

บทความวิจัย (Research Article)

**ความหลากหลายทางพันธุกรรม องค์ประกอบพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของ
พญาอจากภาคเหนือของประเทศไทย**

สาลินี เชียงชิน¹, สุภาวดี ทองยิม², หทัยชนก ปันดิษฐ์², ธิดา แก้วคต², อังคณา อินตา², ยິงมณี ตระกูลพั้ว²,
สันติ วัฒนฐานะ³, สิริพร โรจน์อารยานนท์² และ อุษรา ปัญญา^{2*}

**Genetic diversity, Phytochemical composition and bioactivity, of saba snake
grass, (*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau) of Northern Thailand**

Salinee Chiangchin¹, Supawadee Thongyim², Hataichanok Pundith², Thida Kaewkod², Angkhana Inta²,
Santi Watthana³, Siriphorn Rotarayanont², and Aussara Panya^{2*}

¹ Master of Science Program in Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

² Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

³ Program in Biology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000

* Corresponding author: aussara.pan@cmu.ac.th

Naresuan Phayao J. 2021;14(3):63-73.

Received; 9 October 2020; Revised: 7 December 2020; Accepted: 7 September 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรม องค์ประกอบพฤกษเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของพญาอจาก (*Clinacanthus nutans*) ที่เก็บจากแหล่งธรรมชาติในเขตภาคเหนือจำนวน 3 แหล่ง คือ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา ด้วยเทคนิค sequence-related amplified polymorphism (SRAP-PCR) พบว่าสามารถแยกพญาอจากและพืชในวงศ์เดียวกันได้อย่างชัดเจน เมื่อนำสารสกัดมาวิเคราะห์องค์ประกอบพฤกษเคมี ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ พบว่าสารหลักที่พบ คือ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดพญาอจากจังหวัดเชียงใหม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงกว่าแหล่งอื่น โดยสัมพันธ์กับปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ในตัวอย่าง

คำสำคัญ : พญาอจาก, สารสกัดหยาบ, องค์ประกอบพฤกษเคมี, ฤทธิ์ทางชีวภาพ

¹ หลักสูตรบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

² ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

³ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา 30000

Abstract

The study aimed to investigate genetic diversity, phytochemical composition, and bioactivity of *Clinacanthus nutans* collected from tree provinces of northern Thailand including Chiang Mai, Chiang Rai, and Phayao using sequence-related amplified polymorphism (SRAP-PCR) technique. The data suggested that *C. nutans* could be clearly differentiated from those of the same family. Thin layer chromatography was performed to determine the major phytochemical composition in *C. nutans* extract. The results showed that the major composition in *C. nutans* extract was flavonoid. We investigated the bioactivity of the extracts. The results showed that the extracts of *C. nutans* taken from Chiang Mai possessed the highest antioxidant and antibacterial activity. A significant correlation was found between the antioxidant and antibacterial activity of extract and the highest amount of flavonoid content.

Keywords: Sabah snake grass, Crude extract, Phytochemical composition, Bioactivity

บทนำ

พญาหอ หรือ เสลดพังพอนตัวเมีย (*Clinacanthus nutans*) เป็นพืชในวงศ์ Acanthaceae มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนของประเทศในแถบเอเชีย ในประเทศไทยมักพบขึ้นตามป่าเบญจพรรณ หรือปลูกตามบ้าน ทั่วทุกภาคของประเทศ ใบของพญาหอมีสรรพคุณทางยาในการรักษาโรคทางผิวหนัง แผลไฟไหม้ หรือแผลที่เกิดจากเชื้อไวรัส Herpes simplex virus type 2 และ Varicella-zoster virus [1] ที่พบในผู้ป่วยโรคเริม และงูสวัด ทำให้แผลหายเร็ว ลดอาการปวดได้ดี และไม่มีผลข้างเคียง นอกจากนี้ยังมีรายงานฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบของพญาหอพบว่ามีฤทธิ์เป็นต้านสารอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงถึง 82% เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว [2] และช่วยลดสารไนตริกออกไซด์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบจากสาเหตุการติดเชื้อ หรือได้รับสิ่งกระตุ้นอื่น ๆ เช่น สารพิษ [3] นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบว่าพญาหอมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่ม *Staphylococcus* และ *Bacillus* ได้เป็นอย่างดี โดยแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มเป็นสาเหตุการก่อโรคทางผิวหนัง และอาหารเป็นพิษ [4,5] ปัจจุบันพญาหอจึงมีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในการรักษาโรค ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของสารสกัดพญาหอในทางการแพทย์และเชิงการค้า

องค์ประกอบและชนิดของสารพฤกษเคมีที่สำคัญในพืชสมุนไพรเป็นปัจจัยหลักในการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพร สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจัดเป็นสารทุติยภูมิเฉพาะของพืชแต่ละชนิด ทั้งนี้มีรายงานว่าพญาหอมีสารประกอบทุติยภูมิกลุ่ม กลีเซอไรด์ ไตรเทอพีนอยด์ ฟีนอลิก และ ฟลาโวนอยด์ [6] นอกเหนือจากสารประกอบที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ในพญาหอยังมีสารประกอบอื่น ๆ ที่อยู่ระหว่างการศึกษาก็เป็นจำนวนมาก โดยระดับของสารพฤกษเคมีในพืชสามารถเปลี่ยนแปลงได้แม้ในพืชชนิดเดียวกัน โดยอาจจะได้รับอิทธิพลจากพันธุกรรม หรือสภาพแวดล้อมรวมถึงกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยว เช่น การอบแห้ง หรือการสกัดที่อาจส่งผลต่อระดับของสารพฤกษเคมีในพืช [7] ที่ผ่านมายังไม่มีการรายงานการศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรม องค์ประกอบพฤกษเคมีและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพญาหอที่ปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม องค์ประกอบพฤกษเคมีเบื้องต้น และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระและแบคทีเรียของพญาหอจากพื้นที่ต่าง ๆ ของภาคเหนือ การวิจัยนี้แสดงผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค sequence-related amplified polymorphism (SRAP),

การเปรียบเทียบองค์ประกอบพฤกษเคมีของสารสกัดพญาอด้วยเทคนิค Thin layer chromatography การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยการทดลองฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay และทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ด้วยวิธี Minimal inhibitory concentration และ Minimum bactericidal concentration ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะเป็นการเปิดเผยศักยภาพของพญาอ และเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ประโยชน์ในทาง การแพทย์ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

A. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพญาอ

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบพญาอ (*Clinacanthus nutans*) จากแหล่งปลูกธรรมชาติในจังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา พื้นที่ละ 1 ตัวอย่าง อย่างน้อย พื้นที่ละ 500 กรัม และเก็บตัวอย่างพืชคนละสกุลที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae เพื่อใช้เป็น out group จำนวน 2 ชนิด คือ ต้อยติ่ง (*Ruellia tuberosa*) และตีปลากั้ง (*Phlogacanthus pulcherrimus*) ชนิดละ 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างใบพญาอที่เก็บได้จะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนของใบสดสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ และส่วนของใบอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 วัน เพื่อทำสารสกัดหยาบ

2. การสกัดดีเอ็นเอและการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

สกัดดีเอ็นเอจากใบพญาอของจังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา ต้อยติ่ง และตีปลากั้ง ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ NucleoSpin Plant II (บริษัท MACHEREY-NAGEL, Düren, เยอรมัน) โดยสกัดดีเอ็นเอจากใบสดปริมาณ 50 มิลลิกรัม ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD260 ด้วยเครื่อง nanodrop™ 2000/2000c spectrophotometers (ThermoFisher Scientific, MA, สหรัฐอเมริกา) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

จากนั้นสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้งหมด โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ที่ถูกคิดค้นและพัฒนาโดย Li และ Quiros [8] โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะจำนวน 10 คู่ ได้แก่ M2E7 M2E8 M3E2 M3E6 M3E7 M3E9 M4E1 M4E2 M4E3 และ M4E5 (ตาราง 1) ปฏิบัติ PCR ใช้เอนไซม์ iTaq™ DNA polymerase (LiliF Diagnostic, MA, สหรัฐอเมริกา) ใช้อุณหภูมิและเวลา ดังนี้ ช่วงที่ 1 ประกอบด้วยขั้นตอน (1) initial melting ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 1 นาที (3) annealing ที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 1 นาที (4) extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 2 นาที ทำซ้ำในขั้นตอน (1) – (4) จำนวน 5 รอบ ช่วงที่ 2 ประกอบด้วยขั้นตอน (5) denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที (6) annealing ที่อุณหภูมิ 54 °C นาน 30 วินาที (7) extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 1 นาที ทำซ้ำในขั้นตอน (5)-(7) จำนวน 35 รอบ และทำขั้นตอน (8) final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที เป็นขั้นตอนสุดท้าย

ตาราง 1 Primer ของเทคนิค SRAP

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ 5'→ 3'	ความยาว (นิวคลีโอไทด์)
Forward		
M-2	TGAGTCCAAACCGGAAG	17
M-3	TGAGTCCAAACCGGAAC	17
M-4	TGAGTCCAAACCGGAAT	17
Reverse		
E1	GACTGCGTACGAATTAAC	18
E-2	GACTGCGTACGAATTAAT	18
E-3	GACTGCGTACGAATTGAC	18
E-5	GACTGCGTACGAATTCAA	18
E-6	GACTGCGTACGAATTCAG	18
E-7	GACTGCGTACGAATTCAC	18
E-8	GACTGCGTACGAATTCTG	18
E-9	GACTGCGTACGAATTTGA	18

B. องค์ประกอบพฤษเคมีของพญาयो

1. การสกัดสารสกัดหยาบจากใบพญาयो

นำตัวอย่างใบของพญาयोแล้วจากแต่ละแหล่งที่อบแห้งแล้วปริมาณ 25 กรัม มาบดให้พอละเอียดจากนั้นสกัดด้วยเอทานอล (70% v/v) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าในแนวระนาบความเร็ว 160 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (Rotary evaporator) ภายใต้ความดันต่ำที่อุณหภูมิ 45 °C จนกระทั่งสารละลายเหนียวขึ้น นำสารสกัดไประเหยน้ำออกด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิจนสารแห้ง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเตรียมไว้ทำการทดลองต่อไป

2. การแยกสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเบื้องต้นโดยวิธี Thin Layer Chromatography, TLC)

ละลายสารสกัดหยาบของพญาयोด้วยเมทานอล (95% v/v) นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีโดยใช้สารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐาน (eugenol, quercetin, gallic acid) spot ลงบนแผ่น TLC แล้วใส่ลง

ในระบบที่ใช้แยกสารสกัด คือ hexane:chloroform:ethyl acetate:methanol:water:formic acid 3:3:2:2:0.1:0.1) โดยทำในระบบปิด ตั้งทิ้งให้ตัวทำละลายซึมขึ้นไปบนแผ่น TLC เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร นำไปตรวจสอบแถบสารภายใต้รังสียูวีความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร จากนั้นนำมาพ่นด้วย Anisaldehyde-H₂SO₄ แล้วนำไปวางบนแผ่นให้ความร้อน 5 นาที ก่อนนำไปตรวจสอบ ภายใต้รังสียูวีความยาวคลื่น 256 และ 365 นาโนเมตร [9] จากนั้นวิเคราะห์ความเข้มของแถบสีที่ปรากฏด้วยโปรแกรม ImageJ [10]

C. การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพญาयो

1. การทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH

ละลายสาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และสารสกัดพญาयोทั้ง 3 แหล่งด้วยเมทานอลให้มีความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 และ 0.15625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นดูดสารสกัดแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ใน well plate 96 หลุม และเติมสารละลาย DPPH 150 ไมโครลิตร ในทุกหลุม เทียบกับชุดควบคุม (DPPH และเมทานอล)

นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที
นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร และ

คำนวณเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity ดัง
สมการ

$$\% \text{ radical scavenging activity} = \{(A1 - A2)/A1\} \times 100$$

โดยที่ A1 = ค่าการดูดกลืนแสงควบคุม

A2 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

นำค่า % radical scavenging activity ที่ระดับ
ความเข้มข้นต่าง ๆ มาคำนวณหาค่า IC₅₀ (ค่าความ
เข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้ค่า % radical scavenging
activity ลดลงร้อยละ 50) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2. การทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ สารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) ด้วยวิธี Microdilution method

เตรียมสารสกัดพญายอจากจังหวัดเชียงใหม่
เชียงราย และพะเยา โดยเจือจางแบบสองเท่าลำดับ
ส่วน (two-fold serial dilution) มีค่าความเข้มข้นสูงสุด
เป็น 500 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ลงใน well plate
96 หลุม จากนั้นเติมเชื้อทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus*
epididymidis, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*
aeruginosa และ *Escherichia coli* ที่ปรับ ความขุ่น
เท่ากับ 0.5 McFarland ลงในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่
อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลการ
ทดลองค่า MIC สังเกตจากความขุ่นหรือใสของอาหาร
ที่ไม่มีการเจริญเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีแต่
อาหารกับสารสกัด ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสาร
สกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อให้บันทึกผลการทดลอง
เป็นค่า MIC ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

3. การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของ สารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ด้วยวิธี Streak Plate

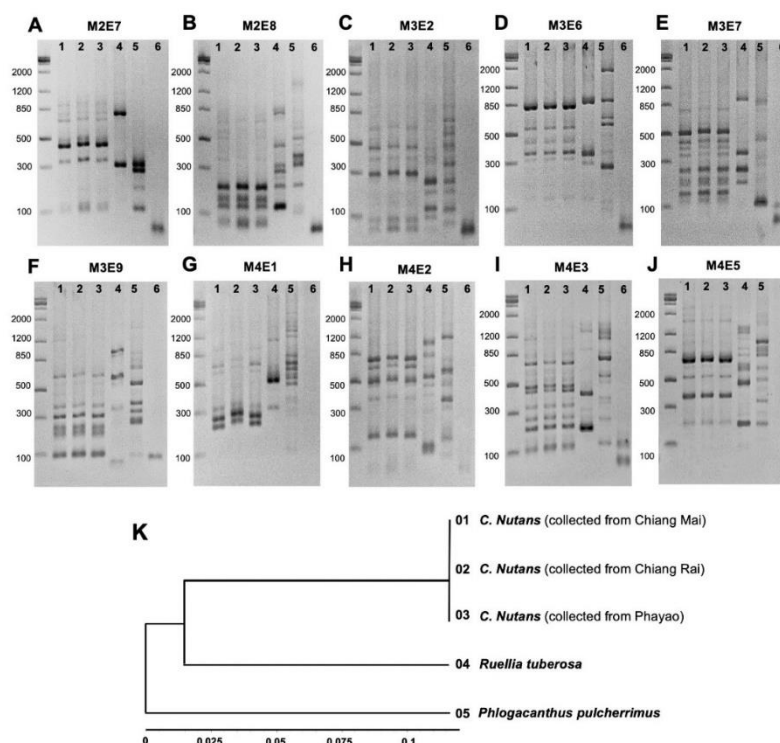
เลือกความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการ
เจริญของแบคทีเรีย (MIC) ไปทำ Streak Plate บน
อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar จากนั้นนำไปบ่ม

ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและ
บันทึกผลการทดลองค่า MBC โดยบันทึกค่าความ
เข้มข้นน้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ
บนอาหาร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

ผลการศึกษา

A. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพญายอ ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค SRAP

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม
ของพญายอที่เก็บจากแหล่งเพาะปลูกธรรมชาติใน
ภาคเหนือ จำนวน 3 แหล่ง ได้แก่ ในจังหวัดเชียงใหม่
เชียงราย และพะเยา ด้วยเทคนิค SRAP โดยใช้ไพรเมอร์
จำนวน 10 คู่ ได้แก่ M2E7 M2E8 M3E2 M3E6 M3E7
M3E9 M4E1 M4E2 M4E3 และ M4E5 เปรียบเทียบ
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับตัวอย่างพืชในวงศ์เดียวกันจำนวน
2 ตัวอย่าง ได้แก่ ต้อยตุง (*R. tuberosa*) และดีปลากั้ง
(*P. pulcherrimus*) พบว่าเทคนิค SRAP ให้แถบดีเอ็นเอ
ทั้งหมด 98 ตำแหน่ง โดยมี 95 ตำแหน่งที่แตกต่าง
ในพืชทั้ง 3 ชนิด ส่วนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพญายอทั้ง
3 แหล่ง มีแถบที่ตรงกันทุกตำแหน่ง (ภาพ 1A-1J)
เมื่อนำข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์
หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม PHYLIP
3.698 โดยวิธี unweighted pair group method using
arithmetic average (UPGMA) แสดงผลในรูปแบบของ
phylogenetic tree พบว่า พญายอทั้ง 3 แหล่ง มีความ
ใกล้ชิดกันมาก ไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมจึง
ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และแยกออกจากพืชใน
วงศ์เดียวกันอย่างชัดเจน (ภาพ 1K)

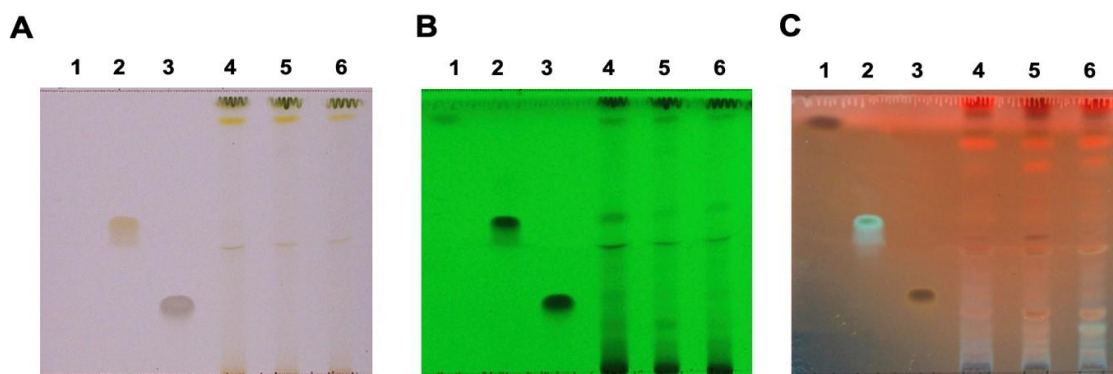


ภาพ 1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพญาอด้วยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ต่างกัน จำนวน 10 คู่ (ภาพ A-J) เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอตัวอย่างพญาอจากจังหวัดเชียงใหม่ (แถวที่ 1) ตัวอย่างพญาอจากจังหวัดเชียงราย (แถวที่ 2) ตัวอย่างพญาอจากจังหวัดพะเยา (แถวที่ 3) ตัวอย่างต้อยตึง (แถวที่ 4) ตัวอย่างติปลากั้ง (แถวที่ 5) PCR negative control (แถวที่ 6)

B. องค์ประกอบพฤษเคมีของสารสกัดพญาอ

การศึกษาองค์ประกอบพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดพญาอด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น hexane:chloroform:ethyl acetate:methanol:water:formic acid (3:3:2:2:0.1:0.1) (ภาพ 2A-2C) วิเคราะห์แถบสีภายใต้รังสียูวีที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร พบว่าองค์ประกอบในสารสกัดพญาอทั้ง 3 แหล่ง มีการเคลื่อนที่ตรงกับมาตรฐาน eugenol (R_f 0.90) และ quercetin (R_f 0.54) แต่ไม่พบแถบสีที่ตรงกับสารมาตรฐาน gallic acid (R_f 0.26) (ภาพ 2B) แต่เมื่อนำไปพ่นด้วย Anisaldehyde- H_2SO_4 และให้ความร้อนจนปรากฏแถบสีที่ชัดเจนมากขึ้น พบว่าองค์ประกอบในสารสกัดพญาอทั้ง 3 แหล่ง

ตรงกับสารมาตรฐาน quercetin เท่านั้น (ภาพ 2C) สรุปได้ว่า quercetin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดพญาอ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร quercetin ที่พบในสารสกัดพญาอจากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบสีด้วยโปรแกรม ImageJ พบว่า สารสกัดพญาอจังหวัดเชียงใหม่มีปริมาณสารเฉลี่ยสูงที่สุด 3380 ± 745.3 สารสกัดจากใบพญาอของจังหวัดเชียงราย 610 ± 128.8 และสารสกัดจากใบพญาอของจังหวัดพะเยา 571.3 ± 7.8 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบแถบสีอื่นปรากฏร่วมด้วย ซึ่งจะต้องทำการตรวจสอบเทียบกับสารมาตรฐานอื่นเพื่อยืนยันผล



ภาพ 2 องค์ประกอบพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดพญาอด้วยวิธี TLC TLC chromatogram ของสารสกัดพญาอ ภายใต้แสงปกติ (A), UV 256 นาโนเมตร (B) และ UV 365 นาโนเมตร (C) โดยเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐาน eugenol (แถวที่ 1) quercetin (แถวที่ 2) และ gallic acid (แถวที่ 3) ตัวอย่างพญาอจากจังหวัดเชียงใหม่ (แถวที่ 4) ตัวอย่างพญาอจากจังหวัดเชียงราย (แถวที่ 5) ตัวอย่างพญาอจากจังหวัดพะเยา (แถวที่ 6)

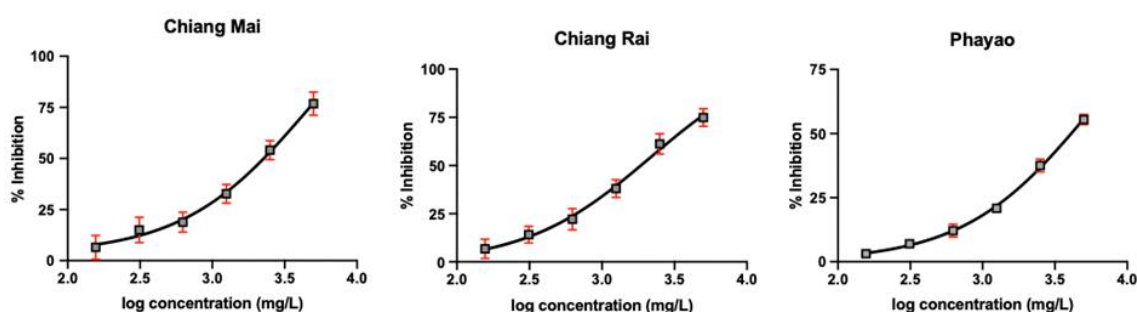
C. ผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพญาอ

1. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพญาอ

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพญาอจาก 3 แหล่ง คณะผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยสารสกัดจากใบพญาอของจังหวัดเชียงใหม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} คือ 2.637 ± 0.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพดีกว่าค่า IC_{50} ของสารสกัดจากใบ

พญาอของจังหวัดเชียงรายคือ 2.771 ± 0.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ IC_{50} ของสารสกัดจากใบพญาอของจังหวัดพะเยาคือ 4.196 ± 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบค่า IC_{50} โดยการวิเคราะห์ทางสถิติ (t-test) พบว่าค่าของสารสกัดจากใบพญาอของจังหวัดเชียงใหม่มีความแตกต่างจากใบพญาอของจังหวัดพะเยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value = 0.0024) ดังแสดงใน

ภาพ 3



ภาพ 3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดพญาอ ภาพแสดงความเข้มข้นของสารสกัดพญาอจาก จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา ที่ทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ radical scavenging activity ลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) โดยการวิเคราะห์ nonlinear regression (curve fit) จากค่าผลการทดลองสามซ้ำด้วยโปรแกรม GraphPad Prism version 8

2. ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดพญายอ

คณะผู้วิจัยทำการศึกษาร่วมเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดพญายอ โดยศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. epidimidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli* โดยตรวจสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดแต่ละแหล่งมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของแบคทีเรียต่างกัน จากผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ พบว่าสารสกัดพญายอของจังหวัดเชียงใหม่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการต้านการเจริญของ *S. epidimidis* โดยมีค่า

MIC และ MBC เท่ากับ 31.25 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* โดยมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 31.25 และ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดพญายอของจังหวัดเชียงรายมีค่า MIC เท่ากันในทุกเชื้อแบคทีเรีย คือ 62.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่มีค่า MBC ที่ดีที่สุดในเชื้อ *S. epidimidis* เท่ากับ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดพญายอของจังหวัดพะเยาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. epidimidis* และ *S. aureus* ได้ดี มีค่า MIC เท่ากับ 31.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MBC เท่ากับ 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในทุกเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นต้องใช้สารสกัดพญายอในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้นมากกว่าเมื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Minimal inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ของสารสกัดพญายอ

สารสกัด	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)							
	<i>S. epidimidis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
พญายอ (เชียงใหม่)	31.25	250	62.5	500	62.5	250	31.25	500
พญายอ (เชียงราย)	62.5	250	62.5	500	62.5	500	62.5	500
พญายอ (พะเยา)	31.25	500	31.25	500	62.5	500	62.5	500
Gentamicin (positive control)	0.0156	0.0156	0.0156	0.0156	0.0156	0.0156	0.0156	0.0156

* ค่าความเข้มข้นเฉลี่ย (n=3)

วิจารณ์

การศึกษาค้นคว้าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพญายอที่เก็บมาจากแหล่งธรรมชาติในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา ด้วยเทคนิค SRAP และเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าสามารถแยกพญายอและพืชสายพันธุ์ใกล้เคียง คือ ต้อยติ่ง และตีนปลากั้ง ได้อย่างชัดเจน โดยพบแถบดีเอ็นเอที่มีความต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 95 แถบ จากทั้งหมด 98 แถบ คิดเป็น 96% แสดงให้เห็นว่า

เทคนิค SRAP สามารถนำมาใช้แยกพญายอออกจากกลุ่มพืชที่มีความใกล้เคียงกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นแบบแผนในการตรวจสอบพญายอก่อนที่จะนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อป้องกันการปนของสายพันธุ์อื่นที่อาจจะมีผลทำให้สรรพคุณของผลิตภัณฑ์จากพญายอนั้นลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบความต่างของแถบดีเอ็นเอในกลุ่มพญายอที่เก็บมาจากแหล่งธรรมชาติที่ต่างกันกลับไม่พบความต่างของแถบดีเอ็นเอ ดังปรากฏตามผลการจัดกลุ่มด้วย

วิธี UPGMA จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าพญาอยู่ในภาคเหนือ นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ตัวอย่างพญา อยู่ในภาคเหนือที่เก็บมานั้นจึงไม่มีความแตกต่างกัน ทางพันธุกรรม สอดคล้องกับการศึกษาวิจัยที่ได้ศึกษา ความแตกต่างทางพันธุกรรมของพญาในประเทศไทย มาเลเซีย ประเทศไทย และเวียดนาม พบว่าแม้ว่าพญา ยอที่ใช้ในการศึกษาเก็บจากแหล่งเพาะปลูกที่มีความ แตกต่างกันทางภูมิศาสตร์ แต่พบว่ามีความคล้ายคลึง กันทางพันธุกรรมสูงถึง 91.6 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ เทคนิค microsatellite [11] ความคล้ายคลึงทาง พันธุกรรมนี้อาจเป็นผลมาจากการขยายพันธุ์พญา ยอทำการตอนกิ่งเป็นหลัก เนื่องจากเป็นวิธีการที่ สะดวก ให้การเจริญเติบโตดี ประกอบกับต้นพญา ยอออกดอกน้อย จึงทำให้มีความหลากหลายทาง พันธุกรรมน้อย อย่างไรก็ตาม ก็มีความเป็นไปได้ว่า ความไวของเทคนิค SRAP อาจจะไม่สามารถแยก ความต่างของสายพันธุ์พญา ยอได้ การศึกษาความ หลากหลายของพันธุกรรมโดยเทคนิควิธีที่มีความไว และความจำเพาะในระดับสูง เช่น microsatellite อาจจะเป็นในการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การหาองค์ประกอบและชนิดของสารพฤกษ เคมีในสารสกัดด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง เป็นเทคนิคที่สะดวก รวดเร็ว สามารถใช้ได้กับสาร หลากหลายชนิด จากผลการทดสอบสารสกัดพญา ยอที่ได้จากธรรมชาติทั้ง 3 แหล่ง พบว่ามีองค์ประกอบหลัก คือ quercetin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ แต่ไม่ พบสาร eugenol และ gallic acid ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม ฟีนอลิก โดยสารสกัดพญา ยอทั้งสามแหล่งมีชนิดของ องค์ประกอบสารพฤกษเคมีที่ใกล้เคียงกันแต่มีปริมาณ สารที่แตกต่างกัน เนื่องจากพญา ยอจากทั้งสามแหล่ง นั้นไม่มีความต่างทางด้านพันธุกรรม จึงอาจจะเป็นไป ได้ว่า ปัจจัยที่มีผลต่อระดับปริมาณสารพฤกษเคมี น่าจะมีปัจจัยหลักมาจากสิ่งแวดล้อมมากกว่า พันธุกรรม เช่น แสง ปริมาณน้ำ ดิน เป็นต้น หรือแม้แต ่ขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวเช่น การอบ การสกัดก็อาจ ส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัดได้เช่นเดียวกัน [11], [12] นอกจากนี้พบว่า เทคนิคและตัวทำละลายที่ ใช้ในการสกัดสารนั้นมีผลต่อชนิดขององค์ประกอบของ สารสกัด การศึกษาของ Khoo และคณะ [13] รายงาน

ว่าเมื่อใช้ตัวทำละลายและเทคนิคที่ใช้ในการสกัด ต่างกัน จะได้สารองค์ประกอบที่ต่างกันออกไป จากการ รวบรวมข้อมูลพบว่า สารสกัดพญา ยอมีองค์ประกอบ หลัก คือ สารในกลุ่มแอลคาลอยด์(alkaloid), ไตรเทอร์ พินอยด์ (triterpenoid), สเตียรอยด์ (steroids), แทนนิน (tannin), อิริโดอยด์ (iridoids) และ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) [13]

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัด พญา ยอเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านอนุ มูลอิสระและต้านเชื้อจุลินทรีย์ การศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้ ทดสอบว่าสารสกัดพญา ยอจากภาคเหนือของประเทศ ไทยทั้ง 3 แหล่ง มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสาร สกัดพญา ยอจากแหล่งเพาะปลูกจังหวัดเชียงใหม่มี ประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดคือ 2.637 ± 0.35 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสูงกว่าสารสกัด พญา ยอจากแหล่งเพาะปลูกจังหวัดเชียงรายและพะเยา ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าประสิทธิภาพของสารสกัดพญา ยอมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ในตัวอย่างสารสกัดพญา ยอที่มีค่าปริมาณสารเฉลี่ยสูง ที่สุดคือ 3380 ± 745.3 โดยผลการศึกษาของ Norlizar และคณะ [14] ก็พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความสัมพันธ์กับปริมาณสารฟีนอลิกในใบพญา ยอ [14] ผลการทดสอบฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียโดยการหา ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ แบคทีเรีย (MIC) และฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *S. epididymidis*, *S. aureus*, *P. Aeruginosa* และ *E. coli* พบว่าสารสกัดพญา ยอให้ผลต้านเชื้อ แบคทีเรียที่ดี แต่มีประสิทธิภาพแตกต่างกันตามชนิด ของแบคทีเรีย สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่ได้รายงานว่สารสกัดจากใบพญา ยอมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. epididymidis*, *S. aureus* และ *E.coli* โดยมีค่า MIC มากกว่า 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป [4] รวมถึง มีฤทธิ์ยับยั้ง และฆ่าแบคทีเรียชนิดอื่นด้วย เช่น *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* และ *Bacillus cereus* [15] ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียจะมีความแตกต่างจาก gentamicin มาก แต่ผลการทดสอบก็แสดงให้เห็นว่าสารสกัดพญา ยอ มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดที่ นำมาทดสอบในงานวิจัยนี้

จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมและองค์ประกอบพฤกษเคมีในพญาอ รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งช่วยเปิดเผยความสำคัญของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมต่อศักยภาพของพญาอซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัยหรือวงการแพทย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Kunsorn P, Ruangrunsi N, Lipipun V, Khanboon A, Rungsihirunrat K. The identities and anti-herpes simplex virus activity of *Clinacanthus nutans* and *Clinacanthus siamensis*. Asian Pac J Trop Biomed. 2013;3(4): 284-290.
2. Yoke KY, Jun JT, Soek ST, Siau HM, Gwendoline CLE, Hoe SC, Zuraini A. *Clinacanthus nutans* Extracts are Antioxidant with Antiproliferative Effect on Cultured Human Cancer Cell Lines. J.Evid.-Based Integr. Med. 2013
3. Nik MA, Nik AR, Nurliyana MY, Natasha Nur Afiqah MNF, Mohd AO, Muhajir H, Mohd AL. Antitumor and antioxidant effects of *Clinacanthus nutans* Lindau in 4 T1 tumorbearing mice. BMC Compl Alternative Med. 2019.
4. Yang HS, Peng TW, Madhavan P, Abdul MS, Akowuah GA. Phytochemical analysis and antibacterial activity of methanolic extract of *Clinacanthus nutans* leaf. Int J Drug Dev Res. 2013;5(3): 349-355.
5. Sangeetha A, Prabu R, Naadeirmuthu and Clara Carol K. In Vitro Screening of Cytotoxic, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae) leaf extracts. Trop J Pharm Res. 2014;13(9): 1455-1461
6. Sekar M, Rashid NA. Formulation, evaluation and antibacterial properties of herbal ointment containing methanolic extract of *Clinacanthus nutans* leaves. Int J. Pharm Clin Res. 2016;8(8): 1170-1174.
7. Guo XD, Ma YJ, Parry J, Gao JM, Yu LL, Wang M. Phenolics content and antioxidant activity of tartary buckwheat from different locations. Molecules;16(12): 9850-9867.
8. Li G, Quiros CF. Sequencerelated amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. Theor Appl Genet. 2001;103: 455-461.
9. Panya A, Pundith H, Thongyim S, Kaewkod TH, Chitov TH, Bovonsombut S, et al. Antibiotic-Antiapoptotic dual function of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau leaf extracts against bovine mastitis. Antibiotics. 2020;9(7): 1-13
10. Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. Biophotonics International. 2004;11(7): 36-42
11. Fong SY, Piva T, Urban S, Huynh T. Genetic homogeneity of vegetatively propagated *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae). J Med Plant Res. 2014;8(25): 903-914.

12. Kennedy DO, Wightman EL. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *Adv Nutr.* 2011;2(1): 32-50.
13. Khoo LW, Kow SA, Lee MT, Tan CP, Shaari K, Tham CL, Abas F. A Comprehensive Review on Phytochemistry and Pharmacological Activities of *Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018;1-39.
14. Norliza AL, Chua LS, Siti Nor AA, Rashid, Noor AZ. Antioxidants, Polyphenols and Marker Phytochemicals Content from Different Parts of *Clinacanthus nutans* (*C.nutans*). *Tran on Sci and Tech.* 2017; 4(3-3): 336 - 341
15. Swee-Hua EL, Maitha AA, Shaima IA, Swee-Yee C, Aish A, Chun-Wai M, Kok-Song L. Antibacterial Activity of *Clinacanthus nutans* Polar and Non-Polar Leaves and Stem Extracts. *Biomed Pharmacol J* 2020;13(3): 1169-1174