

บทที่ 4

ผล และอภิปรายผลการทดลอง

4.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ตัวอย่างของพืชในสกุล *Barleria* ที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้มีตัวอย่างทั้งหมด 18 ตัวอย่าง โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย ดังตารางที่ 4.1 ตัวอย่างพืชในสกุล *Barleria* ที่นำมาศึกษาสามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม คืออังกาบ (*Barleria cristata*) อังกาบหนู (*Barleria prionitis*) เสดตพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina*) สัngerณี (*Barleria strigosa*) กระจับปี่ (*Barleria siamensis*) และพืชในสกุล *Barleria* โดยได้รับการจำแนกและระบุชนิดจากคุณวินัย สมประสงค์ หัวหน้ากลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร รวมทั้งเก็บตัวอย่างทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) ที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกสกุล สำหรับตัวอย่างพืชที่ใช้สำหรับการสกัดสาร เก็บตัวอย่างใบอังกาบ (BR02) จากต้นที่มาจากพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร และนำมาปลูกจนได้พืชอายุประมาณ 2 ปี เพื่อใช้ใบในการสกัดสารต่อไป

4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

4.2.1 ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 18 ตัวอย่าง และพืชนอกสกุล *Baleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CTAB จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จะมีความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 4.2 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการแยกด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1000 คู่เบส

4.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

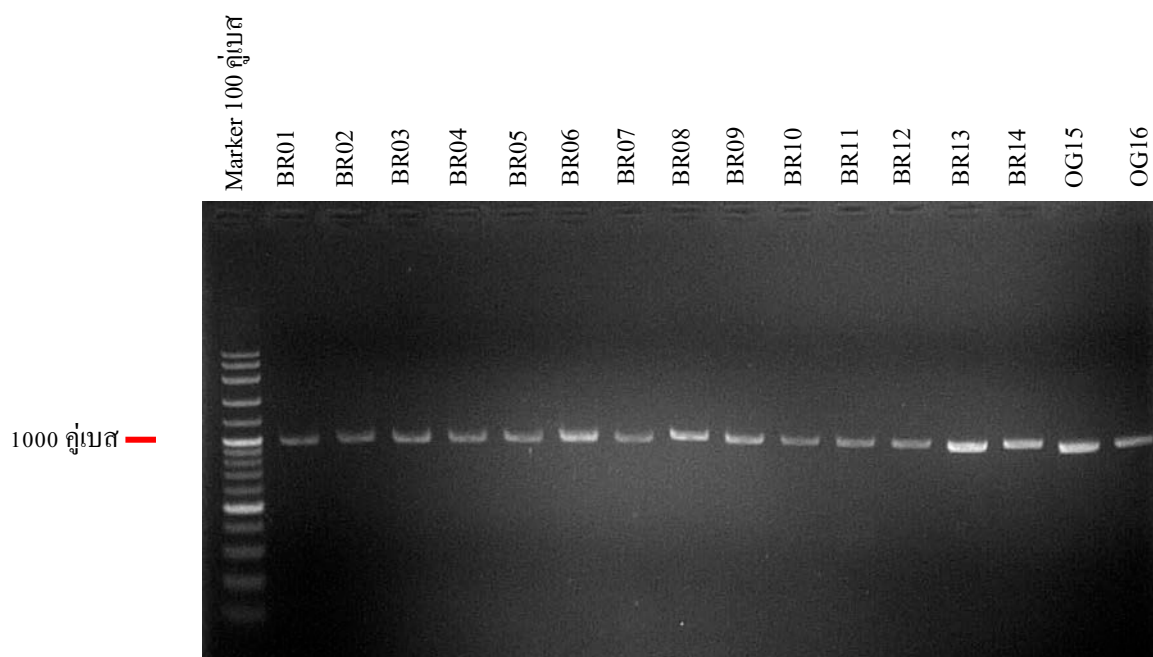
จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 16 ตัวอย่าง และพืชนอกสกุล *Baleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง ดังตัวอย่างตามตารางที่ 4.1 มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง trnL-trnF ของคลอโรพลาสต์ โดยการใช้ไพรเมอร์ C (5' -CGAAATCG GTAGACGCTACG -3') และ F (5'- ATTTGAACTGGTG ACACG AG -3') มีการทำ Negative ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ใส่สารที่เป็น Master mix (Master mix คือสารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ประกอบด้วย PCR buffer, mix dNTP, taq DNA polymerase และไพรเมอร์) เหมือนกับชุดการทดลองอื่น แต่ไม่ใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ เพื่อเปรียบเทียบกับสารที่ใช้ทำ Master mix นั้นไม่ผิดพลาด จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาแยกด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส พบว่าไพรเมอร์ C และ F สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชทั้ง 18 ตัวอย่างได้ โดยพบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 930-967 คู่เบส ดังแสดงขนาดเฉพาะตัวอย่าง BR01- BR14 และพืชนอกสกุล *Baleria* OG15 - OG16 ในรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 รหัส ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และแหล่งที่มาของตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

รหัส	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	จังหวัด	เทคนิค	
				PCR	RAPD
BR01	เสลดพังพอนตัวผู้	<i>Barleria lupulina</i>	ปราจีนบุรี	✓	✓
BR02	อังกาบ	<i>Barleria cristata</i>	กรุงเทพ	✓	✗
BR03	สังกรณี	<i>Barleria strigosa</i>	ฉะเชิงเทรา	✓	✓
BR04	อังกาบหนู	<i>Barleria prionitis</i>	กรุงเทพ	✓	✓
BR05	เสลดพังพอนตัวผู้	<i>Barleria lupulina</i>	น่าน	✓	✓
BR06	อังกาบ	<i>Barleria cristata</i>	สระบุรี	✓	✓
BR07	เสลดพังพอนตัวผู้	<i>Barleria lupulina</i>	ราชบุรี	✓	✓
BR08	เสลดพังพอนตัวผู้	<i>Barleria lupulina</i>	แม่ฮ่องสอน	✓	✓
BR09	อังกาบหนู	<i>Barleria prionitis</i>	ปราจีนบุรี	✓	✓
BR10	สังกรณี	<i>Barleria strigosa</i>	ปราจีนบุรี	✓	✓
BR11	สังกรณี	<i>Barleria strigosa</i>	ชลบุรี	✓	✗
BR12	อังกาบหนู	<i>Barleria prionitis</i>	น่าน	✓	✓
BR13	ระงับพิษ	<i>Barleria siamensis</i>	ชลบุรี	✓	✗
BR14	อังกาบใบเล็ก	<i>Barleria cristata</i>	ชลบุรี	✓	✓
BR17	อังกาบ (ดอกม่วงขาว)	<i>Barleria cristata</i>	สระบุรี	✓	✓
BR18	สังกรณี (ใบมีขนมาก)	<i>Barleria strigosa</i>	นครศรีธรรมราช	✓	✓
BR19	เสลดพังพอนตัวผู้	<i>Barleria lupulina</i>	สระบุรี	✗	✓
BR20	สกุล <i>Barleria</i>	<i>Barleria</i> sp.	ชลบุรี	✗	✓
OG15	ทองพันชั่ง	<i>Rhinacanthus nasutus</i>	ชลบุรี	✓	✗
OG16	ฟ้าทลายโจร	<i>Andrographis paniculata</i>	สระบุรี	✓	✗

ตารางที่ 4.2 ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

รหัส	ชื่อสามัญ	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)	ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (ค่าดูดกลืนแสงที่ 260/280)
BR01	เสลดพังพอนตัวผู้	162.27	1.67
BR02	อังกาบ	284.53	1.39
BR03	สังกรณี	414.16	1.30
BR04	อังกาบหนู	465.52	1.32
BR05	เสลดพังพอนตัวผู้	205.69	1.87
BR06	อังกาบ	273.50	1.34
BR07	เสลดพังพอนตัวผู้	284.68	1.22
BR08	เสลดพังพอนตัวผู้	2,032.04	1.26
BR09	อังกาบหนู	373.30	1.27
BR10	สังกรณี	149.46	1.28
BR11	สังกรณี	159.90	1.33
BR12	อังกาบหนู	402.88	1.27
BR13	ระงับพิษ	310.89	1.16
BR14	อังกาบใบเล็ก	300.00	1.29
BR17	อังกาบ (ดอกม่วงขาว)	419.7	1.75
BR18	สังกรณี (ใบมีขนมาก)	300.00	1.25
BR19	เสลดพังพอนตัวผู้	250.00	1.15
BR20	สกุล <i>Barleria</i>	325.00	1.28
OG15	ทองพันชั่ง	330.77	1.95
OG16	ฟ้าทลายโจร	67.02	1.25



รูปที่ 4.1 แสดงผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ ซึ่งกำหนดให้ lane ที่ 1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส lane ที่ 2-17 คือ BR01- BR14, OG15 และ OG16 ตามลำดับ

4.2.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 16 ตัวอย่าง และพืชนอกสกุล *Barleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง คือทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสบริเวณ *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ พบขึ้นดีเอ็นเอมีขนาด 930-967 คู่เบส จากการนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Kit GF-1 AmbiClean และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ โดยทำการตัดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA 5 ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าพืชในสกุล *Barleria* ที่ศึกษา มีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์อย่างชัดเจน โดยดูจากค่า bootstrap ซึ่งเป็นค่าทดสอบความเชื่อมั่นของ phylogenetic tree บ่งบอกจำนวนข้อมูลที่เกิดจากการสุ่มข้อมูลตัวอย่างเปรียบเทียบกับกันซ้ำๆ สามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มตัวอย่างของเสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ BR01, BR05, BR07 และ BR08 ซึ่ง 4 ตัวอย่างเป็นใบของเสลดพังพอนตัวผู้ที่นำมาจากจังหวัดปราจีนบุรี จังหวัดน่าน จังหวัดราชบุรี และจังหวัดแม่ฮ่องสอน ตามลำดับ

กลุ่มที่ 2 กลุ่มตัวอย่างของอังกาบหนู (*Barleria prionitis*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ BR04, BR09 และ BR12 ซึ่งทั้ง 3 ตัวอย่างเป็นใบของอังกาบหนูที่นำมาจากกรมส่งเสริมวิชาการการเกษตร กรุงเทพมหานคร จังหวัดปราจีนบุรี และจังหวัดน่าน ตามลำดับ

กลุ่มที่ 3 กลุ่มตัวอย่างของสังกรณี (*Barleria strigosa*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ BR03, BR10 และ BR11 ซึ่งทั้ง 3 ตัวอย่างเป็นใบของสังกรณีที่นำมาจากสวนพฤกษศาสตร์ภาคตะวันออก (เขาหินซ้อน) จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดปราจีนบุรี และจังหวัดชลบุรี ตามลำดับ

กลุ่มที่ 4 กลุ่มตัวอย่างของอังกาบ (*Barleria cristata*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ BR02, BR06, BR14 และ BR17 ซึ่งทั้ง 4 ตัวอย่างเป็นใบของกรุงเทพมหานคร จังหวัดสระบุรี จังหวัดชลบุรี และ จังหวัดสระบุรี ตามลำดับ โดยที่ BR14 มีลักษณะใบเล็ก ส่วน BR17 มีลักษณะดอกสีขาวและม่วงในดอกเดียวกัน

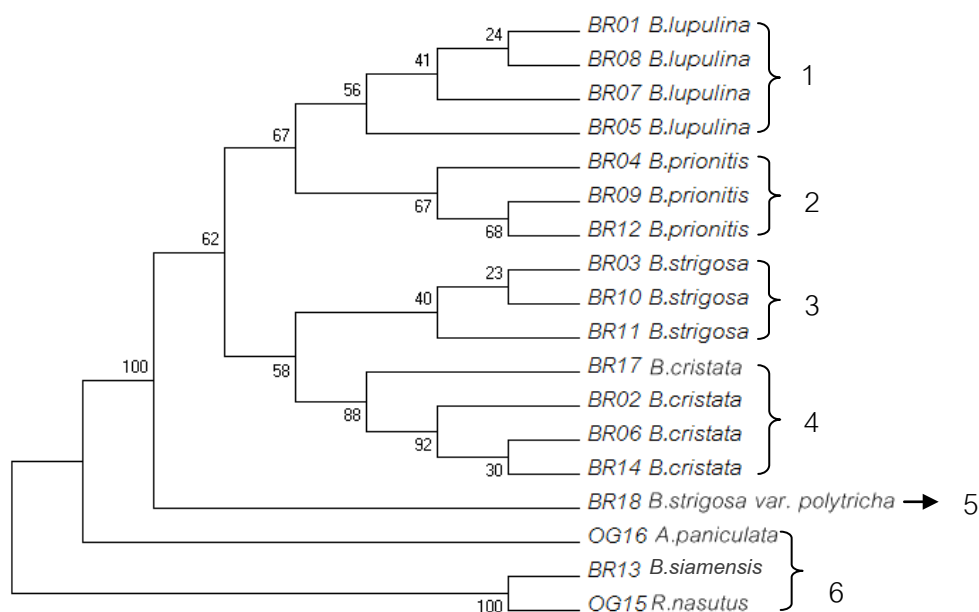
กลุ่มที่ 5 กลุ่มตัวอย่างของสังกรณีที่มีขนมาก (*Barleria strigosa*) จากจังหวัด นครศรีธรรมราช

กลุ่มที่ 6 กลุ่มตัวอย่างของพืชนอกสกุล *Barleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง คือทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) รวมทั้งตัวอย่างที่ BR13 หรือระงับพิษ (*Barleria siamensis*)

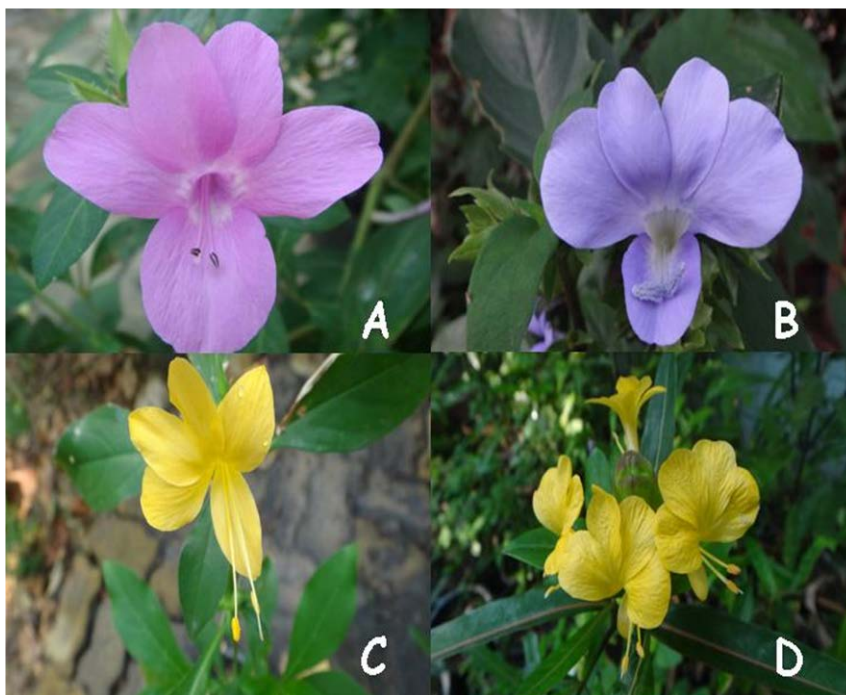
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างพืชได้เป็น 6 กลุ่ม ตามชนิดของพืช โดยเสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*: กลุ่ม 1) แสดงความใกล้ชิดกับอังกาบหนู (*B. prionitis*: กลุ่มที่ 2) และสังกรณี (*B. strigosa*: กลุ่ม 3) แสดงความใกล้ชิดกับอังกาบ (*B. cristata*: กลุ่ม 4) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบว่าอังกาบหนูและเสลดพังพอนตัวผู้เป็นพืชที่มีหนาม และมีดอกสีเหลือง สำหรับและสังกรณีและอังกาบ เป็นพืชที่ไม่มีหนาม และมีดอกสีชมพู ม่วง ดังแสดงในรูปที่ 4.3A-D กลุ่มที่ 5 มีเพียงสังกรณีตัวอย่างที่ BR18 ซึ่งเมื่อศึกษาเพิ่มเติมพบว่าเป็นชนิดหญ้าห้วนาค (*B. strigosa* var. *polytricha*) ที่แยกออกไปจากสังกรณีอื่นอย่างชัดเจน จึงควรมีการทบทวนเรื่องการจัดจำแนกของพืชชนิดนี้ต่อไป และกลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) และทองพันชั่ง (*R. nasutus*) ซึ่งเป็น outgroup รวมทั้งระงับพิษ (*B. siamensis*) ซึ่งแสดงความแตกต่างมากกว่าพืชในสกุล *Barleria*

จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ intron ของ *trnL* และ intergenic spacer (IGS) ระหว่าง 3' exon *trnL* และ *trnF* exon ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ พบว่าหญ้าห้วนาคแสดงความสัมพันธ์กับสังกรณีในระดับต่ำ แม้ว่าพืชชนิดเดียวกัน ซึ่งสังกรณี (*B. strigosa*) เป็นไม้พุ่ม สูง 0.3-1 เมตร แตกกอเป็นพุ่มขนาดเล็ก ใบของสังกรณีมีโคนใบสอบเรียว ก้านใบยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ขนสั้นหยาบประปราย ใบรูปไข่กว้าง ปลายใบเรียวแหลม ดอกเป็นช่อแบบช่อลดรูป ดอกเป็นกระจุกแน่น เรียงข้างเดียว หันไปทางปลายกิ่ง ในแนวระนาบกับลำต้น ใบประดับ 2 อัน รูปไข่ปลายแหลม ใบประดับขนาดเล็กเรียง 2 แถวซ้อนกันด้านล่างของแกนช่อดอก มีขนาด 1-1.5X2-2.7 เซนติเมตร ดอกสีม่วง หรือม่วงอ่อน โคนเชื่อมเป็นหลอดวงกลีบรูปแตร ปลายแยก 5 หยัก การเรียงกลีบแบบห้อยวงกลีบขนาดเล็ก 2 หยัก ซ้อนทับห้อยวงกลีบขนาดใหญ่ 3 หยัก พบขนต่อมจำนวนมากตลอดหลอดวงกลีบ เกสรเพศผู้สืบพันธุ์ได้ 2 เกสร ขนาดยาวกว่าเกสรเพศผู้เป็นหมัน 2 เกสร เกสรเพศเมีย 1 เกสร มีรังไข่และก้านชูเกสรเพศเมียเกลี้ยง ผลเป็นผลแห้งแตก ยาวประมาณ 1.8-2 เซนติเมตร เกลี้ยง สีดำเป็นมัน มี 4 เมล็ด เรียงไปทางหัวผล ซึ่งต่างจากหญ้าห้วนาค (*B. strigosa* var. *polytricha*) ที่เป็นไม้พุ่ม สูง 1-3 เมตร ไม่แตกกอ โคนใบรูปลิ้น ก้านใบยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ขนสั้นหยาบหนาแน่น ใบรูปไข่แคบ โคนใบรูปลิ้น ปลายใบแหลม ดอกมีลักษณะคล้ายกับสังกรณี ยกเว้นพบขนสั้นหนาแน่นบริเวณใบและใบประดับ ดังนั้นแม้จะมีการตั้งชื่อซ้ำชนิด

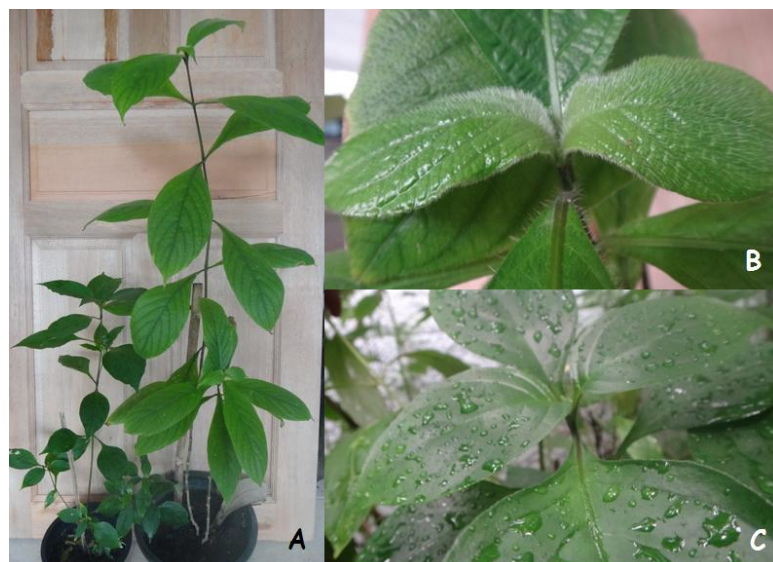
กัน แต่โครงสร้างภายนอกของสังกรณี (*B. strigosa* Willd.) พบมีความแตกต่างจากหญ้าห้วนาค (*B. strigosa* var. *polytricha* (Wall.) R. Ben. อย่างชัดเจนทั้งความสูง (รูปที่ 4.4 A) รูปร่างใบ ความหนาแน่นของขนที่บริเวณใบ (รูปที่ 4.4 B และ C) และดอก กลีบประดับมีปลายเรียวแหลม สอดคล้องกันกับการศึกษาของ Imlay (1938) อย่างไรก็ตามในการเรียกชื่อท้องถิ่นของพืชมีหลากหลาย เช่น สังกรณี กำแพงใหญ่ ขี้ไพนกุ่ม เเท่งดี หญ้าหงอนไก่ และหญ้าห้วนาค เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาข้อมูลด้านโมเลกุลเพิ่มเติม และทบทวนเรื่องการจัดจำแนกของพืชชนิดนี้ต่อไป



รูปที่ 4.2 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Barleria* ด้วยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA 5 โดยสุ่มค่า bootstrap เท่ากับ 1,000



รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะของดอกในพืชสกุล *Barleria* (A) สังกกรณี (*B. strigosa*) (B) อังกาบ (*B. cristata*) (C) อังกาบหนู (*B. prionitis*) และ (D) เสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*)



รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบลักษณะของสังกรณีและหญ้าหวาน (A) ความสูงของสังกรณี (ซ้าย) และหญ้าหวาน (ขวา) (B) ใบมีขนสั้นหยาบหนาแน่นของหญ้าหวาน และ (C) ใบมีขนสั้นปริมาณเล็กน้อยของสังกรณี

4.2.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 4 ตัวอย่างมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 74 ไพรเมอร์ สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้จำนวน 23 ไพรเมอร์ ดังแสดงชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 4.3 แต่เมื่อนำมาทำการทดลองกับกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียง 10 ไพรเมอร์เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และสามารถวิเคราะห์ผลได้ คิดเป็น 43.48 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากการใช้ไพรเมอร์แต่ละชนิดนั้น พบว่าจำนวนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นั้นแตกต่างกัน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยไพรเมอร์ทั้ง 10 ไพรเมอร์นั้น พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอในแต่ละไพรเมอร์มีจำนวนตั้งแต่ 11 แถบ (OPC-02 และ OPC-04) จนถึง 22 แถบ (OPA-18) และได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 152 แถบ เฉลี่ย 15.20 แถบต่อไพรเมอร์ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีขนาดตั้งแต่ 250-2500 คู่เบส ดังตารางที่ 4.4

เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงโดยอาศัยค่าพารามิเตอร์ของ Jaccard แสดงเป็นค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Genetic similarity) ของแต่ละตัวอย่างนั้น พบว่าตัวอย่างที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันจะมีค่าความคล้ายคลึงสูง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มตัวอย่างของเสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ BR01, BR05, BR07, BR08 และ BR19 โดยตัวอย่าง BR05 และ BR19 มีค่าความคล้ายคลึงกันสูงที่สุด (0.703) และตัวอย่าง BR01 และ BR19 มีค่าความคล้ายคลึงกันน้อยที่สุด (0.167)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มตัวอย่างของอังกาบหนู (*B. prionitis*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ BR04, BR09 และ BR12 โดยตัวอย่าง BR04 และ BR09 มีค่าความคล้ายคลึงกันสูงที่สุด (0.684) และตัวอย่าง BR12 แตกต่างจากตัวอย่างอื่นๆในกลุ่มมากที่สุด

กลุ่มที่ 3 กลุ่มตัวอย่างของสังกรณี (*B. strigosa*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ BR03, BR10 และ BR18 โดยตัวอย่าง BR03 และ BR10 มีค่าความคล้ายคลึงกันสูงที่สุด (0.677) และตัวอย่าง BR18 หรือหญ้าห้วนาค (*B. strigosa* var. *polytricha*) ที่แยกออกไปจากสังกรณีอื่นอย่างชัดเจน สอดคล้องกับผลของลำดับนิวคลีโอไทด์

กลุ่มที่ 4 กลุ่มตัวอย่างของอังกาบ (*B. cristata*) ประกอบด้วยตัวอย่างที่ BR06, BR14 และ BR17 ซึ่งทั้ง 3 ตัวอย่างมีค่าความคล้ายคลึงกันสูงระหว่าง 0.500-0.600

แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่าง BR20 ที่ไม่สามารถระบุกลุ่มแน่ชัดมีแนวโน้มที่จะอยู่ในกลุ่มหรือสปีชีส์เดียวกับสังกรณีเนื่องจากมีค่าความคล้ายคลึงกับตัวอย่างที่ BR10 และ BR 18 เท่ากับ 0.348 และ 0.379 ตามลำดับ ดังค่าความคล้ายคลึงในรูปที่ 4.5

การวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Jaccard ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.01e มีค่าระหว่าง 0.14-0.70 และเมื่อสร้างเดนโดรแกรมโดยวิธี UPGMA สามารถแบ่งแยกตัวอย่างพืชในสกุลนี้ได้ทั้งหมด 3 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 มีจำนวน 5 ตัวอย่าง คือ BR01, BR05, BR07, BR08 และ BR19 ซึ่งเป็นตัวอย่างพืชเฉพาะเสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) กลุ่มที่ 2 มีเฉพาะตัวอย่างของอังกาบหนู (*B. prionitis*) ประกอบด้วยตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง คือ BR04, BR09 และ BR12 และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยกลุ่มตัวอย่างอังกาบ (*B. cristata*) กลุ่มตัวอย่างสังกรณี (*B. strigosa*) และตัวอย่าง BR18 หรือหญ้าห้วนาค (*B. strigosa* var. *polytricha*) รวมทั้งตัวอย่าง BR20 ที่ไม่สามารถระบุกลุ่มแน่ชัดมีแนวโน้มที่จะอยู่ในกลุ่มหรือสปีชีส์เดียวกับอังกาบ และสังกรณี ดังแสดงเดนโดรแกรมในรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.3 ชนิด และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดี
(www.synthesigene.com)

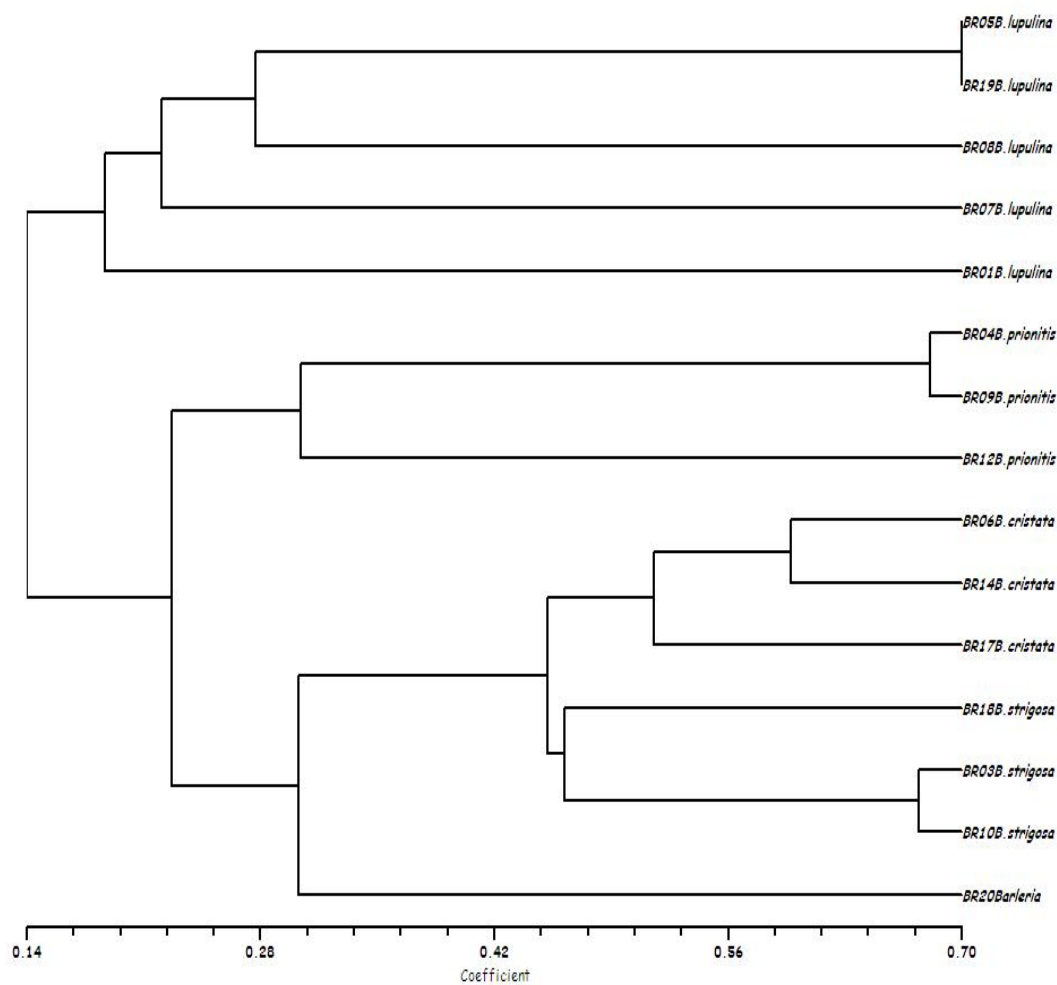
ลำดับที่	ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')
1	OPA-01	CAGGCCCTTC
2	OPA-02	TGCCGAGCTG
3	OPA-03	AGTCAGCCAC
4	OPA-05	AGGGGTCTTG
5	OPA-06	GGTCCCTGAC
6	OPA-08	GTGACGTAGG
7	OPA-10	GTGATCGCAG
8	OPA-11	CAATCGCCGT
9	OPA-12	TCGGCGATAG
10	OPA-13	CAGCACCCAC
11	OPA-14	TCTGTGCTGG
12	OPA-15	TTCCGAACCC
13	OPA-16	AGCCAGCGAA
14	OPA-17	GACCGCTTGT
15	OPA-18	AGGTGACCGT
16	OPA-20	GTTGCGATCC
17	OPC-02	GTGAGGCGTC
18	OPC-04	CCGCATCTAC
19	OPH-02	TCGGACGTGA
20	OPH-05	AGTCGTCCCC
21	OPH-08	GAAACACCCC
22	OPH-12	ACGCGCATGT
23	OPH-20	GGGAGACATC

ตารางที่ 4.4 ชนิดของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอ และขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของพืชในสกุล *Barleria*

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (คู่เบส)
OPA-01	15	400-1500
OPA-12	12	500-2000
OPA-16	20	300-2500
OPA-18	22	450-2500
OPA-20	12	450-2000
OPC-02	11	450-2000
OPC-04	11	450-1700
OPC-05	18	450-2000
OPH-08	15	250-1600
OPH-12	16	250-1200
Total	152	

ตัวอย่าง	BR05	BR08	BR01	BR19	BR07	BR04	BR09	BR12	BR06	BR14	BR18	BR03	BR10	BR17	BR20
BR05	1.000														
BR08	0.174	1.000													
BR01	0.190	0.200	1.000												
BR19	0.703	0.385	0.167	1.000											
BR07	0.348	0.167	0.200	0.154	1.000										
BR04	0.300	0.082	0.085	0.254	0.122	1.000									
BR09	0.226	0.095	0.050	0.214	0.095	0.684	1.000								
BR12	0.121	0.182	0.100	0.222	0.000	0.305	0.308	1.000							
BR06	0.203	0.138	0.036	0.278	0.069	0.379	0.318	0.118	1.000						
BR14	0.277	0.148	0.077	0.324	0.074	0.264	0.214	0.063	0.600	1.000					
BR18	0.290	0.034	0.036	0.194	0.069	0.274	0.250	0.118	0.462	0.380	1.000				
BR03	0.282	0.027	0.056	0.227	0.108	0.378	0.288	0.167	0.500	0.362	0.450	1.000			
BR10	0.268	0.056	0.058	0.235	0.113	0.352	0.337	0.123	0.513	0.407	0.479	0.677	1.000		
BR17	0.222	0.086	0.059	0.262	0.029	0.280	0.220	0.150	0.500	0.536	0.483	0.485	0.496	1.000	
BR20	0.273	0.061	0.065	0.170	0.061	0.286	0.190	0.047	0.304	0.187	0.304	0.379	0.348	0.308	1.000

รูปที่ 4.5 แสดงค่าความเหมือน (similarity matrix) ของพืชในสกุล *Barleria* ที่ได้จากการศึกษา ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี



รูปที่ 4.6 แสดงเดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 15 ตัวอย่าง ที่ได้จากการศึกษาด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ Jaccard coefficients ด้วย UPMGA

4.3 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยในการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล พบสารทั้งหมด 35, 27 และ 22 พิก ตามลำดับ ปริมาณสารที่พบที่มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

Hexane	Ethyl acetate	Ethanol
- 9,12,15-Octadecatrien-1-ol (35.34)	- 9,12,15-Octadecatrien-1-ol (26.36)	- 9,12,15-Octadecatrien-1-ol (23.31)
- 1,2 Benzenedicarboxylic acid (5.10)	- 1,2-Benzenedicarboxylic acid (20.91)	- 1,2-Benzenedicarboxylic acid (21.04)
- Hexadecanoic acid (6.59)	- Phytol isomer (5.93)	- Hexadecanoic acid (7.17)
- Phytol isomer (5.96)	- Stigmasterol (7.95)	- Stigmasterol (7.31)
- Viminalol (7.44)		- Ethyl alpha-d-glucopyranoside (6.79)

ปริมาณใน (%) มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

โดยพบสารที่ทราบโครงสร้างทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมัน เช่น Octadecatrienoic acid หรือ กรดลิโนเลนิก (linolenic acid) เป็นกรดไขมันชนิดกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) มีจำนวนคาร์บอน 18 อะตอม และมีพันธะคู่ (double bond) 3 ตำแหน่ง ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 9, 12 และ 15 เป็น polyunsaturated fatty acid กรดลิโนเลนิกเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential fatty acid) และเป็นกรดไขมันในกลุ่มโอเมกา 3 (omega-3 fatty acid) พบมากในน้ำมันพืช เช่น น้ำมันเมล็ดแฟลก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันคาโนลาและสาหร่ายสไปรูลินา (spirulina) เป็นต้น และ Hexadecanoic acid หรือ กรดปาล์มิติก (palmitic acid) ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) ที่มีคาร์บอนในโมเลกุล 16 อะตอม พบมากในน้ำมันปาล์ม น้ำมันมะพร้าว ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในต้นอังกาบ มีเพียงการศึกษาในอังกาบหนู (*B. prionitis*) ที่สกัดด้วยเอทานอลมีองค์ประกอบของ balarenone, pipataline, lupeol, prioniside A, prioniside B และ prioniside O (Ata และคณะ, 2007) สกัดด้วย hydro-methanolic extract มีองค์ประกอบของ glycosides, steroids, tannins และ flavonoids (Maji และคณะ, 2011) Iridoid glycosides, shanzhiside methyl ester, 6-O-trans-p-coumaroyl-8-O-acetylshanzhiside methyl ester, barlerin, acetylbarlerin, 7-methoxydideroside และ lupuloside จากสารสกัดจากยอดอ่อนด้วยตัวทำละลายเอทานอล (Ata และคณะ, 2009)

อย่างไรก็ตามสารที่พบทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ส่วนใหญ่เป็น 9, 12, 15-Octadecatrien-1-ol หรือ Linoleyl alcohol หรือ Linolenic alcohol ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์ไขมัน (fatty alcohol) หรือ long-chain alcohols ที่ผลิตจากกรดไขมัน เป็นวัตถุดิบหลักสำหรับสารลดแรงตึงผิว โดยใช้เป็นสารหลักในการผลิตผงซักฟอกและลดแรงตึงผิว นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางค์ อาหาร และเป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงอาจนำสารสกัดจากใบอังกาบที่มีแอลกอฮอล์ไขมันจำนวนมากมาใช้ในเชิงพาณิชย์ เนื่องจากเป็นสารธรรมชาติ ซึ่งไม่ทำให้เกิดอาการระคายเคือง มีคุณสมบัติช่วยให้เครื่องสำอางติดผิวดี ทำความสะอาดผิว ชะล้างสิ่งสกปรกและไขมัน รวมทั้งมีคุณสมบัติทำให้ผิวนุ่มขึ้น สำหรับไฟโตสเตอรอล (phytosterol) เป็นสเตอรอลที่ผลิตโดยพืช เช่น ซิโตสเตอรอล (sitosterol) และสตีกมาสเตอรอล (stigmasterol) มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายกับโคเลสเตอรอล จึงช่วยยับยั้งการดูดซึมโคเลสเตอรอลในอาหารที่เรารับประทานเข้าไปไม่ให้เข้าสู่กระแสเลือดด้วยกลไกการเข้าไปแทนที่โคเลสเตอรอล ที่ตัวรับโคเลสเตอรอล โดยไฟโตสเตอรอลเองจะถูกดูดซึมได้น้อยมาก ทำให้โคเลสเตอรอลจากอาหารถูกดูดซึมน้อยลงและถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระ ดังนั้นการบริโภคไฟโตสเตอรอลจะช่วยทำให้ระดับโคเลสเตอรอลรวมลดลง เป็นผลให้ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจลดลง อาหารที่มีไฟโตสเตอรอลสูงโดยทั่วไป ได้แก่ ถั่วชนิดต่างๆ จมูกข้าว รำข้าว และน้ำมันรำข้าว เป็นต้น

4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี paper disc diffusion ต่อเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 พบว่าสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *E. coli* และ *S. aureus* โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ได้มากกว่า *E. coli* เมื่อเปรียบเทียบจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone หรือ clear zone) ของสารสกัดหยาบ ขณะที่สารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซนไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa*, *B. subtilis* และ *M. luteus* ส่วนสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด สำหรับยาปฏิชีวนะ gentamicin ที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ที่ระดับความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้ง 5 ชนิด โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์ ส่วนสารเอทานอล 99.7 เปอร์เซ็นต์ที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด แสดงว่าบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลมาจากสารสกัดเท่านั้น แสดงผลดังตารางที่ 4.6

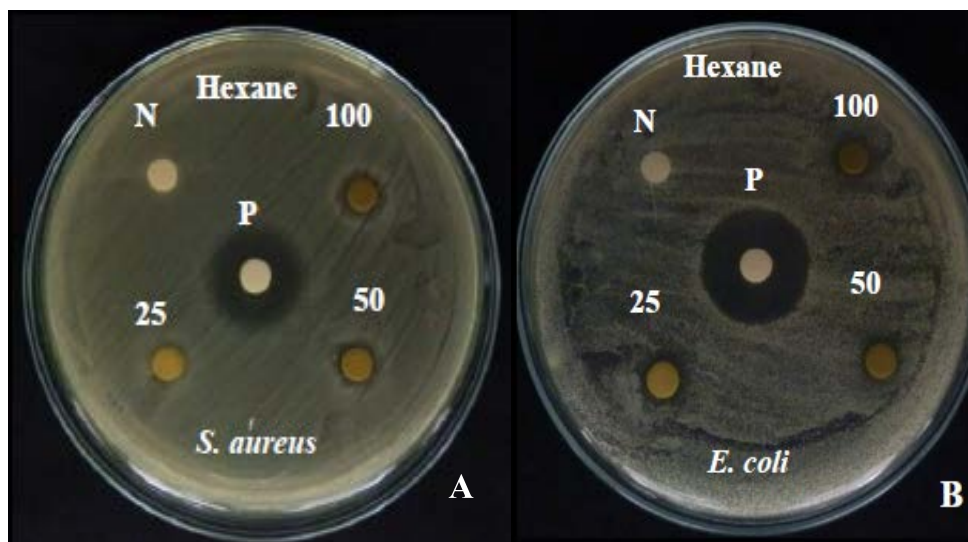
จากตารางที่ 4.6 พบว่าสารสกัดหยาบด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 7.57, 6.83, 6.74 มิลลิเมตร และ 8.12, 7.63, 6.82 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ได้มากกว่า *E. coli* เมื่อเปรียบเทียบจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นสูงจะมีความสามารถยับยั้งเชื้อได้ดีขึ้น และถ้าคิดเป็นปริมาณสารสกัดจะเท่ากับ 2, 1 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อดิสก์ ยาปฏิชีวนะ Gentamicin ที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก ความเข้มข้น

150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด โดยออกฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ได้ดีกว่า *S. aureus* ผลแสดงดังรูปที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งในจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดของจุลินทรีย์	ความเข้มข้นของสารสกัด	ความเข้มข้นของสารสกัดต่อดิสก์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร)		
			เฮกเซน	เอทิลอะซิเตท	เอทานอล
<i>E. coli</i>	100 mg/ml	2 mg	7.57	-	-
	50 mg/ml	1 mg	6.83	-	-
	25 mg/ml	0.5 mg	6.74	-	-
	gentamicin (+)	3 ug	16.90	17.22	16.65
<i>S. aureus</i>	100 mg/ml	2 mg	8.12	-	-
	50 mg/ml	1 mg	7.63	-	-
	25 mg/ml	0.5 mg	6.82	-	-
	Gentamicin (+)	3 ug	14.17	14.15	15.47
<i>M. luteus</i>	100 mg/ml	2 mg	-	-	-
	50 mg/ml	1 mg	-	-	-
	25 mg/ml	0.5 mg	-	-	-
	Gentamicin (+)	3 ug	14.12	14.80	14.70
<i>B. subtilis</i>	100 mg/ml	2 mg	-	-	-
	50 mg/ml	1 mg	-	-	-
	25 mg/ml	0.5 mg	-	-	-
	Gentamicin (+)	3 ug	16.45	16.98	16.53
<i>P. aeruginosa</i>	100 mg/ml	2 mg	-	-	-
	50 mg/ml	1 mg	-	-	-
	25 mg/ml	0.5 mg	-	-	-
	Gentamicin (+)	3 ug	17.78	17.33	17.58

หมายเหตุ (+) หมายถึง ชุดควบคุมเชิงบวก (gentamicin) ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผ่นดิสก์ (disc) เท่ากับ 6.0 มิลลิเมตร



รูปที่ 4.7 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาดจากใบของ อังกาบจากตัวทำละลายเฮกเซน ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ต่อเชื้อ *S. aureus* (A) และ *E. coli* (B) โดยมี P เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (gentamicin) ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ N เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (เอทานอล 99.7%) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาดจากอังกาบที่กล่าวมานี้มีเพียงรายงานของ Salib และคณะ (2013) ที่สกัดสารจากเปลือกของอังกาบ ด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และเอทานอล พบว่าสารสกัดจากเอทานอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งต่อ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *S. mutans* หากนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Kumar และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง จุลินทรีย์จาก *Andrographis serphyllifolia* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์เดียวกันกับอังกาบด้วยเทคนิคเดียวกัน คือ paper disc diffusion พบว่าผลการทดลองมีความสอดคล้องกัน โดยสารสกัดหยาดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* แต่ไม่ยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* และ *B. subtilis*

4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

4.5.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของ mitomycin C ต่อเซลล์ไลน์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ที่ดัดแปลงวิธีการมาจาก Mosmarin (1983) และของ Hussain และคณะ (1993) ซึ่งเป็นการทดสอบการทำงานของเซลล์จากความสามารถในการทำงานของไมโทคอนเดรียในการรีดิวซ์สาร 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) โดยเซลล์ที่มีชีวิต และมีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติ

เอนไซม์ dehydrogenase และ cofactor ในไมโทคอนเดรียจะรีดิวซ์ MTT ให้กลายเป็นผลึก formazan ได้ ดังนั้นเมื่อนำสารละลาย MTT ไปป้อนในเซลล์ที่ต้องการทดสอบ เซลล์ที่มีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติจะรีดิวซ์ MTT ให้เป็น formazan ที่มีสีม่วง โดยเซลล์ที่ตายนั้นจะมีลักษณะใสไม่มีสี ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะติดสีม่วง ซึ่งเมื่อนำมาละลายในตัวทำละลายจะได้สารละลายสีม่วง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ซึ่งนิยมรายงานเป็นระดับความเข้มข้นของสารสกัดยับยั้งที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC₅₀)

ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 6 ชนิด แบ่งเป็นเซลล์ชนิดแขวนลอย 1 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 (murine lymphocytic leukemic cell line) และเซลล์ชนิดเกาะติดพื้นผิว 5 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 (human breast cancer cell line) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 (human colon adenocarcinoma cell line) เซลล์ไตลิงชนิด Vero cell (African green monkey kidney cell line) เซลล์มะเร็งตับของมนุษย์ชนิด HepG2 (human hepatoma cell line) และเซลล์มะเร็งช่องปากของมนุษย์ชนิด KB (human mouth epidermal adenocarcinoma cell line) นำมาทดสอบกับสารสกัดยับยั้งที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อป้อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ก่อนการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดยับยั้ง ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารละลาย mitomycinC (MMC) ต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด คือ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388 เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ชนิด MCF7 เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ชนิด HT29 และเซลล์ไตลิงชนิด Vero cell เพื่อนำไปใช้เป็น positive control ในความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ชนิด P388, MCF7, HT29 และ Vero cell ที่ทำการทดสอบด้วยสารละลาย mitomycinC ที่ความเข้มข้น 6 ระดับ คือ 200, 100, 50, 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาตรวจสอบหาค่าระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารละลาย mitomycinC ในระดับความเข้มข้นต่างๆ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด ทำให้มีอัตราการมีชีวิตรอดลดลงแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเป็นพิษต่อเซลล์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์ประเภท lymphocyte มากที่สุด โดยเซลล์ไลน์ชนิด P388, MCF7, HT29 และ Vero cell มีค่า CC₅₀ เท่ากับ 51.20, 118.97, 61.65 และ 78.62 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ในตารางที่ 4.7 ซึ่งเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีผลทำให้อัตราการมีชีวิตรอดลดลง ดังแสดงในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย mitomycinC กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด ในรูปที่ 4.8

mitomycin C เป็นยาปฏิชีวนะที่ได้ มาจากเชื้อ *Streptomyces caespitosus* มีส่วนที่เป็น active alkylating moiety หรือ alkyl group ที่มีคุณสมบัติในการเข้าไปจับกับส่วน sulfur, nitrogen, oxygen หรือ phosphorus ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสายดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถเกิดการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) และการสังเคราะห์โปรตีน โดยไม่จำเพาะต่อระยะใดในวัฏจักรของเซลล์ (cell-cycle non-specific) ทำให้ไม่สามารถแบ่งเซลล์และตายไปในที่สุด (Sadeghi และคณะ, 1998) mitomycinC จึงนำมาใช้เป็นยารักษาเนื้องอก และมะเร็ง นอกจากนี้ mitomycinC ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านรูปร่างและลักษณะของเซลล์ โดยจะไปยับยั้งกระบวนการในสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA synthesis) ในวัฏจักรของเซลล์ และเมื่อใช้ mitomycinC

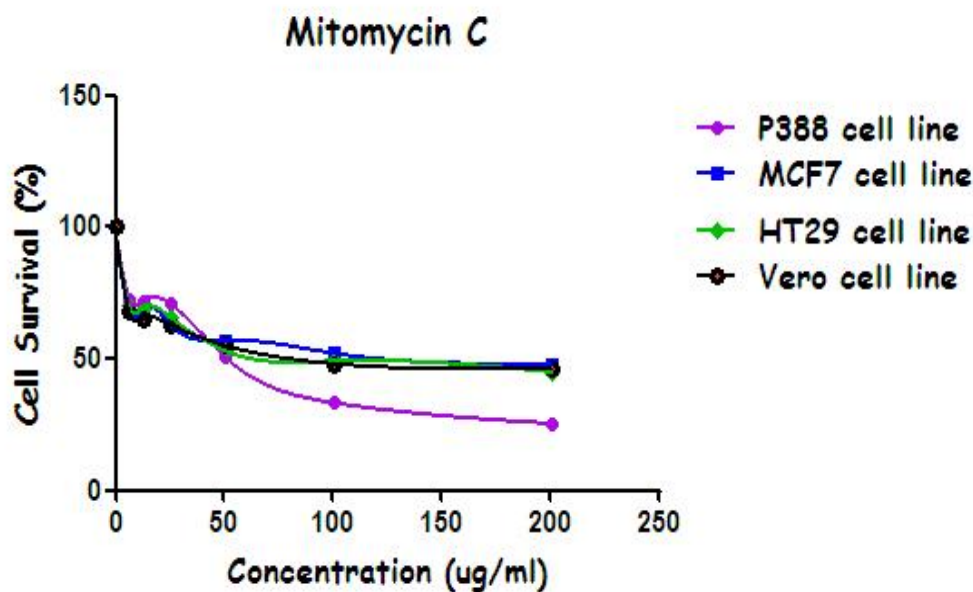
ที่ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ กับเซลล์ชนิด Chang's cells (human conjunctival cell line) บ่มเป็นเวลา 2 และ 4 นาที ไม่ทำให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากปกติ (Murayama และคณะ, 1996)

Sadeghi และคณะ (1998) ได้ทดสอบความเป็นพิษของ mitomycinC ที่มีต่อเซลล์ Keratocyte ของมนุษย์ โดยใช้ความเข้มข้นของ mitomycin C เท่ากับ 0.05, 0.5, 5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรบ่มร่วมกับเซลล์เป็นเวลา 5 นาที และ 1 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอด พบว่า mitomycinC สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) ได้ เมื่อใช้ mitomycinC ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที โดยความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเซลล์ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (inhibitory dose; ID_{50}) เท่ากับ 38 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะมีค่า ID_{50} เท่ากับ 4.8 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ mitomycinC ไม่ได้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้เท่าไร แต่ยังขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการบ่มด้วย สอดคล้องกับ Park และคณะ (2002) ที่ได้รายงานว่า mitomycinC สามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ alpha-TN4 mouse lens epithelial cells (LECs) ซึ่งฤทธิ์ของยาที่ใช้ขึ้นอยู่กับปริมาณและเวลาที่ได้รับ อย่างไรก็ตาม mitomycin C มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ Vero ซึ่งเป็นเซลล์ปกติอีกด้วย ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารละลาย mitomycinC ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น ชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) ในขั้นตอนต่อไป

ในการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการทดสอบสารละลาย mitomycinC กับเซลล์ชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 160, 80, 40, 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (CC_{50}) ในเซลล์ชนิด P388, MCF7, HT29 และ Vero cell เท่ากับ 49.77, 52.49, 99.34 และ 88.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้นต่อเซลล์ MCF7 รวมทั้งสารละลาย beauvericin ที่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า mitomycinC เนื่องจากใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่า โดยเซลล์ไลน์ชนิด P388, MCF7, HT29 และ Vero cell มีค่า CC_{50} เท่ากับ 2.25, 13.40, 15.05 และ 10.48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารละลาย mitomycinC (MMC) ที่มีต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay

Treatment	Cell Line Types	50% cytotoxic concentration: CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
mitomycinC (MMC)	P388	51.20
	MCF7	118.97
	HT29	61.65
	Vero Cell	78.62



รูปที่ 4.8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ mitomycinC (MMC) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ 4 ชนิด คือ P388, HT29, MCF7 และ Vero cell ที่บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

4.5.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาดต่อเซลล์ไลน์

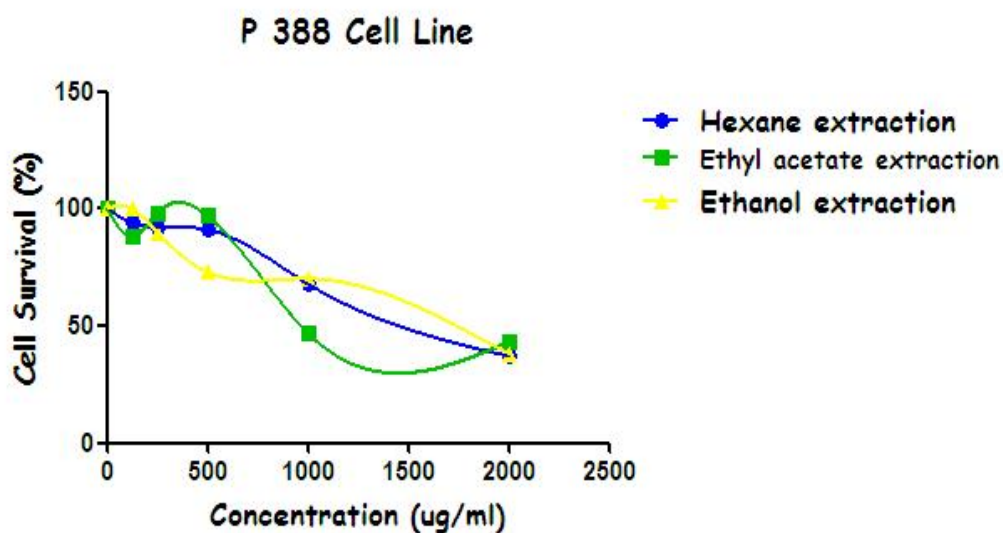
เมื่อนำสารสกัดหยาดที่สกัดได้จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ของใบอังกาบมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 6 ชนิด แบ่งเป็นเซลล์มะเร็ง คือ P388, MCF7, HT29, KB และ HepG2 และเซลล์ปกติ คือ Vero cell ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ และค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นหาก $CC_{50} > 2000$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นับว่ามีค่าความเป็นพิษต่ำ พบว่าสารสกัดหยาดในตัวทำละลายเฮกเซนจากใบอังกาบแสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ได้ในเซลล์ P388, MCF7, HT29 และ KB แต่ไม่แสดงความเป็นพิษในเซลล์ชนิด HepG2 และ Vero cell สำหรับสารสกัดหยาดจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอล มีผลเฉพาะเซลล์ไลน์ชนิด P388 เท่านั้น สำหรับค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 ของสารสกัดหยาดในทุกตัวทำละลาย แสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารสกัดหยาบจากใบอังกาบ จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay

Cell Types	50% Cytotoxic Concentration: CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	Hexane	Ethyl acetate	Ethanol
P388	1447.52	966.22	1742.23
MCF7	866.36	>MCT	>MCT
HT29	1907.56	>MCT	>MCT
KB	1236.75	>MCT	>MCT
HepG2	>MCT	>MCT	>MCT
Vero	>MCT	>MCT	>MCT

MCT=maximal concentration tested ($\geq 2000 \mu\text{g/ml}$)

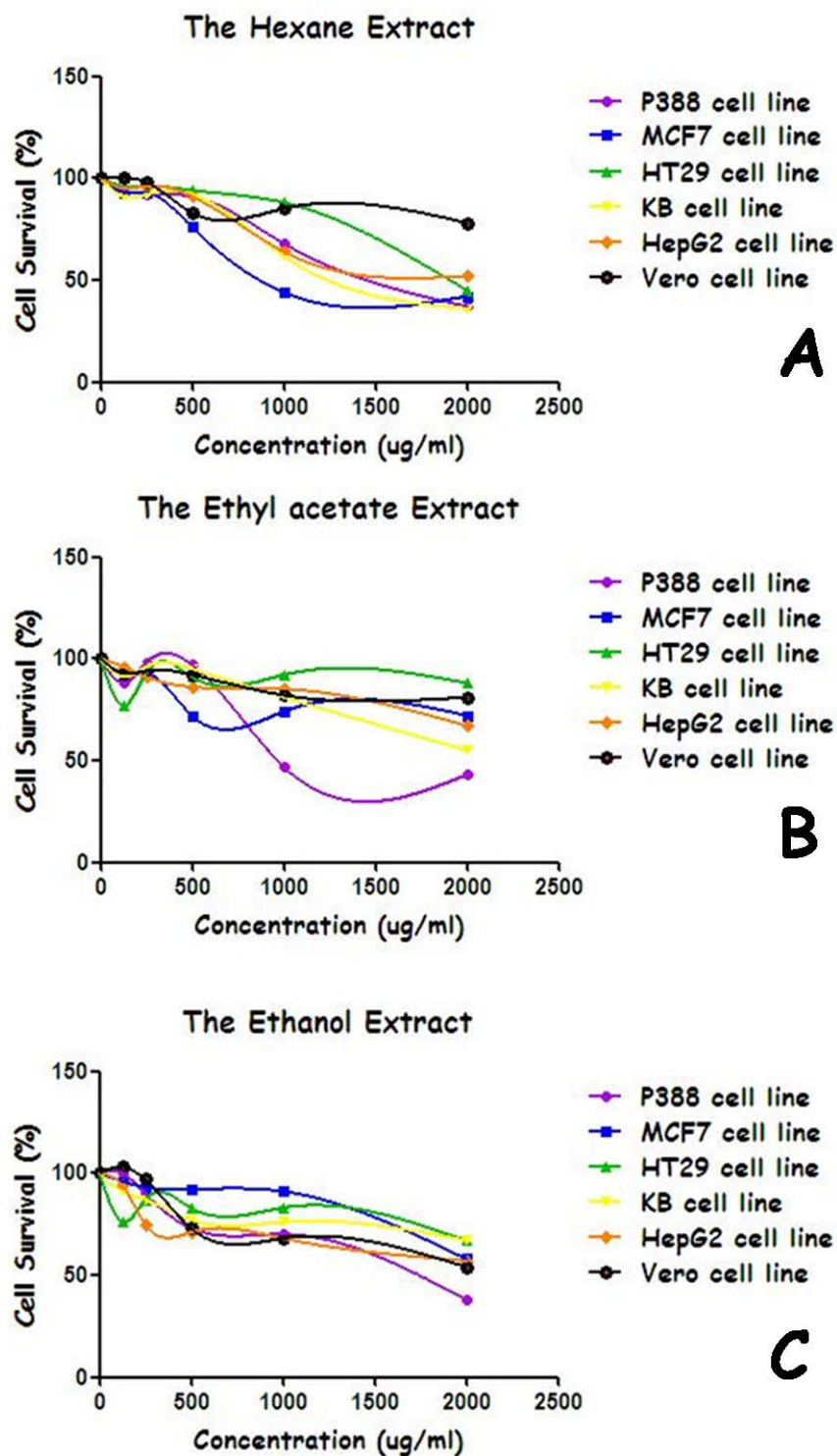
สารสกัดจากใบอังกาบทั้งสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุด โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) เท่ากับ 1447.52, 966.22 และ 1742.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในทั้ง 3 ตัวทำละลายกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ชนิด P388 ในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล จากใบอังกาบต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ไลน์ชนิด P388

สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนของใบอังคาบความเป็นพิษมากที่สุด โดยสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดต่างๆมากที่สุด โดยมีผลต่อเซลล์ชนิด P388, MCF7, HT29 และ KB โดยมีระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1447.52, 866.36, 1907.56 และ 1236.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตามลำดับ แต่ไม่มีผลต่อการตายต่อเซลล์ HepG2 และ Vero ที่ค่าความเข้มข้นสูงสุดในการศึกษา รวมทั้งสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเอทิลอะซิเตท และเอทานอลของใบอังคาบแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 เท่านั้น โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิดต่างๆ ดังรูปที่ 4.10 A-C

ยังไม่มีรายงานการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากต้นอังคาบต่อเซลล์ในหลอดทดลอง มีเพียงการศึกษาของสารสกัดจากรากและใบของอังคาบหนูที่ไม่แสดงความเป็นพิษต่อ albino rats (Dheer และ Bhatnagar, 2010) โดยไม่ก่อให้เกิดความตายเมื่อให้หนูกินสารสกัดในความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 14 วัน รวมทั้งการศึกษาของ Singh และคณะ (2005) ที่ศึกษา iridoid glucosides ที่พบมากในสารสกัดจากอังคาบหนูที่สกัดด้วยน้ำ ไม่สามารถทำให้เกิดความผิดปกติในหนูที่ได้รับสารสกัดทางปากที่ระดับความเข้มข้น 3000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 15 วัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อฉีดสารสกัดด้วยน้ำเข้าทางช่องท้องหนูพบค่าที่ทำให้หนูตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 2530 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม



รูปที่ 4.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน (A) เอทิลอะซิเตท (B) และเอทานอล (C) จากใบอังกาบ ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิด P388, MCF7, HT29, KB, HepG2 และ Vero cell