0.545	0.539	0.535	0.545	0.547	0.540
SB59	0.703	0.577	0.703	0.714	0.714	0.653	0.670	0.561	0.684	0.657	0.690	0.666	0.648	0.659	0.716	0.677
SB31	0.590	0.585	0.666	0.614	0.614	0.693	0.603	0.583	0.648	0.668	0.674	0.654	0.676	0.636	0.642	0.609
SB32	0.621	0.558	0.688	0.610	0.610	0.675	0.970	0.569	0.685	0.660	0.713	0.682	0.706	0.664	0.638	0.683
SB63	0.803	0.574	0.846	0.680	0.680	0.760	0.708	0.543	0.866	0.774	0.841	0.781	0.725	0.724	0.817	0.699
SB66	0.723	0.620	0.807	0.700	0.700	0.797	0.715	0.568	0.804	0.812	0.807	0.779	0.732	0.764	0.741	0.694
SB71	0.751	0.619	0.798	0.703	0.703	0.782	0.734	0.567	0.812	0.774	0.826	0.810	0.735	0.734	0.775	0.724
SB73	0.745	0.614	0.835	0.692	0.692	0.781	0.706	0.558	0.810	0.801	0.835	0.780	0.740	0.727	0.758	0.704
SB74	0.760	0.596	0.851	0.693	0.693	0.769	0.717	0.550	0.837	0.800	0.846	0.791	0.751	0.738	0.779	0.718
SB78	0.637	0.667	0.714	0.688	0.688	0.738	0.664	0.620	0.700	0.790	0.717	0.698	0.729	0.704	0.643	0.655
SB80	0.538	0.613	0.567	0.577	0.577	0.609	0.556	0.573	0.578	0.614	0.602	0.586	0.609	0.572	0.567	0.552
SB97	0.715	0.593	0.784	0.675	0.675	0.749	0.701	0.572	0.775	0.775	0.812	0.783	0.735	0.728	0.733	0.729
SB133	0.706	0.605	0.780	0.709	0.709	0.780	0.719	0.545	0.794	0.771	0.790	0.773	0.809	0.763	0.729	0.719
SB61	0.749	0.609	0.754	0.717	0.717	0.730	0.699	0.530	0.751	0.707	0.742	0.720	0.678	0.726	0.752	0.732
SB39	0.408	0.337	0.386	0.386	0.386	0.374	0.370	0.294	0.403	0.361	0.386	0.371	0.355	0.366	0.411	0.272
SB68	0.384	0.337	0.363	0.358	0.346	0.342	0.291	0.367	0.336	0.363	0.350	0.346	0.347	0.375	0.354	0.357

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	SB2	SB81	SB82	SB83	SB84	SB90	SB91	SB92	SB93	SB94	SB95	SB96	SB130	SB3	SB4	SB120
SB85	0.312	0.273	0.280	0.285	0.277	0.279	0.228	0.305	0.292	0.310	0.284	0.271	0.301	0.310	0.331	0.310
SB110	0.386	0.332	0.360	0.354	0.349	0.341	0.282	0.380	0.332	0.379	0.360	0.345	0.347	0.381	0.363	0.356
SB37	0.319	0.344	0.323	0.328	0.350	0.310	0.289	0.334	0.327	0.329	0.329	0.343	0.328	0.310	0.320	0.332
SB70	0.318	0.267	0.321	0.315	0.314	0.298	0.266	0.322	0.300	0.306	0.305	0.298	0.322	0.313	0.311	0.313
SB114	0.286	0.284	0.286	0.292	0.294	0.285	0.243	0.290	0.284	0.284	0.290	0.289	0.288	0.284	0.291	0.297
SB56	0.368	0.350	0.368	0.363	0.372	0.346	0.297	0.382	0.361	0.368	0.365	0.354	0.338	0.367	0.341	0.365
SB134	0.295	0.292	0.305	0.317	0.311	0.291	0.274	0.316	0.304	0.307	0.314	0.322	0.305	0.299	0.316	0.329
SB24	0.184	0.202	0.207	0.227	0.219	0.191	0.187	0.225	0.206	0.214	0.206	0.224	0.202	0.204	0.202	0.222
SB103	0.347	0.295	0.357	0.362	0.346	0.349	0.258	0.372	0.325	0.360	0.358	0.339	0.357	0.366	0.343	0.361
SB104	0.327	0.281	0.334	0.311	0.314	0.313	0.258	0.328	0.314	0.330	0.319	0.306	0.301	0.309	0.314	0.323
SB105	0.353	0.288	0.359	0.350	0.325	0.334	0.278	0.376	0.335	0.365	0.349	0.332	0.330	0.370	0.359	0.369
SB106	0.325	0.279	0.321	0.319	0.294	0.308	0.295	0.322	0.333	0.316	0.320	0.301	0.286	0.316	0.318	0.331
SB107	0.330	0.280	0.333	0.322	0.316	0.332	0.271	0.338	0.306	0.326	0.305	0.305	0.311	0.352	0.372	0.329
SB115	0.286	0.266	0.286	0.299	0.290	0.282	0.256	0.297	0.281	0.281	0.283	0.282	0.285	0.294	0.295	0.283
SB116	0.334	0.284	0.331	0.311	0.332	0.316	0.281	0.342	0.317	0.337	0.319	0.328	0.332	0.320	0.329	0.326
SB117	0.256	0.228	0.253	0.258	0.265	0.241	0.222	0.247	0.270	0.257	0.251	0.259	0.251	0.267	0.247	0.255
SB118	0.337	0.289	0.357	0.340	0.352	0.326	0.301	0.372	0.356	0.360	0.364	0.345	0.342	0.348	0.328	0.350

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	SB5	SB111	SB22	SB59	SB31	SB32	SB63	SB66	SB71	SB73	SB74	SB78	SB80	SB97	SB133	SB61
SB5	1.000															
SB111	0.693	1.000														
SB22	0.556	0.693	1.000													
SB59	0.724	0.659	0.569	1.000												
SB31	0.646	0.709	0.708	0.607	1.000											
SB32	0.672	0.670	0.558	0.630	0.677	1.000										
SB63	0.863	0.669	0.531	0.715	0.658	0.706	1.000									
SB66	0.785	0.679	0.549	0.668	0.690	0.701	0.852	1.000								
SB71	0.815	0.671	0.534	0.692	0.671	0.709	0.870	0.890	1.000							
SB73	0.819	0.682	0.545	0.686	0.682	0.698	0.874	0.900	0.883	1.000						
SB74	0.813	0.677	0.542	0.702	0.672	0.720	0.907	0.868	0.858	0.921	1.000					
SB78	0.677	0.670	0.591	0.620	0.707	0.670	0.710	0.779	0.735	0.752	0.757	1.000				
SB80	0.586	0.577	0.562	0.537	0.617	0.543	0.575	0.611	0.599	0.621	0.612	0.693	1.000			
SB97	0.778	0.703	0.547	0.696	0.686	0.732	0.829	0.799	0.813	0.840	0.851	0.765	0.633	1.000		
SB133	0.769	0.664	0.542	0.692	0.670	0.746	0.819	0.807	0.821	0.813	0.841	0.743	0.585	0.855	1.000	
SB61	0.798	0.690	0.579	0.744	0.641	0.657	0.787	0.747	0.771	0.764	0.785	0.668	0.564	0.772	0.791	1.000

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	SB5	SB111	SB22	SB59	SB31	SB32	SB63	SB66	SB71	SB73	SB74	SB78	SB80	SB97	SB133	SB61
SB39	0.409	0.327	0.278	0.349	0.328	0.356	0.422	0.398	0.425	0.407	0.407	0.354	0.319	0.371	0.376	0.393
SB68	0.373	0.330	0.281	0.326	0.324	0.350	0.387	0.384	0.399	0.394	0.388	0.348	0.318	0.350	0.352	0.372
SB85	0.305	0.285	0.279	0.268	0.286	0.297	0.311	0.308	0.314	0.306	0.304	0.280	0.290	0.297	0.293	0.298
SB110	0.386	0.315	0.261	0.336	0.316	0.353	0.404	0.385	0.414	0.398	0.395	0.333	0.317	0.359	0.362	0.368
SB37	0.316	0.327	0.344	0.300	0.369	0.335	0.336	0.342	0.351	0.339	0.329	0.341	0.329	0.324	0.354	0.331
SB70	0.304	0.275	0.256	0.287	0.283	0.308	0.324	0.322	0.317	0.313	0.324	0.285	0.269	0.301	0.325	0.333
SB114	0.279	0.284	0.282	0.256	0.283	0.283	0.283	0.289	0.295	0.291	0.289	0.256	0.249	0.267	0.291	0.308
SB56	0.368	0.302	0.269	0.331	0.325	0.345	0.390	0.377	0.395	0.380	0.390	0.353	0.322	0.354	0.378	0.381
SB134	0.312	0.259	0.238	0.277	0.271	0.318	0.315	0.323	0.336	0.314	0.325	0.300	0.277	0.309	0.338	0.324
SB24	0.207	0.190	0.176	0.204	0.184	0.222	0.233	0.225	0.215	0.212	0.225	0.204	0.209	0.209	0.230	0.215
SB103	0.364	0.299	0.276	0.314	0.312	0.332	0.373	0.362	0.371	0.349	0.366	0.348	0.317	0.343	0.360	0.360
SB104	0.324	0.258	0.246	0.285	0.277	0.320	0.330	0.335	0.354	0.346	0.340	0.311	0.311	0.315	0.321	0.119
SB105	0.375	0.305	0.288	0.336	0.306	0.335	0.376	0.354	0.371	0.367	0.374	0.320	0.300	0.342	0.335	0.358
SB106	0.332	0.283	0.263	0.313	0.260	0.323	0.317	0.322	0.324	0.327	0.328	0.341	0.284	0.307	0.306	0.315
SB107	0.333	0.312	0.261	0.320	0.291	0.294	0.333	0.329	0.322	0.328	0.319	0.289	0.283	0.321	0.334	0.332
SB115	0.290	0.273	0.238	0.264	0.248	0.261	0.290	0.289	0.302	0.285	0.277	0.269	0.249	0.262	0.274	0.273
SB116	0.314	0.283	0.242	0.296	0.292	0.335	0.337	0.342	0.354	0.343	0.337	0.322	0.265	0.329	0.339	0.312
SB117	0.256	0.248	0.251	0.223	0.273	0.248	0.263	0.262	0.261	0.268	0.263	0.264	0.293	0.275	0.252	0.248

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	SB5	SB111	SB22	SB59	SB31	SB32	SB63	SB66	SB71	SB73	SB74	SB78	SB80	SB97	SB133	SB61
SB118	0.337	0.291	0.270	0.313	0.307	0.323	0.362	0.355	0.349	0.359	0.373	0.340	0.329	0.360	0.359	0.319
หมายเลข	SB39	SB68	SB85	SB110	SB37	SB70	SB114	SB56	SB134	SB24	SB103	SB104	SB105	SB106	SB107	SB115
SB39	1.000															
SB68	0.862	1.000														
SB85	0.470	0.490	1.000													
SB110	0.799	0.830	0.519	1.000												
SB37	0.364	0.358	0.329	0.354	1.000											
SB70	0.440	0.410	0.340	0.403	0.437	1.000										
SB114	0.353	0.354	0.276	0.333	0.447	0.455	1.000									
SB56	0.438	0.714	0.305	0.411	0.390	0.436	0.408	1.000								
SB134	0.339	0.328	0.274	0.338	0.343	0.401	0.403	0.629	1.000							
SB24	0.246	0.225	0.225	0.233	0.252	0.263	0.228	0.266	0.310	1.000						
SB103	0.432	0.227	0.310	0.424	0.351	0.352	0.333	0.439	0.372	0.231	1.000					
SB104	0.428	0.435	0.352	0.440	0.330	0.388	0.356	0.423	0.356	0.208	0.424	1.000				
SB105	0.439	0.434	0.315	0.406	0.331	0.354	0.314	0.405	0.327	0.222	0.421	0.445	1.000			
SB106	0.299	0.293	0.257	0.283	0.254	0.268	0.233	0.323	0.276	0.216	0.250	0.270	0.289	1.000		
SB107	0.342	0.328	0.260	0.310	0.346	0.300	0.262	0.325	0.273	0.165	0.277	0.282	0.304	0.242	1.000	
SB115	0.359	0.332	0.273	0.338	0.250	0.278	0.280	0.296	0.282	0.177	0.311	0.283	0.310	0.250	0.333	1.000

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	SB116	SB117	SB118
SB116	1.000		
SB117	0.255	1.000	
SB118	0.342	0.264	1.000

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพล

Peak No.	compound	% composition
1	α -pinene	1.26
2	α -thujene	1.05
3	camphene	0.05
4	β -pinene	2.64
5	sabinene	50.2
6	α -phellandrene	0.21
7	myrcene	1.37
8	α -terpinene	3.35
9	limonene	0.60
10	β -phellandrene	0.63
11	1,8 cineol	0.60
12	γ -terpinene	5.78
13	β -trans-ocimene	0.34
14	<i>p</i> -cymene	1.66
15	terpinolene	1.25
16	<i>cis</i> -sabinene hydrate	132
18	<i>trans</i> -sabinene hydrate	1.36
19	<i>trans</i> -menth 2-en-1-ol	0.68
20	terpinen-4-ol	21.62
21	<i>cis</i> -menth 2-en-2-ol	0.51
23	terpinyl acetate	0.13
24	α -terpineol	0.71
28	C ₁₅ H ₂₄	0.39
36	(<i>E</i>)-1(3', 4'-dimethylphenyl) butadiene	0.22
38	(<i>E</i>)-1(3', 4'-dimethylphenyl) butadiene	0.72

ที่มา : ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
(2550)

ตารางผนวกที่ 3 มาตรฐานน้ำมันไพลของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงาน
มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

สารประกอบ	วว. ¹	สมอ. ¹
α -pinene	0.90 – 4.16	1.00 – 3.00
sabinene	25.70 – 40.31	31.00 – 48.00
α -terpinene	6.12 – 16.50	3.00 – 8.00
γ -terpinene	2.00 – 12.66	6.00 – 10.00
terpinen-4-ol	25.40 - 41.50	19.00 – 36.00
DMPBD ⁽³⁾	0.50 - 5.88	-

¹วว. หมายถึง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

² สมอ. หมายถึง สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

⁽³⁾ (*E*)-1(3', 4'-dimethylphenyl) butadiene

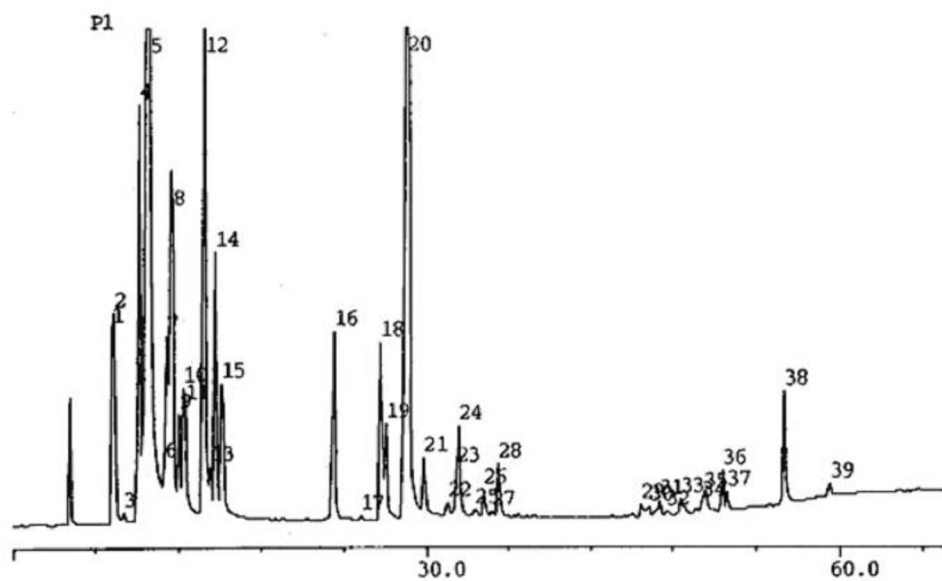
Gas Chromatography: Filcons Instrument model 8000 series

คอลัมน์ ; DB5, 30m x 0.25 mm, 0.25 μ m, J&W Scientific, USA

อุณหภูมิ ; 50 – 220 °C, 4 °C/นาที

Detector ; FID, 230 °C

ที่มา : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2550)



ภาพผนวกที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากไพลด้วย Gas Chromatography

ที่มา : ฝ่ายเกษตรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (2550)



ภาพผนวกที่ 2 ช่อดอกของพืชสกุล *Zingiber* ที่ศึกษาในครั้งนี้ ; ก. *Z. montanum*, ข. *Z. zerumbet*,
ค. *Z. ottensii*, ง. *Z. barbatum*



ภาพผนวกที่ 3 ช่อดอกของพืชสกุล *Zingiber* ที่ศึกษาในครั้งนี้ ; ก. *Z. idae*, ข. *Z. parishii*,
ค. *Z. bradleyanum*, ง. *Z. rubens*



ภาพผนวกที่ 4 ช่อดอกของพืชสกุล *Zingiber* ที่ศึกษาในครั้งนี้ ; ก. *Zingiber* sp.1, ข. *Zingiber* sp.2



ภาพผนวกที่ 5 เหง้าขิงหยวกหรือขิงใหญ่ (*Zingiber officinale* Rosc.)



ภาพผนวกที่ 6 เหง้าขิงเล็กหรือขิงเผ็ด (*Zingiber officinale* Rosc.)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวเสาวลักษณ์ บัวอิน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 21 เดือน มกราคม พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	จังหวัดสงขลา
ประวัติการศึกษา	วท.บ (ชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับสอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (พ.ศ. 2549)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปี งบประมาณ 2550