



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์จีโนมและสารเคมีในพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

โดย ศาสตราจารย์อรุณรัตน์ จวีราช และคณะ

15 กรกฎาคม 2558

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การวิเคราะห์จีโนมและสารเคมีในพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

ศ.ดร.อรุณรัตน์ จีวราช มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ดร.รุ่งลาวัลย์ สุดมูล มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผศ.ดร.ธวัชชัย ธานี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และมหาวิทยาลัยขอนแก่นไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้สนับสนุน
เงินทุนในโครงการวิจัยนี้ภายใต้ทุนพัฒนานักวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สัญญาเลขที่
RSA5580054

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA5580054
ชื่อโครงการ: การวิเคราะห์จีโนมและสารเคมีในพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู
นักวิจัย: อรุณรัตน์ จวีราข มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รุ่งลาวัลย์ สุตมุล มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ธวัชชัย ธานี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
E-mail Address: raccha@kku.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: 16 กรกฎาคม 2555 – 15 กรกฎาคม 2558

พลู *Piper betle* เป็นพืชที่คนไทยรู้จักและใช้มาช้านาน มีสารเคมีสำคัญหลายอย่างซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์มากมาย พลูจึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญแต่ในการปลูกมักประสบปัญหาการเน่า ใบเน่า และใบจุด จากการสำรวจและศึกษาพืชสกุลพริกไทยมากกว่า 12 ปี ทำให้ทราบว่าประเทศไทยมีพืชสกุลนี้กว่า 43 ชนิด ดังนั้นจึงควรมีการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลนี้และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในพืชบางชนิด เนื่องจากมักมีการนำพืชมาใช้แบบแปรรูปเป็นสมุนไพรหรือประกอบในผลิตภัณฑ์อื่นดังนั้นจึงได้สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดเพื่อใช้ในการระบุชนิดชิ้นส่วนพืช พืชที่ยังอ่อนหรือพืชแปรรูป จากบริเวณ *matK* gene, *rbcL* gene และ *psbA-trnH* spacer สำหรับพืชสกุลพริกไทย 36 ชนิดที่เก็บตัวอย่างได้ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBankทั้งสิ้น 190 accessions ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ได้มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดเนื่องจากภายในชนิดเดียวกันมีค่าต่ำ มีเพียงพลูชนิดเดียวที่มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมบริเวณ *matK* gene สูงถึง 0.386 ทั้งนี้อาจเนื่องจากพลูเป็นพืชเศรษฐกิจและมีการปลูกเลี้ยงโดยมนุษย์ซึ่งให้ปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตปัจจัยเหล่านั้นจึงมีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลู ในระหว่างชนิดพืชค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างมีประสิทธิภาพในการระบุชนิดเช่นเดียวกัน โดยบริเวณ *matK* gene มีค่าระหว่าง 0.002 ถึง 0.486 มีเพียง 8 คู่ ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ด้วยบริเวณ *matK* gene แต่สามารถระบุชนิดได้ด้วยบริเวณ *rbcL* gene หรือ *psbA-trnH* spacer จากการสำรวจชนิดยังได้พบว่ามีพืชอีก 8 ชนิด ที่มีกลิ่นเหมือนพลู ได้แก่ *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum*, *P. semiimmersum*, *P. submultinerve*, *P. tricolor* และ *P. yinkiangense* ซึ่งคาดว่าจะมีสารเคมีที่สำคัญคล้ายกับพลูจึงได้สกัดสารจากพืชทั้ง 9 ชนิด และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบสารที่เหมือนในพลู ได้แก่ eugenol, isoeugenol, chavicol, caryophyllene, sabinene, phellandrene, germacrene A and germacrene D และ sesquiterpenes และได้นำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราที่ก่อโรค พบว่า สารสกัด *P. rubroglandulosum* และ *P. yinkiangense* ที่ไม่เจือจางมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* สารสกัด *P. betloides* ที่ไม่เจือจาง และสารสกัด *P. maculaphyllum* ทุกระดับความเข้มข้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ

Staphylococcus aureus ดังนั้น *P. maculaphyllum* จึงเป็นพืชที่น่าสนใจที่สุดเนื่องจากสารสกัดที่เจือจางก็สามารถยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคหลายชนิดในมนุษย์ได้ ต่อมาได้ประเมินปริมาณและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 9 ชนิด พบว่าพลูให้ปริมาณสูงสุด คือ 2.73 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ขณะที่พืชป่าที่ให้ปริมาณสูงสุดคือ *P. tricolor* ได้ 0.76 มิลลิลิตร/กิโลกรัม สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ eugenol/isoeugenol, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene, L-linalool, α -terpineol, β -terpineol, β -selinene, butylated hydroxytoluene, trans-caryophyllene, α -caryophyllene, germacrene D และ β -elemene

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสามารถเสนอได้ว่ามนุษย์สามารถผลิตยาจากพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลูทั้ง 8 ชนิดนี้ได้ทั้งในระดับท้องถิ่นและระดับอุตสาหกรรม จากที่ปัจจุบันใช้ได้เพียงพลูชนิดเดียว ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าพืชทั้ง 8 ชนิดนี้มีศักยภาพในทางอุตสาหกรรม เช่นเดียวกับพลู นอกจากนี้แล้วพืชทั้ง 8 ชนิดยังเป็นพืชป่าซึ่งมีความแข็งแรง ทนต่อโรค แดงกิ่งและใบได้มากกว่าพลูอีกด้วย การใช้พืชหลากหลายชนิดเป็นแนวทางการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืนและยังนำไปสู่การจัดการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติอีกด้วย

คำหลัก: เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด, น้ำมันหอมระเหย, พืชสกุลพริกไทย, พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู, พฤษเคมี

Abstract

Project Code: RSA5580054
Project Title: Analysis of genomics and chemicals in betel-like-scented *Piper* species
Investigators: Arunrat ChaveerachKhon Kaen University
Runglawan Sudmoon Khon Kaen University
Tawatchai Tanee Mahasarakham University
E-mail Address: raccha@kku.ac.th
Project Period: 16 July 2012 – 15 July 2015

Piper betle (Piperaceae) or betel leaf, known locally as “Phlu” has been used by people in Thailand for chewing for a long time. It contains economically important chemicals used in several household products. However, it was reported that root rot, leaf rot and leaf spot are important problems for its cultivations. Over the past 12 years of our researches on *Piper* species, we found that there are more than 43 species. Therefore, the plants should be DNA barcoding constructed and screened for their chemical constituents. As of the *Piper* species are usually used in processed forms for medicines and other products, barcode construction using *matK* gene, *rbcL* gene and *psbA-trnH* spacer regions has been done for serving identification of plant parts, young plants and modified forms in 36 collected species. The 190 sequence accessions have been recorded in GenBank. At intraspecific levels, the genetic distances are most effective for a species identification starting from same sequence or no difference in each species to very low distance values. Only *P. betle* posted the highest values at 0.386 of *matK* gene, this may be because it is an economic and cultivated species, so is supported growth factors from human affected on its genetic distance. The genetic distances at interspecific level are also most effective for different species identification by *matK* gene ranged from 0.002 to 0.486, excepted for eight species-pair which could be identified by each of the other two regions without of combination. There are some plants other than *P. betle* that possess a betel-like scent, viz. *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum*, *P. semiimmersum*, *P. submultinerve*, *P. tricolor*, and *P. yinkiangense*. It was expected that these plants would contain similar useful chemicals as betel, their extracts were screened for the chemical contents by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The extracts contain some important chemical substances that are similar to the betel extract, namely, eugenol, isoeugenol, chavicol, caryophyllene, sabinene, phellandrene, germacrene A and germacrene D, and sesquiterpenes. Different dilutions of these extracts were tested for inhibitory activity

against pathogenic bacteria and fungi. Effectiveness against *Pseudomonas aeruginosa* was found with undiluted *P. rubroglandulosum* and *P. yinkiangense* extracts, and effectiveness against *Staphylococcus aureus* was observed with undiluted *P. betloides* extract and all concentrations of *P. maculaphyllum* extract. Therefore, the most interesting species is *P. maculaphyllum*, as it was effective against *S. aureus*, which causes many human diseases. Volatile oil quantity and chemical components were detected in the nine species by GC-MS. The oil quantity is highest in the cultivated *P. betle* species at 2.73 mL/kg, while wild species had a highest amount at 0.76 mL/kg in *P. tricolor*. Substances found in a satisfactory amount include eugenol/isoeugenol, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene, L-linalool, α -terpineol, β -terpineol, β -selinene, butylated hydroxytoluene, trans-caryophyllene, α -caryophyllene, germacrene D, and β -elemene.

From the chemical constituents and the extract activities, it is suggested that human population can benefit from both local and industrial medicines produced from the eight betel-like-scented *Piper* species, which to date have only been produced from betel leaves. The results also indicate that the eight plant species would have as high a potential as *P. betle* for industrial purposes. Moreover, as the plants are wild species they have a greater vigor, thus growing well and with more branching than betel. The diverse *Piper* species studied and documented are important for sustainable uses and can enable conservation management of natural resources.

Keywords : betel-like-scented *Piper* species, DNA barcode, essential oil, phytochemicals, *Piper* species

สรุปย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ คือ 1) เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดสำหรับพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย 2) เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลูเทียบกับพลู *Piper betle* 3) เพื่อประเมินน้ำมันหอมระเหย (essential oils) จากพืชเหล่านี้ และ 4) เพื่อหาแหล่งวัตถุดิบสำหรับสารเคมีที่สำคัญ เช่น chavicol, eugenol, myristicin, piperine, และ safrole ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าหรือเทียบเท่ากับพลู จึงได้ตรวจเอกสารและสำรวจข้อมูลที่เกี่ยวข้องในการวิจัยจากแหล่งที่มีการใช้พืชสกุลพริกไทยทั้งในแง่เป็นอาหาร ยารักษาโรค ปลูกประดับและใช้ในประเพณีหรือพิธีกรรม ได้เดินทางไปศึกษาการใช้พืชกลุ่มนี้ในภูมิภาคต่างๆ ทำให้ทราบว่าพลาสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ พลูเหลืองหรือพลูนวล และพลูเขียว พืชสกุลพริกไทยที่รู้จักกันดีทั่วทุกภูมิภาคและมีการนำมาใช้ประโยชน์ ได้แก่ พลู พริกไทย *P. nigrum* ชะพลู *P. sarmentosum* ดีปลี *P. retrofractum* พริกหาง *P. longum* และพลูป่า *P. rubroglandulosum* โดยมีสรรพคุณทางสมุนไพรหลายประการ เช่น แก้ปวดฟัน แก้ปวดท้อง แก้ลมพิษ ขับลม ขับเสมหะ บำรุงธาตุ บำรุงหัวใจ และบำรุงโลหิต

เก็บตัวอย่างพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทยได้ทั้งสิ้น 36 ชนิด สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดจากบริเวณ *matK* gene, *rbcL* gene และ *psbA-trnH* spacer ได้สำเร็จในเกือบทุกชนิด มีเพียงสองชนิดคือ *P. montium* และ *P. rubroglandulosum* (♀) ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากบริเวณ *matK* gene ได้ บันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายเหล่านี้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=Piper+Thailand>) ทั้งสิ้น 190 accessions พบว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณ *matK* gene ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเหมาะสมต่อการนำมาใช้ระบุชนิด มีเพียงบางชนิดที่ต้องระบุชนิดด้วยบริเวณ *rbcL* gene หรือ *psbA-trnH* spacer

จากการประเมินด้วยการดมพบว่าพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลูมี 8 ชนิด ได้แก่ พลูดอยสุเทพ *P. betloides* พลูลงยา *P. crocatum* พลูลงยา *P. maculaphyllum* พลูป่า *P. rubroglandulosum* พลูขน *P. semiimmersum* พลูชมพู *P. submultinerve* พลูสามสี *P. tricolor* และพลูจีน *P. yinkiangense* จึงได้เก็บตัวอย่างพลูและพืชเหล่านี้รวม 9 ชนิด มาสกัดสารเคมีโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เฮกเซน (hexane) และวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบสารที่สำคัญในพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลู ได้แก่ eugenol, isoeugenol, chavicol, caryophyllene, sabinene, phellandrene, germacrene A, germacrene D และ sesquiterpenes ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้พบในพลูด้วย ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชทั้ง 9 ชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และรา *Aspergillus flavus* และ *Trichoderma harzianum* โดย แบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ที่นำมาทดสอบนี้ เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้มากในประเทศเขตร้อน พบว่าชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ *P. rubroglandulosum* เพศผู้, *P. yinkiangense*, *P. betloides* และ *P. maculaphyllum* โดยสารสกัด *P. rubroglandulosum* และ *P. yinkiangense* ที่ไม่เจือจางมีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ส่วนสารสกัด *P. betloides* ที่ไม่เจือจาง และสาร

สกัด *P. maculaphyllum* ที่ทุกระดับการเจริญมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* โดยฤทธิ์การยับยั้งเหล่านี้มีค่าสูงกว่าสารสกัดจากพลูในการทดลองเดียวกัน พืชที่น่าสนใจที่สุดคือ *P. maculaphyllum* เนื่องจากแม้ความเข้มข้นต่ำก็มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์หลายโรค นอกจากนี้ยังได้กลั่นน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 9 ชนิด โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ เพื่อเทียบสัดส่วนของน้ำมันหอมระเหยเทียบกับน้ำหนักใบสดจากพืชแต่ละชนิด พบว่าพลูให้น้ำมันหอมมากที่สุด คือ 2.73 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ขณะที่พืชป่าที่ให้ปริมาณสูงสุดคือ *P. tricolor* ได้ 0.76 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ส่วนชนิดที่ให้น้ำมันหอมน้อยที่สุดคือ พลุลงยา *P. crocatum* ซึ่งได้เพียง 0.03 มิลลิลิตร/กิโลกรัม สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบหลักได้แก่ eugenol/isoeugenol, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene, L-linalool, α -terpineol, β -terpineol, β -selinene, butylated hydroxytoluene, trans-caryophyllene, α -caryophyllene, germacrene D และ β -elemene

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสามารถเสนอได้ว่าประชาชนสามารถใช้ประโยชน์จากพืชนี้ได้ทั้งการบริโภคในระดับท้องถิ่นหรือการปลูกเป็นจำนวนมากเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่อไปแทนการใช้ใบพลูเพียงอย่างเดียวในกรณีที่พลูเกิดโรคหรือขาดแคลนในบางฤดู ผลการวิจัยยังชี้ให้เห็นว่าพืชทั้ง 8 ชนิดนี้มีศักยภาพในทางอุตสาหกรรมเช่นเดียวกับพลู นอกจากนี้แล้วพืชทั้ง 8 ชนิดยังเป็นพืชป่าซึ่งมีความแข็งแรง ทนต่อโรค แดงกิ่งและใบได้มากกว่าพลูอีกด้วย การใช้พืชหลากหลายชนิดเป็นแนวทางการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืนและยังนำไปสู่การจัดการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติอีกด้วย

ผลที่ได้จากการวิจัยนำไปสู่การผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหย คือ สบู่ก้อน สบู่เหลว และสเปรย์ระงับกลิ่น เมื่อนำไปทดสอบโดยอาสาสมัครพบว่า สบู่ก้อนและสบู่เหลวมีคุณสมบัติลดอาการคันและการอักเสบของผิวหนังได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนสเปรย์ระงับกลิ่น ช่วยลดกลิ่นเท้าได้อย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน งานวิจัยนี้ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในฐานข้อมูลที่ สกว. ยอมรับทั้งสิ้น 5 เรื่อง โดย ตีพิมพ์แล้ว 1 เรื่อง อยู่ระหว่างการตีพิมพ์ 1 เรื่อง และกำลังส่งเพื่อรับพิจารณาให้ตีพิมพ์ อีก 3 เรื่อง

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	9
2.1 การเก็บตัวอย่าง	9
2.2 การสกัดและตรวจสอบดีเอ็นเอ	9
2.3 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA Barcoding)	10
2.4 การสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลาย	12
2.5 การกลั่นและแยกน้ำมันหอมระเหยจากใบพลู	12
2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากพืชและน้ำมันหอมระเหย	12
2.7 การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืช	13
บทที่ 3 ผลการวิจัย	15
3.1 การใช้ประโยชน์จากพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย	15
3.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลพริกไทยที่พบในประเทศไทย	17
3.3 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากพืช	29
3.4 ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	44
3.5 ปริมาณและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย	49
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	63
4.1 การใช้ประโยชน์พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย	63
4.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcoding)	63
4.3 องค์ประกอบทางเคมีของพลูและพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลู	64
เอกสารอ้างอิง	67
ภาคผนวก ผลงานจากโครงการวิจัย	71

บทที่ 1

บทนำ

พรรณพฤกษชาติสกุลพริกไทย (genus *Piper*) นั้น เป็นพืชกลุ่มหนึ่งที่มีความน่าสนใจยิ่ง เนื่องจากหลายชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น เครื่องเทศ ยาสมุนไพร ยาฆ่าแมลง (Srivastava et al., 2001; Chaveerach et al., 2006a; Fan et al., 2011) พืช *Piper betle* เป็นชนิดหนึ่งที่เป็นที่รู้จักกันดี มีองค์ประกอบทางเคมีที่มีความสำคัญ คือ คาวิคอล (chavicol) ซิเนอล (cineol) ยูจีนอล (eugenol) เป็นต้น (Yusoff et al., 2005; Misra et al., 2009) มีรายงานว่า ยูจีนอล มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นและต้านการอักเสบ (Misra et al., 2009) จึงมีการนำพืชมานำมาปลูกเพื่อการค้าอย่างแพร่หลาย แต่มีปัญหาในการปลูกคือ พืชมักจะเกิดโรคใบเน่าจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* Dast. (Silayoi et al., 1985; Banka and Teo, 2000) และใบจุดจากเชื้อแบคทีเรีย (Banka and Teo, 2000)

การสำรวจพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย (Chaveerach et al., 2008, อรุณรัตน์ จวีราชและคณะ, 2552) พบว่ามีบางชนิดที่มีกลิ่นเหมือนพริกไทย ได้แก่ *P. betloides* Chaveer. & Tanomtong, *P. crocatum* Ruiz et Pavon, *P. maculaphyllum* Chaveer. & Sudmoon, *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mookamul, *P. semiimmersum* C.DC., *P. submultinerve* C.DC., *P. maculaphyllum* Chaveer. & Sudmoon, *P. tricolor* Y.C.Tseng, and *P. yinkiangense* Y.C.Tseng ซึ่งล้วนเป็นพืชป่า เจริญเติบโตได้ดี แดกกิ่งและใบได้มาก และยังมีแข็งแรงมีความต้านทานต่อโรค นอกจากนี้บางชนิดยังมีกลิ่นแรงกว่าพริกไทยอีกด้วย ดังนั้นจึงคาดว่าพืชเหล่านี้น่าจะมีศักยภาพเทียบเท่าหรือสูงกว่าพริกไทยในแง่เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีสารเคมีสำคัญ

การศึกษาวรรณกรรมศาสตร์พื้นบ้านโดยการสำรวจ สังเกต และสัมภาษณ์ มีประโยชน์ในการรวบรวมข้อมูลการใช้ประโยชน์จากพืชซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ได้อีกหลายแง่ต่อไป ทั้งในทางอุตสาหกรรมหรือการพัฒนาใหม่ การใช้ประโยชน์จากข้อมูลพฤกษศาสตร์พื้นบ้านที่มีประสิทธิภาพนั้นต้องนำมาใช้ควบคู่กับการศึกษาความหลากหลายของพืชจึงจะเกิดประโยชน์สูงสุด เนื่องจากหมอยาพื้นบ้านหรือปราชญ์ชาวบ้านที่ให้ข้อมูลการใช้ประโยชน์พืชนั้นมักบอกชื่อพืชเป็นชื่อท้องถิ่นในขณะที่ชื่อท้องถิ่นของพืชแต่ละชนิดในแต่ละพื้นที่เรียกไม่เหมือนกันหรือชื่อท้องถิ่นเดียวกันแต่ต่างพื้นที่กันอาจหมายถึงพืชต่างชนิด ดังนั้นการสำรวจและระบุชนิดพืชทั้งชื่อวิทยาศาสตร์ และชื่อท้องถิ่นจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญอย่างยิ่ง นอกจากนี้แล้วการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอประจำชนิดพืชเพื่อใช้ประโยชน์ในการระบุชนิดในคราวต่อไปในกรณีที่ได้ตัวอย่างเป็นส่วนส่วนของพืชหรือพืชที่ถูกแปรรูปแล้วก็สำคัญอย่างยิ่งสำหรับพืชกลุ่มที่นำมาใช้เป็นยาสมุนไพร

1.1 วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดสำหรับพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย
- 2) เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู ได้แก่ *Piper betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum*, *P. semiimmersum*, *P. submultinerve*, *P. tricolor* และ *P. yinkiangense* เทียบกับพลู *P. betle*
- 3) เพื่อประเมินน้ำมันหอมระเหย (essential oils) จากพืชเหล่านี้
- 4) เพื่อหาแหล่งวัตถุดิบสำหรับสารเคมีที่สำคัญ เช่น chavicol, eugenol, myristicin, piperine และ safrole ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าหรือเทียบเท่ากับพลู

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 อนุกรมวิธานของพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย

มีรายงานการศึกษาความหลากหลายชนิดและซิสเทแมติกส์ (Systematics) ของพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทยมากกว่า 10 ปี Chaveerach et al. (2002) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและรูปแบบดีเอ็นเอด้วยวิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) โดยใช้ไพรเมอร์ 14 แบบ เพื่อเปรียบเทียบหรือบอกความแตกต่างระหว่าง *P. chaba* ของประเทศไทย กับ *P. retrofractum* ของประเทศญี่ปุ่น พบว่าดัชนีความเหมือน (Similarity index) ระหว่าง *P. chaba* กับ *P. retrofractum*, *P. chaba* กับ *P. kadsura*, *P. retrofractum* กับ *P. kadsura* จากข้อมูลสัณฐานวิทยา คือ 71.4%, 38.5%, 46.0% ตามลำดับ จากข้อมูลความหลากหลายของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ 9.4%, 9.3%, 22% ตามลำดับ แสดงว่า *P. retrofractum* และ *P. kadsura* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า *P. chaba* และ *P. retrofractum* ซึ่งมีสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน จึงสรุปได้ว่า *P. chaba* ของประเทศไทยเป็นคนละชนิดกับ *P. retrofractum* ของประเทศญี่ปุ่น

Chaveerach et al. (2006b) รายงานชนิดใหม่ของโลก 3 ชนิด คือ *P. dominantinervium* Chaveer. & Mookamul, *P. pilobracteatum* Chaveer. & Sudmoon และ *P. phuwaense* Chaveer. & Tanee และในปีเดียวกันได้รายงานการใช้ประโยชน์ของพืชสมุนไพรสกุลพริกไทยไว้ทั้งหมด 8 ชนิด ทั้งในแง่ของการเป็นอาหาร เครื่องเทศ สมุนไพร ใช้ในพิธีกรรมต่างๆ และใช้เป็นพืชประดับ (Chaveerach et al., 2006a) ปีต่อมา Chaveerach et al. (2007) พบชนิดใหม่ของโลก 1 ชนิด คือ *P. betloides* Chaveer. & Tanomtong และ 2 สายพันธุ์ คือ *P. thomsonii* C.DC. var. *trichostigma* Chaveer. & Sudmoon และ *P. pedicellatum* C.DC. var. *eglandulatum* Chaveer. & Mookamul ต่อมาจึงได้รายงานความหลากหลายชนิดของพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย โดยได้รวบรวมทั้งพืชสกุลพริกไทยชนิดใหม่ของโลกที่พบครั้งแรก 3 ชนิด พบครั้งที่สองอีก 1 ชนิด และ 2 สายพันธุ์

และยังมีการรายงานชนิดใหม่ของโลกเพิ่มขึ้นอีก 2 ชนิด ด้วย คือ *P. maculaphyllum* Chaveer. & Sudmoon และ *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mookamul (Chaveerach et al., 2008, 2010) ล่าสุด Sudmoon et al. (2011) ได้รายงาน *P. protrusum* Chaveer. & Tanee เป็นพืชชนิดใหม่เพิ่มเติม พืชชนิดนี้พบที่ภาคใต้ของไทย ในการสำรวจพบเพียงต้นเพศผู้จึงได้เก็บตัวอย่างพืชชนิดอื่นๆ ในสกุลเดียวกันอีก 6 ชนิด ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมากที่สุดมาศึกษาข้อมูลระดับโมเลกุลร่วมกันโดยใช้วิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) ข้อมูลระดับโมเลกุลสนับสนุนข้อมูลทางสัณฐานวิทยาว่าพืชดังกล่าวเป็นพืชชนิดใหม่ โดยรวมแล้วปัจจุบันนี้จึงพบพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทยทั้งสิ้น 43 ชนิด

1.2.2 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcoding)

การวิเคราะห์จีโนมของสิ่งมีชีวิตนอกจากเพื่อหาความสัมพันธ์และอธิบายวิวัฒนาการแล้วยังมีจุดประสงค์สำคัญอีกประการหนึ่งคือเพื่อสร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้น ในที่นี้จะกล่าวถึงเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดพืชในกรณีที่พืชนั้นถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นสมุนไพร เนื่องจากพืชจะต้องถูกนำมาใช้เพียงบางส่วนหรือถูกแปรรูปเช่นบดเป็นผงจึงไม่สามารถระบุชนิดได้ด้วยวิธีการดั้งเดิมคือการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดหนึ่งที่เหมาะสมที่สุดในกรณีนี้คือเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

นักวิทยาศาสตร์ได้นำแนวคิดการทำบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตจากการใช้รหัสแท่ง หรือบาร์โค้ด (bar code) ของสินค้าต่างๆ ซึ่งช่วยในการระบุประเภท ชื่อ และราคาสินค้าได้อย่างแม่นยำ ระบบนี้ช่วยลดความผิดพลาดและเพิ่มความรวดเร็วในการบันทึกข้อมูล จึงต้องการนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุสิ่งมีชีวิต เพื่อลดความผิดพลาดและเพิ่มความรวดเร็ว อีกทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ บาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตต้องเป็นสมบัติเฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ซึ่งแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่นง่ายต่อการใช้และความชัดเจน ดีเอ็นเอซึ่งเป็นสารพันธุกรรมแสดงลักษณะเฉพาะของแต่ละสิ่งมีชีวิต นักวิทยาศาสตร์เลือกบริเวณดีเอ็นเอสั้นๆ ที่สะดวกกับการใช้งานและเหมาะสม จากส่วนของโครโมโซมที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดสูง แต่มีความต่างระหว่างชนิดเดียวกันต่ำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดในการระบุสิ่งมีชีวิต (อรุณรัตน์ นวีราช, 2552)

ในปี ค.ศ. 2003 ได้มีการจัดตั้ง Consortium for the Barcoding of Life (CBOL) ขึ้นเพื่อจัดทำมาตรฐานและคู่มือในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด รวบรวมและจัดทำฐานข้อมูลกลางของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่แสดงความสัมพันธ์ของลำดับดีเอ็นเอในบาร์โค้ดกับชนิดต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต มาตรฐานที่จัดทำขึ้นใช้ส่วนของยีน cytochrome C oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรียเป็นบาร์โค้ดสำหรับสัตว์ ส่วนในพืชพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดน้อยมาก เนื่องจากจีโนมพืชในไมโทคอนเดรียมีวิวัฒนาการช้า และมีอัตราการแทนที่ของเบสต่ำกว่ายีนในคลอโรพลาสต์มาก จึงเสนอให้พิจารณาใช้ส่วนของดีเอ็นเอจากนิวเคลียสที่เรียกว่า internal transcribed

sequence (ITS) หรือส่วนของดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์ที่อยู่ระหว่างยีน *psbA* และยีน *trnH* ซึ่งแสดงความแตกต่างชนิดสูง สามารถใช้ในการจำแนกชนิดต่างๆ ของพืชได้ (Hebert et al., 2003) ดังนั้นในพืชจึงอยู่ในระยะการหาบริเวณที่เหมาะสมสำหรับเป็นบาร์โค้ด ซึ่งพืชต่างกลุ่มกันอาจต้องใช้ต่างบริเวณ ดังที่ Chase et al. (2007) เสนอให้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์จาก 3 บริเวณต่อพืช 1 ชนิด โดยมี 2 ทางเลือก คือ *rpoC1*, *matK* และ *psbA-trnH* spacer หรือ *rpoC1*, *rpoB* และ *matK* ต่อมา CBOL Plant Working Group (2009) ได้เสนอ 2 บริเวณ คือ *rbcL* และ *matK* เป็นบริเวณบาร์โค้ดมาตรฐานสากล (core barcode) สำหรับพืชหลายกลุ่ม ล่าสุด Hollingsworth et al. (2011) ได้เสนอบริเวณ *psbA-trnH* spacer เป็นบริเวณมาตรฐานเพิ่มเติม

1.2.3 สารสำคัญที่พบและประโยชน์ของพืชสกุลพริกไทย

Rocha and Ming (1999) พบว่าในใบของ *P. hispidinervium* มีปริมาณของสารซาฟรอลสูงถึง 83-93% ของน้ำมันหอมระเหย สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งทดแทนจากอดีตจนถึงปัจจุบันที่ได้จากพืชใกล้สูญพันธุ์ *Ocotea pretiosa* Benth, *Cinnamomum petrophilum*, *C. mollissimum* และ *Sassa albidum* Nutt. สารซาฟรอลเป็นวัตถุดิบที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารอนุพันธ์ 2 ชนิด โดยโรงงานอุตสาหกรรมคือสารเฮลิโอโทรปินและสารไพเพอโรนอลบิวท็อกไซด์ โดยสารเฮลิโอโทรปินนั้นใช้เป็นสารแต่งกลิ่นและรสในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น น้ำยาขัดพื้น น้ำยาขัดเงา แชมพู สบู่ โลชั่น ผงซักฟอก รวมทั้งน้ำยาทำความสะอาดทั้งหลาย สารชนิดนี้ถ้าได้จากธรรมชาติมีราคาแพงเกินไปสามารถใช้สารสังเคราะห์ได้ ส่วนสารไพเพอโรนอลบิวท็อกไซด์นั้นใช้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของยาฆ่าแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ ซึ่งถึงแม้ว่าจะมีราคาแพงเมื่อสกัดจากธรรมชาติแต่ยังไม่สามารถใช้สารสังเคราะห์มาทดแทนได้

Huang et al. (2001) ศึกษาพบว่าสารสกัดจาก *P. kadsura* ประกอบด้วยสาร 7 ชนิด ซึ่งในจำนวนนี้มี 3 ชนิด คือ futoquinol, galbelgin และ meso-galgravin มีผลยับยั้งทั้ง hepatitis B virus และการสร้าง e antigen ส่วน piperenone สามารถยับยั้งเฉพาะ hepatitis B virus ในขณะที่ piperlactam S มีพิษต่อเซลล์

Amusan and Okorie (2002) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันที่สกัดจากผลของ *P. guineense* ในการรักษาปลาแห้ง (*Charias* spp.) ไม่ให้แมลง *Desmestes maculatus* (Degeer) ทำลาย ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้สารนี้ 5-6 ไมโครลิตรต่อกรัมน้ำหนักปลา สามารถควบคุมการเจริญของแมลงได้ทั้งในระยะที่เป็นตัวอ่อนและตัวเต็มวัยอย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงได้เสนอว่าน้ำมันจากพืชชนิดนี้เหมาะสมที่จะนำมาใช้ป้องกันปลาแห้งไม่ให้แมลงรบกวน

Luger et al. (2002) ได้ศึกษาโครงสร้างผลึกของสาร 3-(4'-methoxyphenyl) propanol pyrrole ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่สกัดได้จากโรโซมของ *P. lolot* ในประเทศเวียดนาม สารนี้มีฤทธิ์

ด้านเบคที่เรีย โมเลกุลของสารประกอบด้วย propanoyl pyrrole อยู่ในแนวระนาบและส่วนของ methoxyphenyl อยู่ในแนวขวางระนาบ มีมุมทาง $93.8(3)^{\circ}$ และมีขนาดใหญ่กว่าที่เคยรายงานไว้จากอนุพันธ์ของ dimethoxy ในพืชสกุลเดียวกันถึง 30°

Samuel et al. (2002) สกัดสารจากใบพริกไทย (*P. nigrum*) และพืชป่า 7 ชนิด ได้แก่ *P. argyrophyllum*, *P. attenuatum*, *P. chuyva*, *P. thwaitessii*, *P. trinueron*, *P. zeylanicum* และชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศศรีลังกา คือ *P. longum* รวมทั้งชนิดที่เป็นพืชปลูกคือ *P. nigrum* และ *P. chaba* ด้วยเมทิลแอลกอฮอล์และวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) ผลโครมาโตแกรมที่ได้พบฟีโนลิก (phenolic) จำนวน 20 จุด โดยมี 1 จุด ที่พบในพืชทุกชนิดซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบและจำแนกที่มีประโยชน์สำหรับพืชสกุลนี้ และยังพบว่าพริกไทยที่เจริญในท้องถิ่นมีแวนิลมีรอลของน้ำมัน โอลีโอเรซิน (oleoresin) และไพเพอรีน (piperine) สูงกว่าพริกไทยที่นำมาจากแหล่งอื่นและชนิดอื่นๆ ที่ศึกษา

Scott et al. (2002, 2004) ศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดจากพืชสกุลพริกไทย 3 ชนิด คือ พริกไทย *P. guineense* และ *P. tuberculatum* ต่อการกำจัดแมลง พบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด มีสารไพเพอรีนซึ่งเป็นสารในกลุ่ม isobutyl amides มีฤทธิ์เป็น neurotoxins ต่อแมลง โดยสารสกัดจากพริกไทยที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ สามารถฆ่าแมลงในสวนและในบ้านเรือนได้ ความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพเริ่มตั้งแต่ 0.01% สามารถกำจัดหนอนผีเสื้อและแมลงในตระกูล Tenthredinidea ถึง 0.1% สามารถกำจัดแมลงปีกแข็งศัตรูของลิ้นจี่และมันฝรั่ง พบว่ามีผลทำให้แมลงศัตรูพืชจากแคนาดาและอเมริกาเหนือตายได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสูตรสารสกัดจากพืชสกุลนี้มีผลไล่แมลงได้ด้วย จึงป้องกันใบพืชจากการกัดกิน และป้องกันแมลงพวกที่เจาะลำต้น สารสกัดจากพริกไทยให้ผลในระดับเหมาะสมในการควบคุมแมลงกลุ่มผีเสื้อและตัวอ่อนของ sawfly และยังยับยั้งการกัดกินได้ในระยะสั้นด้วย นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์อื่นๆ ที่เกิดขึ้นจากการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกันกับสารอื่นในสารสกัดนั้น ข้อดีที่สำคัญของสารสกัดนี้คือช่วงครึ่งชีวิตในธรรมชาติสั้น จึงไม่เป็นพิษกับสิ่งแวดล้อม และปลอดภัยสำหรับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเพราะพืชสกุลนี้ได้ใช้เป็นเครื่องเทศและยามาหลายร้อยปีแล้ว งานวิจัยนี้แนะนำให้ใช้สารสกัดจากพืชเหล่านี้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่เล็กๆ ในสวนครัว ปีต่อมา Scott et al. (2005) ได้ศึกษาการใช้ยาฆ่าแมลงที่สกัดได้จากผลพริกไทยในการควบคุมแมลงที่ทำลายหญ้า European chafer (*Rhizotrogus majalis*) ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดที่มีความเข้มข้น 2.5% สามารถทำลายตัวอ่อนในระยะที่ 3 ของแมลงได้ในภาคสนาม ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 2% สามารถกำจัดหนอนระยะที่ 3 และ 4 ได้ และที่ 4% สามารถกำจัดหนอนระยะที่ 3 ตอนปลายได้ และยังสามารถกำจัดประชากรไส้เดือนได้ เมื่อศึกษาถึงระยะเวลาครึ่งชีวิตพบว่า เป็น 1-2.6 วัน สรุปได้ว่าสารสกัดนี้ตกค้างอยู่ในสภาพธรรมชาติน้อยกว่ายาฆ่าแมลงที่ใช้อยู่คือ diazolon ดังนั้นถ้ามีความหนาแน่นประชากรแมลงรบกวนอยู่เป็นบริเวณควรใช้สารสกัดนี้จะให้ผลดีกว่าบริเวณที่มีประชากรแมลงรบกวนอยู่ในพื้นที่เป็นบริเวณกว้าง ซึ่งจะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายและไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น

Luz et al. (2003) ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากใบและกิ่งอ่อนของ *P. reticulatum* และ *P. crassinervium* จากภาคเหนือของประเทศไทย โดยการกลั่นด้วยไอน้ำแล้ววิเคราะห์ส่วนประกอบด้วยวิธี GC/MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยของ *P. reticulatum* มี β -elemene ถึง 24.6% และ β -caryophyllene มี 16.7% ส่วน *P. crassinervium* มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ β -caryophyllene 17.7%, γ -elemene และ β -elemene 10.9%

Anuradha et al. (2004) สกัดสารจากผลแห้งของ *P. longum* ด้วยเฮกเซน พบสารที่มีคุณสมบัติห้ามการทำงานของเอนไซม์ glucosidase โดยสารนี้ประกอบด้วย pipataline 2, sesamin, oellitorine, guineensine, brachystamide β , 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-propanoic acid-Me-ester, piperlonguminine และพิเพอริน นอกเหนือจากสารประกอบเหล่านี้แล้วยังพบสารชนิดใหม่จากพืชชนิดนี้คือ isodihydropiperlonguminine ส่วนสารที่มีคุณสมบัติห้ามการทำงานของเอนไซม์ glucosidase คือ pipataline, sesamin, pellitorine, guineensine และ brachystamide β ซึ่งสารประกอบกลุ่มนี้น่าจะมีคุณสมบัติต้านไวรัส เบบ้าหวัด และโรคหลอดลมอักเสบ

Dyer et al. (2004) ศึกษาการสกัด การสังเคราะห์ และนิเวศวิทยาวิวัฒนาการของสารเอไมด์ในพืชสกุลพริกไทย จำนวน 1,000 ชนิด ที่ทั่วโลกรู้จัก พบว่าพืช 112 ชนิด มีสารประกอบที่แตกต่างกัน 667 ชนิด ได้แก่ อัลคาลอยด์/เอไมด์ 190 ชนิด ลิแกน 49 ชนิด นิโอลิแกน 70 ชนิด เทอร์พีน (terpene) 97 ชนิด โพรเพนิลฟีนอล (propenylphenol) 39 ชนิด สเตียรอยด์ 15 ชนิด คาวาไพโรน (kavapyrone) 18 ชนิด ซาลิโคน/ไดไฮโดรซาลิโคน (chalcone/dihydrochalcone) 17 ชนิด ฟลาโวน (flavone) 16 ชนิด ฟลาโวนอน (flavanone) 6 ชนิด ไพเพอโรไลด์ (piperolide) 4 ชนิด และสารประกอบอื่นอีก 146 ชนิดที่ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มใดๆ เลย โดยพบสารประกอบเหล่านี้จากทุกส่วนของพืชได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และดอก ตัวอย่างสารประกอบโพรเพนิลฟีนอลที่เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ ยูจีนอล ซาฟรอล และ มายริสทิซิน สารที่สำคัญที่สุดในกลุ่มเอไมด์ คือ พิเพอริน ซึ่งสกัดได้จากพืช 20 ชนิด สารในกลุ่มเอไมด์อื่นๆ ที่พบ เช่น pipericide, pipartine, 4'-desmethyl pipartine และ cenocladamide, 4'-desmethyl pipartine และ cenocladamide และพบว่ามีเอไมด์หลายชนิดที่ออกฤทธิ์ร่วมกันกลายเป็นยาฆ่าแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงตรงกับการรายงานของ Scott et al. (2002)

นอกจากนี้ยังมีการรายงานคุณสมบัติการต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อรา ของ *P. colubrinum* และมีการพยายามโคลนยีนดังกล่าวซึ่งมีลำดับเบสคล้ายออสโมทิน (osmotin) ได้ (Dicto and Munjula, 2005) ด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้มีการนำ *P. colubrinum* มาใช้เป็นต้นตอในการปลูกพริกไทย

ในประเทศไทย ผศ.ดร.จินตนาภรณ์ วัฒนธร หัวหน้าภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และ รศ.ดร.อรุณศรี ปรีเปรม อาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้นำเสนอผลงานการวิจัยเรื่อง “การผลิตสารสกัดพริกไทยหยอดจมูก สำหรับป้องกันภาวะความจำบกพร่องและกรรมวิธีในการผลิต” (ผ่านรายการเวทีชุมชน ทางสถานีวิทยุโทรทัศน์ NBT ขอนแก่น เมื่อวันที่ 24 เมษายน 2551) โดยอาจารย์ทั้งสองท่านร่วมนำเสนอสาระสำคัญของงานวิจัยว่า เนื่องจากทีมวิจัยได้ค้นพบ “สารพิเพอริน” ในพริกไทยดำ ซึ่งมีสรรพคุณในการป้องกันภาวะความจำบกพร่อง

โดยปัจจุบันวงการแพทย์ได้ตระหนักถึงความสำคัญในการชะลอการเสื่อมของระบบประสาท และพยายามที่จะป้องกันเซลล์ประสาทในสมองเพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดโรคสมองเสื่อม มีรายงานทางการศึกษาพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันโรคอัลไซเมอร์ได้ สารพิเพอรินเป็นสารสำคัญที่สกัดจากพริกไทยดำ มีคุณสมบัติในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์ จากจุดนี้เองจึงทำให้ทีมนักวิจัยซึ่งประกอบด้วย รศ.ดร.อรุณศรี ปรีเปรม สาขาวิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ รศ.ดร.สมเดช กนกเมธากุล ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ และ ผศ.ดร.จินตนาภรณ์ วัฒนธร หัวหน้าภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สนใจศึกษาวิธีการนำสารพิเพอรินบรรจุในอนุภาคนาโนแล้วพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบสเปรย์หยอดจมูกเพื่อป้องกันโรคอัลไซเมอร์ ซึ่งพบมากในกลุ่มผู้สูงอายุและคนวัยทำงานที่มีภาวะความเครียดสูง สารพิเพอรินเป็นสารอัลคาลอยด์ที่สกัดได้จากพริกไทยดำซึ่งเป็นสารที่มีรสเผ็ด แสบร้อน และทำให้จามเมื่อสัมผัสกับเยื่อจมูกต่างๆ ซึ่งจะระคายเคืองอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากสูดดมหายใจเอาผงพริกไทย หรือผงสมุนไพรที่มีสารพิเพอรินเป็นส่วนประกอบ ร่างกายจะเกิดปฏิกิริยาต่อต้านเพื่อป้องกันตนเองด้วยการจาม ดังนั้นนักวิจัยจึงได้มีการปรับโครงสร้างทางกายภาพของสารพิเพอรินให้เป็นอนุภาคไลโปโซมที่มีขนาดเล็กระดับนาโนเมตรเพื่อลดการระคายเคืองต่อเยื่อ และมีการตรวจสอบปริมาณการเพิ่มของเซลล์สมองต่อการออกฤทธิ์ของสารพิเพอรินจากพริกไทยดำด้วยเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ เพื่อยืนยันผลที่แน่นอนและน่าเชื่อถือ การศึกษานี้้นอกจากจะส่งผลดีต่อกลุ่มผู้สูงอายุและกลุ่มคนวัยทำงานที่มีภาวะความจำบกพร่องแล้ว ยังนับเป็นความสำเร็จของแวดวงวิชาการไทยที่สามารถค้นพบสรรพคุณของพริกไทยดำทำให้สามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อผู้ป่วยได้อย่างสูงสุด ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการศึกษาวิจัยที่มีผลต่อการพัฒนาประเทศในระยะยาว

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างพืชมะพร้าวและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพริก พร้อมระบุชนิดด้วยข้อมูลหลักฐาน วิทยาตามเอกสารอ้างอิงใน Chaveerach et al. (2008) และ อรุณรัตน์ จวีราช และคณะ (2552) การระบุกลิ่นเหมือนพริกใช้ความคิดเห็นส่วนบุคคล โดยให้ 10 คน ทดลองดมกลิ่นจากใบพริก บันทึกชนิดที่คิดว่ามีกลิ่นเหมือนพริก แล้วเลือกชนิดที่ผู้ทดลองทุกคนลงความเห็นว่ามีกลิ่นเหมือนพริกตรงกัน ทุกคน นำตัวอย่างพืชทุกชนิดมาสกัดดีเอ็นเอ สร้างและวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด ส่วนพืชเฉพาะชนิดที่มีกลิ่นเหมือนพริกนำมาสกัดสาร หาองค์ประกอบทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากพืช

2.2 การสกัดและตรวจสอบดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชตามวิธีการที่รายงานไว้โดย Porebski et al. (1997) ซึ่งมีสารเคมี และขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 1) ตูบ extraction buffer (100 mM Tris pH 8.0, 1.4 M sodium chloride (NaCl), 20 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2% Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)) ซึ่งอุ่นแล้วที่ 65°C ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในโกร่ง เติม polyvinylpyrrolidone (PVP) ปริมาณ 0.03 กรัม และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 ไมโครลิตร
- 2) ใส่เนื้อเยื่อพืชที่เตรียมไว้บดจนละเอียดแล้วย้ายใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3) เติม 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 65°C 30 นาที กลับหลอดไปมาทุก 5 นาที
- 4) เติม Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารในข้อ 3 (ประมาณ 600 ไมโครลิตร) กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน
- 5) Centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนไปใส่หลอดใหม่
- 6) เติม 2-propanol (-20°C) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารที่ได้ กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน แล้วแช่ไว้ที่ -20°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ
- 7) Centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้งแล้วเติมเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
- 8) Centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง แล้วรอให้ตะกอนแห้ง

9) เติม (65°C) 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วแช่ที่ 4°C ข้ามคืน ก่อนนำไปเก็บที่ -20°C

10) วัดปริมาณและตรวจคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis)

11) เตรียมแผ่นเจลอะกาโรส (agarose gel) โดยตวง 0.5X TAE buffer (20 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 0.06% glacial acetic acid) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

12) ชั่งผงอะกาโรส ปริมาณ 0.24 กรัม (= 0.8% agarose) หรือ 0.36 กรัม (= 1.2% agarose) ตามที่ต้องการใส่ลงในข้อ 1 แล้วแกว่ง flask ให้ผงวุ้นเข้ากับ buffer

13) นำไปละลายด้วย microwave สลับกับการแกว่ง flask จนกระทั่งผงวุ้นละลายหมด ตั้งไว้ให้อุ่นที่ประมาณ 60°C คือให้มือจับได้

14) ใส่กระบะเจลลงในบล็อกละและใส่คอมลงไปที่หลังบล็อก ค่อยๆ เทสารในข้อ 3 ลงในกระบะเจล ทิ้งไว้ 20 นาที ก่อนนำเจลไปใช้

15) ใส่เจลที่เตรียมไว้ลงในกระบะเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส เติม 0.5X TAE buffer ให้ท่วมผิวเจล ใช้กระแสไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 30 นาที

16) ย้อมเจลใน 0.001% ethidium bromide 10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 3 รอบ แล้วนำไปถ่ายรูปเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2.3 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA Barcoding)

2.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 1 โดยได้ข้อมูลจาก <http://www.kew.org/barcoding/update.html> ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในปริมาตรรวม 30 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ ดังนี้

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1) sterile H ₂ O	11.4
2) 2X GoTaq master mix (Promega)	15.0
3) primer F (50 ไมโครโมลาร์)	0.3
4) primer R (50 ไมโครโมลาร์)	0.3
5) DNA (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	3.0

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีแล้วนำไปเข้าเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR machine) โดยกำหนดเวลาและอุณหภูมิตามขั้นตอนต่อไปนี้

1) Predenaturation 3 นาที ที่ 94°C

2) ทำปฏิกิริยา 35 รอบ ดังนี้

- 2.1) Denaturation 30 วินาที ที่ 94°C
- 2.2) Annealing 30 วินาที ที่ 55°C
- 2.3) Extension 2 นาที ที่ 72°C
- 3) Final extension 5 นาที ที่ 72°C
- 4) เก็บที่ 4°C จนกว่าจะตรวจผล

ตรวจผลผลิตด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสตั้งรายละเอียดข้างต้น โดยใช้อะกาโรส ความเข้มข้น 1.2% เมื่อได้ผลผลิตที่ต้องการแล้วส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หรือโรงพยาบาลรามารับดี ซึ่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยหลักการ Dye Terminator โดยใช้ Mega BACE1000 Sequencing Systems คู่กับ ALFexpress Analysis System

ตารางที่ 1 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

ชื่อไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	บริเวณเป้าหมาย
MK-F1	TAATTTACGATCAATTCATTC	<i>matK</i> gene
MK-R2	CTTCCTCTGTAAAGAATTC	
RL-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	<i>rbcL</i> gene
RL-R	GTAAAATCAAGTCCACCCRG	
TP-F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	<i>psbA-trnH</i> spacer
TP-R	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	

2.3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ตามขั้นตอนต่อไปนี้

- 1) วิเคราะห์ความถูกต้องด้วยโปรแกรม FinchTV (<http://www.geospiza.com/finchtv/index.htm>) และ BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)
- 2) ใช้เครื่องมือ Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เปรียบเทียบความเหมือน (alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากสิ่งมีชีวิตอื่นซึ่งมีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) วิเคราะห์ทิศทาง (annotation) และตำแหน่งเริ่มการแปลรหัส (reading frame)
- 3) แปลรหัส (translate) ด้วย ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>)

4) บันทึก (submit) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้วิเคราะห์แล้วไว้ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit.html>) เพื่อให้อ้างอิงและนักวิจัยจากทั่วโลกสามารถเข้าถึงได้

2.4 การสกัดสารจากพืชด้วยตัวทำละลาย

เตรียมสารสกัดจากพืชโดยนำใบมาล้างและผึ่งลม ชั่งมา 25 กรัม บดให้เป็นผงละเอียด เติมตัวทำละลายคือเฮกเซน (analytical grade) ปริมาตร 120 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบและทดสอบฤทธิ์ต่อไป

2.5 การกลั่นและแยกน้ำมันหอมระเหยจากใบพลู

เก็บใบสดที่เจริญเติบโตเต็มที่ ชั่งมา 1 กิโลกรัม นำใบพืชไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไอน้ำ (WiseTherm Heating Mantles) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จะได้น้ำมันหอมระเหยที่แยกจากน้ำให้เก็บส่วนนี้ไว้และส่วนของน้ำที่มีน้ำมันหอมระเหยรวมอยู่ด้วย จากนั้นใช้กรวยแยกแยกน้ำมันหอมระเหยออกจากน้ำ โดยเติมสาร dichloromethane (CH_2Cl_2) : น้ำมันหอมระเหยที่รวมอยู่กับน้ำ ในอัตราส่วน 25:500 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากันทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ซึ่งน้ำมันหอมระเหยกับ dichloromethane จะแยกชั้นออกมาอยู่ด้านล่างของกรวยแยก เก็บส่วนนี้ไว้ จากนั้นนำประเหยสาร dichloromethane ออก ด้วยเครื่อง (Rotary Evaporator model) จะได้น้ำมันหอมระเหยเข้มข้น เก็บไว้ที่ -20°C ก่อนนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบและทดสอบฤทธิ์ต่อไป

2.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดจากพืชและน้ำมันหอมระเหย

วิเคราะห์สารสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลายและน้ำมันหอมระเหย ด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ด้วยเครื่อง Agilent Technologies GC 6890 N/5973 inert MS ที่เชื่อมกับคอลัมน์แบบคาปิลลารี ขนาด $30.0\text{ m} \times 250\text{ }\mu\text{m} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดสารสกัดปริมาตร 1 ไมโครลิตร ตั้งค่าอุณหภูมิ mass-transferred line เป็น 280°C กำหนดค่าอุณหภูมิตู้อบให้เพิ่มจาก 70°C ถึง 120°C ด้วยอัตรา 3°C ต่อนาที และให้คงอยู่ที่ 120°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นให้เพิ่มขึ้นจนถึง 270°C ด้วยอัตรา 5°C ต่อนาที ร้อยละของปริมาณสารองค์ประกอบเมื่อเทียบกับองค์ประกอบทั้งหมด (relative content) คำนวณได้จากพื้นที่ใต้กราฟ ระบุชนิดสารโดยเปรียบเทียบแมสสเปกตรัม (mass spectrum) ของสารองค์ประกอบที่ได้กับข้อมูลในฐานข้อมูล Wiley 7N.1 library

2.7 การทดสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืช

2.7.1 การเตรียมสารสกัด

แบ่งสารที่สกัดได้มา 15 มิลลิลิตร นำไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่อง Rotary Evaporator (Buchi, Switzerland) จนระเหยหมด แล้วละลายสารสกัดด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางแบบ two-fold serial dilutions ด้วย DMSO ดังนั้นความเข้มข้นที่จะใช้ทดสอบคือ 0 (ไม่เจือจาง) เจือจาง 2 4 และ 8 เท่า

2.7.2 การเตรียมจุลินทรีย์เพื่อการทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* TISTR 126, *Escherichia coli* TISTR 780, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 78 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และรา *Aspergillus flavus* TISTR 3041 และ *Trichoderma harzianum* TISTR 3553 ซึ่งซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร Luria-Bertani (LB) agar (1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl, 1.5% Bactoagar, pH 7.0; Sambrook and Russell, 2001) ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเจือจางเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^1 CFU ต่อ มิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบ ส่วนราเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose (PDA) agar (The National Plant Diagnostic Network Diagnostics, http://wiki.bugwood.org/Potato_dextrose_agar) ที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน แล้วเขี่ยปลายของเส้นใยไปเลี้ยงบนจานอาหารใหม่ ที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน เพื่อใช้ทดสอบ

2.7.3 การเตรียมจานอาหารและสารควบคุม

ทดสอบด้วยวิธี well plate diffusion โดยในจานอาหารแต่ละจานมีอาหาร 20 มิลลิลิตร เป็น LB agar สำหรับแบคทีเรียและ PDA สำหรับรา แต่ละจานเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จำนวน 7 หลุม สารควบคุมลบ (negative control) คือ DMSO และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ สารควบคุมบวก (positive control) ใช้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คือ ampicillin สำหรับแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และ clindamycin สำหรับ *Staphylococcus aureus* สำหรับราใช้ itraconazole สารทดสอบที่เติมลงในแต่ละหลุมใช้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

2.7.4 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

กระจายเซลล์ความเข้มข้น 1×10^1 CFU ต่อ มิลลิลิตร บนจานอาหาร LB agar เจาะหลุม เติมน้ำในแต่ละหลุมลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดของบริเวณยับยั้งการเจริญ (clear zone) ทั้งหมด ลบด้วยขนาดของหลุม จะได้เป็นขนาดที่นำไปบอกฤทธิ์ของสาร โดยผลการทดสอบฤทธิ์แบ่งเป็น 3 ระดับ ดังนี้

ระดับ 1 ไม่มีบริเวณยับยั้ง ได้ผลเป็น 0 มิลลิเมตร นั่นคือ ไม่มีฤทธิ์ทางสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ระดับ 2 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง คือ ได้ผลเป็น <5 มิลลิเมตร นั่นคือมีบริเวณยับยั้งแต่น้อยมาก ถือว่าไม่มีฤทธิ์ทางสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ระดับ 3 มีการยับยั้ง แบ่งเป็นระดับย่อย คือ

- ได้ผลเป็น 5-10 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ยับยั้งอย่างอ่อน (mild inhibitory)
- ได้ผลเป็น >10-15 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ยับยั้งปานกลาง (moderate inhibitory)
- ได้ผลเป็น >15 มิลลิเมตร มีฤทธิ์ยับยั้งอย่างแรง (strong inhibitory)

วิธีการทดลองและหลักการแปลผลนี้ดัดแปลงมาจาก Suppakul et al. (2006)

2.7.5 การทดสอบฤทธิ์การต้านรา

เขี่ยปลายเส้นใยมาเลี้ยงบนจานอาหารที่ 28°C เป็นเวลา 5 วัน นำจานเพาะเลี้ยงเจาะมา หลุมห่างจากเส้นใย 1 เซนติเมตร เติมสารแต่ละอย่างลงในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 28°C อีก 7 วัน แล้ว วัดขนาดของบริเวณยับยั้งการเจริญ แจกแจงระดับการยับยั้งเช่นเดียวกับการยับยั้งแบคทีเรีย

2.7.6 ความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดสอบฤทธิ์ได้คำนวณค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibition concentration: MIC) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากพืชแต่ละชนิดที่ผสมลงในอาหารแล้วจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2000)

2.7.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดสอบแต่ละอย่างทำ 3 ซ้ำ แล้วคำนวณความเชื่อมั่นทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) ด้วย IBM program SPSS Statistics 19

บทที่ 3

ผลการวิจัย

3.1 การใช้ประโยชน์จากพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย

จากการศึกษาและสำรวจการใช้พืชสกุลพริกไทยในภูมิภาคต่างๆ ทั้งในแง่เป็นอาหาร ยา รักษาโรค ปลูกประดับและใช้ในประเพณีหรือพิธีกรรม พบว่าพลูสายพันธุ์ที่นิยมปลูกในประเทศไทย ได้แก่ พลูเหลืองหรือพลุนวล และพลูเขียว ข้อมูลที่ได้จากการสำรวจ สังเกต และสอบถาม ทำให้ทราบว่าได้มีการนำพืชสกุลพริกไทยหลายชนิดมาใช้ประโยชน์ในชีวิตประจำวันของประชาชนทั่วทุกภูมิภาค หลายชนิดเป็นพืชเศรษฐกิจ หลายชนิดมีคุณสมบัติทางยาสมุนไพร ชนิดที่เป็นที่รู้จักทั่วไปในทุกภูมิภาค (รูปที่ 1) มีการนำมาใช้ประโยชน์มากและการใช้ประโยชน์ดังรายละเอียดต่อไปนี้

พลู *P. betle* L. คนไทยมีความผูกพันกับพลูมาแต่โบราณกาล มีการนำมาใช้ประโยชน์หลายประการ เช่น การกินหมาก และการประกอบพิธีกรรมต่างๆ แก้อาการชาวมเนื่องจากไปลุยน้ำมาแล้วติดเชื้อ ใช้ใบพลูเขียวแก่ 7 ใบ เสกคาถากวาดให้หาย ฎไปตามขาหลายๆ รอบ เปลี่ยนใบใหม่ มีคุณสมบัติทางยา คือ แก้ปวดฟัน แก้ร้มนวด ลดกลิ่นปาก รักษากลาก น้ำกัดเท้า แก้ลมพิษ แก้อาการอักเสบของเยื่อจมูก แก้เจ็บขบ รักษาแผล แก้ก้น แก้ท้องอืดเฟ้อ แก้ปวดท้อง แก้ท้องเสีย ขับลม

พริกไทย *P. nigrum* L. เป็นพืชเศรษฐกิจ ใช้ผลเป็นเครื่องเทศ และยาสมุนไพร มีคุณสมบัติทางยา คือ บำรุงธาตุ ช่วยเจริญอาหาร ลดอาการท้องอืดเฟ้อ แน่นจุกเสียด ขับลม ขับเหงื่อ ขับปัสสาวะ แก้อาการคัน ใช้ประกอบในตำรับเบญจกูลรักษาธาตุ

ชะพลู *P. sarmentosum* Roxb. ใช้รับประทานเป็นผัก และประกอบอาหารประเภทแกง มีคุณสมบัติทางยา คือ บำรุงธาตุ บำรุงหัวใจ บำรุงโลหิต ช่วยเจริญอาหาร ลดระดับน้ำตาลในเลือด แก้ปัสสาวะรดที่นอน แก้ปวดท้อง ขับเสมหะ ใช้ประกอบในตำรับเบญจกูลรักษาธาตุ

ติปลี *P. retrofractum* Vahl ใช้เป็นยาสมุนไพรและเครื่องเทศ ปัจจุบันนิยมนำมาปลูกประดับ เนื่องจากลักษณะการแตกกิ่งและสีของผลสุกที่สวยงาม มีคุณสมบัติทางยา คือ ใช้แก้พิษอัมพฤกษ์ อัมพาต แก้กัวร้อน แก้กัวร่วง แก้พิษงู แก้ปวดฟัน แก้ปวดท้อง แก้กัวเสีย แก้กัวอืด แก้กัวเฟ้อ ขับลม ขับเสมหะ รักษาโรคหืด ใช้ประกอบในตำรับเบญจกูลรักษาธาตุ

สะค้านเนื้อ *P. pendulispicum* C.DC. ต้นเพศเมียซึ่งติดผลมีชื่อเรียกว่าสะค้าน สะค้านเนื้อ หรือจะค้านจิ้น ใช้ลำต้นมาประกอบอาหาร ส่วนต้นเพศผู้มีชื่อเรียกว่าสะค้านแดง ใช้ลำต้นที่มีเนื้อไม้สีแดงเรื่อเป็นยาสมุนไพรบำรุงกำลัง



รูปที่ 1 พืช *Piper betle* (ก) พริกไทย *P. nigrum* (ข) ชะพลู *P. sarmentosum* (ค) ดีปลี *P. retrofractum* (ง) สะค้านเนื้อ *P. pendulispicum* (จ) พริกหาง *P. longum* (ฉ) พลุป่า *P. rubroglandulosum* (ช)

พริกหาง *P. longum* L. ใช้เครือหรือลำต้น ต้มแล้วดื่ม น้ำ เป็นยาสมุนไพร รักษาภูมิแพ้ ริดสีดวงทวาร ริดสีดวงจมูก แก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ ลดไขมันอุดตันเส้นเลือดในสมอง ลดความดัน รักษา เบาหวาน แก้ปวดศีรษะ ลดไข้

พลูป่า *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mookamul ชาวบ้านอาจนำมากินกับหมากถ้าไม่สามารถหาพลูได้ แต่ไม่ค่อยนิยมเพราะรสเผ็ดมากกว่าพลู หมอยาพื้นบ้านนำมารักษาโรคโดยเดี่ยว แล้วเป่า รักษาโรคเรื้อรัง รักษาโรคถุงส่ว

3.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลพริกไทยที่พบในประเทศไทย

เก็บตัวอย่างพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทยได้ทั้งสิ้น 36 ชนิด (รูปที่ 2-7) โดยมี 3 ชนิดที่มี ตัวอย่างต้นเพศผู้และเพศเมียด้วย บางชนิดเก็บได้หลายซ้ำ สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด จากบริเวณ *matK* gene, *psbA-trnH* spacer region และ *rbcL* gene ได้สำเร็จในเกือบทุกตัวอย่าง มีเพียงสองชนิดคือ *P. montium* และ *P. rubroglandulosum* (♀) ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากบริเวณ *matK* gene ได้ บันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายเหล่านี้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=Piper+Thailand>) ทั้งสิ้น 190 accessions (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมจากแต่ละบริเวณ ดังนี้

ความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิด

บริเวณ *matK* gene ให้ค่า 0.000 ใน *P. dominantinervium*, *P. hongkongense*, *P. kraense* และ *P. longum* ถึง 0.386 ใน *P. betle*

บริเวณ *rbcL* gene ให้ค่า 0.000 ใน *P. dominantinervium*, *P. hongkongense*, *P. longum*, *P. pedicellatum*, *P. pilobracteatum*, *P. polysyphonum*, *P. sarmentosum*, *P. sylvestre* และ *P. wallichii* ถึง 0.166 ใน *P. betle*

บริเวณ *psbA-trnH* spacer ให้ค่า 0.000 ใน *P. dominantinervium*, *P. khasianum*, *P. kraense*, *P. longum*, *P. montium*, *P. mutabile*, *P. nigrum*, *P. pilobracteatum*, *P. polysyphonum* และ *P. sarmentosum* ถึง 0.117 ใน *P. boehmeriifolium*

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด

บริเวณ *matK* gene ให้ค่า 0.000 ใน 8 คู่ ได้แก่ *P. kraense* กับ *P. dominantinervium*, *P. magnibaccum* กับ *P. kraense*, *P. phuwaense* กับ *P. dominantinervium*, *P. phuwaense* กับ *P. kraense*, *P. pilobracteatum* กับ *P. dominantinervium*, *P. pilobracteatum* กับ *P. kraense*, *P. pilobracteatum* กับ *P. phuwaense*, *P. sylvestre* กับ *P. polysyphonum* ถึง 0.486 ในคู่ *P. ribesioides* กับ *P. pilobracteatum*



รูปที่ 2 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper argyritis* (ก) *P. betle* (ข) *P. betloides* (ค)
P. boehmeriifolium (ง) *P. caninum* (จ) และ *P. colubrinum* (ฉ)



รูปที่ 3 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper crocatum* (ก) *P. dominantinervium* (ข) *P. hongkongense* (ค) *P. khasianum* (ง) *P. kraense* (จ) และ *P. longum* (ฉ)



รูปที่ 4 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper maculaphyllum* (ก) *P. magnibaccum* (ข)
P. montium (ค) *P. mutabile* (ง) *P. nigrum* (จ) และ *P. pedicellatum* (ฉ)



รูปที่ 5 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper pendulispicum* (ก) *P. phuwuaense* (ข)
P. pilobracteatum (ค) *P. polysyphonum* (ง) *P. protrusum* (จ) และ *P. retrofractum* (ฉ)



รูปที่ 6 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper ribesioides* (ก) *P. rubroglandulosum* (ข)
P. sarmentosum (ค) *P. semiimmersum* (ง) *P. submultinerve* (จ) และ *P. sylvaticum* (ฉ)



รูปที่ 7 พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย *Piper sylvestre* (ก) *P. thomsonii* (ข) *P. tricolor* (ค) *P. umbellatum* (ง) *Piper wallichii* (จ) และ *P. yinkiangense* (ฉ)

ตารางที่ 2 GenBank accession number เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลพริกไทย

Scientific name	GenBank accession number		
	<i>matK</i>	<i>psbA-trnH</i> spacer	<i>rbcL</i>
<i>Piper argyritis</i>	KM073990	JX442927, KM055176	JX291978, KM055126
<i>P. betle</i> (♀)	GU372747, KM098143	GQ891996, JQ248053	JQ248074
<i>P. betle</i> (♂)	KM098144	JQ248050	JQ248071
<i>P. betloides</i>	KM098135	JQ248051	JQ248072
<i>P. boehmeriifolium</i>	KM073991, KM073992	KM055177, KM055178	KM055127, KM055128
<i>P. caninum</i>	KM073993, KM073994	KM055179, KM055180	KM055129, KM055130
<i>P. colubrinum</i>	GU372751, KM073995	GQ892000	KM055131
<i>P. crocatum</i>	KM098136	JQ248047	JQ248068
<i>P. dominantinervium</i>	KM073996, KM073997	KM055181, KM055182	KM055132, KM055133
<i>P. hongkongense</i>	KM073998, KM073999	KM055183, KM055184	KM055134, KM055135
<i>P. khasianum</i>	KM074000, KM074001	KM055185, KM055186	KM055136, KM055137
<i>P. kraense</i>	KM074002, KM074003	KM055187, KM055188	KM055138, KM055139
<i>P. longum</i>	KM074004, KM074005	KM055189, KM055190	KM055140, KM055141
<i>P. maculaphyllum</i>	KM074006, KM098137	JQ248046, KM055191	JQ248067, KM055142
<i>P. magnibaccum</i>	KM074007, KM074008	KM055192, KM055193	KM055143, KM055144

ตารางที่ 2 GenBank accession number เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลพริกไทย (ต่อ)

Scientific name	GenBank accession number		
	<i>matK</i>	<i>psbA-trnH</i> spacer	<i>rbcL</i>
<i>P. montium</i>	n/a	KM055194, KM055195	KM055145, KM055146
<i>P. mutabile</i>	KM074035	KM055196, KM055197	KM055147, KM055148
<i>P. nigrum</i>	KM074009, KM074010	GQ891994, KM055198, KM055199	KM055149, KM055150
<i>P. pedicellatum</i> var. <i>eglandulatum</i>	KM074011, KM074012	KM055200, KM055201	KM055151, KM055152
<i>P. pendulispicum</i> (♀)	KM074013, GU372748	KM055202, GQ891997	KM055153, JX291979
<i>P. phuwaense</i>	KM074014, KM074015	KM055203, KM055204	KM055154, KM055155
<i>P. pilobracteatum</i>	KM074016, KM074017, KM074018, KM074019	KM055205, KM055206, KM055207, KM055208	KM055156, KM055157, KM055158, KM055159
<i>P. polysyphonum</i>	KM074020, KM074021	KM055209, KM055210	KM055160, KM055161
<i>P. protrusum</i>	KM074032, KM074033	GU980900, KM055223	KM055172, KM055173
<i>P. retrofractum</i>	GU372749, KM074034	GQ891998, KM055224	KM055175
<i>P. ribesioides</i>	GU372750, KM074022	GQ891999, KM055211	KM055162

หมายเหตุ n/a คือไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

ตารางที่ 2 GenBank accession number เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลพริกไทย (ต่อ)

Scientific name	GenBank accession number		
	<i>matK</i>	<i>psbA-trnH</i> spacer	<i>rbcL</i>
<i>P. rubroglandulosum</i> (♀)	n/a	JX442926	JX291977
<i>P. rubroglandulosum</i> (♂)	KM098138	JX442925	JX291976
<i>P. sarmentosum</i>	GU372746, KM074023, KM074024	KM055212, KM055213	KM055163, KM055164
<i>P. semiimmersum</i>	KM098139	JQ248045	JQ248066
<i>P. submultinerve</i>	KM098140	JQ248048	JQ248069
<i>P. sylvaticum</i>	KM074025, KM074026	KM055214, KM055215	KM055174
<i>P. sylvestre</i>	KM074027, KM074028	KM055216, KM055217	KM055165, KM055166
<i>P. thomsonii</i> var. <i>trichostigma</i>	KM074029	KM055218	KM055167
<i>P. tricolor</i>	KM098141	JQ248049	JQ248070
<i>P. umbellatum</i>	EU669471*, GQ429067*	KM055219, KM055220	KM055168, KM055169
<i>P. wallichii</i>	KM074030, KM074031	KM055221, KM055222	KM055170, KM055171
<i>P. yinkiangense</i>	KM098142	JQ248052	JQ248073

หมายเหตุ * คือ accessions จากงานวิจัยอื่นซึ่งนำมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรม, n/a คือไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

บริเวณ *rbcL* gene ให้ค่า 0.000 ใน 49 คู่ ได้แก่ *P. dominantinervium* กับ *P. caninum*, *P. kraense* กับ *P. boehmeriifolium*, *P. maculaphyllum* กับ *P. khasianum*, *P. magnibaccum* กับ *P. khasianum*, *P. magnibaccum* กับ *P. caninum*, *P. magnibaccum* กับ *P. dominantinervium*, *P. montium* กับ *P. khasianum*, *P. montium* กับ *P. magnibaccum*, *P. mutabile* กับ *P. caninum*, *P. mutabile* กับ *P. dominantinervium*, *P. mutabile* กับ *P. magnibaccum*, *P. nigrum* กับ *P. caninum*, *P. nigrum* กับ *P. dominantinervium*, *P. nigrum* กับ *P. magnibaccum*, *P. nigrum* กับ *P.*

mutabile, *P. pedicellatum* กับ *P. khasianum*, *P. pedicellatum* กับ *P. magnibaccum*, *P. pedicellatum* กับ *P. montium*, *P. pedicellatum* กับ *P. pendulispicum*, *P. pendulispicum* กับ *P. caninum*, *P. pendulispicum* กับ *P. dominantinervium*, *P. pendulispicum* กับ *P. magnibaccum*, *P. pendulispicum* กับ *P. mutabile*, *P. pendulispicum* กับ *P. nigrum*, *P. phuwaense* กับ *P. caninum*, *P. phuwaense* กับ *P. dominantinervium*, *P. phuwaense* กับ *P. magnibaccum*, *P. phuwaense* กับ *P. mutabile*, *P. phuwaense* กับ *P. nigrum*, *P. phuwaense* กับ *P. pedicellatum*, *P. pilobraceatum* กับ *P. caninum*, *P. pilobraceatum* กับ *P. mutabile*, *P. polysyphonum* กับ *P. khasianum*, *P. polysyphonum* กับ *P. magnibaccum*, *P. polysyphonum* กับ *P. montium*, *P. sarmentosum* กับ *P. longum*, *P. sylvestre* กับ *P. khasianum*, *P. sylvestre* กับ *P. magnibaccum*, *P. sylvestre* กับ *P. montium*, *P. thomsonii* กับ *P. nigrum*, *P. pilobraceatum* กับ *P. phuwaense*, *P. polysyphonum* กับ *P. pendulispicum*, *P. polysyphonum* กับ *P. pedicellatum*, *P. sylvestre* กับ *P. pendulispicum*, *P. sylvestre* กับ *P. pedicellatum*, *P. sylvestre* กับ *P. polysyphonum*, *P. wallichii* กับ *P. umbellatum*, *P. protrusum* กับ *P. phuwaense*, *P. protrusum* กับ *P. pilobraceatum* ถึง 0.213 ในคู่ *P. betle* กับ *P. argyritis*

บริเวณ *psbA-trnH* spacer ให้ค่า 0.000 ใน 16 คู่ ได้แก่ *P. montium* กับ *P. magnibaccum*, *P. pilobraceatum* กับ *P. caninum*, *P. polysyphonum* กับ *P. pedicellatum*, *P. ribesoides* กับ *P. pedicellatum*, *P. sarmentosum* กับ *P. longum*, *P. sylvestre* กับ *P. pedicellatum*, *P. wallichii* กับ *P. khasianum*, *P. wallichii* กับ *P. pedicellatum*, *P. protrusum* กับ *P. magnibaccum*, *P. sylvestre* กับ *P. polysyphonum*, *P. sylvestre* กับ *P. ribesoides*, *P. wallichii* กับ *P. polysyphonum*, *P. wallichii* กับ *ribesoides*, *P. wallichii* กับ *P. sylvestre*, *P. yinkiangense* กับ *P. betle* ถึง 0.228 ในคู่ *P. semiimmersum* กับ *P. umbellatum*

พบว่าบริเวณ *matK* gene ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำในชนิดเดียวกันและให้ค่าสูงในระหว่างชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3 ดังนั้นจึงเป็นบริเวณที่มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดพืชสกุลพริกไทย

[illegible]

3.3 สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากพืช

เนื่องจากพลูเป็นพืชสกุลพริกไทยชนิดที่มีการนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดและมีสารสำคัญต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม แต่ก็ยังมีปัญหาในการปลูกทำให้วัตถุดิบที่ป้อนเข้าสู่โรงงานอุตสาหกรรมมีปริมาณไม่เพียงพอส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูง หากมีพืชอื่นที่มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกันหรือมากกว่าพลูจะเป็นทางเลือกใหม่ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น จึงได้เก็บตัวอย่างพลู (รูปที่ 8) และชนิดที่มีกลิ่นเหมือนพลูอีก 8 ชนิด ได้แก่ พลูดอยสุเทพ *P. betloides* (รูปที่ 9) พลูลงยา *P. crocatum* (รูปที่ 10) พลูลงยา *P. maculaphyllum* (รูปที่ 11) พลูป่า *P. rubroglandulosum* (รูปที่ 12) พลูขน *P. semiimmersum* (รูปที่ 13) พลูชมพู *P. submultinerve* (รูปที่ 14) พลูสามสี *P. tricolor* (รูปที่ 15) และพลูจีน *P. yinkiangense* (รูปที่ 16) มาจากสถานที่ต่าง ๆ ดังตารางที่ 4 เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี ในสารสกัดจากพืชด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 17-25 ระบุสารที่พบในพืชแต่ละชนิดได้ดังตารางที่ 5-13 โดยพบสารที่สำคัญ ได้แก่ eugenol, isoeugenol, chavicol, caryophyllene, sabinene, phellandrene, germacrene A, germacrene D และ sesquiterpenes



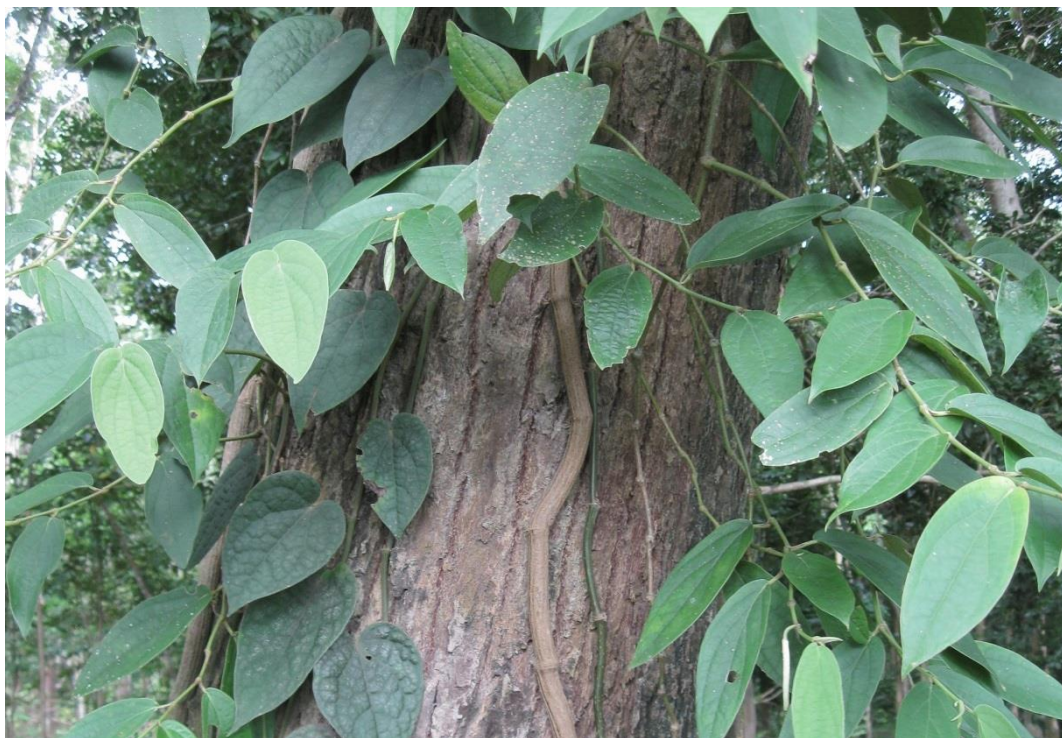
รูปที่ 8 พลู *Piper betle*



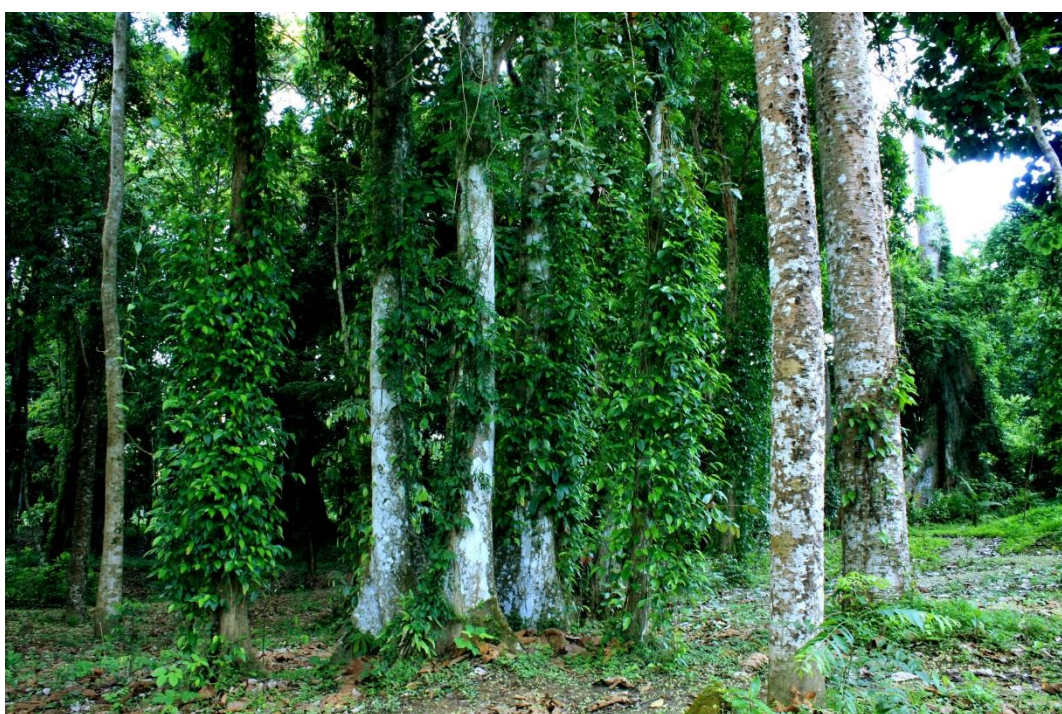
รูปที่ 9 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู พลูดอย *Piper betloides*



รูปที่ 10 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู พลูลงยา *Piper crocatum*



รูปที่ 11 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพญานาค พญานาค *Piper maculaphyllum*



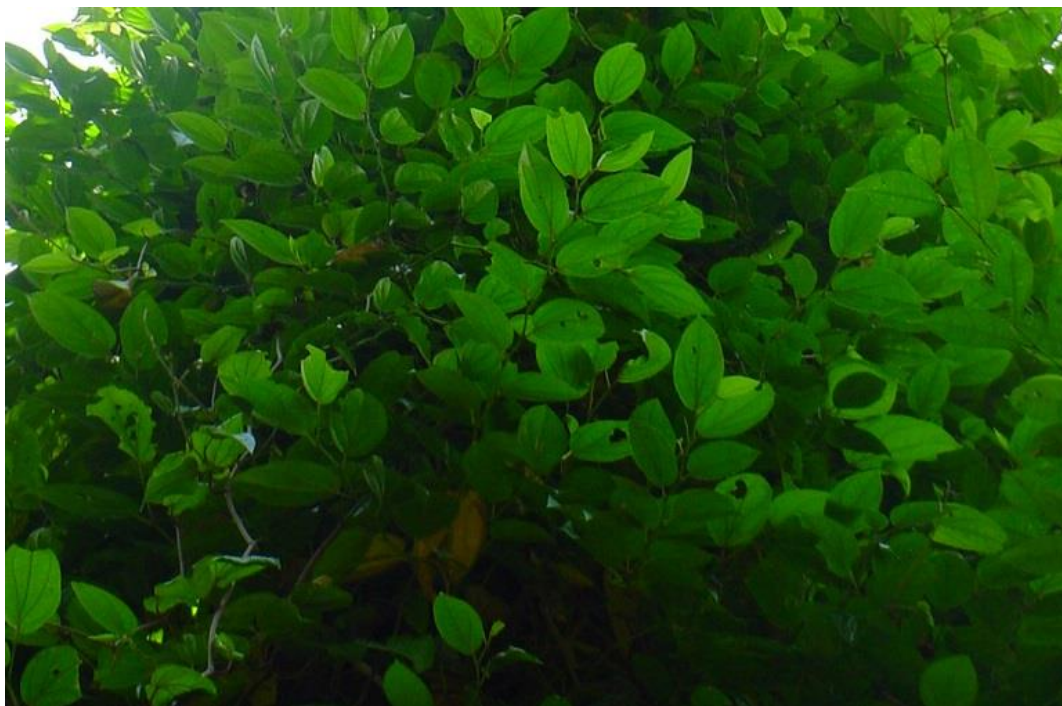
รูปที่ 12 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพญานาค พญานาค *Piper rubroglandulosum*



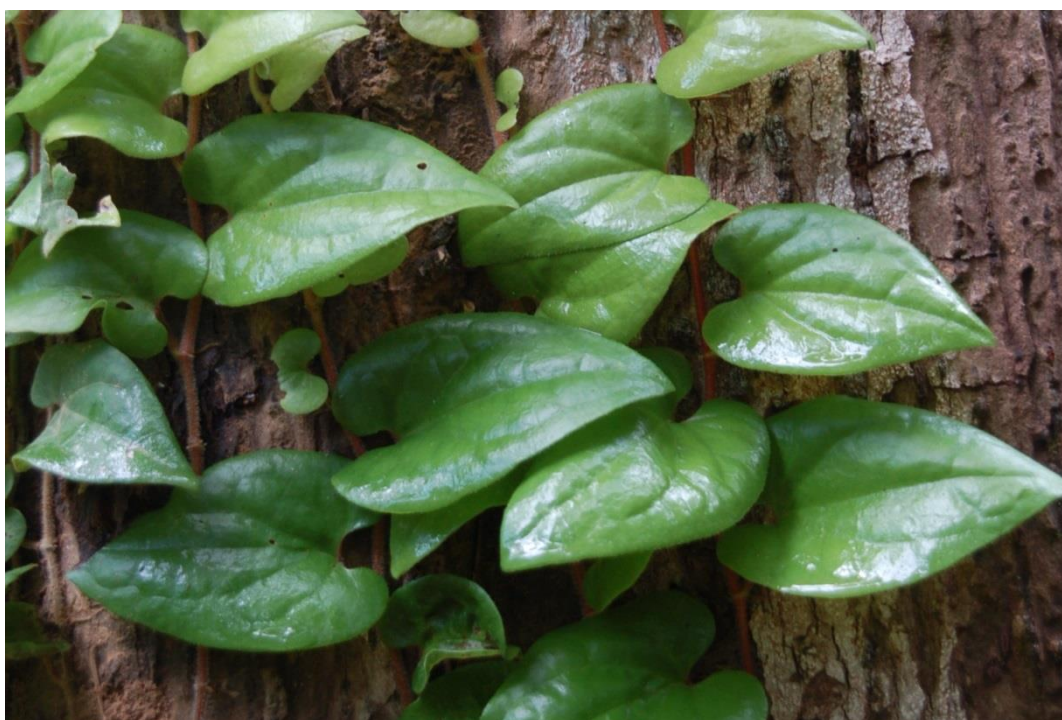
รูปที่ 13 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู่ พลู่ขน *Piper semiimmersum*



รูปที่ 14 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู่ พลู่ชมพู *Piper submultinerve*



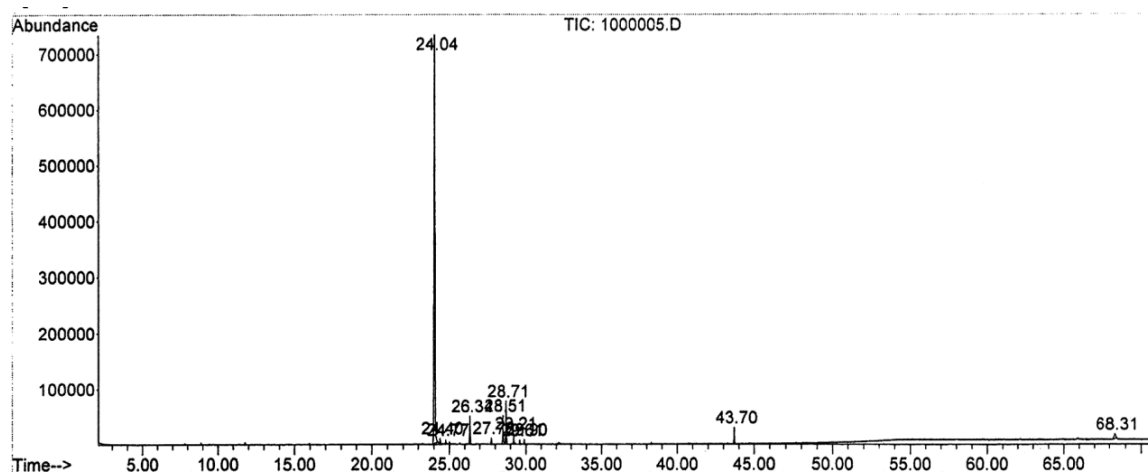
รูปที่ 15 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพญู พญูสามสี *Piper tricolor*



รูปที่ 16 พืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพญู พญูจีน *Piper yinkiangense*

ตารางที่ 4 ตัวอย่างศึกษาและสถานที่เก็บตัวอย่างพลูและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

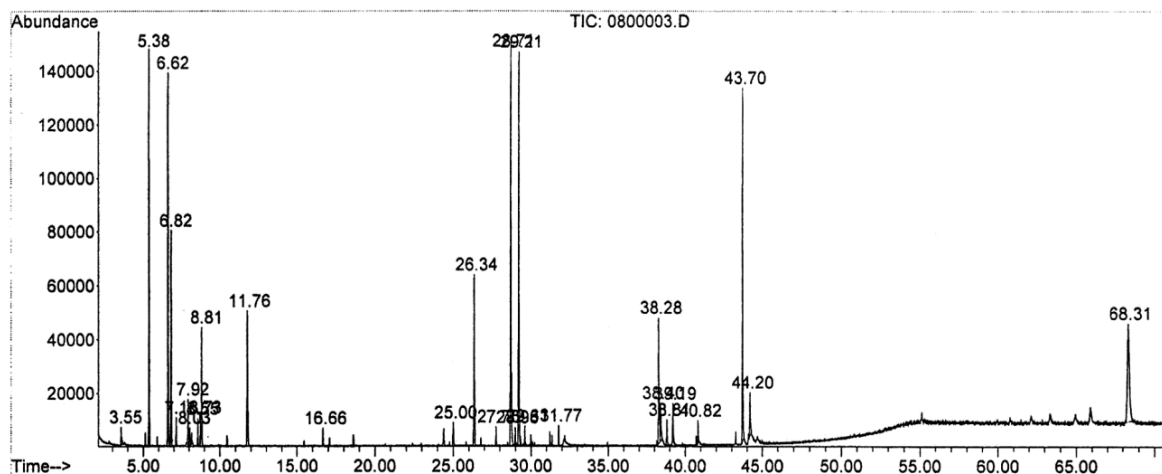
ลำดับที่	ตัวอย่าง	ชื่อวิทยาศาสตร์	สถานที่เก็บตัวอย่าง
1.	พลู	<i>Piper betle</i>	อ. เมือง จ. ขอนแก่น
2.	พลูดอยสุเทพ	<i>P. betloides</i>	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จ. เชียงใหม่
3.	พลูลงยา	<i>P. crocatum</i>	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จ. เชียงใหม่
4.	พลูลงยา	<i>P. maculaphyllum</i>	เขตห้ามล่าสัตว์ป่าเขาพระแทว จ. ภูเก็ต
5.	พลูป่า	<i>P. rubroglandulosum</i>	ศูนย์พัฒนาและส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่า เขาพระแทว จ. ภูเก็ต
6.	พลูขน	<i>P. semiimmersum</i>	อุทยานแห่งชาติศรีพังงา จ. พังงา
7.	พลูชมพู	<i>P. submultinerve</i>	สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จ. เชียงใหม่
8.	พลูสามสี	<i>P. tricolor</i>	อุทยานแห่งชาติศรีพังงา จ. พังงา
9.	พลูจีน	<i>P. yinkiangense</i>	อุทยานแห่งชาติเขาสก จ. สุราษฎร์ธานี



รูปที่ 17 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper betle*

ตารางที่ 5 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper betle*

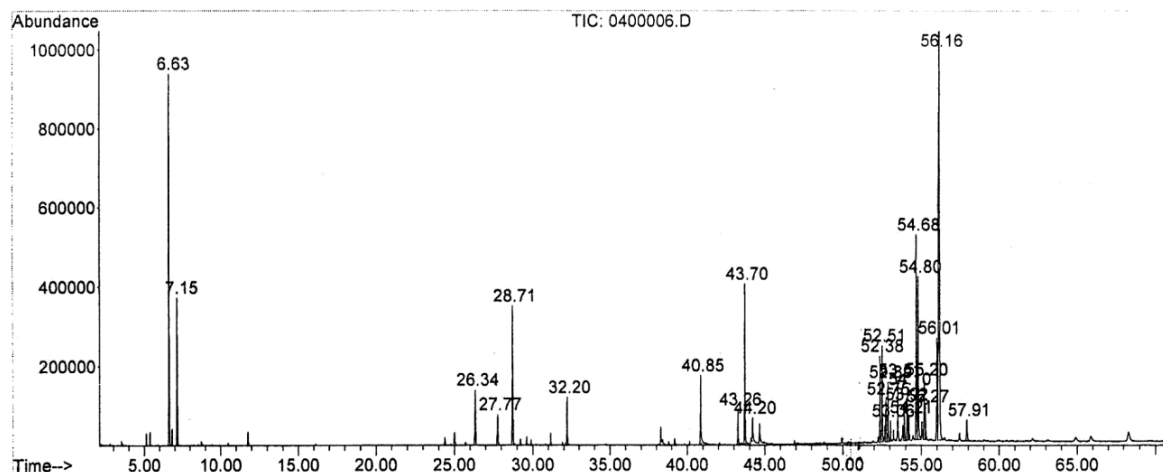
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
24.042	Eugenol หรือ Isoeugenol หรือ 4-cyclopropyl-2-methoxyphenol หรือ Chavibetol	$C_{10}H_{12}O_2$	164	80.524
28.707	Germacrene-D	$C_{15}H_{24}$	204	5.210
26.339	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	3.833
28.513	α -amorphene	$C_{15}H_{24}$	204	3.319
43.702	Phytol	$C_{20}H_{40}O$	296	1.669
29.213	Bicyclogermacrene	$C_{15}H_{24}$	204	1.241
	Unknown			4.204



รูปที่ 18 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper betloides*

ตารางที่ 6 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper betloides*

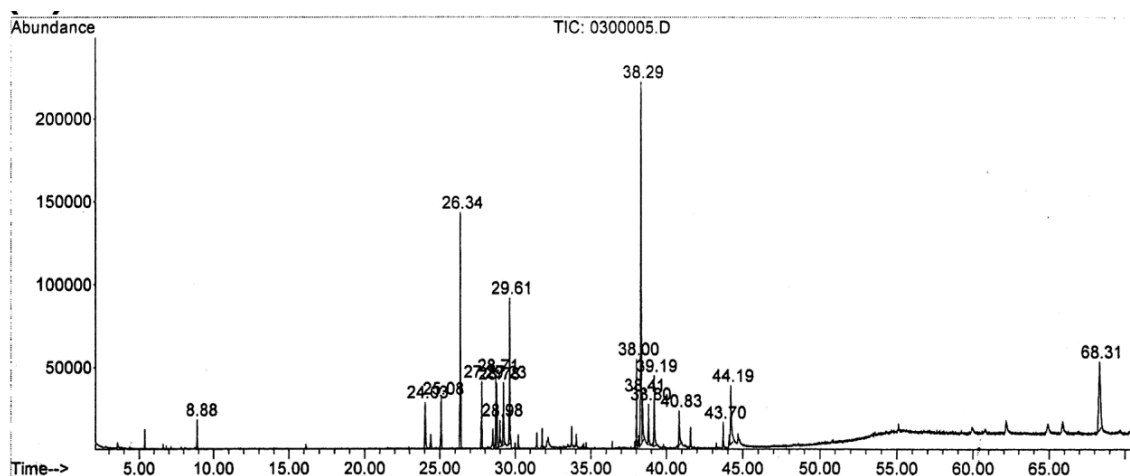
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
28.713	Germacrene-D หรือ β -cubebene หรือ Naphthalene,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro	$C_{15}H_{24}$	204	13.286
29.212	Bicyclogermacrene	$C_{15}H_{24}$	204	12.552
5.381	α -pinene หรือ Tricyclene หรือ γ -terpinene หรือ 4-carene	$C_{10}H_{16}$	136	9.424
6.621	Sabinene หรือ β -phellandrene หรือ β -terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	9.352
68.309	1,3-dimethyl-4-azaphenanthrene 4'methy-2 phenylindole	$C_{15}H_{13}N$	207	9.160
43.702	Phytol isomer	$C_{20}H_{40}O$	296	8.930
26.339	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	5.885
6.821	β -pinene หรือ Sabinene หรือ Cyclohexane,4-methylene-1-(1-methylethyl)	$C_{10}H_{16}$	136	5.527
11.768	L-linalool	$C_{10}H_{18}O$	154	4.377
11.756	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	278	4.130
38.278	β -phellandrene หรือ β -thujene หรือ Sabinene	$C_{10}H_{16}$	136	3.548
	Unknown			13.829



รูปที่ 19 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาดด้วยเฮกเซน จาก *Piper crocatum*

ตารางที่ 7 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper crocatum*

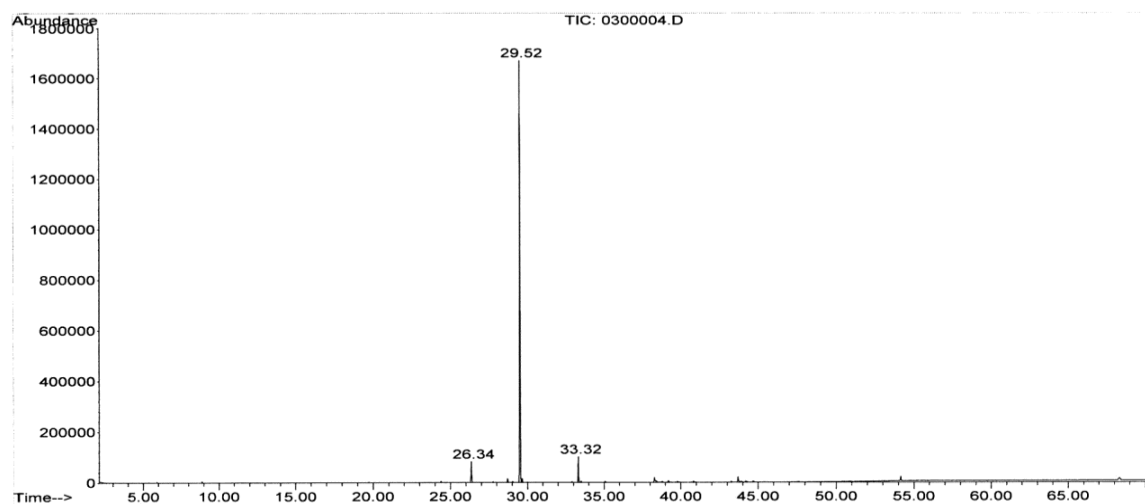
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
6.627	Sabinene หรือ β -phellandrene หรือ β -terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	10.166
54.683	4-allyloxy-6-methoxy-N,N-dimethyl-1,3,5-	$C_9H_{14}N_4O_2$	210	6.543
28.713	Germacrene-D หรือ β -cubebene หรือ Naphthalene,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro หรือ Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene,2-isopropyl-5-m	$C_{15}H_{24}$	204	4.585
43.702	Phytol isomer	$C_{20}H_{40}O$	296	4.368
7.150	β -myrcene	$C_{10}H_{16}$	136	4.006
56.005	Methyl (25R)-5-oxo-A-nor-3,5-secospirost	$C_{27}H_{42}O_5$	446	3.651
40.846	Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	256	2.259
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	2.058
27.773	α -humulene	$C_{15}H_{24}$	204	1.121
56.158	Unknown			61.243



รูปที่ 20 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper maculaphyllum*

ตารางที่ 8 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper maculaphyllum*

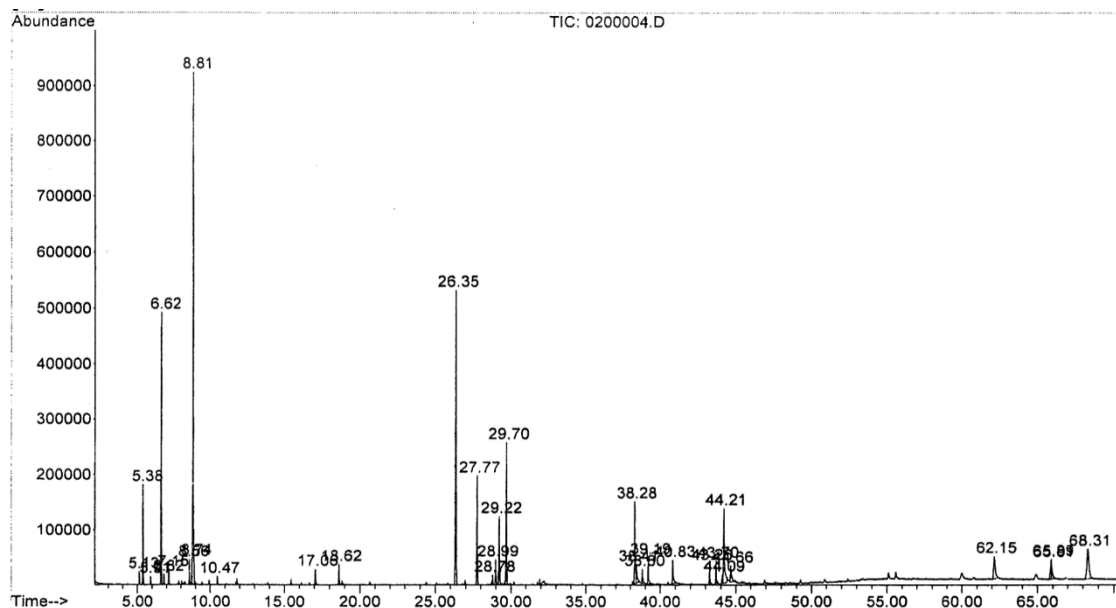
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
38.296	Germacrene-A	$C_{15}H_{24}$	204	24.256
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	13.442
68.315	24(Z)-methyl-25-homocholesterol หรือ 1,5-dimethyl-6-(1,5-dimethylhexyl)-15,16	$C_{29}H_{50}O$	414	9.660
29.612	1H-cycloprop[e]azulene หรือ Bicyclogermacrene	$C_{15}H_{24}$	204	7.112
29.224	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro หรือ Bicyclogermacrene	$C_{15}H_{24}$	204	3.867
28.707	Germacrene-D หรือ β -cubebene	$C_{15}H_{24}$	204	3.777
27.767	α -humulene หรือ β -selinene	$C_{15}H_{24}$	204	3.611
28.778	1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methylbenzene	$C_{15}H_{22}$	202	3.389
24.025	Isoeugenol หรือ Chavibetol	$C_{10}H_{12}O_2$	164	3.236
25.082	β -elemene	$C_{15}H_{24}$	204	3.014
8.877	1,8-cineole	$C_{10}H_{18}O$	154	1.393
	Unknown			23.243



รูปที่ 21 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper rubroglandulosum*

ตารางที่ 9 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper rubroglandulosum*

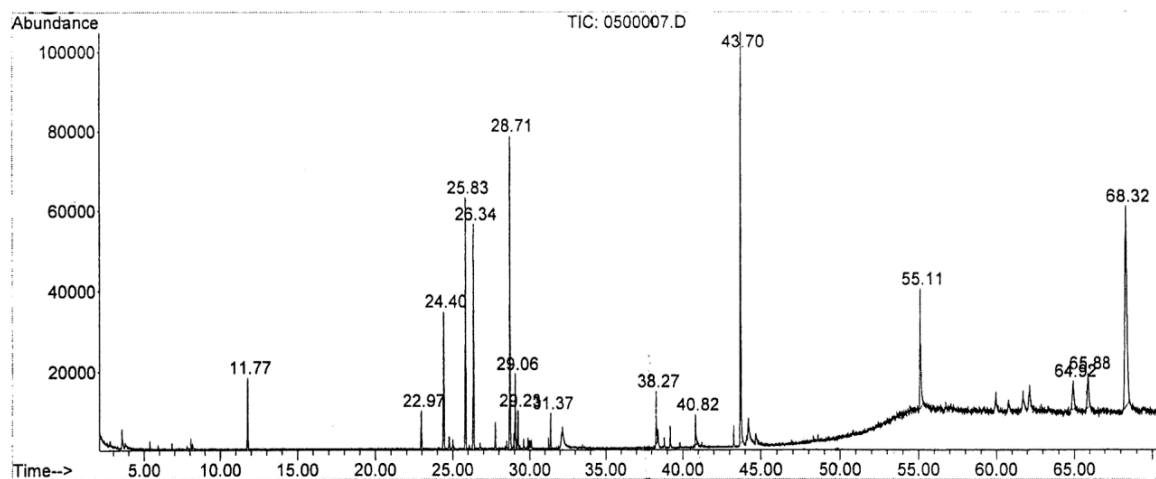
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
29.518	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol (butylated hydroxytoluene)	$C_{15}H_{24}O$	220	89.828
26.339	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	5.330
	Unknown			4.842



รูปที่ 22 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper semiimmersum*

ตารางที่ 10 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper semiimmersum*

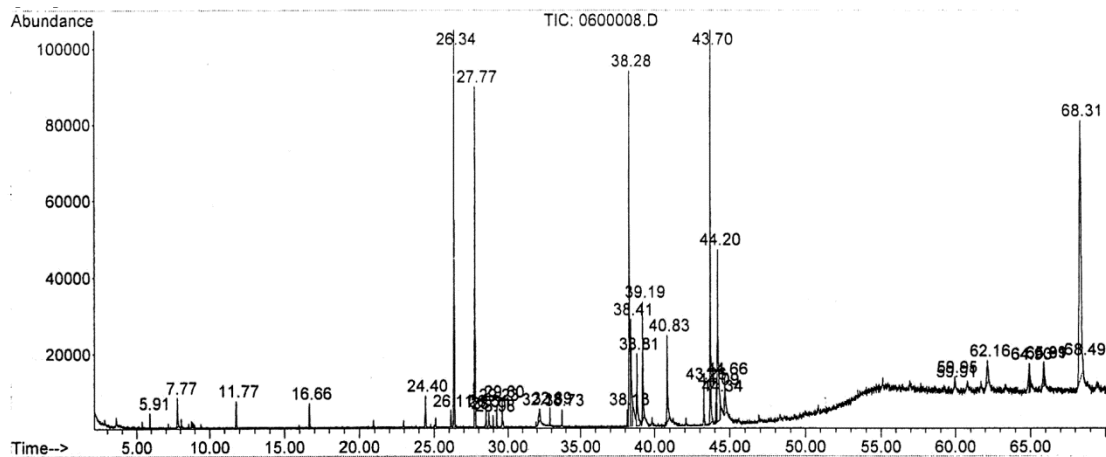
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทาง เคมี	Mw	Relative content (%)
8.812	Sabinene หรือ β -phellandrene	$C_{10}H_{16}$	136	22.788
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	15.304
6.627	Sabinene หรือ β -phellandrene หรือ Cyclohexane หรือ 4-methylene-1-(1-methylethyl) หรือ β -terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	10.121
29.694	β -bisabo	$C_{15}H_{24}$	204	5.977
44.207	9-octadecenoic acid Heptadecene-(8)-carbonic acid-(1) หรือ 9,12,15-octadecatrien-1-ol,(z,z,z)-	$C_{18}H_{34}O_2$	282	5.000
27.767	cis,cis,cis-1,1,4,8-tetramethyl-4,7,10- cycloundecatriene หรือ β -selinene หรือ α - humulene หรือ α -caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	5.211
38.278	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	278	4.064
5.381	α -pinene หรือ Tricycle[2.2.1.02,6] heptane,1,7,7-trimethyl หรือ γ -terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	3.399
62.151	Vitamin e	$C_{29}H_{50}O_2$	430	2.660
	Unknown			25.476



รูปที่ 23 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาบด้วยเฮกเซน จาก *Piper submultinerve*

ตารางที่ 11 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper submultinerve*

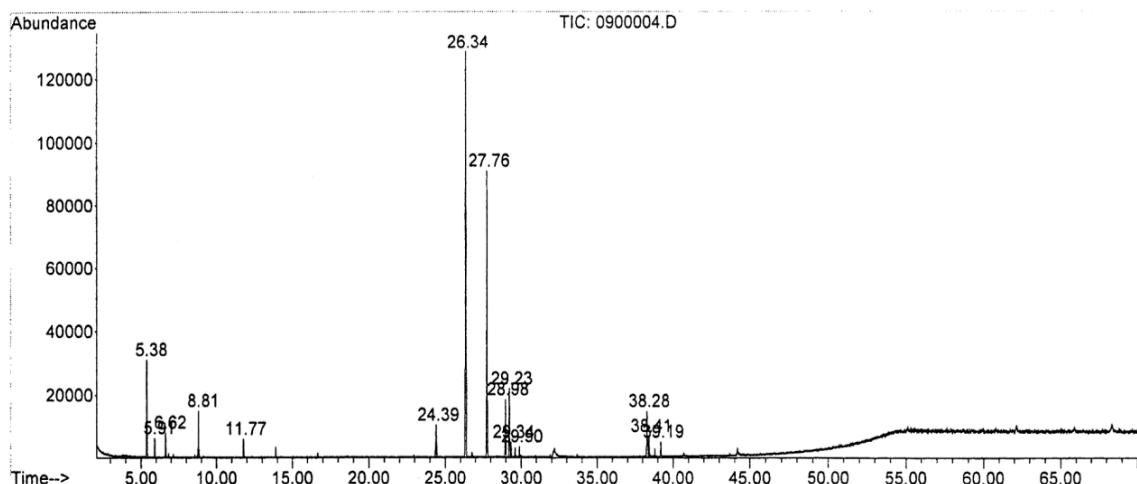
RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
43.702	Phytol isomer	$C_{20}H_{40}O$	296	24.754
68.314	24(z)-methyl-25-homocholesterol หรือ 1,5-dimethyl-6-(1,5-dimethylhexyl)-15,16	$C_{29}H_{50}O$	414	19.150
28.713	Germacrene-D	$C_{15}H_{24}$	204	10.676
25.828	α -gurjunene	$C_{15}H_{24}$	204	9.199
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	8.555
24.400	α -copaene หรือ α -cubebene	$C_{15}H_{24}$	204	5.517
11.768	L-linalool	$C_{10}H_{18}O$	154	2.381
22.967	α -cubebene หรือ α -ylangene	$C_{15}H_{24}$	204	1.453
55.106	Unknown			18.315



รูปที่ 24 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาดด้วยเฮกเซน จาก *Piper tricolor*

ตารางที่ 12 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper tricolor*

RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
68.315	(23s)ethylcholest-5-en-3.β-ol	$C_{29}H_{50}O$	414	18.663
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	14.593
38.279	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	278	10.581
27.767	α-humulene	$C_{15}H_{24}$	204	9.427
44.195	9,12,15-octadecatrien-1-ol,(z,z,z)- หรือ 7,10,13-hexadecatrienoic acid	$C_{18}H_{32}O$	264	7.025
39.189	Neophytadiene	$C_{20}H_{38}$	278	3.270
40.829	Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	256	2.711
	Unknown			33.730



รูปที่ 25 โครมาโทแกรมจาก GC-MS ของสารสกัดหยาดด้วยเฮกเซน จาก *Piper yinkiangense*

ตารางที่ 13 สารเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบในสารสกัดจาก *Piper yinkiangense*

RT (min)	ชื่อสาร	สูตรทางเคมี	Mw	Relative content (%)
26.345	Trans-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	39.444
27.767	α -humulene หรือ α -caryophyllene หรือ β -selinene	$C_{15}H_{24}$	204	25.152
5.381	α -pinene หรือ (1R,1S)-2,6,6-trimethyl bicyclo[3.1.1]hept-2-ene หรือ Tricyclene tricycle หรือ [2.2.1.0 ^{2,6}]heptane, 1,3,3-trimethyl หรือ 3-care	$C_{10}H_{16}$	136	6.025
29.230	α -selinene	$C_{15}H_{24}$	204	5.271
28.983	β -selinene	$C_{15}H_{24}$	204	4.606
8.813	Sabinene หรือ β -phellandrene หรือ β -terpin	$C_{10}H_{16}$	136	3.647
24.389	α -copaene	$C_{15}H_{24}$	204	3.185
38.408	3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecene	$C_{20}H_{40}$	280	1.520
	Unknown			11.150

3.4 ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชทั้ง 9 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (รูปที่ 26) ได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และรา *Aspergillus flavus* และ *Trichoderma harzianum* ได้ผลขนาดของบริเวณยับยั้ง (ตารางที่ 14) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

สารสกัดพืชที่ไม่ได้เจือจาง

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

สารสกัดจากพืช 8 ชนิด คือ *P. betle* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. submultinerve*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, *P. semiimmersum* และ *P. yinkiangense* ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญแต่ไม่เกิดฤทธิ์ยับยั้ง

แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

สารสกัดจากพืช 7 ชนิด คือ *P. betle* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, *P. semiimmersum* และ *P. yinkiangense* ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ แต่มีเพียง 2 ชนิด คือ *P. rubroglandulosum* เพศเมีย และ *P. yinkiangense* ที่มีฤทธิ์การยับยั้งอย่างอ่อน คือ เกิดบริเวณยับยั้ง 5.17 ± 0.29 และ 5.17 ± 0.29 มิลลิเมตร

แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

สารสกัดจาก *P. betloides* และ *P. maculaphyllum* มีฤทธิ์การยับยั้งอย่างอ่อน คือ เกิดบริเวณยับยั้ง 5.83 ± 0.76 และ 6.00 ± 1.00 มิลลิเมตร

สำหรับแบคทีเรีย *Escherichia coli* และรา *Aspergillus flavus* และ *Trichoderma harzianum* สารสกัดจากพืชทั้ง 9 ชนิด ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ

สารสกัดพืชที่เจือจาง

เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชที่เจือจาง 2 4 และ 8 เท่า ได้ผลดังนี้

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

สารสกัดจากพืช 8 ชนิด คือ *P. betle* เพศผู้, *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. maculaphyllum*, *P. rubroglandulosum* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย, *P. semiimmersum*, *P. submultinerve* และ *P. yinkiangense* ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญแต่ไม่เกิดฤทธิ์ยับยั้ง

แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa*

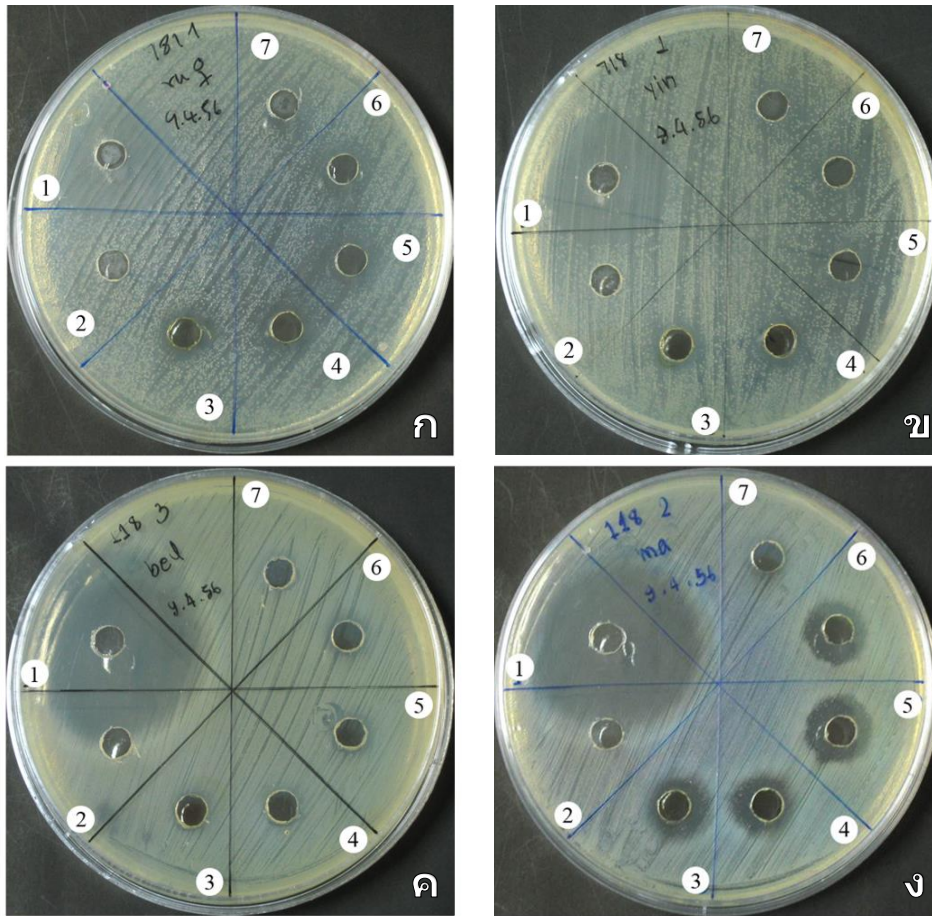
สารสกัดจากพืชที่ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญแต่ไม่เกิดฤทธิ์ยับยั้ง ได้แก่ *P. rubroglandulosum* เพศผู้ ทุกระดับการเจือจาง *P. betloides*, *P. crocatum*, *P. rubroglandulosum* เพศเมีย, *P. semiimmersum* และ *P. yinkiangense* ที่ระดับการเจือจาง 2 และ 4 เท่า และ *P. betle* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย และ *P. maculaphyllum* ที่ระดับการเจือจาง 2 เท่า

แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

สารสกัดจาก *P. betloides* ทุกระดับการเจือจางทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญแต่ไม่เกิดฤทธิ์ยับยั้ง สารสกัดจาก *P. maculaphyllum* เกิดฤทธิ์ยับยั้ง โดยมีบริเวณยับยั้งขนาด 5.67 ± 0.58 , 6.33 ± 1.15 และ 5.67 ± 0.58 มิลลิเมตร สำหรับการเจือจาง 2 4 และ 8 เท่า ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์การยับยั้งของแต่ละระดับการเจือจางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$).

สำหรับแบคทีเรีย *Escherichia coli* และรา *Aspergillus flavus* และ *Trichoderma harzianum* สารสกัดจากพืชทั้ง 9 ชนิด ไม่เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ

แบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ที่นำมาทดสอบนี้ เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้มากในประเทศเขตร้อน จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยพืชต่างๆ เพื่อนำมาใช้เพิ่มเติมจากพลู พบว่าชนิดที่เป็นไปได้ ได้แก่ *P. rubroglandulosum* เพศผู้, *P. yinkiangense*, *P. betloides* และ *P. maculaphyllum* โดยสารสกัดที่ไม่เจือจางจาก *P. rubroglandulosum* และ *P. yinkiangense* มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ส่วนสารสกัดที่ไม่เจือจางจาก *P. betloides* และสารสกัดที่ทุกระดับการเจือจางจาก *P. maculaphyllum* มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* พืชที่น่าสนใจที่สุดคือ *P. maculaphyllum* เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์หลายโรค ประชาชนจึงสามารถใช้ประโยชน์จากพืชนี้ได้ทั้งการบริโภคในระดับท้องถิ่นหรือการปลูกเป็นจำนวนมากเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่อไปแทนการใช้ใบพลูเพียงอย่างเดียว ในกรณีที่พลูเกิดโรคหรือขาดแคลนในบางฤดู ผลการทดสอบยังพบว่าสารสกัดจาก *P. yinkiangense*, *P. betloides* and *P. maculaphyllum* มีฤทธิ์การยับยั้ง *P. aeruginosa* และ *S. aureus* สูงกว่าสารสกัดจากพลู



รูปที่ 26 ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชที่ระดับการเจือจางต่างๆ ต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* (สารสกัดจาก ♀ *Piper rubroglandulosum* (ก) *P. yinkiangense* (ข)) และ *Staphylococcus aureus* (สารสกัดจาก *P. betloides* (ค) *P. maculaphyllum* (ง)) สารที่เติมลงไปในแต่ละหลุมได้แก่ (1) antibiotic (2) น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (3) สารสกัดที่ไม่ได้เจือจาง (4) สารสกัดที่เจือจาง 2 เท่า (5) สารสกัดที่เจือจาง 4 เท่า (6) สารสกัดที่เจือจาง 8 เท่า และ (7) DMSO

ตารางที่ 14ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชที่ระดับการเจือจางต่างๆ ต่อการเจริญของแบคทีเรีย

พืชและระดับการเจือจางของสารสกัด	ขนาดของบริเวณยับยั้งการเจริญ (มม.±SE) ของแบคทีเรีย ^a		
	<i>B. thuringiensis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
♀ <i>Piper betle</i>			
ไม่เจือจาง	2.00 ± 0.00 ^A	2.67 ± 0.58 ^A	0.00
เจือจาง 2 เท่า	2.17 ± 0.29	2.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	0.00
เจือจาง 8 เท่า	0.00	0.00	0.00
♂ <i>P. betle</i>			
ไม่เจือจาง	2.50 ± 0.50 ^A	3.67 ± 0.58 ^{ABD}	0.00
เจือจาง 2 เท่า	2.33 ± 0.29	3.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	0.00
<i>P. betloides</i>			
ไม่เจือจาง	2.67 ± 0.58 ^{AB}	4.33 ± 0.58 ^{BCDE}	5.83 ± 0.76 ^A
เจือจาง 2 เท่า	2.17 ± 0.29	3.33 ± 0.29	3.83 ± 0.76
เจือจาง 4 เท่า	2.17 ± 0.29	2.50 ± 0.87	3.67 ± 1.53
เจือจาง 8 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	2.67 ± 1.15
<i>P. crocatum</i>			
ไม่เจือจาง	3.75 ± 0.35 ^{BC}	4.50 ± 0.87 ^{BCE}	0.00
เจือจาง 2 เท่า	3.33 ± 0.58	3.17 ± 1.04	0.00
เจือจาง 4 เท่า	3.33 ± 0.29	2.67 ± 0.58	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.83 ± 0.76	0.00	0.00
<i>P. maculaphyllum</i>			
ไม่เจือจาง	2.33 ± 0.29 ^A	3.33 ± 1.15 ^{AB}	6.00 ± 1.00 ^A
เจือจาง 2 เท่า	2.50 ± 0.00	3.00 ± 0.00	5.67 ± 0.58
เจือจาง 4 เท่า	2.50 ± 0.50	0.00	6.33 ± 1.15
เจือจาง 8 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	5.67 ± 0.58

^aหมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกัน มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 14ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชที่ระดับการเจือจางต่างๆ ต่อการเจริญของแบคทีเรีย (ต่อ)

พืชและระดับการเจือจางของสารสกัด	ขนาดของบริเวณยับยั้งการเจริญ (มม.±SE) ของแบคทีเรีย ^a		
	<i>B. thuringiensis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
♀ <i>P. rubroglandulosum</i>			
ไม่เจือจาง	3.50 ± 0.87 ^{BCD}	5.17 ± 0.29 ^C	0.00
เจือจาง 2 เท่า	3.17 ± 0.58	4.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	3.17 ± 0.76	3.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.67 ± 1.15	0.00	0.00
♂ <i>P. rubroglandulosum</i>			
ไม่เจือจาง	2.67 ± 0.58 ^{ACD}	5.00 ± 0.00 ^{CD}	0.00
เจือจาง 2 เท่า	2.33 ± 0.58	4.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.83 ± 1.04	3.17 ± 0.29	0.00
เจือจาง 8 เท่า	3.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	0.00
<i>P. semiimmersum</i>			
ไม่เจือจาง	2.17 ± 0.29 ^A	3.67 ± 1.53 ^{ABD}	0.00
เจือจาง 2 เท่า	2.33 ± 0.58	4.33 ± 2.31	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	0.00
<i>P. submultinerve</i>			
ไม่เจือจาง	2.00 ± 0.00 ^A	0.00	0.00
เจือจาง 2 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.33 ± 0.58	0.00	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.33 ± 0.58	0.00	0.00
<i>P. yinkiangense</i>			
ไม่เจือจาง	3.67 ± 0.76 ^C	5.17 ± 0.29 ^{CE}	0.00
เจือจาง 2 เท่า	3.00 ± 0.50	4.00 ± 0.00	0.00
เจือจาง 4 เท่า	2.33 ± 0.58	2.67 ± 0.58	0.00
เจือจาง 8 เท่า	2.00 ± 0.00	0.00	0.00

^aหมายเหตุ ขนาดของบริเวณยับยั้งที่กำกับด้วยอักษรภาษาอังกฤษแตกต่างกัน มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.5 ปริมาณและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

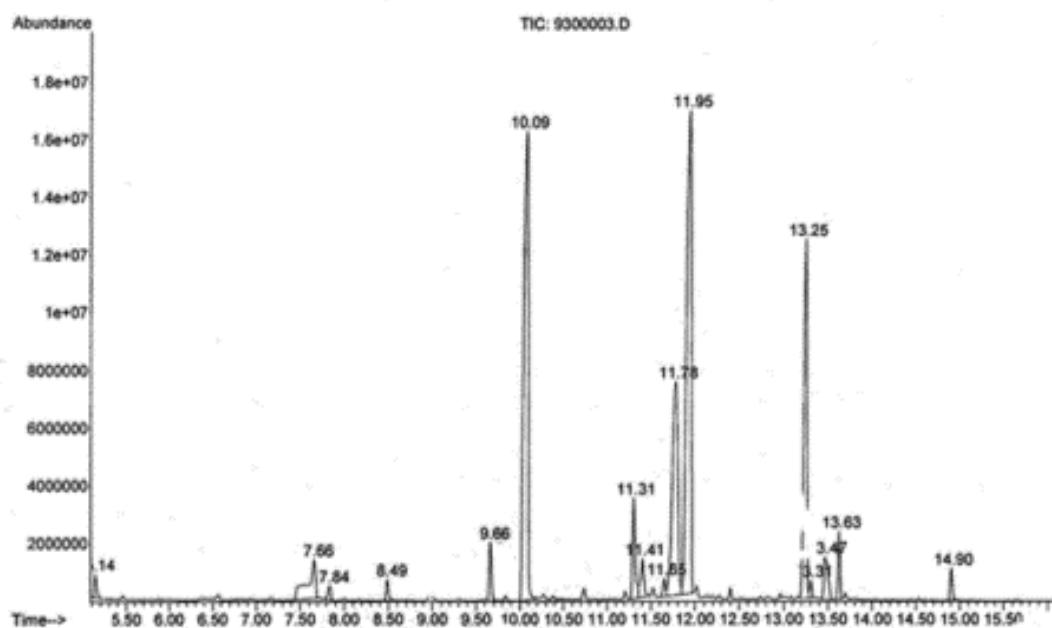
ได้กลั่นน้ำมันหอมจากพลูและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลูโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ ได้สัดส่วนของน้ำมันหอมระเหยเทียบกับน้ำหนักใบสดจากพืชแต่ละชนิดดังตารางที่ 15 พบว่าพลูให้น้ำมันหอมมากที่สุด คือ 2.73 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ชนิดที่ให้น้ำมันหอมน้อยที่สุดคือพลูลงยา *P. crocatum* ซึ่งได้เพียง 0.03 มิลลิลิตร/กิโลกรัม โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยของพืชแต่ละชนิดดังรูปที่ 27-35 เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีระหว่างพืชแต่ละชนิดดังตารางที่ 16 ปริมาณสารองค์ประกอบที่พบในสัดส่วนมากกว่า 10% ได้แก่ พบ L-linalool 13.629-26.590% ใน *P. betloides* และ *P. crocatum* พบ β -terpineol, α -terpineol, 4-terpineol, และ isomers ของ terpineol 10.111-46.560% ใน *P. betloides*, *P. crocatum* และ *P. tricolor* พบ eugenol/isoegenol 49.942-53.559% ใน *P. tricolor* และ *P. betle* พบ eugenol acetate/isoegenol acetate 29.739% ใน *P. betle* พบ β -elemene 14.384% ใน *P. submultinerve* พบ isomers ของ caryophyllene 11.505-39.422% ใน *P. maculaphyllum*, *P. submultinerve* และ *P. yinkiangense* พบ β -selinene และ α -selinene 10.319-36.62% ใน *P. betloides*, *P. yinkiangense*, และ *P. submultinerve* พบ germacrene D 12.528-36.317% ใน *P. maculaphyllum* และ *P. submultinerve* พบ bicyclogermacrene 14.482% ใน *P. tricolor* พบ butylated hydroxytoluene 13.521-29.474% ใน *P. crocatum*, *P. betloides*, *P. maculaphyllum* และ *P. semiimsum* พบ 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene 13.559-60.089% ใน *P. betle*, *P. yinkiangense*, *P. submultinerve*, *P. tricolor*, *P. rubroglandulosum* และ *P. semiimsum*

เมื่อทราบว่าองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยมีสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และต้านการอักเสบจึงได้ทดลองนำน้ำมันหอมระเหยมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ 3 อย่าง ได้แก่ สบู่ก้อน สบู่เหลว และสเปรย์ระงับกลิ่น (รูปที่ 36) และนำผลิตภัณฑ์เหล่านี้ไปทดสอบในอาสาสมัครจำนวน 60 คน พบว่าสบู่ก้อนและสบู่เหลวช่วยลดอาการอักเสบของผิวหนังโดยเฉพาะสิวที่ใบหน้าและช่วยลดอาการคันได้อย่างมีนัยสำคัญ สเปรย์ระงับกลิ่นมีคุณสมบัติในการลดหรือกำจัดกลิ่นเท้าได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน

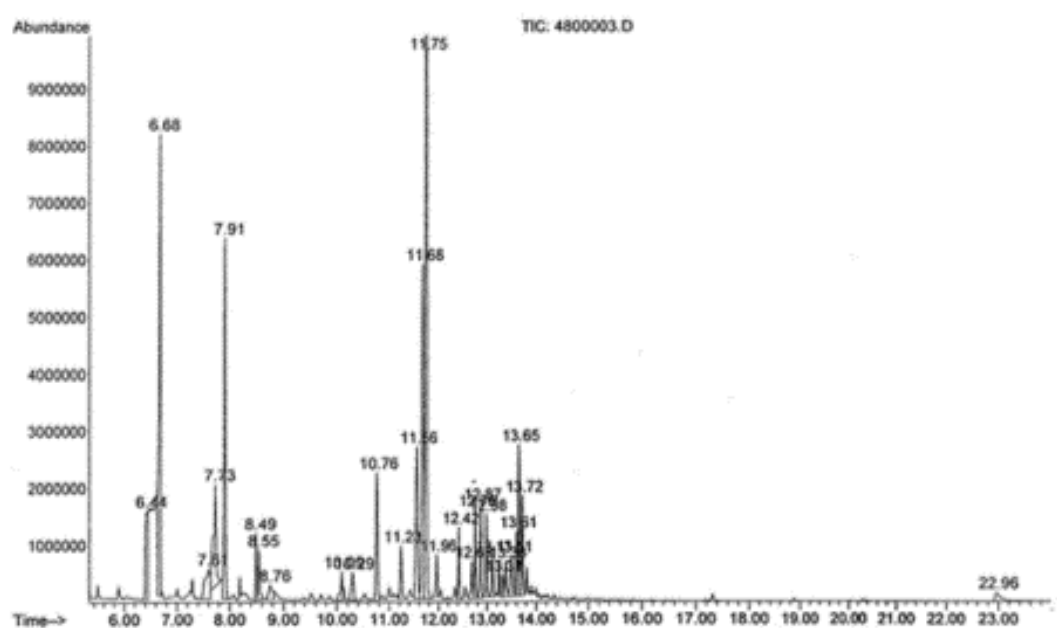
ตารางที่ 15 สัดส่วนของน้ำมันหอมระเหยเทียบกับน้ำหนักใบสดจากพืชแต่ละชนิด

พืชที่ใช้กลิ่น	เดือน/ปี/ฤดูกาล* ที่กลิ่น	น้ำหนักสด (กิโลกรัม)	ปริมาณน้ำมัน หอม (มิลลิลิตร)	สัดส่วนน้ำมัน หอม (มิลลิลิตร/ กิโลกรัม)
<i>Piper betle</i> 1	11/2012/D	1.00	1.840	1.84
	7/2013/R	0.92	0.770	0.84
	7/2013/R	1.00	0.790	0.79
	7/2013/R	0.94	1.050	1.12
	8/2013/R	1.00	2.150	2.15
	8/2013/R	1.00	2.730	2.73
<i>P. betle</i> 2	11/2012/D	1.00	0.950	0.95
<i>P. betloides</i>	2/2014/D	0.82	0.078	0.10
<i>P. crocatum</i>	2/2014/D	0.66	0.020	0.03
<i>P. maculaphyllum</i>	5/8/2013/R	0.50	0.025	0.05
<i>P. rubroglandulosum</i> 1	4/2014/D	0.47	0.220	0.47
<i>P. rubroglandulosum</i> 2	1/4/2014	0.33	0.240	0.72
<i>P. semiimersum</i>	8/2013/R	0.60	0.080	0.13
<i>P. submultinerve</i> 1	2/2014/D	1.00	0.115	0.12
<i>P. submultinerve</i> 2	2/2014/D	0.76	0.302	0.40
<i>P. submultinerve</i> 3	2/2014/D	0.36	0.010	0.03
<i>P. submultinerve</i> 4	2/2014/D	0.94	0.032	0.03
<i>P. tricolor</i> 1	11/2013/D	0.78	0.590	0.76
<i>P. tricolor</i> 2	2/2014/D	0.98	0.030	0.03
<i>P. yinkiangense</i>	4/2014/D	0.65	0.40	0.62

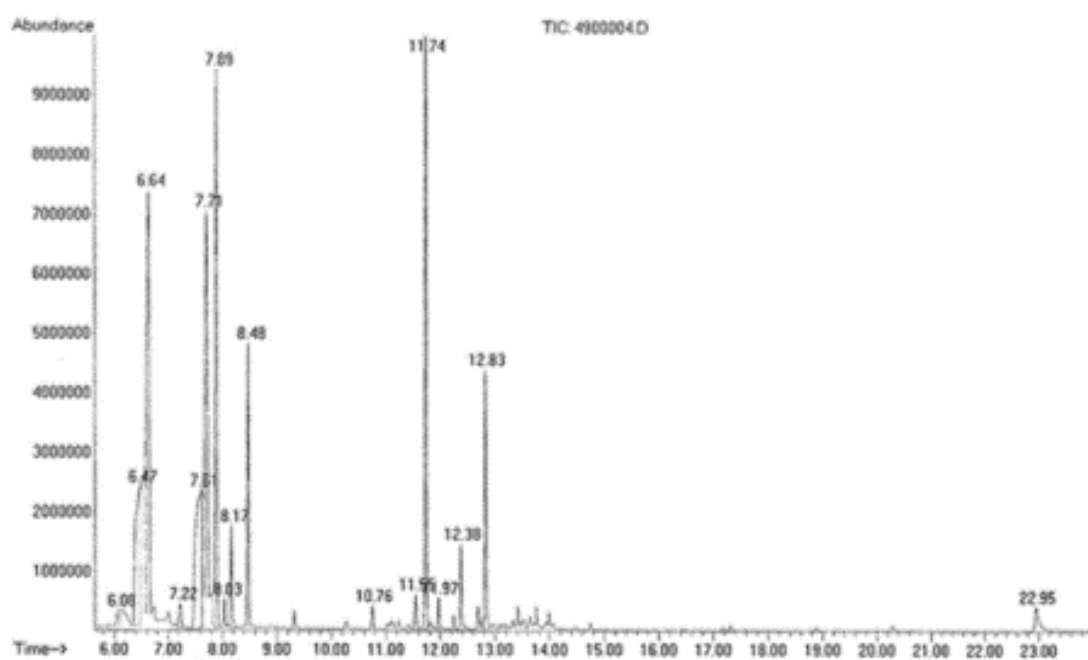
*D = ฤดูแล้ง, R = ฤดูฝน



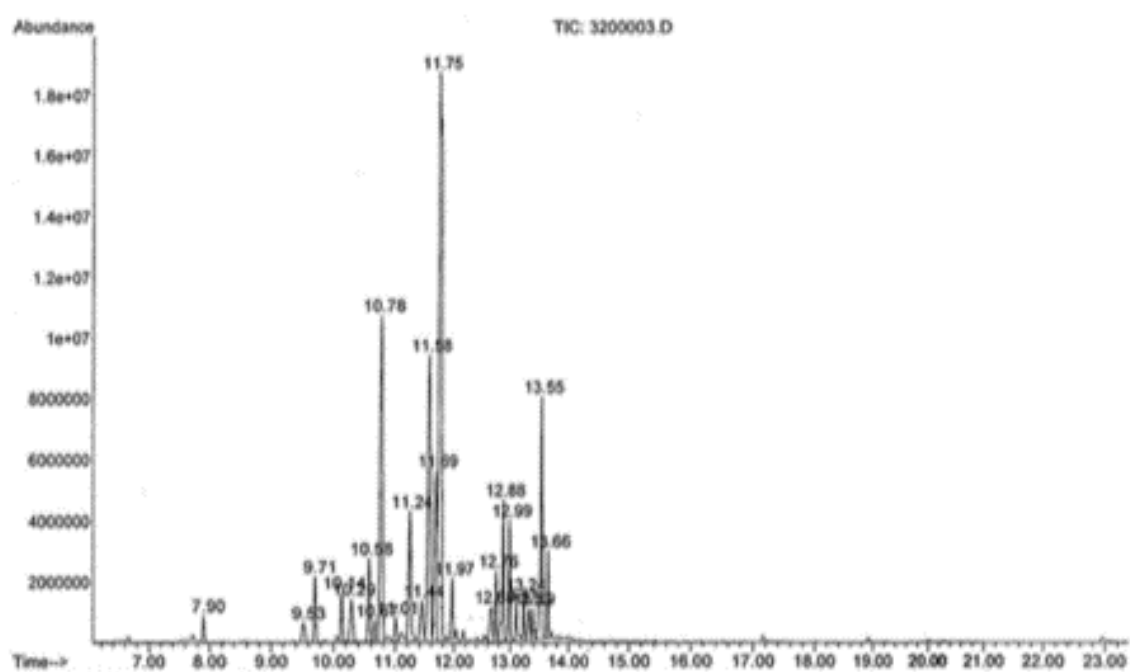
รูปที่ 27 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper betle*



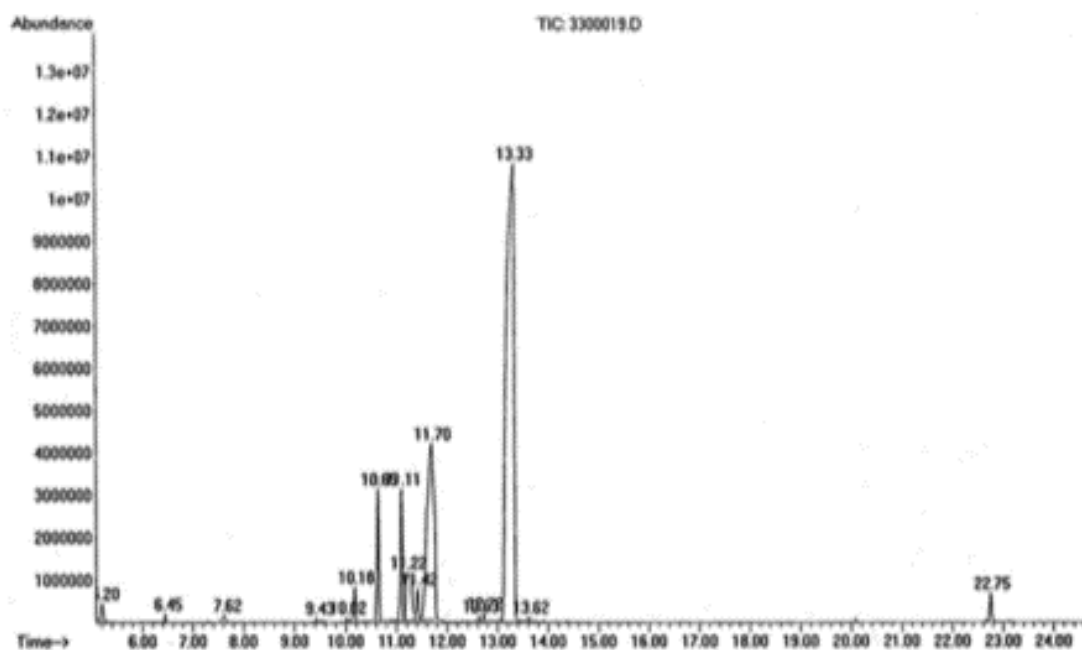
รูปที่ 28 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper betloides*



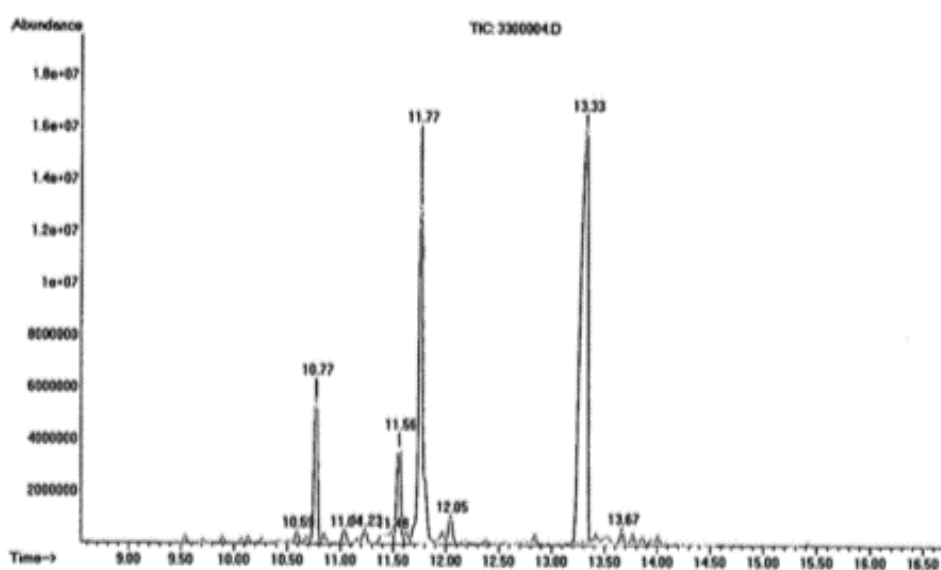
รูปที่ 29 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper crocatum*



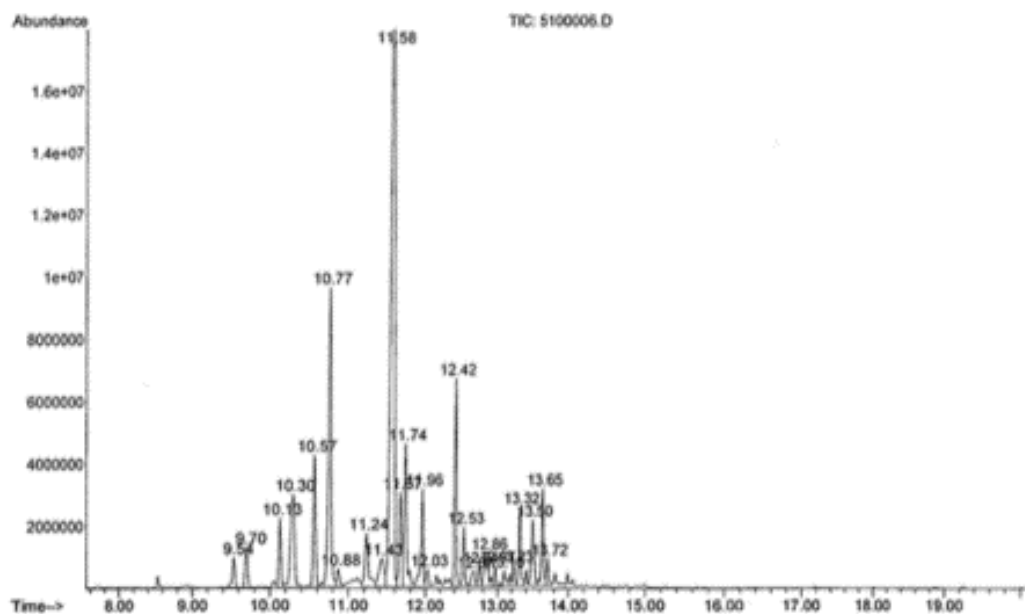
รูปที่ 30 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper maculaphyllum*



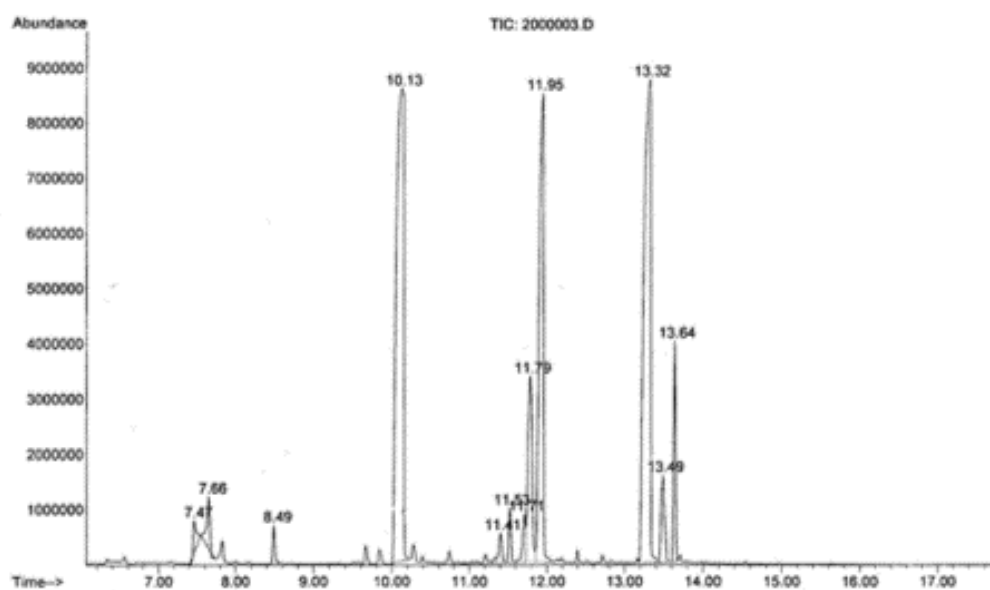
รูปที่ 31 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper rubroglandulosum*



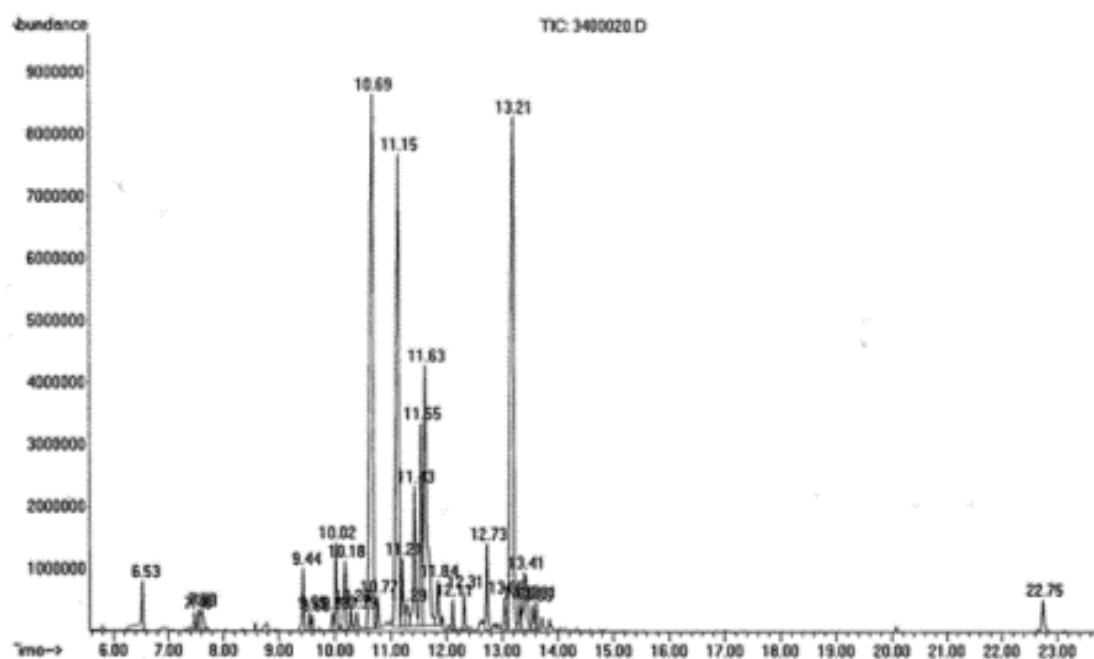
รูปที่ 32 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper semiimmersum*



รูปที่ 33 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper submultinerve*



รูปที่ 34 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper tricolor*



รูปที่ 35 โครมาโทแกรมแสดงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจาก *Piper yinkiangense*

ตารางที่ 16 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากพุ่มและพืชสกุลพริกไทยที่มีกลิ่นเหมือนพลู

Relative content (%)									
Compound	Retention time	Formula	Molecular weight						
Eucalyptol	5.143	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	0.654	-	-	-	-
trans-β-Ocimene; δ-3-Carene; α-Ocimene;									
cis-Ocimene; cis-β-Ocimene; γ-Terpinene;	5.195-5.477	C ₁₀ H ₁₆	136	-	-	-	-	0.597	0.688
Tricyclene; α-Pinene									
trans-Sabinene hydrate	6.072	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	-	0.717	-	-	-
β-Terpineol	7.243-7.710	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	-	25.025	-	-	0.701
L-Linalool	6.406-6.683	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	-	13.629	0.160	-	1.594
α-Terpineol	7.462-7.912	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	0.494	10.111	-	-	-
Linalyl propionate		C ₁₃ H ₂₂ O ₂	210	-	-	14.218	0.636	-	2.243
Borneol	7.479	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	-	-	-	-	0.240
4-Terpineol	7.554-7.733	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	-	4.705	-	-	0.381
n-Decanal	7.612	C ₁₀ H ₂₀ O	156	-	-	-	-	-	1.208
2-Cyclohexen-1-ol,									
1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans-	7.658	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	3.762	-	-	-	-
cis-Piperitol	8.056	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	-	-	-	-	0.508
Geraniol	8.166-8.950	C ₁₀ H ₁₈ O	154	-	-	1.204	7.777	-	-
Chavicol	8.489-8.546	C ₉ H ₁₀ O	134	0.716	0.617	1.110	-	4.035	-
δ-Elemene; α-Terpinene; δ-2-Carene;	9.429-9.539	C ₁₅ H ₂₄	204	-	-	-	0.149	-	1.337
δ-4-Carene									
Chavicol acetate	9.550-9.677	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	176	6.843	1.637	-	-	-	0.293

[illegible]

ตารางที่ 16 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำหอมระเหยจากพืชรากไม้ในประเทศไทยที่มีกลิ่นเหมือนพญา

				Relative content (%)															
Compound	Retention time	Formula	Molecular weight																
γ-Cadinene; α-Cadinene; α-Morphine; α-Amorphene; 4,5-Dimethyl-11-Methylenetricyclo[7.2.1.0(4.9)]dodecane	11.408-11.422	C ₁₅ H ₂₄	204	2.652	1.633	-	-	1.858	-	-	-	-	-	-	-	-	5.822	0.761	-
α-Selinene	11.414-11.627	C ₁₅ H ₂₄	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.180	-	-	0.820	10.749
β-Selinene	11.269-11.673	C ₁₅ H ₂₄	204	-	-	10.319	-	-	-	-	-	-	-	3.281	36.62	2.429	7.540	-	-
(+)-Ledene	11.677	C ₁₅ H ₂₄	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Butylated hydroxytoluene	11.713-11.765	C ₁₅ H ₂₄ O	220	-	-	23.912	13.521	27.542	-	-	29.474	-	-	9.743	7.849	7.060	1.169	-	-
Bicyclogermacrene	11.714-11.737	C ₁₅ H ₂₄	204	2.748	-	-	-	-	-	-	-	-	5.742	-	-	-	-	14.482	-
1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene		C ₁₀ H ₁₆	136																
δ-Cadinene	11.840-13.323	C ₁₅ H ₂₄	204	-	-	1.078	-	1.043	-	-	-	-	3.456	1.145	0.975	-	-	-	1.133
δ-Amorphene	11.956	C ₁₅ H ₂₄	204	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.918	-
Isoeugenol acetate; Eugenol acetate	11.973	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	206	29.739	-	-	-	1.833	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Calamenene	12.031	C ₁₅ H ₂₂	202	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.608	-	-	-	-	-	-
α-Clonene		C ₁₃ H ₁₈	174																

[illegible]



รูปที่ 36 ผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำมันหอมระเหยเป็นส่วนผสม ได้แก่ สบู่ก้อน (ก) และสบู่เหลว (ข) ลดอาการคันและการอักเสบของผิวหนัง และสเปรย์ (ค) ระงับกลิ่นเท้า

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

พืชสกุลพริกไทยมีรายงานพบในประเทศไทยถึง 43 ชนิด แม้ส่วนใหญ่จะเป็นพืชป่า แต่ได้มีการนำหลายชนิดมาใช้ประโยชน์ทางด้านต่าง ๆ เช่น เป็นเครื่องเทศ เป็นยาสมุนไพร และใช้ผสมในยาฆ่าแมลง (Chaveerach et al., 2006a, 2008; Scott et al., 2008; Fan et al., 2011) พืช *Piper betle* เป็นชนิดที่นิยมปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารสำคัญหลายชนิด ได้แก่ คาวิคอล ซินีออล และยูจีนอล (Chaveerach et al., 2006a; Yusoff et al., 2005; Misra et al., 2009)

4.1 การใช้ประโยชน์พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย

พืชสกุลพริกไทยที่รู้จักกันดีทั่วทุกภูมิภาคและมีการนำมาใช้ประโยชน์ ได้แก่ พืช พริกไทย *P. nigrum* พืช *P. sarmentosum* ติปส์ *P. retrofractum* พริกหาง *P. longum* และพืชมะนาว *P. rubroglandulosum* โดยมีสรรพคุณทางสมุนไพรหลายประการ เช่น แก้ปวดฟัน แก้ปวดท้อง แก้ลมพิษ ขับลม ขับเสมหะ บำรุงธาตุ บำรุงหัวใจ และบำรุงโลหิต พืชเป็นชนิดที่ปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจมากที่สุด แต่มีปัญหาในการปลูกเช่น โรคใบเน่าและโรคใบจุด ดังนั้นการหาพืชทดแทนหรือชนิดที่สามารถนำมาปลูกเสริมได้จะเป็นการวางแผนการจัดการทรัพยากรที่ยั่งยืน ดังนั้นจึงเริ่มจากประเมินชนิดที่มีกลิ่นเหมือนพริกไทยซึ่งมีแนวโน้มว่าจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน

4.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA Barcoding)

เนื่องจากการนำพืชมาใช้ประโยชน์ทั้งโดยการใช้ชิ้นส่วนพืชหรือนำมาแปรรูปโดยบดเป็นผง ดังนั้นจึงควรมีการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดไว้เพื่อใช้ระบุชนิดพืช

ในประเทศไทยได้มีการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดพืชดอกหลายกลุ่ม ได้แก่ บริเวณ *trnH-psbA* spacer ใช้ได้ผลดีในพืชสกุล *Senna* (Monkheang et al., 2011) *Cissus* และ *Smilax* (Kritpetcharat et al., 2011) บริเวณ *rbcL* gene ใช้ในพืชกาฝาก ได้แก่ สกุล *Scurrula*, *Dendrophthoe*, *Helixanthera*, *Macrosolen* และ *Viscum* (Kwanda et al., 2013) ส่วน *matK* ใช้ได้ในพืชสกุล *Piper* บางชนิด (Sudmoon et al., 2012) งานวิจัยนี้ได้เก็บตัวอย่างพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทยทั้งสิ้น 36 ชนิด สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดจากบริเวณ *matK* gene, *psbA-trnH* spacer และ *rbcL* gene บันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายเหล่านี้ไว้ในฐานข้อมูล

GenBank ทั้งสิ้น 190 accessions พบว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณ *matK* gene ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเหมาะสมต่อการนำมาใช้ระบุชนิด คือมีค่าเป็นไปตามหลักการของ Prof. Dr. Paul D.N. Hebert (Hebert et al., 2003) ว่า ค่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดจะค่อนข้างสูงแต่ภายในชนิดเดียวกันจะมีความผันแปรต่ำ แต่ในพลูซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดสูงที่สุด ถึง 0.386 สอดคล้องกับความหลากหลายทางสายพันธุ์ที่มีในชนิดนี้ ซึ่งอาจเป็นผลจากการกระทำของมนุษย์คือนำมาปลูกในสภาวะที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงที่สุด ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมจากบริเวณ *matK* gene นี้ใช้ระบุชนิดได้เกือบทุกชนิด มีเพียง 8 คู่ เท่านั้นที่ให้ค่าเป็น 0 จึงไม่สามารถระบุชนิดได้โดยการใช้อนุกรมบริเวณนี้ โดยทั้ง 8 คู่นี้สามารถใช้อีกสองบริเวณระบุชนิดได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Newmaster et al. (2007) ที่เสนอให้ใช้สองบริเวณคือ *matK* gene และ *trnH-psbA* spacer ในการระบุชนิด

4.3 องค์ประกอบทางเคมีของพลูและพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลู

จากการประเมินด้วยการดมพบว่าพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลูมี 8 ชนิด ได้แก่ พลูดอยสุเทพ *P. betloides* พลูลงยา *P. crocatum* พลูลงยา *P. maculaphyllum* พลูป่า *P. rubroglandulosum* พลูชน *P. semiimmersum* พลูชมพู *P. submultinerve* พลูสามสี *P. tricolor* และพลูจีน *P. yinkiangense* จึงได้เก็บใบพลูและพืชเหล่านี้รวม 9 ชนิด มาสกัดสารเคมีโดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เฮกเซน (hexane) และวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) พบสารที่สำคัญในพืชที่มีกลิ่นเหมือนพลู ได้แก่ eugenol, isoeugenol, chavicol, caryophyllene, sabinene, phellandrene, β -phellandrene, β -cubebene, germacrene A, germacrene D และ sesquiterpenes ซึ่งสารสำคัญเหล่านี้พบในพลูด้วยแต่ในสัดส่วนที่แตกต่างกันไป

ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชทั้ง 9 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และรา *Aspergillus flavus* และ *Trichoderma harzianum* โดย แบคทีเรีย *P. aeruginosa* และ *S. aureus* ที่นำมาทดสอบนี้ เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้มาก ในประเทศเขตร้อน พบว่าชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญ ได้แก่ *P. rubroglandulosum* เพศผู้ *P. yinkiangense*, *P. betloides* และ *P. maculaphyllum* โดยสารสกัดที่ไม่เจือจางจาก *P. rubroglandulosum* และ *P. yinkiangense* มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. aeruginosa* ส่วนสารสกัดที่ไม่เจือจางจาก *P. betloides* และสารสกัดที่ทุกระดับการเจือจางจาก *P. maculaphyllum* มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ด้วยข้อมูลเหล่านี้พืชชนิดที่น่าสนใจว่าจะมีศักยภาพในการนำมาใช้ได้เช่นเดียวกับพลู ได้แก่ *P. rubroglandulosum* (♂), *P. yinkiangense*, *P. betloides* และ *P. maculaphyllum* โดยงานวิจัยนี้พบว่าพืชทั้งสี่ชนิดนี้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าพลู โดยชนิดที่น่าสนใจมากที่สุดคือ *P. maculaphyllum* เนื่องจากแม้

ความเข้มข้นต่ำๆก็มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของหลายโรคในมนุษย์

เมื่อกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 9 ชนิด โดยการกลั่นด้วยไอน้ำ เพื่อเทียบสัดส่วนของน้ำมันหอมระเหยเทียบกับน้ำหนักใบสดจากพืชแต่ละชนิด พบว่าพลูให้น้ำมันหอมมากที่สุด คือ 2.73 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ชนิดที่ให้น้ำมันหอมน้อยที่สุดคือพลูลงยา *P. crocatum* ซึ่งได้เพียง 0.03 มิลลิลิตร/กิโลกรัม องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของพืชเหล่านี้ที่พบสูงกว่า 10% ได้แก่ L-linalool, β -terpineol, α -terpineol, 4-terpineol, eugenol/isoegenol, eugenol acetate/isoegenol acetate, β -elemene, caryophyllene, β -selinene, α -selinene, germacrene D, bicyclogermacrene, butylated hydroxytoluene, 4-allyl-1,2-diacetoxybenzene สารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในครัวเรือน เช่น linalool ใช้แต่งกลิ่นน้ำหอม และผสมในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขอนามัยและผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ได้แก่ โลชั่น สบู่ แชมพู สารซักฟอก terpeneol มีกลิ่นหอมที่ทำให้รู้สึกผ่อนคลายคล้ายกับกลิ่นไลแลค จึงมักนำมาใช้ผสมในน้ำหอม เครื่องสำอางค์ และสารปรุงรสแต่งกลิ่นอาหาร (Kumar et al., 2010; Sanubol et al., 2014) น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ในปริมาณแตกต่างกันอาจเป็นผลจากสองปัจจัย คือ ประเภทของพืชเป็นพืชป่าหรือพืชปลูก และฤดูกาลฤดูฝนหรือฤดูแล้ง นั่นคือ พืชปลูกที่ปลูกเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม มีการบำรุงเป็นอย่างดีให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงกว่า และในฤดูฝนได้ปริมาณสูงกว่าฤดูแล้ง

แม้ว่าในพืชป่าทุกชนิดจะให้น้ำมันหอมระเหยในปริมาณต่ำกว่าพืชปลูกอย่างพลู แต่พบว่ามีอัตราส่วนขององค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญสูงกว่า หากพืชป่าเหล่านี้ได้รับการปลูกและบำรุงเป็นอย่างดีเช่นเดียวกับพลู อาจทำให้ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงเทียบเท่ากับพลู ซึ่งเป็นความน่าสนใจที่จะนำมาทดลองปลูกและหาสภาวะที่เหมาะสมหรือปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงขึ้นเพราะพืชป่ามีข้อได้เปรียบคือต้านทานต่อโรค เจริญเติบโตเร็ว แตกกิ่งและใบได้มาก อีกทั้งการมีพืชทางเลือกเป็นปัจจัยสำคัญในการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืน ในเบื้องต้นประชาชนสามารถใช้ประโยชน์จากพืชนี้ได้ทั้งการบริโภคในระดับท้องถิ่นหรือการปลูกเป็นจำนวนมากเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่อไปแทนการใช้ใบพลูเพียงอย่างเดียวในกรณีที่พลูเกิดโรคหรือขาดแคลนในบางฤดู

เอกสารอ้างอิง

- อรุณรัตน์ จวีราข. 2552. อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของพืช. โครงการผลิตตำราคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น, 172 หน้า.
- อรุณรัตน์ จวีราข, รุ่งลาวัลย์ สุดมูล, ธวัชชัย ธานี และ ปิยะ โมคมูล. 2552. พืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่นการพิมพ์, ขอนแก่น, 165 หน้า.
- Amusan, A.A.S. and Okorie, T.G. 2002. The use of *Piper guineense* fruit oil (PFO) as protectant of dried fish against *Dermestes maculatas* (Degeer) infestation. Global Journal of Pure and Applied Sciences 8(2): 197–201.
- Anuradha, V., Sreelatha, T., Srinivas, P.V., Tivari, A.K. and Rao, J.M. 2004. Isolation and synthesis of new bioactive molecules from *Piper longum*. Natural Product Research 18(3): 247–251.
- Banka, R.A. and Teo, S.P. 2000. *Piper betle*. In: van der Vossen, H.A.M., Wessel, M. (eds.) PROSEA 16 stimulant plants. Backhuys, Leiden, pp. 135-140.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America 106(31): 12794–12797.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Van Den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.G., Kelly, L. and Wilkinson, M. 2007. A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. Taxon 56(2): 295–299.
- Chaveerach, A., Kunitake, H., Nuchadomrong, S., Sattayasai, N. and Komatsu, H. 2002. RAPD patterns as a useful tool to differentiate Thai *Piper* from morphologically alike Japanese *Piper*. Science Asia 28(3): 197–201.
- Chaveerach, A., Mookamul, P., Sudmoon, R. and Tanee, T. 2006a. Ethnobotany of the genus *Piper* (Piperaceae) in Thailand. Ethnobotany Research and Applications 4: 223–231.
- Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T. and Mookamul, P. 2006b. Three new species of Piperaceae from Thailand. Acta Phytotaxonomica Sinica 44(4): 447–453.
- Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T. and Mookamul, P. 2008. The species diversity of the genus *Piper* from Thailand. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 59(2): 105–163.
- Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T. and Mookamul, P. 2010. Notes on *Piper rubroglandulosum* (Piperaceae) in Thailand. Acta Phytotaxonomica et Geobotanica 60(3): 175–177.

- Chaveerach, A., Tanomtong, A., Sudmoon, R., Tanee, T. and Morkkamul, P. 2007. A new species and two new varieties of *Piper* (Piperaceae) from Thailand. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 58(1): 33–38.
- Dicto, J. and Manjula, S. 2005. Identification of elicitor-induced PR5 gene homologue in *Piper colubrinum* Link by suppression subtractive hybridization. *Current Sciences* 88(25): 624–627.
- Dyer, L.A., Richards, J. and Dodson, C.D. 2004. Isolation, synthesis, and evolutionary ecology of *Piper* amides. In: Dyer, L.A. and Palmer, A.N. (eds.). *Piper: A Model Genus for Studies of Evolution, Chemical Ecology, and Trophic Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 117–139.
- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and Infection* 6: 509–515.
- Fan, L.S., Muhamad, R., Omar, D. and Rahmani, M. 2011. Insecticidal properties of *Piper nigrum* fruit extracts and essential oils against *Spodoptera litura*. *International Journal of Agriculture and Biology* 13: 517–522.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and De Waard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270(1512): 313–321.
- Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. and Little, D.P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE* 6(5): e19254.
- Huang, R.L., Chen, C.F., Feng, H.Y. and Lin, L.C. 2001. Anti-hepatitis B virus of seven compounds isolated from *Piper kadsura* (Choisy) Ohwi. *Journal of Chinese Medicine* 12(3): 179–190.
- Kritpetcharat, O., Kritpetcharat, P., Daduang, J., Daduang, S., Suwanrungruang, K., Khemtonglang, N., Bletter, N., Sudmoon, R. and Chaveerach, A. 2011. Using DNA markers and barcoding to solve the common problem of identifying dried medicinal plants with the examples of *Smilax* and *Cissus* in Thailand. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(15): 3480–3487.
- Kumar, N., Mirsa, P., Dube, A., Bhattacharya, S., Dikshit, M. and Ranade, S. 2010. *Piper betle* Linn. a maligned pan-Asiatic plant with an array of pharmacological activities and prospects for drug discovery. *Current Sciences* 99: 923–932.

- Kwanda, N., Noikotr, K., Sudmoon, R., Tanee, T. and Chaveerach, A. 2013. Medicinal parasitic plants on diverse hosts with their usages and barcodes. *Journal of Natural Medicines* 67(3): 438–445.
- Luger, P., Weber, M., Dung, N.X., Luu, V.T., Rang, D.D., Tuong, D.T. and Ngoc, P.H. 2002. The crystal structure of 3-(4'-methoxyphenyl) propanonoyl pyrrole of *Piper lolot* C.DC. from Vietnam. *Crystal Research Technology* 37(6): 627–633.
- Luz, A.I.R., Zoghbi, M.G.B. and Maia, J.G.S. 2003. The essential oils of *Piper reticulatum* L. and *P. crassinervium* H.B.K. *Acta Amazonica* 33(2): 341–344.
- Misra, P., Kumar, A., Khare, P., Gupta, S., Kumar, N. and Dube, A. 2009. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. *Journal of Medical Microbiology* 58: 1058–1066.
- Monkheang, P., Sudmoon, R., Tanee, T., Noikotr, K., Bletter, N. and Chaveerach, A. 2011. Species diversity, usages, molecular markers and barcode of medicinal *Senna* species (Fabaceae, Caesalpinioideae) in Thailand. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(26): 6173–6181.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Steeves, R.A.D. and Janovec, J. 2007. Testing candidates plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources* 8: 480–490.
- Porebski, S., Bailey, L.G. and Baum, B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 8–15.
- Rocha, S.F.R. and Ming, L. 1999. *Piper hispidinervium*: a sustainable source of safrole. In: Janick, J. (ed.). *Perspective on New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, pp. 479–481.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Coldspring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuel, M.R.A., Gurusinghe, P.A., Alles, W.S. and Kronole, S.T.W. 2002. Genetic diversity and crop improvement in pepper (*Piper nigrum*). *Acta Horticulturae* (ISHS) 188: 117–124.
- Sanubol, A., Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tanee, T., Noikotr, K. and Chuachan, C. 2014. Betel-like-scented *Piper* plants as diverse sources of industrial and medicinal aromatic chemicals. *Chiang Mai Journal of Science* 41(5.1): 1171–1181.
- Scott, I.M., Arnason, J.T. and Philogne, B.J.R. 2002. The efficacy of *Piper nigrum* (Piperaceae) extracts: botanical alternatives for urban pest insect control. Do688. The 2002 ESA Annual Meeting and Exhibition, Fort Lauderdale, Florida, 14-20 November 2002.

- Scott, I.M., Gagnon, N., Lesage, L., Philogene, B.J.R. and Arnason, J.T. 2005. Efficacy of botanical insecticides from *Piper* species (Piperaceae) extracts for control of European chafer (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Economic Entomology* 98(3): 845–855.
- Scott, I.M., Jensen, H., Nicol, R., Lesage, L., Bradbury, R., Sánchez-Vindas, P., Poveda, L., Arnason, J.T. and Philogène, B., Jr. 2004. Efficacy of *Piper* (Piperaceae) extracts for control of common home and garden insect pests. *Journal of Economic Entomology* 97(4): 1390–1403.
- Scott, I.M., Jensen, H.R., Philogène, B.J.R. and Arnason, J.T. 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochemistry Reviews* 7: 65–75.
- Silayoi, I., Krengpiem, P. and Disthabanchong, A. 1985. Effectiveness of systemic fungicides for control of *Phytophthora parasitica* NK1 in foot rot of *Piper betle*. *Thai Agricultural Research Journal* 3: 104–107.
- Srivastava, S., Gupta, M.M., Prajapati, V., Tripathi, A.K. and Kumer, S. 2001. Insecticidal activity of myristicin from *Piper mullesua*. *Pharmaceutical Biology* 39(3): 226–229.
- Sudmoon, R., Tanee, T. and Chaveerach, A. 2011. *Piper protrusum* (Piperaceae), a new species from southern Thailand based on morphological and molecular evidence. *Journal of Systematics and Evolution* 49(5): 468–475.
- Sudmoon, R., Tanee, T., Wongpanich, V., Bletter, N. and Chaveerach, A. 2012. Ethnobotany and species specific molecular markers of some medicinal *sakhan* (*Piper*, Piperaceae). *Journal of Medicinal Plants Research* 6(7): 1168–1175.
- Suppakul, P., Sanla-ead, N. and Phoopuritham, P. 2006. Antimicrobial and antioxidant activities of betel oil. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 40: 91–100.
- Yusoff, Z., Mahmud, Z., Saleh, S.H. and Mohd, E.Y. 2005. Study on the chemical constituents of *Piper betle* L. in relation to their possible insect attractant property. *Malaysian Journal of Science* 24: 143–147.