การจำแนกบัวบกออกจากพรมมิและแว่นแก้วด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลายพิมพ์สารเคมี และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

IDENTIFICATION OF *HYDROCOTYLE UMBELLATA* L., *CENTELLA ASIATICA* L. AND *BACOPA MONNIERI* L. BY MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS, CHEMICAL FINGERPRINT AND DNA FINGERPRINT

มณิสร สุขสวัสดิ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2566

การจำแนกบัวบกออกจากพรมมิและแว่นแก้วด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลายพิมพ์สารเคมี และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

มณิสร สุขสวัสดิ์

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

IDENTIFICATION OF *HYDROCOTYLE UMBELLATA* L., *CENTELLA ASIATICA* L. AND *BACOPA MONNIERI* L. BY MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS, CHEMICAL FINGERPRINT AND DNA FINGERPRINT

MANISORN SUKSAWAT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Pharmaceutical Product Development)
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University
2023

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การจำแนกบัวบกออกจากพรมมิและแว่นแก้วด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลายพิมพ์สารเคมี และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ของ

มณิสร สุขสวัสดิ์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการเภสัชภัณฑ์
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

....

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

....

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

.... ที่ปรึกษาหลัก	.... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรพรรณ สิทธิถาวร)	(รองศาสตราจารย์ ดร.สรกนก วิมลมั่งคั่ง)
	.... กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง)

ชื่อเรื่อง	การจำแนกบัวบกออกจากพรมมิและแว่นแก้วด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลายพิมพ์สารเคมี และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
ผู้วิจัย	มณิสร สุขสวัสดิ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วรพรรณ สิทธิถาวร

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพรมีความสำคัญเพื่อให้มั่นใจชนิดของสมุนไพรเพื่อไม่ให้เกิดการผิดพลาดในการนำมาใช้ บัวบก พรมมิ และแว่นแก้วเป็นสมุนไพรที่พบว่ามีความสับสนในการนำมาใช้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วโดยใช้ลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลายพิมพ์สารเคมีโดยใช้เทคนิค high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) และลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างด้วยวิธี polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) และเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการระบุชนิดของผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีจำหน่ายในท้องตลาด การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าพรมมิมีลักษณะเนื้อเยื่ออีพิเดอร์มิส และเซลล์ขนแตกต่างจากบัวบกและแว่นแก้ว จึงสามารถใช้เนื้อเยื่อดังกล่าวจำแนกพรมมิออกจากบัวบกและแว่นแก้วได้ การศึกษาลายพิมพ์สารเคมี ใช้ asiaticoside เป็นสารเทียบของบัวบก bacoside A3 เป็นสารเทียบของพรมมิ และ quercetin เป็นสารเทียบของแว่นแก้ว รูปแบบของลายพิมพ์สารเคมีสามารถจำแนกสมุนไพรทั้งสามชนิดได้ การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR-RFLP โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน maturase K (*mat*K) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H1, *Sph*1 และ *Bsp*D1 มีความจำเพาะกับบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วตามลำดับ การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงสามารถจำแนกสมุนไพรทั้งสามชนิดได้ เมื่อทดสอบผลิตภัณฑ์สมุนไพรจำนวน 8 ตัวอย่าง ด้วย 3 วิธีดังกล่าว พบว่ามีผลิตภัณฑ์สมุนไพร 2 ตัวอย่างที่มีชนิดไม่ตรงตามที่ระบุในฉลาก ได้แก่ ชาสมุนไพรบัวบก 1 ตัวอย่างที่ผลการทดสอบพบว่าเป็นแว่นแก้ว และชาซงพรมมิ 1 ตัวอย่างที่ผลการทดสอบพบว่าเป็นบัวบก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจสอบเอกลักษณ์ของบัวบก พรมมิและแว่นแก้ว เพื่อให้มั่นใจว่าสมุนไพรที่นำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์สุขภาพถูกต้องและเกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ : บัวบก, พรมมิ, แว่นแก้ว

Title	IDENTIFICATION OF *HYDROCOTYLE UMBELLATA* L., *CENTELLA ASIATICA* L. AND *BACOPA MONNIERI* L. BY MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS, CHEMICAL FINGERPRINT AND DNA FINGERPRINT
Author	MANISORN SUKSAWAT
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2023
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Worapan Sitthithaworn

The Identification of herbs is important to ensure their correct use. *Centella asiatica* L., *Bacopa monnieri* L., and *Hydrocotyle umbellata* L. have been used with some confusion. This study aimed to identify *C. asiatica* L., *B. monnieri* L., and *H. umbellata* L. using morphological characteristics under a microscope, chemical fingerprint using high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC), and a DNA fingerprint created by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and to validate the identification of herbal products available on the market. Microscopic analysis found that *B. monnieri* L. has epidermis and trichome characteristics different from *C. asiatica* L. and *H. umbellata* L. Therefore, these tissues can be used to classify *B. monnieri* L. from *C. asiatica* L. and *H. umbellata* L. Chemical fingerprint analysis used asiaticoside as a marker for *C. asiatica* L., bacoside A3 for *B. monnieri* L., and quercetin for *H. umbellata* L. Chemical fingerprint patterns were able to identify the three herbal species. The DNA fingerprint analysis used PCR-RFLP by amplifying DNA fragments of the maturase K (*mat*K) gene using polymerase chain reaction. Then the DNA fragments were cut with a restriction enzyme and the DNA pattern was examined by agarose gel electrophoresis. It was found that restriction enzymes *Bam*H1, *Sph*1, and *Bsp*D1 were specific to *C. asiatica* L., *B. monnieri* L., and *H. umbellata* L., respectively. DNA fingerprint was able to identify the three herbs. The results of testing eight samples of herbal products using these three methods were that two samples of herbal products were not as specified on the label: a sample of *C. asiatica* L. tea that the test results found to be *H. umbellata* L. and a sample of *B. monnieri* L. tea that the test results found that it was *C. asiatica* L. This study showed that it is necessary to identify *C. asiatica* L., *B. monnieri* L., and *H. umbellata* L. to ensure that the herbs used in the production of health products are of the correct type and are beneficial to consumers.

Keyword : Centella asiatica, Bacopa monnieri, Hydrocotyle umbellata

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร.วรพรรณ สิทธิถาวร ที่ให้คำปรึกษา ชี้แนะวิธีการศึกษาวิจัย แนวทางการอภิปรายและสรุปผลเพื่อให้งานวิจัยเกิดประโยชน์สูงสุดตลอดระยะเวลาการทำวิจัย ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สรกนก วิมลมั่งคั่ง ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบปากเปล่า และรองศาสตราจารย์ ดร.สริน ทัดทอง ที่ร่วมเป็นกรรมการสอบปากเปล่า ผู้ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะอันเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงงานวิจัยให้ดียิ่งขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการเภสัชภัณฑ์ ที่ถ่ายทอดความรู้ที่เป็นประโยชน์สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการทำวิจัยตลอดจนถึงการทำงาน

ขอขอบพระคุณองค์การเภสัชกรรมที่ให้ทุนการศึกษา เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือสำหรับการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุนและกำลังใจในการทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

มณิสร สุขสวัสดิ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ........ ฉ

สารบัญ .... ช

สารบัญตาราง........ ฏ

สารบัญรูปภาพ .... ฏ

บทที่ 1 บทนำ........ 1

ที่มาและความสำคัญของปัญหา........ 1

วัตถุประสงค์........ 2

สมมติฐานการวิจัย........ 2

ขอบเขตของการวิจัย 2

ตัวแปรที่เกี่ยวข้อง 3

กรอบแนวคิดการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ........ 3

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม........ 4

1. บัวบก........ 4

1.1 ข้อมูลทั่วไป........ 4

1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 4

1.3 องค์ประกอบทางเคมี........ 5

1.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา........ 5

2. พรมมิ........ 7

2.1 ข้อมูลทั่วไป 7

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7

2.3 องค์ประกอบทางเคมี 7

2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา 8

3. แว่นแก้ว 10

3.1 ข้อมูลทั่วไป 10

3.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 10

3.3 องค์ประกอบทางเคมี 10

3.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา 11

4. การศึกษาลักษณะเซลล์พืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 12

5. thin-layer chromatography 14

5.1 หลักการของเทคนิค thin-layer chromatography 14

6. high-performance thin layer chromatography 15

6.1 หลักการของเทคนิค high-performance thin layer chromatography 15

6.2 วัฏภาคคงที่ (stationary phase) 16

6.3 วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) 17

6.4 การเลือกความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด (detection wavelength) 18

6.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารอนุพันธ์ (derivatization reagent) 18

7. เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) 19

7.1 ขั้นตอนในการทำ PCR 19

7.2 องค์ประกอบในการทำ PCR 19

7.3 เทคนิคอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 21

7.4 PCR-RFLP (PCR – restriction fragment length polymorphism) 21

7.5 อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) 21

7.6 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) 21

7.7 เจลอะกาโรส (agarose gel) 22

7.8 การใส่ดีเอ็นเอลงในเจล 23

8. ยีนหรือดีเอ็นเอที่ใช้ในการระบุชนิดพืช 23

9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพิสูจน์เอกลักษณ์บัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว 23

9.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 23

9.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค HPTLC 29

9.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 31

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 33

1. อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี 33

1.1 สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา 33

1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ 33

1.3 สารเคมี 35

2. วิธีดำเนินงานวิจัย 36

2.1 การศึกษาลักษณะเซลล์พืชของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วด้วยกล้องจุลทรรศน์ 36

2.2 การศึกษาลายพิมพ์สารเคมีของบัวบกออกจากพรมมิและแว่นแก้ว 37

โดยใช้เทคนิค high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) 37

2.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว 38

บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย 42

1. ลักษณะตัวอย่างของบัวบก พรมมิ แว่นแก้วและผลิตภัณฑ์สมุนไพร 42

2. ผลการศึกษาลักษณะเซลล์พืชของบัวบก พรมมิ แว่นแก้วและผลิตภัณฑ์สมุนไพร 44

ด้วยกล้องจุลทรรศน์ 44

3. การศึกษาลายพิมพ์สารเคมีของบัวบก พรมมิ แว่นแก้วและผลิตภัณฑ์สมุนไพร 47
โดยใช้เทคนิค high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) 47
3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่ 47
3.2 การศึกษาลายพิมพ์สารเคมีของผลิตภัณฑ์สมุนไพร 51
4. ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ แว่นแก้วและผลิตภัณฑ์สมุนไพร 54
4.1 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว 54
4.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพร 59
5. ผลการศึกษาเพิ่มเติมของผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ไม่ตรงตามฉลากและผลิตภัณฑ์ 62
ที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่ตรงกับสมุนไพรมาตรฐาน 62
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล 65
บรรณานุกรม 71
ภาคผนวก 80
ประวัติผู้เขียน 87

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แนวทางการเลือกวัฏภาคคงที่ 16

ตาราง 2 แนวทางการเลือกวัฏภาคเคลื่อนที่ 17

ตาราง 3 แนวทางการเลือกใช้ derivatization reagent 18

ตาราง 4 แนวทางการเลือกใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสตามขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 22

ตาราง 5 เนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของบัวบก 23

ตาราง 6 เนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของพรมมิ 25

ตาราง 7 สภาวะการวิเคราะห์สารสกัดบัวบกด้วยเทคนิค HPTLC 29

ตาราง 8 สภาวะการวิเคราะห์สารสกัดพรมมิด้วยเทคนิค HPTLC 30

ตาราง 9 สภาวะการวิเคราะห์สารสกัดแว่นแก้วด้วยเทคนิค HPTLC 30

ตาราง 10 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 44

ตาราง 11 แสดง HPTLC profiles โดย spot เรียงจากซ้ายไปขวา: asiaticoside, บัวบก, bacoside A3, พรมมิ, quercetin dihydrate และแว่นแก้ว ตามลำดับ 48

ตาราง 12 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ 54

ตาราง 13 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อของสมุนไพรหมายเลข 1, หมายเลข 3 และหมายเลข 7 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 63

ตาราง 14 แสดงผลการศึกษาผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่างด้วยลายพิมพ์สารเคมี ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ และลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 69

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย 3

ภาพประกอบ 2 ลักษณะทั่วไปของบัวบก 4

ภาพประกอบ 3 โครงสร้าง (A) asiaticoside, (B) asiatic acid, (C) madecassoside, (D) madecassic acid 5

ภาพประกอบ 4 โครงสร้าง asiaticoside 6

ภาพประกอบ 5 ลักษณะทั่วไปของพรมมิ 7

ภาพประกอบ 6 โครงสร้าง bacoside A3, bacopaside II, jujubogenin, bacopasaponin C, bacopaside I 8

ภาพประกอบ 7 โครงสร้าง bacoside A3 9

ภาพประกอบ 8 ลักษณะทั่วไปของแว่นแก้ว 10

ภาพประกอบ 9 โครงสร้าง quercetin, avicularin, quercitrin, hyperoside 10

ภาพประกอบ 10 โครงสร้าง neochlorogenic acid 11

ภาพประกอบ 11 โครงสร้าง hibalactone 11

ภาพประกอบ 12 โครงสร้าง quercetin dihydrate 12

ภาพประกอบ 13 ลักษณะเซลล์ของผงบัวบกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย 13

ภาพประกอบ 14 ลักษณะเซลล์ของบัวบกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (10 - 11)uniseriate flagellate conial hairs of adaxial leaf lamina, (12 - 13) pieces of epidermal cells showing stomata, (14) pieces of costal cells, (15) bits of conical hairs, (16 - 17) pieces of leaf lamina showing epidermis and palisade parenchyma, (18) group of spongy parenchyma,(19) ground tissue showing sphaero - crystal, (20) collenchyma and parenchyma, (21) isolated sphaero – crystal, (22) ground tissue of rhizome showing starch grains, (23 – 25) pieces of tracheary elements 24

ภาพประกอบ 15 ลักษณะเซลล์ของบัวบกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (a-c) trichomes, (d) calcium oxalate crystal, (e) anomocytic stomata, (f) spongy parenchyma with chloroplast, (g) tracheid with spiral thickening, (h) parenchyma cell,(j) paracytic stomata 24

ภาพประกอบ 16 ลักษณะเซลล์ของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดง glandular trichome ... 25

ภาพประกอบ 17 ลักษณะเซลล์ของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (A) upper epidermal cells, (B) lower epidermal cells, (C) lower epidermal cells near midrib, (D) a portion of leaf showing vein islet patterns and glandular trichomes (E) arrangement of cells in glandular trichome (F) lateral view of glandular trichome.. 26

ภาพประกอบ 18 ลักษณะเซลล์ของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (A) starch granules, (B) a portion of sclerenchymatous cells, (C) series of oil globules, (D) calcium crystals, raphides and druses, (E) spirally appearing xylem vessels for water and mineral conduction, (F) calcium and magnesium deposits in the lining of wall, (G) starch and other grains, (H) upper view of trichome (I) a portion of stomata along with guard cells 26

ภาพประกอบ 19 ลักษณะเซลล์ของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (a) epidermis, (b) parenchyma with starch grains, (c) anomocytic stoma, (d) lignified fibers, (e) sieve tube, and (f) scalariform vessel.. 27

ภาพประกอบ 20 ลักษณะเซลล์ของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (a) anisocytic stomata, (b) diacytic stomata, (c) lignified fibre, (d) oil globules, (e) prismatic crystals, (f) annular vessels from vascular bundle 27

ภาพประกอบ 21 ลักษณะเซลล์ของแว่นแก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (a) wood fiber, (b) upper leaf epidermis, (c) lower leaf epidermis, (d) petiole epidermis, (e) pericyclic fibres, (f) tannin cells, (g) neural epidermis, (h) secretory ducts, (i-j) xylem vessels, (k) wood parenchyma, and (l) palisade cells... 28

ภาพประกอบ 22 แสดงตัวอย่างสมุนไพร (authentic plants) ได้แก่ (a) บัวบก (b) พรมมิ และ (c) แว่นแก้ว 42

ภาพประกอบ 23 แสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร ได้แก่ (a, b) ตัวอย่างหมายเลข 1 และ 2 ผงสมุนไพรบัวบกบรรจุแคปซูล (c, d, e) ตัวอย่างหมายเลข 3, 4 และ 5 ชาสมุนไพรบัวบกบรรจุซอง

(f) ตัวอย่างหมายเลข 6 ผงสมุนไพรบัวบกสำหรับแบ่งบรรจุ (g) ตัวอย่างหมายเลข 7 ชาสมุนไพรพรมมิ และ (h) ตัวอย่างหมายเลข 8 ต้นแห้งพรมมิ 43

ภาพประกอบ 24 แสดงผลการแสกนที่ 200-700 นาโนเมตรของ (a) asiaticoside, (b) bacoside A3, (c) quercetin dihydrate, (d) บัวบก, (e) พรมมิ และ (f) แว่นแก้ว..... 50

ภาพประกอบ 25 แสดงลายพิมพ์สารเคมีภายใต้แสงขาว หลังจากฉีดพ่นด้วย p-anisaldehyde 51

ภาพประกอบ 26 แสดงลายพิมพ์สารเคมีภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หลังจากฉีดพ่นด้วย p-anisaldehyde 52

ภาพประกอบ 27 แสดงลายพิมพ์สารเคมีภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร หลังจากฉีดพ่นด้วย p-anisaldehyde 52

ภาพประกอบ 28 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบส (sequence alignment) ของส่วนของดีเอ็นเอบริเวณยีน maturase K (matK) ของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว จากฐานข้อมูลยีน GenBank ลำดับเบสที่ตัวหนาแสดง forward primer และ reverse primer ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamH1 (G/GATCC) Sph1 (GCATG/C) และ BspD1 (AT/CGAT) เครื่องหมาย*แสดงตำแหน่งที่มีเบสเหมือนกันในพืชทั้งสามชนิด..... 55

ภาพประกอบ 29 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสรูปแบบดีเอ็นเอที่สกัดได้ ของ (1) บัวบก (2) พรมมิ (3) แว่นแก้ว (4) DNA marker และ PCR product ของ (5) บัวบก (6) พรมมิ (7) แว่นแก้ว 57

ภาพประกอบ 30 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส Purify PCR Product ของ (1) บัวบก (2) พรมมิ (3) แว่นแก้ว และ (4) DNA marker..... 57

ภาพประกอบ 31 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสรูปแบบดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และ แว่นแก้ว (1) ก่อนและหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (2) BamH1, (3) Sph1 และ (4) BspD1 อักษร M (bp) หมายถึงเครื่องหมายบอกขนาดดีเอ็นเอมีหน่วยเป็นจำนวนเบส (base pair, bp) 58

ภาพประกอบ 32 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสรูปแบบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ 1-6 แสดงในแถบที่ 1-6 ตัวอย่างที่ 7-8 แสดงในแถบที่ 8 และ 9 และ DNA marker แสดงในแถบที่ 7 59

ภาพประกอบ 33 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส PCR Product ของผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ 1-4 แสดงในแถบที่ 1-4 ตัวอย่างที่ 5-8 แสดงในแถบที่ 6-9 และ DNA marker แสดงในแถบที่ 5 59

ภาพประกอบ 34 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส Purify PCR Product ของผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ 1-4 แสดงในแถบที่ 1-4 ตัวอย่างที่ 5-8 แสดงในแถบที่ 6-9 และ DNA marker แสดงในแถบที่ 5 60

ภาพประกอบ 35 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสรูปแบบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1, 2, 3 และ 4; (1) ก่อนและหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (2) *Bam*H1, (3) *Sph*1 และ (4) *Bsp*D1 อักษร M (bp) หมายถึงเครื่องหมายบอกขนาดดีเอ็นเอมีหน่วยเป็นจำนวนเบส (base pair, bp) 60

ภาพประกอบ 36 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสรูปแบบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 5, 6, 7 และ 8; (1) ก่อนและหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (2) *Bam*H1, (3) *Sph*1 และ (4) *Bsp*D1 อักษร M (bp) หมายถึงเครื่องหมายบอกขนาดดีเอ็นเอมีหน่วยเป็นจำนวนเบส (base pair, bp) 61

ภาพประกอบ 37 แสดงตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของบัวบก โดยใช้โปรแกรม webcutter 81

ภาพประกอบ 38 แสดงตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพรมมิ โดยใช้โปรแกรม webcutter 82

ภาพประกอบ 39 แสดงตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแว่นแก้ว โดยใช้โปรแกรม webcutter 83

ภาพประกอบ 40 แสดงสำเนาคำขอรับอนุสิทธิบัตร กรรมวิธีการจำแนกบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว โดยใช้พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP) เลขที่ 2303003219 84

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาจากการเลือกใช้สมุนไพรผิดชนิดจะทำให้เกิดโทษต่อตัวผู้ใช้ ซึ่งอาจเกิดจากความเข้าใจผิดเกี่ยวกับชนิดของสมุนไพรที่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน หรือมีชื่อที่ใกล้เคียงกัน ปัจจุบันการใช้สมุนไพรได้รับความนิยมมากขึ้นเพื่อเป็นทางเลือกในการดูแลสุขภาพ และมักพบการปลอมปนของสมุนไพรที่จำหน่ายในท้องตลาดเนื่องจากการทดแทนโดยเจตนาเพื่อเพิ่มผลกำไรหรือการระบุผิดด้วยความไม่รู้ โดยเฉพาะเครื่องยาสมุนไพรเป็นส่วนของพืชที่ใช้เป็นยาและมักถูกตัดเป็นชิ้นแล้วทำให้แห้งซึ่งยากต่อการระบุชนิดของพืชที่ใช้เป็นเครื่องยาจึงมักเกิดปัญหาในการใช้ ทำให้เกิดความกังวลเกี่ยวกับความปลอดภัยและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพร ในตลาดโลกมีความสับสนในการนำบัวบกและพรมมิมาใช้ในการบำรุงประสาทและความจำ[1, 2] เนื่องจากในบางท้องถิ่นมีการเรียกชื่อบัวบก (*Centella asiatica* L.) และพรมมิ (*Bacopa monnieri.* L.) ว่าพรมมิ (Brahmi)[3] ส่วนบัวบกและแว่นแก้ว (*Hydrocotyle umbellata* L.) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันจึงอาจทำให้มีความสับสนในการนำไปใช้

เมื่อเกิดการปลอมปนชนิดของสมุนไพรและไม่มีการตรวจสอบวัตถุดิบสมุนไพรก่อนจะนำมาผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรนั้น จะทำให้ประสิทธิผลของผลิตภัณฑ์ไม่เป็นไปตามที่ต้องการ และการใช้สมุนไพรผิดชนิดอาจเกิดอาการไม่พึงประสงค์อันมาจากการรับประทานเนื่องจากผู้รับประทานอาจแพ้สมุนไพรชนิดดังกล่าวแต่อาจรับประทานไปด้วยความไม่รู้ รวมถึงการรับประทานร่วมกับสมุนไพรอื่นที่ห้ามรับประทานร่วมกัน หรืออาจเกิดปฏิกิริยากับสมุนไพรหรือตัวยาชนิดอื่นจนทำให้ประสิทธิภาพลดลง เช่น บัวบกอาจเพิ่มระดับน้ำตาลและคอเลสเตอรอล จึงไม่ควรรับประทานร่วมกับยาลดน้ำตาลและยาลดคอเลสเตอรอล เพราะจะทำให้ประสิทธิผลของยาลดน้ำตาลและยาลดคอเลสเตอรอลลดลง และควรระวังการใช้บัวบกร่วมกับยาที่มีกระบวนการเมแทบอลิซึมผ่าน cytochrome P450 (CYP 450) เนื่องจากบัวบกมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ CYP 2C9 และ CYP 2C19 จึงมีความสำคัญในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสมุนไพร เพื่อให้มั่นใจในชนิดของสมุนไพรเพื่อไม่ให้เกิดการผิดพลาดในการนำมาใช้[4]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเอกลักษณ์สมุนไพรบัวบก (*Centella asiatica* L.) พรมมิ (*Bacopa monnieri.* L.) และแว่นแก้ว (*Hydrocotyle umbellata* L.) ด้วยการตรวจดูลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC) เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีในสมุนไพรมีคุณสมบัติทางเคมีต่างกัน(5) และการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอของสมุนไพรแต่ละชนิดมีลักษณะเฉพาะตัว และลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่เปลี่ยนแปลงตามระยะการเจริญเติบโตของพืชหรือตามสภาวะแวดล้อม สามารถทำซ้ำ ๆ กัน และได้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง(6)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อจำแนกบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วโดยใช้

- ลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- เทคนิค high-performance thin-layer chromatography (HPTLC)
- ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างด้วย PCR-RFLP

2. เพื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีจำหน่ายในท้องตลาดว่าชนิดสมุนไพรตรงตามที่ระบุไว้ในฉลากหรือไม่

สมมติฐานการวิจัย

ลักษณะเซลล์พืช องค์ประกอบทางเคมี และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว ที่ต่างกัน สามารถจำแนกสมุนไพรทั้งสามชนิดนี้ได้

ขอบเขตของการวิจัย

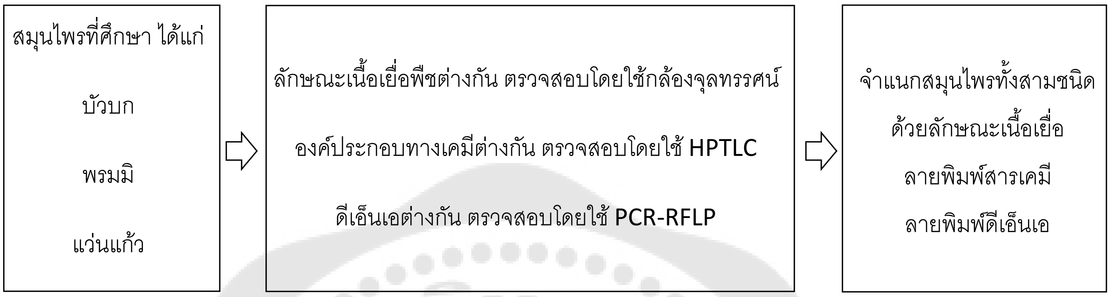
การตรวจสอบเนื้อเยื่อพืชส่วนเหนือดินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค HPTLC โดยใช้ asiaticoside เป็น marker ของบัวบก ใช้ bacoside A3 เป็น marker ของพรมมิ และใช้ quercetin เป็น marker ของแว่นแก้ว และลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างด้วย PCR-RFLP ซึ่งใช้ยีน maturase K (*mat*K) โดยศึกษาจากพืชที่เป็นมาตรฐาน (authentic plants) ได้แก่ บัวบก พรมมิ และแว่นแก้วที่ปลูกที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เมื่อได้วิธีที่เหมาะสมจึงทดสอบกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ตัวแปรที่เกี่ยวข้อง

ตัวแปรต้น: ชนิดของสมุนไพร

ตัวแปรตาม: ลักษณะเนื้อเยื่อพืช องค์ประกอบทางเคมี ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพประกอบ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย

หมายเหตุ : เมื่อทดสอบในสมุนไพรทั้งสามชนิดได้แล้ว จึงทดสอบกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีจำหน่ายในท้องตลาด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. โรงงานผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรสามารถนำวิธีการจำแนกสมุนไพรบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วมาใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สมุนไพรได้

2. ผู้บริโภคสามารถใช้สมุนไพรได้อย่างมีความปลอดภัยมากยิ่งขึ้น

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

1. บัวบก

เป็นสมุนไพรที่ใช้ประโยชน์ในการบำรุงประสาทและความจำ บำรุงหัวใจ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านเบาหวาน ต้านการอักเสบ เป็นต้น[1]

ภาพประกอบ 2 ลักษณะทั่วไปของบัวบก [7]

1.1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Centella asiatica* (L.) Urb.[8]

วงศ์: Apiaceae[8, 9]

พืชที่ใช้ชื่อว่าบัวบก ตามสารานุกรมพืชแห่งประเทศไทย มี 7 ชนิด ดังนี้ *Centella asiatica* (L.) Urb (วงศ์ Apiaceae), *Crinum wattii* Baker (วงศ์ Amaryllidaceae), *Desmodium renifolium* (L.) Schindl. (วงศ์ Fabaceae), *Hydrocotyle umbellata* L. (วงศ์ Apiaceae), *Proiphys amboinensis* (L.) Herb. (วงศ์ Amaryllidaceae), *Stephania pierrei* Diels (วงศ์ Menispermaceae) และ *Uvaria lurida* Hook.f. & Thomson (วงศ์ Annonaceae)[9]

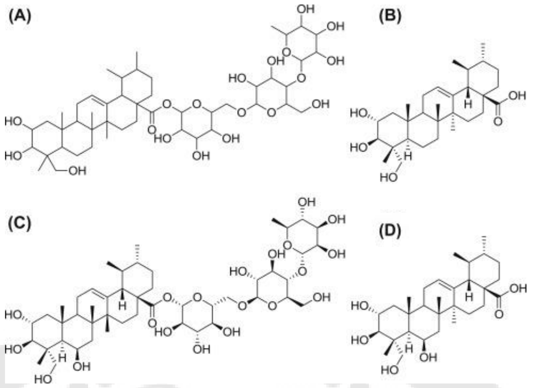
โดยที่ *Hydrocotyle umbellata* L. (วงศ์ Apiaceae) มักถูกนำมาใช้ผิดโดยเข้าใจว่าเป็น *Centella asiatica* (L.) Urb (วงศ์ Apiaceae)

1.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชล้มลุก ลำต้นเรียวยาวประมาณ 12 ถึง 15 เซนติเมตร ใบงอกจากข้อ ข้อละ 2 ถึง 10 ใบ ใบมีลักษณะกลมเป็นรูปไต ขอบหยักมน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 ถึง 5 เซนติเมตร และมีความยาวประมาณ 2-6 เซนติเมตร[1, 7]

1.3 องค์ประกอบทางเคมี

สารที่พบในบัวบกจัดอยู่ในกลุ่ม triterpenoid glycoside ประกอบด้วย asiaticoside, asiatic acid, madecassoside และ madecassic acid[10]



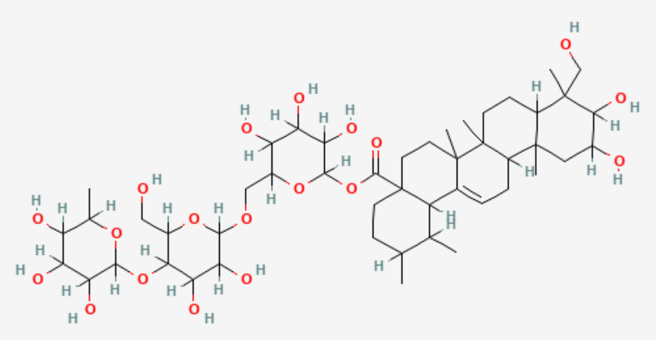
ภาพประกอบ 3 โครงสร้าง (A) asiaticoside, (B) asiatic acid, (C) madecassoside, (D) madecassic acid [11]

1.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

asiaticoside มีความสามารถสูงในการผ่าน blood–brain barrier (BBB) จึงทำให้สามารถรักษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทได้[12] ปกติร่างกายมีกระบวนการกำจัด amyloid-β แต่ถ้ากระบวนการนั้นบกพร่อง amyloid-β จะสะสมอยู่ที่เซลล์ประสาทในสมองและทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคอัลไซเมอร์หรือภาวะสมองเสื่อม เมื่อทำการทดลองในหลอดทดลองพบว่า asiaticoside จะช่วยลดความเสียหายของเซลล์ประสาทในหลอดทดลองที่เกิดจากการสัมผัสกับ amyloid-β[2, 13] และทดลองในหนูโดยฉีด Aβ 1-42 oligomers ให้หนู ประเมินประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำที่ดีขึ้นโดยการทดสอบ Morris water maze (MWM) และเมื่อทำการย้อมสี H&E (hematoxylin and eosin) ของเนื้อเยื่อ hippocampal และส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าโครงสร้างของเนื้อเยื่อที่เสียหายได้รับการรักษาโดย asiaticoside นอกจากนี้ ยังพบว่า asiaticoside ช่วยลดระดับของ cytokines ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ[14]

ความจำบกพร่องเกิดจากการขาดเลือดในสมอง การทดลองในหลอดทดลองพบว่า asiaticoside ช่วยป้องกันเซลล์ประสาทขาดเลือดในหลอดทดลองได้[15] และเมื่อทดลองในหนูพบว่า asiaticoside ช่วยลดความบกพร่องของหน่วยความจำที่เกิดจากการขาดเลือดในสมองชั่วคราวในหนู โดยใช้กลไกต้านการอักเสบผ่านการยับยั้งการทำงานที่มากเกินไปของ p38 MAPK pathway[16] อีกทั้ง asiaticoside ยังสามารถรักษาหนูที่มีภาวะสมองเสื่อมจากโรคหลอดเลือดสมอง vascular dementia (VD) ได้อีกด้วย[17]

ในการศึกษานี้ใช้ asiaticoside เป็น marker ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของบัวบก asiaticoside มีคุณสมบัติดังนี้



ภาพประกอบ 4 โครงสร้าง asiaticoside [18]

IUPAC Name [6-[[3,4-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-5-(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxyoxan-2-yl]oxymethyl]-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl]10,11-dihydroxy-9-(hydroxymethyl)-1,2,6*a*,6*b*,9,12*a*-hexamethyl-2,3,4,5,6,6*a*,7,8,8*a*,10,11,12,13,14*b*-tetradecahydro-1*H*-picene-4*a*-carboxylate

Molecular Formula	$C_{48}H_{78}O_{19}$
Molecular Weight	959.1
CAS Number	16830-15-2[18]
Solubility	ละลายได้ดีในเมทานอล[19]

2. พรมมิ

เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการบำรุงประสาทและความจำ คลายกังวล ต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านการอักเสบ เป็นต้น[2, 20]

ภาพประกอบ 5 ลักษณะทั่วไปของพรมมิ [21]

2.1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.[22]

วงศ์: Scrophulariaceae[22]

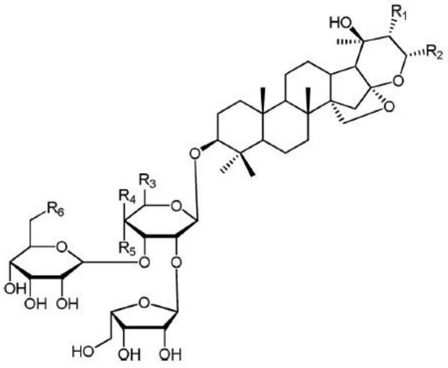
สารานุกรมพืชแห่งประเทศไทย จัดพืชชนิดนี้ไว้ในวงศ์ Plantaginaceae[9]

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชล้มลุก ลำต้นยาวเรียว สีเขียว แตกกิ่งก้านตามข้อปล้อง ใบมีความมันเงา หนาและมีขนาดเล็ก ขอบใบเรียบมน มีเส้นกลางที่เด่นชัด เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.6 ถึง 0.9 มิลลิเมตร และมีความยาวประมาณ 4 ถึง 5 มิลลิเมตร เรียงเป็นคู่ตามลำต้น[21]

2.3 องค์ประกอบทางเคมี

พรมมิมีองค์ประกอบทางเคมีหลักเป็นสารกลุ่ม triterpenoid saponin ได้แก่ bacoside (เช่น bacosides A1-A3, และ bacoside B), bacopasaponin (เช่น bacopasaponins A-F), bacopaside (เช่น bacopasides I-V)[20, 23]



ภาพประกอบ 6 โครงสร้าง bacoside A3, bacopaside II, jujubogenin, bacopasaponin C, bacopaside I [23]

หมายเหตุ โครงสร้าง bacoside A3: R_1=H, R_2=CHC(CH_3)$_2$, R_3=CH_2OH, R_4=H, R_5=OH, R_6=OH, bacopaside II: R_1=CHC(CH_3)$_2$, R_2=H, R_3: CH_2OH, R_4=H, R_5=OH, R_6=OH, jujubogenin: R_1=H, R_2=CHC(CH_3)$_2$, R_3=H, R_4=OH, R_5=H, R_6=OH, bacopasaponin C: R_1=CHC(CH_3)$_2$, R_2=H, R_3=H, R_4=OH, R_5=H, R_6=OH, bacopaside I: R_1=CHC(CH_3)$_2$, R_2=H, R_3=H, R_4=OH, R_5=H, R_6=SO_3OH

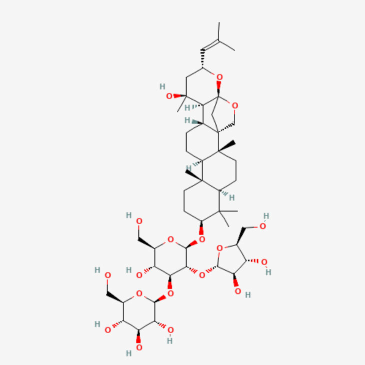
2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

bacoside A ประกอบด้วยสี่องค์ประกอบ ได้แก่ bacoside A3, bacopaside II, jujubogenin และ bacopasaponin C โดย bacoside A สามารถป้องกันระบบประสาทได้จากการควบคุม mRNA translation และการแสดงออกของตัวรับ (neuroreceptors) เช่น alpha-amino-3 -hydroxy-5 -methyl-4 -isoxazole propionic acid receptor (AMPAR), N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) และ gamma-aminobutyric acid receptor (GABAR) ในส่วนต่างๆ ของสมอง[24] อีกทั้ง bacoside A ช่วยป้องกันการสะสมของ amyloid-β และการสร้าง fibrils ซึ่งเป็นปัจจัยที่เป็นสาเหตุของภาวะสมองเสื่อม และสามารถลดการเสื่อมของระบบประสาทในหนูได้[2]

ภาวะความจำเสื่อมเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้น (oxidative stress) สารสื่อประสาทที่เปลี่ยนแปลงไป และการตายของเซลล์ (apoptosis) เมื่อทำการประเมินในหนู พบว่า bacoside สามารถลดภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน และลดความเสื่อมของเส้นประสาทได้[25] โดย bacoside A สามารถป้องกันระบบประสาทโดยการลดภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของ H_2O_2 ในเซลล์ประสาท[26]

ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำในทารกแรกเกิดสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท สารสื่อประสาทจะเสียสมดุลส่งผลให้การเรียนรู้และความจำบกพร่อง เมื่อทดลองในหนูที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ พบว่า bacoside A จะช่วยปรับสมดุลของสารสื่อประสาทได้ โดย bacoside A ช่วยปรับปรุงความไม่สมดุลของ dopamine และ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) ที่เกิดจาก oxidative stress ดังนั้น bacoside A จะช่วยบำรุงประสาทและความจำได้(27)

ในการศึกษานี้ใช้ bacoside A3 เป็น marker ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของพรมมิ bacoside A3 มีคุณสมบัติดังนี้



ภาพประกอบ 7 โครงสร้าง bacoside A3 (28)

IUPAC Name (2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-2-[(2*R*,3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-5-[(2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-6-[[(1*S*,2*R*,5*R*,7*S*,10*R*,11*R*,14*R*,15*S*,16*S*,18*R*,20*S*)-16-hydroxy-2,6,6,10,16-pentamethyl-18-(2-methylprop-1-enyl)-19,21-dioxahexacyclotricosan-7-yl]oxy]oxan-4-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol

Molecular Formula	$C_{47}H_{76}O_{18}$
Molecular Weight	929.1
CAS Number	157408-08-7(28)
Solubility	ละลายได้ดีในเมทานอลและเอทานอล(29)

3. แว่นแก้ว

เป็นสมุนไพรที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มความจำ ต้านการอักเสบ แก้อาการช้ำใน และคลายกังวล[30-32]

ภาพประกอบ 8 ลักษณะทั่วไปของแว่นแก้ว [33]

3.1 ข้อมูลทั่วไป

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Hydrocotyle umbellata* L.[34]

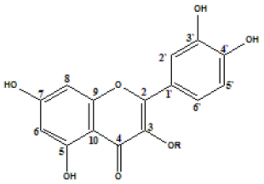
วงศ์: Apiaceae[9, 34]

3.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

พืชล้มลุก ใบสีเขียวมีลักษณะกลม ผิวเรียบ ขอบหยัก พื้นผิวด้านบนมีสีเข้มกว่าด้านล่าง และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-6 เซนติเมตร ก้านใบทรงกระบอกยาวเรียวติดกับตัวใบที่บริเวณกลางใบ มีสีเขียวถึงม่วงแกมเขียว ความยาวประมาณ 16 ถึง 20 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 0.5 ถึง 0.7 เซนติเมตร[33]

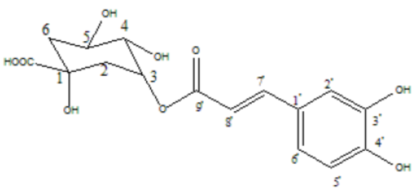
3.3 องค์ประกอบทางเคมี

แว่นแก้วมีองค์ประกอบทางเคมีหลักเป็นสารกลุ่ม flavonoids เช่น quercetin[32], avicularin, quercitrin, hyperoside, neochlorogenic acid[35] และองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มอื่น เช่น hibalactone[36]

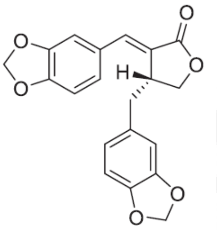


ภาพประกอบ 9 โครงสร้าง quercetin, avicularin, quercitrin, hyperoside [35]

หมายเหตุ โครงสร้าง quercetin: R = H, avicularin: R = arabinose, quercitrin: R = rhamnose, hyperoside: R = galactose



ภาพประกอบ 10 โครงสร้าง neochlorogenic acid [35]



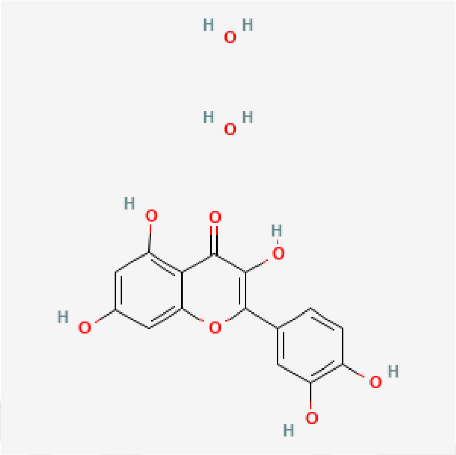
ภาพประกอบ 11 โครงสร้าง hibalactone [36]

3.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ภาวะสมองเสื่อมเกิดจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท โดยสามารถชะลอการเสื่อมได้หลายวิธี เช่น การให้สารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากอนุมูลอิสระทำให้เซลล์ประสาทถูกทำลายเกิดภาวะ oxidative stress quercetin เป็นฟลาโวนอยด์ที่พบได้ในสมุนไพรหลายชนิด มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ปกป้องเซลล์ประสาทโดยลดภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและการอักเสบของเส้นประสาท แต่ความสามารถในการผ่าน blood–brain barrier (BBB) ของ quercetin ต่ำ จะต้องปรับปรุงการดูดซึมผ่าน BBB จึงจะเพิ่มความสามารถในการต่อต้านความผิดปกติของระบบประสาทได้[37]

quercetin ช่วยเพิ่มความจำได้ เนื่องจากสามารถยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของสารสื่อประสาท acetylcholine ภายในสมอง ทำให้ปริมาณสารสื่อประสาทลดลงซึ่งเป็นสาเหตุของความจำเสื่อม สัตว์ที่ได้รับการบำบัดด้วย *Hydrocotyle umbellata* L. จะมีการพัฒนากระบวนการเรียนรู้และความจำ และยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้[38]

ในการศึกษานี้ใช้ quercetin เป็น marker ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของแว่นแก้ว quercetin มีคุณสมบัติดังนี้



ภาพประกอบ 12 โครงสร้าง quercetin dihydrate [39]

IUPAC Name 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one; dihydrate

Molecular Formula $C_{15}H_{14}O_9$

Molecular Weight 338.27

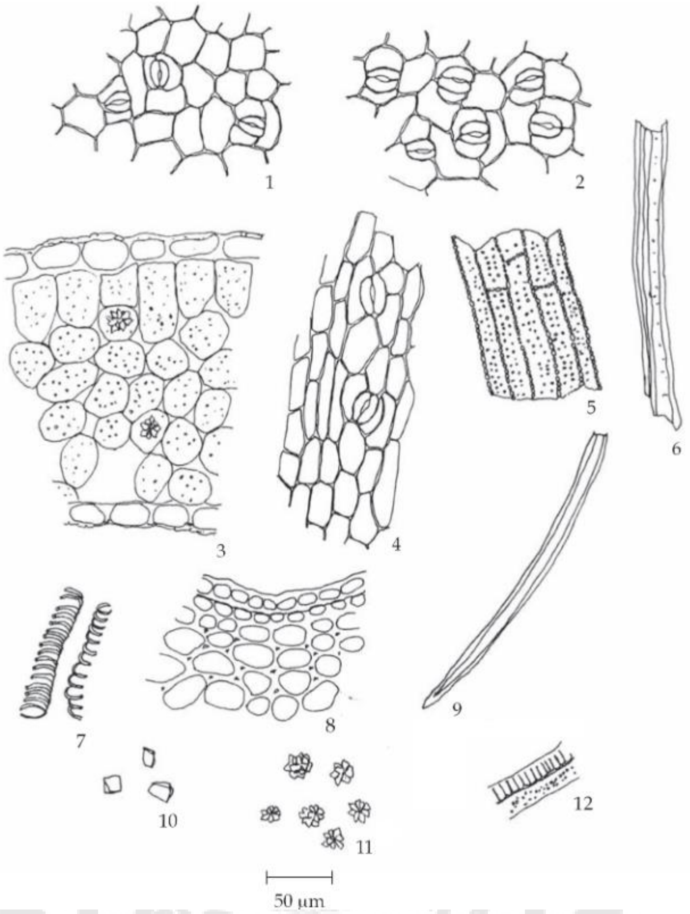
CAS Number 6151-25-3[39]

Solubility ละลายได้ดีในเมทานอล เอทานอล DMSO และ DMF[40, 41]

4. การศึกษาลักษณะเซลล์พืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การตรวจสอบคุณภาพสมุนไพรไทยจะต้องอ้างอิงข้อกำหนดมาตรฐานสมุนไพรตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (thai herbal pharmacopoeia) โดยกำหนดให้ศึกษาลักษณะเซลล์เนื้อเยื่อของพืชสมุนไพรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic method) ตรวจสอบได้โดยการตัดชิ้นส่วนของสมุนไพรให้บาง โดยตัดตามขวางหรือตามยาว เพื่อดูส่วนประกอบภายในเซลล์ลักษณะเซลล์ การเรียงตัวของเนื้อเยื่อ หรือตรวจสอบลักษณะของผงยา เพื่อดูคุณลักษณะจำเพาะเพื่อที่จะสามารถระบุชนิดสมุนไพร การศึกษาผงยา อาจต้องใช้น้ำยาเคมีช่วยเพื่อให้เห็นลักษณะเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น เช่น chloral hydrate, HCl, aniline sulfate, safranin หรือ fast green[42, 43]

ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (thai herbal pharmacopoeia 2018) มีการระบุลักษณะเซลล์ของผงบัวบกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไว้ดังภาพ[44]



ภาพประกอบ 13 ลักษณะเซลล์ของผงบัวบกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย1. upper epidermis, 2. lower epidermis, 3. lamina in sectional view, 4. epidermis with stomata from petiole, 5. pitted vessels, 6. fibres, 7. spiral vessels, 8. epidermis and collenchyma in sectional view, 9. unicellular trichome, 10. prismatic crystals, 11. rosette aggregate crystals, 12. scalariform and pitted vessels [44]

จากการสืบค้นมีงานวิจัยที่ศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของผงบัวบก พรมมิและแว่นแก้ว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยจะกล่าวถึงไว้ในหัวข้อ 9.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. thin-layer chromatography

5.1 หลักการของเทคนิค thin-layer chromatography

เป็นเทคนิคในการแยกสารผสม อาศัยหลักการที่ว่าองค์ประกอบในสารผสมแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันในการกระจายอยู่ใน 2 วัฏภาค ได้แก่ วัฏภาคคงที่ (stationary phase) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับสารที่ต้องการแยก โดยใช้วัฏภาคคงที่ คือ แผ่นแก้วบางที่เคลือบด้วย aluminum oxide หรือ silica gel และวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ทำหน้าที่เป็นตัวพาหรือตัวทำละลายสารที่ต้องการแยกให้เคลื่อนที่ไปบนตัวดูดซับ ที่เลือกตามคุณสมบัติขององค์ประกอบในสารผสม อาศัยหลักการ “like dissolves like” คือองค์ประกอบในสารผสมที่มีขั้วใกล้เคียงกับวัฏภาคคงที่จะถูกดูดซับในวัฏภาคคงที่ และองค์ประกอบในสารผสมที่มีขั้วใกล้เคียงกับวัฏภาคเคลื่อนที่จะเคลื่อนที่ไปตามวัฏภาคเคลื่อนที่[45, 46]

หากแบ่งประเภทตามขั้วของวัฏภาคคงที่จะแบ่งได้ 2 แบบ คือ normal phase และ reversed phase โดย normal phase คือวัฏภาคคงที่มีขั้วมากกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ วัฏภาคคงที่ที่นิยมใช้ได้แก่ silica gel, alumina และ magnesium oxide และวัฏภาคเคลื่อนที่นิยมใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น hexane, tetrahydrofuran ทำให้สารที่มีขั้วจะเคลื่อนที่ออกมาช้ากว่าสารที่ไม่มีขั้ว ส่วน reversed phase คือวัฏภาคคงที่มีขั้วน้อยกว่าวัฏภาคเคลื่อนที่ วัฏภาคคงที่ที่นิยมใช้ได้แก่ octadecyl (C18), octyl (C8) และวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น acetonitrile น้ำ และส่วนผสมของน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์[47, 48]

6. high-performance thin layer chromatography

6.1 หลักการของเทคนิค high-performance thin layer chromatography

โครมาโตกราฟีแบบชั้นบางที่มีประสิทธิภาพสูง (high-performance thin layer chromatography, HPTLC) เป็นเทคนิคที่ซับซ้อน การแยกสารผสมเกิดขึ้นจากการที่สารเคลื่อนที่ไปตามวัฏภาคเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคคงที่ ถ้าสารผสมมีขั้วใกล้เคียงกับวัฏภาคเคลื่อนที่ก็จะเคลื่อนที่ไปตามวัฏภาคเคลื่อนที่ แต่ถ้าสารผสมมีขั้วใกล้เคียงกับวัฏภาคคงที่จะถูกดูดซับอยู่กับวัฏภาคคงที่และเคลื่อนที่ไปตามวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า เทคนิค HPTLC นั้นมีประสิทธิภาพการแยกและขีดความสามารถในการตรวจวัดที่สูงกว่าเทคนิค TLC โดย detection limit (absorption) ของ HPTLC มีค่า 100 - 500 pg[49] มีค่าต่ำกว่า detection limit ของ TLC ซึ่งมีค่า 1 - 5 ng และ detection limit (fluorescence) ของ HPTLC มีค่า 5 - 10 pg มีค่าต่ำกว่า detection limit ของ TLC ซึ่งมีค่า 50 - 100 pg เนื่องจากขนาดอนุภาคของ HPTLC plate (ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 5-6 µm) ละเอียดกว่า TLC plate (ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 10-12 µm) และ HPTLC มีการควบคุมความชื้นและ pre-conditioning ด้วยเครื่อง auto developing chamber ให้ความสามารถในการทำซ้ำได้ดี และป้องกันการรบกวนจากสภาพแวดล้อมส่งผลให้การแยกมีประสิทธิภาพ และการ spot สารโดยใช้ auto sampler ทำให้ควบคุมขนาด spot ให้มีขนาดเล็ก และการ spot สารมีความสม่ำเสมอ ใช้สารปริมาณน้อยในการวิเคราะห์ รวมถึงเวลาในการวิเคราะห์ต่ำกว่าอีกด้วย[5, 48]

เมื่อเปรียบเทียบกับ high-performance liquid chromatography (HPLC) พบว่า HPTLC เป็น planar chromatography ต่างจาก HPLC ซึ่งเป็น column chromatography โดย HPLC มีประสิทธิภาพในการแยกสูงกว่า HPTLC เนื่องจากวัฏภาคคงที่แบบ column มีข้อได้เปรียบกว่า planar เนื่องจากสามารถเพิ่มความยาวคอลัมน์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกได้ และสามารถใช้ guard column ในการกรองสิ่งสกปรกที่อาจปนมาในตัวอย่างได้ อีกทั้ง HPLC มีปั๊มที่สามารถควบคุมความดันและอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ และถ้าใช้ปั๊มระบบ gradient elution จะสามารถแยกสารที่มีขั้วต่างกันได้ดีขึ้น แม้ประสิทธิภาพในการแยกของ HPTLC จะต่ำกว่า แต่มีราคาถูกกว่าและใช้งานง่าย[47]

6.2 **วัฏภาคคงที่** (stationary phase)

การเลือกชนิดของวัฏภาคคงที่ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารที่ต้องการวิเคราะห์ ได้แก่ ความมีขั้วของสาร เพื่อให้สามารถแยกองค์ประกอบในสารผสมออกจากกันได้อย่างชัดเจน

ตาราง 1 แนวทางการเลือกวัฏภาคคงที่ [50]

type of sample	stationary phases
all classes of compounds	silica gel
basic compounds (alkaloids, amines, etc.), steroids, terpenes, aromatic and aliphatic hydrocarbons	aluminium oxide
sugars, carboxylic acids, sulfonic acids, phenols, purines, pyrimidines, nucleotides	amino phase
all classes of compounds, PHB esters	cyano phase
all classes of compounds, steroids, hormones	diol phase
polar substances, separation according to lipophilic properties and chain length, steroids, tetracyclins, phthalates, barbiturates, nucleo bases, aminophenols	rp c-2, c-8, c-18 phases
phenols, flavonoids, nitro compounds	polyamide
poly cyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), number of diol groups (boric acid), number of isolated double bonds.	silica gel impregnated with silver nitrate
enantiomers	chiral phase

6.3 **วัฏภาคเคลื่อนที่** (mobile phase)

ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะมีขั้วและความสามารถในการแยกสารแตกต่างกัน การเลือกวัฏภาคเคลื่อนที่จึงขึ้นอยู่กับชนิดของวัฏภาคคงที่และคุณสมบัติของสารที่ต้องการวิเคราะห์วัฏภาคเคลื่อนที่ต้องละลายสารที่ต้องการวิเคราะห์ได้ แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการวิเคราะห์ และมีความเป็นพิษน้อย[5, 48, 51]

ตาราง 2 แนวทางการเลือกวัฏภาคเคลื่อนที่ [48]

chemical compounds	mobile phase
polar compounds	ethyl acetate: methanol: water [100:13.5:10]
lipophilic compounds	toluene: ethyl acetate [93:7]
alkaloids	toluene: ethyl acetate: diethyl amine [70:20:10]
flavonoids	ethyl acetate: formic acid: glacial acetic acid: water [100:11:11:26]
saponin	chloroform: glacial acetic acid: methanol: water [64:32:12:8]
coumarin	diethyl ether: toluene [1:1] saturated with 10% acetic acid
bitter drug	ethyl acetate: methanol: water [77:15:8]
cardiac glycosides	ethyl acetate: methanol: water [100:13.5:10] or [81:11:8]
essential oil	toluene: ethyl acetate [93:7]
lignans	chloroform: methanol: water [70:30:4] chloroform: methanol [90:10] toluene: ethyl acetate [70:30]
pigments	ethyl acetate: formic acid: glacial acetic acid: water [100:11:11:26
pungent testing	toluene: ethyl acetate [70:30]
terpenes	chloroform: methanol: water [65:25:4]
triterpenes	ethyl acetate: toluene: formic acid [50:50:15] toluene: chloroform: ethanol [40:40:10]

relative polarity ของ dichloromethane, เมทานอล และน้ำ เท่ากับ 0.309, 0.762 และ 1.000 ตามลำดับ[52]

6.4 การเลือกความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด (detection wavelength)

สารอินทรีย์ที่มีพันธะคู่สลับเดี่ยว (conjugated double bond) จะสามารถดูดกลืนแสงในช่วง uv-visible เช่น anthraglycosides, coumarins, flavonoids และ alkaloid บางชนิด จะสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 และ 366 นาโนเมตร

ส่วนสารที่สามารถมองเห็นสีได้ในแสงธรรมชาติ จะสามารถดูดกลืนแสงขาว (white light) ได้[48]

6.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารอนุพันธ์ (derivatization reagent)

สารที่ไม่มีสีและไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยรังสี UV หรือการเรืองแสง สามารถทำให้ตรวจวัดได้โดยใช้ derivatization reagent ใช้ในการพ่นหรือแช่เพลต เพื่อเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสารให้เป็นอนุพันธ์ที่ตรวจวัดได้

ตาราง 3 แนวทางการเลือกใช้ derivatization reagent [48]

colour reagent	chemical compounds	colour
dragendroff reagent	alkaloids	red-brown zone (vis)
natural products-polyethylene glycol reagent	flavonoids	intense yellow, orange and green fluorescent zones in uv 366 nm
vanillin sulphuric acid or anisaldehyde sulphuric acid	bitter principle	red-brown, yellow-brown, dark green zone (vis)
	saponin	coloured zones (vis)
	essential oil	blue, brown or red zones (vis)
10 % ethanolic koh	anthraquinones (emodin, rhein)	red zones (vis), red fluorescence (uv 366 nm)
	anthrones (aloin, cascarosides)	yellow zones (vis), yellow fluorescence (uv 366 nm)
	coumarins, scopoletin, umbelliferone	bright blue fluorescent zone (uv 366 nm)
ninhydrin reagent	amino acids, peptides, amines and amino-sugars	yellow, brown to pink and violet (vis)
iodine	indole, quinoline derivative, thiols and all organic compounds	dark zone (uv 254)

7. เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) ให้ได้จำนวนมากภายในระยะเวลารวดเร็ว ไพรเมอร์จะสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ในบริเวณที่จำเพาะบนดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้เอนไซม์ taq polymerase นำนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยเบสทั้ง 4 ได้แก่ อะดีนีน (A) ไทมีน (T) ไซโตซีน (C) และกัวนีน (G) มาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ จะสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ในทิศทางจากปลาย 5' ไป 3'[53]

7.1 ขั้นตอนในการทำ PCR

7.1.1 ขั้นตอน denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอเกลียวคู่เป็นสายเดี่ยวสองสาย ใช้อุณหภูมิประมาณ 90-97 องศาเซลเซียส

7.1.2 ขั้นตอน primer annealing ใช้อุณหภูมิประมาณ 50-60°C เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ บริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน

7.1.3 ขั้นตอน primer extension จะใช้เอนไซม์ taq polymerase สร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ต่อที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ ใช้อุณหภูมิประมาณ 72°C เป็นเวลา 2-5 นาที

ไพรเมอร์จะจับกับทั้งดีเอ็นเอต้นแบบและดีเอ็นเอสายที่สร้างขึ้นใหม่ ทำให้จำนวนดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบปฏิกิริยาจะเพิ่มเป็นสองเท่าอย่างต่อเนื่อง จนจำนวนเท่ากับ 2^n (เมื่อ n คือจำนวนรอบของการทำ PCR)[53]

7.2 องค์ประกอบในการทำ PCR

7.2.1 ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

7.2.2 ไพรเมอร์ (primer)

ไพรเมอร์จะต้องมีเบสคู่สมกันในตำแหน่งปลาย 3' และตำแหน่งปลาย 5' ของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยการจับของไพรเมอร์ต่อดีเอ็นเอเป้าหมายคือ forward primer จะจับที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวสายหนึ่ง และ reverse primer จะจับที่ปลาย 5' ของดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวอีกสายหนึ่ง ซึ่งไพรเมอร์เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides) ความยาวประมาณ 20-24 bp ไพรเมอร์ที่ดีจะมีองค์ประกอบของ G และ C อยู่ระหว่าง 40-60% และควรมีค่า melting temperature (Tm) ของทั้งสองเส้นใกล้เคียงกัน คำนวณค่า Tm โดยประมาณได้จากสูตร

Tm = [4 x (G+C)] + [2 x (A+T)] โดย G, C, A และ T คือจำนวนเบสแต่ละชนิดในสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์[54, 55]

7.2.3 เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase)

เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสควรเลือกใช้ชนิดที่ทนความร้อนได้ดี (thermostable DNA polymerase) เนื่องจากขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ต้องมีการทำให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยวด้วยความร้อน เอนไซม์ที่นิยมใช้คือ taq polymerase แยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ที่เจริญในน้ำพุร้อน สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส[56]

7.2.4 ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate, dNTPs)

dNTPs ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์ของเบส 4 ชนิดคือ A, T, C, G ที่จะใช้ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ โดยจะเตรียมเป็นสารผสมที่มีความเข้มข้นในช่วง 20-200 µM[55]

7.2.5 บัฟเฟอร์ (PCR buffer)

โดยทั่วไป PCR buffer ประกอบด้วย 50 mM KCl และ 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 ที่อุณหภูมิห้อง เตรียม buffer ความเข้มข้น 10 เท่าของที่ใช้จริง (10X) ซึ่งจะต้องใช้ 1 ใน 10 ของปริมาตรรวมในปฏิกิริยา PCR เพื่อทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X[55]

7.2.6 แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$)

แมกนีเซียมคลอไรด์ใช้เร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลต่อการจับกันของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ และมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย ถ้าความเข้มข้นน้อยเกินไปจะทำให้การจับคู่ระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบเกิดขึ้นน้อย ปฏิกิริยาจะไม่เกิดขึ้นหรือเกิดได้ไม่ดี ถ้าความเข้มข้นมากเกินไปจะทำให้การจับคู่ระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบมีความจำเพาะน้อย ทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ใช่เป้าหมายที่แท้จริงมากขึ้น ซึ่งความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในปฏิกิริยาโดยทั่วไปคือ 1.5 mM[55]

7.3 เทคนิคอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism, RFLP)

เป็นเทคนิคที่อาศัยความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอของพืชชนิดหนึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ พืชต่างชนิดกันจะมีลำดับเบสที่แตกต่างกัน เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนที่แตกต่างกัน[57] เมื่อตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงทำให้เห็น polymorphism ของดีเอ็นเอ ข้อจำกัดของวิธีนี้คือต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมาก แก้ไขข้อจำกัดนั้นได้โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP มาช่วยในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ[58]

7.4 PCR-RFLP (PCR – restriction fragment length polymorphism)

เป็นวิธีที่ใช้หาความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายแบบเฉพาะเจาะจงโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นเปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)[59]

7.5 อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอจะใช้วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส เป็นวิธีที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุโดยใช้กระแสไฟฟ้า เมื่อใส่สารที่มีประจุลงในตัวกลางในสนามไฟฟ้าที่เกิดจากขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว โมเลกุลของสารที่มีประจุจะเคลื่อนเข้าหาประจุตรงข้าม โดยโมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนไปที่ขั้วลบ และโมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนไปที่ขั้วบวก สารแต่ละชนิดจะสามารถแยกออกจากกันได้ เนื่องจากโมเลกุลของสารต่างๆ จะมีความแตกต่างของประจุ ขนาด และรูปร่างโมเลกุล ทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน[54]

7.6 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

อิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีตัวกลางเป็นเจลนิยมใช้ในการแยกกรดนิวคลีอิก เจลเกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอไรส์เซชัน (polymerization) แบบสายตรง (linear) และระหว่างสาย (cross-link) ทำให้เกิดสารประกอบพอลิเมอร์ซึ่งมีลักษณะเป็นร่างแหสามมิติที่มีรูพรุน รูพรุนของเจลต้องมีขนาดเหมาะสมกับขนาดของสารที่ต้องการแยก ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสคือ ประจุ ขนาด และรูปร่างโมเลกุลของสาร ชนิดของบัฟเฟอร์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า และความเข้มข้นของตัวกลาง[60, 61]

เจลที่นิยมใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอ คือเจลพอลิอะครีลาไมด์ (polyacrylamide gel) และเจลอะกาโรส (agarose gel) โดยเจลพอลิอะครีลาไมด์จะมีประโยชน์ในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็ก (น้อยกว่า 300–500 คู่เบส) และใช้สำหรับงานที่ต้องการความละเอียดสูง สามารถจำแนกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันแม้เพียง 1 bp อีกทั้งยังทำงานได้เร็วกว่าและที่อุณหภูมิสูงกว่าเจลอะกาโรส แต่เจลพอลิอะครีลาไมด์เป็นสารพิษต่อระบบประสาทและเป็นอันตราย ส่วนเจลอะกาโรสใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ จะมีอำนาจจำแนกต่ำกว่าเจลพอลิอะครีลาไมด์แต่มีช่วงการจำแนกสูงกว่า การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอจึงนิยมใช้อะกาโรสเป็นตัวกลาง[55, 61]

7.7 เจลอะกาโรส (agarose gel)

อิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้เจลอะกาโรสเป็นตัวกลาง อะกาโรสเป็นโพลิเมอร์ที่สกัดจากสาหร่ายทะเล ซึ่งก่อตัวเป็นเจลได้โดยใช้บัฟเฟอร์และให้ความร้อนจากนั้นปล่อยให้เย็นลง สามารถเตรียมได้ง่ายและรวดเร็ว นิยมใช้ในการศึกษากรดนิวคลีอิก เนื่องจากเจลอะกาโรสไม่เป็นพิษ และขนาดรูพรุนที่เกิดขึ้นมีความสม่ำเสมอ ความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้ขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ถ้าต้องการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ควรใช้อะกาโรสที่มีความเข้มข้นต่ำ และถ้าต้องการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กควรใช้อะกาโรสที่มีความเข้มข้นสูง การตรวจดูดีเอ็นเอใช้สารเรืองแสงที่สามารถแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ เช่น เอธิเดียมโบรไมด์ เมื่อนำไปส่องภายใต้แสง UV จะเกิดการเรืองแสง (fluorescence)[62]

ตาราง 4 แนวทางการเลือกใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสตามขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ [62]

ความเข้มข้นของอะกาโรส (%)	**ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ** (bp)
0.2	5000-40000
0.4	5000-30000
0.6	3000-10000
0.8	1000-7000
1	500-5000
1.5	300-3000
2	200-1500
3	100-1000

7.8 การใส่ดีเอ็นเอลงในเจล

เมื่อจะใส่ดีเอ็นเอลงในเจล ต้องผสมดีเอ็นเอกับ loading dye ซึ่งประกอบด้วยสารที่มีความหนาแน่นสูงและสารย้อม (dye) เพื่อไม่ให้ดีเอ็นเอฟุ้งกระจาย ทำให้สามารถติดตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสได้(62)

8. ยีนหรือดีเอ็นเอที่ใช้ในการระบุชนิดพืช

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอ ซึ่งการจัดเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแตกต่างกัน หรือเรียกว่าการเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) จึงสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพืชแต่ละชนิดได้และไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ในงานวิจัยนี้จะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน maturase K (*mat*K) เป็น DNA marker ซึ่งเป็นยีนที่แทรกอยู่ในส่วนอินทรอน (intron) ของยีน trnK ในพลาสติด (plastid) มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส เนื่องจากยีน *mat*K มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงจึงใช้จำแนกชนิดพืชได้ดี(54, 63, 64)

9. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพิสูจน์เอกลักษณ์บัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว

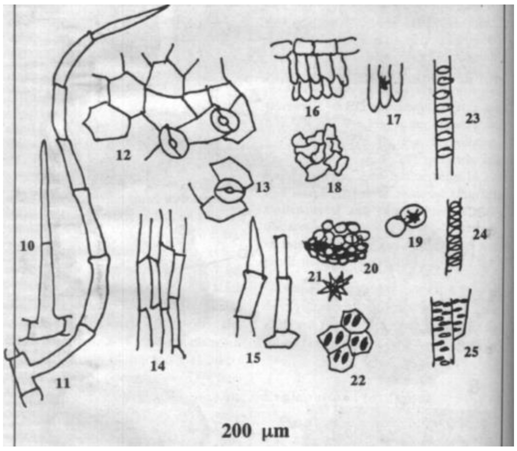
9.1 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

9.1.1 จากการสืบค้นมีการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของบัวบกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังนี้

บัวบกพบ stomata type หลายแบบ มีขนแบบเซลล์เดียว และมีท่อลำเลียงน้ำหลายแบบ ดังตาราง 5 และพบผลึกแคลเซียมออกซาเลต ดังภาพประกอบ 15 (d)(65)

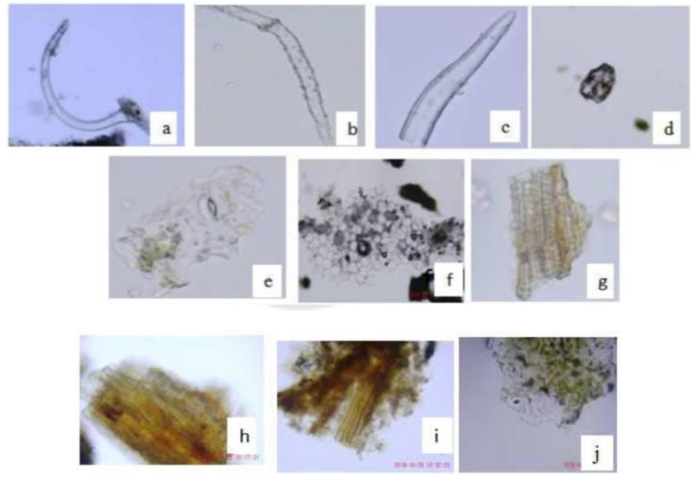
ตาราง 5 เนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของบัวบก

ปากใบ (stomata type)	**ขน** (trichome)	**ท่อลำเลียงน้ำ** (vessel and tracheid)
anisotricytic, isotricytic, tetracytic และ anomocytic ดังภาพประกอบ 14 (12 - 13)	ขนเซลล์เดียว (unicellular hair) ดังภาพประกอบ 14 (10, 11, 15)	annular, helical และ pitted thickening ดังภาพประกอบ 14 (23 - 25)(66)
anomocytic และ paracytic ดังภาพประกอบ 15 (e, j)	ขนเซลล์เดียว (unicellular hair) ดังภาพประกอบ 15 (a - c)	tracheid แบบ spiral thickening ดังภาพประกอบ 15 (g)(65)



ภาพประกอบ 14 ลักษณะเซลล์ของบัวบกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(10 - 11)uniseriate flagellate conial hairs of adaxial leaf lamina, (12 - 13) pieces of epidermal cells showing stomata, (14) pieces of costal cells, (15) bits of conical hairs, (16 - 17) pieces of leaf lamina showing epidermis and palisade parenchyma, (18) group of spongy parenchyma,(19) ground tissue showing sphaero - crystal, (20) collenchyma and parenchyma, (21) isolated sphaero – crystal, (22) ground tissue of rhizome showing starch grains, (23 – 25) pieces of tracheary elements [66]



ภาพประกอบ 15 ลักษณะเซลล์ของบัวบกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

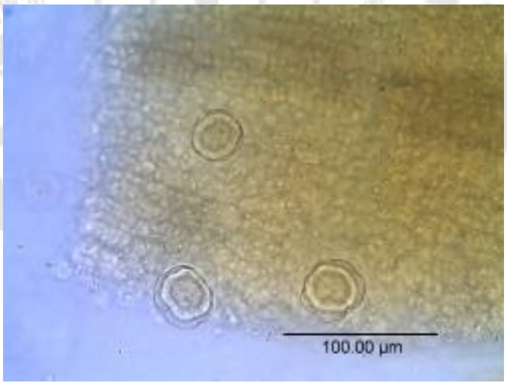
(a-c) trichomes, (d) calcium oxalate crystal, (e) anomocytic stomata, (f) spongy parenchyma with chloroplast, (g) tracheid with spiral thickening, (h) parenchyma cell,(j) paracytic stomata [65]

9.1.2 จากการสืบค้นมีการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังนี้

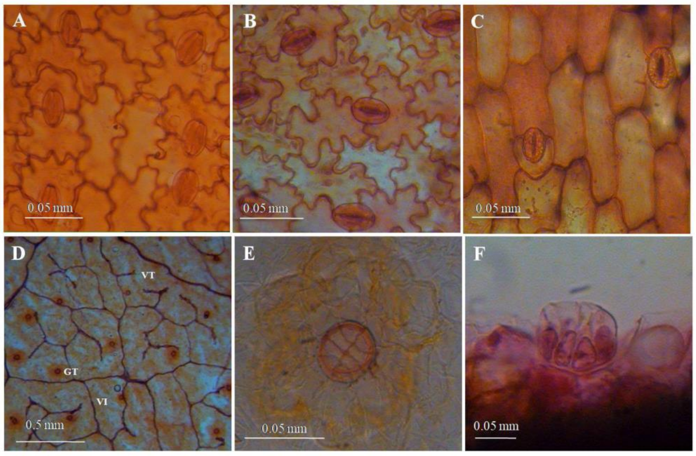
พรมมิพบ stomata type หลายแบบ มีขนแบบ glandular trichome และมีท่อลำเลียงน้ำหลายแบบ ดังตาราง 6 และพบผลึกแคลเซียมดังภาพประกอบ 18 (d)[67] ผลึกปริซึม ดังภาพประกอบ 20 (e)[68]

ตาราง 6 เนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของพรมมิ

ปากใบ (stomata type)	**ขน** (trichome)	**ท่อลำเลียงน้ำ** (vessel)
anomocytic ดังภาพประกอบ 17 (a, b, c)	glandular trichome ดังภาพประกอบ 16[69] และ 17[67] (d, e, f)	spiral xylem vessel ดังภาพประกอบ 18 (e)[67]
anomocytic ดังภาพประกอบ 19 (c)	-	scalariform vessel ดังภาพประกอบ 19 (f)[70]
anisocytic และ diacytic ดังภาพประกอบ 20 (a, b)	-	annular vessel ดังภาพประกอบ 20 (f)[68]

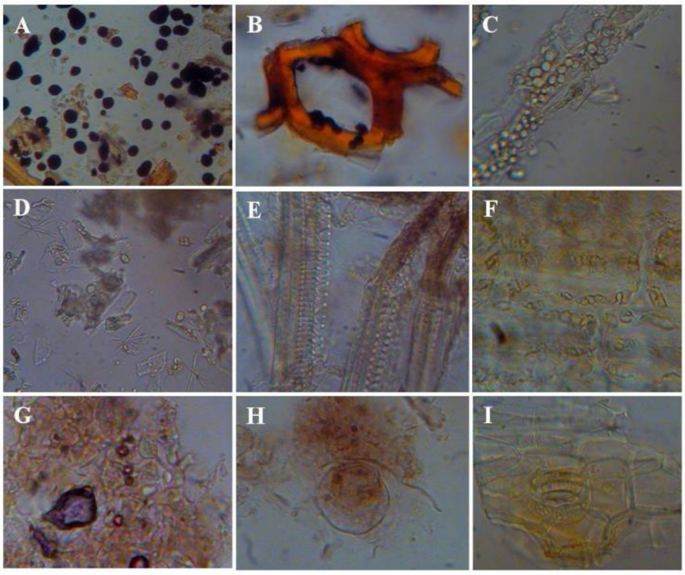


ภาพประกอบ 16 ลักษณะเซลล์ของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดง glandular trichome[69]



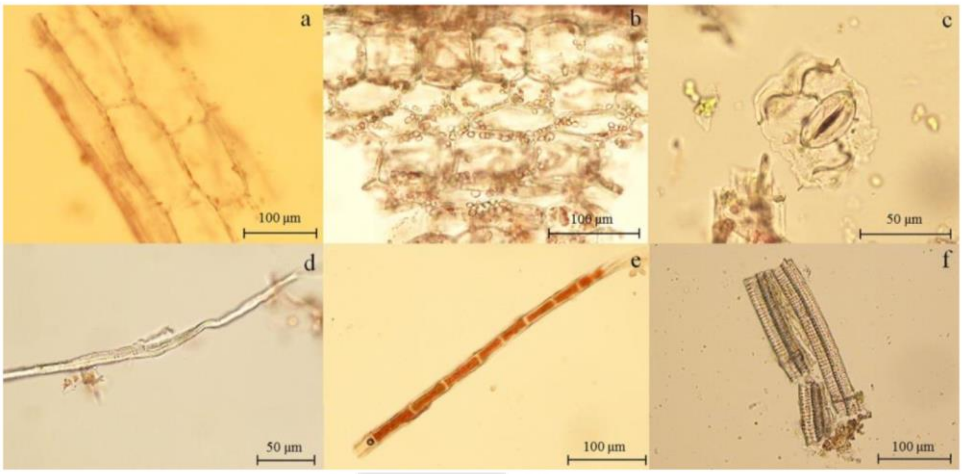
ภาพประกอบ 17 ลักษณะเซลล์ของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(A) upper epidermal cells, (B) lower epidermal cells, (C) lower epidermal cells near midrib, (D) a portion of leaf showing vein islet patterns and glandular trichomes (E) arrangement of cells in glandular trichome (F) lateral view of glandular trichome. [67]



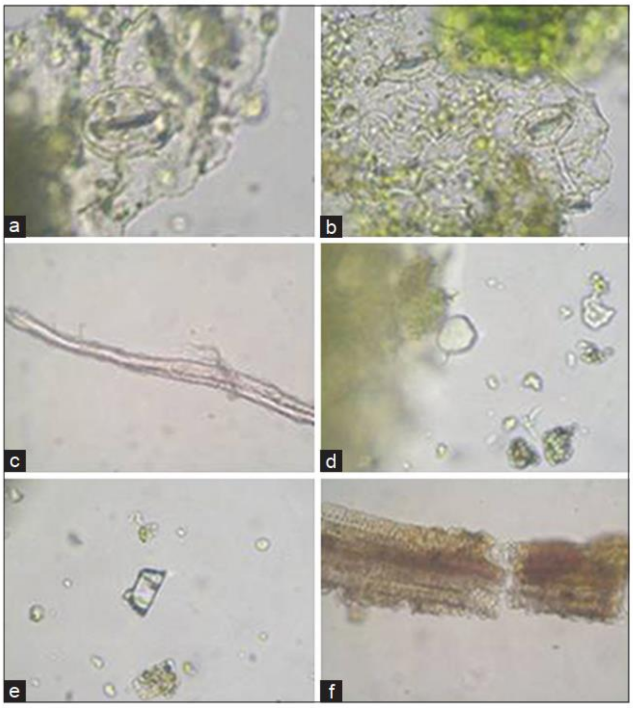
ภาพประกอบ 18 ลักษณะเซลล์ของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(A) starch granules, (B) a portion of sclerenchymatous cells, (C) series of oil globules, (D) calcium crystals, raphides and druses, (E) spirally appearing xylem vessels for water and mineral conduction, (F) calcium and magnesium deposits in the lining of wall, (G) starch and other grains, (H) upper view of trichome (I) a portion of stomata along with guard cells [67]



ภาพประกอบ 19 ลักษณะเซลล์ของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(a) epidermis, (b) parenchyma with starch grains, (c) anomocytic stoma, (d) lignified fibers, (e) sieve tube, and (f) scalariform vessel (70)

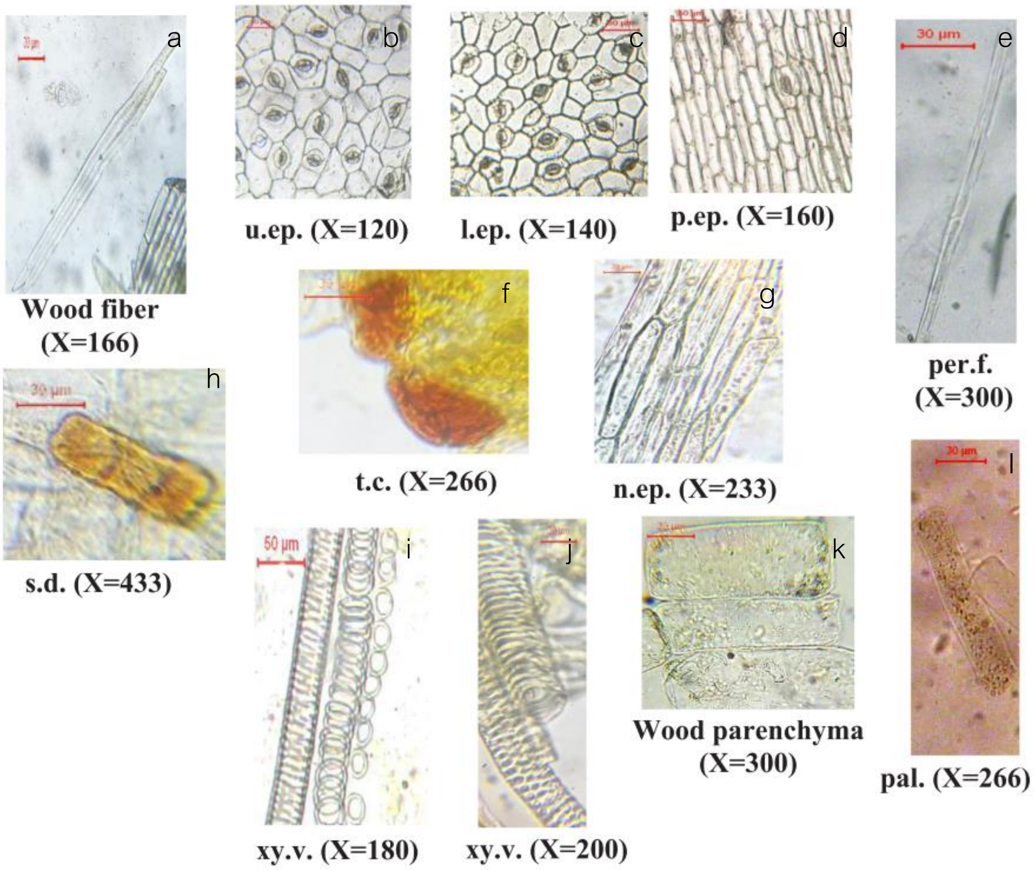


ภาพประกอบ 20 ลักษณะเซลล์ของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(a) anisocytic stomata, (b) diacytic stomata, (c) lignified fibre, (d) oil globules, (e) prismatic crystals, (f) annular vessels from vascular bundle (68)

9.1.3 จากการสืบค้นมีการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของแว่นแก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังนี้

แว่นแก้วพบ stomata type ดังภาพประกอบ 21 (b, c, d, g) พบ vessels ดังภาพประกอบ 21 (i, j) และพบ wood fibres และ pericyclic fibres ดังภาพประกอบ 21 (a, e)[33]



ภาพประกอบ 21 ลักษณะเซลล์ของแว่นแก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(a) wood fiber, (b) upper leaf epidermis, (c) lower leaf epidermis, (d) petiole epidermis, (e) pericyclic fibres, (f) tannin cells, (g) neural epidermis, (h) secretory ducts, (i-j) xylem vessels, (k) wood parenchyma, and (l) palisade cells [33]

หมายเหตุ : X คือ กำลังขยายของเลนส์ใกล้ตาคูณกับกำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุ

จากการสืบค้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าพรมมิมีลักษณะพิเศษคือขนแบบ glandular trichome ขอบของปากใบมีลักษณะหยัก พบผลึกแคลเซียมและผลึกปริซึม ส่วนบัวบกนั้นพบผลึกแคลเซียมออกซาเลต และในส่วนแว่นแก้วพบงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพียง 1 งานวิจัย ซึ่งไม่มีการระบุลักษณะพิเศษที่จะทำให้สามารถแยกออกจากบัวบกและพรมมิได้ จึงควรทำการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อหาลักษณะพิเศษของพืชแต่ละชนิดต่อไป

9.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค HPTLC

มีการศึกษาวิจัยนำสมุนไพรบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วมาวิเคราะห์ด้วย HPTLC จึงได้นำมาเสนอข้อมูลการใช้วัฏภาคคงที่ วัฏภาคเคลื่อนที่ ความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวัด สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารอนุพันธ์ ดังตารางต่อไปนี้

ตาราง 7 สภาวะการวิเคราะห์สารสกัดบัวบกด้วยเทคนิค HPTLC

Stationary phase	Mobile phase	Detection wavelength	Derivatization reagent
silica gel $60F_{254}$ aluminum sheets	dichloromethane: methanol: water (14:6:1)	254 nm, 366 nm, white light	anisaldehyde sulphuric acid[71]
silica gel $60F_{254}$ aluminum sheets	toluene: ethyl acetate: methanol: glacial acetic acid (2:7:3:1)	595 nm	anisaldehyde sulphuric acid[72]
silica gel $60F_{254}$ aluminum sheets	chloroform: glacial acetic acid methanol: water (5.5:3:0.5:0.4)	254 nm, 366 nm	p-anisaldehyde reagent[73]
silica gel $60F_{254}$ aluminum sheets	ethyl acetate: methanol: water (10:2.5:1)	254 nm, 366 nm, visible light	5% aqueous H_2SO_4[74]
silica gel $60F_{254}$ aluminum sheets	n-butanol: ethyl acetate: water (4:1:5)	600 nm	-[10]

ตาราง 8 สภาวะการวิเคราะห์สารสกัดพรมมิด้วยเทคนิค HPTLC

Stationary phase	Mobile phase	Detection wavelength	Derivatization reagent
silica gel $60F_{254}$ aluminum sheets	dichloromethane: methanol: water (14:6:1)	254 nm, 366 nm, white light	anisaldehyde sulphuric acid[75]
silica gel $60F_{254}$ aluminum sheets	chloroform: methanol: water (18: 9: 0.6)	540 nm	-[76]
silica gel $60F_{254}$ aluminum sheets	dichloromethane: methanol: water (4.5: 1.0: 0.1)	225 nm	-[77]
silica gel $60F_{254}$ aluminum sheets	butanol: acetic acid: water (4:1:5)	580 nm	anisaldehyde-sulfuric acid[23]
silica gel $60F_{254}$ aluminum sheets	dichloromethane: methanol: water (4.5:1.0:0.1)	254 nm, 366 nm	vanillin sulfuric acid[68]

ตาราง 9 สภาวะการวิเคราะห์สารสกัดแว่นแก้วด้วยเทคนิค HPTLC

Stationary phase	Mobile phase	Detection wavelength	Derivatization reagent
silica gel $60F_{254}$ aluminum sheets	ไม่ระบุ	254 nm, 366 nm	p-anisaldehyde /sulfuric acid[33]

จากการสืบค้นมีงานวิจัย[71] ที่วิเคราะห์บัวบกและพรมมิด้วยเทคนิค HPTLC เปรียบเทียบกัน โดยนำสมุนไพรบัวบกและพรมมิมาสกัดโดยผสมตัวอย่างผง 1 กรัมกับเมทานอล 10 มิลลิลิตร sonicate เป็นเวลา 10 นาทีและปั่นเหวี่ยงสารละลายด้วย centrifuge และใช้ส่วนลอยเหนือตะกอนเป็นสารละลายทดสอบด้วยเทคนิค high-performance thin-layer chromatographic (HPTLC) โดยใช้ mobile phase เป็น dichloromethane, methanol, water อัตราส่วน 14:6:1 (v/v/v) ศึกษาภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254, 366 นาโนเมตร และแสงขาว จากนั้นใช้ derivatization reagent เป็น anisaldehyde และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3 นาที นำมาศึกษาภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร และภายใต้แสงขาว โดยใช้ specific marker(s) เป็นสารเปรียบเทียบ ได้แก่ madecassoside, asiaticoside, bacopaside I, bacopaside II, bacoside A3 , bacopasaponin C, bacopaside X, madecassic acid, asiatic acid และ bacosine เมื่อใช้ derivatization reagent เป็น anisaldehyde ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสารให้เป็นอนุพันธ์ที่ตรวจวัดได้ จากนั้นนำมาศึกษาภายใต้แสงขาว ทำให้สามารถเห็นแถบที่ชัดเจน พบว่า HPTLC profiles ของ *Centella asiatica* และ *Bacopa monnieri* มีแถบตรงกับ specific marker(s) ต่างชนิดกัน แสดงว่าสภาวะการวิเคราะห์ที่ใช้มีความเหมาะสมในการแยกบัวบกออกจากพรมมิ

9.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่างานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวบก 3 รายการ[78-80] งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพรมมิ 4 รายการ[81-84] และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแว่นแก้ว 1 รายการ[33] งานวิจัยเหล่านั้นใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการวิเคราะห์พืชชนิดเดียวกัน แต่มาจากแหล่งปลูกหรือชนิดพันธุ์ (variety) ต่างกัน และเป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการวิเคราะห์สารพันธุกรรมทั้งหมด (Whole genome) จึงมีโอกาสพบการเปลี่ยนแปลงหรือความผันแปรของลำดับเบสได้ง่าย จึงสามารถจำแนกพืชจากแหล่งต่าง ๆ หรือชนิดพันธุ์ต่าง ๆ ได้ แต่ในงานวิจัยนี้จะใช้ยีนใดยีนหนึ่งที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ แม้ว่าพืชนั้น ๆ จะมาจากแหล่งปลูกต่างกันหรือต่างชนิดพันธุ์

จากการสืบค้นมีงานวิจัยที่ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวบกจากหลายแหล่ง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของบัวบกทุกแหล่งเหมือนกัน[85] และจากการสืบค้นข้อมูลบัวบกในฐานข้อมูล GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K จำนวน 20 ข้อมูล เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม blastn พบว่ามีลำดับเบสที่เหมือนกันมากกว่า 99% จำนวน 19 ข้อมูล ข้อมูลพรมมิในฐานข้อมูล GenBank มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K จำนวน 12 ข้อมูล เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม blastn พบว่ามีลำดับเบสที่เหมือนกันมากกว่า 99% จำนวน 11 ข้อมูล ข้อมูลแว่นแก้วในฐานข้อมูล GenBank มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K จำนวน 4 ข้อมูล เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม blastn พบว่ามีลำดับเบสที่เหมือนกัน 100% จำนวน 4 ข้อมูล

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชทั้ง 3 ชนิดมาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) พบว่ายีน *mat*K มีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ระหว่างบัวบกกับพรมมิ เท่ากับ 80.72 % ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างบัวบกกับแว่นแก้ว เท่ากับ 81.53 % และค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างพรมมิกับแว่นแก้ว เท่ากับ 80.22 % แสดงว่ายีน *mat*K น่าจะสามารถแยกความแตกต่างของพืชทั้ง 3 ชนิดได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

1.1 สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา

1) พืชต้นแบบ (authentic plants) ได้แก่ บัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว ปลูกที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และได้จัดเก็บตัวอย่างพืชแห้งไว้ที่ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ โดยมีหมายเลขสำหรับบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว ดังนี้ WSCA01, WSBM01 และ WSHU01 ตามลำดับ

2) ผลิตภัณฑ์สมุนไพร เลือกผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่จำหน่ายทางอินเตอร์เนต โดยใช้คำค้น สมุนไพรบัวบก และสมุนไพรพรมมิ คัดเลือกตัวอย่างที่ราคาไม่เกิน 100 บาท จากร้านค้าที่น่าเชื่อถือ ได้ตัวอย่างจำนวน 8 ตัวอย่าง ดังนี้

2.1) ผงสมุนไพรบัวบกบรรจุแคปซูล (ปราจีนบุรี ประเทศไทย)

2.2) ผงสมุนไพรบัวบกบรรจุแคปซูล (ปราจีนบุรี ประเทศไทย)

2.3) ชาสมุนไพรบัวบก บรรจุซอง (ประเทศไทย)

2.4) ชาสมุนไพรบัวบก บรรจุซอง (นครปฐม ประเทศไทย)

2.5) ชาสมุนไพรบัวบก บรรจุซอง (ปราจีนบุรี ประเทศไทย)

2.6) ผงสมุนไพรบัวบกสำหรับแบ่งบรรจุ (กรุงเทพฯ ประเทศไทย)

2.7) ชาสมุนไพรพรมมิ (ศรีสะเกษ ประเทศไทย)

2.8) ต้นแห้งพรมมิ (ประเทศไทย)

1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ
สำหรับการศึกษาลักษณะเซลล์

1) กล้องจุลทรรศน์ พร้อมชุดถ่ายภาพ (Nikon eclipse, E200, Japan)

2) กระจกสไลด์ และ cover slip

สำหรับการศึกษาลายพิมพ์สารเคมี

1) TLC sampler (CAMAG, Linomat 5, Switzerland)

2) automatic developing chamber (CAMAG, ADC 2, Switzerland)

3) derivatizer (CAMAG, Switzerland)

4) TLC plate heater (CAMAG 3, Switzerland)

5) TLC visualizer (CAMAG 2, Switzerland)

6) twin trough chamber (CAMAG, Switzerland)

7) HPTLC silica gel 60 F254 plates (Merck, Germany)

8) เครื่องชั่งทศนิยม 6 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, XPR26, Switzerland)

9) บีกเกอร์ (Duran, Germany)

10) ปิเปต (HBG, Germany)

11) กระดาษกรอง (Whatman, England)

สำหรับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, ML204, Switzerland)

2) micropipettes (Biohit, Proline, Finland)

3) micropipettes (NICHIRYO, Nichipet EX, Japan)

4) microwave oven (Turbora, TRX-4314)

5) centrifuge (Hettich Zentrifugen, Universal 32 R, Germany)

6) FastPrep-24™ Classic bead beating grinder and lysis system (MP Biomedicals, USA)

7) electrophoresis system (Advance, Mupid®-exu, Japan)

8) dry bath incubator (Major Science, cool-hotter, Taiwan)

9) vortex mixer (witeg Wisd, Germany)

10) PCR thermocycler (Biometra, T-Gradient, Germany)

11) ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, Sweden)

12) ขวดแก้ว 250 mL (Duran, Germany)

13) เม็ด bead

14) pipette tips

15) paraffin film

16) 1.5 ml microcentrifuge tube

17) 2 ml collection tube

1.3 สารเคมี

สำหรับการศึกษาลักษณะเซลล์

1) chloral hydrate

2) glycerin water

สำหรับการศึกษาลายพิมพ์สารเคมี

1) สารมาตรฐาน asiaticoside (Lot No. 17606, PhytoLab, Germany)

2) สารมาตรฐาน bacoside A3 (Lot No. CFS202201, ChemFaces, China)

3) สารมาตรฐาน quercetin dihydrate (Lot No. 0 0 G706, European Pharmacopoeia Reference Standard, France)

4) methanol

5) ethanol

6) dichloromethane

7) p-anisaldehyde

สำหรับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1) agarose (GeneMate, USA)

2) TAE buffer (Invitrogen, USA)

3) SYBR Safe DNA gel stain 10,000X concentrate in DMSO (Invitrogen, USA)

4) gel loading dry purple (6X) (BioLabs, England)

5) genomic DNA mini kit (plant) (Geneaid, Taiwan)

6) AccuStart™ II GelTrack™ PCR SuperMix (2X) (Quantabio, Germany)

7) universal DNA purification kit (Tiangen, China)

8) 10X rCutSmart™ buffer (New England Biolabs, England)

9) DNA marker 100 bp DNA ladder (Invitrogen, USA)

10) forward primer และ reverse primer (Eurofins Scientific, Luxembourg)

11) เอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Bam*H1, *Sph*1 และ *Bsp*D1) (New England Biolabs, England)

2. วิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 การศึกษาลักษณะเซลล์พืชของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.1.1 วิธีการเตรียมสไลด์แบบลอกผิวใบ

1) นำใบมาแช่ใน chloral hydrate

2) หยิบใบมาวางบนสไลด์ และหยด glycerin water 1-2 หยด

3) ปิดด้วย cover slip แล้วซับน้ำยาที่ล้นออกมา ด้วยกระดาษทิชชู

2.1.2 วิธีการเตรียมสไลด์แบบผงจากส่วนเหนือดิน

1) นำผงสมุนไพรตักไว้บนสไลด์ที่เตรียมไว้

2) หยด chloral hydrate ลงบนสไลด์ 1-2 หยด

3) นำไปอังกับเปลวไฟ และใช้เข็มเขี่ย

4) หยด glycerine water 1-2 หยด

5) ปิดด้วย cover slip แล้วซับน้ำยาที่ล้นออกมา ด้วยกระดาษทิชชู

2.1.3 ถ่ายภาพด้วยชุดถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

2.1.4 วาดภาพจากรูปที่ถ่ายได้

2.2 การศึกษาลายพิมพ์สารเคมีของบัวบกออกจากพรมมิและแว่นแก้ว โดยใช้เทคนิค high-performance thin-layer chromatography (HPTLC)

2.2.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

1) ชั่ง asiaticoside 1 มิลลิกรัม ลงในหลอดที่มีฝาปิด เติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร

2) ชั่ง bacoside A3 1 มิลลิกรัม ลงในหลอดที่มีฝาปิด เติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร

3) ชั่ง quercetin dihydrate 1 มิลลิกรัม ลงในหลอดที่มีฝาปิด เติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร

4) นำทั้ง 3 หลอดมา sonicate เป็นเวลา 10 นาที

2.2.2 การเตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพืชสดทั้ง 3 ชนิด คือบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ มาเตรียมโดยนำมาอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปั่นด้วยโถปั่นและนำมาชั่ง 1 กรัม เติมเมทานอล 10 มิลลิลิตร sonicate เป็นเวลา 10 นาที และปั่นเหวี่ยงสารละลายด้วย centrifuge และใช้ส่วนลอยเหนือตะกอนเป็นสารละลายทดสอบ

การเตรียมตัวอย่างจากผลิตภัณฑ์สมุนไพร ทำได้โดยนำตัวอย่างสมุนไพรมาชั่ง 1 กรัม เติมเมทานอล 10 มิลลิลิตร sonicate เป็นเวลา 10 นาที และปั่นเหวี่ยงสารละลายด้วย centrifuge และใช้ส่วนลอยเหนือตะกอนเป็นสารละลายทดสอบ

2.2.3 การวิเคราะห์หาระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการจำแนกบัวบกออกจากพรมมิและแว่นแก้วด้วยเทคนิค HPTLC

ฉีดพ่นสารมาตรฐานและสารสกัดจากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บน HPTLC plates silica gel 60 F254 ด้วยเครื่อง TLC sampler และนำแผ่นมา developing ด้วยเครื่อง auto developing chamber เป็นระยะทาง 9 เซนติเมตร โดยใช้ mobile phase dichloromethane: methanol: water ปรับอัตราส่วนเป็น 14:6:1, 15:5:1 และ 17:3:1 (v/v/v) จากนั้นนำแผ่นมาพ่นด้วย p-anisaldehyde และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาถ่ายรูปด้วยเครื่อง TLC visualizer ซึ่งกระบวนการทั้งหมดควบคุมโดยโปรแกรม visionCATS

2.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว

2.3.1 การสกัด DNA จาก authentic plant และผลิตภัณฑ์สมุนไพร

วิธีสกัดเป็นไปตามวิธีของชุด genomic DNA mini kit (plant) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 tissue dissociation

นำใบพืชสด/ผลิตภัณฑ์สมุนไพรมาใส่ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube พร้อมเม็ด bead ปิเปต GP1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงในหลอด และผสมให้เข้ากันด้วย vortex บดโดยใช้เครื่อง FastPrep-24™ ความเร็วรอบ 4.0 เมตรต่อวินาที เป็นเวลา 10 วินาที บ่มโดยใช้เครื่อง cool-hotter dry bath incubator ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กลับหลอดไป-มาทุก ๆ 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 lysis

ปิเปต GP2 buffer 100 ไมโครลิตรลงในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันด้วย vortex นำไป incubate on ice เป็นเวลา 3 นาที นำมา centrifuge อัตราเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที นำมากรองโดยเทสารละลายลงใน filter column ที่อยู่ใน 2 ml collection tube จากนั้น centrifuge เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง filter column เทสารละลายจาก 2 ml collection tube ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube ใหม่

ขั้นตอนที่ 3 DNA binding

ปิเปต GP3 buffer ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทันที เป็นเวลา 5 วินาที ปิเปตสารละลายปริมาตร 700 ไมโครลิตรลงใน GD column ที่อยู่ใน 2 ml collection tube จากนั้น centrifuge เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายใน 2 ml collection tube ทิ้ง ปิเปตสารละลายที่เหลือลงใน GD column centrifuge เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายใน 2 ml collection tube ทิ้ง

ขั้นตอนที่ 4 wash

ปิเปต W1 buffer 400 ไมโครลิตรลงใน GD column และ centrifuge เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน 2 ml collection tube ทิ้ง ปิเปต wash buffer 600 ไมโครลิตรลงใน GD column และ centrifuge เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน 2 ml collection tube ทิ้ง จากนั้น centrifuge เป็นเวลา 3 นาที

ขั้นตอนที่ 5 DNA elution

นำ GD column ย้ายมาใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube ใหม่ ปิเปต elution buffer ที่ให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียสไว้ 100 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ GD column ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที จากนั้น centrifuge เป็นเวลา 1 นาที

2.3.2 การทำ polymerase chain reaction (PCR)

การทำ PCR เป็นไปตามวิธีของชุด AccuStart™ II GelTrack™ PCR SuperMix (2X) ดังนี้

จากการเปรียบเทียบตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอใช้ยีน *mat*K เป็น DNA template และใช้

forward primer CENMATKS 5'-TATGTGAATACGAATCCATCTTCGTC-3' และ reverse primer CENMATKR 5'-TTACAAAATTTCGCTTTAGCCAATGA-3'

ขั้นตอนการทำ PCR สำหรับ 1 reaction คือ ปิเปตน้ำ 38 ไมโครลิตร, AccuStart™ II GelTrack™ PCR SuperMix (2X) 50 ไมโครลิตร, forward primer 4 ไมโครลิตร และ reverse primer 4 ไมโครลิตร ลงใน tube ผสมให้เข้ากัน centrifuge 20 วินาที ปิเปตดีเอ็นเอ 4 ไมโครลิตร ลงไปใน tube ผสมให้เข้ากัน และ centrifuge 20 วินาที

นำ tube มาใส่ในเครื่อง PCR thermocycler ตั้งค่าอุณหภูมิและเวลา ดังนี้

- initial DNA denaturation	94°C, 3 นาที	
- DNA denaturation	94°C, 30 วินาที	30 รอบ
- primer annealing	50°C, 30 วินาที	
- primer extension	72°C, 1 นาที	
- final primer extension	72°C, 3 นาที	

2.3.3 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์เป็นไปตามวิธีของชุด universal DNA purification kit ดังนี้

1) ปิเปต buffer BL 500 ไมโครลิตรลงใน spin column CB2 ที่อยู่ใน 2 ml collection tube นำไป centrifuge เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน 2 ml collection tube ทิ้ง

2) ปิเปต PCR product และ buffer PC ในปริมาตรเท่า ๆ กัน ผสมให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายดังกล่าวลงใน spin column CB2 ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไป centrifuge เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน 2 ml collection tube ทิ้ง

3) ปิเปต buffer PW 600 ไมโครลิตร ลงใน spin column CB2 นำไป centrifuge เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน 2 ml collection tube ทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง จากนั้น centrifuge เป็นเวลา 2 นาที นำ 2 ml collection tube ทิ้ง

4) นำ spin column CB2 มาใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube ปิเปต buffer EB 50 ไมโครลิตรลงตรงกลางของ spin column CB2 ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที centrifuge เป็นเวลา 2 นาที นำ spin column CB2 ทิ้ง และนำสารละลายใน 1.5 ml microcentrifuge tube มาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

2.3.4 การตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้และการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

1) เตรียม 1.2% agarose gel โดยชั่งผงวุ้น agarose 0.30 กรัม ใส่ในขวดเตรียม agarose gel เติมสารละลาย 1X TAE buffer 25 มิลลิลิตร สำหรับตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้และ PCR product

2) เตรียม 2.5% agarose gel โดยชั่งผงวุ้น agarose 0.625 กรัม ใส่ในขวดเตรียม agarose gel เติมสารละลาย 1X TAE buffer 25 มิลลิลิตร สำหรับตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

3) ให้ความร้อนโดยใช้ microwave จนกระทั่งสารละลายใสเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อสารละลายเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 60°C เติม SYBR Safe DNA gel stain 0.1 µL จากนั้นเท agarose gel ลงในถาดเตรียมเจล แล้วทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

4) วางถาดเจลที่เตรียมไว้ลงในเครื่อง mupid-exu electrophoresis system แล้วเติมสารละลาย 1X TBE buffer ให้ท่วมเจลพอดี

5) นำตัวอย่างดีเอ็นเอและ PCR product ที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร แล้วปิเปตลงในหลุมเจลจนครบทุกตัวอย่าง

6) ปิเปต DNA marker (100 bp DNA ladder) 5 ไมโครลิตรลงในหลุม

7) เปิดเครื่อง mupid-exu electrophoresis system โดยการปรับการทำงานที่ 100 โวลต์เป็นเวลา 20 นาที

8) นำ agarose gel มาถ่ายภาพภายใต้รังสี UV โดยใช้เครื่อง ImageQuant LAS 4000 mini

2.3.5 การจำแนกพืชทั้ง 3 ชนิดด้วย PCR-RFLP

1) ตรวจสอบยืนยันลำดับเบสของพืชทั้ง 3 ชนิด โดยการทำ DNA sequencing (ส่งวิเคราะห์ที่บริษัท macrogen)

2) ตรวจสอบความถูกต้อง โดยใช้โปรแกรม blastn

3) เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยวิเคราะห์หาเอนไซม์ที่จำเพาะในพืชแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรม webcutter

4) ตัดดีเอ็นเอที่เลือกไว้ของพืชต้นแบบและผลิตภัณฑ์สมุนไพรด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Bam*H1, *Sph*1 และ *Bsp*D1) โดยใช้ 10X rCutSmart™ buffer ในการเกิดปฏิกิริยา บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

บทที่ 4
ผลการดำเนินงานวิจัย

1. ลักษณะตัวอย่างของบัวบก พรมมิ แว่นแก้วและผลิตภัณฑ์สมุนไพร

ตำรายามาตรฐานสมุนไพรไทยกำหนดให้ใช้ส่วนเหนือดินของบัวบกในการผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร บัวบกมีใบเดี่ยวก้านใบยาว ใบรูปกลม (orbicular) หรือรูปไต (reniform) ขอบใบหยัก ผิวเรียบ ส่วนพรมมิและแว่นแก้วไม่ได้ถูกกำหนดไว้ในตำรายามาตรฐานสมุนไพรไทย พรมมิมีใบเดี่ยวขนาดเล็กมีความมันเงาเรียงตรงข้ามกันบนลำต้น ขอบใบเรียบมน แว่นแก้วมีใบเดี่ยวรูปกลม ผิวเรียบ ขอบใบหยัก ก้านใบทรงกระบอกยาวเรียวติดกับตัวใบที่บริเวณกลางใบ ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว (authentic plants) ดังภาพประกอบ 22

ภาพประกอบ 22 แสดงตัวอย่างสมุนไพร (authentic plants) ได้แก่ (a) บัวบก (b) พรมมิ และ (c) แว่นแก้ว

ผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา ได้จากการคัดเลือกผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่จำหน่ายทางอินเตอร์เนต โดยใช้คำค้น สมุนไพรบัวบก และสมุนไพรพรมมิ คัดเลือกตัวอย่างที่ราคาไม่เกิน 100 บาท จากร้านค้าที่น่าเชื่อถือ สำหรับผลิตภัณฑ์สมุนไพรพรมมิที่มีจำหน่าย ส่วนใหญ่เป็นสารสกัด จึงไม่ได้นำมาศึกษา ได้ตัวอย่างจำนวน 8 ตัวอย่าง ดังนี้ ผงสมุนไพรบัวบกบรรจุแคปซูลจำนวน 2 ตัวอย่าง (กำหนดให้เป็นตัวอย่างหมายเลข 1 และ 2) ชาสมุนไพรบัวบกบรรจุซองจำนวน 3 ตัวอย่าง (กำหนดให้เป็นตัวอย่างหมายเลข 3, 4 และ 5) ผงสมุนไพรบัวบกสำหรับแบ่งบรรจุ จำนวน 1 ตัวอย่าง (กำหนดให้เป็นตัวอย่างหมายเลข 6) ชาสมุนไพรพรมมิ จำนวน 1 ตัวอย่าง (กำหนดให้เป็นตัวอย่างหมายเลข 7) และต้นแห้งพรมมิ จำนวน 1 ตัวอย่าง (กำหนดให้เป็นตัวอย่างหมายเลข 8) ทุกตัวอย่างมีฉลากระบุชื่อสมุนไพรชัดเจน ยกเว้นตัวอย่างหมายเลข 3

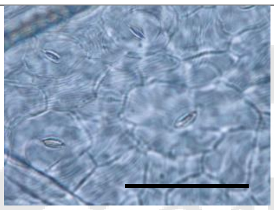
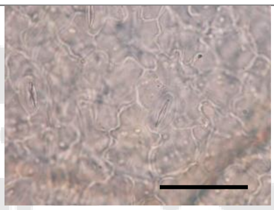
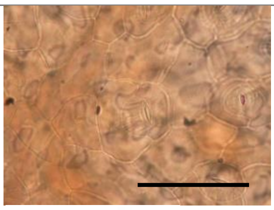
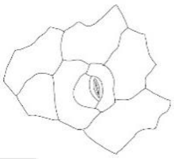
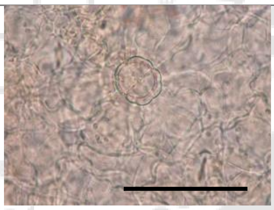
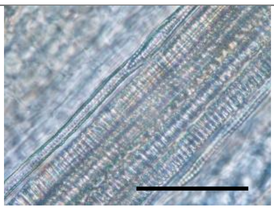
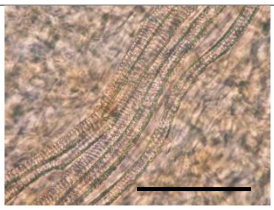
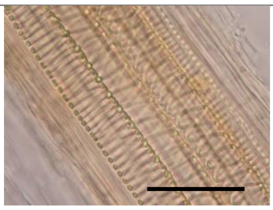
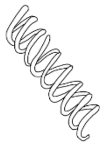
เมื่อได้รับผลิตภัณฑ์พบว่าไม่มีฉลาก ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร ภาพประกอบ 23

ภาพประกอบ 23 แสดงตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพร ได้แก่ (a, b) ตัวอย่างหมายเลข 1 และ 2 ผงสมุนไพรบัวบกบรรจุแคปซูล (c, d, e) ตัวอย่างหมายเลข 3, 4 และ 5 ชาสมุนไพรบัวบกบรรจุซอง (f) ตัวอย่างหมายเลข 6 ผงสมุนไพรบัวบกสำหรับแบ่งบรรจุ (g) ตัวอย่างหมายเลข 7 ชาสมุนไพรพรมมิ และ (h) ตัวอย่างหมายเลข 8 ต้นแห้งพรมมิ

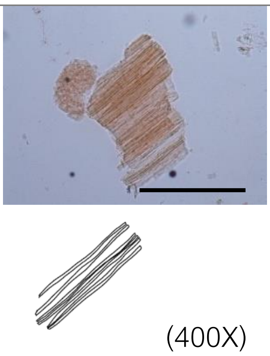
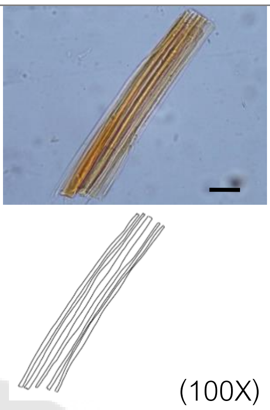
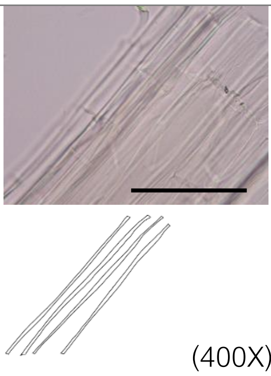
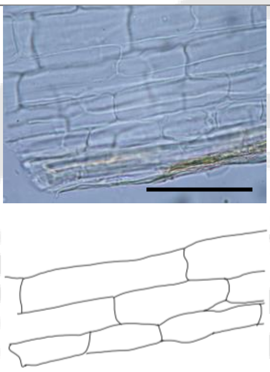
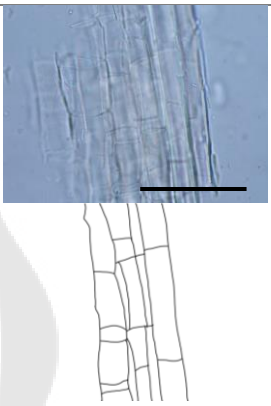
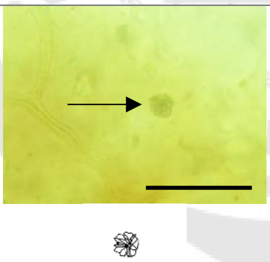
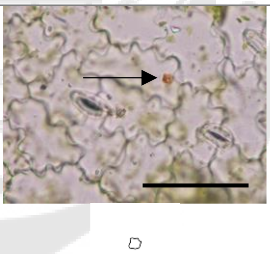
2. ผลการศึกษาลักษณะเซลล์พืชของบัวบก พรมมิ แว่นแก้วและผลิตภัณฑ์สมุนไพรด้วยกล้องจุลทรรศน์

ศึกษาลักษณะเซลล์พืชของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ผลดังตาราง 10

ตาราง 10 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์

	บัวบก	**พรมมิ**	**แว่นแก้ว**
ปากใบ (stomata type)	 (400X) anomocytic stomata	 (400X) anomocytic stomata	  (400X) paracytic stomata
ขน (trichome)	 (400X) unicellular trichome	 (400X) glandular trichome	 (400X) unicellular trichome
ท่อลำเลียงน้ำ (vessel)	 (400X) spiral vessel	 (400X) spiral vessel	  (400X) spiral vessel

ตาราง 10 (ต่อ)

เส้นใย (fibers)	 (400X)	 (100X)	 (400X)
epidermis **(บริเวณก้านใบ)**	 (400X)	(400X)	 (400X)
ผลึก (crystals) **พบที่** epidermis **บริเวณแผ่นใบ**	 (400X)	 (400X)	(400X)

หมายเหตุ เครื่องหมายขีดในรูปแสดงถึง scale ขนาด 0.01 มิลลิเมตร

เมื่อนำใบบัวบกมาลอกผิวใบ จะพบ epidermis โดยพบปากใบ (stomata) ซึ่งปากใบจะประกอบด้วย guard cell, subsidiary cell และ epidermal cell ที่มีเซลล์ล้อมรอบปากใบจำนวนตั้งแต่ 3 เซลล์ขึ้นไป ซึ่งไม่ได้เรียงตัวอย่างมีลักษณะเฉพาะ (anomocytic stomata) ลักษณะเนื้อเยื่อของบัวบกเมื่อบดเป็นผง จะพบ epidermis พบปากใบ และพบขน (trichome) ที่เป็นเซลล์ 1 เซลล์ (unicellular trichome) พบท่อลำเลียงน้ำมีลักษณะเป็นเกลียว (spiral vessel) พบเส้นใย (fibers) ซึ่งมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ยาวเรียวแหลม และพบผลึก (crystals) ที่คล้ายกับ rosette aggregate crystals ที่มีรายงานไว้ใน THP ว่าพบในบัวบก

เมื่อลอกผิวใบของพรมมิ จะพบ epidermis โดยพบปากใบที่มีเซลล์ล้อมรอบปากใบจำนวนตั้งแต่ 3 เซลล์ขึ้นไป ซึ่งไม่ได้เรียงตัวอย่างมีลักษณะเฉพาะ (anomocytic stomata) และขอบปากใบมีลักษณะหยัก ลักษณะเนื้อเยื่อของพรมมิเมื่อบดเป็นผง จะพบ epidermis พบปากใบ และพบขนชนิดมีต่อม (glandular trichome) พบท่อลำเลียงน้ำมีลักษณะเป็นเกลียว (spiral vessel) พบเส้นใย (fibers) ซึ่งมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ยาวเรียวแหลม และพบผลึก (crystals)

เมื่อนำใบแว่นแก้วมาลอกผิวใบ จะพบ epidermis โดยพบปากใบที่มีเซลล์ล้อมรอบปากใบจำนวน 2 เซลล์ขนานกับปากใบ (paracytic stomata) ลักษณะเนื้อเยื่อของแว่นแก้วเมื่อบดเป็นผง จะพบ epidermis พบปากใบ และพบขนที่เป็นเซลล์ 1 เซลล์ (unicellular trichome) พบท่อลำเลียงน้ำมีลักษณะเป็นเกลียว (spiral vessel) พบเส้นใย (fibers) ซึ่งมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ยาวเรียวแหลม และพบผลึก (crystals)

จากตาราง 10 พบว่าพรมมิมีลักษณะเนื้อเยื่อที่แตกต่างจากบัวบกและแว่นแก้วอย่างชัดเจน เนื่องจาก epidermal cell ของพรมมิมีลักษณะหยัก อีกทั้งพรมมิมีขนแบบ glandular trichome แต่บัวบกและแว่นแก้วพบว่ามีขนแบบเซลล์เดียว ในส่วนที่แตกต่างของบัวบกและแว่นแก้วที่พบคือ บัวบกพบ stomata type แบบ anomocytic ส่วนแว่นแก้วพบ stomata type แบบ paracytic แต่จากการทบทวนวรรณกรรมบัวบกมีการพบ stomata type หลายแบบ โดยมีแบบ paracytic ด้วย จากการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว สามารถจำแนกพรมมิออกจากบัวบกและแว่นแก้วได้ แต่ยังไม่สามารถจำแนกบัวบกและแว่นแก้วออกจากกันได้

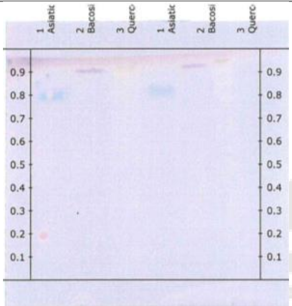
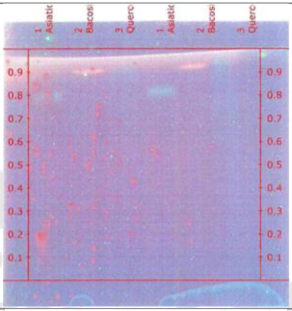
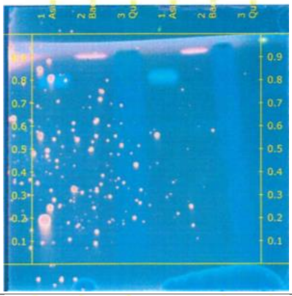
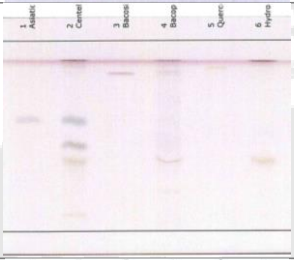
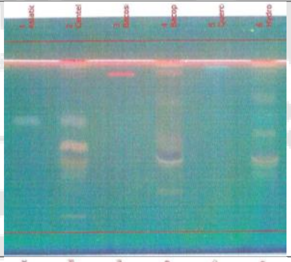
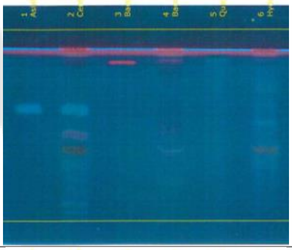
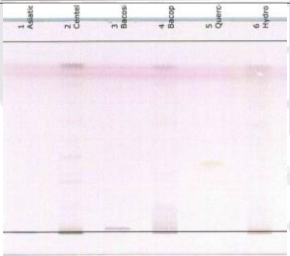
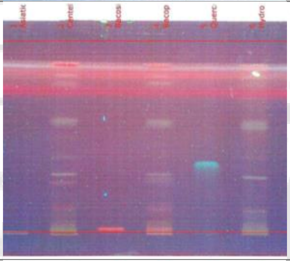
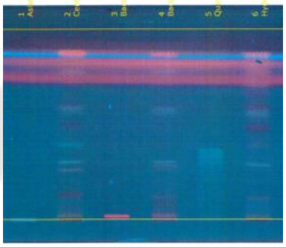
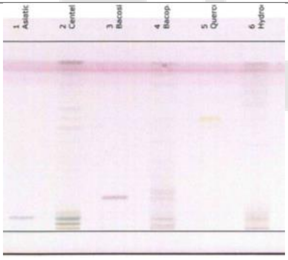
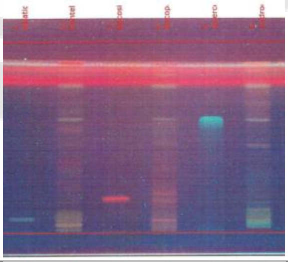
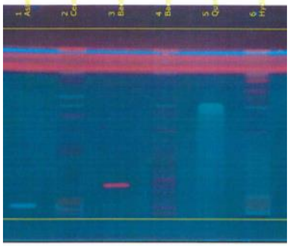
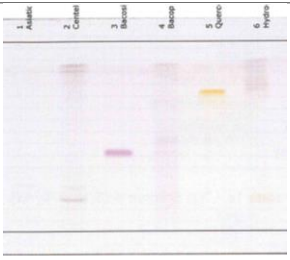
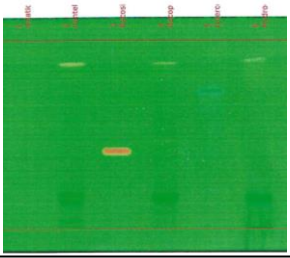
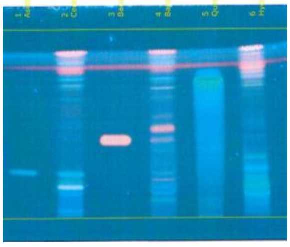
3. การศึกษาลายพิมพ์สารเคมีของบัวบก พรมมิ แว่นแก้วและผลิตภัณฑ์สมุนไพร โดยใช้เทคนิค high-performance thin-layer chromatography (HPTLC)

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของวัฏภาคเคลื่อนที่

เมื่อนำสมุนไพรบัวบก พรมมิ แว่นแก้ว มาสกัดโดยผสมตัวอย่างผง 1 กรัมกับเมทานอล 10 มิลลิลิตร sonicate เป็นเวลา 10 นาทีและปั่นเหวี่ยงสารละลายด้วย centrifuge และใช้ส่วนลอยเหนือตะกอนเป็นสารละลายทดสอบด้วยเทคนิค high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็น dichloromethane: methanol: water จากนั้นใช้ derivatization reagent เป็น p-anisaldehyde และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3 นาที นำมาศึกษาภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254, 366 นาโนเมตร และแสงขาว โดยใช้ specific marker(s) เป็นสารเปรียบเทียบ ได้แก่ asiaticoside สำหรับบัวบก, bacoside A3 สำหรับพรมมิ และ quercetin dihydrate สำหรับแว่นแก้ว

ศึกษาอัตราส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม กล่าวคือหาความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยลดความมีขั้วของวัฏภาคเคลื่อนที่จากอัตราส่วน 14:6:1 เป็น 15:5:1, 17:3:1, 16:4:1 และ 16:5:1 (v/v/v) ดังตาราง 11

ตาราง 11 แสดง HPTLC profiles โดย spot เรียงจากซ้ายไปขวา: asiaticoside, บัวบก, bacoside A3, พรมมิ, quercetin dihydrate และแว่นแก้ว ตามลำดับ

อัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่	ศึกษาภายใต้แสงขาว	ศึกษาภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	ศึกษาภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร
14:6:1			
15:5:1			
17:3:1			
16:4:1			
16:5:1			

จากการตรวจสอบลักษณะลายพิมพ์องค์ประกอบทางเคมีของ asiaticoside, บัวบก, bacoside A3, พรมมิ, quercetin dihydrate และแว่นแก้วบนแผ่น HPTLC (HPTLC profiles) ตามตาราง 11 วิเคราะห์ผลได้ดังนี้

วัฏภาคเคลื่อนที่ dichloromethane, methanol, water อัตราส่วน 14:6:1

แถบของ asiaticoside, bacoside A3 และ quercetin dihydrate มีค่า R_f สูง อยู่บริเวณด้านบนของแผ่น HPTLC และแยกออกจากกันไม่ชัดเจน

วัฏภาคเคลื่อนที่ dichloromethane, methanol, water อัตราส่วน 15:5:1

แถบของ asiaticoside, bacoside A3 และ quercetin dihydrate มีค่า R_f สูง อยู่บริเวณด้านบนของแผ่น HPTLC และแยกออกจากกันไม่ชัดเจน

วัฏภาคเคลื่อนที่ dichloromethane, methanol, water อัตราส่วน 17:3:1

แถบของ asiaticoside, bacoside A3 และ quercetin dihydrate มีค่า R_f ต่ำ อยู่บริเวณด้านล่างของแผ่น HPTLC และแยกออกจากกันไม่ชัดเจน

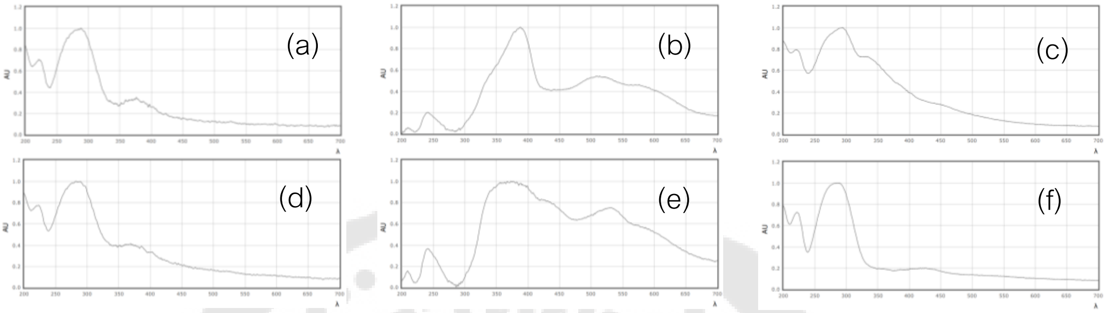
วัฏภาคเคลื่อนที่ dichloromethane, methanol, water อัตราส่วน 16:4:1

แถบของ asiaticoside, bacoside A3 และ quercetin dihydrate มีค่า R_f ต่ำ อยู่บริเวณด้านล่างของแผ่น HPTLC และแยกออกจากกันไม่ชัดเจน

วัฏภาคเคลื่อนที่ dichloromethane, methanol, water อัตราส่วน 16:5:1

แถบของ asiaticoside, bacoside A3 และ quercetin dihydrate อยู่ตรงกลางของแผ่น HPTLC และแถบทั้งสามแยกจากกันชัดเจน โดยพบแถบของ asiaticoside ปรากฎที่ R_f 0.137 ใกล้เคียงกับบัวบก (R_f 0.128) แถบของ bacoside A3 ขึ้นที่ R_f 0.283 ใกล้เคียงกับพรมมิ (R_f 0.281) และแถบของ quercetin dihydrate ปรากฎที่ R_f 0.582 ใกล้เคียงกับแว่นแก้ว (R_f 0.591)

จากนั้นนำแผ่น HPTLC ที่ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ dichloromethane, methanol, water อัตราส่วน 16:5:1 มาแสกนที่ความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบการดูดกลืนแสงขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพรบัวบก พรมมิและแว่นแก้ว เทียบกับสารมาตรฐาน asiaticoside, bacoside A3 และ quercetin dihydrate ดังภาพประกอบ 24



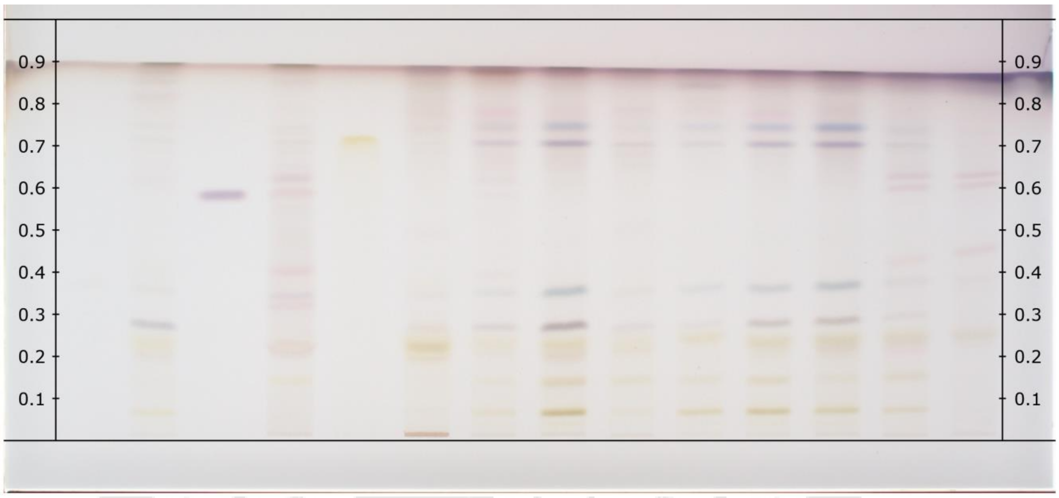
ภาพประกอบ 24 แสดงผลการแสกนที่ 200-700 นาโนเมตรของ (a) asiaticoside, (b) bacoside A3, (c) quercetin dihydrate, (d) บัวบก, (e) พรมมิ และ (f) แว่นแก้ว

จะเห็นว่า asiaticoside ดูดกลืนแสงได้สูงที่สุดที่ความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร และรูปแบบการดูดกลืนแสงของ asiaticoside ที่เป็นสารมาตรฐานและในสมุนไพรเหมือนกัน การดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน bacoside A3 และ bacoside A3 ในสมุนไพรเป็นรูปแบบเดียวกัน และดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 388 และ 373 นาโนเมตร ตามลำดับ และการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน quercetin และ quercetin ในสมุนไพรเป็นรูปแบบเดียวกัน และดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 294 และ 289 นาโนเมตร ตามลำดับ

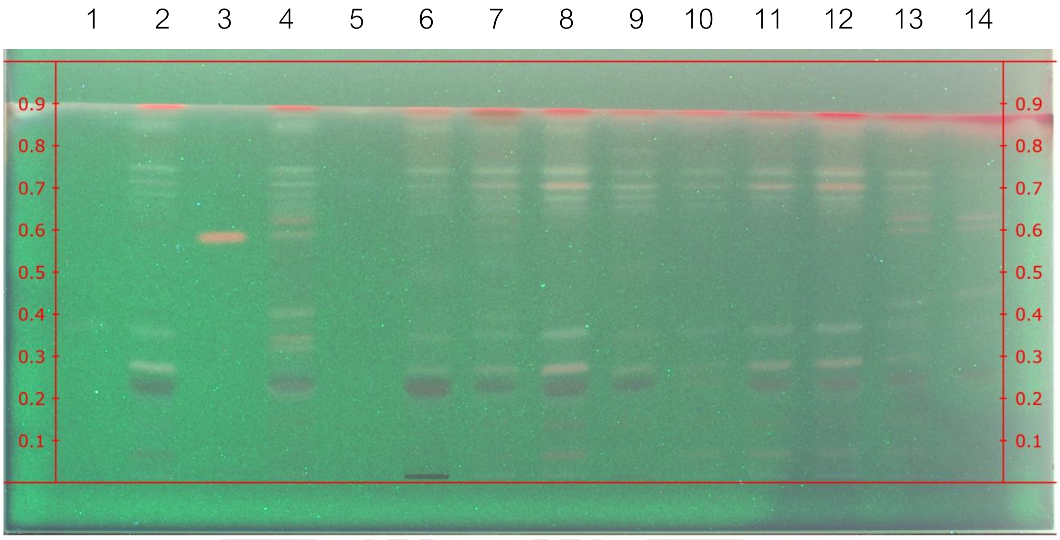
3.2 การศึกษาลายพิมพ์สารเคมีของผลิตภัณฑ์สมุนไพร

นำอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม dichloromethane, methanol, water เท่ากับ 16:5:1 มาทดสอบกับผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่างเทียบกับ authentic plants ดังภาพประกอบ 25-27

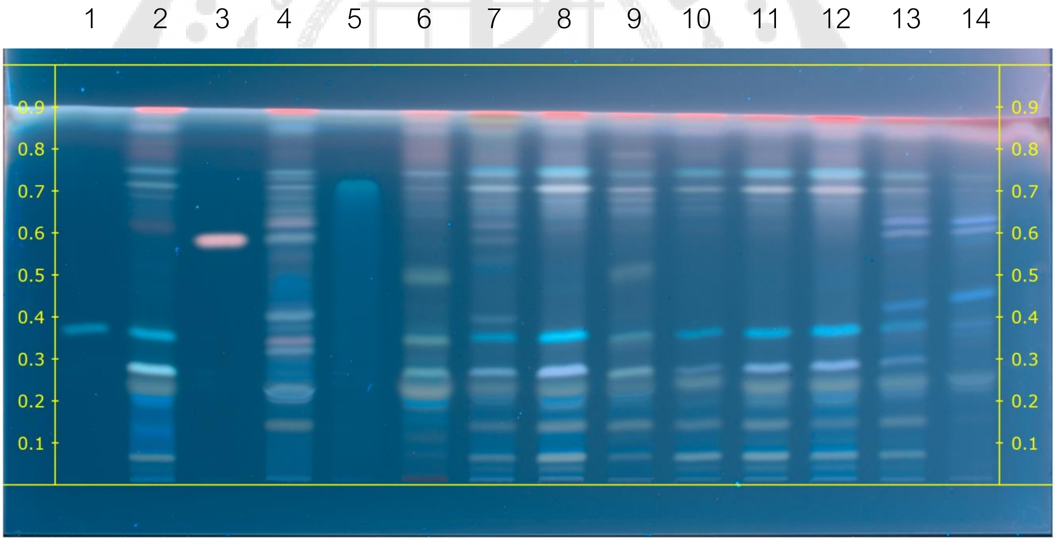
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



ภาพประกอบ 25 แสดงลายพิมพ์สารเคมีภายใต้แสงขาว หลังจากฉีดพ่นด้วย p-anisaldehyde สารมาตรฐาน ได้แก่ (แถว 1) asiaticoside (แถว 3) bacoside A3 (แถว 5) quercetin dihydrate สมุนไพรอ้างอิง (authentic plants) ได้แก่ (แถว 2) บัวบก (แถว 4) พรมมิ (แถว 6) แว่นแก้ว ผลิตภัณฑ์สมุนไพร ได้แก่ (แถว 7) ตัวอย่างหมายเลข 1 ผงสมุนไพรบัวบกบรรจุแคปซูล (แถว 8) ตัวอย่างหมายเลข 2 ผงสมุนไพรบัวบกบรรจุแคปซูล (แถว 9) ตัวอย่างหมายเลข 3 ชาสมุนไพรบัวบกบรรจุซอง (แถว 10) ตัวอย่างหมายเลข 4 ชาสมุนไพรบัวบกบรรจุซอง (แถว 11) ตัวอย่างหมายเลข 5 ชาสมุนไพรบัวบกบรรจุซอง (แถว 12) ตัวอย่างหมายเลข 6 ผงสมุนไพรบัวบกสำหรับแบ่งบรรจุ (แถว 13) ตัวอย่างหมายเลข 7 ชาสมุนไพรพรมมิ (แถว 14) ตัวอย่างหมายเลข 8 ต้นแห้งพรมมิ



ภาพประกอบ 26 แสดงลายพิมพ์สารเคมีภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร หลังจากฉีดพ่นด้วย p-anisaldehyde (ลำดับตัวอย่างเหมือนภาพประกอบ 25)



ภาพประกอบ 27 แสดงลายพิมพ์สารเคมีภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร หลังจากฉีดพ่นด้วย p-anisaldehyde (ลำดับตัวอย่างเหมือนภาพประกอบ 25)

จากภาพประกอบ 27 พบว่า asiaticoside และบัวบกปรากฏที่ R_f ใกล้เคียงกัน (0.371 และ 0.359 ตามลำดับ) bacoside A3 และพรมมิปรากฏที่ R_f ใกล้เคียงกัน (0.582 และ 0.588 ตามลำดับ) quercetin dihydrate และแว่นแก้วปรากฏที่ R_f เท่ากัน (0.708)

เมื่อพิจารณาลายพิมพ์สารเคมีของผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่างเทียบกับ specific markers พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้ง 8 ตัวอย่างมีแถบ (R_f 0.353, 0.353, 0.353, 0.359, 0.360, 0.367, 0.371 และ 0.371) ที่ปรากฏตรงกับ asiaticoside (R_f 0.371) ผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1, 7 และ 8 มีแถบ (R_f 0.584, 0.589 และ 0.585) ที่ปรากฏตรงกับ bacoside A3 (R_f 0.582) ผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1-6 มีแถบ (R_f 0.708) ที่ปรากฏตรงกับ quercetin dihydrate (R_f 0.708)

แต่เมื่อพิจารณาจากรูปแบบลายพิมพ์สารเคมีเทียบกับ authentic plants พบว่า ผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1 และ 7 มีรูปแบบเหมือนบัวบกผสมพรมมิ หมายเลข 2 และ 4-6 มีรูปแบบเหมือนบัวบก หมายเลข 3 มีรูปแบบเหมือนแว่นแก้ว หมายเลข 8 มีรูปแบบเหมือนพรมมิ

4. ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ แว่นแก้วและผลิตภัณฑ์สมุนไพร

4.1 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว

การคัดเลือกส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะต่อบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว และการเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ ในการศึกษานี้เลือกยีน maturase K (*mat*K) เนื่องจากการสืบค้นข้อมูลยีน *mat*K ของสมุนไพรทั้งสามชนิดในฐานข้อมูลยีน (GenBank, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ของพืชทั้งสามชนิด ได้แก่ บัวบก (JQ024945.1, MH621592.1 และ MN886299.1) พรมมิ (KP844742.1, MK578173.1 และ KP844739.1) และแว่นแก้ว (MF350202.1, MH552087.1 และ KJ772840.1) มาเปรียบเทียบกัน (sequence alignment) ด้วยโปรแกรม Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) พบว่ายีน *mat*K มีส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะต่อบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว

จากนั้นเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดส่วนของดีเอ็นเอแล้วให้รูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับพืชแต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรม webcutter (http://heimanlab.com/cut2.html) เลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตามตาราง 12 และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ (recognition site) แสดงในภาพประกอบ 28

ตาราง 12 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	**ตำแหน่งที่ตัด**	**ความจำเพาะต่อพืช**
*Bam*H1	G/GATCC	บัวบก
*Sph*1	GCATG/C	พรมมิ
*Bsp*D1	AT/CGAT	แว่นแก้ว

```
KP844742B     TTCAAAAAAAAAATCCAAGATTCTTCTTATTCTTATATAATTATCATGTATGTGAATACGA 152
MK578173B     TTCAAAAAAAAAATCCAAGATTCTTCTTATTCTTATATAATTATCATGTATGTGAATACGA 188
KP844739B     TTCAAAAAAAAAATCCAAGATTCTTCTTATTCTTATATAATTATCATGTATGTGAATACGA 162
MF350202H     TTCAAAAAGAAATAAAAGACTATTCTTCTTCCTATATAATTCTTATCTATGTGAATACGA 147
MH552087H     TTCAAAAAGAAATAAAAGACTATTCTTCTTCCTATATAATTCTTATCTATGTGAATACGA 146
KJ772840H     -TCAAAAAGAAATAAAAGACTATTCTTCTTCCTATATAATTCTTATCTATGTGAATACGA 59
JQ024945C     TTCAAAAAGATCTCAAAGATTCTTCTTCTTCCTATATAATTCTTATCTATGTGAATACGA 137
MH621592C     TTCAAAAAGATCTCAAAGATTCTTCTTCTTCCTATATAATTCTTATCTATGTGAATACGA 224
MN886299C     TTCAAAAAGATCTCAAAGATTCTTCTTCTTCCTATATAATTCTTATCTATGTGAATACGA 231
               ******* *  *  **** * ***** *** ********* * ** *************

KP844742B     ATCCATTTTCGTCTTTCTACGTGCACAATCTTATCATTTACGATCAATATCTTCTCGACT 212
MK578173B     ATCCATTTTCGTCTTTCTACGTGCACAATCTTATCATTTACGATCAATATCTTCTCGACT 248
KP844739B     ATCCATTTTCGTCTTTCTACGTGCACAATCTTATCATTTACGATCAATATCTTCTCGACT 222
MF350202H     ATCCATCTTCGTCTTTCTCCGTAACCAATCTTCTCGTTTACGCTCAACATCTTCTGGAAC 207
MH552087H     ATCCATCTTCGTCTTTCTCCGTAACCAATCTTCTCGTTTACGCTCAACATCTTCTGGAAC 206
KJ772840H     ATCCATCTTCGTCTTTCTCCGTAACCAATCTTCTCGTTTACGCTCAACATCTTCTGGAAC 119
JQ024945C     ATCCATCTTCGTCTTTTTCCGCAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTAGAAC 197
MH621592C     ATCCATCTTCGTCTTTTTCCGCAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTAGAAC 284
MN886299C     ATCCATCTTCGTCTTTTTCCGCAACCAATCTTCTCATTTACGCTCAACATCTTCTAGAAC 291
              ****** ********* * **    ******* ** ****** **** ******* **

KP844742B     TCTTCTTGAACGAATCTATTTCTATGCCAAAATAGAGCGTCTTGTTAACCTTTTTATTAA 272
MK578173B     TCTTCTTGAACGAATCTATTTCTATGCCAAAATAGAGCGTCTTGTTAACCTTTTTATTAA 308
KP844739B     TCTTCTTGAACGAATCTATTTCTATGCCAAAATAGAGCGTCTTGTTAACCTTTTTATTAA 282
MF350202H     CCTTCTTGAACGAATATATTTCTATGGAAAAATAAACTATCTTGTAGAAGTCTTTGTT-- 265
MH552087H     CCTTCTTGAACGAATATATTTCTATGGAAAAATAAACTATCTTGTAGAAGTCTTTGTT-- 264
KJ772840H     CCTTCTTGAACGAATATATTTCTATGGAAAAATAAACTATCTTGTAGAAGTCTTTGTT-- 177
JQ024945C     CCTTCTTGAACGAGTATATTTCTATGGAAAAATAGAACATCTTGGAGAAGTCTTTGCT-- 255
MH621592C     CCTTCTTGAACGAGTATATTTCTATGGAAAAATAGAACATCTTGGAGAAGTCTTTGCT-- 342
MN886299C     CCTTCTTGAACGAGTATATTTCTATGGAAAAATAGAACATCTTGGAGAAGTCTTTGCT-- 349
               ************ * **********  ****** *   *****   *  * ***  *

KP844742B     GGTTAAGCATTTTCAGGTGAATCTATGGTTGGTCAAGGAGCCTTGCATGCTTTATGTTAG 332
MK578173B     GGTTAAGCATTTTCAGGTGAATCTATGGTTGGTCAAGGAGCCTTGCATGCTTTATGTTAG 368
KP844739B     GGTTAAGCATTTTCAGGTGAATCTATGGTTGGTCAAGGAGCCTTGCATGCTTTATGTTAG 342
MF350202H     ----AAGGTTTTTCAGGTCAATCTATTCTTGTTGAAGGACCCTTTCATGCATTATGTTAG 321
MH552087H     ----AAGGTTTTTCAGGTCAATCTATTCTTGTTGAAGGACCCTTTCATGCATTATGTTAG 320
KJ772840H     ----AAGGTTTTTCAGGTCAATCTATTCTTGTTGAAGGACCCTTTCATGCATTATGTTAG 233
JQ024945C     ----AAGGCTTTTCAAGTCAATCTATGGTTATTGAAGGATCCTTTCATGCATTACGTTAG 311
MH621592C     ----AAGGCTTTTCAAGTCAATCTATGGTTATTGAAGGATCCTTTCATGCATTACGTTAG 398
MN886299C     ----AAGGCTTTTCAAGTCAATCTATGGTTATTGAAGGATCCTTTCATGCATTACGTTAG 405
                  ***  ****** ** *******  **  * ***** **** ***** *** *****

KP844742B     GTATCAAAAAAAAATTGATTCTGGCTTCAAAAGGGACGTCTTTTTTGCTAAAGAAATGGAA 392
MK578173B     GTATCAAAAAAAAATTGATTCTGGCTTCAAAAGGGACGTCTTTTTTGCTAAAGAAATGGAA 428
KP844739B     GTATCAAAAAAAAATTGATTCTGGCTTCAAAAGGGACGTCTTTTTTGCTAAAGAAATGGAA 402
MF350202H     GTATCAAGGAAAATCGATTCTCGCTTCAAAAGAGACGCCCCTTTTGATGAAAAAATGGAC 381
MH552087H     GTATCAAGGAAAATCGATTCTCGCTTCAAAAGAGACGCCCCTTTTGATGAAAAAATGGAC 380
KJ772840H     GTATCAAGGAAAATCGATTCTCGCTTCAAAAGAGACGCCCCTTTTGATGAAAAAATGGAC 293
JQ024945C     GTATCAAGGAAAATCAATTCTCACATCAAAAGGGACGCCTCTTTTGATGAAAAAATGGGT 371
MH621592C     GTATCAAGGAAAATCAATTCTCACATCAAAAGGGACGCCTCTTTTGATGAAAAAATGGGT 458
MN886299C     GTATCAAGGAAAATCAATTCTCACATCAAAAGGGACGCCTCTTTTGATGAAAAAATGGGT 465
              *******  *****  *****  * ******* **** *  ***** * ** ******
```

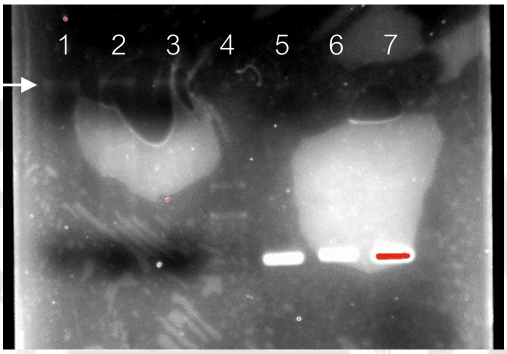
ภาพประกอบ 28 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบส (sequence alignment) ของส่วนของดีเอ็นเอบริเวณยีน maturase K (matK) ของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว จากฐานข้อมูลยีน GenBank ลำดับเบสที่ตัวหนาแสดง forward primer และ reverse primer ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamH1 (G/GATCC) Sph1 (GCATG/C) และ BspD1 (AT/CGAT) เครื่องหมาย*แสดงตำแหน่งที่มีเบสเหมือนกันในพืชทั้งสามชนิด

```
KP844742B      GTCTTACCTTGTCGCTTTTTGGCAATCGCACTTTTTAATGTGGTTTCATCCAAAAAGGAT 452
MK578173B      GTCTTACCTTGTCGCTTTTTGGCAATCGCACTTTTTAATGTGGTTTCATCCAAAAAGGAT 488
KP844739B      GTCTTACCTTGTCGCTTTTTGGCAATCGCACTTTTTAATGTGGTTTCATCCAAAAAGGAT 462
MF350202H      ATATTATTTTGTTAATTTCTGGCAATGTCATTTTTATCTGTGGTCTCAACCGGGACGTAT 441
MH552087H      ATATTATTTTGTTAATTTCTGGCAATGTCATTTTTATCTGTGGTCTCAACCGGGACGTAT 440
KJ772840H      ATATTATTTTGTTAATTTCTGGCAATGTCATTTTTATCTGTGGTCTCAACCGGGACGTAT 353
JQ024945C      ATATTACTTTGTTAATTTATGGCAATGTCATTTTTACCTGTGGTCTCAACCGAGAAGGAT 431
MH621592C      ATATTACTTTGTTAATTTATGGCAATGTCATTTTTACCTGTGGTCTCAACCGAGAAGGAT 518
MN886299C      ATATTACTTTGTTAATTTATGGCAATGTCATTTTTACCTGTGGTCTCAACCGAGAAGGAT 525
                * ***  ****   *** *******  ** ****   ****** *** **   * * **

KP844742B      TTCTATAAACCAATTATCCAACTATTCTCTTGAATTTTTGGGCTATCTTTCAAGTGTGCG 512
MK578173B      TTCTATAAACCAATTATCCAACTATTCTCTTGAATTTTTGGGCTATCTTTCAAGTGTGCG 548
KP844739B      TTCTATAAACCAATTATCCAACTATTCTCTTGAATTTTTGGGCTATCTTTCAAGTGTGCG 522
MF350202H      CTATATAAACCAATTCTACAACCATTCCCTTGATCTTTTGGGCTATTTATCAAGTGCGCG 501
MH552087H      CTATATAAACCAATTCTACAACCATTCCCTTGATCTTTTGGGCTATTTATCAAGTGCGCG 500
KJ772840H      CTATATAAACCAATTCTACAACCATTCCCTTGATCTTTTGGGCTATTTATCAAGTGCGCG 413
JQ024945C      CTGTATAAACCAATTATATAATTATTCGCTCGACTTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCACG 491
MH621592C      CTGTATAAACCAATTATATAATTATTCGCTCGACTTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCACG 578
MN886299C      CTGTATAAACCAATTATCTAATTATTCGCTCGACTTTCTGGGCTATCTATCAAGTGCACG 585
                * ************ *  **  **** ** **  ** ******** * *******  **

KP844742B      AATGAACCCTTCAGTAGTACGGAGTCAAATTCTAGAAAATTCATTTCTAATTAATAATCC 572
MK578173B      AATGAACCCTTCAGTAGTACGGAGTCAAATTCTAGAAAATTCATTTCTAATTAATAATCC 608
KP844739B      AATGAACCCTTCAGTAGTACGGAGTCAAATTCTAGAAAATTCATTTCTAATTAATAATCC 582
MF350202H      GTTAAACCCTTCAATGATACGTGGTCAAATGCTAGAAAATGTATTTCTAATTGATAATGC 561
MH552087H      GTTAAACCCTTCAATGATACGTGGTCAAATGCTAGAAAATGTATTTCTAATTGATAATGC 560
KJ772840H      GTTAAACCCTTCAATGATACGTGGTCAAATGCTAGAAAATGTATTTCTAATTGATAATGC 473
JQ024945C      GCTAAACCCTTCAATGGTACGCGGTCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATAC 551
MH621592C      GCTAAACCCTTCAATGGTACGCGGTCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATAC 638
MN886299C      GCTAAACCCTTCAATGGTACGCGGTCAAATGCTAGAAAATTCATTTCTAATTGATAATAC 645
                 * ********* *  ****  ******* *********  ********** ***** *

KP844742B      TATTAAGAAATTCGATACCTTTGTTCCAATTATTCCTCTGATTGCGTCATTAGCTAAAGC 632
MK578173B      TATTAAGAAATTCGATACCTTTGTTCCAATTATTCCTCTGATTGCGTCATTAGCTAAAGC 668
KP844739B      TATTAAGAAATTCGATACCTTTGTTCCAATTATTCCTCTGATTGCGTCATTAGCTAAAGC 642
MF350202H      TATTAAAAAGGTTGAGACTATTGTTCCAATTAGTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGC 621
MH552087H      TATTAAAAAGGTTGAGACTATTGTTCCAATTAGTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGC 620
KJ772840H      TATTAAAAAGGTTGAGACTATTGTTCCAATTAGTCCTCTGATTGGATCATTGGCTAAAGC 533
JQ024945C      TATTAATAAGTTCGATACTCTTATTCCAATTATTCCTCTGATTGCATCATTGGCTAAAGC 611
MH621592C      TATTAATAAGTTCGATACTCTTATTCCAATTATTCCTCTGATTGCATCATTGGCTAAAGC 698
MN886299C      TATTAATAAGTTCGATACTCTTATTCCAATTATTCCTCTGATTGCATCATTGGCTAAAGC 705
               ****** **  * ** **  ** ********* ***********  ***** ********

KP844742B      GAAATTTTGTAACCTATTGGGGCATCCCACTAGTAAGCCGGTTTGGGCGGATTTATCTGA 692
MK578173B      GAAATTTTGTAACCTATTGGGGCATCCCACTAGTAAGCCGGTTTGGGCGGATTTATCTGA 728
KP844739B      GAAATTTTGTAACCTATTGGGGCATCCCACTAGTAAGCCGGTTTGGGCGGATTTATCTGA 702
MF350202H      GAAATTTTGTAATGTATTGGGGCATCCTATTAGTAAGGCGGTTTGGTCTGATTTATCAGA 681
MH552087H      GAAATTTTGTAATGTATTGGGGCATCCTATTAGTAAGGCGGTTTGGTCTGATTTATCAGA 680
KJ772840H      GAAATTTTGTAATGTATTGGGGCATCCTATTAGTAAGGCGGTTTGGTCTGATTTATCAGA 593
JQ024945C      GAAATTTTGTAACATGTTGGGGCATCCTATTAGTAAGGTGGTTTGGGCCGATTTATCAGA 671
MH621592C      GAAATTTTGTAACATGTTGGGGCATCCTATTAGTAAGGTGGTTTGGGCCGATTTATCAGA 758
MN886299C      GAAATTTTGTAACATGTTGGGGCATCCTATTAGTAAGGTGGTTTGGGCCGATTTATCAGA 765
               ************  * *********** * *******  ******* * ******** **
```

ภาพประกอบ 28 (ต่อ) แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบส (sequence alignment) ของส่วนของดีเอ็นเอบริเวณยีน maturase K (matK) ของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว จากฐานข้อมูลยีน GenBank ลำดับเบสที่ตัวหนาแสดง forward primer และ reverse primer ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้แสดงตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ BamH1 (G/GATCC) Sph1 (GCATG/C) และ BspD1 (AT/CGAT) เครื่องหมาย*แสดงตำแหน่งที่มีเบสเหมือนกันในพืชทั้งสามชนิด

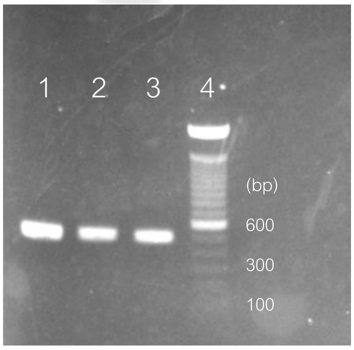
กระบวนการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ สมุนไพรอ้างอิง ดำเนินการดังนี้

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากพืชสดแต่ละชนิด ดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีการแตกหัก แต่มีความเข้มต่ำ แสดงว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพดีแต่มีปริมาณน้อย สังเคราะห์ส่วนของยีน *mat*K ด้วย PCR ใช้ forward primer CENMATKS 5’-TATGTGAATACGAATCCATCTTCGTC-3’ และ reverse primer CENMATKR 5’-TTACAAAATTTCGCTTTAGCCAATGA-3’ ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ ได้ดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว ที่มีขนาดประมาณ 500 bp ซึ่งสอดคล้องกับขนาดที่วางแผนไว้ ดังภาพประกอบ 29



ภาพประกอบ 29 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสรูปแบบดีเอ็นเอที่สกัดได้ ของ (1) บัวบก (2) พรมมิ (3) แว่นแก้ว (4) DNA marker และ PCR product ของ (5) บัวบก (6) พรมมิ (7) แว่นแก้ว

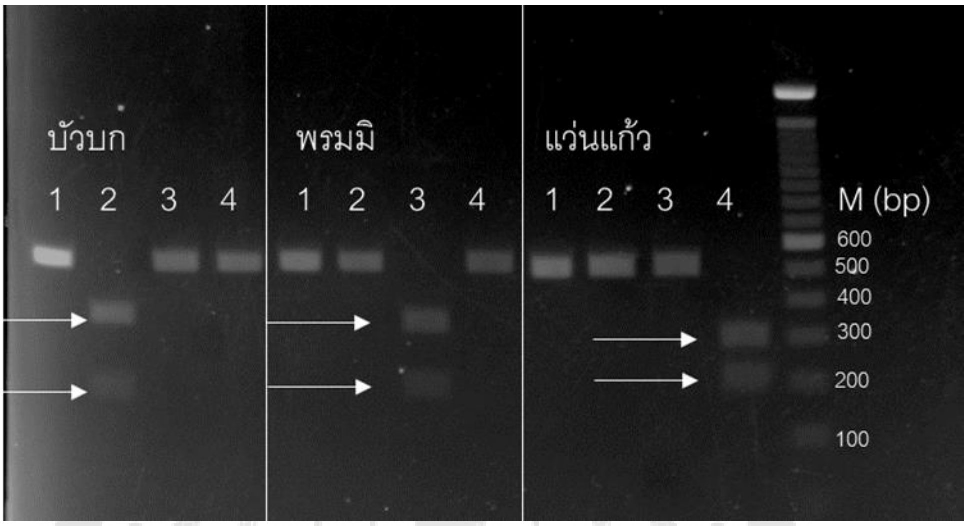
เมื่อพบว่าไพรเมอร์ที่ใช้สามารถสังเคราะห์ส่วนของยีน *mat*K ได้ตามขนาดที่ต้องการ จึงสังเคราะห์ส่วนของยีน *mat*K ให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น และทำส่วนของยีนที่ได้ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ DNA purification kit ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี เนื่องจากเห็นแถบสว่างชัดเจนที่ขนาด 500 bp และไม่ปรากฏแถบสว่างขนาดอื่น ดังภาพประกอบ 30



ภาพประกอบ 30 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส Purify PCR Product ของ (1) บัวบก (2) พรมมิ (3) แว่นแก้ว และ (4) DNA marker

จากนั้นนำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ทำเพื่อตรวจสอบยืนยันลำดับเบสของพืชทั้ง 3 ชนิด

ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอและตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสปรากฏรูปแบบดีเอ็นเอดังภาพประกอบ 31

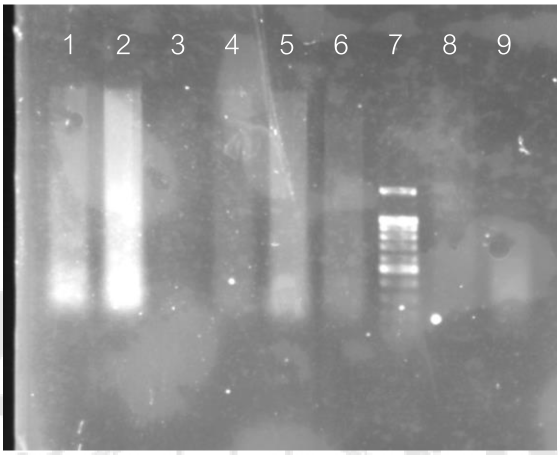


ภาพประกอบ 31 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสรูปแบบดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว (1) ก่อนและหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (2) *Bam*H1, (3) *Sph*1 และ (4) *Bsp*D1 อักษร M (bp) หมายถึงเครื่องหมายบอกขนาดดีเอ็นเอมีหน่วยเป็นจำนวนเบส (base pair, bp)

จากภาพประกอบ 31 แสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนพีซีอาร์ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอบริเวณยีน *mat*K ได้ดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว ที่มีขนาดประมาณ 500 เบส หลังจากบ่มด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ได้กำหนดไว้สำหรับพืชแต่ละชนิด เอนไซม์ตัดจำเพาะจะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพืชที่กำหนดเท่านั้น แต่จะไม่ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพืชอีก 2 ชนิด กล่าวคือเมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H1 ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว พบว่า *Bam*H1 มีความจำเพาะกับบัวบกเท่านั้นโดยทำให้ดีเอ็นเอที่มีขนาด 500 bp ขาดออกจากกันเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 150 bp และ 350 bp แต่เอนไซม์นี้ไม่มีผลต่อพรมมิและแว่นแก้ว เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sph*1 ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ-พบว่า *Sph*1 มีความจำเพาะกับพรมมิเท่านั้นโดยทำให้เกิดดีเอ็นเอที่มีขนาด 170 bp และ 330 bp และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsp*D1 มีความจำเพาะกับแว่นแก้วเท่านั้นโดยทำให้เกิดดีเอ็นเอที่มีขนาด 200 bp และ 300 bp

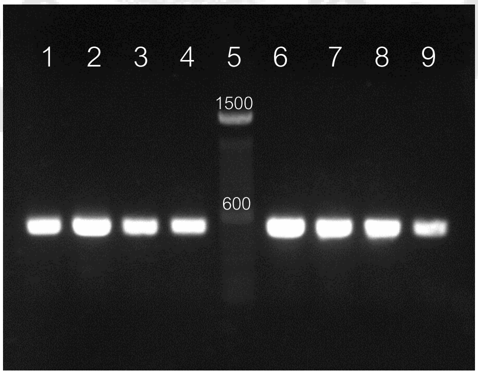
4.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพร

นำผลิตภัณฑ์สมุนไพรมาสกัดดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่ได้แตกหักมีลักษณะเป็นปื้นและมีความเข้มต่ำ แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพไม่ดี แต่ยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาได้ ดังภาพประกอบ 32



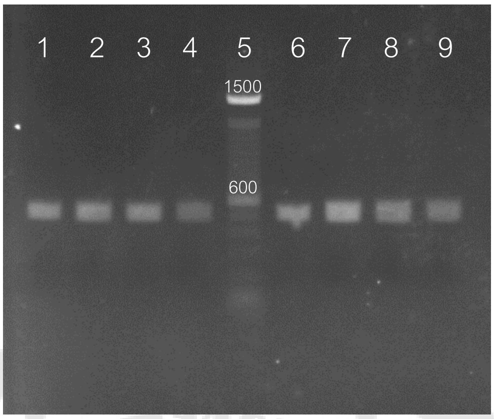
ภาพประกอบ 32 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสรูปแบบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ 1-6 แสดงในแถบที่ 1-6 ตัวอย่างที่ 7-8 แสดงในแถบที่ 8 และ 9 และ DNA marker แสดงในแถบที่ 7

สังเคราะห์ส่วนของยีน *mat*K ด้วย PCR ได้ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีขนาดประมาณ 500 bp ดังภาพประกอบ 33



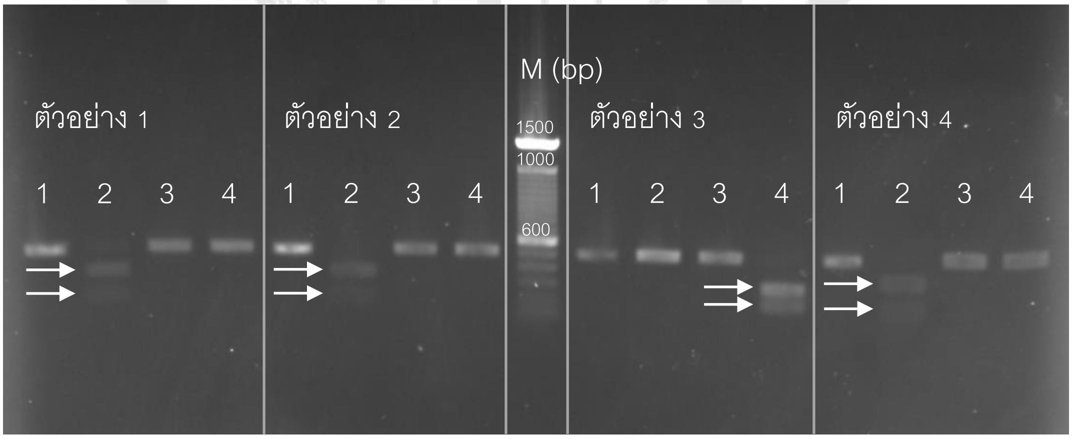
ภาพประกอบ 33 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส PCR Product ของผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ 1-4 แสดงในแถบที่ 1-4 ตัวอย่างที่ 5-8 แสดงในแถบที่ 6-9 และ DNA marker แสดงในแถบที่ 5

ทำส่วนของยีนที่ได้ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ DNA purification kit ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี แถบสว่างชัดเจนที่ขนาด 500 bp และไม่ปรากฏแถบสว่างขนาดอื่น ดังภาพประกอบ 34



ภาพประกอบ 34 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส Purify PCR Product ของผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ 1-4 แสดงในแถบที่ 1-4 ตัวอย่างที่ 5-8 แสดงในแถบที่ 6-9 และ DNA marker แสดงในแถบที่ 5

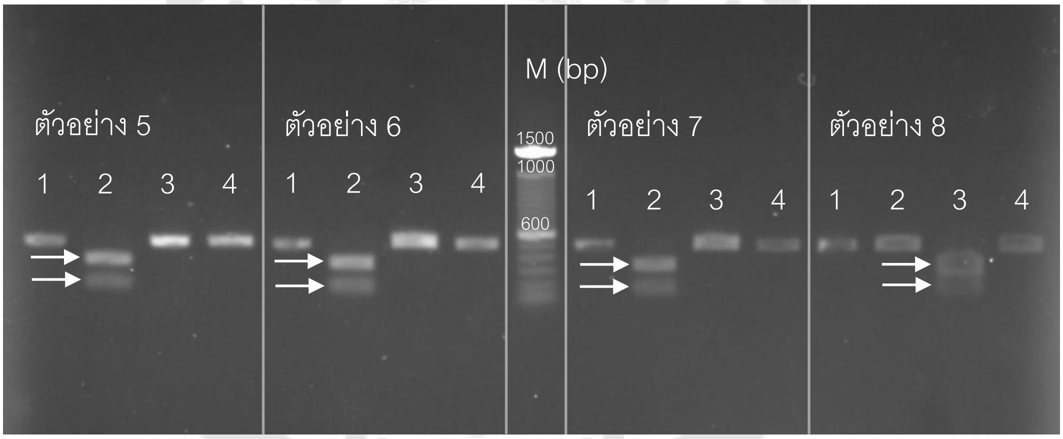
การตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1, 2, 3 และ 4 ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสปรากฏรูปแบบดีเอ็นเอดังภาพประกอบ 35



ภาพประกอบ 35 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสรูปแบบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1, 2, 3 และ 4; (1) ก่อนและหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (2) *Bam*H1, (3) *Sph*1 และ (4) *Bsp*D1 อักษร M (bp) หมายถึงเครื่องหมายบอกขนาดดีเอ็นเอมีหน่วยเป็นจำนวนเบส (base pair, bp)

จากภาพประกอบ 35 แสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนพีซีอาร์ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอบริเวณยีน *mat*K ได้ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีขนาดประมาณ 500 เบส เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H1 ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1, 2, 3 และ 4 พบว่า *Bam*H1 มีความจำเพาะกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1, 2 และ 4 โดยทำให้ดีเอ็นเอที่มีขนาด 500 bp ขาดออกจากกันเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 350 bp และ 150 bp แต่เอนไซม์นี้ไม่มีผลต่อผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 3 เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sph*1 ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่า *Sph*1 ไม่มีผลต่อผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1, 2, 3 และ 4 และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsp*D1 มีความจำเพาะกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 3 โดยทำให้เกิดดีเอ็นเอที่มีขนาด 300 bp และ 200 bp แต่เอนไซม์นี้ไม่มีผลต่อผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1, 2 และ 4

การตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 5, 6, 7 และ 8 ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสปรากฏรูปแบบดีเอ็นเอดังภาพประกอบ 36



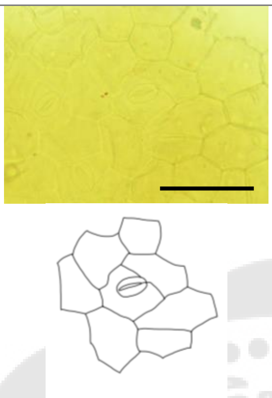
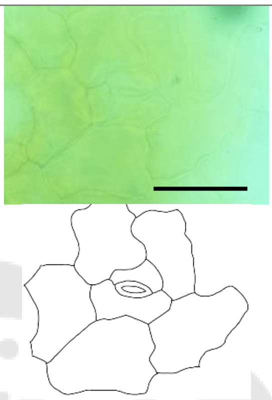
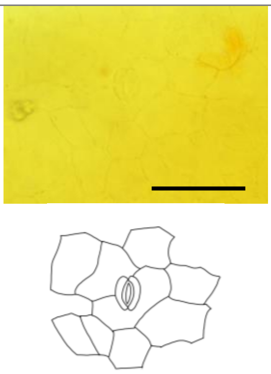
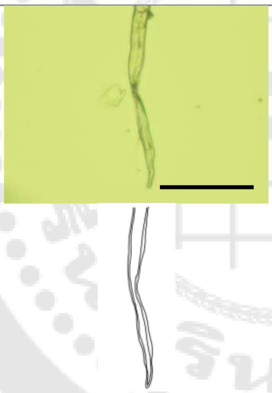
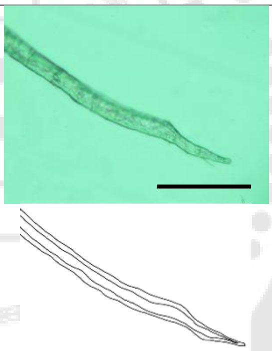
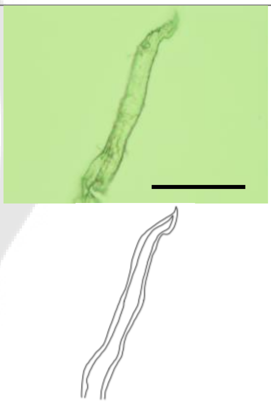
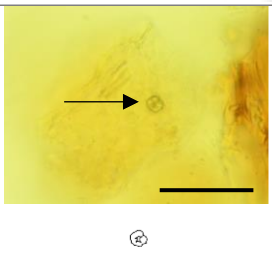
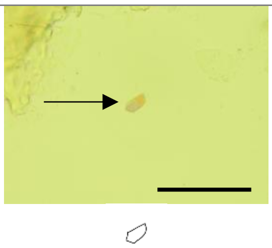
ภาพประกอบ 36 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสรูปแบบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 5, 6, 7 และ 8; (1) ก่อนและหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (2) *Bam*H1, (3) *Sph*1 และ (4) *Bsp*D1 อักษร M (bp) หมายถึงเครื่องหมายบอกขนาดดีเอ็นเอมีหน่วยเป็นจำนวนเบส (base pair, bp)

จากภาพประกอบ 36 แสดงให้เห็นว่าในขั้นตอนพีซีอาร์ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ส่วนของดีเอ็นเอบริเวณยีน *mat*K ได้ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีขนาดประมาณ 500 เบส เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H1 ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 5, 6, 7 และ 8 พบว่า *Bam*H1 มีความจำเพาะกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 5, 6 และ 7 โดยทำให้ดีเอ็นเอที่มีขนาด 500 bp ขาดออกจากกันเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 400 bp และ 100 bp แต่เอนไซม์นี้ไม่มีผลต่อผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 8 เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sph*1 ตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่า *Sph*1 มีความจำเพาะกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 8 โดยทำให้ดีเอ็นเอของสมุนไพรหมายเลข 8 ที่มีขนาด 500 bp ขาดออกจากกันเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 350 bp และ 150 bp แต่ไม่มีผลต่อผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 5, 6 และ 7 และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsp*D1 ไม่มีผลต่อผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 5, 6, 7 และ 8

5. ผลการศึกษาเพิ่มเติมของผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ไม่ตรงตามฉลากและผลิตภัณฑ์ที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่ตรงกับสมุนไพรมาตรฐาน

จากผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 3 ชาสมุนไพรบัวบก พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 3 ไม่ใช่บัวบกตามฉลากแต่เป็นแว่นแก้ว และผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 7 ชาชงพรมมิ พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 7 ไม่ใช่พรมมิตามฉลากแต่เป็นบัวบก และจากการศึกษาลายพิมพ์สารเคมีพบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1 ผงสมุนไพรบัวบกบรรจุแคปซูล และหมายเลข 7 ชาชงพรมมิ มีลายพิมพ์ที่มีลักษณะผสมระหว่างบัวบกและพรมมิ จึงนำสมุนไพรหมายเลข 1, หมายเลข 3 และหมายเลข 7 มาศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อช่วยในการระบุชนิดของผลิตภัณฑ์สมุนไพรดังกล่าว

ตาราง 13 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อของสมุนไพรหมายเลข 1, หมายเลข 3 และหมายเลข 7 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

	ผลิตภัณฑ์หมายเลข 1	**ผลิตภัณฑ์หมายเลข 3**	**ผลิตภัณฑ์หมายเลข 7**
ปากใบ (stomata type)	 (400X) anomocytic stomata	 (400X) paracytic stomata	 (400X) anomocytic stomata
ขน (trichome)	 (400X) unicellular trichome	 (400X) unicellular trichome	 (400X) unicellular trichome
ผลึก (crystals)	 (400X)	 (400X)	 (400X)

หมายเหตุ เครื่องหมายขีดในรูปแสดงถึง scale ขนาด 0.01 มิลลิเมตร

จากผลการตรวจสอบลักษณะเนื้อเยื่อ พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1 มีขนแบบเซลล์เดียวเหมือนบัวบกและแว่นแก้ว และขอบของปากใบไม่มีลักษณะหยักจึงไม่ใช่พรมมิ อีกทั้งพบ stomata type แบบ anomocytic เหมือนกับบัวบก ผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1 จึงเป็นบัวบก ไม่ใช่พรมมิ และไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากสมุนไพรทั้งสองชนิดผสมกัน เนื่องจากการตรวจลักษณะเนื้อเยื่อไม่พบเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเหมือนพรมมิ และผลการตรวจด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ *Sph*1 ซึ่งจำเพาะกับพรมมิก็ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

จากการตรวจสอบลักษณะเนื้อเยื่อ พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 3 มีขนแบบเซลล์เดียวเหมือนบัวบกและแว่นแก้ว และขอบของปากใบไม่มีลักษณะหยักจึงไม่ใช่พรมมิ อีกทั้งพบ stomata type แบบ paracytic เหมือนกับแว่นแก้ว ต่างจากบัวบกที่พบ stomata type แบบ anomocytic ประกอบกับผลการศึกษาลายพิมพ์สารเคมีผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 3 มีลายพิมพ์สารเคมีเหมือนแว่นแก้ว และจากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่ามีความจำเพาะกับเอนไซม์ *Bsp*D1 ดังนั้นสมุนไพรหมายเลข 3 จึงเป็นแว่นแก้ว ไม่ใช่บัวบก

และพบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 7 พบ stomata type แบบ anomocytic เหมือนกับบัวบกและพรมมิ แต่ขอบปากใบของผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 7 ไม่มีลักษณะหยักเหมือนกับขอบปากใบของพรมมิ และพบว่ามีขนแบบเซลล์เดียวเหมือนบัวบก ไม่พบ glandular trichome เหมือนที่พบในพรมมิ และพบผลึกที่คล้ายกับ rosette aggregate crystals ที่มีรายงานไว้ใน THP ว่าพบในบัวบก ดังภาพประกอบ 13 ผลการศึกษาลายพิมพ์สารเคมีพบว่า ผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 7 มีลายพิมพ์ที่มีลักษณะผสมระหว่างบัวบกและพรมมิ แต่จากผลการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอและผลการตรวจสอบลักษณะเนื้อเยื่อ พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 7 เป็นบัวบก ไม่ใช่พรมมิ และไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากสมุนไพรทั้งสองชนิดผสมกัน เนื่องจากการตรวจลักษณะเนื้อเยื่อไม่พบเนื้อเยื่อที่มีลักษณะเหมือนพรมมิ และผลการตรวจด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ *Sph*1 ซึ่งจำเพาะกับพรมมิก็ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วโดยใช้ลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลายพิมพ์สารเคมีที่สร้างด้วยเทคนิค high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างด้วย PCR-RFLP และนำมาใช้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีจำหน่ายในท้องตลาดจำนวน 8 ตัวอย่างว่าชนิดสมุนไพรตรงตามที่ระบุไว้ในฉลากหรือไม่

ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia, THP) มีการระบุลักษณะเนื้อเยื่อของบัวบกไว้ว่าพบ epidermis และพบปากใบหลายแบบ เช่น anisocytic, paracytic และ anomocytic stomata แต่ในการศึกษานี้พบเฉพาะ anomocytic stomata และพบผลึกในรูปแบบ rosette aggregate ตรงกับที่ระบุใน THP และใน THP ระบุว่าพบท่อลำเลียงน้ำแบบ annular, spiral, scalariform หรือ reticulate vessel แต่การศึกษานี้พบเพียง spiral vessel ส่วนขนพบ unicellular trichome เหมือนที่ระบุใน THP

ลักษณะเซลล์ของพรมมิภายใต้กล้องจุลทรรศน์อ้างอิงงานวิจัย[67, 68, 70] จะพบ epidermis และพบปากใบหลายแบบ เช่น anomocytic, anisocytic และ diacytic stomata แต่ในการศึกษานี้พบเฉพาะ anomocytic stomata และพบว่า epidermal cell ของพรมมิมีลักษณะหยัก และมีขนแบบ glandular trichome เหมือนกับที่ระบุในงานวิจัยและสอดคล้องกับที่ระบุไว้ใน American Herbal Products Association Botanical Identity References Compendium[69] ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่ชัดเจนที่ไม่พบในบัวบกและแว่นแก้ว งานวิจัยระบุว่าพบท่อลำเลียงน้ำแบบ annular, spiral และ scalariform vessel แต่การศึกษานี้พบเพียง spiral vessel และพบผลึกแต่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นผลึกชนิดใด และไม่พบ sieve tube ตามที่ระบุในการทบทวนวรรณกรรม

ส่วนแว่นแก้วพบ epidermis, paracytic stomata, unicellular trichome, spiral vessel และ fibers เมื่อเทียบกับงานวิจัยที่พบเพียง 1 งานวิจัย[32] ที่ศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งงานวิจัยนี้ระบุเพียงว่าพบ epidermis, fibers และ vessel

จากการศึกษาลักษณะเซลล์พืชของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าพรมมิมีลักษณะเด่นที่ชัดเจนที่ไม่พบในบัวบกและแว่นแก้ว ทำให้สรุปได้ว่าการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถจำแนกพรมมิออกจากบัวบกและแว่นแก้วได้ แต่ไม่สามารถจำแนกบัวบกออกจากแว่นแก้วได้

จากการศึกษาลายพิมพ์สารเคมีของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้วโดยใช้เทคนิค high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) โดยอ้างอิงวัฏภาคเคลื่อนที่ dichloromethane: methanol: water อัตราส่วน 14:6:1 จากการสืบค้นงานวิจัย[71] และใช้ derivatization reagent เป็น anisaldehyde จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 3 นาที นำมาศึกษาภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254, 366 นาโนเมตร และแสงขาว

บัวบกมีองค์ประกอบทางเคมีหลายชนิดที่สามารถใช้เป็นสารเทียบ (specific markers) ได้ เช่น asiaticoside, asiatic acid, madecassoside และ madecassic acid ในการศึกษานี้เลือกใช้ asiaticoside เป็นสารเทียบในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของบัวบกเนื่องจาก asiaticoside เป็นสารเทียบที่แนะนำโดย THP องค์ประกอบทางเคมีของพรมมิมีหลายชนิด เช่น bacoside A3, bacopaside II, jujubogenin และ bacopasaponin C ในการศึกษานี้เลือกใช้ bacoside A3 เป็นสารเทียบของพรมมิเนื่องจากเป็นสารที่มีฤทธิ์น่าสนใจและมีปริมาณมากในพรมมิทำให้สามารถตรวจวัดได้ง่าย แว่นแก้วมีองค์ประกอบทางเคมีหลักเป็นสารกลุ่ม flavonoids เช่น quercetin, avicularin, quercitrin, hyperoside, neochlorogenic acid และองค์ประกอบทางเคมีกลุ่มอื่น เช่น hibalactone ในการศึกษานี้เลือกใช้ quercetin dihydrate เป็นสารเทียบเนื่องจากมีงานวิจัยที่ศึกษาสารดังกล่าวในแว่นแก้ว[32] และสารเทียบที่เลือกควรมี R_f ต่างกันเมื่อใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่กำหนด เพื่อให้สามารถจำแนกพืชทั้งสามชนิดได้

เมื่อนำอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ดังกล่าวมาปรับใช้ทำให้แถบของ asiaticoside, bacoside A3 และ quercetin dihydrate มีค่า R_f สูง อยู่บริเวณด้านบนของแผ่น HPTLC และแยกออกจากกันไม่ชัดเจน แถบของ asiaticoside, bacoside A3 และ quercetin dihydrate มีค่า R_f สูง อยู่บริเวณด้านบนของแผ่น HPTLC และแยกออกจากกันไม่ชัดเจน เนื่องจากสภาวะการวิเคราะห์ไม่ได้ทำตามงานวิจัยที่อ้างอิงทั้งหมด ได้แก่ ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ และการควบคุมความชื้น จึงปรับวัฏภาคเคลื่อนที่ให้มีขั้วลดลง เป็น 15:5:1, 17:3:1, 16:4:1 และ 16:5:1 พบว่าอัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม คือ 16:5:1 เนื่องจากแถบของ asiaticoside, bacoside A3 และ quercetin dihydrate อยู่ตรงกลางของแผ่น HPTLC และแถบทั้งสามแยกจากกันชัดเจน โดยพบแถบของ asiaticoside ใกล้เคียงกับแถบของบัวบก แถบของ bacoside A3 ใกล้เคียงกับแถบของพรมมิ และแถบของ quercetin dihydrate ใกล้เคียงกับแถบของแว่นแก้ว และเมื่อนำแผ่น HPTLC ดังกล่าวไปแสกนที่ความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร พบว่า asiaticoside และบัวบกดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดเท่ากัน bacoside A3 และพรมมิดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดใกล้เคียงกัน quercetin dihydrate และแว่นแก้วดูดกลืนแสงที่

ความยาวคลื่นสูงสุดใกล้เคียงกัน จึงทำให้สรุปได้ว่าพบสาร asiaticoside ในบัวบก สาร bacoside A3 ในพรมมิ และสาร quercetin dihydrate ในแว่นแก้ว

asiaticoside เป็นสารที่จำเพาะกับบัวบก และ bacoside A3 เป็นสารที่จำเพาะกับพรมมิ การพบสารชนิดนี้จึงสามารถระบุชนิดพืชได้ แต่ quercetin เป็นฟลาโวนอยด์และพบได้ในพืชหลายชนิด จากการศึกษานี้พบแถบที่ตรงกับ quercetin ในบัวบกและพรมมิด้วย ดังนั้น quercetin ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นสารเทียบสำหรับแว่นแก้ว ซึ่งต้องพิจารณาสารชนิดอื่นต่อไป อย่างไรก็ตามลายพิมพ์สารเคมีของพืชแต่ละชนิดมีความจำเพาะและสามารถใช้จำแนกชนิดพืชได้

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณยีน maturase K (*mat*K) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส ซึ่งบริเวณยีนนี้มีส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะต่อบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว ในการศึกษานี้ ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลยีนโดยใช้โปรแกรม nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch) เพื่อยืนยันว่าส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากพืชทั้ง 3 ชนิด เป็นดีเอ็นเอของยีน *mat*K และได้ลงทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในฐานข้อมูลโดยมีรหัสในฐานข้อมูลยีนสำหรับบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว คือ LC778269, LC778271, LC778270 ตามลำดับ

จากนั้นเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดส่วนของดีเอ็นเอแล้วให้รูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับพืชแต่ละชนิด ได้แก่ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H1 (ตำแหน่งตัด G/GATCC) *Sph*1 (GCATG/C) และ *Bsp*D1 (AT/CGAT) และตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H1 มีความจำเพาะกับบัวบกเท่านั้น แต่เอนไซม์นี้ไม่มีผลต่อพรมมิและแว่นแก้ว เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sph*1 มีความจำเพาะกับพรมมิเท่านั้น และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsp*D1 มีความจำเพาะกับแว่นแก้วเท่านั้น

เมื่อทดสอบกับผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่างด้วยเทคนิค HPTLC โดยใช้อัตราส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม (dichloromethane, methanol, water เท่ากับ 16:5:1) เทียบกับ specific markers และ authentic plants พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1 และ 7 มีรูปแบบเหมือนบัวบกผสมพรมมิ มีแถบที่ขึ้นตรงกับ asiaticoside และมีแถบที่ขึ้นตรงกับ bacoside A3 สมุนไพรหมายเลข 2, 4, 5 และ 6 มีรูปแบบเหมือนบัวบก และมีแถบที่ขึ้นตรงกับ asiaticoside

สมุนไพรหมายเลข 3 มีรูปแบบเหมือนแว่นแก้ว และมีแถบที่ขึ้นตรงกับ quercetin dihydrate สมุนไพรหมายเลข 8 มีรูปแบบเหมือนพรมมิ และมีแถบที่ขึ้นตรงกับ bacoside A3

ผลจาก HPTLC คาดว่าสมุนไพรหมายเลข 1 และ 7 อาจจะเป็นบัวบกหรือพรมมิ สมุนไพรหมายเลข 2, 4, 5 และ 6 อาจจะเป็นบัวบกตรงตามฉลากที่ระบุ สมุนไพรหมายเลข 3 อาจจะเป็นแว่นแก้วซึ่งไม่ตรงตามฉลากที่ระบุว่าเป็นบัวบก สมุนไพรหมายเลข 8 อาจจะเป็นพรมมิตรงตามฉลากที่ระบุ ทั้งนี้ต้องพิจารณาผลการศึกษาอีก 2 วิธีร่วมด้วยเพื่อระบุชนิดของสมุนไพร

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างด้วย PCR-RFLP ของผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่าง พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H1 มีความจำเพาะกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1, 2, 4, 5, 6 และ 7 แสดงว่าสมุนไพรหมายเลข 1, 2, 4, 5 และ 6 เป็นบัวบกตรงตามฉลากที่ระบุ ส่วนสมุนไพรหมายเลข 7 เป็นบัวบกไม่ตรงตามฉลากที่ระบุว่าเป็นพรมมิ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsp*D1 มีความจำเพาะกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 3 แสดงว่าสมุนไพรหมายเลข 3 เป็นแว่นแก้ว ซึ่งไม่ตรงตามฉลากที่ระบุว่าเป็นบัวบก ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sph*1 มีความจำเพาะกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 8 แสดงว่าสมุนไพรหมายเลข 8 เป็นพรมมิตรงตามฉลากที่ระบุ

จากผลการศึกษาผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่างด้วยลายพิมพ์สารเคมีและลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่ามีผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ไม่ตรงตามฉลากระบุคือหมายเลข 3 และหมายเลข 7 จึงนำมาศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อระบุชนิดของสมุนไพร พบว่าสมุนไพรหมายเลข 3 มีขนแบบเซลล์เดียวเหมือนบัวบกและแว่นแก้ว และพบ stomata type แบบ paracytic เหมือนกับแว่นแก้ว แต่จากการทบทวนวรรณกรรมของบัวบกมีการพบ stomata type หลายแบบ โดยมีแบบ paracytic ด้วย ดังนั้นสมุนไพรหมายเลข 3 อาจจะเป็นบัวบกหรือแว่นแก้ว และพบว่าสมุนไพรหมายเลข 7 พบ stomata type แบบ anomocytic เหมือนกับบัวบกและพรมมิ แต่ขอบปากใบของสมุนไพรหมายเลข 7 ไม่มีลักษณะหยักเหมือนกับขอบปากใบของพรมมิ และพบว่ามีขนแบบเซลล์เดียวเหมือนบัวบก ไม่พบ glandular trichome เหมือนที่พบในพรมมิ จึงสามารถระบุได้ว่าสมุนไพรหมายเลข 7 อาจจะเป็นบัวบก

และเมื่อนำผลการศึกษาผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่างด้วยลายพิมพ์สารเคมี ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์มาพิจารณาร่วมกัน แสดงดังตาราง 14

ตาราง 14 แสดงผลการศึกษาผลิตภัณฑ์สมุนไพร 8 ตัวอย่างด้วยลายพิมพ์สารเคมี ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข	**การศึกษาลายพิมพ์สารเคมี**	**การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ**	**การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อ**
1 ผงสมุนไพรบัวบก บรรจุแคปซูล	บัวบกผสมพรมมิ	บัวบก	บัวบกหรือแว่นแก้ว
2 ผงสมุนไพรบัวบก บรรจุแคปซูล	บัวบก	บัวบก	-
3 ชาสมุนไพรบัวบก บรรจุซอง	แว่นแก้ว	แว่นแก้ว	บัวบกหรือแว่นแก้ว
4 ชาสมุนไพรบัวบก บรรจุซอง	บัวบก	บัวบก	-
5 ชาสมุนไพรบัวบก บรรจุซอง	บัวบก	บัวบก	-
6 ผงสมุนไพรบัวบก สำหรับแบ่งบรรจุ	บัวบก	บัวบก	-
7 ชาสมุนไพรพรมมิ	บัวบกผสมพรมมิ	บัวบก	บัวบก
8 ต้นแห้งพรมมิ	พรมมิ	พรมมิ	-

พบถึงความสอดคล้องกันของผลการศึกษาและทำให้สามารถระบุชนิดของสมุนไพรหมายเลข 3 และหมายเลข 7 ได้ว่าสมุนไพรหมายเลข 3 คือแว่นแก้วไม่ใช่บัวบกตามที่ฉลากระบุ และสมุนไพรหมายเลข 7 คือบัวบกไม่ใช่พรมมิตามที่ฉลากระบุ ส่วนสมุนไพรหมายเลข 1, 2, 4, 5 และ 6 เป็นบัวบกตรงตามฉลากที่ระบุ และสมุนไพรหมายเลข 8 เป็นพรมมิตรงตามฉลากที่ระบุ

จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีจำหน่ายในท้องตลาดยังมีการพบการระบุชนิดของสมุนไพรไม่ถูกต้อง ดังนั้นการศึกษาเอกลักษณ์สมุนไพรจึงเป็นสิ่งสำคัญ ทำให้สามารถนำสมุนไพรไปใช้ได้ถูกชนิด โดยการศึกษาเอกลักษณ์สมุนไพรมีหลายวิธี ซึ่งในการศึกษาวิจัยนี้นำเสนอ 3 วิธี คือ ลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลายพิมพ์สารเคมีที่ได้มาจากเทคนิค HPTLC ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างด้วย PCR-RFLP

ข้อดีของวิธีการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์คือพรมมิมีลักษณะเด่นคือ epidermal cell ของพรมมิมีลักษณะหยัก และมีขนแบบ glandular trichome จึงแยกออกจากบัวบกและแว่นแก้วได้ แต่วิธีนี้ไม่สามารถแยกแว่นแก้วและบัวบกได้ วิธีนี้มีข้อจำกัดคืออาศัยทักษะและความชำนาญของผู้วิเคราะห์ เนื่องจากอาจมีเซลล์บางอย่างที่สามารถช่วยในการระบุชนิดของพืชได้ แต่ผู้วิเคราะห์อาจไม่พบเซลล์ดังกล่าว

ข้อดีของเทคนิค HPTLC คือรูปแบบของลายพิมพ์สารเคมีของสมุนไพรมาตรฐานต่างกัน ข้อเสียของวิธีนี้คือ มีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อสารเคมีในสมุนไพร ทั้งสถานที่ปลูก เวลาในการเก็บเกี่ยว อายุของสมุนไพร และกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ก็อาจส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีด้วย ดังเห็นได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1 และหมายเลข 7 ที่มีลายพิมพ์สารเคมีไม่ชัดเจน มีรูปแบบเหมือนทั้งบัวบกและพรมมิ อาจมีปัจจัยบางอย่างที่กล่าวมาส่งผลให้ลายพิมพ์สารเคมีเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อใช้วิธีตรวจสอบลักษณะเนื้อเยื่อไม่พบว่ามีเนื้อเยื่อของพรมมิปน และการตรวจสอบด้วย PCR-RFLP ก็ไม่พบว่ามีดีเอ็นเอของพรมมิ และในงานวิจัยนี้สารเทียบไม่สามารถช่วยยืนยันชนิดสมุนไพรได้เนื่องจากผลิตภัณฑ์สมุนไพรทั้ง 8 ตัวอย่างมีแถบที่ปรากฏตรงกับ asiaticoside ผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1, 7 และ 8 มีแถบที่ปรากฏตรงกับ bacoside A3 ผลิตภัณฑ์สมุนไพรหมายเลข 1-6 มีแถบที่ปรากฏตรงกับ quercetin dihydrate

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีข้อดีคือดีเอ็นเอของสมุนไพรแต่ละชนิดมีลักษณะเฉพาะตัว ดีเอ็นเอไม่เปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม ไม่เปลี่ยนแปลงตามอายุพืช และกระบวนการผลิตไม่ส่งผลให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลง ทำให้สามารถระบุชนิดของสมุนไพรได้ชัดเจนกว่าอีก 2 วิธีข้างต้น

เมื่อใช้ทั้ง 3 วิธีในการศึกษาเอกลักษณ์สมุนไพรจะช่วยจำแนกและยืนยันชนิดของบัวบก พรมมิ แว่นแก้วและผลิตภัณฑ์สมุนไพรได้ ข้อควรระวังในการตรวจสอบพืชทั้ง 3 วิธี คือ ความเป็นเนื้อเดียวกันของตัวอย่างและความทั่วถึงในการสุ่มตัวอย่าง ซึ่งจำเป็นต้องสุ่มตัวอย่างจากหลายบริเวณและปฏิบัติตามข้อกำหนดในการสุ่มตัวอย่าง นอกจากนี้หากพบตัวอย่างที่มีปัญหาควรทำการตรวจสอบตัวอย่างนั้นซ้ำและใช้หลายวิธีในการตรวจสอบร่วมกัน

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

1. Vasantharuba S, Banumathi P, Premalatha MR, Sundaram SP, Thangaiah A. Functional properties of *Centella asiatica* (L.): A review. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2012;4:8-14.
2. Abdul Manap AS, Vijayabalan S, Madhavan P, Chia YY, Arya A, Wong EH, et al. *Bacopa monnieri*, a Neuroprotective Lead in Alzheimer Disease: A Review on Its Properties, Mechanisms of Action, and Preclinical and Clinical Studies. Drug Target Insights. 2019;13:1-13.
3. Srirama R, Santhosh Kumar JU, Seethapathy GS, Newmaster SG, Ragupathy S, Ganeshaiah KN, et al. Species Adulteration in the Herbal Trade: Causes, Consequences and Mitigation. Drug Saf. 2017;40(8):651-61.
4. ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2562. ราชกิจจานุเบกษา. ลงวันที่ 17 เมษายน 2562. Report No.: เล่มที่ 136, ตอนพิเศษ 95 ง
5. Shivatare R, Nagore D, Nipanikar S. 'HPTLC' an important tool in standardization of herbal medical product: A review. Journal of Scientific and Innovative Research. 2013;2:1086-96.
6. Weising K, Nybom H, Pfenninger M, Wolff K, Kahl G. DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2005.
7. Madathilparambil Vasu S. Botanical Pharmacognosy of *Centella asiatica* (Linn.) Urban. Pharmacognosy Journal. 2017;9(4).
8. International Plant Names Index [Internet]. Surrey: The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Herbarium; 2023 [about 1 p.]. Available from: https://www.ipni.org/n/1197718-2.
9. ราชันย์ ภู่มา สส, บรรณาธิการ. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557. กรุงเทพฯ: สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช; 2557.

10. Gupta A, Verma S, Kushwaha P, Srivastava S, Rawat AKS. Quantitative Estimation of Asiatic acid, Asiaticoside & Madecassoside in two accessions of *Centella asiatica* (L) Urban for Morpho-chemotypic variation. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 2014;48:65-9.

11. Rehman R, Yousaf S, Hanif MA, Azeem W, Paulenco A. Medicinal Plants of South Asia, Chapter 32 - Indian Pennywort. 2019. p. 768.

12. Hanapi NA, Mohamad Arshad AS, Abdullah JM, Tengku Muhammad TS, Yusof SR. Blood-Brain Barrier Permeability of Asiaticoside, Madecassoside and Asiatic Acid in Porcine Brain Endothelial Cell Model. J Pharm Sci. 2021;110(2):698-706.

13. Song D, Jiang X, Liu Y, Sun Y, Cao S, Zhang Z. Asiaticoside Attenuates Cell Growth Inhibition and Apoptosis Induced by Aβ(1-42) via Inhibiting the TLR4/NF-κB Signaling Pathway in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. Front Pharmacol. 2018;9:28.

14. Zhang Z, Li X, Li D, Luo M, Li Y, Song L, et al. Asiaticoside ameliorates β-amyloid-induced learning and memory deficits in rats by inhibiting mitochondrial apoptosis and reducing inflammatory factors. Exp Ther Med. 2017;13(2):413-20.

15. Sun T, Liu B, Li P. Nerve Protective Effect of Asiaticoside against Ischemia-Hypoxia in Cultured Rat Cortex Neurons. Med Sci Monit. 2015;21:3036-41.

16. Chen S, Yin ZJ, Jiang C, Ma ZQ, Fu Q, Qu R, et al. Asiaticoside attenuates memory impairment induced by transient cerebral ischemia-reperfusion in mice through anti-inflammatory mechanism. Pharmacol Biochem Behav. 2014;122:7-15.

17. Guo M, Xu J, Wang S, Dong B. Asiaticoside reduces autophagy and improves memory in a rat model of dementia through mTOR signaling pathway regulation. Mol Med Rep. 2021;24(3).

18. PubChem [Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; 2006 [about 1 p.]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Asiaticoside.

19. Zheng X-F, Lu X-Y. Measurement and Correlation of Solubilities of Asiaticoside in Water, Methanol, Ethanol, n-Propanol, n-Butanol, and a Methanol + Water Mixture from (278.15 to 343.15) K. Journal of Chemical & Engineering Data. 2011;56(3):674-7.

20. Parveen R, Shamsi TN, Kumar H, Fatima S. PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND IN VITRO BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF AQUEOUS AND METHANOLIC EXTRACT OF *BACOPA MONNIERI*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2016;8:90-6.

21. Vasu S. Botanical Pharmacognosy of *Bacopa monnieri* (Linn.) Pennell. Pharmacognosy Journal. 2020;12:1559-72.

22. International Plant Names Index [Internet]. Surrey: The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Herbarium; 2023 [about 1 p.]. Available from: https://www.ipni.org/n/1072674-2.

23. Christopher C, Johnson AJ, Mathew PJ, Baby S. Elite genotypes of *Bacopa monnieri*, with high contents of Bacoside A and Bacopaside I, from southern Western Ghats in India. Industrial Crops and Products. 2017;98:76-81.

24. Sekhar VC, Viswanathan G, Baby S. Insights Into the Molecular Aspects of Neuroprotective Bacoside A and Bacopaside I. Curr Neuropharmacol. 2019;17(5):438-46.

25. Hota SK, Barhwal K, Baitharu I, Prasad D, Singh SB, Ilavazhagan G. *Bacopa monniera* leaf extract ameliorates hypobaric hypoxia induced spatial memory impairment. Neurobiology of Disease. 2009;34(1):23-39.

26. Bhardwaj P, Jain CK, Mathur A. Comparative evaluation of four triterpenoid glycoside saponins of bacoside A in alleviating sub-cellular oxidative stress of N2a neuroblastoma cells. J Pharm Pharmacol. 2018;70(11):1531-40.

27. Thomas RB, Joy S, Ajayan MS, Paulose CS. Neuroprotective potential of *Bacopa monnieri* and Bacoside A against dopamine receptor dysfunction in the cerebral cortex of neonatal hypoglycaemic rats. Cell Mol Neurobiol. 2013;33(8):1065-74.

28. PubChem [Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; 2015 [about 1 p.]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bacoside-A3.

29. BioClick [Internet]. Chengdu: BioCrick BioTech; 2007 [about 1 p.]. Available from: https://www.biocrick.com/Bacoside-A-BCC8127.html.

30. Oliveira TLS, Morais SR, Sá S, Oliveira MG, Florentino IF, Silva DMD, et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and anxiolytic-like effects of the ethanolic extract,

fractions and Hibalactone isolated from *Hydrocotyle umbellata* L. (Acariçoba) - Araliaceae. Biomed Pharmacother. 2017;95:837-46.

31. Fagundes da Rocha F, Silva-Almeida C, Santos R, Santana S, Costa E, Paula J, et al. Anxiolytic-like and sedative effects of *Hydrocotyle umbellata* extract in mice. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2011;21:115-20.

32. Hamdy SA, El Hefnawy HM, Azzam SM, Aboutabl EA. Chemical profiling, volatile oil analysis and anticholinesterase activity of *Hydrocotyle umbellata* L. aerial parts cultivated in Egypt. South African Journal of Botany. 2018;115:108-12.

33. Hamdy SA, El Hefnawy HM, Azzam SM, Aboutabl EA. Botanical and genetic characterization of *Hydrocotyle umbellata* L. cultivated in Egypt. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University. 2018;56(1):46-53.

34. International Plant Names Index [Internet]. Surrey: The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Herbarium; 2023 [about 1 p.]. Available from: https://www.ipni.org/n/843746-1.

35. Hamdy SA, Menze ET, El Hefnawy HM, Azzam SM, Aboutabl EA. In-vivo Anti-inflammatory Activity of *Hydrocotyle umbellata* L. aerial parts and Isolation of the Main Phytochemicals. Iran J Pharm Res. 2020;19(3):34-44.

36. Oliveira MGd, Almeida PHGd, Oliveira TLS, Silva LdS, Carvalho FSd, Alves SF, et al. HPLC-PDA method validated for the determination of hibalactone in *Hydrocotyle umbellata* subterraneous parts and its ultrasound-assisted extraction optimization. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2019;29(2):162-70.

37. Khan H, Ullah H, Aschner M, Cheang WS, Akkol EK. Neuroprotective Effects of Quercetin in Alzheimer's Disease. Biomolecules. 2019;10(1).

38. Barbosa CC, Rodrigues TC, Ataídes CFS, Santos ML, Ghedini PC, Dias Junior W, et al. Protective effects of *Hydrocotyle umbellata* var. *bonariensis* Lam. (Araliaceae) on memory in sleep-impaired female mice. Journal of Ethnopharmacology. 2019;245:112183.

39. PubChem [Internet]. Bethesda: National Library of Medicine; 2005 [about 1 p.]. Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284452.

40. Patel AA, Amin AA, Patwari AH, Shah MB. Validated high performance thin layer

chromatography method for simultaneous determination of quercetin and gallic acid in Leea indica. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2017;27(1):50-3.

41. BPS Bioscience [Internet]. San Diego: BPS Bioscience, Inc.; 2023 [about 1 p.]. Available from: https://bpsbioscience.com/quercetin-27214.

42. นพมาศ สุนทรเจริญนนท์, นงลักษณ์ เรืองวิเศษ. คุณภาพเครื่องยาไทย จากงานวิจัยสู่การพัฒนาอย่างยั่งยืน. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ; 2551.

43. กลุ่มจัดทำตำรายาของประเทศไทย สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. คู่มือการจัดทำข้อมูลเพื่อกำหนดมาตรฐานยาสมุนไพรไทยในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia, THP). นนทบุรี: 1241 มิราคูลัส; 2560.

44. สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia 2021). นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์; 2564.

45. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. North Clin Istanb. 2016;3(2):156-60.

46. Bele A, Khale A. An overview on thin layer chromatography. Int J Pharm Pharm Sci. 2011;2.

47. Bairy P. A COMPARISON STUDY OF HPLC AND HPTLC: PRINCIPLES, INSTRUMENTATIONS AND APPLICATIONS. ASIO Journal of Analytical Chemistry (ASIO-JAC). 2015;1:20-8.

48. Ramu B, Kishorebabu C. High Performance Thin Layer Chromatography and Its Role Pharmaceutical Industry: Review. Open Science. 2018;5:29-34.

49. Merck [Internet]. Darmstadt: Merck KGaA; 2022 [about 1 p.]. Available from: https://www.merckmillipore.com/TH/en/analytics-sample-preparation/learning-center-thin-layer-chromatography/hptlc/NGub.qB.fCoAAAFVPmJDx07N,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F.

50. Patel R, Patel M, Nitin D, Dubey N, Bharat P. HPTLC Method Development and Validation: Strategy to Minimize Methodological Failures. Journal of Food and Drug Analysis. 2012;20:794-804.

51. วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์. การตรวจวิเคราะห์สารพิษโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี่. วารสาร

เทคนิคการแพทย์เชียงใหม่. 2538;28(2):22-33.

52. Prof. Dr. Christian Reichardt PDTW. Classification of Solvents. Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry. 4th Edition ed. New York: VCH Publishers; 2010. p. 65-106.

53. Joshi M, Deshpande J. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. International Journal of Biomedical Research. 2011;2.

54. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. พิมพ์ครั้งที่ 1 ed. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์; 2545.

55. Bartlett JMS, Stirling D. Methods in Molecular Biology, Vol. 226: PCR Protocols. 2nd ed. Totowa: Humana Press; 2003.

56. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988;239(4839):487-91.

57. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet. 1980;32(3):314-31.

58. เมษิณี ประสานจิตต์. การตรวจพิสูจน์หลักฐานดีเอ็นเอทางนิติวิทยาศาสตร์จากอดีตถึงปัจจุบันและการตรวจพิสูจน์จีโนไทป์ของหมู่เลือดระบบเอบีโอจากคราบเลือดเพื่อประโยชน์ทางนิติวิทยาศาสตร์ [วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์]. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์; 2562.

59. Rasmussen HB. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting, Gel Electrophoresis - Principles and Basics. Magdeldin DS, editor: InTech; 2012.

60. Magdeldin S. Gel electrophoresis: Principles and basics: BoD–Books on Demand; 2012.

61. Yılmaz M, Ozic C, Gok I. Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. Gel Electrophoresis–Principles and Basics. 2012;4:33.

62. Patricia B, Silvia N. Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities. In: Sameh M, editor. Gel Electrophoresis. Rijeka: IntechOpen; 2012. p. Ch. 1.

63. สุรีพร เกตุงาม. เครื่องหมายดีเอ็นเอ ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช DNA Markers in Plant Breeding วารสารวิชาการ มอบ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 2546;5(2):37-59.

64. Hilu K, Liang H. The matK gene: sequence variation and application in plant systematics. Am J Bot. 1997;84(6):830.

65. C M, John A, A S, V G, Kannan B N, A K. PHARMACOGNOSTIC AND HPTLC BASED COMPARATIVE STUDY ON LEAVES OF *MERREMIA EMARGINATA* BURM. F. AND *CENTELLA ASIATICA* (L.) URBAN. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 2019:29-37.

66. Jelani S, Jabeen F, Prabhakar M, Leelavathi P. Pharmacognostic studies on *centella asiatica* (L) urban. Anc Sci Life. 1993;12(3-4):439-50.

67. Shaba Khan N, Chaurasia B, Kumar Dixit A. Pharmacognostic Characterization for Taxonomic Identification of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. for Quality Control. International journal of pharma and bio sciences. 2021;11:54-62.

68. Gubbannavar JS, Chandola HM, Harisha CR, Khanpara K, Shukla VJ. A comparative pharmacognostical and preliminary physico-chemical analysis of stem and leaf of *Bacopa monnieri* (L.) Pennel and *Bacopa floribunda* (R.BR.) Wettst. Ayu. 2013;34(1):95-102.

69. American Herbal Products Association Silver Spring: American Herbal Products Association; 2015 [about 1 p.]. Available from: http://www.botanicalauthentication.org/index.php/Bacopa_monnieri_(whole_plant).

70. Saesong T, Nangngam P, Ingkaninan K. Pharmacognostic and physico-chemical investigations of the aerial part of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 2019;41:397-404.

71. HPTLC Association [Internet]. Rheinfelden: International Association for the Advancement of High Performance Thin Layer Chromatography; 2023 [about 1 p.]. Available from: https://www.hptlc-association.org/atlas/hptlc-

atlas.cfm?atlasCommand=plant&uuid=03V99LTP.

72. Patel LJ, Raval MA, Patel SG, Patel AJ. Development and Validation of Stability Indicating High-Performance Thin-Layer Chromatographic (HPTLC) Method for Quantification of Asiaticoside from *Centella asiatica* L. and its Marketed Formulation. J AOAC Int. 2019;102(4):1014-20.

73. Kaur I, Suthar N, Kaur J, Bansal Y, Bansal G. Accelerated Stability Studies on Dried Extracts of *Centella asiatica* Through Chemical, HPLC, HPTLC, and Biological Activity Analyses. J Evid Based Complementary Altern Med. 2016;21(4):Np127-37.

74. Pai V, Chandrashekar KS, Rao P, Setty M. High-performance thin-layer chromatography marker-based standardization of Piperine, Asiaticoside, and Withanolide-A in the developed polyherbal formulation and in vitro evaluation of acetylcholinesterase inhibition. Pharmacognosy Magazine. 2019;15:256-60.

75. HPTLC Association [Internet]. Rheinfelden: International Association for the Advancement of High Performance Thin Layer Chromatography; 2023 [about 1 p.]. Available from: https://www.hptlc-association.org/atlas/hptlc-atlas.cfm?atlasCommand=plant&uuid=593ZI8L8.

76. Shrikumar S, Sandeep S, Ravi TK, Umamaheswari M. A HPTLC determination and fingerprinting of Bacoside A in *Bacopa monnieri* and its formulation. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2004;66:132-5.

77. Prakash O, Singh G, Singh R, Mathur S, Bajpai M, Yadav S. Determination of bacoside A by HPTLC in *Bacopa monnieri* extract. International Journal of Green Pharmacy. 2008;2.

78. Devkota A. Ecophysiological study of *Centella asiatica* (Linn.) Urban of Nepal. Department of Botany: Central Department of Botany; 2011.

79. Prasad A, Dhawan SS, Mathur AK, Prakash O, Gupta MM, Verma RK, et al. Morphological, chemical and molecular characterization of *Centella asiatica* germplasms for commercial cultivation in the Indo-Gangetic plains. Nat Prod Commun. 2014;9(6):779-84.

80. Zhang XG, Han T, He ZG, Zhang QY, Zhang L, Rahman K, et al. Genetic diversity

of *Centella asiatica* in China analyzed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: combination analysis with chemical diversity. J Nat Med. 2012;66(1):241-7.

81. Saha S, Adhikari S, Mukhopadhyay S, Ghosh P. Comparative studies on regeneration of different tissues of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst in vitro and analysis of genetic homogeneity by random DNA markers (RDMs). Acta Ecologica Sinica. 2022.

82. Ramesh M, Vijayakumar K, Alagarsamy K, Pandian S. RAPD based genetic stability analysis among micropropagated, synthetic seed derived and hardened plants of *Bacopa monnieri* (L.): a threatened Indian medicinal herb. Acta Physiologiae Plantarum. 2011;33:163-71.

83. Karthikeyan A, Madhanraj A, Pandian SK, Ramesh M. Genetic variation among highly endangered *Bacopa monnieri* (L.) Pennell from Southern India as detected using RAPD analysis. Genetic Resources and Crop Evolution. 2011;58(5):769-82.

84. Tripathi N, Chouhan DS, Saini N, Tiwari S. Assessment of genetic variations among highly endangered medicinal plant *Bacopa monnieri* (L.) from Central India using RAPD and ISSR analysis. 3 Biotech. 2012;2(4):327-36.

85. วิเชียร กีรตินิจกาล. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวบก (*Centella asiatica* L.) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา. สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). 2562.

ภาคผนวก

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
AcsI	8	62 618 703 886 1442 1527 2207 2292	r/aatty
AcyI	3	436 1260 2025	gr/cgyc
AflIII	3	713 1537 2302	a/crygt
Alw21I	3	579 1403 2168	gwgcw/c
Alw44I	3	575 1399 2164	g/tgcac
AlwNI	3	763 1587 2352	cagnnn/ctg
ApaLI	3	575 1399 2164	g/tgcac
ApoI	8	62 618 703 886 1442 1527 2207 2292	r/aatty
AseI	3	644 1468 2233	at/taat
AsnI	3	644 1468 2233	at/taat
Asp700I	3	801 1625 2390	gaann/nnttc
AspHI	3	579 1403 2168	gwgcw/c
BamHI	5	378 1202 1644 1967 2409	g/gatcc
BbiII	3	436 1260 2025	gr/cgyc
Bbv12I	3	579 1403 2168	gwgcw/c
BglII	3	175 999 1764	a/gatct
BsaHI	3	436 1260 2025	gr/cgyc
BsaI	3	508 1332 2097	ggtctc
BsiHKAI	3	579 1403 2168	gwgcw/c
BspLU11I	3	713 1537 2302	a/catgt
BsrDI	3	488 1312 2077	gcaatg
BstI	5	378 1202 1644 1967 2409	g/gatcc
BstX2I	11	175 378 518 999 1202 1342 1644 1764 1967 2107 2409	r/gatcy
BstYI	11	175 378 518 999 1202 1342 1644 1764 1967 2107 2409	r/gatcy
Eam1104I	2	823 1684	ctcttc
EarI	2	823 1684	ctcttc
Eco31I	3	508 1332 2097	ggtctc
EcoT22I	3	392 1216 1981	atgca/t
Hin1I	3	436 1260 2025	gr/cgyc
HindIII	1	817	a/agctt
Hsp92I	3	436 1260 2025	gr/cgyc
Ksp632I	2	823 1684	ctcttc
MflI	11	175 378 518 999 1202 1342 1644 1764 1967 2107 2409	r/gatcy
Mph1103I	3	392 1216 1981	atgca/t
Msp17I	3	436 1260 2025	gr/cgyc
NsiI	3	392 1216 1981	atgca/t
NspI	3	717 1541 2306	rcatg/y
Ppu10I	3	388 1212 1977	a/tgcat
PshBI	3	644 1468 2233	at/taat
VneI	3	575 1399 2164	g/tgcac
VspI	3	644 1468 2233	at/taat
XbaI	3	280 1104 1869	t/ctaga
XhoII	11	175 378 518 999 1202 1342 1644 1764 1967 2107 2409	r/gatcy
XmnI	3	801 1625 2390	gaann/nnttc
Zsp2I	3	392 1216 1981	atgca/t

ภาพประกอบ 37 แสดงตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของบัวบก โดยใช้โปรแกรม webcutter

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
AatII	3	409 1233 2079	gacgt/c
AclNI	3	700 1524 2370	a/ctagt
AcsI	16	523 578 588 619 673 1347 1402 1412 1443 1497 1695 2193 2248 2258 2289 2343	r/aatty
AcyI	3	406 1230 2076	gr/cgyc
Alw21I	3	216 1040 1886	gwgcw/c
Alw44I	3	212 1036 1882	g/tgcac
ApaLI	3	212 1036 1882	g/tgcac
ApoI	16	523 578 588 619 673 1347 1402 1412 1443 1497 1695 2193 2248 2258 2289 2343	r/aatty
AseI	3	602 1426 2272	at/taat
AsnI	3	602 1426 2272	at/taat
Asp700I	3	771 1595 2441	gaann/nnttc
AspHI	3	216 1040 1886	gwgcw/c
BbiII	3	406 1230 2076	gr/cgyc
BbuI	3	360 1184 2030	gcatg/c
Bbv12I	3	216 1040 1886	gwgcw/c
Bpu14I	3	733 1557 2403	tt/cgaa
BsaAI	3	211 1035 1881	yac/gtr
BsaBI	3	237 1061 1907	gatnn/nnatc
BsaHI	3	406 1230 2076	gr/cgyc
Bse118I	3	708 1532 2378	r/ccggy
Bse8I	3	237 1061 1907	gatnn/nnatc
Bsh1365I	3	237 1061 1907	gatnn/nnatc
BsiHKAI	3	216 1040 1886	gwgcw/c
Bsp119I	3	733 1557 2403	tt/cgaa
BsrBRI	3	237 1061 1907	gatnn/nnatc
BsrFI	3	708 1532 2378	r/ccggy
BssAI	3	708 1532 2378	r/ccggy
BstBI	3	733 1557 2403	tt/cgaa
Cfr10I	3	708 1532 2378	r/ccggy
Csp45I	3	733 1557 2403	tt/cgaa
Eam1104I	1	25	ctcttc
EarI	1	25	ctcttc
Eco57I	3	565 1389 2235	ctgaag
EcoT22I	3	45 869 1715	atgca/t
Hin1I	3	406 1230 2076	gr/cgyc
HincII	3	297 1121 1967	gty/rac
HindII	3	297 1121 1967	gty/rac
HindIII	1	1696	a/agctt
HpaI	3	297 1121 1967	gtt/aac
Hsp92I	3	406 1230 2076	gr/cgyc
Ksp632I	1	25	ctcttc
LspI	3	733 1557 2403	tt/cgaa
MamI	3	237 1061 1907	gatnn/nnatc
Mph1103I	3	45 869 1715	atgca/t
MslI	3	179 1003 1849	caynn/nnrtg
Msp17I	3	406 1230 2076	gr/cgyc
NsiI	3	45 869 1715	atgca/t
NspI	3	360 1184 2030	rcatg/y
NspV	3	733 1557 2403	tt/cgaa
PaeI	3	360 1184 2030	gcatg/c
Ppu10I	3	41 865 1711	a/tgcat
PshBI	3	602 1426 2272	at/taat
SfuI	3	733 1557 2403	tt/cgaa
SpeI	3	700 1524 2370	a/ctagt
SphI	3	360 1184 2030	gcatg/c
SspI	3	738 1562 2408	aat/att
VneI	3	212 1036 1882	g/tgcac
VspI	3	602 1426 2272	at/taat
XbaI	3	582 1406 2252	t/ctaga
XmnI	3	771 1595 2441	gaann/nnttc
Zsp2I	3	45 869 1715	atgca/t

ภาพประกอบ 38 แสดงตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพรมมิ โดยใช้โปรแกรม webcutter

Enzyme name	No. cuts	Positions of sites	Recognition sequence
AcsI	3	625 1366 2061	r/aatty
AcyI	3	358 1099 1794	gr/cgyc
AgeI	3	698 1439 2134	a/ccggt
AlwNI	3	685 1426 2121	cagnnn/ctg
ApoI	3	625 1366 2061	r/aatty
Asp700I	3	723 1464 2159	gaann/nnttc
BamHI	1	1483	g/gatcc
BanIII	3	337 1078 1773	at/cgat
BbiII	3	358 1099 1794	gr/cgyc
Bsa29I	3	337 1078 1773	at/cgat
BsaAI	3	523 1264 1959	yac/gtr
BsaHI	3	358 1099 1794	gr/cgyc
BsaI	3	430 1171 1866	ggtctc
BsaWI	3	698 1439 2134	w/ccggw
BscI	3	337 1078 1773	at/cgat
Bse118I	3	698 1439 2134	r/ccggy
BseCI	3	337 1078 1773	at/cgat
BsiI	2	48 789	ctcgtg
BsmBI	3	360 1101 1796	cgtctc
Bsp106I	3	337 1078 1773	at/cgat
BspDI	3	337 1078 1773	at/cgat
BspXI	3	337 1078 1773	at/cgat
BsrDI	3	410 1151 1846	gcaatg
BsrFI	3	698 1439 2134	r/ccggy
BssAI	3	698 1439 2134	r/ccggy
BssSI	2	48 789	ctcgtg
BstI	1	1483	g/gatcc
BstX2I	1	1483	r/gatcy
BstYI	1	1483	r/gatcy
Bsu15I	3	337 1078 1773	at/cgat
Cfr10I	3	698 1439 2134	r/ccggy
ClaI	3	337 1078 1773	at/cgat
DraII	3	300 1041 1736	rg/gnccy
Eco31I	3	430 1171 1866	ggtctc
EcoO109I	3	300 1041 1736	rg/gnccy
EcoT22I	3	314 1055 1750	atgca/t
Esp3I	3	360 1101 1796	cgtctc
Hin1I	3	358 1099 1794	gr/cgyc
Hsp92I	3	358 1099 1794	gr/cgyc
MflI	1	1483	r/gatcy
Mph1103I	3	314 1055 1750	atgca/t
MslI	2	5 746	caynn/nnrtg
Msp17I	3	358 1099 1794	gr/cgyc
NsiI	3	314 1055 1750	atgca/t
PinAI	3	698 1439 2134	a/ccggt
Ppu10I	3	310 1051 1746	a/tgcat
PpuMI	3	300 1041 1736	rg/gwccy
Psp5II	3	300 1041 1736	rg/gwccy
XhoII	1	1483	r/gatcy
XmnI	3	723 1464 2159	gaann/nnttc
Zsp2I	3	314 1055 1750	atgca/t

ภาพประกอบ 39 แสดงตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของแว่นแก้ว โดยใช้โปรแกรม webcutter

สำเนา

แบบ สป/สผ/อสป/001-ก
หน้า 1 ของจำนวน 2 หน้า

คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ การประดิษฐ์
☐ การออกแบบผลิตภัณฑ์
☑ อนุสิทธิบัตร

ข้าพเจ้าผู้ลงลายมือชื่อในคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ตามพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2535 และ พระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542

สำหรับเจ้าหน้าที่	
วันรับคำขอ 02 พย 2566	เลขที่คำขอ
วันยื่นคำขอ 02 พย 2566	2303003219
สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	
ใช้กับแบบผลิตภัณฑ์ ประเภทผลิตภัณฑ์	
วันประกาศโฆษณา	เลขที่ประกาศโฆษณา
วันออกสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร	เลขที่สิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
ลายมือชื่อเจ้าหน้าที่	

1. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์ กรรมวิธีการจำแนกบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว โดยใช้พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP)

2. คำขอรับสิทธิบัตรการออกแบบผลิตภัณฑ์นี้เป็นคำขอสำหรับแบบผลิตภัณฑ์อย่างเดียวกันและเป็นคำขอลำดับที่ ______
ในจำนวน ______ คำขอ ที่ยื่นในคราวเดียวกัน

3. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☐ บุคคลธรรมดา ☑ นิติบุคคล ☐ หน่วยงานรัฐ ☐ มูลนิธิ ☐ อื่นๆ ______
ชื่อ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ 114 ซอยสุขุมวิท 23
ตำบล/แขวง คลองเตยเหนือ อำเภอ/เขต วัฒนา จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10110 ประเทศ ไทย
อีเมล ______
☐ เลขประจำตัวประชาชน ☑ เลขทะเบียนนิติบุคคล ☐ เลขประจำตัวผู้เสียภาษีอากร 0 9 9 4 0 0 0 1 5 8 1 8 1 ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)
ในกรณีที่กรมฯ สื่อสารกับท่าน ท่านสะดวกใช้ทาง ☐ อีเมลผู้ขอ ☑ อีเมลตัวแทน

3.1 สัญชาติ ไทย
3.2 โทรศัพท์ 0-26495000 ต่อ11015,11081
3.3 โทรสาร 0-2259-1822

4. สิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบ ☑ ผู้รับโอน ☐ ผู้ขอรับสิทธิโดยเหตุอื่น

5. ตัวแทน (ถ้ามี)
ชื่อ นางสาวนิยดา รุ่งเรืองผล
ที่อยู่ 114 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ซอยสุขุมวิท 23
ตำบล/แขวง คลองเตยเหนือ อำเภอ/เขต วัฒนา จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10110 ประเทศ ไทย
อีเมล niyada76@gmail.com
เลขประจำตัวประชาชน 3 2 2 0 1 0 0 2 9 0 9 1 7 ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

5.1 ตัวแทนเลขที่ 2454
5.2 โทรศัพท์ 0-26495000 ต่อ11015,11081
5.3 โทรสาร 0-2259-1822

6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์ ☐ ชื่อและที่อยู่เดียวกันกับผู้ขอ
ชื่อ นางสาววรพรรณ สิทธิถาวร
ที่อยู่ 52/248 หมู่ 7
ตำบล/แขวง หลักหก อำเภอ/เขต เมือง จังหวัด ปทุมธานี รหัสไปรษณีย์ 12000 ประเทศ ไทย
อีเมล worapan@g.swu.ac.th
เลขประจำตัวประชาชน 3 1 4 9 9 0 0 2 0 7 8 1 9 ☑ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

7. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิม
ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้ถือว่าได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ ในวันเดียวกับคำขอรับสิทธิบัตร
เลขที่ ______ วันยื่น ______ เพราะคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้แยกจากหรือเกี่ยวข้องกับคำขอเดิมเพราะ
☐ คำขอเดิมมีการประดิษฐ์หลายอย่าง ☐ ถูกคัดค้านเนื่องจากผู้ขอไม่มีสิทธิ ☐ ขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ

<u>หมายเหตุ</u> ในกรณีที่ไม่อาจระบุรายละเอียดได้ครบถ้วน ให้จัดทำเป็นเอกสารแนบท้ายแบบพิมพ์นี้โดยระบุหมายเลขกำกับข้อและหัวข้อที่แสดงรายละเอียดเพิ่มเติมดังกล่าวด้วย

สำหรับเจ้าหน้าที่

จำแนกประเภทสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร

☐ กลุ่มวิศวกรรม	☐ กลุ่มเคมี	สิทธิบัตรการออกแบบ	อนุสิทธิบัตร
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (วิศวกรรม)	สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เคมีเทคนิค)	☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 1)	☐ อนุสิทธิบัตร (วิศวกรรม)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ไฟฟ้า)	สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ปิโตรเคมี)	☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 2)	☐ อนุสิทธิบัตร (เคมี)
สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (ฟิสิกส์)	สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เทคโนโลยีชีวภาพ)	☐ สิทธิบัตรการออกแบบ (ออกแบบผลิตภัณฑ์ 3)	
	สิทธิบัตรการประดิษฐ์ (เภสัชภัณฑ์)		

ภาพประกอบ 40 แสดงสำเนาคำขอรับอนุสิทธิบัตร กรรมวิธีการจำแนกบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว โดยใช้พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP) เลขที่ 2303003219

แบบ สป/สผ/อสป/001-ก (ใบต่อ)
หน้า 2 ของจำนวน 2 หน้า

8. การยื่นคำขอนอกราชอาณาจักร ☐ PCT ☐ เพิ่มเติม (ดังแนบ)

วันยื่นคำขอ	เลขที่คำขอ	ประเทศ	สัญลักษณ์จำแนกการประดิษฐ์ระหว่างประเทศ	สถานะคำขอ
8.1				
8.2				
8.3				

8.4 ☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอสิทธิให้ถือว่าได้ยื่นคำขอนี้ในวันที่ได้ยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรในต่างประเทศเป็นครั้งแรกโดย
☐ ได้ยื่นเอกสารหลักฐานพร้อมคำขอนี้ ☐ ขอยื่นเอกสารหลักฐานหลังจากวันยื่นคำขอนี้

9. การแสดงการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรได้แสดงการประดิษฐ์ที่หน่วยงานของรัฐเป็นผู้จัด
วันแสดง วันเปิดงานแสดง ผู้จัด

10. การประดิษฐ์เกี่ยวกับจุลชีพ

10.1 เลขทะเบียนฝากเก็บ	10.2 วันที่ฝากเก็บ	10.3 สถาบันฝากเก็บ/ประเทศ

11. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอยื่นเอกสารภาษาต่างประเทศก่อนในวันยื่นคำขอนี้ และจะจัดยื่นคำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ที่จัดทำเป็นภาษาไทยภายใน 90 วัน นับจากวันยื่นคำขอนี้ โดยขอยื่นเป็นภาษา
☐ อังกฤษ ☐ ฝรั่งเศส ☐ เยอรมัน ☐ ญี่ปุ่น ☐ อื่นๆ

12. ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ขอให้อธิบดีประกาศโฆษณาคำขอรับสิทธิบัตร หรือรับจดทะเบียน และประกาศโฆษณาอนุสิทธิบัตรนี้ หลังจากวันที่
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรขอให้ใช้รูปเขียนหมายเลข ในการประกาศโฆษณา

13. คำขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรนี้ประกอบด้วย
ก. แบบพิมพ์คำขอ 3 หน้า
ข. รายละเอียดการประดิษฐ์ หรือคำพรรณนาแบบผลิตภัณฑ์ 5 หน้า
ค. ข้อถือสิทธิ 2 หน้า
ง. รูปเขียน 2 รูป 1 หน้า
จ. ภาพแสดงแบบผลิตภัณฑ์
☐ รูปเขียน รูป หน้า
☐ ภาพถ่าย รูป หน้า
ฉ. บทสรุปการประดิษฐ์ 1 หน้า

14. เอกสารประกอบคำขอ
☑ เอกสารแสดงสิทธิในการขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร
☐ หนังสือรับรองการแสดงการประดิษฐ์/การออกแบบผลิตภัณฑ์
☑ หนังสือมอบอำนาจ
☐ เอกสารรายละเอียดเกี่ยวกับจุลชีพ
☐ เอกสารการขอนับวันยื่นคำขอในต่างประเทศเป็นวันยื่นคำขอในประเทศไทย
☐ เอกสารขอเปลี่ยนแปลงประเภทของสิทธิ
☑ เอกสารอื่นๆ

15. ข้าพเจ้าขอรับรองว่า
☑ การประดิษฐ์นี้ไม่เคยยื่นขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตรมาก่อน
☐ การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาปรับปรุงมาจาก

16. ลายมือชื่อ
☐ ผู้ขอรับสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร ☑ ตัวแทน
(นางสาวนิยดา รุ่งเรืองผล)

หมายเหตุ บุคคลใดยื่นขอรับสิทธิบัตรการประดิษฐ์หรือการออกแบบผลิตภัณฑ์ หรืออนุสิทธิบัตร โดยการแสดงข้อความอันเป็นเท็จแก่พนักงานเจ้าหน้าที่ เพื่อให้ได้ไปซึ่งสิทธิบัตรหรืออนุสิทธิบัตร ต้องระวางโทษจำคุกไม่เกินหกเดือน หรือปรับไม่เกินห้าพันบาท หรือทั้งจำทั้งปรับ

ภาพประกอบ 40 (ต่อ) แสดงสำเนาคำขอรับอนุสิทธิบัตร กรรมวิธีการจำแนกบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว โดยใช้พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP) เลขที่ 2303003219

แบบ สป/สผ/อสป/012-ก

หน้า 1 ของจำนวน 1 หน้า

ใบต่อแนบท้าย แบบ สป/สผ/อสป/001-ก

เพิ่มเติมข้อ 6. ผู้ประดิษฐ์/ผู้ออกแบบผลิตภัณฑ์

2. **นางสาวมณิสร สุขสวัสดิ์**
หน่วยงานต้นสังกัด นิสิตบัณฑิตศึกษาคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ 25/87 หมู่ 6 ต.ต้นมะม่วง อ.เมืองเพชรบุรี จ.เพชรบุรี 76000

เลขบัตรประชาชน 1769900397373

ภาพประกอบ 40 (ต่อ) แสดงสำเนาคำขอรับอนุสิทธิบัตร กรรมวิธีการจำแนกบัวบก พรมมิ และแว่นแก้ว โดยใช้พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP) เลขที่ 2303003219

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล มณิสร สุขสวัสดิ์

วัน เดือน ปี เกิด 7 กันยายน 2538

สถานที่เกิด เพชรบุรี

วุฒิการศึกษา พ.ศ. 2561 วิทยาศาสตรบัณฑิต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย