รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : การวิจัยและพัฒนาชีวภัณฑ์เพื่อการผลิตพืชปลอดภัย

2. โครงการวิจัย : ศึกษาปริมาณและคุณสมบัติทางชีวภาพของสารสคอพอเลตินจากพืชและการประยุกต์ใช้ควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในพืช

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การทำบริสุทธิ์สารสคอพอเลตินและตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ
(ภาษาอังกฤษ) : ระบุชื่อการทดลองตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวเขมมิการ์ โขมพัตร	**สังกัด** สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8
ผู้ร่วมงาน	นางสาวสาวิตรี เขมวงศ์	**สังกัด** สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8
	นางสาวปริยากร ฤทธิสุนทร	**สังกัด** สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8
	นางสาวเยาวภา สุขพรมา	**สังกัด** มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
	นางนันทา เชิงเชาว์	**สังกัด** มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

5. บทคัดย่อ

สคอพอเลตินเป็นสารธรรมชาติจัดอยู่ในกลุ่มคูมารินซึ่งสามารถสกัดได้จากพืชหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่สารชนิดนี้จะถูกใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์และใช้เป็นยาสมุนไพร ยอบ้าน (*Morinda citrifolia* L.) จัดอยู่ในแฟมิลี่ Rubiaceae เป็นพืชท้องถิ่นที่พบได้ทั่วไปในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง รวมทั้งพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย จากการสำรวจของทีมวิจัยก่อนนี้พบว่ายอบ้านมีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการสกัดสารสคอพอเลติน งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อสกัดสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์จากผลยอบ้านโดยใช้เทคนิค Column chromatography ในการแยกสาร ซึ่งดำเนินการโดยแยกสารผ่านคอลัมน์ซิลิกา จากนั้นทำการชะด้วยตัวชะ 2 ระบบ ได้แก่ 0-60% เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน และ 2% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบสารที่แยกได้ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานสคอพอเลตินด้วยเทคนิค Thin-layer cromatography (TLC), NMR และจากการเปรียบเทียบด้วยโครมาโทรแกรมของ FTIR พบว่าสารที่ได้มีค่าระดับความสอดคล้องกับสารมาตรฐาน 94.82 % บ่งชี้ว่าสารที่สกัดได้จากผลยอบ้านคือสารสคอพอเลติน

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

สคอพอเลติน เป็นสารทุติยภูมิที่มีมวลโมเลกุลต่ำ จุดเดือดสูง มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ ภายใต้สภาวะที่ถูกกระตุ้นทั้งจากตัวกระตุ้นแบบชีวภาพและแบบกายภาพ พืชสามารถสร้างสารชนิดนี้เพิ่มขึ้นมาได้อีกในปริมาณมาก โดยอาจพบได้ในบริเวณชิ้นส่วนต่างๆ เช่น ลำต้น ราก ใบ และผล อย่างไรก็ตาม สารนี้ถูกสร้างขึ้นในพืชเพียงบางชนิด โดยจุดเด่นของสารชนิดนี้คือการมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) รวมทั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ปัจจุบันจึงได้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะในทางการแพทย์ อย่างไรก็ตามการศึกษาและนำสคอพอเลตินมาใช้ประโยชน์ในเชิงการเกษตรเพื่อป้องกันหรือลดระดับความรุนแรงจากการถูกเชื้อรุกราน สำหรับประเทศไทยยังคงมีข้อมูลน้อย

นอกจากการศึกษาเพื่อพัฒนาด้านการอารักขาพืชแล้ว การศึกษาสารสำคัญในพืชที่สามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น ทั้งยังสามารถปลูกขยายพันธุ์ได้ง่าย ก็จะเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการช่วยเหลือเกษตรกรโดยการนำผลผลิตดังกล่าวมาสกัดสารสำคัญที่สามารถพัฒนาไปใช้ต่อยอดในอีกหลากหลายสาขาทั้งในงานด้านการเกษตร ตลอดจนงานด้านอุตสาหกรรมและการแพทย์ จะก่อให้เกิดประโยชน์ในเชิงเศรษฐกิจอีกมากมาย นอกจากนี้การศึกษาแนวทางในการนำสคอพอเลตินที่สกัดได้จากพืชมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร โดยอาศัยวัตถุดิบที่หาได้ง่าย มีความปลอดภัยจำเป็นต้องดำเนินการอย่างเร่งด่วนเพื่อรองรับแนวทางการส่งเสริมการเกษตรของทางภาครัฐที่มุ่งไปยังประเด็นการสร้างความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคจากปัญหาสารเคมีตกค้าง การรณรงค์ลดการใช้สารเคมีแก้ปัญหาโรคพืช รวมทั้งลดความเสียหายของผลผลิต จึงต้องสร้างทางเลือกในการแก้ปัญหาโรคพืชให้แก่เกษตรกรผู้ผลิตด้วยควบคู่กัน

6.1 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและทำบริสุทธิ์สารสคอพอเลตินจากพืชที่มีศักยภาพและศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของสารที่ได้

6.2 เป้าหมายของงานวิจัย

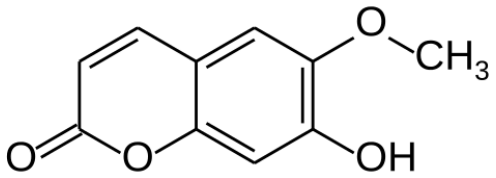
โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การศึกษาวิธีการนำสารสคอพอเลตินจากพืชที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับนำมาสกัดสารสคอพอเลติน โดยศึกษาตั้งแต่กระบวนการสกัดและทำให้บริสุทธิ์ จากนั้นทำการตรวจสอบคุณสมบัติพื้นฐานที่จำเป็นเพื่อตรวจยืนยันผลการสกัดที่ได้ ก่อนนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรหรือในทางอื่นๆที่เกี่ยวข้องต่อไป

6.3 การตรวจเอกสาร

กรมวิชาการเกษตร

6.3.1 สคอพอเลติน (Scopoletin)

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



รูปที่1 โครงสร้างของสคอพอเลติน

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

กรมวิชาการเกษตร

Tegos *et al.* (2002) ได้รายงานว่าสคอพอเลตินมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยยับยั้งกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบต่อมา Rigane *et al*. (2013) ได้รายงานถึงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้สารสกัดด้วยเมธานอลจากใบและดอกของต้น *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 ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) มีความสำคัญคือเป็นสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่นเช่นกระบวนการเกิดสนิมของเหล็ก การเกิดสีน้ำตาลในผลไม้ (เช่นในแอปเปิ้ล) หรือการทำให้น้ำมันพืชเหม็นหืน หรือกระบวนการออกซิเดชั่นที่เกิดในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ ควันบุหรี่ รังสียูวี ปัจจัยเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นซึ่งสร้างความเสียหายได้ทั้งในพืชและในร่างกายมนุษย์ จึงได้มีการศึกษาหาสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากแหล่งต่างๆสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านการเกษตร ด้านเภสัชกรรม รวมไปถึงด้านการแพทย์

6.3.3 การประยุกต์ใช้สารสคอพอเลติน

<u>ด้านการเกษตร</u>

เนื่องจากสารชนิดนี้มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อรา แบคทีเรีย จึงได้มีการนำมาปรับใช้ทางด้านการเกษตร เช่น การลดการเกิดโรคราเขียวจากเชื้อ *Penicillium digitatum* บนผลส้ม (Sanzani *et al*., 2014), การยับยั้งการเจริญของไมซีเลียมของเชื้อ *Alternaria alternate* ซึ่งก่อให้เกิดโรคจุดสีน้ำตาลในใบยาสูบ (Sun *et al*., 2014), การยับยั้งการสังเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* ในมันฝรั่ง *(Gnonlonfin et al., 2011)* การยับยั้งการสร้างสปอร์และการเจริญของไมซิเลียมของเชื้อราชนิดต่างๆเพื่อการเก็บรักษาข้าวโพด เช่น *Penicillium* sp., *Aspergillus, Fusarium* (Ba *et al*., 2017) นอกจากนี้ Sun *et al*., 2014 ได้ทดสอบผลของสารสคอพอเลตินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Alternaria alternate* ทั้งแบบการยับยั้งโดยตรง (direct

กรมวิชาการเกษตร

inhibition) และแบบการยับยั้งผ่านการกระตุ้นความต้านทานในพืช (induced resistance) โดยในการทดสอบแบบ direct inhibition บนอาหาร PDA ที่มีสารสคอพอเลตินผสมอยู่ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสคอพอเลตินที่ระดับความเข้มข้น 48 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถลดการเจริญของเชื้อ *Alternaria* เหลือ 68 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปที่ 480 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดการเจริญของเชื้อดังกล่าวเหลือเพียง 14 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้พ่นสารสคอพอเลติน และในการทดสอบการนำไปใช้กระตุ้นความต้านทานในพืช ได้ชักนำให้มีการสร้างความต้านทานในใบยาสูบเป็นเวลา 7 ชั่วโมง โดยทำการแช่ก้านใบยาสูบในสารละลายสคอพอเลตินความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ และ 500 ไมโครโมลาร์ เทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำกลั่น จากนั้นทำการปลูกเชื้อ *Alternaria* แล้วตรวจดูการเกิดแผลหลังจากปลูกเชื้อไปแล้ว 5 วัน พบว่าขนาดของรอยแผลในชุดทดสอบที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสคอพอเลตินทั้งสองระดับความเข้มข้นสามารถลดขนาดของรอยแผลที่เกิดจากเชื้อ *Alternaria* ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้สคอพอเลตินภายนอกสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อ *Alternaria* ในใบยาสูบได้ ซึ่งกระบวนการต้านทานภายในพืช (Plant defense) นั้นเป็นกระบวนการหนึ่งที่พืชใช้ปรับตัวเองเพื่อต่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรค โดยมีวิธีการต่างๆกัน เช่น การทำให้เซลล์ที่กำลังติดเชื้อและเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงตาย เรียกว่าการเกิด hypersensitive cell death โดยกระบวนการนี้จะสังเกตเห็นรอยไหม้สีน้ำตาล (necrosis), การสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค ที่เรียกว่าไฟโตอเล็กซิน, การสร้างโปรตีนขึ้นมาทำลายเชื้อโรค ที่เรียกว่า pathogenesis related-proteins (PR-proteins) เช่น เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส หรือเอนไซม์ไคติเนสเพื่อย่อยผนังเซลล์ของผู้รุกราน, การกักบริเวณเชื้อไม่ให้ลุกลามไปยังเซลล์ข้างเคียงโดยกระบวนการสร้างลิกนินหรือซูเบอรินพอกบริเวณผนังเซลล์พืช และการสร้างผนังเซลล์พืชให้แข็งแรงขึ้น เช่น การสร้างแคลโลส แนวทางการประยุกต์ใช้ความรู้ทางชีวเคมีเพื่อป้องกันโรคพืชจึงนำไปสู่การค้นหาสารกระตุ้นความต้านทานภายในพืช หรืออิลิซิเตอร์ (elicitor) ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นชีวภาพ เช่น เชื้อรา จีนัส *Trichoderma*, *Penicilliumsim pliclassimum*, Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), สารสกัดจากสาหร่าย หรือตัวกระตุ้นเคมี เช่น Acibenzolar-S-methyl (ASM), β-Aminobutyric acid (BABA), Phosphite, Probenazole, Salicylic acid (SA) หรือตัวกระตุ้นทางกายภาพ เช่น การใช้อุณหภูมิสูงหรือต่ำ การใช้รังสีแกมม่า หรือการกระตุ้นด้วยแสงยูวี

นอกเหนือจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยตรงแล้วสารสคอพอเลตินยังมีอีกคุณสมบัติหนึ่งคือการเป็นสารต้านการเกิดอนุมูลอิสระ โดยจะทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างจากกระบวนการตอบสนองอย่างรวดเร็ว (Hypersensitive response, HR) เมื่อพืชถูกรุกราน ซึ่งโดยทั่วไปเมื่อถูกบุกรุก พืชจะตอบสนองโดยการสร้างสารเคมีขึ้นมาต้านผู้บุกรุก เช่น การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ ไนตริกออกไซด์ ฯลฯ ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตาม ผลของกิจกรรมที่เกิดขึ้นจะก่อให้เกิดการสะสมของอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสารที่มี

พิษต่อเซลล์พืชและส่งผลให้เซลล์พืชในบริเวณนั้นเกิดการถูกทำลายไปด้วย ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระที่พืชสร้างขึ้นจึงทำหน้าที่ในการช่วยลดพิษภายในตัวพืชไม่ให้เซลล์พืชถูกทำลาย (จีระภา, 2551)

<u>ด้านอื่นๆ</u>

สารสคอพอเลตินมีการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการแพทย์เนื่องจากมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อก่อโรคในคน เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella typhi* (Acharya *et al*., 2013) นอกจากนี้การใช้ประโยชน์จากสารชนิดนี้พบว่ามีการรายงานอย่างกว้างขวาง เช่น การสกัดและนำสารชนิดนี้ไปรักษาโรคความดันโลหิตสูง ควบคุมระดับคอเลสเตอรอล และ LDL รักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด และรักษาอาการผิดปกติของระบบประสาท (Mogana *et al*., 2013, Das *et al.,* 2014) การใช้เป็นสารต้านการเกิดเนื้องอก ต้านการเกิดไทรอยด์ (DAS, 2014) การต้านอนุมูลอิสระ การต้านเชื้อจุลินทรีย์ การต้านการอักเสบของไขสันหลัง การป้องกันโรคตับ (Taguchi *et al.* 2001) การต้านเชื้อรา การต้านฮีสตามีน การต้านไวรัส และการลดความดันโลหิตสูงโดยการขยายหลอดเลือด (Tanton, 2008) ซึ่งรายงานการศึกษาและประยุกต์ใช้สารชนิดนี้บ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญและคุณค่าในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆได้หลากหลายโดยสารสคอพอเลตินนี้มีแหล่งกำเนิดจากพืช ดังนั้นคุณประโยชน์ของการศึกษาปริมาณสารชนิดนี้ในพืชที่มีแนวโน้มจะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการสกัดสารสคอพอเลตินก็จะก่อให้เกิดการเพิ่มทางเลือกในการสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรอีกทางหนึ่งด้วย

7. วิธีดำเนินการ :

<u>สิ่งที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. ผลยอบ้าน
2. คอลัมน์แก้ว
3. กล่องแสงยูวี (UV-box)
4. แผ่น TLC ซิลิกาเจล แบบ normal-phase
5. เครื่องมือตรวจวิเคราะห์ทางกายภาพ เช่น เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เครื่อง NMR และเครื่อง FTIR
6. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีสำหรับทำการแยกและวิเคราะห์สาร

<u>วิธีการ</u>

สกัดสารสคอพอเลตินบริสุทธิ์ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Napiroon *et al.,* 2018 โดยนำผลยอแห้งที่บดละเอียดแล้ว 200 กรัมมาสกัดด้วย 95% เอทานอล ปริมาตร 600 มิลลิลตร สกัดโดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที วันละ 6 ชั่วโมง เก็บสลับกับวางทิ้งไว้ในที่มืด เก็บส่วนสารละลายใสที่ได้ในวันที่ 2 และทำการสกัดซ้ำอีก 2 รอบโดยใช้ 95% เอทานอล ในการสกัด นำสารละลายใสที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 รอบมารวมกัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไประเหยไล่ตัวทำละลายออกด้วยด้วยเครื่อง evaporator จนได้สารสกัดเอทานอลที่มีลักษณะเป็น semi-solid สีน้ำตาลดำ นำไปชะแยกสารชนิดอื่นที่ไม่มีขั้วออกด้วยเฮกเซน จากนั้นนำสารสกัดส่วน

กรมวิชาการเกษตร

ที่เหลือจากการชะด้วยเฮกเซนบดรวมกับผงซิลิกาอัตราส่วน 1:1 W/W เพื่อให้จับกันแน่นเป็นผง นำผงดังกล่าวไปแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกาในอัตรา ผงตัวอย่าง 50 กรัม ต่อคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกา 225 กรัม (ตัวอย่าง 25 กรัมต่อซิลิกา 250 กรัม) ทำการชะแบบ gradient ด้วยสารละลายเฟสเคลื่อนที่ตั้งแต่ 0-60% เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน โดยเพิ่มความเข้มของเอทิลอะซิเตทขึ้นทีละ 10% และเก็บสารที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ fraction ละ 50 มิลลิลิตร นำสารที่ชะออกจากคอลัมน์มาทดสอบด้วยเทคนิค TLC (ในขั้นตอนนี้ได้ปรับมาใช้การทดสอบสารบนแผ่นซิลิกาเจลชนิด normal-phase และปรับใช้ระบบตัวพาเป็น เอทิลอะซิเตท:เฮกเซน อัตราส่วน 50:50 เนื่องจากสารที่ออกจากคอลัมน์ไม่ได้ถูกรบกวนจากสารสีในปริมาณที่มีผลต่อการตรวจการเรืองแสงของสารเป้าหมาย) จากนั้นทำการรวม fraction ที่พบว่ามีสคอพอเลติน วัดปริมาณและบันทึกลักษณะสารที่ได้ นำไปตรวจวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR และวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นด้วยเทคนิค FTIR เปรียบเทียบกับสารสคอพอเลตินมาตรฐานซึ่งสารสคอพอเลตินที่แยกได้นี้จะนำไปใช้สำหรับการทดลองศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพในการทดลองลำดับต่อไป

<u>การบันทึกข้อมูล</u>: -ปริมาณสคอพอเลตินบริสุทธิ์ต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ในพืชที่คัดเลือกว่ามีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อการสกัดสารชนิดนี้

-ลักษณะของสารบริสุทธิที่ได้ และ รูปแบบโครมาโตแกรมจากการนำสารที่สกัดได้ และสารที่แยกผ่านคอลัมน์ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR และ FTIR เพื่อตรวจสอบสูตรโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชั่นของสารที่ได้

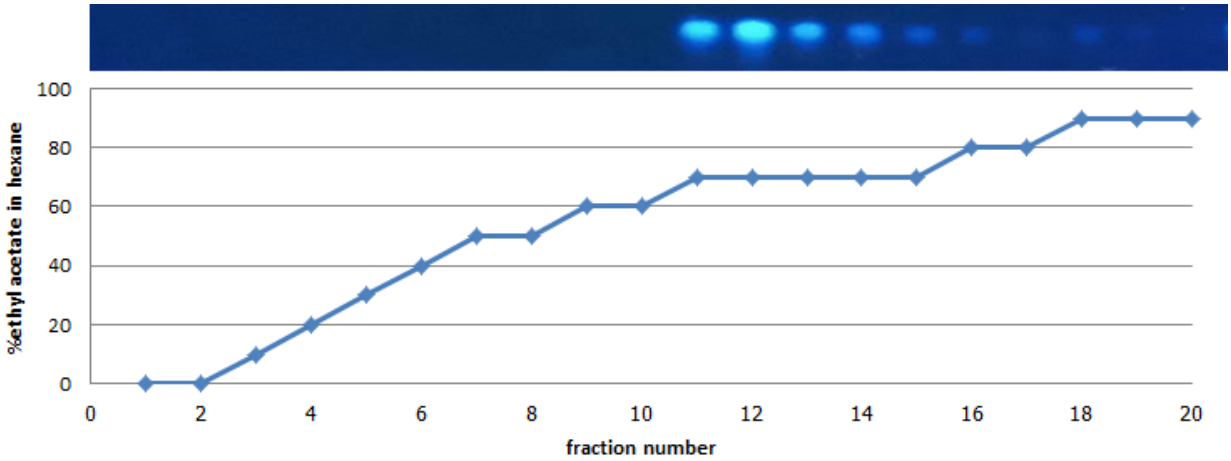
<u>ระยะเวลาในการดำเนินการ</u>: เริ่มต้นตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2563 รวม 2 ปี

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

กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

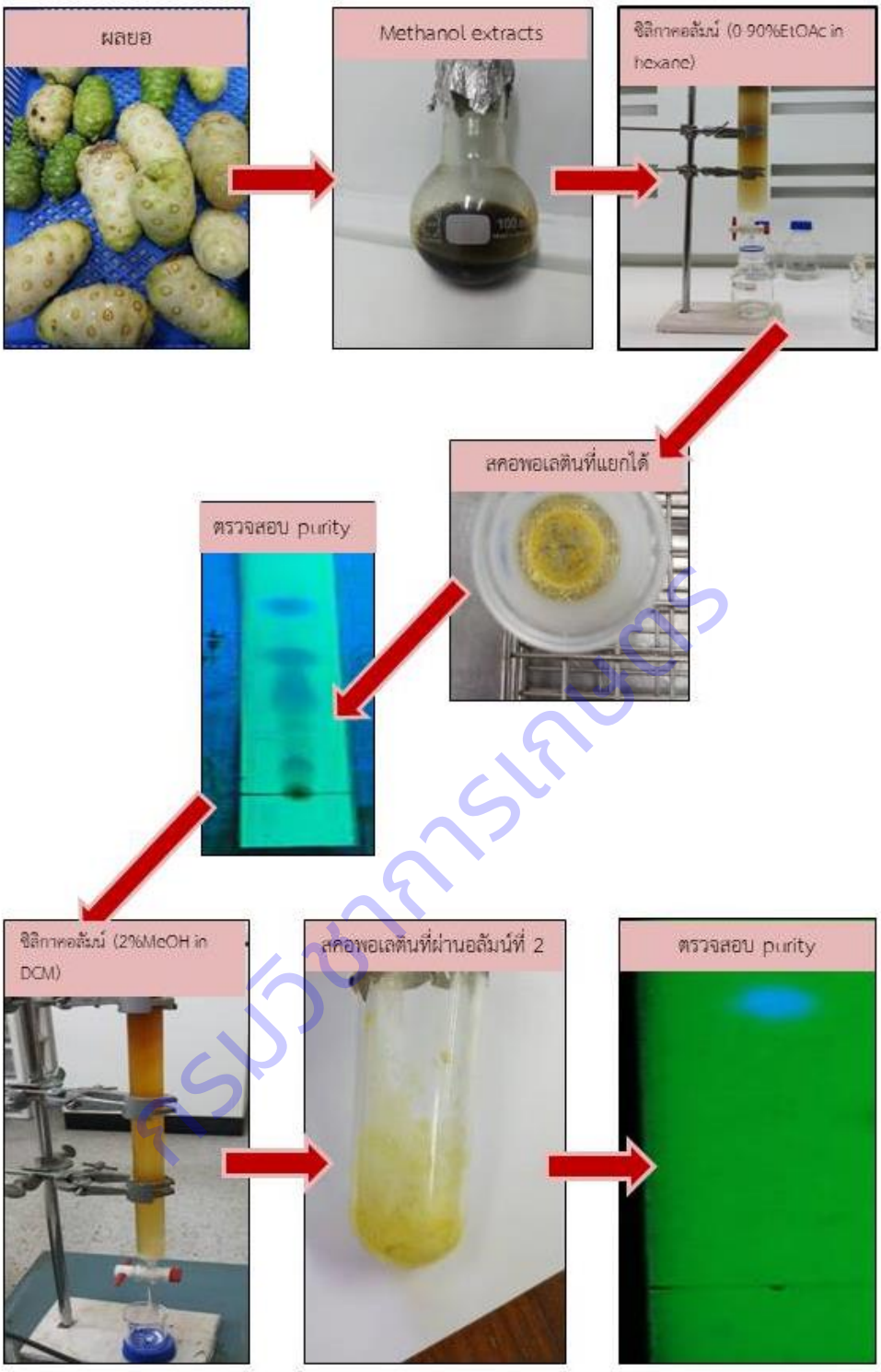
ในการสกัดผลยอบ้าน เมื่อนำมาสกัดตามขั้นตอนจะได้สารสกัดเอทานอลมีลักษณะเป็น semi-solid โดยมีส่วนผสมของสารส่วนที่ไม่มีขั้วอยู่ จึงเลือกใช้เฮกเซนเป็นตัวชะเพื่อแยกส่วนดังกล่าวออกไปก่อน ส่วนที่เหลือได้เป็นสารสกัดหยาบ ตั้งชื่อเป็น M2 จากนั้นนำส่วน M2 มาบดผสมกับซิลิกาแล้วนำไปแพ็ครวมกับคอลัมน์ซิลิกา ทำการชะด้วยเอทิลอะซิเตทในเฮกเซนโดยไล่จากขั้วต่ำไปยังขั้วสูงพบว่าความเข้มข้นของตัวชะขณะที่สารเริ่มออกคือที่ 60 เปอร์เซ็นต์เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 เปรียบเทียบปริมาณสคอพอเลตินจาก fraction ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ซิลิกาด้วยสารละลาย 0-90% เอทิลอะซิเตทในเฮกเซนโดยวิธี TLC

กรมวิชาการเกษตร

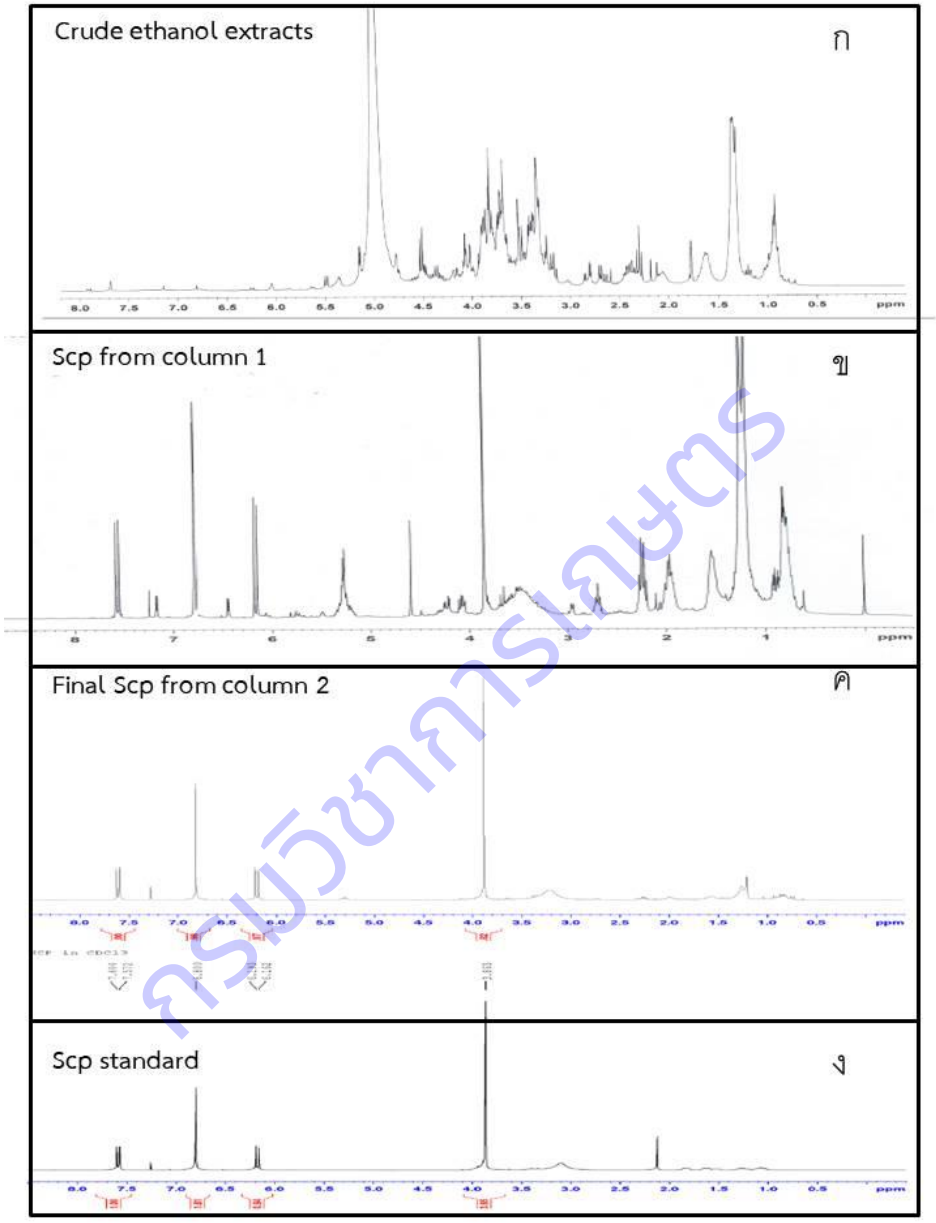
ในลำดับการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ซิลิกา ได้ปรับใช้เทคนิค TLC ชนิด normal phase และเปลี่ยนระบบการชะจากเดิมใช้เมทานอล:น้ำ (75:25) ซึ่งตรวจพบการแยกของสารเพียงแถบเดียวในตำแหน่งตรงกับสารมาตรฐาน เป็นระบบที่แยกด้วย 2% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน พบว่าปรากฏแถบของสารชนิดอื่นๆดังรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าสารสคอพอเลตินที่แยกได้จากคอลัมน์นี้ยังคงเหลือสารอื่นปนเปื้อนอยู่จึงยังเป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์ มีความจำเป็นต้องทำการแยกสารสคอพอเลตินครั้งที่ 2 โดยแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกาและเปลี่ยนระบบตัวทำละลายใหม่เพื่อให้ได้สคอพอเลตินบริสุทธิ์สำหรับศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ซึ่งในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ได้ดำเนินการวิเคราะห์โดยการแยกสารที่ได้บนแผ่น TLC ชนิด normal phase และใช้สารละลาย 2% เมทานอลในไดคลอโรมีเทนเป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยกระบวนการสกัดและแยกสารสคอพอเลตินให้บริสุทธิ์แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 ขั้นตอนการแยกและทดสอบความบริสุทธิ์ของสารสคอพอเลตินจากผลยอ

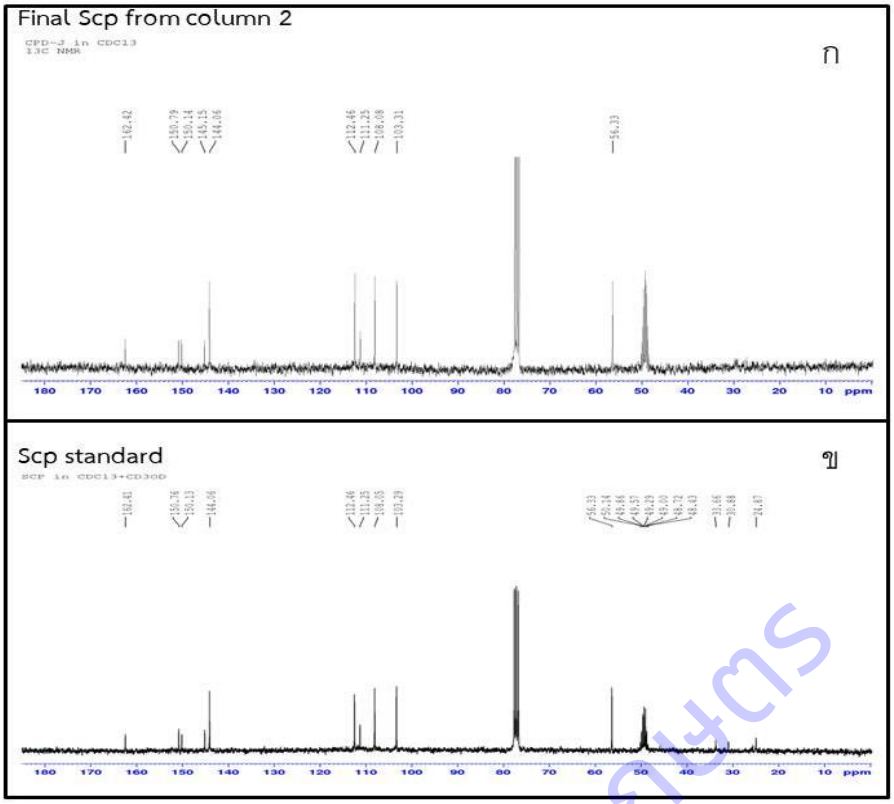
จากการนำสารลักษณะเป็นผงสีเหลือง ที่แยกได้จากคอลัมน์ที่ 2 ไปทดสอบด้วยวิธี TLC พบว่าเหลือสารเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้แสงยูวีเพียงแถบเดียวในตำแหน่งตรงกับสารสคอพอเลติน จึงดำเนินการตรวจสอบ

โครงสร้างของสารที่แยกได้ด้วยเทคนิค NMR ^{1}H และ ^{13}C เทียบกับสารมาตรฐานสคอพอเลตินแสดงดังรูปโครมาโตแกรมที่ 4 และ 5 ตามลำดับ รวมทั้งตรวจสอบหมู่ฟังก์ชั่นของสารที่สกัดได้โดยเทคนิค FTIR เปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของสารสคอพอเลตินมาตรฐาน ผลดังรูปที่ 6

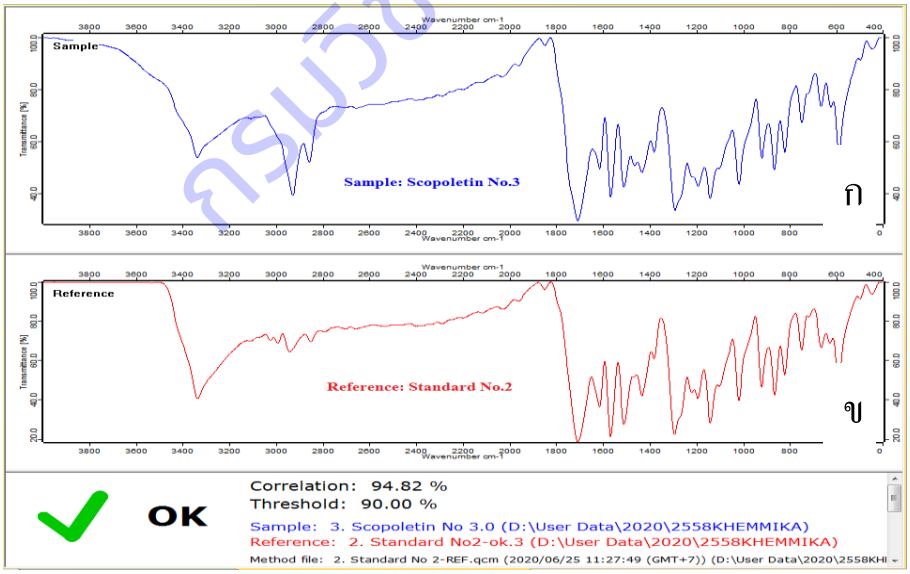


กรมวิชาการเกษตร

รูปที่ 4 ^{1}H-NMR สเปกตรัม ของสารสกัดหยาบเอทานอล M2 (ก), สารสกัดที่แยกผ่านคอลัมน์ที่ 1 โดยชะด้วยระบบเอทิลอะซิเตทในเฮกเซน (ข), สารสกัดที่แยกผ่านคอลัมน์ที่ 2 โดยชะด้วยระบบ 2% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน (ค) และ สารสคอพอเลตินมาตรฐาน (ง)



รูปที่ 5 ^{13}C-NMR สเปกตรัม ของสารสกัดที่แยกผ่านคอลัมน์ที่ 2 โดยชะด้วยระบบ 2% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน (ก) และ สารสคอพอเลตินมาตรฐาน (ข)



รูปที่ 6 FTIR สเปกตรัม ของของสารสกัดที่แยกผ่านคอลัมน์ที่ 2 โดยชะด้วยระบบ 2% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน (ก) และ สารสคอพอเลตินมาตรฐาน (ข)

กรมวิชาการเกษตร

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การทดลองนี้สามารถสกัดและทำบริสุทธิ์สารสคอพอเลตินได้โดยใช้การแยกผ่านคอลัมน์ 2 ครั้ง โดยก่อนการแยกทำการแยกส่วนสารอื่นๆที่ไม่มีขั้วออกก่อนโดยใช้เฮกเซน จากนั้นแยกผ่านคอลัมน์ซิลิกาที่ชะด้วย 0-60% เอทิลอะซิเตทในเฮกเซน แล้วทำการแยกอีกครั้งผ่านคอลัมน์ซิลิกาที่ชะด้วย 2% เมทานอลในไดคลอโรมีเทน ซึ่งสารที่ได้นี้เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค TLC (รูปที่ 3) NMR (รูปที่ 4 และ 5) และ FTIR (รูปที่ 6) เปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานสคอพอเลติน มีค่าความสอดคล้องกัน 94.82 % (รูปที่ 6) จึงยืนยันได้ว่าสารบริสุทธิ์ที่สกัดได้คือสารสคอพอเลติน ซึ่งจะนำไปใช้สำหรับการสกัดสารดังกล่าวออกมาเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. มีการนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการผลิตสารสกัดจากพืชที่มีศักยภาพและหาได้ง่ายเพื่อใช้ในการป้องกันโรคพืชที่เกิดขึ้นในแปลงได้ด้วยตนเอง นอกจากนี้ผลสำเร็จของงานจะช่วยยกระดับมูลค่าของพืชบางชนิดให้สูงขึ้นได้ โดยจะก่อให้เกิดทางเลือกใหม่ของรายได้จากการนำพืชที่มีศักยภาพไปจำหน่ายสำหรับเป็นวัตถุดิบในงานวิจัยต่อยอด

กลุ่มเป้าหมาย คือ เกษตรกรหรือกลุ่มเกษตรกร

2. นำองค์ความรู้เรื่องคุณสมบัติของสารสคอพอเลตินและแหล่งที่มาของสารชนิดนี้ไปต่อยอดในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทั้งเพื่อการลดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด การใช้เป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ หรือปรับใช้ในสาขางานวิจัยที่เกี่ยวข้องอื่นๆ เช่น งานทางด้านการแพทย์ หรืองานสหวิทยาการ อันเป็นการบูรณาการงานวิจัยร่วมกันระหว่างหน่วยงานต่อไปในอนาคต

กลุ่มเป้าหมาย คือ นักวิจัยและนักวิชาการด้านโรคพืชกรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร สถาบันการศึกษา หน่วยงานวิจัยด้านการแพทย์

3. นำองค์ความรู้และแหล่งที่มาของวัตถุดิบไปใช้ในการประยุกต์สร้างสารชีวภัณฑ์ในทางการค้าสำหรับใช้ทดแทนการใช้สารเคมีรวมทั้งใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์อื่นๆตามศักยภาพหรือคุณสมบัติของสารสคอพอเลติน

กลุ่มเป้าหมาย คือ หน่วยงานภาคอุตสาหกรรม

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ช่วยเหลือให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมปฏิบัติงานด้วย

กรมวิชาการเกษตร

12. เอกสารอ้างอิง

จินันทนา จอมดวง และ สุมาฬี พรหมรุกชาติ. 2558. **การใช้ชีวภัณฑ์ทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดโรคเพื่อเพิ่มผลผลิตและลดต้นทุนในการผลิตข้าวที่ใช้เป็นวัตถุดิบอาหารเสริมสุขภาพ.**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

จีระภา ชัยวงศ์. 2551. **เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินและการสลายสคอพอลิตินในใบและเซลล์แขวนลอยยางพาราที่ถูกกระตุ้นโดยเชื้อรา.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ณัชชา ลูกรักษ์ และ ดุสิต อธินุวัฒน์. 2556. **ปัญหาและอุปสรรคในการปรับเปลี่ยนเพื่อการผลิตพืชผักอินทรีย์ของเกษตรกรจังหวัดราชบุรีที่ผ่านการอบรมโครงการพัฒนาระบบเกษตรอินทรีย์.**Thai Journal of Science and Technology.*ปีที่ 2. ฉบับที่ 2.*

มานะ กาญจนมณีเสถียร, อัจฉรา เพ็งหนู, ฤดีกร วิวัฒนปฐพี และ วานิด รอดเนียม. 2556. **การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์และการพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคพืชที่ปลูกในระบบไฮโดรโพนิกส์.** รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยศิลปากร.

พันศักดิ์ จิตสว่าง, วิลาวรรณ์ เชื้อบุญ, ดุสิต อธินุวัฒน์, 2015. **เทคโนโลยีการจัดการโรคพืชในระบบการผลิตข้าวอินทรีย์**. Thai Journal of Science and Technology 4, 272–285.

ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี, อภิรัชต์ สมฤทธิ์, ธารทิพย ภาสบุตร, 2555. **การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช.** รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล, รุ่งนภา ก่อประดิษฐ์สกุล และ ธารทิพย ภาสบุตร. 2542. **การพัฒนาสารออกฤทธิ์จากว่านน้ำเพื่อใช้ควบคุมโรคผลเน่าของมะม่วงเพื่อการส่งออก**.รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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.

กรมวิชาการเกษตร

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.

Anthon, GE. and Barrett, DM. 2001.**Colorimetric Method for the Determination of Lipoxygenase Activity.**Journal of agricultural and food chemistry. 49, 32–37.

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.

Beyer, W.F., Fridovich, I. 1987.**Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions**. Analytical biochemistry. 161, 559–566.

Bradford, M.M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**.Analytical biochemistry. 72, 248–254.

Brennan, T., Frenkel, C. 1977.**Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear.** Plant Physiology 59, 411–416.

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

DAS, M. 2014. **Evaluation of the Laxative Effects of Methanolic Extract of *Spilanthes acmella***. East West University.

Ederli, L., Madeo, L., Calderini, O., Gehring, C., Moretti, C., Buonaurio, R., Paolocci, F., Pasqualini, S. 2011. **The Arabidopsis thaliana cysteine-rich receptor-like kinase CRK20 modulates host responses to *Pseudomonas syringae*pv. tomato DC3000 infection**. Journal of plant physiology. 168, 1784–1794.

Gnonlonfin, G. j. b., Adjovi, Y., Gbaguidi, F., Gbenou, J., Katerere, D., Brimer, L., Sanni, A. 2011. **Scopoletin in Cassava Products as an Inhibitor of Aflatoxin Production**. Journal of

Food Safety. 31, 553–558. doi:10.1111/j.1745-4565.2011.00334.x

Güell, I., Cabrefiga, J., Badosa, E., Ferre, R., Telleda, M., Bardaji, E., Planas, M., Feliu, L. 2011. **Improvement of the Efficacy of Linear Undecapeptides against Plant-Pathogenic Bacteria by Incorporation of D-Amino Acids.** Applied and Environmental Microbiology. 2667-2675.

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

Hutadilok-Towatana, N., Chaiyamutti, P., Panthong, K., Mahabusarakam, W., Rukachaisirikul, V. 2006. **Antioxidative and free radical scavenging activities of some plants used in Thai folk medicine.**Pharmaceutical biology. 44, 221–228.

Jeandet, P., Hébrard, C., Deville, M.-A., Cordelier, S., Dorey, S., Aziz, A., Crouzet, J. 2014.**Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health.**Molecules. 19, 18033–18056.

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.

Kuc, J. 1995. **Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants**. Annual review of phytopathology. 33, 275–297.

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.

Mogana, R., Teng-Jin, K., Wiart, C. 2013.**Anti-Inflammatory, Anticholinesterase, and Antioxidant Potential of Scopoletin Isolated from *Canariumpatentinervium*Miq. (BurseraceaeKunth)**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.2013, e734824. doi:10.1155/2013/734824.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Muller, K.O., and Borger, H. 1940. **Experimentelleuntersuchungenuber die Phytophthora-resistenzerkartoffel**. Arb. Biol. Reichsasnstalt. Landw.Forstw. Berlin 23, 189-231.

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.

Santos, T., Villanueva, J.R., Nombela, C. 1977.**Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* beta-glucanases**.Journal of bacteriology 129, 52–58.

Sanzani, S.M., Schena, L., Ippolito, A. 2014. **Effectiveness of phenolic compounds against citrus green mould**. Molecules. 19, 12500–12508.

Shannon, L.M., Kay, E., Lew, J.Y. 1966. **Peroxidase isozymes from horseradish roots I. Isolation and physical properties.**Journal of Biological Chemistry. 241, 2166–2172.

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.

Sun, H., Wang, L., Zhang, B., Ma, J., Hettenhausen, C., Cao, G., Sun, G., Wu, J., Wu, J. 2014. **Scopoletin is a phytoalexin against *Alternaria alternata* in wild tobacco dependent on jasmonate signalling**. Journal of experimental botany. 65, 4305–4315.

Suryati, Efdia, M., Astuti, S.H. and Aziz, H. 2016.**Isolation of scopoletin fromsubang-subang plants (*Spilanthes paniculata* Wall. ex Dc.)**. Der Pharma Chemica. 8(9), 99-104.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Taguchi, G., Yoshizawa, K., Kodaira, R., Hayashida, N., Okazaki, M. 2001**. Plant hormone regulation on scopoletin metabolism from culture medium into tobacco cells**. Plant science. 160, 905-911.

Tanton DW. **A Drug-Free Approach to Healthcare** - 2009 Revised Edition: Soaring Heights Publishing; 2008. 356 p.

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.

Torres, A.M., Mau-Lastovicka, T., Rezaaiyan, R. 1987. **Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 35, 921–925.

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.

Zuker, A.P., Buck, B., McGrory, J.B. 1968. **Structure of O_{16}**. Physical Review Letters.21, 39.

13. ภาคผนวก : เป็นส่วนที่ให้รายละเอียดเพิ่มเติม ซึ่งไม่จำเป็นต้องแสดงไว้ในเนื้อหาของรายงาน เช่น สูตร วิธีคำนวณ ตารางการบันทึกข้อมูลภาพ แสดงเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย แบบสำรวจข้อมูล เป็นต้น ส่วนนี้จะมีหรือไม่มีก็ไม่ทำให้เนื้อหาของรายงานขาดความสมบูรณ์

กรมวิชาการเกษตร

หมายเหตุ

*** ให้แนบไฟล์รูปภาพประกอบด้วย เพื่อนำไปจัดทำรูปเล่มต่อไป**

กรมวิชาการเกษตร