รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ฤทธิ์เบื้องต้นของดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแหน

(Preliminary Screening of *Tagetes minuta* and *Chrysanthemum indicum* Flowers on Duckweed Growth)

คณะผู้วิจัย

1.**ภญ.ผศ.นุชนาฏ กิจเจริญ**
2.**ภญ.รศ.ดร.ศรีสมบัติ นวนพรัตน์สกุล**
3.**ภญ.ผศ.ดร.ปัทมวรรณ เผือกผ่อง**

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ซึ่งให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัยประจำปี 2553 สำหรับงานวิจัยนี้ รวมทั้งการอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ ในการทำวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาเภสัชเวท และภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่สำหรับการวิจัย

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย ฤทธิ์เบื้องต้นของดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแหน
(Preliminary Screening of *Tagetes minuta* and *Chrysanthemum indicum* Flowers on Duckweed Growth)

ชื่อผู้วิจัย
1. ภญ.ผศ.นุชนาฏ กิจเจริญ
2. ภญ.รศ.ดร.ศรีสมบัติ นวนพรัตน์สกุล
3. ภญ.ผศ.ดร.ปัทมวรรณ เผือกผ่อง

หน่วยงานที่สังกัด คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ปีงบประมาณ 2553

บทคัดย่อ

ในทางเกษตรกรรมมีการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่นการนำมาใช้เป็นสารกำจัดศัตรูพืช (Pesticides) ซึ่งมักมุ่งเน้นการกำจัดแมลง (Insecticides) แต่วัชพืชก็เป็นอีกหนึ่งปัญหาที่สำคัญเช่นกัน ซึ่งการกำจัดวัชพืชนั้นส่วนใหญ่เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีสังเคราะห์เป็นหลัก เนื่องจากเห็นผลเร็ว แต่ทำให้เกิดปัญหาการตกค้างในสิ่งแวดล้อม และเป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้เองด้วย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) โดยแยกสกัดด้วย methanol และน้ำ (ดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) นั้นจะมีการนำกากของพืชหลังจากต้มกับน้ำแล้วไปสกัดต่อด้วย Methanol ด้วย) วิธีการที่ใช้ในการทดสอบ คือ Lemna phytotoxicity assay ซึ่งเป็นการตรวจสอบการเจริญเติบโตของแหน (Duckweed, *Lemna minor*) ในสารสกัดต่างๆ ของพืชสมุนไพรที่ใช้ทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่สารสกัดลงไป วิธีการทดสอบเบื้องต้นนี้เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในการนำมาเป็นรูปแบบ (model) ในการศึกษาวิจัยเพื่อศึกษาผลต่อการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวต่อการทดสอบสูง และไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย

ผลการวิจัยฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) นี้ โดยดูค่า EC_{10}, EC_{20} และ EC_{50} พบว่าดอกดาวเรืองที่สกัดด้วย methanol มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ดีที่สุด (EC_{10} เท่ากับ 95.58 µg/ml, EC_{20} เท่ากับ 108.11 µg/ml และ EC_{50} เท่ากับ 156.47 µg/ml) รองลงมาคือดอกดาวเรืองที่สกัดด้วยน้ำ (EC_{10} เท่ากับ 107.59 µg/ml, EC_{20} เท่ากับ 140.26 µg/ml และ EC_{50} เท่ากับ 310.75 µg/ml) ส่วนสารสกัดจากดอก

เบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วย methanol และที่สกัดด้วยน้ำ และกากจากการสกัดด้วยน้ำที่สกัดต่อด้วย methanol นั้น ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ทั้ง 3 สารสกัด แต่มีผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (EC_{10} เท่ากับ 227.44, 277.68 และ 212.22 µg/ml ตามลำดับ) โดยสารสกัดในชั้นน้ำให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้น้อยที่สุด (EC_{10} เท่ากับ 277.68 µg/ml)

ผลการตรวจสอบกลุ่มสารเคมีในสารสกัดจากดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) พบว่าพืชทั้งสองชนิดนี้มีองค์ประกอบของสารเคมีคล้ายๆ กัน คือพบสาร Phenolic compounds ในกลุ่มของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) โดยอยู่ในรูปของ glycosides (Flavonoids glycosides) นอกจากนี้ยังตรวจพบสารที่มีโครงสร้างหลักของ Steroids อยู่ในพืชทั้งสองชนิดนี้ด้วย (พบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วย methanol เท่านั้น) ส่วนในสารกัดด้วยน้ำของดอกดาวเรือง และสารสกัดกากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำแล้วนำมาสกัดต่อด้วย methanol นั้นตรวจพบ Triterpenoid saponins ส่วนสารสกัดดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ด้วยน้ำนั้นตรวจสอบไม่พบสารพฤกษเคมีหลักใดๆ นอกจากน้ำตาล และส่วนโครงสร้าง phenolic group เท่านั้น ทั้งดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) นี้ตรวจสอบแล้วไม่พบสารในกลุ่ม Alkaloids

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Research Title Preliminary Screening of *Tagetes minuta* and *Chrysanthemum indicum* Flowers on Duckweed Growth

Researcher 1. Assist.Prof. Nudchanart Kitcharoen

2. Assoc.Prof. Dr. Srisombat Nawanopparatsakul

3. Assist.Prof.Dr. Patamawan Phuagphong

Office Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

Research Grants Faculty of Pharmacy, Silpakorn University

Abstract

In agriculture, some plants are implemented as pesticides with a focus on insects (insecticides). Weeds is an another important issue as well which they are mostly managed by the synthetic chemicals since rapid results. However, weed control with widespread use of chemical herbicides may also pose questions about their potential health impacts and environmental effects due to residual activity and/or soil and groundwater contamination.

This study, therefore, was aimed at screening the inhibitory effects of various aqueous and methonolic extracts from two species (*Tagetes minuta* (TM) and *Chrysanthemum indicum* (CI) flowers) of flowering plants in Compositae family on plant growth using Lemna phytotoxicity assay.

Dried flowers of TM and CI were serially extracted with methanol and water (for CI, the marc from water extract is repeatly extracted with methanol) and used to test if they exhibited inhibitory effects on *Lemna minor* growth compared with medium as negative control in the Lemna phytotoxicity assay. This assay has been an acceptable, sensitive, simple and inexpensive screening test for phytotoxic effects.

The inhibition activities of extracts was determined by serial dilutions of each extract and expressed as effective concentrations that resulted in 10% (EC_{10}), 20% (EC_{20}) and 50% (EC_{50}) inhibition of duckweed growth.

Our results showed that methonolic extracts of TM had greatest inhibitory effects with EC_{10}, EC_{20}, and EC_{50} of 95.58, 108.11, and 156.47 µg/ml respectively. Aqueous extracts of TM had the second most inhibitory effects with EC_{10}, EC_{20}, and EC_{50} of 107.59, 140.26, and 310.75 µg/ml respectively.

Extracts of CI were shown to have much less inhibition activity. Methanolic extract and methanolic extract of marc from water extract of CI had EC_{10} of 227.44 and 212.22 µg/ml respectively, while aqueous extract of CI was shown to have the least inhibitory effect (EC_{10} = 277.68 µg/ml) on duckweed growth.

A phytochemical screening of TM and CI flowers showed similar patterns of chemical compositions, the major constituent being flavonoid glycoside. Besides, steroidal structures were present only in methanolic extracts from both species of plants. Triterpenoid saponins were detected in both aqueous extracts of TM and methanolic extracts of marc from water extracts of CI. As expected, aqueous extract of CI was shown to contain no other phytochemical except sugars and phenolic group moiety structure. Alkaloids were not detected in both species of plants.

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ i

บทคัดย่อภาษาไทย ii

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ iv

สารบัญเรื่อง vi

สารบัญตาราง vii

สารบัญรูป viii

คำอธิบายศัพท์ สัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย ix

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย 4

1. การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพร 4
2. การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชโดยวิธี Lemna Phytotoxicity Assay 4
3. การตรวจสอบกลุ่มสารเคมีในพืชโดยการทำ Phytochemical Screening 7

บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 9

1. ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนโดยวิธี Lemna Phytotoxicity Assay 9
2. การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี (Phytochemical Screening) ของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) 24

บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ 29

บทที่ 5 เอกสารอ้างอิง (References) 31

ภาคผนวก

ตารางแสดงสูตรอาหารเพาะเลี้ยงแหน E-medium 33

ตาราง Probit transform values 34

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตารางแสดงสูตรอาหารเพาะเลี้ยงแหน (E-medium) 5

ตารางที่ 2 จำนวนใบของแหน (frond number) ในสารสกัดจากดอกดาวเรือง ในวันที่ 7 10

ตารางที่ 3 จำนวนใบของแหน (frond number) ในสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ในวันที่ 7 11

ตารางที่ 4 อัตราการเจริญเติบโต (Relative growth rate, RGR) และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (% Inhibition of growth rate, % GR Inhibition) ของแหนในสารสกัดจากดอกดาวเรือง 14

ตารางที่ 5 อัตราการเจริญเติบโต (Relative growth rate, RGR) และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (% Inhibition of growth rate, % GR Inhibition) ของแหนในสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) 15

ตารางที่ 6 ค่า EC_{10}, EC_{20} และ EC_{50} ของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่สกัดด้วย methanol และที่สกัดด้วยน้ำ (Water) 19

ตารางที่ 7 ค่า EC_{10}, EC_{20} และ EC_{50} ของสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วย methanol และที่สกัดด้วยน้ำ (Water) และสารสกัดจากกากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำ แล้วสกัดต่อด้วย methanol 21

ตารางที่ 8 ค่า EC_{10}, EC_{20} และ EC_{50} ของสารมาตรฐาน Copper sulfate ($CuSO_4$) 22

ตารางที่ 9 ค่า EC_{10}, EC_{20} และ EC_{50} ของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ methanol และน้ำ (สำหรับดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำนั้นจะมีการนำกากมาสกัดต่อด้วย methanol อีกครั้ง) รวมทั้งสารมาตรฐาน Copper sulfate ($CuSO_4$) 23

ตารางที่ 10 การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี (Phytochemical screening) ของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ด้วย methanol และน้ำ (โดยในกรณีของดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำ กากที่เหลือจะนำมาสกัดต่อด้วยเมทานอลด้วย) 27

ตารางแสดงสูตรอาหารเพาะเลี้ยงแหน E-medium 32

ตาราง Probit transform values 33

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่สกัดด้วย methanol 18

รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่สกัดด้วยน้ำ 18

รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วย methanol 20

รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำ 20

รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารสกัดจากกากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำ แล้วสกัดต่อด้วย methanol 21

รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารมาตรฐาน Copper sulfate ($CuSO_4$) 22

คำอธิบายศัพท์ สัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในงานวิจัย

Chrysanthemum indicum	=	ชื่อวิทยาศาสตร์ของเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย)
$CuSO_4$	=	Copper sulphate, เป็นสารมาตรฐานในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหน
Duckweed	=	แหน
EC_x	=	Effective concentration, เป็นความเข้มข้นของสารที่มีผลยับยั้งการเจริญของพืชได้ X %
E – medium	=	อาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงแหน
Frond	=	ใบเล็กๆ แต่ละใบของแหนที่รวมกันอยู่เป็นกลุ่ม
Frond number	=	จำนวนใบเล็กๆ ทั้งหมดที่ตรวจนับได้
Lemna	=	แหน
Lemna minor	=	ชื่อวิทยาศาสตร์ของแหน
mg	=	milligram
ml	=	milliliter
ppm	=	part per million, หนึ่งส่วนในล้านส่วน
SD	=	standard deviation
µg	=	microgram
Tagetes minuta	=	ชื่อวิทยาศาสตร์ของดาวเรือง

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันในทางเกษตรกรรมมีการใช้สารเคมีสังเคราะห์จำนวนมาก ซึ่งสารเคมีสังเคราะห์เหล่านี้ส่วนใหญ่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตสูง และมักมีการตกค้างสะสมในธรรมชาติ เมื่อมีการใช้สารเหล่านี้เป็นจำนวนมากย่อมทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกร รวมทั้งเกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและระบบนิเวศวิทยา นอกจากนี้สารเคมีบางส่วนที่มีการตกค้างในพืช ผัก ผลไม้ และอาหารทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ไม่เพียงแต่ประเทศไทยเท่านั้นที่ตระหนักถึงปัญหานี้ ประเทศต่างๆ ทั่วโลกล้วนต่างตื่นตัวในกระแสเรื่องสิ่งแวดล้อมและการบริโภคเพื่อสุขภาพ[1] ทำให้ผู้บริโภคตระหนักถึงความปลอดภัยในการบริโภคอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากขึ้น และนำไปสู่การศึกษาวิจัยเพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีสังเคราะห์ และเพิ่มการใช้สารที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมแทน

ในประเทศไทยตั้งแต่อดีตมาแล้วนั้นมีการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆอย่างหลากหลายโดยอาศัยภูมิปัญญาชาวบ้าน ในทางเกษตรกรรมมีการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์เช่นเดียวกัน ประโยชน์หนึ่งที่มีการนำมาใช้คือนำมาเป็นสารกำจัดศัตรูพืช (Pesticides) โดยมุ่งเน้นการกำจัดแมลง (Insecticides) เช่น ยาสูบ สะเดา ข่า เป็นต้น ซึ่งการใช้สารจากสมุนไพรนี้นอกจากให้ผลดีแล้วยังช่วยลดปัญหาการตกค้างของสารเคมีสังเคราะห์ในสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งที่สำคัญของประเทศไทย อย่างไรก็ตามปัญหาทางด้านเกษตรกรรมไม่ได้มีเฉพาะเรื่องของแมลงศัตรูพืชเท่านั้น วัชพืชก็เป็นอีกหนึ่งปัญหาที่สำคัญเช่นกัน โดยการกำจัดวัชพืชนั้นส่วนใหญ่เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีสังเคราะห์เป็นหลัก[1-2] เนื่องจากเห็นผลเร็ว แต่เกิดปัญหาการตกค้างในสิ่งแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศและยังเป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้เองด้วย

สารกำจัดวัชพืช (Herbicides หรือ Weedicides) คือ สารเคมีใดๆ ที่ใช้ในการกำจัดหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืช ซึ่งแย่งน้ำ อาหาร และแสงสว่างจากพืชที่เพาะปลูก ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลิตผลทางการเกษตร[2-3] ดังนั้นสารกำจัดวัชพืชจึงมีบทบาทสำคัญต่อการเกษตร ปัจจุบันมีการใช้สารกำจัดวัชพืชอย่างกว้างขวาง มีการใช้ทั้งในนาข้าว ในพืชสวน และพืชไร่ ใช้ทั้งก่อนปลูกและหลังปลูก เมื่อมีความนิยมใช้สารกำจัดวัชพืชกันเพิ่มขึ้น จึงทำให้สารเคมีเหล่านี้กระจายและสะสมตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ในดิน ในน้ำ ในอากาศ และในอาหารที่ใช้บริโภค ในประเทศไทยสารกำจัดวัชพืชส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ซึ่งทำให้เกิดปัญหาทางพิษวิทยาที่สำคัญและมีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น นอกจากนี้สารเคมีสังเคราะห์ยังทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาของวัชพืชได้อีกด้วย [2-4]

การศึกษาฤทธิ์ของพืชสมุนไพรเพื่อนำมาใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชนั้นมีน้อยมาก ทั้งๆที่มีรายงานการพบสารเคมีในพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช[5-13] ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการทราบว่าสมุนไพรที่มีฤทธิ์กำจัดแมลงนั้นจะมีฤทธิ์ต่อการเจริญเติบโตของพืชด้วยหรือไม่ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นสารกำจัดวัชพืชต่อไป จากการทบทวนวรรณกรรมพืชกำจัดแมลงมีหลายชนิด[14-15] ได้แก่ ยาสูบ สะเดา ข่า หางไหลหรือโล่ติ๊น น้อยหน่า กระเทียม ดาวเรือง และใบสะระแหน่ เป็นต้น ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยมีความสนใจในการทดสอบพืชที่ใช้ส่วนของดอกมาทดสอบ และจากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีดอกของพืชที่อาจจะมีฤทธิ์ที่สนใจแต่พบได้ในประเทศไทยไม่มากนัก ได้แก่ดอกดาวเรือง และนอกจากนี้ยังมีดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่ถึงแม้ว่าจะไม่ได้มีรายงานว่ามีฤทธิ์กำจัดแมลง แต่เนื่องจากเป็นพืชในสกุลเดียวกับไพรีทรัม (*Chrysanthemum cinerariifolium*) ซึ่งมีสาร Pyrethrins ซึ่งใช้กำจัดแมลงได้ดี[14-15] จึงเลือกพืช 2 ชนิดนี้มาศึกษา

ดาวเรือง (marigold) [14-15] เป็นพืชล้มลุกที่อยู่ในสกุล *Tagetes* มีหลายชนิด อยู่ในวงศ์ Compositae ดอกดาวเรืองนอกจากจะนำไปใช้ประโยชน์ในแง่ของไม้ตัดดอกตบแต่งอาคารเพื่อความสวยงามแล้ว ยังสามารถนำดอกดาวเรืองมาประยุกต์ใช้เป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชได้อีกด้วย เพราะดอกและใบมีกลิ่นฉุน แมลงจึงไม่อยากเข้าใกล้ สารที่พบในดอกดาวเรืองมีหลายกลุ่ม ได้แก่ น้ำมันหอมระเหย และสารสีในกลุ่ม xanthophylls เช่น lutein เป็นต้น

เบญจมาศสวน หรือดอกเก๊กฮวย เป็นพืชล้มลุก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Chrysanthemum indicum* อยู่ในวงศ์ Compositae เป็นพืชในสกุลเดียวกับไพรีทรัม (*Chrysanthemum cinerariifolium*) [14-15] ซึ่งมีสาร Pyrethrins มีฤทธิ์กำจัดแมลงได้ดี ดอกเบญจมาศสวนหรือดอกเก๊กฮวยนี้เป็นที่รู้จักกันดีในแง่ของการนำมาต้มกับน้ำ ใช้เป็นเครื่องดื่มกันอย่างแพร่หลาย สารที่พบในดอกได้แก่ น้ำมันหอมระเหย flavonoids และสารสีในกลุ่ม carotenoids เป็นต้น

วิธีที่ใช้ในการศึกษาเบื้องต้น (preliminary screening) เพื่อค้นหาสารที่อาจมีฤทธิ์กำจัดวัชพืชคือ Lemna phytotoxicity assay[16-18] ซึ่งเป็นการดูผลต่อการเจริญเติบโตของวัชพืชแหน วิธีนี้เป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาวิจัย มีความไวต่อการทดสอบสูงและไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย[17,18] การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธีนี้จะทำให้ทราบฤทธิ์ของสารสกัดดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ว่ามีฤทธิ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชหรือไม่

จากผลการศึกษาที่ได้ครั้งนี้ ถ้าสารสกัดพืชสมุนไพรเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช (แหน) ซึ่งอาจมีผลในการช่วยกำจัดวัชพืช[17] ทำให้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อศึกษาให้เฉพาะกับชนิดของวัชพืชอื่นต่อไป ทำให้ได้สมุนไพรใหม่ๆ เป็นสารกำจัดวัชพืชแทนสารเคมีสังเคราะห์ที่ทำให้เกิดผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตและระบบนิเวศได้ และยังจะเป็นการเพิ่มคุณค่า (value-added) ของดอกไม้ 2 ชนิดนี้ด้วย ทั้งยังช่วยลดต้นทุนของเกษตรกร

ในการซื้อสารเคมีราคาแพง และลดการนำเข้าสารเคมีสังเคราะห์จากต่างประเทศอีกด้วย โดยในการทดสอบนั้นจะมีการทดสอบสารสกัดจากดอกดาวเรืองแห้งซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ใช้แล้วจากการทำมาลัยดอกไม้สดต่างๆ (ในงานวิจัยนี้จัดหาตัวอย่างเป็นดอกดาวเรืองสดแล้วนำมาทำให้แห้ง) และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) นั้นจะมีการทดสอบสารสกัดจากกากของพืชหลังจากนำไปต้มเป็นน้ำเก๊กฮวยแล้วด้วย (เพื่อดูว่ากากที่เหลือทิ้งจากการต้มน้ำเก๊กฮวยแล้วยังสามารถนำมาใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชได้หรือไม่)

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

<u>การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพร</u>

1. ดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ได้ในรูปดอกแห้งจากร้านค้า
2. ดอกดาวเรืองสดจากร้านค้านำมาดึงกลีบออกเป็นชิ้นๆ (แบบสด)
3. นำดอกดาวเรืองในข้อ 2 มาอบที่อุณหภูมิประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส ใน hot air oven ให้แห้ง (แบบแห้ง)
4. นำพืชแห้งแต่ละชนิดมาแยกสกัดด้วยน้ำ และ เมทานอล (ในสัดส่วน 1:10) โดยใช้ความร้อนช่วย (digestion) และมีการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง ในกรณีของดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำ กากที่เหลือจะนำมาสกัดด้วยเมทานอลด้วย
5. กรองและนำสารสกัดที่ได้ไประเหยจนแห้ง โดยใช้เครื่อง Rotary evaporator ได้สารสกัดหยาบ (crude extracts)
6. นำสารสกัดหยาบที่ได้เก็บไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดสอบต่อไป

<u>การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช โดยวิธี</u> <u>Lemna Phytotoxicity Assay</u> [16-18]

I. การเก็บและการเตรียมแหน

1. นำแหนมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงหรือจากบ่อน้ำตามธรรมชาติ
2. ล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาดและเลือกแต่แหนที่สมบูรณ์มาใช้
3. ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง (ทำใน lamina air flow hood)
4. นำแหนที่ได้จาก ข้อ 3 เลี้ยงในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแหน (E - medium) ที่ปราศจากเชื้อที่เตรียมไว้ และเพาะเลี้ยงไว้ในห้องอุณหภูมิ 25$\pm$ 2 องศาเซลเซียส และมีแสงตลอดเวลา
5. นำแหน จากข้อ 4 นี้สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป

II. การเตรียม Culture medium (E-medium) สำหรับแหน

ตารางที่ 1 ตารางแสดงสูตรอาหารเพาะเลี้ยงแหน (E-medium)

ในอาหารเหลว 1 ลิตร ประกอบไปด้วยสารต่อไปนี้

ชื่อสาร	***ปริมาณ (mg)***
KH_2PO_4	680
KNO_3	1515
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1180
$MgSO_4.7H_2O$	492
H_3BO_3	2.86
$MnCl_2$	3.62
$ZnSO_4.7H_2O$	0.22
$CuSO_4.5H_2O$	0.08
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.12
$FeCl_3.6H_2O$	5.40
EDTA	11.2

การเตรียมอาหารสูตร E-medium สำหรับเพาะเลี้ยงแหน

1. ผสมสารต่างๆ ตามสูตรในน้ำกลั่นให้ครบปริมาตรที่ต้องการ
2. ปรับ pH ให้ได้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0
3. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ โดยการนำไปเข้า autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
4. รอให้เย็น และใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์การเจริญเติบโตของแหนต่อไป

III. Lemna phytotoxicity assay

1. เตรียม culture medium (E-medium) สำหรับใช้ในการเลี้ยงแหน และใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับเจือจางสารสกัดจากพืชเพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆสำหรับการทดสอบฤทธิ์
2. ละลายสารสกัดหยาบจากพืชให้ได้ความเข้มข้นที่แน่นอน
3. เตรียมขวดแก้ว (vials) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ โดยใส่สารสกัดให้มีความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชแต่ละการทดสอบ 6 ความเข้มข้น ในช่วง 1-1000 μg/ml (100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 μg/ml) และมี negative control (ไม่ใส่สารสกัดจากพืช) และ positive control คือ Copper sulfate ($CuSO_4$) โดยทำ triplicate ในแต่ละการทดสอบ

4. นำแหนที่เพาะเลี้ยงไว้ เลือกเฉพาะกลุ่มที่มี 2-4 ใบ (2-4 fronds) มาใช้ โดยใส่แต่ละ vials ให้ได้ 15 ใบ (15 fronds / vial)
5. ปิดฝา vials และนำไปเพาะเลี้ยงในห้องอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียสและให้แสงตลอดเวลา
6. สังเกตความเปลี่ยนแปลงต่างๆ โดยใช้แว่นขยายช่วย ในวันที่ 3, 5 และ 7 ของการทดสอบ โดยในวันที่ 7 จะมีการนับจำนวนใบของแหน (frond number) ที่มีอยู่ด้วย

หมายเหตุ

1. ใช้จำนวนใบของกลุ่มควบคุม (negative control) ในวันที่ 7 เป็นตัวเปรียบเทียบการเจริญเติบโตกับกลุ่มทดสอบต่างๆ
2. วิเคราะห์ข้อมูลและเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของสารสกัดจากพืชต่างๆ โดยดูค่า EC_{10} EC_{20} และ EC_{50}

IV. การวิเคราะห์ข้อมูล

1. หาอัตราการเจริญเติบโต (relative growth rate) ของแหนในสารสกัดต่างๆ และในกลุ่มควบคุม (negative) โดยใช้สูตรดังนี้

Relative growth rate (RGR) / วัน = $Ln(N_t / N_0)$ / *จำนวนวัน*

N_t = จำนวนใบ (fronds) ในความเข้มข้นนั้นๆ หลังจากผ่านไป 7 วัน (วันที่ 7)

N_0 = จำนวนใบ (fronds) เริ่มต้น (วันที่ 0) ในความเข้มข้นนั้นๆ เมื่อเริ่มต้นการทดลอง (ในการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 15 ในทุกขวด)

จำนวนวัน ในการทดลองนี้เท่ากับ 7

2. หา % inhibition relative growth rate ในวันที่ 7 เทียบกับกลุ่มควบคุม (negative) โดยใช้สูตรดังนี้

Percent inhibition of relative growth rate (% GR Inh) = $(RGR_C - RGR_T) / RGR_C$ *X 100*

RGR_C = ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average relative growth rate, Average RGR) ของแหนในกลุ่ม negative control

RGR_T = ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average relative growth rate, Average RGR) ของแหนในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดต่างๆ รวมถึง positive control ด้วย

3. plot กราฟระหว่าง % inhibition (แกน Y) กับ ความเข้มข้น (แกน X) โดยทำทุกความเข้มข้น
4. หาค่า EC_{10} EC_{20} และ EC_{50} จากกราฟที่ได้
5. เปรียบเทียบค่า EC_{10} EC_{20} และ EC_{50} ของสารสกัดที่ได้จากพืชสมุนไพรแต่ละชนิด

<u>การตรวจสอบกลุ่มสารเคมีในพืช โดยการทำ Phytochemical screening</u> [19]

องค์ประกอบทางเคมีของพืชสมุนไพรแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน จึงส่งผลต่อการแสดงสรรพคุณ และการเตรียมสมุนไพรนั้นเพื่อใช้เป็นยา การศึกษาชนิดของกลุ่มสารเคมีในพืช (phytochemicals) มีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตยาจากพืชสมุนไพร การทราบชนิดของกลุ่มสารที่พบในพืช ยังแสดงถึงสรรพคุณและความเป็นพิษของพืชนั้นอย่างคร่าวๆ ได้อีกด้วย เช่นหากพบว่าพืชนั้นมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารกลุ่ม tannins พืชนั้นอาจมีฤทธิ์ฝาดสมาน ถ้าพบสารกลุ่ม cardiac glycosides พืชนั้นอาจมีผลต่อการทำงานของหัวใจ เป็นต้น

การตรวจสอบทำได้โดยนำสารสกัดหยาบจากพืชแต่ละชนิดมาทดสอบกับ reagent ต่างๆ ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีบางกลุ่มที่มีอยู่ในกลุ่มสารต่างๆ ที่มีอยู่ในพืช[19] ทำให้ตรวจสอบกลุ่มสารต่างๆ ที่มีอยู่ในพืชได้ ได้แก่ phenolic compounds, tannins, flavonoids, coumarins, anthraquinones, steroids, triterpenoids, saponins, cardiac glycosides และ alkaloids

การตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีบางกลุ่มที่มีอยู่ในกลุ่มสารต่างๆ ที่มีอยู่ในพืช สามารถทำได้โดยการทดสอบด้วยวิธีต่างๆ หรือ reagent test ต่างๆ ดังนี้

1. การตรวจสอบ*สารกลุ่ม tannins:* หยด *2% gelatin solution* 1-2 หยดลงไปในสารสกัดที่ละลายด้วยน้ำ แล้วสังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น
2. การตรวจสอบ*สารกลุ่ม saponins:* ใช้วิธี *Foam test* โดยเขย่าสารสกัดที่ละลายด้วยน้ำแรงๆ แล้วสังเกตฟองที่เกิดขึ้น
3. การตรวจสอบ*โครงสร้าง phenolic:* หยด $FeCl_3$ *T.S.* 1-2 หยดลงไปในสารสกัดที่ละลายด้วยน้ำหรือแอลกอฮอล์ แล้วดูสีและตะกอนที่เกิดขึ้น
4. การตรวจสอบ*สารกลุ่ม flavonoids:* ใช้วิธี *cyanidin test* โดยใส่ magnesium ribbon 1-2 ชิ้น ลงไปในสารสกัดที่ละลายด้วยแอลกอฮอล์ หยดกรด hydrochloric เข้มข้นลงไป 2-3 หยด แล้วดูสีที่เกิดขึ้น โดยถ้าสารสกัดมีสีเข้มรบกวน ให้สังเกตสีที่ฟองที่เกิดขึ้น
5. การตรวจสอบ*น้ำตาล:* ใช้วิธี *Molisch's test* โดยหยด 5% α-naphthol ใน alcohol 1-2 หยดลงไปในสารสกัดที่ละลายด้วยแอลกอฮอล์ เขย่าให้เข้ากัน แล้วค่อยๆ รินกรด sulfuric เข้มข้นให้ไหลลงไปอยู่ที่ก้นหลอดทดลองจนเห็นการแยกชั้นกับสารสกัด แล้วสังเกตสีของวงแหวนที่เกิดขึ้น
6. การตรวจสอบ*โครงสร้าง unsaturated lactone ring:* หยด *Kedde reagent A* 1-2 หยดลงไปในสารสกัดที่ละลายด้วยแอลกอฮอล์ เขย่าให้เข้ากัน แล้วหยด *Kedde reagent B* 1-2 หยดตามลงไป สังเกตสีที่เกิดขึ้น โดยควรทำ blank ไว้เปรียบเทียบด้วย

7. การตรวจสอบ*สารกลุ่ม anthraquinones:* ใช้วิธี *Borntrager test* โดยเตรียมสารสกัดที่ละลายด้วยแอลกอฮอล์ให้มีความเข้มข้นมากสักหน่อย เติมกรด 10-20 % hydrochloric ลงไปในปริมาตรที่เท่ากันกับสารสกัดเข้มข้น แล้วนำไปให้ความร้อนโดยการต้มในหม้ออังไอน้ำ หรือตั้งบน hot plate โดยตรง สัก 2-3 นาที รอให้เย็น แล้วสกัดด้วย ethyl acetate โดยการเขย่าในหลอดทดลอง แยกสารสกัดชั้น ethyl acetate ออกมาใส่หลอดทดลองอันใหม่ แล้วเติม 10 % alkaline solution เช่น KOH, NaOH หรือ NH_4OH ลงไป 1-2 ml แล้วเขย่า และสังเกตสีในชั้นทั้งสอง
8. การตรวจสอบ d*eoxy sugars:* ใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก *Kiliani test* โดยเติม $FeCl_3$ T.S. 1-2 หยดลงไปในสารสกัดที่ละลายด้วยแอลกอฮอล์ เขย่าให้เข้ากัน แล้วค่อยๆ รินกรด sulfuric เข้มข้นให้ไหลลงไปอยู่ที่ก้นหลอดทดลองจนเห็นการแยกชั้นกับสารสกัด แล้วสังเกตสีของวงแหวนที่เกิดขึ้น
9. การตรวจสอบ*สารกลุ่ม triterpenes / steroids:* ใช้วิธี *Liebermann-Burchard test* โดยหยด acetic anhydride 1-2 หยด ลงในสารสกัดที่แห้ง คนให้ละลาย แล้วหยดกรด sulfuric เข้มข้น ลงข้างๆ ให้ค่อยๆ ไหลไปสัมผัสกับสาร สังเกตสีที่เกิดขึ้นทันทีและต่อไปอีก 1-2 นาที
10. การตรวจสอบ*สารกลุ่ม alkaloids:* หยด *Dragendorff's reagent* ลงในสารสกัดที่เข้มข้นและละลายด้วยกรด 10 % hydrochloric และกรองแล้ว (ถ้ามีตะกอน) แล้วสังเกตตะกอนและสีตะกอนที่เกิดขึ้น

บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนโดยวิธี Lemna Phytotoxicity Assay

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแหน โดยวิธี Lemna Phytotoxicity Assay นั้น ทำได้โดยเตรียม culture medium (E- medium) สำหรับใช้ในการเลี้ยงแหนและใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับเจือจางสารสกัดจากพืชเพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับการทดสอบฤทธิ์ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์มี 6 ความเข้มข้น คือ 100, 200, 400, 600, 800 และ 1000 µg/ml (ppm) โดยทำแบบ 3 ซ้ำ (triplicate) และใช้สารละลาย Copper sulfate ($CuSO_4$) 10 µg/ml (ppm) เป็น positive control

การวิเคราะห์ข้อมูลจากการเพาะเลี้ยงแหนทำได้โดยการหาอัตราการเจริญเติบโต (relative growth rate) และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหน (% Inhibition of growth rate, % GR Inhibition) ของสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับ negative control ที่ไม่มีการใส่สารสกัดลงไป คือจะเป็นอาหารเลี้ยงแหน (E-medium) เพียงอย่างเดียว ซึ่งได้จากผลการเจริญเติบโตของแหน ซึ่งดูจากจำนวนใบของแหนที่นับได้ในวันที่ 7 (day 7) เมื่อเทียบกับจำนวนใบของแหนที่ใส่ลงไปในวันเริ่มแรกของการทดลอง (day 0) ซึ่งสำหรับการทดลองในครั้งนี้ คือ 15 ใบในทุกๆ การทดสอบ

1.1 จำนวนใบของแหน (Frond number) ในการเลี้ยงเมื่อเริ่มต้น (วันที่ 0) และวันที่ 7 ของการทดลอง

เมื่อเลี้ยงแหนในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C และวางบนชั้นวางขวดที่มีการเปิดไฟสว่างตลอด 24 ชั่วโมง โดยในแต่ละขวดจะใส่แหนลงไป 15 ใบในวันเริ่มต้น (วันที่ 0) เมื่อครบ 7 วัน (วันที่ 7) ก็จะทำการนับจำนวนใบของแหน (frond number) ในแต่ละขวด และบันทึกข้อมูล โดยในการทดลองแต่ละครั้งจะมีตัวควบคุมทั้งที่เป็น positive control ซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ดี ในการทดลองนี้ใช้ Copper sulfate ($CuSO_4$) และมี negative control ซึ่งเป็นการเจริญเติบโตแบบปกติของแหน จะไม่มีการใส่สารสกัด หรือสารมาตรฐานลงไป โดยจะมีเพียงแต่อาหารเหลวเลี้ยงแหนเท่านั้น ซึ่งในการทดลองนี้ใช้สารอาหารเหลวที่เรียกว่า E-medium

ผลการทดลองสำหรับสารสกัดของพืชแต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 2 - 3

1.1.1 **สำหรับสารสกัดดอกดาวเรือง (ตารางที่** 2)

ตารางที่ 2 จำนวนใบของแหน (frond number) ในสารสกัดจากดอกดาวเรือง ในวันที่ 7

		Day 0	**Day 7**		
	conc. **(µg/ml or ppm)**	จำนวนใบเริ่มต้น (frond no) ในแต่ละขวด	**frond no**		
			ขวด 1	ขวด 2	ขวด 3
MeOH Extract	1000	15	7	1	1
	800	15	4	1	6
	600	15	12	10	12
	400	15	15	10	19
	200	15	27	26	25
	100	15	50	46	42
Water Extract	1000	15	16	10	13
	800	15	12	18	17
	600	15	38	40	22
	400	15	48	38	32
	200	15	50	40	48
	100	15	54	62	52
CuSO4	10	15	9	5	5
Control	-	15	70	82	76

1.1.2 **สำหรับสารสกัดดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) (ตารางที่** 3)

ตารางที่ 3 จำนวนใบของแหน (frond number) ในสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ในวันที่ 7

		Day 0	Day 7		
	conc. (µg/ml or ppm)	จำนวนใบเริ่มต้น (frond no) ในแต่ละขวด	frond no		
			ขวด 1	ขวด 2	ขวด 3
MeOH Extract	1000	15	37	45	50
	800	15	45	46	47
	600	15	53	52	56
	400	15	49	48	66
	200	15	79	91	85
	100	15	119	87	104
Water Extract	1000	15	57	49	55
	800	15	76	84	60
	600	15	73	66	81
	400	15	75	67	73
	200	15	100	88	86
	100	15	82	98	97
กากที่เหลือจากการสกัดด้วยน้ำนำมาสกัดต่อด้วย MeOH	1000	15	44	54	54
	800	15	50	60	75
	600	15	55	73	90
	400	15	71	79	76
	200	15	71	76	89
	100	15	72	87	80
CuSO4	10	15	20	13	15
Control	-	15	89	94	89

1.2 **อัตราการเจริญเติบโต** (Relative growth rate, RGR) **และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต** (% Inhibition of growth rate, % GR Inhibition) **ของแหนในสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม** (Negative และ Positive control)

อัตราการเจริญเติบโต (Relative growth rate, RGR) ของแหนดูจากจำนวนใบที่เพิ่มมากขึ้นในแต่ละขวดในวันที่ 7 เทียบกับจำนวนใบในวันเริ่มต้น (วันที่ 0) ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 – 3 โดยจะคำนวณออกมาเป็นอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน ดังนี้

$$\textit{Relative growth rate (RGR) / วัน} = Ln(N_t / N_0) / \textit{จำนวนวัน}$$

N_t = จำนวนใบ (fronds) ในความเข้มข้นนั้นๆ หลังจากผ่านไป 7 วัน (วันที่ 7)

N_0 = จำนวนใบ (fronds) เริ่มต้น (วันที่ 0) ในความเข้มข้นนั้นๆ เมื่อเริ่มต้นการทดลอง (ในการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 15 ในทุกขวด)

จำนวนวัน ในการทดลองนี้เท่ากับ 7

หลังจากนั้นจะหาค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average relative growth rate, Average RGR) ของแหนในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด ในสารมาตรฐาน หรือ positive control ($CuSO_4$) และใน negative control (ไม่ใส่สารสกัด หรือสารมาตรฐานสำหรับทดสอบ มีเพียงอาหารเลี้ยงแหนเท่านั้น) ขั้นต่อไปจะใช้ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของแหนในกลุ่ม negative control ซึ่งจัดเป็นอัตราการเจริญเติบโตปกติมาเป็นตัวเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของแหนในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัด แล้วคำนวณออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหน (% Inhibition of growth rate, % GR Inhibition) ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดได้ ส่วน positive control ซึ่งเป็นสารที่ทราบกันดีว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้ โดยในการทดลองนี้ใช้ $CuSO_4$ เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาความเชื่อถือได้ของข้อมูลในแต่ละครั้งที่ทำการทดลอง โดยดูว่า positive control สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้จริงในแต่ละครั้งของการทดลอง

Percent inhibition of growth rate (% GR Inhibition) ของแหนในสารสกัดจากพืชต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Negative control) ในวันที่ 7 คำนวณได้ตามสูตร ดังนี้

$$\textit{Percent inhibition of growth rate (\% GR Inh)} = (RGR_C - RGR_T) / RGR_C \times 100$$

RGR_C = ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average relative growth rate, Average RGR) ของแหนในกลุ่ม negative control

RGR_T = ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average relative growth rate, Average RGR) ของแหนในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดต่างๆ รวมถึง positive control ด้วย

อัตราการเจริญเติบโต (Relative growth rate, RGR) และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (% Inhibition of growth rate, % GR Inhibition) ของแหน ในสารสกัดจากพืชต่างๆ แสดงในตารางที่ 4 – 5

1.2.1 **สำหรับสารสกัดดอกดาวเรือง (ตารางที่** 4)

ตารางที่ 4 อัตราการเจริญเติบโต (Relative growth rate, RGR) และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (% Inhibition of growth rate, % GR Inhibition) ของแหน ในสารสกัดจากดอกดาวเรือง

		Day 0	Day 7								
	conc.(ppm)	จำนวนใบเริ่มต้น frond no	frond no								
			ขวด 1	ขวด 2	ขวด 3	growth rate 1	growth rate 2	growth rate 3	**avg.GR**	SD	***% GR Inh***
	1000		7	1	1	-0.1089	-0.3869	-0.3869	**-0.2942**	0.1605	***227.09***
	800		4	1	6	-0.1888	-0.3869	-0.1309	**-0.2355**	0.1342	***201.74***
MeOH	*600*	**15**	12	10	12	-0.0319	-0.0579	-0.0319	**-0.0406**	0.0150	***117.52***
Extract	*400*		15	10	19	0.0000	-0.0579	0.0338	**-0.0081**	0.0464	***103.48***
	200		27	26	25	0.0840	0.0786	0.0730	**0.0785**	0.0055	***66.09***
	100		50	46	42	0.1720	0.1601	0.1471	**0.1597**	0.0125	***31.01***
	1000		16	10	13	0.0092	-0.0579	-0.0204	**-0.0230**	0.0336	***109.96***
	800		12	18	17	-0.0319	0.0260	0.0179	**0.0040**	0.0314	***98.27***
Water	*600*	**15**	38	40	22	0.1328	0.1401	0.0547	**0.1092**	0.0473	***52.83***
Extract	*400*		48	38	32	0.1662	0.1328	0.1082	**0.1357**	0.0291	***41.37***
	200		50	40	48	0.1720	0.1401	0.1662	**0.1594**	0.0170	***31.13***
	100		54	62	52	0.1830	0.2027	0.1776	**0.1878**	0.0132	***18.89***
Positive Control CuSO4	*10*	**15**	9	5	5	-0.0730	-0.1569	-0.1569	**-0.1290**	0.0485	
Negative Control		**15**	70	82	76	0.2201	0.2427	0.2318	**0.2315**	0.0113	

1.2.2 **สำหรับสารสกัดดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ตารางที่** 5

ตารางที่ 5 อัตราการเจริญเติบโต (Relative growth rate, RGR) และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (% Inhibition of growth rate, % GR Inhibition) ของแหน ในสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย)

		Day 0	Day 7								
	conc.(ppm)	จำนวนใบเริ่มต้น	frond no								
		frond no	ขวด 1	ขวด 2	ขวด 3	growth rate 1	growth rate 2	growth rate 3	**avg.GR**	SD	***% GR Inh***
	1000		37	45	50	0.1290	0.1569	0.1720	**0.1526**	0.0218	***40.61***
	800		45	46	47	0.1569	0.1601	0.1632	**0.1601**	0.0031	***37.72***
MeOH	*600*	**15**	53	52	56	0.1803	0.1776	0.1882	**0.1820**	0.0055	***29.17***
Extract	*400*		49	48	66	0.1691	0.1662	0.2117	**0.1823**	0.0255	***29.06***
	200		79	91	85	0.2373	0.2575	0.2478	**0.2476**	0.0101	***3.67***
	100		119	87	104	0.2959	0.2511	0.2766	**0.2745**	0.0224	***-6.82***
	1000		57	49	55	0.1907	0.1691	0.1856	**0.1818**	0.0113	***29.26***
	800		76	84	60	0.2318	0.2461	0.1980	**0.2253**	0.0247	***12.33***
Water	*600*	**15**	73	66	81	0.2261	0.2117	0.2409	**0.2262**	0.0146	***11.98***
Extract	*400*		75	67	73	0.2299	0.2138	0.2261	**0.2233**	0.0084	***13.13***
	200		100	76	68	0.2710	0.2318	0.2159	**0.2396**	0.0284	***6.78***
	100		82	88	86	0.2427	0.2528	0.2495	**0.2483**	0.0051	***3.39***

ตารางที่ 5 อัตราการเจริญเติบโต (Relative growth rate, RGR) และเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (% Inhibition of growth rate, % GR Inhibition) ของแหน ในสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ต่อ

		Day 0	Day 7								
	conc.(ppm)	จำนวนใบเริ่มต้น frond no	frond no								
			ขวด 1	ขวด 2	ขวด 3	growth rate 1	growth rate 2	growth rate 3	avg.GR	SD	% GR Inh
กากที่เหลือจากการสกัดด้วยน้ำ นำมาสกัดต่อด้วย MeOH	*1000*	**15**	44	54	54	0.1537	0.1830	0.1830	**0.1732**	0.0169	***32.59***
	800		50	60	75	0.1720	0.1980	0.2299	**0.2000**	0.0290	***22.18***
	600		55	73	90	0.1856	0.2261	0.2560	**0.2225**	0.0353	***13.41***
	400		71	79	76	0.2221	0.2373	0.2318	**0.2304**	0.0077	***10.34***
	200		71	76	89	0.2221	0.2318	0.2544	**0.2361**	0.0166	***8.14***
	100		72	87	80	0.2241	0.2511	0.2391	**0.2381**	0.0135	***7.35***
Positive Control CuSO4	*10*	**15**	20	13	15	0.0411	-0.0204	0.0000	**0.0069**	0.0313	
Negative Control		**15**	89	94	89	0.2544	0.2622	0.2544	**0.2570**	0.0045	

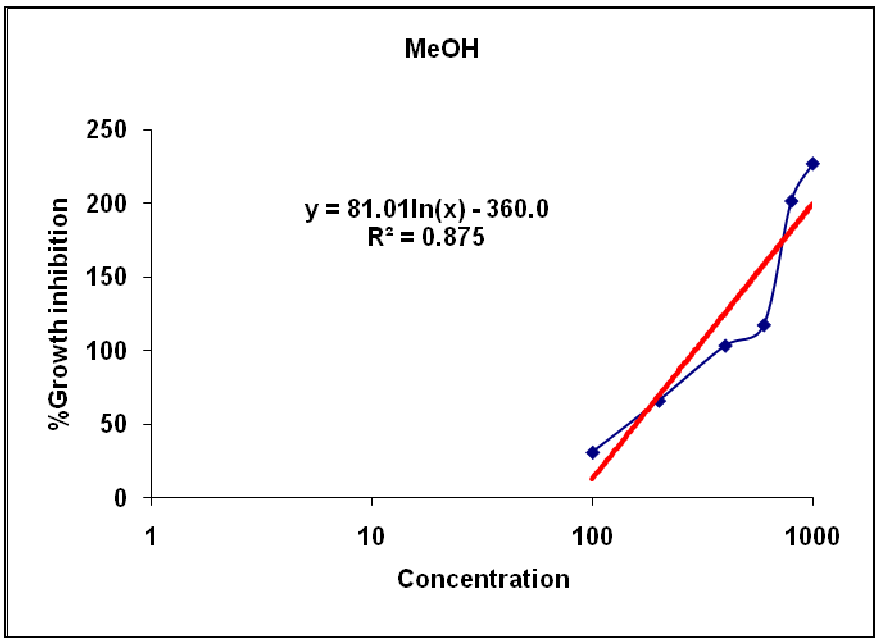
1.3 Effective concentration for 10 %, 20 % and 50 % Inhibition of relative growth rate (EC10, EC20 and EC50) ***ของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหน***

หลังจากได้ค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (% Inhibition of growth rate, % GR Inhibition) ของแหน ในสารสกัดจากพืชต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้ว เมื่อนำไปสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด (conc.) ในแกน X กับ เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโต (% Inhibition of growth rate, % GR Inhibition) ของแหน ในแกน Y ก็จะได้สมการเส้นตรงออกมาซึ่งสามารถหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ ได้ ในการทดลองนี้จะดูการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนที่ 10 % (EC_{10}) และ 20 % (EC_{20}) ซึ่งตามมาตรฐานของ Organization for economic co-operation and development (OECD)[20] guidelines for the testing of chemicals (*Lemna* sp. Growth Inhibition Test) กล่าวว่าการดูผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ 10 หรือ 20 % ก็เพียงพอและเหมาะสมแล้ว แต่อย่างไรก็ตามผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนที่ 50 % (EC_{50}) ก็ได้แสดงไว้ด้วย

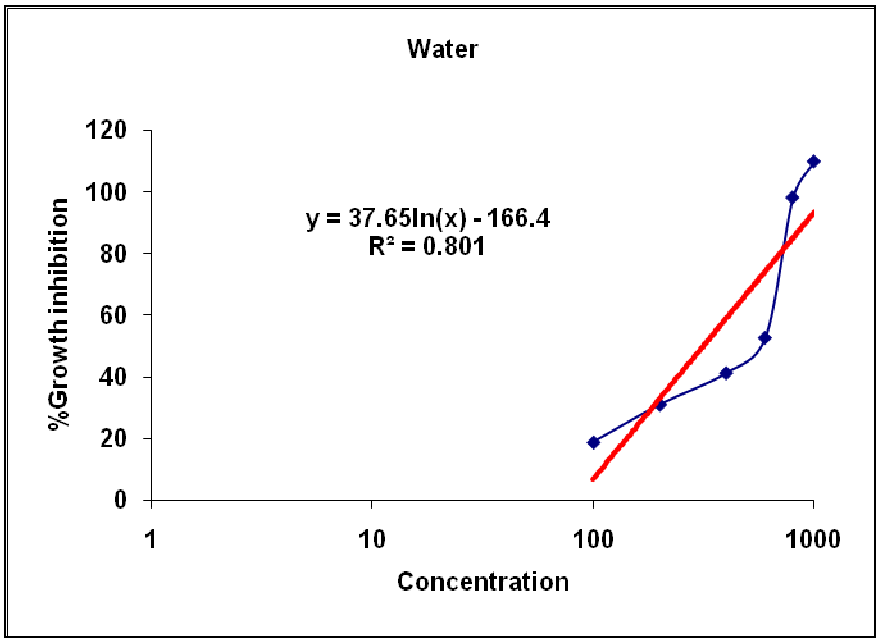
1.3.1 **สำหรับสารสกัดดอกดาวเรือง**

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4) พบว่าสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่สกัดด้วย methanol (methanol extract) และที่สกัดด้วยน้ำ (water extract หรือ aqueous extract) นั้น ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ ทั้ง 2 สารสกัด โดยแปรตามความเข้มข้น คือยิ่งความเข้มข้นมากยิ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้มาก แต่มีความแรงต่างกัน โดย methanol extract จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ดีกว่า (ค่า % inhibition of growth rate สูงกว่า)

เมื่อสร้างกราฟระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของ methanol extract (รูปที่ 1) และ water extract หรือ aqueous extract (รูปที่ 2) แล้วก็จะได้สมการเส้นตรงออกมาและสามารถหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่างๆ ได้ โดยค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนที่ 10% (EC_{10}), 20 % (EC_{20}) และ 50 % (EC_{50}) ของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่สกัดด้วย methanol และ water (aqueous) มีค่าดังที่แสดงในตารางที่ 6



รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่สกัดด้วย methanol



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่สกัดด้วยน้ำ (water)

ตารางที่ 6 ค่า EC_{10}, EC_{20} และ EC_{50} ของสารสกัดจากดอกดาวเรืองที่สกัดด้วย methanol และที่สกัดด้วยน้ำ (water)

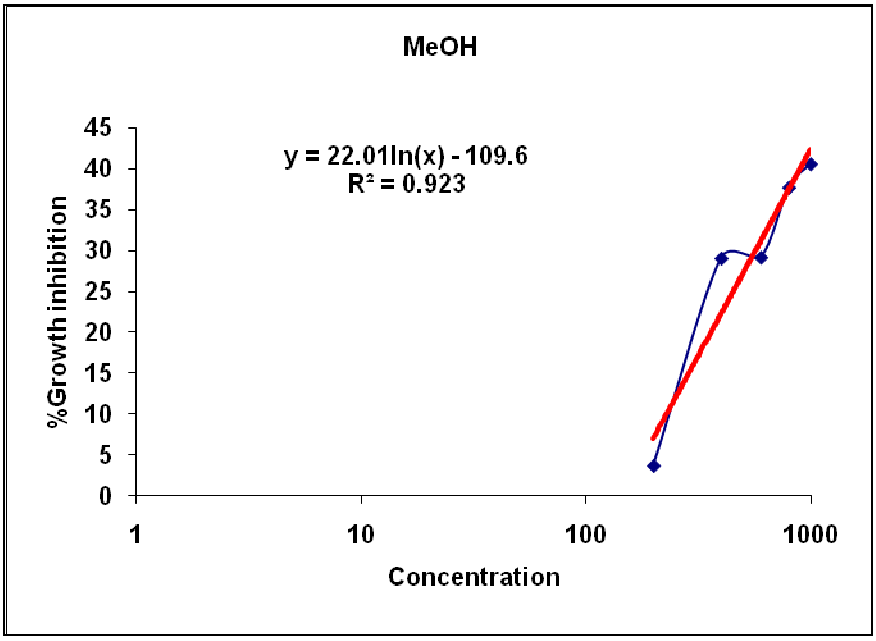
	EC_{10} µg/ml (ppm)	EC_{20} µg/ml (ppm)	EC_{50} µg/ml (ppm)
สารสกัดด้วย methanol	95.58	108.11	156.47
สารสกัดด้วยน้ำ (water)	107.59	140.26	310.75

1.3.2 **สำหรับสารสกัดดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย)**

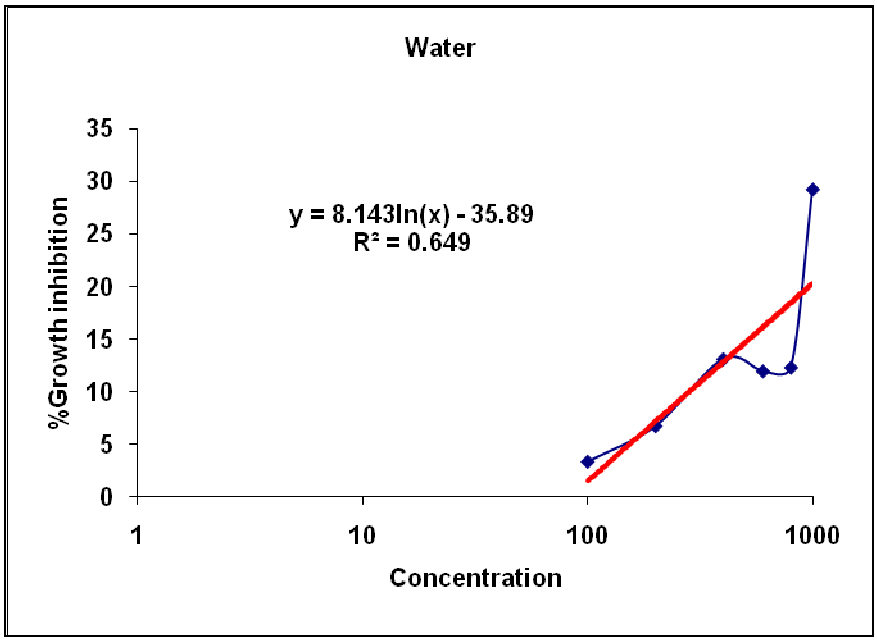
ดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) มีการแยกสกัดด้วย methanol และน้ำ (water) โดยกากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำแล้วจะมีการนำมาสกัดด้วย methanol อีกครั้ง

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 5) พบว่าสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วย methanol (methanol extract) และที่สกัดด้วยน้ำ (water extract หรือ aqueous extract) และกากจากการสกัดด้วยน้ำที่สกัดต่อด้วย methanol นั้น ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ ทั้ง 3 สารสกัด แต่มีผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml (ppm) มีค่า % inhibition of growth rate เท่ากับ 40.61, 29.26 และ 32.59 ตามลำดับ)

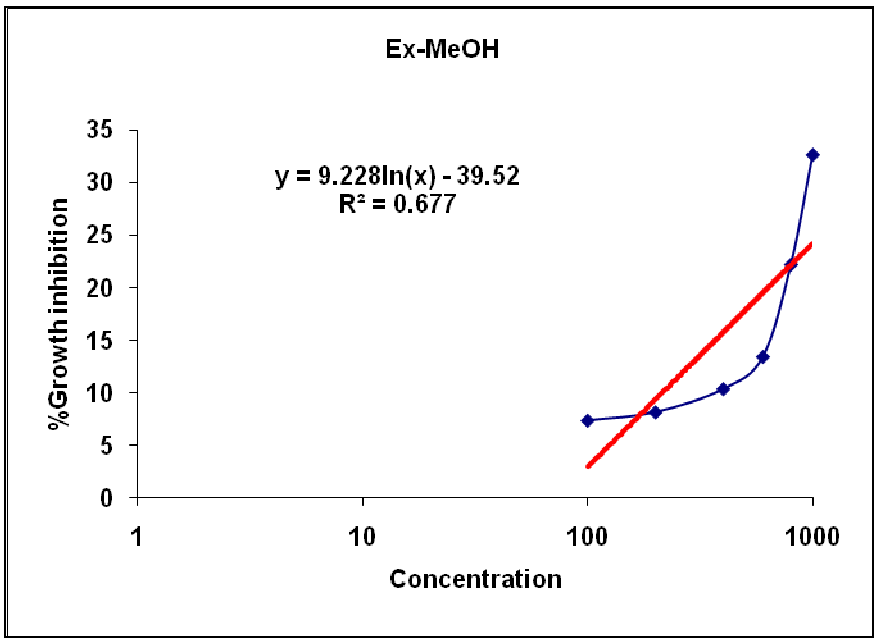
เมื่อสร้างกราฟระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของ methanol extract (รูปที่ 3), water extract หรือ aqueous extract (รูปที่ 4) และ สารสกัดกากที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำแล้วนำมาสกัดต่อด้วย methanol (รูปที่ 5) แล้วก็จะได้สมการเส้นตรงออกมาและสามารถหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่างๆ ได้ โดยค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนที่ 10% (EC_{10}), 20 % (EC_{20}) และ 50 % (EC_{50}) ของสารสกัดต่างๆ จากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) นี้ มีค่าดังที่แสดงในตารางที่ 7



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารสกัดจากดอกดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วย methanol



รูปที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำ (water)



รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารสกัดจากกากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำ แล้วสกัดต่อด้วย methanol

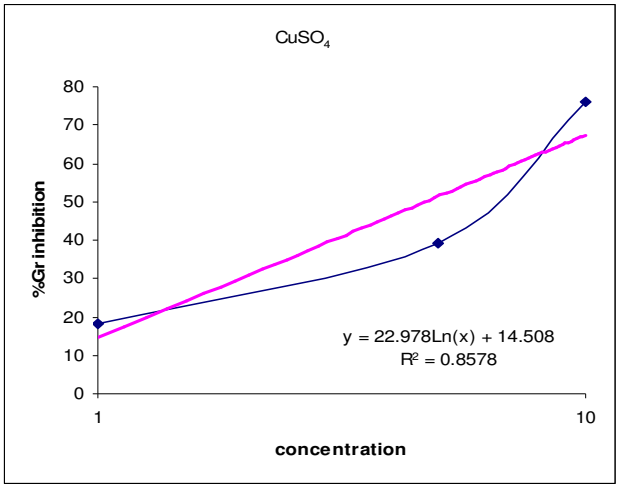
ตารางที่ 7 ค่า EC_{10}, EC_{20} และ EC_{50} ของสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วย methanol และที่สกัดด้วยน้ำ (water) และสารสกัดจากกากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำ แล้วสกัดต่อด้วย methanol

	EC_{10} µg/ml (ppm)	EC_{20} µg/ml (ppm)	EC_{50} µg/ml (ppm)
สารสกัดด้วย methanol	227.44	357.94	> 1000
สารสกัดด้วยน้ำ (water)	277.68	946.23	> 1000
สารสกัดจากกากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำ แล้วสกัดต่อด้วย methanol	212.22	626.04	> 1000

1.3.3 **สำหรับสารมาตรฐาน** Copper sulfate ($CuSO_4$) **ที่ใช้เป็น** Positive control

สารมาตรฐานที่ใช้เป็น Positive control ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหน ในการทดลองแต่ละครั้งคือสารละลาย Copper sulfate ($CuSO_4$) ความเข้มข้น 10 µg/ml (ppm) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้เป็นอย่างดี โดยทำให้แหนตาย

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนของสารละลาย Copper sulfate ($CuSO_4$) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (ไม่ได้แสดงข้อมูลไว้) และเมื่อสร้างกราฟระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ดังรูปที่ 6 ก็จะได้สมการเส้นตรงออกมาและสามารถหาค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ($CuSO_4$) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งต่างๆ ได้ โดยค่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนที่ 10% (EC_{10}), 20 % (EC_{20}) และ 50 % (EC_{50}) ของสารมาตรฐาน ($CuSO_4$) มีค่าดังที่แสดงในตารางที่ 8



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง concentration กับ % inhibition of growth rate ของสารมาตรฐาน Copper sulfate ($CuSO_4$)

ตารางที่ 8 ค่า EC_{10}, EC_{20} และ EC_{50} ของสารมาตรฐาน Copper sulfate ($CuSO_4$)

	EC_{10} µg/ml (ppm)	EC_{20} µg/ml (ppm)	EC_{50} µg/ml (ppm)
สารมาตรฐาน Copper sulfate ($CuSO_4$)	0.82	1.27	4.67

จากผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ methanol และน้ำ โดยสำหรับดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำนั้นจะมีการนำกากมาสกัดต่อด้วย methanol อีกครั้ง รวมทั้งสารมาตรฐาน Copper sulfate ($CuSO_4$) ได้ผลสรุปค่า EC_{10}, EC_{20} และ EC_{50} ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่า EC_{10}, EC_{20} และ EC_{50} ของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ methanol และน้ำ (สำหรับดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำนั้นจะมีการนำกากมาสกัดต่อด้วย methanol อีกครั้ง) รวมทั้งสารมาตรฐาน Copper sulfate ($CuSO_4$)

ชนิดของพืช / สารมาตรฐาน ($CuSO_4$)	สารสกัดสารจากพืชในตัวทำละลายชนิดต่างๆ	EC_{10} µg/ml (ppm)	EC_{20} µg/ml (ppm)	EC_{50} µg/ml (ppm)
ดอกดาวเรือง	สารสกัดใน methanol	95.58	108.11	156.47
	สารสกัดในน้ำ	107.59	140.26	310.75
ดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย)	สารสกัดใน methanol	227.44	357.94	> 1000
	สารสกัดในน้ำ	277.68	946.23	> 1000
	สารสกัดกากที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำ แล้วนำมาสกัดต่อด้วย methanol	212.22	626.04	> 1000
สารมาตรฐาน ($CuSO_4$)		0.82	1.27	4.67

จากตารางสรุปผลค่า EC_{10}, EC_{20} และ EC_{50} (ตารางที่ 9) ของฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ methanol และน้ำ (สำหรับดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำนั้นจะมีการนำกากมาสกัดต่อด้วย methanol อีกครั้ง) พบว่า ดอกดาวเรืองที่สกัดด้วย methanol มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ดีที่สุด (EC_{10} เท่ากับ 95.58, EC_{20} เท่ากับ 108.11 และ EC_{50} เท่ากับ

156.47) รองลงมาคือ ดอกดาวเรืองที่สกัดด้วย น้ำ (EC_{10} เท่ากับ 107.59, EC_{20} เท่ากับ 140.26 และ EC_{50} เท่ากับ 310.75) ส่วนสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วย methanol (methanol extract) และที่สกัดด้วยน้ำ (water extract หรือ aqueous extract) และกากจากการสกัดด้วยน้ำที่สกัดต่อด้วย methanol นั้น ให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ ทั้ง 3 สารสกัด แต่มีผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (EC_{10} เท่ากับ 227.44, 277.68 และ 212.22 ตามลำดับ) โดยสารสกัดในชั้นน้ำให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้น้อยที่สุด (EC_{10} เท่ากับ 277.68)

2. การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี (Phytochemical Screening) ของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย)

การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี (Phytochemical screening) เป็นการตรวจสอบโดยเบื้องต้น เพื่อให้ทราบว่าในตัวอย่างพืชนั้นๆ มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารในกลุ่มใดบ้าง อย่างไรก็ตาม สารบางกลุ่มไม่มีวิธีการตรวจสอบที่เฉพาะเจาะจง เช่นสารในกลุ่มเทอร์ปีน (terpenes) จะมีวิธีตรวจสอบเฉพาะสารกลุ่ม triterpenes เท่านั้น และการตรวจสอบสารแต่ละกลุ่ม หรือโครงสร้างแต่ละแบบ มักมีมากกว่า 1 วิธี โดยอาจทำการตรวจสอบหลายๆ วิธีเพื่อยืนยันผล

การตรวจสอบแต่ละวิธี อาจพบผลบวกลวง (false positive) และผลลบลวง (false negative) ดังนั้นผลที่ได้จากการตรวจสอบจึงเป็นเพียงการคาดคะเน ซึ่งจะเป็นที่แน่นอนก็ต่อเมื่อสามารถสกัดแยกสารบริสุทธิ์ และนำสารนั้นไปพิสูจน์หาสูตรโครงสร้างทางเคมีโดยเทคนิคต่างๆ แล้วเท่านั้น

การสรุปผลการตรวจสอบ วิธีการตรวจสอบหลายวิธี ไม่มีความจำเพาะกับสารกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง เนื่องจากเป็นการตรวจสอบลักษณะของโครงสร้างเท่านั้น ซึ่งอาจพบได้ในสารมากกว่า 1 กลุ่ม เช่นการตรวจสอบพบลักษณะโครงสร้างแบบ phenolic อาจเป็นส่วนของโครงสร้างสารได้หลายกลุ่ม เช่นflavonoids, coumarins, tannins, anthraquinones หรือสาร phenolics กลุ่มอื่นๆ ก็ได้ การสรุปผลจึงต้องนำผลการตรวจสอบทุกวิธีมาประมวลอย่างรอบคอบที่สุด และในตัวอย่างพืชอาจพบสารมากกว่า 1 กลุ่มก็ได้

การสรุปผลการตรวจสอบ

สารแต่ละกลุ่มจะสามารถให้ผลบวกกับวิธีการตรวจสอบแตกต่างกันไป โดยสามารถแบ่งกลุ่มสารที่สามารถตรวจสอบจากตัวอย่างพืชแห้ง หรือจากสารสกัด ได้เป็น 3 จำพวกใหญ่ๆ ดังนี้

1. สารจำพวก triterpenes และ steroids

วิธีการตรวจสอบหลักของสารจำพวกนี้คือ Liebermann-Burchard test โดยจะให้สีม่วงแดงกับสารที่มีโครงสร้างหลักแบบ triterpenes และสีเขียวฟ้ากับสารที่มีโครงสร้างหลัก steroids หากในตัวอย่างมีองค์ประกอบทางเคมีทั้ง 2 ลักษณะ จะเห็นสีทั้งม่วงแดงและเขียวฟ้าซ้อนกันเป็นชั้น และมีระยะเวลาการแสดงสีที่ต่างกัน

สารจำพวก triterpenes และ steroids แต่ละกลุ่มจะให้ผลการตรวจสอบคือ

สารที่ไม่ได้อยู่ในลักษณะของ glycosides จะให้ผลบวกกับเฉพาะ Liebermann-Burchard test แต่จะไม่ให้ผลบวกกับการทดสอบน้ำตาลโดย Molisch's test

สารกลุ่ม saponins จะให้ผลบวกกับ foam test และการตรวจสอบน้ำตาลด้วย ส่วนสีผลบวกกับ Liebermann-Burchard test จะขึ้นกับว่าเป็น triterpenoid saponins หรือ steroidal saponins

สารกลุ่ม cardiac glycosides จะให้ผลบวกสีเขียวฟ้ากับ Liebermann-Burchard test และจะให้ผลบวกกับการตรวจสอบ unsaturated lactone ring โดย Kedde's test และ deoxy-sugars โดย Keller-Kiliani's test ด้วย นอกจากนี้ การมี deoxy-sugars ในโครงสร้าง ทำให้สารกลุ่มนี้แสดงผลบวกกับการตรวจสอบน้ำตาลแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Molisch's test) อีกด้วย

*2. **สารจำพวก** phenolics*

วิธีการตรวจสอบหลักของสารจำพวกนี้คือ การตรวจสอบโครงสร้าง phenolic group (aromatic ring – OH) ในตัวอย่างพืชมักมี phenolic compounds ที่มีลักษณะการติดของหมู่ hydroxy บน benzene ring หลายแบบปนกันอยู่ การให้สีผลบวกจึงเป็นสีปนกัน สามารถเห็นเป็นสีเขียว น้ำเงิน น้ำตาลไปจนถึงดำ การจำแนกชนิดของ phenolic compounds จะใช้ผลการตรวจสอบอื่นมาประกอบ ดังนี้

สารกลุ่ม flavonoids จะให้ผลบวกกับ cyanidin test ด้วย โดยสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู ส้ม หรือแดง

สารกลุ่ม tannins จะให้ผลบวกกับการทดสอบด้วยสารละลาย gelatin ด้วย คือเกิดตะกอนขุ่นขาวขึ้น

สารกลุ่ม anthraquinones จะให้ผลบวกกับ Borntrager test ด้วย โดยจะเกิดสีชมพู ส้ม หรือแดงขึ้นในชั้นสารละลายด่าง และสีเหลืองที่อยู่ในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์จะจางลงจนถึงไม่มีสี

สารกลุ่ม coumarins จะให้ผลบวกกับการตรวจสอบ coumarins ด้วย คือเห็นการเรืองแสงบนกระดาษกรองที่ชุบสารสกัดแล้วนำไปส่องภายใต้ UV 365 นาโนเมตร แต่หากเป็น coumarins ชนิดที่ระเหยได้ง่ายมาก อาจไม่ให้ผลบวกกับการตรวจสอบโครงสร้าง phenolic

สารกลุ่ม phenolic อื่น ๆ นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้ว จะให้ผลบวกเฉพาะกับการตรวจสอบโครงสร้าง phenolic group เท่านั้น

นอกจากนี้ สารจำพวกนี้มักอยู่ในรูปของ glycosides จึงอาจพบผลบวกกับการตรวจสอบน้ำตาลร่วมด้วย (Molisch's test)

3. สารจำพวก alkaloids

ได้แก่ สารกลุ่ม alkaloids ซึ่งจะให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย Dragendorff's reagent โดยจะเกิดตะกอนหนักสีส้มอิฐขึ้น

การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี (Phytochemical screening) ของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด คือ methanol และน้ำ (โดยในกรณีของดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำ กากที่เหลือจะนำมาสกัดต่อด้วยเมทานอลด้วย) แสดงอยู่ในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี (Phytochemical screening) ของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ด้วย methanol และน้ำ (โดยในกรณีของดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำ กากที่เหลือจะนำมาสกัดต่อด้วยเมทานอลด้วย)

	ดอกดาวเรือง		**ดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย)**		
	สกัดด้วย methanol	**สกัดด้วย น้ำ**	**สกัดด้วย** methanol	**สกัดด้วย น้ำ**	สารสกัดกากที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำแล้วนำมาสกัดต่อด้วย **methanol**
การทดสอบ					
$FeCl_3$ T.S.	+	+	+	+	+
2% Gelatin Solution	-	-	-	-	-
Foam test	-	+	-	-	+
Molisch's test	+	+	+	+	+
Cyanidin test	+	+	+	-	+
Kedde reagent	-	-	-	-	-
Borntrager test	+	-	-	-	-
Lieburmann-Burchard test	+ (เขียว)	+ (ม่วงแดง)	+ (เขียว)	-	+ (ม่วงแดง)
Dragendroff's reagent	-	-	-	-	-

จากผลการตรวจสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดจากดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ด้วยตัวทำละลายต่างๆ (ตารางที่ 10) พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดนี้มีองค์ประกอบของสารเคมีคล้ายๆ กัน คือพบสาร Phenolic compounds ในกลุ่มของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เนื่องจากให้ผลบวกกับการตรวจสอบโครงสร้าง phenolic group เมื่อใช้ $FeCl_3$ T.S. ในการตรวจสอบ และยังให้ผลบวกกับ Cyanidin test ซึ่งเป็นการตรวจสอบโครงสร้างหลักของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยอยู่ในรูปของ glycosides เนื่องจากให้ผลบวกกับการตรวจสอบน้ำตาลโดย Molisch's test ด้วย ซึ่งสาร Flavonoid glycosides ในดอกดาวเรืองนั้นสามารถตรวจพบได้ทั้งในสารสกัดที่สกัดด้วย methanol และที่สกัดด้วยน้ำ ส่วนสาร Flavonoid glycosides ในดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) นั้นตรวจพบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วย methanol เท่านั้น (รวมทั้งสารสกัดกากที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำแล้วนำมาสกัดต่อด้วย methanol ด้วย) แต่ตรวจไม่พบในสารสกัดด้วยน้ำ นอกจากนี้ยังตรวจสอบพบสารที่มีโครงสร้างหลักของ Steroids อยู่ในพืชทั้งสองชนิดนี้ด้วย (พบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วย methanol เท่านั้น) เนื่องจากได้ผลบวกกับ Lieburmann-Burchard test เป็นสีเขียว ส่วนในสารกัดด้วยน้ำของดอกดาวเรืองนั้นตรวจพบสารที่มีโครงสร้างหลักของ Triterpenes เนื่องจากได้ผลบวกกับ Lieburmann-Burchard test เป็นสีม่วงแดง และยังให้ผลบวกกับการตรวจสอบ Foam test อีกด้วย แสดงว่ามีสาร Saponin อยู่ (เป็น Triterpenoid saponins) ส่วนในสารสกัดกากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำแล้วนำมาสกัดต่อด้วย methanol นั้นนอกจากการพบสาร Flavonoid glycosides แล้วยังตรวจพบสารที่มีโครงสร้างหลักของ Triterpenes เนื่องจากได้ผลบวกกับ Lieburmann-Burchard test เป็นสีม่วงแดง และยังให้ผลบวกกับการตรวจสอบ Foam test อีกด้วย แสดงว่ามีสาร Saponin อยู่ (เป็น Triterpenoid saponins) ส่วนสารสกัดดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ด้วยน้ำนั้นตรวจสอบไม่พบสารพฤกษเคมีหลักใดๆ นอกจากน้ำตาล (ให้ผลบวกกับการตรวจสอบ Molisch's test) และส่วนโครงสร้าง phenolic group (ใช้ $FeCl_3$ T.S. ในการตรวจสอบ) เท่านั้น ทั้งดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) นี้ตรวจสอบแล้วไม่พบสารในกลุ่ม Alkaloids เนื่องจากให้ผลลบกับ Dragendroff's reagent

จากผลการตรวจสอบกลุ่มสารเคมีในพืชทั้งสองชนิดนี้ ทำให้ทราบอย่างคร่าวๆ ว่าพืชมีองค์ประกอบเคมีเป็นสารประกอบในกลุ่มใดบ้าง แต่ยังไม่สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบฤทธิ์กับสารที่พบในพืชได้ ซึ่งทั้งดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วย methanol พบองค์ประกอบของสารเคมีคล้ายกันมาก จะมีเพียงก็แต่ดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำเท่านั้นที่ไม่พบสารหลักใดๆ ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการที่มันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้น้อยที่สุด (EC_{10} เท่ากับ 277.68)

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาฤทธิ์เบื้องต้นของดอกดาวเรือง และดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) โดยแยกสกัดด้วย methanol และน้ำ (โดยดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) นั้นมีการนำกากของพืชหลังจากต้มกับน้ำแล้วไปสกัดต่อด้วย methanol ด้วย) วิธีการที่ใช้ในการทดสอบ คือ Lemna phytotoxicity assay ซึ่งเป็นการตรวจสอบการเจริญเติบโตของแหน (Duckweed, *Lemna minor*) ในสารสกัดต่างๆ ของพืชสมุนไพรที่ใช้ทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่สารสกัดลงไป

ผลการวิจัย พบว่าดอกดาวเรืองที่สกัดด้วย methanol มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ดีที่สุด (EC_{10} เท่ากับ 95.58 µg/ml, EC_{20} เท่ากับ 108.11 µg/ml และ EC_{50} เท่ากับ 156.47 µg/ml) รองลงมาคือดอกดาวเรืองที่สกัดด้วยน้ำ (EC_{10} เท่ากับ 107.59 µg/ml, EC_{20} เท่ากับ 140.26 µg/ml และ EC_{50} เท่ากับ 310.75 µg/ml) ส่วนสารสกัดจากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วย methanol และที่สกัดด้วยน้ำ และกากจากการสกัดด้วยน้ำที่สกัดต่อด้วย methanol นั้นให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ทั้ง 3 สารสกัด แต่มีผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (EC_{10} เท่ากับ 227.44, 277.68 และ 212.22 µg/ml ตามลำดับ) โดยสารสกัดในชั้นน้ำให้ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้น้อยที่สุด (EC_{10} เท่ากับ 277.68 µg/ml)

ผลการตรวจสอบกลุ่มสารเคมีในสารสกัดจากดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) พบว่าพืชทั้งสองชนิดนี้มีองค์ประกอบของสารเคมีคล้ายๆ กัน คือพบสาร Phenolic compounds ในกลุ่มของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) โดยอยู่ในรูปของ glycosides (Flavonoids glycosides) นอกจากนี้ยังตรวจพบสารที่มีโครงสร้างหลักของ Steroids อยู่ในพืชทั้งสองชนิดนี้ด้วย (พบเฉพาะในสารสกัดที่สกัดด้วย methanol เท่านั้น) ส่วนในสารกัดด้วยน้ำของดอกดาวเรือง และสารสกัดกากดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่ผ่านการสกัดด้วยน้ำแล้วนำมาสกัดต่อด้วย methanol นั้นตรวจพบ Triterpenoid saponins ส่วนสารสกัดดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ด้วยน้ำนั้นตรวจสอบไม่พบสารพฤกษเคมีหลักใดๆ นอกจากน้ำตาล และส่วนโครงสร้าง phenolic group เท่านั้น ทั้งดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) นี้ตรวจสอบแล้วไม่พบสารในกลุ่ม Alkaloids ในการวิจัยนี้ยังไม่สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างผลการทดสอบฤทธิ์กับสารที่พบในพืชได้ ซึ่งทั้งดอกดาวเรืองและดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วย methanol พบองค์ประกอบของสารเคมีคล้ายกันมาก จะมีเพียงก็แต่ดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) ที่สกัดด้วยน้ำเท่านั้นที่ไม่พบสารหลักใดๆ ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการที่มันมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้น้อยที่สุด (EC_{10} เท่ากับ 277.68)

ผลการทดลองในครั้งนี้ เมื่อสร้างกราฟระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้น ได้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงไม่ค่อยดี (ค่า r^2 มักน้อยกว่า 0.9) ซึ่ง model การทดลองโดยดูการเจริญเติบโตของแหนนั้นค่อนข้างจะมีปัจจัยหลายอย่างมารบกวนการดูผลได้ ต้องควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบให้ดี ดังนั้นการประเมินฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนจึงเป็นการพิจารณาผลอย่างคร่าวๆ ในเบื้องต้นเท่านั้น ควรมีการทดสอบฤทธิ์นี้โดยวิธีอื่นๆ ด้วย เพื่อยืนยันผล

ข้อเสนอแนะจากการวิจัยในครั้งนี้ เมื่อพิจารณาจากผลการวิจัยทำให้ทราบว่าดอกดาวเรืองมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแหนได้ดี โดยเฉพาะเมื่อใช้ methanol เป็นตัวทำละลายในการสกัด ส่วนดอกเบญจมาศสวน (เก๊กฮวย) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชได้น้อย ดังนั้นดอกดาวเรืองแห้งที่เหลืออยู่ในพวงมาลัยดอกไม้ซึ่งปกติจะทิ้งเป็น waste ไปหลังจากพวงมาลัยแห้งแล้วก็อาจจะนำมาใช้ประโยชน์เพิ่มเติมในการช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของวัชพืชได้ในอนาคต

บทที่ 5

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง (References)

1. ชมรมเกษตรธรรมชาติ. เกษตรธรรมชาติด้วยเทคนิคจุลินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 5. บริษัทฐานการพิมพ์จำกัด, 2544.
2. วิฑูรย์ ปัญญากุล. เกษตรยั่งยืน วิถีการเกษตรเพื่ออนาคต. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : มูลนิธิสายใยแผ่นดิน. 2547.
3. Putnam, A. R. Allelochemicals from plants as herbicides. Weed Technology 2 (1988), 510-518.
4. Duke, S. O., Dayan, F. E., Romagni, J. G. and Rimando, A. M. Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. Weed Research 10 (2000), 99-111.
5. Xuan, T. D., Eiji, T., Hiroyuki, T., Mitsuhiro, M., Khanh ,T. D. and Chung, M. Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica* A.Juss) to crops and weeds. Crop Protection 23 (2004), 335-345.
6. Tran, D. X, Tawata. S., Nguyen, H. H, Tran, D. K. and Chung, I. M. Assessment of phytotoxic action of *Ageratum congzoides* L. (billy goat weed) on weed. Crop Protection 23 (2004), 915-922.
7. Anaya, A. L., Macías-Rubalcava, M., Cruz-Ortega, R., García-Santana, C., Sánchez-Monterrubio, N. P., Hernández-Bautista, E. B. and Mata, R. Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. Phytochemistry 66 (2005), 487-494.
8. Weir, T. L., Bais, H. P. and Vivanco, J. M. Intraspecific and interspecific interactions mediated by a phytotoxin, (-)-catechin, secreted by the roots of Centaurea maculosa (spotted knapweed) . J Chem Ecology 29 (2003), 2397-2412.

9. Kato-Noguchi, H., Tanaka, Y., Murakami, T., Yamamura, S and Fujihara, S. Isolation and identification of an allelopathic substance from peel of *Citrus junos*. Phytochemistry 61 (2002), 849-853.
10. Kato-Noguchi, H., Tanaka, Y. Allelopathic potential of *Citrus junos* fruit waste from food processing industry. Bioresource Technology 94 (2004), 211-214.
11. Batish, D. R., Setia, N., Singh, H. P. and Kohli, R. K. Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. Crop Protection 23 (2004), 1209-1214.
12. Fujihara, S. and Shimizu, T. Effect of peel extracts from *Citrus junos* Sieb. Ex Tanaka on weed growth. Weed Research Japan 44 (1999), 168-169.
13. Fujihara, S. and Shimizu, T. Growth inhibitory effect of peel extract from *Citrus junos*. Plant Growth Regulation 3 (2003), 223-233.
14. ผุสดี สายธนะพันธ์ และ พันชิตช์ มะลิสุวรรณ. สมุนไพรกำจัดแมลงและศัตรูพืช. กรุงเทพมหานคร: บริษัทศรีสยามพรินท์แอนด์แพคก์ จำกัด, 2546.
15. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. พืชฆ่าแมลง และพืชมีพิษบางชนิดในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2546.
16. Pomati, F., Netting, A. G., Calamari, D. and Neilan, B. A. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. Aquatic Toxicology 67 (2004), 387-396.
17. Rahman, A., Choudhary, M. I, Thomsen, W. J. Bioassay techniques for drug development : A Manual of Bioassay Techniques for Natural Products Research. 2001, 65-67.
18. Tong, Z. and Hongjun, J. Use of duckweed (*Lemna minor* L.) growth inhibition test to evaluate the toxicity of acrylonitrile, sulphocyanic sodium and acetonitrile in china. Environmental Pollution 98 (1997), 143-147.
19. ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร. หนังสือคู่มือปฏิบัติการเทคนิคการสกัดแยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและการตรวจสอบเบื้องต้นทางพฤกษเคมี วิชาปฏิบัติการเภสัชเวท1. 2550, 60-66.
20. OECD (2006). Guidelines for the testing of chemicals (*Lemna* sp. Growth Inhibition Test). No.221. Organization for economic co-operation and development.

ภาคผนวก

ตารางแสดงสูตรอาหารเพาะเลี้ยงแหน E-medium[18]

ในอาหารเหลว 1 ลิตร ประกอบไปด้วยสารต่อไปนี้

ชื่อสาร	***ปริมาณ (mg)***
KH_2PO_4	680
KNO_3	1515
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	1180
$MgSO_4.7H_2O$	492
H_3BO_3	2.86
$MnCl_2$	3.62
$ZnSO_4.7H_2O$	0.22
$CuSO_4.5H_2O$	0.08
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.12
$FeCl_3.6H_2O$	5.40
EDTA	11.2

การเตรียมอาหารสูตร E-medium สำหรับเพาะเลี้ยงแหน

1. ผสมสารต่างๆ ตามสูตรในน้ำกลั่นให้ครบปริมาตรที่ต้องการ
2. ปรับ pH ให้ได้อยู่ในช่วง 5.5 – 6.0
3. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ โดยการนำไปเข้า autoclave

ตาราง *Probit transform values*

%	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
0	...	1.9098	2.1218	2.2522	2.3479	2.4242	2.4879	2.5427	2.5911	2.6344
1	2.6737	2.7096	2.7429	2.7738	2.8027	2.8299	2.8556	2.8799	2.9031	2.9251
2	2.9463	2.9665	2.9859	3.0046	3.0226	3.0400	3.0569	3.0732	3.0890	3.1043
3	3.1192	3.1337	3.1478	3.1616	3.1750	3.1881	3.2009	3.2134	3.2256	3.2376
4	3.2493	3.2608	3.2721	3.2831	3.2940	3.3046	3.3151	3.3253	3.3354	3.3454
5	3.3551	3.3648	3.3742	3.3836	3.3928	3.4018	3.4107	3.4195	3.4282	3.4368
6	3.4452	3.4536	3.4618	3.4699	3.4780	3.4859	3.4937	3.5015	3.5091	3.5167
7	3.5242	3.5316	3.5389	3.5462	3.5534	3.5605	3.5675	3.5745	3.5813	3.5882
8	3.5949	3.6016	3.6083	3.6148	3.6213	3.6278	3.6342	3.6405	3.6468	3.6531
9	3.6592	3.6654	3.6715	3.6775	3.6835	3.6894	3.6953	3.7102	3.7070	3.7127
10	3.7184	3.7241	3.7298	3.7354	3.7409	3.7464	3.7519	3.7574	3.7628	3.7681
11	3.7735	3.7788	3.7840	3.7893	3.7945	3.7996	3.8048	3.8099	3.8150	3.8200
12	3.8250	3.8300	3.8350	3.8399	3.8448	3.8497	3.8545	3.8593	3.8641	3.8689
13	3.8736	3.8783	3.8830	3.8877	3.8923	3.8969	3.9015	3.9161	3.9107	3.9152
14	3.9197	3.9242	3.9286	3.9331	3.9375	3.9419	3.9463	3.9506	3.9550	3.9593
15	3.9636	3.9678	3.9721	3.9763	3.9806	3.9848	3.9890	3.9931	3.9973	4.0014
16	4.0055	4.0096	4.0137	4.0178	4.0218	4.0259	4.0299	4.0339	4.0379	4.0419
17	4.0458	4.0498	4.0537	4.0576	4.0615	4.0654	4.0693	4.0731	4.0770	4.0808
18	4.0846	4.0884	4.0922	4.0960	4.0998	4.1035	4.1073	4.1110	4.1147	4.1184
19	4.1221	4.1258	4.1295	4.1331	4.1367	4.1404	4.1440	4.1476	4.1512	4.1548
20	4.1584	4.1619	4.1655	4.1690	4.1726	4.1761	4.1796	4.1831	4.1866	4.1901
21	4.1936	4.1970	4.2005	4.2039	4.2074	4.2108	4.2142	4.2176	4.2210	4.2244
22	4.2278	4.2312	4.2345	4.2379	4.2412	4.2446	4.2479	4.2512	4.2546	4.2579
23	4.2612	4.2644	4.2677	4.2710	4.2743	4.2775	4.2808	4.2840	4.2872	4.2905
24	4.2937	4.2969	4.3001	4.3033	4.3065	4.3097	4.3129	4.3160	4.3192	4.3224
25	4.3255	4.3287	4.3318	4.3349	4.3380	4.3412	4.3443	4.3474	4.3505	4.3536
26	4.3567	4.3597	4.3628	4.3659	4.3689	4.3720	4.3750	4.3781	4.3811	4.3842
27	4.3872	4.3902	4.3932	4.3962	4.3992	4.4022	4.4052	4.4082	4.4112	4.4142
28	4.4172	4.4201	4.4231	4.4260	4.4290	4.4319	4.4349	4.4378	4.4408	4.4437
29	4.4466	4.4495	4.4524	4.4554	4.4583	4.4612	4.4641	4.4670	4.4698	4.4727
30	4.4756	4.4785	4.4813	4.4842	4.4871	4.4899	4.4923	4.4956	4.4985	4.5013
31	4.5041	4.5070	4.5098	4.5126	4.5155	4.5183	4.5211	4.5239	4.5267	4.5295
32	4.5323	4.5351	4.5379	4.5407	4.5435	4.5462	4.5490	4.5518	4.5546	4.5573
33	4.5601	4.5628	4.5656	4.5684	4.5711	4.5739	4.5766	4.5793	4.5821	4.5848
34	4.5875	4.5903	4.5930	4.5957	4.5984	4.6011	4.6039	4.6066	4.6093	4.6120
35	4.6147	4.6174	4.6201	4.6228	4.6255	4.6281	4.6308	4.6335	4.6362	4.6389
36	3.6415	4.6442	4.6469	4.6495	4.6522	4.6549	4.6575	4.6602	4.6628	4.6655
37	4.6681	4.6708	4.6734	4.6761	4.6787	4.6814	4.6840	4.6866	4.6893	4.6919
38	4.6945	4.6971	4.6998	4.7024	4.7050	4.7076	4.7102	4.7129	4.7155	4.7181
39	4.7207	4.7233	4.7259	4.7285	4.7311	4.7337	4.7363	4.7389	4.7614	4.7441
40	4.7467	4.7492	4.7518	4.7544	4.7570	4.7596	4.7622	4.7647	4.7673	4.7699
41	4.7724	4.7750	4.7776	4.7802	4.7827	4.7853	4.7879	4.7904	4.7930	4.7955
42	4.7981	4.8007	4.8032	4.8058	4.8083	4.8109	4.8134	4.8160	4.8185	4.8211
43	4.8236	4.8262	4.8287	4.8313	4.8338	4.8363	4.8389	4.8414	4.8440	4.8465
44	4.8490	4.8516	4.8541	4.8566	4.8592	4.8617	4.8642	4.8668	4.8693	4.8718
45	4.8743	4.8769	4.8794	4.8819	4.8844	4.8870	4.8895	4.8920	4.8945	4.8970
46	4.8996	4.9021	4.9046	4.9071	4.9096	4.9122	4.9147	4.9172	4.9197	4.9222
47	4.9247	4.9272	4.9298	4.9323	4.9348	4.9373	4.9398	4.9423	4.9488	4.9473
48	4.9498	4.9524	4.9549	4.9574	4.9599	4.9624	4.9649	4.9674	4.9699	4.9724

(Continued)

ตาราง *Probit transform values (ต่อ)*

(*Continued*)

%	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
49	4.9749	4.9774	4.9799	4.9825	4.9850	4.9875	4.9900	4.9925	4.9950	4.9975
50	5.0000	5.0025	5.0050	5.0075	5.0100	5.0125	5.0150	5.0175	5.0201	5.0226
51	5.0251	5.0276	5.0301	5.0326	5.0351	5.0376	5.0401	5.0426	5.0451	5.0476
52	5.0502	5.0527	5.0552	5.0577	5.0602	5.0627	5.0652	5.0677	5.0702	5.0728
53	5.0753	5.0778	5.0803	5.0828	5.0853	5.0878	5.0904	5.0929	5.0954	5.0979
54	5.1004	5.1030	5.1055	5.1080	5.1105	5.1130	5.1156	5.1181	5.1206	5.1231
55	5.1257	5.1282	5.1307	5.1332	5.1358	5.1383	5.1408	5.1434	5.1459	5.1484
56	5.1510	5.1535	5.1560	5.1586	5.1611	5.1637	5.1662	5.1689	5.1713	5.1738
57	5.1764	5.1789	5.1815	5.1840	5.1866	5.1891	5.1917	5.1942	5.1968	5.1993
58	5.2019	5.2045	5.2070	5.2096	5.2121	5.2147	5.2173	5.2198	5.2224	5.2250
59	5.2275	5.2301	5.2327	5.2353	5.2378	5.2404	5.2430	5.2456	5.2482	5.2508
60	5.2533	5.2559	5.2585	5.2611	5.2637	5.2666	5.2689	5.2715	5.2741	5.2767
61	5.2793	5.2819	5.2845	5.2871	5.2898	5.2924	5.2950	5.2976	5.3002	5.3029
62	5.3055	5.3081	5.3107	5.3134	5.3160	5.3186	5.3213	5.3239	5.3266	5.3292
63	5.3319	5.3345	5.3372	5.3398	5.3425	5.3451	5.3478	5.3505	5.3531	5.3558
64	5.3585	5.3611	5.3638	5.3665	5.3692	5.3719	5.3745	5.3772	5.3799	5.3826
65	5.3853	5.3880	5.3907	5.3934	5.3961	5.3989	5.4016	5.4043	5.4070	5.4097
66	5.4125	5.4152	5.4179	5.4207	5.4234	5.4261	5.4289	5.4316	5.4344	5.4372
67	5.4399	5.4427	5.4454	5.4482	5.4510	5.4538	5.4565	5.4693	5.4621	5.4649
68	5.4677	5.4705	5.4733	5.4761	5.4789	5.4817	5.4845	5.4874	5.4902	5.4930
69	5.4959	5.4987	5.5015	5.5044	5.5072	5.5101	5.5129	5.5158	5.5187	5.5215
70	5.5244	5.5273	5.5302	5.5330	5.5359	5.5388	5.5417	5.5446	5.5476	5.5505
71	5.5534	5.5563	5.5592	5.5622	5.5651	5.5681	5.5710	5.5740	5.5769	5.5799
72	5.5828	5.5858	5.5888	5.5918	5.5948	5.5978	5.6008	5.6038	5.6068	5.6098
73	5.6128	5.6158	5.6189	5.6219	5.6250	5.6280	5.6311	5.6341	5.6372	5.6403
74	5.6433	5.6464	5.6495	5.6426	5.6557	5.6588	5.6620	5.6651	5.6682	5.6713
75	5.6745	5.6776	5.6808	5.6840	5.6871	5.6903	5.6935	5.6967	5.6999	5.7031
76	5.7063	5.7095	5.7128	5.7160	5.7192	5.7225	5.7257	5.7290	5.7323	5.7356
77	5.7388	5.7421	5.7454	5.7488	5.7521	5.7554	5.7588	5.7621	5.7655	5.7688
78	5.7722	5.7756	5.7790	5.7824	5.7858	5.7892	5.7926	5.7961	5.7995	5.8030
79	5.8064	5.8099	5.8134	5.8169	5.8204	5.8239	5.8274	5.8310	5.8345	5.8381
80	5.8416	5.8452	5.8488	5.8524	5.8560	5.8596	5.8633	5.8669	5.8705	5.8742
81	5.8779	5.8816	5.8853	5.8890	5.8927	5.8965	5.9002	5.9040	5.9078	5.9116
82	5.9154	5.9192	5.9230	5.9269	5.9307	5.9346	5.9385	5.9424	5.9463	5.9502
83	5.9542	5.9581	5.9621	5.9661	5.9701	5.9741	5.9782	5.9822	5.9863	5.9904
84	5.9945	5.9986	6.0027	6.0069	6.0110	6.0152	6.0194	6.0237	6.0279	6.0322
85	6.0364	6.0407	6.0450	6.0494	6.0537	6.0581	6.0625	6.0669	6.0714	6.0758
86	6.0803	6.0848	6.9893	6.0939	6.0985	6.1031	6.1077	6.1123	6.1170	6.1217
87	6.1264	6.1311	6.1359	6.1407	6.1455	6.1503	6.1552	6.1601	6.1650	6.1700
88	6.1750	6.1800	6.1850	6.1901	6.1952	6.2004	6.2055	6.2107	6.2160	6.2212
89	6.2265	6.2319	6.2372	6.2426	6.2481	6.2536	6.2591	6.2646	6.2702	6.2759
90	6.2816	6.2873	6.2930	6.2988	6.3047	6.3106	6.3165	6.3225	6.3285	6.3346
91	6.3408	6.3469	6.3532	6.3595	6.3658	6.3722	6.3787	6.3852	6.3917	6.3984
92	6.4051	6.4118	6.4187	6.4255	6.4325	6.4395	6.4466	6.4538	6.4611	6.4684
93	6.4758	6.4833	6.4909	6.4985	6.5063	6.5141	6.5220	6.5301	6.5382	6.5464
94	6.5548	6.5632	6.5718	6.5805	6.5893	6.5982	6.6072	6.6164	6.6258	6.6352
95	6.6449	6.6546	6.6646	6.6747	6.6849	6.6954	6.7060	6.7169	6.7279	6.7392
96	6.7507	6.7624	6.7744	6.7866	6.7991	6.8119	6.8250	6.8384	6.8522	6.8663
97	6.8808	6.8957	6.9110	6.9268	6.9431	6.9600	6.9774	6.9954	7.0141	7.0335
98	7.0537	7.0749	7.0969	6.1201	7.1444	7.1701	7.1973	7.2262	7.2571	7.2904
99	7.3263	7.3656	7.4087	7.4571	7.5120	7.5758	7.6520	7.7478	7.8782	8.0902

ประวัติทีมผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - สกุล (นางสาว) (ภาษาไทย) ภญ.ผศ.นุชนาฏ กิจเจริญ หัวหน้าโครงการ
(ภาษาอังกฤษ) Assist. Prof. Nudchanart Kitcharoen
ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ถ. ราชมรรคาใน อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
โทรศัพท์ 0-3425 5800 , 0-34253911 ต่อ 24289 โทรสาร 0-3425 5801
e-mail address nudchana@su.ac.th

2. ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรีสาขา เภสัชศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่จบ 2530
- ปริญญาโทสาขา เภสัชเวท สถาบันจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่จบ 2536

3. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประกอบด้วยกลุ่มวิชาเภสัชเวท แขนงวิชา Pharmacognosy and Phytochemistry

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - สกุล (นางสาว) (ภาษาไทย) ภญ.รศ.ศรีสมบัติ นวนพรัตน์สกุล ผู้ร่วมโครงการ
(ภาษาอังกฤษ) Assoc. Prof. Srisombat Nawanopparatsakul
ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ถ. ราชมรรคาใน อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
โทรศัพท์ 0-3425 5800 โทรสาร 0-3425 5801
e-mail address Srisom@su.ac.th

2. ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรีสาขา เภสัชศาสตร์ สถาบัน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
  ปีที่จบ 2530
- ปริญญาโทสาขา เภสัชวิทยา สถาบัน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
  ปีที่จบ 2533
- ปริญญาเอก เภสัชศาสตร์สังคมและการบริหาร สถาบัน มหาวิทยาลัยศิลปากร
  ปีที่จบ 2553

3. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประกอบด้วยกลุ่มวิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา แขนงวิชา Pharmacology

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - สกุล (นางสาว) (ภาษาไทย) ภญ.ผศ.ปัทมวรรณ เผือกผ่อง ผู้ร่วมโครงการ
(ภาษาอังกฤษ) Assist. Prof. Patamawan Phuagphong

ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ถ. ราชมรรคาใน อ.เมือง จ.นครปฐม 73000
โทรศัพท์ 0-3425 5800 โทรสาร 0-3425 5801
e-mail address patamawan@su.ac.th

2. ประวัติการศึกษา
   - ปริญญาตรีสาขา เภสัชศาสตร์ สถาบัน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
     ปีที่จบ 2539
   - ปริญญาโทสาขา Pharmaceutical Science สถาบัน Osaka University, Japan
     ปีที่จบ 2545
   - ปริญญาเอกสาขา Pharmaceutical Science สถาบัน Osaka University, Japan
     ปีที่จบ 2547

3. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช ประกอบด้วยกลุ่มวิชา
   เภสัชวิทยาและพิษวิทยา แขนงวิชา เภสัชวิทยาระบบประสาทส่วนกลาง