

การตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาเร่งน้อย (*Amomum uliginosum* K.D.Koenig)

โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS1 ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ

ประสพอร รินทอง¹, วชิรินทร์ พากฎพัทธ์², ปิณฑนา เลิศสถิตธนกร³ และวนิดา ไทรชมภู⁴

Received: 20 December 2013

Accepted: 21 January 2014

บทคัดย่อ

บทนำ: เร่งน้อยเป็นเครื่องยาที่ได้จากส่วนผลของพืชชนิด *Amomum uliginosum* K.D.Koenig (Zingiberaceae) มีสรรพคุณขับลม บรรเทาอาการคลื่นไส้ อาเจียน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาเร่งน้อยโดยอาศัยการเปรียบเทียบเครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง internal transcribed spacer1 (ITS1) ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ ซึ่ง ITS1 เป็นช่วงดีเอ็นเอที่มีความยาวไม่มากและข้อมูลพันธุกรรมมีความผันแปรสูง จึงนิยมใช้ในการตรวจเอกลักษณ์เครื่องยา **วิธีดำเนินการวิจัย:** เครื่องยาเร่งน้อยที่ใช้ในการศึกษาแบ่งเป็นตัวอย่างอ้างอิง 4 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ได้จากร้านขายยาแผนโบราณ 11 ตัวอย่าง ศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS1 ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีน้ำมันเร่งน้อยด้วยเครื่อง Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GC-MS) **ผลการวิจัย:** เครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS1 ของเครื่องยาเร่งน้อยทุกตัวอย่างมีความยาวเท่ากับ 180 คู่เบสและมีส่วนประกอบ G+C คิดเป็นร้อยละ 57.22-60.56 ผลการตรวจเอกลักษณ์พบว่าเครื่องยาจากร้านขายยาแผนโบราณจำนวน 7 ตัวอย่างมีเครื่องหมายดีเอ็นเอตรงกับ *A. uliginosum* และน้ำมันที่สกัดได้มีสาร bornyl acetate, camphor และ nerolidol เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนเครื่องยาจากร้านขายยาแผนโบราณที่เหลือจำนวน 4 ตัวอย่างเป็นเครื่องยาปลอมปนและในน้ำมันมีสาร nerolidol เป็นองค์ประกอบหลัก **สรุปผลการวิจัย:** ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันของเครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS1 แสดงถึงชนิดพืชซึ่งเป็นแหล่งที่มาของเครื่องยาที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์เครื่องยาเร่งน้อยได้ และสามารถประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่งดังกล่าวเพื่อตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาหรือสมุนไพรชนิดอื่นต่อไป

คำสำคัญ: เร่งน้อย, *Amomum uliginosum* Internal transcribed spacer1 เครื่องหมายดีเอ็นเอ

วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน 2557; 10(1): 32-41

¹ วท.ด. อาจารย์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

² ภ.บ. อาจารย์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยเภสัชกรรมคลินิก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

³ Ph.D. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

⁴ Ph.D. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ หน่วยวิจัยเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

* ติดต่อผู้พิมพ์: ดร.ประสพอร รินทอง คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต.ขามเรียง อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

โทรศัพท์/โทรสาร +66 4375 4360 Email: prasobom@gmail.com

Identification of Reo noi (*Amomum uliginosum* K.D.Koenig) Crude Drug using ITS1 DNA Marker of Nuclear DNA

Prasob-orn Rinthong^{1*}, Watcharin Paktipat², Pilanthana Lertsatitthanakorn³, Wanida Caichompoo⁴

Abstract

Introduction: Reo noi is a crude drug derived from the ripe fruit of *Amomum uliginosum* K.D.Koenig (Zingiberaceae). It is generally used for carminative, antinausea and antivomiting purposes. This study aimed to identify Reo noi crude drugs by using the internal transcribed spacer1 (ITS1) DNA Marker of nuclear DNA. This DNA region is small size and highly genetic variation. It has been widely used for crude drug identification. **Methods:** Four authentic and 11 commercial crude drug samples were examined. The ITS1 DNA markers were performed by using polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing techniques. The obtained volatile oils were also analyzed for the chemical components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GC-MS). **Results:** The ITS1 DNA markers of all samples were 180 bp in lengths and G+C contents were 57.22-60.56%. Seven commercial samples showed their DNA markers identical to *A. uliginosum*. Major constituents of their volatile oils were bornyl acetate, camphor and nerolidol. The remained commercial samples were adulterants which nerolidol was a major compound of their volatile oils. **Conclusion:** The nucleotide sequence variation of ITS1 DNA marker indicated botanical origin of Reo noi crude drugs. As results, the ITS1 DNA marker was successfully used as a tool for identifying Reo noi crude drugs. This DNA marker can be used to identify another crude drugs and medicinal plants.

Keywords: Reo noi, *Amomum uliginosum*, Internal transcribed spacer 1, DNA marker

IJPS 2014; 10(1): 32-41

¹ Ph.D., Lecturer, Pharmaceutical Chemistry and Natural product Research Unit, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Thailand

² Ph.D., Lecturer, Clinical Pharmacy Research Unit, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Thailand

³ Ph.D., Assistant Professor, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Thailand

⁴ Ph.D., Assistant Professor, Pharmaceutical Chemistry and Natural Product Research Unit, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Thailand

*Corresponding author: Prasob-orn Rinthong, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Khamriang Sub-district, Kantharawichai, Maha Sarakham 44150 Tel./Fax. +66 4375 4360 Email: prasoborn@gmail.com

บทนำ

ว่านน้อยหรือ *Amomum uliginosum* K. D. Koenig จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นพืชที่มีลำต้นเทียมซึ่งเกิดจากกาบใบที่อัดกันแน่น ใบเป็นใบเดี่ยว รูปรีกว้างคล้ายหอกและปลายใบแหลม ใบออกแบบสลับ ช่อ

ดอกแทงตรงจากเหง้า มีดอกย่อยสีขาว เหง้าและไหลสีขาวอมเหลือง (Holttum, 1950) ผลของว่านน้อยลักษณะทรงกลมและมีขนคล้ายผลเงาะ เมื่อผลสุกเปลือกผลจะมีสีแดงและเมล็ดสีน้ำตาล ว่านน้อยเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิประเทศที่เป็นป่าดงดิบ ป่าดิบแล้ง ป่าละเมาะ

และบริเวณรุ่มไร่ที่มีความชื้นพอเหมาะ พบการกระจายพันธุ์ในเขตประเทศไทย ลาว กัมพูชาและมาเลเซีย ซึ่งในประเทศไทยพบร่น้อยมากแถบภาคตะวันออก (จันทบุรี ตราด ระยอง) และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (มุกดาหาร ยโสธร) ผลร่น้อยถูกนำมาใช้เป็นเครื่องยาซึ่งมีสรรพคุณเผ็ดปร่า มีสรรพคุณขับลมในลำไส้ แก้อท้องขึ้น ท้องอืดเฟ้อ ช่วยบรรเทาอาการคลื่นไส้อาเจียน (Thiangburanatham, 1988) สามารถใช้เป็นเครื่องยาเดี่ยวหรือใช้ร่วมกับเครื่องยาเร่วใหญ่ (*Alpinia* sp. วงศ์ Zingiberaceae) โดยเรียกว่า “เร่วทั้งสอง” ผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเครื่องยาเร่วน้อย พบว่ามีฤทธิ์ด้านการบีบตัวของมดลูก ออกฤทธิ์คล้ายสารฮีสตามีน ลดความดันโลหิตและมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, 2008) นอกจากนี้น้ำมันที่สกัดได้จากผลร่น้อยยังมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ทำให้เกิดความผิดปกติในระบบทางเดินอาหาร ฤทธิ์ด้านการก่อกลายพันธุ์และมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (Pulbutr *et al.*, 2012)

การตรวจเอกลักษณ์สมุนไพรถือเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญในการควบคุมมาตรฐานสมุนไพร การตรวจเอกลักษณ์ที่ถูกต้องจะสัมพันธ์กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและความปลอดภัยของสมุนไพร ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยได้กำหนดวิธีตรวจเอกลักษณ์สมุนไพรโดยอาศัยข้อมูล 3 ส่วนประกอบกัน คือ 1) ข้อมูลลักษณะทางจุลทรรศน์, 2) มหรรณของสมุนไพร และ 3) ข้อมูลสารสำคัญที่มีในสมุนไพร (Sittichai, 2004) ซึ่งเครื่องยาเร่วน้อยมีลักษณะทางมหรรณ ได้แก่ ผลมีรูปร่างกลมจนถึงรูปไข่ ถูกออกแบบเป็น 3 พูโดยมีเยื่อบางๆ กัน เมล็ดมีสีน้ำตาลและไม่มีขี้ด ซึ่งแตกต่างจากเมล็ด

ของเครื่องยาเร่วใหญ่ที่แต่ละเมล็ดจะมีขี้ด สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันร่น้อยที่สกัดได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำ ได้แก่ bornyl acetate และ camphor (Rattarom, 2004; Pulbutr *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตาม การตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาเร่วน้อยที่จำหน่ายในร้านขายยาสมุนไพรในประเทศไทยนั้น เบื้องต้นอาศัยการสังเกตลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่า ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยทักษะความชำนาญส่วนบุคคลและมีข้อจำกัดในกรณีที่เครื่องยามีสภาพผลแตกหัก ผลไม่สมบูรณ์หรือเครื่องยาถูกปลอมปนด้วยสมุนไพรชนิดอื่นที่มีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกัน ทำให้การประยุกต์ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเพื่อเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตหรือที่เรียกว่า “เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)” เข้ามามีบทบาทด้านการตรวจเอกลักษณ์สมุนไพรมากขึ้น เนื่องจากมีความถูกต้องแม่นยำสูงและยังเป็นข้อมูลสำคัญในการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืชอีกด้วย การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer1 (ITS1) ที่อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 18S และ 5.8S (รูปที่ 1) ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์พืชหลายชนิด เช่น ถั่งเช่า (*Cordyceps* species) (Yue-Qin *et al.*, 2002), ขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) (Jiang *et al.*, 2006), เร่ว (*A. villosum*) (Qiao *et al.*, 2009) เป็นต้น เนื่องจากเป็นดีเอ็นเอส่วนที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงและมีความยาวไม่มาก สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ง่าย แม้ว่าจีโนมิก ดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณจะมีสภาพไม่สมบูรณ์ (Sukrong *et al.*, 2007)



รูปที่ 1 นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ที่อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 18S และ 5.8S

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS1 ของเครื่องยาเร่วน้อยโดยเพิ่มจำนวนนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวด้วยเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (direct sequencing) ตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาเร่วน้อยด้วยการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS1 ระหว่างตัวอย่างอ้างอิงและตัวอย่างที่ได้จากร้านขายยาแผนโบราณในประเทศไทย นอกจากนี้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเร่วน้อย โดยสกัดน้ำมันจากตัวอย่างเครื่องยาด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเครื่อง Gas Chromatography Mass Spectroscopy (GC-MS) เพื่อใช้เป็นข้อมูลเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างผลการตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาเร่วน้อยโดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS1 กับสารสำคัญที่มีในน้ำมันเร่วน้อย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างพืช

เครื่องยาเร่วน้อยที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) แบ่งเป็นตัวอย่างเครื่องยาที่เก็บตัวอย่างจากร้านขายยาแผนโบราณในภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทยจำนวน 11 ตัวอย่าง และตัวอย่างอ้างอิงจำนวน 4 ตัวอย่าง ตัวอย่างอ้างอิงพิสูจน์เอกลักษณ์โดย ญ.จุลลักษ์ณ์ รัตตะธมน์ อาจารย์ประจำคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามและถูกทำให้แห้งโดยอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เครื่องยาเร่วน้อยทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้รวมทั้งตัวอย่างพรรณไม้แห้งของตัวอย่างอ้างอิงถูกเก็บรักษาที่หน่วยวิจัยเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เครื่องยาเร่วน้อยในแต่ละตัวอย่างจะถูกคัดเลือกแบบสุ่มมาจำนวน 20 ผล เพื่อสังเกตลักษณะทางกายภาพด้วยตาเปล่าและบันทึกผล

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาและชนิดตัวอย่างเครื่องยาเร่วน้อยที่ใช้การศึกษา

ที่	ตัวอย่างรหัส	ชนิดตัวอย่าง	แหล่งที่มา	Herbarium voucher NO.
1	RN01	ตัวอย่างจากร้านขายยาแผนโบราณ (Commercial samples)	ร้านขายยาแผนโบราณ ชม.01 จ.เชียงใหม่	MSU.PH-Reonoi-R1
2	RN02		ร้านขายยาแผนโบราณ จ.อุดรธานี	MSU.PH-Reonoi-R2
3	RN03		ร้านขายยาแผนโบราณ จ.นครราชสีมา	MSU.PH-Reonoi-R3
4	RN04		ร้านขายยาแผนโบราณ กท.01 กรุงเทพมหานคร	MSU.PH-Reonoi-R4
5	RN05		ร้านขายยาแผนโบราณ กท.02 กรุงเทพมหานคร	MSU.PH-Reonoi-R5
6	RN06		ร้านขายยาแผนโบราณ ชม.02 จ.เชียงใหม่	MSU.PH-Reonoi-R6
7	RN07		ร้านขายยาแผนโบราณ กท.03 กรุงเทพมหานคร	MSU.PH-Reonoi-R7
8	RN08		ร้านขายยาแผนโบราณ จ.ชลบุรี	MSU.PH-Reonoi-R8
9	RN09		ร้านขายยาแผนโบราณ กท.04 กรุงเทพมหานคร	MSU.PH-Reonoi-R9
10	RN10		ร้านขายยาแผนโบราณ จ.สงขลา	MSU.PH-Reonoi-R10
11	RN11		ร้านขายยาแผนโบราณ กท.05 กรุงเทพมหานคร	MSU.PH-Reonoi-R11
12	RN12	ตัวอย่างอ้างอิง (Authentic samples)	อ.เขาสอยดาว จ.จันทบุรี	No.MSU.PH-ZIN-A2-1-1
13	RN13		อ.เลิงนกทา จ.ยโสธร	No.MSU.PH-ZIN-A2-2
14	RN14		อ.เมือง จ.มุกดาหาร	No.MSU.PH-ZIN-A2-3
15	RN15		อ.เขาสอยดาว จ.จันทบุรี	No.MSU.PH-ZIN-A2-1-2

2. การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1

2.1 การสกัดจีโนมิตีดีเอ็นเอ

เครื่องยาเรว่น้อยแต่ละตัวอย่างนำมาบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้โกร่งและลูกโกร่งร่วมกับการใช้ในโตรเจนเหลว ซึ่งน้ำหนักผงยาประมาณ 50 mg เพื่อนำมาสกัดจีโนมิตีดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini kit (QiaGen®, Germany) วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของจีโนมิตีดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย Agarose gel electrophoresis โดย Agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 2 (w/v) เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1kb ladder (Invitrogen Corp., USA)

2.2 การเพิ่มปริมาณนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำจีโนมิตีดีเอ็นเอที่ได้มาสกัดเพิ่มปริมาณนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 โดยไพรเมอร์ ITS1F (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA-3') ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับตำแหน่งขนาบข้างปลาย 3' ของ Ribosomal DNA ชนิด 18S และไพรเมอร์ In 5.8R (5'-GAC TCG ATG GTT CAC GGG ATT CT-3') (Rinthong, 2007) ที่มีลำดับ นิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับตำแหน่งขนาบข้างปลาย 5' ของ Ribosomal DNA ชนิด 5.8S ส่วนประกอบสำหรับเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ประกอบด้วย PCR buffer ความเข้มข้น 10X ปริมาตร 3 ml., dNTPs 0.15 ml., 0.20 mmol. ของไพรเมอร์แต่ละชนิด และเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ชนิด Taq polymerase 1 หน่วย (Promega, USA) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 50 ml. การเพิ่มปริมาณนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยเทคนิค PCR ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 30 รอบภายใต้สภาวะดังนี้ Pre-cycling 95 °C นาน 5 min., Denaturation 95 °C นาน 50 s., Annealing 55 °C นาน 30 s., Elongation 72 °C นาน 1 min. และ Final elongation 72 °C นาน 5 min. ตรวจสอบผลผลิตของเทคนิค PCR โดยเทคนิค Agarose gel electrophoresis โดยใช้ gel

ความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v) เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 1kb plus ladder (Invitrogen Corp., USA) เก็บรักษาผลผลิตของเทคนิค PCR ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลผลิตของเทคนิคพีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้ทั้งหมดจะถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทวาร์ดเมดิก กรุงเทพมหานคร วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันกับที่ใช้ในขั้นตอนเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งทิศทาง forward และ reverse ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของเครื่องยาเรว่น้อยทั้งหมดถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร BioEdit (Hall, 1999) และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของพืชชนิด *A. uliginosum* ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank

3. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเรว่น้อย

3.1 การสกัดน้ำมันเรว่น้อย

นำเครื่องยาเรว่น้อยมาบดให้เป็นผงและนำไปผ่านแรงเบอร์ 18 ซึ่งน้ำหนักผงแห้ง 15 g. และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 ml. กลั่นน้ำมันเรว่น้อยโดยใช้วิธีกลั่นด้วยไอน้ำนาน 2.5 ชั่วโมง บันทึกปริมาณน้ำมันที่สกัดได้ เครื่องยาเรว่น้อยแต่ละตัวอย่างจะถูกสกัดน้ำมันจำนวน 3 ซ้ำ (n=3)

3.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเรว่น้อยละลายน้ำมันเรว่น้อยในเฮกเซนให้ได้ความเข้มข้น 10 ml/ml. และวิเคราะห์หาองค์ประกอบในน้ำมันเรว่น้อยโดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph - Mass Spectrometer รุ่น GCMS-QP 2010 (Shimadzu®, Japan) ซึ่งต่อกับเครื่องฉีดสารอัตโนมัติ รุ่น AOC-5000 (Shimadzu®, Japan) มีรายละเอียดคือใช้ Capillary column ชนิด RtX®-5 MS (ความยาวของคอลัมน์ 30 m., เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 mm., ความหนาของฟิล์ม 0.25 mm.) ระบบการฉีดสารประกอบด้วยอุณหภูมิของส่วนฉีดสาร 250 °C อุณหภูมิของคอลัมน์

เริ่มต้นจาก 80 °C (คงไว้ 2 นาที) และเพิ่มขึ้นในอัตรา 10 °C/min จนเป็น 280 °C (คงไว้ 1 นาที) ก๊าซพาเป็นก๊าซฮีเลียม อัตราการไหล 1 ml/min ปริมาตรที่ฉีด 1 ml. ใช้ Split mode ในอัตราส่วน 1:100 และ ionization 0 kV อุณหภูมิของส่วน ionization 230 °C ช่วงมวลในการวิเคราะห์ 35-550 amu ทำการเปรียบเทียบ Mass spectrum ขององค์ประกอบในน้ำมันเร่วน้อยกับสารมาตรฐานใน NIST Libraries ของเครื่อง GC-MS เพื่อให้ทราบชนิดขององค์ประกอบในน้ำมันดังกล่าว

ผลการวิจัย

1. ลักษณะทางกายภาพของเครื่องยาเร่วน้อย

เครื่องยาเร่วน้อยที่ใช้ในการศึกษานี้ทั้ง 15 ตัวอย่างมีลักษณะทางกายภาพคล้ายคลึงกัน คือ ผลเป็นทรงกลมมี 3 พู น้ำหนักต่อผลอยู่ในช่วง 0.21-0.51 กรัม และมีเส้นผ่าศูนย์กลางต่อผลในช่วง 8.7-9.7 มิลลิเมตร เมล็ดมีลักษณะเป็นก้อนที่มีเหลี่ยม สีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม แต่ละเมล็ดไม่มีขี้ด

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1

Genomic DNA ของเครื่องยาเร่วน้อยทุกตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ได้ด้วยเทคนิค PCR ลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของเครื่องยาเร่วน้อยทั้งตัวอย่างอ้างอิงและตัวอย่างที่ได้จากร้านขายยาแผนโบราณมีความยาวเท่ากับ 180 คู่เบส และมีส่วนประกอบ G+C ร้อยละ 57.22-60.56 ผลการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องยาทั้งหมด พบว่าตัวอย่างอ้างอิงจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างรหัส RN12 RN13 RN14 และ RN15 มีลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 เหมือนกันในทุกตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 2) และตรงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของพืชชนิด *A. uliginosum* ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank (Accession number AY76827) อีกด้วย ซึ่งบ่งชี้ว่าเครื่องยาเร่วน้อยตัวอย่างอ้างอิงทั้งหมดเป็นส่วนผลของพืชชนิด *A. uliginosum*

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของเครื่องยาที่เก็บตัวอย่างจากร้านขายยาแผนโบราณจำนวน 11 ตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันของตัวอย่างอ้างอิง (ตารางที่ 2) ทำให้สามารถแบ่งเครื่องยาเร่วน้อยที่เก็บตัวอย่างจากร้านขายยาแผนโบราณได้เป็น 2 กลุ่ม กำหนดชื่อเรียกเป็น “Commercial กลุ่มที่ 1” และ “Commercial กลุ่มที่ 2” ตามลำดับ “Commercial กลุ่มที่ 1” ประกอบด้วยเครื่องยาเร่วน้อย 7 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างรหัส RN01 RN02 RN04 RN08 RN09 RN10 และ RN11 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทุกตำแหน่งนิวคลีโอไทด์และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างอ้างอิงทุกตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เช่นกัน ทำให้สามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างเร่วน้อย “Commercial กลุ่มที่ 1” มีแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์จากพืชชนิด *A. uliginosum* ส่วน “Commercial กลุ่มที่ 2” ประกอบด้วย 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างรหัส RN03 RN05 RN06 และ RN07 มีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 เหมือนกันทุกตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ แต่ข้อมูลดังกล่าวมีความแตกต่างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างอ้างอิงและ “Commercial กลุ่มที่ 1” จำนวน 11 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 13, 51, 53, 65, 70, 128, 129, 136, 151, 157 และ 169 ตามลำดับ เห็นได้ว่าตัวอย่างเครื่องยา “Commercial กลุ่มที่ 2” มีแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์จากพืชชนิดเดียวกัน แต่ไม่ใช่พืชชนิด *A. uliginosum*

ตารางที่ 2 ผลเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของตัวอย่างเรว่น้อยที่ศึกษากับพืชชนิด *A. uliginosum* ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank

ตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์										
		13	51	53	65	70	128	129	136	151	157	169
<i>A. uliginosum</i> (RN12 RN13 RN14 RN15)	Authentic	T	C	A	T	T	G	A	T	A	C	C
<i>A. uliginosum</i> (AY76827)	Gen Bank	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
RN01 RN02 RN04 RN08 RN09 RN10 RN11	Commercial กลุ่มที่ 1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
RN03 RN05 RN06 RN07	Commercial กลุ่มที่ 2	C	T	C	G	C	A	G	C	G	T	T

หมายเหตุ

กำหนดให้ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นนับจากตำแหน่งที่ 1 ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1

* แทนนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างรหัส RN12 RN13 RN14 และ RN15

3. องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันเรว่น้อย

เครื่องยาเรว่น้อยทั้งตัวอย่างอ้างอิงและตัวอย่างที่ได้จากร้านขายยาแผนโบราณมีปริมาตรโดยน้ำหนักของน้ำมันที่สกัดได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำอยู่ในช่วงร้อยละ 2.60-4.89 (ตารางที่ 3) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำมันเรว่น้อยโดยใช้เครื่อง GC-MS พบว่าเครื่องยาเรว่น้อยที่เป็นตัวอย่างอ้างอิงมีสาร bornyl acetate และ camphor เป็นองค์ประกอบหลัก ทุกตัวอย่าง ส่วนเครื่องยาเรว่น้อยที่ถูกแบ่งกลุ่มเป็น "Commercial กลุ่มที่ 1" น้ำมันที่สกัดได้จากเครื่องยา

แต่ละตัวอย่างมีสารองค์ประกอบหลักที่แตกต่างออกไป กล่าวคือ ตัวอย่างรหัส RN08 มีสาร bornyl acetate และ camphor เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับตัวอย่างอ้างอิง ตัวอย่างรหัส RN01 RN09 RN12 และ RN14 มีสาร bornyl acetate camphor และ nerolidol เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างรหัส RN10 และ RN11 มีสาร nerolidol เป็นองค์ประกอบหลักเช่นเดียวกับเครื่องยาเรว่น้อยในกลุ่ม "Commercial กลุ่มที่ 2" ตัวอย่างรหัส RN03 RN05 RN06 และ RN07

ตารางที่ 3 ร้อยละสุทธิของน้ำมันเรว่น้อยที่สกัดได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำและองค์ประกอบทางเคมี

ตัวอย่าง	ชนิดตัวอย่าง	ร้อยละสุทธิของน้ำมันที่กลั่นได้ (%v/w)	สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบ (ร้อยละสัมพัทธ์)					
			Camphor	Borneol	Bornyl acetate	Nerolidol	Farnesol	รวม
RN12	Authentic	2.93±0.00	25.50	2.64	34.96	0.74	7.03	70.87
RN13		2.60±0.00	35.65	10.14	50.71	0.00	0.00	96.50
RN14		3.13±0.00	32.53	4.52	29.59	0.79	16.15	83.58
RN15		3.46±0.00	28.95	1.99	33.75	0.90	6.21	71.80

RN01		3.67±0.03	18.13	5.00	16.24	28.64	8.09	76.10
RN02		3.46±0.00	21.54	3.97	20.96	48.13	0.00	94.60
RN04	Commercial กลุ่มที่ 1	4.17±0.08	12.21	1.14	18.08	52.91	0.48	84.82
RN08		3.64±0.04	33.14	11.81	39.77	0.91	4.77	90.40
RN09		3.40±0.07	26.64	2.33	29.6	21.13	3.78	83.48
RN10		4.75±0.07	5.45	0.46	4.87	37.42	1.42	49.62*
RN11		4.73±0.00	0.00	0.00	0.00	92.21	0.00	92.21
RN03		4.89±0.00	7.49	0.59	5.42	71.64	0.00	85.14
RN05	Commercial กลุ่มที่ 2	4.74±0.04	0.48	0.00	0.58	65.02	0.25	66.33
RN06		4.24±0.04	8.09	1.52	7.55	67.00	1.64	85.80
RN07		4.53±0.00	0.00	0.00	0.00	91.43	0.00	91.43

* บาง peak ของ GC-MS chromatogram ไม่สามารถระบุชนิดสารได้

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ตัวอย่างเครื่องยาเร่วน้อยที่ใช้ในการวิจัยนี้ ทุกตัวอย่างมีลักษณะทางกายภาพตรงตามผลการศึกษา ลักษณะทางเภสัชเวทของผลเร่ว (Rattarom, 2004) ขนาดผลและน้ำหนักต่อผลใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาเร่วน้อยที่เก็บตัวอย่างจากร้านขายยาแผนโบราณโดยอาศัยเครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง ITS1 ของนิวเคลียร์ดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง พบว่าตัวอย่างเครื่องยาเร่วน้อยจากร้านขายยาแผนโบราณที่ใช้ในการศึกษาจากจำนวนทั้งหมด 11 ตัวอย่าง พบเครื่องยาจำนวน 4 ตัวอย่างที่ไม่ได้มีที่มาทางพฤกษศาสตร์จากพืชชนิด *A. uliginosum* ซึ่งเป็นเครื่องยาที่เก็บตัวอย่างจากร้านขายยาแผนโบราณที่ตั้งอยู่ในจังหวัดนครราชสีมาและเชียงใหม่จังหวัดละ 1 แห่ง และร้านขายยาแผนโบราณที่ตั้งอยู่ในกรุงเทพมหานครจำนวน 2 แห่ง และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของเครื่องยาที่มีการปลอมปนมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณเดียวกันของสมุนไพรจำนวน 3 ชนิด ซึ่งมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกับเครื่องยาเร่วน้อย ได้แก่ *Amomum villosum* (Thiangburanatham, 1988), *Alpinia nigra* (Phonsena, 2007) และ *Alpinia allughas* (Saralamp, 1992) เพื่อค้นหาแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของพืชถูกนำมาปลอมปน พบว่าไม่ตรงกับ

ข้อมูลของพืชทั้งสามชนิดดังกล่าว จึงไม่สามารถหาข้อสรุปได้ว่าสมุนไพรที่มีการปลอมปนเป็นส่วนผลของพืชชนิดใด อย่างไรก็ตาม จากผลการตรวจเอกลักษณ์เครื่องยาเร่วน้อยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 นี้ แสดงให้เห็นว่าในปัจจุบันเครื่องยาเร่วน้อยที่มีจำหน่ายในร้านขายยาแผนโบราณในประเทศไทย มีแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์จากส่วนผลของ *A. uliginosum* และพืชชนิดอื่นอีกหนึ่งชนิด ซึ่งส่วนผลของพืชชนิดนี้มีลักษณะภายนอกเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าเหมือนกับผลของ *A. uliginosum*

ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันเร่วน้อย พบว่าองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันเร่วน้อยซึ่งกลั่นจากตัวอย่างอ้างอิงในการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับสารสำคัญที่พบในน้ำมันเร่วน้อยจากงานวิจัยของ Rattarom (2004) และ Pulbutr *et al.* (2012) คือ มีสาร bornyl acetate และ camphor เป็นองค์ประกอบหลัก แต่เครื่องยาเร่วน้อยที่เก็บตัวอย่างจากร้านขายยาแผนโบราณบางตัวอย่างพบสาร bornyl acetate camphor และ nerolidol เป็นองค์ประกอบหลัก บางตัวอย่างพบ nerolidol เพียงสารเดียวเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งชนิดและปริมาณของสารสำคัญที่แตกต่างกันในน้ำมันที่กลั่นได้จากพืชชนิดเดียวกันนี้อาจเป็นผลจากปัจจัยหลายประการ เช่น แหล่งเพาะปลูกสมุนไพร วิธีการเก็บสมุนไพร เป็นต้น (Janssen, 1987; Garcia,

2002) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดพืชซึ่งเป็นแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเครื่องยาที่ประกอบทางเคมีในน้ำมันที่สกัดได้ พบว่าเครื่องยาที่มีแหล่งที่มาจากพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *A. uliginosum* มี nerolidol เพียงสารเดียวเป็นองค์ประกอบหลักในทุกตัวอย่าง ส่วนเครื่องยาที่มีแหล่งที่มาจากพืชชนิด *A. uliginosum* มีเพียงหนึ่งตัวอย่างเท่านั้นที่มี nerolidol เป็นองค์ประกอบหลัก เห็นได้ว่าแหล่งที่มาทางพฤกษศาสตร์ของเครื่องยาที่แตกต่างกันจะมีสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันแตกต่างกันด้วย ซึ่งอาจส่งผลต่อฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเครื่องยาได้

กิตติกรรมประกาศ

บางส่วนของงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ พ.ศ. 2553 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

References

- Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Southern Center of Thai Traditional Medicine, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University. editors. Medicinal plants in Primary Health Care. Bangkok: Charoen Printing; 2008.
- Garcia D, Alvarez A, Tornos P, Fernandez A, Saenz T., Gas chromatographic-mass spectrometry study of the essential oils of *Pimenta racemosa* var. *terbinthina* and *P. racemosa* var. *grisea*, *Z. Naturforsch.* 2002; 57c: 449-451.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999; 41: 95-98.
- Holttum RE. The Zingiberaceae of the Malay Peninsula. *Gard. Bull. Singapore.* 1950; 13(1): 1-249.
- Janssen AM, Scheffer JJ, Baerheim SA. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review aspects of the test methods, *Planta. Med.* 1987; 53(5): 395-398.
- Jiang H, Xie Z, Koo HJ, *et al.* Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medicinal *Zingiber* species: Tools for authentication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) *Phytochemistry* 2006; 67: 1673-1685.
- Phonsena P, "Kala". In: Medicinal plants in Eastern (Khao Hin Son) Botanical Garden. Chachoengsao: Khao Hin Son Royal Development Study Centre; 2007. 23.
- Pulbutr P, Caichompoo W, Lertsatitthanakorn P, Phadungkit M, Rattanakit S. Antibacterial activity, antimutagenic activity and cytotoxic effect of an essential oil obtained from *Amomum uliginosum* K.D.Koenig. *J. Biol. Sci.* 2012; 12(6): 255-360.
- Qiao CF, Han QB, Zhao ZL, Wang ZT, Xu LS, Xu HX. Sequence analysis based on ITS1 region of nuclear ribosomal DNA of *Amomum villosum* and ten species of *Alpinia*. *J. Food Drug Anal.* 2009; 17: 142-145.
- Rattarom R. Pharmacognostic properties and chemical composition of Bastard cardamom. Bangkok: Master's thesis, Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University; 2004.
- Rinthong P. Genetic variation in genus *Croton* (*Croton* spp.). Bangkok: Ph.D.'s thesis, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University; 2007.
- Saralamp P, Temsiririrkkul R, Chuakul W, editors. Medicinal plants in Siri Ruckhachati Gar-

- den. Bangkok: Amarin Printing and Publishing; 1992.
- Sittichai N. Herbal Standardization in Thai Herbal Pharmacopoeia. *Thai J. Phytopharm.* 2004; 11(1): 21-32.
- Surong S, Zhu S, Ruangrungsri N, Phadungcharoen T, Palanuvej C, Komatsu K. Molecular analysis of the genus *Mitragyna* existing in Thailand based on rDNA ITS sequences and its application to identify a narcotic species: *Mitragyna speciosa*. *Biol. Pharm. Bull.* 2007; 30(7): 1284-1288.
- Thiangburanatham W. Herbs Dictionary. Bangkok: O. S. Printing House; 1988.
- Yue-Qin C, Nung W, Hui Z, Liang-Hu Q. Differentiation of medicinal *Cordyceps* species by rDNA ITS sequence analysis. *Planta Med.* 2002; 68: 635-639.