ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว. (A-F)

A. รายชื่อผลงานที่ตีพิมพ์และเผยแพร่ จากการสนับสนุนทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย TRF-MRG5080006

1. ธาริณี สืบปาละ สุพัตรา ปรศุพัฒนา ศรีสมพร ปรีเปรมและ**ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์.** 2550. การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืช 3 ชนิด ในสกุล Murdannia (วงศ์ Commelinaceae). **Murdannia bracteata, M. loriformis and M. nudiflora.** วารสารวิจัย มข. (บศ.) 7(2): เม.ย.-มิ.ย. : 98-110.

2. ธาริณี สืบปาละ ศรีสมพร ปรีเปรม สุพัตรา ปรศุพัฒนาและ**ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์.** 2007. การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชเวทของพืช 3 ชนิด ในสกุลหญ้าปักกิ่ง (วงศ์ผักปลาบ). **Murdannia bracteata, M. loriformis and M. nudiflora.** Isan Journal of Pharmaceutical Sciences 3(1): January-June : 43-52.

3. **THAWEESAK THITIMETHAROCH,** Woraporn Putalun & Robert B. Faden. **Murdannia discreta** (Commelinaceae): Recognizing and Understanding a Rare Species in Thailand. 14th Flora of Thailand Meeting. Carlsberg Academy, Copenhagen, Denmark. 18-21 August 2008. (Oral Presentation)

4. **THAWEESAK THITIMETHAROCH,** Tarinee Subphala, Srisomporn Preeprame, Supratra Porasuphatana & Robert B. Faden. The Identification of Yah Peking as **Murdannia bracteata** (Commelinaceae) and the species with which it has been confused. 14th Flora of Thailand Meeting. Carlsberg Academy, Copenhagen, Denmark. 18-21 August 2008. (Oral Presentation)

5. Orasa Chaichumporn, Srisomporn Preeprame and **THAWEESAK THITIMETHAROCH.** Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae): **Murdannia japonica, M. spectabilis and M. vaginata**: The 3rd Sino-Thai

International Conference. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi, P.R. China. 23-31 Octobert 2008. 145-146.

6. Sureerut Kaewsaart, Srisomporn Preeprame and **THAWEESAK THITIMETHAROCH**. Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Four *Cyanotis* species (Family Commelinaceae): **Cyanotis arachnoidea, C. axillaris, C. thwaitesii and C. vaga**: The 3rd Sino-Thai International Conference. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi, P.R. China. 23-31 Octobert 2008. 260-263.

7. สุรีรัตน์ เขียวสอาด[1], ศรีสมพร ปรีเปรม[1], สุพัตรา ปรศุพัฒนา[1] และ **ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์[1*]** . COMPARATIVE PHARMACOGNOSTIC STUDIES AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF Murdannia gigantea, M. macrocarpa AND M. simplex (FAMILY COMMELINACEAE). การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 14 โรงแรมสุนีย์แกรนด์ แอนด์ คอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ จ.อุบลราชธานี 10-12 ตุลาคม 2553.

8. อรษา ชัยชุมพร[1], สุพัตรา ปรศุพัฒนา[1], ศรีสมพร ปรีเปรม[1] และ **ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์[1*]**. COMPARATIVE PHARMACOGNOSTIC STUDIES AND ANTIOXIDANT ACTIVITES OF Murdannia discreta, M. edulis AND M. japonica (FAMILY COMMELINACEAE). การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT ครั้งที่ 14 โรงแรมสุนีย์แกรนด์ แอนด์ คอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ จ.อุบลราชธานี 10-12 ตุลาคม 2553.

9. Sureerut Kaewsaart, Supratra Porasuphatana, R.B. Faden and **THAWEESAK THITIMETHAROCH**. Total Phenolic Content and DPPH radical scavenging activity from aerial vegetative parts of **Murdannia bracteata, M. gigantean, M. macrocarpa and M. simplex**. (Family Commelinaceae): The 2nd Symposium of the Flore du Cambodge, du Laos et du Vietnam. Institution of Ecology and Biological Resources, Ministere des Affaires Etrangeres et Europeennes, Sud Expert Plantes and Museum National d'histoire naturelle, Hanoi, Vietnam. 6-8 December 2010. 80p.

10. Orasa Chaichumporn, Supratra Porasuphatana, R.B. Faden and **THAWEESAK THITIMETHAROCH**. DPPH radical scavenging activity and total Phenolic Content from aerial vegetative parts of **Murdannia bracteata, M. discreta, M. edulis and M. japonica**. (Family Commelinaceae): The 2nd Symposium of the Flore du Cambodge, du Laos et du Vietnam. Institution of

Ecology and Biological Resources, Ministere des Affaires Etrangeres et Europeennes, Sud Expert Plantes and Museum National d'histoire naturelle, Hanoi, Vietnam. 6-8 December 2010. 81p.

B. สามารถสร้างมหาบัณฑิต ได้ 3 คน และได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานระดับชาติ 1 คน (ธารินี) และระดับนานาชาติ 1 คน (สุรีรัตน์) ปัจจุบันเป็นครู อาจารย์ หรือ นักวิจัย

C. การค้นพบใหม่

ทราบจุลลักษณะวินิจฉัยแผ่นใบและรูปวิธานจำแนกชนิดพันธุ์พืชซึ่งเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนสำหรับพืชสกุลนี้ (Diagnostic Innovation)

การศึกษาครั้งนี้พบพืชที่ยังไม่สามารถระบุชนิดของพืชได้หนึ่งชนิด (**Murdannia** sp. = **Murdannia ubonensis**) คาดว่าจะเป็นพืชที่ถูกค้นพบใหม่ของโลก (New to Science)

นอกจากนี้ยังพบพืชที่ยังมีชื่อพฤกษศาสตร์ยังไม่ถูกต้องตามกฎการกำหนดชื่อ (New Combination) คือ **Murdannia discreta**

D. พบข้อควรระวังในการบริโภคสมุนไพรพืชวงศ์ผักปราบ (Commelinaceae) คือ การสะสมผลึกแคลเซียมออกซาเลท จำนวนมากในส่วนต่างๆ ของพืช อาจทำให้ผู้บริโภค เกิดการระคายเคืองทางเดินอาหาร และสะสมที่ไต

E. ความรู้และประสบการณ์ที่ได้ทำให้สามารถนำไปบูรณาการการเรียนการสอน ในมุมมองการวินิจฉัยพืชสมุนไพร ภูมิปัญญาท้องถิ่นเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์ ฤทธิ์ทางยาและพิษวิทยา

F. รายชื่อผลงานต้นฉบับรอการตีพิมพ์และเผยแพร่

(มีปัญหาเรื่องค่าใช้จ่ายเดินทางเพื่อเทียบเคียงพืชต้นแบบ (type specimen) ที่พิพิธภัณฑ์พืชในยุโรปและการสำรวจเพิ่มเติมในพื้นที่ใหม่)

1. **Murdannia discreta** (Commelinaceae), A New Combination from Thailand
2. Comparative Leaf Anatomy of Asian **Murdannia** species
3. Comparative data of TLC patterns in between genus **Murdannia** and **Cyanois**
4. **Murdannia ubonensis** T. Thitimetharoch & R.B. Faden (Commelinaceae), a new species from Thailand

ISSN: 1905-0852

IJPS

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน

Isan Journal of Pharmaceutical Sciences

Volume 3, Number 1, January-June 2007

Original Article

การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชเวทของพืช 3 ชนิดในสกุลหญ้าปักกิ่ง (วงศ์ผักปลาบ)

Comparative Basic Pharmacognostic Studies of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae)

ธารินี สืบปาละ[1], ศรีสมพร ปรีเปรม[1], สุพัตรา ปรศุพัฒนา[1], ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์[1*]

Tarinee Subphala[1], Srisomporn Preeprame[1], Supatra Porasuphatana[1], Thaweesak Thitimetharoch[1*]

[1]คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

Received: 27 February, 2007 *Accepted: 12 June, 2007*

Abstract

The comparative basic pharmacognostic studies for three *Murdannia* species (Family Commelinaceae), *M. bracteata, M. loriformis* and *M. nudiflora*, were conducted by using methods of diagnostic microscopic studies (leaf scraping and leaf clearing) and phytochemical methods (physico-chemical value and thin-layer chromatography). Cutin pattern and macro-hairs are distinguished epidermal microscopic characters among the species. The differences of total phenolic contents and thin-layer chromatogram are supported the identification.

Keywords: Commelinaceae, genus *Murdannia*, pharmacognostic study, microscopic character, phytochemistry

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชเวทของพืช 3 ชนิด ในสกุลหญ้าปักกิ่ง (วงศ์ผักปลาบ) คือหญ้าปักกิ่ง *(M. bracteata)* ผักลืมผัวใหญ่ *(M. loriformis)* และกินกุ้งน้อย *(M. nudiflora)* ด้วยวิธีศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบ (วิธีขูดผิวแผ่นใบและวิธีทำตัวอย่างให้ใส) และวิธีทางพฤกษเคมี (วิธีประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี) พบว่าลักษณะลวดลายคิวทินและขนขนาดใหญ่ที่ปรากฏ ลักษณะวินิจฉัยทางเคมีคือ ปริมาณรวมของฟีนอลิก และทินเลเยอร์โครมาโทแกรมแสดงให้เห็นถึงลักษณะความแตกต่างของพืชดังกล่าว และสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการวินิจฉัยได้

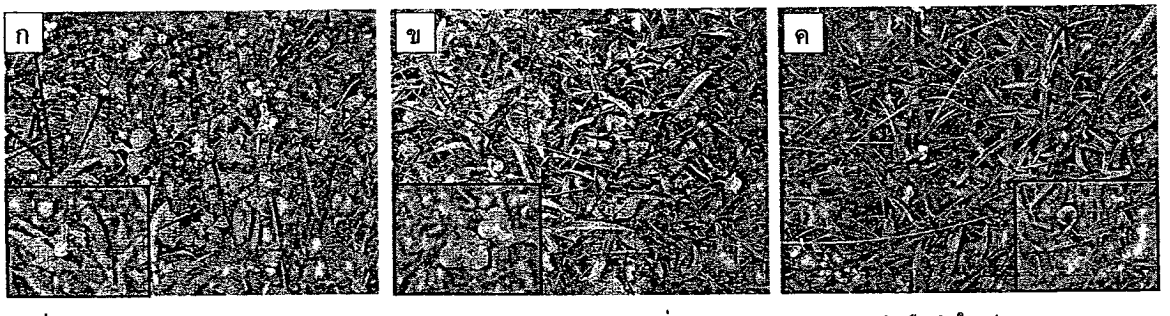
คำสำคัญ: วงศ์ผักปลาบ สกุลหญ้าปักกิ่ง การศึกษาทางเภสัชเวท จุลลักษณะ พฤกษเคมี

*ผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้: ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โทรศัพท์ 043-362093 โทรสาร 043-202379, email: thati@kku.ac.th

บทนำ

สมุนไพรหญ้าปักกิ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวสกุล *Murdannia* วงศ์ผักปลาบ (Family Commelinaceae) มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Murdannia bracteata* (C.B. Clarke) J.K. Morton ex D.Y. Hong มีลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไปคล้ายกับพืชอีก 2 ชนิด คือ ผักลืมผัวใหญ่ *(M. loriformis (Hassk.)* R.S. Rao & Kammathy) และกินกุ้งน้อย (*M. nudiflora* (L.) Brenan) (รูปที่ 1) แต่ *M. bracteata* และ *M. loriformis* จะพบลักษณะปรากฏของลำต้นที่มีใบแบบกระจุก (Rosette stem) (Thitimetharoch et al., 2004)

สมุนไพรหญ้าปักกิ่งมีสรรพคุณช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Phetsuk et al., 2005) รักษาอาการเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ และกำจัดพิษ (Saralamp et al., 1996) ใช้เพื่อช่วยลดผลข้างเคียงจากการใช้เคมีบำบัดหรือรังสีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็ง (วีณา, 2542) การพบว่าสารสำคัญกลัยโคสฟิงโกไลปิด (Glycosphinggolipid) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในหลอดทดลอง (Jiratchariyakul et al., 1998) สารสกัดด้วยเอทานอลที่มีคุณสมบัติป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลอง (Intiyot et al., 1998) ลดระดับสารอะฟลาทอกซิน-อัลบูมิน (Aflatoxin-albumin) ในหนูทดลอง (Vinitketkumnuen et al., 1999) และยังมีฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารพิษรวมถึงสารสกัดยังมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* (Intiyot et al., 2002; Vinitketkumnuen et al., 1996) ผักลืมผัวใหญ่เป็นผักพื้นบ้านโดยยอดอ่อนรับประทานเป็นผักจิ้ม (Thitimetharoch et al., 2004) ส่วนกินกุ้งน้อยมีรายงานถึงสรรพคุณว่ามีการใช้ส่วนรากแก้ไข้ แก้บิด แก้ปวดเบ่งเวลาถ่ายปัสสาวะ ใช้ส่วนใบเป็นยาพอกแผลเรื้อรัง (Perry and Metzger, 1980) ทั้งต้นต้มกับน้ำมันใช้รักษาโรคเรื้อน หรือบดเป็นผงใช้รักษาอาการคัน และรักษาแผลถูกไฟไหม้ (Jain and De Filipps, 1991) รายงานการศึกษาจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของสกุล *Murdannia* (วงศ์ผักปลาบ) มีไม่มากนัก แต่ที่มีผลการศึกษาเด่นชัด ได้แก่ Tomlinson (1969) พบลักษณะปรากฏของขนจิ๋วมีต่อม (Glandular micro-hairs) ขนขนาดใหญ่ (Macro-hairs) แบบต่างๆ และปากใบเป็นชนิด 6 เซลล์ Faden และ Inman (1996) ได้ศึกษาตัวอย่างพืชในทวีปแอฟริกาและศรีลังกา สรุปลักษณะเด่นของจุลลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบพืชสกุลนี้เพิ่มเติมคือ เนื้อเยื่อผิวมีลักษณะบาง มีการสะสมและมีลวดลายคิวทิน (Cutin Pattern) และลักษณะวินิจฉัยทั่วไปไม่พบเส้นกลางใบชัดเจน ปากใบเป็นชนิดที่มีเซลล์ข้างเซลล์เคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ (Commelina type) พบด้านล่างของแผ่นใบ และพบปากใบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 4 เซลล์ (Tradescantia type) บริเวณใกล้ขอบใบด้านบน (Thitimetharoch et al., 2004) รายงานผลการศึกษาเนื้อเยื่อแผ่นใบของหว่านดองลิง (*M. japonica* (Thunb.) Faden) พบลักษณะเนื้อเยื่อผิวใบสอดคล้องกับรายงานวิจัยข้างต้นที่ได้กล่าวไว้ ส่วนการศึกษาทางพฤกษเคมีเบื้องต้นในพืชสกุลนี้มีรายงานผลการศึกษาเฉพาะในสมุนไพรหญ้าปักกิ่งพบว่ามีกลุ่มหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน กลุ่มฟลาโวนอยด์และแคลเซียมออกซาเลต (วีณา, 2542)



รูปที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและภาพขยายของดอก ก. หญ้าปักกิ่ง *(M. bracteata)* ข. ผักลืมผัวใหญ่ *(M. loriformis)* ค. กินกุ้งน้อย *(M. nudiflora)*

พืชสกุล *Murdannia* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปคล้ายคลึงกันมาก อาจเกิดความสับสนในการระบุชนิดพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาลักษณะวินิจฉัยทางเภสัชเวทจึงมีความสำคัญ นอกจากใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการจัดทำมาตรฐานพืช แล้วยังใช้เป็นข้อมูลสำหรับระบุลักษณะวินิจฉัยชนิดพืชได้อีกด้วย การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการวิจัยเพื่อเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชเวท และศึกษาลักษณะเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของข้อมูลลักษณะจุลลักษณะบางอย่างโดยใช้วิธีศึกษาวิจัยวินิจฉัยเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้วยวิธีขูดผิวแผ่นใบและวิธีทำตัวอย่างให้ใส การวิจัยทางพฤกษเคมีด้วยวิธีประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี ของพืชสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง ผักลืมผัวใหญ่ และกินกุ้งน้อย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างที่ใช้วิจัย (ตารางที่ 1)

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างจากภาคสนาม พร้อมเลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์สำหรับจัดทำเป็นตัวอย่างแห้งมาตรฐานอ้างอิง ซึ่งเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และเลือกเฉพาะส่วนใบมาแช่ใน 70% เอทานอล (Ethanol) สำหรับวิจัยจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบ และเลือกส่วนเหนือดินมาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วนำไปบดเป็นผง จากนั้นนำไปวิจัยทางพฤกษเคมีต่อไป

ตารางที่ 1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยและอ้างอิง

ชนิดพืช	ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา	วันที่เก็บ	สถานที่เก็บ
M. bracteata	TS & TT-1	20 มกราคม 2548	สวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
	TS-15	9 กันยายน 2548	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่
	TS-19	16 เมษายน 254	อำเภอเชียงม่วน จังหวัดพะเยา
M. loriformis	TS & TT-2	6 มิถุนายน 2548	สีฐาน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
M. nudiflora	TT-560	30 กันยายน 2544	อุทยานแห่งชาติภูเวียง จังหวัดขอนแก่น
	TS-22	13 มิถุนายน 2549	บ้านหนองหลุบ ตำบลแดงน้อย อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

TS = Tarinee Subphala, TT = Thaweesak Thitimetharoch

2. วิธีการทดลอง

2.1 วิธีวิจัยจุลลักษณะ (Microscopic methods) ศึกษาเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยี่ห้อ Olympus รุ่น BH-2 และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพระบบดิจิตอลโดยใช้ยี่ห้อ Olympus รุ่น DP-12

2.1.1 วิธีขูดผิวแผ่นใบ (Leaf scraping) ทำการขูดเนื้อเยื่อแผ่นใบบริเวณส่วนกลางใบด้านที่ไม่ต้องการศึกษาออกจนได้เนื้อเยื่อผิวอีกด้านที่ต้องการศึกษา จากนั้นย้อมด้วยสีซาฟรานิน (Safranin) ล้างสี แล้วดึงน้ำออกด้วยกระบวนการชุดลำดับเอทานอล (Ethanol series) จากนั้นนำไปผ่านสารละลายผสมระหว่าง 100% เอทานอล และไซลีน (Xylene) อัตราส่วน 1 : 1 และไซลีนบริสุทธิ์ตามลำดับ (Johansen, 1940) ผนึกตัวอย่างเป็นสไลด์ถาวรด้วยสารเคลือบสังเคราะห์ DePeX

2.1.2 วิธีทำใบให้ใส (Leaf clearing) เลือกบริเวณส่วนกลางของแผ่นใบ ทำการละลายรงควัตถุและทำตัวอย่างให้ใสโดยใช้สารละลายชุดลำดับเอทานอล 5% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) และสารละลายอิ่มตัวคลอรัลไฮเดรท (Chloral hydrate) ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วทำการดึงน้ำออกโดยชุดลำดับเอทานอล ย้อมด้วยเซเลสไทน์บลู บี (Celestine blue B) และซาฟรานิน ล้างสีออกด้วย 95% เอทานอล (Johansen, 1940) จากนั้นนำตัวอย่างเข้ากระบวนการทำสไลด์ถาวร

2.2 วิธีวิจัยทางพฤกษเคมี (Phytochemical methods)

2.2.1 วิธีประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (Physico-chemical value) ได้แก่ การหาปริมาณสารสกัดด้วยเมทานอล (Methanol) และน้ำ ทำการเตรียมสารสกัดพืชทั้งสามชนิด โดยนำผงตัวอย่างมาชั่งอย่างละ 5 กรัม ทำการสกัดด้วยเมทานอลและน้ำอย่างละ 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองเอาตะกอนออก นำส่วนที่เป็นของเหลวที่สกัดด้วยน้ำมาระเหยเอาน้ำออกด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) ส่วนสกัดด้วยเมทานอลนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการชั่งสารสกัดแล้วหาปริมาณสุทธิของสารสกัดคิดเป็นร้อยละของพืชแต่ละชนิด ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้รายงานผล (Jirawongse, 2000) ส่วนการหาปริมาณรวมของสารฟีนอลิก (Total phenolic contents) ทำการเตรียมสารสกัดโดยละลายสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิดด้วยเมทานอลและน้ำ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารมาตรฐานฟีนอลิกโดยใช้กรดเฟอรูลิก (Ferulic acid) ความเข้มข้น 31.125-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจาง Folin-Ciocalteu reagent ลง 10 เท่า เติมสารสกัด 200 ไมโครลิตร และเติม 1.5 มิลลิลิตร Folin-Ciocalteu reagent ผสมให้เข้ากันรอให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ โดยทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 1.5 มิลลิลิตร ของโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที แล้วดูดสารละลายขึ้นมา 200 ไมโครลิตร ใส่ถาดหลุม 96 ช่อง (96-well plate) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 725 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader) ใช้น้ำและเมทานอลเป็นตัวอย่างเทียบเคียง ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้รายงานผล (Folin and Ciocalteu, 1927) ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารสกัด เทียบเคียงกับค่ามาตรฐานกรดเฟอรูลิก (มิลลิกรัมต่อกรัม ของสารสกัด) การหาค่าปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดเทียบกับค่ากรดเฟอรูลิก (Ferulic acid equivalents) คำนวณได้ตามสมการ

$$C = c * V/m$$

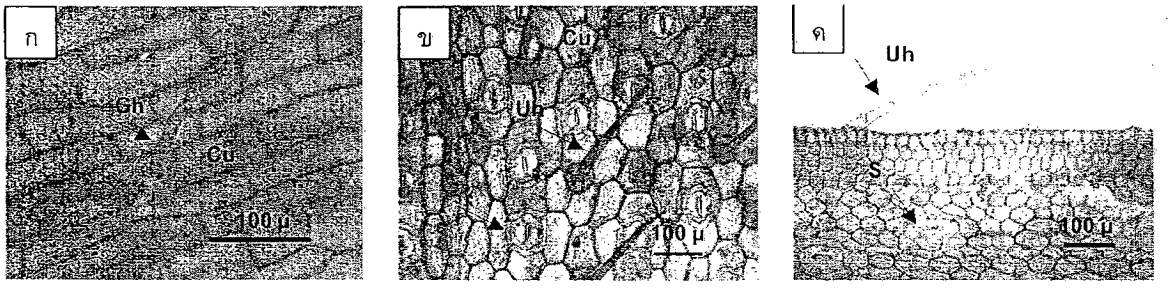
C = ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด)
c = ความเข้มข้นของกรดเฟอรูลิกที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม)
V = ปริมาตรของสารสกัด (มิลลิลิตร)
m = น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)

2.2.2 วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (Thin-layer chromatography, TLC) ใช้ตัวอย่างบดเป็นผง 1 กรัมของพืชแต่ละชนิดมาสกัดด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร 15 นาที จากนั้นนำสารสกัด 5 ไมโครลิตร มาหยดบนแผ่น TLC (Silica gel 60 F_{254} หนา 0.25 มิลลิเมตร Merck) ขนาด 5 cm x 10 cm โดยใช้ชุดตัวทำละลาย 2 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม : เอทิลแอซีเตต : เมทานอล : กรดฟอร์มิก : น้ำ (Chloroform : Ethyl acetate : Methanol : Formic acid : Water) อัตราส่วน 900 : 250 : 150 : 25 : 25 โดยใช้ ß-Sitosterol และ Andrographolide เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วบันทึกผล จากนั้นสังเกตภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light, UV) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร บันทึกผล ส่วนตัวทำละลายชุดที่ 2 ประกอบด้วย เอทิลแอซีเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซีติก: น้ำ (Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water) อัตราส่วน 125 : 11 : 11 : 13.5 โดยใช้ Tannic acid เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วยน้ำยา 2% เฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride) ในเอทานอล แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วบันทึกผล ตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride) ในเอทานอล โดยใช้ Rutin เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วบันทึกผล จากนั้นสังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร บันทึกผล (Wagner et al., 1984)

ผลการทดลอง

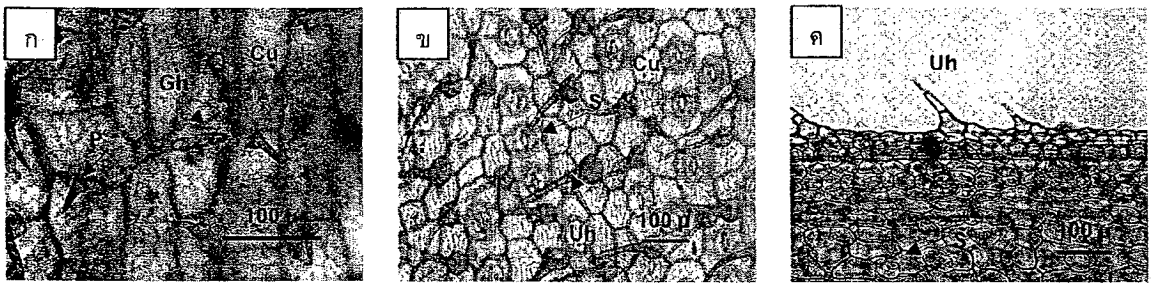
การวิจัยจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบ

หญ้าปักกิ่ง (*M. bracteata*) เนื้อเยื่อผิว (Epidermis) ทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทิน (Cutin) สะสมเห็นชัดเจนลักษณะเป็นลวดลายร่างแห (Reticulate) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม รูปร่างเซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่าและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบ **ปากใบ** (Stomata) พบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ เรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างและกระจายบริเวณใกล้ขอบเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน เซลล์ขน พบขนจิ๋วที่มี 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นเซลล์ต่อมรูปกระบอง (Glandular micro-hairs) ยาว 80 - 120 ไมโครเมตร ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง และพบขนขนาดใหญ่ (Macro hairs) 4-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว (Uniseriate-hairs) กระจายทั่วไปเฉพาะเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง **ขอบใบ** (Margins) เซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม พบขนปุ่ม (Papillae) และขนขนาดใหญ่ 2-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว (รูปที่ 2)



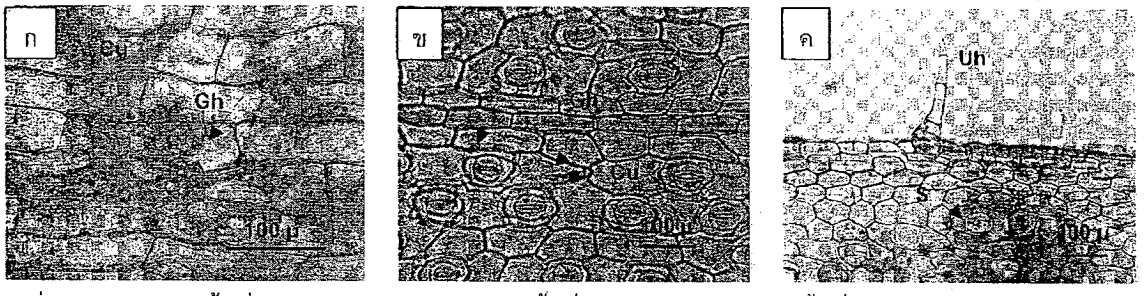
รูปที่ 2 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของหญ้าปักกิ่ง ก. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านบน ข. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านล่าง ค. บริเวณขอบใบ (Cu = Cutin, Gh = Glandular micro-hair, S = Stoma, Uh = Uniseriate-hair)

ผักลืมผัวใหญ่ (*M. loriformis*) เนื้อเยื่อผิวทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทินสะสมเห็นชัดเจนลักษณะเป็นลวดลายร่างแห เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลมขนาดรูปร่างเซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่าและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบ **ปากใบ** พบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ เรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างและกระจายบริเวณใกล้ขอบเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน **เซลล์ขน** พบขนจิ๋วที่มี 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นเซลล์ต่อมรูปกระบองยาว 60-100 ไมโครเมตร ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง และพบขนหนามปลายแหลม (Prickle hairs) ยาว 50-100 ไมโครเมตร กระจายทั่วไปบนเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน และพบขนขนาดใหญ่ 2-4 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว กระจายทั่วไปที่เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านล่าง **ขอบใบ** เซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม พบขนปุ่ม และขนขนาดใหญ่ 2-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของผักลืมผัวใหญ่ ก. เนื้อเยื่อผิวใบแผ่นด้านบน ข. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านล่าง ค. บริเวณขอบใบ (Cu = Cutin, Gh = Glandular micro-hair, P = Prickle hair, S = Stoma, Uh = Uniseriate-hair)

กินกุ้งน้อย (*M. nudiflora*) **เนื้อเยื่อผิว** ทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทินสะสมเห็นชัดเจนลักษณะเป็นลวดลายร่างแห (Striate) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม รูปร่างเซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่าและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบ **ปากใบ** พบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ เรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างและกระจายบริเวณใกล้ขอบเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน **เซลล์ขน** พบขนจิ๋วที่มี 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นเซลล์ต่อมรูปกระบองยาว 50-100 ไมโครเมตร ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง ไม่พบขนขนาดใหญ่ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง **ขอบใบ** เซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม พบขนปุ่ม และขนขนาดใหญ่ 2-5 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของกินกุ้งน้อย ก. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านบน ข. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านล่าง ค. บริเวณขอบใบ (Cu = Cutin, Gh = Glandular micro-hair, S = Stoma, Uh = Uniseriate-hair)

การวิจัยทางพฤกษเคมี

วิธีประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ พบว่าปริมาณร้อยละของสารที่สกัดด้วยเมทานอลและสกัดด้วยน้ำของหญ้า-ปักกิ่ง ผักลืมผัวใหญ่ และกินกุ้งน้อยมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือ ปริมาณร้อยละของสารที่สกัดด้วยเมทานอลมีค่าเป็น 4.13±0.61, 4.26±0.39 และ 3.88±0.92 ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารสกัดด้วยน้ำมีค่าเป็น 3.26±0.49, 3.38±0.63 และ 3.03±0.23 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สำหรับปริมาณรวมของสารฟีนอลิกที่สกัดด้วยเมทานอลคิดเป็นมิลลิกรัมต่อกรัม (มก./ก) ของสารสกัด พบว่าหญ้าปักกิ่งมีปริมาณมากที่สุดคือ 74.61±6.36 มก/ก ของสารสกัด รองลงมาคือผักลืมผัวใหญ่มีค่าเป็น 37.95±4.16 มก./ก ของสารสกัด และกินกุ้งน้อยมีค่าเป็น 16.31±1.68 มก./ก ของสารสกัด ตามลำดับ ส่วนปริมาณรวมของสารฟีนอลิกที่สกัดด้วยน้ำ พบว่าหญ้าปักกิ่งและผักลืมผัวใหญ่มีปริมาณใกล้เคียงกันคือ 55.78±2.35 และ 56.26±2.27 มก./ก ของสารสกัด ตามลำดับ ส่วนกินกุ้งน้อยมีเพียง 37.91±1.80 มก./ก ของสารสกัด (ตารางที่ 2)

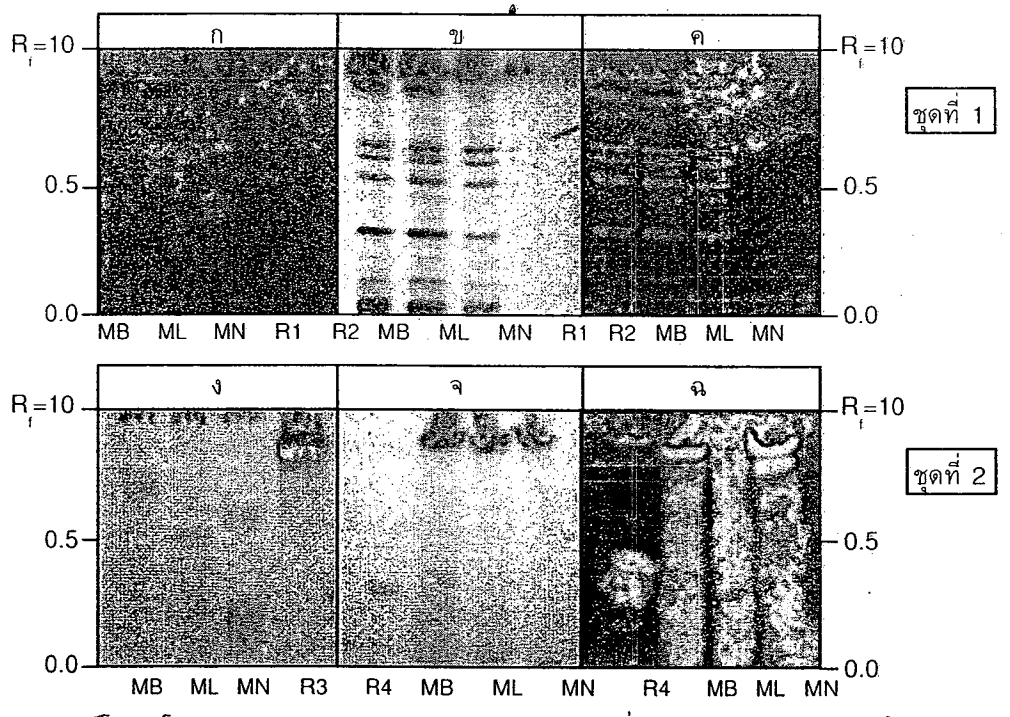
ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษาด้วยคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

พารามิเตอร์	หญ้าปักกิ่ง	ผักลืมผัวใหญ่	กินกุ้งน้อย
ร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเมทานอล	4.13 ± 0.61	4.26 ± 0.39	3.88 ± 0.92
ร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ	3.26 ± 0.49	3.38 ± 0.63	3.03 ± 0.23
ปริมาณรวมของฟีนอลิกที่สกัดด้วยเมทานอล (มก/ก)	74.61 ± 6.36	37.95 ± 4.16	16.31 ± 1.68
ปริมาณรวมของฟีนอลิกที่สกัดด้วยน้ำ (มก/ก)	55.78 ± 2.35	56.26 ± 2.27	37.91 ± 1.80

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี สำหรับโครมาโตแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอล (TLC fingerprint profile of methanol extract) ของพืชทั้ง 3 ชนิด ในตัวทำละลายชุดที่ 1 พบว่าภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร สารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิด จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดง (รูปที่ 5-ก) ที่ค่า R_f ประมาณ 0.65, 0.85 และ 0.95 และปรากฏแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.15, 0.45 และ 0.65 เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล ปรากฏแถบสีม่วงแดง (รูปที่ 5-ข) ของสารมาตรฐาน β-Sitosterol (R1) และ Andrographolide (R2) มีค่า R_f ประมาณ 0.9 และ 0.7 ตามลำดับ จะเห็นแถบสีที่

ค่า R_f ต่างๆ ของสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด แต่พบว่ามีแถบสีน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.8 ในสารสกัดหญ้าปักกิ่งและผักลืมผัวใหญ่ และเมื่อสังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร (รูปที่ 5-ค) จะเห็นแถบสะท้อนแสงสีแดง สีเขียวและสีชมพูของพืชทั้ง 3 ชนิด ที่มีค่า R_f ต่างๆ ของแถบสารในแต่ละสีใกล้เคียงกันแต่พบแถบสีน้ำเงินเข้มที่ค่า R_f ประมาณ 0.8 ในสารสกัดหญ้าปักกิ่งและผักลืมผัวใหญ่ ส่วนตัวทำละลายชุดที่ 2 เมื่อตรวจสอบด้วย 2% เฟอร์ริกคลอไรด์ในเอทานอล (รูปที่ 5-ง) สารมาตรฐานของกรดแทนนิก (Tannic acid) (R3) ปรากฏแถบสีน้ำเงินมีค่า R_f ประมาณ 0.9 สารสกัดหญ้าปักกิ่งปรากฏแถบสีน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.4 และแถบสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.2, 0.3 และ 0.7 สารสกัดผักลืมผัวใหญ่ปรากฏแถบสีน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.4 และ 0.5 แถบสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.2 และ 0.3 สารสกัดกินกุ้งน้อยไม่ปรากฏแถบสีน้ำเงิน แต่จะปรากฏแถบสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.2, 0.25 และ 0.55 และเมื่อตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล (รูปที่ 5-จ) สารมาตรฐานรูทิน (Rutin) (R4) ปรากฏแถบสีเหลืองมีค่า R_f ประมาณ 0.3 สารสกัดหญ้าปักกิ่งและผักลืมผัวใหญ่ปรากฏแถบสีเหลืองที่ค่า R_f ประมาณ 0.7 และ 0.55 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดกินกุ้งน้อยมีค่า R_f ประมาณ 0.1, 0.5 และ 0.6 และเห็นชัดเจนขึ้นเมื่อสังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร สารมาตรฐานรูทิน (R4) ปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลือง (รูปที่ 5-ฉ) สารสกัดหญ้าปักกิ่งปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลืองที่ค่า R_f ประมาณ 0.1, 0.2, 0.5 และ 0.7 แถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.25, 0.8 และ 0.85 สารสกัดผักลืมผัวใหญ่ปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลืองที่ค่า R_f ประมาณ 0.1, 0.2, 0.55 และ 0.7 แถบสารสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.3 สารสกัดกินกุ้งน้อยปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลืองที่ค่า R_f ประมาณ 0.2, 0.35, 0.5 และ 0.65 แถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.8 และ 0.85



รูปที่ 5 ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลของหญ้าปักกิ่ง *(M. bracteata)* ผักลืมผัวใหญ่ *(M. loriformis)* และกินกุ้งน้อย *(M. nudiflora)* ก-ค, ในตัวทำละลายชุดที่ 1 (คลอโรฟอร์ม:เอทิลแอซีเตต:เมทานอล:กรดฟอร์มิก น้ำ = 900:250:150:25:25) ก. สังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร ข. ตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล ค. หลังจากตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล สังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร ง-ฉ, ในตัวทำละลายชุดที่ 2 (เอทิลแอซีเตต:กรดฟอร์มิก:กรดแอซีติก:น้ำ = 125:11:11:13.5) ง. ตรวจสอบด้วยน้ำยา 2% เฟอร์ริกคลอไรด์ในเอทานอล จ. ตรวจสอบด้วยน้ำยา 1% อลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล ฉ. หลังจากตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล สังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร (MB = M. *bracteata*, ML = M. *loriformis*, MN = M. *nudiflora*, R1 = β-Sitosterol, .2 = Andrographolide, R3 = Tannic acid, R4 = Rutin)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของพืชทั้ง 3 ชนิด พบจุลลักษณะที่ปรากฏทั่วไปมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tomlinson (1969), Faden and Inman (1996) และ Thitimetharoch et al. (2004) โดยลักษณะลวดลายการสะสมคิวทินที่เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบสามารถใช้เป็นจุลลักษณะวินิจฉัยในระดับสกุลได้ ซึ่งหญ้าปักกิ่ง *(M. bracteata)* และผักลืมผัวใหญ่ *(M. loriformis)* มีการสะสมคิวทินลวดลายลักษณะร่างแห ส่วนกินกุ้งน้อย *(M. nudiflora)* มีลวดลายตามยาวลักษณะเป็นเส้นขนาน ขนขนาดใหญ่ที่เนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างจะพบเฉพาะในหญ้าปักกิ่งและผักลืมผัวใหญ่ แต่ขนหนามปลายแหลมพบเฉพาะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านบนของผักลืมผัวใหญ่เท่านั้น (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จุลลักษณะวินิจฉัยของเนื้อเยื่อผิวใบของหญ้าปักกิ่ง ผักลืมผัวใหญ่และกินกุ้งน้อย

จุลลักษณะวินิจฉัย	หญ้าปักกิ่ง	ผักลืมผัวใหญ่	กินกุ้งน้อย
ลวดลายคิวทิน	ร่างแห	ร่างแห	ขนานตามยาว
ขนขนาดใหญ่			
- ผิวแผ่นใบด้านบน	ไม่พบ	ขนหนาม	ไม่พบ
- ผิวแผ่นใบด้านล่าง	4-7 เซลล์ เรียงเป็นแถวเดียว	2-4 เซลล์ เรียงเป็นแถวเดียว	ไม่พบ

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางพฤกษเคมี โดยวิธีการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ไม่เห็นความแตกต่างร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ แต่เห็นความแตกต่างในปริมาณรวมของสารฟีนอลิกที่สกัดด้วยเมทานอล ซึ่งพบมากที่สุดในหญ้าปักกิ่งมีปริมาณมากกว่าผักลืมผัวใหญ่ประมาณ 2 และประมาณ 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกินกุ้งน้อย และปริมาณรวมของสารฟีนอลิกที่สกัดด้วยน้ำจะเห็นว่าหญ้าปักกิ่งและผักลืมผัวใหญ่มีปริมาณมากกว่ากินกุ้งน้อยประมาณ 1.5 เท่า

โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลของพืชทั้ง 3 ชนิด ในตัวทำละลายชุดที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β-Sitosterol (R1) และ Andrographolide (R2) (รูปที่ 5 ก-ค) หลังจากตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล และสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร พบแถบสีโดยทั่วไปคล้ายคลึงกันและคาดว่าส่วนมากจะเป็นสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) โดยเปรียบเทียบกับแถบสีม่วงของสารมาตรฐาน โดยแถบสะท้อนแสงสีแดงของคลอโรฟิล (Chlorophyll) มีค่า R_f ใกล้เคียงกัน แต่ที่เห็นต่างกันชัดเจนคือแถบสีน้ำเงินที่ R_f ประมาณ 0.8 ที่พบได้เฉพาะสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งและผักลืมผัวใหญ่เท่านั้น ในตัวทำละลายชุดที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Tannic acid (R3) และ Rutin (R4) (รูปที่ 5 ง-ฉ) หลังจากตรวจสอบด้วย 2% เฟอร์ริก-คลอไรด์ในเอทานอล ที่มีสารมาตรฐาน Tannic acid เปรียบเทียบกับสารสกัดกับพืชตัวอย่าง ซึ่งสารทดสอบจะทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มแทนนินทำให้พบแถบสีของสารสกัดโดยทั่วไปมีความแตกต่างกัน โดยแถบสีน้ำเงินของสารกลุ่ม Hydrolysable tannins พบได้ในสารสกัดจากหญ้าปักกิ่งและผักลืมผัวใหญ่แต่พบความแตกต่างที่ค่า R_f ประมาณ 0.5 มีความเข้มของแถบสีน้ำเงินซึ่งพบได้เฉพาะในผักลืมผัวใหญ่เท่านั้น ส่วนแถบสีเขียวของสารกลุ่ม Condensed tannins พบได้ในสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิด แต่สารสกัดหญ้าปักกิ่งและกินกุ้งน้อยพบแถบสีเขียวได้ชัดเจนและแตกต่างกันที่ค่า R_f ประมาณ 0.7 และ 0.55 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล ที่มีสารมาตรฐาน Rutin เปรียบเทียบกับสารสกัดกับพืชตัวอย่าง ซึ่งสารทดสอบจะทำปฏิกิริยากับกลุ่มไฮดรอกซิลของกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก

โดยเฉพาะสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ปรากฏแถบสีเหลืองและน้ำตาลอ่อนของสารสกัดหญ้าปักกิ่งและผักลืมผัวใหญ่ในรูปแบบคล้ายคลึงกัน แต่จะพบแถบสีที่หนาในสารสกัดของผักลืมผัวใหญ่ที่ค่า R_f ประมาณ 0.5 ขณะที่แถบสีเหลืองหนาจะปรากฏในสารสกัดกินกุ้งน้อย 2 แถบอย่างเห็นชัดเจนที่ค่า R_f ประมาณ 0.1 และ 0.5 โดยปรากฏชัดเจนภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร และเห็นแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.3 ของสารสกัดหญ้าปักกิ่งและผักลืมผัวใหญ่ แต่ไม่พบในสารสกัดกินกุ้งน้อยที่ค่า R_f ดังกล่าว

หญ้าปักกิ่ง *(M. bracteata)* และ ผักลืมผัวใหญ่ *(M. loriformis)* มีจุลลักษณะและองค์ประกอบพื้นฐานทางพฤกษเคมีคล้ายคลึงกันมากกว่ากินกุ้งน้อย *(M. nudiflora)* ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้ ยังแสดงให้เห็นถึงบางลักษณะที่แตกต่างกัน (ลวดลายคิวทิน ขนขนาดใหญ่ ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก ทินเลเยอร์โครมาโทแกรม) และสามารถใช้ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะประกอบในการระบุชนิดได้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับความสนับสนุนชุดอุปกรณ์การวิจัยจาก รศ.ดร. สมาน เทศนา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย (GS-KKU 49111118) และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับการสนับสนุนเพิ่มเติมจากโครงการศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยแผ่นใบของพืชสกุลหญ้าปักกิ่ง (TRF-MRG 5080006) ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งประเทศไทย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

วีณา จิรัจฉริยากูล. 2542. สารต้านมะเร็ง จากหญ้าปักกิ่ง. *จุลสารข้อมูลสมุนไพร.* 16(3): 10-13.

Faden RB, Inman KE. 1996. Leaf Anatomy of the African Genera Commelinaceae. In: Anthericopsis and *Murdannia*. *The Biodiversity of African Plants*. Kluwer Academic Publishers, Netherland. pp 464-471.

Folin O, Ciocalteu V. 1927. On Tyrosine and Tryptophane Determination in Proteins. *J Biol Chem* 27: 627-650.

Intiyot Y, Kinouchi T, Kataoka K, et al., 2002. Antimutagenicity of *Murdannia loriformis* in the *Salmonella* Mutation Assay and its Inhibitory Effects on Azoxymethane-induced DNA Methylation and Aberrant *crypt* Focus Formation in Male F344 Rats. *J Med Investigation* 49(1-2): 25-34.

Intiyot Y, Kinouchi T, Vinitketkumnuen U, et al., 1998. Effect of *Murnannia loriformis* Extract on Xenobiotic Metabolizing Enzyme Introduction and AOM-Induced Colon Cancer in Rats. *The 3rd International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations*. Bangkok, Thailand. pp116.

Jain SK, De Filipps RA. 1991. *Medicinal Plants of India*. Vol. I. Reference Publications, Algonac, Michigan, USA. pp249-251.

Jiratchariyakul W, Mongkarndi P, Okabe H, et al., 1998. Cytotoxic Glycosphingolipid from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao & Kammathy. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* 5(20): 10-20.

Jirawongse VA. 2000. *Thai Herbal Pharmacopoeia.* Vol. II. Prachachon co., Ltd., Bangkok, Thailand. pp4.

Perry LM, Metzger J. 1980. *Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses.* The MIT Press Cambridge, Massacahusetts, London, England. pp 82.

Phetsuk P, Hahnvajanawong C, Lulitanond V, et al., 2005. Immunomodulatory Effect of Thai Plant [*Master of Science Thesis in Medical Microbiology*]. Khon Kaen, The Graduate School, Khon Kaen University. (abstract)

Saralamp P, Chuakul W, Temsiririrkkul R, et al., 1996. *Medicinal Plants in Thailand. Vol. I.* Amarin Printing and Publishing Public Co..Ltd. Bangkok,Thailand. pp 162.

Thitimetharoch T, Chantaranothai P, Thammathaworn A, Faden RB. 2004. Taxonomic Studies of the Family Commelinaceae in Thailand. [*Ph.D. Philosophy Thesis in Biology*]. Khon Kaen, The Graduate School, Khon Kaen University. pp 75-190.

Tomlinson PB. 1969. *Anatomy of the Monocotyledons III (Commelinales-Zingiberales).* The Clarendon Press, Oxford. pp 371-395.

Vinitketkumnuen U, Charoenkunathum W, Kongtawelert P, et al., 1996. Antimutagenicity and DT-diaphorase Inducer Activity of Thai Medicinal Plant, *Murdannia loriformis. Herbs Spices Medicinal Plants* 4: 45-52.

Vinitketkumnuen U, Chewonarin T, Dhumtanom P. et al., 1999. Aflatoxinalbumin Adducts Formation after Single and Multiple Dose of Alflatoxin B1 in Rats Treated with Thai Medicinal Plants. *Mutation Research* 428: 345-51.

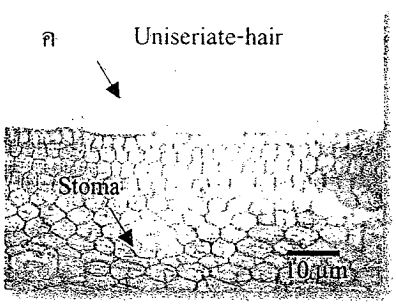
Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984. *Plant Drug Analysis.* Springer-Verlag, New York, USA. pp 349-354.

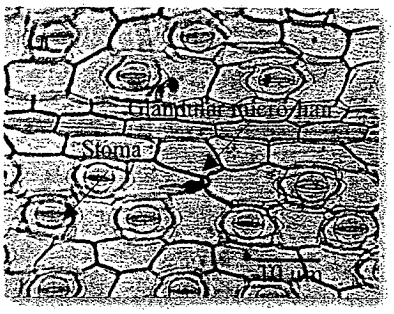
RESEARCH JOURNAL (GRADUATE STUDIES)

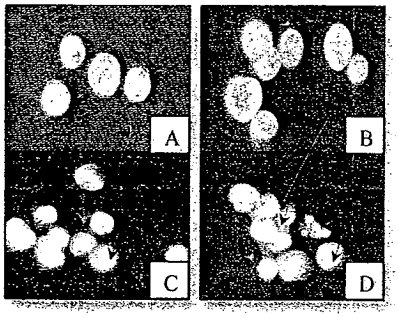
วารสารวิจัย มบ.

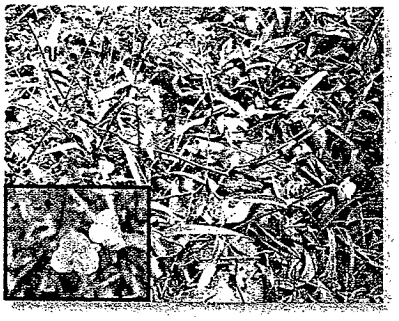
ISSN 0859-3957 ปีที่ 7 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2550

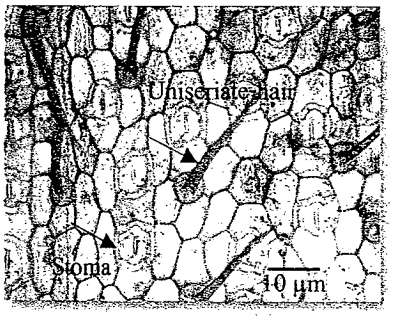
ฉบับบัณฑิตศึกษา











การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืช 3 ชนิด ในสกุล *Murdannia* (วงศ์ Commelinaceae)

Comparative Pharmacognostic and Antioxidant Activity Studies of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae)

ธารีนี สืบปาละ (Tarinee Subphala) * ดร.สุพัตรา ปรศุพัฒนา (Dr.Supatra Porasuphatana) **
ดร.ศรีสมพร ปรีเปรม (Dr.Srisomporn Preeprame) ** ดร.ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์ (Dr.Thaweesak Thitimetharoch) ***

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทของพืชสมุนไพร 3 ชนิด ในสกุล *Murdannia* (วงศ์ Commelinaceae) คือ หญ้าปักกิ่ง (*M. bracteata*), ผักลืมผัวใหญ่ (*M. loriformis*) และกินกุ้งน้อย (*M. nudiflora*) ด้วยวิธีศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยแผ่นใบ คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟีสามารถแยกความแตกต่างของพืชสมุนไพรดังกล่าวได้ โดยพบว่าจุลลักษณะวินิจฉัยของแผ่นใบคือ ลักษณะปรากฏของลวดลายคิวทินและขนขนาดใหญ่ ลักษณะวินิจฉัยทางเคมีคือ ปริมาณสารสกัดในเมทธานอลมีความแตกต่างอย่างชัดเจนในการศึกษาหาปริมาณฟีนอลิค และทินเลเยอร์โครมาโทแกรม สำหรับการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันพบว่าสารสกัดด้วยเมทธานอลของ *M. bracteata* มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุดเมื่อศึกษาด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) และวิธี The ability of ferric reducing-antioxidant power (FRAP) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของ *M. nudiflora* มีความสามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ดีที่สุด

ABSTRACT

The comparative pharmacognostic studies for three *Murdannia* species (Family Commelinaceae), *M. bracteata*, *M. loriformis* and *M. nudiflora*, were conducted using methods of diagnostic microscopic studies, leaf scraping and leaf clearing; phytochemical methods, physico-chemical value and thin layer chromatography. Theses methods are found to be useful for the diagnosis. Cutin pattern and macro-hairs were distinguished based on microscopic characters. The evaluations of phytochemical studies, phenolic contents and thin layer chromatogram, have been valuable tools for pharmacognostic identification. In the determining of antioxidant activity, we found that crude methanolic extracts of *M. bracteata* showed the highest of antioxidant activity using 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) and The ability of ferric reducing-antioxidant power (FRAP) methods. Whereas the water extraction of *M. nudiflora* was found to be the highest of inhibitory activity in lipid peroxidation.

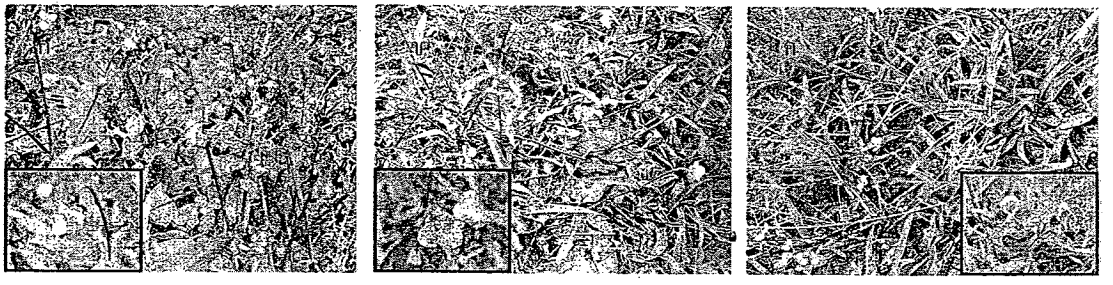
คำสำคัญ: Commelinaceae การศึกษาทางเภสัชเวท ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

Key Words: Commelinaceae, Pharmacognostic, Antioxidant activity

* *นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
** *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
*** *อาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

สมุนไพรหญ้าปักกิ่งจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในสกุล *Murdannia* วงศ์ผักปราบ (Commelinaceae) จากการศึกษาอนุกรมวิธานและทบทวนรายชื่อพืชวงศ์ผักปราบในประเทศไทยของ Thitimetharoch (2004) ซึ่งรายงานว่าสมุนไพรหญ้าปักกิ่งมีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Murdannia bracteata* (C.B. Clarke) J.K. Morton ex D.Y. Hong พบว่ามีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายกับพืชอีก 2 ชนิด คือ ผักลืมผัวใหญ่ (*M. loriformis* (Hassk.) Rolla Rao & Kammathy) และกินกุ้งน้อย (*M. nudiflora* (L.) Brenan) (รูปที่ 1) แต่ลักษณะปรากฏของลำต้นและใบแบบกระจุก (Rosette form) รากสะสมอาหาร (Storage roots) จะพบได้ใน *M. bracteata* และ *M. loriformis* เท่านั้น



รูปที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุล *Murdannia* 3 ชนิดคือ: ก. *M. bracteata*, ข. *M. loriformis*, ค. *M. nudiflora*

การใช้ประโยชน์สมุนไพรหญ้าปักกิ่งรับวัฒนธรรมจากประเทศจีน ซึ่งมีสรรพคุณช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย รักษาอาการเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจและกำจัดพิษ (Saralamp et al., 1996) ใช้รักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งหลายชนิดเพื่อช่วยลดผลข้างเคียงทางเคมีบำบัดหรือรังสีบำบัด (วีณา, 2542) มีการศึกษาและวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหญ้าปักกิ่ง เช่น สารสำคัญกลัยโคสฟิงโกไลปิดส์ (Glycosphinggolipid) จากหญ้าปักกิ่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในหลอดทดลอง (Jiratchariyakul et al., 1998) สารสกัดด้วยเอทธานอลมีคุณสมบัติป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลอง (Intiyot et al., 1998) ลดระดับสาร Aflatoxin-alblumin ในหนูทดลอง (Vinitketkumnuen et al., 1999) และยังมีฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารพิษรวมถึงสารสกัดยังมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* (Vinitketkumnuen et al., 1996; Intiyot et al., 2002) นอกจากนี้สารสกัดดังกล่าวยังมีฤทธิ์ในการเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Phetsuk et al., 2005) ส่วนกินกุ้งน้อยตามการแพทย์พื้นบ้านโดยรากใช้แก้ไข้ โรคบิด แก้ปวดเบ่งเวลาถ่ายปัสสาวะ ใบใช้เป็นยาพอกแผลเรื้อรัง (Perry and Metzger, 1980) ทั้งต้นต้มในน้ำมันใช้รักษาโรคเรื้อน บดเป็นผงใช้รักษาอาการคันและแผลถูกไฟไหม้ (Jain and De Filipps, 1991) และผักลืมผัวใหญ่เป็นผักพื้นบ้านที่ใช้ยอดอ่อนรับประทานเป็นผักจิ้มน้ำพริก (Thitimetharoch, 2004) โดยทั่วไปพืชสกุล Murdannia มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันมาก ง่ายต่อการปลอมปนและเกิดความสับสนในการระบุชนิดพันธุ์ การศึกษาทางเภสัชเวทจึงมีความสำคัญ นอกจากจะจัดทำมาตรฐานลักษณะวินิจฉัยชนิดพืชสมุนไพร ยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาและการใช้ประโยชน์ในวิทยาศาสตร์สาขาอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไปโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การศึกษาฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันซึ่งมีรายงานการศึกษามากมายถึงความสัมพันธ์ถึงสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันนั้นมีบทบาท

สำคัญในการป้องกันและยับยั้งโรคมะเร็งหลายชนิด (Slaga, 1995)

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเภสัชเวทจุลลักษณะวินิจฉัยด้วยวิธีขูดผิวใบและวิธีทำตัวอย่างให้ใส การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ และวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี นอกจากนี้ยังสนใจในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสมุนไพรหญ้าปักกิ่ง ผักลืมผัวใหญ่ และกินกุ้งน้อย ด้วยวิธี DPPH FRAP และ TBARS เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานการวิจัยต่อไปในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีวิจัย

1) วิธีศึกษาทางจุลลักษณะ (Microscopic Method)

ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูป

วิธีขูดผิวแผ่นใบ (Leaf scraping) นำแผ่นใบมาขูดแล้วย้อมสี Safranin แช่ในชุดลำดับเอธิลแอลกอฮอลล์แล้วนำไปผ่านกระบวนการทำสไลด์ถาวร (Johansen, 1940)

วิธีทำตัวอย่างให้ใส (Leaf clearing) นำส่วนที่ต้องการศึกษามาทำการละลายรงควัตถุและทำตัวอย่างให้ใส ด้วยเอธิลแอลกอฮอลล์, 5% NaOH และ Chloral hydrate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ แล้วนำไปเข้ากระบวนการย้อมสี Celestine blue B/Safranin และกระบวนการทำสไลด์ถาวร (Johansen, 1940)

2) วิธีศึกษาคุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมี (Phytochemical method)

วิธีประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (Physico-chemical value) ได้แก่การหาปริมาณสารสกัดด้วยเมทธานอล และน้ำ (Anonymous, 1966) ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด (Total phenolic contents) (Folin and Ciocalteu, 1927)

วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี (Thin layer chromatography, TLC) นำผงยา 1 กรัมของพืชแต่ละชนิดมาสกัดด้วยเมทธานอล 5 มิลลิลิตร 15 นาทีจากนั้นนำ 5 ไมโครลิตรมาหยดบนแผ่น TLC (G60 F_{254} Merck) ขนาด 5 cm x 10 cm โดยใช้ชุดตัวทำละลาย ชุดที่ 1 Chloroform : Ethyl acetate : Methanol : Formic acid : Water อัตราส่วน 900 : 250 : 150 : 25 : 25 ตรวจสอบด้วย 10% กรดซัลฟุริคในเอทธานอลและตรวจสอบความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร ชุดที่ 2 ประกอบด้วย Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : water อัตราส่วน 125 : 11 : 11 : 13.5 ตรวจสอบด้วยเฟอร์ริกคลอไรด์ อลูมิเนียมคลอไรด์ และตรวจสอบด้วยความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร บันทึกผล (Wagner and Bladt, 1984) ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาเก็บจากภาคสนามแล้วจัดทำเป็นตัวอย่างแห้งซึ่งเก็บไว้ที่พิธภัณฑ์พืชสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ดังตารางที่ 1

3) การศึกษาฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน (Antioxidant assays) นำพืชแต่ละชนิดมา 5 กรัมสกัดด้วยเมทธานอลและน้ำอย่างละ 20 มิลลิลิตรนำไปปั่นเหวียงประมาณประมาณ 2 ชั่วโมงจากนั้นนำมากรองแล้วไปทำให้แห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง เก็บในอุณหภูมิต่ำ

วิธี 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH) การทดสอบฤทธิ์ในการจับกับสารอนุมูลอิสระที่เสถียร สารใดก็ตามที่มีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH นี้ได้จะส่งผลค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ก็จะลดลงสำหรับสารต้านออกซิแดนท์ที่ใช้เปรียบเทียบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระในการศึกษาคือ Trolox และรายงานค่าเป็น EC_{50} จาก % Scavenging (Ohtake and Tagashira, 1998)

วิธี The ability of ferric reducing-anti-oxidant power (FRAP) คือ การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันรวมทั้งหมดเพื่อวัดความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิแดนท์รวมทั้งหมด (Total antioxidant power) โดยวัดความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งใช้พื้นฐานความรู้ว่าสารต้านกระบวนการออกซิเดชันในร่างกายทั้งที่เป็นโลหะ

และเอนไซม์ โดยหาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ของสารสกัด รายงานผลเป็นค่าความสามารถของสารสกัดในการต้านออกซิเดชันโดยการรีดิวซ์เหล็ก Fe^{3+} ให้เป็นเหล็ก Fe^{2+} (FRAP-value) ของสารสกัดที่วัดได้ไปเปรียบเทียบค่า FRAP ของ Trolox (Benzie and Strain, 1996)

วิธี **Thiobarbituric acid reactive substances (TBARs)** การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวหรือเรียกว่ากระบวนการ Lipid peroxidation ในกระบวนการเกิดนี้จะให้สารประกอบต่าง ๆ มากมาย แต่ที่นิยมนำมาตรวจวัดคือสารประกอบเชิงซ้อน Malondialdehydes ที่เป็น Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และรายงานค่าความสามารถในการต้านการเกิดปฏิกิริยาเป็นค่า EC_{50} จาก % Inhibition (Ohkawa et al., 1979)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจุลลักษณะ คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมี

ชนิด	ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา	วันที่เก็บ	สถานที่เก็บ
M. bracteata	TS&TT-1	20 January 2005	มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น
	TS-15	9 September 2005	อุทธยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จ.เชียงใหม่
	TS-19	16 April 2006	อ.เชียงม่วน จ. พะเยา
M. loriformis	TS&TT-2	6 June 2005	มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น
M. nudifora	TT-560	30 September 2002	อุทธยานแห่งชาติภูเวียง จ. ขอนแก่น
	TS-22	13 June 2006	บ้านหนองหลุบ ต. แดงน้อย อ. เมือง จ. ขอนแก่น

TS = Tarinee Subphala, TT = Thaweesak Thitimetharoch

ผลการทดลอง

1) การศึกษาทางจุลลักษณะ

1.1 หญ้าปักกิ่ง (*Murdannia bracteata* (C.B. Clarke) J.K. Morton ex D.Y. Hong) ดังแสดงในรูปที่ 2

เนื้อเยื่อผิว (Epidermis) ทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทิน (Cutin) สะสมเห็นชัดเจนลักษณะเป็นลวดลายร่างแห (Reticulate) รูปร่างเซลล์เนื้อเยื่อผิวเมื่อมองจากผิวใบด้านบนเซลล์มีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาด (30-40 x 10-12 μm^2) ส่วนรูปร่างผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลมขนาด (8-12 x 12-15 μm^2) เซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่าและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง **ปากใบ** (Stomata) **พบปากใบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียง** เซลล์คุม 6 เซลล์ กระจายอยู่น้อยมากบริเวณใกล้ขอบผิวใบด้านบน และเรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของผิวใบด้านล่าง **เซลล์ขน** พบขนจิ๋วที่มี 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นรูปกระบอง (Glandular micro-hairs) ขนาด 20-40 μm ทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง พบขนขนาดใหญ่ (Macro hairs) 4-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว (Uniseriate hairs) ขนาด 60-70 μm กระจายทั่วไปบนผิวใบด้านล่าง **ขอบใบ** (Margin) เซลล์บริเวณใกล้ขอบใบรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม พบขนปุ่ม (Papillae) และขนขนาดใหญ่ 2-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว

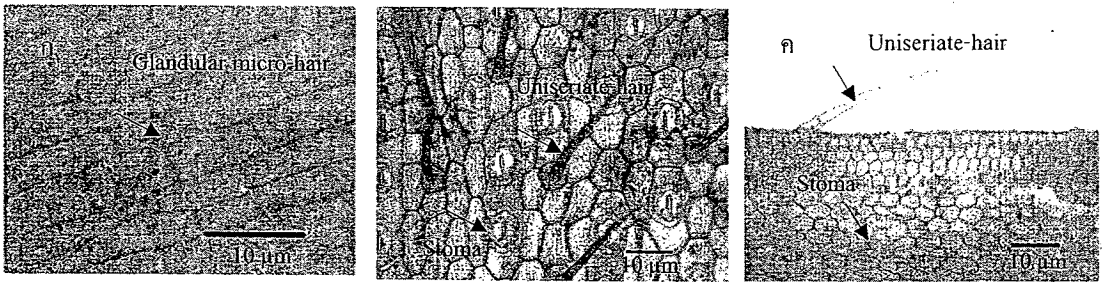
1.2 ผักลืมผัวใหญ่ (*Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao & Kammathy) ดังแสดงในรูปที่ 3

เนื้อเยื่อผิว ทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทินสะสมเห็นชัดเจนลักษณะเป็นลวดลายร่างแห รูปร่างเซลล์เนื้อเยื่อผิวเมื่อมองจากผิวใบด้านบนเซลล์มีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาด (10-15 x

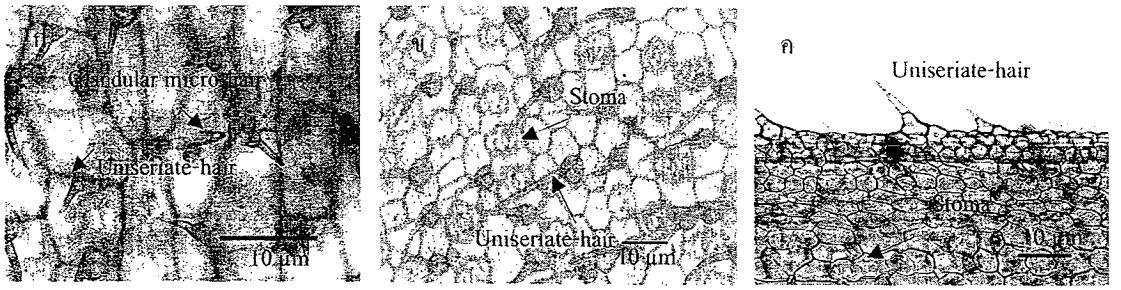
35-40 μm^2) ส่วนรูปร่างผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม (8-10 x 10-15 μm^2) เซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่าและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง **ปากใบ** พบปากใบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ กระจายอยู่น้อยมากบริเวณใกล้ขอบผิวใบด้านบน และเรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของผิวใบด้านล่าง **เซลล์ขน** ขนจิ๋วที่มี 3 เซลล์ปลายเป็นรูปกระบอง ขนาด 20 μm พบทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง พบขนขนาดใหญ่ 2 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว ขนาด 20 μm กระจายทั่วแผ่นใบที่ผิวใบด้านบน และขนขนาดใหญ่ 2-4 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว ขนาด 20-40 μm กระจายทั่วไปบนผิวใบด้านล่าง **ขอบใบ** เซลล์บริเวณใกล้ขอบใบมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม บริเวณขอบใบพบขนขนาดใหญ่ 2-4 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว

1.3 กินกุ้งน้อย (*Murdannia nurdiflora* (L.) Brenan) ดังแสดงในรูปที่ 4

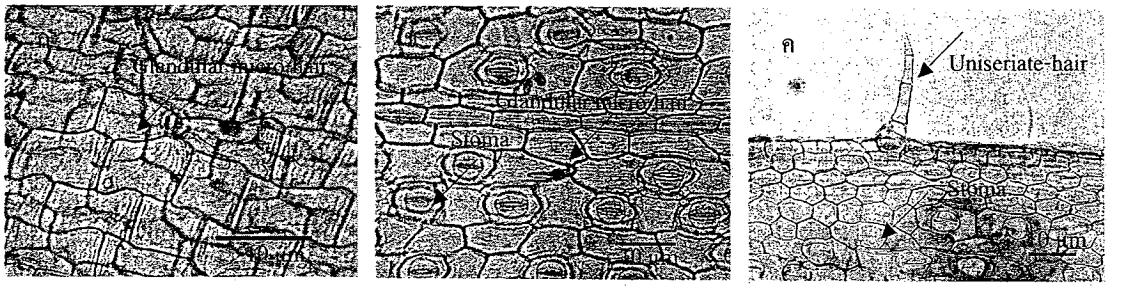
เนื้อเยื่อผิว ทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทินสะสมลักษณะเป็นเส้นขนานลวดลายตามยาว (Striate) รูปร่างเซลล์เนื้อเยื่อผิวเมื่อมองจากผิวใบด้านบนเซลล์มีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาด (5-10 x 10-13 μm^2) ส่วนรูปร่างผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมขนาด (10-20 x 15-20 μm^2) เซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่าและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง **ปากใบ** ชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ กระจายน้อยมากบริเวณใกล้ขอบผิวใบด้านบน และเรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของผิวใบด้านล่าง **เซลล์ขน** พบขนจิ๋วที่มี 3 เซลล์ปลายเป็นรูปกระบอง ทั้งผิวใบด้านบนและผิวใบด้านล่าง **ขอบใบ** เซลล์บริเวณใกล้ขอบใบรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลมพบ ขนปุ่มเล็ก และขนขนาดใหญ่ 2-4 เซลล์ เรียงเป็นแถวเดียวส่วนจุลลักษณะที่แตกต่างของพืชทั้ง 3 ชนิด



รูปที่ 2 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อผิวใบของ *M. bracteata*: ก. เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนมีคิวทินสะสมลวดลายร่างแห รูปร่างผิวใบเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า และขนจิ๋ว (ลูกศรชี้); ข. เนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีคิวทินลวดลายร่างแห ขนแถวเดียว (ลูกศรชี้) และปากใบจัดเรียงอย่างเป็นระเบียบ (ลูกศรชี้); ค. ขอบใบ มีขนแถวเดียว (ลูกศรชี้) และปากใบ (ลูกศรชี้)



รูปที่ 3 รูปแสดงลักษณะเนื้อเยื่อผิวใบของ *M. loriformis*: ก. เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนมีคิวทินสะสมแบบลวดลายร่างแห ขน 2 เซลล์ เรียงแถวเดียว (ลูกศรชี้) และขนจิ๋ว (ลูกศรชี้); ข. เนื้อเยื่อของผิวใบด้านล่างมีคิวทินลวดลายร่างแห ขนแถวเดียว (ลูกศรชี้) ปากใบจัดเรียงอย่างเป็นระเบียบ (ลูกศรชี้); ค. ขอบใบ มีขนแถวเดียว (ลูกศรชี้) และปากใบ (ลูกศรชี้)



รูปที่ 4 แสดงลักษณะนื้อเยื่อผิวใบของ *M. nudiflora*: ก. เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนมีคิวทินสะสมแบบลวดลายตามยาว มีขนจิ๋ว (ลูกศรชี้); ข. เนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีคิวทินสะสมแบบลวดลายตามยาว ปากใบจัดเรียงอย่างเป็นระเบียบ (ลูกศรชี้) และขนจิ๋ว (ลูกศรชี้); ค. ขอบใบ พบขนแถวเดียว (ลูกศรชี้) และปากใบ (ลูกศรชี้)

2) องค์ประกอบเคมี

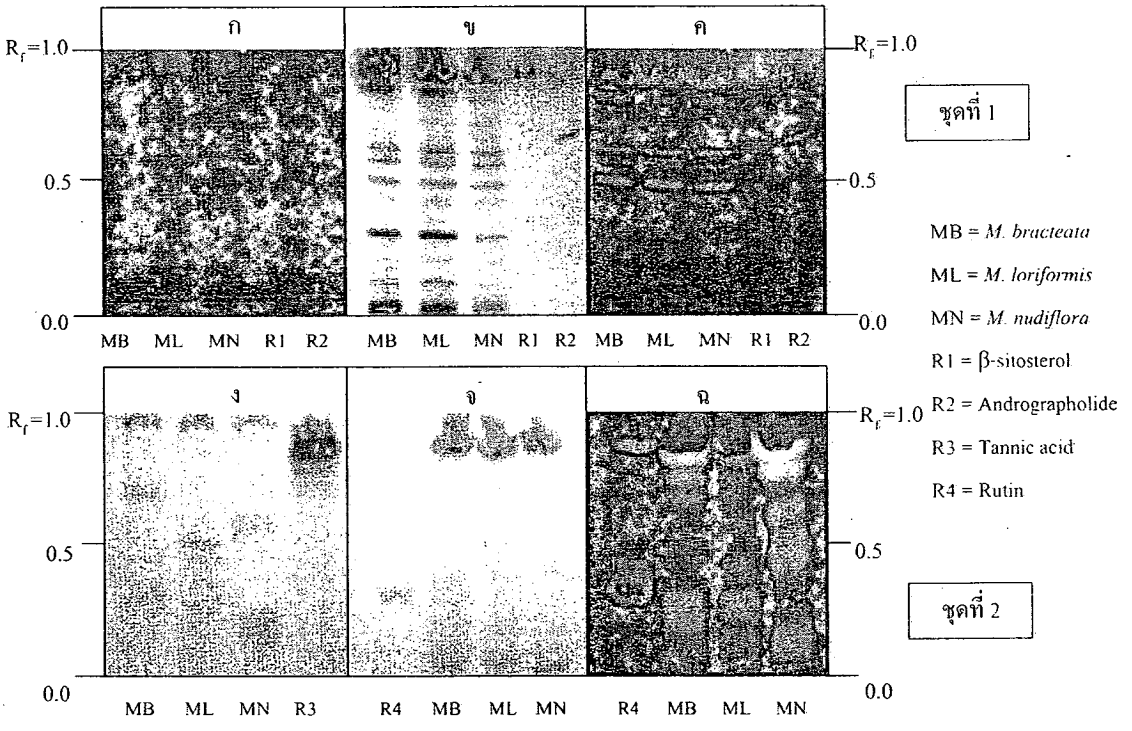
2.1 วิธีประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ร้อยละของปริมาณสารที่สกัดด้วยเมทธานอล และสกัดด้วยน้ำ ปริมาณฟีนอลิคที่สกัดด้วยเมทธานอล และสกัดด้วยน้ำ ดังตารางที่ 2

2.2 วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี สำหรับโครมาโตแกรมของสารสกัดด้วยเมทธานอล (TLC fingerprint profile of methanol extract) ของพืชทั้ง 3 ชนิด เมื่อใช้ระบบตัวทำละลายชุดที่ 1 เพื่อตรวจสอบกลุ่ม Terpenoid ประกอบด้วย Chloroform : Ethyl acetate : Methanol : Formic acid : Water อัตราส่วน 900 : 250 : 150 : 25 : 25 เมื่อสังเกตภายใต้ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดงและสีฟ้า (รูปที่ 5-ก) และเมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดซัลฟุริคในเอทธานอล จะปรากฏแถบสีแตกต่างกัน (รูปที่ 5-ข) และเมื่อเมื่อสังเกตภายใต้ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตรหลังตรวจสอบด้วย 10% กรดซัลฟุริคในเอทธานอล จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดง น้ำเงิน เขียว ชมพู (รูปที่ 5-ค) ส่วนตัวทำละลายชุดที่ 2 เพื่อตรวจสอบสารกลุ่มฟีนอลิประกอบด้วย Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water อัตราส่วน 125 : 11 : 11 : 13.5 เมื่อตรวจสอบด้วยน้ำยาเฟอร์ริกคลอไรด์จะปรากฏแถบสีเขียว น้ำเงิน (รูปที่ 5-ง) และเมื่อตรวจสอบด้วยน้ำยาอลูมิเนียมคลอไรด์จะปรากฏแถบสีเหลืองและน้ำตาลอ่อน (รูปที่ 5-จ) แล้วตรวจสอบด้วยความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลืองและสีฟ้าขาวชัดเจน (รูปที่ 5-ฉ)

ตารางที่ 2 ค่าปริมาณของค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของพืชในสกุล Murdannia

พารามิเตอร์	*M. bracteata*	*M. loriformis*	*M. nudiflora*
ปริมาณสารสกัดด้วยเมทธานอล (ร้อยละ)	4.13 ± 0.61	4.26 ± 0.39	3.88 ± 0.92
ปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ (ร้อยละ)	3.26 ± 0.49	3.38 ± 0.63	3.03 ± 0.23
ปริมาณฟีนอลิค (มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัดด้วยเมทธานอล)	74.61 ± 6.36	37.95 ± 4.16	16.31 ± 1.68
ปริมาณฟีนอลิค (มิลลิกรัม/กรัมของสารสกัดด้วยน้ำ)	55.78 ± 2.35	56.26 ± 2.27	37.91 ± 1.80

Mean ± SD (n=3)



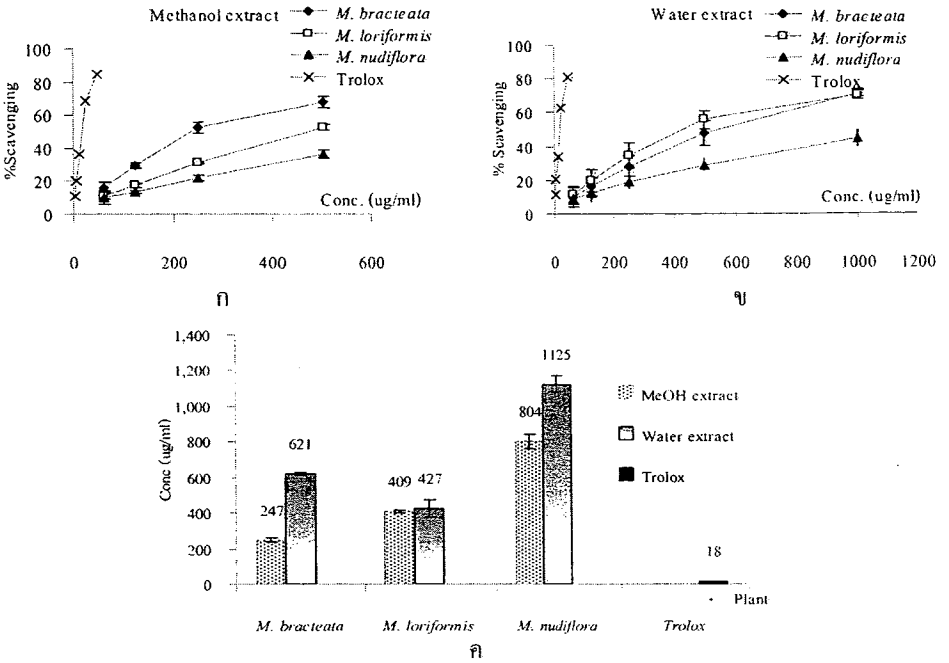
รูปที่ 5 ทินเลเยอร์โครมาโทรแกรมของสารสกัดด้วยเมทธานอลของ *M. bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora* ทินเลเยอร์โครมาโตแกรมของสารสกัดด้วยเมทธานอลของ *M. bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora*: ก-ค, ในตัวทำละลายชุดที่ 1 Chloroform: Ethyl acetate : Methanol : Formic acid : water (900 : 250 : 150 : 25 : 25), ก. ตรวจสอบภายใต้แสง UV 366, ข. ตรวจสอบด้วย 10% กรดซัลฟุริคในเอทธานอล, ค. ตรวจสอบด้วย 10% กรดซัลฟุริคในเอทธานอล ภายใต้แสง UV 366 ; ง-ฉ, ตัวทำละลายชุดที่ 2 Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water (125: 11: 11: 13.5), ง. ตรวจสอบด้วยน้ำยา 2% เฟอร์ริกคลอไรด์-เอทธานอล, จ. ตรวจสอบด้วยน้ำยา 1% อลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทธานอล, ฉ. ตรวจสอบด้วย 1% อลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทธานอล ภายใต้แสง UV 366

3) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

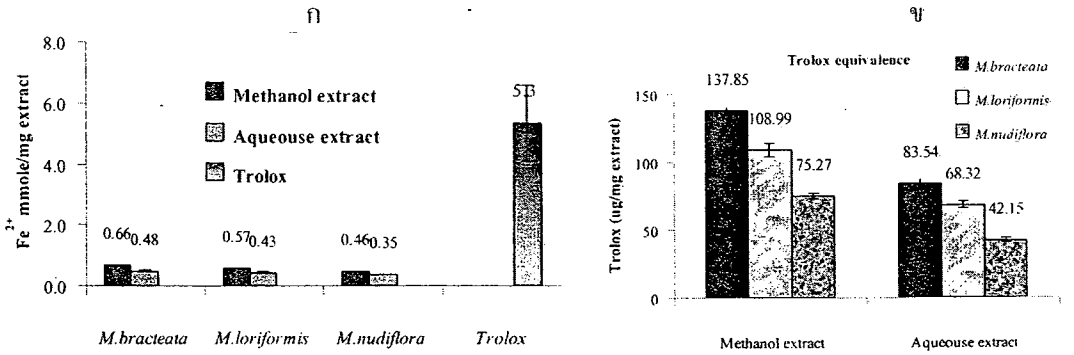
3.1 วิธี **DPPH** ในการทดสอบฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระที่เสถียรของสารสกัดด้วยเมทธานอลและน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิดและสารต้านออกซิเดชันมาตรฐานคือ Trolox พบว่าสารสกัดด้วยสารสกัดด้วยเมทธานอลและน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิดทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ DPPH และเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงพบว่าสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิดสามารถลดค่าการดูดกลืนแสงลงได้ดังรูปที่ 6 ก-ข และเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวนค่า EC_{50} จะได้ผลดังตารางที่ 3 ซึ่งสารสกัดด้วยเมทธานอลของ *M. bracteata* มีความสามารถในการกำจัด DPPH ได้ดีที่สุด (EC_{50}=246.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของ *M. loriformis* ความสามารถในการกำจัด DPPH ได้ดีที่สุด (EC_{50}=427.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) และจากค่า EC_{50} สารสกัดด้วยเมทธานอลนั้นมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ ดังรูปที่ 6-ค

3.2 วิธี **FRAP** ผลการทดลองพบว่าสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์เป็น Reducing agent แตกต่างกัน รายงานผลเป็นค่าความสามารถของสารสกัดในการต้านออกซิเดชันโดยการรีดิวซ์เหล็ก Fe^{3+} เป็น Fe^{2+} (Fe^{2+} มิลลิโมล/มิลลิกรัมของสารสกัด) นอกจากนี้จะแสดงเป็นค่าเทียบเท่ากับสารต้านออกซิเดชันมาตฐาน (Trolox) สารที่มีค่าเทียบเท่ากับสารต้านออกซิเดชันมาตรฐานมากนั้นหมายความว่ามีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันสูง ซึ่งค่าเปรียบเทียบของสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิดแสดงไว้ดังตารางที่ 3 นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบสารที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเมทธานอลพบว่าสารที่สกัดด้วยเมทธานอลมีค่า FRAP สูงกว่า (รูปที่ 7) และสารสกัดด้วยเมทธานอลและน้ำของ *M. bracteata* มีค่า FRAP สูงที่สุด

3.3 **TBARs assay** ผลการทดลองพบว่าสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งปฏิกิริยาการเกิด Lipid peroxidation โดยมีค่าการดูดกลืนแสงลดลงเมื่อนำไปคำนวนค่า EC_{50} แสดงในตารางที่ 3 จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบสารที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยเมทธานอลพบว่าสารที่สกัดด้วยน้ำจะมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา Lipid peroxidation ได้ดีกว่า และสารสกัดด้วยเมทธานอลของ *M. loriformis* จะมีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา Lipid peroxidationได้สูงที่สุด ส่วนสารสกัดด้วยน้ำของ *M. nudiflora* มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยา Lipid peroxidationได้สูงที่สุด



รูปที่ 6 ค่าความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ DPPH ของตัวอย่างสารสกัด *M. bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora* ทั้งส่วนที่สกัดด้วยเมทธานอลและน้ำ: ก. สกัดด้วยเมทธานอล, ข. สกัดด้วยน้ำ, ค. ค่า EC_{50} (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)



รูปที่ 7 แสดงค่า FRAP ของสารสกัด *M. bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora*: ก. รายงานผลเป็น Fe^{2+} mmole/mg extract, ข. รายงานค่า FRAP ของสารสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับค่าความสามารถของ Trolox

ตารางที่ 3 ค่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารสกัด *M. bracteata*, *M. loriformis* และ *M. nudiflora* ทั้งส่วนที่สกัดด้วยเมทธานอล และน้ำ และสารต้านออกซิเดชันมาตรฐาน (Trolox)

Assay	*M. bracteata*		*M. loriformis*		*M. nudiflora*		Trolox
	Methanol extract	Water extract	Methanol extract	Water extract	Methanol extract	Water extract	
DPPH EC_{50} (μg/ml)	246.9±11.8	620.9±5.4	408.8±9.6	427.1±48.76	804.3±41.0	1124.7±42.09	18.1±1.48
FRAP							
Fe^{2+}(mmole/mg extract)	0.66±0.008	0.48±0.011	0.57±0.0176	0.43±0.0087	0.46±0.0072	0.35±0.0049	5.31±1.2
trolox -μg /mg-extract	137.85±2.60	83.54±3.35	108.99±5.13	68.3±2 .65	75.27± 2.19	42.15 ±1.49	-
TBARs EC_{50} (mg/ml)	2.00±0.090	1.51±0.076	2.27±0.149	1.6±0.071	2.37±0.220	1.09±0.065	0.27±0.028

n=3 (mean ± SD)

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยแผ่นใบของพืชทั้ง 3 ชนิดในสกุลหญ้าปักกิ่ง (Murdannia) พบว่าจุลลักษณะที่ปรากฏทั่วไปมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Tomlinson (1969), Faden and Inman (1996) และ Thitimetharoch (2004) และพบว่าลักษณะลวดลายการสะสมคิวทินที่เนื้อเยื่อผิวใบสามารถใช้เป็นจุลลักษณะวินิจฉัยได้โดย *M. nudiflora* ที่มีลวดลายตามยาวเป็นเส้นขนาน ส่วน *M. bracteata* และ *M. loriformis* มีลวดลายร่างแห และการปรากฏหรือไม่ปรากฏของขนขนาดใหญ่บนผิวแผ่นใบด้านบนและด้านล่างสามารถใช้ในการจำแนก *Murdannia* ทั้ง 3 ชนิดนี้ได้โดยที่ไม่พบขนขนาดใหญ่ที่ผิวใบด้านบนของ M. bracteata และไม่พบขนขนาดใหญ่ที่ผิวใบด้านล่างของ *M. nudiflora* ดังแสดงในตารางที่ 4 อย่างไรก็ตามข้อมูลจุลลักษณะแผ่นใบที่ได้ศึกษาครั้งนี้ควรศึกษาพืชชนิดเดียวกันที่มีความแตกต่างของสภาพถิ่นที่อยู่ตามการแพร่กระจายพันธุ์เพิ่มเติมเพื่อจะได้ทราบลักษณะที่คงที่ (Consistent characters) ลักษณะผันแปร (Variation characters) และลักษณะที่ดีสำหรับใช้เป็นลักษณะจำแนกหรือวินิจฉัยควรเป็นลักษณะปรากฏอันเกิดจากพันธุกรรมและไม่ผันแปรตามสิ่งแวดล้อม

การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ โดยศึกษาปริมาณร้อยละของสารที่สกัดด้วยเมทธานอลและน้ำ พบว่าปริมาณฟีนอลิคที่สกัดด้วยเมทธานอลของ *M. bracteata* มีค่ามากที่สุดประมาณ 2 เท่าของ *M. loriformis* และประมาณ 4.5 เท่าของ *M. nudiflora* ตามลำดับ โครมาโตแกรมของทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟีในสารสกัดด้วยเมทธานอลพบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด โดยทั่วไปมีองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นเหมือนกันคือ Steroid, Triterpene, Lactone, Tannin และ Flavonoids โดยในตัวทำละลายชุดที่ 1 แสดงให้เห็นความแตกต่างทางโครมาโทแกรม ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่จะเป็นสารกลุ่มที่มีขั้วน้อย จะเห็นชัดเจนภายใต้แสง UV 366 และเมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดซัลฟุริคในเอทธานอล โดยเฉพาะแถบที่มีค่า Rf ประมาณ 0.75 นั้นจะปรากฏเฉพาะ *M. bracteata* และ *M. loriformis* ส่วนในตัวทำละลายชุดที่ 2 จะเห็นกลุ่มสารส่วนใหญ่ที่มีความเป็นขั้วมากกว่าชุดที่ 1 เมื่อตรวจสอบด้วย 2 % เฟอร์ริกคลอไรด์ในเอทธานอล และตรวจสอบด้วย 1% อลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทธานอล สามารถแยกความแตกต่างโครมาโทแกรมของสารสกัดได้อย่างชัดเจนภายใต้แสง UV 366 พบว่า *M. loriformis* ไม่ปรากฏสารเรืองแสงสีฟ้าขาว 2 แถบที่ค่า R_f ประมาณ

0.75-0.8 และ 0.82-0.88 ในขณะที่อีก 2 ชนิด ปรากฏแถบสารในช่วงดังกล่าวอย่างชัดเจน จากรูปที่ 5-จ จะเห็นว่าสารสกัดของ *M. nudiflora* ปรากฏแถบสารเรืองแสงสีเหลืองของสารกลุ่ม Flavonoid หลายแถบอย่างชัดเจน (R_f ประมาณ 0.1, 0.12-0.2, 0.4-0.58 และ 0.6-0.65) ซึ่งมากกว่าสารสกัดพืชอีก 2 ชนิด

การศึกษาพืชฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชทั้ง 3 ชนิดที่สกัดด้วยเมทธานอลและน้ำเพื่อเปรียบเทียบกัน การสกัดด้วยน้ำนั้นจะเลียนแบบการปรุงอาหารซึ่งสารส่วนใหญ่จะเป็นสารมีขั้วสูง เช่น น้ำตาล ส่วนสกัดด้วยเมทธานอลจะได้สารกลุ่มที่มีขั้วและไม่มีขั้วซึ่งครอบคลุมเกือบทุกกลุ่มของสารจะเห็นว่าค่า Yield ของสารสกัดด้วยเมทธานอลจะมีค่าสูงกว่าสารสกัดด้วยเมทธานอลของ *M. bracteata* ฤทธิ์ในการกำจัด DPPH สูงที่สุด (EC_{50}= 246.9 µg/ml) ขณะที่สารสกัดด้วยน้ำของ *M. loriformis* มีฤทธิ์ในการกำจัด DPPH สูงสุด (EC_{50}=427.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากผลการทดลองจะเห็นว่าสารสกัดด้วยเมทธานอลของพืชทั้ง 3 ชนิดมีฤทธิ์ในการกำจัดได้ดีกว่าสารสกัดด้วยเมทธานอล สำหรับการวัดความสามารถในการเป็นสารรีดิวซ์ (Reducing agent) โดยวัดความสามารถของสารสกัดในการถ่ายเทอิเล็คตรอนให้แก่เหล็ก Fe^{3+} ซึ่งเลียนแบบคุณสมบัติประการหนึ่งของสารต้านออกซิเดชันโดยการเติมอิเล็คตรอนทำให้โมเลกุลนั้นไม่เป็นอนุมูลอิสระอีกต่อไป ค่า FRAP ที่สกัดด้วยเมทธานอลจะสูงกว่าสารสกัดด้วยน้ำซึ่งเหมือนกับวิธี DPPH และค่า FRAP ของ *M. bracteata* มีค่าสูงที่สุดทั้งที่สกัดด้วยน้ำและเมทธานอลรองลงมา *M. loriformis* และ *M. nudiflora* ตามลำดับ นอกจากนี้ค่า FRAP ยังสอดคล้องกับปริมาณ Phenolic compound ของสารสกัดด้วยน้ำและเมทธานอลของพืชทั้ง 3 ชนิด จากผลการทดลองทั้ง 2 วิธีจะเห็นว่าสารสกัดด้วยเมทธานอลของ *M. bracteata* มีค่าสูงสุดแสดงว่าพืชชนิดนี้มีความสามารถเป็น Scavenging agent และ Reducing agent ได้ดี และสำหรับการตรวจวัดฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากความสามารถในการป้องกันเซลล์หรือส่วนประกอบของเซลล์จัดเป็นวิธีการที่มีความใกล้เคียงกับปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในร่างกายเช่น ปฏิกิริยา Lipid peroxidation โดยวัดค่า Thiobarbituric reactive substance (TBARs) จากผลการทดลองสารสกัดด้วยน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิด สามารถต้านการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation ได้ดีกว่าสกัดด้วยเมทธานอลอาจเนื่องมาจากสารสกัดด้วยน้ำจะมีกลุ่มสารที่มีขั้วสูงซึ่งจะมีหมู่ ไฮดรอกซิลมากกว่าจึงมีความสามารถในการละลายได้ดีกว่า นอกจากนี้เคยมีรายงานว่าการที่มีไฮดรอกซิลเพิ่มเข้ามาทำให้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่า (Ho, 1992; Hollman et al, 1995) อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการต้านปฏิกิริยา Lipid peroxidation พบว่าสารสกัดด้วยน้ำของ *M. nudiflora* มีฤทธิ์สูงสุด (EC_{50}=1.09 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งอาจเกี่ยวเนื่องมาจากสกัดของ *M. nudiflora* มีสารกลุ่ม Flavonoids เป็นองค์ประกอบหลักที่มากกว่าดังจะเห็นแบน TLC รูป 5-ฉ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่มีประสิทธิภาพมากโดยเฉพาะ Lipid peroxyl radical (Nordmann, 1993)

ตารางที่ 4 จุลลักษณะที่แตกต่างของผิวใบของ M. bracteata, M. loriformis และ M. nudiflora

ลักษณะ	*M. bracteata*	*M. loriformis*	*M. nudiflora*
ลวดลายคิวทิน ขนขนาดใหญ่	ร่างแห	ร่างแห	เป็นเส้นขนานตามยาว
- ผิวใบด้านบน	ไม่พบ	2 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว	ไม่พบ
- ผิวใบด้านล่าง	4-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว	2-4 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว	ไม่พบ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากทุนอุดหนุนส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ ประจำภาคต้น ปีการศึกษา 2549 มหาวิทยาลัยขอนแก่น และขอขอบคุณรศ. ดร. สมาน เทศนา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องสถานที่และเครื่องมือในการถ่ายภาพดิจิตอล

เอกสารอ้างอิง

วีณา จิรัจฉริยากูล. 2542. สารต้านมะเร็งจากหญ้าปักกิ่ง. จุลสารข้อมูลสมุนไพร. 16(3): 10-13.

Anonymous, 1966. Officinal Indian Pharmacopoeia, 2nd ed. Government of India, New Delhi.

Benzie, I.F., Strain, J.J. 1996. The ferric reduction ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. Ana.l Biochem. 239(1): 70-6.

Faden, R.B, Inman, K.E. 1996. Leaf anatomy of the African genera Commelinaceae: Anthericopsis and Murdannia. The Biodiversity of African Plants. Kluwer Academic Plubishers, Netherland.

Folin, O., Ciocalteu, V. 1927. On Tyrosine and Tryptophane Determination in Proteins. Journal of Biological Chemistry. (27): 627-650.

Ho, C. T. 1992. Phenolic Compounds in Food: an Overview. In: Huang, M. T., Ho, C. T. and Lee, C. Y. (Editors), Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II. American Chemical Society, Washington, 2-7.

Hollman, P. C. H., Vries, J. H. M., Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J. B. and Katan, M. B. 1995. Absorption of Dietary Quercetin Glycosides and Quercetin in Healthy Ileostomy Volunteers. Am J Clin Nutr. 62:1276-1282.

Intiyot, Y., Kinouchi, T., Vinitketkumnuen, U., Ohnishi, Y. 1998. Effect of *Murnannia loriformis* Extract on Xenobiotic Metabolizing Enzyme Introduction and AOM-Induced Colon Cancer in Rats. The 3rd International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations. Bangkok, Thailand.

Intiyot, Y., Kinouchi, T., Kataoka, K., Arimochi, H., Kuwahara, T., Vinitketkumnuen, U., Ohnishi, Y. 2002. Antimutagenicity of *Murdannia loriformis* in the Salmonella mutation assay and its inhibitory effects on azoxymethane-induced DNA methylation and aberrant *crypt* focus formation in male F344 rats. Med Invest. 49(1-2): 25-34.

Jain, S.K., DeFilipps, R.A. 1991. Medicinal Plants of India. Vol. I. Reference Publications, Algonac, Michigan.

Jiratchariyakul, W., Mongkarndi, P., Okabe, H., Frahm, A.W. 1998. Cytotoxic glycospinglipid from Murdannia loriformis (Hassk.) Rolla Rao and Kammathy. Thai J Phytopharm. 5(20): 10-20.

Johansen, D.A. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill Book Company, New York, USA.

Nordmann, R. 1993. Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidant Vitamins. C R Seances Soc Biol Fil 187:277-285.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assy for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analst. Biochem., 95: 351-358.

Ohtake, Y., Tagashira, M. 1998. A New Antioxidant 1,3-Benodioxole from Mellissa officinalis. Planta. Medica., 64: 555-8.

Perry, L.M., Metzger J. 1980. Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses. The MIT Press Cambridge, Massacahusetts, London.

Phetsuk, P., Hahnvajanawong, C., Lulitanond, V., Laupattarakasem, P. 2005. Immunomodulatory Effect of Thai Plant [Master of Science Thesis in Medical Microbiology]. Khon Kaen, The Graduate School, Khon Kaen Uiversity.

Saralamp, P., Chuakul, W., Temsiririrkkul, R., Clayton, T. 1996. Medicinal Plants in Thailand. Vol. I. Amarin Printing and Plulishing Pubblic Co..Ltd. Bangkok.

Slaga, T. J. 1995. Inhibition of the induction of cancer by antioxidants. Adv. Exp. Med. Biol. 369, 167-174.

Thitimetharoch, T., Chantaranothai, P., Thammathaworn, A., Faden, R.B. 2004. Taxonomic Studies of the Family Commelinaceae in Thailand [Ph.D. Philosophy Thesis in Biology]. Khon Kaen, The Graduate School, Khon Kaen University.

Tomlinson, P.B. 1969. Anatomy of the Monocotyledons III (Commelinales-Zingiberales). The Clarendon Press, Oxford.

Vinitketkumnuen, U., Charoenkunathum, W., Kongtawelert, P., Lertprasertsuk, N., Picha, P., Matsushima, T. 1996. Antimutagenicity and DT-diaphorase inducer activity of Thai Medicinal plant, *Murdannia loriformis*. Herbs Spices Medicinal Plants. 4: 45-52.

Vinitketkumnuen, U., Chewonarin, T., Dhumtanom, P. Lertprasertsuk, N., Wild, C.P. 1999. Alfatoxin-albumin adducts formation after single and multiple dose of alflatoxin B1 in rats treated with Thai medicinal plants. Mutation Reserch. 428(-): 345-51.

Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M. 1984. Plant Drug Analysis, translate by Scott, A. Springer-Verlag, New York.

NATURAL HISTORY MUSEUM OF DENMARK
UNIVERSITY OF COPENHAGEN

Dr Thaweesak Thitimetharoch
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Khon Kaen University
Khon Kaen 40002
Thailand

26 MARCH 2008

BOTANICAL GARDEN & MUSEUM

GOTHERSGADE 130
1123 COPENHAGEN K

TEL +45 35 32 22 00
DIR +45 35 32 21 90
FAX +45 35 32 22 10

henrikp@snm.ku.dk
www.nathimus.ku.dk

Dear Dr Thitimetharoch,

Many thanks for offering two lectures for the **14th Flora of Thailand Meeting** that will be held at the Carlsberg Academy in Copenhagen from 18–21 August 2008. I am delighted to inform you, on behalf of the organizing committee, that we have decided to accept your proposed lectures:

- **T. Thitimetharoch**, T. Subphala, S. Preeprame, S. Porasuphatana & R. B. Faden: The identification of Yah Peking as *Murdannia bracteata* (Commelinaceae) and the species with which it has been confused.
- **T. Thitimetharoch**, W. Putalun & R. B. Faden: *Murdannia discreta* (Commelinaceae): recognizing and understanding a rare species in Thailand.

You might like to know already at this stage that a Powerpoint projector with a connected laptop will be standard equipment in the lecture room. If you need to show slides or overheads, we can provide such projectors as well, but please let us know good time in advance. 20 minutes (*including* time for questions) will be available for each lecture.

We look very much forward to seeing you in Copenhagen in August – and to hearing your interesting presentations.

Yours sincerely

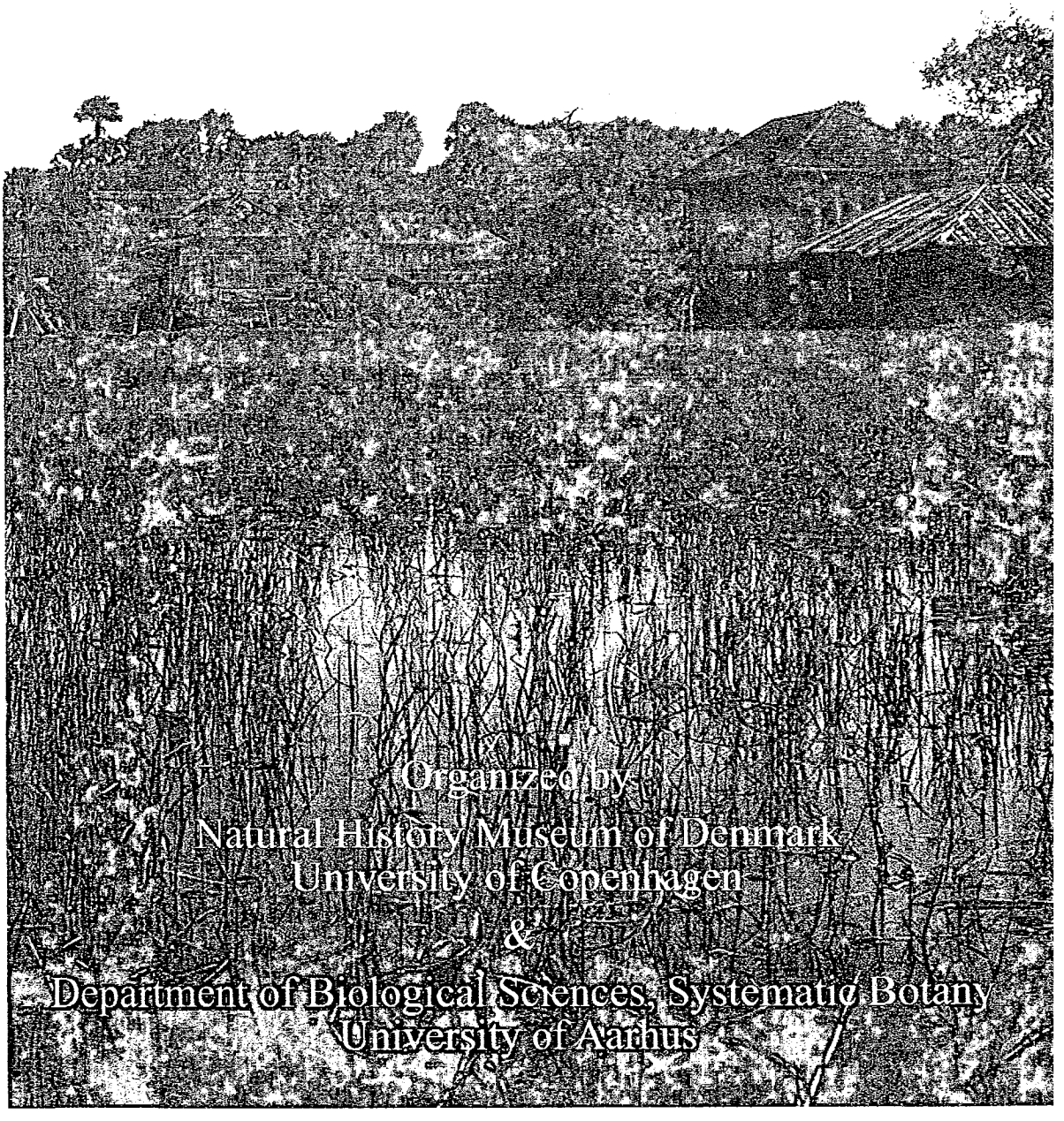
Henrik Ærenlund Pedersen
Associate Professor, Ph.D.

14th FLORA OF THAILAND MEETING

Carlsberg Academy, Copenhagen, Denmark

18 – 21 August 2008

ABSTRACTS



Murdannia discreta (Commelinaceae): recognizing and understanding a rare species in Thailand

Thaweesak Thitimetharoch, Woraporn Putalun & Robert B. Faden

Aneilema discretum Craib was described in 1912 from a single Kerr collection from Doi Suthep in northern Thailand. It was not recollected for more than half a century. Despite more than a dozen collections since the mid-1980's, recognition of *A. discretum* as a distinct species of *Murdannia* has remained in doubt. In a recent Ph.D. thesis (Thitimetharoch, 2004) the plant was just mentioned in a note. Our latest studies, including a field collection from the type locality in September 2007, have confirmed that *M. discreta* is a relatively rare but distinct species that is somewhat intermediate between the common and widespread species *M. japonica* and *M. edulis*. From the former it may best be distinguished by its pubescent leaves and from the latter by the presence of cauline leaves or leafy bracts on the flowering shoots. *Murdannia discreta* is known from the Northern, Northeastern and Eastern Floristic Regions of Thailand. A 2007 Maxwell collection has extended the known distribution of this species, which is nearly endemic to Thailand, further east into Cambodia.

T. Thitimetharoch, Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand. Email: tthitikku@yahoo.com

W. Putalun, Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

R.B. Faden, Department of Botany, MRC 166, Smithsonian Institution, P.O. Box 37012, Washington, DC 20013-7012, U.S.A. Email: fadenr@si.edu

Murdannia discreta (Commelinaceae): Recognizing and Understanding a Rare Species in Thailand

Thaweesak Thitimetharoch*
Woraporn Putalun *
Robert B. Faden**

* **Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand.**
** **Department of Botany, Smithsonian Institution, Washington, DC, U.S.A.**

Murdannia Royle (1839)

Perennial or annual herbs.
Roots thin or thick sometimes tuberous.
Leaves spirally arranged or distichous, lamina sessile.
Inflorescences terminal and/or axillary thyrses, or variously reduced.
Flowers bisexual, actinomorphic or zygomorphic, pedicellate.
Sepals free, sepaline or colored. *Petals* free, not clawed, petaline.
Stamens 6, dimorphic, filaments generally free, glabrous or bearded;
Fertile stamens (2-) 3, antesepalous;
Staminodes 3 (-4), antepetalous (if 4, then one, antesepalous, anterior, with a minute antherodes or lacking, filaments shorter than the stamens, anthers basifixed, trilobed or hastate.
Capsules (bi-) trilocular, (bi-) trivalved, locule 1-many-seeded.
Seeds uniseriate or biseriate, embryotega circular, dorsal to sublateral, hilum ellipsoid to linear, mid-ventral or subbasal-ventral.

M. clandestina

Genus *Murdannia*

- **Faden, R.B.** (1998) : about 50 species, pan tropical and warm temperate, mainly in Asia.
- **Hooker, J.D.** (1892)
  India : ca. 30 species
- **Cherfils, H.** (1937)
  Indo-China : 20 species
- **Hong & DeFilipps** (2000)
  China : 20 species (6 endemic spp.)

Thitimetharoch and et al. (2004)

=> Murdannia 14 species were recorded for the Flora.

1. **Murdannia clandestina**
2. **Murdannia divergens**
3. **Murdannia edulis** (<= **Aneilema discreta**)
4. **Murdannia gigantea**
5. **Murdannia japonica**
6. **Murdannia loriformis**
7. **Murdannia macrocarpa**
8. **Murdannia medica**
9. **Murdannia nudiflora**
10. **Murdannia pauciflora**
11. **Murdannia spectabilis**
12. **Murdannia spirata**
13. **Murdannia vaginata**
14. **Murdannia sp.**

Aneilema discretum Craib (1912) **Kew Bull.**

(=> 2 fertile stamens ?)

A.F.G. Kerr 1909 (K!, holotype)
Doi Suthep-Pui, Chiang Mai
18 July 1911

It was not recollected for more than half a century.

Kerr 1909 (K!), Doi Suthep-Pui, Chiang Mai, 1911

Sakol 208 (BK), **Surin, 1965**

G. Murata et al. T-37666 (BKF & KYO), **Sangkha, Surin, 1984**

H. Takahashi T-63236 (KYO), **Phu Kradung, Loei, 1988**

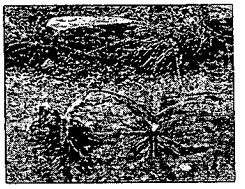
P. Chantaranothai et al. 704 (KKU), **Phu Pan NP, Sakon Nakhon, 1997**

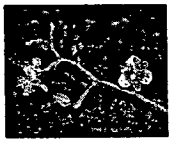
Martin Greijmans 78 (BKF& CMU), **Khong Chium, Ubon Ratchathani, 2001**

Despite more than a dozen collections since the mid-1980's, recognition of *A. discretum* as a distinct species of *Murdannia* has remained in doubt.

Wan Kai Jae Lek (ว่านไก่แจ้เล็ก)

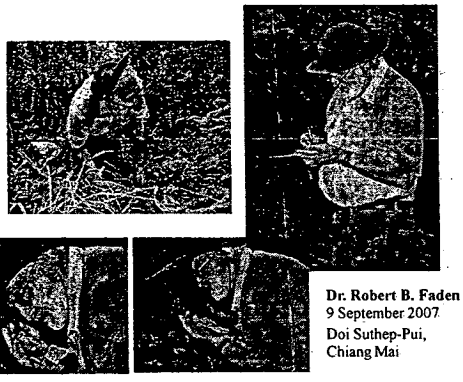
Thitimetharoch, T. & Yongvanit, S. (2007) => anti-inflammatory





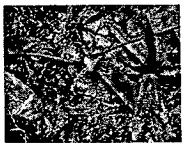
Pale violet flowers !

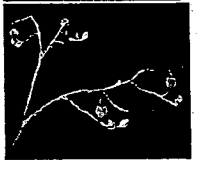
Thitimetharoch T. 604 (BKF, KKU), 30 May 2005 &
741 (BKF, US), 28 July 2007, Ubon Ratchathani (Kong Chium).



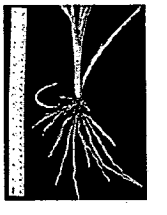
Dr. Robert B. Faden
9 September 2007
Doi Suthep-Pui,
Chiang Mai

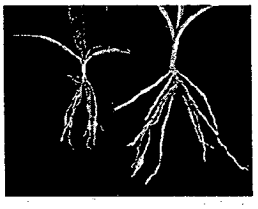
An exact flower opening time : 1640h.

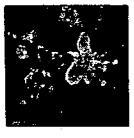


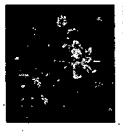


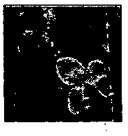
Thaweesak T. & R.B. Faden 766 (BKF, K, KKU, US),
Chiang Mai, Doi Suthep-Pui (type locality), 9 September 2007









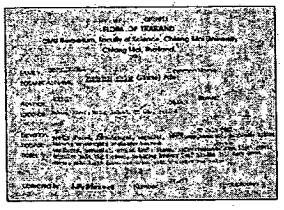


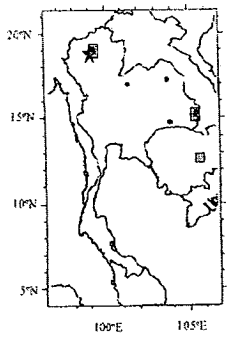
Thailand.— NORTHERN, NORTH-EASTERN, EASTERN
Distribution.— Thailand **and Cambodia (new record)**.

Ecology.— Seasonal swampy soils in deciduous forest,
alt. 30-150-550 m [Cambodia (Kratie) Ubon Ratchathani (Kong Chium) to Loei (Phu Kra Dung)]
Flowering from June to November,
Flower opening time from late afternoon to evening.

Vernacular.— **Wan Kai Jae Lek** (ว่านไก่แจ้เล็ก) Ubon Ratchathani (Kong Chium)

J.F. Maxwell 07-417 (CMU): Cambodia, Kratie, Sambour, Kring Island (Mekong River), *Ca.* 30 m., 30 July 2007





★ Type locality

▣ TT collection

▣ Maxwell collect.

Distribution of **Murdannia discreta**

Murdannia edulis (Stokes) Faden
in Taxon. 29(1): 77. 1980.

Wan khaow niao (ว่านข้าวเหนียว)

Thailand.— NORTHERN, NORTH-EASTERN, EASTERN, SOUTH-WESTERN.
Distribution.— India, Nepal, Bhutan, Bangladesh, China, Taiwan, Myanmar, Thailand, Indo-China, Indonesia (Java), Timor, New Guinea, Philippines.

Ecology.— Seasonal swampy soils in deciduous or oak-pine forests, alt. 40-1,300 m;
flowering from January to March,
Flower opening time from from late afternoon to evening.

Vernacular.— Dode (โด๋เด๋) (Phu Wiang – Khon Kaen);
Wan khaow niao (ว่านข้าวเหนียว) (Ban Chum Saeng – Nakhon Ratchasima).

Murdannia japonica (Thunb.) Faden
in Taxon. 26(1): 142. 1977

Kot tung na (ไกรทุ่งนา)

Thailand.— Throughout the country.
Distribution.— India, China (Tonkin), Thailand, Indo-China, Malaysia, Java.

Ecology.— In lowland evergreen forest, exposed areas in gallery forest, wet places in deciduous or bamboo forests, alt. 50-1,000 m; flowering from May to August,
Flower opening time from late afternoon to evening.

Vernacular.— Kot tung na (ไกรทุ่งนา) (General);
Phak plap doi (ผักปลาบดอย) (Doi Chiang Dao-Chiang Mai);
Wahn dong ling (หว่านดองลิง) (Hin Dat-Kanchanaburi);
Ya khing ling (หญ้าจิงลิง) (Nakhon Sawan).

Comparisons of some morphological characters among Murdannia discreta, M. edulis and M. japonica

Character	M. discreta	M. edulis	M. japonica
Distal tubers	Present	Present	Absent
Leaves	Glabrous / rarely Pubescent, with a line of pubescence along the margin above (rarely below or covering the entire lower surface)	Glabrous / Pubescent, with a line of pubescence along the margin above (rarely below or covering the entire lower surface)	Glabrous
Flowering shoots	with ca. 6 lamina sheaths and a few bladclass sheaths on both the uppermost and the lower most in spiral arrangement	with bladeless sheaths in spiral arrangement	with several well-developed lamina sheaths in districhou arrangement and congested at the top

Cont.

Character	M. discreta	M. edulis	M. japonica
Flowers	White / pale violet	Pinkish purple / Violet blue / Rarely white	White / Rarely Pinkish purple
Anthers	Yellow	Cream-colored	Variable, Cream-colored, Yellowish orange / Violet-gray
Filaments of Fertile stamens	6-7 mm long	3.5-4 mm long	3.5-5 mm long
Capsules	Subovoid, 6-7 x 5-6 mm	Oblong-ellipsoid, 5-7 x 3.5-4 mm	Subovoid, 5-7 x 4-5 mm,

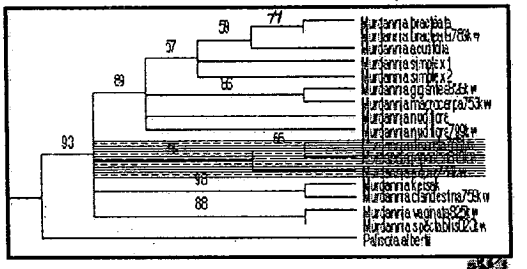
Cont.

Character	M. discreta	M. edulis	M. japonica
Seeds	?	Ca. 2 x 1.5 mm (terminal seeds), Ca. 1 x 1.5-2 mm (medial seeds) Testa obscurel pitted all over; embryotega subdorsal	Ca. 2.5 x 2 mm (terminal seeds), Ca. 1.5-2 x 1.5-2 mm (medial seeds) Testa finely radiately reticulate and spinulose-warty from Mid-dorsal embryotega
Flowering time	Rainy season	Winter	Rainy season

DNA ANALYSIS

trnL-F, At103

ML bootstrap consensus tree



Wurdack et al. (unpublished)

"The **Murdannia edulis** Species Group"

Perennials with basal rosettes of broad leaves, roots thick or tuberous, flowering shoots axillary from the rosette leaves, inflorescences panicle-like thryses, bracteoles perfoliate, and sepals with three longitudinal ribs

- **Murdannia discreta**
- **Murdannia edulis**
- **Murdannia japonica**

KEY TO THE SPECIES

"**Murdannia edulis** Species Group"
Perennials with basal rosettes of broad leaves, roots thick or tuberous, flowering shoots axillary from the rosette leaves, inflorescences panicle-like thryses, some bracteoles perfoliate, and sepals with three longitudinal ribs

1. Flowering shoots lacking well-developed leaves — **M. edulis**

1. Flowering shoots with well-developed leaves
   2. Leaves with a line of pubescence along the margin above — **M. discreta**
   2. Leaves glabrous — **M. japonica**

Conclusions

- **Murdannia discreta** is a distinct species that resembles **M. japonica** and **M. edulis**.
- **M. discreta** is a rare or uncommon species.
- **M. discreta** is newly reported from Cambodia.
- New characters for **M. discreta** are reported:
  a. the presence of root tubers
  b. the presence of 3 instead of 2 fertile stamens
  c. A new flower color (pale violet)
  d. An exact flower opening time : 1640h.

Bibliographies

1. Craib, W.G. 1912. Contributions to the Flora of Siam (Miscellaneous Information). **Kew Bulletin**. 1912: 397-435.
2. Faden, R.B. 1977. The Identity of *Commelina japonica* Thunb. (Commelinaceae). **Taxon**. 26(1): 142-144.
3. Faden, R.B. 1980. The Taxonomy and Nomenclature of Some Asiatic Species of *Murdannia*(Commelinaceae). **Taxon**. 29(1): 71-83.
4. Faden, R.B. 1998. Commelinaceae. *In*: Kubitzki, K. **The Families and Genera of Vascular Plants**. Vol. 4
5. Hong, D.Y. and DeFilipps, R.A. 2000. Commelinaceae. **Flora of China**. Vol. 24.
6. Thitimetharoch, T. and et al. 2004. Taxonomic Studies of the Family Commelinaceae in Thailand. **Unpublished Ph.D. Thesis**.
7. Thitimetharoch, T. & Yongvanit, S. 2007. Ethnobotanical Survey of Pha Taem National Park, Ubon Ratchathani Province, Thailand. **The 2nd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Products (Proceeding)**.

Acknowledgments

- Prof. Dr. Pranom Chantaranothai, Dept. Biology, KKU
- Facilities: Fact. Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University and Dept. Botany, Smithosonian Institution, USA.
- Thai and Herbaria abroad (BK, BKF, CU, CMU, KKU, K, KYO, PSU, TCD, US)
- Ken Wurdack *et al.* (Murdannia clade)
- Financial supports:
  Research Grants: Thailand Research Fund (**TRF-MRG-5080006**)
  Traveling Funds for this trip: Khon Kaen University and Fact. Pharmaceutical Sciences, KKU

The identification of Yah Peking as *Murdannia bracteata* (Commelinaceae) and the species with which it has been confused

Thaweesak Thitimetharoch, Tarinee Subphala, Srisomporn Preeprame, Supatra Porasuphatana & Robert B. Faden

Murdannia bracteata (Commelinaceae) is the correct name for Yah Peking. This plant has been confused with other species of the genus, especially *M. loriformis* and *M. nudiflora*. A study of these three species was conducted using leaf anatomical methods (leaf scrapes and clearings), phytochemical methods (physico-chemical value and thin-layer chromatography), and anti-oxidant activity (1,1-diphenyl-2-picrilhydrazly (DPPH) and ferric reducing-anti-oxidant power (FRAP)). Cutin patterns and presence or absence of macro-hairs were found to be useful for distinguishing these species. The differences in phenolic contents, thin-layer chromatograms, and anti-oxidant activity were also useful for separating the three species.

T. Thitimetharoch, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand. Email: thathi@kku.ac.th

T. Subphala, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

S. Preeprame, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

S. Porasuphatana, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

R.B. Faden, Department of Botany, MRC 166, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, PO Box 37012, Washington DC, 20560, 20013-7012, U.S.A.

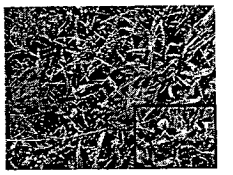
The Identification of Yah Peking as Murdannia bracteata (Commelinaceae) and the Species with which It Has Been Confused

Thaweesak Thitimetharoch *, Tarinee Subphala *, Srisomporn Preeprame *, Supatra Porasuphatana * and Robert B. Faden**

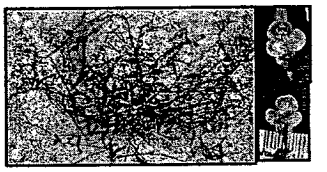
* Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand.
*** Department of Botany, Smithsonian Institution, Washington, DC, U.S.A.

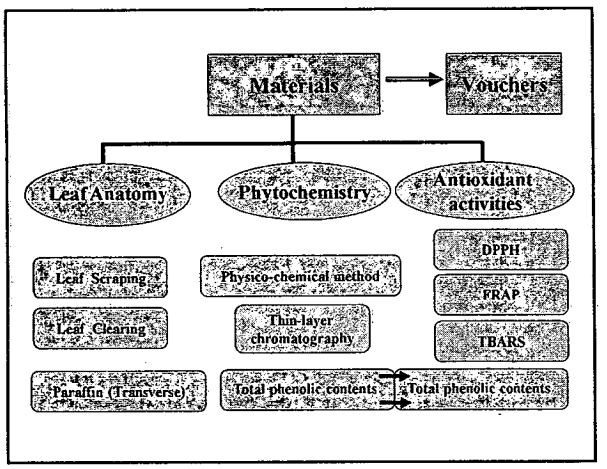
M. bracteata

M. nudiflora



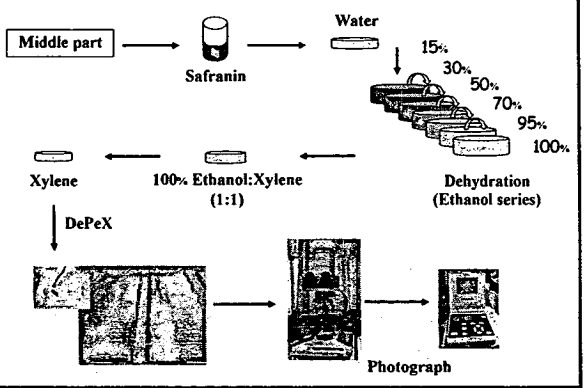
M. loriformis



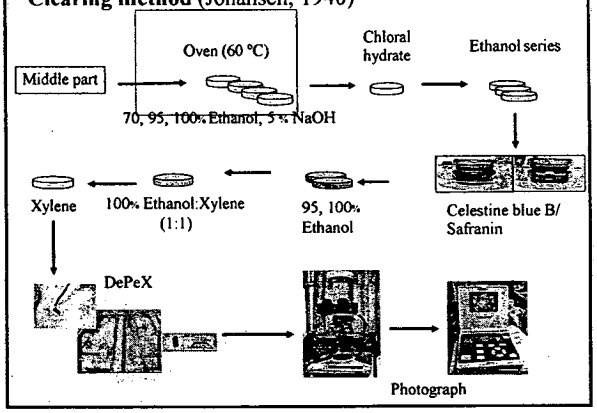


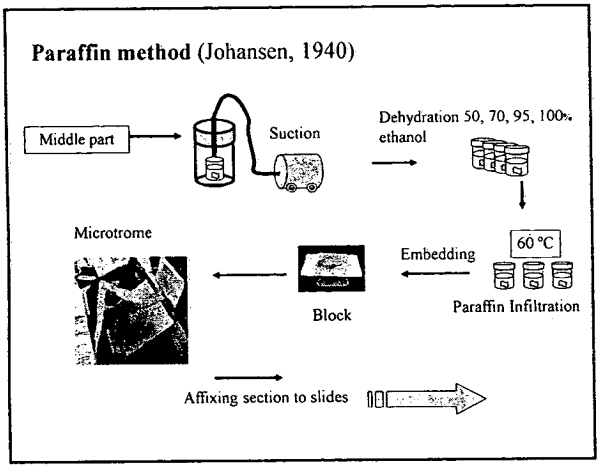
Leaf Anatomy

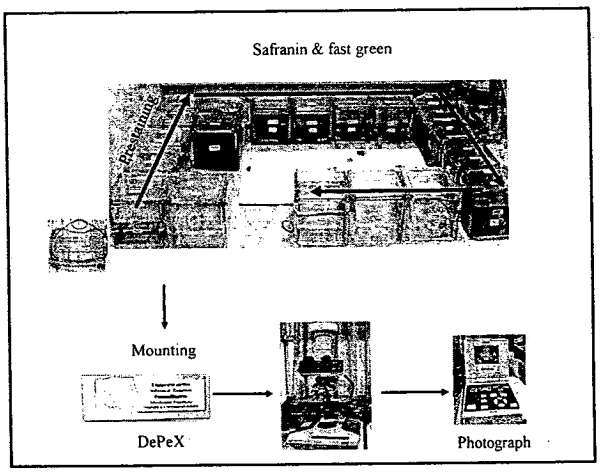
Scraping method (Johansen, 1940)

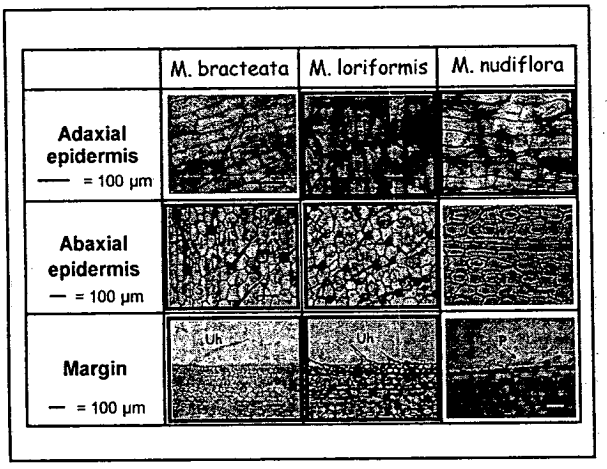


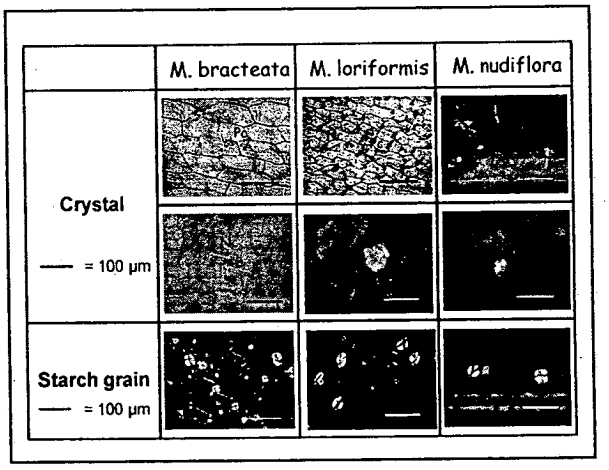
Clearing method (Johansen, 1940)

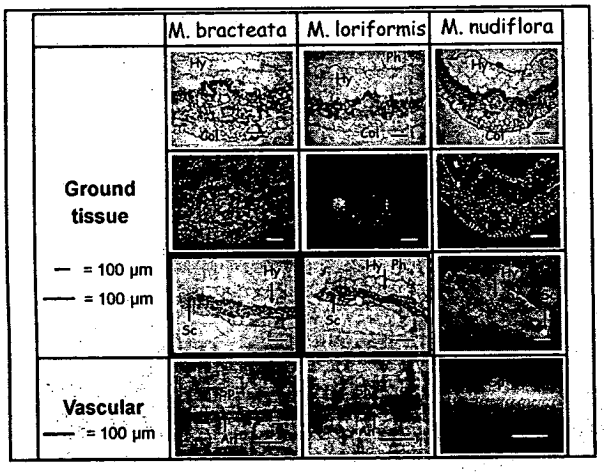












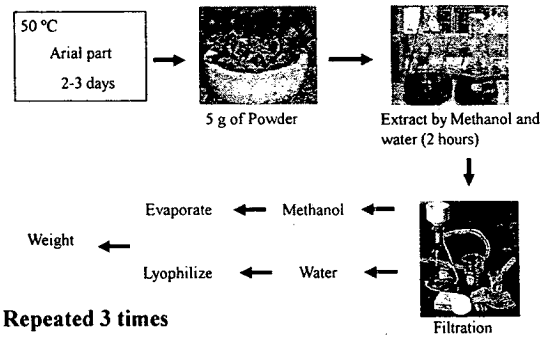
Discussion and conclusion

- General microscopic features are agreed with Tomlinson (1966), Faden and Inman (1996) and Thitimetharoch et al. (2004).
- Cutin patterns and presence or absence of macro-hairs and shape of leaf margin are useful for distinguishing the species.
- 2-celled prickle-hairs and druse crystals are firstly reported for the genus.

Phytochemical methods

- Physico-chemical value
- Thin-layer chromatography, TLC

Physico-chemical value



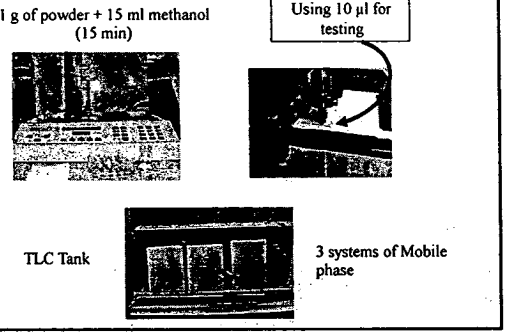
Repeated 3 times

Percent yield of extraction

Parameter	M. bracteata Mean ± SD (n=3)	M. loriformis Mean ± SD (n=3)	M. nudiflora Mean ± SD (n=3)
Methanol-extract (%)	4.13±0.61	4.26±0.39	3.88±0.92
Water-extract (%)	3.26±0.49	3.38±0.63	3.03±0.23

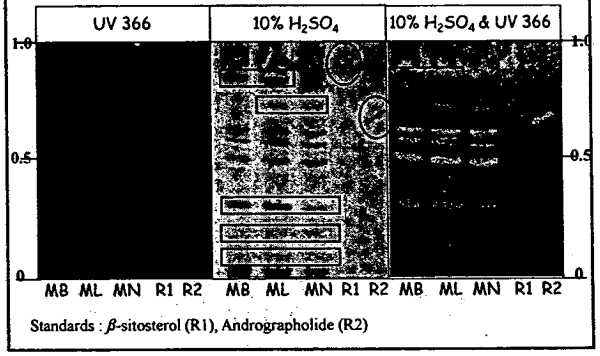
Thin-layer chromatography; TLC

(Waqner and Bladt, 1984)



System Solvent 1

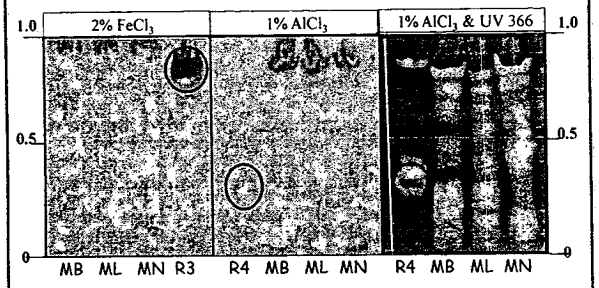
$CHCl_3$: EtAc : MeOH : Formic acid : Water
(900 : 250 : 150 : 25 :25) Stationary phase: Silica gel F_{254}



Standards : β-sitosterol (R1), Andrographolide (R2)

System Solvent 2

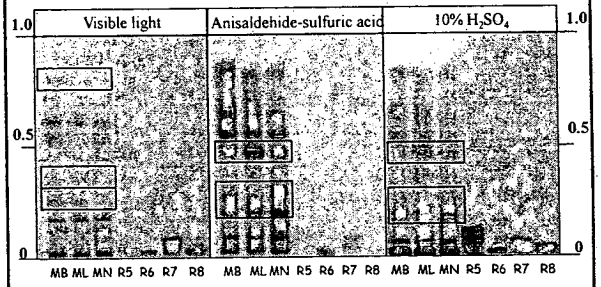
EtAc : Formic acid : Acetic acid : Water
(125 : 11 : 11 : 25 : 13.5) Stationary phase: Silica gel F_{254}



Standards : Tannic acid (R3), Rutin (R4)

System Solvent 3

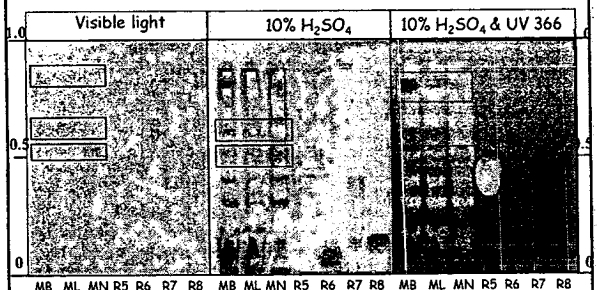
Hexane : EtAc : MeOH : Acetic acid : Water
(70 : 30 : 5 : 0.5) Stationary phase: Silica gel F_{254}



Standards : Ferulic acid (R5), (-)-epicatechin gallate (R6)
Quercitin (R7), Gallic acid (R8)

System Solvent 3

Hexane : EtAc : MeOH : Acetic acid : Water
(70 : 30 : 5 : 0.5) Stationary phase: Reverse phase (RP-18)



Standards : Ferulic acid (R5), (-)-epicatechin gallate (R6)
Quercitin (R7), Gallic acid (R8)

Discussion and conclusion

- Physico-chemical values are not obviously difference
- The results of phytochemical studies (TLC) show relationship among the species and are agreed with morphological features.
- The flavonoid chromatograms of three *Murdannia* are useful for the taxonomic value.
- The most suitable system for separating is EtAc : formic acid : acetic acid : water [125 : 11: 11 : 13.5].

Anti-oxidant activities

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH assay)
- Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP assay)
- Total phenolic contents (Folin-Ciocalteu assay)

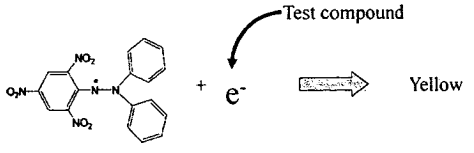
} SET

- Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS assay)

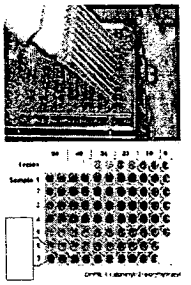
} HAT

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

Ohtake and Tagashira, 1998; Prior et al. (2005)



Violet
λ = 515 nm



Use Trolox for standard Anti-oxidant

Add 150 µl DPPH
(6 X 10^{-5} M) in 96-well plate

⇩

Add 50 µl sample
(Methanol, Aqueous extract)

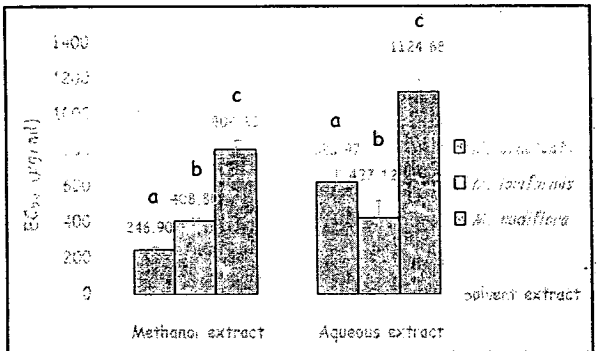
⇩

Incubated at room temperature for 20 min in darkness

⇩

The absorbance was measured at λ=490 nm using a microplate reader

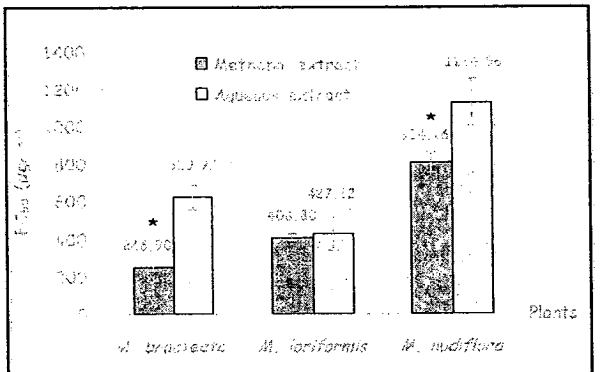
Modify from Li et al. (2005)



[a]*M. bracteata* difference from *M. loriformis* and *M. nudiflora* (p-value<0.05)

[b]*M. loriformis* difference from *M. bracteata* and *M. nudiflora* (p-value<0.05)

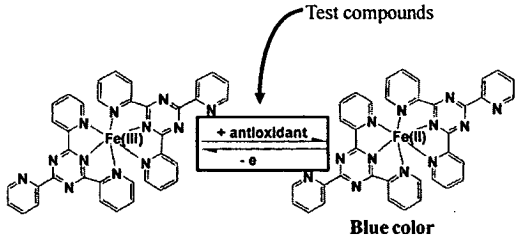
[c]*M. nudiflara* difference from *M. bracteata* and *M. loriformis* (p-value<0.05)



*** Significant at p-value < 0.05**

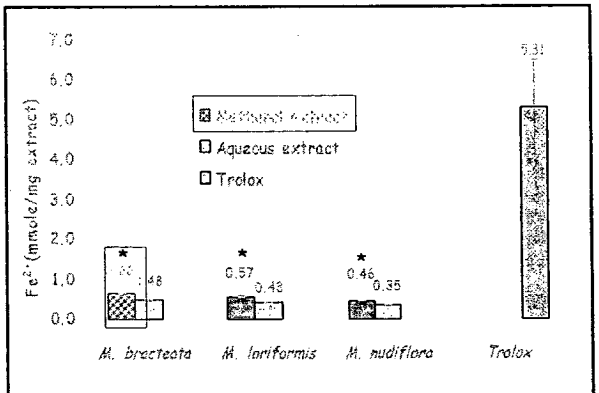
Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP assay)

Benzie and Strain (1996); Huang et al. (2005)

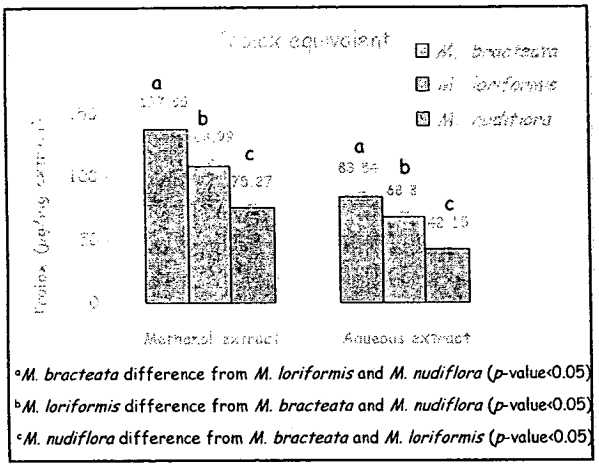


Blue color

$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$, λ_{max} = 593 nm



*** Significant at p-value < 0.05**



[a] *M. bracteata* difference from *M. loriformis* and *M. nudiflora* (p-value<0.05)
[b] *M. loriformis* difference from *M. bracteata* and *M. nudiflora* (p-value<0.05)
[c] *M. nudiflora* difference from *M. bracteata* and *M. loriformis* (p-value<0.05)

Total Phenolic Contents (Folin-Ciocalteu assay)

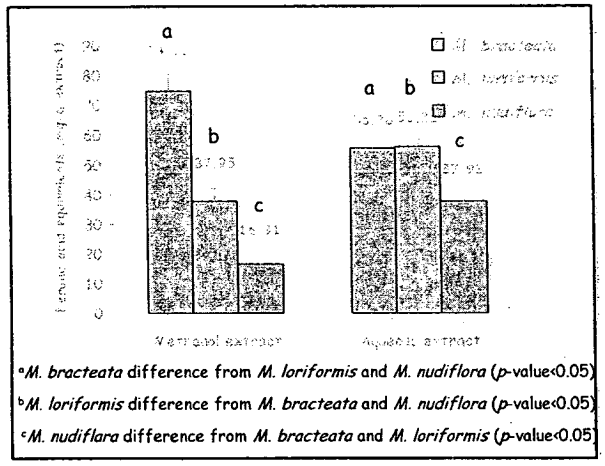
Folin, (1927); Singleton and Rossi, (1965)

$$Na_2WO_4/Na_2MoO_4 \Rightarrow (phenol\text{-}MoW_{11}O_4)^{-4}$$

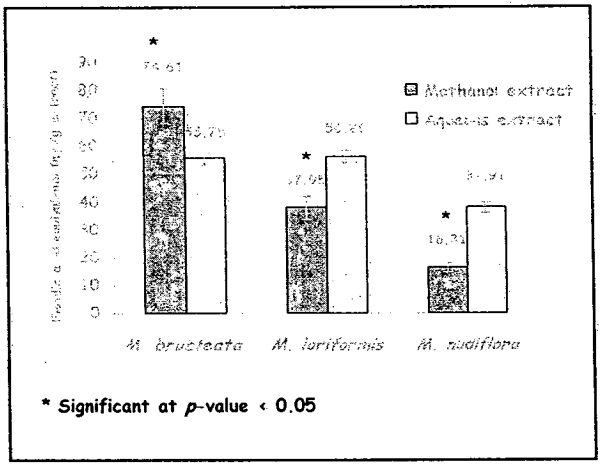
Mo (VI) [Yellow] + e^- ⇒ Mo (V) [Blue]

λ = 725 nm

Phenolic compound



[a] *M. bracteata* difference from *M. loriformis* and *M. nudiflora* (p-value<0.05)
[b] *M. loriformis* difference from *M. bracteata* and *M. nudiflora* (p-value<0.05)
[c] *M. nudiflara* difference from *M. bracteata* and *M. loriformis* (p-value<0.05)



*** Significant at p-value < 0.05**

Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS assay)

Mahakunakorn et al. (2004); Buege and Aust. (1978)

Inhibition of lipid peroxidation in rat brain homogenate

0.5 ml brain tissue homogenate
+ 0.9 ml phosphate buffer (50mM, pH 7.4)
+ 0.5 ml [0.01mM $FeSO_4$ + 0.1mM ascorbic acid]
+ 0.1 ml of vehicle or test compounds

⇩

Incubated of mixture at 37 °C for 30 min

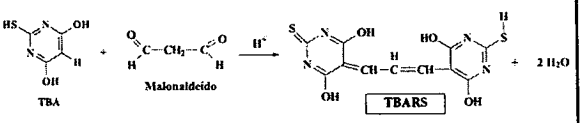
⇩

The reaction was terminated on ice by adding 0.5 ml of 35% (v/v) perchloric acid to the mixture ⇨

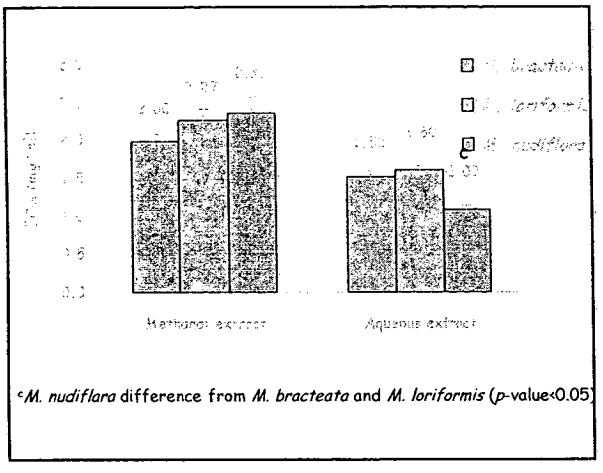
The mixture centrifugation at 3000g for 15 min ⇨ The supernatant was incubated with 0.5 ml of 0.6% thiobarbituric acid a 100 °C for 60 min

⇩

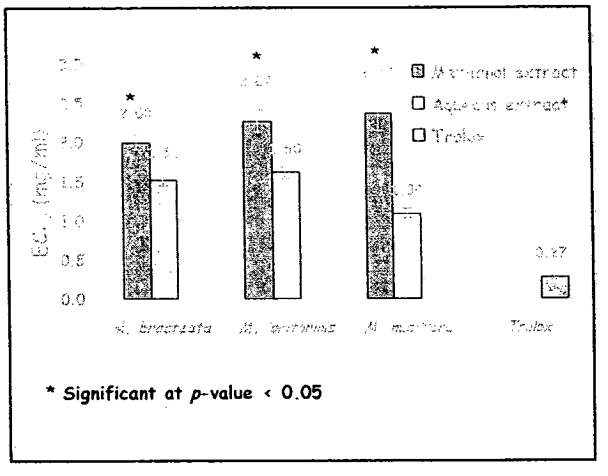
After a cooling period, The absorbance of TBARS was measured at λ=532 nm using a microplate reader ⇦ Using trolox for positive control Methanol and water for blank



% Inhibition = $[(OD_{Blank} - OD_{Test})/OD_{Blank}] * 100$



*M. nudiflara difference from *M. bracteata* and *M. loriformis* (p-value<0.05)



* Significant at p-value < 0.05

Discussion and conclusion

- The methanol extract of *M. bracteata* is shown the best of potential antioxidant activity in SET mechanism, whereas the aqueous extract of *M. nudiflora* is in HAT mechanism.
- The activities are varied in each species with the differences.

Acknowledgments

- Facilities: Center for Research and Development of Herbal Health Products (CRD-HHP), Fact. Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University
- Thai and other Herbaria (BK, BKF, CMU, KKU, K, US)
- Financial supports:
  KKU Graduate School: GS-KKU 49111118
  Thailand Research Fund (**TRF-MRG-5080006**)

The 3rd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Health Products

第三届中泰传统医药和天然药物研究国际学术研讨会

PROCEEDING

论文集

Hosted by

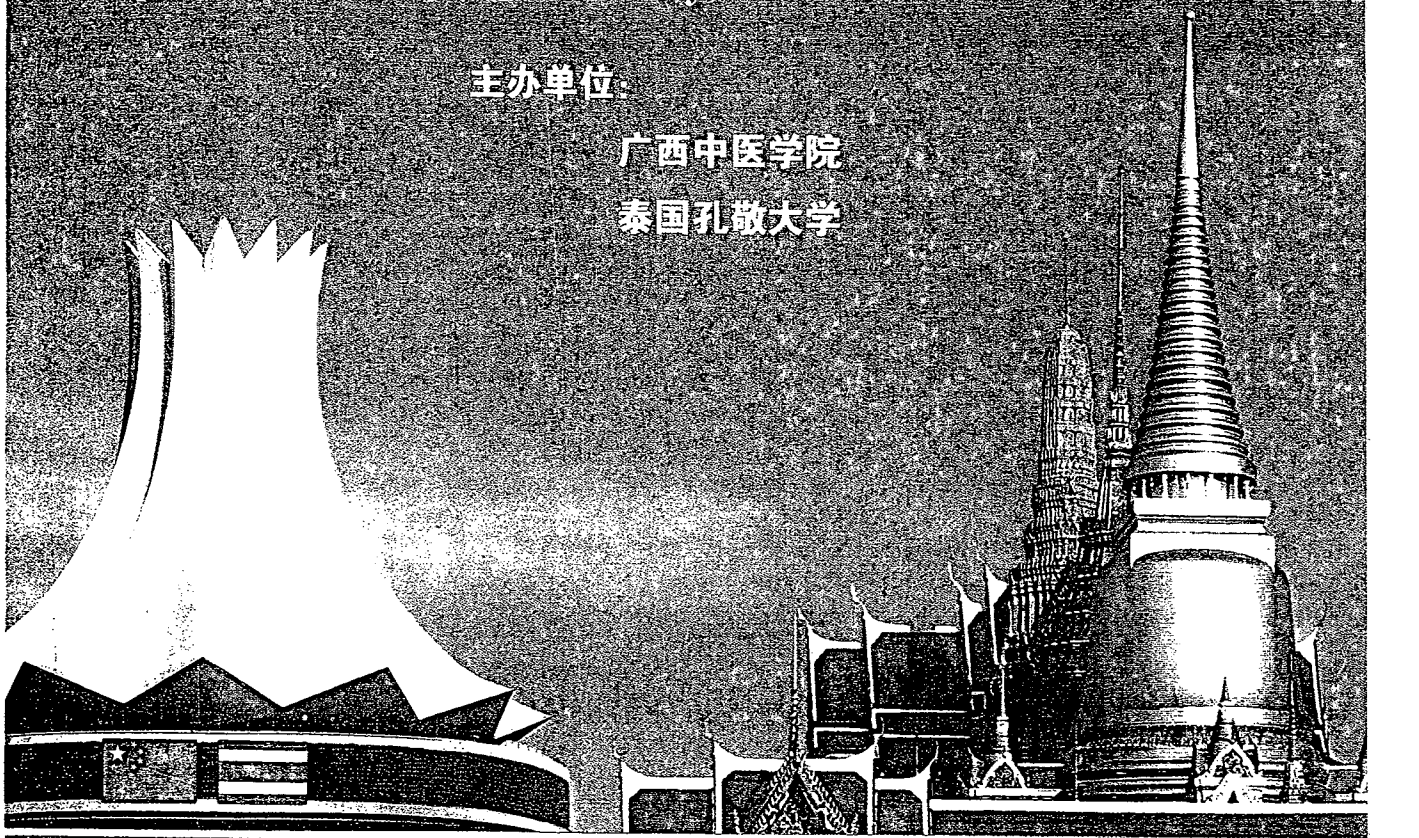
Guangxi Traditional Chinese Medical University

Khon Kaen University, Thailand

主办单位：

广西中医学院

泰国孔敬大学



OCTOBER 29~31, NANNING, GUANGXI, P.R. CHINA

中国·广西·南宁 2008年10月29~31日

Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae)

Orasa Chaichumporn[1], Srisomporn Preeprame[2], Thaweesak Thitimetharoch[3]

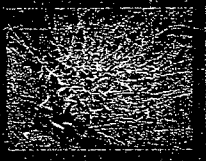
Abstract :

Thin layer chromatograms of *Murdannia japonica*, *M. spectabilis* and *M. vaginata* in each system are useful for identification. The patterns are represented high variation of chemical constituents. Diversity in terpenoids sugars, lipids and even by the colors.

Introduction

Materials and Methods

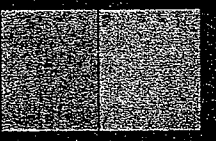
Murdannia japonica : M1



M. vaginata : M2

M. spectabilis :M3

Results



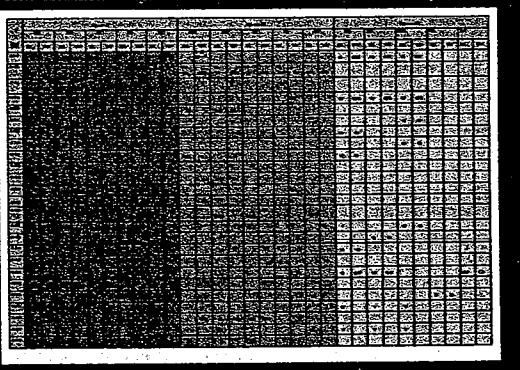
systems I

systems II

systems III

Discussion & Conclusion

References



Acknowledgements

Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae)

Orasa Chaichumporn[1], Srisomporn Preeprame[2], Thaweesak Thitimetharoch[2*]

[1]Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

[2]Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen, University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

* Corresponding author E-mail: thathi@kku.ac.th

Abstract: Thin layer chromatograms of *Murdannia japonica*, *M. spectabilis* and *M. vaginata* in each system are useful for identification. The patterns are represented high variation of chemical constituents: flavonoids, terpenoids, sugar, lipid and ester by the colors.

Key words: TLC, Identification, *Murdannia*, Commelinaceae

1. Introduction

Asian herbs from genus *Murdannia* (Family Commelinaceae) have been used as medicines such as *M. japonica* is used for oreilles enflees and healing burn skin (Laos)[3] and anti-cancer (Malaysia)[7]. Moreover *M. spectabilis* is treated for constipation in children, coughs, asthma, strangury, dysentery and maturative poultice (Laos)[3]. *M.* nudiflora is for the treatment of dysentery, antifebrile, reduce swelling (Taiwan), reduce fever, relief pain, stranqury (Indo-China) and healing minor wounds and infectious fungus spots (Philippines).[3] Fourteen species of *Murdannia* were enumerated for the Flora of Thailand. The general morphological features are similar and very difficult to identify, especially in sterile parts[8].

Flavonoids were the major compounds for Family Commelinaceae[2]. Thin layer chromatograms of three *Murdannia* species (Family Commelinaceae) were valuable for the diagnosis. Steroids, lactones, tannins, triterpenes and flavonoids were investigated[5,6].

The aim of this preliminary study is to apply TLC study for the identification.

2. Materials and Methods

The aerial parts of three *Murdannia* species: *Murdannia japonica* (Thumb.) Feden, *M. spectabilis* (Kurz) Faden and *M. vaginata* (L.) G.Bruckn., were collected for voucher specimens and experimental materials. The vouchers were deposited at Herbal Herbarium, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University and Forest Herbarium Bangkok (BKF), Thailand. Solvent systems [*systems I*: ethyl acetate - formic acid - acetic acid - water (40 : 3.4 : 3.4 : 4.2, *v/v*), *systems II* ethyl acetate - formic acid - water - methanol (30: 6 : 6: 3, *v/v*), *systems III* : hexane - ethyl acetate - methanol - acetic acid - water (35 : 15 : 2.5 : 0.25, *v/v*)] were modified for methanol extraction of the samples and standard markers (quercitin and ferulic acid) on silica gel 60 F254. The chromatograms were investigated by using 10% sulfuric acid in ethanol and ultraviolet light 254 nm and 366 nm[1,4].

3. Results

Chromatograms of three *Murdannia* species show different visible spots in colors and

R_f values among the systems (Fig 1, Fig 2, Fig 3 and Table 1).

4. Discussion & Conclusion

The chromatograms show the different of valuable R_f and colored spots such as yellow and orange, green grey, violet, (flavonoids and/or terpenoids), brown (sugar, lipid and/or ester). The samples are distinguished by the patterns for all solvent systems, but the system III displays higher separation. However, the suitable systems need to be performed for valuable identification and future researches.

5. Acknowledgements

We would like to thank Graduate School, Center for Research and Development of Herbal Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University and Thailand Research Fund (TRF-MRG-5080006) for their supports.

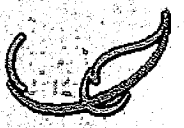
6. References

1. Macek K. Pharmacutical Application of Thin-Layer and Paper Chromatography. Elsevier Publishing Company, London, England. 1972; 569-582.
2. Martinez MAD-P, Swain T. Flavonoids and Chemotaxonomy of The Commelinaceae. Biochemical Systematics and Ecology. 1985; 13(4):391-402.
3. Perry LM, Metzger I. Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses. The MIT Press Cambridge, Massacahusetts, London, England. 1980; 81-82.
4. Rijke ED, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer G and Brinkman UATh. Analytical Separation and Detection Medthods for Flavonoids. Journal of Chromatography A. 2006; 1112:31-63.
5. Subphala T, Porasuphatana S, Preeprame S, Titimetharoch T. Coparative Pharmacognostic and Anti oxidant Activity Studies of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae). KKU Research Journal (Graduate studies). 2007; 7(2):98-110.
6. Subphala T, Porasuphatana S, Preeprame S, Titimetharoch T. Coparative Studies among *Murdannia bracteata*, *M. lorifomis* and *M. nudiflora* (commelinaceae) in Thailand. Master of Science Thesis in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Graduate School, Khon Kaen University. 2008; 114.
7. Tan ML, Tengku Muhammad TS, Samian MR, Najimudin N, Sulaiman SF. Effect of *Murdania*

   japonica plant extracts on growth rates of certain cancer cell lines. Journal of Tropical Medicinal Plants. 2003; 4(1): 57-62.
8. Thitimetharoch T, Chantaranothai P, Thammathaworn A, Faden RB. Taxonomic Studiesof the Family Commelinaceae in Thailand. Ph.D. Philosophy Thesis in Biology, Graduate School, Khon Kaen University. 2004; 213.

Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Four *Cyanotis* species (Family Commelinaceae)

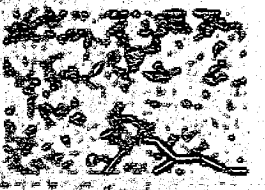
Supreeyar Kingsaard[1], Sutsomporn Preeprame[2], Thawesak Thitimetharoch[3]*



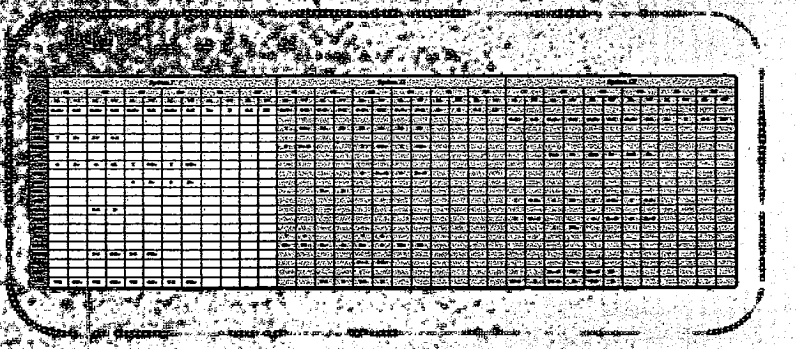
Abstract

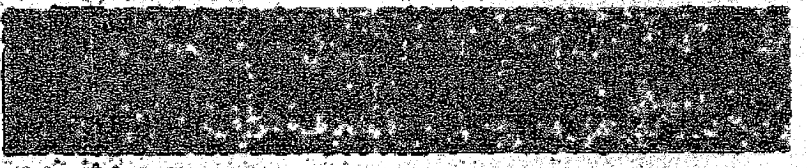
Introduction

Materials and Methods



Results





Acknowledgements

References

Preliminary Thin-Layer Chromatography (TLC) Identification of Four *Cyanotis* species (Family Commelinaceae)

Sureerut Kaewsaart[1], Srisomporn Preeprame[2], Thaweesak Thitimetharoch[2*]

1. Graduate School of Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

2. Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

* Corresponding author E-mail: thathi@kku.ac.th

Abstract: Thin layer chromatograms of *Cyanotis arachnoidea*, *C. axillaris*, *C. thwaitesii* and *C. vaga* are useful for identification. The patterns of *Cyanotis arachnoidea* generally similar to C. *thwaitesii* and *C. vaga*, whereas *C. axillaries* is different. The best chromatographic system is shown to be solvent system of ethyl acetate - formic acid - water (32.5 : 7.5 : 10, *v/v*).

Key words: TLC, Identification, *Cyanotis*, Commelinaceae

1. Introduction

Asian herbs from genus *Cyanotis* (Family Commelinaceae) have been used as medicines such as Indian *C. axillaris* is for tympanitis (Malabar Coast) and ascites (Behar)[1]. Moreover Philippine *C. vaga* is for breast cancer[2].

Eight taxa of the genus *Cyanotis* were enumerated for the Flora of Thailand[8]. The general occurrences of some species are similar. They are difficult for the distinguishing, especially from sterile parts.

Flavonoids were the major compounds for Family Commelinaceae[4]. Thin layer chromatograms of three *Murdannia* species (Family Commelinaceae) were valuable for the diagnosis[6,7].

The aim of this preliminary study is to apply TLC study for the identification.

2. Materials and Methods

The whole plants of four species in genus *Cyanois* (Family Commelinaceae): *C. arachnoidea* Wight, *C. axillaris* (L.) Sweet, *C. thwaitesii* Hassk. and *C. vaga* (Lour.) Schult. f., were collected for voucher specimens and experimental materials. The vouchers were deposited at Herbal Herbarium, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen and Forest Herbarium Bangkok (BKF), Bangkok, Thailand. Solvent systems [*systems I*: ethyl acetate - formic acid - water - methanol (30 : 6 : 6 : 3, *v/v*), *systems II* : ethyl acetate - formic acid - water (32.5 : 7.5 : 10, *v/v*), *systems III* : ethyl acetate - formic acid - acetic acid - water (40 : 3.4 : 3.4 : 4.2, *v/v*)] were modified for methanol extraction of the samples and standard markers (quercitin and ferulic acid) on silica gel 60 F254. The chromatograms were investigated by using 10% sulfuric acid in ethanol and ultraviolet light 254 nm and 366 nm[3,5].

3. Results

Chromatograms of four *Cyanotis* species show different visible spots in colors and R_f values among the systems (Fig 1, Fig 2, Fig 3 and Table 1).

4. Discussion & Conclusion

The solvent systems are preliminarily modified for the separation. Flavonoids are main chemical constituents. The chromatograms show the different occurrences among four *Cyanotis* species. In general, the contents in each sample display higher polarity than the markers, whereas the *Murdannia* species are lower polarity[6,7]. The samples are well separated in solvent *system II* [ethyl acetate - formic acid - water (32.5 : 7.5 : 10, *v/v*)]. However, the suitable systems need to be performed for valuable identification and future researches.

5. Acknowledgements

We would like to thank Graduate School, Center for Research and Development of Herbal Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University and Thailand Research Fund (TRF-MRG-5080006) for their supports.

6. References

1. Blatter E, Caius JF, Mhasker KS. Indian Medicinal Plants. 2nd ed. Lalit Mohan Basu 6, Allahabad, India. 1935; 2538-2541.
2. Graham JG, Quinn ML, Fabricant DS, Farnsworth NR. Review Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. Journal of Ethnopharmacology. 2000; 73, 347–377.
3. Macek, K. Pharmacutical Appl ication of Thin-Layer and Paper Chromatography. Elsevier Publishing Company, London, England. 1972; 569-582.
4. Martineza MADP, Swain T. Flavonoids and Chemotaxonomy of The Commelinaceae. Biochemical Systematics and Ecology. 1985; 13(4), 391-402.
5. Rijke ED, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer G and Brinkman UATh. Analytical Separation and Detection Medthods for Flavonoids. Journal of Chromatography A, 2006; 1112, 31-63.
6. Subphala T, Porasuphatana S, Preeprame S, Titimetharoch, T. Comarative Pharmacognostic and Anti-oxidant Activity Studies of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae). KKU Research Journal (Graduate studies). 2007; 7(2): 98-110.
7. Subphala T, Porasuphatana S, Preeprame S, Titimetharoch T. Comarative Studies among *Murdannia bracteata*, *M. lorifomis* and *M. nudiflora* (commelinaceae) in Thailand. Master of Science Thesis in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Graduate School, Khon Kaen University. 2008; 114.
8. Thitimetharoch T, Chantaranothai, P, Thammathaworn, A, Faden, RB. Taxonomic Studies of the Family Commelinaceae in Thailand. Ph.D. Philosophy Thesis in Biology, Graduate School, Khon Kaen University. 2004; 212.

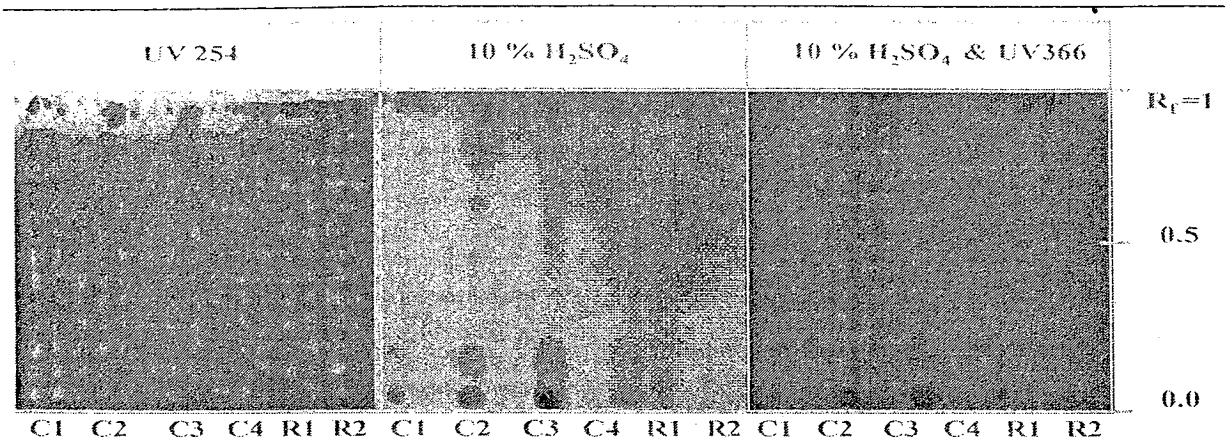


Fig 1 TLC chromatograms of four *Cyanotis* species in each solvent system: (C1: *C. vaga*, C2: *C. axillaris*, C3: *C. arachnoidea*, C4: *C. thwaitesii*, R1: Quercitin and R2: Ferulic acid) in *systems I.*

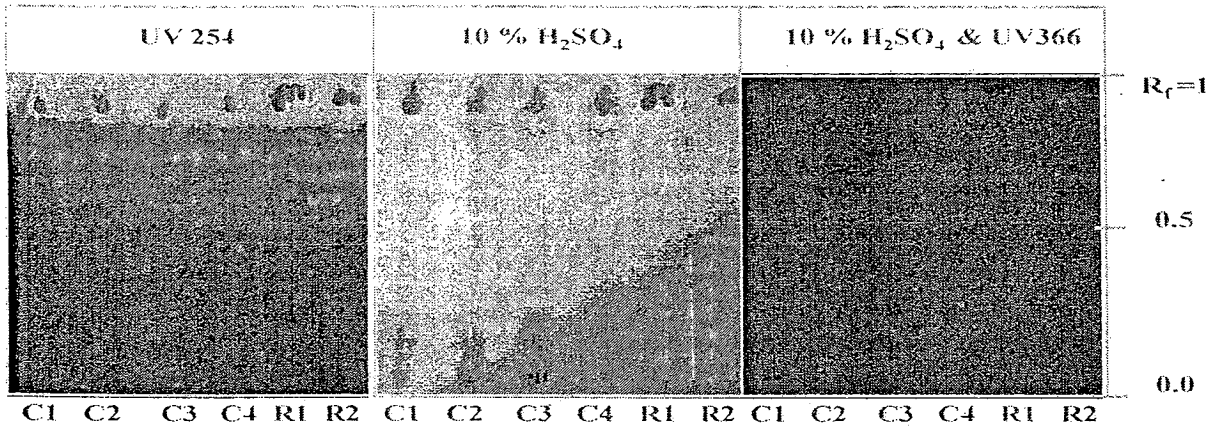


Fig 2 TLC chromatograms of four *Cyanotis* species in each solvent system: (C1: *C. vaga*, C2: *C. axillaris*, C3: *C. arachnoidea*, C4: *C. thwaitesii*, R1: Quercitin and R2: Ferulic acid) in *systems II.*

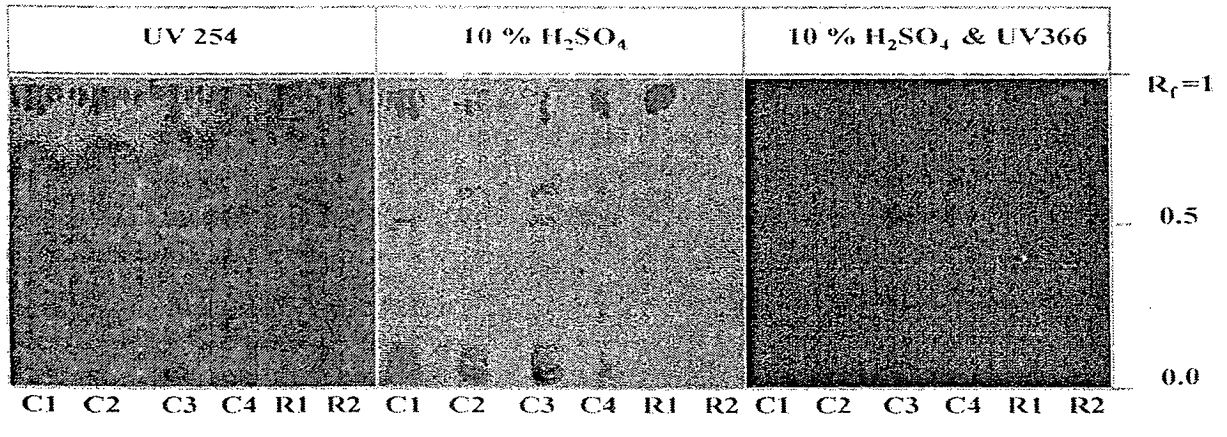


Fig 3 TLC chromatograms of four *Cyanotis* species in each solvent system: (C1: *C. vaga*, C2: *C. axillaris*, C3: *C. arachnoidea*, C4: *C. thwaitesii*, R1: Quercitin and R2: Ferulic acid) *systems III.*

Table 1 R_f-values and color reactions after sprayed with 10% sulfuric acid-ethanol solution and observation under UV light at 366 nm for four *Cyanotis* species in each system.

R_f	System I												System II												System III											
	C1		C2		C3		C4		R1		R2		C1		C2		C3		C4		R1		R2		C1		C2		C3		C4		R1		R2	
	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV	DL	UV
0.93	Gr-Br	O-R	Gr-Br	O-R	Gr-Br	O-R	Gr-Br	O-R	Br	D	G-P	LB	Gr-Br	O-R	Gr-Br	O-R	Gr-Br	O-R	Gr-Br	O-R	Br	D	G-P	LB												
0.92																									Gr-B	O-R	Gr-Br	O-R	Gr-Br	O-R	Gr-Br	O-R	Br	D	G-P	LB
0.86													Y	O-Br	FG	FO	FG	FO	FG	FO																
0.83	Y	Br	P-V	O-P																																
0.81													O	Br -D			Y	O-Br	Y	O-Br																
0.80																											FPG	FO	FPG	FO	FPG	FO				
0.78	O	Br	G	OL	Y	O-Br	Y	O-Br																												
0.75																	O	Br -D	O	Br -D																
0.71					O	Br	O	Br																												
0.67															Br	D																				
0.65																									Y	O -Br	G	FO	Y	O -Br	Y	O -Br				
0.62			P-G	D																																
0.55																									O	Br -D			O	Br -D	O	Br -D				
0.32																											P	FG								
0.19													V	G			V	G																		
0.14													FBr	FO	Br	O	Br	O	FBr	FO																
0.12			P-G	O-Br	P-G	O-Br																														
0.08																	Br -P	O-Br																		
0.07																											Br -G	FO	Br	FO						
0.00	V-R	O-Br	V-R	O-Br	V-R	O-Br	V-R	O-Br							V-G	D	V-G	D							FV-G	D	FV-G	D	V-D	D						

C1: *C. vaga*, C2: *C. axillaris*, C3: *C. arachnoidea*, C4: *C. thwaitesii*, R1: Quercitin, R2: Ferulic acid, DL: day light, UV: UV light at 366 nm,
B: blue, Br: brown, D: dark, F: faint, G: gray, Gr: green, L: ligh, O: orang, P: pink, R: red, V: violet, Y: yellow.

COMPARATIVE PHARMACOGNOSTIC STUDIES AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF Murdannia gigantea, M. macrocarpa AND M. simplex (FAMILY COMMELINACEAE)

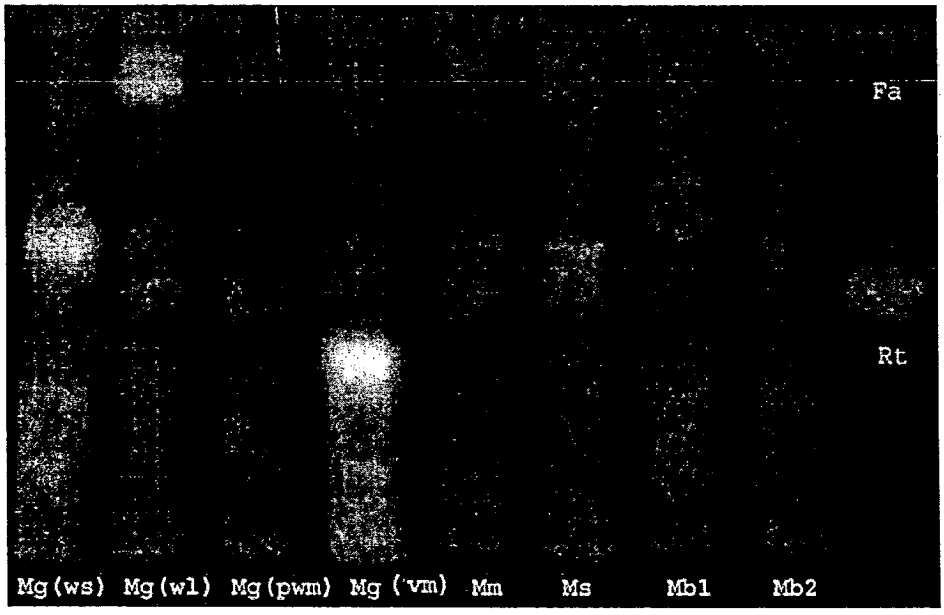
การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสมุนไพรน้ำค้างกลางเที่ยงหญ้าตั๊กแตนและว่านสะหรีกันไทร (วงศ์ผักปราบ)

สุรีรัตน์ เขียวสอาด[1], **ศรีสมพร ปรีเปรม**[1], **สุพัตรา ปรศุพัฒนา**[1], **ทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์**[1*]

[1] *คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002*

* *E-mail*: thathi@kku.ac.th

การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลทางเภสัชเวทของพืชน้ำค้างกลางเที่ยง (Murdannia gigantea) [มีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ กลุ่มดอกสีขาว ต้นขนาดเล็ก กลุ่มดอกสีขาวต้นขนาดใหญ่ กลุ่มดอกสีขาวโคนม่วงและกลุ่มดอกสีม่วง] หญ้าตั๊กแตน (M. macrocarpa) และว่านสะหรีกันไทร (M. simplex) (วงศ์ผักปราบ) ด้วยวิธีศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยแผ่นใบ (วิธีทำให้ใสและวิธีพาราฟิน) การศึกษาพฤกษเคมีเบื้องต้น (วิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง (วิธี Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP และ TBARS) พบว่า ทุกวิธีสามารถใช้ประกอบการวินิจฉัยเพื่อแสดงความแตกต่างของพืชทุกชนิดได้ดี รวมทั้งแสดงความแตกต่างในกลุ่มพืชที่มีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยาได้ [M. gigantea] และแสดงให้เห็นโอกาสในการจำแนกพืชกลุ่มนี้ในระดับสายพันธุ์ (variety)



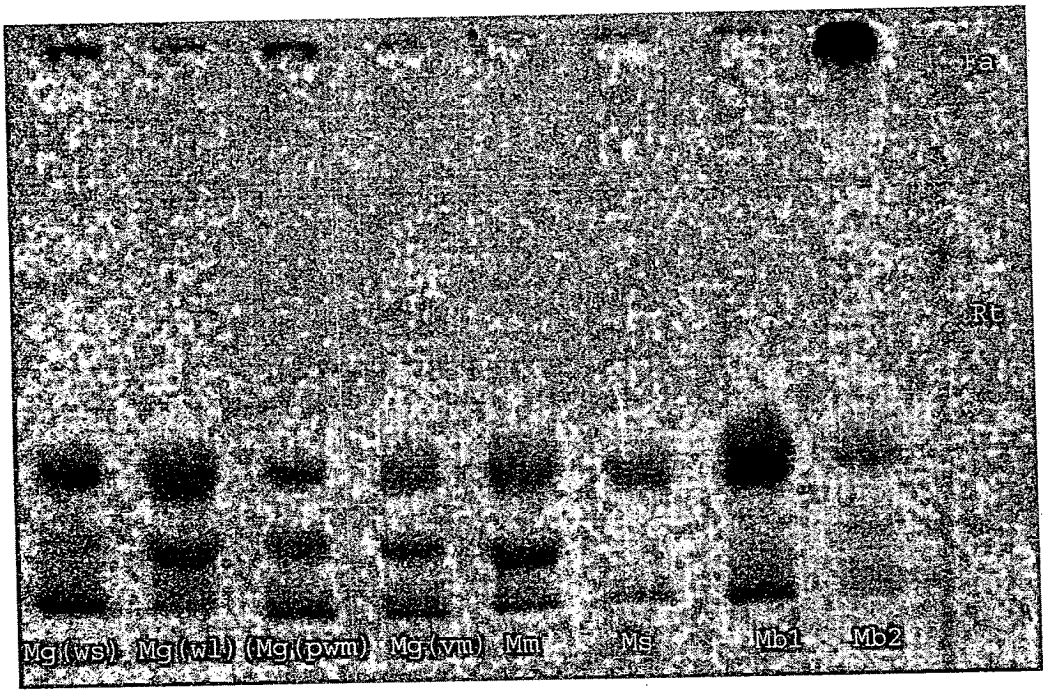
ชื่อไฟล์ภาพ : Effective Chromatogram (Vegetative part)

วันที่ถ่าย : 08-02-53

สถานที่ถ่าย : คณะเภสัชสาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ถ่ายภาพ : สุรีรัตน์ เขียวสอาด

รายละเอียด : ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ Murdannia gigantea [ดอกขาวต้นเล็ก Mg (ws), ดอกขาวต้นใหญ่ Mg (wl), ดอกขาวโคนม่วง Mg (pwm) และ ดอกม่วง Mg (vm)], M. macrocarpa (Mm), M. simplex (Ms) และ M. bracteata (Mb1 และ Mb2) ในระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย เอทิลแอซีเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซีติก : น้ำ (125: 11: 11: 13.5) โดยใช้กรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid, Fa) และ รูทิน (Rutin, Rt) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride) ในเอทานอลและสังเกตแถบสะท้อนแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร



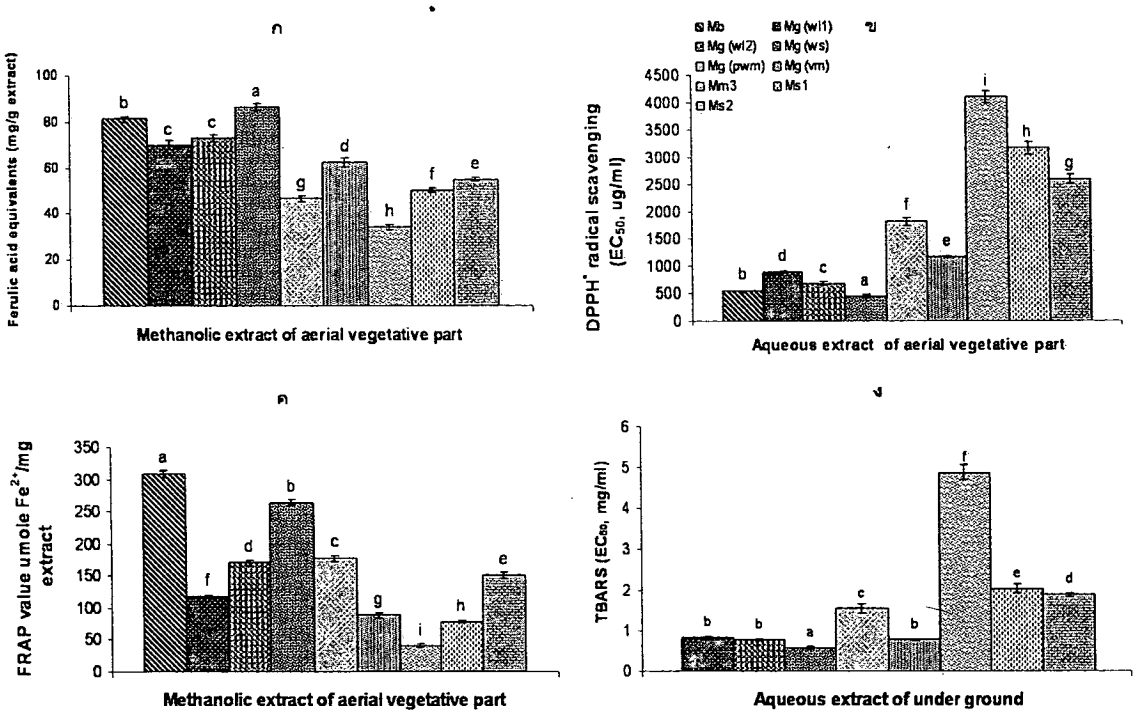
ชื่อไฟล์ภาพ : Effective Chromatogram (Underground part)

วันที่ถ่าย : 08-02-53

สถานที่ถ่าย : คณะเภสัชสาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ถ่ายภาพ : สุรีรัตน์ เขียวสอาด

รายละเอียด : ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ Murdannia gigantea [ดอกขาวต้นเล็ก Mg (ws), ดอกขาวต้นใหญ่ Mg (wl), ดอกขาวโคนม่วง Mg (pwm) และ ดอกม่วง Mg (vm)], M. macrocarpa (Mm), M. simplex (Ms) และ M. bracteata (Mb1 และ Mb2) ในระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย เอทิลแอซีเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซีติก : น้ำ (125: 11: 11: 13.5) โดยใช้กรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid, Fa) และ รูทิน (Rutin, Rt) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล และสังเกตแถบสี



ชื่อไฟล์ภาพ : Effective Anti-oxidant Methods

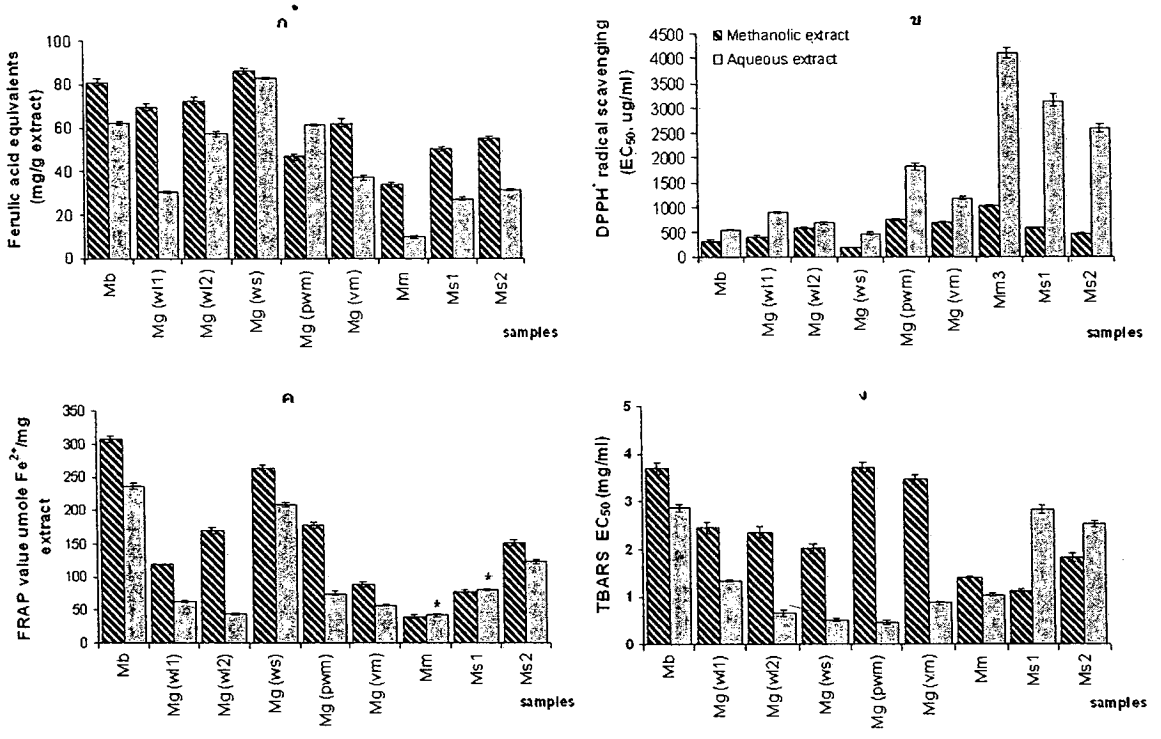
วันที่ถ่าย : 14-04-53

สถานที่ถ่าย : คณะเภสัชสาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ถ่ายภาพ : สุรีรัตน์ เขียวสอาด

รายละเอียด : แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในแต่ละวิธี (ก. Folin-Ciocalteu ข. DPPH ค. FRAP และ ง. TBARS) ที่สามารถแสดงความแตกต่างได้อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำทั้งจากส่วนเหนือดินและใต้ดินของ **Murdannia bracteata** (Mb), **M. gigantea** [ดอกขาวต้นเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวต้นใหญ่: Mg (wl), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], **M. macrocarpa** (Mm) และ **M. simplex** (Ms)

[โดยตัวอักษรบนภาพที่เหมือนกัน หมายความว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.05$)]



ชื่อไฟล์ภาพ : Different solvent

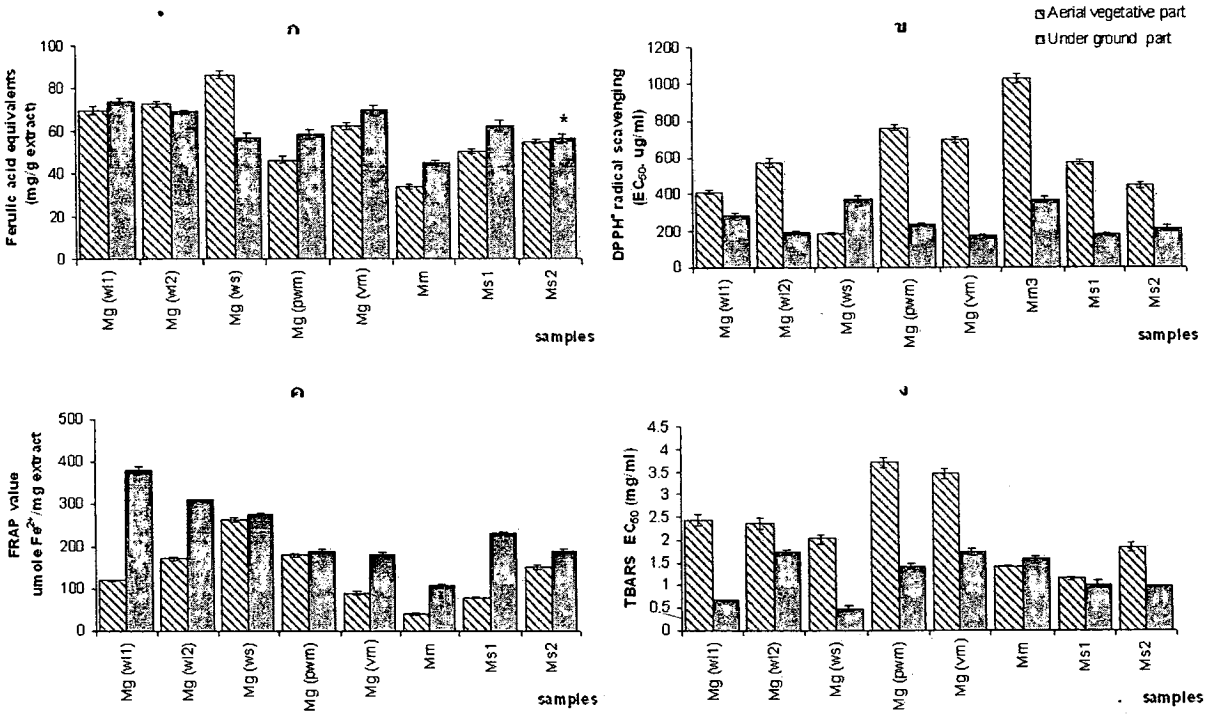
วันที่ถ่าย : 10-05-53

สถานที่ถ่าย : คณะเภสัชสาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ถ่ายภาพ : สุรีรัตน์ เขียวสอาด

รายละเอียด : เปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในแต่ละวิธี (ก. Folin-Ciocalteu ข. DPPH ค. FRAP และ ง. TBARS) ระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำจากส่วนเหนือดินของ **Murdannia bracteata** (Mb), **M. gigantea** [ดอกขาวต้นเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวต้นใหญ่: Mg (wl), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], **M. macrocarpa** (Mm) และ **M. simplex** (Ms)

[โดยเครื่องหมาย * บนภาพ หมายความว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.05$)]



ชื่อไฟล์ภาพ : Different material part

วันที่ถ่าย : 07-06-53

สถานที่ถ่าย : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ถ่ายภาพ : สุรีรัตน์ เขียวสอาด

รายละเอียด : เปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในแต่ละวิธี (ก. Folin-Ciocalteu ข. DPPH ค. FRAP และ ง. TBARS) ระหว่างสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินและส่วนใต้ดินของ Murdannia gigantea [ดอกขาวต้นเล็ก: Mg (ws), ดอกขาวต้นใหญ่: Mg (wl), ดอกขาวโคนม่วง: Mg (pwm) และ ดอกม่วง: Mg (vm)], M. macrocarpa (Mm) และ M. simplex (Ms)

[โดยเครื่องหมาย * บนภาพ หมายความว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.05$)]

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

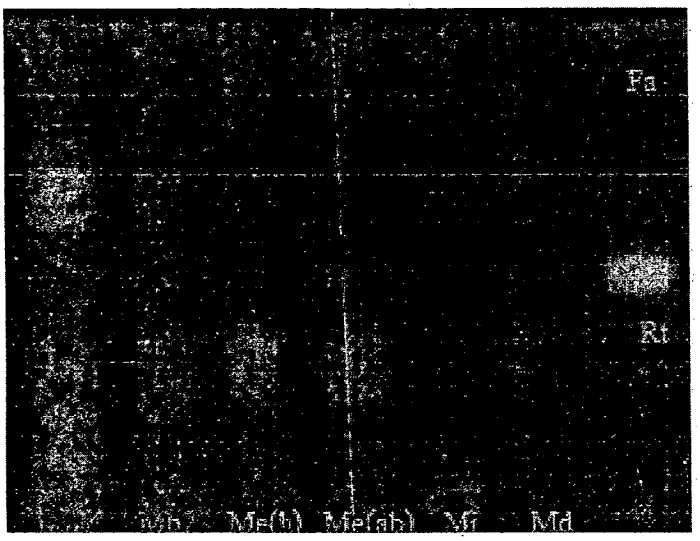
การศึกษาเปรียบเทียบทางเภสัชเวทและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสมุนไพรไก่เถื่อนป่า ว่านข้าวเหนียวและโกฐทุ่งนา (วงศ์ผักปราบ)

อรษา ชัยชุมพร[1], สุพัตรา ปรศุพัฒนา[1], ศรีสมพร ปรีเปรม[1] และทวีศักดิ์ ธิติเมธาโรจน์[1]*

[1] *คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002*

* *E-mail: thathi@kku.ac.th*

การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลทางเภสัชเวทของพืชสมุนไพรไก่เถื่อนป่า (Murdannia discreta) ว่านข้าวเหนียว (M. edulis) [มีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะขนปกคลุมส่วนต่างๆ ขนาดและความหนาของช่อดอก] และโกฐทุ่งนา (M. japonica) (วงศ์ผักปราบ) ด้วยวิธีศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยแผ่นใบประดับช่อดอก (วิธีทำตัวอย่างให้ใสและวิธีพาราฟิน) การศึกษาทางพฤกษเคมีเบื้องต้น (วิธีหาปริมาณรวมของสารสกัดและทินเลเยอร์โครมาโทกราฟฟี) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหลอดทดลอง (วิธี Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP และ TBARS) พบว่า ทุกวิธีสามารถใช้ประกอบการวินิจฉัยเบื้องต้นเพื่อแสดงความแตกต่างของพืชทุกชนิดได้ดี และสามารถแสดงความแตกต่างในกลุ่มพืชที่มีลักษณะผันแปรทางสัณฐานวิทยาได้



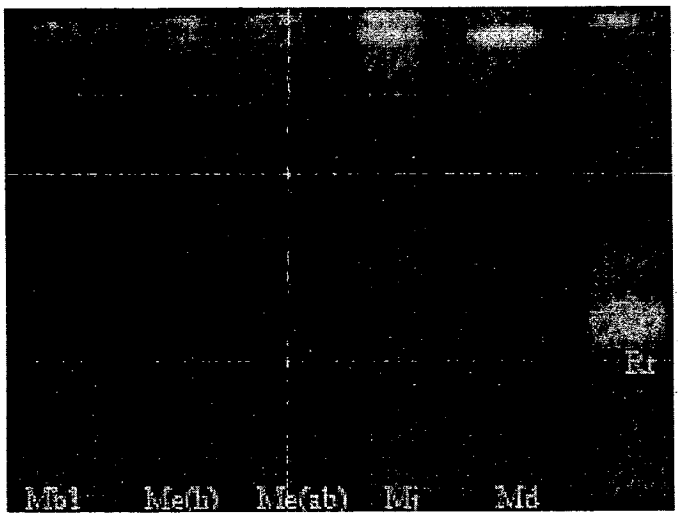
ชื่อไฟล์ภาพ : Chromatogram (Vegetative part)

วันที่ถ่าย : 10-02-53

สถานที่ถ่าย : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ถ่ายภาพ : นางสาวอรษา ชัยชุมพร

รายละเอียด : ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนเหนือดินของ Murdannia edulis [มีขนมากหลังแผ่นใบ (hairy blade); Me(h) และมีขนน้อยหลังแผ่นใบ (glabrate blade); Me(ab)], M. japonica (Mj) และ M. discreta (Md) และ M. bracteata (Mb1, Mb2) ในระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย เอทิลแอซีเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซีติก : น้ำ (125 : 11 : 11 : 13.5) โดยใช้กรดเฟอร์รูลิก (Ferulic acid, Fa) และรูทิน (Rutin, Rt) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride) ในเอทานอล และสังเกตแถบสะท้อนแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร



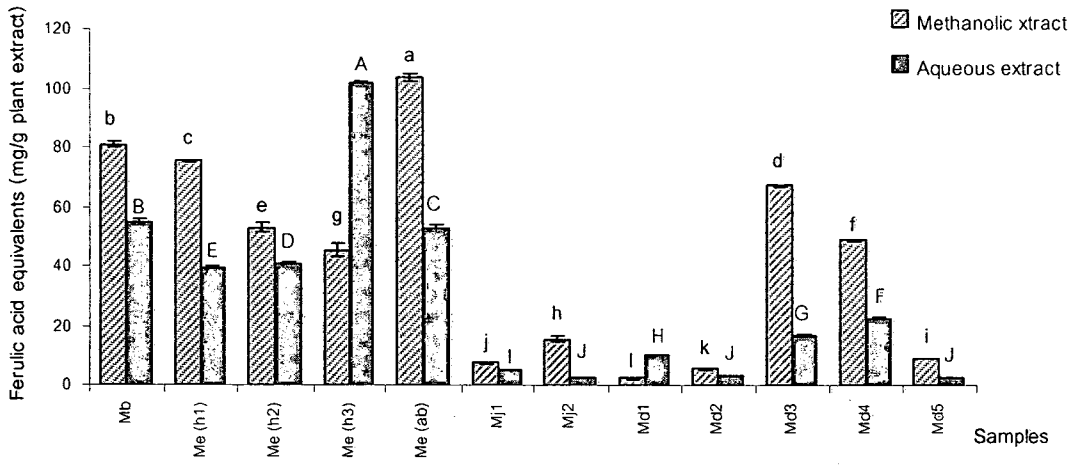
ชื่อไฟล์ภาพ : Chromatogram (Underground part)

วันที่ถ่าย : 15-02-53

สถานที่ถ่าย : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ถ่ายภาพ : นางสาวอรษา ชัยชุมพร

รายละเอียด : ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลจากส่วนใต้ดินของ Murdannia edulis [มีขนมากหลังแผ่นใบ (hairy blade); Me(h) และมีขนน้อยหลังแผ่นใบ (glabrate blade); Me(ab)], M. japonica (Mj) และ M. discreta (Md) และ M. bracteata (Mb1)) ในระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย เอทิลแอซีเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซีติก : น้ำ (125 : 11 : 11 : 13.5) โดยใช้รูทิน (Rutin, Rt) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride) ในเอทานอล และสังเกตแถบสะท้อนแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร



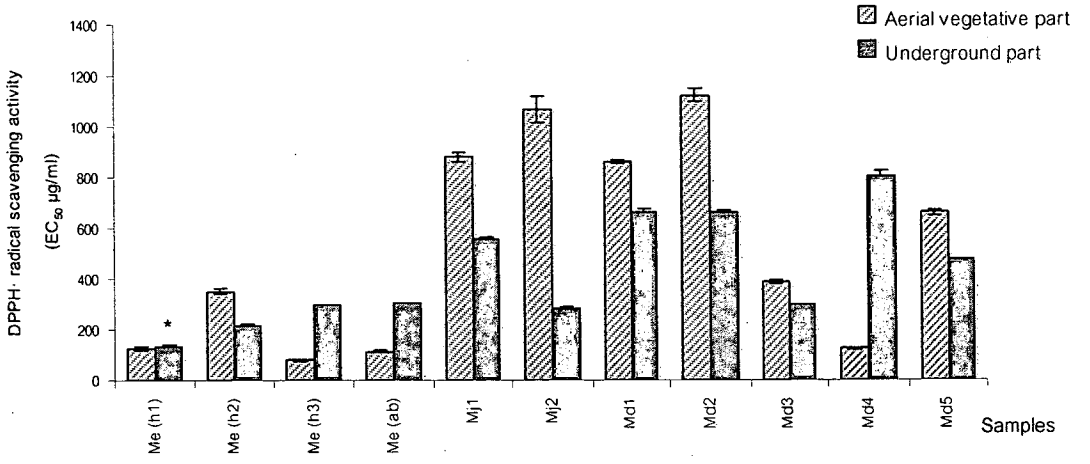
ชื่อไฟล์ภาพ : Effective Folin-Ciocalteu Method

วันที่ถ่าย : 24-05-53

สถานที่ถ่าย : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ถ่ายภาพ : นางสาวอรษา ชัยชุมพร

รายละเอียด : แสดงค่า เปรียบเทียบปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกจากส่วนเหนือดินของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ ของ **Murdannia edulis** [มีขนมากหลังแผ่นใบ (hairy blade) (Me (h1), Me (h2) และ Me (h3) และมีขนน้อยหลังแผ่นใบ (glabrate blade); Me(ab)], **M. japonica** (Mj1 และ Mj2), **M. discreta** (Md1-5) และ **M. bracteata** (Mb) [โดยอักษรบนภาพที่เหมือนกันหมายความว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.05$)]



ชื่อไฟล์ภาพ : Different material part

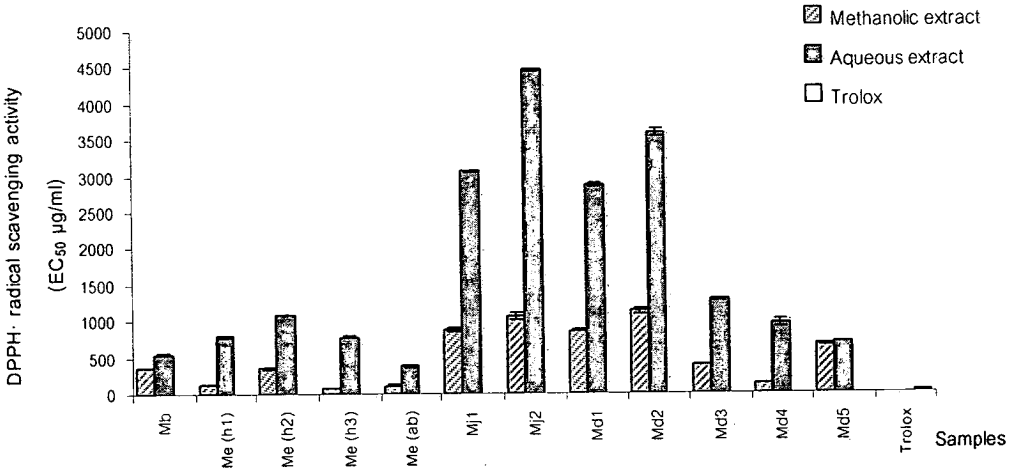
วันที่ถ่าย : 16-06-53

สถานที่ถ่าย : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ถ่ายภาพ : นางสาวอรษา ชัยชุมพร

รายละเอียด : แสดงค่า EC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ จากส่วนเหนือดินและใต้ดินของสารสกัดด้วยเมทานอลของ **Murdannia edulis** [มีขนมากหลังแผ่นใบ (hairy blade) (Me (h1), Me (h2) และ Me (h3) และมีขนน้อยหลังแผ่นใบ (glabrate blade); Me(ab)], **M. japonica** (Mj1 และ Mj2), **M. discreta** (Md1-5) และ **M. bracteata** (Mb)

[โดยเครื่องหมาย* บนภาพหมายความว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.05$)]



ชื่อไฟล์ภาพ : Different solvent

วันที่ถ่าย : 22-04-53

สถานที่ถ่าย : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผู้ถ่ายภาพ : นางสาวอรษา ชัยชุมพร

รายละเอียด : แสดงค่า EC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\cdot}$ จากส่วนเหนือดินของสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำของ Murdannia edulis [มีขนมากหลังแผ่นใบ (hairy blade) (Me (h1), Me (h2) และ Me (h3) และมีขนน้อยหลังแผ่นใบ (glabrate blade); Me(ab)], M. japonica (Mj1 และ Mj2), M. discreta (Md1-5) และ M. bracteata (Mb)

[โดยเครื่องหมาย* บนภาพหมายความว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.05$)]

Institute of Ecology and Biological Resources

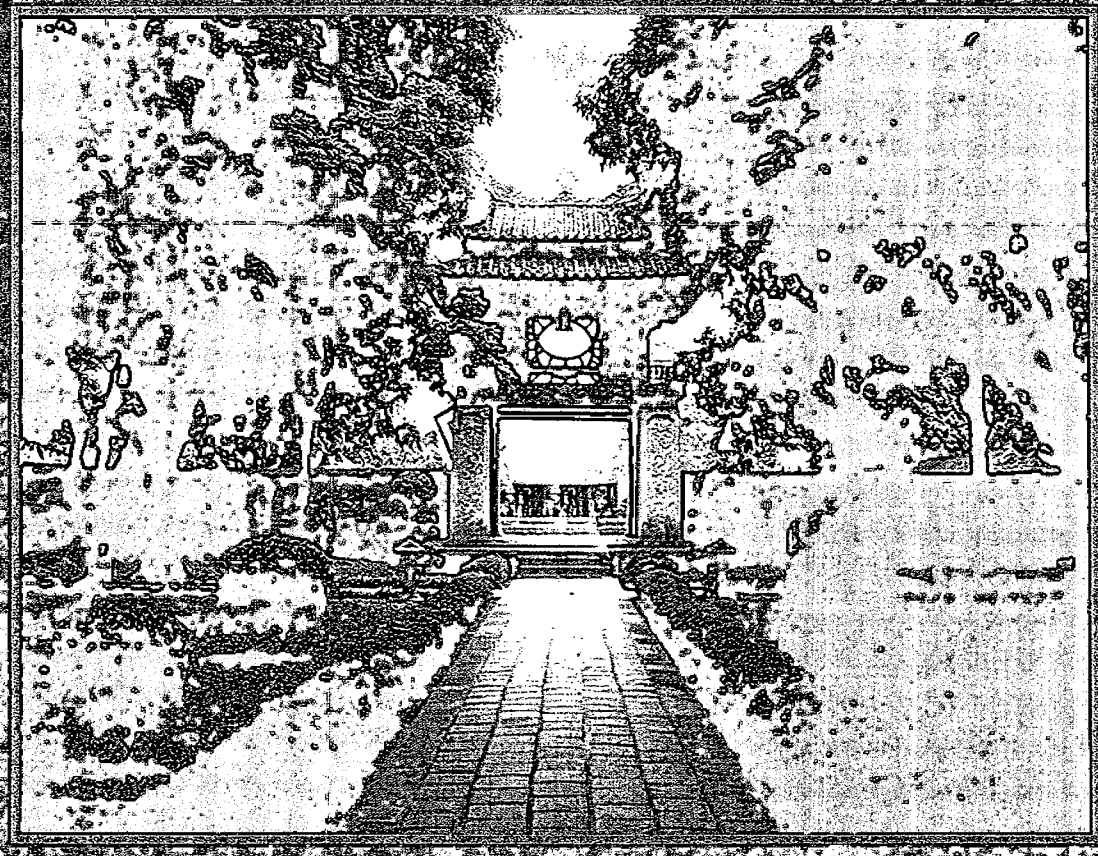
Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Ministère des Affaires Etrangères et Européennes

Sud Expert Plantes

Muséum national d'histoire naturelle

PROGRAMME

2e Symposium de la
« Flore du Cambodge, du Laos et du Vietnam »
2nd Symposium of the
« Flore du Cambodge, du Laos et du Vietnam »



VAST

CRITICAL ECOSYSTEM PARTNERSHIP FUND

2010 Année Internationale de la Diversité Biologique

IRD
Institut de recherche pour le développement

Étudiées autrefois pour la Flore Générale d'Indochine au Muséum national d'histoire naturelle par Gagnepain et Guillaumin (1933), les Orchidées du Cambodge sont récoltées depuis 2003 dans le cadre des missions scientifiques des botanistes de Paris, Phnom Penh, Montpellier et Edimbourg.

Les nouvelles prospections, dans les provinces de Kompong Speu, Koh Kong, Pursat, Siem Reap, Preah Vihear et la Municipalité de Sihanouk-Ville, ont fourni de nouvelles espèces, non encore répertoriées sur ce territoire. 500 taxons figurent actuellement sur la Check-list des Orchidées, dont une centaine est documentée et mise en ligne sur Internet (*).

La famille des *Orchidées* Juss. est d'une exceptionnelle diversité morphologique (feuilles, inflorescences, racines), de types de croissance et de phyllotaxie. Une Clé multiple (*) qui utilise les fiches de synthèse sur les taxons, pourra être facilement complétée par la récolte d'autres taxons. Ce projet conduit par V. Nazarov et M. Telepova utilise l'informatique pour structurer et analyser les descriptions morphologiques des taxons, les caractères de la microstructure florale (MEB), les données écologiques, géographiques, etc.

L'expertise et la valorisation de l'ensemble de la Flore (où les Orchidées représentent plus de 30% des espèces) ne sont pas encore terminées, ni encore disponibles sous forme électronique. Cette lacune est préjudiciable à la bonne connaissance scientifique et vernaculaire, et donc à l'élaboration de mesures de gestion durable des forêts et de protection des orchidées.

Source: http://www.r-b-o.eu/cgi-bin/RBO/checklist/displaychecklist.pl?db=Cambodia (*).

H49

Total phenolic content and DPPH$^{\bullet}$ radical scavenging activity from aerial vegetative parts of *Murdannia bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* (Commelinaceae)

Sureerut KHAEWSAART [1], Supatra PORASUPHATANA [2], Robert B. FADEN [3] & **Thaweesak THITIMETHAROCH** [2]

[1] Graduate School Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand
[2] Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand
[3] Department of Botany, Smithsonian Institution, Washington DC, 20013-7012, USA.

Total phenolic content (TPC) and DPPH$^{\bullet}$ radical scavenging activities (DPPH$^{\bullet}$ RSA) between methanolic and aqueous extracts from aerial vegetative parts of *Murdannia bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* (Commelinaceae) are evaluated by Folin-Ciocalteu assay and DPPH$^{\bullet}$ assay. TPC of all species is established to correspond to DPPH$^{\bullet}$ radical scavenging capacity. *Murdannia gigantea* generally exhibits the highest TPC and the strongest DPPH$^{\bullet}$ scavenging capacity, followed by *M. macrocarpa* and *M. simplex*, respectively. Extraction solvents, variation among species and environmental factors may have an influence on the differences.

Total Phenolic Content and DPPH· Radical Scavenging Activity from Aerial Vegetative Part of *Murdannia bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* (Family Commelinaceae)

Sureerut Khaewsaart[1], Supatra Porasuphatana[2], Faden B. Robert3, Thaweesak Thirimetharoch[2,*]

[1] Graduate School Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand
[2] Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand
[3] Department of Botany, Smithsonian Institution, Washington DC, 20013-7012, USA
* Correspondence author: E-mail: thathi@kku.ac.th

Introduction

A previous study had reported that antioxidant activity and yield of phenolic content were influenced by different extracting solvents (Othman *et al.* 2007; Subphala *et al.* 2008). In genus **Murdannia**, methanolic part shows stronger potential antioxidant activity and higher TPC than aqueous part (Subphala *et al.* 2007, 2008).

Methanolic and aqueous extract of aerial vegetative part of four **Murdannia** species will be made comparative study on TPC and DPPH· radical scavenging capacity

Materials and methods

Mature aerial vegetative part of **Murdannia bracteata**, **M. gigantea**, **M. macrocarpa** and **M. simplex** were collected as samples for the experiments (Table 1 and Figure 1). Vouchers were mede and deposited. Each sample was grounded and extracted by using methanol and distilled water (sample : solvent = 1:20, w/v), shook at room temperature for 2 hrs. Methanolic extract was evaporated to dryness in a rotary evaporator at 45 °C, whereas aqueous extract was freeze-dried at -50 °C. Crude extract was stored in a desiccator at room temperature for future use.

Folin-Ciocalteu assay (modified from Singleton and Rossi, 1965): Ferulic acid (FA) was used as a standard for the calibration.

DPPH· radical-scavenging activity: (modified from Saänchez-Moreno *et al.*, 1999 and Li *et al.*, 2005)

Statistical analysis: Data was determined using SPSS 10.1 (one-way ANOVA). Duncan's significant difference procedure was used for separation of means at the $p = 0.05$. Linear regression to correlate between TPC and DPPH· RSA was carried out using Excel 2003.

Acknowledgements

This work was financially supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training grant (BRT-T652058). We would like to thank to Center for Research and Development of Herbal Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, and Thailand Research Fund (TRF-MRG-5080006) for their facilities.

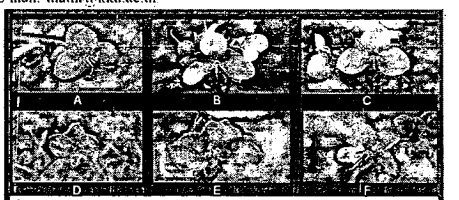


Figure 1 **Murdannia bracteata (A), M. gigantea [B – D : B. white flowers; Mg (wl4). C. purplish white flowers; Mg (pwm). D. violet flowers; Mg (vm)], M. macrocarpa (E) and M. simplex (F)**

Abstract

Total phenolic content (TPC) and DPPH· radical scavenging activities (DPPH· RSA) between methanolic and aqueous extract from aerial vegetative part of *Murdannia bracteata*, *M. gigantea*, *M. macrocarpa* and *M. simplex* are evaluated by Folin-Ciocalteu assay and DPPH· assay. TPC of all species is established to correspond to DPPH· radical scavenging capacity. *Murdannia gigantea* generally exhibits the highest TPC and the strongest DPPH· scavenging capacity, followed by *M. macrocarpa* and *M. simplex*, respectively. Extracting solvents, variation of the species and environmental factors may be influenced on the difference.

M. bracteata	Mb	violet	Phu Phan forest, Sakon Nakhon Province	20/08/2008	SK, OC & TT 68
M. gigantea	Mg (wl1)	white : large plant	Phu Manorom temple, Mukdahan Province	08/10/2008	SK, OC & TT 15
M. gigantea	Mg (wl2)	white : large plant	Soi Sawan waterfall, Ubon ratchathani Province	10/10/2008	SK, OC & TT 18
M. gigantea	Mg (wl3)	white : large plant	Pha Taem forest, Ubon ratchathani Province	22/08/2008	SK, OC & TT 36
M. gigantea	Mg (wl4)	white : large plant	Tup Phaya Sao waterfall, Khon Kaen Province	27/08/2008	SK, OC & TT 41
M. gigantea	Mg (wl)	white : smaller plant	Ban Chom Manee, Nakhon Phanom Province	09/08/2008	SK, OC & TT 58
M. gigantea	Mg (pwm)	purplish white : moderate	Phu Pha forest, Loei Province	27/07/2008	SK, OC & TT 54
M. gigantea	Mg (vm)	violet : moderate	Phu Phan forest, Sakon Nakhon Province.	20/08/2008	SK, OC & TT 66
M. macrocarpa	Mm1	violet	Soi Sawan waterfall, Ubon ratchathani Province	10/10/2008	SK, OC & TT 19
M. macrocarpa	Mm2	violet	Phu Kradueng forest, Loei Province	07/12/2008	SK, OC & TT 27
M. macrocarpa	Mm3	violet	Phu Kradueng forest, Loei Province	29/10/2008	TT, OC & SK 1205
M. simplex	Ms1	violet	Doi Suthep-Pui forest, Chiang Mai Province	15/08/2008	SK, OC & TT 35
M. simplex	Ms2	violet	Doi Inthanon forest, Chiang Mai Province	15/10/2008	TT, OC & SK 1134

Result

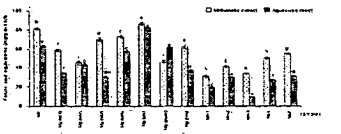


Figure 2 Comparative TPC of the samples in different extracting solvents are measured by means ± SD (n = 4). The vertical bars represent standard error of the mean. Means marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

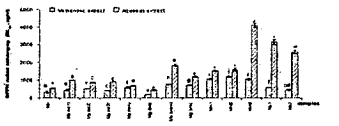


Figure 3 Comparative DPPH· RSA of the samples in different extracting solvents are measured by means ± SD (n = 4). The vertical bars represent standard error of the mean. Means marked with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

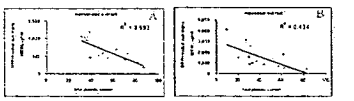


Figure 4 Correlation between TPC and DPPH· RSA of the plants in methanolic extract (A) and aqueous extract (B) of the plants

Discussion & Conclusion

Amount of TPC is established to correspond to DPPH· radical scavenging capacity for all species in both methanolic and aqueous extract. Different amount of phenolic compounds in the plants could possess different antioxidant capability.

The results suggest that methanolic extract possesses higher TPC and stronger scavenging activity than the aqueous extract.

Murdannia gigantea shows the highest TPC and the strongest DPPH· RSA.

Samples from different locations are significantly different in each species as well as morphological variation of the species (color of flowers, plant size among population) could influence the value of TPC and scavenging activity. (Table 1 and Figure 2, 3 and 4).

References

1. Li, G., Min, B.S., Zheng, C., Lee, J., Oh, S.R., Ahn, K.S. and Lee, H.K. 2005. Neuroprotective and Free Radical Scavenging Activities of Phenolic Compounds from *Hovenia dulcis*. Archives of Pharmacal Research 5(7): 804-809
2. Othman, a., Ismail, A., Ghani, N.A. and Adenan, I. 2007. Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Cocoa Beans. Food Chemistry 100:1523–1530.
3. Saänchez-Moreno, C., Larrauri, J.A. and Saura-Calixto, F.1999. Free Radical Scavenging Capacity and Inhibition of Lipid Oxidation of Wines, Grape Juices and Related Polyphenolic Constituents. Food Research International 32: 407–412
4. Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of Total Phenolic with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144–158
5. Subphala, T., Porasuphatana, S., Prequame, S. and Thitimetharoch, T. 2007. Comparative Pharmacognostic and Anti-oxidant Activity Studies of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae). KKU Research Journal (Graduate studies) 7(2): 98-110
6. Subphala, T., Porasuphatana, S., Prequame, S. and Thitimetharoch T. 2008. Comparative Studies among *Murdannia bracteata*, *M. loriformis* and *M. multiflora* (commelinaceae) in Thailand. Master of Science Thesis in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Graduate School, Khon Kaen University

H50 DPPH$^{\cdot}$ radical scavenging activity and total phenolic content from aerial vegetative parts of *Murdannia bracteata*, *M. discreta*, *M. edulis* and *M. japonica* (Commelinaceae)

Orasa CHAICHUMPORN [1], Supratra PORASUPHATANA [2], Robert B. FADEN [3] & **Thaweesak THITIMETHAROCH** [2]

[1] Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.
[2] Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen, University, Khon Kaen, 40002, Thailand.
[3] Department of Botany, Smithsonian Institution, Washington DC, 20013-7012, USA.

DPPH$^{\cdot}$ radical scavenging activity (DPPH$^{\cdot}$ RSA) and total phenolic content (TPC) of methanolic and aqueous extracts from aerial vegetative part of four *Murdannia* species (Commelinaceae): *Murdannia bracteata*, *M. discreta*, *M. edulis* and *M. japonica* have been conducted by using 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH) and Folin-Ciocalteu assay. All species show amounts of TPC established to correspond to DPPH$^{\cdot}$ RSA. In general, *M. edulis* shows a higher value of TPC and DPPH$^{\cdot}$ RSA, especially in methanolic part. Therefore, a population of *Murdannia discreta* exhibits the highest of TPC. Samples from different locations display significantly different results as well as morphological differences in *M. edulis*: hairy on lower surface of leaves. These factors could influence TPC and scavenging activity value.

H51 Grain diversity of lowland black rice in the North and Northeast of Thailand

Theera THUMMAVONGSA & Piyarat ITHARAT

Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

In order to assess the diversity of lowland black rice grain for possible utilization and quality improvement in Thailand, 34 local rice genetic resources (34 accessions), collected from the Northern and Northeastern cultivation zones in Thailand, were investigated for grain characters. The distribution patterns of some characters were observed. Variation in the shape and hull colour of the grain was very high. Lowland black rice has high phenotypic variation in the grain, especially in pericarp colour, presentation and zonation of hair on hull.

DPPH• Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content from Aerial Vegetative Part of *Murdannia bracteata*, *M. discreta*, *M. edulis* and *M. japonica* (Family Commelinaceae)

Orasa Chaichumporn[1], Supratra Porasuphatana[2], Faden B. Robert[3], Thaweesak Thitimetharoch[2]*

[1]Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

[2]Faculty of Pharmaceutical Science, Khon Kaen, University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

[3]Department of Botany, Smithsonian Institution, Washington DC, 20013-7012, USA.

* correspondence author, E-mail: thathi@kku.ac.th

Introduction

According to a view of Subphala *et al* (2007, 2008), antioxidant activity from some *Murdannia* species (*M. bracteata*, *M. loriformis* and *M. multiflora*) were contributed to phenolic compounds. The antioxidant activity and total phenolic content (TPC) were influenced by different extracting solvents. The methanolic extract showed higher TPC and stronger antioxidant activity when compared to aqueous extracts.

This study was conducted to compare DPPH• radical scavenging activity (DPPH• RSA) and TPC of methanolic and aqueous extracts from aerial vegetative part of some *Murdannia* species on their population and morphological differences.

Materials and Methods

Aerial vegetative part of *Murdannia bracteata*, *M. edulis*, *M. japonica* and *M. discreta* were collected from natural forest in Thailand (Table 1). The vouchers were deposited at Forest Herbarium Bangkok (BKF), Bangkok and the duplicates were kept at Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand. Each samples was grounded and extracted by using methanol and distilled water (sample:solvent = 1:20 w/v) for 2 hr using a shaker. The methanol extraction was evaporated at 45 °C using a rotary evaporator, whereas the aqueous extract was freeze-dried at -50 °C for solvent removed by Lyophilizer. Crude extract was stored in a desiccator at room temperature, until use extract.

DPPH• radical scavenging activity

According to a modification method from Li *et al.* (2005), The antioxidant activity of each extraction was expressed as the EC50 values as determined from regression equation between concentration and DPPH• RSA (%). Methanol was used a control and trolox was used as standard agent.

Folin-Ciocalteu assay

Total phenolic content (TPC) was determined using the Folin-Ciocalteu reagent method, by a modifications of Singleton and Rossi (1965). Ferulic acid (FA) was used as the standard for the calibration curve.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SPSS software version 11.5. Differences among the variables were tested for Significance by using the ANOVA procedure (Duncan's Multiple Range Test, DMRT) and linear regression to correlate between free radical scavenging activity with TPC, using a level of significance of $p < 0.05$.

Acknowledgements

This work was financially supported by the TRF/BIOTEC Special Program for Biodiversity Research and Training Grant (BRT-T652059). We would like to thank to Center of Research and Development of Herbal Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University and Thailand Research Fund (**TRF-MRG-5080006**) for their facilities.

References

Li, G., *et al.* 2005. Hemoprotective and Free Radical Scavenging Activities of Phenolic Compounds from *Hovenia dulcis*. *Archives of Pharmacal Research* 28(7): 804-809.

Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.

Subphala T, Porasuphatana S, Preepram S, Thitimetharoch, T. 2007. Comparative Pharmacognostic and Antioxidant Activity Studies of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae). *KKU Research Journal (Graduate studies)* 7(2): 98-110.

Subphala T, Porasuphatana S, Preepram S, Thitimetharoch T. 2008. *Comparative Studies among Murdannia bracteata, M. loriformis and M. multiflora (commelinaceae) in Thailand*. Master of Science Thesis in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Graduate School, Khon Kaen University: 114.

Abstract

DPPH• radical scavenging activity (DPPH• RSA) and total phenolic content (TPC) of methanolic and aqueous extracts from aerial vegetative part of four *Murdannia* species (Family Commelinaceae): *Murdannia bracteata*, *M. discreta*, *M. edulis* and *M. japonica* have been conducted by using 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl (DPPH) and Folin-Ciocalteu assay. All species show amount of TPC established to correspond to DPPH• RSA. In generally, *M. edulis* performs higher value of TPC and DPPH• RSA, especially in methanolic part. Therefore, a population of *Murdannia discreta* exhibits the highest of TPC. Samples from different location significantly display different results as well as morphological differences in *M. edulis*: hairy on lower surface of leaves. These factors could influence TPC and scavenging activity value.

Key words: DPPH• radical scavenging activity, total phenolic content, *Murdannia*, Commelinaceae

Table 1 Details of samples.

Samples	Code	Hairy on lower surface of leaves	Locality	Habitat	Collection Date	Voucher's no.
M. Bracteata	Mb	absent	Pha Pae forest, Sakon Nakhon Province	Wet places in deciduous forest (DF)	20/08/2009	SK, OC & TT 58
M. edulis	Me (h1)	Present	Phu Manorom Temple, - Mukdahan Province	Dried places in DF	09/10/2008	OC, SK & TT 10
M. edulis	Me (h2)	present	Dhanat Dam, Khon Kaen Province	Dried places in DF	01/04/2009	OC, SK & TT 32
M. edulis	Me (h3)	present	Kuchinarai District, Kalasin Province	Dried places in DF	21/6/2009	OC, SK & TT 1117
M. edulis	Me (nh)	absent	Dhanat Dam, Khon Kaen Province	Dried places in DF	01/04/2009	OC, SK & TT33
M. japonica	Mj1	absent	Tup Pharya Sawa water fall; Khon Kaen Province	Gallery forest	25/06/2009	OC, SK & TT37
M. japonica	Mj2	absent	Phra That Doi Tung Temple, Chiang Rai Province	Dried places in DF	13/10/2009	TT, OC & SK 1178
M. discreta	Md1	absent	Phu Kao forest, Loei Province	Gallery forest	28/07/2009	OC, SK & TT 55
M. discreta	Md2	absent	Doi Suthep-Pui forest; Chiang Mai Province	Gallery forest	15/08/2009	OC, SK & TT 60
M. discreta	Md3	absent	Doi Suthep-Pui forest; Chiang Mai Province	Dried places in DF	15/08/2009	OC, SK & TT 62
M. discreta	Md4	absent	Pha Taem forest, Ubon Ratchathani Province	Dried places in dipterocarp forest	22/6/2009	OC, SK & TT 71
M. discreta	Md5	absent	Kuchinarai District, Kalasin Province	Dried places in DF	21/6/2009	TT, OC,SK 1112
M. discreta	Md6	absent	Phu Kwiang forest, Loei Province	Wet places in DF	30/10/2009	TT, OC, SK 1300

OC = Orasa Chaichumporn, SK = Sunsanee Khamwannaa, TT= Thaweesak Thitimetharoch

Results

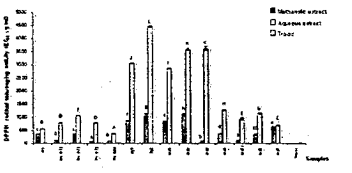


Figure 1 Comparison DPPH• RSA with EC50 value of the samples in different extracts. Values are expressed as mean ± SD (n = 4). Mean with different letters are significantly different at the level of $p < 0.05$.

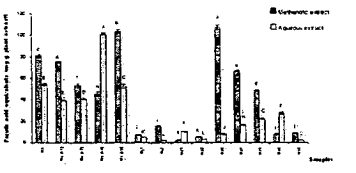


Figure 2 Comparison TPC of the plants in different extracts. Values are expressed as mean ± SD (n = 4). Mean with different letters are significantly different at the level of $p < 0.05$.

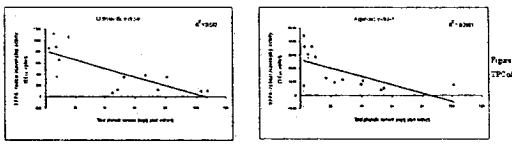


Figure 3 Correlation between EC50 values from DPPH assay and TPC of the plants in methanolic (A) and aqueous extracts (B).

Discussio & Conclusion

TPC and DPPH• RSA could distinguish among the species. *Murdannia edulis* generally performs higher TPC and stronger DPPH• RSA. The methanolic extract displays higher TPC and stronger DPPH• RSA than the aqueous extract. This study suggests that the results are useful for taxonomic evidence and for finding potential source of natural antioxidant from plants in Family Commelinaceae.

Murdannia discreta (Commelinaceae), A New Combination from Thailand

Thaweesak Thitimetharoch*, Woraporn Putalun* and Robert B. Faden[1]**

* *Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand*

** *Department of Botany, MRC 166, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, PO Box 37012, Washington DC, 20560, 20013-7012, U.S.A.*

Abstract: *Aneilema discretum* Craib was described from a single 1911 Kerr collection from Doi Suthep in northern Thailand. It was not recollected for more than half a century. Despite more than a dozen collections since the mid-1980's, recognition of *A. discretum* as a distinct species of *Murdannia* has remained in doubt. In a recent Ph.D. thesis (Thitimetharoch, 2004) the plant was just mentioned in a note. Our more recent studies, including a field collection from the type locality in September 2007, have confirmed that *M. discreta* is a relatively rare but distinct species that is somewhat intermediate between the common and widespread species *M. japonica* and *M. edulis*. From the former it may best be distinguished by its pubescent leaves and from the latter by the presence of cauline leaves or leafy bracts on the flowering shoots. *Murdannia discreta* is known from the Northern, Northeastern and Eastern Floristic Regions of Thailand. Another 2007 Maxwell collection has extended the known distribution of this nearly endemic Thailand species further east into Cambodia.

[1] *Author for correspondence.*

INTRODUCTION

Aneilema discretum Craib was described by Craib (1912) based on a single Kerr collection (*Kerr* 1909) from the lower slopes of Doi Suthep, Chiang Mai Province, Thailand. It has remained obscure ever since. Faden (1991: 153) referred this name to the genus *Murdannia* but without making the new combination. Thitimetharoch (2004: 82) mentioned *A. discretum* in the discussion under *M. edulis* (Stokes) Faden but did not accept it as a distinct species. Indeed, until recently, no other collections have been recognized for certain as belonging to *A. discretum.* Our working hypothesis has been that either *A. discretum* was a rare and not fully characterized species or else that it was an hybrid between *M. edulis* and *M. japonica* (Thunb.) Faden, the two species to which it bears the closest resemblance.

Several things happened in close succession that made us conclude that *A. discretum* is a distinct species of *Murdannia.* The first was that in loan of Commelinaceae from Thailand from Kyoto University. One of us (RBF) noted that there were six [check] collections from various localities in Thailand that were a good match for the type of *Aneilema discretum.* Second, from the images of these specimens that were sent to him. One of us (TT) recognized that a collection he had made in eastern Thailand (*T. Thitimetharoch 604 & 741*) very far from the type locality of *A. discrteum*, was also this species. Third, a recent collection made by J. F. Maxwell from Cambodia (Maxwell 07-417 (CMU)), which we

studied in September, 2007 at Chiang Mai University (CMU) made us realize that this species was even more widespread than we had previously believed. And fourth, we collected this species on at the type locality in September 2007 (*Thitimetharoch & Faden* 766), and it was evident that we were dealing with a distinct species and not a hybrid (see discussion). *Aneilema discretum* has never been transferred to *Murdannia*, so the following new combination is necessary:

Murdannia discreta (Craib) Thitimetharoch & Faden, **comb. nov.** Basionym: *Aneilema discretum* Craib, Kew Bull. 1912: 414 (1911). Type: Doi Sootep, in mixed jungle, 1,100 ft.[335 m], 18 July 1911, *A. F. J. Kerr* 1909 (K!, holotype (sheet with the printed species description (Fig.1); isotypes, K! (sheet lacking the description label) TCD! or TCM??), Fig. 1.

[Maxwell & Elliott (201: 125) recorded *A. discretum* as being of medium abundance between 400 and 500 m in Doi Suthep-Pui National Park but do not consider its taxonomy.]

A full description of *M. discreta*, based on all of the collections observed follows:

Perennial herbs with spirally basal rosette leaves. *Roots* tuberous, sometimes producing distal tubers (TT & FD 766). *Leaves* on basal rosette, linear to narrowly elliptic, 15-35(-60) by 1.5-3(-4.5) cm, glabrous except puberulent at inframarginal line of adaxial surface (rarely sparsely pubescent, *Gen Murata et al. T-37666*) base narrowly cuneate, apex acute to acuminate, margins thickened and cartilage, undulate and often ciliate at base. *Leaf sheaths* distinct on flowering shoots, 1.5-2.5 by 0.5-1 cm, usually puberulent or pubescent throughout on the uppermost. *Flowering shoots* commonly single, scapiform, commonly 50-80 cm long, puberulent on ascending part, and usually with 6 leaves which reduced distally, spirally distance, the lowest and largest leaf lanceolate, 5-14 by 1-2 cm, the upper most, 2-3, reduced to bladeless tubular sheaths, 1-1.5 by 0.3-0.4 cm, the lowest one (prophyll?) becomes forked (bifid), 2.5-7 x 0.5-1 cm. *Inflorescences* terminal, lax-thyrses on the terminal of flowering shoots, inflorescence axis straight, with *ca.* 7 alternate cincinni, each 1-3.5 cm long; cincinnus peduncles 0.3-1.5 cm long; cincinnus bracts membranous, amplexicaul, lanceolate to ovate, 3-6 by 3-4 mm, glabrous, decreasing in size from the lower to the upper cincinni. *Flowers* white; bracteoles membranous, amplexicaul, ovate, *ca.* 3 by 2 mm, persistent, pedicels 5-10 mm long, enlarging in fruit. *Sepals* slightly succulent, greenish white, reddish or purplish white, lanceolate, 6-8 by 2.5-3.5 mm, with 2 shallow grooves and 3 ridges on back side. *Petals* white or pinkish purple, obovate, 5-8 by 3-6 mm. *Fertile stamens* 3, antesepalous, filaments 6-7 mm long, white or pale violet bearded on lower part; anthers yellow, narrowly elliptic, 1.5-2 by 0.5-1 mm, pollen white. *Staminodes* 3, antepetalous 3, filaments 2-3 mm long, white or pale violet bearded on lower part; antherodes yellow, distinct trilobed, 1-2 by 1-1.5 mm. *Ovary* ovate-oblong, *ca.* 1-2 by 0.6 mm, glabrous, styles 5-7 mm long, stigma simple. *Capsules* ovoid, 6-7 by 5-6 mm, glabrous, often beaked. *Seeds* many.

(the description was measured from both dried and living materials!)

Thailand.- **NORTHERN**: Chiang Mai *Bogner s.n.* (K) [no date], (Doi Suthep-Pui) *A.F.G. Kerr 1909* (K, TCD), 18 July 1911, *J.F. Maxwell 87-754* (CMU), 1 August 1987, (Panup-Doi Suthep-Pui) *H. Takahashi T-62935* (KYO), 16 July 1988, (near Wang Bua Ban Waterfall-Doi Suthep-Pui) *M. N. Tamura T-60077* (KYO), 16 July 1988, (near Huai Kaew Waterfall-Doi Suthep-Pui) *T. Thitimetharoch & Faden 766* (BKF, US), 9 September 2007; **NORTH-EASTERN**: Loei (Phu Kradung) *H. Takahashi T-63177* (KYO), 27 August 1988 & *T-63236* (KYO), 29 August 1988, Sakon Nakhon (Phu Phan), *Chantaranothai et al. 704* (KKU), 3 October 1997; **EASTERN**: Surin, *Sakol 208* (BK), 16 May 1965, *Gen Murata et al*

T-37726 (KYO), October 6, 1984, (Sangkha, 103' 40 'E, 14-30'N, 190 m) *Gen Murata et al T-37666* (BKF, KYO), October 6, 1984; Ubon Ratchathani (Kong Chium Gene Conservation Station, Ban Bahai, N 15' 25".981 – E 105' 27"996) *Martin Greijmans 78* (BKF, CMU), 23 May 2001, (Pha Taem, Pha Mohn trail) *T. Thitimetharoch 604* (BKF, KKU), 30 May 2005 & *741* (BKF, US), 28 July 2007

Distribution.- Cambodia. (Kratie Province, Sambour Dist., Mae Kong River, Kring Island, SE side of the island, 30 m., *J.F. Maxwell 07-417* (CMU), 30 July 2007)

Used.- Chewed fresh roots or leaves are used as compasses for the treatment of general minor wound (Thitimetharoch & Yongvanit, 2007).

Ecology.- Moist places in deciduous forest, alt. 150-400 (-1,280) m; flowering and fruiting from June to November, flower opening from late afternoon to evening.

Notes.- *Murdannia discreta* is a rare species. It was first recorded only a locality at Doi Suthep-Pui, Chiang Mai, but now it seems to have a wider range to northeastern part of the country. It is characterized by its leafy bracts on the flowering shoots. We have found that the species has three fertile stamens not two as quoted in the original description. Most characters are intermediate between *M. edulis* and *M. japonica*. Some taxonomic characters are still questioned for the species such as distally fusiform tubers and seed morphology (Table 1). This species is needed for future study.

Table 1. Comparison of some morphological characters among *M. discreta*, *M. edulis* and *M. japonica*.

Characters	*M. discreta*	*M. edulis*	*M. japonica*
Distal tubers	present (sometimes)	present	absent
Leaves	glabrous	glabrescent or pubescent	glabrous
Flowering shoots	single with *ca.* 6 lamina sheaths with a few bladeless sheaths on both the uppermost and lower most in spirally distance arrangement, 1-2 cm width	single to several with 2-4 bladeless sheaths, sometimes with a short lamina on the lowermost one in spirally distance arrangment	single to a few with several well-developed lamina sheaths in districhous arrangement and congested at the top, 2.5-6.5 cm width
Inflorescence axes / Infl.stalk	Straight / puberulent throughout	Straight / glabrous	zig-zag / glabrous
Flowers	white	pinkish purple, violet blue or rarely white	white or rarely pinkish purple
Anthers	yellow	cream-colored	variable, cream-colored, yellowish orange or violet-gray
Filaments of fertile stamens	6-7 mm long	3.5-4 mm long	3-5 mm long
Filaments of sterile stamens	*ca.* 2 mm long	2.5-3 mm long	2-3.5 mm long
Capsules	*ovoid*	*oblong-ellipsoid*	*ovoid*
Seeds	?	*ca.* 2 x 1.5 mm (terminal seeds), *ca.* 1 x 1.5-2 mm (medial seeds); testa obscurely pitted all over; embryotega subdorsal	*ca.* 2.5 x 2 mm (terminal seeds), *ca.* 1.5-2 x 1.5-2 mm (medial seeds); testa finely radiately reticulate and spinulose-warty from middorsal embryotega

Discussion

The new information about *Murdannia discreta* has led us to conclude that it is a rare or uncommon but widespread species that is seldom collected. Although we think that it is closely related to *M. edulis* and *M. japonica* because of its broad rosette leaves and perfoliate bracteoles, we think that it is very unlikely to have originated as a hybrid between these species. In most characters, such as the presence of cauline leaves, occasional vivipary from the lower nodes on the flowering shoots, and white flowers, *M discreta* much more closely resembles *M. japonica* than *M. edulis* (Table 1). Only in its pubescent leaves, the general appearance of the basal rosette and its ecology is *M. discreta* more similar to *M. edulis* than to *M. japonica*.

The three species can be separated by the following key:

1. Flowering shoots lacking well-developed leaves; roots with distal fusiform tubers ***M. edulis***

   Flowering shoots with well developed leaves; roots with or without tubers 2

2. Leaves with an inframarginal adaxial band of hairs, rarely the pubescence abaxial and either inframarginal or covering the abaxial surface; cauline leaves at most 3 per shoot, spirally distance arrangement, 1-2 cm width, inflorescence axis rather straight, fertile filaments 6-7 mm long. ***M. discreta***

   Leaves glabrous; cauline leaves often numerous, districhous and congested at the top, 2.5-6.5 width, inflorescence axis rather zig-zag, fertile filaments 3-5 mm long ***M. japonica***

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (RGJ: grant no. 4.B.KK/42/B.1) and the Thailand Research Fund (TRF-MRG-5080006) for financial support. We are very grateful to the curators and staff of Kew (K) and Trinity College, Dublin (TCD) who made it possible to study their specimens. We also thank to National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, the Applied Taxonomic Research Center, Faculty of Science and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University for their facilities.

REFERENCES

Brückner, G. 1930. Commelinaceae. In: **Die naturlichen Pflanzenfamilien** (Ed. by A.Engler), ed.2, vol. 15: 159-181. Leipzig.

Craib, W.G. 1912. Contributions to the Flora of Siam (Miscellaneous Information). **Kew Bulletin**. 1912: 397-435.

Faden, R.B. 1977. The Identity of *Commelina japonica* Thunb. (Commelinaceae). **Taxon**. 26(1): 142-144.

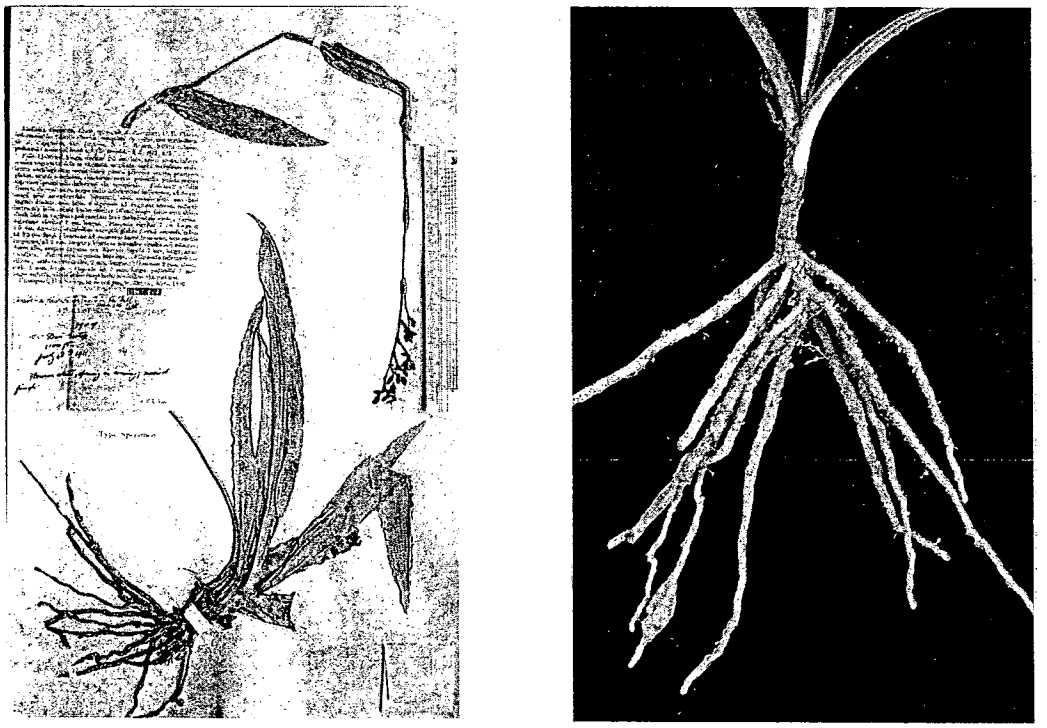
Faden, R.B. 1980. The Taxonomy and Nomenclature of Some Asiatic Species of *Murdannia* (Commelinaceae): The Identity of *Commelina medica* Lour. and *Commelina tuberosa* Lour. **Taxon**. 29(1): 71-83.

Faden, R.B. 1998. Commelinaceae. *In*: Kubitzki, K. **The Families and Genera of Vascular Plants**. Vol. 4 (Flowering Plants-Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except *Gramineae*), pp. 109-128. Springer, Berlin.

Thitimetharoch, T. 2004. Taxonomic Studies of the Family Commelinaceae in Thailand. **Unpublished Ph.D. Thesis**. Khon Kaen University.

Thitimetharoch, T. & Yongvanit, S. 2007. Ethnobotanical Survey of Pha Taem National Park, Ubon Ratchathani Province, Thailand. (Proceeding) **The 2nd Sino-Thai International Conference on Traditional Medicine and Natural Products**. 2-6 December 2007, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand.

Thaweesak Thitimetharoch*, Woraporn Putalun* and Robert B. Faden. 2008. *Murdannia discreta* (Commelinaceae): Recognizing and Understanding a Rare Species in Thailand. (Abstract) **14th Flora of Thailand Meeting**. 18-21 August 2008. Carlsberg Academy, Copenhagen, Denmark.



A B

Figure 1 Murdannia discreta: A. holotype of *Aneilema discretum* Craib, Kew Herbarium (K) and B. distal fusiform tubers.

Comparative data of TLC patterns in between genus *Murdannia* and *Cyanois*

1. Introduction

2. Materials and Methods

The whole plants of four species in genus *Cyanois* (Family Commelinaceae): *C. arachnoidea* Wight, *C. axillaris* (L.) Sweet, *C. thwaitesii* Hassk., *C. vaga* (Lour.) Schult. f. and aerial parts of three *Murdannia* species: *Murdannia japonica* (Thumb.) Feden, *M. spectabilis* (Kurz) Faden and *M. vaginata* (L.) G.Bruckn., were collected for voucher specimens and experimental materials. The vouchers were deposited at Herbal Herbarium, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen and Forest Herbarium Bangkok (BKF), Bangkok, Thailand. Solvent systems [*systems I*: chloroform - ethyl acetate - methanol - formic acid - water (90 : 25 : 15 :2.5: 2.5, *v/v*) and *systems II*: ethyl acetate - formic acid - acetic acid - water (125 : 11 : 11 : 13.5, *v/v*)] were modified for methanol extraction of the samples and standard markers [Andrographolide (AG), Ferulic acid (FA) and Rutin (RT)] on silica gel 60 F254. The chromatograms were investigated by using 10% sulfuric acid in ethanol (10% H_2SO_4), 1 % Aluminum chloride in ethanol (1% $AlCl_3$) and ultraviolet light 254 nm and 366 nm[3,5].

3. Results

TLC fingerprint profile of methanol extract ของพืชแต่ละชนิด เมื่อใช้ *systems I* เพื่อตรวจสอบกลุ่ม Terpenoid เมื่อสังเกตภายใต้ UV-366 จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดงและสีฟ้า (Fig 1-A) และเมื่อตรวจสอบด้วย 10% H_2SO_4 จะปรากฏแถบสีแตกต่างกัน (Fig 1-B) และเมื่อสังเกตภายใต้ UV- 366 จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดง น้ำเงิน เขียว (Fig 1-C) ส่วน *systems II* เพื่อตรวจสอบสารกลุ่ม Flavonoids เมื่อตรวจสอบด้วย 10% H_2SO_4 และสังเกตภายใต้ UV- 366 จะปรากฏแถบสีแดง เหลืองและฟ้าขาว (Fig 2-A) และเมื่อตรวจสอบด้วย 1% $AlCl_3$ จะปรากฏแถบสีเหลือง (Fig 2-B) และเมื่อสังเกตภายใต้ UV- 366 จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลืองและสีฟ้าขาวชัดเจน (Fig 2-C)

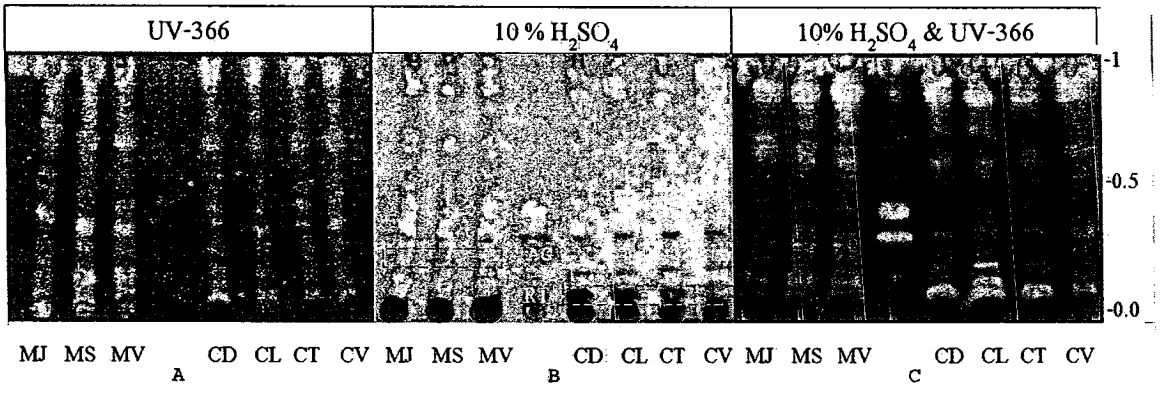


Fig 1 TLC chromatograms of *C. arachnoidea* (CD), *C. axillaris* (CL), *C. thwaitesii* (CT), *C. vaga* (CV), *M. japonica* (MJ), *M. vaginata* (MS), *M. spectabilis* (MV), Andrographolide (AG), Ferulic acid (FA) and Rutin (RT) in *systems I.*

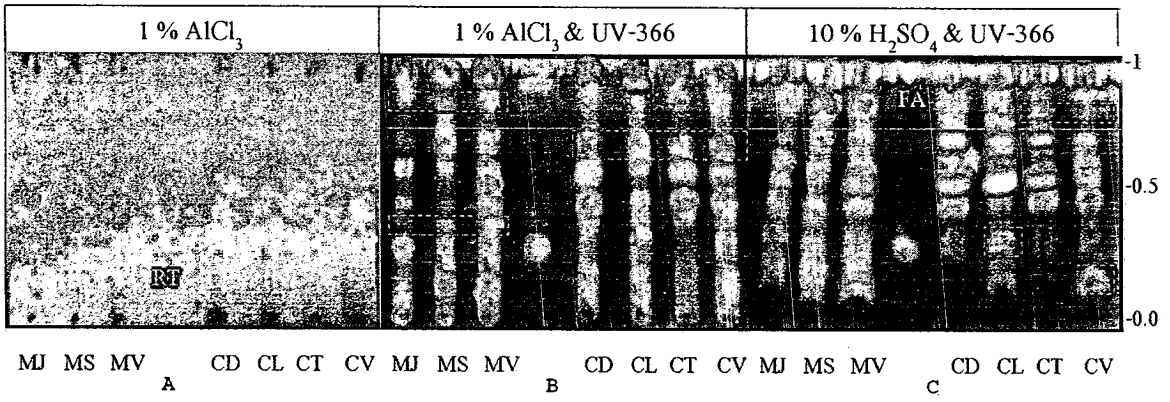


Fig 2 TLC chromatograms of *C. arachnoidea* (CD), *C. axillaris* (CL), *C. thwaitesii* (CT), *C. vaga* (CV), *M. japonica* (MJ), *M. vaginata* (MS), *M. spectabilis* (MV), Ferulic acid (FA) and Rutin (RT) in *systems II.*

4. Discussion & Conclusion

จากการศึกษาพบว่าโดยทั่วไปพืชกลุ่มนี้มีองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นเหมือนกันคือสารกลุ่ม Terpenoid และ Flavonoids โดยใน *systems I* เมื่อตรวจสอบด้วย 10% H_2SO_4 จะแสดงแถบสีบนโครมาโทแกรม ที่ค่า R_f ต่างๆ คล้ายกันในพืชแต่ละชนิด ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่จะเป็นสารกลุ่มที่มีขั้วน้อย โดยจะปรากฏแถบสีม่วงฟ้า สีม่วงน้ำตาล และสีม่วง ที่ค่า R_f ประมาณ 0.85, 0.41 และ 0.16 เป็นสารประกอบหลักของพืชกลุ่มนี้ ซึ่งคาดว่าเป็นสารกลุ่ม Terpenoid แต่ที่แตกต่างคือ พืชในสกุล *Murdannia* จะปรากฏแถบสีม่วงน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.2 (Fig 1-B) ส่วนพืชในสกุล *Cyanois* จะปรากฏแถบสีม่วงชัดเจนที่ค่า R_f ประมาณ 0.11 และจะเห็นแถบแสงสะท้อนสีฟ้าขาวชัดเจน ภายใต้แสง UV-366 (Fig 1-C)

ส่วนใน *systems II* สามารถแยกความแตกต่างโครมาโทแกรมของสารสกัดแต่ละชนิดได้อย่างชัดเจน เมื่อตรวจสอบด้วย 10% H_2SO_4 และ 1% $AlCl_3$ ภายใต้แสง UV-366 จะเห็นสารกลุ่มที่มีขั้วมากกว่าที่พบใน *systems I* และสารส่วนใหญ่ที่แยกได้เป็นสารในกลุ่ม Flavonoids ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชกลุ่มนี้มีสารกลุ่ม Flavonoids ที่หลากหลายและแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ดังแสดงใน Fig 2 โดย

- **แถบสารที่แสดงความแตกต่างระหว่างพืชในแต่ละสกุล** คือ จะปรากฏแถบแสงสะท้อนสีฟ้าขาวที่ค่า R_f ประมาณ 0.81 และ 0.37 เฉพาะในพืชสกุล *Murdannia* ซึ่งแตกต่างจากพืชในสกุล *Cyanois* ที่จะปรากฏที่ค่า R_f ประมาณ 0.68 [Fig 2: ตรวจสอบด้วย 1% $AlCl_3$ ภายใต้แสง UV-366]
- **แถบสารที่แสดงความแตกต่างระหว่างพืชแต่ละชนิด:** จะปรากฏแถบสีเหลืองที่ค่า Rf ต่างๆ แตกต่างกัน กล่าวคือ MJ พบที่ค่า R_f ประมาณ 0.29 MS พบที่ค่า R_f ประมาณ 0.13 MV พบที่ค่า R_f ประมาณ 0.44 CD พบที่ค่า R_f ประมาณ 0.45 และ 0.58 เหมือนกับ CT และ CV [Fig 2: ตรวจสอบด้วย 1% $AlCl_3$] แต่แตกต่างที่ค่า R_f ประมาณ 0.16 ใน CV จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลืองชัดเจน [Fig 2: เมื่อตรวจสอบ

ด้วย 1% $AlCl_3$ ภายใต้ UV-366] และจะพบแถบสีส้มที่ค่า R_f ประมาณ 0.9 เฉพาะใน CL [Fig 2: ตรวจสอบด้วย 1% $AlCl_3$]

โดยสารที่แตกต่างกันสามารถนำมาใช้เป็น Chemical marker ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของพืชแต่ละชนิดได้ ซึ่งสนับสนุนรายงานการวิจัยอนุกรมเชิงเคมีของพืชวงศ์ Commelinaceae ทั้งหมดที่ผ่านมาที่ใช้สารกลุ่ม Flavoniods เป็นสารสำคัญในการจัดจำแนกชนิด (Stirton and Harborne, 1980; Martinez, 1985; Martinez and Swain, 1985; Martinez MADP and Martinez AJ, 1993; ธารินี สืบปาละ และคณะ, 2551; Chaichumporn et al., 2008; Kaewsaart *et al.*, 2008)

Murdannia ubonensis T. Thitimetharoch & R.B. Faden (Commelinaceae), a new species from Thailand

Thaweesak Thitimetharoch[1], Robert B. Faden[2] and Pranom Chantaranothai[3]

[1] Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.
[2] Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, PO Box 37012, Washington DC, 20013-7012, U.S.A.
[3] Department of Biology, Faculty of Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

ABSTRACT. A new species, *Murdannia ubonensis* Faden & Thitimetharoch, is restricted to Pha Taem National Park, Khong Chium District, Ubon Ratchathani Province, Thailand. This paper is given a full description and illustrations. Also, the features distinguishing it from the closely related species, *Murdannia edulis* and *M. japonica*, are summarized.

KEY-WORDS: *Commelinaceae* – *Murdannia* – Thailand – Ubon Ratchathani – Khong Chium – Pha Taem.

INTRODUCTION

During a field trip at Pha Taem National Park, Khong Chium District, Ubon Ratchathani Province. We found a population of very robust and giant rosette plants with several slender lateral flowering shoots. The plant is similar to common species in deciduous forest, *Murdannia edulis* (Stokes) Faden (Faden, 1980). The features distinguish it from the closely species, *Murdannia edulis* (Stokes) Faden and *M. japonica* (Thunb.) Faden are summarized in Table 1. Detailed study is described and illustrated (Figure 1) as below.

Murdannia ubonensis Faden & Thitimetharoch, **sp. nov.** (Fig. 1)
Holotype: THAILAND: Ubon Ratchathani Province, Khong Chium District, Pha Taem National Park, *T. Thitimetharoch 599* (holotype- K, isotype- BK, BKF, KKU, US)

Paratypes: *T. Thitimetharoch 531* (KKU, US), *T. Thitimetharoch 633* (BK, BKF, K, KKU, US), *T. Thitimetharoch 641* (KKU, US)

Murdannia edulis (Stokes) Faden affinis a qua differt lamina folii longiore et latiore, glabra.

A giant and robust perennial herbs, with spirally basal rosette leaves. *Roots* fibrous, thick, with a distal, fusiform tubers. *Leaves* on basal rosette, linear-oblong, 30-45 by 3.5-9 cm, glabrous, base cuneate, apex acuminate, margins thick, cartilage, undulate and scaberulate. *Leaf sheaths* on basal rosette leaves, ca. 4 by 2 cm. *Flowering shoots* slender, commonly producing many, up to 10 per plant, scapiform, usually 30-50 cm long, suberect or ascending, usually sparsely branched below, with 2-3 bladeless sheathing bracts, 1-2 by 0.4-0.5 cm. *Inflorescences* terminal, lax-thyrses on the flowering shoots and lateral branches, with 6-10 alternate cincinni. *Cincinnus axis* 2-3 cm long, with 10 - up to 20 dense spirally arranged flowered, cincinnus bracts chatacheous, decreasing in size from the lower to the upper cincinni, tubular sheaths, 9-30 by 2.5-3 mm, perfoliate, glabrous, often green with maroon, persistent, cincinnus peduncles 2-7 mm. *Flowers* bisexual, actinomorphic, reddish or orange-pink (rarely violet), bracteoles membranous, ovate, ca. 2 by 2 mm, amplexicaul, not perfoliate, glabrous, persistent, pedicels erected to ascending, 4-6 mm long, glabrous. *Sepals* chartaceous, green, sometimes with maroon, lanceolate, 4-6 by 2-2.5 mm, apex acuminate, smooth and puberulent out side. *Petals* redish or orange-pink (rarely violet), oblanceolate, 5.5-6 by 3-3.5 mm, apex acute. *Fertile stamens* 3, filaments ca. 4 mm long, reddish (or rarely violet) bearded on lower parts, anthers reddish or cream, elliptic, ca. 1.5 by 1 mm. *Staminodes* 3, filaments ca. 3 mm long, reddish (or rarely violet) bearded on lower parts, antherodes yellowish or cream, trilobed (the medial lobe obscure), ca. 0.5 by 1 mm. *Ovary* greenish, elliptic, ca. 2 by 1 mm, styles ca. 4 mm long, stigma simple. *Capsules* ellipsoid, 5-7 by 3.5-4 mm, shortly beaked, glabrous, locules (3-)4 seeded. *Seeds* uniseriate, trapizoid or rectangular, 1.5-2 by 1.2-1.4 mm, testa grayish brown or brown, smooth, obscure rugose-obscure pitted, usually finely white-silver warts, embryotega circular on sublateral to dorsal, hilum punctiform, usually elliptic on subbasal-ventral side.

Vernacular name.- Kai-Tuan-Yai (ไก่เถื่อนใหญ่)

Used.- minced thick roots and/or its tuberous roots are treated as anti-septic, anti-coagulant and healing wound. Roots and tuberous roots are fodder for wild chicken in dry season.

Thailand.- EASTERN: Ubon Ratchathani (Pha Taem National Park-Khong Chium District)

Distribution.- rare and endemic

Ecology.- wet places in understory deciduous forest; flowering in July-September, flowers opening in the evening, and fruiting in October-November.

Table 1. Summary of morphological differences among species, *Mudannia ubonensis* Faden & Thitimetharoch, *M. edulis* (Stokes) Faden and *M. japonica* (Thunb.) Faden.

Characters	*M. ubonensis*	*M. edulis*	*M. japonica*
Roots	Thick, 3-5 mm in diam., with distal tubers	Moderately thick, 2-3 mm in diam., with distal tubers	Moderately thick, 2-3 mm in diam., but not tuberous
Leaves	Broader, 3.5-9 cm width, glabrous on both side	Narrower, 2-3 cm width, subglabrous or dense pubescent beneath and usually dense puberulent along margins above	Narrower to moderate, 1-5.5 cm width,
Flowering shoots producing	More slender, numerous	Slender, single to few	Larger, single to a few
Sheaths on flowering shoots	ca. 4 by 2 cm, bladeless	ca. 2.5-3 by 1 cm, bladeless	Ca. X cm, leafy
Inflorescence	Dense thyrse	Lax panicle	Lax panicle
Cincinni	Dense spirally arranged flowers	Spaced flowers	Spaced flowers
Cincinnus axis	short with dense flowers, straight	elongate with spaced flowers, slightly zig-zag	elongate with spaced flowers, strongely zig-zag
Cincinnus bracts	Chatacheous, tubular sheaths folded cincinnus, caducous	Membranous, ovate-amplexicaule, caducous	Membranous, ovate-amplexicaul, caducous
Flowers	Redish Orange or Orange-pink (rarely violet)	White or purple to violet	White (rarely light purple)
Sepals	Chartaceous, smooth and puberulent on back side, apex acuminate	Slightly succulent, with distinct 2 grooved, 3 ridged and glabrous on back side, apex obtuse-rounded	Slightly succulent, with distinct 2 grooved, 3 ridged and glabrous on back side, apex obtuse-rounded
Petals	oblanceolate, apex acute	obovate, apex obtuse-round	Obovate-suborbicular, apex rounded
Anthers	reddish or cream, ca. 1.5 by 0.8 mm	cream, 1.8-2 by 1-1.2 mm	Gray or violet-gray (rarely pale yellow), 0.8-1.5 by 1.3-2 mm
Antherodes	yellowish or cream	bright yellow	yellow
Capsules		Obovoid, ca. X mm, 4-seeded in each locule	Ellipsoid-oblong, ca. 5-7 by 4-5 mm, 3-4(-8)-seeded in each locule
Seeds		Testa brown, obscurely pitted all over, with a midventral ridge	Testa brown, finely radiately reticulate and spinulost-warty from embryotega, with a midventral ridge

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by The Thailand Research Fund (TRF), Research Center for Makong Regional Tourism, Khon Kaen University. The authors are thankful to thank to head of Pha Taem National Park, Mr. Saksit Subsombun and Mr. Bunlue Subsiri for helping in the field. We are very grateful to the directors and curators of BK, BKF, K, KKU and US herbaria for their holdings and facilities. We also thank to Smithsonian Institution, USA, Department of Biology, Faculty of Sciences and Department of Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Thailand for their facilities.

BIBLIOGRAPHIES

Faden, R.B. 1977. The Identity of Commelina japonica Thunb. (Commelinaceae). **Taxon**. 26(1): 142-144.

Faden, R.B. 1980. The Taxonomy and Nomenclature of Some Asiatic Species of *Murdannia* (Commelinaceae): The Identity of *Commelina medica* Lour. and *Commelina tuberosa* Lour. **Taxon**. 29(1): 71-83.

Fernandes, R. and H. Santapau. 1954. Critical Notes on the Identity and Nomenclature of Some Bombay Plants. **Journal, Bombay Natural History of Society**. 52(1): 137-141.

Nampy, Santhosh and Paul Joby. 2003. *Murdannia fadeniana* Nampy & Joby (Commelinaceae), a new species from India. **Candollea**. 58: 79-82.