รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : การวิจัยและพัฒนาชีวภัณฑ์เพื่อการผลิตพืชปลอดภัย

2. โครงการวิจัย : ศึกษาปริมาณและคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินจากพืชและการประยุกต์ใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : ศึกษาวิธีสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารสคอพอเลตินในพืชที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นภาคใต้ตอนล่าง

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): extraction and quantification of scopoletin in plants that are readily available in the lower southern regions

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวเขมมิการ์ โขมพัตร	**สังกัด** สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8
ผู้ร่วมงาน	นางสรัญญา ช่วงพิมพ์	**สังกัด** สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8
	นางสาวสาวิตรี เขมวงศ์	**สังกัด** สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8
	นางสาวปริยากร ฤทธิสุนทร	**สังกัด** สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8
	นางสาวเยาวภา สุขพรมา	**สังกัด** มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กรมวิชาการเกษตร

5. บทคัดย่อ: สรุปใจความสำคัญของผลงานวิจัยให้เห็นผลงานอย่างชัดเจน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารสคอพอเลติน (scopoletin; scp) ซึ่งเป็นสารธรรมชาติจากพืชที่ได้มีการนำไปใช้ประโยชน์หลากหลายเนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นในด้านการต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายในพื้นภาคใต้ตอนล่าง จำนวน 18 ชนิด ได้แก่ ขี้กาคล้า เคี่ยม ดาหลา ทุเรียนเทศ เนียงนก ผักกาดนกเขา ผักบุ้งน้ำ พาโหม ฟักข้าว มะเดื่อ มะม่วงหิมพานต์ มันสำปะหลัง ยอบ้าน ยอป่า ลองกอง ลังแข และ ยางพารา ซึ่งพืชแต่ละชนิดจำแนกเป็นส่วนใบ ผล ราก และเปลือกขึ้นอยู่กับชนิดพืชนั้น โดยทำการปรับระบบการแยกสารด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography (TLC) ให้สามารถวิเคราะห์สารสคอพอเลตินจากตัวอย่างที่มีความหลากหลายสำหรับใช้ประเมินในเชิงคุณภาพ ซึ่งสารสคอพอเลตินที่วิเคราะห์ได้จากการปรับเทคนิคจะปรากฏแถบสีน้ำเงินเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร โดยมีค่าอัตราส่วนระยะทางที่สารเคลื่อนที่ต่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Rf) เป็น 0.7 และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคนี้คือ 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผลการประเมินพืชท้องถิ่นทั้ง 18 ชนิด ในเชิงคุณภาพควบคู่กับการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค High-pressure liquid chromatography (HPLC) พบว่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน โดยผลยอบ้านมีปริมาณสารสคอพอเลตินสูงที่สุด และจากการเก็บรวบรวมผลยอ

บ้านในพื้นที่ต่างๆจำนวน 21 พื้นที่ ครอบคลุม จ.สงขลา จ.ตรัง และจ.พัทลุง พบว่ามีปริมาณสคอพอเลตินอยู่ในช่วง 190.44 - 785.52 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 393.27± 165.42 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ผลการจากการศึกษาสำรวจพืชท้องถิ่นในงานวิจัยนี้ บ่งชี้ว่าผลยอบ้านเป็นพืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพสูงสำหรับนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อสกัดสารสคอพอเลติน อันเป็นทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าให้กับพื้นท้องถิ่นชนิดนี้ในอนาคต

6. คำนำ

สคอพอเลติน เป็นสารทุติยภูมิที่มีมวลโมเลกุลต่ำ จุดเดือดสูง มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ภายใต้สภาวะที่ถูกกระตุ้นทั้งจากตัวกระตุ้นแบบชีวภาพและทางกายภาพ พืชสามารถสร้างสารชนิดนี้เพิ่มขึ้นมาได้อีกในปริมาณมาก โดยอาจพบได้ในบริเวณชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ลำต้น ราก ใบ และผล อย่างไรก็ตามสารนี้ถูกสร้างขึ้นในพืชเพียงบางชนิด โดยจุดเด่นของสารชนิดนี้คือการมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) รวมทั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ปัจจุบันจึงได้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะในทางการแพทย์ และด้วยคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาและนำสคอพอเลตินมาใช้ประโยชน์ในเชิงการเกษตรเพื่อป้องกันหรือลดระดับความรุนแรงจากการถูกเชื้อก่อโรคพืชรุกราน โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายใต้นโยบายเกษตรปลอดภัยที่หน่วยงานภาครัฐมุ่งส่งเสริมและผลักดันให้เกิดขึ้น มีความจำเป็นต้องทำการศึกษาหาสารธรรมชาติที่มีความปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อเป็นสารตัวเลือกใหม่ๆให้กับเกษตรกรในการใช้ป้องกันและหรือแก้ปัญหาโรคพืช อย่างไรก็ตามข้อมูลการใช้สารสคอพอเลตินสำหรับการประยุกต์ใช้ในทางการเกษตรสำหรับประเทศไทยยังคงมีน้อย

นอกจากการศึกษาเพื่อพัฒนาด้านการอารักขาพืชอันเป็นการรองรับแนวนโยบายเกษตรปลอดภัยแล้ว การศึกษาสารสำคัญในพืชที่สามารถหาได้ง่าย และราคาต่ำยังนับเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชชนิดนั้นๆ ได้โดยเฉพาะในพืชบางชนิดที่มักประสบปัญหาผลผลิตล้นตลาดในบางฤดูกาล เช่น ลองกอง หรือผลสุกร่วงหล่นส่งกลิ่นเหม็นรบกวน เช่น ผลยอ เป็นต้น ดังนั้นหากมีแนวทางช่วยเหลือเกษตรกรโดยการนำผลผลิตดังกล่าวมาสกัดสารสำคัญที่สามารถพัฒนาต่อยอดไปในอีกหลากหลายสาขาทั้งในงานด้านการเกษตร ตลอดจนงานด้านอุตสาหกรรมและการแพทย์ ย่อมจะก่อให้เกิดประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจอีกมากมาย งานวิจัยนี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อสำรวจหาพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายและมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการสกัดสารสคอพอเลติน โดยมีการปรับวิธีการตรวจสอบสารโดยเทคนิค TLC ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายและต้นทุนต่ำเพื่อให้สามารถใช้ในการประเมินพืชเบื้องต้น ควบคู่กับการยืนยันผลในเชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC เพื่อคัดเลือกพืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพสำหรับนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสคอพอเลติน โดยได้จัดทำฐานข้อมูลปริมาณสคอพอเลตินในพืชที่คัดเลือกดังกล่าวเพื่อนำไปประกอบการพิจารณาใช้ประโยชน์พืชชนิดนี้ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

6.1 วัตถุประสงค์

6.1.1 เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและวิเคราะห์ที่เหมาะสมสำหรับเปรียบเทียบปริมาณสารสคอพอเลตินจากชิ้นส่วนพืช เช่น ราก ใบ หัว และเมล็ด

6.1.2 เพื่อประเมินปริมาณสคอพอเลตินในพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง เช่น ลองกอง, ยางพารา, ยอบ้าน, ผักกาดนกเขา และมันสำปะหลัง ฯลฯ

6.1.3 เพื่อจัดทำฐานข้อมูลปริมาณสคอพอเลตินในพืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตสารสคอพอเลติน

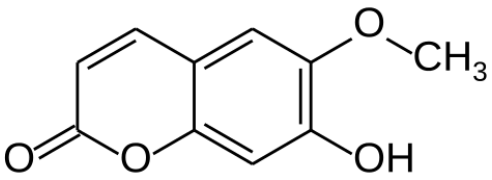
6.2 เป้าหมายของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การศึกษาปริมาณสารสคอพอเลตินจากพืชท้องถิ่นที่พบได้ง่ายในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง รวมถึงอาจพบได้ในพื้นที่อื่นๆทั่วประเทศเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตสารสคอพอเลติน โดยทำการศึกษาตั้งแต่กระบวนการสกัดและวิเคราะห์สารสคอพอเลตินในเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค TLC ควบคู่ไปกับการยืนยันผลในเชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC เพื่อใช้ในการประเมินคัดเลือกพืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นพืชวัตถุดิบเพื่อการสกัดสารสคอพอเลติน โดยได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลช่วงปริมาณสารสคอพอเลตินและค่าเฉลี่ยปริมาณสารที่พบในพืชชนิดนั้น ภายใต้ขอบเขตพื้นที่ปลูกที่ต่างๆกัน ครอบคลุมพื้นที่ จ.สงขลา จ.ตรัง และจ.พัทลุง สำหรับให้นักวิจัยหรือผู้ที่สนใจนำไปใช้ประกอบการการพิจารณากำหนดแผนการใช้ประโยชน์ในศาสตร์ที่เกี่ยวข้องต่อไป

6.3 การตรวจเอกสาร

6.3.1 สคอพอเลติน (Scopoletin)

สคอพอเลติน เป็นสารทุติยภูมิที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นทั้งตัวกระตุ้นชีวภาพ เช่น เชื้อจุลินทรีย์ หรือ ตัวกระตุ้นกายภาพ เช่น การเกิดบาดแผล หรือการได้รับรังสีบางชนิด สคอพอเลตินมีขนาดโมเลกุล 192.17 กรัมต่อโมล และจุดหลอมเหลวที่ 204 องศาเซลเซียส โดยมีโครงสร้างดังรูปที่ 1



รูปที่1 โครงสร้างของสคอพอเลติน

กรมวิชาการเกษตร

สคอพอเลตินจัดอยู่ในกลุ่มไฟโตอเล็กซินที่มีการรายงานการพบในพืชหลายชนิด เช่น พืชในตระกูลผักบุ้ง *(Convolvulus microphyllus)* (Zafar *et al*., 2005), พืชตระกูลยาสูบ *(Nicotiana benthamiana)* (Vialart *et al*., 2012), ยางพารา (*Hevea brasiliensis)* (Churngchow and Rattarasarn, 2001), มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (Andreae and Andreae, 1949) ผักคราดหัวแหวน *(Spilanthes acmella* Murr.) (Abyari *et al.,* 2016), ยอ *(Morinda citrifolia* Linnaeus) (West and Deng, 2010) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) (BA *et al*., 2017) และ ทานตะวัน (*Helianthus annuus*) (Saftić-Panković *et al.,* 2006) โดย Gutierrez *et al.,* (1995) ได้นำใบของทานตะวันมาศึกษากระบวนการสะสมของสคอพอเลติน พบว่าสามารถเหนี่ยวนำกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ออกซิไดซ์สคอพอเลตินให้เป็นสารประกอบที่มีสีและไม่ละลายน้ำหลังการกระตุ้นใบด้วย $CuCl_2$ หรือน้ำตาลซูโครส โดยเห็นการเรืองแสงเกิดขึ้นภายใต้แสง UV ในขณะที่กระตุ้นด้วย salicylic acid, dichloroisonicotinic acid หรือ glutathione ไม่เกิดการเรืองแสง การสร้างสารประกอบนี้ในพืชจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่มากระตุ้นและอายุของเนื้อเยื่อพืช ในยางพารามีการศึกษาปริมาณของสคอพอเลตินเพื่อใช้ในการบ่งบอกระดับความต้านทานโรคของพันธุ์ยางชนิดต่างๆได้ โดยพันธุ์ยางที่อ่อนแอจะผลิตสคอพอเลตินได้น้อยกว่าพันธุ์ต้านทาน (Churngchow and Rattarasarn, 2001) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Khompatara, 2017 พบว่าในสภาวะปกติใบยางพาราชำถุงพันธุ์ RRIM600 สามารถตรวจพบสคอพอเลตินได้ที่ระดับ 0.2-0.4 มิลลิกรัม จากใบยางสด 1 กิโลกรัม

6.3.2 คุณสมบัติของสารสคอพอเลติน

Tegos *et al.* (2002) ได้รายงานว่าสคอพอเลตินมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ต่อมา Rigane *et al*. (2013) ได้รายงานถึงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้สารสกัดด้วยเมทานอลจากใบและดอกของต้น *Calendula officinalis* ซึ่งมีสารสคอพอเลตินเป็นส่วนประกอบ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ 3 ชนิดและเชื้อราอีก 2 ชนิด โดยได้ชี้ว่าผลที่ได้สามารถนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตสาร bioactive จากพืชได้ และในปีเดียวกันนี้ Acharya *et al.* (2013) ได้รายงานถึงคุณสมบัติของสคอพอเลตินในการยังยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhi* ได้นอกจากคุณสมบัติด้านการเป็นสาร antimicrobial แล้ว สคอพอเลตินยังได้รับการรายงานถึงคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยสคอพอเลตินที่สกัดจาก *Sinomonium acutum* สามารถกำจัดอนุมูล superoxide anion ในปฏิกิริยา xanthine/xanthine oxidase (Shaw *et al.,* 2003) นอกจากนี้ Malik *et al.* (2011) ได้รายงานว่าสคอพอเลตินสามารถนำมาใช้กำจัดอนุมูลอิสระชนิด 1, 1-diphenyl-2-picrul-hydrazil free radical (DPPH), อนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ได้ โดยผู้วิจัยชี้ว่าสคอพอเลตินควบคุมอนุมูลอิสระได้โดยผ่านทางกระบวนการที่หลากหลาย เช่น การขนส่งกรดไขมันสายยาวในไมโตคอนเดรีย เป็นต้น ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีความสำคัญคือเป็นสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่น เช่น กระบวนการเกิดสนิมของเหล็ก การเกิดสีน้ำตาลในผลไม้ (เช่นในแอปเปิ้ล) หรือการทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน หรือกระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ ควันบุหรี่ หรือรังสียูวี ปัจจัยเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นซึ่งสร้างความเสียหายได้ทั้งในพืชและในร่างกาย

กรมวิชาการเกษตร

มนุษย์ จึงได้มีการศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งต่างๆสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านการเกษตร ด้านเภสัชกรรม รวมไปถึงด้านการแพทย์

จากประโยชน์อันหลากหลายของสารสคอพอเลตินตามที่ได้เคยมีการรายงานก่อนนี้ ทั้งในด้านการนำไปปรับใช้เพื่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด ตลอดจนต้านอนุมูลอิสระ บ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญและคุณค่าของสารคอพอเลติน อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าการศึกษาสคอพอเลตินในพืชมักมีดำเนินการเฉพาะพืชที่นักวิจัยสนใจทีละชนิดเป็นส่วนใหญ่ แต่ข้อมูลเชิงเปรียบเทียบปริมาณสคอพอเลตินในพืชหลากหลายชนิดเพื่อคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพสู่การนำไปใช้ประโยชน์ยังไม่พบการรายงาน การศึกษาปริมาณสารชนิดนี้ในพืชท้องถิ่นหลากหลายชนิดเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปประกอบการพิจารณาคัดเลือกวัตถุดิบต้นทุนต่ำสำหรับสกัดสารสคอพอเลตินนับเป็นก้าวแรกของงานวิจัยภายใต้แนวทางการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายของพืชท้องถิ่น ทั้งยังเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับพืชนั้นๆอันเป็นการเสริมรายได้ให้แก่เกษตรกรอีกทางหนึ่งด้วย

7. วิธีดำเนินการ:

<u>อุปกรณ์</u>

1. พืชท้องถิ่นชนิดต่างๆ เช่น ลองกอง, ยางพารา, ยอบ้าน, ผักกาดนกเขา และมันสำปะหลัง ฯลฯ
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
3. ตู้อบความร้อน (hot-air oven)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า (electric balance) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 3 ตำแหน่ง
5. เครื่องบดตัวอย่างพืช (Blender)
6. เครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator)
7. เครื่องเขย่าสารแบบหมุน (orbital shaker)
8. กล่องทดสอบสารด้วยแสงยูวี (UV box)
9. เครื่อง High-pressure liquid chromatography (HPLC)
10. วัสดุและสารเคมีสำหรับการสกัดและวิเคราะห์ตัวอย่าง เช่น แผ่น TLC, ซิลิกาเจล, โถแก้วดูดความชื้น, ชุดกรองสุญญากาศ, syringe filter, ขวด vial, TLC แทงค์, สารสคอพอเลตินมาตรฐาน, เอทานอล, เมทานอล, อะซิโตไนไตร และกรดอะซิติก เป็นต้น

<u>วิธีการปฏิบัติ</u>

1. การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่พบได้ง่ายในท้องถิ่นภาคใต้ตอนล่าง ไม่ต่ำกว่า 5 ชนิด เช่น ลองกอง, ยางพารา, ยอบ้าน, ผักกาดนกเขา และมันสำปะหลัง นำมาสกัดตามวิธีที่ปรับจาก Ba *et al*., 2017 ดังนี้ เตรียมตัวอย่างโดยนำส่วนใบพืชมาวางผึ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน และนำมาอบที่อุณหภูมิ 60$\pm$1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2

ศรีวิชาการเกษตร

ชั่วโมงก่อนบดเพื่อให้ตัวอย่างแห้งกรอบบดได้ง่าย สำหรับตัวอย่างผล เมล็ด เปลือก หรือหัวของพืชที่มีลักษณะอวบน้ำและเสี่ยงต่อการเน่าเสีย นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆและอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60±1 องศาเซลเซียสจนกว่าตัวอย่างจะแห้งและมีน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาสกัด โดยผสมผงตัวอย่างแห้งในอัตราส่วน 0.5 กรัม 1 กรัม และ 5 กรัม ใน 100% เอทานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร วางไว้ 3 วันที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บเฉพาะส่วนสารละลายใสนำไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยเครื่อง rotary evaporator ปรับปริมาตรด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอลให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 3 มิลลิลิตร เก็บสารละลายส่วนใสในภาชนะทึบแสง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสสำหรับไว้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

2. การวิเคราะห์สคอพอเลตินเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค TLC (Thin-Layer Chromatography)

ปรับจากวิธีตั้งต้นของ Ba *et al*., 2017 ทำการตรวจสอบและปรับระบบการแยกสารสคอพอเลตินด้วยเทคนิค TLC ให้สามารถแยกสารรบกวนที่บดบังการเรืองแสงของสารสคอพอเลติน ออกจากตำแหน่งที่มีสารสคอพอเลติน เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความหลากหลายของชนิดพืชและชิ้นส่วนพืชได้ในคราวเดียวกัน ทำการทดสอบยืนยันโดยคัดเลือกพืชไม่ต่ำกว่า 3 ชนิด แยกชิ้นส่วนของพืชแต่ละชนิด เช่น ใบ ราก และผล นำมาทดสอบการแยกด้วยระบบที่มีการปรับเรียบร้อยแล้ว จากนั้นทำการทดสอบระดับความสามารถในการวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินเชิงเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC โดยใช้สารสคอพอเลตินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการแยกเพื่อประเมินค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้ จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ มา spot ลงบนแผ่นซิลิกา รอให้แห้งแล้วนำไปแยกโดยจุ่มแผ่นซิลิกาลงในอ่างแก้วที่บรรจุสารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมกำหนดระยะทางในการเคลื่อนที่ของตัวทำละลาย 6 เซนติเมตร เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงระยะทางที่กำหนดยกแผ่นซิลิกาออกมาวางผึ่งให้แห้ง นำไปส่องภายใต้แสงยูวี หากมีสารสคอพอเลตินจะปรากฏเป็นแถบสีน้ำเงินเรืองแสงภายใต้แสงยูวีที่ความยาวแสง 365 นาโนเมตร เปรียบขนาดและตำแหน่งของแถบสีน้ำเงินเรืองแสงในแต่ละตัวอย่างที่ปรากฏตรงกันกับแถบสีน้ำน้ำเรืองแสงของสารมาตรฐานสคอพอเลตินเพื่อประเมินชนิดและปริมาณของสารสคอพอเลตินในตัวอย่างนั้นๆ

3. การวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินเชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography) เพื่อคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพสำหรับการจัดทำฐานข้อมูลสู่การใช้ประโยชน์

นำสารละลายตัวอย่างพืชที่สกัดได้ในข้อ 1 โดยเลือกใช้ตัวอย่างที่ความเข้นข้นการสกัด 0.5 กรัมใน10 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นน้อยที่สุดเป็นอันดับแรก นำมากรองผ่านแผ่นกรอง (syringe membrane) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 ไมครอน บรรจุในขวด vial สีชา นำไปวิเคราะห์ตามวิธีของ Khompatara, 2017 ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1100) โดยใช้คอลัมน์แบบ reverse-phase (ZORBAX Eclipse XDB-c18, 4.6x150mm, 5 micron) ตั้งค่าการแยกแบบ gradient โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ 2 ชนิด คือ 1) อะซิโตไนไตรล์ และ 2) 0.1% กรดฟอร์มิก ควบคุมอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ตามระยะเวลา (นาที) ต่อ % ของอะซิโตไนไตรล์ ดังนี้ นาทีที่ 0-2/80, นาทีที่ 8.5-10/60, นาทีที่ 12/55, นาทีที่ 13/40 และนาทีที่ 15/50 ควบคุมอัตราเร็วของเฟสเคลื่อนที่เป็น 1 มิลลิลิตร

ร่างอุทกรีนเทค

ต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 40 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลาที่ทำการแยก ตรวจสอบสัญญาณของสารที่แยกได้ด้วย fluorescence detector (FLD) โดยตั้งค่าช่วงแสง excitation และ emission สำหรับสคอพอเลตินเป็น 337 นาโนเมตร และ 425 นาโมเมตร ตามลำดับ วิเคราะห์ผลจากพื้นที่ใต้พีคด้วยโปรแกรม Chemstation Software (Agilent Technologies) ปริมาตรการฉีดตัวอย่าง (injection volume) 20 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสคอพอเลติน (0.05-10 ไมโครกรัมสคอพอเลติน/มิลลิลิตร) กรณีความเข้มข้นสูง เจือจางด้วย 95% เอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการปรับปริมาตรตัวอย่างในขั้นตอนการสกัด และกรณีความเข้มข้นต่ำเกินไปจนไม่พบสัญญาณของสารสคอพอเลติน ทดสอบซ้ำโดยใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างที่สูงขึ้น นำค่าการคำนวณผลวิเคราะห์ที่ได้มาประเมินร่วมกับผลการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ โดยพืชที่มีปริมาณสคอพอเลตินสูงกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งจะถูกคัดเลือกเป็นพืชที่มีศักยภาพเหมาะสมสำหรับนำไปสกัดแยกสารสคอพอเลตินในการทดลองต่อไป จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างพืชที่คัดเลือกได้เพิ่มเติมโดยครอบคลุมพื้นที่ที่ต่างกันไม่ต่ำกว่า 5 พื้นที่ต่อจังหวัด โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่ จ.สงขลา จ.ตรัง และจ.พัทลุง หรือจังหวัดอื่นๆ ใกล้เคียง นำตัวอย่างพืชที่ได้มาสกัดและวิเคราะห์ เพื่อหาช่วงปริมาณของสคอพอเลตินในพืชชนิดนั้น

<u>การบันทึกข้อมูล</u>: ปริมาณสคอพอเลตินในหน่วยมิลลิกรัมสคอพอเลตินต่อน้ำหนักพืชแห้ง 1 กิโลกรัม แยกตามชิ้นส่วนของพืชที่ศึกษา ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้เป็นข้อมูลของปริมาณสคอพอเลติน base-line ที่มีอยู่เดิมในพืชนั้นๆ

<u>ระยะเวลาในการดำเนินการ</u>: เริ่มต้นตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2563 รวม 2 ปี

<u>สถานที่ดำเนินการทดลอง</u>: ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ และห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารพิษตกค้างทางการเกษตร กลุ่มพัฒนาฯ สวพ.8

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

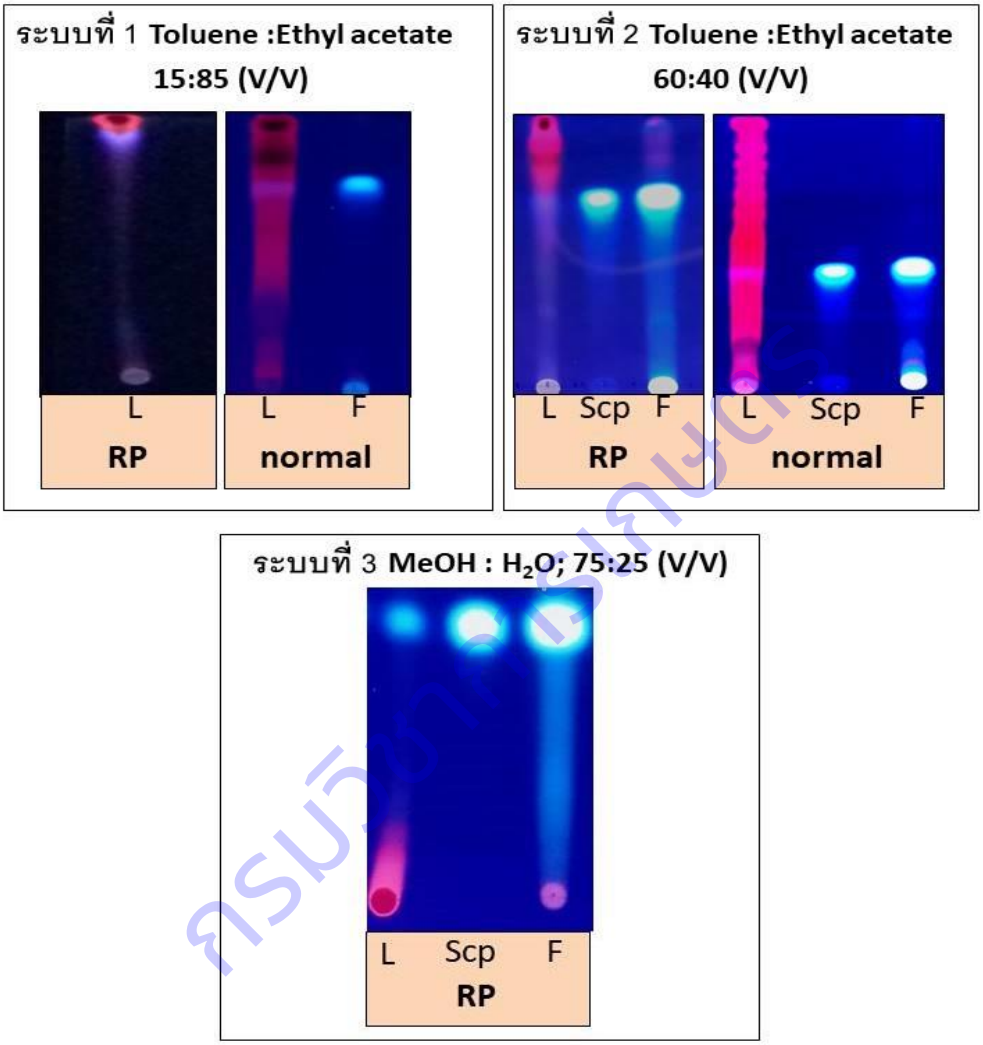
8.1 การวิเคราะห์สคอพอเลตินเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)

<u>8.1.1 การทดสอบและปรับระบบการแยกสคอพอเลตินด้วยเทคนิค TLC</u>

งานวิจัยนี้เป็นการสำรวจปริมาณสคอพอเลตินในพืชหลากหลายชนิดและหลากหลายชิ้นส่วนพืช จึงจำเป็นต้องเลือกใช้หรือปรับวิธีการวิเคราะห์ให้สามารถรองรับการตรวจตัวอย่างที่มีความหลากหลายได้ โดยใช้วิธีตั้งต้นของ Ba *et al.,* 2017 ซึ่งได้ทำการตรวจสอบสคอพอเลตินในหัวมันสำปะหลัง โดยใช้ TLC ชนิด RP18 และใช้ โทลูอีนร่วมกับเอทิลอะซิเตท อัตราส่วน 15:85 เป็นเฟสเคลื่อนที่ ซึ่งในขั้นตอนนี้ผู้วิจัยได้นำสารสกัดเอทานอลจากใบและผลของยอบ้านมาเป็นตัวแทนพืชสำหรับใช้ทดสอบระบบ พบว่าวิธีการที่คัดเลือกสามารถแยกได้เฉพาะสารสคอพอเลตินในผลยอ (ไม่แสดงรูป) แต่ไม่สามารถแยกสคอพอเลตินในส่วนของใบยอออกจากกลุ่มสารรบกวนตัวอื่นได้ จึงได้มีการทดสอบปรับเปลี่ยนทั้งชนิดของแผ่น TLC และความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ ในอัตราส่วนต่างๆ เช่น ผลการทดสอบในรูปที่ 2 (ระบบที่ 1 และ 2) ซึ่งจากการทดสอบปรับเปลี่ยนระบบการแยกหลายระบบพบว่า เมื่อใช้แผ่น TLC ชนิด normal phase และเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอลร่วมกับน้ำ

กรมวิชาการเกษตร

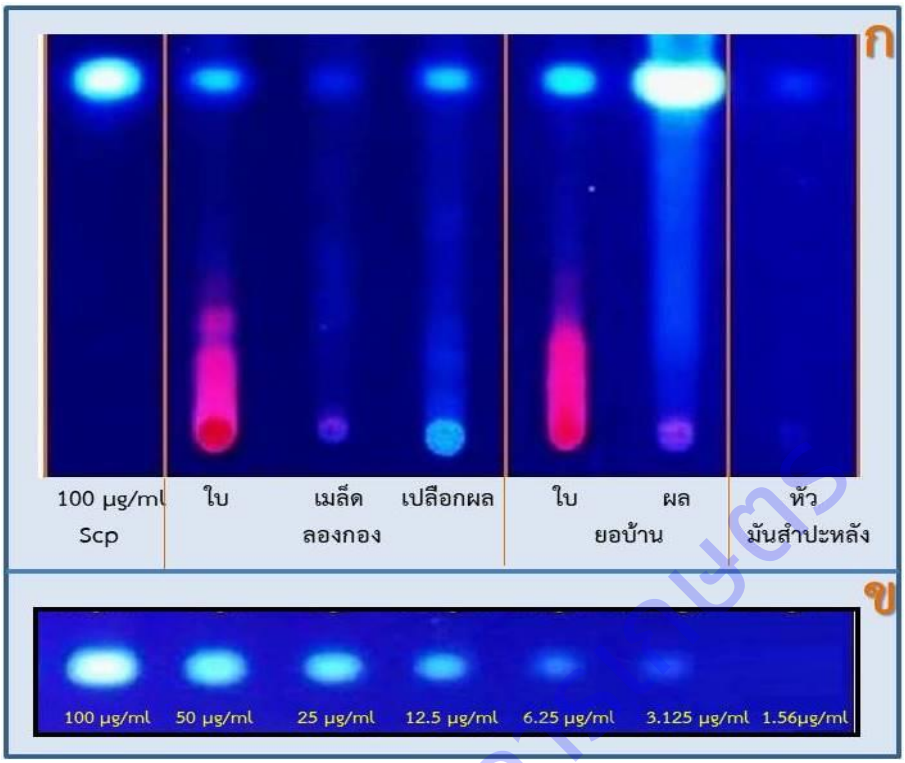
ในอัตราส่วน 75:25 สามารถแยกสคอพอเลตินในตัวอย่างใบและผลยอ โดยไม่ถูกบดบังการเรืองแสงจากสารชนิดอื่นและมีตำแหน่งตรงกับสารสคอพอเลตินมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบ (รูปที่ 2 ระบบที่ 3) ซึ่งค่าอัตราส่วนระยะทางที่สารสคอพอเลตินเคลื่อนที่/ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Rf) สำหรับการแยกระบบนี้เท่ากับ 7.0 ดังนั้นจึงเลือกใช้ระบบเมทานอล:น้ำ (75:25) ในการประเมินปริมาณสคอพอเลตินเชิงคุณภาพในพืช



รูปที่ 2 การทดสอบระบบสารละลายที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่บนเพลท TLC โดยใช้ตัวอย่างใบและผลของยอบ้านที่ความเข้มข้น 1.67 กรัมน้ำหนักแห้ง/มิลลิลิตร เทียบกับสารสคอพอเลตินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร; L=ใบ, F=ผล, Scp=สคอพอเลติน, RP=reverse phase, normal = normal phase

สำหรับการทดสอบความสามารถในการแยกสารสคอพอเลตินในพืชที่มีความหลากหลายชอบชิ้นส่วนที่นำมาวิเคราะห์ ดำเนินการโดยคัดเลือกพืช 3 ชนิดแต่ละชนิดจำแนกเป็นชิ้นส่วนต่างๆ ได้แก่ ลองกอง (ใบ เมล็ด และเปลือก) ยอบ้าน (ใบและผล) และมันสำปะหลัง (หัว) นำพืชแต่ละชิ้นส่วนมาสกัดด้วยเอทานอลและปรับ

ปริมาตรสุดท้ายให้มีความเข้มข้น 1.67 กรัมน้ำหนักแห้ง/มิลลิลิตร เมื่อนำมาแยกด้วย TLC โดยใช้ระบบที่ปรับแล้วข้างต้น พบว่าสามารถแยกสคอพอเลตินออกจากสารรบกวนได้ในทุกตัวอย่าง ดังรูป ที่ 3 ก



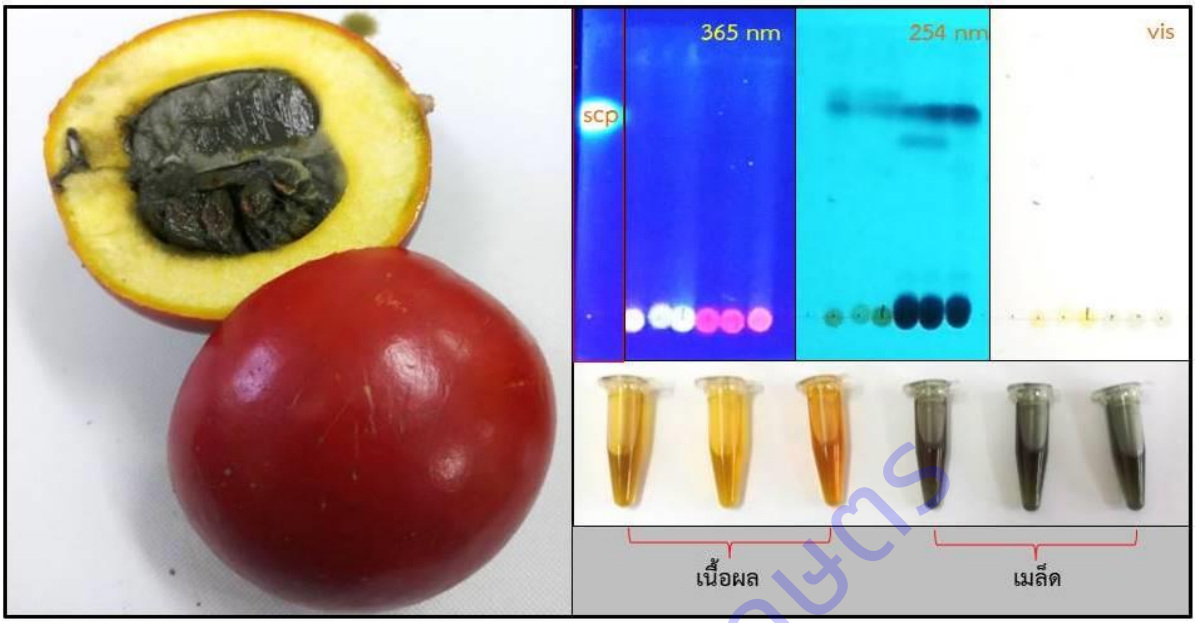
รูปที่ 3 การตรวจประเมินความสามารถในการวิเคราะห์สารสคอพอเลตินด้วยเทคนิค TLC; ก) การเรืองแสงของสารสคอพอเลตินในสารสกัดเอทานอลจากชิ้นส่วนลองกอง ยอบ้าน และมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้น 1.67 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร และ ข) การเรืองแสงของสารมาตรฐานสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 และ 1.56 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วย TLC พบว่าสามารถตรวจพบแถบเรืองแสงของสารสคอพอเลตินเมื่อส่องภายใต้แสงยูวีที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ที่ระดับความเข้มข้นน้อยที่สุด 3.125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถมองเห็นแถบดังกล่าวได้ด้วยตาเปล่า (รูปที่ 3 ข) ซึ่งผลดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ West and Deng (2010) ซึ่งได้รายงานการทดสอบวิธีการวิเคราะห์สคอพอเลตินด้วย TLC โดยมีการเปรียบเทียบยืนยันชนิดสารร่วมกับ HPLC พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ด้วย TLC คือ 3.7 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

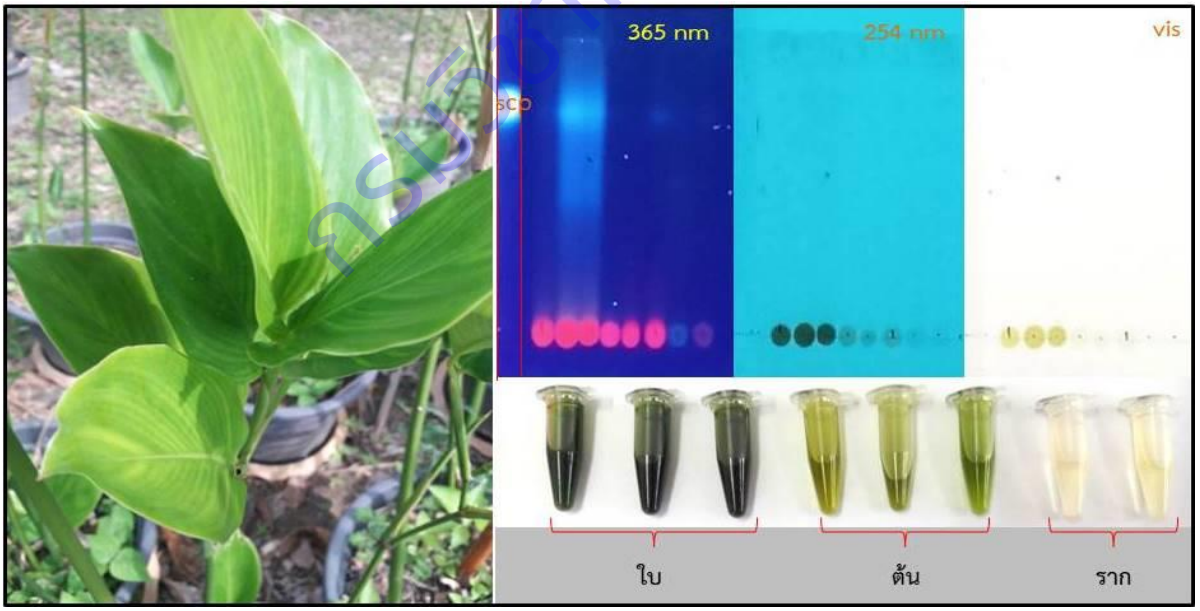
8.1.2 ผลการวิเคราะห์สคอพอเลตินเชิงคุณภาพในพืชท้องถิ่นชนิดต่างๆด้วยเทคนิค TLC

การออกพื้นที่สำรวจและสุ่มเก็บพืชท้องถิ่นในพื้นที่ภาคใต้ ดำเนินการโดย ครอบคลุมพื้นที่ จ.สงขลา จ.พัทลุง จ.ตรัง จ.นราธิวาส* จ.ปัตตานี* จ.สตูล* จ.นครศรีธรรมราช* และ จ.ชุมพร* (* = ได้รับความอนุเคราะห์จากเกษตรกรในพื้นที่เก็บและจัดส่ง) ได้พืชจำนวน 18 ชนิดพืช ได้แก่ ขี้กา คล้า เคี่ยม ดาหลา ทุเรียนเทศ เนียงนก

ผักกาดนกเขา ผักบุ้งน้ำ พาโหม ฟักข้าว มะเดื่อ มะม่วงหิมพานต์ มันสำปะหลัง ยางพารา ยอบ้าน ยอป่า ลองกอง และลังแข โดยผลการประเมินระดับปริมาณสารสคอพอเลตินด้วยเทคนิค TLC ในพืชแต่ละชนิดแสดงดังรูปที่ 4-22

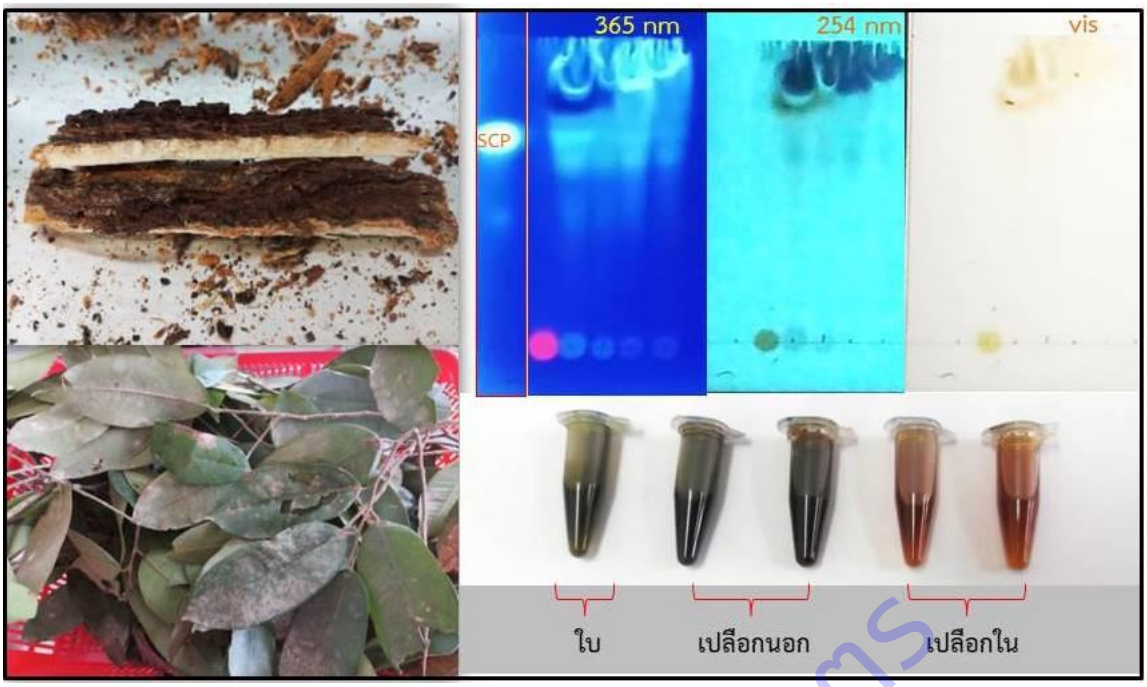


รูปที่ 4 ผลขี้กา (*Gymnopetalum integrifolim* Kurz.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเนื้อผลและเมล็ด ที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



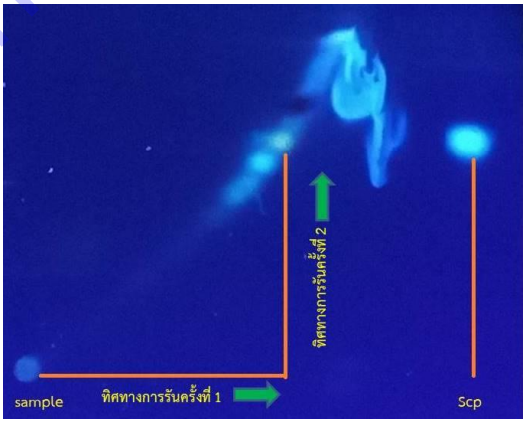
รูปที่ 5 ต้นคล้า (*Schumannianthus dichotomus* (Roxb.) Gagnep) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ ต้น และราก ที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

กรมวิทยาศาสตร์



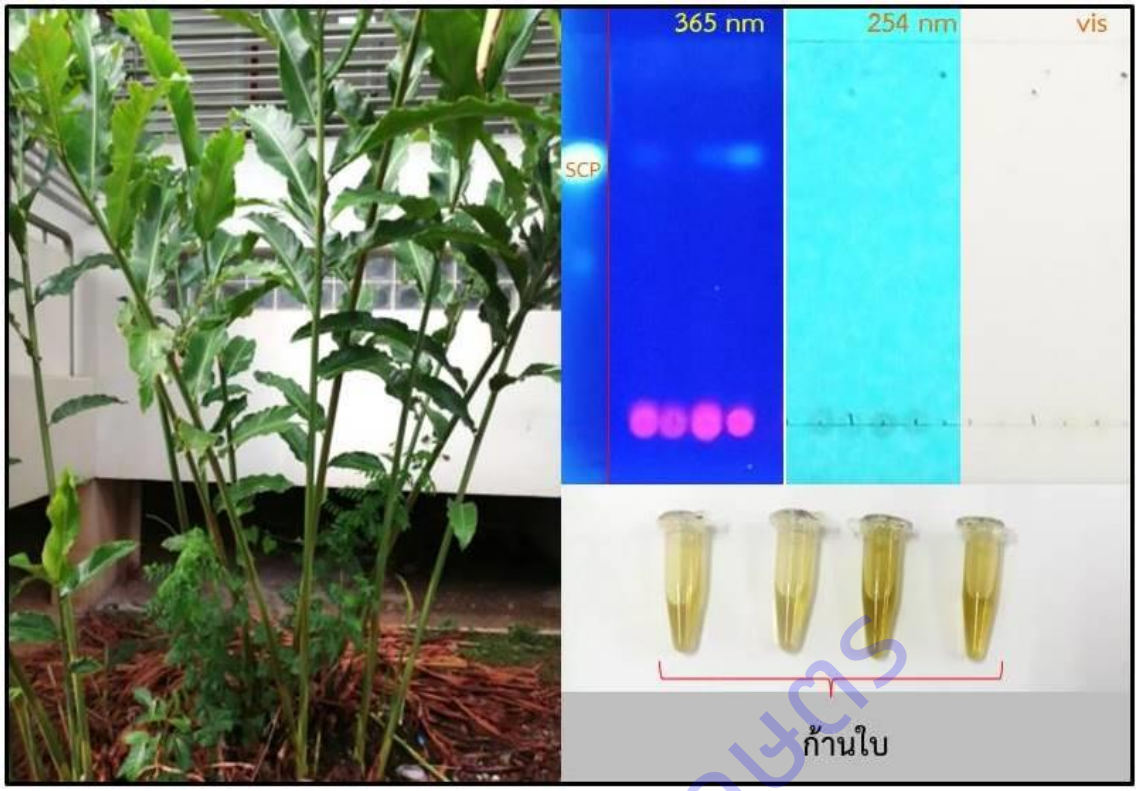
รูปที่ 6 เคี่ยม (*Cotylelobium lanceolatum* Craib) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ เปลือกนอก และเปลือกในที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

จากรูปที่ 6 พบว่าการแยกสารสกัดจากเปลือกนอกและเปลือกในเคี่ยมด้วย TLC ถูกรบกวนโดยสารไม่ทราบชนิดจำนวนมาก ซึ่งการรบกวนดังกล่าวมีลักษณะคล้ายคลึงกัน จึงคัดเลือกสารสกัดเปลือกนอกเคี่ยมมาทำการแยกเพื่อยืนยันการมีอยู่ของสคอพอเลติน โดยรัน TLC 2 ครั้งในทิศทางตั้งฉากกัน ซึ่งในการรันครั้งที่ 1 ทำการรันเฉพาะตัวอย่าง และในครั้งที่ 2 ทำการ spot สารรสคอพอเลตินร่วมในการรันด้วย ซึ่งจากรูปที่ 7 จะเห็นได้ว่าตรวจพบสารเรืองแสงในตัวอย่าง ณ ตำแหน่งเดียวกันกับสารสคอพอเลติน

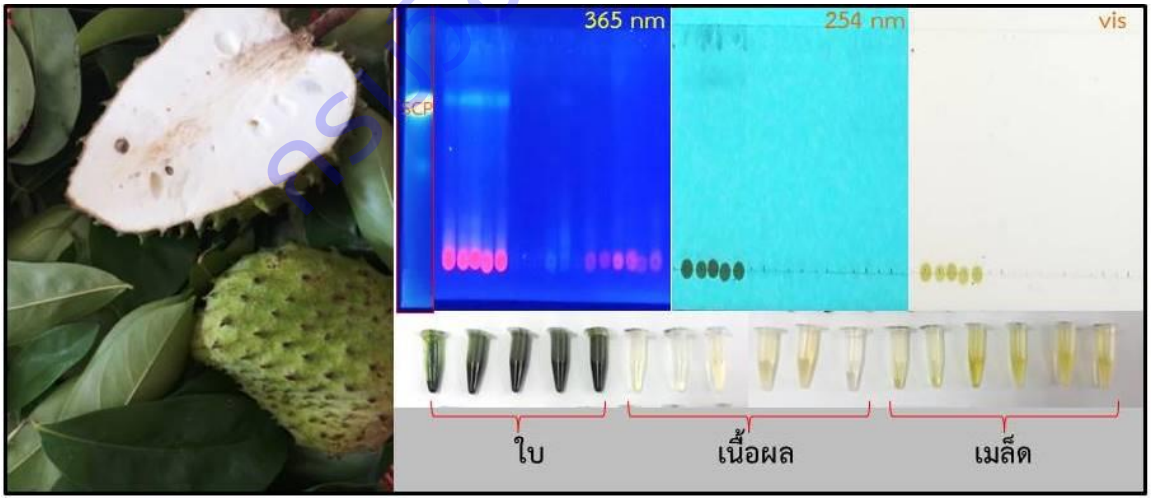


รูปที่ 7 การทดสอบสารสคอพอเลตินในเปลือกนอกเคี่ยมโดยการรัน TLC แบบ 2 ทิศทางเปรียบเทียบกับสคอพอเลตินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

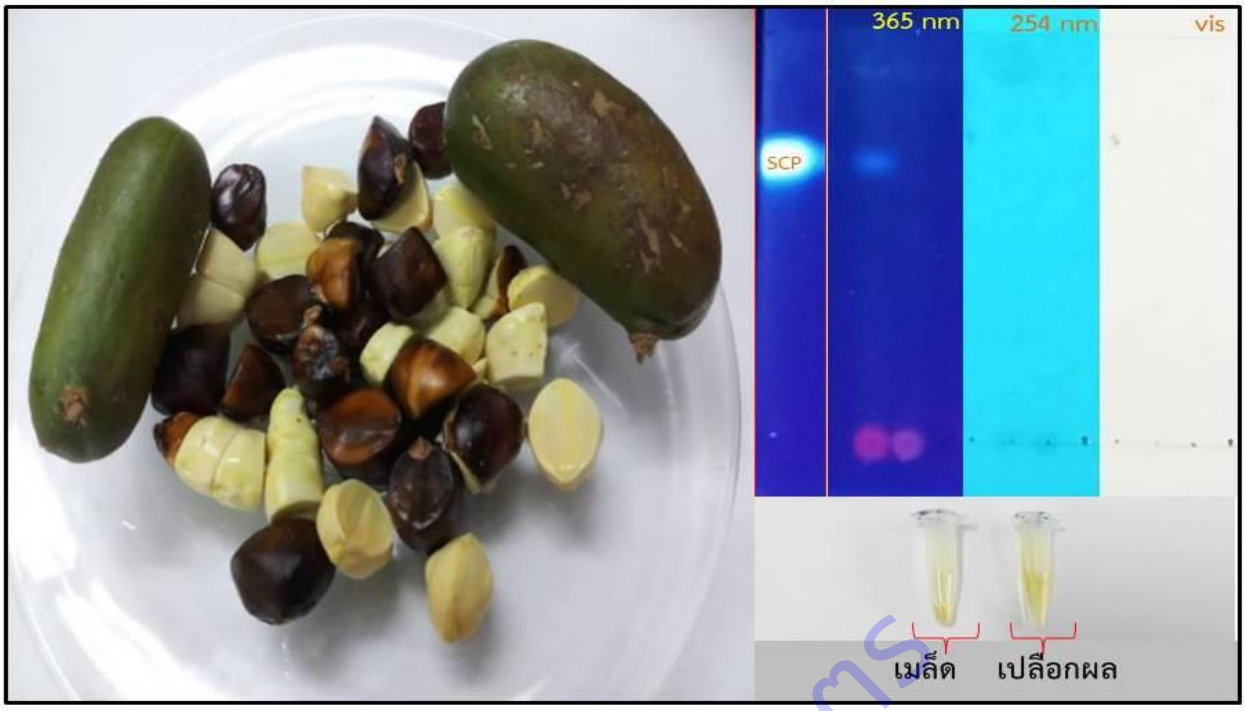
กรมวิทยาศาสตร์



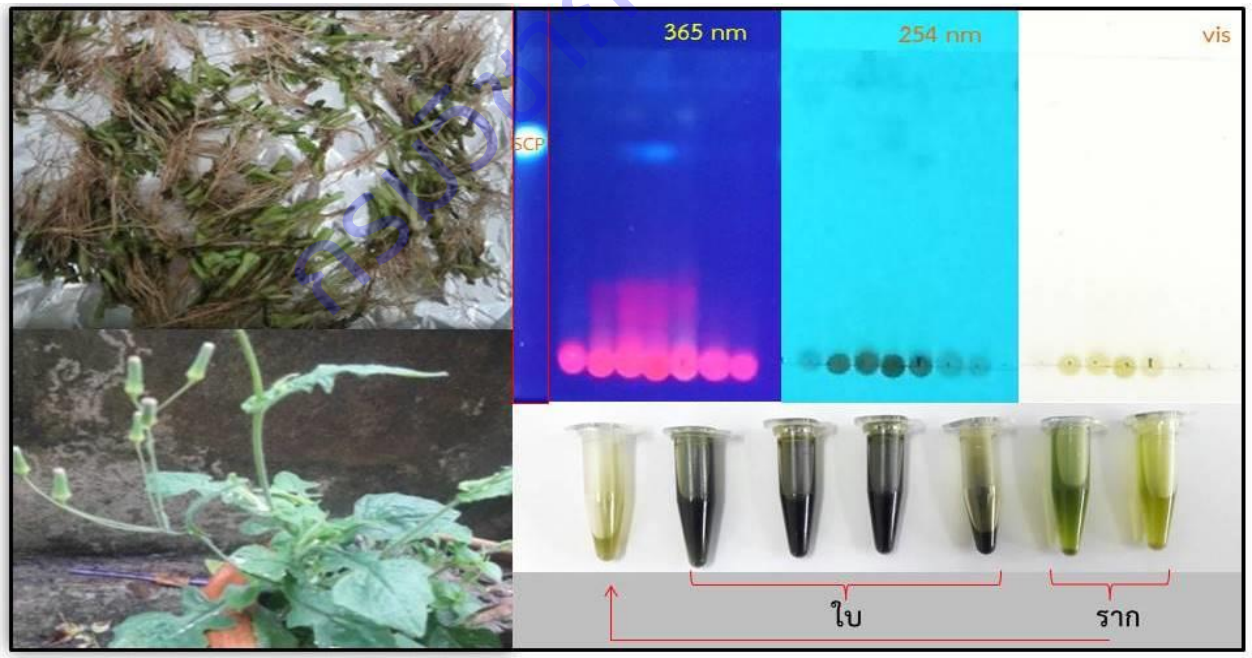
รูปที่ 8 ดาหลา (*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของก้านใบที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



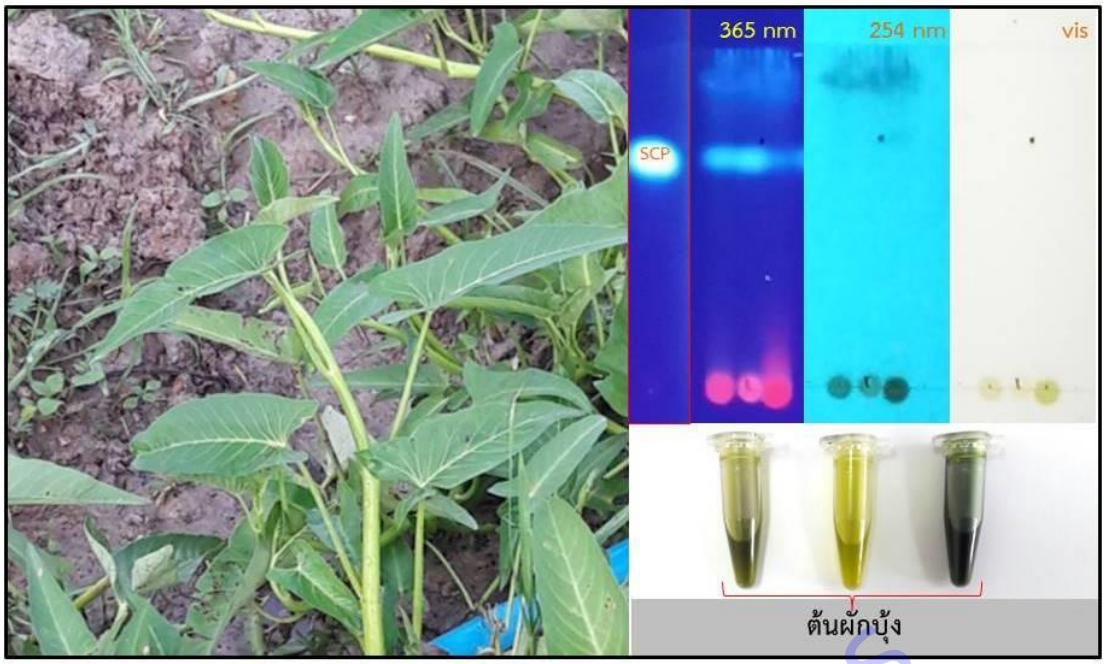
รูปที่ 9 ทุเรียนเทศ (*Annona muricata* L.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ เนื้อผล และเมล็ดที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



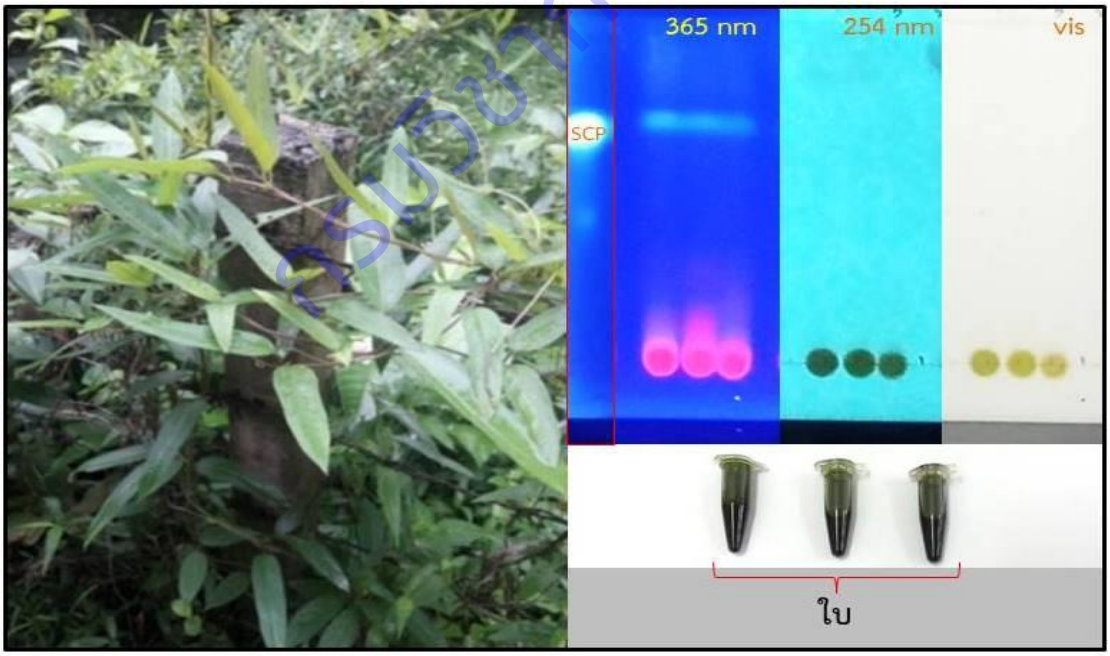
รูปที่ 10 เนียงนก (*Archidendron bubalinum* (jack) I.C. Nielsen) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเมล็ดและเปลือกผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



รูปที่ 11 ผักกาดนกเขา (*Emilia sonchifolia* (L.) DC.ex Wight) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบและรากที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

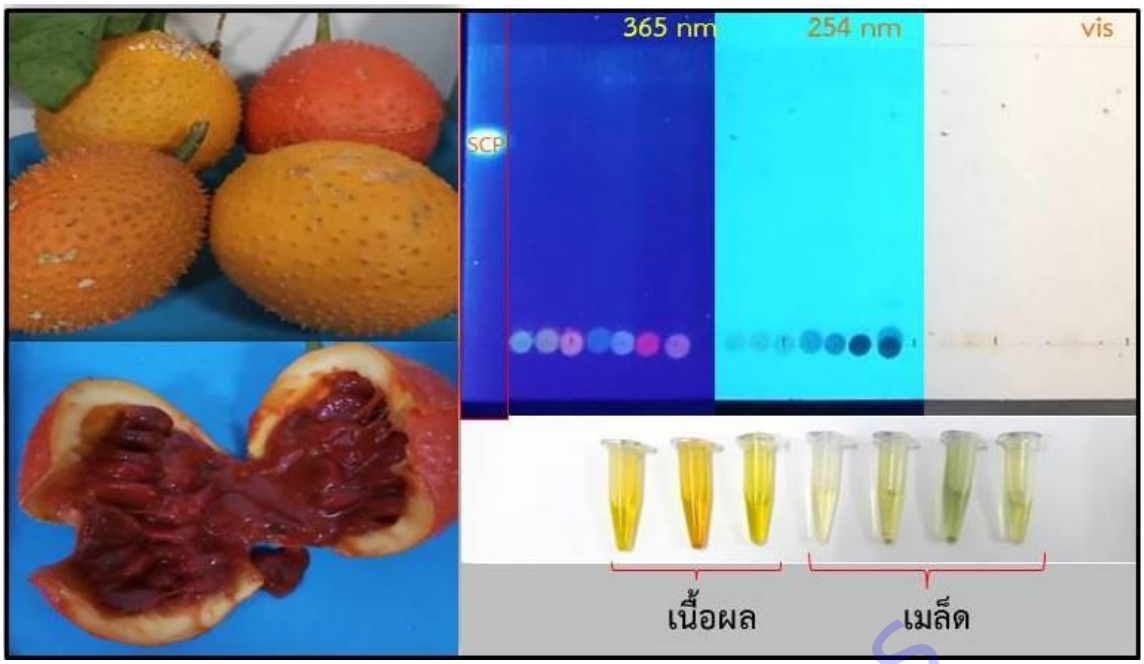


รูปที่ 12 ผักบุ้งน้ำ (*Ipomoea aquatica*) และการแยกสารสกัดเอทานอลของต้นผักบุ้งที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

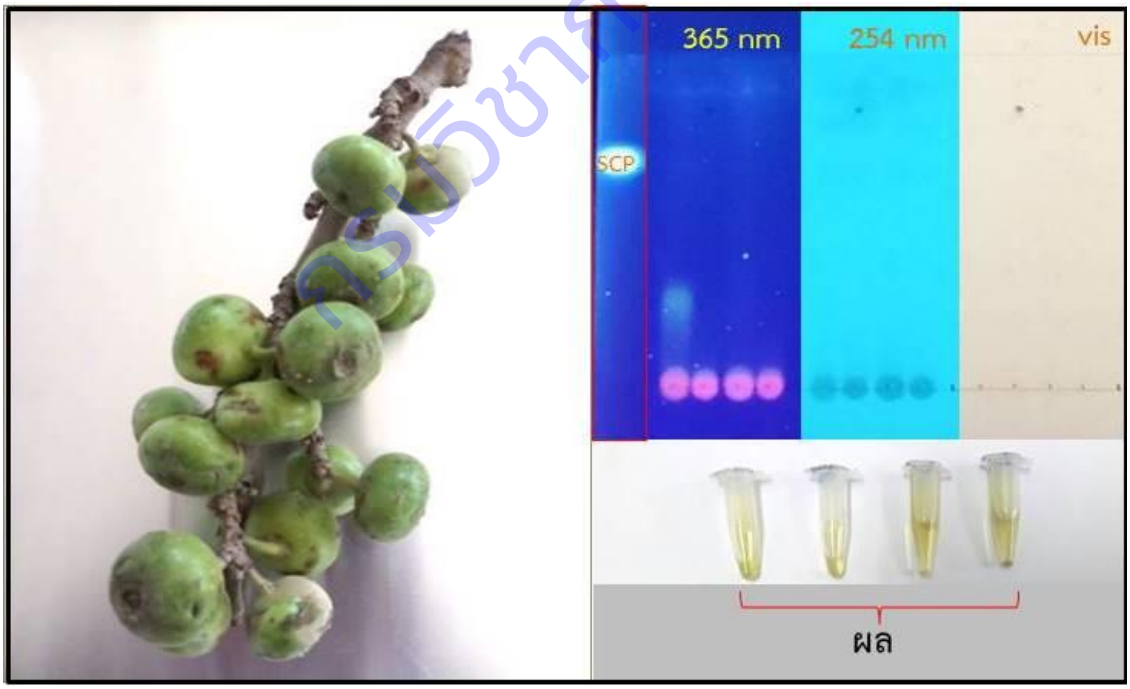


รูปที่ 13 พาโหม (*Paederia foetida* Linn) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

ลิขสิทธิ์การเกษตร

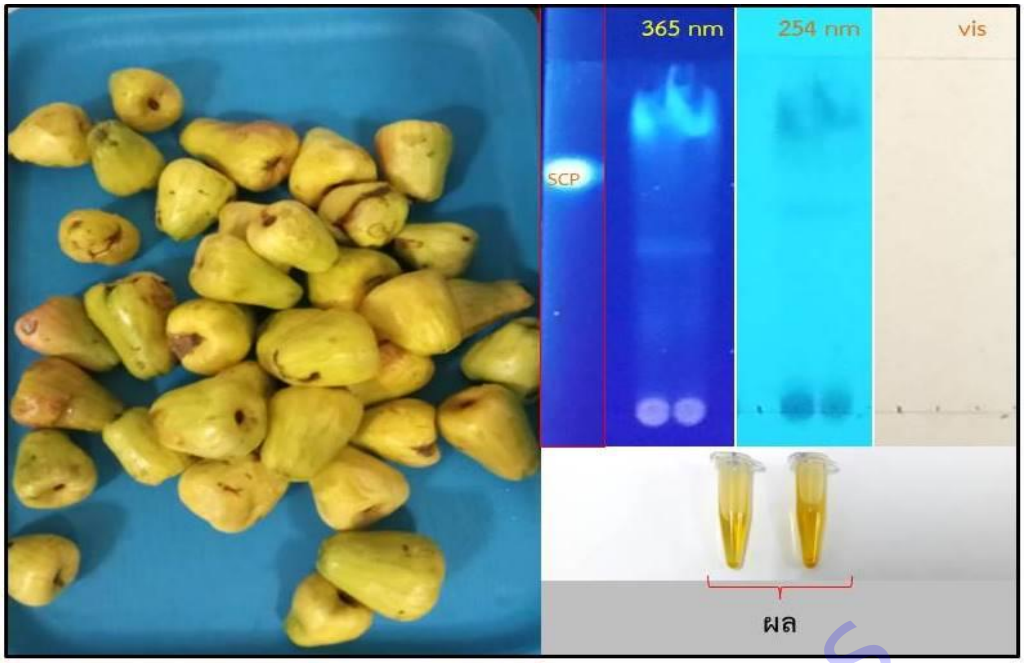


รูปที่ 14 ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเนื้อผลและเมล็ดที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

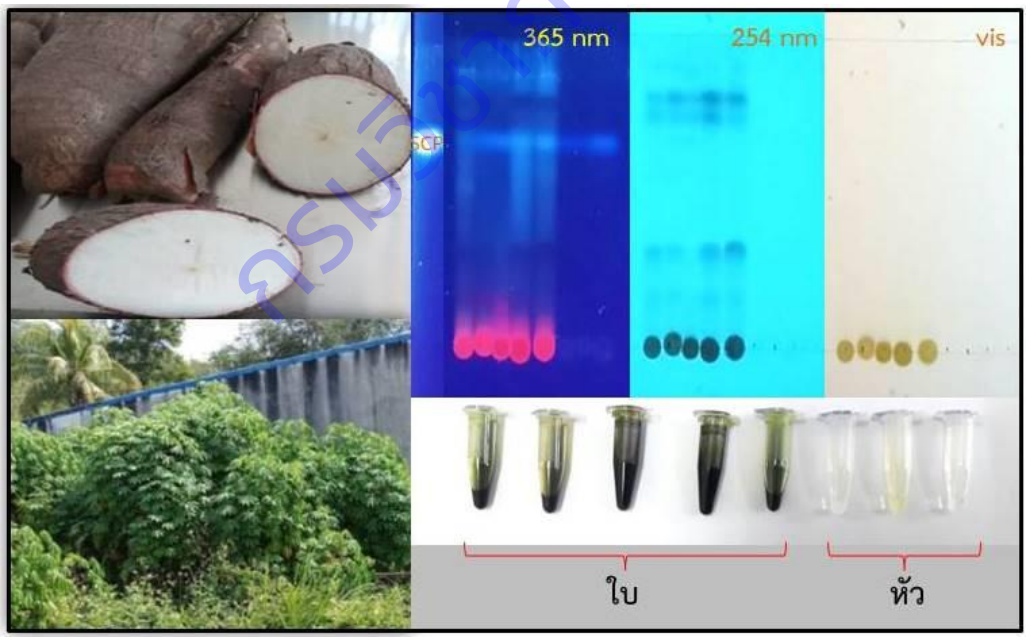


รูปที่ 15 มะเดื่อ (*Ficus hispida* L.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

กรมวิชาการเกษตร

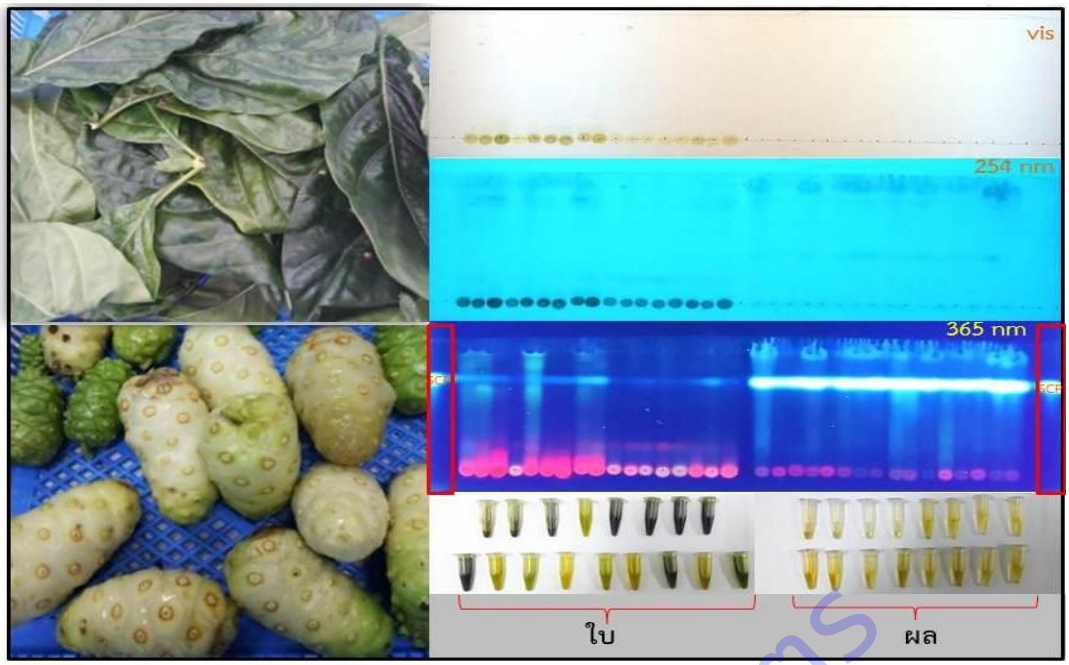


รูปที่ 16 มะม่วงหิมพานต์ (*Anacardium occidentale*) และการแยกสารสกัดเอทานอลของผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

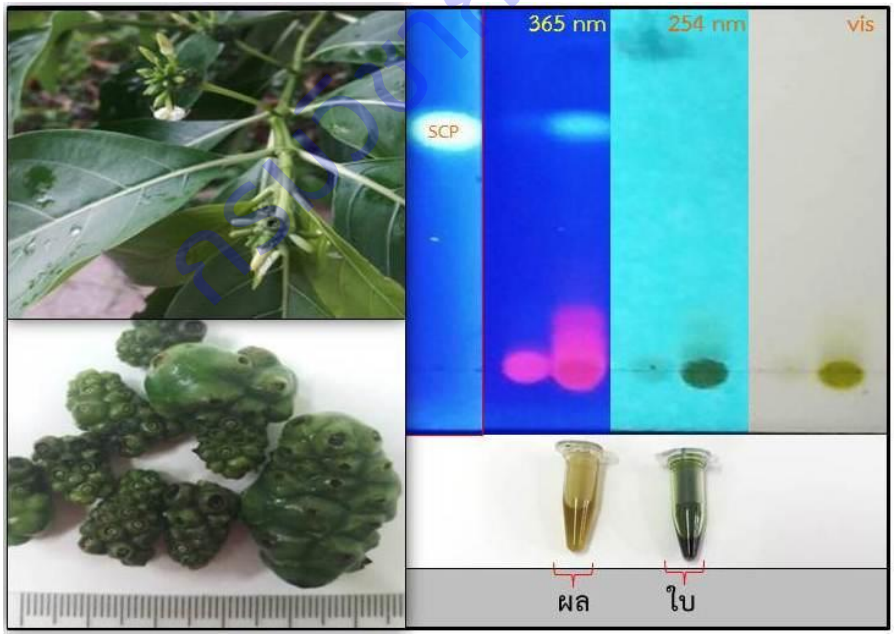


รูปที่ 17 มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* (L.) Crantz.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบและหัวที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

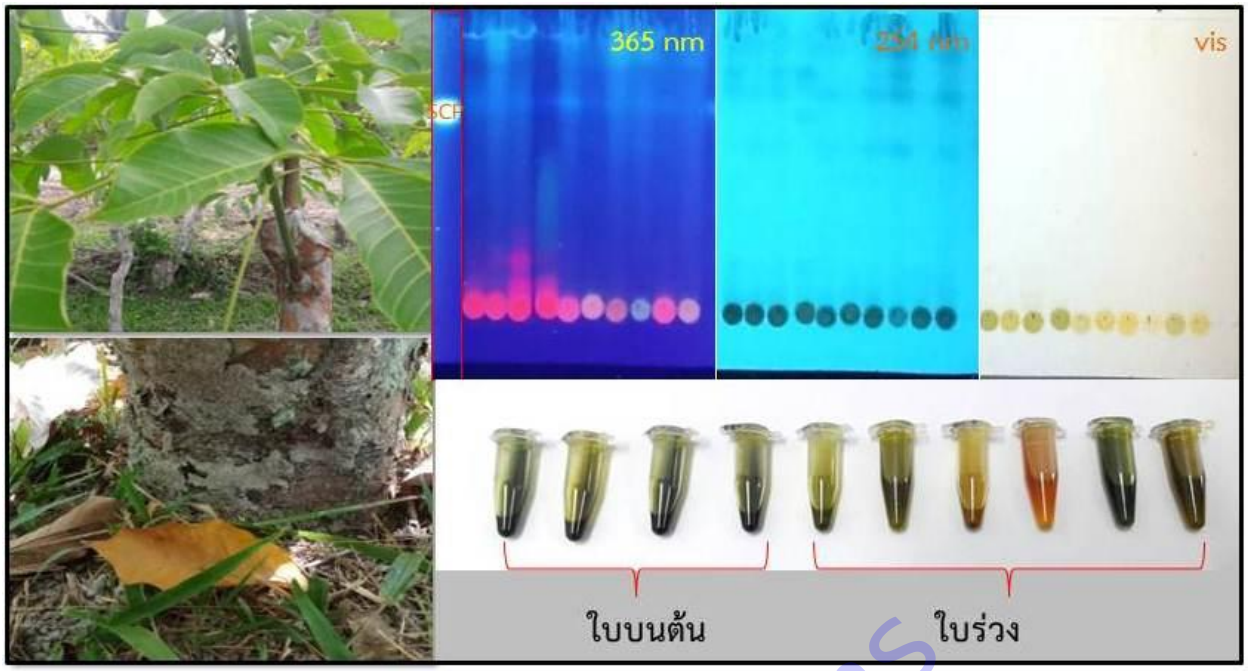
กรมวิชาการเกษตร



รูปที่ 18 ยอบ้าน (*Morinda citrifolia* L.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบและผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนเมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

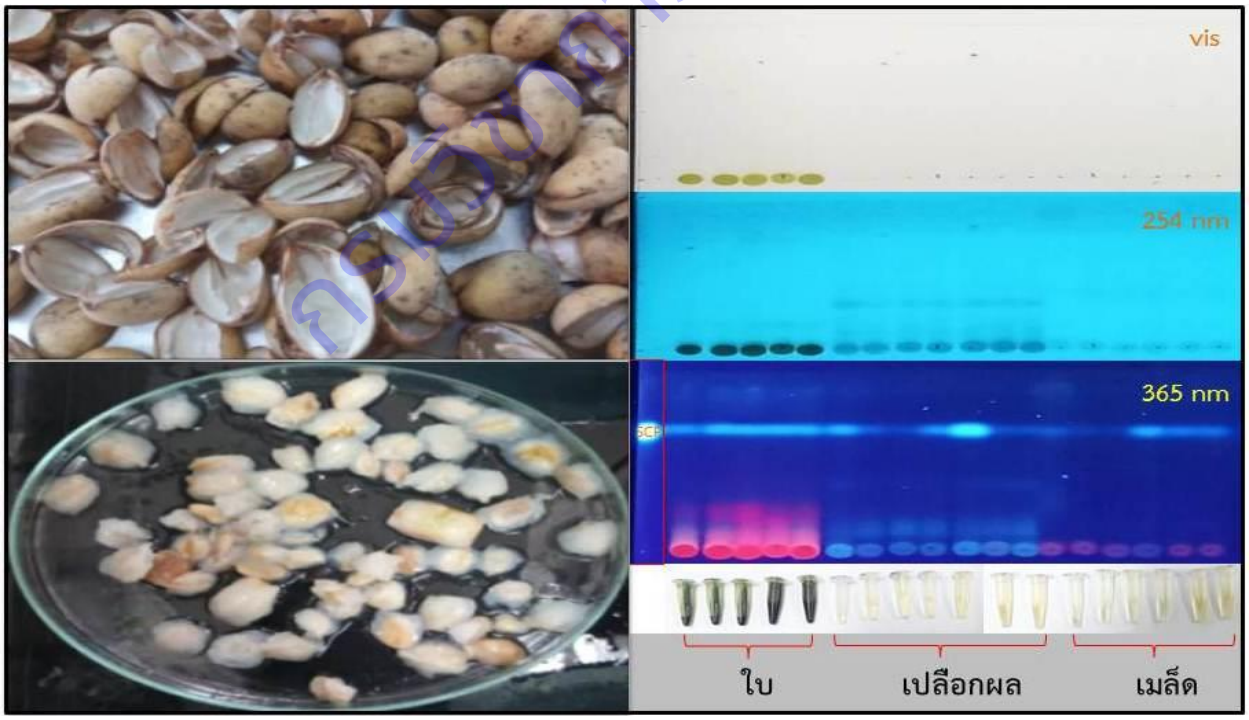


รูปที่ 19 ยอป่า (*Morinda coreia* Buch.-Ham.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของผลและใบที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible



รูปที่ 20 ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบบนต้นและใบร่วงที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

กรมวิชาการเกษตร



รูปที่ 21 ลองกอง (*Lansium domesticum* Corr.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของใบ เปลือกผล และเมล็ดที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน (scp)ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

รูปที่ 22 ลังแข (*Baccaurea macrophylla* Muell. Arg.) และการแยกสารสกัดเอทานอลของเปลือกผลที่ความเข้มข้น 1.57 กรัมน้ำหนักแห้งต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค TLC เทียบกับสารสคอพอเลติน(scp) ภายใต้แสงยูวีที่ 365 นาโนมตร 254 นาโนเมตร และแสง visible

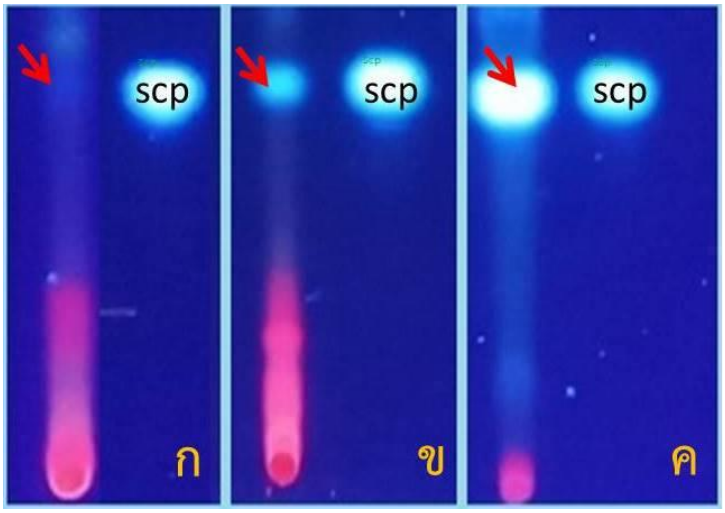
จากการประเมินเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค TLC โดยใช้สารสกัดจากพืชชนิดต่างๆที่ความเข้มข้นการสกัดเท่ากัน และใช้สารสคอพอเลตินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการเปรียบเทียบ ภายใต้เกณฑ์ในการจำแนกกลุ่มพืชดังรูปที่ 23 สามารถจำแนกได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีสคอพอเลตินในระดับสูง (ความเข้มของแถบเรืองแสงในตัวอย่างทดสอบสูงกว่าแถบสคอพอเลตินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ได้แก่ ยอบ้าน (ผล)

กลุ่มที่ 2 มีสคอพอเลตินในระดับปานกลาง (มองเห็นแถบเรืองแสงได้ชัดเจนในตัวอย่างทดสอบแต่ไม่เกินความเข้มของแถบสคอพอเลตินมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ได้แก่ ลองกอง (ใบ) ยอป่า (ใบ) และผักบุ้งน้ำ (ต้น)

กลุ่มที่ 3 มีสคอพอเลตินในระดับน้อยหรือไม่พบ (มองเห็นแถบเรืองแสงได้เล็กน้อยในตัวอย่างทดสอบหรือไม่พบแถบการเรืองแสง) ได้แก่ เคี่ยม (ใบ และเปลือก) เนียงนก (เมล็ด และเปลือกผล) ทุเรียนเทศ (ใบ, เนื้อผล และเมล็ด) ฟักข้าว (เนื้อผล และเมล็ด) ขี้กา (เมล็ด และเนื้อผล) คล้า (ใบ, ต้น และราก) มะม่วงหิมพานต์ (เนื้อผล) ลังแข (เนื้อผล) มะเดื่อ (ผล) ผักกาดนกเขา (ใบ และราก) ยางพารา (ใบบนต้น และใบร่วง) ดาหลา (ก้านใบ) ยอป่า (ผล) ลองกอง (เมล็ด) มันสำปะหลัง (หัว) ยอบ้าน (ใบ) พาโหม (ใบ) มันสำปะหลัง (ใบ) และลองกอง (เปลือกผล)

กรมวิชาการเกษตร



รูปที่ 23 ตัวอย่างการประเมินเปรียบเทียบปริมาณสารสคอพอเลตินด้วยเทคนิค TLC ในตัวอย่างพืชทดสอบ(ลูกศรสีแดง) กับสคอพอเลตินมาตรฐาน (Scp) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร; ก) พบระดับน้อยหรือไม่พบ ข) พบระดับปานกลาง และ ค) พบระดับสูง

จากผลการทดลองประเมินปริมาณสคอพอเลตินในเชิงคุณภาพโดยเทคนิค TLC พบว่า พืชที่มีปริมาณสคอพอเลตินสูงที่สุด ได้แก่ ผลยอบ้าน (รูปที่ 18) ในขณะที่ชิ้นส่วนใบของยอบ้าน รวมทั้งชิ้นส่วนพืชชนิดอื่นๆที่ทำการทดสอบพบว่าให้แถบการเรืองแสงต่ำกว่าระดับการเรืองแสงของสารสคอพอเลตินที่ใช้เปรียบเทียบในทุกตัวอย่าง

8.2 ผลการวิเคราะห์สคอพอเลตินในพืชท้องถิ่นชนิดต่างๆด้วยเทคนิค High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อคัดเลือกพืชที่มีศักยภาพสำหรับการจัดทำฐานข้อมูลสู่การใช้ประโยชน์

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง จำนวน 18 ชนิดพืช นำมาสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินโดยเทคนิค HPLC โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสคอพอเลติน (0.05-10 ไมโครกรัมสคอพอเลติน/มิลลิลิตร ; R^2 = 0.9999) พบว่าในการวิเคราะห์ปริมาณสคอพอเลตินในเปลือกเคี่ยมด้วย HPLC ไม่สามารถระบุข้อมูลในเชิงปริมาณได้ทั้งนี้อาจเนื่องจากภายในเคี่ยมยังมีสารสำคัญอื่นๆอีกหลายชนิดนอกเหนือจากสารสคอพอเลติน ดังจะเห็นได้จากการแยกด้วยวิธี TLC (รูปที่ 6) ซึ่งอาจมีสารบางชนิดที่มีค่าช่วงเวลาการแยก (retention time) ใกล้เคียงหรือซ้อนทับกับสารสคอพอเลติน ส่งผลให้ไม่สามารถแยกพีคเดี่ยวของสารสคอพอเลตินออกมาคำนวณเชิงปริมาณได้ อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์สารสคอพอเลตินเชิงปริมาณในพืชท้องถิ่นชนิดอื่นๆด้วย HPLC แสดงดังตารางที่ 1

สำนักวิทยบริการฯ

ตารางที่ 1 ปริมาณสคอพอเลตินในตัวอย่างพืชที่พบได้ง่ายในท้องถิ่นภาคใต้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

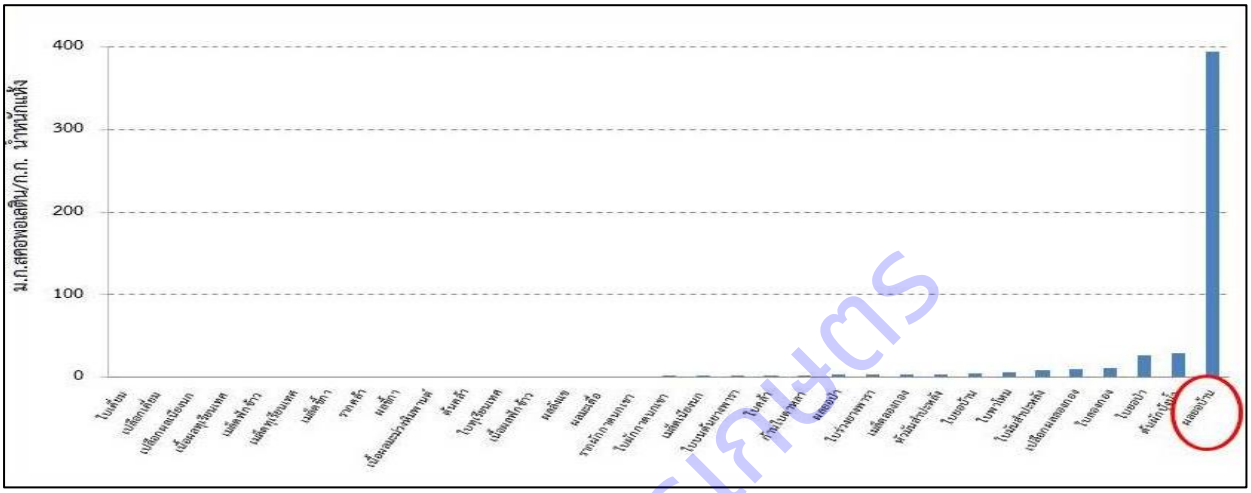
ชนิดพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์/วงศ์	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	ชิ้นส่วนพืช (organ)	ปริมาณสคอพอเลติน (มก/.กก.น้ำหนักแห้ง)	
				mean ± SD.	ซ้ำ
1. ขี้กา	*Gymnopetalum integrifolim* Kurz.	จ.สงขลา	ผล	0.23 ± 0.22	3
	(Cucurbitaceae)		เมล็ด	0.19 ± 0.07	3
2. คล้า	*Schumannianthus dichotomus* (Roxb.)	จ.พัทลุง	ใบ	2.81 ± 2.47	3
	Gagnep. (Marantaceae)	และ จ.สงขลา	ต้น	0.45 ± 0.52	3
			ราก	0.21 ± 0.02	2
3. เคี่ยม	*Cotylelobium lanceolatum*	จ.ชุมพร*	ใบ	ND	1
	Craib (Dipterocarpaceae)		เปลือก	ND	1-
4. ดาหลา	*Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith.	จ.นราธิวาส*และ จ.สงขลา	ก้านใบ	2.95 ± 3.61	4
	(Zingiberaceae)				
5. ทุเรียนเทศ	*Annona muricata* L. (Annonaceae)	จ.สงขลา	ใบ	0.59 ± 0.21	5
			เมล็ด	0.14 ± 0.17	6
			เนื้อผล	0.02 ± 0.04	6
6. เนียงนก	*Archidendron bubalinum* (jack) I.C.	จ.สงขลา	เมล็ด	2.64	1
	Nielsen (Leguminosae)		เปลือกผล	0.00	1
7. ผักกาดนกเขา	*Emilia sonchifolia* (L.) Dc. (Compositae)	จ.สงขลา	ใบ	2.49 ± 2.62	4
			ราก	1.59 ± 2.05	3
8. ผักบุ้งน้ำ	*Ipomoea aquatic* (Convolvulaceae)	จ.สงขลา	ต้น	29.19 ± 15.45	3
9. พาโหม	*Paederia foetida* Linn. (Rubiaceae)	จ.สงขลา	ใบ	6.32 ± 1.37	3
10 ฟักข้าว	*Momordica cochinchinensis*	จ.สงขลา	เนื้อผล	0.60 ± 0.78	3
	(Lour.) Spreng. (Cucurbitaceae)		เมล็ด	0.11 ± 0.12	4
11. มะเดื่อ	*Ficus hispida* L. (Moraceae)	จ.สงขลา	ผล	1.51 ± 1.15	4
12.มะม่วงหิมพานต์	*Anacardium occidentale* (Anacardiaceae)	จ.สงขลา	เนื้อผล	0.42 ± 0.38	2
13. มันสำปะหลัง	*Manihot esculenta* (L.) Crantz	จ.สงขลา	ใบ	8.34 ± 5.49	5
	(Euphorbiaceae)		หัว	4.22 ± 2.41	3
14. ยอบ้าน	*Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae)	จ.ปัตตานี* จ.สงขลา จ.ตรัง	ใบ	5.65 ± 4.91	21
		และจ.พัทลุง	ผล	393.27± 165.42	21
15. ยอป่า	*Morinda elliptica (*Hook.f.) Ridl	จ.สงขลา	ใบ	26.55	1
	(Rubiaceae)		ผล	3.26	1
16. ยางพารา	*Hevea brasiliensis* Mull-Arg.	จ.สงขลา และจ.พัทลุง	ใบบนต้น	2.74 ± 0.47	4
	(Euphorbiaceae)		ใบร่วง	3.83 ± 2.25	6
17. ลองกอง	*Lansium domesticum* Corr. (Meliaceae)	จ.สงขลา	ใบ	11.31 ± 1.50	5
		จ.สตูล* และ	เปลือกผล	9.75 ± 15.54	7
		จ.นครศรีธรรมราช*	เมล็ด	3.97 ± 3.68	6
18. ลังแข	*Baccaurea macrophylla* Muell. Arg.	จ.นราธิวาส*	ผล	0.70 ± 0.77	3
	(Euphorbiaceae)				

หมายเหตุ ND = not detected (ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการทดลองนี้)

* = ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากเกษตรกรหรือบุคคลในพื้นที่เป็นผู้สุ่มเก็บและส่งตัวอย่าง

กรมวิชาการเกษตร

จากการทดสอบสารสคอพอเลตินในเชิงคุณภาพ (รูปที่ 4-22) ควบคู่ไปกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามีพืชท้องถิ่นที่มีปริมาณสคอพอเลตินสูงเกินค่าที่กำหนดเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก (มากกว่า 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักพืชแห้ง) จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ ยอบ้านเฉพาะส่วนของผล (รูปที่ 24) ซึ่งจากการสุ่มเก็บตัวอย่างผลยอเพิ่มเติมจำนวน 21 พื้นที่ ครอบคลุมพื้นที่ใน จ.สงขลา จ.ตรัง และจังหวัดพัทลุง พบว่าผลยอแห้งน้ำหนักหนึ่งกิโลกรัม มีปริมาณสคอพอเลตินอยู่ในช่วง 190.44 – 785.52 มิลลิกรัม โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 393.27± 165.42 มิลลิกรัม



รูปที่ 24 ปริมาณสคอพอเลตินเฉลี่ยในพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายในพื้นที่ภาคใต้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ระดับปริมาณของสารสคอพอเลตินเฉลี่ยในผลยอที่ได้จากการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ West and Deng (2010) ซึ่งได้วิเคราะห์ปริมาณสารสคอพอเลตินจากผลยอที่เก็บจากพื้นที่ต่างกัน 8 แหล่ง ครอบคลุมพื้นที่เฟรนโปลินิเซีย ได้แก่ ตาฮิติ โมโอเรอา โมทูฟาเรโอเน่ ตองก้า สาธารณรัฐโดมินิกัน โอกินาวา ไทย และฮาวาย พบว่ามีสคอพอเลตินอยู่ในช่วง 100-400 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผลยอแห้ง 1 กิโลกรัม

นอกจากการคัดเลือกพืชท้องถิ่นที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นพืชวัตถุดิบสำหรับการสกัดสารสคอพอเลตินเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์แล้วนั้น จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการประเมินเชิงคุณภาพเบื้องต้นด้วยเทคนิค TLC และการตรวจสอบเชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC พบว่ายังให้ผลการประเมินที่สอดคล้องกันดังตารางที่ 2 ซึ่งการนำเทคนิค TLC มาใช้ นับเป็นวิธีที่ต้นทุนต่ำ ทำได้ง่ายและสะดวก ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง สารเคมีที่ใช้ในระบบการแยกที่ได้ปรับใช้นี้ มีราคาไม่แพงมาก หาได้ง่าย และมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้งานสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลวิเคราะห์ที่ได้ยังมีความสอดคล้องกับวิธีการที่ใช้เครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพสูง มีความซับซ้อน และราคาแพง เช่น HPLC จึงเหมาะสำหรับการนำไปปรับใช้เพื่อการศึกษาเบื้องต้นสำหรับการสำรวจประเมินปริมาณสคอพอเลตินในพืช

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 2 การประเมินจำแนกปริมาณสคอพอเลตินในพืชท้องถิ่นโดยวิธี TLC และ HPLC

ชนิดพืช/ชิ้นส่วนพืช	การจำแนกปริมาณสคอพอเลตินในพืช/ชิ้นส่วนพืช	
	วิธี TLC	วิธี HPLC
ยอบ้าน (ผล)	กลุ่มที่ 1	$\geq$ 100 ม.ก./ก.ก.น้ำหนักแห้ง
ลองกอง (ใบ) ยอป่า (ใบ) และผักบุ้งน้ำ (ต้น)	กลุ่มที่ 2	10-100 ม.ก./ก.ก.น้ำหนักแห้ง
เคี่ยม (ใบ และเปลือก) เนียงนก (เมล็ด และเปลือกผล) ทุเรียนเทศ (ใบ, เนื้อผล และเมล็ด) ฟักข้าว (เนื้อผล และเมล็ด) ขี้กา (เมล็ด และเนื้อผล) คล้า (ใบ, ต้น และราก) มะม่วงหิมพานต์ (เนื้อผล) ลังแข (เนื้อผล) มะเดื่อ (ผล) ผักกาดนกเขา (ใบ และราก) ยางพารา (ใบบนต้น และใบร่วง) ดาหลา (ก้านใบ) ยอป่า (ผล) ลองกอง (เมล็ด) มันสำปะหลัง (หัว) ยอบ้าน (ใบ) พาโหม (ใบ) มันสำปะหลัง (ใบ) และลองกอง (เปลือกผล)	กลุ่มที่ 3	< 10 ม.ก./ก.ก.น้ำหนักแห้ง หรือตรวจไม่พบ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพืชท้องถิ่นจำนวน 18 ชนิด พบว่ายอบ้าน (เฉพาะส่วนผล) เป็นพืชที่มีศักยภาพสูงที่สุดสำหรับนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดสารสคอพอเลตินเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป ทั้งในด้านการแพทย์ ด้านการเกษตร หรือด้านอื่นๆที่เกี่ยวข้อง และจากการตรวจสอบราคาในปี 2564 พบว่าสารสคอพอเลตินที่มีจำหน่ายในเชิงการค้าปริมาณ 100 มิลลิกรัม ที่ความบริสุทธิ์$\geq$ 99 % มีราคาสูงถึงหนึ่งหมื่นบาทโดยประมาณ (https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s2500?lang=en&region=TH เข้าถึงเมื่อมีนาคม 2564) โดยผลการวิเคราะห์เพื่อจัดทำฐานข้อมูลปริมาณสคอพอเลตินในผลยอบ้านที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ต่างๆ ถึง 21 พื้นที่ ครอบคลุมพื้นที่ จ.สงขลา จ.ตรัง และจ.พัทลุง พบว่า มีปริมาณสคอพอเลตินโดยเฉลี่ย 393.27$\pm$ 165.42 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผลยอแห้ง 1 กิโลกรัม จะเห็นได้ว่าหากสามารถสกัดสารสคอพอเลตินได้จากผลยอบ้านซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายทั้งในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างรวมถึงพื้นที่ต่างๆทั่วประเทศ จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชชนิดนี้ได้ต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ในขั้นตอนการประเมินปริมาณสคอพอเลตินเบื้องต้นได้มีการปรับเทคนิค TLC เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ชิ้นส่วนพืชได้หลายชนิดพร้อมกันทั้งส่วนใบ ราก และผล โดยไม่ถูกรบกวนหรือถูกรบกวนน้อยมากจากสีของสารชนิดอื่นในพืชนั้นๆ พบว่าระบบการแยกที่เหมาะสม คือ การแยกบนแผ่น TLC ชนิด normal phase ภายใต้ระบบตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่เป็นเมทานอล:น้ำ ($MeOH:H_2O$) ในอัตรา 75:25 (V/V) ซึ่งการใช้เทคนิคดังกล่าวให้ผลสอดคล้องเป็นไปในทางเดียวกับการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค HPLC นอกจากนี้เทคนิค TLC ยังมีข้อดีคือเป็นเทคนิคที่มีค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสกัดและวิเคราะห์ค่อนข้างต่ำ สามารถดำเนินการได้ไม่ยาก และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความซับซ้อนและมีต้นทุนการลงทุนสูง แม้จะมีข้อจำกัดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่มีความละเอียดไม่เทียบเท่า HPLC แต่ผู้วิจัยที่สนใจสามารถ

กรมวิชาการเกษตร

นำเทคนิคนี้ไปปรับใช้ รองรับการศึกษาเชิงสำรวจหรือเพื่อการประเมินเชิงคุณภาพของสารสคอพอเลตินในพืชหรือผลิตภัณฑ์จากพืชได้ต่อไปในอนาคตได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์: ให้ระบุผลงานที่สิ้นสุด ได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างไร พัฒนาต่อหรือถ่ายทอด หรือเผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย (ระบุเป็นข้อๆ)

1. ได้ชนิดของพืชท้องถิ่นที่หาได้ง่ายและมีศักยภาพเหมาะสมสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสารสคอพอเลติน เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ และศึกษาต่อยอด เช่น ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพของสารสคอพอเลติน และการประยุกต์ใช้สารสคอพอเลตินในด้านต่างๆ **กลุ่มเป้าหมาย** คือ นักวิจัย เกษตรกรหรือกลุ่มเกษตรกร และผู้สนใจทั่วไป

2. เกิดทางเลือกใหม่ในการสร้างรายได้ให้กับเกษตรกร เนื่องจากพืชท้องถิ่นเป็นวัตถุดิบต้นทุนต่ำที่นักวิจัยไทยสามารถนำมาใช้ในการสกัดสารสคอพอเลตินได้เอง อันเป็นการทดแทนการสั่งซื้อหรือนำเข้าสารดังกล่าว ช่วยให้เกิดการลดต้นทุนในการพัฒนางานวิจัยของประเทศ ผ่านการใช้ทรัพยากรที่มีอยู่แล้วภายในประเทศอย่างคุ้มค่า **กลุ่มเป้าหมาย** คือ เกษตรกรหรือกลุ่มเกษตรกร นักวิจัย และผู้สนใจทั่วไป

3. องค์ความรู้เรื่องเทคนิคการตรวจสอบวิเคราะห์สารสคอพอเลตินในพืชที่ได้จากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปปรับใช้ในงานวิจัยสาขาที่เกี่ยวข้อง เช่น การสำรวจพันธุ์พืช การประเมินระดับภูมิคุ้มกันในพืช หรือรองรับกิจกรรมการเพิ่มมูลค่าให้กับพืชท้องถิ่นในพื้นที่ต่างๆทั่วประเทศ **กลุ่มเป้าหมาย** คือ นักวิจัย และนักวิชาการกรมวิชาการเกษตร สถาบันการศึกษา และผู้สนใจทั่วไป

4. นำองค์ความรู้และแหล่งที่มาของวัตถุดิบไปใช้ในการผลิตสารสคอพอเลตินทางการค้าสำหรับใช้ประโยชน์ในด้านที่เกี่ยวข้อง ทั้งทางการแพทย์ เกษตรกรรม อุตสาหกรรม **กลุ่มเป้าหมาย** คือ หน่วยงานภาคอุตสาหกรรม

11. คำขอบคุณ: ผู้วิจัยขอขอบคุณทีมเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์จุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สวพ.8 เป็นอย่างยิ่งสำหรับความร่วมมือร่วมใจทุ่มเทปฏิบัติงานตั้งแต่การลงพื้นที่เก็บตัวอย่างจนกระทั่งการวิเคราะห์ต่างๆดำเนินการได้แล้วเสร็จ และขอขอบคุณที่ปรึกษาด้านวิชาการและผู้บริหารของหน่วยงาน ที่อำนวยความสะดวกต่างๆในการปฏิบัติงานภายใต้ข้อจำกัดของงบประมาณในปี 2563 ซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับรายละเอียดงานเพื่อความเหมาะสมโดยไม่ให้กระทบต่อวัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้

กรมวิชาการเกษตร

12. เอกสารอ้างอิง

Abyari, M., Nasr, N., Soorni, J., Sadhu, D. 2016. **Enhanced Accumulation of Scopoletin in Cell Suspension Culture of *Spilanthes acmella* Murr. Using Precursor Feeding**. Brazilian Archives of Biology and Technology. 59.

Acharya, D., Bogati, B., Risal, P. 2013. **Scopoletin reduces intracellular survival of *Salmonella typhi* within U937 human macrophage cell line in vitro**. Sky Journal of Microbiology Research. Vol. 1(6), pp. 47 – 51.

Andreae, S.R., Andreae, W.A. 1949. **The metabolism of scopoletin by healthy and virus infected potato tubers.**Canadian Journal of Research. 27, 15–22.

Ba, R., Alfa, T., Gbaguidi, F., Novidzro, K.M., Dotse, K., Koudouvo, K., Houngue, U., DonouHounsode, M.T., Koumaglo, K.H., Ameyapoh, Y., others. 2017. **Maize Fungal Growth Control with Scopoletin of Cassava Roots Produced in Benin**. International Journal of Microbiology. 2017.

Churngchow, N., Rattarasarn, M. 2001. **Biosynthesis of scopoletin in *Heveabrasiliensis* leaves inoculated with *Phytophthorapalmivora***. Journal of plant physiology. 158, 875–882.

Gutierrez M-C, Parry AD, Tena M, Jorrin J, Edwards R. 1995. **Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower**. Phytochemistry. 38: 1185±1191.

Khompatara, K., 2017. Systemic Acquired Resistance in *Hevea brasiliensis* Induced by the Seaweed Extract from *Sargassumpolycystum*. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Biochemistry. Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

Malik, A., Kushnoor, A., Saini, V., Singhal, S., Kumar, S. and Yadav, Y.C. 2011. **In vitro antioxidant properties of Scopoletin**. J. Chem. Pharm. Res., 2011, 3(3), 659-665.

Rigane, G., Ben Younes, S., Ghazghazi, H., Ben Salem, R., others. 2013a. **Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia**.International Food Research Journal. 20, 3001–3007.

Saftić-Panković, D., Veljović-Jovanović, S., Pucarević, M., Radovanović, N., Mijić, A. 2006. **Phenolic compounds and peroxidase in sunflower near-isogenic lines after downy mildew infection**.Helia. 29, 33–42.

กรมวิทยาศาสตร์

Shaw, C.Y., Chen, C.H., Shu, C.C., Chen, C.C. and Tsai, Y.C. 2003. **Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*.** Phytother Res. 17(7), 823-5.

Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O., Lewis, K. 2002. **Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials.** Antimicrobial agents and chemotherapy. 46, 3133–3141.

Vialart, G., Hehn, A., Olry, A., Ito, K., Krieger, C., Larbat, R., Paris, C., Shimizu, B., Sugimoto, Y., Mizutani, M., others. 2012. **A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits p-coumaroyl CoA 2′-hydroxylase activity (C2′ H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants**. The Plant Journal. 70, 460–470.

West, B.J., Deng, S. 2010. **Thin layer chromatography methods for rapid identity testing of *Morindacitrifolia* L.(Noni) fruit and leaf**. Adv. J. Food Sci. Technol. 2, 298–302.

Zafar, R., Ahmad, S., Mujeeb, M. 2005. **Estimation Of Scopoletin In Leaf And Leaf Callus Of *Convolvulus Microphyllus* Sieb**. Indian journal of pharmaceutical sciences 67, 562.

กรมวิชาการเกษตร

13. ภาคผนวกรูปภาพ

รูปผนวกที่ 1 การลงพื้นที่เก็บตัวอย่างพืชสำหรับงานวิจัย

รูปผนวกที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับนำไปสกัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร

รูปผนวกที่ 3 ลำดับขั้นตอนการวิเคราะห์และทดสอบ; ก) ลำดับการสกัดอย่างพืช และ ข) การวิเคราะห์ตัวอย่างพืช