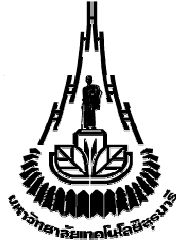


รหัสโครงการ SUT3-302-50-24-28



รายงานการวิจัย

พันธุ์ สารออกฤทธิ์สำคัญ และผลของสารสำคัญในกวาวเครือขาว
(The varieties, phytochemicals and their effects in White Kwao Krua)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

พันธุ์ สารออกฤทธิ์สำคัญ และผลของสารสำคัญในกวาวเครือขาว
(The varieties, phytochemicals and their effects in White Kwao Krua)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ยุวดี มานะเกษม

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ดร. ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล

ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น กรมวิชาการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550-2552

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2553

บทคัดย่อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้รวบรวมกวาวเครือขาว โดยเก็บเมล็ดของต้นที่รวบรวมมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และได้ทำการจำแนกสายพันธุ์ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD 3 ซ้ำ สุ่มซ้ำละ 12 ต้น จำนวน 36 สายต้น ใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR-Touchdown PCR เพื่อการจำแนกสายพันธุ์ ผลการวิเคราะห์ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ จำนวน 7 ลักษณะ วิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มโดยใช้ principle component analysis (PCA) พบว่า กวาวเครือขาวมีการแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายต้นที่ 34 มีลักษณะเด่นคือ ใบมีขนาดใบเล็ก กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 23 สายต้น มีลักษณะเด่นคือ ใบรูปรี ฐานใบแหลม และปลายใบเรียวแหลม และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 12 สายต้น ลักษณะเด่นคือ ใบรูปไข่ ฐานใบมน และปลายใบเป็นติ่งแหลม จากการจำแนกด้วย ISSR-Touchdown PCR ใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 41 ไพรเมอร์ พบว่าตรวจจับแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 355 ตำแหน่ง คิดเป็น 8.66 ตำแหน่งต่อไพรเมอร์ มีขนาดของแถบประมาณ 280 bp ถึง 1,550 bp ในจำนวนนี้มีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic) จำนวน 293 ตำแหน่ง คิดเป็น 82.54% ของทั้งหมด และเป็นตำแหน่งที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic) จำนวน 62 ตำแหน่ง คิดเป็น 17.46% มีค่า polymorphism information content (PIC) ระหว่าง 0.0315-0.9779 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 0.4779 และมีค่า No. of effective alleles per locus (N_e) ระหว่าง 1.1250-1.8541 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 1.5544 อัลลีลต่อโลกัส ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม (genetic similarity : GS) ของตัวอย่างทั้งหมดพบว่า มีค่าระหว่าง 0.50-0.86 โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.77 ที่ระดับ GS เท่ากับ 0.56 แยกได้ 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ 34 และสายต้นที่ 7 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยต้นที่เหลือ อีก 34 สายต้น ซึ่งกลุ่มที่ 2 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยที่ GS เท่ากับ 0.69 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่า ความแปรปรวนที่พบน่าจะเกิดจากภายในกลุ่ม ทุกต้นมีพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน และคาดว่าอาจเกิดจาก 5 แหล่งพันธุกรรมจากเมล็ดภายในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จากการทดลองนี้ พบว่าการใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์กวาวเครือขาวได้ และให้ผลสอดคล้องกับความแตกต่างของลักษณะภายนอก

พิวรารินและจันิสทีอินเป็นสารไอโซฟลาโวนอยด์ที่พบมากในหัวกวาวเครือขาว ทำให้สารสกัดจากพืชดังกล่าวมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีผลในการขยายหลอดเลือด และอาจลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานได้ ได้ทำการวิจัย 3 ชุดการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในเดือนมกราคม 2549 ถึง เดือนมีนาคม 2552 เพื่อเพิ่มปริมาณพิวรารินและจันิสทีอิน โดยใช้สารสกัดที่เหมาะสม และเพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากกวาวเครือขาวต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน ชุดการทดลองที่ 1 ใช้สารไลโคซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ อย่างละ 5 ความเข้มข้น เพื่อชักนำฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระในหัวกวาวเครือขาว ที่ปลูกใน growth chamber ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์จำนวน 4 ซ้ำ เริ่มชักนำเมื่อกวาวเครือขาวอายุ 4 เดือน (ทั้งนี้เพราะกวาวเครือขาวเริ่มสะสมสารสำคัญที่อายุ 4 เดือน) จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน เก็บข้อมูลหลังสิ้นสุดการชักนำที่ 1 วัน 7 วัน 15 วันและ 30 วัน พบว่าที่เวลา 7 วันหลังการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้สารสำคัญในหัวกวาวเครือขาวมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 49.9 เปอร์เซ็นต์และมี FRAP values เท่ากับ 6.05 ไมโครโมลของ Fe^{2+} /กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างจากทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและที่ 15 วันหลังการชักนำด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตรและคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้สารสำคัญในหัวกวาวเครือขาวมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 54.7 และ 49.9 เปอร์เซ็นต์และมี FRAP values เท่ากับ 5.72 และ 6.05 ไมโครโมลของ Fe^{2+} /กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างจากทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชุดการทดลองที่ 2 ใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร กรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตรและคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นสารชักนำเพื่อชักนำปริมาณของพิวรีนีน จินิสทีอินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และปลูกในโรงเรือนวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์และที่ปลูกในแปลงทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก พบว่าการใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ปริมาณของพิวรีนีนและจินิสทีอินในหัวของกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนมีปริมาณสูงที่สุดและแตกต่างจากทรีตเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีพิวรีนีนเท่ากับ 423 และ 386 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และมีจินิสทีอินเท่ากับ 22.6 และ 22.4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของพิวรีนีนและจินิสทีอินเมื่อชักนำในต้นที่ปลูกในแปลงทดลอง ขณะที่การใช้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ปลูกในโรงเรือน และปลูกในแปลงทดลองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2,482 1,050 และ 1,026 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมี FRAP value เท่ากับ 4.55 4.73 และ 6.69 ไมโครโมล ของ Fe^{2+} /กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ชุดการทดลองที่ 3 นำหัวกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และชักนำด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร จากการทดลองที่สอง ที่มีพิวรีนีนสูงที่สุดมาสกัดด้วย เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้ป้อนหนูแรทพันธุ์วิสตาร์อายุ 10 สัปดาห์ ทั้งในหนูปกติและหนูเป็นเบาหวานเพื่อเปรียบเทียบผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดกับกลุ่มควบคุม พบว่าสารสกัดในกวาวเครือขาวไม่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงเทียบพลาสมาทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน แต่

มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 30 วัน โดยในวันที่ 14 ของการป้อนสารสกัดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ 28.95 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 21 ลดได้ 26.37 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวไม่มีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและเนื้อเยื่อตับของหนูเบาหวาน จากการศึกษาทดลองทำให้ได้สารชักนำที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของ พิวรารีนและจีนิสทีอินคือการใช้ ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร และได้ข้อมูลเบื้องต้นว่าสารสกัดจากกวาวเครือขาวขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทที่เป็นเบาหวานได้ตั้งแต่วันที่ 14 ของการป้อนอย่างต่อเนื่อง

Abstract

Seeds of White Kwao Krua (WKK) [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] were collected from Prachuab Khiri Khan were planted and propagated in the farm of Suranaree University of Technology, however, their genetic backgrounds were ambiguous. Thirty six clones of WKK in the same age were sampled for classification using 7 botanical characteristics and DNA fingerprint by ISSR-Touchdown PCR technique. The relationship of the 7 botanical characteristics using principle component analysis (PCA) showed the WKK clones fell into 3 groups. The first group was clone number 34 which was distinguished from the other groups by its small leaf size. The second group consisted of 23 clone with elliptic leaf shape, acute leaf base, and acuminate leaf base, and cuspidate leaf apex. The ISSR-Touchdown PCR technique with 41 primers detected 355 loci of DNA with an average of 8.66 loci per primer. The sizes of DNA ranged between 280 bp to 1,550 bp. Two hundred ninety three loci exhibited polymorphism information content (PIC) was between 0.0315-0.9779 (average 0.4779) and number of effective alleles per locus (N_e) ranged between 1.1250-1.8541 (average 1.5544). The genetic similarity (GS) of WKK ranged between 0.50-0.86 (average 0.77). At the GS of 0.56 from cluster analysis, the WKK varieties could be divided into 2 major groups. The first group comprised of clone number 34, and the second group could be further divided into 2 subgroups at GS of 0.69. Population structure revealed that variation of WKK resulted from segregation tithing groups. None of the WKK clones was identical in genetic, and they were expected to be driven from 5 genetic sources. These result showed that applying of the ISSR-Touchdown PCR technique could be used to classify WKK efficiently and the result corresponded to the classification using botanical characteristics.

Puerarin and genistein are isoflavonoids in the tuberous roots of WKK. WKK contains estrogen-like substances. It contains antioxidants and has vascular relaxation properties. It was decided to determine whether it also has a hypoglycemic effect on diabetic rats. Three sets of experiments were conducted at Suranaree University of Technology from January 2006 to March 2009. These were to study the antioxidant activities and to increase the amount of puerarin and genistein in the tuberous roots of WKK through the use of elicitors. Furthermore, whether the crude extract of WKK has a hypoglycemic effect on diabetic rats was also investigated. The first set of experiments was set up as a complete randomized design with five concentrations of each

elicitor (chitosan, salicylic acid and CuCl_2) which were applied 4 times over one month to WKK grown in a growth chamber. The experiment had 4 replications. The data were collected at 1, 7, 15 and 30 days after the final application of the elicitors. The results showed that all concentrations of elicitors used could promote statistically significant differences in the antioxidant activities of WKK. Salicylic acid at 100 mg/L gave the highest antioxidant activities [% inhibition by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method = 58.3%, ferric reducing antioxidant power (FRAP) values = $5.89 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g dw}$] at 7 days after application. Chitosan at 1,000 mg/L and CuCl_2 at 200 mg/L gave the highest antioxidant activities (% inhibition = 54.7 and 49.9% by the DPPH method) and had FRAP values = 5.72 and $6.05 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g dw}$ at 15 days after application. In the second set of experiments, chitosan at 1,000 mg/L, salicylic acid at 100 mg/L, and CuCl_2 at 200 mg/L were used together to induce and to increase the amount of puerarin and genistein, and to increase antioxidant activity in WKK grown in the growth chamber, in the greenhouse, and in the field. The experiments in the growth chamber and in the greenhouse were set up as complete randomized designs with 8 treatments and 4 replications. The experiment in the field was set up as a randomized complete block design with 8 treatments and 3 replications. The result showed that WKK that were treated with chitosan at 1,000 mg/L plus CuCl_2 at 200 mg/L gave the highest amount of puerarin and genistein when grown in the growth chamber and in the greenhouse. The result for this treatment was significantly different from other treatments. The puerarin content after this treatment was 423 and $386 \mu\text{g/g dw}$, and the genistein content was 22.6 and $22.4 \mu\text{g/g dw}$. However, there were no statistically significant differences in the amount of puerarin and genistein for WKK that was grown in the field. The treatment of chitosan at 1,000 mg/L, plus salicylic acid at 100 mg/L, plus CuCl_2 at 200 mg/L, gave the highest antioxidant activities for the WKK that were grown in the growth chamber, in the greenhouse, and in the field. The IC_{50} results for these treatments were 2,482, 1,050 and $1,026 \mu\text{g/ml}$ by the DPPH method, and the FRAP values were 4.55, 4.73 and $6.69 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g dw}$, respectively. The third set of experiments involved WKK that were grown in a growth chamber with treatment using chitosan at 1,000 mg/L plus CuCl_2 at 200 mg/L, which gave the highest puerarin content from the second experiment. Samples from WKK grown under these conditions were used to test the hypoglycemic effect in normal rats and in diabetic rats. Those WKK were extracted with 80% ethanol, and the crude extract was given to 10 week old rats, both normal and diabetic. The results showed that the crude extract could not reduce the blood sugar level in normal and acute diabetic rats. But, after repeated

daily oral administration in chronic diabetic rats for 30 days, the crude extract statistically significantly reduced blood sugar levels compared to those of the control group by 28.92% and 26.37% on days 14 and 21. Furthermore, histopathology findings showed no evidence of lesions related to the extract toxicity. Therefore, chitosan at 1,000 mg/L plus CuCl_2 at 200 mg/L could increase the amount of puerarin and genistein in WKK. In addition, the WKK crude extract administered orally daily at 100 mg/kg body weight to chronic diabetic rats showed an hypoglycemic effect from day 14.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ใช้งบประมาณสนับสนุนการทำวิจัยนี้ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือในการวิจัย ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สนับสนุนพื้นที่ปลูกกวางเครือ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น กรมวิชาการเกษตร สนับสนุนเครื่องมือบางชนิดในการวิจัยและขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยทุกท่านที่ตั้งใจทำงานวิจัยนี้อย่างตั้งใจจริง

ขอขอบคุณ

รองศาสตราจารย์ ดร.ชวดี มานะเกษม

หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

บทที่	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ข
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	จ
สารบัญ	๗
สารบัญตาราง	ฐ
สารบัญตารางภาคผนวก	ฒ
สารบัญภาพ	ณ
สารบัญภาพภาคผนวก	ด
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
1.5 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้	5
2 ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 กวาวเครือขาว	6
2.1.1 นิเวศวิทยา	6
2.1.2 พันธุ์และลักษณะทางพฤกษศาสตร์	6
2.1.3 การเจริญเติบโต	7
2.1.4 สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	8
2.1.5 พิษวิทยาของกวาวเครือขาว	9
2.2 ไอโซฟลาโวนอยด์	9
2.2.1 Puerarin	10
2.2.2 Genistein	11

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
2.3	11
2.3.1	11
2.3.2	12
2.3.3	12
2.3.4	13
2.3.5	13
2.4	15
2.4.1	16
2.4.2	17
2.4.3	18
2.5	19
2.5.1	19
2.5.2	21
3	
3.1	
ชนิดของพืช	23
การจำแนกลักษณะพฤกษศาสตร์	23
การจำแนกด้วยเทคนิค ISSR-Touchdown PCR	24
3.2	
อิสระและการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว	
3.2.1	26
3.2.2	29
3.2.3	29
3.2.4	30

สารบัญ (ต่อ)

บทที่

หน้า

3.3	พิววาริน จินิสทีอิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวางเครือขาวที่ปลูกชักนำด้วยโคโคซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน	
3.3.1	การเตรียมสารชักนำและต้นกวางเครือขาว	30
3.3.2	การสกัดสารจากหัวกวางเครือขาว	32
3.3.3	การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก	32
3.3.4	การตรวจหาฟลาโวนอยด์	33
3.3.5	การหาปริมาณของพิววารินและจินิสทีอินด้วย HPLC	33
3.3.6	ฤทธิ์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH	34
3.3.7	การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP	34
3.3.8	การวิเคราะห์ข้อมูล	35
3.4	สารสกัดกวางเครือขาวกับการลดระดับน้ำตาลในเลือดและผลกระทบต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน	
3.4.1	การเตรียมการทดลอง	35
3.4.2	ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดกวางเครือขาวในหนูแรทที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน โดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)	36
3.4.3	ฤทธิ์ของสารสกัดกวางเครือขาวในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวาน เมื่อให้สารสกัดวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน	36
3.4.4	ผลของสารสกัดกวางเครือขาวต่อเนื้อเยื่อในตับอ่อนและตับของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 30 วัน	37
3.4.5	การวิเคราะห์ข้อมูล	37
4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1	การทดลองที่หนึ่ง การจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวโดยใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR และลักษณะทางพฤกษศาสตร์	
4.1.1	ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์	38

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4.1.2 ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	47
4.1.3 โครงสร้างทางพันธุกรรม.....	54
4.2 การทดลองที่สอง ชนิดและความเข้มข้นของสารชักนำต่อฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระและการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว	
4.2.1 การชักนำด้วยไคโตซาน.....	56
4.2.2 ผลของการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก.....	61
4.3.3 ผลของการชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์.....	64
4.4.4 ผลของสารชักนำต่อการมีอยู่ของจินสทีอินและพิวราริน.....	69
4.3 พิวราริน จินสทีอิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวางเครือขาวที่ถูกชักนำ ด้วย ไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ในสภาพแวดล้อมที่ แตกต่างกัน	
4.3.1 ผลของสารชักนำต่อปริมาณพิวรารินและจินสทีอิน.....	70
4.3.2 ผลต่อปริมาณสารฟีนอลิก.....	73
4.3.3 ผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์.....	74
4.3.4 ผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.....	74
4.3.5 ผลของสารชักนำต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว.....	77
4.4 สารสกัดกวางเครือขาวกับการลดระดับน้ำตาลในเลือดและผลกระทบต่อ เนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน	
4.4.1 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดกวางเครือขาวในหนูแรทที่ มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT).....	81
4.4.2 ฤทธิ์ของสารสกัดกวางเครือขาวในการลดระดับน้ำตาลในเลือด ของหนูแรทเบาหวาน เมื่อให้สารสกัดวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน.....	84
4.4.3 ผลของสารสกัดกวางเครือขาวต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและเนื้อเยื่อตับ ของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 30 วัน.....	87

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5	สรุปผลการทดลอง..... 98
6	บทสรุปและข้อเสนอแนะ 100
รายการอ้างอิง..... 102	
ภาคผนวก	
	ภาคผนวก ก การเตรียม citrate buffer 118
	ภาคผนวก ข การเตรียม Neutral phosphate buffered formalin 119
	ภาคผนวก ค เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา 120

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	9
2.2	12
3.1	27
3.2	34
4.1	40
4.2	41
4.3	43
4.4	45
4.5	49
4.6	55
4.7	55
4.8	56
4.9	71
4.10	72

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.11 สารฟีนอลิกในหัวกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน	73
4.12 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในหัวกวาวเครือขาวหลังถูกชักนำในสภาพการปลูก แตกต่างกัน	75
4.13 ค่า IC ₅₀ ของกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน	76
4.14 FRAP value ของกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน	76
4.15 ผลของสารชักนำต่อน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของกวาวเครือขาว	78
4.16 ผลของสารชักนำต่อสารสกัดหยาบ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)	79
4.17 ผลของสารชักนำต่อการสังเคราะห์แสง (มิลลิโมลาร์/ตารางเซนติเมตรวินาที)	81
4.18 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทปกติที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ ในภาวะการมีกลูโคส ในเลือดสูงในเลือดสูงเฉียบพลัน	82
4.19 เปอร์เซ็นต์ระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันใน หนูปกติที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน	82
4.20 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ ในภาวะที่มี ระดับกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน	83
4.21 เปอร์เซ็นต์ระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน ในหนูเบาหวานในภาวะที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน	84
4.22 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารแต่ละกลุ่มต่อเนื่อง 30 วัน	85
4.23 เปอร์เซ็นต์การลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน	86
4.24 เปอร์เซ็นต์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของแต่ละกลุ่มทดลองเมื่อเทียบกับ ค่าเริ่มต้น (เทียบกับวันที่ 0)	86

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางผนวกที่	หน้า
1 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันที่เหมาะสม หลังชักนำด้วยไคโตซาน	121
2 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว	122
3 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันที่เหมาะสม หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก	123
4 ผลของกรดซาลิไซลิกต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว	124
5 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันที่เหมาะสม หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์	125
6 ผลของคอปเปอร์คลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว	126
7 เปรียบเทียบ peak intensity ของสารอื่น ๆ ที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงกับพิวรีน	127
8 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติตลอดการทดลอง 30 วัน	128
9 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทปกติที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ และมีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน	129
10 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ และมีภาวะกลูโคส ในเลือดสูงเฉียบพลัน	130

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาว 8
2.2	สูตรโครงสร้างของ พิวราริน 10
2.3	สูตรโครงสร้างของ จินีสทีอิน 11
2.4	โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอล 13
2.5	แสดงสารอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล 14
2.6	สารอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ 15
2.7	ตัวอย่างของสิ่งชักนำที่มีผลต่อการผลิตสารในวิธีการสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์..... 16
2.8	โครงสร้างของไคโตซาน 17
2.9	สูตรโครงสร้างของกรดซาลิไซลิกและวิธีการสังเคราะห์ 18
2.10	สูตรโครงสร้างของสเตรปโตโซโทซิน 20
2.11	สูตรโครงสร้างของกลัยเบนคลาไมด์ 21
3.1	ผังแปลงทดลองกวาวเครือขาวที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี..... 24
4.1	เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะของกวาวเครือขาว 46 36 สายต้น คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัด กลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x
4.2	ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยใช้ 47 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ (สีด้านหลังใบ ลักษณะใบ ขนบนส่วนของลำ ต้น ขนที่ฝัก สีของดอก ขนาดของใบ และความยาวก้านช่อดอก) จากการวิเคราะห์ โดย PCA
4.3	เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย 51 ISSR-Touchdown PCR. คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x
4.4	ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกวาวเครือขาว 36 สายต้นโดยการ 52 วิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR จากการวิเคราะห์โดย PCA

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.5	53
<p>แผนโครงแกรมความสัมพันธ์ของกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR- Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x</p>	
4.6	54
<p>ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ จากการวิเคราะห์โดย PCA</p>	
4.7	57
<p>สารฟีนอลิกหลังการชักนำด้วยไคโตซาน</p>	
4.8	58
<p>ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังการชักนำด้วยไคโตซาน</p>	
4.9	59
<p>ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยไคโตซาน</p>	
4.10	60
<p>ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยไคโตซาน</p>	
4.11	62
<p>สารฟีนอลิก ของกวาวเครือขาวที่ชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก</p>	
4.12	62
<p>ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก</p>	
4.13	63
<p>ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก</p>	
4.14	63
<p>ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก</p>	
4.15	65
<p>สารฟีนอลิกหลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์</p>	
4.16	65
<p>ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์</p>	
4.17	67
<p>ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์</p>	
4.18	67
<p>ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์</p>	
4.19	69
<p>TLC โครมาโตแกรมของ พิวารินมาตรฐานและพิวาริน ของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาว</p>	
4.20	70
<p>TLC โครมาโตแกรมของจินิสทีอินมาตรฐานและ จินิสทีอิน ของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาว</p>	
4.21	88
<p>แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลคส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วันของหนูปกติ</p>	

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.22 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลคส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) 89 และ acinous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนู เบาหวานกลุ่มควบคุม	
4.23 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลคส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) 90 และ acinous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วันของหนูเบาหวาน กลุ่มที่ได้รับกลัยเบนคลาไมด์	
4.24 ตับอ่อนของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวางเครือขาว แสดงพยาธิ 91 สภาพของตับอ่อน แสดงไอเลคส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acinous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัด กวางเครือขาว	
4.25 ภาพตัดขวางตับหนูแรทของหนูปกติประกอบด้วยหลอดเลือดดำ (cv) 93 เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E)	
4.26 พยาธิสภาพของตับหนูแรทเบาหวานกลุ่มควบคุมประกอบด้วย 94 หลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E)	
4.27 พยาธิสภาพของตับหนูแรทเบาหวานกลุ่มที่ได้รับกลัยเบนคลาไมด์ 95 ประกอบด้วย หลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่าง แถวของเซลล์ตับ (s) (H&E)	
4.28 พยาธิสภาพของตับหนูแรทเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 96 กวางเครือขาวประกอบด้วยหลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอย ระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E)	

สารบัญญภาพภาคผนวก

	ภาพผนวกที่	หน้า
1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FeSO_4 กับ ผลต่างของ ค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร	131
2	กราฟมาตรฐานของกรดแกลิก	131
3	กราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน	132
4	ต้นกวางเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber	132
5	โรงเรือนที่ใช้ปลูกกวางเครือขาว	133
6	ต้นกวางเครือขาวอายุ 1 ปี ที่ปลูกในแปลงทดลอง	133
7	กราฟมาตรฐานของพิวราริน	134
8	กราฟมาตรฐานของจีนิสทีอิน	134

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et Suvatabandhu) Niyomdham] เป็นพืชสมุนไพรและเป็นพืชสงวนลำดับที่ 8 ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518 (ฉบับที่ 1) ตามประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่ประกาศในราชกิจจานุเบกษา (กรมวิชาการเกษตร, 2548) เพื่อไม่ให้จำนวนที่พบในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็วและอาจสูญพันธุ์ได้ ความต้องการกวาวเครือขาวมีสูงขึ้นใน พ.ศ. 2542 ในประเทศไทยกวาวเครือขาวมักพบในบริเวณพื้นที่ราบเชิงเขา และพื้นที่ลาดชันของเทือกเขาต่างๆ เช่นที่จังหวัดกาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ เชียงใหม่ ตาก เลย ลำปาง และสระบุรี (Dithachaiwong *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลายตามแหล่งที่พบกวาวเครือขาวนำไปสู่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยวิธีใช้โมเลกุลเครื่องหมาย เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Inter Simple Sequences Repeat (ISSR), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), Simple Sequence Repeat (SSR) ในรายงานทั่วไป โมเลกุลเครื่องหมายถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ กวาวเครือขาว Dithachaiwong *et al.* (2005) ใช้ RAPD ซึ่งมีการร่วมกับ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ในการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาวจากแหล่งพันธุ์ต่างๆ 7 แหล่ง ได้แก่ กาญจนบุรี เชียงใหม่ ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เลย ลำปาง และสระบุรี อย่างไรก็ตามการจำแนกโดยใช้ RAPD มีความแตกต่างกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ Jamjanta (1996) ตรวจสอบชนิดของพันธุ์กวาว 5 ชนิด โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์และเทคนิค RAPD แบบแผนของไอโซไซม์ที่บ่งบอกความแตกต่างของกวาวเครือได้ดีที่สุด คือ esterase และ peroxidase ที่น่าสนใจคือแบบแผนของ dendrogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอโซไซม์ สอดคล้องกับ dendrogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD Sittihiphrom (2005) ใช้เทคนิค HAT-RAPD ในการจำแนก กวาวเครือ (*Pueraria* spp.)

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) เป็นเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมายชนิดหนึ่งที่ใช้วิธีพีซีอาร์ในการตรวจสอบ ไพรเมอร์ของ ISSR จะมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำเป็นชุด ซึ่งจะไปจับกับตำแหน่งเบสคู่สมที่มีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำเช่นกัน บนจีโนมของสิ่งมีชีวิต ที่เรียกว่า Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite ตำแหน่งของ SSR กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิต ทำให้ไพรเมอร์จับกับตำแหน่งต่างๆ บนจีโนม ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นมาเป็นบริเวณระหว่าง SSR สองตำแหน่ง เทคนิคนี้จึงชื่อ Inter Simple Sequence Repeat ซึ่งโพลิมอร์ฟิซึมหรือความแตกต่าง เกิดขึ้นจากความแปรปรวน (variation) ของลำดับเบสภายในชิ้นส่วนดีเอ็นเอเช่น

insertion หรือ deletion และการ mutation ของบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าจับ ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เทคนิคนี้คล้ายกลับ RAPD ในส่วนที่ว่าเป็นการสุ่มตำแหน่งต่างๆของจีโนม แต่ ISSR มีความจำเพาะสูงกว่า เนื่องจากลำดับเบสของไพรเมอร์ มีความจำเพาะมากกว่า ไม่ได้มีลำดับเบสสุ่มเหมือนกับ RAPD จึงเป็นเทคนิคที่ทำซ้ำได้สูง (high reproducibility) ส่วนเทคนิค touchdown PCR ช่วยในการเพิ่มความจำเพาะและปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ทำได้โดยลดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ลงทุกๆ รอบพีซีอาร์ การใช้เทคนิค touchdown PCR ร่วมกับ ISSR ทำให้แถบดีเอ็นเอมีความชัดเจนมากขึ้นและง่ายต่อการอ่านผล (Tsumura *et al.*, 1996) UPGMA มีหลักการคือ การใช้หลักการทางสถิติด้วยวิธี clustering algorithms โดยนำข้อมูลทาง phenetics ซึ่งเป็นอนุกรมวิธานเชิงจำนวน numerical taxonomy อาศัยความคล้ายคลึงกันทางลักษณะภายนอกทั้งหมด ทั้งค่าเดี่ยวๆ discrete character และค่าต่อเนื่อง continuous character แล้วเปลี่ยนเป็นระยะทาง distance สร้างความสัมพันธ์รูปต้นไม้ (Sneath and Sokal, 1973) PIC มีหลักการคือ การคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเออื่นๆ ว่ามีประโยชน์ในการนำไปใช้มากหรือน้อย เป็นค่าที่แสดงความหลากหลายของข้อมูลในตำแหน่งที่ศึกษา (Botstein *et al.*, 1980)

กวางเครือขาวสะสมอาหารไว้ในรากสะสมอาหาร (หัว) ที่อยู่ใต้ดิน ในหัวกวางเครือขาวมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (Lee *et al.*, 1983; Cherdshewasart *et al.*, 2004) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง (antioxidant) (Cherdshewasart *et al.*, 2008) สารไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) ที่พบการสะสมในกวางเครือขาวคือฟิราริน (puerarin) และจินิสทีอิน (genistein) (Chansakaow *et al.*, 2000) ฟิรารินมีผลลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ลดการแข็งตัวของหลอดเลือด (Xu *et al.*, 2005) และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (John *et al.*, 2004) ส่วนจินิสทีอินเป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนอย่างอ่อนลดการเกิดภาวะกระดูกพรุน (Knight and Eden, 1996) การยับยั้งเซลล์มะเร็งและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Frank *et al.*, 1994) อนุมูลอิสระ (free radicals) เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถทำลายเซลล์และทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง และโรคอัลไซเมอร์ การบริโภคหรือใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จะป้องกันและลดโอกาสเกิดโรคเหล่านี้ได้ (เฉลิมพงษ์ แสนจุ่มและไชยวัฒน์ ไชยสุด, 2547) สารต้านอนุมูลอิสระจะจับอิเล็กตรอน โคเคเดี่ยวของสารอนุมูลอิสระ จึงยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Gutteridge and Halliwell, 1994) ความก้าวหน้าของงานวิจัยด้านสรรพคุณและพิษวิทยาของกวางเครือขาวมีมากขึ้น ทำให้ผู้บริโภคเข้าใจและยอมรับผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของกวางเครือขาวในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ยาแผนโบราณ อาหารเสริมสุขภาพหรือใช้ผสมในเครื่องสำอางมากขึ้น (วิชัย เจริญชีวะศาสตร์, 2541; นิสากร ปานประสงค์, 2542; อดี สหวัชรินทร์, 2542) คณะกรรมการอาหารและยาขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ที่มีกวางเครือขาวเป็นส่วนประกอบเป็นยาแผนโบราณแล้วกว่า 50 คำรับ (กระทรวงสาธารณสุข, 2542)

และมูลค่าการส่งออกของผลิตภัณฑ์จากถั่วเขียวมีประมาณ 1,500 ล้านบาท/ปี (มูลนิธิกรแพทยแผนไทย, 2548) ถั่วเขียวยังใช้ในการเลี้ยงสัตว์ได้ พบว่าถั่วเขียวที่ผสมในอาหารเลี้ยงสุกรสามารถเพิ่มคุณภาพเนื้อของสุกรเพศผู้ได้ใกล้เคียงกับเนื้อของสุกรเพศเมีย (สมโภชน์ ทับเจริญ และคณะ, 2552) การผสมถั่วเขียว 1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงไก่ ทำให้ไก่เจริญเติบโตไม่แตกต่างจากการได้รับฮอร์โมนสังเคราะห์ แต่ทำให้สีและรสชาติของเนื้อส่วนอกดีกว่าการให้ฮอร์โมนสังเคราะห์ (อรธวุฒิ พลายนบุญ และคณะ, 2552) หัวถั่วเขียวมีพิวรารินที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงไม่แตกต่างจาก α -tocopherol ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Cherdshewasart *et al.*, 2008) และมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองได้ (Chen *et al.*, 2004) อาจจะเป็นประโยชน์ในการรักษาโรคเบาหวานได้ เนื่องจากการใช้ประโยชน์จากถั่วเขียวมีความหลากหลายมากขึ้น คาดว่าความต้องการใช้หัวถั่วเขียวจะเพิ่มขึ้นด้วย ปัญหาที่สำคัญคือ คุณภาพของหัวไม่สม่ำเสมอ Cherdshewasart *et al.* (2008) พบว่าถั่วเขียวที่เก็บจากป่าจำนวน 28 แห่ง มีสารไอโซฟลาโวนอยด์ชนิดหลัก ๆ เช่น พิวราริน และจินสทีอิน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากได้รับอิทธิพลของพันธุกรรม และอิทธิพลของสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ เพื่อลดปัญหาดังกล่าวและทำให้หัวถั่วเขียวที่ปลูกโดยเกษตรกรมีคุณภาพดีขึ้น จึงใช้วิธีเร่งให้ถั่วเขียวสร้างหรือสะสมสารไอโซฟลาโวนอยด์ให้สูงขึ้น ในพืชตระกูลเดียวกันกับถั่วเขียว เพิ่มปริมาณจินสทีอินได้ด้วยการใช้สารชักนำเช่น ไคโตซาน (chitosan) และกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) (Kneer *et al.*, 1999; Al-Tawaha *et al.*, 2005) ประสานฉลาดคิด (2546) พบว่าการฉีดพ่นคอปเปอร์คลอไรด์เพิ่มปริมาณจินสทีอินในหัวถั่วเขียวได้

เนื่องจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้รวบรวมพันธุ์ถั่วเขียวจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ตั้งแต่ปี 2542 และขยายพันธุ์จากเมล็ดที่เกิดจากการผสมข้าม เนื่องจากเป็นพืชตระกูลถั่ว ถั่วเขียวมีลักษณะดอกสมบูรณ์เพศและขยายพันธุ์โดยเกิดผสมตัวเอง แต่มีรายงานการศึกษาการผสมของถั่วมีโอกาสดเกิดการผสมข้ามได้ (Mackie and Smith, 1935) เป็นเรื่องที่น่าแปลกใจที่ไม่สามารถจำแนกถั่วเขียวชนิดนี้ได้โดยมีประสิทธิภาพโดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์เนื่องจากรักษาพันธุ์ไว้ใกล้ถั่วเขียวที่มาจากแหล่งอื่น

งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อการประยุกต์เทคนิคการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (ISSR-Touchdown PCR) ในการจำแนกพันธุ์ถั่วเขียวที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลายซึ่งรวบรวมไว้ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และศึกษาถึงวิธีการชักนำปริมาณสารสำคัญในถั่วเขียว โดยใช้ไคโตซาน กรดซาลิไซลิกและคอปเปอร์คลอไรด์เป็นสารชักนำ แล้วคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำ (treatment time) ของสารแต่ละชนิดที่เพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุดมาใช้ร่วมกัน เพื่อชักนำให้ถั่วเขียวสร้างพิวราริน จินสทีอิน สารฟีนอลิก

โดยรวม (total phenolic acid) สารฟลาโวนอยด์โดยรวม (total flavonoids) และศึกษาผลกระทบของสารชักนำต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว แล้วนำกวางเครือขาวที่มีฟิรารินสูงที่สุดที่ได้จากการชักนำ ไปป้อนหนูแรทที่เป็นเบาหวานเพื่อศึกษาฤทธิ์ของการลดระดับน้ำตาลในเลือด เปรียบเทียบกับการป้อนน้ำกลั่นและการป้อนยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการใช้สารชักนำในการปลูกกวางเครือขาว และการใช้กวางเครือขาวในเชิงการรักษาโรคเบาหวานต่อไปได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อรวบรวมสายพันธุ์กวางเครือ และจัดกลุ่มโดยใช้ความใกล้ชิดของสายพันธุ์
- 1.2.2 เพื่อให้ทราบถึงชนิด และผลของสารออกฤทธิ์สำคัญของกวางเครือขาวในทุกสายพันธุ์ที่พบ
- 1.2.3 เพื่อให้ได้แนวทางการเพิ่ม ผลผลิต และสารออกฤทธิ์ให้สูงขึ้น จากการปลูก และการจัดการที่เหมาะสม

1.3 ขอบเขตการวิจัย

- 1.3.1 การทดลองที่หนึ่ง ทำการจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลายซึ่งรวบรวมไว้ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยการประยุกต์เทคนิคการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (ISSR-Touchdown PCR) ในการจำแนกพันธุ์กวางเครือขาว สุ่มตรวจจำนวน 36 สายต้น
- 1.3.2 การทดลองที่สอง กลุ่มตัวอย่างคือกวางเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber อายุ 4 เดือน ชักนำด้วยไกลโคซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ ชนิดละ 5 ความเข้มข้น ตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คัดเลือกความเข้มข้นของสารชักนำแต่ละชนิดที่ทำให้หัวกวางเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดไปใช้ในการทดลองที่สาม
- 1.3.3 การทดลองที่สาม นำสารจากการทดลองที่สองมาใช้ร่วมกันเพื่อชักนำ ให้กวางเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ในโรงเรือนและแปลงทดลอง สร้างสารฟิราริน จินีสทีอินและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
- 1.3.4 การทดลองที่สี่ คัดเลือกหัวกวางเครือขาวที่มีปริมาณของฟิรารินสูงที่สุดจากการทดลองที่สาม ไปสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์แล้วป้อนหนูแรทที่เป็นเบาหวาน เปรียบเทียบฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดกับการป้อนน้ำกลั่นและยากลับเบนคลาไมด์ (glibenclamide)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถจำแนกพันธุ์กวางเครือขาที่มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลายซึ่งรวบรวมไว้ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้
- 1.4.2 ได้สารชักนำที่เหมาะสมในการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มพิวรารินและจินีสทีอินในหัวกวางเครือขาให้สูงขึ้นก่อนการเก็บเกี่ยว
- 1.4.3 ทราบถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
- 1.4.4 ได้ทราบฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทในสภาวะที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงเฉียบพลันและการให้สารติดต่อกัน เป็นเวลา 30 วัน ผลต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับ ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในผู้ป่วยโรคเบาหวานต่อไป

1.5 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 1.5.1 ผู้ปลูกกวางเครือขาและผู้ประกอบธุรกิจด้านสมุนไพร
- 1.5.2 ผู้ประกอบวิชาชีพเวชกรรม เภสัชกรรม
- 1.5.3 ผู้ประกอบโรคศิลปะสาขาการแพทย์แผนไทยและหมอพื้นบ้าน
- 1.5.4 หน่วยงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์ของกวางเครือขา
- 1.5.5 สถาบันการศึกษาทั่วไป

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กวาวเครือขาว

กวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvatabandhu) Niyomdham] (ชวลิต นิยมธรรม, 2538) หรือ ตานจอมทอง กวาวหัว ตาลานเครือ เป็นพืชในวงศ์ Leguminosae อนุวงศ์ papilionoideae (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540).

2.1.1 นิเวศวิทยา

ชวลิต นิยมธรรม (2538) รายงานว่าพบได้มากตามป่าเบญจพรรณในภาคเหนือที่จังหวัดเชียงใหม่และลำปาง ในพื้นที่ที่มีความสูง 300-800 เมตรจากระดับน้ำทะเล จรรย์ ดิษฐโชษวงศ์ และคณะ (2550)

2.1.2 พันธุ์ และลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กรมวิชาการเกษตร (2548) รายงานว่า หัวหรือรากสะสมอาหาร (tuberous roots) ลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดใหญ่และคอดยาวเป็นตอน ๆ ต่อเนื่องกัน เปลือกบางแต่แข็ง สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม ความหนาของเปลือกประมาณ 2-4 มิลลิเมตร เนื้อภายในมีสีขาวนวล เห็นวงปี ลำต้นเป็นเถาเลื้อยพันกับต้นไม้อื่น เถาย่อยจะแตกแขนงออกไปจากเถาหลัก เถาแก่มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ยอดอ่อนและกิ่งอ่อน มีสีเขียว ใบเป็นใบประกอบมีใบย่อย 3 ใบ ก้านใบประกอบยาว 10-28 เซนติเมตร หูใบเป็นรูปไข่ โคนใบมนหรือเป็นติ่งยื่นลงมา ดอกเป็นช่อเดี่ยวและช่อแขนง ออกตามปลายกิ่ง ยาว 20-30 เซนติเมตร ก้านช่อดอกมีขนสั้น ๆ คล้ายดอกถั่ว ยาว 4-7 เซนติเมตร กลีบรองดอกเชื่อมติดกันเป็นรูปประมง มีกลีบดอก 5 กลีบ ดอกออกเป็นกระจุกในระยะผลัดใบ กระจุกละ 3-5 ดอก ฝักมีลักษณะแบนรูปขอบขนาน กว้างประมาณ 7 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร มี 3-4 เมล็ด/ฝัก เมล็ดค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2.1)

ในประเทศไทยกวาวเครือขาวมักพบในบริเวณพื้นที่ราบเชิงเขา และพื้นที่ลาดชันของเทือกเขาต่างๆ เช่นที่จังหวัดกาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ เชียงใหม่ ตาก เลย ลำปาง และสระบุรี (Dithachaiwong *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลายตามแห่งที่พบ กวาวเครือขาวนำไปสู่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยวิธีใช้โมเลกุลเครื่องหมาย เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Inter Simple Sequences Repeat (ISSR), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), Simple Sequence Repeat (SSR) ในรายงานทั่วไป โมเลกุลเครื่องหมายถูกนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาว Dithachaiwong *et al.* (2550) ใช้ RAPD ซึ่งมีการร่วมกับ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ในการจำแนกพันธุ์กวาวเครือขาวจากแหล่งพันธุ์ต่างๆ 7 แหล่ง ได้แก่ กาญจนบุรี เชียงใหม่ ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เลย ลำปาง และ

สระบุรี อย่างไรก็ตามการจำแนกโดยใช้ RAPD มีความแตกต่างกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ Jamjanta (1996) ตรวจสอบชนิดของพันธุ์กว่า 5 ชนิด โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์และเทคนิค RAPD แบบแผนของไอโซไซม์ที่บ่งบอกความแตกต่างของกวาวเครือได้ดีที่สุด คือ esteras และ peroxidase ที่น่าสนใจคือแบบแผนของ dendrogram ที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไอโซไซม์ สอดคล้องกับ dendrogram ที่ได้จากผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD Sittiphrom (2005) ใช้เทคนิค HAT-RAPD ในการจำแนก กวาวเครือ (*Pueraria spp.*)

นอกจากนี้ยังมีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกพืชชนิดอื่นๆ เช่น Mendes *et al.* (2009) ประสบความสำเร็จในการใช้เทคนิค ISSR การจำแนกพืชสมุนไพร *Angelica lignescens* และ *Melanoselinum decipiens* Sakuanrungsirikul *et al.* (2005a) ได้ใช้เทคนิค ISSR ในการจำแนกพันธุ์ทุเรียน และพันธุ์เงาะ (Sakuanrungsirikul *et al.*, 2005b) ISSR ใช้หลักการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยวิธีพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้จะจับกับส่วนที่เป็นลำดับเบสซ้ำเป็นชุดๆ ของ microsatellite และมีเบสพิเศษอีก 1-3 เบสที่ปลาย 3' หรือ 5' เพื่อเพิ่มความจำเพาะ และลดความซับซ้อนของรูปแบบของแถบ นอกจากนี้เทคนิค ISSR ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับดีเอ็นเอใดๆของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษามาก่อน ดังนั้นจึงง่ายกว่าเทคนิคอื่นๆ (Wolfe *et al.* 1998) เทคนิคนี้ยังให้แถบที่มีความแตกต่างกันมาก และทำซ้ำได้

2.1.3 การเจริญเติบโต

ประสาร ฉลาดคิด (2546) พบว่าการเจริญในรอบ 1 ปี (phenological cycle) ของกวาวเครือขาวในป่าตามธรรมชาติที่ อำเภอน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา มีระยะแตกเครือเถาและใบอ่อนเริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม ระยะการเจริญและพัฒนาของเครือเถาและใบเริ่มตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงกรกฎาคม ระยะผลัดใบเริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงกุมภาพันธ์ ระยะออกดอกเริ่มตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์และ ระยะการติดฝักจนเจริญและพัฒนาเป็นเมล็ดแก่ในเดือนเมษายน ขณะที่ในแปลงทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีจะออกดอกในระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงมกราคม เมื่อมีอายุ 6 เดือน จำนวนช่อดอกเฉลี่ย/ต้นเท่ากับ 41.90 น้ำหนักเฉลี่ย/100 เมล็ดเท่ากับ 2.52 กรัม โดยมีระยะ เวลาตั้งแต่เริ่มออกดอกในเดือนพฤศจิกายนจนกระทั่งเมล็ดแก่ในเดือนมีนาคมหรือประมาณ 4 เดือน น้ำหนักหัวเฉลี่ยเมื่ออายุ 4 เดือนเท่ากับ 38.59 กรัม และเพิ่มขึ้นเป็น 249.88 กรัม เมื่อต้นกวาวเครือขาวอายุ 16 เดือน เปอร์เซ็นต์ความชื้นเฉลี่ยของหัวที่อายุ 4 เดือนเท่ากับ 90.29 และเพิ่มขึ้นเป็น 90.69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อกวาวเครือขาวอายุ 16 เดือน ความหนาแน่นเฉลี่ยของหัวที่อายุ 4 เดือนเท่ากับ 0.98 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร และเพิ่มขึ้นเป็น 1.03 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อกวาวเครือขาวอายุ 16 เดือน



ภาพที่ 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของถั่วแระหรือถั่วดำ (วิโรจน์ เชาว์วิเศษ, 2550)

2.1.4 สารพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

สารไอโซฟลาโวนส์ในหัวทำให้ถั่วแระหรือถั่วดำมีคุณสมบัติเป็นไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogen) คือเอสโตรเจนที่ได้จากพืชและออกฤทธิ์เช่นเดียวกับเอสโตรเจนในสัตว์ทุกประการ ไฟโตเอสโตรเจนมีฤทธิ์ต่อร่างกายหลายอย่าง ทั้งกระตุ้นภูมิคุ้มกันต้านทาน ต้านอนุมูลอิสระและทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมน (บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล, 2543) นอกจากนี้มีรายงานผลของถั่วแระหรือถั่วดำต่อระบบต่าง ๆ ในสัตว์ทดลองดังนี้

2.1.4.1 ผลต่อระบบสืบพันธุ์ มีผลคุมกำเนิดยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อน การสร้างอสุจิ การหลั่งน้ำนม และการออกไข่ของสัตว์ทดลอง (นันทวัน บุญยะประกัสสร และอรนุช โชคชัย เจริญพร, 2539) ทำให้หนูทดลองที่ตั้งท้องในระยะแรกแท้ง (ยุทธนา สมิตะสิริและสันติ ศักคารัตน์, 2538) การให้ผงป่นถั่วแระหรือถั่วดำขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/ครั้ง ทำให้ขนาดและน้ำหนักของอัณฑะ ต่อมลูกหมาก และ seminal vesicle ของหนูทดลองลดลงและทำให้อสุจิหยุดการเจริญ (ยุพดี ลางคลิจันทร์, 2527)

2.1.4.2 ผลต่อระบบเลือด ถั่วแระหรือถั่วดำมีฤทธิ์กระตุ้นให้ตับสร้างโปรตีนที่จับแคลเซียมได้ ระบบทางเดินอาหารจึงดูดซึมแคลเซียมได้มากขึ้นและทำให้ total protein และ chlolesterol ในเลือดสูงขึ้น (สมบูรณ์ อนันตลาโกชัยและสุวิทย์ เจริญชัย, 2528) การให้ถั่วแระหรือถั่วดำขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงของหนูทดลองลดลงประมาณร้อยละ 20 (บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล, 2543)

2.1.4.3 ผลต่อต่อมหมวกไตและตับ สารสกัดถั่วแระหรือถั่วดำจะลดการหลั่ง follicle stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) จากต่อมใต้สมอง การสร้างฮอร์โมนเพศจึงลดลง ทำให้ต่อมหมวกไตทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนแทน ต่อมหมวกไตจึงมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น และ

การป้อนผงป่นปริมาณ 100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/ครั้ง ทำให้มีเลือดคั่งในหลอดเลือดดำใหญ่ในตับ (ยูพดี ลางคลินท์, 2527) หนูขาวที่กินผงกวางเครือขาวปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ต่อเนื่อง 14 วัน ทำให้เซลล์ตับเกิดการอักเสบมีเลือดคั่ง

2.1.5 พิษวิทยาของกวางเครือขาว

กวางเครือขาวมีค่า LD₅₀ มากกว่า 10 กรัม/กิโลกรัม การทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังในหนูเพศผู้ที่ได้รับกวางเครือขาว 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่าทำให้หนูมีการเติบโตลดลง มีคอเลสเตอรอลลดลงจาก 70 มิลลิกรัม เหลือ 20 มิลลิกรัม มีตับโตขึ้น และอัมตะมีอาการบวมน้ำ (ปราณี ชวลิตธำรง และคณะ, 2542)

2.2 ไอโซฟลาโวนอยด์

ไอโซฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟลาโวนอยด์กลุ่มหนึ่งที่พบทั่วไปในพืชตระกูลถั่วจึงพบได้ในกวางเครือขาว และเป็นสารกลุ่มที่ทำให้เกิดสรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกวางเครือขาวดังรายละเอียดข้างต้น สามารถแบ่งไอโซฟลาโวนอยด์ตามโครงสร้างออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ chromenes, isoflavones, isoflavone glycosides, coumestans และ pterocarpan (Ingham *et al.*, 1989) ดังสรุปในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 กลุ่มของสารฟลาโวนอยด์และตัวอย่างสารในแต่ละกลุ่ม (Ingham *et al.*, 1989)

กลุ่มของไอโซฟลาโวนอยด์	สารในกลุ่ม
Chromenes	-Miroestrol
	-Deoxymiroestrol
	-Isomiroestrol
Isoflavones	-Daidzein
	-Genistein
	-Kwakhurin
	-Kwakhurin hydrate
Isoflavone glycosides	-Daidzin
	-Genistin
	-Mirificin
	-Puerarin

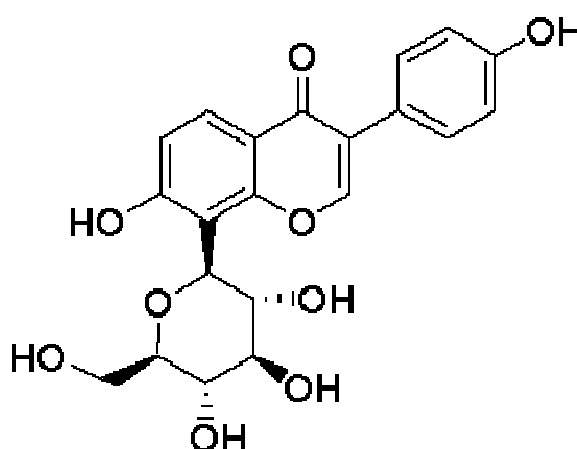
ตารางที่ 2.1 กลุ่มของสารฟลาโวนอยด์และตัวอย่างสารในแต่ละกลุ่ม (ต่อ) (Ingham *et al.*, 1989)

Coumestans	-Coumestrol
	-Mirificoumestan
	-Mirificoumestan glycol
	-Mirificoumestan hydrate
Pterocarpan	-Tuberosin
	-Puemiricarpene

ตัวอย่างของสารไอโซฟลาโวนอยด์ในกลุ่มต่าง ๆ ที่มีการใช้ประโยชน์และได้รับความสนใจในปัจจุบัน มีดังนี้

2.2.1 Puerarin

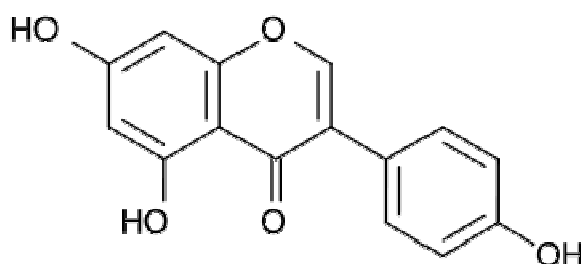
พิวรารินเป็นสารประกอบไอโซฟลาโวนอยด์ สูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{20}O_9$ และสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพ 2.2 มีผลต่อการรักษาภาวะอ้วน (obesity) ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติและภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (Xu *et al.*, 2005) ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน (Chen *et al.*, 2004) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเกิดโรคมะเร็ง (John *et al.*, 2004) พิวรารินแยกได้จาก *Pueraria lobata* (Guo *et al.*, 2001) มีผลให้การไหลเวียนเลือดดีขึ้น (Zhu *et al.*, 2004; Cervellati, 2002) และป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (Benlhabib, 2004)



ภาพที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของ พิวราริน (Sigma-aldrich, 2009a)

2.2.2 Genistein

จินิสทีอิน มีสูตรโครงสร้างดังแสดงในภาพที่ 2.3 มีคุณสมบัติเป็นสารที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (William and Harbone, 1989) จึงมีผลต่อร่างกายหลายประการ เช่น ลดภาวะกระดูกพรุน (Knight and Eden, 1996) ลดไขมันอุดตันในเส้นเลือด (Antony *et al.*, 1996) ยับยั้งกระบวนการเกิดมะเร็งหลายประการ เช่น antimutagenic, antiproliferative, antiestrogenic และ antioxidant (Frank *et al.*, 1994)



ภาพที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของจินิสทีอิน (Sigma-aldrich, 2009b)

2.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวางเครือขาว

2.3.1 อนุมูลอิสระ

คืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่เข้าคู่อย่างน้อย 1 อิเล็กตรอนจึงเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร และว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี (ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ, 2545) อนุมูลอิสระอาจเกิดจากการสลายตัวของโมเลกุลที่ถูกกระตุ้นโดยรังสีเอ็กซ์ รังสีอิเล็กตรอน รังสีแกมมา และความร้อน หรืออาจเกิดจากกระบวนการย่อยสลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ เกิดจากการออกซิเดชันของลิพิดในอาหารเนื่องจากความร้อน แสง และโลหะหนัก เช่น เหล็กและแมงกานีส และเกิดจากมลภาวะ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไนโตรเจนไดออกไซด์ คาร์บอนหรี ในสภาวะปกติร่างกายจะสร้างอนุมูลอิสระในอัตราที่ปกติ และเป็นไปในแนวทางที่เป็นประโยชน์ แต่ในสภาวะที่มีการสร้างมากเกินไป จะเกิดภาวะความเครียดเนื่องจากออกซิเดชัน (oxidative stress) จึงเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ พิษของอนุมูลอิสระต่อพืช เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจะสร้างอนุมูลอิสระของ reactive oxygen species (ROS) ขึ้น (Polle and Rennenberg, 1993) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 จึงทำให้สรีรวิทยาและการแสดงออกของยีนของพืชเปลี่ยนแปลงไป (Sharma and Davis, 1997)

ตารางที่ 2.2 สาเหตุของความเครียดในพืชที่เป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ

Stressor	ROS
Drought	$O_2^{\circ -}$
Nutrient deficiency	$O_2^{\circ -}$
Pathogens	H_2O_2

2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

คือสารที่มีโครงสร้างที่สามารถจับอิเล็กตรอนโคเดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและปฏิกิริยาถูกโซ่ได้ จึงลดอัตราการเกิดโรคร้ายแรงต่าง ๆ ที่เกิดจากอนุมูลอิสระเป็นต้นเหตุ (Gutteridge and Halliwell, 1994)

2.3.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

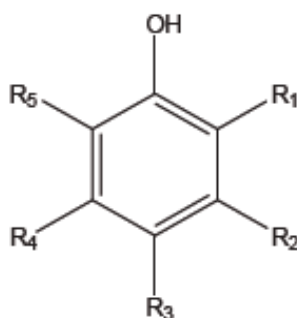
2.3.3.1 วัดความสามารถในการจับสารอนุมูลอิสระ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH) เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชันที่ใช้ reagent คือ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรในตัวทำละลายเมทานอล สารละลายนี้มีสีม่วง คือดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง รายงานผลเป็นค่า 50 เปอร์เซนต์ effective concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มของ DPPH เหลืออยู่ 50 เปอร์เซนต์ หรือรายงานในรูปของค่า IC_{50} ด้วย ซึ่งทำโดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซนต์การยับยั้งอนุมูลอิสระกับความเข้มของสารตัวอย่าง เพื่อหาค่า IC_{50} วิธี DPPH มีข้อดีคือ สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง และมี reproducibility สูง แต่มีข้อเสียคือ ไม่สามารถใช้วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเลือดได้เพราะต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็น alcohol ซึ่งทำให้โปรตีนตกตะกอนได้

2.3.3.2 วิธี ferric reducing/antioxidant power (FRAP) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันโดยอาศัยปฏิกิริยารีดอกซ์ และติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบเชิงซ้อนคือ เมื่อสารประกอบเชิงซ้อน ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) ได้รับอิเล็กตรอนจากสารต้านออกซิเดชัน แล้วจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ) ที่มีสีม่วงน้ำเงิน วิธี FRAP สามารถติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จากนั้นศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันในสารตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ferrous sulfate แล้วรายงานเป็นค่า FRAP value ข้อดีของวิธีนี้ก็คือ เสียค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก รวดเร็ว มีขั้นตอนในการทดลองไม่ยุ่งยากซับซ้อนและมี reproducibility ดี

สารต้านอนุมูลอิสระในพืชที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินอี พบมากในเมล็ดทานตะวัน ถั่วเหลือง และน้ำมันรำข้าว สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดสี กลิ่นและรสชาติในพืชผักและผลไม้ เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids compound) ซึ่งมีประมาณ 8,000 ชนิด (ปวีณา ข่วงทิพย์, 2546; นวลศรี รักอริยะธรรม และอัญชญา เจนวิถีสุข, 2545)

2.3.4 สารประกอบฟีนอล

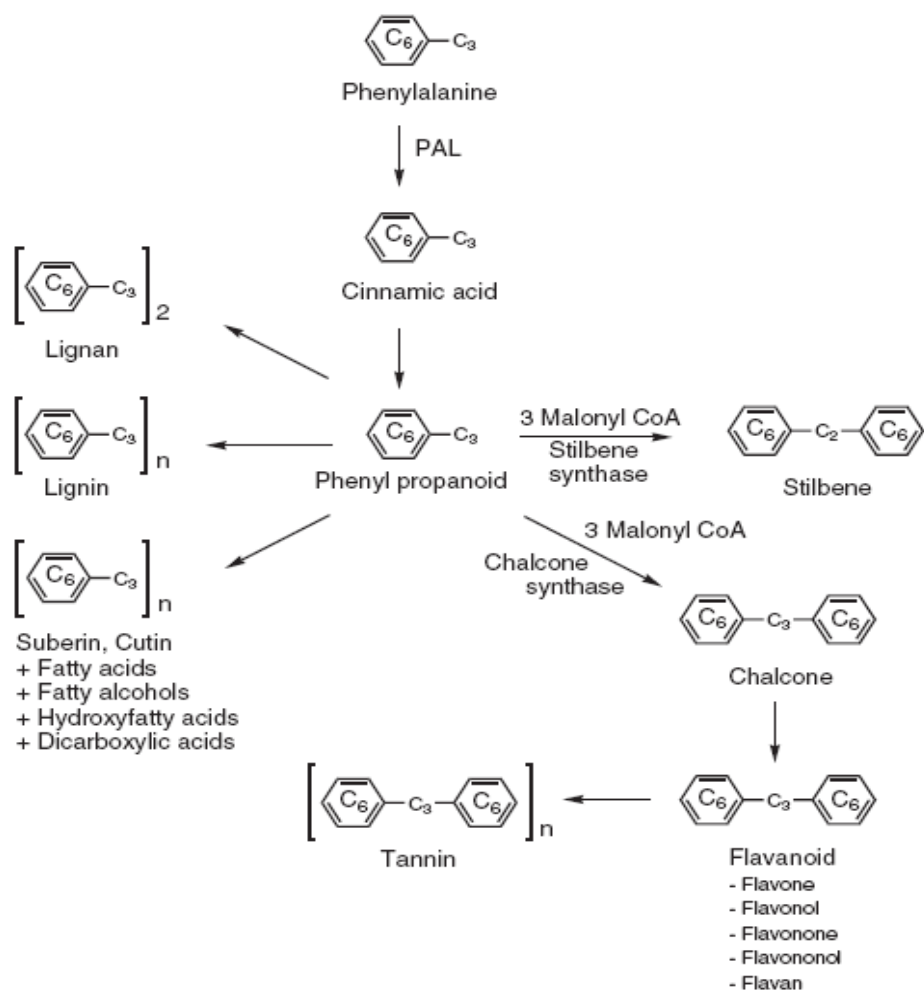
เป็นอนุพันธ์ของเบนซีนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่เป็นแกนหลักและอาจมีหมู่แทนที่ มาแทนที่ตำแหน่ง ortho meta หรือ para ได้อีก R1 ถึง R5 เป็นหมู่แทนที่ การแทนที่ตำแหน่งต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้สารประกอบฟีนอลในพืชมีโครงสร้างแตกต่างกันไป ดังภาพที่ 2.4 สารประกอบฟีนอล เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่สำคัญในพืช สังเคราะห์จากกรดอะมิโน ฟีนอลอะลานิน (phenylalanine) และไทโรซีน (tyrosine) อนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลที่พบในพืชได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ลิกนิน เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2.5



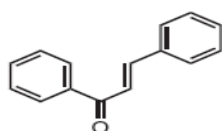
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างพื้นฐานของสารประกอบฟีนอล

2.3.5 สารประกอบฟลาโวนอยด์

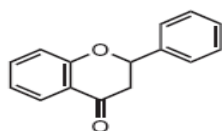
เป็นสารกลุ่มหนึ่งของสารประกอบฟีนอล เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง p-cumaryl Co A (C6-C3) กับ malonyl Co A 3 โมเลกุล ได้เป็น chalcones แล้วทำการปิดวงในสภาวะที่เป็นกรด โครงสร้างของสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์จึงเป็น diphenylpropane (C6-C3-C6) ความแตกต่างของสารกลุ่มนี้จะขึ้นอยู่กับหมู่แทนที่และความไม่อิ่มตัวของสารแต่ละชนิด ตัวอย่างสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ดังแสดงในภาพที่ 2.6



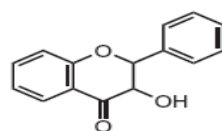
ภาพที่ 2.5 แสดงสารอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอล



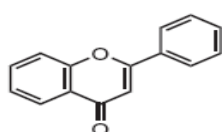
Chalcone



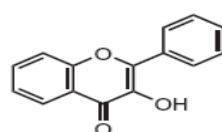
Flavonone



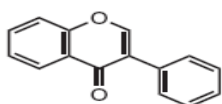
Flavononol



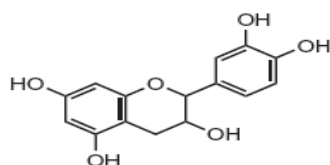
Flavone



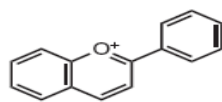
Flavonol



Isoflavone



Catechin

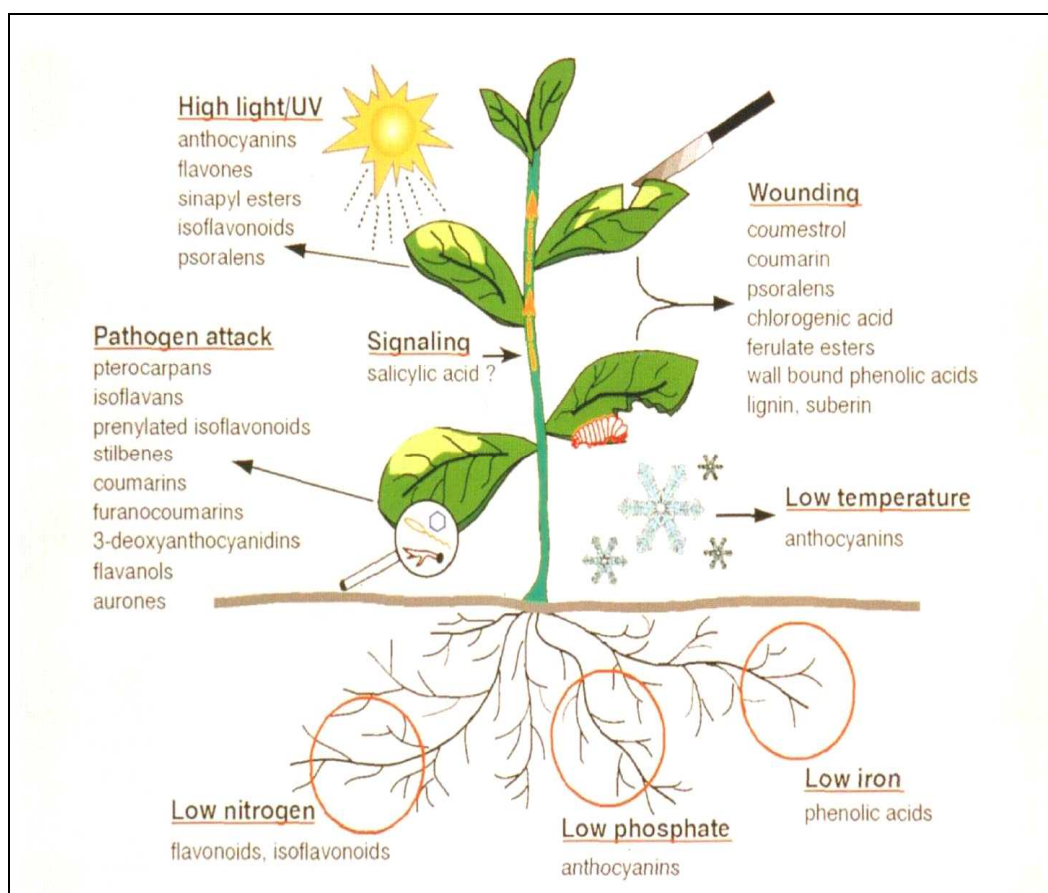
Anthocyanidin
(Flavylium cation)

ภาพที่ 2.6 สารอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์

2.4 สารชักนำ

สารชักนำคือโมเลกุลที่สามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างสารทุติยภูมิ เช่น ฟีนิลโพรพานอยด์ ที่พบว่า สิ่งที่มีผลต่อสารไอโซฟลาโวนอยด์คือ ความเข้มแสง หรือ รังสียูวี การเข้าทำลายของโรคพืช การเกิดบาดแผล และปริมาณธาตุอาหารในดิน (ภาพที่ 2.7) เป็นต้น สารชักนำอาจมาจากภายในหรือภายนอกเซลล์ของพืชก็ได้ การจำแนกจึงขึ้นอยู่กับที่มาของสารชักนำ ได้เป็น 2 แบบ ตามลักษณะของการกำเนิด ได้แก่ปัจจัยจากสิ่งมีชีวิต เช่น สารประกอบไกลโคโปรตีน สารอินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ และ สารโพลีแซคคาไรด์ ที่ได้จากพืช เช่น เปกติน หรือ เซลลูโลส และที่ได้จาก

จุลินทรีย์ เช่น ไคติน ไคโตซาน หรือ กลูแคน จากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น รั้งสียูวี เกลือ โลหะหนัก หรือ สารเคมีที่ไปรบกวนการทำงานของเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Heike and Dietrich, 1995)

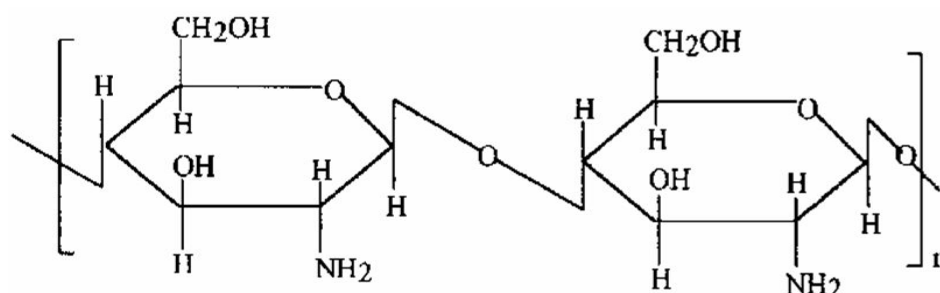


ภาพที่ 2.7 ตัวอย่างของสิ่งชักนำที่มีผลต่อการผลิตสารในวิถีการสังเคราะห์ฟีนอลโพรพานอยด์ (Dixon and Paiva, 1995)

2.4.1 ไคโตซาน (ภาพที่ 2.8)

เป็นอนุพันธ์ของไคติน หมู่แอซิติล ($-\text{CO}-\text{CH}_3$) ของไคตินถูกกำจัดออกเหลือเป็น หมูอะมิโน ($-\text{NH}_2$) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สอง ด้วยปฏิกิริยาเคมีความร้อนกับสารละลายต่างเข้มข้น (ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และสุวดี จันทรกระจ่าง, 2542) หรือด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่ม chitin deacetylase ถ้าหมู่แอซิติลถูกตัด หรือหลุดออกไปประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ไคตินจะถูกเรียกว่า ไคโตซาน และถ้าหมู่แอซิติลถูกตัดหรือหลุดไปประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์ จะเรียกว่า fully deacetylated chitosan (เขาวภา ไหวพริบ, 2534) ไคโตซานสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์สารประกอบฟลาโวนอยด์ ในพืช (Young and Kaus, 1983) การใช้เป็นสารชักนำโดยฉีดพ่นสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตรที่ใบของถั่วเหลืองเพิ่มไอโซฟลาโวนส์ในเมล็ดถั่วเหลืองได้ถึง 16-96 เปอร์เซ็นต์

(Al-Tawaha *et al.*, 2005) และเพิ่มยังคาอิดซีอินได้ถึง 150 เปอร์เซ็นต์ ไคโตซานมีคุณสมบัติเป็น linear polyelectrolyte มีความหนาแน่นทางประจุสูงจึงยึดจับกับประจุลบและโลหะได้ดี (อัยฎาฐ แสงนภาเพ็ญ, 2542) จึงอาจช่วยเสริมการออกฤทธิ์ของสารอื่น เมื่อใช้เป็นสารชักนำในพืชได้ ไคโตซานละลายในกรดอินทรีย์อ่อน เช่น กรดแอสซิดิก ซิตริก เป็นต้น ไม่ละลายน้ำที่ pH เป็นกลาง ไม่สามารถละลายได้ที่ pH สูงกว่า 6.5 ไม่ละลายในสารอินทรีย์หลายชนิดแต่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ไคโตซานมีองค์ประกอบของไนโตรเจนอยู่จึงมีบทบาทสำคัญในด้านปุ๋ยชีวภาพ และสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (สุวลิ จันทร์กระจ่าง, 2544)

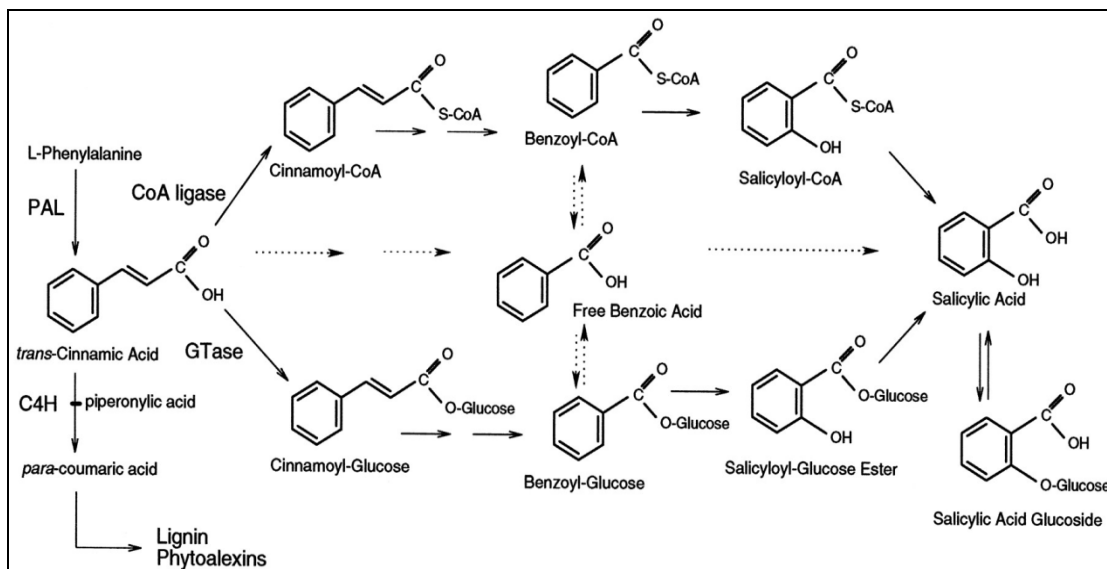


ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของไคโตซาน จาก Muzzarelli (1973)

2.4.2 กรดซาลิไซลิก

มีสูตรโครงสร้าง และวิถีของการสังเคราะห์ แสดงในภาพที่ 2.9 กรดซาลิไซลิกสังเคราะห์มาจากกรดอมิโนฟีนิลอลานิน โดยฟีนิลอลานินจะเปลี่ยนเป็น transcinamic acid จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น benzoic acid และเป็น กรดซาลิไซลิกในที่สุด (Davies, 1995) กรดซาลิไซลิกเป็นผงสีขาว ไร้ออกซิเจน มีกลิ่นฉุน (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive, 1992) ละลายน้ำได้เล็กน้อย ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์เข้มข้นประมาณ 15.2 กรัม/100 มิลลิลิตร เมื่อถูกความร้อนสามารถระเหิดได้ กรดซาลิไซลิกเป็นสารประกอบฟีนอลอย่างง่ายที่มีผลต่อกระบวนการเจริญเติบโตของพืช เช่น การเปิด-ปิดของปากใบ การงอกของเมล็ด การดูดซับประจุ การแสดงออกของเพศและการต้านทานการเข้าทำลายของโรค นอกจากนี้ยังยับยั้งการสังเคราะห์และการทำงานของเอธิลีน ทำให้ถูกนำมาใช้เพื่อชะลอการสุกของผลไม้ (ศิริชัย กัลยาณรัตน์, 2548) การฉีดพ่นกรดนี้ในถั่วเขียวสามารถเพิ่มจำนวนฝักและผลผลิตของถั่วเขียวได้ (Singh and Kaur, 1980) มีผลต่อการเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงและปริมาณของคลอโรฟิลล์ในถั่วเหลือง (Zhao *et al.*, 1995) มีผลควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อโรคที่เข้าทำลายพืชให้จำกัดอยู่ในบริเวณเล็ก ๆ รอบ ๆ บริเวณที่เชื้อเริ่มเข้าไปในพืช เรียกว่า hypersensitive reaction (HR) ซึ่ง HR เป็นผลมาจาก systemic acquired resistance (SAR)

ซึ่งเกิดขึ้นจากการชักนำของกรดซาลิไซลิก ระบบดังกล่าวเกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้นให้พืชสร้างเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนอยด์ (Raskin, 1992) ดังนั้นการที่พืชสร้างเอนไซม์ชนิดนี้มากขึ้นอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนอยด์เพื่อใช้ในการป้องกันตัวแบบ SAR ของพืชได้



ภาพที่ 2.9 สูตรโครงสร้างของกรดซาลิไซลิกและวิธีการสังเคราะห์ (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive, 1992)

2.4.3 คอปเปอร์คลอไรด์

คอปเปอร์คลอไรด์มีธาตุทองแดงที่เป็นจุลธาตุอาหารของพืช ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์เร่งปฏิกิริยารีดอกซ์ และกระบวนการถ่ายโอนอิเล็กตรอนในพืช มีผลต่อกระบวนการสร้างโปรตีน สร้างคลอฟิลล์ เพิ่มความสมบูรณ์ของการพัฒนาเมล็ดและผลอ่อน และช่วยในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้สังเคราะห์แสง (ขงยุทธ โอสดสภา, 2543) การฉีดพ่นสารละลายที่มีส่วนผสมของทองแดงให้กับถั่วเขียว ทำให้ปริมาณสารสำคัญแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารละลายของทองแดงความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้คาอิดซีอินมีค่าเฉลี่ยสูงสุด 44.69 มิลลิกรัม/ลิตร และทำให้จันนิสทีอินมีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 28.45 มิลลิกรัม/ลิตร (ประสาร ฉลาดคิด, 2546)

2.5 โรคเบาหวาน (diabetes mellitus, DM)

คือภาวะที่ร่างกายมีระดับกลูโคสในเลือดหลังอดอาหาร 12-14 ชั่วโมงแล้วยังสูงกว่า 140 มิลลิกรัม/เดซิลิตร เนื่องจากการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินจากเซลล์บีตา (beta cell) ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แซนส์ของตับอ่อนลดลง หรือขาดฮอร์โมนอินซูลินจากการที่เซลล์บีตาถูกทำลาย หรือการตอบสนองของเนื้อเยื่อเป้าหมายต่อการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินลดลง ทำให้การเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนผิดปกติ องค์การอนามัยโลกแบ่งโรคเบาหวานตามสาเหตุเป็น 4 ชนิด แต่ที่เป็นปัญหาและมีผู้สนใจศึกษามากมี 2 ชนิด คือ เบาหวานชนิดที่ 1 หรือเบาหวานชนิดพึ่งฮอร์โมนอินซูลิน (type 1 diabetes mellitus หรือ insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) เกิดจากตับอ่อนผลิตฮอร์โมนอินซูลินไม่ได้หรือผลิตได้ไม่เพียงพอ เนื่องจากเซลล์บีตาถูกทำลายจากระบบภูมิคุ้มกันที่ทำงานผิดปกติมักพบในเด็ก อาการของโรคที่มักพบได้แก่ ปัสสาวะบ่อย กระหายน้ำบ่อย น้ำหนักลด และอ่อนเพลีย โรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือเบาหวานชนิดไม่พึ่งฮอร์โมนอินซูลิน (type 2 diabetes mellitus หรือ non insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) โดยเซลล์บีตาในตับอ่อนสามารถผลิตฮอร์โมนอินซูลินได้ แต่ฮอร์โมนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เซลล์ไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมน เกิดภาวะดื้อต่อฮอร์โมนอินซูลิน (insulin resistance) เป็นโรคเบาหวานชนิดที่พบได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 90 ของเบาหวานที่พบทั่วโลก อาการในระยะแรกๆ ไม่เด่นชัด ผู้ป่วยทราบว่าตนเป็นโรคก็ต่อเมื่อมีอาการของภาวะแทรกซ้อนเกิดขึ้น (ณัฐธัญ แสนบัวพันธ์, 2545)

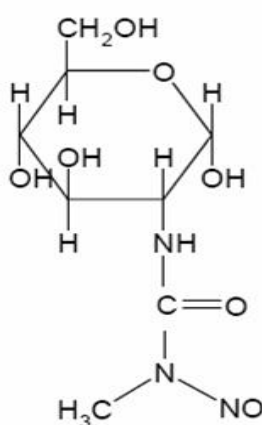
การรักษาโรคเบาหวานของแพทย์แผนปัจจุบันยังคงใช้ฮอร์โมนอินซูลินและยาสังเคราะห์ในรูปแบบของยาเม็ดเป็นยาหลักในการรักษา เช่น ยา glibenclamides, biguanides, sulfonylureas และ thiazolidinediones เป็นต้น แต่ยาเหล่านี้มักมีผลข้างเคียง และไม่สามารถป้องกันโรคแทรกซ้อนได้ (Rang and Dale, 1991) การใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคนี้นี้จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจและมีรายงานถึงความสามารถในการใช้ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองอยู่อย่างต่อเนื่อง

2.5.1 การทำให้สัตว์ทดลองเป็นเบาหวานด้วยสเตรปโตโซโทซิน (streptozotocin)

สเตรปโตโซโทซินเป็นยาปฏิชีวนะที่สังเคราะห์ได้จาก *Streptomyces achromogenes* และสามารถสังเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการ และมีสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 2.10 มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน มีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำ สามารถละลายน้ำได้ ค่า pH ประมาณ 4-4.5 (Elias *et al.*, 1994) ใช้ชักนำเบาหวานโดยฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (intravenous, i.v.) ของหนูวัยเจริญพันธุ์เพื่อชักนำเบาหวานชนิดพึ่งฮอร์โมนอินซูลินต้องใช้ในขนาดระหว่าง 40-60 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (Ganda *et al.*, 1976) การฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal, i.p.) ต้องใช้ขนาดเท่ากันหรือสูงกว่า แต่ถ้าใช้ต่ำกว่า 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และใช้ชักนำเพียงครั้งเดียวอาจจะไม่ได้ผล (Katsumata *et*

al., 1992) โดยยาจะกระจายไปยังตับอ่อน ถ้าใส่ไปที่ตับ และไตมากที่สุด แต่ไม่เข้าสู่สมอง (Karunanayake *et al.*, 1974) สเตรปโตโซโทซินเป็นสารกลุ่ม methylnitrosourea จึงออกฤทธิ์โดยจับที่ glucosetransporter (GLUT2) และผ่านเข้าไปในเซลล์บีตาในตับอ่อน (Schnedl *et al.*, 1994) ทำให้เกิดการเติมหมู่ alkyl ที่สายดีเอ็นเอ จึงทำให้สายดีเอ็นเอเสียหาย (Elsner *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังทำให้เกิด nitric oxide (NO) ซึ่งก็มีผลทำลายเซลล์บีตา (Szkudelski, 2001) ทำให้เซลล์บีตาตาย และมีการทำงานที่ผิดปกติ จึงมีการสังเคราะห์ proinsulin ลดลง จึงหลังอินซูลินได้ลดลงเกิดเป็นโรคเบาหวาน (Nakatsuka *et al.*, 1990)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานโดยสเตรปโตโซโทซินได้แก่ 1) อาหารถ้าหนูกินอาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูง และคาร์โบไฮเดรตต่ำ (โปรตีน 63 เปอร์เซ็นต์, คาร์โบไฮเดรต 6 เปอร์เซ็นต์) ก่อนการฉีดสเตรปโตโซโทซิน โอกาสเกิดโรคเบาหวานจะลดลง (Schmidt *et al.*, 1980) 2) ขนาดของสเตรปโตโซโทซินและชนิดของสัตว์ทดลอง ความรุนแรงของการเกิดโรคเบาหวานจะขึ้นอยู่กับขนาดของสารที่มากขึ้น ขนาดที่นิยมใช้จะอยู่ระหว่าง 25-200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ทดลอง ขนาดที่เหมาะสมต่อหนูแรทคือ 50-65 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Karunanayake *et al.*, 1974) 4) อายุ เมื่อให้สเตรปโตโซโทซินในสัตว์ทดลองที่อายุน้อยโอกาสเกิดโรคเบาหวานก็จะน้อยลง Wong and Wu (1994) รายงานว่าการให้สเตรปโตโซโทซินขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัมแบบ i.v. ในหนูอายุ 8 สัปดาห์ จะเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานดีกว่าการให้ในหนูอายุ 4 และ 6 สัปดาห์

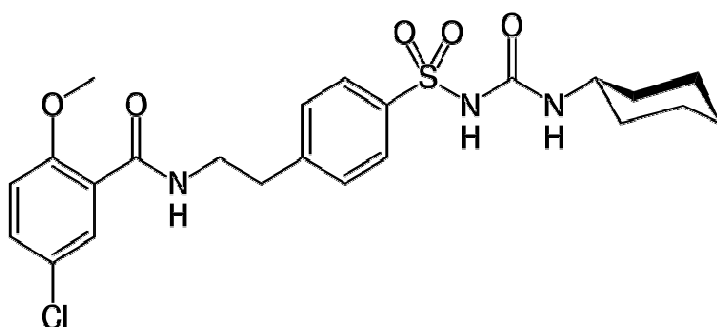


ภาพที่ 2.10 สูตรโครงสร้างของสเตรปโตโซโทซิน (Elias *et al.*, 1994)

2.5.2 ยารักษาโรคเบาหวานชนิดกลัยเบนคลาไมด์

กลัยเบนคลาไมด์เป็นยา กลุ่ม second generation sulfonylurea เป็นยาเม็ดลดน้ำตาลในเลือดชนิดหลักที่ใช้มาเกือบ 40 ปีแล้ว และยังคงใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เพราะเทียบตามน้ำหนักยาแล้วจะมีความแรงกว่า first generation sulfonylurea ถึง 50-100 เท่า และมีสูตรโครงสร้างคือ 1-[4-[2-(5-chloro-2-methoxybenzamido) ethyl] benzensulfonyl]-3-cyclohexylurea (Davis and Gramer, 1999) (ภาพที่ 2.11) กลัยเบนคลาไมด์เป็นกรดอ่อน ดูดซึมในระบบทางเดินอาหารได้ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ (Ferner and Neil, 1988) กลัยเบนคลาไมด์กระตุ้นเซลล์บีตาให้หลั่งอินซูลิน แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างอินซูลินได้ ยาออกฤทธิ์โดยจับกับรีเซพเตอร์ที่ผนังเซลล์ เรียกว่า sulfonylurea receptor (SUR) และทำให้เกิดการปิดกั้น ATP sensitive potassium channels ที่ผนังของเซลล์บีตาจึงเกิด membrane depolarization ขึ้นและทำให้ calcium channels ที่ผนังเซลล์เปิดทางให้แคลเซียมเคลื่อนย้ายจากภายนอกเข้าสู่เซลล์ได้ การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์ทำให้เกิดการเคลื่อนย้าย insulin granule มาที่ผนังเซลล์และหลั่งอินซูลินออกมา (Schmid-Antomarchi *et al.*, 1987; Luzi and Pozza, 1997) ปัจจุบันพบว่า SUR เป็นส่วนหนึ่งของ ATP sensitive potassium channels ซึ่งอยู่บนผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่ามีอยู่ที่ผนังเซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งทำให้ยามีผลต่อการเต้นและการบีบตัวของหัวใจได้ (Ashcroft and Gribble, 1999)

กลัยเบนคลาไมด์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในระยะที่ยังไม่เกิดภาวะ ketoacidosis และสามารถลดระดับของ glucagon ในเลือดได้จึงมีผลช่วยลดการเกิดภาวะ ketoacidosis (อรพรรณ มาตังคสมบัติ, 2544) ฤทธิ์ที่ไม่พึงประสงค์ของยาพบในเดือนแรกที่ใช้ยา เช่น เกิดผื่นคัน คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร ตัวเหลือง เป็นต้น (Harrigan *et al.*, 2001)



ภาพที่ 2.11 สูตรโครงสร้างของกลัยเบนคลาไมด์ (Davis and Gramer, 1999)

ความเป็นประโยชน์ของกาวเครือขาวเกิดจากการมีสารสำคัญสะสมอยู่ในส่วนหัวที่เป็นส่วนสะสมอาหาร ในธรรมชาตินั้นสารที่สะสมอยู่มีความแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อมและการควบคุมโดยพันธุกรรม และการปลูกเพื่อใช้ประโยชน์นั้นยังเป็นที่ถกเถียงในวงวิชาการ และยังไม่ค่อยได้รับความเชื่อถือในด้านคุณภาพของผลผลิตเท่าที่ควร ดังนั้นการปลูกให้ได้คุณภาพดี ควรได้สารสำคัญไม่น้อยกว่าที่เก็บจากป่า และต้องมีความสม่ำเสมอของสารสำคัญ หรือสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารสำคัญได้ การใช้สารชักนำชนิดต่าง ๆ ในพืชตระกูลเดียวกัน และถูกพัฒนาไปในเชิงอุตสาหกรรม โดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วกระตุ้นให้พืชสร้างสารสำคัญ แต่มีข้อจำกัดในด้านต้นทุนสูง การชักนำในแปลงปลูกจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ จากการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พบว่าธาตุโลหะหนักบางอย่าง เช่น เหล็ก ทองแดง และสังกะสี ทำให้กาวเครือขาวสร้างสารสำคัญมากขึ้น ดังนั้นการใช้สารชนิดอื่น ๆ เช่น ไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ ทั้งที่เป็นชนิดเดี่ยว ๆ หรือใช้ร่วมกันน่าจะให้ผลที่ดีขึ้น และอาจเป็นแนวทางให้เกิดการผลิตเป็นสารชักนำสำเร็จรูปขึ้นมาให้ผู้ปลูกกาวเครือหรือสมุนไพรมีสารสำคัญคล้าย ๆ กัน ได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การทดลองที่หนึ่ง การจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวโดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเทคนิค

ISSR-Touchdown PCR

3.1.1 ชนิดของพืช : กวางเครือขาว ในแปลงของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส.) รวมทั้งสิ้น 36 สายต้น (ภาพที่ 3.1) ซึ่งได้จากการเพาะเมล็ดจากต้นที่ซื้อต้นพันธุ์มาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

3.1.2 การจำแนกลักษณะพฤกษศาสตร์ :

3.1.2.1 การจำแนกลักษณะพฤกษศาสตร์ตาม จรัญ ดิษฐไชยวงศ์ และคณะ (2550) ประกอบด้วย 7 ลักษณะ ได้แก่

3.1.2.1.1 สีด้านหลังใบ คำนวณจากค่า L^* , a^* , b^* และประยุกต์วิธีการเก็บข้อมูลจาก cowpea descriptions ตามลักษณะการจำแนกพันธุ์ของ International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) (IBPGR, 1983) โดยค่า L^* คือ ทิศทางสี ในด้านความสว่าง เริ่มจากมืด (สีดำ) $L^*= 0$ ถึง สว่าง (สีขาว) $L^*= 100$, ค่า a^* คือ ทิศทางสี เริ่มจากสีแดง (+a) ถึง สีเขียว (-a), ค่า b^* คือ ทิศทางสี เริ่มจากสีเหลือง (+b) ถึง สีน้ำเงิน (-b) ด้วยเครื่อง Minolta CR-300 ตามระบบ The Hunter L, a, b Color Space (DeMan, 1999) และค่า x และ y = ค่าสีตามระบบ CIE chromaticity diagram (DeMan, 1999)

3.1.2.1.2 ลักษณะใบ ได้แก่ รูปร่างใบ [ovate (ใบรูปไข่), elliptic (ใบรูปรี)], ฐานใบ [obtusate (ฐานใบมน), acute (ฐานใบแหลม)], ปลายใบ [cuspidate (ปลายใบเป็นดิ่งแหลม) และ acuminate (ปลายใบเรียวแหลม)]

3.1.2.1.3 ขนบนส่วนของลำต้น

3.1.2.1.4 ขนที่ฝัก

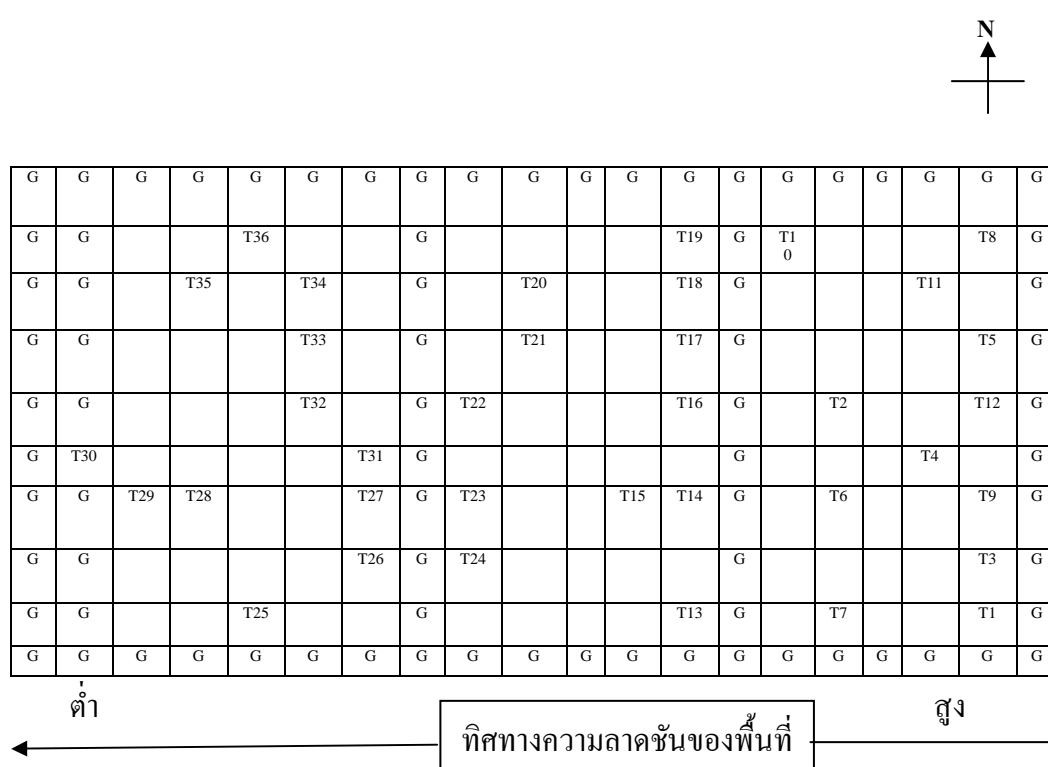
3.1.2.1.5 สีของดอก คำนวณจากค่า L^* , a^* , b^* และประยุกต์วิธีการเก็บข้อมูลจาก cowpea descriptions (IBPGR, 1983) เช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1.1

3.1.2.1.6 ขนาดของใบย่อยส่วนปลาย โดยการวัดความยาวจากส่วนยอดใบถึงฐานใบ และความกว้างโดยการวัดส่วนที่กว้างที่สุดของใบ

3.1.2.1.7 ความยาวก้านช่อดอก

3.1.2.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ใช้ลักษณะพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ ได้แก่ สีด้านหลังใบ ลักษณะใบ ขนบนส่วนของลำต้น ขนที่ฝัก สีของดอก ขนาดของใบ และ

ความยาวก้านช่อดอก มาใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างต้นโดยต้นที่มีลักษณะเดียวกันให้คะแนนเป็น 1 หรือ 0 เมื่อปรากฏหรือไม่ปรากฏลักษณะที่ตำแหน่งเดียวกันคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) ด้วยโปรแกรม NTSYS pc v.21 (Biostatistics, Inc.) และ Winboot program (Yap and Nelson, 1996) ซึ่งกำหนดการวิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำของการสุ่มวิเคราะห์ของการสร้าง Consensus tree วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Principle component analysis (PCA) และหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากร (Nei, 1972) ด้วยโปรแกรม POPGENE V1.31 (Yeh, Yang and Boyle, 1999)



ภาพที่ 3.1 ผังแปลงทดลองกวาวเครือขาวที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
(T1-T36=สายต้นที่ 1-36, G=แนวป้องกัน)

3.1.3 การจำแนกด้วยเทคนิค ISSR-Touchdown PCR : ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

3.1.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนโดยประยุกต์จากวิธีการของ Li and Midmore (1999) โดยบดใบพืชใน โกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด ตักผงตัวอย่างใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ (microcentrifuge tube) ที่มีบัฟเฟอร์สำหรับสกัด (extraction buffer : 2% CTAB, 1.4 M NaCl,

0.1 M Tris pH 8.0, 0.02 M EDTA pH 8.0, 1% PVP และ 1% β -mercapto ethanol) 500 μ l นำไปอุ่นที่ 65°C 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (16,500 g) นาน 5 นาที คัดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย chloroform : isoamyl (24 : 1) ปริมาตร 1 เท่า เขย่า และปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที คัดสารละลายส่วนบนใส่หลอดไมโครพิวส์ใหม่ นำไปอุ่นที่ 55°C 30 นาที แล้วแช่เย็นที่ 4°C 5 นาที เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่ากลับหลอดไปมาเบาๆ จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอ แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที (16,500 g) นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70% 1 ครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้น้ำกลั่นหนึ่งมาซึ้อ 180 μ l เติม 5 M NaCl 20 μ l และเอทานอล 95% 400 μ l พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ จนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย เอทานอล 70% อีก 2 ครั้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติมสารละลาย TE ที่มี RNase (10 mg/ml) ปริมาตร 40 μ l เก็บดีเอ็นเอที่ -20°C

จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ 5 μ l 6X Loading dye 2 μ l ที่มี 1X Vistragreen® (Amersham, USA) และ dH₂O 5 μ l รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 12 μ l จากนั้นหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ลงในร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง และหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, EU) ลงในร่องสำหรับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานลงบนอะกาโรสเจล ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นานประมาณ 50-60 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Documentation System (Vilber Lourmat, France) และบันทึกภาพที่ได้

3.1.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิควิธี ISSS-Touchdown PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ตามวิธีการของ Sakuanrungsirikul, *et al.*, (2005a) ตามสภาวะดังนี้ สารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางจนเหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา (10-30 ng) 3.5 μ l, 10x Taq buffer with (NH₄)₂SO₄ (Fermentas) 1.5 μ l, 25 mM MgCl₂ 0.9 μ l, 20 mM dNTPs 0.9 μ l, 5 U Taq DNA polymerase (Fermentas) 0.187 μ l, dH₂O 6.263 μ l และ 20 μ M ISSR 0.75 μ l ในปริมาตรรวม 15 μ l จำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ 41 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3.5) ใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิด้วยเครื่อง Thermal cycler (PE Applied Biosystem, PCR System 9700) ดังนี้ ใช้อุณหภูมิ 94°C นาน 5 นาที ตามด้วย touchdown PCR จำนวน 5 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที, 52°C นาน 1 นาที, 72°C นาน 1 นาที โดยอุณหภูมิลดลง 1°C ทุก 1 รอบ จากนั้นตามด้วย PCR ปกติจำนวน 30 รอบ ประกอบด้วยอุณหภูมิ 94°C 1 นาที, 48°C 1 นาที, 72°C 1 นาที และสุดท้ายการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอให้เสร็จสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 5 นาที เก็บผลที่ได้ที่ 4°C

ทำการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากผลผลิตปฏิกิริยา PCR โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ 5 μ l

6X Loading dye ที่มี 1X Vistragreen® (Amersham, USA) 2 μ l และ dH₂O 5 μ l รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 12 μ l จากนั้นหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ลงในร่องสำหรับหยอดตัวอย่าง และหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, EU) ลงในร่องสำหรับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานลงบนอะกาโรสเจล ผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นานประมาณ 50-60 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Documentation System (Vilber Lourmat, France) ทำซ้ำด้วยวิธี PCR ทั้ง 36 ครั้ง เพื่อยืนยันผลของ PCR ที่ได้ของการทดลอง

3.1.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอ ใช้น้ำหนักโมเลกุลด้วยโปรแกรม PhotoCapt (Vilber Lourmat, France) กำหนดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันเป็นหนึ่งลักษณะ ให้ค่าคะแนนเป็น 1 หรือ 0 เมื่อปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น

3.1.3.4 การวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม กำหนดค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS pc v.21 (Biostatistics, Inc.) และ Winboot program (Yap and Nelson, 1996) ซึ่งกำหนดการวิเคราะห์หาค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำของการสุ่มวิเคราะห์ของการสร้าง consensus tree วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย PCA และหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มประชากร (Nei, 1972) ด้วยโปรแกรม POPGENE V1.31 (Yeh, Yang and Boyle, 1999)

3.2 การทดลองที่สอง ชนิดและความเข้มข้นของสารชักนำต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยแบ่งเป็น 3 การทดลองย่อย ก่อนการชักนำเตรียมต้นกวางเครือขาวจากการเพาะเมล็ดและปลูกใน growth chamber ที่กำหนดค่าความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน เท่ากับ 27/25 °C ช่วงแสงกลางวัน/กลางคืน 14/10 ชั่วโมง ความเข้มแสงเท่ากับ 270 ลักซ์ เมื่อต้นกวางเครือขาวอายุ 4 เดือน จึงทำการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ทรีตเมนต์ (ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด) ทรีตเมนต์ ละ 12 ซ้ำ (1 ต้น/ซ้ำ) ดังแสดงในตาราง ที่ 3.1

3.2.1 การชักนำด้วยไลโคซาน

3.2.1.1 การเตรียมสารชักนำ นำผงไลโคซานขนาด 0.01 0.5 1.0 และ 1.5 กรัม นำใส่ในน้ำสะอาด ปริมาตร 990 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติมกรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และคนจนผงไลโคซานละลายหมดจะได้สารละลายไลโคซานเข้มข้น 0, 10, 500 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร ในกรดอะซิติก 1 เปอร์เซ็นต์

3.2.1.2 การชักนำ เมื่อกวางเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber อายุ 4 เดือน จึงทำการชักนำโดยนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นไปราดลงดินบริเวณโคนต้นกวางเครือขาวแล้วพรวน

ดินกลบ ทำทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้ง ห่างกัน 7 วัน จากนั้นเก็บข้อมูลจากทุกทริตเมนต์ หลังจากทำการชักนำครั้งที่ 4 แล้ว 1 วัน 7 วัน 15 วัน และ 30 วัน เพื่อวิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้นต่อฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ พื้นที่ใบ อัตราการสังเคราะห์แสง อัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง และน้ำหนักสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากแต่ละทริตเมนต์

ตารางที่ 3.1 การทดลองและระดับความเข้มข้นของสารชักนำในแต่ละการทดลองย่อย

ชนิดของสารชักนำ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
การทดลองที่ 3.1 ไคโตซาน	0, 10, 500, 1000 และ 1500 (Al-Tawaha <i>et al.</i> , 2005)
การทดลองที่ 3.2 กรดซาลิไซลิก	0, 10, 100, 150 และ 200 (Kneer <i>et al.</i> , 1999)
การทดลองที่ 3.3 คอปเปอร์คลอไรด์	0, 10, 100, 200, และ 300 (ประสาร นลาตคิต, 2546)

3.2.1.3 การสกัดสารจากหัวกวาวเครือขาว ใช้วิธีของวิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) โดยอบหัวกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างที่หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด (ultra centrifuge mill) จะได้ผงกวาวเครือขาวที่มีขนาดของอนุภาค 100 mesh ซึ่งผงกวาวเครือขาวหนัก 10 กรัม ใส่+ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เต็มเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman เบอร์ 42) แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 รอบ/นาที (Yu *et al.*, 2000) เป็นเวลา 12 นาที แล้วแยกสารละลายส่วนที่ใสไประเหยตัวทำละลายออกด้วย rotary evaporator ภายใต้การลดอุณหภูมิและความดันบรรยากาศ จนได้สารสกัดซึ่งมีความหนืด สีน้ำตาลติดอยู่ใน flask ซึ่งน้ำหนักของสารสกัดกวาวเครือขาวที่สกัดได้และเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์ในกรณีต่าง ๆ ต่อไป

3.2.1.4 วัดฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ใช้วิธีการทดลองของ Brand-Williams *et al.*, (1995) นำสารที่สกัดได้จากแต่ละทริตเมนต์ 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH (ที่ละลายในเมทานอล) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ในที่มีอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 517 นาโนเมตร และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ} = \left\{ \frac{[\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}]}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right\} \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด 1.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย DPPH 1.5 มิลลิลิตร

$\text{Abs}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสม กับเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร

3.2.1.5 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ตามวิธีของ Benzie and Strain (1999) สร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) โดยผสมสารละลาย FeSO_4 ความเข้มข้น 0.101-1.011 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับสารละลาย FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร และผสม FRAP reagent กับเมทานอล (สารละลายควบคุม) ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย acetate buffer pH 3.6 เป็น blank สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ FeSO_4 กับค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร (ค่าการดูดกลืนแสงของสาร FeSO_4 - ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม) แล้วคำนวณหาสมการเส้นตรง (ภาพผนวกที่ 1) เพื่อใช้คำนวณค่า FRAP value ของแต่ละตัวอย่าง กรณีหาค่า FRAP value ของตัวอย่าง ให้ผสมสารสกัดของแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสง แล้วคำนวณ ค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ของแต่ละตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า FRAP value

3.2.1.6 การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ตามวิธีการของ Singleton *et al.* (1965) โดยผสมสารสกัดแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย folin-ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใน volumetric flask ทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย 7.5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (w/v) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอล 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารต่าง ๆ แทนการใช้สารละลายตัวอย่างเพื่อใช้เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) สร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยผสมกรดแกลลิกแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายต่าง ๆ เช่นเดียวกับกรณีของสารสกัดแต่ละตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดแกลลิก (ภาพผนวกที่ 2) รายงานปริมาณฟีนอลิกของแต่ละทรีตเมนต์ เป็นค่า gallic acid equivalent

3.2.1.7 ตรวจหาฟลาโวนอยด์ ด้วย aluminium chloride complex colorimetric method ตามวิธีของ Chang *et al.* (2002) โดยผสมสารสกัดความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมอะซิเตท ความเข้มข้น 1 โมล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงวัดการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน (quercetin) การสร้างกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน

ความเข้มข้น 1-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้ขึ้นตอนและผสมกับสารละลายต่าง ๆ เหมือนกรณีของสารสกัดตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารเคอร์ซีติน (ภาพผนวกที่ 3) และรายงานปริมาณฟลาโวนอยด์ของแต่ละทรีตเมนต์เป็นค่า quercetin equivalent

3.2.1.8 การวัดตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ตัวแปรที่วัดได้แก่ พื้นที่ใบของกวางเครือขาวด้วยเครื่อง delta-T image analysis system วัดอัตราการสังเคราะห์แสงด้วยเครื่อง Portable Photosynthesis รุ่น LCA-4 (portable photosynthesis and transpiration measurement system) คำนวณอัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของแต่ละตัวอย่างและชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง

3.2.1.9 การวิเคราะห์ข้อมูล วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) ของทุกตัวแปร (ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิก ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ อัตราส่วนน้ำหนักสด/แห้ง น้ำหนักของสารที่สกัดได้และอัตราการสังเคราะห์แสง) ของแต่ละความเข้มข้น ในแต่ละการทดลอง ด้วยวิธี F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละความเข้มข้นด้วยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS version 14 (Statistical Package for Social Science) (Levesque and SPSS Inc., 2006) โดยวิเคราะห์แยกตามวันที่เก็บข้อมูลหลังการชักนำและแสดงผลในรูปของกราฟแท่งที่กำกับด้วยตัวอักษรแสดงความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ย โดยค่าข้อมูลที่ปรากฏในวันเดียวกัน ที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.2.2 การชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก

3.2.2.1 การเตรียมสารชักนำ เตรียมสารละลายกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0 10 100 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร โดยชั่งกรดซาลิไซลิก 0.01 1.1 1.5 และ 2.0 กรัม แล้วละลายด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.2.2 การชักนำ เมื่อกวางเครือขาวใน growth chamber มีอายุ 4 เดือน นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นไปฉีดพ่นให้ทั่วทั้งต้นจนสารละลายหยดลงจากใบ ทำการชักนำ 4 ครั้ง แต่ละครั้ง ห่างกัน 7 วัน เก็บข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ วัดพื้นที่ใบ อัตราการสังเคราะห์แสง คำนวณอัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง และชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบของแต่ละทรีตเมนต์ และวิเคราะห์ข้อมูล เหมือนการทดลองที่ 1

3.2.3 การชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

เตรียมสารละลายความเข้มข้น 0 10 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร โดยเตรียม stock solution ของทองแดงความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัม/ลิตร จาก คอปเปอร์คลอไรด์ โดยชั่งสาร 2.68

กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลายทองแดงความเข้มข้น 10 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร จากคอปเปอร์คลอไรด์โดยใช้ stock solution ของคอปเปอร์คลอไรด์ ปริมาตร 1 10 20 และ 30 มิลลิลิตรตามลำดับ ละลายในน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร การชักนำทำเหมือนการทดลองที่ 2

3.2.4 ตรวจหาการมีอยู่ของพิวรารินและจีนิสทีอิน

ตรวจหาการมีอยู่ของสารทั้งสองในทุกทริตเมนต์ด้วย thin layer chromatography (TLC) ใช้วิธีการทดสอบของ Dan *et al.* (2004) โดยการจุด (spot) สารมาตรฐานของสารพิวรารินและสารจีนิสทีอินที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และจุดสารสกัดหยาบของแต่ละทริตเมนต์อย่างละ 2 ไมโครลิตรลงบน TLC silicagel 60 F₂₅₄ (MERK) ขนาด 10 x 10 เซนติเมตร แล้ว develop ด้วยตัวทำละลายเคลื่อนได้แก่ *n*-butanol : acetic acid : น้ำ (5 : 3 : 1 โดยปริมาตร) แล้วตรวจหาสารพิวรารินภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และสารจีนิสทีอินภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เปรียบเทียบค่า retention mobility (R_f) ของสารสกัดหยาบของแต่ละทริตเมนต์กับสารละลายมาตรฐาน ยืนยันผลการตรวจหาโดยนำแผ่น TLC แผ่นเดิมมาอบที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบตำแหน่งของสารทั้งสองในแต่ละตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐานของสารพิวรารินและสารจีนิสทีอิน

3.3 การทดลองที่สาม พิวราริน จีนิสทีอิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวางเครือขาวที่ถูกชักนำด้วยโคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

3.3.1 การเตรียมสารชักนำและต้นกวางเครือขาว

สารที่ใช้ชักนำทั้ง 8 ทริตเมนต์ ได้จากการนำโคโตซาน ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร คอปเปอร์คลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร และกรดซาลิไซลิก 100 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเป็นสารชักนำที่ดีที่สุดจากการทดลองในบทที่ 3 ใช้เป็นสารชักนำร่วมกัน โดยจัดเป็นทริตเมนต์ได้ทั้งหมด 8 ทริตเมนต์ ดังนี้

- | | |
|----------------|---|
| ทริตเมนต์ที่ 1 | ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น (control) |
| ทริตเมนต์ที่ 2 | ฉีดพ่นด้วยกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (SA) |
| ทริตเมนต์ที่ 3 | ฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร (CuCl ₂) |
| ทริตเมนต์ที่ 4 | ฉีดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (CuCl ₂ + SA) |
| ทริตเมนต์ที่ 5 | ราดโคนต้นด้วยโคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan) |
| ทริตเมนต์ที่ 6 | ราดโคนต้นด้วยโคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับฉีดพ่นกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan + SA) |

ทรีตเมนต์ที่ 7 ราคโคนต้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร นิดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan + CuCl_2)

ทรีตเมนต์ที่ 8 ราคโคนต้นด้วยไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับการนิดพ่นด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร และกรดซาลิไซลิกที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร (Chitosan + CuCl_2 + SA)

นำทรีตเมนต์ทั้งหมดไปชักนำในกวางเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ในโรงเรือนและในแปลงทดลอง ก่อนการชักนำเตรียมต้นพืชและวางแผนการทดลอง ดังนี้

การปลูกใน growth chamber ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาพืช อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยนำต้นกวางเครือขาว อายุ 3 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดและปลูกในกระถางที่บรรจุดินปลูกสำเร็จรูป (ดินปลูก มทส) เข้า growth chamber ที่ตั้งค่าความชื้นสัมพัทธ์ 85 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ $27/25^{\circ}\text{C}$ ช่วงแสง 14/10 ชั่วโมง ความเข้มแสง 270 ลักซ์ เมื่อต้นกวางเครือขาวอายุ 4 เดือน (ภาพผนวกที่ 4) จึงทำการชักนำ ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (complete randomized design: CRD) 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 4 ซ้ำ (1 ต้น/ซ้ำ)

การปลูกในโรงเรือน (ภาพผนวกที่ 5) ทำการทดลองที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยนำต้นกวางเครือขาว อายุ 3 เดือน จากการเพาะเมล็ดและปลูกในกระถางเข้าไปไว้ในโรงเรือน ให้น้ำด้วยระบบสปริงเกลอร์ (แบบปีกผีเสื้อ ติดตั้งบนหลังคาด้านในโรงเรือน) ในเวลา 9.00-9.30 ทุกวัน ให้น้ำปุ๋ยคอกผสมปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ในอัตราส่วน 1 : 1 เดือนละ 1 ครั้ง แต่แต่ละครั้งให้ปริมาณ 5 กรัม/ต้น ไม่นิดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชตลอดการทดลอง เมื่อต้นกวางเครือขาวอายุ 4 เดือนจึงเริ่มทำการชักนำสารสำคัญ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 8 ซ้ำ (1 ต้น/ซ้ำ)

การปลูกในแปลงทดลอง (ภาพผนวกที่ 6) ทำการทดลองที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยนำเอาต้นกวางเครือขาว อายุ 3 เดือน ที่ได้จากการเพาะเมล็ด ย้ายลงดินที่ยกร่องสูง 0.5 เมตร ด้วยระยะปลูกระหว่างแถวห่างกัน 3 เมตร และระยะระหว่างต้นห่างกัน 2 เมตร ทำค้ำแบบแยกต้น ให้น้ำด้วยระบบสปริงเกลอร์ (แบบปีกผีเสื้อ ติดตั้งสูงจากโคนต้น 0.5 เมตร) ในเวลา 9.00-9.30 ทุกวัน ให้น้ำปุ๋ยคอกผสมปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ในอัตราส่วน 1:1 เดือนละ 1 ครั้ง แต่แต่ละครั้งให้ปริมาณ 5 กรัม/ต้น ไม่นิดพ่นสารกำจัดศัตรูพืชตลอดการทดลอง เมื่อต้นกวางเครือขาวอายุ 12 เดือน และใบอยู่ในระยะเพศลาดจึงเริ่มทำการชักนำ (ไม่สามารถชักนำที่อายุ 8 เดือนได้ เนื่องจากกวางเครือขาวอยู่ในระยะใบแก่และกำลังผลัดใบ) ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก (randomized complete block design: RCB) 8 ทรีตเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ (block) ซ้ำละ 4 ต้น

เมื่อต้นกวางเครือขาวในแต่ละกรณี ถึงระยะที่ต้องทำการชักนำด้วยทรีตเมนต์ต่าง ๆ ตามแผนการทดลอง จึงใช้ทรีตเมนต์ทั้ง 8 ชนิด มาชักนำอย่างต่อเนื่องจำนวน 4 ครั้ง แต่แต่ละครั้งห่างกัน 7

วัน โดยการฉีดพ่นลงบนต้นกวาวเครือขาว (กรณีคอปเปอร์คลอไรด์และกรดซาลิไซลิก) หรือราดลงดินบริเวณโคนต้นแล้วพรวนดินกลับไป (กรณีโคโคซาน) เก็บข้อมูลจากทุกทริตเมนต์ หลังการชักนำครั้งสุดท้าย 15 วัน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณฟิวรารินและจิบเบอเรลลิน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิก ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และผลที่มีต่อการเจริญเติบโตของต้นกวาวเครือขาว ได้แก่ อัตราส่วนน้ำหนักสด/แห้งของหัว น้ำหนักของสารที่สกัดได้และอัตราการสังเคราะห์แสง (วัดด้วยเครื่อง leaf chamber analysis type LCA-4) ในเวลา 10.00-12.00 นาฬิกา

3.3.2 การสกัดสารจากหัวกวาวเครือขาว

ตามวิธีของ วิโรจน์ เชาววิเศษ (2550) โดยอบหัวกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างที่หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดชนิด ultra centrifuge mill ได้ผงกวาวเครือขาวที่มีขนาดอนุภาค 100 mesh จากนั้นชั่งผงกวาวเครือขาว 10 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมเอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง (whatman เบอร์ 42) แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที (Yu *et al.*, 2000) เป็นเวลา 12 นาที แยกเอาสารละลายส่วนที่ใสไประเหยตัวทำละลายออกภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่ำและการลดความดันบรรยากาศ จนได้สารสกัดสีน้ำตาล ติดอยู่ใน flask ที่ใช้ระเหยตัวทำละลาย บันทึกน้ำหนักของสารที่สกัดจากหัวกวาวเครือขาว แล้วเก็บในอุณหภูมิ -20°C

3.3.3 การตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ตามวิธีการของ Singleton *et al.* (1965) โดยผสมสารสกัดแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับสารละลาย folin-ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ใน volumetric flask ที่งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย 7.5 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (w/v) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอล 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารต่าง ๆ แทนการใช้สารละลายตัวอย่างเพื่อใช้เป็น blank นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิก โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) สร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก ความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยผสมกรดแกลลิกแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายต่าง ๆ เช่นเดียวกับกรณีของสารสกัดแต่ละตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดแกลลิก รายงานปริมาณฟีนอลิกของแต่ละทริตเมนต์ เป็นค่า gallic acid equivalent

3.3.4 การตรวจหาฟลาโวนอยด์

ด้วยวิธี aluminium chloride flavonoids complex colorimetric method ตามวิธีของ Chang *et al.* (2002) และ Harbone (1998) โดยผสมสารสกัดแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 0.0263 กรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม อลูมิเนียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และโพแทสเซียมอะซิเตท ความเข้มข้น 1 โมล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงวัดการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร กำหนดหาปริมาณฟลาโวนอยด์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน (quercetin) การสร้างกราฟมาตรฐานของเคอร์ซีตินความเข้มข้น 1-16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้ขั้นตอนและผสมกับสารละลายต่าง ๆ เหมือนกรณีของสารสกัดตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารเคอร์ซีตินและรายงานปริมาณฟลาโวนอยด์ของแต่ละทริตเมนต์เป็นค่า quercetin equivalent

3.3.5 การหาปริมาณของฟิรารินและจินัสทีอินด้วย HPLC

ตามวิธีของ Zhang *et al.* (1999) และวิโรจน์ เชาว์วิเศษ (2550) โดยกรองสารละลายของสารสกัดกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างด้วยกระดาษกรองไนลอนเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร เก็บสารละลายที่กรองได้ใน vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC (Hewlett-Packard 1050 Series) ที่ใช้ diode array เป็น detector โดยฉีดสารสกัด 20 ไมโครลิตร/ครั้ง/ตัวอย่างผ่านคอลัมน์ชนิด RP-C₁₈ Agilent® column (4.6x150 มิลลิเมตร) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์เท่ากับ 5 ไมโครเมตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) acetic acid ในน้ำ (A) และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) acetic acid ใน acetonitrile (B) โดยทำเป็น gradient (ตารางที่ 3.2) ใช้อัตราการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิของระบบเท่ากับ 30°C กำหนดพื้นที่ใต้กราฟด้วยโปรแกรม Chem station 3D (Hewlett-Packard Company, Scientific Instruments Division) เปรียบเทียบตำแหน่งของสาร ฟิรารินและจินัสทีอินในสารสกัดกวาวเครือขาวแต่ละตัวอย่างกับสารมาตรฐาน แล้วนำพื้นที่ใต้กราฟของสารทั้งสองมาคำนวณหาปริมาณสารที่แต่ละตัวที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานของฟิราริน (ภาพผนวกที่ 7) และจินัสทีอิน (ภาพผนวกที่ 8) ที่วิเคราะห์ในสภาวะเดียวกับสารสกัดกวาวเครือขาว แล้วจึงคำนวณเป็นปริมาณของสารต่อหน่วยน้ำหนักแห้งเพื่อรายงานผลการวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 3.2 gradient ของเฟสเคลื่อนที่ชนิด (A) และชนิด (B)

เวลา (นาที)	ปริมาตรของเฟสเคลื่อนที่ (เปอร์เซ็นต์)	
	(A)	(B)
0	90	10
35	72	28

3.3.6 ฤทธิ์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ DPPH

ตามวิธีของ Brand-Williams *et al.* (1995) โดยนำสารสกัดแต่ละตัวอย่างมาละลายด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 750-4500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 4.9 มิลลิลิตร กับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เมื่อผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร แล้วจึงคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสาร DPPH ด้วยจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ} = \left\{ \frac{[\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}]}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right\} \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด 1.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย DPPH 1.5 มิลลิลิตร

$\text{Abs}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรผสม กับเมทานอล 1.5 มิลลิลิตร

สร้างกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระกับความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละตัวอย่าง สร้างสมการเส้นตรงเพื่อคำนวณ IC_{50}

3.3.7 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

ตามวิธีของ Benzie and Strain (1999) สร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) โดยผสมสารละลาย FeSO_4 ความเข้มข้น 0.101–1.011 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร และผสม FRAP reagent กับเมทานอล (สารละลายควบคุม) ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย acetate buffer pH 3.6 เป็น blank สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ FeSO_4 กับค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร (ค่าดูดกลืนแสงของสาร FeSO_4 - ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม) แล้วคำนวณหาสมการเส้นตรง เพื่อใช้

คำนวณค่า FRAP value ของแต่ละตัวอย่าง การหาค่า FRAP value ของแต่ละตัวอย่าง ผสมสารสกัดของตัวอย่าง ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร กับ FRAP reagent ปริมาตร 950 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสง แล้วคำนวณ ผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ของแต่ละตัวอย่าง นำค่าที่ได้ไปคำนวณค่า FRAP value ของตัวอย่างต่อไป

3.3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) ปริมาณพิวราลิน จินิสทีอิน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ อัตราการสังเคราะห์แสง อัตราส่วนน้ำหนักสด/แห้ง และน้ำหนักของสารที่สกัดได้ ของแต่ละทริตเมนต์ ด้วยวิธี F-test และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ระหว่างทริตเมนต์ ด้วยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS (Statistical Package for Social Science) version 14 (Levesque และ SPSS Inc., 2006)

3.4 การทดลองที่ 4 สารสกัดกวางเครือขาวกับการลดระดับน้ำตาลในเลือดและผลกระทบต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน

3.4.1 การเตรียมการทดลอง

3.4.1.1 สารสกัดกวางเครือขาว คัดเลือกกวางเครือขาวจากทริตเมนต์ที่ให้ปริมาณพิวราลินสูงที่สุด ที่ได้จากการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂ ในต้นกวางเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber จากการทดลองในบทที่ 4 มาใช้ทำการทดลอง เตรียมสารสกัดกวางเครือขาวด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ โดยนำหัวกวางเครือขาวมาล้างทำความสะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วบดให้เป็นผงละเอียด ชั่งผงกวางเครือขาว 5 กรัม เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร (ต่อครั้ง) คนแบบต่อเนื่องนาน 48 ชั่วโมง กรองแยกกากไปสกัดซ้ำอีกครั้ง นำเอทิลแอลกอฮอล์ที่สกัดได้ทั้งหมดมาระเหยด้วย rotary evaporation และทำให้แห้งด้วยการอบที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะได้สารสกัดสีเหลืองอำพัน โดยมี yield เท่ากับ 33.6 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง เก็บสารสกัดไว้ที่ -20°C

3.4.1.2 สัตว์ทดลอง หนูแรท (*Rattus norvegicus*) เพศผู้พันธุ์วิสตาร์ อายุ 4 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง อาคารสัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยเลี้ยงในกรงสเตนเลสที่มีซี่เหล็กรัดซี่เข้าเป็นวัฏจักรนอน ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C ให้ช่วงสว่างถึงมืด 12 ชั่วโมง ช่วงสว่างเริ่มต้นเมื่อ 6.00 นาฬิกา ให้น้ำประปาและอาหารเม็ดสำเร็จรูปตลอดเวลา เนื่องจากมีปัญหาด้านการเตรียมการทดลองจึงต้องเลี้ยงหนูทดลองต่อไปจนถึงอายุ 10 สัปดาห์และมีน้ำหนักตัว 350-400 กรัม จึงได้เริ่มทำการทดลอง

3.4.1.3 การเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวาน แบ่งหนูส่วนหนึ่งเพื่อเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยงดให้อาหารหนู 16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้เข็มเจาะบริเวณปลายหางหนูเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดด้วยกลูโคมิเตอร์ (Advantage[®] II, Roch Diagnosis) ก่อนฉีดสเตรปโตโซโทซินในขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่ละลายในซีเตรตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ก) เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal, ip.) (Kamalakkannan and Stanely, 2006) ในวันที่ 7 หลังฉีดสเตรปโตโซโทซินให้หนูอดอาหาร 16 ชั่วโมง เก็บเลือดมาตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด คัดเลือกหนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 250 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ซึ่งเป็นหนูที่เกิดภาวะเบาหวานไปทำการทดลอง (Sabu and Subburaju, 2002)

3.4.2 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดกวางเครือขาวในหนูแรทที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

3.4.2.1 ในหนูปกติ งดให้อาหารหนูก่อนทำการทดลอง 16 ชั่วโมง แบ่งหนูเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว โดยแต่ละตัวต้องเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดที่เวลา 0 นาที (ก่อนป้อนสาร) แล้วจึงป้อนสารตามกลุ่มที่ถูกจัดไว้ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 2 ป้อนยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด กลัยเบนคลาไมด์ (daonil[®]) 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 3-4 ป้อนสารสกัดกวางเครือขาวที่ 100 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว หลังจากป้อนสารแต่ละกลุ่ม เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงป้อนกลูโคส 3 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (Pushparaj *et al.*, 2000) ในหนูทุกกลุ่มแล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดอีกครั้งหลังป้อนสารแต่ละกลุ่ม 60 120 180 และ 240 นาที การป้อนสารทำโดยนำกระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร มาต่อด้วยเข็มป้อนสารลงกระเพาะ (gastric feeding needle) เบอร์ 18 จากนั้น ป้อนสารครั้งละไม่เกิน 1 มิลลิลิตร

3.4.2.2 ในหนูเบาหวาน คัดเลือกหนูที่เป็นเบาหวานเข้าทำการทดลองโดยทำการทดลองเหมือนในหนูปกติ แต่ใช้กลุ่มทดลองเพียง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมทำการป้อนน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 2 ทำการป้อน กลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลุ่มที่ 3 ทำการป้อนสารสกัดกวางเครือขาวที่ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดอีกหลังป้อนสารแต่ละกลุ่ม 30 60 120 180 240 และ 300 นาที

3.4.3 ฤทธิ์ของสารสกัดกวางเครือขาวในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานเมื่อให้สารสกัดวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน

แบ่งหนูที่เป็นเบาหวานออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว โดยหนูกลุ่มที่ 1 คือ หนูปกติที่ป้อนน้ำกลั่นขนาด 1 มิลลิลิตร/ตัว/วัน กลุ่มที่ 2 คือ หนูเบาหวานที่ป้อนน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน กลุ่มที่ 3 คือ หนูเบาหวานที่ป้อนกลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/

วัน กลุ่มที่ 4 คือ หนูเบาหวานที่ป้อนกวาวเครือขาว 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (ใช้ 100 มิลลิกรัมของสารสกัดหยาบ/1กิโลกรัมนน.ตัวของหนูทำการให้ทุกวัน) ทำการป้อนน้ำหรือสาร (ของแต่ละกลุ่ม) ผ่านท่อลงสู่กระเพาะโดยตรง โดยใช้ gastric feeding needle เป็นเวลา 30 วัน เก็บเลือด และตรวจระดับน้ำตาลในเลือดทุก 7 วัน แล้วเปรียบเทียบผลการลดระดับน้ำตาลในเลือดของแต่ละทรีตเมนต์กับกลุ่มควบคุมในแต่ละครั้งของการตรวจเลือด และในทรีตเมนต์เดียวกันเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดของการตรวจแต่ละครั้งกับข้อมูลก่อนการป้อนสาร (วันที่ 0)

3.4.4 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเนื้อเยื่อในตับอ่อน และตับของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 30 วัน

โดยใช้หนูจากการทดลองในหัวข้อที่ 3.4.3 หลังป้อนสารครบ 30 วัน แล้วทำการฆ่าหนูด้วยเครื่องตัดคอ จากนั้นผ่าหน้าท้องแล้วตัดตับอ่อนและตับไปคงสภาพใน neutral phosphate buffer formalin

(ภาคผนวก ข) เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จึงนำไปผ่านขั้นตอนจนได้เป็นสไลด์ถาวรของเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยฮีมาทอกซิลิน (Hematoxylin) และอีโอซิน (Eosin) (ภาคผนวก ค) เพื่อศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

3.4.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลระดับน้ำตาลในเลือดด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม (ทรีตเมนต์) โดยใช้ duncan multiple rang test (DMRT) และเปรียบเทียบข้อมูลก่อนและหลังด้วย student's paired-t test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS (Statistical Package for Social Science) version 14 (Levesque and SPSS Inc., 2006)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 การจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวโดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเทคนิค ISSR-Touchdown PCR

4.1.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

กวางเครือขาวที่รวบรวมในแปลงของฟาร์มมทส. มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่หลากหลาย ดังนั้นการทดลองนี้จึงประยุกต์ตาม จรัญ ดิษฐไชยวงศ์ และคณะ (2550) และวิธีการเก็บข้อมูลจาก cowpea descriptions ตามลักษณะการจำแนกพันธุ์ของ International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) (IBPGR, 1983) จำแนกความแตกต่างของกวางเครือขาวได้ ดังนี้

4.1.1.1 สีด้านหลังใบของใบย่อยส่วนปลายจากกวางเครือขาวทั้ง 36 สายต้น โดยใช้ระบบ The Hunter L, a, b Color Space (DeMan, 1999) พบว่ามีค่า L^* และ b^* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่ค่า a^* ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.1) ค่า a^* อยู่ระหว่าง -23.33 ถึง -5.41 สายต้นที่ T11 ใบย่อยส่วนปลายมีสีเขียวมากที่สุด ($a^* = -23.33$) และสายต้นที่ T27 ใบย่อยส่วนปลายมีสีเขียวน้อยที่สุด ($a^* = -5.41$) ค่า b^* อยู่ระหว่าง 14.35 ถึง 31.14 สายต้นที่ T26 ใบย่อยส่วนปลายมีสีเหลืองมากที่สุด ($b^* = 31.14$) สายต้นที่ T23 ใบย่อยส่วนปลายมีสีเขียวน้อยที่สุด ($b^* = 14.35$) ค่า L^* อยู่ระหว่าง 35.42 ถึง 47.79 สายต้นที่ T34 ใบย่อยส่วนปลายมีความสว่างมากที่สุด ($L^* = 47.79$) สายต้นที่ T24 ใบย่อยส่วนปลายมีความสว่างน้อยที่สุด ($L^* = 35.42$) และค่า x และ y หมายถึง ค่าสีตามระบบ CIE chromaticity diagram (DeMan, 1999) ซึ่งคำนวณจากค่า L^* , a^* , b^* พบว่าค่า x และ y แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ มีค่า x อยู่ระหว่าง 0.3613 ถึง 0.3226 สายต้นที่ T34 มีค่า x มากที่สุด ($x = 0.3613$) สายต้นที่ T23 มีค่า x น้อยที่สุด ($x = 0.3226$) และมีค่า y อยู่ระหว่าง 0.4569-0.3338 สายต้นที่ T11 มีค่า y มากที่สุด ($y = 0.4569$) สายต้นที่ T30 มีค่า y น้อยที่สุด ($y = 0.3338$)

4.1.1.2 ลักษณะใบ พบว่า กวางเครือขาวทั้ง 36 สายต้น มีลักษณะใบย่อยส่วนปลายแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.2 จำแนกความแตกต่างที่ใบย่อยส่วนปลายได้ 2 กลุ่ม ดังนี้

4.1.1.2.1 ใบย่อยส่วนปลาย รูปไข่ (ovate) ฐานใบมน (obtuse) ปลายใบเป็นติ่งแหลม (cuspidate) จำนวน 12 สายต้น ได้แก่ สายต้นที่ T1, T2, T8, T9, T11, T13, T17, T18, T21, T22, T28, และ T32

4.1.1.2.2 ใบย่อยส่วนปลาย รูปรี (elliptic) ฐานใบแหลม (acute) ปลายใบเรียวแหลม (acuminate) จำนวน 24 สายต้น ได้แก่ สายต้นที่ T3, T4, T5, T6, T7, T10, T12, T14, T15, T16, T19, T20, T23, T24, T25, T26, T27, T29, T30, T31, T33, T34, T35 และ T36

4.1.1.3 ขนบนส่วนลำต้น ทั้ง 36 สายต้น ไม่มีขนบนส่วนของลำต้น ดังแสดงในตารางที่

4.2

4.1.1.4 ขนที่ฝัก (ตารางที่ 4.2)

4.1.1.4.1 มีขนที่ฝัก ได้แก่ สายต้นที่ T6 และ T24

4.1.1.4.2 ไม่มีขนที่ฝัก ได้แก่ สายต้นที่ T2, T3, T4, T5, T7, T8, T10, T11, T12, T14, T16, T17, T18, T20, T21, T25, T26, T29, T30, T31, T32 และ T35 (สายต้นที่ไม่ติดฝักจำนวน 11 สายต้น ได้แก่ สายต้นที่ T1, T9, T15, T19, T22, T23, T27, T28, T33, T34 และ T36 เนื่องจากระหว่างการแทงช่อดอกมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง-ต่ำทำให้เกิดการฝ่อของช่อดอก)

4.1.1.5 ลักษณะสีของดอก ใช้การพิจารณาสีกลีบดอกกึ่งกลาง และสีกลีบดอกกึ่งนอก จากการสังเกตสีกลีบดอกกึ่งกลางทั้ง 32 สายต้น มีสีกลีบดอกกึ่งกลางสีน้ำเงินอมม่วงที่เข้มถึงจางแตกต่างกัน จึงได้นำระบบ The Hunter L, a, b Color Space (DeMan, 1999) มาใช้ในการเก็บข้อมูลและเนื่องจากในช่วงระยะเวลาการเก็บข้อมูลสภาพอากาศแปรปรวน การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง-ต่ำระหว่างการแทงช่อดอกทำให้เกิดการฝ่อของช่อดอกจำนวน 4 สายต้น พบว่าสีกลีบดอกกึ่งกลาง และสีกลีบดอกกึ่งนอกทั้ง 32 สายต้นมีค่า L^* , a^* และ b^* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.3) ค่า L^* อยู่ระหว่าง 26.60 ถึง 75.19 สายต้นที่ T34 สีกลีบดอกกึ่งกลางมีความสว่างมากที่สุด ($L^* = 75.19$) สายต้นที่ T25 สีกลีบดอกกึ่งกลางมีความสว่างน้อยที่สุด ($L^* = 26.60$) ค่า a^* อยู่ระหว่าง 10.47 ถึง 38.34 สายต้นที่ T34 สีกลีบดอกกึ่งกลางมีสีเขียวมากที่สุด ($a^* = -10.47$) และสายต้นที่ T33 สีกลีบดอกกึ่งกลางมีสีเขียวน้อยที่สุด ($a^* = 38.34$) และ ค่า b^* อยู่ระหว่าง -9.48 ถึง -34.19 สายต้นที่ T34 สีกลีบดอกกึ่งกลางมีสีเหลืองมากที่สุด ($b^* = -9.48$) สายต้นที่ T30 สีกลีบดอกกึ่งกลางมีสีเหลืองน้อยที่สุด ($b^* = -34.19$)

สีกลีบดอกกึ่งนอกทั้ง 32 สายต้นมีค่า L^* , a^* และ b^* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 3.4) ค่า L^* อยู่ระหว่าง 101.89 ถึง 58.87 สายต้นที่ T23 สีกลีบดอกกึ่งนอกมีความสว่างมากที่สุด ($L^* = 101.89$) สายต้นที่ T25 สีกลีบดอกกึ่งนอกมีความสว่างน้อยที่สุด ($L^* = 58.87$) ค่า a^* อยู่ระหว่าง -11.45 ถึง 16.28 สายต้นที่ T18 สีกลีบดอกกึ่งนอกมีสีเขียวมากที่สุด ($a^* = 16.28$) และสายต้นที่ T19 สีกลีบดอกกึ่งนอกมีสีเขียวน้อยที่สุด ($a^* = -11.45$) และ ค่า b^* อยู่ระหว่าง -17.50 ถึง 17.85 สายต้นที่ T25 สีกลีบดอกกึ่งนอกมีสีเหลืองมากที่สุด ($b^* = -1.50$) สายต้นที่ T19 สีกลีบดอกกึ่งนอกมีสีเหลืองน้อยที่สุด ($b^* = 17.85$)

ตารางที่ 4.1 สีด้านหลังใบของใบย่อยส่วนปลายของกวางเครือขาว

สาย ต้น	สีของหลังใบ									
	L*	a*	b*	x	y					
T1	39.04	l-p	-16.80	a-c	19.17	kl	0.3295	lm	0.4188	i-l
T2	39.78	k-o	-18.40	bc	21.23	i-k	0.3312	j-l	0.4288	e-l
T3	44.10	c-h	-21.77	c	27.42	a-e	0.3386	c-i	0.4492	a-c
T4	38.08	o-q	-16.11	a-c	18.53	k-m	0.3295	k-m	0.4165	j-l
T5	39.94	k-o	-16.98	a-c	20.29	jk	0.3324	i-l	0.4219	g-l
T6	38.63	m-p	-18.07	bc	20.14	jk	0.3288	l-n	0.4262	f-l
T7	40.82	h-o	-18.35	bc	22.30	f-k	0.3344	f-l	0.4308	d-k
T8	41.44	f-o	-19.46	c	23.07	d-k	0.3329	h-l	0.4337	c-j
T9	40.54	j-o	-19.65	c	22.55	e-k	0.3312	j-l	0.4349	c-i
T10	38.93	m-p	-16.11	a-c	18.30	k-m	0.3286	l-n	0.4140	k-m
T11	46.69	a-c	-23.33	c	30.40	a-c	0.3418	c-e	0.4569	a
T12	42.47	d-l	-20.05	c	24.20	c-j	0.3348	f-l	0.4376	b-g
T13	41.03	g-o	-19.29	c	22.71	e-k	0.3329	g-l	0.4338	c-j
T14	43.41	c-j	-21.95	c	28.15	a-c	0.3405	c-f	0.4544	a
T15	44.09	c-h	-19.81	c	24.90	c-j	0.3371	d-j	0.4364	b-h
T16	44.38	b-g	-21.31	c	26.78	a-h	0.3383	c-i	0.4458	a-e
T17	39.49	k-o	-18.34	bc	21.42	i-k	0.3319	i-l	0.4301	e-l
T18	44.89	a-e	-22.66	c	28.06	a-c	0.3388	c-i	0.4529	ab
T19	38.45	n-q	-15.37	a-c	18.37	k-m	0.3310	j-l	0.4133	lm
T20	40.62	i-o	-19.20	c	22.02	h-k	0.3311	j-l	0.4317	d-j
T21	44.51	b-f	-21.41	c	27.72	a-d	0.3406	c-f	0.4491	a-c
T22	44.05	c-i	-21.18	c	27.18	a-f	0.3398	c-g	0.4474	a-d
T23	35.88	p-q	-13.83	a-c	14.35	m	0.3226	n	0.3984	m
T24	35.42	q	-13.66	a-c	14.68	lm	0.3246	mn	0.4002	m
T25	42.70	d-k	-18.79	bc	24.65	c-i	0.3398	c-h	0.4369	b-h
T26	47.54	ab	-6.30	ab	31.14	a	0.3517	b	0.4522	ab
T27	40.73	h-o	-5.41	a	21.36	i-k	0.3370	d-j	0.4200	h-l
T28	39.54	k-o	-15.70	a-c	20.63	jk	0.3375	d-j	0.4216	g-l
T29	41.96	d-m	-16.83	a-c	22.06	h-k	0.3378	d-j	0.4246	f-l
T30	41.42	f-o	-17.17	a-c	20.79	i-k	0.3330	g-l	0.3338	o
T31	41.74	d-n	-5.48	a	22.16	g-k	0.3361	d-k	0.3361	o
T32	41.48	e-o	-17.39	a-c	20.84	i-k	0.3352	e-l	0.4205	g-l
T33	43.56	c-j	-18.64	bc	25.73	b-i	0.3429	cd	0.3429	o
T34	47.79	a	-14.20	a-c	28.38	a-c	0.3613	a	0.3604	n
T35	45.01	a-d	-19.10	c	27.03	a-g	0.3450	c	0.4410	a-f
T36	42.40	d-l	-18.15	bc	24.76	c-j	0.3420	c-e	0.4365	b-h
F-test	**	ns	**	**	**	**	**	**	**	**
CV(%)	4.18		36.4		10.93		1.04		2.09	

หมายเหตุ ^u ค่าเฉลี่ย 3 ใบ/ซ้ำ; จำแนกสีตามระบบของ The Hunter L*, a*, b* Color Space และค่า x และ y = ค่าสีตามระบบ CIE chromaticity diagram (DeMan, 1999); L* = ทิศทางสี ในด้านความสว่าง เริ่มจากมืด (สีดำ) L*= 0 ถึง สว่าง (สีขาว) L*= 100; a* = ทิศทางสี เริ่มจากสีแดง (+a) ถึง สีเขียว (-a), b*= ทิศทางสี เริ่มจากสีเหลือง (+b) ถึง สีนํ้าเงิน (-b);x และ y = ค่าสีตามระบบ CIE ซึ่งคำนวณจากค่า L*, a*, b*;ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 4.2 ลักษณะใบย่อยส่วนปลาย ขนบนส่วนของลำต้น และขนที่ฝักของกวาวเครือขาว

สาย ต้น	รูปร่างใบ	ฐานใบ	ปลายใบ	ขนบนส่วน ของลำต้น		ขนที่ฝัก		หมายเหตุ
				มี	ไม่มี	มี	ไม่มี	
T1	ovate	obtuse	cuspidate	/				ไม่ติดฝัก
T2	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T3	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T4	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T5	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T6	elliptic	acute	acuminate	/	/			
T7	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T8	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T9	ovate	obtuse	cuspidate	/				ไม่ติดฝัก
T10	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T11	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T12	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T13	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T14	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T15	elliptic	acute	acuminate	/				ไม่ติดฝัก
T16	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T17	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T18	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T19	elliptic	acute	acuminate	/				ไม่ติดฝัก
T20	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T21	ovate	obtuse	cuspidate	/		/		
T22	ovate	obtuse	cuspidate	/				ไม่ติดฝัก
T23	elliptic	acute	acuminate	/				ไม่ติดฝัก
T24	elliptic	acute	acuminate	/	/			
T25	elliptic	acute	acuminate	/		/		
T26	elliptic	acute	acuminate	/		/		

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

สาย ต้น	รูปร่างใบ	ฐานใบ	ปลายใบ	ขนบนส่วน		ขนที่ฝัก		หมายเหตุ
				ของลำต้น				
				มี	ไม่มี	มี	ไม่มี	
T27	elliptic	acute	acuminate		/			ไม่ติดฝัก
T28	ovate	obtuse	cuspidate		/			ไม่ติดฝัก
T29	elliptic	acute	acuminate		/		/	
T30	elliptic	acute	acuminate		/		/	
T31	elliptic	acute	acuminate		/		/	
T32	ovate	obtuse	cuspidate		/		/	
T33	elliptic	acute	acuminate		/			ไม่ติดฝัก
T34	elliptic	acute	acuminate		/			ไม่ติดฝัก
T35	elliptic	acute	acuminate		/		/	
T36	elliptic	acute	acuminate		/			ไม่ติดฝัก

หมายเหตุ : รูปร่างใบ [ovate (ใบรูปไข่) และ elliptic (ใบรูปรี)];ฐานใบ [obtuse (ฐานใบมน) และ acute (ฐานใบแหลม)];ปลายใบ [cuspidate (ปลายใบเป็นดิ่งแหลม) และacuminate (ปลายใบเรียวแหลม)]

ตารางที่ 4.3 สีของดอกบานคูกกลางและคูนอกของกวางเครือขาว

สายต้น	สีของหลังใบ											
	L*		a*		b*		L*		a*		b*	
T1	50.14	cd	22.28	k	-22.43	b-e	86.30	de	-2.37	f	5.87	c
T2	38.69	h-j	30.90	d-g	-23.60	c-f	77.27	h-j	6.70	cd	-6.29	i-k
T3	40.37	f-i	34.99	a-e	-27.93	g-i	77.54	h-j	4.41	g-k	-3.12	g-i
T4	44.36	e-g	31.14	c-g	-26.01	d-h	75.99	i-k	6.15	f-h	-4.62	h-j
T5	40.51	f-i	26.04	h-j	-21.30	bc	72.93	kl	5.79	f-i	5.58	c
T6	27.77	no	35.66	a-e	-28.90	h-j	84.84	d-f	0.32	l-o	0.75	e-g
T7	32.20	k-n	29.37	f-i	-18.96	b	77.79	h-j	2.89	h-m	-2.34	e-h
T8	35.99	i-k	37.11	a	-27.26	f-i	78.08	h-j	4.43	g-k	-2.10	e-h
T9	46.35	c-e	30.82	e-g	-25.90	d-h	80.48	gh	2.86	h-m	-1.22	e-h
T10	30.08	l-o	37.18	a	-26.48	e-i	82.18	fg	2.24	j-m	1.53	de
T11	31.97	k-n	35.47	a-e	-27.97	g-i	80.06	gh	2.70	i-m	-2.45	fh
T12	42.88	e-h	29.19	f-i	-26.23	e-i	74.63	jk	5.29	f-j	-7.18	jk
T13	40.86	f-i	37.04	a	-25.71	d-h	78.96	g-i	2.73	i-m	-0.55	e-g
T14	45.67	d-f	35.29	a-e	-22.11	b-d	91.15	c	-4.16	p	4.83	cd
T15	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง											
T16	50.87	c	31.88	b-g	-20.40	bc	77.44	h-j	11.90	bc	-8.29	k
T17	39.81	g-j	35.08	a-e	-26.40	e-i	84.09	ef	-1.31	n-p	4.70	cd
T18	28.33	m-o	37.82	a	-21.01	bc	63.38	n	16.28	a	-14.18	l
T19	58.52	b	27.25	g-l	-20.52	bc	101.73	a	-11.45	r	17.85	a
T20	35.20	j-l	34.74	a-e	-27.53	f-i	79.50	g-i	4.13	g-k	-3.10	g-i
T21	38.40	h-j	35.84	a-d	-29.13	h-j	79.57	g-i	2.94	h-m	-0.64	e-g
T22	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง											
T23	57.50	b	25.16	ij	-27.03	f-i	101.89	a	-11.30	r	16.89	a
T24	46.30	c-e	29.86	f-h	-24.04	c-g	97.86	b	-7.58	o	12.43	b
T25	26.60	o	34.74	a-e	-26.63	f-i	58.87	o	16.19	a	-17.50	m
T26	41.58	e-h	36.83	ab	-29.62	h-i	72.76	kl	9.28	c-e	-9.37	k
T27	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง											
T28	45.26	d-f	35.94	a-c	-27.56	f-i	79.29	g-i	4.27	g-k	-2.69	e-i
T29	44.07	e-g	31.94	b-g	-26.69	f-i	78.38	hi	2.39	j-m	1.19	ef
T30	32.88	k-n	37.83	a	-34.19	k	79.67	g-i	3.48	g-l	1.10	ef
T31	43.35	e-h	33.37	a-f	-30.43	ij	84.14	ef	1.38	k-n	4.89	cd
T32	30.82	k-o	37.75	a	-32.38	k	71.11	l	8.09	d-f	11.37	b
T33	31.13	k-o	38.34	a	-27.46	f-i	67.86	m	12.31	b	10.84	b
T34	75.19	a	10.47	k	-9.48	a	88.09	cd	-3.43	f	6.35	c
T35	33.18	k-m	38.17	a	-27.03	f-i	72.55	kl	10.69	b-d	-9.33	K
T36	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง											
F-test	**		**		**		**		**		**	
CV(%)	6.87		7.75		8.36		2.38		21.09		24.32	

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ย 3 ใบ/ช่อ; จำแนกสีตามระบบของ The Hunter L*, a*, b* Color Space และค่า x และ y = ค่าสีตามระบบ CIE chromaticity diagram (DeMan, 1999); L* = ทิศทางสี ในด้านความสว่าง เริ่มจากมืด (สีดำ) L*= 0 ถึง สว่าง (สีขาว) L*= 100; a* = ทิศทางสี เริ่มจากสีแดง (+a) ถึง สีเขียว (-a), b* = ทิศทางสี เริ่มจากสีเหลือง (+b) ถึง สีนํ้าเงิน (-b); x และ y = ค่าสีตามระบบ CIE ซึ่งคำนวณจากค่า L*, a*, b*; ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

4.1.1.6 ขนาดใบ พบว่ากวาวเครือขาว 36 สายต้น มีขนาดใบย่อยส่วนปลายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.4) ความยาวใบตั้งแต่ 8.1-23.63 cm ความกว้างใบตั้งแต่ 4.33-13.83 cm กวาวเครือขาวสายต้นที่ 5 มีขนาดใบใหญ่ที่สุด คือ ใบกว้าง 13.83 cm ยาว 23.63 cm กวาวเครือขาวสายต้นที่ 34 มีขนาดใบเล็กที่สุด คือ ใบกว้าง 4.33 cm ยาว 8.1 cm

4.1.1.7 ความยาวก้านช่อดอก พบว่ากวาวเครือขาว 36 สายต้น มีความยาวก้านช่อดอกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.4) ความยาวก้านช่อดอกตั้งแต่ 6.5-66.03 cm กวาวเครือขาวสายต้นที่ 4 มีความยาวก้านช่อดอกยาวที่สุด คือ 66.03 cm และกวาวเครือขาวสายต้นที่ 34 มีความยาวก้านช่อดอกสั้นที่สุด คือ 6.5 cm

จากการใช้ลักษณะใบในการจำแนก พบว่าสามารถจำแนกกวาวเครือขาวออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ได้ดังนี้ คือ กลุ่มที่ 1 ใบขนาดเล็ก รูปร่างใบรูปรี (elliptic), ฐานใบแหลม (acute) และปลายใบเป็นติ่งแหลม (cuspidate) กลุ่มที่ 2 รูปร่างใบรูปรี ฐานใบแหลม และปลายใบเป็นติ่งแหลม กลุ่มที่ 3 รูปร่างใบรูปไข่ (ovate), ฐานใบมน (obtuse) และปลายใบเรียวแหลม (acuminate) แต่ทั้ง 36 สายต้นไม่สามารถระบุได้ว่ามีความเกี่ยวเนื่องทางสายพันธุ์หรือไม่ จึงได้ใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่เก็บข้อมูลในการทดลองนี้ จำนวน 7 ลักษณะมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของกวาวเครือขาวที่รวบรวมไว้ วิเคราะห์ผลลักษณะที่บันทึกได้คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity จัดกลุ่มความสัมพันธ์สร้างเดนโดรแกรมด้วย UPGMA (ภาพที่ 4.1) และวิธี PCA (ภาพที่ 4.2) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Genetic Similarity: GS) พบว่าค่า GS มีค่าระหว่าง 0.57-0.97 โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.77 ที่ความสัมพันธ์ 0.65 แยกได้ 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ 34 ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากกลุ่มอื่นที่เด่นชัด คือ ใบมีลักษณะขนาดเล็ก รูปรี ฐานใบแหลม และปลายใบเรียวแหลม

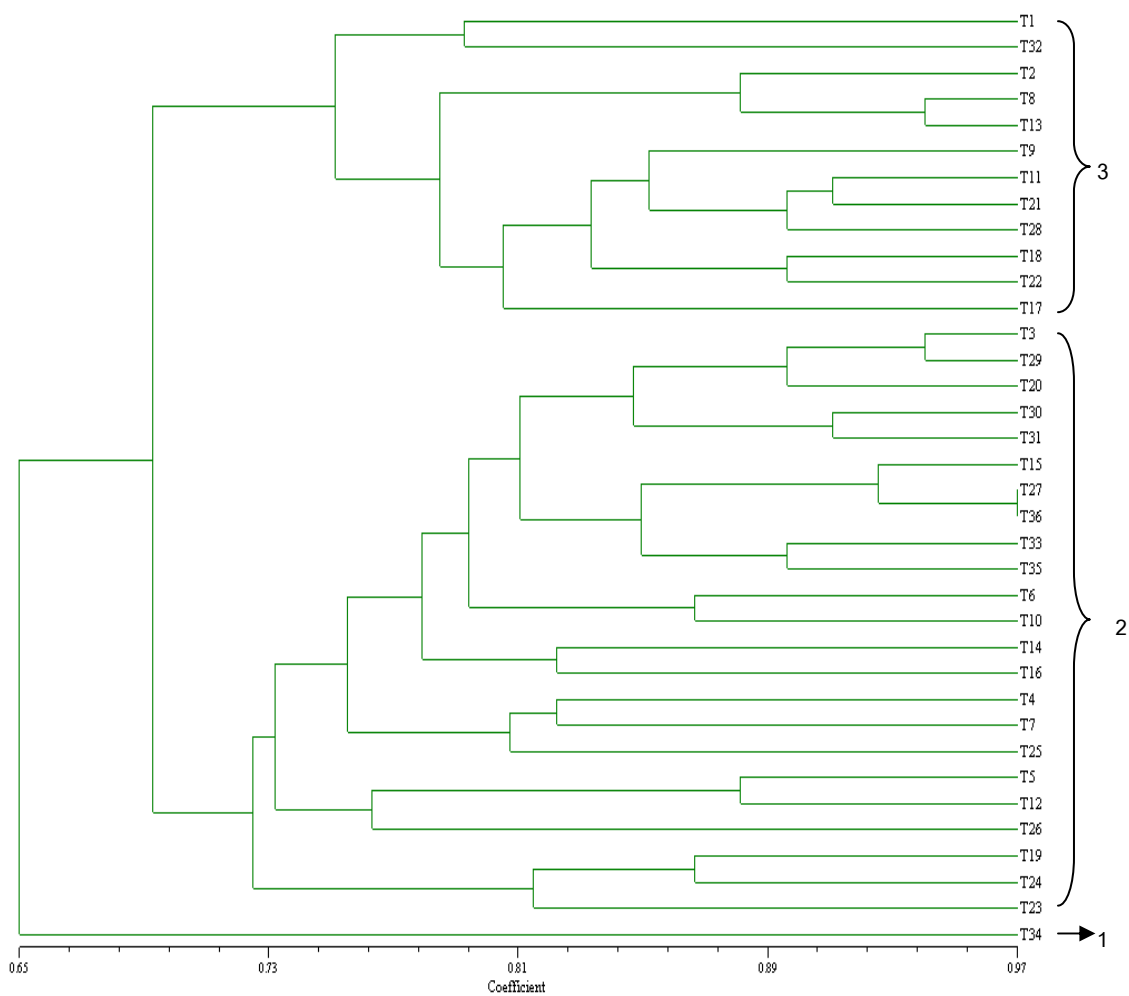
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 23 สายต้น มีลักษณะใบที่ค่อนข้างใกล้เคียงกับสายต้นที่ 34 พบว่าสายต้นที่ 27 และ 36 มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากที่สุดในระดับ 0.97

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 12 สายต้น ใบมีลักษณะรูปไข่ ฐานใบมน และปลายใบเป็นติ่งแหลม ผลการจัดกลุ่มด้วยวิธีนี้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วย bootstraps มีค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการวิเคราะห์ระหว่าง 2-80.9% คล้ายคลึงกับลักษณะที่รายงานโดย Dithachaiyawong *et al.* (2005) จากการวิเคราะห์ค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (GS) ของกลุ่มตัวอย่าง พบว่า มีค่าระหว่าง 0.57-0.97 แสดงให้เห็นว่าลักษณะภายนอกมีความแตกต่างกันมาก ทั้งนี้สายต้นที่ 34 มีลักษณะที่ต่างจากต้นอื่นๆ อย่างเด่นชัด

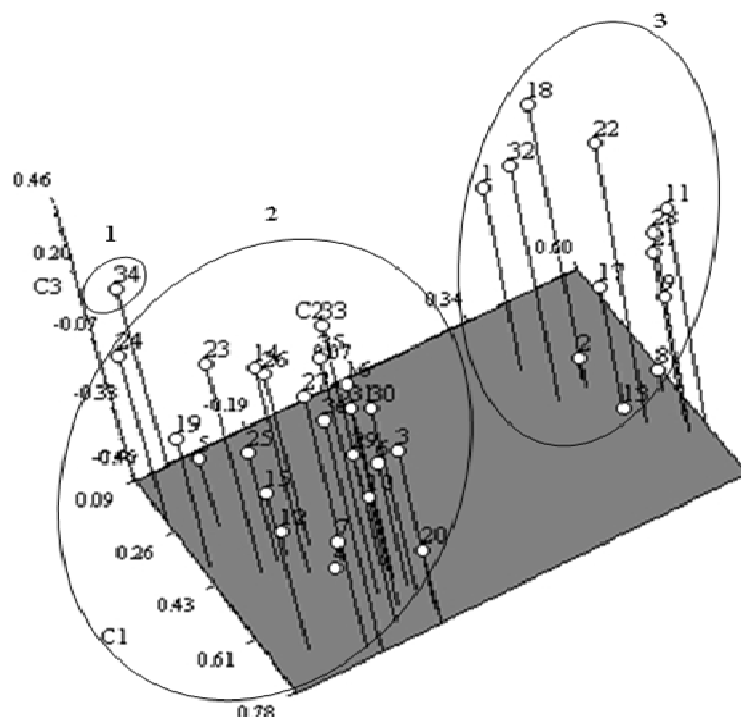
ตารางที่ 4.4 ขนาดใบและความยาวก้านช่อดอกของกวาวเครือขาว

สายต้น	ใบย่อยส่วนปลาย(cm) ^U				ความยาวก้านช่อดอก(cm) ^U	
	ยาว		กว้าง			
T1	12.17	j-m	8.23	h-l	50.13	b-d
T2	16.80	c-f	10.50	c-e	48.17	c-f
T3	14.20	e-k	7.27	k-m	32.57	h-n
T4	19.53	bc	12.73	ab	66.03	a
T5	23.63	a	13.83	a	44.73	c-g
T6	14.17	e-k	9.30	e-j	40.20	d-i
T7	17.87	b-d	10.37	c-e	48.83	c-e
T8	15.93	d-i	10.80	c-e	53.77	bc
T9	13.77	f-l	9.53	d-h	49.47	c-e
T10	16.17	d-h	10.70	c-e	36.93	f-k
T11	13.07	g-m	9.53	d-h	35.37	g-l
T12	20.13	b	11.67	bc	34.33	g-m
T13	16.43	c-g	11.03	cd	28.77	i-o
T14	17.30	b-e	9.23	e-j	25.00	l-p
T15	15.6	d-j	7.93	h-l	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง	
T16	13.17	g-m	7.90	h-l	48.63	c-e
T17	14.23	e-k	9.40	e-i	38.10	e-j
T18	13.57	f-m	8.30	g-l	36.75	g-k
T19	17.83	b-d	9.93	d-g	42.30	c-h
T20	13.77	f-l	8.47	g-l	23.33	m-p
T21	12.80	h-m	7.37	k-m	14.70	pq
T22	12.00	k-m	8.87	f-k	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง	
T23	14.50	k-n	8.03	h-l	23.23	m-p
T24	15.97	d-i	8.40	g-l	35.57	g-l
T25	15.83	d-i	10.27	c-e	60.27	ab
T26	10.57	l-n	4.73	op	27.33	j-o
T27	12.83	h-m	7.47	kl	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง	
T28	12.50	i-m	9.23	e-j	25.77	k-p
T29	10.70	k-n	5.90	m-o	21.23	n-p
T30	13.00	g-m	7.77	i-l	27.77	j-o
T31	10.17	mn	5.77	n-p	22.60	n-p
T32	12.60	i-m	8.47	g-l	48.33	c-f
T33	14.10	e-l	8.00	h-l	45.10	c-g
T34	8.10	n	4.33	j-l	6.50	q
T35	13.83	e-l	7.70	l-n	20.23	op
T36	11.97	k-m	7.00	k	ไม่ออกดอกช่วงการทดลอง	
F-test	**		**		**	
CV (%)	12.34		9.60		18.87	

หมายเหตุ: ^U ค่าเฉลี่ย 3 ใบ/ช่อดอก; ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



ภาพที่ 4.1 เดนโดแกรมความสัมพันธ์ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะของกวางเครือขาว 36 สายต้น คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x



ภาพที่ 4.2 ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างถั่วเขียว 36 สายต้น โดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ (สีด้านหลังใบ ลักษณะใบ ขนบนส่วนของลำต้น ขนที่ฝัก สีของดอก ขนาดของใบ และความยาวก้านช่อดอก) จากการวิเคราะห์โดย PCA

4.1.2 ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผลการทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR จำนวน 41 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถตรวจจับแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 355 ตำแหน่ง คิดเป็น 8.66 ตำแหน่งต่อไพรเมอร์ โดยมีขนาดของแถบตั้งแต่ 280 bp ถึง 1,550 bp ในจำนวนนี้มีตำแหน่งดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic) จำนวน 293 ตำแหน่ง คิดเป็น 82.54% ของทั้งหมด และเป็นตำแหน่งที่ไม่แตกต่างกัน (monomorphic) จำนวน 62 ตำแหน่ง คิดเป็น 17.46% ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ผลจากการตรวจสอบประสิทธิภาพของ ISSR และเทคนิคที่ใช้โดยการวิเคราะห์ค่า Polymorphism Information Content (PIC) ซึ่งบอกคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้น ๆ ว่ามีประโยชน์ในการนำไปใช้มากหรือน้อย จากผลการทดลองพบว่า มีค่าระหว่าง 0.0315-0.9779 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 0.4779 ทั้งนี้การใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR ของการทดลองนี้มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ ISSR markers ของ Muthusamy, Kanagarajan and Ponnusamy (2008) ในการจำแนก rice bean (*Vigna umbellata* (Thunb.) ซึ่งมีค่า

PIC เท่ากับ 0.203 เช่นเดียวกันกับงานทดลองของ Thimmappaiah *et al.* (2009) ที่ใช้เทคนิค ISSR makers ในการจำแนกความหลากหลายของมะม่วงหิมพานต์ในประเทศอินเดีย พบว่ามีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.304 และ Tantasawat *et al.* (2010) ใช้เทคนิค ISSR จำแนกและเปรียบเทียบพันธุ์ถั่วฝักยาวในประเทศไทย มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.137-0.276 (PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.197)

เมื่อเปรียบเทียบการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR กับการใช้ชนิด SSR ของ Benor *et al.* (2008) ในการจำแนกสายพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์ที่ผสมตัวเอง (inbred lines) ของประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และสหรัฐอเมริกา พบว่ามีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.31 แต่ ISSR-Touchdown PCR ที่ใช้ในการทดลองนี้ให้ค่า PIC ที่สูงกว่า (0.4779) ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด ISSR เป็นการตรวจสอบเบสซ้ำเช่นเดียวกันภายในจีโนมพืช และเมื่อเปรียบเทียบกับ RAPD และพบว่า ISSR ที่ใช้ในการทดลองนี้มีประสิทธิภาพดีกว่า โดยจากการรายงานของ Muthusamy, Kanagarajan and Ponnusamy (2008) ซึ่งใช้เทคนิควิธี RAPD ในการจำแนก rice bean (*Vigna umbellata* (Thunb.) มีค่า PIC เท่ากับ 0.243 เช่นเดียวกับ Thimmappaiah *et al.* (2009) ที่จำแนกความหลากหลายของมะม่วงหิมพานต์ในประเทศอินเดีย โดยใช้เทคนิควิธี RAPD เช่นกันมีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.312 อย่างไรก็ตามค่า PIC จากเทคนิค ISSR-Touchdown PCR ของการทดลองนี้ มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าการใช้เทคนิควิธี SSR markers ในการจำแนกและเปรียบเทียบถั่วฝักยาวในประเทศไทย ซึ่งมีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.251-0.752 (PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.597) (Tantasawat *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามเทคนิค ISSR-Touchdown PCR ในการทดลองนี้มีค่า PIC ของไพรเมอร์ที่มีค่าสูงสุด คือ 0.9779 ซึ่งขึ้นกับการเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทดลอง และมีค่า No. of effective alleles per locus (N_e) หมายถึง จำนวนอัลลีลที่เหมาะสมต่อโลกัส อยู่ระหว่าง 1.1250-1.8541 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 1.5544 จึงสรุปได้ว่าการใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR มีคุณสมบัติในการจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10x โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงด้วยวิธี Jaccard similarity จัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA และสร้าง dendrogram ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังแสดงในภาพที่ 4.3 ผลจากการวิเคราะห์ Similarity Coefficient พบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.50-0.86 (50-86 %) จากแผนโคโรแกรม UPGMA (ภาพที่ 4.3) สามารถจัดกลุ่มกวางเครือขาวออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ที่ระดับ 56% และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีกที่ระดับ 69% (ภาพที่ 4.3) เมื่อเปรียบเทียบความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ดีเอ็นเอของกวางเครือขาวจาก UPGMA ด้วยการวิเคราะห์ค่า Bootstraps พบว่าผลการจัดกลุ่มใกล้เคียงกับ UPGMA สายต้นที่ใกล้ชิดกันยังอยู่ใกล้ชิดกันโดยมีค่าความเชื่อมั่นที่ได้จากการวิเคราะห์ Bootstraps อยู่ระหว่าง 0.3-90.5% ผลการวิเคราะห์ UPGMA สามารถแยกได้ออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 4.3) ที่ระดับ GS 56%

ตารางที่ 4.5 ไพรเมอร์ ISSR ที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของกวางเครือขาว และลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงถึงความแตกต่าง (polymorphisms) ค่า polymorphism information content (PIC) และค่า No. of effective alleles per locus (N_e) ของแต่ละไพรเมอร์

No.	Primer	Sequence 5' → 3'	Total no. of Bands	Monomorphic	Polymorphic	PIC	N_e
1	ISSR10	(GA) ₈ T	11	0	11	0.5386	1.7102
2	ISSR12	(GA) ₈ A	10	1	9	0.3820	1.7215
3	ISSR13	(CT) ₈ T	11	0	11	0.7134	1.7097
4	ISSR15	(CT) ₈ G	11	0	11	0.8786	1.5120
5	ISSR16	(CA) ₈ T	10	6	4	0.0602	1.6379
6	ISSR17	(GA) ₈ A	6	5	1	0.0816	1.6498
7	ISSR20	(GT) ₈ C	4	0	4	0.3511	1.4500
8	ISSR22	(TC) ₈ A	5	0	5	0.2392	1.7914
9	ISSR23	(TC) ₈ C	10	1	9	0.2246	1.6203
10	ISSR26	(AC) ₈ C	11	3	8	0.2498	1.3097
11	ISSR27	(AC) ₈ G	13	0	13	0.5207	1.3113
12	ISSR34	(AG) ₈ YT	8	0	8	0.4352	1.5848
13	ISSR36	(AG) ₈ YA	8	0	8	0.3677	1.8010
14	ISSR40	(GA) ₈ YT	9	3	6	0.8516	1.5441
15	ISSR42	(GA) ₈ YG	10	4	6	0.3331	1.3331
16	ISSR46	(CA) ₈ RT	10	0	10	0.6624	1.4261
17	ISSR48	(CA) ₈ RG	11	1	10	0.6653	1.5236
18	ISSR50	(GT) ₈ YC	6	0	6	0.5149	1.5682
19	ISSR51	(GT) ₈ YG	8	0	8	0.2160	1.1250
20	ISSR55	A (CA) ₂ CYT	12	2	10	0.3361	1.5892
21	ISSR56	(AC) ₈ YA	11	3	8	0.2144	1.4782
22	ISSR57	(AC) ₈ YG	9	1	8	0.3757	1.5221
23	ISSR60	(ACC) ₆	8	0	8	0.3009	1.5650
24	ISSR66	CT(CCT) ₅ C	8	7	1	0.0615	1.7906
25	ISSR67	(GGC) ₆	10	0	10	0.4080	1.5731
26	ISSR68	(GAA) ₆	7	4	3	0.0315	1.6480
27	ISSR69	(GTT) ₆	10	0	10	0.3941	1.5142
28	ISSR73	(GACA) ₄	10	0	10	0.6898	1.6480
29	ISSR74	(CCCT) ₄	9	0	9	0.3190	1.6648
30	ISSR78	(GGAT) ₄	6	0	6	0.4082	1.7085
31	ISSR80	(GGAGA) ₃	9	0	9	0.6669	1.8541
32	ISSR81	(GGGTG) ₃	10	1	9	0.4037	1.8022
33	ISSR84	HBH(AG) ₃	10	1	9	0.2728	1.6400
34	ISSR85	BHB(GA) ₃	6	4	2	0.9633	1.1776
35	ISSR86	VDV(CT) ₃	11	3	8	0.8036	1.5170
36	ISSR87	DVD(TC) ₃	8	2	6	0.8025	1.4725
37	ISSR89	DBD(AC) ₃	5	3	2	0.9779	1.1515
38	ISSR90	VHV(GT) ₃	7	4	3	0.7972	1.3413
39	ISSR91	HVH(TG) ₃	7	3	4	0.8403	1.4032
40	ISSR95	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC	5	0	5	0.2178	1.6556
41	ISSR98	GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G	5	0	5	0.7511	1.6828
Total			355	62	293	19.5924	63.7292
Average			8.66	17.46	83.54	0.4779	1.5544

หมายเหตุ : B=(C, G, T), D=(A, G, T), H=(A, C, T), R=(A, G), Y=(C, T), V=(A, C, G)

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ T34 และสายต้นที่ T7

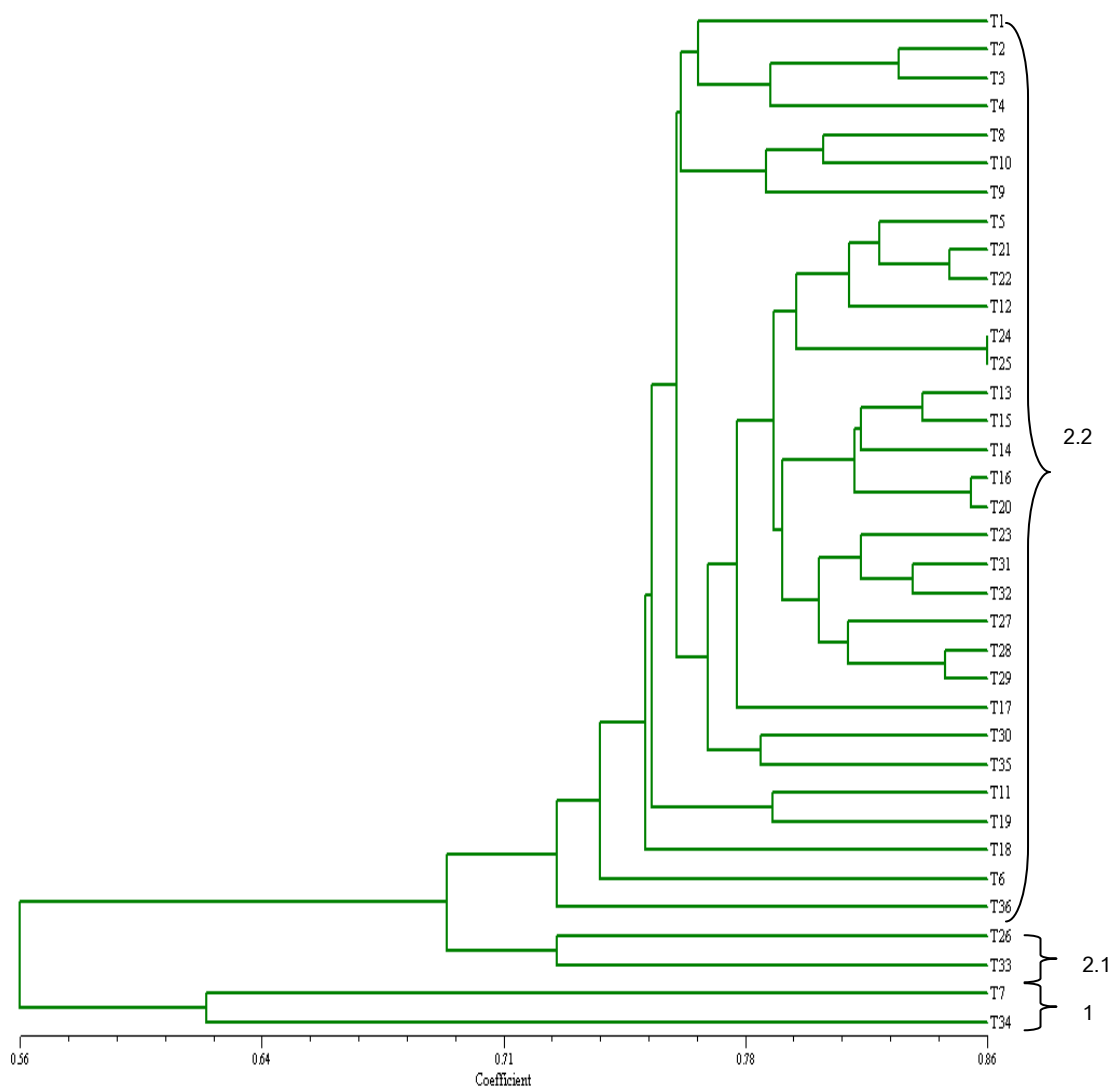
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือจำนวน 34 สายต้นแยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ที่ระดับ GS 69%

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วย 2 สายต้น คือ สายต้นที่ T26 และสายต้นที่ T33

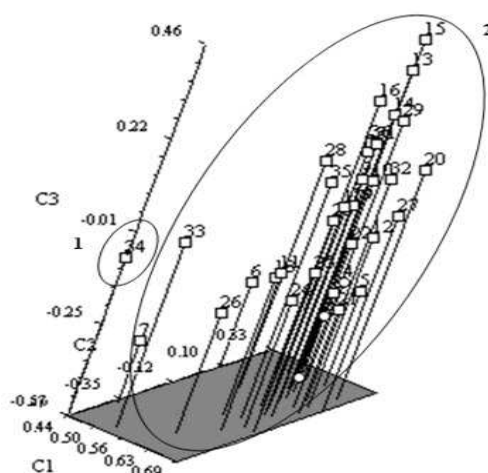
กลุ่มย่อยที่ 2.2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือ 32 สายต้น คือ สายต้นที่ T1-6, T8-25, T27-32, T35 และ T36

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี PCA (ภาพที่ 4.4) พบว่าการจัดกลุ่มสามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ สายต้นที่ T34 แยกตัวออกจากกลุ่มอื่นอย่างเด่นชัดเช่นเดียวกับสายต้นที่ T7, T26 และ T33 สายต้นที่เหลือจำนวน 32 สายต้น และมีการกระจุกตัวอยู่เป็นกลุ่มเดียวกัน

ทั้งนี้สายต้นที่ 34 มีลักษณะที่ต่างจากต้นอื่นๆ อย่างเด่นชัด ซึ่งปรากฏทั้งในข้อมูลการแยกด้วยลักษณะทางพฤกษศาสตร์และดีเอ็นเอ ผลการแยกกลุ่มด้วยลักษณะทางพฤกษศาสตร์ให้ผลสอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะทางดีเอ็นเอ โดยมีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (GS) ของกลุ่มตัวอย่างโดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR มีค่าระหว่าง 0.50-0.86 แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ถึงแม้ว่าสายต้นภายในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 34 สายต้น คือ สายต้นที่ T1-6, T8-33, T35 และ T36 จะมีลักษณะใบที่แตกต่างกัน แต่ผลการวิเคราะห์ทางดีเอ็นเอจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงว่าตำแหน่งที่ตรวจจับด้วย ISSR นั้นอาจไม่สัมพันธ์กับตำแหน่งที่ควบคุมการแสดงออกของใบเช่นเดียวกับรายงานของ Dithachaiyawong *et al.* (2005) ที่พบว่าลักษณะใบมีความแตกต่างกันถึงแม้จะมาจากจังหวัดเดียวกัน เนื่องจากความเครียดอาจเป็นพืชตระกูลถั่วและมีโอกาสการผสมข้ามได้ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของความแปรปรวนนี้ (Mackie and Smith, 1935)



ภาพที่ 4.3 เดนโดแกรมความสัมพันธ์ของกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR. คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x



ภาพที่ 4.4 ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR จากการวิเคราะห์โดย PCA

ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นเมื่อทดลองรวม 2 ลักษณะเข้าด้วยกัน เนื่องจากเครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องหมายแบบคู่ที่จับลำดับเบสซ้ำในช่วงสั้น ๆ ประมาณ 1-6 คู่เบส ที่มีการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม ซึ่งส่วนใหญ่ไม่ใช่ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมการแสดงออก (Reddy, Sarla and Suddiq, 2002) จึงอาจไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ใช้ในการจัดจำแนกหากใช้สมมุติฐานว่า ตำแหน่งของดีเอ็นเอไม่สัมพันธ์กับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ตรวจสอบ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการใช้ความแตกต่างของใบ ผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA และสร้าง dendrogram ความสัมพันธ์ดังแสดงในภาพที่ 4.5 มีค่าความใกล้เคียงทางพันธุกรรม (GS) ของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 36 สายต้นมีค่าระหว่าง 0.50-0.83 (50-83%) จากภาพที่ 3.6 มีจัดกลุ่มกวาวเครือขาวออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ที่ระดับ GS 53% และสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีกที่ระดับ GS 66% เมื่อเปรียบเทียบความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA ด้วยการวิเคราะห์ค่า bootstraps พบว่า ผลการจัดกลุ่มใกล้เคียงกับ UPGMA มีค่าความเชื่อมั่นระหว่าง 1.2-96.4% ผลการวิเคราะห์ UPGMA สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 4.5) ที่ระดับ GS 53%

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สายต้นที่ T34 และสายต้นที่ T7

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือจำนวน 34 สายต้น แยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อยที่ระดับ GS 66%

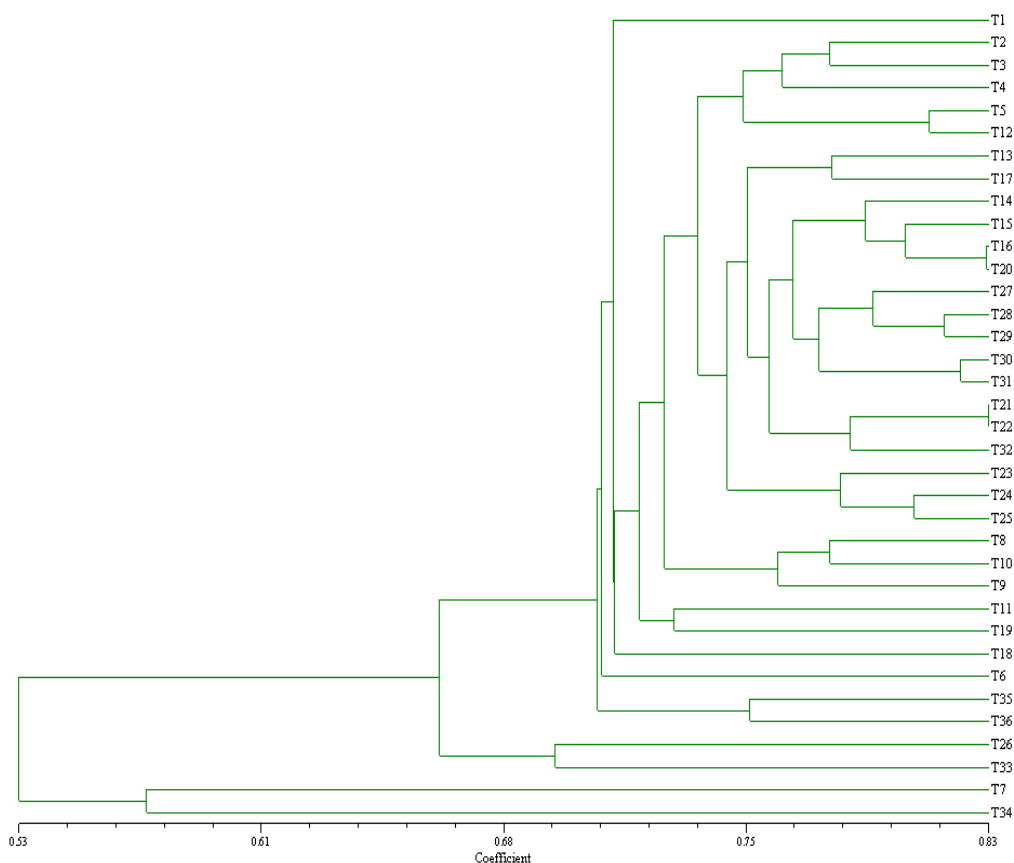
กลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วย 2 สายต้น คือ สายต้นที่ T26 และสายต้นที่ T33

กลุ่มย่อยที่ 2.2 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลือ 32 สายต้น คือ สายต้นที่ T1-6, T8-25,

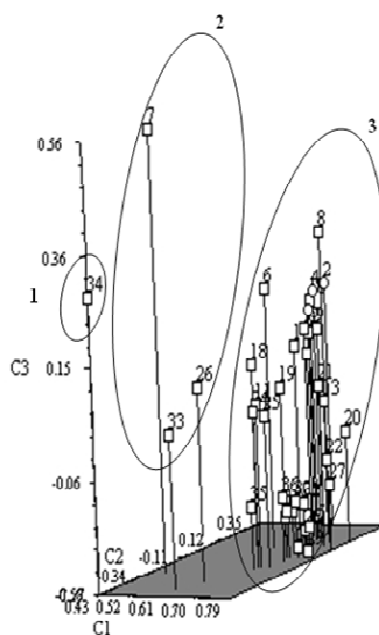
T27-32, T35 และ T36

ทั้งนี้ผลการรวม 2 ลักษณะเข้าด้วยกันให้ผลการจัดกลุ่ม UPGMA ใกล้เคียงกับการใช้ลักษณะดีเอ็นเอของกวาวเครือขาวในการจำแนกพันธุ์

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี PCA (ภาพที่ 4.6) พบว่าการจัดกลุ่มสามารถ 3 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 คือ สายต้นที่ T34 กลุ่มที่ 2 สายต้นที่ T7, T26 และ T33 และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสายต้นที่เหลืออีก 32 สายต้น โดยมีการกระจุกตัวอยู่เป็นกลุ่มเดียวกัน ทั้งนี้การรวมลักษณะทั้ง 2 นี้เข้าด้วยกันทำให้คาดได้ว่า พันธุกรรมของกวาวเครือขาวที่มีการรวบรวมไว้นี้มาจาก 5 ฐานพันธุกรรมใหญ่หรือต้นพันธุ์ โดยฐานที่ 1 คือ สายต้นที่ 34 ฐานที่ 2, 3,4 คือ สายต้นที่ 7, 26, 33 (ตามลำดับ) และฐานที่ 5 มีสมาชิกในกลุ่มมากที่สุดจำนวน 32 สายต้น ซึ่งน่าจะเป็นกลุ่มจากแม่พันธุ์ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน และจากผลการทดลองทั้งในลักษณะทางพฤกษศาสตร์ และดีเอ็นเอ พบว่าไม่มีต้นใดมีพันธุกรรมเดียวกัน ทุกต้นมีความแตกต่างกันทั้งหมด



ภาพที่ 4.5 เดนโดแกรมความสัมพันธ์ของกวาวเครือขาว 36 สายต้น โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงตามวิธี Jaccard similarity และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10x



ภาพที่ 4.6 ภาพ 3 มิติแสดงการกระจายตัวของกลุ่มตัวอย่างกวาวเครือขาว 36 สายต้นโดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR ร่วมกับลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ จากการวิเคราะห์โดย PCA

4.1.3 โครงสร้างทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจาก PCA (ภาพที่ 4.4) พบว่าทั้ง 2 กลุ่มมีการกระจุกตัวอยู่ในตำแหน่งต่างกัน ผลการวิเคราะห์ค่าดัชนีความหลากหลาย (Shannon' information index; I) ของกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีค่าระหว่าง 0.1550-0.4473 (ตารางที่ 4.6) โดยกลุ่มประชากรในกลุ่มที่ 1 มีค่าดัชนีความหลากหลายน้อยที่สุดเนื่องจากจำนวนประชากรมีปริมาณน้อย การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรกวาวเครือขาว ทั้ง 2 กลุ่ม (ตารางที่ 4.7) พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity : H_t) เท่ากับ 0.2885 ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic diversity of population : H_s) เท่ากับ 0.2048 และค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (coefficient of genetic differentiation : G_{st}) เท่ากับ 0.2901 แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระดับกว้าง แต่ความแตกต่างหรือความแปรปรวนที่เกิดขึ้นนั้นส่วนใหญ่เกิดจากความแตกต่างภายในกลุ่มประชากรเอง (70.99%) มากกว่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร (29.01%) และพบว่ามีค่าการถ่ายเทยีน (gene flow; N_m) เท่ากับ 1.2235 แสดงให้เห็นว่ามีการ

แลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรในระดับต่ำ (ตารางที่ 4.7) แสดงว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมประชากรกวาวเครือขาวที่รวบรวมไว้นี้เกิดจาก plant to plant variation หรือเกิดจากการกระจายตัวของลักษณะ heterosis มีการผสมข้ามกับพันธุ์ที่มาจากแหล่งอื่น (open pollination) น้อย การวิเคราะห์ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Nei's genetic identity) มีค่าเท่ากับ 0.8145 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เท่ากับ 0.2052 และระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรทั้ง 2 กลุ่มเท่ากับ 10.25974 (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.6 ค่าดัชนีความหลากหลาย (Shannon' information index; I) ของกวาวเครือขาว 2 กลุ่ม โดยการวิเคราะห์ด้วย ISSR-Touchdown PCR

	Group 1	Group 2	Total
sample	2	34	36
I	0.1550	0.4473	0.4583
St.Dev	0.2644	0.2554	0.2457

ตารางที่ 4.7 โครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรกวาวเครือขาว (population genetic structure) แสดงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity; Ht), ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic diversity of population; Hs), ค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างระหว่างประชากร (coefficient of genetic differentiation ; Gst) และค่า gene floating (Nm)

List	Ht	Hs	Gst	Nm
Mean	0.2885	0.2048	0.2901	1.2235
St.Dev.	0.0319	0.0194		

ตารางที่ 4.8 ค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Nei's genetic identity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างกลุ่มพันธุ์กวาวเครือขาว 2 กลุ่ม และเดนโดรแกรมแสดงระยะห่างทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ด้วย Nei's genetic distance method (1972) and UPGMA by using PHYLIP V. 3.5

		Genetic distance		Genetic identity	
pop ID		1	2		
Genetic distance	1	****	0.8145		
	2	0.2052	****		

```

+-----10.25974 -----pop1
--1
+-----10.25974 -----pop2

```

4.2 การทดลองที่สอง ชนิดและความเข้มข้นของสารชักนำต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว

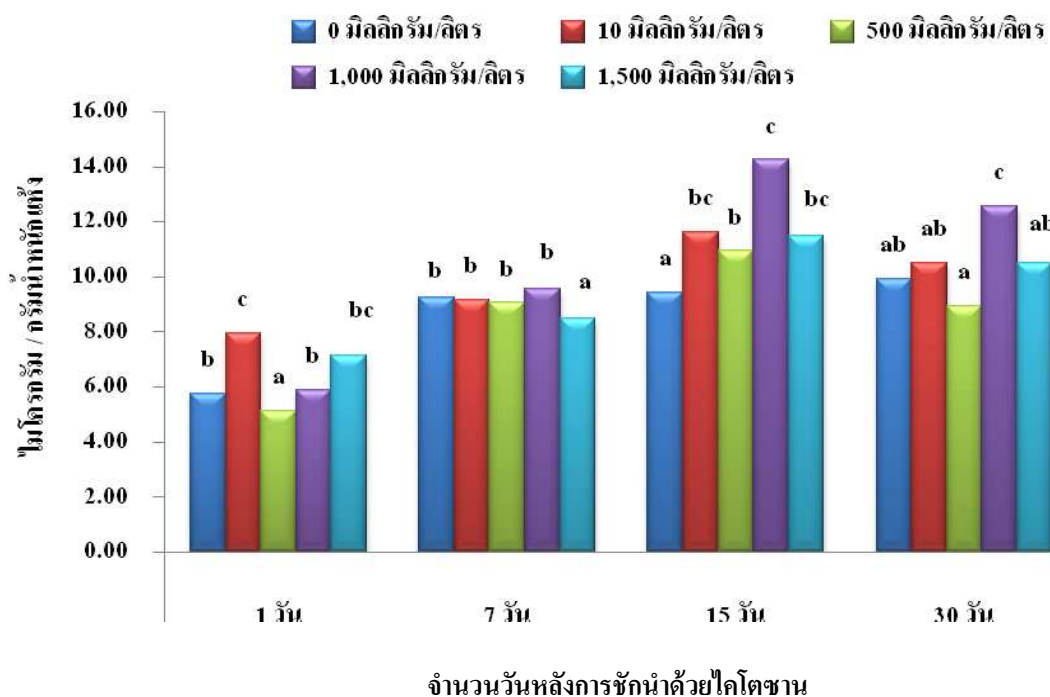
จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของสารชักนำแต่ละชนิดและจำนวนวันหลังการชักนำครั้งสุดท้ายต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต่อปัจจัยที่คาดว่าจะมีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกวาวเครือขาว เช่น ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ ได้ผลดังต่อไปนี้

4.2.1 การชักนำด้วยไลโคซาน

เมื่อการชักนำด้วยไลโคซานทั้ง 5 ความเข้มข้น (0 10 500 1,000 และ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร) แล้วมีผลต่อตัวแปรต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

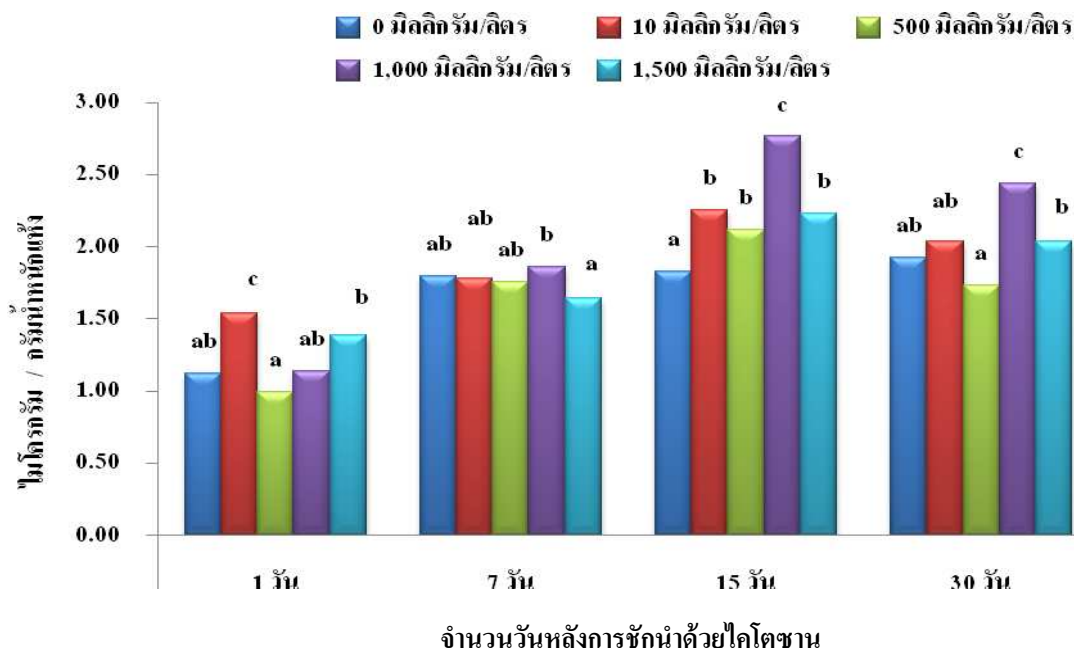
4.2.1.1 ผลต่อสารปริมาณของประกอบฟีนอลิก พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้นที่ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในหัวกวาวเครือขาว สูงที่สุด คือ 14.0 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดลองและยังสูงกว่าที่พบในวันที่ 1 วันที่ 7 และวันที่ 30 ที่ใช้ความเข้มข้นเดียวกัน ถึง 58.7, 32.8 และ 11.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7) แสดงว่าสารไลโคซานสามารถชักนำสารประกอบฟีนอลิกให้เพิ่มขึ้นได้ สอดคล้องกับ Khan *et al.* (2003) ที่พบว่าการฉีดพ่นไลโคซานในถั่วเหลืองสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) และ tyrosine ammonia-lyase (TAL) และทำให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น ดังนั้น ความ

เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร จึงเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการชักนำ การใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า เช่น 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร จะได้ผลที่ต่ำลง แสดงว่าสารฟีนอลิกตอบสนองเป็นแบบระฆังคว่ำ (bell shape) ต่อความเข้มข้นของสารชักนำที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณสารจะเพิ่มสูงสุดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ถ้าความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอีกจะทำให้ปริมาณสารลดลง สอดคล้องกับการชักนำสารไอโซฟลาโวนอยด์ในถั่วเหลือง โดย Kneer *et al.* (1999)



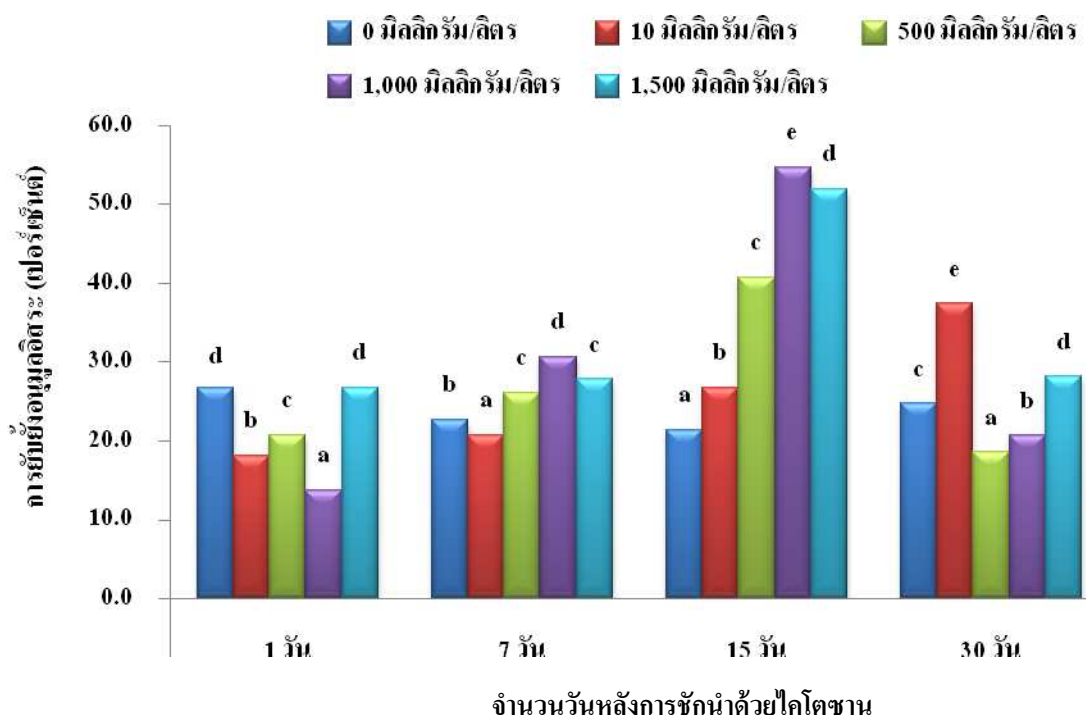
ภาพที่ 4.7 สารฟีนอลิกหลังการชักนำด้วยไคโตซาน

4.2.1.2 ผลต่อสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่า มีผลคล้ายกับผลต่อสารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจสอบในข้างต้น คือ วันที่ 15 หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ สูงที่สุดคือ 2.76 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดลอง (ภาพที่ 4.8) สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่าไคโตซานเพิ่มปริมาณของฟลาโวนอยด์ในถั่วลูปินได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากสารฟลาโวนอยด์เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิก (Santos and Mira, 2004) กลไกของการชักนำ น่าจะไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL (Inui *et al.*, 1997)



ภาพที่ 4.8 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังการชักนำด้วยไคโตซาน

4.2.1.3 ผลต่อการยับยั้งอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 15 วัน มีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งสารอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 54.7 เปอร์เซ็นต์ (สูงกว่ากลุ่มควบคุมในวันเดียวกันถึง 61 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่น ๆ (ภาพที่ 4.9) ซึ่งอาจเกิดผลของการมีสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ ที่เพิ่มขึ้น ดังที่พบในการทดลองข้างต้น เนื่องจากสารทั้งสองกลุ่มเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ทำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น สอดคล้องกับ Ding *et al.* (2002) ที่พบว่าปริมาณของสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีสหสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อกัน หรืออาจเกิดจากค่า pH ของสารละลายไคโตซานที่เป็นกรด เมื่อใช้ชักนำหลายครั้งโดยการคลุกกับดิน อาจมีผลเปลี่ยนแปลงค่า pH ของดินให้เป็นกรดด้วย จนเกิดความเปลี่ยนแปลงของความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชในดินได้ เนื่องจากขณะทำการทดลองไม่ได้วัด pH ของดิน ข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นเพียงข้อสันนิษฐานของผู้วิจัยเท่านั้น ยงยุทธ โอสดสภา (2543) กล่าวถึงความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหารพืชในสภาวะดินกรดว่า ธาตุแคลเซียม แมกนีเซียมและโพแทสเซียมจะละลายได้ง่ายขึ้น แต่ฟอสฟอรัสจะถูกตรึงทำให้ละลายได้ยาก การมีธาตุบางอย่างละลายได้มากขึ้นอาจมีผลต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ การมีไนโตรเจนสูงจะลดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วย วิธี DPPH และ FRAP ลง แต่การมีกำมะถันเพิ่มขึ้นจะทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชเพิ่มขึ้น

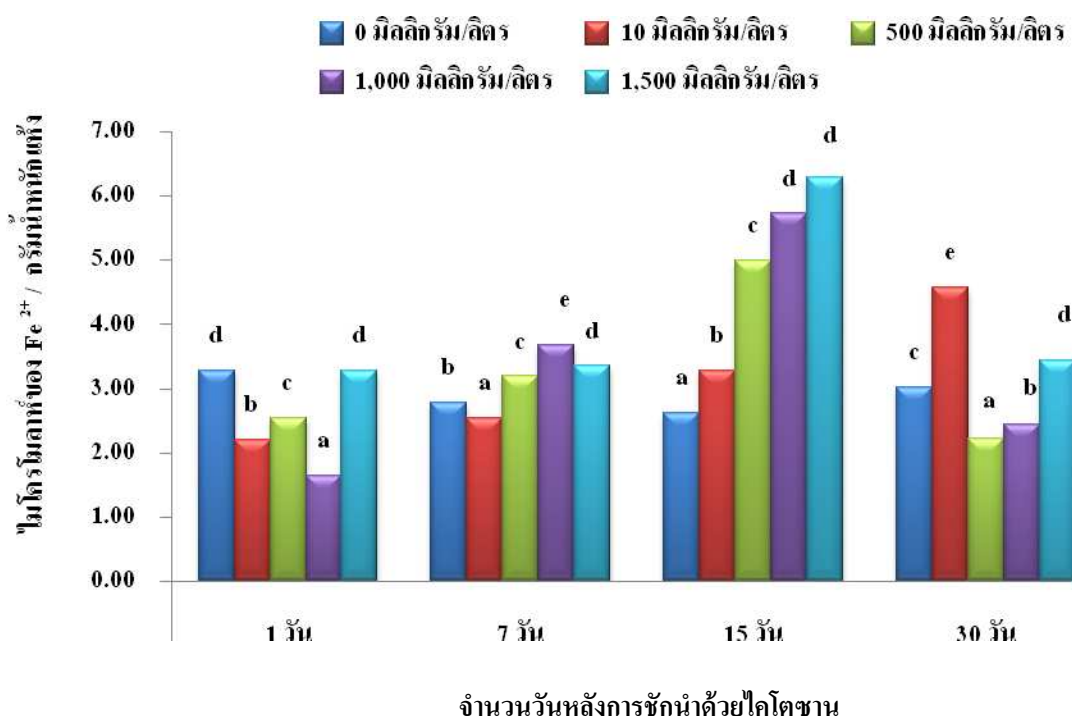


ภาพที่ 4.9ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยไอโตซาน

4.2.1.4 ผลต่อการเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP พบว่าที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยไอโตซานความเข้มข้นที่ 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร และ 1,500 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระของสารสกัดควาวเครือขาวของทั้งสองความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 5.72 และ 6.29 ไมโครโมลาร์ของ Fe^{2+} /กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับและไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่น การชักนำเพิ่มความสามารถในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่วันที่ 1 และมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 15 หลังจากนั้นจะลดต่ำลงจนใกล้เคียงกับผลในวันที่ 1 (ภาพที่ 4.10) ซึ่งอาจเกิดจากการชักนำสามารถไปเพิ่มปริมาณสารฟีนอลิกและสาร ฟลาโวนอยด์ขึ้นได้ดังที่พบในผลการทดลองข้างต้น

เพื่อกำหนดเกณฑ์ในการคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำที่เหมาะสมจึงใช้วิธีการให้คะแนน (score) เป็น ระดับ ตั้งแต่ 1 คะแนน ถึง 3 คะแนน โดยกำหนดให้ค่าที่สูงที่สุดที่มีนัยสำคัญทางสถิติมีระดับคะแนนเท่ากับ 3 และกำหนดให้ ค่าที่สูงเป็นอันดับ 2 มีระดับคะแนนเท่ากับ 2 ค่าที่สูงเป็นอันดับที่ 3 มีระดับคะแนนเท่ากับ 1 ดังนั้น ทริตเมนต์ที่เหมาะสมที่สุดจะต้องมีคะแนนผลรวมของทุกปัจจัยที่เกี่ยวข้องการสารสร้างสารเคมี (total score A) สูงที่สุด ส่วนการคัดเลือกวันที่เหมาะสมต่อการเก็บผลข้อมูลหลังการชักนำ ได้จากวันเก็บข้อมูลที่มีผลรวมของ total score B ของแต่ละวันของทุกปัจจัยที่เกี่ยวข้องสูงที่สุด แสดงในตารางผนวกที่ 1 พบว่าไอโตซาน

ความเข้มข้น 1000 ppm เหมาะสมต่อการชักนำให้กวางเครือขาวสร้างส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารเคมีมากที่สุด และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บข้อมูลหลังการชักนำคือ ที่ 15 วัน เนื่องจากมีคะแนนรวมของวันสูงที่สุด คือ 22 ได้จาก 6+8+4+4 จะพบว่า การชักนำด้วยไลโคซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นสูงที่สุดนั้น ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วย วิธี DPPH และ FRAP เพิ่มขึ้นด้วย ส่วนกลไกของการเพิ่มขึ้นนั้นยังไม่ทราบแน่ชัดและต้องศึกษาในรายละเอียดต่อไป ส่วนการลดลงของสารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยทั้งสองวิธีในวันที่ 30 หลังสิ้นสุดการชักนำแสดงว่าสารอนุมูลอิสระในกวางเครือขาวมีการตอบสนองต่อสารชักนำอย่างรวดเร็ว และลดปริมาณลงเมื่อระยะเวลาหลังถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าถ้าต้องใช้สารดังกล่าวเพื่อชักนำจะต้องรู้กำหนดเวลาที่แน่นอนถึงจุดที่จะให้สารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดก่อนทำการเก็บเกี่ยวให้ทันช่วงเวลานั้นต่อไป



ภาพที่ 4.10 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยไลโคซาน

4) ผลต่อปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว ใน ตารางผนวกที่ 2 พบว่า ทุกตัวแปรที่ใช้วัดการเจริญเติบโตหลังการชักนำไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าไคโตซานไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แม้จะมีรายงานว่ามิซาคุโนโตะเจ็นเป็นส่วนประกอบอยู่ในไคโตซานประมาณ 8.7 เปอร์เซ็นต์ (Ohta *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตาม กวางเครือขาวมีแนวโน้มเจริญเติบโตเป็นปกติและเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง

4.2.2 ผลของการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก

การชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกทั้ง 5 ความเข้มข้น (0 10 100 150 และ 200 มิลลิกรัม/ลิตร) มีผลต่อตัวแปรต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

4.2.2.1 ผลต่อสารประกอบฟีนอลิก พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในหัวกวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 15.5 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.11)

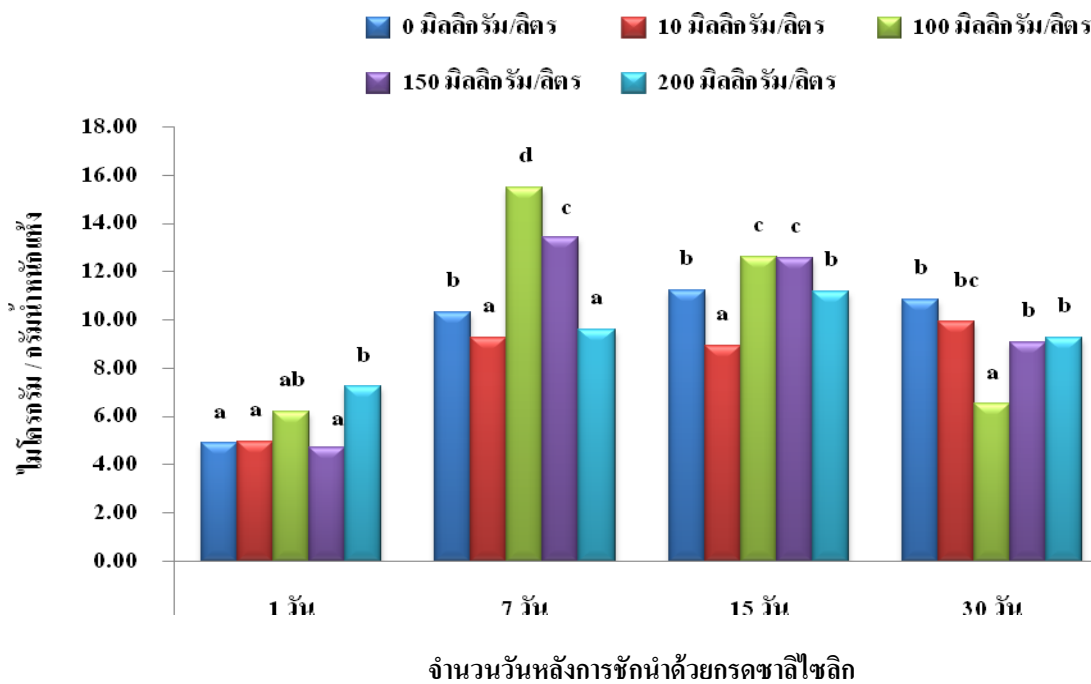
4.2.2.2 ผลต่อสารประกอบฟลาโวนอยด์ พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในหัว

กวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 3.01 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.12)

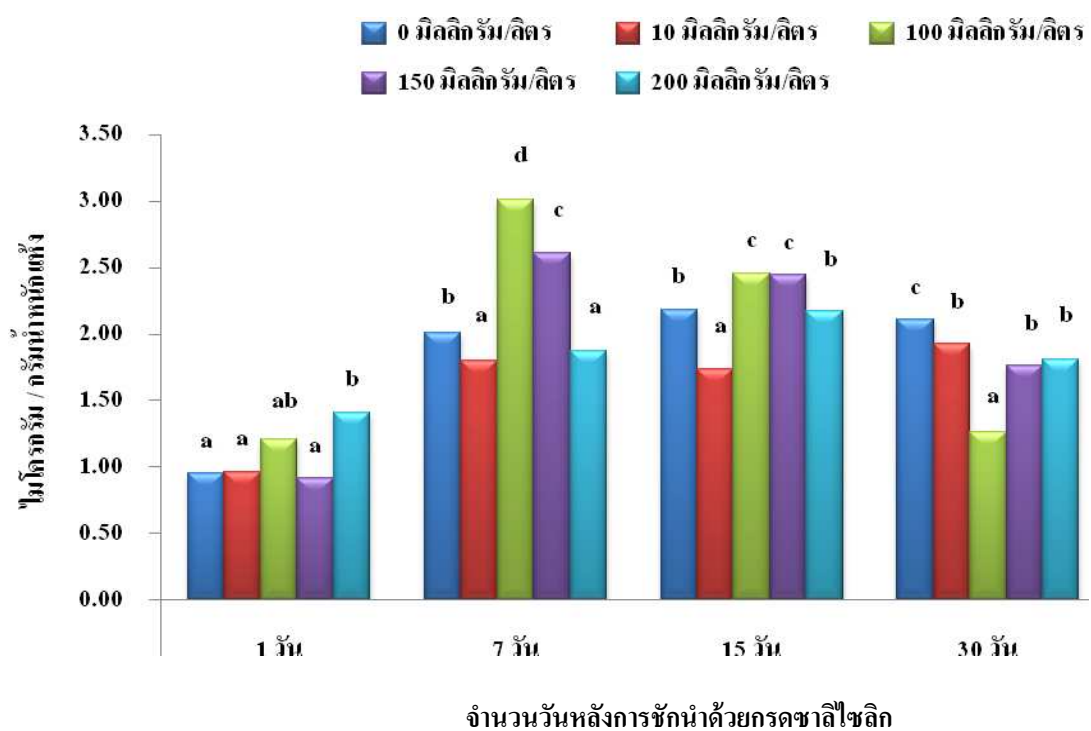
4.2.2.3 ผลต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้การยับยั้งอนุมูลอิสระในหัวกวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 58.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.13)

4.2.2.4 ผลต่อการเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP พบว่า การเก็บข้อมูลที่ 7 วัน หลังสิ้นสุดการชักนำ พบว่าความเข้มข้นที่ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้การยับยั้งอนุมูลอิสระในหัวกวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 5.89 ไมโครโมลาร์ของ Fe^{2+} /กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเงื่อนไขอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.14)

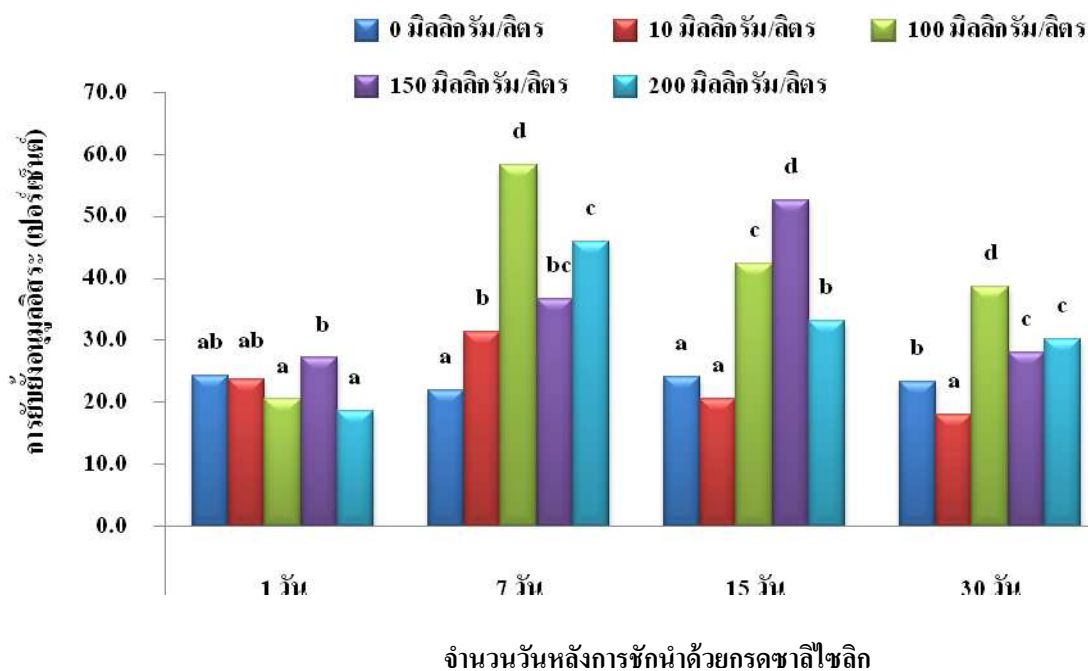
ผลจากการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งความเข้มข้นที่ใช้และระยะเวลาการเก็บข้อมูลหลังสิ้นสุดการชักนำ ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ การคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำที่เหมาะสมใช้เกณฑ์การให้คะแนนเหมือนกับการชักนำด้วยไคโตซาน (ตารางผนวกที่ 3) พบว่า การชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 7 วัน หลังการชักนำ ทำให้ผลของการชักนำค่าต่าง ๆ ในข้างต้นดีที่สุด สอดคล้องกับ Ali *et al.* (2007) ที่พบว่า ค่าดังกล่าวสูงขึ้นไป



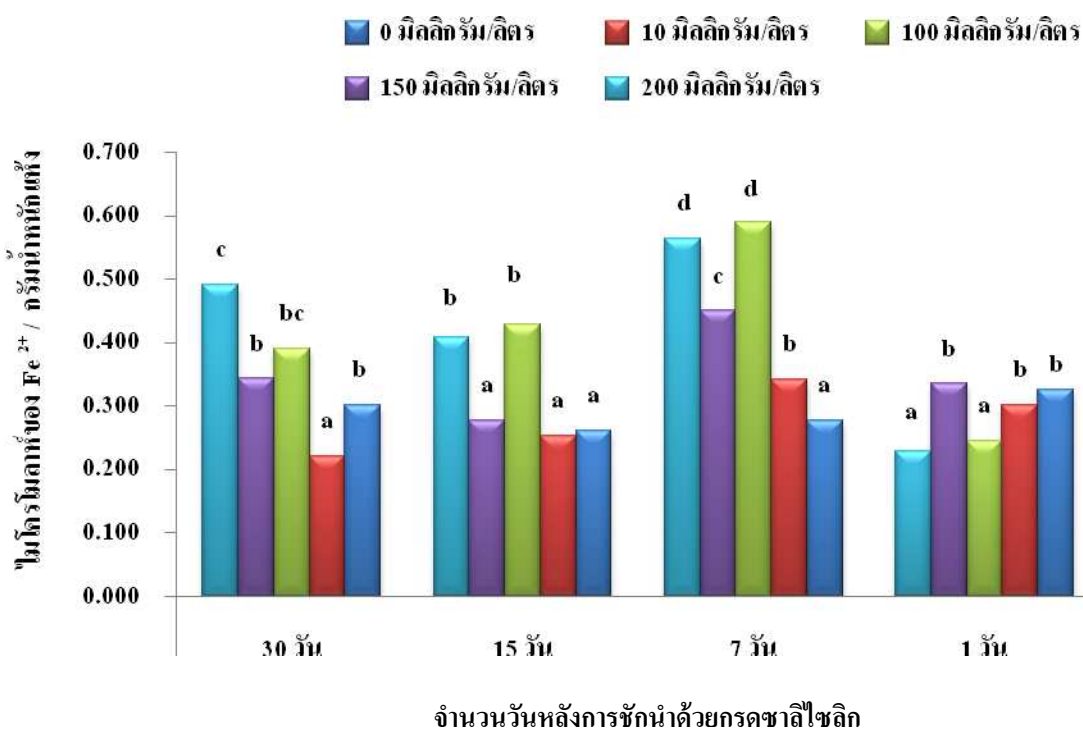
ภาพที่ 4.11 สารฟีนอลิก ของกาวเชื้อขาวที่ชักนำด้วยกรดซาลีไซลิก



ภาพที่ 4.12 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลังชักนำด้วยกรดซาลีไซลิก



ภาพที่ 4.13 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก



ภาพที่ 4.14 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก

วันที่ 7 และวันที่ 9 ของการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกในโสมจีน เนื่องจากกรดซาลิไซลิกไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ PAL จึงเกิดการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกชนิดต่าง ๆ รวมถึงฟลาโวนอยด์เพื่อตอบสนองต่อสัญญาณที่ได้รับ (Rao *et al.*, 2000)

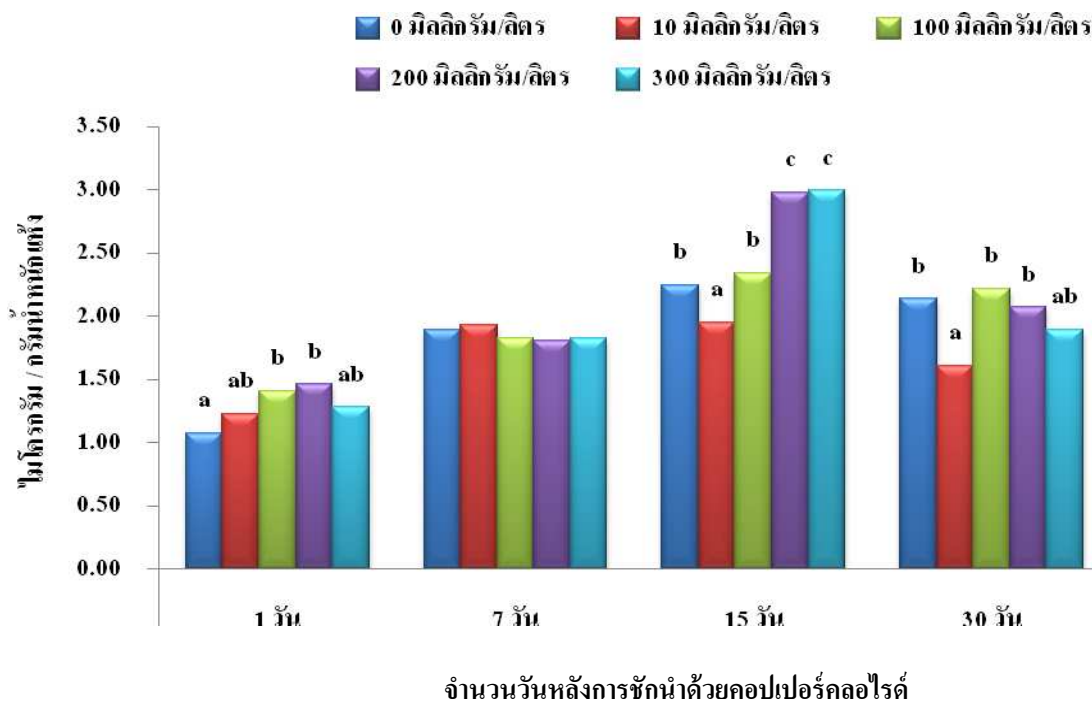
4.2.2.5 ผลต่อปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว ในตารางผนวกที่ 4 พบว่ากรดซาลิไซลิกไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แม้จะมีรายงานว่ากรดซาลิไซลิกมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตในพืชอื่น ๆ ก็ตาม เช่น การฉีดพ่นที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ให้แก่ถั่วเหลือง พบว่า ทำให้ของน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งของต้นและราก เส้นผ่าศูนย์กลางลำต้น จำนวนใบต่อต้นและปริมาณของคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ฉีดพ่นสารนี้ (Yildirim *et al.*, 2008) กรดซาลิไซลิกมีผลต่อความยาวรากและอาจเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวและการขยายตัวของเซลล์ หรือออกฤทธิ์ในทางเสริมกันสารออกซิน (Kling and Meyer, 1983; Li and Li, 1995; Singh, 1993) การฉีดพ่นในถั่วในแปลงทดลองพบว่าสามารถเพิ่ม คลอโรฟิลล์ชนิดเอ และ ชนิดบี และแคโรทีนอยด์ (Türkyılmaz *et al.*, 2005) Khan *et al.* (2003) พบว่ากรดซาลิไซลิกเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงในถั่วเหลืองและข้าวโพด Wang and Li (2006) พบว่าการฉีดพ่นกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์/ลิตร ที่ให้แก่ถั่วเหลือง ทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงสุทธิและค่า F_v / F_m (chlorophyll a fluorescence parameter) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม จึงสรุปว่ากรดซาลิไซลิกเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงได้ Hirano *et al.* (2000) รายงานว่ากรดซาลิไซลิกมีผลในทางอ้อมของการใช้สารชักนำต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยทำให้พืชมีระบบการป้องกันตัวจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม ทำให้พืชสร้างสารบางอย่างขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวก่อนที่จะมีการเข้าทำลายของเชื้อโรคจริง ๆ จึงช่วยลดความเสียหายของผลผลิตลงได้เมื่อมีการเข้าทำลายของเชื้อ ทำให้การเจริญเติบโตของพืชหรือผลผลิตดีขึ้น

4.2.3 ผลของการชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

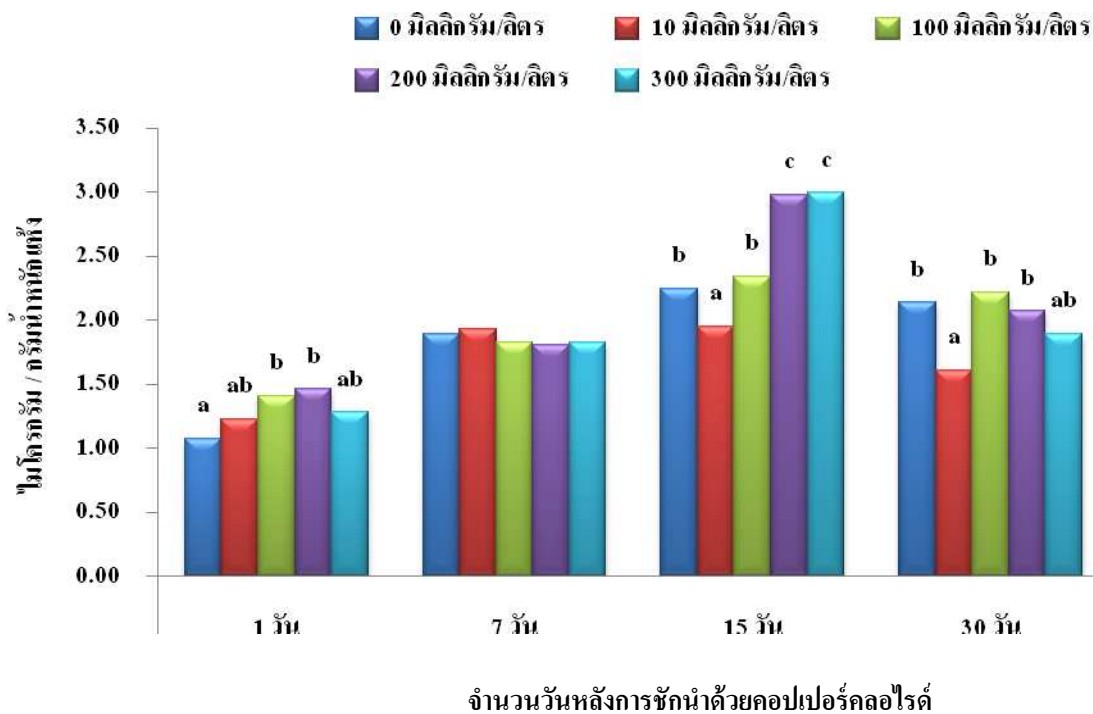
การชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ 5 ความเข้มข้น (0 10 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร) มีผลต่อ สารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้

4.2.3.1 ผลต่อสารประกอบฟีนอลิกของการเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในหัวกวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 15.5 และ 15.4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.15)

4.2.3.2 สารประกอบฟลาโวนอยด์ของการเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้นที่ 100 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในหัวกวางเครือขาวสูงที่สุดคือ 2.98 และ 2.99 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.15 สารฟอสฟอรัสหลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์



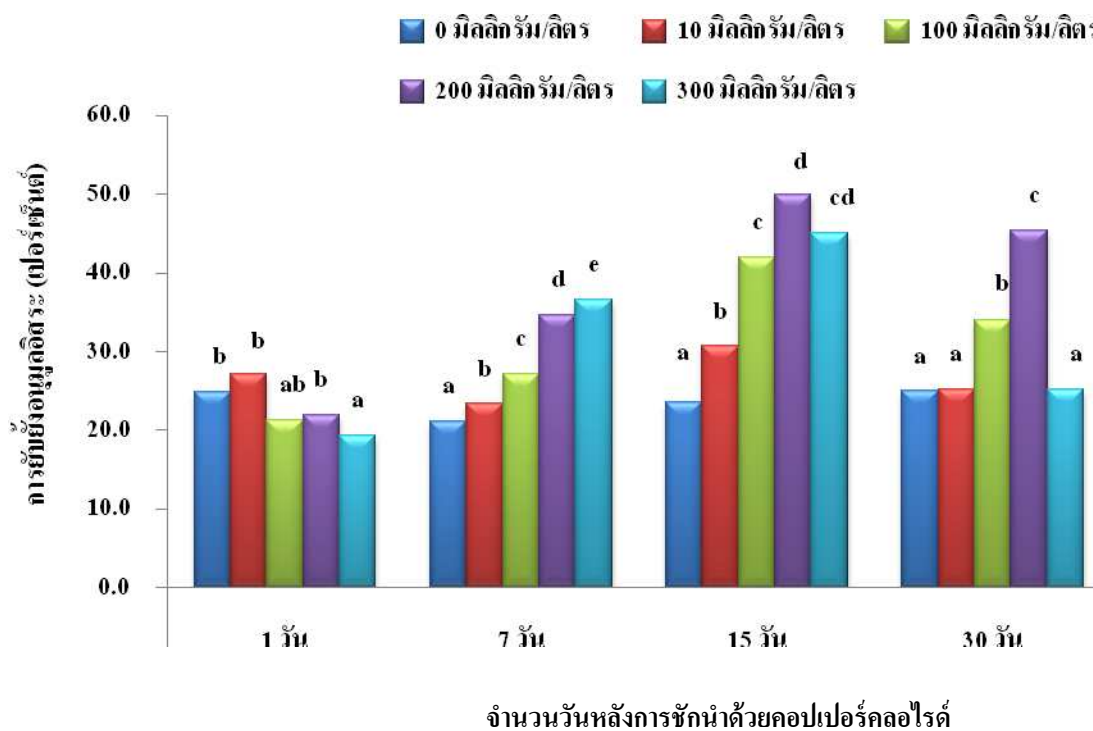
ภาพที่ 4.16 ปริมาณสารฟอสฟอรัสหลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

4.2.3.3 ผลต่อการยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของการเก็บข้อมูล ที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้การยับยั้งอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวสูงที่สุดคือ 49.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.17)

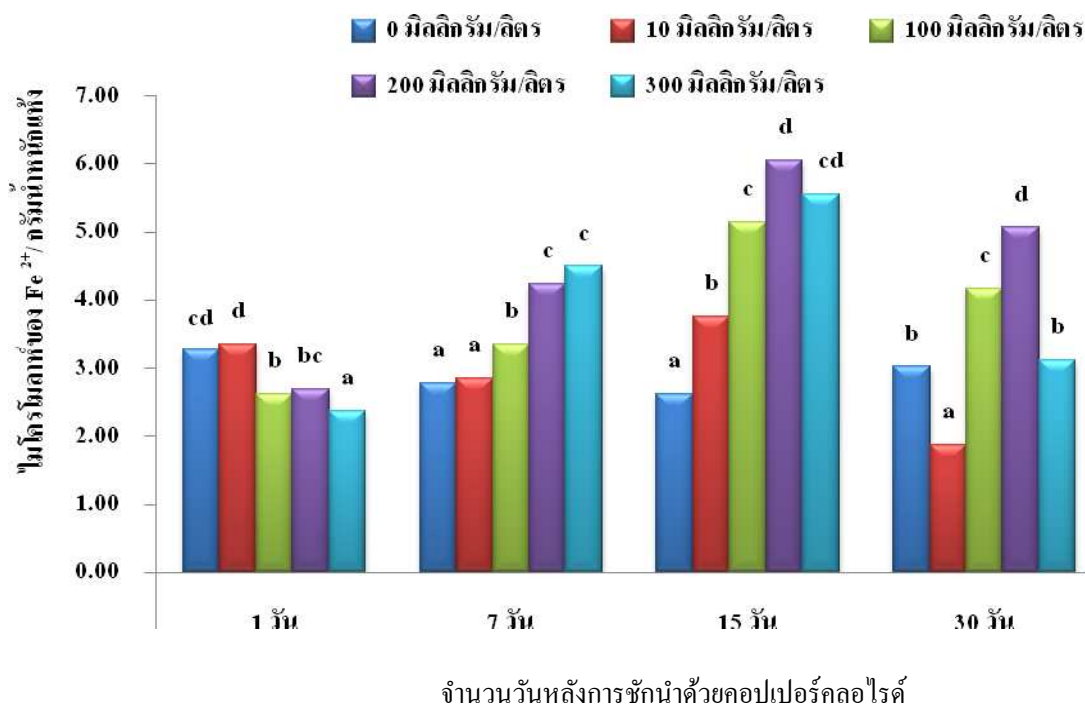
4.2.3.4 ผลต่อการเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP ของการเก็บข้อมูลที่ 15 วัน หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้สารสกัดสามารถรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด คือ 6.05 ไมโครโมลาร์ของ Fe^{2+} /กรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นอื่นที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4.18)

4.2.3.5 ผลต่อปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว ในตารางผนวกที่ 6 พบว่า คอปเปอร์คลอไรด์ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกวาวเครือขาว เนื่องจากผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม กวาวเครือขาวมีแนวโน้มเจริญเติบโตเป็นปกติและเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ผลที่เกิดจากการชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ ต่อการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระ การเป็นตัวรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่ อาจเกิดจากคอปเปอร์คลอไรด์มีทองแดงเป็นส่วนองค์ประกอบ ทองแดงเป็นจุลธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับพืช เป็นโคเอนไซม์ เป็นส่วนประกอบของโปรตีนหลายชนิดและมีส่วนร่วมในวิถีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิชนิดต่าง ๆ การที่ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้นหลังการชักนำอาจเกิดจาก ทองแดงไปชักนำให้เกิดสารอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) (Schutzendubel and Polle, 2002) เช่น superoxide anion (O_2^-), singlet oxygen (1O_2) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ให้สูงขึ้นอนุมูลอิสระเหล่านี้จะออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุล ทำให้เซลล์และดีเอ็นเอถูกทำลาย (De Vos *et al.*, 1992) เพื่อป้องกันผลกระทบของ ROS พืชจึงกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์หลัก ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบฟีนอลขึ้นเพื่อใช้ป้องกันตัว เช่น phosphate dehydrogenase (G6PDH), shikimate dehydrogenase (SKDH), phenylalanine ammonia lyase (PAL) และ cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่า การชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์ในถั่วลันเตาสามารถเพิ่มปริมาณของฟลาโวนอยด์ได้ การที่วันที่ 15 หลังชักนำด้วยความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้มีสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ที่สูงที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติกัน แสดงว่าการตอบสนองต่อปริมาณคอปเปอร์คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นนั้นเริ่มคงที่และน่าจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นให้มากกว่านี้ ประสาร ฉลาดคิด (2546) พบว่าการฉีดพ่นคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้เกิดอาการใบไหม้เป็นจุดและปริมาณของจินิสทีอินและคาอิดซินอินซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ลดลง การคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันหลังการชักนำที่เหมาะสมใช้เกณฑ์การให้คะแนนเหมือนกับกรณีชักนำด้วยไคโตซานและการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิก



ภาพที่ 4.17 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์



ภาพที่ 4.18 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจสอบด้วยวิธี FRAP หลังชักนำด้วยคอปเปอร์คลอไรด์

ดังแสดงในตารางผนวกที่ 5 ดังนั้นในการชักนำครั้งนี้จึงเลือกความเข้มข้นที่ 200 มิลลิกรัม/ลิตร เนื่องจากได้ผลการชักนำที่ดีเท่ากับความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร แต่จะลดความเสี่ยงต่อการเป็นพิษได้ดีกว่า

ผลการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay สารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากรากสะสมอาหารของกวางเครือขาวจะให้โปรตอน (H^+) แก่สารอนุมูลอิสระ DPPH เมื่อได้รับโปรตอน DPPH จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ทำให้การดูดกลืนแสงลดลง จึงคำนวณเป็นการยับยั้งสารอนุมูลอิสระเมื่อตรวจสอบตัวอย่างต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน และรายงานฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระได้ เช่น การทดลองของ Arokiyaraj *et al.* (2008) จึงตั้งสมมุติฐานว่า ถ้าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระแตกต่างกัน แสดงว่าในสารสกัดนั้นต้องมีชนิด หรือ ปริมาณ หรือทั้งสองอย่าง แตกต่างกันและความแตกต่างนั้น น่าจะเกิดจากผลของสารชักนำ จึงทำให้คัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมได้ จากการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 2 วิธี การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลโดยรวม และปริมาณของฟลาโวนอยด์ ให้ผลการทดลองไปในทางเดียวกันคือ ตัวอย่างที่มีสารประกอบฟีนอลสูงก็จะมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระและเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีด้วย

Prior *et al.* (1998) และ Wang and Lin (2000) กล่าวถึงการชักนำด้วยทริตเมนต์ที่แตกต่างกัน ว่า อาจมีผลไปกระตุ้นให้เกิดสารชนิดที่แตกต่างกันไป จึงมีผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน และ Fabrendorf *et al.* (1995) รายงานว่าเมื่อสารชักนำเข้าสู่พืช ทำให้พืชสร้างสารต่าง ๆ เพื่อใช้ในระบบป้องกันตัว โดยสร้างเอนไซม์ G6PDH ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน pentose phosphate pathway (PPP) และสร้างสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกขึ้น จนได้สารฟีนอลิกในกลุ่มต่าง ๆ เพิ่มขึ้น

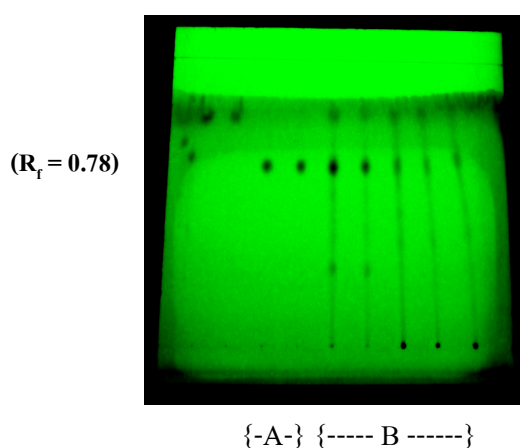
มีแนวโน้มว่าการชักนำเกือบทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงในวันที่ 30 หลังสิ้นสุดการชักนำ แสดงว่าสารชักนำแต่ละชนิดมีความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการชักนำ และจะลดอิทธิพลลงเมื่อผ่านจุดที่เหมาะสมนั้นไป ระยะเวลาเก็บข้อมูลหลังการชักนำครั้งสุดท้าย (1 7 15 และ 30 วัน) มีผลอย่างชัดเจนต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจเกิดจากผลของปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการดูดซึมและการเคลื่อนย้ายสารภายในต้นพืช ดังนี้ (1) ชนิดและอายุของพืช ใบพืชที่อายุน้อยจะมีอัตราการดูดซึมสาร ได้มากกว่าใบแก่ เนื่องจากการพัฒนาของใบและคิวทิเคิลนั้นยังไม่สมบูรณ์ จึงทำให้สารผ่านเข้าไปได้ง่ายกว่าและส่วนที่จะดูดซึมสารได้ดีคือขนราก รากที่เริ่มแตกใหม่หรือมีอายุน้อยจะมีขนรากมากและดูดซึมสารได้ดีกว่า (2) อุณหภูมิ เมื่อสูงขึ้นการดูดซึมสารจะมากขึ้น เพราะทำให้โมเลกุลของใบเกาะกันอย่างหลวม ทำให้น้ำผ่านไปได้ง่าย แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้

การดูดซึมสารลดลงเนื่องจากปากใบปิด (3) ความชื้นสัมพัทธ์ สารชักนำที่เป็นสารละลายน้ำ เมื่อน้ำระเหยไปยังใบพืช ส่วนของน้ำจะระเหยสู่บรรยากาศ ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ต่ำน้ำจะได้เร็ว เนื้อสาร

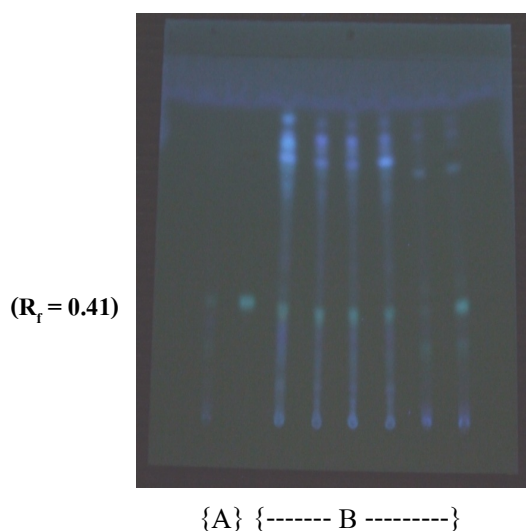
จะแห้งติดอยู่บนใบ การดูดซึมจะเกิดขึ้นได้ยากมาก ถ้าให้สารขณะความชื้นสัมพัทธ์สูง น้ำอยู่ในสารละลายเมื่อฉีดพ่นไปยังใบจะระเหยได้ช้า จึงทำให้ใบพืชดูดซึมสารได้ดีกว่า (4) ปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความเข้มข้นของสารละลาย ค่า pH ของสารละลาย ความเข้มข้นของสารละลาย สารละลายที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้การดูดซึมสารได้มากขึ้น (Greene and Bukovac, 1977)

4.2.4 ผลของสารชักนำต่อการมีอยู่ของจินิสทีอินและพิวราริน

เนื่องจากต้องการใช้ผลทดลองนี้ไปใช้ในการศึกษาผลของการใช้สารชักนำทั้งสามชนิดร่วมกันเพื่อชักนำพิวรารินและจินิสทีอินในการทดลองต่อไป จึงทดสอบการมีอยู่ของสารทั้งสองจากทุกการทดลอง พบว่าตำแหน่งของจุดในสารสกัด และค่า retention mobility (R_f) ของแต่ละตัวอย่างตรงกับจุดของสารมาตรฐานทั้งสองชนิด และพบว่า ทุกทรีตเมนต์รวมทั้งกลุ่มควบคุมด้วยมีการสร้างสารจินิสทีอินและพิวรารินขึ้นเป็นปกติ เห็นได้จากตำแหน่งของสารจากแต่ละตัวอย่างที่ปรากฏขึ้นในตำแหน่งที่ตรงกันกับสารมาตรฐานทั้งสองชนิดเมื่อทดสอบด้วยวิธี TLC ดังแสดงใน ภาพที่ 4.19 และ 4.20 แสดงว่าสารชักนำไม่มีผลไปยับยั้งการสร้างพิวรารินและจินิสทีอิน และอาจมีผลส่งเสริมให้เกิดการสร้างที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) การชักนำด้วยไคโตซาน และคอปเปอร์คลอไรด์ ในถั่ว lupin สามารถเพิ่มปริมาณของจินิสทีอินได้ประมาณ 6 ถึง 13 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Kneer *et al.* (1999) รายงานว่าสารไคโตซานและกรดซาลิไซลิกสามารถเพิ่มการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนและจินิสทีอินในรากถั่ว lupin ได้มากขึ้น ซึ่งจะได้ทดลองและหาปริมาณของสารทั้งสองที่เกิดจากการใช้สารชักนำร่วมกันในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.19 TLC โครมาโตแกรมของพิวรารินมาตรฐาน (A) และ puerarin ของสารสกัดจากหัว + กวาวเครือขาว (B) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ใช้คือ n-butanol : acetic acid : water (5 : 3 : 1 โดยปริมาตร)



ภาพที่ 4.20 TLC โครมาโตแกรมของจีนิสทีอินมาตรฐาน (A) และจีนิสทีอินของสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาว (B) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ n-butanol : acetic acid : water (5:3:1 โดยปริมาตร)

4.3 พิวราริน จีนิสทีอิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวาวเครือขาวที่ถูกชักนำด้วยโคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

4.3.1 ผลของสารชักนำต่อปริมาณพิวรารินและจีนิสทีอิน

4.3.1.1 ผลต่อปริมาณพิวราริน พบว่าการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂ ทำให้กวาวเครือขาวมีปริมาณพิวรารินสูงที่สุดทั้งการทดลองใน growth chamber (423 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) และในโรงเรือน (386 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อชักนำในแปลงทดลอง กวาวเครือขาวที่ปลูกในแปลงทดลองมีแนวโน้มของการสร้างพิวรารินสูงกว่าการปลูกใน growth chamber หรือ ปลูกในโรงเรือน (ตารางที่ 4.9) พิวรารินที่ขึ้นอาจเกิดจากสารชักนำไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด ในกระบวนการไกลโคไลซิส คือ fructose-1,6-bisphosphatase จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน fructose-1,6-bisphosphate ไปเป็น fructose-6-phosphate และเอนไซม์ aldolase จะแยก fructose-1,6-bisphosphate ให้เป็น dihydroxyacetonephosphate และ glyceraldehyde-3-phosphate ซึ่ง glyceraldehyde-3-phosphate จะถูกเปลี่ยนเป็น phosphoenolpyruvate (PEP) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไอโซฟลาโวน (สมบุญ เชภิญญาวัฒน์, 2548) พิวรารินซึ่งเป็นสารกลุ่มไอโซฟลาโวนส์จึงเพิ่มขึ้น การชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂ อาจทำให้การทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ดีที่สุด การสังเคราะห์พิวรารินจึงเกิด ผลการทดลองใน growth chamber และในโรงเรือนให้ผลเหมือนกันและไม่มีสารชักนำที่ทำให้ปริมาณพิวรารินในหัวกวาวเครือขาวต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าสารชักนำทั้งหมดไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์จึงยัง

ตารางที่ 4.9 ผลของสารชักนำต่อพิวรารินในกวางเครือขาวที่ปลูกในสภาพแวดล้อมต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของพิวราริน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	132 a	277 a	355
SA	292 c	299 abc	383
CuCl ₂	311 cd	297 ab	341
CuCl ₂ +SA	201 ab	288 a	333
Chitosan	257 bc	341 bcd	386
Chitosan+SA	282 bc	344 cd	371
Chitosan+CuCl ₂	423 e	386 d	4351
Chitosan+CuCl ₂ + SA	384 de	365 c	413
CV (เปอร์เซ็นต์)	1.59	1.70	1.91

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

กิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ได้ปกติ ในแปลงทดลองไม่มีความแตกต่างกันของพิวรารินอาจเกิดจากปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ เช่น รังสียูวี ลม หรือศัตรูพืช (Stafford, 1997; Olsson *et al.*, 1998) มีผลในทางเสริมหรือลดบทบาทของสารชักนำ หรือเกิดจากพิวรารินถูกสร้างเพื่อการป้องกันตัวของพืชอยู่แล้ว จึงมีปริมาณสูงเมื่อมีปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ในแปลงทดลองมากกว่าระดับอื่นอย่างต่อเนื่อง เห็นได้จากกลุ่มควบคุมในแปลงทดลองมีปริมาณพิวรารินสูงกว่าในโรงเรือนและใน growth chamber การกระตุ้นด้วยสารชักนำจึงไม่เพิ่มปริมาณของสารดังกล่าวขึ้นไปได้อีก ชี้ดจำกัดดังกล่าวอาจมีผลของพันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง ในบางพันธุ์อาจมีขีดจำกัดของการสร้างพิวรารินได้มากกว่าพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้

4.3.1.2 ผลต่อปริมาณจิบเบอเรลลินที่อินพบว่าการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂ ทำให้กวางเครือขาวมีปริมาณจิบเบอเรลลินสูงที่สุด (22.6 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการทดลองใน growth chamber และในโรงเรือน (22.4 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง) และในโรงเรือน การชักนำด้วย Chitosan และ Chitosan+CuCl₂+SA ทำให้ปริมาณของพิวรารินสูงไม่แตกต่างจากการใช้ Chitosan+CuCl₂ การชักนำในแปลงทดลองไม่ทำให้ปริมาณจิบเบอเรลลินมีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 4.10) จากการทดลองโคโตซาน คอปเปอร์คลอไรด์ และกรดซาลิไซลิกมีผลต่อการเพิ่มปริมาณจิบเบอเรลลินสอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่าการชักนำด้วยโคโตซาน และคอปเปอร์คลอไรด์ ในถั่วลูปินเพิ่มปริมาณจิบเบอเรลลินได้ 6 ถึง 13 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ

ตารางที่ 4.10 ผลของสารชักนำต่อจีนิสทีอินในกวางเครือขาวที่ปลูกในสภาพแวดล้อมต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของจีนิสทีอิน (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	6.2 a	12.2 b	11.4
SA	5.2 a	8.6 a	9.3
CuCl ₂	20.6 cd	19.8 c	14.2
CuCl ₂ +SA	10.3 ab	17.8 c	14.1
Chitosan	10.4 ab	23.7 d	14.9
Chitosan+SA	9.8 ab	20.7 cd	14.3
Chitosan+CuCl ₂	22.6 d	22.4 d	19.0
Chitosan+CuCl ₂ + SA	15.7 bc	22.7 d	16.5
CV (เปอร์เซ็นต์)	2.47	3.56	3.48

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

กลุ่มควบคุม Kneer *et al.* (1999) พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 0.12 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ใช้ร่วมกับ การเลี้ยงเซลล์รากถั่ว lupin เพิ่มจีนิสทีอินได้ 108.0 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และการใช้กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 800 ไมโครโมลาร์ เพิ่มจีนิสทีอินได้ 122.2 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่ การให้น้ำกลั่นมีปริมาณพิวราซิน เท่ากับ 5.0 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งเท่านั้น รูปแบบการชักนำ Mithofer *et al.* (1996) รายงานว่าเมื่อไคโตซานถูกย่อยสลายจะปลดปล่อยสารโอลิโกแซ็กคาไรด์ซึ่ง สามารถไปจับกับ beta-glucan-binding protein ที่อยู่ในบริเวณ plasmalemma ของรากพืช จึงทำให้ พืชสร้างสารทุติยภูมิขึ้นมาตอบสนอง คอปเปอร์คลอไรด์อาจมีผลในทางส่งเสริมกันกับไคโตซาน เห็นได้จากการใช้คอปเปอร์คลอไรด์อย่างเดียวเพิ่มจีนิสทีอินได้น้อยกว่าการใช้ร่วมกันกับไคโตซาน มี รายงานถึงอิทธิพลของธาตุทองแดงในคอปเปอร์คลอไรด์ต่อเพิ่มสารในกลุ่มจีนิสทีอินในสภาพ แปลงทดลองของประสาร ฉลาดคิด (2546) ว่าการฉีดพ่นสารละลายทองแดงทำให้ปริมาณจีนิสทีอิน ในหัวกวางเครือขาวมากกว่ากลุ่มควบคุม ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัม/ลิตร เพิ่มจีนิสทีอินได้สูงสุด Hakamatsuka (1991) พบว่าคอปเปอร์คลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ ทำให้ถั่ว *P. lobata* มีจีนิสทีอิน เพิ่มขึ้น 5-10 เท่า ความถี่ในการชักนำเป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณจีนิสทีอิน Kneer *et al.* (1999) พบว่าการชักนำด้วยไคโตซานและกรดซาลิไซลิกเพียงครั้งเดียวทำให้ปริมาณจีนิสทีอินเพิ่มขึ้นในวัน แรกและจะค่อย ๆ ลดลง จึงต้องชักนำแบบต่อเนื่องเพื่อคงปริมาณสารไว้

4.3.2 ผลต่อปริมาณสารฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารทุติยภูมิที่สำคัญในพืช สังเคราะห์จากกรดอะมิโนฟีนิลอะลานินและไทโรซีนอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในพืชได้แก่ ฟลาโวนอยด์ แทนนิน ลิกนิน เป็นต้น กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนให้ผลสอดคล้องกัน เมื่อชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA คือทำให้มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุดที่สุด คือ 15.0 ไมโครกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง แตกต่างจากในโรงเรือนและในแปลงทดลองที่พบว่า Chitosan+CuCl₂ มีปริมาณของสารฟีนอลิกสูงสุดคือ 16.1 และ 16.6 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) จากการทดลองพบว่าไคโตซานมีผลต่อการเพิ่มปริมาณฟีนอลิก Fahrendorf *et al.* (1995) รายงานว่าเมื่อสารชักนำเข้าสู่พืช พืชอาจสร้างระบบป้องกันตัวโดยสร้างเอนไซม์ G6PDH ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน pentose phosphate pathway (PPP) และจะสร้างสารตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกขึ้น และไคโตซานอาจจะไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ควบคุมการสังเคราะห์สารไอโซฟลาโวนอยด์ โดยกระตุ้นกิจกรรมของ phenylalanine ammonia-lyase (PAL) (Inui *et al.*, 1997) สอดคล้องกับ Khan *et al.* (2002) ที่พบว่ากรดนิคโตนิกในของถั่วเหลืองสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL และ tyrosine ammonia-lyase (TAL) ให้สูงขึ้นได้จึงส่งผลให้มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกในใบของถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.11 สารฟีนอลิกในหัวกวาวเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของสารฟีนอลิก (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	11.7 b	9.8 a	12.4
SA	9.3 a	12.0 b	13.2
CuCl ₂	13.1 b	11.3 b	13.2
CuCl ₂ +SA	13.0 b	14.8 cd	12.6
Chitosan	11.6 b	12.0 b	12.1
Chitosan+SA	13.0 b	11.0 ab	12.8
Chitosan+CuCl ₂	12.5 b	16.1 d	16.6
Chitosan+CuCl ₂ + SA	15.0 c	14.0 c	16.0
CV (เปอร์เซ็นต์)	5.81	7.13	13.92

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกลำดับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.3 ผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์

สารประกอบฟลาโวนอยด์เป็นสารกลุ่มหนึ่งของสารประกอบฟีนอลิก ตัวอย่างสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ได้แก่ แอนโทไซยานิน และไอโซฟลาโวนอยด์ เป็นต้น จากการทดลอง พบว่า กวาวเครือที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนให้ผลที่ไม่สอดคล้องกันการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA ทำให้หัวกวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 3.09 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง แต่การปลูกในโรงเรือนพบว่าการชักนำด้วย Chitosan+SA มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 2.50 ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แต่ในแปลงทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของสารฟลาโวนอยด์ (ตารางที่ 4.12) แสดงให้เห็นว่าโคโคซาน คอปเปอร์คลอไรด์ และกรดซาลิไซลิกมีผลต่อปริมาณของฟลาโวนอยด์ สอดคล้องกับ Hubert and Ragai (1997) ที่พบว่า การชักนำด้วยโคโคซาน และคอปเปอร์คลอไรด์ ในถั่วลันเตาเพิ่มปริมาณของฟลาโวนอยด์ให้สูงกว่ากลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากฟลาโวนอยด์เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกกลไกของการชักนำน่าจะคล้ายกันคือไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ PAL แล้วทำให้เกิดการกระบวนการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องจนได้สารประกอบ ฟลาโวนอยด์ชนิดต่าง ๆ (Inui *et al.*, 1997) ส่วนผลที่เกิดจากกรดซาลิไซลิก Ali *et al.* (2007) พบว่า กรดซาลิไซลิกเป็นสัญญาณกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ Andrew *et al.* (1994) พบว่าการฉีดพ่นคอปเปอร์คลอไรด์ทำให้ถั่วอัลฟาฟา (*M. sativa* L.) สร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น เพราะคอปเปอร์คลอไรด์ซึ่งมีธาตุทองแดงซึ่งเป็นจุลธาตุอาหารพืช เป็นโคเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ได้ แต่ทองแดงที่มากเกินไปความต้องการของพืชอาจชักนำให้เกิดสารอนุมูลอิสระที่เป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) (Schutzendubel and Polle, 2002) เช่น superoxide anion (O₂⁻), singlet oxygen (¹O₂) และ hydrogen peroxide (H₂O₂) ให้สูงขึ้น อนุมูลอิสระเหล่านี้จะออกซิไดซ์สารชีวโมเลกุลภายในเซลล์และยังทำลายดีเอ็นเอ (De Vos *et al.*, 1992) ROS จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารประกอบฟลาโวนอยด์เพื่อใช้ป้องกันตัวเอง เช่น phosphate dehydrogenase (G6PDH), shikimate dehydrogenase (SKDH), phenylalanine ammonia lyase (PAL) และ cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) จึงทำให้ปริมาณของฟลาโวนอยด์เพิ่มขึ้น

4.3.4 ผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถจับอิเล็กตรอนโคเดเดี่ยวของอนุมูลอิสระ ทำให้ไม่สามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Gutteridge and Halliwell, 1994) ในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาศัยวิธีการตรวจ 2 แนวทาง แนวทางที่ 1 คือ การวัดความสามารถในการจับสารอนุมูลอิสระ (scavenging method) ซึ่งใช้วิธี DPPH assay เป็นวิธีทดสอบ และแนวทางที่ 2 คือ

การวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์สารต้านอนุมูลอิสระ (reducing method) ซึ่งใช้วิธี FRAP เป็นวิธีทดสอบ

ตารางที่ 4.12 ปริมาณฟลาโวนอยด์ในหัวกวาวเครือขาวหลังถูกชักนำในสภาพการปลูกแตกต่างกัน

ทรีตเมนต์	ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ (ไมโครกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	1.87 a	2.19 bc	2.80
SA	2.38 bc	1.65 a	2.46
CuCl ₂	2.23 b	2.27 bc	2.92
CuCl ₂ +SA	2.91 d	2.12 bc	3.73
Chitosan	2.34 bc	1.94 ab	3.77
Chitosan+SA	2.57 c	2.50 c	3.07
Chitosan+CuCl ₂	2.14 ab	2.09 bc	3.06
Chitosan+CuCl ₂ + SA	3.09 d	2.16 bc	2.73
CV (เปอร์เซ็นต์)	6.85	9.81	19.2

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.4.1 DPPH assay พบว่าการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA ทำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดจากการทดลองใน growth chamber ในโรงเรือน และในแปลงทดลอง โดยมีค่า IC₅₀ เท่ากับ 2,482 1,049 และ 1,025 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กวาวเครือขาวที่ปลูกในโรงเรือน และในแปลงทดลอง มีแนวโน้มของการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ปลูกใน growth chamber (ตารางที่ 4.13)

4.3.4.2 FRAP กวาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ปลูกในโรงเรือนและในแปลงทดลองได้ผลสอดคล้องกัน เมื่อชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA ทำให้กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ FRAP value = 4.55 4.73 และ 6.69 ไมโครโมล ของ Fe²⁺/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4.14)

การชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA สามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดทั้งจากการตรวจวัดด้วย DPPH และ FRAP สอดคล้องกับการทดลองข้างต้นที่พบว่าทรีตเมนต์ดังกล่าวสามารถชักนำสารฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ ให้สูงที่สุดได้เช่นกัน แสดงว่าสารทั้งสองกลุ่มเป็นสารที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวด้วย สอดคล้องกับ Ding *et al.* (2002) ที่รายงานว่า

ตารางที่ 4.13 ค่า IC_{50} ของกวางเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน

ทรีตเมนต์	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	3,042 h	1,889 a	1,167 a
SA	2,563 b	1,600 b	1,480 abc
CuCl ₂	2,900 f	1,810 a	1,746 c
CuCl ₂ +SA	2,612 d	1,630 b	1,635 bc
Chitosan	2,915 g	1,820 a	1,218 ab
Chitosan+SA	2,596 c	1,621 b	1,629 bc
Chitosan+CuCl ₂	2,893 e	1,183 c	1,187 a
Chitosan+CuCl ₂ + SA	2,482 a	1,049 c	1,025 a
CV (เปอร์เซ็นต์)	2.57	2.32	14.2

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.14 FRAP value ของกวางเครือขาวหลังการชักนำในสภาพการปลูกที่แตกต่างกัน

ทรีตเมนต์	FRAP value (ไมโครโมลของ Fe ²⁺ /สารสกัด 1 กรัม)		
	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	24.7 b	30.4 a	42.9 a
SA	37.3 c	32.2 ab	44.9 a
CuCl ₂	18.5 a	28.6 a	40.4 a
CuCl ₂ +SA	20.6 a	29.2 a	40.5 a
Chitosan	28.1 b	29.3 a	41.3 a
Chitosan+SA	18.0 a	29.9 a	41.9 a
Chitosan+CuCl ₂	38.7 c	40.3 bc	57.3 ab
Chitosan+CuCl ₂ + SA	45.5 d	47.3 c	66.9 b
CV (เปอร์เซ็นต์)	7.22	12.31	17.26

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีสหสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณของฟีนอลิก และปริมาณของ ฟลาโวนอยด์ ปริมาณ ช่วงทิพย์ (2546) และ นวลศรี รักอริยะธรรมและอัญชญา เจนวิถีสุข (2545) รายงานว่าสารต้านอนุมูลอิสระในพืชที่สำคัญได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ดังนั้นการพบว่า Chitosan+CuCl₂+SA สามารถชักนำให้มีสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์สูงขึ้นจากการทดลองในข้างต้น จึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจวัดด้วยทั้งสองเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกัน

Wang and Lin (2000) กับ Prior *et al.* (1998) รายงานว่าสารชักนำที่ต่างกันมีผลกระตุ้นให้เกิดสารชนิดที่แตกต่างกัน ทำให้พืชที่ถูกชักนำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่างกัน Cherdshewasart *et al.* (2008) พบว่า พิวราลินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงไม่แตกต่างจาก α -tocopherol ซึ่งใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน จากการทดลองพบว่า Chitosan+CuCl₂ ที่สามารถชักนำให้กวางเครือขาวสร้างพิวราลินสูงที่สุด แต่ยังชักนำฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวางเครือขาวได้น้อยกว่าการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA แสดงว่าพิวราลินไม่ใช่สารชนิดเดียวที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวางเครือขาว การเพิ่มกรดซาลิไซลิกเข้าไปอาจจะมีผลในทางส่งเสริมให้มีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ๆ ขึ้นมาได้อีก สอดคล้องกับการพบว่ามี peak intensity ของสารอื่น ๆ ที่ปรากฏในโครมาโตแกรมร่วมกับพิวราลินและจินิสทีอิน พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ peak intensity ของสารในตำแหน่ง retention time ในนาที่ที่ 13.2 18.3 และนาที่ที่ 20.1 การชักนำด้วยทรีตเมนต์ต่าง ๆ พบว่า ratio of peak intensity ที่ตำแหน่ง 13.2 มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าตำแหน่ง 18.3 และ 20.1 และพบว่าการชักนำด้วย Chitosan+CuCl₂+SA มีค่าสัดส่วนของ ratio of peak intensity ที่ตำแหน่ง 13.2 สูงที่สุด สอดคล้องกับการชักนำให้กวางเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดด้วย ดังนั้นสารในตำแหน่งดังกล่าวอาจเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่ได้จากการชักนำ พบว่ามีอัตราส่วนสูงกว่าที่พบในสารชักนำทุกทรีตเมนต์ (ตารางผนวกที่ 7) สอดคล้องกับการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดทั้งจากการตรวจวัดด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP ดังนั้นสารในตำแหน่งดังกล่าวอาจเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ผลที่ไม่สอดคล้องในทรีตเมนต์ Chitosan อาจเกิดจากค่าในแปลงที่สูงเนื่องจากการหาค่าเฉลี่ยจากทั้งสามสภาพการทดลอง ควรศึกษาถึงชนิดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่อไป ส่วนสารในตำแหน่งที่ 18.3 และ 20.1 มีการเปลี่ยนแปลงของ ratio of peak intensity น้อยอาจไม่มีผลจากทรีตเมนต์ที่ใช้ชักนำ

4.3.5 ผลของสารชักนำต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว

ผลของสารชักนำต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาวทั้งสามสภาพแวดล้อมควรให้ผลที่สอดคล้องกัน เช่น มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตที่เหมือนกันเมื่อชักนำด้วยทรีตเมนต์เดียวกัน ผลที่ไม่สอดคล้องกันอาจหมายถึงมีอิทธิพลของปัจจัยอื่น

มาเกี่ยวข้อง แล้วมีผลมากกว่าสารชักนำ หรือ สารชักนำบางชนิดที่อาจได้รับอิทธิพลจากปัจจัยอื่น แล้วมีผลส่งเสริมหรือลดบทบาทของสารชักนำ ผลการทดลองสามารถบอกถึงอิทธิพลของสารชักนำ เมื่อใช้ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน โดยเฉพาะการผลการทดลองในแปลงปลูกจะช่วยยืนยันถึงผลของสารชักนำว่าสามารถแนะนำให้เกษตรกรใช้ได้หรือไม่

4.3.5.1 ผลของสารชักนำต่อน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของหัวกวาวเครือขาวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในการชักนำใน growth chamber และในโรงเรือน แต่พบความแตกต่างของการชักนำในแปลงทดลอง โดยพบว่าทรีตเมนต์ที่มีไคโตซานร่วมด้วยทุกทรีตเมนต์จะมีอัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งสูง (ตารางที่ 4.15) สอดคล้องกับการทดลองของ Boonlertnirun *et al.* (2008) ที่ใช้เมล็ดข้าวคลุกกับสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 80 มิลลิกรัม/ลิตร ตามด้วยการราดลงดินอีก 4 ครั้ง ในหนึ่งฤดูการเพาะปลูกพบว่าสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าไคโตซานมีส่วนช่วยให้กวาวเครือขาวเจริญเติบโต ซึ่งอาจจะเกิดจากไคโตซานในดินเป็นแหล่งของคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ในดิน เมื่อจุลินทรีย์ในดินเจริญเติบโตก็จะช่วยเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นสารอนินทรีย์ให้อยู่ในรูปที่รากพืชสามารถดูดซึมนำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น จะเห็นได้จากการทดลองใส่ไคโตซานในดินโดยที่ไม่ใส่ปุ๋ยเคมี ทำให้มีการเพิ่มของจุลินทรีย์ในดินได้มากขึ้นและทำให้การเจริญเติบโตของพืชดีขึ้นด้วย (Bolto *et al.*, 2004; Somashekar and Richard, 1996) ในแปลงทดลองมีความแตกต่างของการเจริญเติบโตของต้นที่ไม่ต่างกันมาก แต่ในส่วนที่อยู่ใต้ดินมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เช่นขนาดของหัว ที่ต่างกัน นอกจากไคโตซานแล้ว จึงน่าจะมีอิทธิพลของดิน และจุลินทรีย์ในดิน ต่อการเจริญเติบโตด้วย

ตารางที่ 4.15 ผลของสารชักนำต่อน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งของกวาวเครือขาว

ทรีตเมนต์	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	10.6 : 1	16.8 : 1	25.5 : 1 a
SA	12.2 : 1	18.1 : 1	30.3 : 1 bc
CuCl ₂	10.4 : 1	13.8 : 1	23.5 : 1 a
CuCl ₂ +SA	12.4 : 1	18.2 : 1	27.1 : 1 ab
Chitosan	12.7 : 1	18.6 : 1	32.2 : 1 c
Chitosan+SA	13.7 : 1	19.1 : 1	32.7 : 1 c
Chitosan+CuCl ₂	11.1 : 1	17.8 : 1	30.5 : 1 bc
Chitosan+CuCl ₂ + SA	12.1 : 1	18.5 : 1	32.3 : 1 c
CV (เปอร์เซ็นต์)	6.95 : 1	14.6 : 1	19.8

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.5.2 ผลต่อปริมาณสารสกัดหยาบ สารสกัดหยาบเป็นเหมือนผลผลิตของพืชสมุนไพร มีสมุนไพรหลายชนิดรวมถึงกวาวเครือขาว ที่ซื้อขายในรูปของสารสกัดหยาบแทนการใช้ตัวอย่างแห้ง เนื่องจากจะช่วยลดขั้นตอนในกระบวนการผลิต การขนส่งและการเก็บรักษา ผลที่แตกต่างกันอาจเกิดจากสารช้กน่าน้อยกว่าเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ เนื่องจากไม่พบความแตกต่างของการช้กน่านใน growth chamber แต่พบความแตกต่างทางสถิติของหัวที่ปลูกในโรงเรือนและในแปลงปลูก (ตารางที่ 4.16) น่าจะเกิดจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อมอื่น ๆ มาเกี่ยวข้องด้วย ทริตเมนต์ส่วนใหญ่แสดงผลที่สอดคล้องกันเมื่อเปลี่ยนสภาพแวดล้อม เช่น การช้กน่านด้วยไคโตซานให้ค่าที่สูงกว่าการช้กน่านด้วยทริตเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของทั้งสองสภาพแวดล้อม แสดงว่ามีปัจจัยของสภาพแวดล้อมมีผลในทางเสริมการช้กน่านด้วยไคโตซาน ไม่เคยมีรายงานที่แสดงว่าไคโตซานมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณสารสกัดหยาบในพืช แต่มีรายงานว่าสามารถเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงในพืชได้ (Khan *et al.*, 2002) จึงน่าจะมีผลทางอ้อมต่อสารสกัดหยาบ เนื่องจากการสังเคราะห์จะสร้างสารปฐมภูมิ เช่น สารไขมัน โปรตีน หรือแป้ง ในพืช สารเหล่านี้เปลี่ยนเป็นสารทุติยภูมิอย่างสารประกอบฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ การพบปริมาณสารสกัดหยาบที่สูงกว่าอาจคาดหวังได้ว่าจะมีสารทุติยภูมิชนิดดังกล่าวมากขึ้นได้

ตารางที่ 4.16 ผลของสารช้กน่านต่อสารสกัดหยาบ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)

ทริตเมนต์	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	32.8	42.0 bcd	79.8 cd
SA	29.4	34.1 ab	53.7 a
CuCl ₂	31.1	32.0 a	64.7 b
CuCl ₂ +SA	31.9	42.6 bcd	71.7 bc
Chitosan	35.3	49.7 d	84.2 d
Chitosan+SA	31.5	42.3 bcd	70.2 bc
Chitosan+CuCl ₂	33.6	47.7 cd	79.7 cd
Chitosan+CuCl ₂ + SA	30.4	38.6 abc	72.1 bc
CV (เปอร์เซ็นต์)	7.11	10.0	17.1

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.3.5.3 ผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ ต้นที่ปลูกใน ในแปลงทดลอง (ตารางที่ 4.17) โดยการชักนำด้วย CuCl_2 +SA และ chitosan+SA ทำให้ การสังเคราะห์แสงสูงที่สุด ขณะที่การชักนำด้วย ไคโตซาน หรือ คอปเปอร์คลอไรด์ อย่างเดียวมี อัตราการสังเคราะห์แสงต่ำ โดยเฉพาะการใช้ กรดซาลิไซลิก มีอัตราการสังเคราะห์แสงต่ำสุด แต่การ ใช้ร่วมไคโตซาน หรือ คอปเปอร์คลอไรด์ นั้นจะมีผลส่งเสริมให้เกิดการสังเคราะห์แสงสูงขึ้น ขณะที่ การใช้สารทั้งสามชนิดทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงสูงกว่าการใช้สารชักนำแต่ละตัวเพียงเล็กน้อย ผลที่ได้อาจถึงสารชักนำที่ใช้ร่วมกันเพิ่มการสังเคราะห์แสงได้ดีขึ้น Khan *et al.* (2003) พบว่าไคโต ซานและกรดซาลิไซลิกเพิ่มอัตราการสังเคราะห์แสงในถั่วเหลือง Wang and Li (2006) พบว่าการฉีด พ่นกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์/ลิตร ที่ให้แก่ถั่วเหลือง ทำให้อัตราการสังเคราะห์ แสงสุทธิ และค่า F_v/F_m (chlorophyll a fluorescence parameter) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม กลไกการชัก นำยังไม่เคยมีผู้ศึกษามาก่อน เนื่องจากการทดลองในโรงเรือน และ growth chamber ได้ผลที่ไม่ แตกต่างทางสถิติ จึงไม่สอดคล้องกับผลการทดลองในแปลงปลูก ผลจากแปลงทดลองอาจเกิดจาก อิทธิพลของปัจจัยอื่นได้ สมบุญ เตชภิญญาวัฒน์ (2538) ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์แสงเช่น 1) ความเข้มของแสง 2) อุณหภูมิ 3) อายุของใบ 4) ปริมาณน้ำที่พืชได้รับ และ 5) ธาตุอาหาร แต่จาก การทดลองในแปลง ปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้และน่าจะมีผลมากที่สุดคือ 1) ความเข้มแสงซึ่งในแปลงมี สูงกว่าในโรงเรือนที่มีหลังคาพลาสติกคลุมและใน growth chamber ถ้าความเข้มแสงมากจะเพิ่ม อัตราการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์สุทธิให้สูงขึ้นจึงมีผลต่อการสังเคราะห์แสง 2) อุณหภูมิ มีอิทธิพล ต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ถ้าอุณหภูมิเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จะทำให้พืชมีอัตรา การสังเคราะห์ด้วยแสงสูงขึ้น 3) อายุของใบ ใบพืชที่อ่อนหรือแก่เกินไปจะสังเคราะห์ด้วยแสงต่ำกว่า ใบพืชที่เจริญเติบโตเต็มที่เพราะว่าใบที่อ่อนเกินไปการพัฒนาของคลอโรพลาสต์ยังไม่เจริญเต็มที่ ส่วนใบที่แก่เกินไปจะมีการสลายตัวของกรานูมและคลอโรฟิลล์ 4) ธาตุอาหาร ธาตุแมกนีเซียมและ ไนโตรเจนเป็นธาตุสำคัญในองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์ ธาตุเหล็กจำเป็นต่อการสร้างคลอโรฟิลล์ และเป็นองค์ประกอบของไซโทโครมซึ่งเป็นตัวถ่ายอิเล็กตรอนส่วนธาตุแมงกานีส และคลอโรฟิลล์ จำเป็นต่อกระบวนการแตกตัวของน้ำในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยแสง การขาดธาตุอาหารเหล่านี้ ทำให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง ในแปลงทดลองจะมีความแปรปรวนของชนิดและปริมาณ มากกว่าจึงอาจส่งผลให้เกิดความแตกต่างได้

ตารางที่ 4.17 ผลของสารชักนำต่อการสังเคราะห์แสง (มิลลิโมลาร์/ตารางเซนติเมตรวินาที)

ทรีตเมนต์	growth chamber	โรงเรือน	แปลงทดลอง
Water (control)	20.2	22.2	23.9 b
SA	20.5	20.2	20.0 a
CuCl ₂	21.1	20.2	21.1 ab
CuCl ₂ +SA	19.0	23.0	26.6 c
Chitosan	22.1	20.0	23.5 b
Chitosan+SA	23.6	23.1	26.5 c
Chitosan+CuCl ₂	21.9	23.2	20.5 a
Chitosan+CuCl ₂ + SA	21.7	21.5	21.5 ab
CV (เปอร์เซ็นต์)	5.89	7.81	6.22

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

4.4 การทดลองที่ 4 สารสกัดกวางเครือขาวกับการลดระดับน้ำตาลในเลือดและผลกระทบต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน

การหาระดับกลูโคสในเลือดของหนูแรทพันธุ์ วิสตาร์ พบว่ามีระดับกลูโคสปกติในเลือดอยู่ในช่วง 63.33 ± 7.64 ถึง 71.33 ± 11.02 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (ตารางผนวกที่ 8) ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับการทดลองของ ณัฐชัย แสนบัวพันธ์ (2548) พบว่าหนูแรทพันธุ์วิสตาร์ ขนาดน้ำหนักตัว 200-250 กรัมมีระดับกลูโคสปกติในเลือดอยู่ในช่วง 64.05-75.80 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ส่วนหนูแรทพันธุ์ Sprague-Dawley ขนาดน้ำหนักตัว 250-300 กรัมมีระดับกลูโคสในเลือด 70.50 ± 4.81 ถึง 85.00 ± 3.11

4.4.1 ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดกวางเครือขาวในหนูแรทที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

4.4.1.1 หนูปกติ ผลของสารกลุ่มต่าง ๆ ต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติ โดยการทำ OGTT นั้น พบว่ากลัยเบนคลาไมด์ซึ่งเป็นยาเม็ดลดน้ำตาลในเลือดกลุ่ม sulfonylureas ที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์บีตาในตับอ่อน โดยกระตุ้นการหลั่งอินซูลินและยับยั้งการหลั่งกลูคากอน (Luzi and Pozza, 1997) ที่ใช้เป็นยามาตรฐาน (positive control) นั้น สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 120 นาที จนถึง 240 นาทีหลังรับยาเข้าไป สำหรับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวางเครือขาวที่ความเข้มข้น 100 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว นั้นไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.18 และตารางผนวกที่ 9) แม้ว่าที่สารที่

ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่ 120 นาที จะลดระดับน้ำตาลได้มากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 11.23 เปอร์เซ็นต์ ก็ตาม (ตารางที่ 4.19) ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชบางชนิด ซึ่งมีวิธีการทดสอบคล้ายกัน เช่น Mukherjee *et al.* (1972) พบว่า สารสกัดใบตำลึง (*Coccinia indica*) ขนาด 1 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถต้านการเพิ่มระดับกลูโคสในเลือดของหนูปกติได้ร้อยละ 25 และ Bailey *et al.* (1985) พบว่า สารสกัดเนื้อมะระ (*Momordica charantia*) มีฤทธิ์ทนกลูโคสของหนูเมาส์ในช่วงเวลาที่ 8 หลังได้รับสารสกัด ซึ่งแสดงว่าสารสกัดจากพืชหลายชนิดสามารถลดระดับกลูโคสในเลือดเมื่อถูกชักทำให้เกิดภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันในหนูปกติได้ แต่ไม่พบผลดังกล่าวในการใช้สารสกัดกวาวเครือขาว

ตารางที่ 4.18 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทปกติที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ ในภาวะการมีกลูโคสในเลือดสูงในเลือดสูงเฉียบพลัน

การปฏิบัติ	ระดับน้ำตาลในเลือด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)				
	0 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที
น้ำกลั่น	60.0±4.8	112.5±15.1	95.8±8.9	77.0±3.7	76.5±8.6
กลัยเบนคลาไมด์	63.5±3.9	105.0±5.7	62.0±11.3*	52.8±14.5*	47.5±13.5*
กวาวเครือขาว (100 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	68.3±9.8	111.5±9.5	86.5±3.1	77.0±2.8	72.5±1.3
กวาวเครือขาว (500 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	70.3±6.6	116.5±9.3	85.0±4.2	74.5±2.6	70.8±5.8

หมายเหตุ * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 4.19 เปอร์เซ็นต์ระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันในหนูปกติที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน

กลุ่มทดลอง	0 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที
กลัยเบนคลาไมด์ (10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	-5.83	6.67	35.25	31.49	37.91
กวาวเครือขาว (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	-3.75	0.89	9.66	0.00	5.23
กวาวเครือขาว (500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	-7.08	-3.56	11.23	3.25	7.52

4.4.1.2 หนูเบาหวาน พบว่าผลของกลัยเบนคลาไมด์และสารสกัดกวางเครือไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน ฤทธิ์กลัยเบนคลาไมด์อาจเกิดจาก 2 สาเหตุ คือ 1) ขนาดที่ใช้อาจต่ำเกินไป เนื่องจากหนูเป็นเบาหวานบางตัวอาจมีอาการเบาหวานเป็นเบาหวานในขั้นรุนแรงจนยาไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้สอดคล้องกับ Sharma *et al.* (1997) ที่รายงานว่ากลัยเบนคลาไมด์มีผลลดระดับน้ำตาลในหนูที่เป็นเบาหวานที่ไม่รุนแรงถึงปานกลาง เพราะในขั้นนี้เซลล์บีตาของตับอ่อนยังไม่ได้เสียหายทั้งหมด และยังสร้างอินซูลินได้ และ Ratzman *et al.* (1984) หนูที่เป็นเบาหวานขั้นรุนแรงนั้นเซลล์บีตาจะถูกทำลายเกือบทั้งหมดทำให้กลัยเบนคลาไมด์ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ 2) หนูเบาหวานบางตัวอาจทุเลาจากการเป็นเบาหวานโดยมีการฟื้นคืน (recovery) ของไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ได้ ทำให้ค่าเฉลี่ยระดับน้ำตาลในเลือดของกลุ่มลดต่ำกว่าความเป็นจริง ทำให้ผลการทดลองมีความคลาดเคลื่อนมาตรฐานสูงจนไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.20 และตารางผนวกที่ 10) แต่ถ้าพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การลดลงของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงจากกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกันของทั้ง กลัยเบนคลาไมด์และสารสกัดกวางเครือพบว่ากลัยเบนคลาไมด์มีแนวโน้มลดระดับน้ำตาลในเลือดได้มากขึ้นตั้งแต่นาทีที่ 120 หลังได้รับสารและสามารถลดระดับน้ำตาลได้สูงที่สุดในเวลา 300 นาที คิดเป็น 36.09 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดกวางเครือทำให้ผลที่คล้ายกับผลของกลัยเบนคลาไมด์ คือมีแนวโน้มลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ตั้งแต่นาทีที่ 120 และสามารถลดระดับน้ำตาลได้มากที่สุดในเวลา 300 นาที คิดเป็น 36.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (ตารางที่ 4.21)

ตารางที่ 4.20 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ ในภาวะที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน

เวลา (นาที)	กลุ่มทดลอง		
	น้ำกลั่น	กลัยเบนคลาไมด์	กวางเครือขาว
0	310.00±32.68	313.75±64.58	324.25±59.71
30	363.50±46.72	359.75±63.74	369.25±69.56
60	548.75±45.13	539.75±100.9	528.00±92.62
120	416.50±57.04	373.00±95.79	375.00±61.03
180	380.50±49.49	338.00±116.59	317.50±49.26
240	349.00±33.74	259.00±103.15	290.50±37.93
300	354.00±38.24	226.25±113.77	223.25±83.05

ตารางที่ 4.21 เปอร์เซ็นต์ระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันในหนูเบาหวานในภาวะที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงเทียบพลัน

	0 นาที	30 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที	300 นาที
กลัยเบนคลาไมด์	-1.21	1.03	1.64	10.44	11.17	25.79	36.09
กวาวเครือขาว	-4.60	-1.58	3.78	9.96	16.56	16.76	36.94

4.4.2 ฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานเมื่อให้สารสกัดวันละครั้งติดต่อกัน 30 วัน

กลัยเบนคลาไมด์สามารถลดระดับน้ำตาลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 30 ของการทดลอง (ตารางที่ 4.22) โดยลดได้สูงที่สุดในวันที่ 21 คิดเป็น 43.49 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น (วันที่ 0) (ตารางที่ 4.23) พบว่าวันที่ 21 ลดลงมากที่สุดถึง 38.11 เปอร์เซ็นต์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.20) Sharma *et al.* (1997) รายงานว่ากลัยเบนคลาไมด์มีผลลดระดับน้ำตาลในหนูที่เป็นเบาหวานที่ไม่รุนแรงถึงปานกลาง เพราะในขั้นนี้เซลล์บีตาของตับอ่อนยังไม่ได้เสียหายทั้งหมดและยังสร้างอินซูลินได้ ดังนั้นกลัยเบนคลาไมด์จึงสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งอินซูลินได้ การทดลองครั้งนี้พบว่าในวันที่ 30 กลัยเบนคลาไมด์ยังสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ สอดคล้องกับ Sharma *et al.* (1996) ที่พบว่าทำให้กลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 10 วัน มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูเบาหวาน และ Peungvicha *et al.* (1996) พบว่าการให้ยาขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ติดต่อกัน 8 วัน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นเพราะหนูทุกกลุ่มยังมีการดำเนินของโรคยังไม่ถึงขั้นรุนแรง ทำให้ในวันที่ 14 ถึงวันที่ 30 ของการทดลองนั้นยากกลัยเบนคลาไมด์ยังสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ หรืออาจเป็นไปได้ว่ากลัยเบนคลาไมด์มีฤทธิ์นอกตับอ่อน คือเพิ่มการนำกลูโคสเข้าเซลล์และเพิ่มการใช้กลูโคสได้อีกด้วย (อรพรรณ มาตังคสมบัติ, 2544; Ojewole, 2002)

ส่วนผลของสารสกัดกวาวเครือขาวหลังจากป้อนสารสกัดติดต่อกัน 14 วัน พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวลดระดับน้ำตาลได้มากที่สุดถึง 28.95 เปอร์เซ็นต์ มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (กลุ่มควบคุม: 331.40 ± 44.98 มิลลิกรัม/เดซิลิตร, สารสกัด: 236.67 ± 38.11 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) และยังได้ผลใกล้เคียงกับที่เวลา 21 วัน ที่ลดระดับน้ำตาลได้ถึง 26.37 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.18 และเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (กลุ่มควบคุม: 345.40 ± 29.90 มิลลิกรัม/เดซิลิตร, สารสกัด: 254.3 ± 67.08 มิลลิกรัม/เดซิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 4.19 และการเทียบกับค่าเริ่มต้น (เปรียบเทียบกับวันที่ 0) ในกลุ่มเดียวกัน พบว่าในวันที่ 14 ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้มากที่สุดถึง 18.30 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.22 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารแต่ละกลุ่มต่อเนื่อง 30 วัน

กลุ่มทดลอง	ระดับน้ำตาลในเลือด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)				
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 30
น้ำกลั่น (กลุ่มควบคุม)	297	385	399	299	297
	317	375	328	352	389
	291	396	273	373	229
	297	315	322	368	355
	320	313	335	335	365
ค่าเฉลี่ย	304.40	356.80	331.40	345.40	327.00
s.d.	13.15	39.78	44.98	29.90	64.37
กลัยเบนคลาไมด์	354	306	178	132	166
	357	319	170	323	298
	283	191	152	202	124
	279	171	232	130	154
	304	223	262	189	272
ค่าเฉลี่ย	315.40 a	242.00* ab	198.80* b	195.20* b	202.80* b
s.d.	37.83	67.13	46.23	78.52	77.13
กวาวเครือขาว	308	358	270	233	290
	279	210	200	252	200
	325	349	243	239	300
	273	266	206	230	304
	274	369	292	384	309
279	329	209	188	209	
ค่าเฉลี่ย	289.67 ab	313.50 b	236.67* a	254.33* ab	268.67 ab
s.d.	21.61	62.50	38.11	67.08	50.17

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 (DMRT)

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน (LSD)

กับระดับน้ำตาลในวันที่ 0 ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัด (ตารางที่ 4.24)

สารสกัดกวางเครือขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทที่เป็นเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 14 ของการป้อนสารอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วันได้ ซึ่งอาจเกิดจากคุณสมบัติของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ เช่น ฟิราโรนที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนสอดคล้องกับการทดลองของ บุทธนา สมิตศิริและคณะ (2551) ที่พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารเสริมชนิดหนึ่งซึ่งมีส่วนผสมของกวางเครือขาวทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติกาลลงได้ เป็นที่น่าสนใจว่าสารสกัดกวางเครือขาวออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยผ่านกลไกใดบ้าง เช่น อาจผ่านกลไกการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากบีต้าเซลล์เหมือน estradiol เช่นเดียวกับ Kooptiwut *et al.* (2007) ที่พบว่าเซลล์ตับอ่อนหลังอินซูลินสูงขึ้นเมื่อเลี้ยงในระดับน้ำตาลสูงร่วมกับเอสโตรเจนเป็นเวลา 10 วัน และยังช่วยป้องกันกลุ่มเซลล์ตับอ่อนซึ่งทำงานด้อยลงเมื่ออยู่ในน้ำเลี้ยงที่มีระดับน้ำตาลสูงให้หลังอินซูลินได้ดีขึ้น หรืออาจผ่านกลไกการนำกลูโคสเข้าเซลล์ หรืออาจมีฤทธิ์เสริมการทำงานของอินซูลิน เหมือนฟิราโรนถูกใช้ในการบำบัดโรคเบาหวานในประเทศจีนมาตั้งแต่ปี 1990 เนื่องจากสามารถเพิ่มการตอบสนองต่ออินซูลิน เพิ่มการใช้กลูโคสและสนับสนุนการไหลเวียนของเลือด (Jia *et al.*, 2003) จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการออกฤทธิ์และผลในสัตว์ species อื่นที่สูงขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลนำไปสู่การพัฒนากรวางเครือขาวให้เป็นยารักษาโรคเบาหวานต่อไป

ตารางที่ 4.23 เปรอ์เซ็นต์การลดระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

กลุ่มทดลอง	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 30
กลัยเบนคลาไมด์					
10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	-3.61	32.17	40.01	43.49	37.98
กวางเครือขาว					
100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	4.84	12.14	28.59	26.37	17.84

ตารางที่ 4.24 เปรอ์เซ็นต์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของแต่ละกลุ่มทดลองเมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น (เทียบกับวันที่ 0)

กลุ่มทดลอง	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 30
น้ำกลั่น	-17.21	-8.87	-13.47	-7.42
กลัยเบนคลาไมด์				
(10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	23.27	36.97	38.11	35.70
กวางเครือขาว				
(100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว)	-8.23	18.30	12.20	7.25

4.4.3 ผลของสารสกัดกวางเครือขาวต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและเนื้อเยื่อตับของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 30 วัน

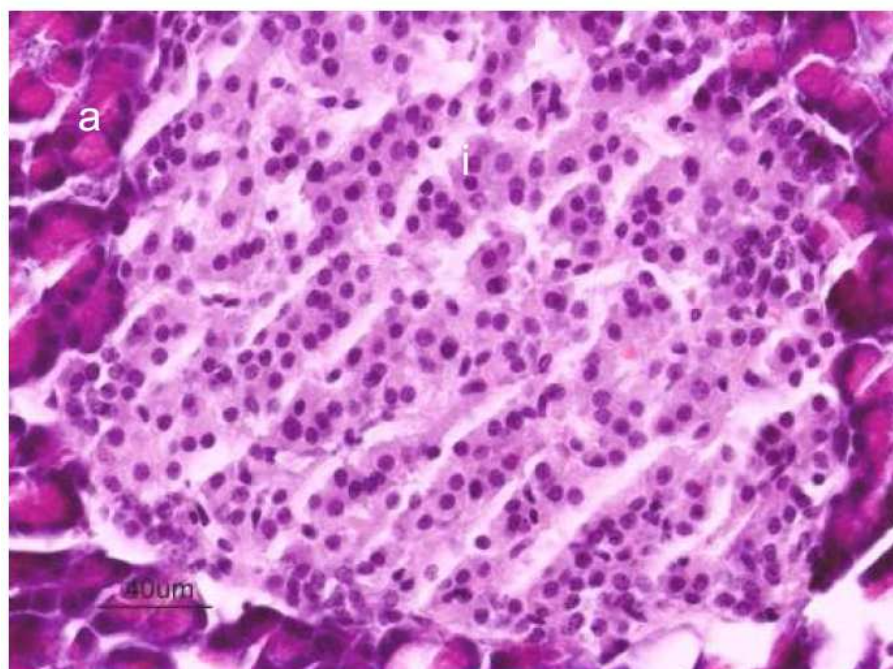
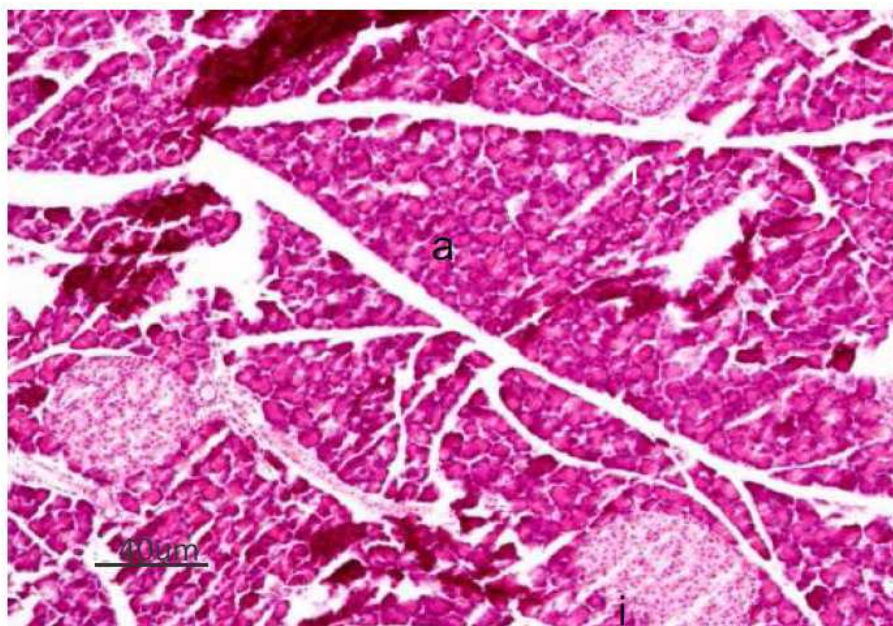
4.4.3.1 ผลต่อจุลพยาธิสภาพของตับอ่อน ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนหนูกลุ่มปกติ ที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน มีลักษณะดังนี้ พบไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์มีรูปร่างกลมหรือรี มีขอบเขตแยกออกจากตับอ่อนส่วนไม่สร้างฮอร์โมน (exocrine pancreas) มีทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็กกระจายกันอยู่ทั่วไป การจัดเรียงตัวของเซลล์ภายในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์เป็นระเบียบ มีช่องว่าง (ภาพตัดขวางของเส้นเลือดฝอย) ที่ชัดเจนและเป็นระเบียบ ภายในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมที่มีขนาดใกล้เคียงกันมีนิวเคลียสรูปร่างกลมติดสีน้ำเงิน เห็นนิวเคลียสโอลด์สชัดเจน ไซโทพลาซึมติดสีชมพูของสีอีโอซินอย่างสม่ำเสมอทั่วเซลล์ (ภาพที่ 4.21)

1) ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับน้ำกลั่นขนาด 2 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 วัน เมื่อย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซินมีลักษณะแตกต่างจากกลุ่มปกติดังนี้ ไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์มีรูปร่างไม่แน่นอนส่วนใหญ่จะเหี่ยวหรือยุบไป จำนวนไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์ลดลง 62.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับหนูปกติมีช่องว่างมากขึ้น เซลล์ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างรี (ภาพที่ 4.22)

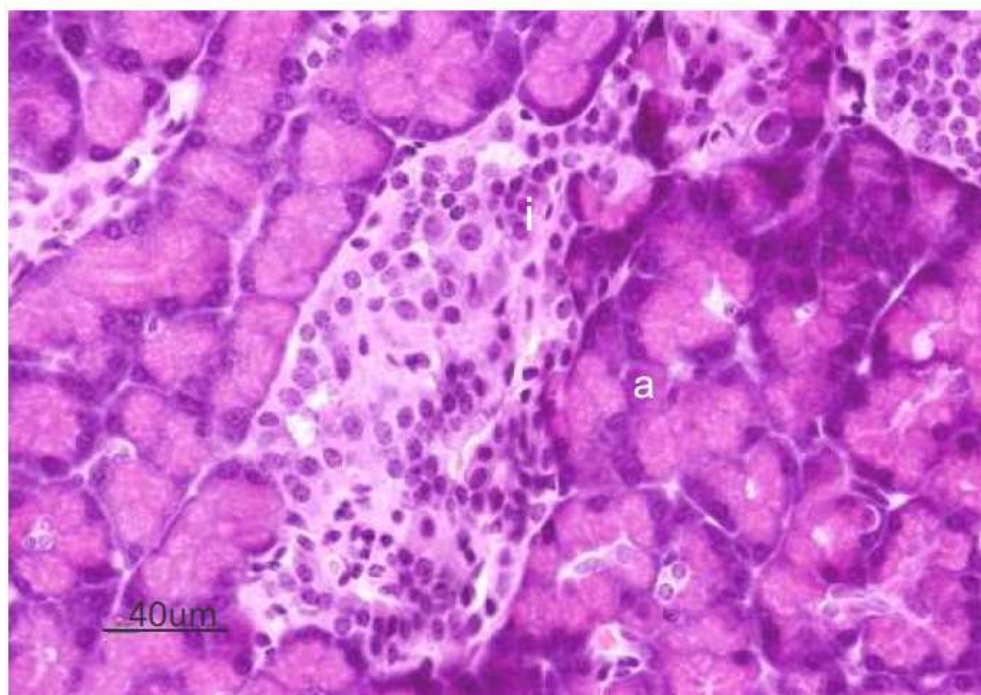
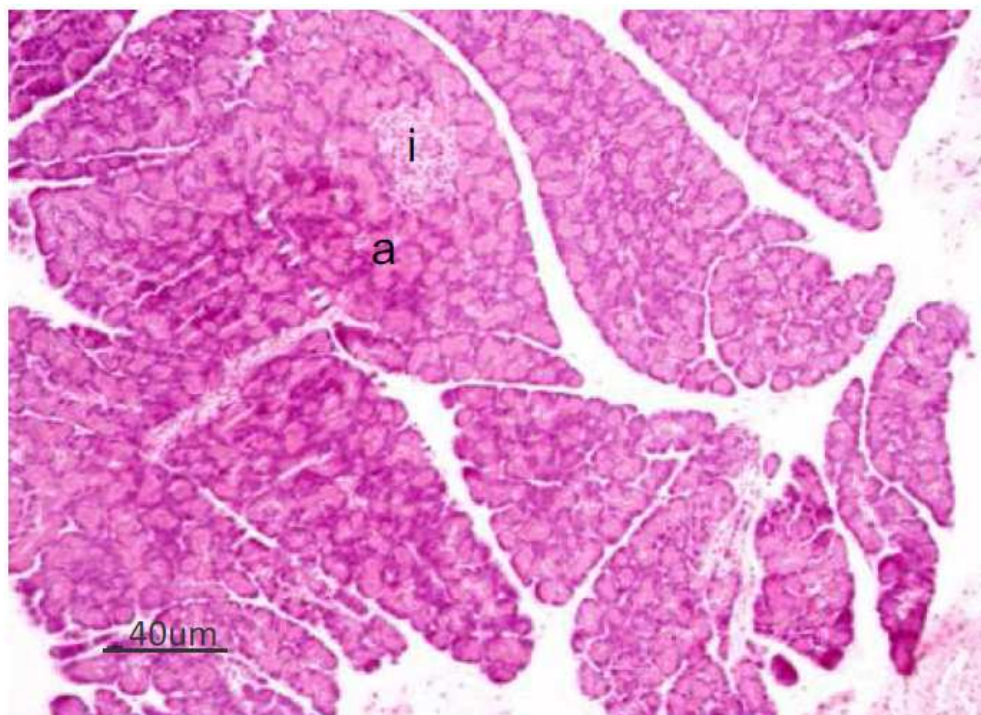
2) ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนของหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับยา กลัยเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน มีลักษณะคล้ายกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมคือ ไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอนส่วนใหญ่มีขนาดเล็กกว่าหนูปกติและมีจำนวนลดลง 51.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับหนูปกติ เซลล์ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอนและจัดเรียงกันอย่างไม่เป็นระเบียบ เส้นเลือดฝอยแคบลงและไม่เป็นระเบียบ นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างรีติดสีน้ำเงินเข้มทึบ (ภาพที่ 4.23)

3) ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากกวางเครือขาวปริมาณ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน มีลักษณะคล้ายกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับกลัยเบนคลาไมด์ แต่มีลักษณะของเซลล์ที่เป็นปกติมากกว่าและเห็นช่องว่างที่เป็นเส้นเลือดฝอยขยายออกมากกว่าที่พบใน ไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยา กลัยเบนคลาไมด์ ซึ่งอาจเกิดจากพิวรารีนในสารสกัดกวางเครือขาวมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือดได้ (John *et al.*, 2004) แต่ไอเลตส์ออฟแลงเกอร์-แฮนส์ยังมีรูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดเล็กและเป็นระเบียบน้อยกว่าในหนูปกติ โดยมีจำนวนลดลงถึง 41.1

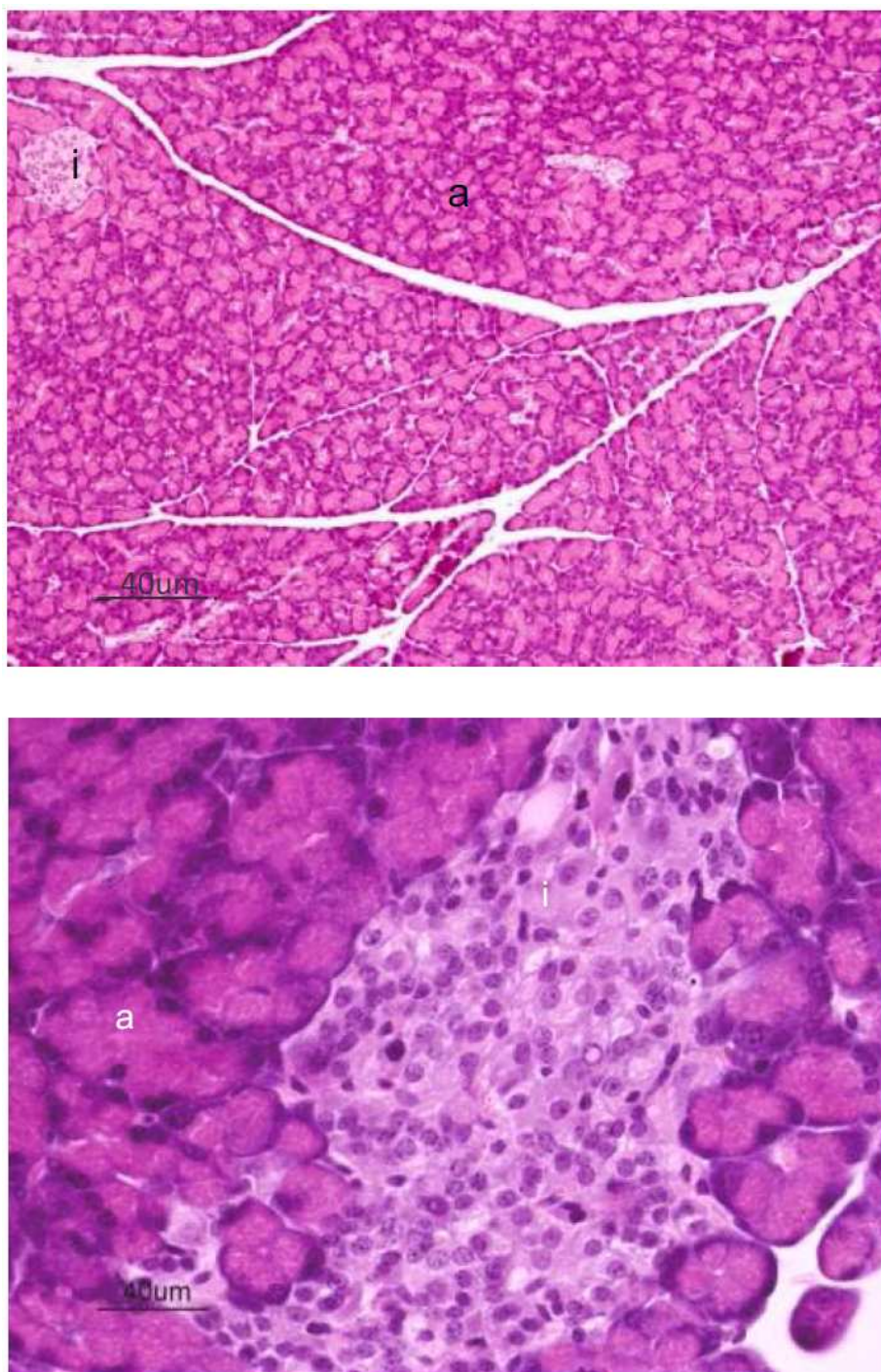
เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับหนูปกติและพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวางเครือขาวมีจำนวนไอเลตส์ออฟฟแลงเกอร์แฮนส์ที่หลือมากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ป้อนกลัยเบนคลาไมด์ เป็นไปได้ว่าสารสกัดจากกวางเครือขาว ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงนั้น สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระจากสเตรปโตโซโทซินจึงช่วยลดความเสียหายต่อเซลล์ใน ไอเลตส์ออฟฟแลงเกอร์แฮนส์ (ภาพที่ 4.24)



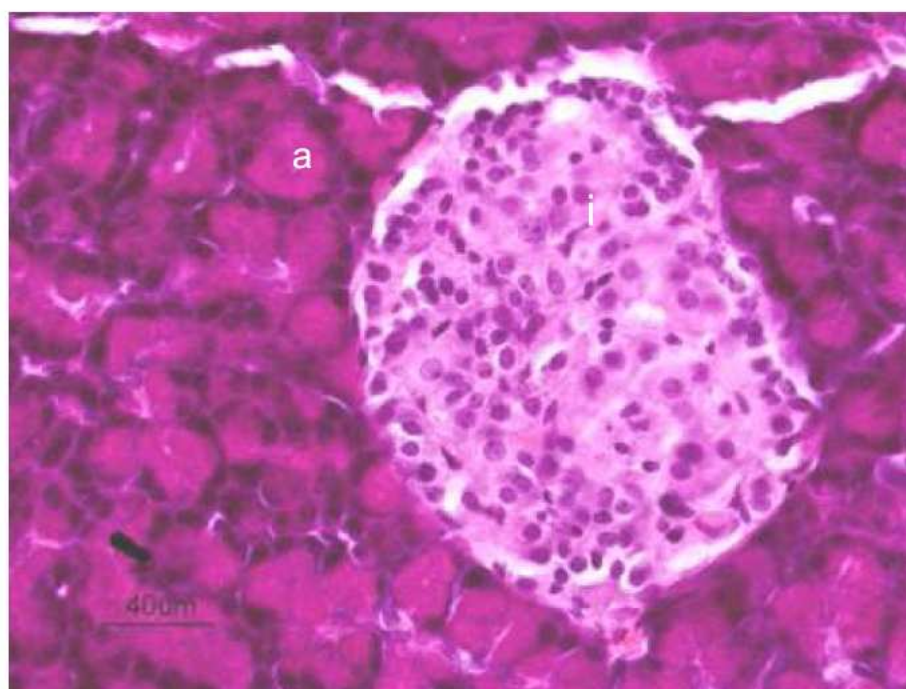
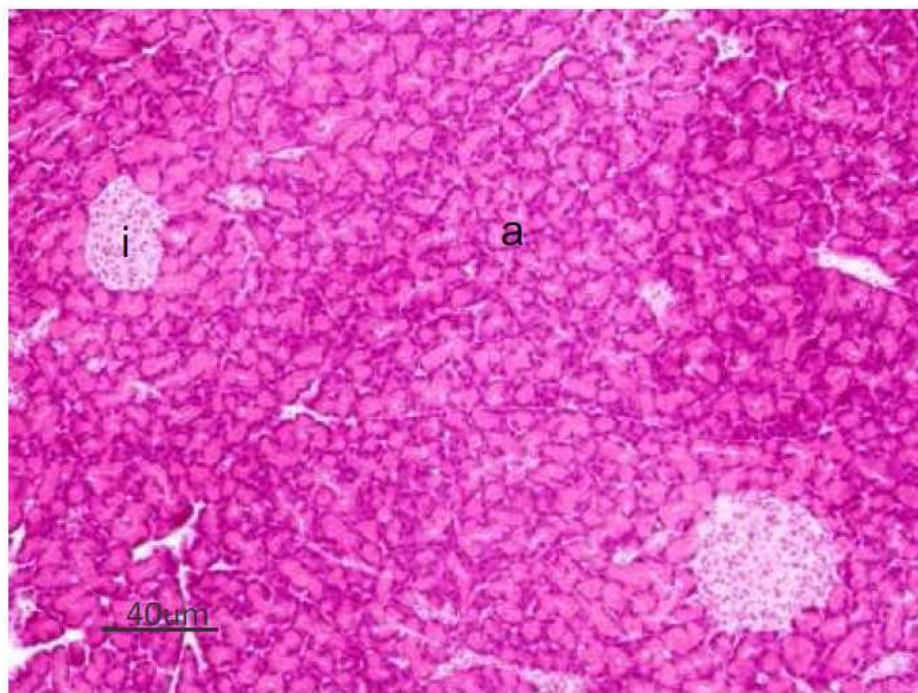
ภาพที่ 4.21 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนูปกติ (ภาพบน กำลังขยาย x10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 4.22 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



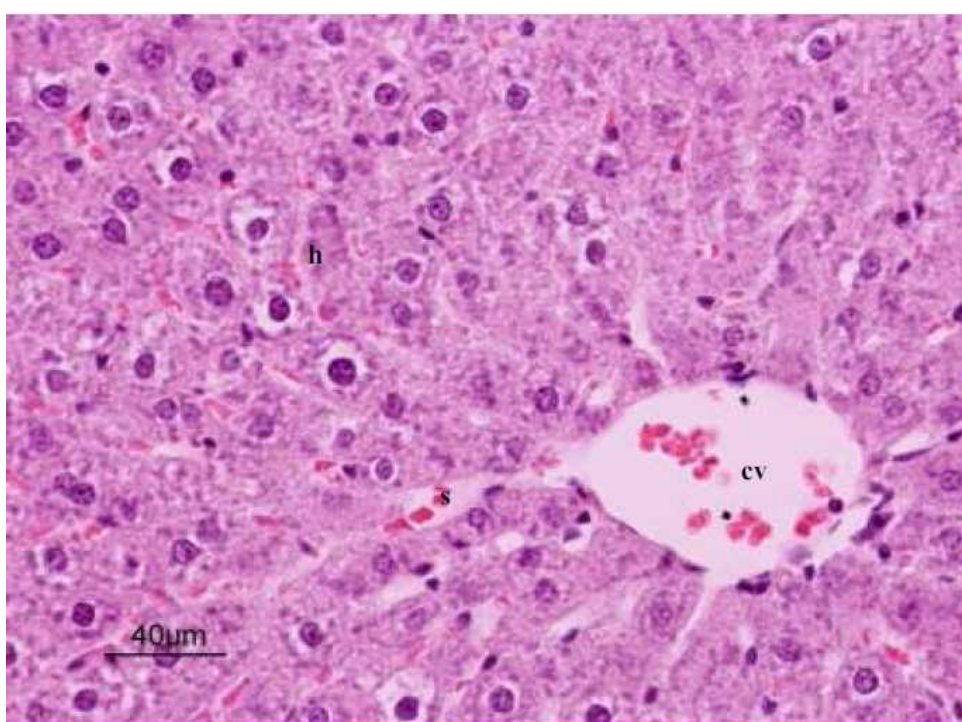
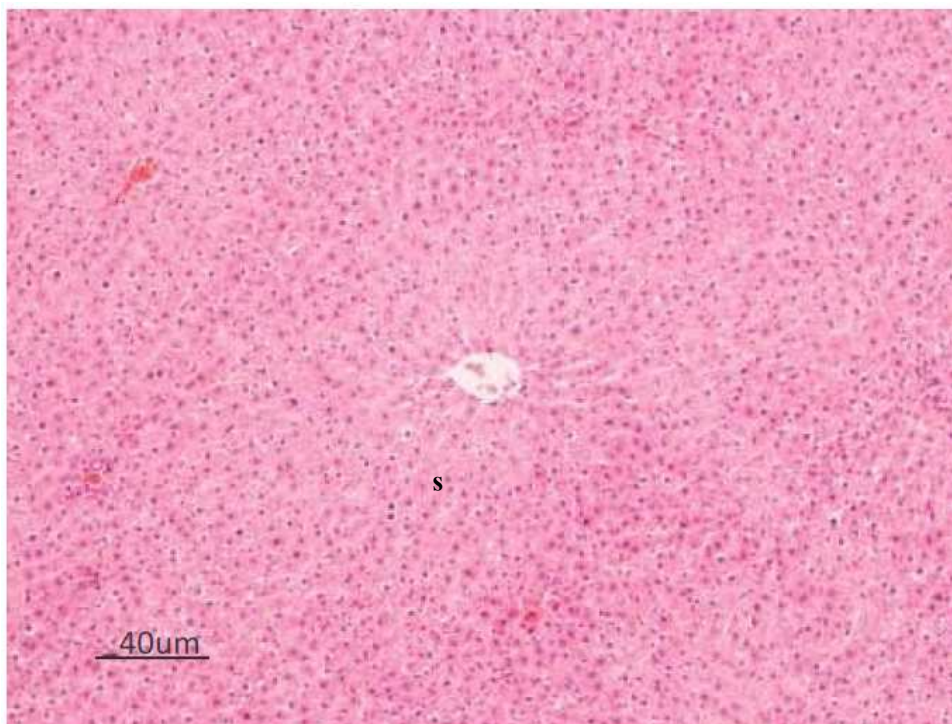
ภาพที่ 4.23 แสดงพยาธิสภาพของตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acenous cells (a) หลังจากได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับกลัยเบน-คลาไมด์ (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



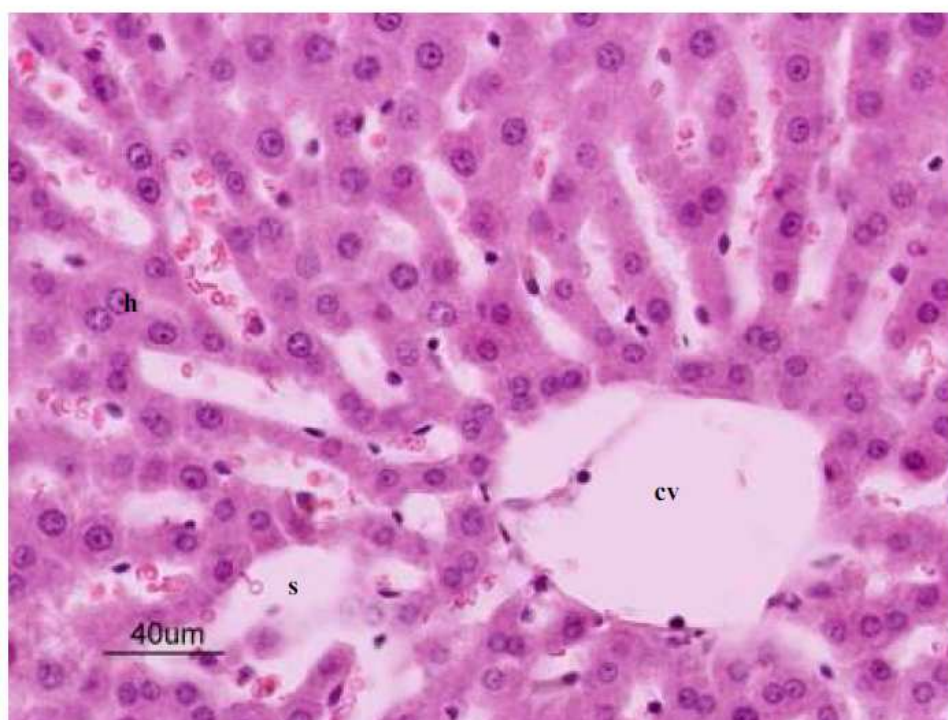
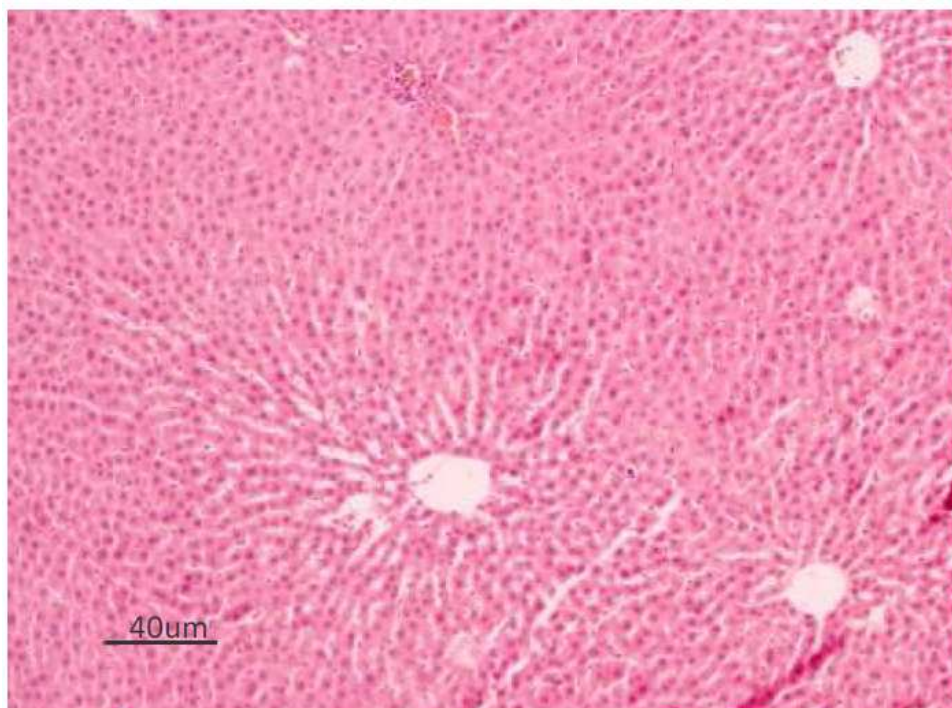
ภาพที่ 4.24 ตับอ่อนของหนุเบหาวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาว แสดงพยาธิสภาพของ ตับอ่อน แสดงไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ (i) และ acinenous cells (a) หลังจากได้รับ สารทดสอบติดต่อกัน 30 วัน ของหนุเบหาวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาว (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)

พยาธิสภาพของตับอ่อนในหนูที่เป็นเบาหวานทุกกลุ่ม เป็นผลโดยตรงจากการทำลายของ streptozotocin ที่ใช้ชักนำให้หนูทดลองเกิดเป็นเบาหวาน (Rakieta *et al.* 1963; Junod *et al.* 1967; Szkudelski, 2001) สอดคล้องกับ Ahmed *et al.* (1998) ที่รายงานว่าสาร streptozotocin ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีผลทำให้เซลล์บีตาในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์เหลือเพียงร้อยละ 27.01 ขณะที่ในหนูกลุ่มปกติมีเซลล์บีตาสูงถึงร้อยละ 60.01 และ Szkudelski (2001) รายงานว่าสาร streptozotocin ที่ใช้ในการชักนำเบาหวานในสัตว์ทดลองนั้น เป็นสารที่เติมกลุ่มเมทิลให้กับดีเอ็นเอและให้สารอนุมูลอิสระชนิดแรง คือ สารไนตริกออกไซด์ ดังนั้นเซลล์บีตาที่อยู่ภายในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์จึงถูกทำลายโดยไนตริกออกไซด์ได้ง่ายเพราะในเซลล์ตับอ่อนไม่มีเอนไซม์กำจัดอนุมูลอิสระ เซลล์จึงถูกทำลายและตายในที่สุด นอกจากนี้ การพบการบวมของเซลล์ในไอเลตส์ออฟแลงเกอร์แฮนส์ที่พบในหนูทุกกลุ่มที่เป็นเบาหวาน อาจเกิดจากภาวะแทรกซ้อนที่พบในโรคเบาหวาน เช่น การติดเชื้อ การอักเสบ หรือความผิดปกติของการเผาผลาญไขมัน เป็นต้น (พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์ และ พิเชฐ สัมปทานุกุล, 2541) ดังนั้นพยาธิสภาพของตับอ่อนที่พบในการทดลองนี้ พบในหนูเบาหวานทุกกลุ่ม จึงยังไม่อาจสรุปได้ว่าพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องจากสารสกัดกวางเครือขาว

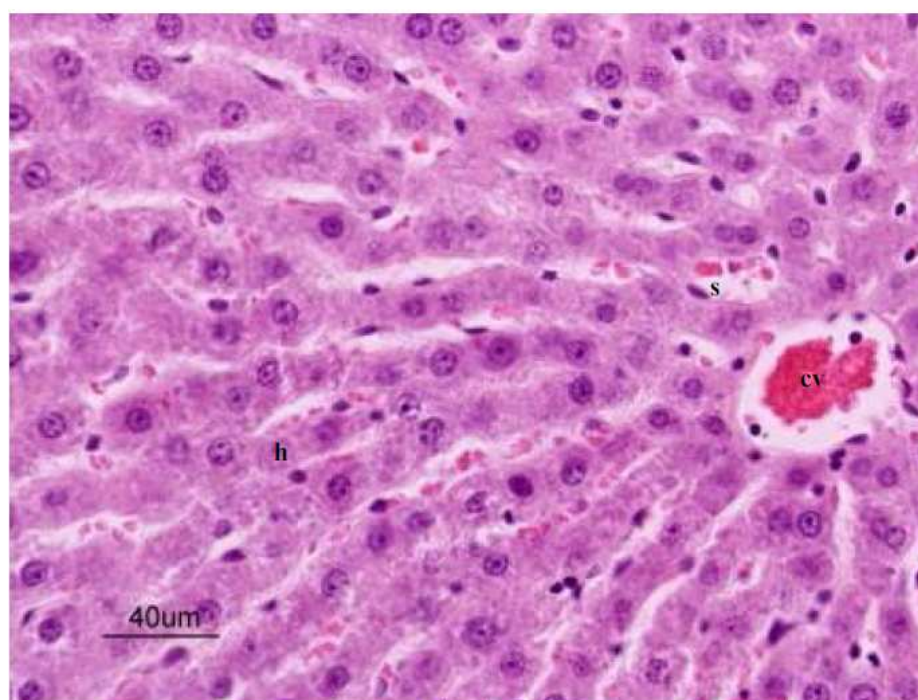
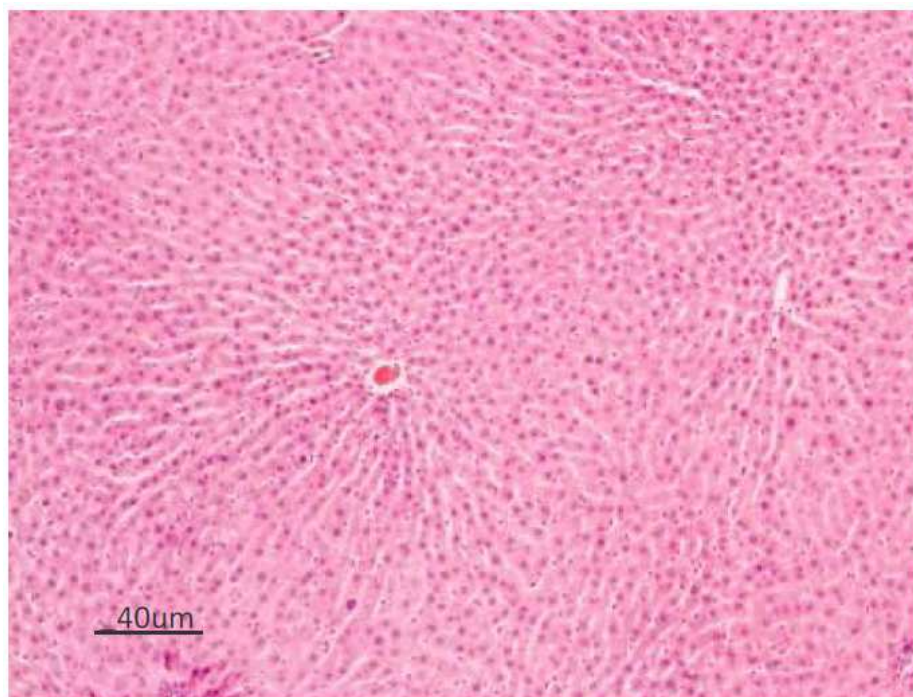
4.4.3.2 ผลต่อลักษณะจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับหนูแรท กลุ่มปกติทุกตัวที่เชื่อมด้วยสีฮีมาทอกซาลินและอีโอซินมีลักษณะปกติและเหมือนกัน คือ มีหลอดเลือดดำตรงกลาง (central vein: cv) (ภาพที่ 4.25) มีเซลล์ตับเรียงเป็นแถวในแนวรัศมี (hepatic cord: h) มีหลอดเลือดฝอย (sinusoid: s) อยู่ระหว่างแถวของเซลล์ตับ มีเซลล์เม็ดเลือดแดงติดสีชมพูเข้มของอีโอซินอยู่ในหลอดเลือด ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับหนูเบาหวานทุกกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน 30 วัน (ภาพที่ 4.26) กลุ่มที่ได้รับยาไกลซีเบนคลาไมด์ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน 30 วัน (ภาพที่ 4.27) และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวางเครือขาว 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน 30 วัน (ภาพที่ 4.28) มีความแตกต่างจากหนูกลุ่มปกติ คือ หลอดเลือดฝอยที่แทรกระหว่างแถวของเซลล์ตับมีการขยายกว้างขึ้น (sinusoid dilation) พยาธิสภาพที่เกิดในตับพบในหนูทุกกลุ่ม Singh *et al.* (2001) รายงานว่าสาร streptozotocin ขนาด 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่ใช้ชักนำให้หนูทดลองเป็นโรคเบาหวานไม่ทำลายตับของสัตว์ การเกิดการขยายของหลอดเลือดฝอยที่มีมากกว่าในหนูปกติ อาจมีสาเหตุจากตับมีการอักเสบเนื่องจากภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานตลอดจนภาวะเลือดไปเลี้ยงไม่เพียงพอ (พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์และพิเชฐ สัมปทานุกุล, 2541) และกรณีของสารสกัดกวางเครืออาจมีผลของพิววารินร่วมด้วยเนื่องจากพิววารินมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและเพิ่มการไหลเวียนของเลือดในหลอดเลือด coronary artery (John *et al.*, 2004)



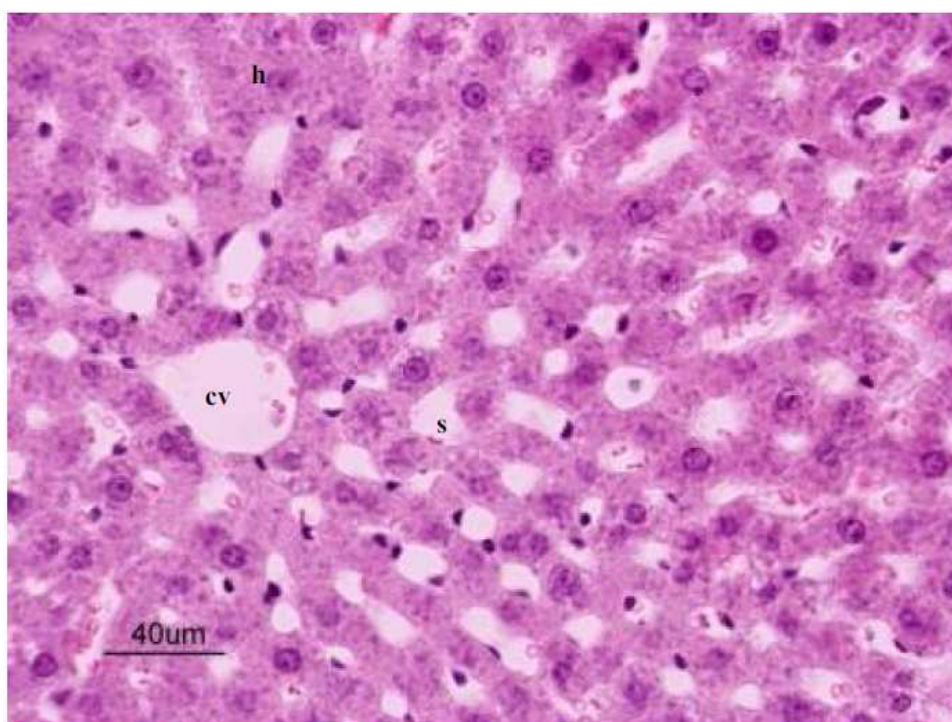
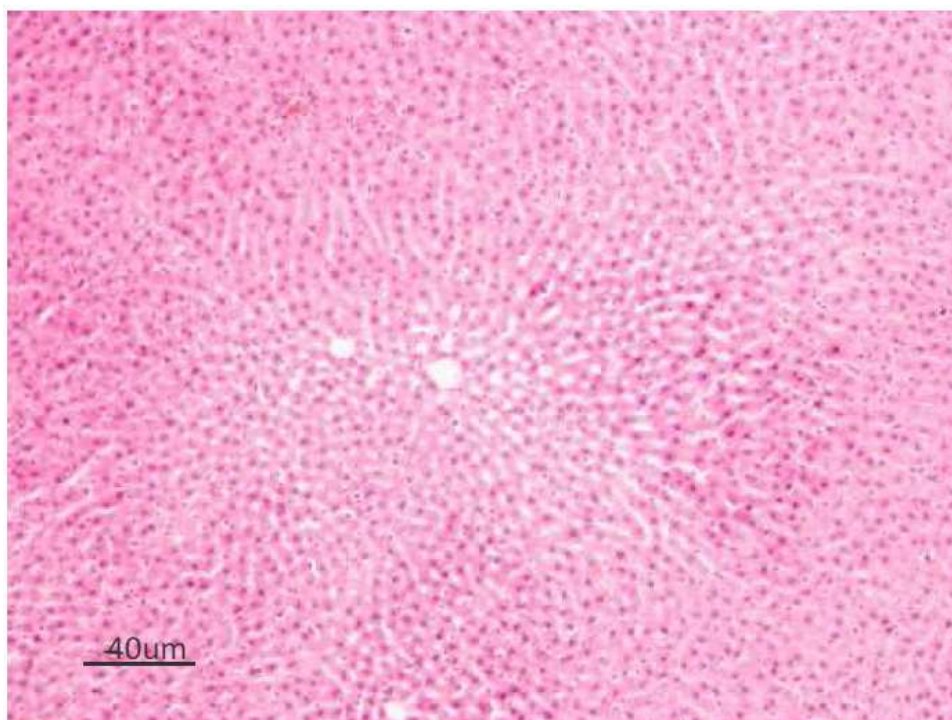
ภาพที่ 4.25 ภาพตัดขวางดับหนูแรทของหนูปกติประกอบด้วยหลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 4.26 พยาธิสภาพของตับหนูแรทเบาหวานกลุ่มควบคุมประกอบด้วยหลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 4.27 พยาธิสภาพของตับหนูแรทหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับกลัยเบนคลาไมด์ประกอบด้วย หลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s) (H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)



ภาพที่ 4.28 พยาธิสภาพของตับหนูแรทหนูเบาหวานกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวประกอบ
ด้วยหลอดเลือดดำ (cv) เซลล์ตับ (h) หลอดเลือดฝอยระหว่างแถวของเซลล์ตับ (s)
(H&E) (ภาพบน กำลังขยาย x 10; ภาพล่าง กำลังขยาย x 40)

ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าลักษณะดังกล่าวเกิดจากการได้รับสารสกัดกวางเครือขาว สอดคล้องกับการศึกษาถึงพิษเรื้อรังของกวางเครือขาวโดย ทรงพล ชีวะพัฒน์และคณะ (2543) ที่ให้ผงกวางเครือขาวแก่หนูขาวพันธุ์วistar ในขนาด 10 และ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 90 วัน ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติต่อค่าโลหิตวิทยาและไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของอวัยวะภายในที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติของกวางเครือขาว บางพยาธิสภาพมีโอกาสเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หรืออาจเป็นความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับอายุ หรืออาจเกิดเนื่องจากภาวะเบาหวาน เพราะฉะนั้นผลการตรวจทางจุลพยาธิสภาพที่พบครั้งนี้ ยังไม่อาจสรุปได้ว่าสารสกัดจากกวางเครือขาวทำให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูแรท

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การจำแนกพันธุ์กวางเครือขาวโดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเทคนิค ISSR-Touchdown PCR

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีได้รวบรวมกวางเครือขาวที่ได้มาจากเมล็ดจากต้นที่รวบรวมมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบว่ามีลักษณะที่แปรปรวนหลากหลาย จึงทำให้ไม่สามารถแยกกลุ่มได้ด้วยลักษณะภายนอก งานวิจัยนี้ใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเทคนิค ISSR-Touchdown PCR ในการจำแนกสายพันธุ์ กวางเครือขาวจำนวน 36 สายต้น ซึ่งการใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ 7 ลักษณะ โดยการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มด้วย UPGMA และ PCA พบว่าสามารถแยกออกได้ 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายต้นที่ 34 ลักษณะเด่นคือ ใบมีขนาดใบเล็ก กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 23 สายต้น มีลักษณะเด่นคือ ใบรูปรี ฐานใบแหลม และปลายใบเรียวแหลม และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 12 สายต้น ลักษณะเด่นคือ ใบรูปไข่ ฐานใบมน และปลายใบเป็นติ่งแหลม และการจำแนกโดยใช้เทคนิค ISSR-Touchdown PCR พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลและวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์มีค่า PIC ระหว่าง 0.0315-0.9779 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 0.4779 และมีค่า N_c ระหว่าง 1.1250-1.1854 หรือ เฉลี่ยเท่ากับ 1.5544 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม (GS) ของตัวอย่างทั้งหมดพบว่ามีค่าระหว่าง 0.50-0.86 โดยมีค่าเฉลี่ยเป็น 0.77 ที่ระดับ GS เท่ากับ 0.56 (56%) แยกได้ 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ 34 และสายต้นที่ 7 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยต้นที่เหลือ อีก 34 สายต้น ภายในกลุ่ม 2 นี้สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่มย่อยที่ GS เท่ากับ 0.69 (69%) ผลของโครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่า ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกวางเครือขาวที่รวบรวมไว้น่าจะเกิดจากภายในกลุ่ม โดยทุกต้นมีพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน และคาดว่าอาจเกิดจาก 5 แหล่งพันธุกรรมที่มาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

5.1.2 ชนิดและความเข้มข้นของสารชักนำต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว

ความเข้มข้นและระยะเวลาการเก็บข้อมูลที่เหมาะสมต่อการชักนำให้หัวกวางเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ คือไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 15 วัน หลังหยุดการชักนำ กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 7 วัน หลังหยุดชักนำและคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ 15 วัน หลังหยุดชักนำ สารชักนำทั้งหมดไม่มีผลยับยั้งหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของกวางเครือขาวอายุ 4

เดือน ที่ปลูกใน growth chamber สารชักนำทั้งหมดไม่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์จีสทีอิน และพิวราริน

5.1.3 พิวราริน จีสทีอิน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในกวางเครือขาวที่ถูกชักนำด้วยโคโคซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน

การฉีดพ่นด้วย Chitosan+CuCl₂ ทำให้กวางเครือขาวสร้างพิวรารินสูงที่สุด ทั้งการทดลองใน growth chamber และในโรงเรือน และยังทำให้กวางเครือขาวสร้างจีสทีอินและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดด้วย การฉีดพ่นด้วย Chitosan+CuCl₂+SA ทำให้กวางเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และในโรงเรือน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณของสารฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุดด้วย และการชักนำด้วยทรีตเมนต์ต่าง ๆ ไม่มีผลเสียหายต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาวในทุกสภาพแวดล้อมที่ทำการทดลอง ที่สำคัญพบว่าการฉีดพ่นด้วย Chitosan+SA ทำให้กวางเครือขาวมีอัตราการสังเคราะห์แสง สารที่สกัดได้ และอัตราส่วนของน้ำหนักสด/น้ำหนักแห้งสูงขึ้นด้วย

5.1.4 สารสกัดกวางเครือขาวกับการลดระดับน้ำตาลในเลือดและผลกระทบต่อเนื้อเยื่อตับอ่อน และตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน

สารสกัดกวางเครือขาวไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดในภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลันได้ทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน การทดสอบฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดเมื่อป้อนสารสกัดต่อเนื่องกัน 30 วัน พบว่าในวันที่ 14 ของการป้อนสารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว สามารถลดระดับน้ำตาลได้มากที่สุดถึง 28.95 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 21 วัน ลดระดับน้ำตาลได้ 26.37 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันและยังพบว่าในวันที่ 14 ลดน้ำตาลในเลือดได้มากที่สุดถึง 18.30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเวลาก่อนป้อนสารสกัด (วันที่ 0) ขณะที่ยากลับเบนคลาไมด์สามารถลดระดับน้ำตาลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงวันที่ 30 ของการทดลอง โดยลดระดับน้ำตาลในเลือดได้สูงที่สุดในวันที่ 21 ของการป้อนสาร คิดเป็น 43.49 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกันและยังพบว่าสารสกัดไม่มีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและตับของหนูทดลอง จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สารสกัดกวางเครือขาวสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานได้ จึงอาจจะมีประโยชน์ในทางการรักษาโรคเบาหวานได้

บทที่ 6

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัย “พันธุ์ สารออกฤทธิ์สำคัญ และผลของสารสำคัญในกวางเครือขาว” ได้ผลการทดลองตรงตามวัตถุประสงค์ 4 ข้อ ที่ตั้งไว้คือ

1. เพื่อรวบรวมสายพันธุ์กวางเครือ และจัดกลุ่มโดยใช้ความใกล้ชิดของสายพันธุ์

ได้ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Genetic similarity : GS) โดยที่ระดับ GS เท่ากับ 0.56 แยกได้ 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายต้นที่ 34 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยต้นที่เหลือ อีก 35 สายต้น และแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยที่ GS เท่ากับ 0.69 ส่วนผลของโครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่า ความแปรปรวนน่าจะเกิดจากภายในกลุ่ม ทุกต้นมีพันธุกรรมที่ไม่เหมือนกัน และคาดว่าอาจเกิดจาก 5 แหล่งพันธุกรรม

2. เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และสารคอปเปอร์คลอไรด์

ในการชักนำให้กวางเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการสะสมสารฟีนอลิก สารฟลาโวนอยด์ สูงขึ้นนั้น พบว่าการชักนำด้วยกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้หัวกวางเครือขาวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีสะสมสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สูงที่สุด

3. เพื่อคัดเลือกทรีตเมนต์ที่เหมาะสมจากการใช้สารไคโตซาน กรดซาลิไซลิก และคอปเปอร์คลอไรด์เป็นสารชักนำร่วมกัน

ในการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การสร้างพิวรารินและจินัสทีอินในหัวกวางเครือขาว ที่ปลูกใน growth chamber ในโรงเรือน และในแปลงทดลอง พบว่า การใช้ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้ปริมาณของพิวราริน และจินัสทีอินในหัวของกวางเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber และที่ปลูกในโรงเรือนมีปริมาณสูงที่สุด และการใช้ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ทำให้กวางเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber ปลูกในโรงเรือน และปลูกในแปลงทดลองมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

4. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดกวางเครือขาวต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดและผลกระทบต่อตับอ่อนและตับของหนูแรทที่เป็นเบาหวาน

พบว่าสารสกัดกวางเครือขาวไม่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทในภาวะที่มีระดับน้ำตาลสูงเฉียบพลันทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน แต่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนู

เบาหวานที่ได้รับสารสกัดอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน โดยในวันที่ 14 ของการป้อน และสารสกัด กวาวเครือขาวไม่มีผลก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเนื้อเยื่อตับอ่อนและเนื้อเยื่อตับของหนูเบาหวาน

ข้อเสนอแนะ

1. การใช้สารชั่งนำมีปัญหาด้านการเตรียมสาร การแนะนำให้เกษตรกรใช้ควรจัดให้อยู่ใน รูปที่ใช้ได้ง่ายที่สุดก่อนจึงควรศึกษาถึงรูปแบบที่เหมาะสมต่อไป เช่น เป็นสารชั่งนำสำเร็จรูป
2. การชั่งนำสารพิวรารินและจินิสทีอินในแปลงปลูกไม่ได้ผล ควรศึกษาเพิ่มเติม โดยเฉพาะความเข้มข้นที่ใช้ และความถี่ในการชั่งนำ และต้องคำนึงวิธีปฏิบัติที่ง่ายและมีค่าใช้จ่าย น้อยด้วย จึงจะได้รับความสนใจจากเกษตรกร
3. การชั่งนำด้วย ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับคอปเปอร์คลอไรด์ 200 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เพิ่มพิวรารินและจินิสทีอิน และการใช้ไคโตซานความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ ลิตร ร่วมกับกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร และคอปเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในหัวกวาวเครือขาวได้ อาจใช้ได้กับสมุนไพรชนิดอื่น ๆ เนื่องจากพืชสมุนไพรที่มีสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญ จึงควรนำไปใช้ชั่ง นำในพืชชนิดอื่น ๆ ผลที่ได้รับจะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มคุณภาพสมุนไพรที่ได้จากการปลูกต่อไป ได้
4. กวาวเครือขาวควรได้รับความสนใจในการใช้เพื่อรักษาโรคเบาหวาน เนื่องจากสามารถ ลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูแรทที่เป็นเบาหวานได้ จึงควรทำการศึกษาให้มากขึ้น อย่างน้อยที่สุดอาจ ทำให้ผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานสามารถบริโภคกวาวเครือขาวได้ เนื่องจากปัจจุบันยังมีข้อห้ามอยู่ เนื่องจากผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลทั้งทางบวกและทางลบต่อโรคเบาหวาน

รายการอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. (2548). กวาวเครือขาว-พืชมหัศจรรย์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ
- กระทรวงสาธารณสุข. (2542). สธ. ย้ำจุดยืนต่อการพัฒนาแพทย์แผนไทยและสมุนไพร: กรณีศึกษา กวาวเครือ เอกสารแถลงข่าวกระทรวงสาธารณสุข 7 ตุลาคม.
- จรัญ คิษฐไชยวงศ์ สุจิรัตน์ สงวนรังสิกุล ยุทธนา สมิตศิริ สุรพจน์วงศ์ใหญ่ สิริพันธุ์ ศรีจักรวาล และ สุชน สุวรรณบุตร. (2550). การจำแนกและคัดเลือกสายพันธุ์กวาวเครือขาว. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. โครงการวิจัยและพัฒนากวาวเครือขาว กองทุนสนับสนุนงานวิจัยกรมวิชาการเกษตร. 1-58.
- เฉลิมพงษ์ แสนจุ่ม และไชยวัฒน์ ไชยสุต. (2547). การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของสารสกัดกระชายดำและน้ำหมักชีวภาพที่สกัดจากกระชายดำ [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.irpus.org/project_file/2547_2006-08-23_R10003-47.pdf.
- ชวลิต นิมมธรรม. (2538). กวาวเครือ. อนุกรมวิธานพืชอักษร ก. ราชบัณฑิตยสถาน. กรุงเทพฯ:เพื่อนพิมพ์. 495 หน้า
- ณัฐธัญ แสนบัวผัน. (2548). ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของสารสกัดใบขี้เหล็กและผลต่อลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของตับอ่อนและตับในหนูแรทเบาหวาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ทรงพล ชีวะพัฒน์ ปราณี ชวลิตธำรง สมเกียรติ ปัญญา มัง สดุดี รัตนจรัสโรจน์ และ อัญชลี จุฑาพุทธิ. (2543). พิษวิทยาของกวาวเครือขาว. ว. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 42: 202-223.
- นวลศรี รักอริยธรรม และอัญชญา เจนวิถีสุข. (2545). แอนติออกซิเดนท์: สารต้านมะเร็งในผักสมุนไพรไทย. เชียงใหม่: นพบุรี. 56 หน้า
- นันทวัน บุญยประภัสสรและอรนุช โชคชัยเจริญพร. (2539). สมุนไพรพื้นบ้าน. ประชาชน. 40 หน้า
- นิสากร ปานประสงค์. (2542). กวาวเครือความหวังสมุนไพรไทย. วารสาร UPDATE กันยายน-ตุลาคม. หน้า 40-45.
- บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล. (2543). คิดก่อนกิน. กรุงเทพฯ: รวมทรรศน์. 65 หน้า
- ประสาร ฉลาดคิด. (2546). อิทธิพลของสภาพแวดล้อมและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การออกดอก การติดผลและเมล็ด และการสะสมสาร daidzein และ genistein ในหัวกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw et. Suvatabandhu) Niyomdham] วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

- ปราณี เชาวลิตขำรง ทรงพล ชีวพัฒน์ สดุดี รัตนจรัสโรจน์ และสมเกียรติ ปัญญามัง (2542). สรุปผล การศึกษาพืชกึ่งเรื้อรังของกวาวเครือขาวในหนูขาว. ใน รายงานวิจัยสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข.
- ปวีณา ช่วงทิพย์. (2546). ฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของพืชผักพื้นบ้าน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์ และสุวดี จันทร์กระจ่าง. (2542). การพัฒนาแผ่นบางไคโตซานเพื่อการ กรองแยกชีวะสาร. หน้า 28-59 ใน การสัมมนาทางวิชาการเรื่อง ความร่วมมือของภาครัฐและ เอกชนในการพัฒนาการผลิตและการใช้สารไคตินไคโตซานแบบครบวงจร. 2-3 เมษายน 2542. ระนอง.
- พงษ์ศักดิ์ วรรณไกรโรจน์ และ พิเชฐ สัมปทานุกุล. (2541). ตำราภาพจุลพยาธิวิทยา. กรุงเทพฯ.
- มูลนิธิการแพทย์แผนไทย. (2548). กวาวเครือ...การพัฒนาและคุ้มครองอย่างยั่งยืน. ใน เอกสาร ประกอบการสัมมนาวิชาการ เรื่อง กวาวเครือกับการพัฒนาและคุ้มครองอย่างยั่งยืน. 13-15 กันยายน 2548. กระทรวงสาธารณสุข. นนทบุรี.
- ไมตรี สุทธิจิตต์ ปกฤษฎาภักดิ์ แก้วสุริยะ ศิริวรรณ สุทธิจิตต์ และอุดมภักดิ์ ขาลสุวรรณ. (2545). แอน ดิโออกซิแดนซ์และสารสำคัญในพืชสมุนไพรไทย. วารสารเภสัชศาสตร์และวิทยา ศาสตร์ สุขภาพ. 3: 254-260.
- ยงยุทธ โอสลดสภา. (2543). ธาตุอาหารพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตรมหาวิท ยา ลัยเกษตรศาสตร์.
- ยุทธนา สมิตสิริ วสันต์ มะโนเรือง และ ชัยณรงค์ โตจรัส. (2551). การทดสอบผลิตภัณฑ์อาหารเสริม สุขภาพที่มีส่วนผสมของกวาวเครือขาว ใบโอ ดี. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. [Online]. Available: <http://sesamio.com/sg-IIResearch.html>.
- ยุทธนา สมิตสิริ และสันติ ศักดารัตน์. (2538). รูปแบบของสมุนไพรกวาวเครือขาวที่เหมาะสม สำหรับใช้คุมกำเนิดคนพิการ. ว. เทคโนโลยีสุรนารี. 2(2): 89-96.
- ยุพดี ลางคลิจันทร์. (2527). การศึกษาผลของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) ที่มีต่ออวัยวะสืบ พันธุ์และการสืบพันธุ์ในหนูเพศผู้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัย เชียงใหม่.
- เยาวภา ไหวพริบ. (2534). การผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วิชัย เชิดชีวะศาสตร์. (2541). ข้อเสนอแนะ และทิศทางการวิจัยกวาวเครือขาวในอนาคต. ใน เอกสาร ประกอบการสัมมนาเรื่องกวาวเครือ (หน้า 36-38). กรุงเทพฯ: สถาบันการแพทย์แผนไทย. กรมการแพทย์.

- วิโรจน์ เขาวัวพิเศษ. (2550). ผลของสังกะสีต่อการสะสม puerarin ในรากสะสมอาหารของกวาวเครือขาว [*Pueraria candollei* Graham var. *mirifica* (Airy shaw et. suvatabandhu) niyomdham] และผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการคลายตัวของหลอดเลือดหนูขาว (*Rattus norvegicus*). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- วุฒิ วุฒิชัยธรรมเวช. (2540). สารานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- ศิริชัย กัลยาณรัตน์. (2548). ผลของกรดซาลิไซลิกต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้. ว. เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว. 4(2): 2-5.
- สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. (2548). ชีววิทยาพืช. กรุงเทพฯ: จามจุรีโปรดักท์. 297 หน้า.
- สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย และสุวิทย์ เจริญชัย. (2528). ผลของกวาวเครือขาวต่ออณูกรรมพันธุกรรม. ในการประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 11. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมโภชน์ ทับเจริญ, ยุทธนา สมิตะศิริ, สุเจตน์ ชื่นชม, หลอด แปรงกระโทก และ เสาวลักษณ์ ผ่องลำเจียก. (2552). ผลของกวาวเครือขาวต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพซากของสุกรในระยะรุ่นขุน. [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.ku.ac.th/kaset60/Theme04/theme-0408/Project03/index-04-0803.html>
- สุวดี จันทร์กระจ่าง. (2544). การประยุกต์ใช้สาร. ใน เรื่องนำรู้ไคติน-ไคโตซาน. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- อรดี สหวัชรินทร์. (2542). กวาวเครือ สมุนไพรครอบจักรวาล. ว. เกษะการเกษตร. 23(3): 127-135.
- อรพรรณ มาตังคสมบัติ. (2544). ยาที่ใช้ในโรคเบาหวาน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: แสงเทียน.
- อรรถวุฒิ พลายนบุญ สมโภชน์ ทับเจริญ อรทัย ไตรวุฒานนท์ อรประพันธ์ ส่งเสริม เกรียงศักดิ์ สอาดรักษ์ มณฑาทิพย์ ชุณหลาภ ชีรวุฑ ปิ่นทอง และ วุฒิชัย นุดกุล. (2552). การใช้อาหารผสมผงกวาวเครือขาวในการเลี้ยงไก่เนื้อตอน. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://www.rdi.ku.ac.th/Techno_ku60/res-62/index62.html
- อัญญาฐ แสงนภาเพ็ญ. (2542). การสกัดไคโตซานจากกากเซลล์จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม (กรดซิตริก). วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- Ahmed, I., Adeghata, E., Sharma, A.K., Pallot, D.T. and Singh, J. (1998). Effect of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Res Clin Pract.* 40: 145-151.
- Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. (2007). Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Molecules.* 12; 607-621.

- Al-Tawaha, A., Seguin, P., Smith, D.L. and Beaulieu, C. (2005). Biotic elicitors as a mean of increasing isoflavone concentration of soybean seeds. *Annu. Appl. Biol.* 146: 303-310.
- Andrew, D.P., Sarah, A.T. and Robert, E. (1994). The effect of heavy metal on isoflavone metabolism in alfafa (*Medicago sativa*). *Plant Physiol.* 106: 195-202.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., and Hughes, C.L. (1996). Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr.* 126(1): 43-50.
- Arnao, M.B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends Food Sci Tech.* 11: 419-421.
- Arokiyaraj, S., Martin, S., Perinbam1, K., Arockianathan, P.M. and Beatrice, V. (2008). Free radical scavenging activity and HPTLC finger print of *Pterocarpus santalinus* L. an in vitro study. *INDJST.* 1(7): 1-3.
- Ashcroft, F.M. and Gribble, F.M. (1999). ATP-sensitivity K^+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia.* 42: 903-919.
- Bailey, C.J., Day, C., Turner, S.L. and Leatherdale, B.A. (1985). Cerasee, a traditional treatment for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Res.* 2: 81-84.
- Benlhabib, E., Baker, J.I., Keyler, D.E. and Singh, A.K. (2004). Effects of Purified puerarin on voluntary alcohol intake and alcohol withdrawal symptoms in P rats receiving free access to water and alcohol. *J Med Food.* 7(2): 180-186.
- Benor, S., Zhang, M., Wang, Z. and Zhang, H. (2008). Assessment of genetic variation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in bred lines using SSR molecular markers. *J. Gene. Genomics.* 35: 373-379.
- Benzie, I. and Strain, J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Meth Enzymol.* 299: 15-27.
- Bolto, B., Dixon, D. and Eldridge, R. (2004). Ion exchange for the removal of natural organic matter. *Reactive and Functional Polymers.* 60: 171-182.
- Boonlertnirun, S., Boonruang, C. and Suvanasa, R. (2008). Application of chitosan in rice production. *J Miner Met Mater Soc.* 8: 47-52.

- Botstein, D., White, R.L., Skalnick, M.H., and Davies, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32, pp. 314–331.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995). Use of a free radicals method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 28: 25-30.
- Cervellati, R., Renzulli, C., Guerra, M.C. and Speroni, E. (2002). Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method. *J Agric Food Chem.* 50: 7504-7509.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric method. *J Food Drug Anal.* 10: 178-182.
- Chansakaow, S., Ishikawa, T., Seki, H., Sekine, K. Okada, M. And Chaichantipyuth, C. (2000). Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. *J Nat Prod.* 63: 173-175.
- Chen, W.C., Hayakawa, S., Yamamoto, T., Su, H.C., Liu, I.M. and Cheng, J.T. (2004). Mediation of beta-endorphin by the isoflavone puerarin to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Plant Med.* 70(2):113-116.
- Cherdshewasart, W. and Sutjit, W. (2008). Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. *Phytomedicine.* 15: 38-43.
- Cherdshewasart, W., Cheewasopit, W. and Picha, P. (2004). The differential anti-proliferation effect of white (*Pueraria mirifica*), red (*Butea superba*) and black (*Mucuna collettii*) Kwao Krua plants on the growth of MCF-7 cells. *J. Ethnopharmacol.* 93: 255-260.
- Davies, P.J. (1995). *Plant hormones*. Kluwer Academic publisher dordrecht. Natherland. 833 p.
- Davis, S.N. and Gramer, D.K. (1999). Insulin, oral hypoglycemic agents and the pharmacology of the endocrine pancreas. pp. 1487-1518. In J.G. Hardmon, L. Elsner and M.E. Limbird (eds.) *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, New York: McGraw-Hill companies.
- De Vos, R.C.H., Vonk, M.J., Vooijs, R. and Schat, H. (1992). Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.* 98: 853-858.

- DeMan, J.D. (1999). Principles of Food Chemistry. 3rd Eds. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland. 520 p.
- Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C. and Smith, D.L. (2002). Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-proteins genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta*. 214: 895-901.
- Dithachaiyawong, J., Sakuanrungrasirikul, S., Samittasiri, Y., Wongyai, S., Srijukkawan, S. and Suwannabury, S. (2005). Clonal selection of *Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu by using molecular markers. *Agricultural Sci. J.* 365-6(Suppl): 36(5-6): 919-922.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 7: 1085-1097.
- Elias, D., Prigozin, H., Polak, N., Rapoport, M., Lohse, A.W. and Cohen, I.R. (1994). Autoimmune diabetes induced by the beta-cell toxic STZ: immunity to the 60-kDa hest shock protein and to insulin. *Diabetes*. 43: 992-998.
- Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R. and Lenzen, S. (2000). Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 43: 1528-1533.
- Fahrendorf, T., Ni, W., Shorroosh, B.S. and Dixon, R.A. (1995). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIX. Transcriptional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavanoid phytoalexin response. *Plant mol Biol*. 28: 885-900.
- Ferner, R.E. and Neil, H.A. (1988). Sulfonylureas and hypoglycemia. *Br Med J*. 246: 949-950.
- Folin, O. and Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophan determination in protein. *J Biol Chem*. 73: 627-650.
- Frank, A.A., Custer, L. J., Cerna, C.M. and Narala, K.K. (1994). Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J Agri Food Chem*. 42: 1905-1913.
- Ganda, O.P., Rossi, A.A. and Like, A.A. (1976). Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes*. 25: 595-603.
- Geibel, M., Geiger, H. and Treutter, D. (1990). Tectochrysin 5- and genistein 5-glucosides from the bark of *Prunus cerasus*. *Phytochemistry*. 29: 1351-1353.

- Greene, D.W. and Bukovac, M.J. (1977). Foliar penetration of naphthalene-acetic acid: enhancement by light and role of stomata. *Am J Bot.* 64: 96-101
- Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R. and Lenzen, S. (2000). Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia.* 43: 1528-1533.
- Guo, Z., Jin, Q., Fan, G., Duan, Y., Qin, C. and Wen, M. (2001). Microwave assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*. *Anal Chim Acta.* 436: 41-47.
- Gutteridge, J.M.C. and Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants in aging and disease: fact or fantasy. In *Antioxidants in nutrition, health, and disease.* pp. 111-135. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Hakamatsuka, T., Ebizuka, Y., and Sankawa, U. (1991). Induce isoflavonoid from copper chloride treat stems of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry.* 30(5): 1481-1482.
- Harbone, J.B. (1998). *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.* 3.ed. London: Chapman & Hall, 302p.
- Harrigan, R.A., Nathan, M.S. and Beattie, P. (2001). Oral agents for the treatment of type 2 diabetes mellitus: pharmacology, toxicity, and treatment. *Ann Emerg Med.* 38(1): 68-78.
- Heike, D. and Dietrich, K. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzym Microb Tech.* 17: 647-684.
- Hirano, S., Hayashi, M. and Okuno, S. (2000). Soybean seeds surface-coated with depolymerised chitins: chitinase activity as a predictive index for the harvest of beans in field culture. *J Sci Food Agr.* 81: 205-209.
- Hubert, G. and Ragai, K.I. (1997). Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. *Phytochemistry.* 44: 1463-1467.
- IBPGR. (1983). *Cowpea Descriptors International Board for Plant Genetic Resources.* IBPGR, Rome. 29p.
- Ingham, J.L., Tahara, S. and Dziedzic, S.Z. (1989). Minor isoflavone from root of *Pueraria mirifica*. *Z Naturforsch.* 44: 742-762.
- Inui, H., Yamaguchi, Y. and Hirano, S. (1997). Elicitor actions of n-acetyl-chitooligosaccharides and laminari-oligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Biosci Biotechnol Biochem.* 61: 975-978.

- Jamjanta, N. (1996). Identification of *Pueraria* spp. by Molecular Biology Techniques. M.Sc. thesis, Department of Biology, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- Jia, W., Gao, W.Y., and Xiao, P.G. (2003). Antidiabetic drugs of plant origin used in china: compositions, pharmacology, and hypoglycemic mechanisms. *Chin J Chin Mater Med.* 28: 108–113.
- John, I., Baker, Daniel, E., Keyler and Ashok, K.S. (2004). Effects of purified puerarin on voluntary alcohol intake and alcohol withdrawal symptoms in P rats receiving free access to water and alcohol. *J Med Food.* 7(2): 180-186. [Online]. Available: <http://www.liebertonline.com/action/showPreferences>.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive. (1992). Salicylic acid biosynthesis pathway. [Online]. Available: <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/125/1/318/F7>
- Junod, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E. and Renold, A.E. (1967). Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 126: 201-205.
- Kahn, C.R. (2000). Glucose homeostasis and insulin action. pp. 1303-1306. In C.R. Kahn and L.B. Kenneth (eds.) Principles and practice of endocrinology and metabolism. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Kamalakkannan, N. and Stanely, M.P.P. (2006). Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Mol Cell Biochem.* 293: 211-219.
- Karunanayake, E.K., Hearse, D.J. and Mellows, G. (1974). The synthesis of [¹⁴C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochem J.* 142: 673-683.
- Katsumata, K., Katsumata, K.Jr. and Katsumata, Y. (1992). Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan-or streptozotocin-induced diabetes in rats. *Horm Metab Res.* 24: 508-510.
- Khan, W., Balakrishnan, P. and Smith, D.L. (2003). Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *J Plant Physiol.* 160(5): 485-492.
- Khan, W.M., Prithviraj, B. and Smith, D.L. (2002). Effect of foliar application of chitin and chitosan oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynthetica.* 40: 621-624.
- King, H., Aubert, R.E. and Herman, W.H. (1998). Global burden of diabetes, prevalence numerical estimates and projects. *Diabetes Care.* 21: 1414-1431.

- Kling, G.J. and Meyer, M.M. (1983). Effects of phenolic compounds and indoleacetic acid on adventitious root initiation in cuttings of *Phaseolus am-us*, *Acer saccharium*, and *Acer griseum*. Hort. Sci. 18: 353-354.
- Kneer, R., Poulev, A., Olesinski, A. and Raskin, I. (1999). Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L. J Exp Bot. 50: 1553-1559.
- Knight, D.C and Eden, J.A. (1996). A Review of the clinical effect of phytoestrogen. Obstet Gynecol. 87(5): 897-904.
- Kooptiwut, S., Semprasert, N. and Chearskul, S. (2007). Estrogen increases glucose-induced insulin secretion from mouse pancreatic islets cultured in a prolonged high glucose condition. J Med Assoc Thai. 90: 956-61.
- Lee, Y.S., Park, J.S., Cho, S.D., Son, J.K., Cherdshewasart, W. and Kang, K.S. (1983). Requirement of metabolic activation for estrogenic activity of *Pueraria mirifica*. J Nat Prod. 63: 173-175.
- Levesque, R. and SPSS, Inc. (2006). SPSS programming and data management, 3rd edition. SPSS institute. USA.
- Li, D., Park, S.H., Shim, J.H., Lee, H.S., Tang, S.Y., Park, C.S. and Park, K.H. (2004). In vitro enzymatic modification of puerarin to puerarin glycoside by maltogenic amylase. Carbohydr Res. 339: 2789-2797.
- Li, L. and Li, L. (1995). Effects of resorcinol and salicylic acid on the formation of adventitious roots on hypocotyl cutting of *Vigna radiate*. J Trop Subtrop Bot. 3: 67-71.
- Li, M. and Midmore, D.J. (1999). Estimating the genetic relationships of Chinese water chestnut (*E. dulcis* (Burm.f.) Hensch) cultivated in Australia, using RAPDs. J. of Hort and Biotech. 74 (2): 224-231.
- Luzi, L. and Pozza, G. (1997). Gilbenclamide: an old drug with a novel mechanism of action. Acta. Diabetol. 34: 239-244.
- Mackie W.W. and Smith F.L. (1935). Evidence of field hybridization in beans. Bot. 50: 1553-1559.
- Manonai, J., Chittachoen, A., Theppisai, U., and Theppisai, H. 2007. Effect of *Pueraria mirifica* on vaginal health. Menopause. 14 (5): 919-924. doi: 10.1097/gme.0b013e3180399486.

- Mendes, M.D., Trindade, H., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Fontinha, S.S. and Pedro, L.G. (2009). Volatile and molecular characterization of two Portuguese endemic species: *Angelica lignescens* and *Melanoselinum decipiens*. *Biochemical Systematics and Ecology* 37: 98-105.
- Mithöfer, A., Lottspeich, F. and Ebel, J. (1996). One-step purification of the β -glucan elicitor-binding protein from soybean (*Glycine max* L.) roots and characterization of an anti-peptide antiserum. *FEBS Lett.* 381: 203-207.
- Mukherjee, K., Ghosh, N.C. and Datta, T. (1972). *Coccinia indica* Linn. as potential hypoglycemic agent. *Indian J Exp Biol.* 10: 347-349.
- Muthusamy, S., Kanagarajan, S. and Ponnusamy, P. (2008). Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of ricebean (*Vigna umbellata*) landraces. *Plant Biotechnology.* 11(3) [online]. From :<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol11/issue3/full/8/>
- Muzzarelli, R.A.A. (Ed.). (1973). *Natural chelating polymers*. New York. Pergamon Press. 83p.
- Nei, M. (1972). Genetic Distance Between Populations. *Amer. Naturalist.* 10: 232-292.
- Noor, H. and Ashcroft, S.J. (1998). Pharmacological characterisation of the antihyperglycemic properties of *Tinospppora crispera* extract. *J Ethnopharmacol.* 62: 7-13.
- Nukatsuka, M., Yoshimura, Y., Nishida, M. and Kawada J. (1990). Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cell in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol.* 127: 161-165.
- Ohta, K., Taniguchi, A., Konishi, N. and Hosoki, T. (1999). Chitosan treatment effects growth and flower quality in *Eustoma gradiflorum*. *Hort Sci.* 34: 233-234.
- Ojewole, J.A.O. (2002). Hypoglycemic effect of *Clausena anisata* (Willd) Hook methanolic root extract in rats. *J Ethnopharmacol.* 81: 231-237.
- Olsson, L.C., Veit, M., Weissenböck, C. and Bornman, J.F. (1998). Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry.* 49: 1021-1028.
- Peungvicha, P., Thirawarapan, S. and Watanabe, H. (1996). Hyperglycemic effect of water extract of the root of *Pandanus odoratus* RIDL. *Biol Pharm Bull.* 19: 364-366.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 63: 1035-1042.

- Polle, A. and Rennenberg, H. (1993). Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress. In: Fowden, L. and Mansfield, T. (eds). Plant adaptation to environmental stress. 263-273 pp.
- Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C, Lischner, N, Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. and Mainland, C.M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolics and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. J Agric Food Chem. 46(7): 2686-2693.
- Pulido, R., Bravo, L. and Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. J agric Food Chem. 48: 3396-3402.
- Pushparaj, P., Tan, C.H. and Tan, B.K.H. (2000). Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. J Ethnopharmacol. 72: 69-76.
- Rakieten, N., Rakieten, M.L. and Nadkarni, M.V. (1963). Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. Canc Chemother Rep 1. 29: 91-98.
- Rang, H.P. and Dale, M.M. (1991). The endocrine system pharmacology. 2nd (ed.). UK. Longman Group. 504-508 pp.
- Rao, M.V., Lee, H.I., Creelman, R.A., Mullet, J.E. and Davis, K.R. (2000). Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. Plant Cell. 12: 1633-1646.
- Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. Ann Rev Plant Physiol Mol Biol. 43: 439-463.
- Ratzman, K.P., Schulz, B., Heinke, P. and Besch, W. (1984). Tobutamide does not alter insulin requirement in type 1 (insulin-dependent) diabetes. Diabetologia. 27: 8-12.
- Sabu, M.C. and Subburaju, T. (2002). Effect of *Cassia auriculata* Linn. on serum glucose level, glucose utilization by isolated rat hemidiaphragm. J Ethnopharmacol. 80: 203-206.
- Sakuanrungsirikul, S., Suntonnon, S. and Wongwarat, T. (2005a). Discrimination of Durian Cultivars Using Inter-Simple Sequence Repeat Markers. Agricultural Sci. J. (36) 5-6 (Suppl); 262-264.
- Sakuanrungsirikul, S., Suntonnon, S., Supakaesorn, S. and Wongwarat, T. (2005b). Genetic diversity of cultivated rambutan cultivars (*Nephlium lappaceum* L.) in Thailand as revealed by Intersimple sequence repeat (ISSR) markers. Agricultural Sci. J. (36) 5-6 (Suppl); 265-267.

- Samittasiri, Y. (1998). Research and Development of White Kwao Krua. *In Seminar of White Kwao Krua*. Ministry of Public Health, Bangkok, Thailand. pp. 21-35.
- Santos, M.R. and Mira, L. (2004). Protection by flavonoids against the peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine. *Free Radic Res.* 38: 1011-1018.
- Schmid-Antomarchi, H., De Weille J., Fosset, M. and Lazdunski, M. (1987). The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K^+ channel in insulin-secreting cells. *J Biol Chem.* 262: 15840-15844.
- Schmidt, F.H., Siegel, E.G. and Trapp, V.E. (1980). Metabolic and hormonal investigations in long-term streptozotocin diabetic rats on different dietary regimens. *Diabetologia.* 18: 161-168.
- Schnedl, W.J., Ferbes, S., Johnson, J.H. and Newgard, C.B. (1994). STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes.* 43: 1326-1333.
- Schutzendubel, A. and Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot.* 53: 1351-1365.
- Sharma, S.R., Dwivedi, S.K. and Swarup, D. (1997). Hypoglycemic, antihyperglycemic and hypolipidemic activities of *Cesalpinia bonducella* seeds in rats. *J Ethnopharmacol.* 58: 39-44.
- Sharma, S.R., Dwivedi, S.K., Varshney, V.P. and Swarup, D. (1996). Antihyperglycemic and insulin release effects of *Agle marmelos* leaves in streptozotocin-diabetic rats. *Phytother Res.* 10: 426-428.
- Sharma, Y.K. and Davis, K.R. (1997). The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biol Med.* 23: 480-488.
- Sigma-aldrich. (2009a). Genistein. [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/productdetail.do?n4=82435|sigma&m5=search_concat_pno|brand_key&f=spec
- Sigma-aldrich. (2009b). Puerarin. [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/pro>
- Singh, G. and Kaur, M. (1980). Effect of growth regulators on podding and yield of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Indian J Plant Physiol.* 23: 366-370.
- Singleton, V.L. and Rossi Jr., J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult.* 16: 144-158.

- Sitthiphrom, S. (2005). Molecular Identification of *Dimocarpus longan* L., *Curcuma* spp., *Pueraria* spp. And *Ficus* spp. By SCAR Markers. Ph.D. of Biology. Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. **Numerical Taxonomy**. Freeman. San Francisco. 573 pp.
- Somashekar, D. and Richard, J. (1996). Chitosanase properties and applications: A Review. *Bioresour Technol.* 55: 35-45.
- Stafford, H.A. (1997). Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots. *Bot Rev.* 63: 27-39.
- Stanely, P., Prince, M., Menon, V.P. and Gunasekaran, G. (1999). Hypolipidemic actions of *Tinospora cordifolia* roots in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 64: 53-57.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β -cell of the rat pancreas. *Physiol Res.* 50: 536-546.
- Tagashira, M. and Ohtake, Y. (1988). A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. *Planta Medica.* 64: 555-558.
- Tantasawat, P., Trongchuen, J., Prajongjai, T., Seehalak, W. and Jittayasothorn, Y. (2010). Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yard long bean (*Vigna unguiculata* spp. *Sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. *Scientia Horticulturae.* 124:204-216.
- Thimmappaiah, W., Santhosh, G. Shobha, D. and Melwyn, G.S. (2009). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae.* 120:411-417.
- Tsumura, Y., Ohba, K and Strauss, SH. (1996). Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theor Appl Genet.** 92: 40-45.
- Türkyılmaz, B., Akta, L.Y. and Güven, A. (2005). Salicylic acid induced some biochemical and physiological changes in *Phaseolus vulgaris* L. *Sci Eng J Firat Univ.* 17(2): 319-326.
- Wang, C.J., Wang, J.M., Lin, W.L., Chu, C.Y., Chu, F.P. and Tseng, T.W. (2005). Protective effect of hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem Toxicol.* 38: 411-416.
- Wang, H.J. and Murhy, P.A. (1994). Isoflavone composition of american and japanese soybean in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. *J Agric Food Chem.* 42: 1674-1677.

- Wang, L.J. and Li, S.H. (2006). Salicylic acid-induced heat or cold tolerance in relation to Ca²⁺ homeostasis and antioxidant systems in young grape plants, *Plant Sci.* 170: 685-694.
- Wang, S.Y. and Lin, H.S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem.* 48: 140-146.
- William, C.A. and Harborne, J.B. (1989). Isoflavonoides. pp. 421-449. In J. B. Harborne (ed.) *Method in plant biochemistry*. Vol. 1. Plant phenolics. Academic Press. London.
- Wolfe ,A.D., Xiang, Q-Y, Kephart, S.R. (1998) Assessing hybridization in natural populations of *enstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology.* 7: 1107-1125.
- Wong, K.K. and Wu, H.M. (1994). Effect of age and streptozotocin concentration on the induction by streptozotocin of hyperglycemia in fasting rats. *Biochem Mol Biol Int.* 33: 131-136.
- Xu, M.E., Xiao, S.Z., Sun, Y.H., Zheng, X.X., Ou-Yang, Y. and Guan, C. (2005). The study of anti-metabolic syndrome effect of puerarin in vitro. *Life Sci.* 77: 3183-3196
- Yap, I. V. and R.J. Nelson. (1996). Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendograms. International rice research institute, Philippines. pp. 5-11.
- Yeh, C.F., Yang, R.C. and Boyle, T. (1999). POPGENE VERSION 1.31. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Quick User Guide. University of Alberta, Alberta, Canada.
- Yildirim, E., Turan, M. and Guvenc, I. (2008). Effect of foliar salicylic acid applications on growth, chlorophyll and mineral content of cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown under salt stress. *J Plant Nutr.* 31: 593-612.
- Young, D.H. and H. Kauss. (1983). Release of calcium from suspension cultured *Glycine max* cells by chitosan, other polycations and polyamines in relation to effects on membrane permeability. *Plant Physiol.* 73: 698-702.
- Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croes, R.A., Farder, G.M., MaGonigle, B. and Odell, J.T. (2000). Production of the isoflavones genistein and daidzein in non - legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol.* 124: 781-793.

- Zhang, Y., Tong, T.S., Cunnick, J.E., Murphy, P.A. and Hendrich, S. (1999). Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations. *J Nutr.* 129: 399-405.
- Zhao, H.J., Lin, X.W, Shi, H.Z. and Chang, S.M. (1995). The regulating effects of phenolic compounds on the physiological characteristics and yield of soybeans. *Acta Agron. Sin.* 21: 351-355.
- Zhu, J.H., Wang, X.X. and Chen, J.Z. (2004). Effects of puerarin on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *Acta Pharmacol Sin.* 25: 1045-1051.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก**การเตรียม citrate buffer**

เตรียม NaCl 0.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (โดยชั่ง NaCl 9 กรัม มาละลายในน้ำ ปริมาตร 991 มิลลิลิตร) เตรียม Citric acid 20 mM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (โดยชั่ง citric acid หนัก 0.04208 กรัม มาละลายใน NaCl 0.9 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ข

การเตรียม Neutral phosphate buffered formalin

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	4.0 กรัม
Na_2HPO_4	6.0 กรัม
40เปอร์เซ็นต์ formaldehyde	100.0 มิลลิลิตร
tap/distilled water	900.0 มิลลิลิตร

นำ Na_2HPO_4 ละลายน้ำ คนตลอดเวลาเพื่อให้ละลายได้ง่ายขึ้น จากนั้นเติม $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ เมื่อละลายดี แล้วจึงเติม 40 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde ลงไป ปรับปริมาตรให้ครบตามต้องการ สารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินใช้คงสภาพเนื้อเยื่อเพื่อเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อสำหรับการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา ควรตัดเนื้อเยื่อภายหลังการเปิดซากและแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินทันทีเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงภายหลังตาย โดยตัดให้หนาไม่เกิน 1.0 เซนติเมตร แช่ไว้ในสารละลายคงสภาพนาน 12-24 ชั่วโมง ให้ ปริมาตรของสารละลายเป็น 10 เท่าของปริมาตรเนื้อเยื่อ

ภาคผนวก ค

เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (กมลวรรณ ศรีปลั่ง, 2546)

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อและขบวนการผ่านชิ้นเนื้อในสารละลายต่าง ๆ

1. นำเนื้อเยื่อแช่ใน neutral buffered formalin (pH 7.4)
2. นำเนื้อเยื่อมาตัดให้ได้ขนาดตามต้องการ
3. นำเนื้อเยื่อที่ตัดแต่งแล้วมา dehydrated, cleared และ embedded โดยแช่เนื้อเยื่อในสารละลายต่าง ๆ ตามขั้นตอน ดังนี้
 - 3.1 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที 2 ครั้ง
 - 3.2 เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที
 - 3.3 เอทานอล 90 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที
 - 3.4 เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที
 - 3.5 เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์และ xylene (1 : 1, v : v) 30 นาที
 - 3.6 xylene, 30 นาที 1 ชั่วโมง ตามลำดับ
 - 3.7 soft, medium hard และ hard paraffins อย่างละ 30 นาที ตามลำดับที่ 58°C ภายใต้อุณหภูมิอากาศ
 - 3.8 embed เนื้อเยื่อ โดยเท paraffin ลงในพิมพ์ที่มีเนื้อเยื่ออยู่
4. นำเนื้อเยื่อที่อยู่ในพิมพ์ paraffin มาตัด 5 ไมครอน
5. นำเนื้อเยื่อมาติดบน glass slide โดยใช้ standard warm water technique และรอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน
6. ย้อมสี slides ด้วย Hematoxylin & Eosin โดยแช่เนื้อเยื่อ ตามขั้นตอนดังนี้
 - 6.1 เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที
 - 6.2 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที
 - 6.3 เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที
 - 6.4 เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที
 - 6.5 Distilled water 2 นาที
 - 6.6 Harris hematoxylin 8 นาที
 - 6.7 เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที
 - 6.8 Eosin 2 นาที
 - 6.9 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที
 - 6.10 เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที
 - 6.11 xylene 2 นาที 2 ครั้ง

7. นำ slides ที่ผ่านการย้อมสีแล้ว มาปิดด้วย cover slips โดยใช้ น้ำยา permount หยดก่อน 1-2 หยด รอให้แห้ง โดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน

ตารางผนวกที่ 1 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันที่เหมาะสม หลังชักนำด้วย ไคโตซาน

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	DPPH		FRAP		ฟีนอลิก		ฟลาโวนอยด์		รวมความ เข้มข้น
	15 วัน	15 วัน	30 วัน	15 วัน	30 วัน	15 วัน	30 วัน		
control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	1	2	2	1	-	1	-	7	
1,000	2	3	-	3	2	3	2	15	
1,500	3	3	1	-	-	-	-	7	
รวมแต่ละวัน	6	8	3	4	2	4	2		

หมายเหตุ จัดอันดับจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพที่ 4.7 ถึง 4.10

ตารางผนวกที่ 2 ผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว

ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง กับการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนวันหลังสิ้นสุดการชักนำ			
		1 วัน	7 วัน	15 วัน	30 วัน
พื้นที่ใบ (ตารางเซนติเมตร)	0	863	964	1,033	1,807
	10	817	959	1,060	2,083
	500	866	959	984	1,835
	1,000	824	971	1,061	2,102
	1,500	854	951	1,027	2,077
อัตราการสังเคราะห์แสง (มิลลิโมลาร์/ตารางเซนติเมตร . วินาที)	0	17.0	19.0	22.2	22.2
	10	16.9	16.8	18.5	18.5
	500	17.0	18.6	18.6	18.6
	1,000	16.2	23.2	23.0	23.0
	1,500	16.8	17.4	18.7	18.7
น้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง	0	7.57	8.30	8.88	11.69 b
	10	7.10	8.15	9.18	11.39 b
	500	7.39	8.22	8.59	9.82 a
	1,000	7.09	7.57	8.76	12.21 b
	1,500	7.40	8.24	9.18	12.11 b
ปริมาณสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)	0	2.55	2.85	3.57	4.66
	10	2.54	2.46	3.17	4.51
	500	2.56	2.83	3.21	3.92
	1,000	2.43	3.49	4.01	4.88
	1,500	2.52	2.56	4.04	4.82

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ถูกกำกับด้วยตัวอักษรเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ
ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ โดยวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ 3 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นและจำนวนวันที่เหมาะสม หลังชักนำด้วย
กรดซาลีไซลิก

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	DPPH		FRAP		ฟีนอลิก		ฟลาโวนอยด์		รวม
	7 วัน	15 วัน	7 วัน	30 วัน	7 วัน	15 วัน	7 วัน	15 วัน	ความ เข้มข้น
control	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	3	-	3	-	3	1	3	1	14
150	-	2	-	-	2	1	2	1	8
200	1	-	2	1	-	-	-	-	4
ผลรวมแต่ละวัน	4	2	5	1	5	2	5	2	

หมายเหตุ จัดอันดับจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพที่ 4.11 ถึง 4.14

ตารางผนวกที่ 4 ผลของกรดซัลฟิวริกต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว

ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง กับการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนวันหลังสิ้นสุดการชักนำ			
		1 วัน	7 วัน	15 วัน	30 วัน
พื้นที่ใบ (ตารางเซนติเมตร)	0	852	933	1,040	1,869
	10	797	1,010	1,092	1,986
	100	842	920	1,100	2,063
	150	886	934	996	1,916
	200	832	954	1,097	1,351
อัตราการสังเคราะห์แสง (มิลลิโมลาร์/ตารางเซนติเมตร .วินาที)	0	16.6	18.5	21.5	24.8
	10	15.0	20.5	23.2	20.7
	100	16.2	21.4	20.2	26.5
	150	16.4	18.5	22.5	20.5
	200	15.7	10.8	15.4	18.2
น้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง	0	7.31	8.00	8.93	11.83
	10	6.56	8.39	9.22	10.87
	100	7.17	7.83	9.35	11.95
	150	7.57	8.29	8.39	10.30
	200	7.22	8.14	9.32	10.00
ปริมาณสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)	0	0.224	0.274	0.306	0.405
	10	0.215	0.298	0.396	0.431
	100	0.274	0.327	0.350	0.620
	150	0.262	0.276	0.384	0.408
	200	0.206	0.282	0.432	0.401

ตารางผนวกที่ 5 การให้คะแนนเพื่อคัดเลือกความเข้มข้น และจำนวนวันที่เหมาะสมหลังชักนำด้วย
คอปเปอร์คลอไรด์

ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	DPPH				FRAP				Total phenolic				Total flavonoids				Total score A	
	Day				Day				Day				Day					
	1	7	15	30	1	7	15	30	1	7	15	30	1	7	15	30		
control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	2
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	6
200	-	-	3	2	-	-	3	1	-	-	3	-	-	-	-	3	-	15
300	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	10
Total score B	-	-	6	2	-	-	6	1	-	-	9	-	-	-	-	9	-	-

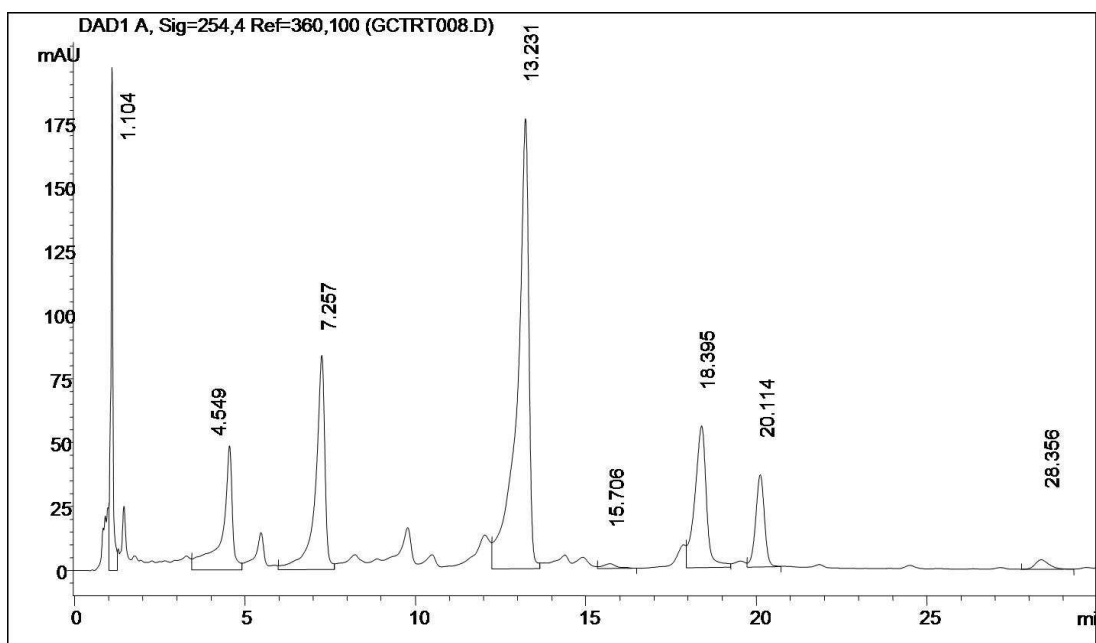
หมายเหตุ จัดอันดับจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากภาพที่ 4.15-4.18

ตารางผนวกที่ 6 ผลของคอปเปอร์คลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของกวางเครือขาว

ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง กับการเจริญเติบโต	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนวันหลังสิ้นสุดการชักนำ			
		1 วัน	7 วัน	15 วัน	30 วัน
พื้นที่ใบ (ตารางเซนติเมตร)	0	879	967	1,035	1,954
	10	851	997	1,104	1,954
	100	844	892	1,014	1,890
	200	953	977	1,020	2,226
	300	876	964	1,026	1,884
อัตราการสังเคราะห์แสง (มิลลิโมลาร์/ตารางเซนติเมตร .วินาที)	0	17.2	18.0	21.9	23.9
	10	16.7	16.2	21.5	18.3
	100	16.6	16.6	23.4	21.1
	200	15.2	18.7	25.5	26.6
	300	16.4	17.5	18.9	19.9
น้ำหนักสด/น้ำหนักแห้ง	0	7.54	8.30	8.88	11.85
	10	7.29	8.19	9.49	10.74
	100	6.92	7.97	8.53	11.19
	200	7.44	8.40	8.78	10.98
	300	7.00	8.21	8.79	10.15
ปริมาณสารที่สกัดได้ (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง)	0	0.258	0.272	0.303	0.405
	10	0.251	0.244	0.366	0.385
	100	0.249	0.251	0.399	0.442
	200	0.255	0.277	0.433	0.576
	300	0.246	0.260	0.337	0.396

ตารางผนวกที่ 7 เปรียบเทียบ peak intensity ของสารอื่น ๆ ที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงกับพิวรีน

ทริตเมนต์	ratio of peak intensity = $\text{mAU}_{(\text{แต่ละ retention time})} / \text{mAU}_{(\text{ของพิวรีน})}$		
	retention time = 13.	retention time =	retention time = 20
	2 นาที	18.3 นาที	.1 นาที
Water (control)	1.4	0.5	0.5
SA	1.9	0.8	0.8
CuCl ₂	0.6	0.3	0.2
CuCl ₂ + SA	0.4	0.1	0.1
Chitosan	3.4	0.4	0.3
Chitosan + SA	1.2	0.4	0.4
Chitosan + CuCl ₂	3.7	1.2	1.6
Chitosan + CuCl ₂ + SA	4.1	1.3	0.6



ตารางผนวกที่ 8 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติตลอดการทดลอง 30 วัน (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)

การปฏิบัติ	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 30
หนูปกติ	68	96	64	69	71
	64	84	56	58	66
	72	64	71	66	57
	65	66	66	66	68
ค่าเฉลี่ย	67.00	71.33	64.33	63.33	63.67
s.d.	4.36	11.02	7.64	4.62	5.86

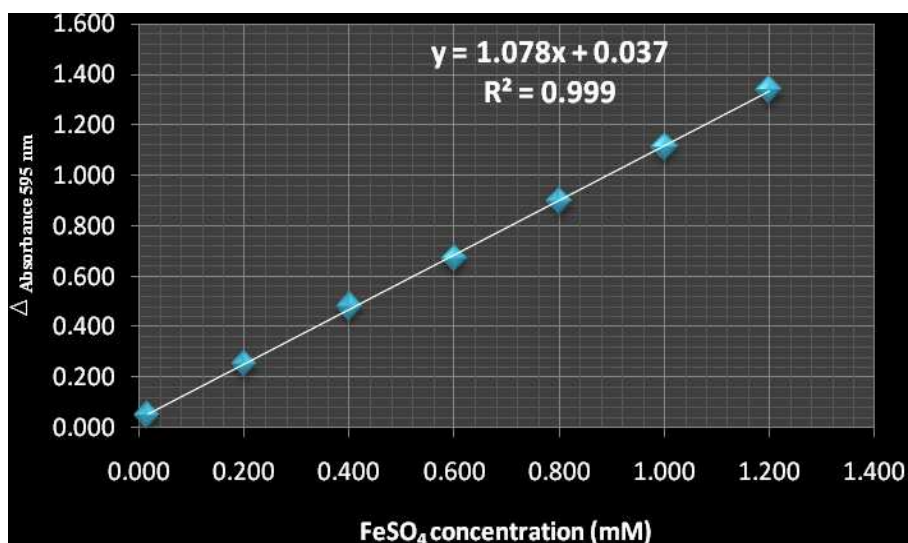
ตารางผนวกที่ 9 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทปกติที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ และมีภาวะกลูโคสในเลือดสูงเฉียบพลัน

การปฏิบัติ	ระดับน้ำตาลในเลือด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)				
	0 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที
น้ำกลั่น	63	102	91	81	75
	65	120	93	79	72
	55	130	109	75	89
	57	98	90	73	70
ค่าเฉลี่ย	60.0	112.5	95.8	77.0	76.5
s.d.	4.8	15.1	8.9	3.7	8.6
กลัยเบนคลาไมด์	64	98	46	36	31
	67	108	69	61	58
	65	111	62	46	42
	58	103	71	68	59
ค่าเฉลี่ย	63.5	105.0	62.0*	52.8*	47.5*
s.d.	3.9	5.7	11.3	14.5	13.5
กวางเครือขาว 100 มก./กอน้ำหนักตัว	81	103	82	77	73
	64	117	89	73	74
	70	122	88	79	72
	58	104	87	79	71
ค่าเฉลี่ย	68.3	111.5	86.5	77.0	72.5
s.d.	9.8	9.5	3.1	2.8	1.3
กวางเครือขาว 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว	69	108	80	77	71
	79	118	89	71	72
	70	111	83	76	63
	63	129	88	74	77
ค่าเฉลี่ย	70.3	116.5	85.0	74.5	70.8
s.d.	6.6	9.3	4.2	2.6	5.8

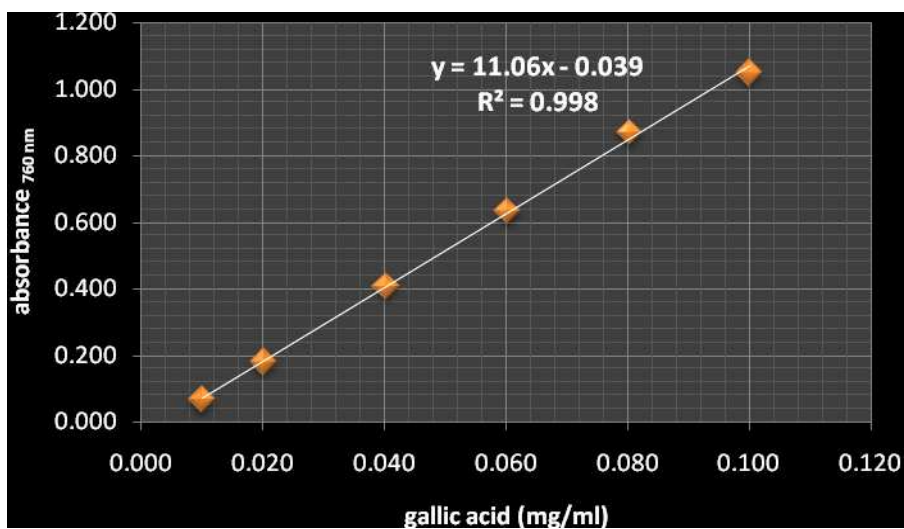
* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน

ตารางผนวกที่ 10 ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทเบาหวานที่ได้รับสารกลุ่มต่าง ๆ และมีภาวะ
 กลูโคส ในเลือดสูงเฉียบพลัน

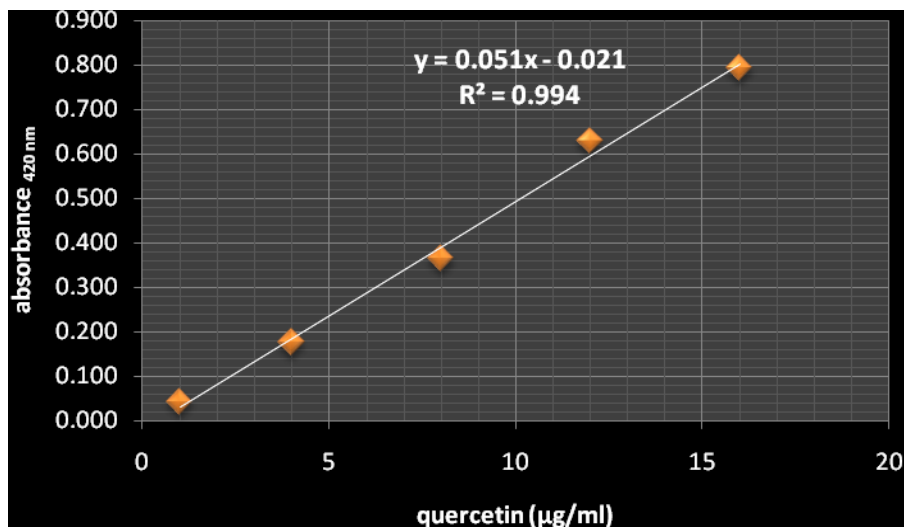
กลุ่มทดลอง	ระดับน้ำตาลในเลือด (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	120 นาที	180 นาที	240 นาที	300 นาที
น้ำกลั่น	299	385	566	385	341	315	327
	353	399	600	464	407	379	397
	275	295	535	465	437	377	375
	313	375	494	352	337	325	317
ค่าเฉลี่ย	310.0	363.5	548.8	416.5	380.5	349.0	354.0
s.d.	32.7	46.7	45.1	57.0	49.5	33.7	38.2
กลัยเบนคลาไมด์	375	415	600	470	439	374	363
	364	383	600	429	355	306	254
	255	268	390	256	171	137	90
	261	373	569	337	387	219	198
ค่าเฉลี่ย	313.8	359.8	539.8	373.0	338.0	259.0	226.2
s.d.	64.6	63.7	100.9	95.8	116.6	103.2	113.8
กวาวเครือขาว	254	270	406	306	253	248	122
	331	393	506	345	322	277	206
	313	382	600	407	322	299	243
	399	432	600	442	373	338	322
ค่าเฉลี่ย	324.3	369.3	528.0	375.0	317.5	290.5	223.3
s.d.	59.7	69.6	92.6	61.0	49.3	37.9	83.1



ภาพผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ FeSO₄ กับ ผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร



ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก



ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน



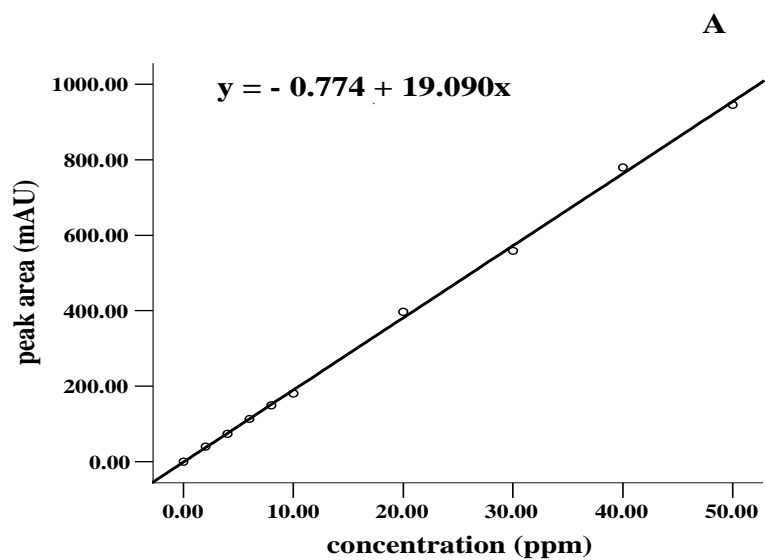
ภาพผนวกที่ 4 ต้นกาวเครือขาวที่ปลูกใน growth chamber



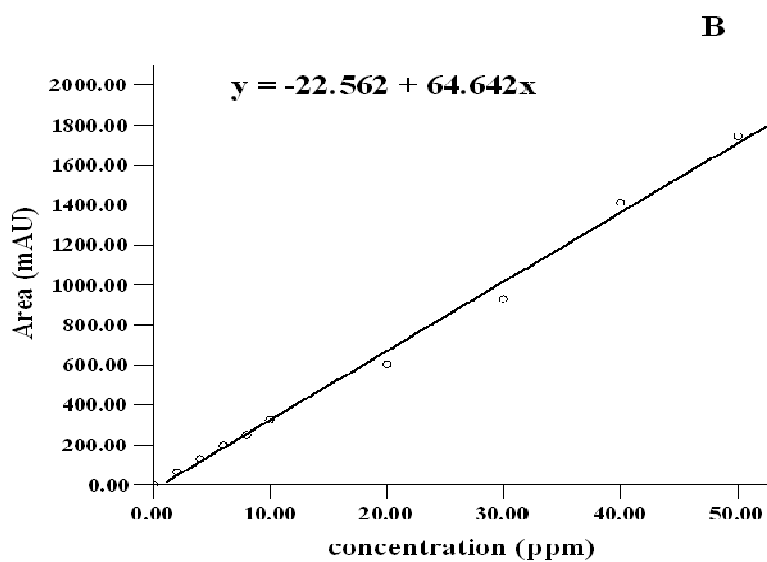
ภาพผนวกที่ 5 โรงเรือนที่ใช้ปลูกกวาวเครือขาว



ภาพผนวกที่ 6 ต้นกวาวเครือขาวอายุ 1 ปี ที่ปลูกในแปลงทดลอง



ภาพผนวกที่ 7 กราฟมาตรฐานของพิวราดิน



ภาพผนวกที่ 8 กราฟมาตรฐานของ จีนิสทีอิน



เลขที่ 12 / 2551

ใบอนุญาตให้ใช้สัตว์

ในงานวิจัย งานทดสอบ งานผลิตชีววัตถุ และงานอื่น ๆ

ใบอนุญาตนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย ซึ่งมีหน้าที่กำกับและดูแลจรรยาบรรณการใช้สัตว์ในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ให้เป็นไปตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ของสภาวิจัยแห่งชาติ ได้พิจารณาโครงการวิจัยเรื่อง ผลของสารชักนำต่อผลผลิตและปริมาณโซฟลาโนอยด์ของหัวกวาวเครือขาว และฤทธิ์ของสารในการลดระดับกลูโคสในเลือดของหนูแรท ซึ่ง นายบุญร่วม ทิดกำ เป็นหัวหน้าโครงการ โดยมี ผศ. ดร. ยูวดี มานะเกษม เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและเป็นผู้ที่ได้รับอนุญาตให้ดำเนินการตามโครงการนี้ได้ และมีเงื่อนไขว่าผู้ใช้สัตว์ในความรับผิดชอบของโครงการต้องปฏิบัติตามข้อมูลที่ระบุในใบขออนุญาต และโครงการอย่างเคร่งครัด

กรณีที่มีการปฏิบัติอย่างหนึ่งอย่างใดนอกเหนือจากที่กรอกไว้ในข้อมูลและที่เสนอไว้ในโครงการ คณะกรรมการฯ จะดำเนินการจกใบอนุญาตนี้ และแจ้งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทราบ

(ศาสตราจารย์ นาวาอากาศโท ดร. สราวุฒิ สุจิตจร)

ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วันที่ออกใบอนุญาต	6	สิงหาคม 2551
วันที่หมดอายุ	5	สิงหาคม 2553