

การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชเวทของพืช 3 ชนิดในสกุลหญ้าน้ำปักกิ่ง (วงศ์ผักปลาบ)

Comparative Basic Pharmacognostic Studies of Three *Murdannia* species (Family Commelinaceae)

ธารินี สืบปาละ¹, ศรีสมพร ปรีเปรม¹, สุพัตรา ปรศุพพัฒนา¹, ทวีศักดิ์ อธิเมธาโรจน์^{1*}

Tarinee Subphala¹, Srisomporn Preeprame¹, Supatra Porasuphatana¹, Thaweesak Thitimetharoch^{1*}

¹คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

Received: 27 February, 2007 Accepted: 12 June, 2007

Abstract

The comparative basic pharmacognostic studies for three *Murdannia* species (Family Commelinaceae), *M. bracteata*, *M. loriformis* and *M. nudiflora*, were conducted by using methods of diagnostic microscopic studies (leaf scraping and leaf clearing) and phytochemical methods (physico-chemical value and thin-layer chromatography). Cutin pattern and macro-hairs are distinguished epidermal microscopic characters among the species. The differences of total phenolic contents and thin-layer chromatogram are supported the identification.

Keywords: Commelinaceae, genus *Murdannia*, pharmacognostic study, microscopic character, phytochemistry

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชเวทของพืช 3 ชนิด ในสกุลหญ้าน้ำปักกิ่ง (วงศ์ผักปลาบ) คือหญ้าน้ำปักกิ่ง (*M. bracteata*) ผักลิ้มผิวใหญ่ (*M. loriformis*) และกินกุ้งน้อย (*M. nudiflora*) ด้วยวิธีศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบ (วิธีขูดผิวแผ่นใบและวิธีทำตัวอย่างให้ใส) และวิธีทางพิษเคมี (วิธีประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี) พบว่าลักษณะลวดลายคิวทินและขนขนาดใหญ่ที่ปรากฏ ลักษณะวินิจฉัยทางเคมีคือ ปริมาณรวมของฟีนอลิก และทินเลเยอร์โครมาโทแกรมแสดงให้เห็นถึงลักษณะความแตกต่างของพืชดังกล่าว และสามารถใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการวินิจฉัยได้

คำสำคัญ: วงศ์ผักปลาบ สกุลหญ้าน้ำปักกิ่ง การศึกษาทางเภสัชเวท จุลลักษณะ พิษเคมี

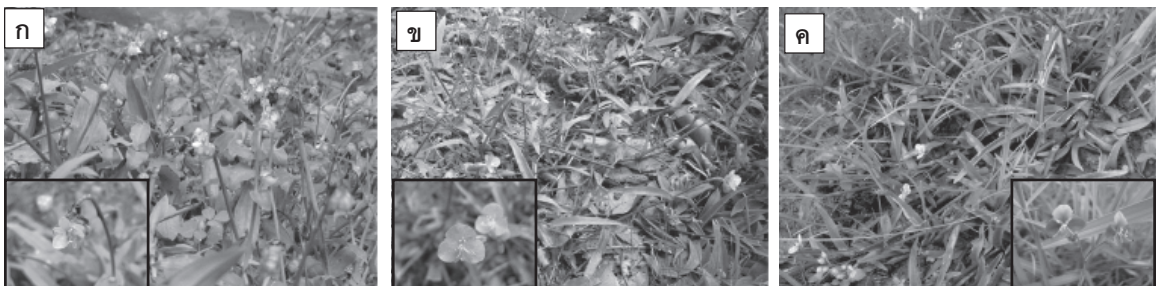
*ผู้เขียนที่สามารถติดต่อได้: ทวีศักดิ์ อธิเมธาโรจน์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โทรศัพท์ 043-362093 โทรสาร 043-202379, email: thati@kku.ac.th

บทนำ

สมุนไพรรูปร่างปากกิ้งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวสกุล *Murdannia* วงศ์ผักปลาบ (Family Commelinaceae) มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Murdannia bracteata* (C.B. Clarke) J.K. Morton ex D.Y. Hong มีลักษณะสันฐานวิทยาทั่วไปคล้ายกับพืชอีก 2 ชนิด คือ ผักลิ้มผัวใหญ่ (*M. loriformis* (Hassk.) R.S. Rao & Kammathy) และกินกึ่งน้อย (*M. nudiflora* (L.) Brenan) (รูปที่ 1) แต่ *M. bracteata* และ *M. loriformis* จะพบลักษณะปรากฏของลำต้นที่มีใบแบบกระจุก (Rosette stem) (Thitimetharoch et al., 2004)

สมุนไพรรูปร่างปากกิ้งมีสรรพคุณช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Phetsuk et al., 2005) รักษาอาการเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ และกำจัดพิษ (Saralamp et al., 1996) ใช้เพื่อช่วยลดผลข้างเคียงจากการใช้เคมีบำบัดหรือรังสีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็ง (วิธนา, 2542) การพบว่าสารสำคัญกลัยโคสฟิงโกไลปิด (Glycosphingolipid) มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ในหลอดทดลอง (Jiratchariyakul et al., 1998) สารสกัดด้วยเอทานอลที่มีคุณสมบัติป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ในหนูทดลอง (Intiyot et al., 1998) ลดระดับสารอะฟลาทอกซิน-อัลบูมิน (Aflatoxin-albumin) ในหนูทดลอง (Vinitketkumnuen et al., 1999) และยังมีฤทธิ์เหนี่ยวนำเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายสารพิษรวมถึงสารสกัดยังมีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ เมื่อทดสอบกับเชื้อ *Salmonella typhimurium* (Intiyot et al., 2002; Vinitketkumnuen et al., 1996) ผักลิ้มผัวใหญ่เป็นผักพื้นบ้านโดยยอดอ่อนรับประทานเป็นผัก

จิ้ม (Thitimetharoch et al., 2004) ส่วนกินกึ่งน้อย มีรายงานถึงสรรพคุณว่ามีการใช้ส่วนรากแก้ไข้ แก้บิด แก้ปวดเบ่งเวลาถ่ายปัสสาวะ ใช้ส่วนใบเป็นยาพอกแผลเรื้อรัง (Perry and Metzger, 1980) ทั้งต้นต้มกับน้ำมันใช้รักษาโรคเรื้อน หรือบดเป็นผงใช้รักษาอาการคัน และรักษาแผลถูกไฟไหม้ (Jain and De Filippis, 1991) รายงานการศึกษาจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของสกุล *Murdannia* (วงศ์ผักปลาบ) มีไม่มากนัก แต่ที่มีผลการศึกษาดังกล่าวได้แก่ Tomlinson (1969) พบลักษณะปรากฏของขนจุ่มต่อม (Glandular micro-hairs) ขนขนาดใหญ่ (Macro-hairs) แบบต่างๆ และปากใบเป็นชนิด 6 เซลล์ Faden และ Inman (1996) ได้ศึกษาตัวอย่างพืชในทวีปแอฟริกาและศรีลังกา สรุปลักษณะเด่นของจุลลักษณะเนื้อเยื่อแผ่นใบพืชสกุลนี้เพิ่มเติมคือ เนื้อเยื่อผิวมีลักษณะบาง มีการสะสมและมีลวดลายคิวทิน (Cutin Pattern) และลักษณะวินิจัยทั่วไปไม่พบเส้นกลางใบชัดเจน ปากใบเป็นชนิดที่มีเซลล์ข้างเซลล์เฉียงเซลล์คุ่ม 6 เซลล์ (Commelina type) พบด้านล่างของแผ่นใบ และพบปากใบชนิดที่มีเซลล์ข้างเซลล์เฉียงเซลล์คุ่ม 4 เซลล์ (Tradescantia type) บริเวณใกล้ขอบใบด้านบน (Thitimetharoch et al., 2004) รายงานผลการศึกษาเนื้อเยื่อแผ่นใบของหว้านดองลิง (*M. japonica* (Thunb.) Faden) พบลักษณะเนื้อเยื่อผิวใบสอดคล้องกับรายงานวิจัยข้างต้นที่ได้กล่าวไว้ ส่วนการศึกษาทางพฤกษเคมีเบื้องต้นในพืชสกุลนี้มีรายงานผลการศึกษาเฉพาะในสมุนไพรรูปร่างปากกิ้งพบว่ามีกลุ่มหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน กลุ่มฟลาโวนอยด์และแคลเซียมออกซาเลต (วิธนา, 2542)



รูปที่ 1 ลักษณะทางสันฐานวิทยาและภาพขยายของดอก ก. หนู่ปากกิ้ง (*M. bracteata*) ข. ผักลิ้มผัวใหญ่ (*M. loriformis*) ค. กินกึ่งน้อย (*M. nudiflora*)

พืชสกุล *Murdannia* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปคล้ายคลึงกันมาก อาจเกิดความสับสนในการระบุชนิดพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาลักษณะวินิจฉัยทางเภสัชเวทจึงมีความสำคัญ นอกจากใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการจัดทำมาตรฐานพืช แล้วยังใช้เป็นข้อมูลสำหรับระบุลักษณะวินิจฉัยชนิดพืชได้อีกด้วยการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการวิจัยเพื่อเปรียบเทียบข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชเวท และศึกษาลักษณะเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของข้อมูลลักษณะจุลลักษณะบางอย่างโดยใช้วิธีศึกษาวิจัยวินิจฉัยเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้วยวิธีชุดผิวแผ่นใบและวิธีทำตัวอย่างให้สีการวิจัยทางพฤกษเคมีด้วยวิธีประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ของพืชสมุนไพรหญ้าปากกิ้ง ผักลิ้มผัวใหญ่ และกินกุ้งน้อย

ตารางที่ 1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัยและอ้างอิง

ชนิดพืช	ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา	วันที่เก็บ	สถานที่เก็บ
<i>M. bracteata</i>	TS & TT-1	20 มกราคม 2548	สวนสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
	TS-15	9 กันยายน 2548	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่
	TS-19	16 เมษายน 254	อำเภอเชียงม่วน จังหวัดพะเยา
<i>M. loriformis</i>	TS & TT-2	6 มิถุนายน 2548	สีฐาน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
<i>M. nudiflora</i>	TT-560	30 กันยายน 2544	อุทยานแห่งชาติภูเวียง จังหวัดขอนแก่น
	TS-22	13 มิถุนายน 2549	บ้านหนองหลุม ตำบลแดงน้อย อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

TS = Tarinee Subphala, TT = Thaweesak Thitimetharoach

2. วิธีการทดลอง

2.1 วิธีวิจัยจุลลักษณะ (Microscopic methods)

ศึกษาเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงยี่ห้อ Olympus รุ่น BH-2 และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพระบบดิจิทัลโดยใช้ยี่ห้อ Olympus รุ่น DP-12

2.1.1 วิธีชุดผิวแผ่นใบ (Leaf scraping)

ทำการชุดเนื้อเยื่อแผ่นใบบริเวณส่วนกลางใบด้านที่ไม่ต้องการศึกษาออกจนได้เนื้อเยื่อผิวอีกด้านที่ต้องการศึกษา จากนั้นย้อมด้วยสีซาฟรานิน (Safranin) ล้างสี แล้วดึงน้ำออกด้วยกระบวนการชุดลำดับเอทานอล (Ethanol series) จากนั้นนำไปผ่านสารละลายผสมระหว่าง 100% เอทานอล และไซลีน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างที่ใช้วิจัย (ตารางที่ 1)

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างจากภาคสนามพร้อมเลือกตัวอย่างที่สมบูรณ์สำหรับจัดทำเป็นตัวอย่างแห้งมาตรฐานอ้างอิง ซึ่งเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์พืชสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และเลือกเฉพาะส่วนใบมาแช่ใน 70% เอทานอล (Ethanol) สำหรับวิจัยจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบ และเลือกส่วนเหนือดินมาอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนแห้งแล้วนำไปบดเป็นผง จากนั้นนำไปวิจัยทางพฤกษเคมีต่อไป

(Xylene) อัตราส่วน 1 : 1 และไซลีนบริสุทธิ์ตามลำดับ (Johansen, 1940) ผนึกตัวอย่างเป็นสไลด์ถาวรด้วยสารเคลือบสังเคราะห์ DePeX

2.1.2 วิธีทำใบให้ใส (Leaf clearing)

เลือกบริเวณส่วนกลางของแผ่นใบ ทำการละลายรงควัตถุและทำตัวอย่างให้ใสโดยใช้สารละลายชุดลำดับเอทานอล 5% โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) และสารละลายอิมิตัวคลอรัลไฮเดรท (Chloral hydrate) ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วทำการดึงน้ำออกโดยชุดลำดับเอทานอล ย้อมด้วยเซเลสไทน์บลู บี (Celestine blue B) และซาฟรานิน ล้างสีออกด้วย 95% เอทานอล (Johansen, 1940) จากนั้นนำตัวอย่างเข้ากระบวนการทำสไลด์ถาวร

2.2 วิธีวิจัยทางพฤกษเคมี (Phytochemical methods)

2.2.1 วิธีประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (Physico-chemical value) ได้แก่ การหาปริมาณสารสกัดด้วยเมทานอล (Methanol) และน้ำ ทำการเตรียมสารสกัดพืชทั้งสามชนิด โดยนำผงตัวอย่างมาชั่งอย่างละ 5 กรัม ทำการสกัดด้วยเมทานอลและน้ำอย่างละ 200 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กรองเอาตะกอนออก นำส่วนที่เป็นของเหลวที่สกัดด้วยน้ำมาระเหยเอาน้ำออกด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) ส่วนสกัดด้วยเมทานอลนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้ง (Evaporator) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการชั่งสารสกัดแล้วหาปริมาณสุทธิของสารสกัดคิดเป็นร้อยละของพืชแต่ละชนิด ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้รายงานผล (Jirawongse, 2000) ส่วนการหาปริมาณรวมของสารฟีนอลิก (Total phenolic contents) ทำการเตรียมสารสกัดโดยละลายสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิดด้วยเมทานอลและน้ำ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมสารมาตรฐานฟีนอลิกโดยใช้กรดเฟอร์ูลิก (Ferulic acid) ความเข้มข้น 31.125-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจาง Folin-Ciocalteu reagent ลง 10 เท่า เติมสารสกัด 200 ไมโครลิตร และเติม 1.5 มิลลิลิตร Folin-Ciocalteu reagent ผสมให้เข้ากันรอให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ โดยทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 1.5 มิลลิลิตร ของโซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที แล้วดูดสารละลายขึ้นมา 200 ไมโครลิตร ใส่ถาดหลุม 96 ช่อง (96-well plate) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 725 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader) ใช้น้ำและเมทานอลเป็นตัวอย่างเทียบเคียง ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้รายงานผล (Folin and Ciocalteu, 1927) ค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากสารสกัด เทียบเคียงกับค่ามาตรฐานกรดเฟอร์ูลิก (มิลลิกรัมต่อกรัม ของสารสกัด) การหาค่าปริมาณทั้งหมดของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดเทียบกับค่ากรดเฟอร์ูลิก (Ferulic acid equivalents) คำนวณได้ตามสมการ

$$C = c * V/m$$

- C = ปริมาณรวมของสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด)
 c = ความเข้มข้นของกรดเฟอร์ูลิกที่ได้จากกราฟมาตรฐานของสารสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม)
 V = ปริมาตรของสารสกัด (มิลลิลิตร)
 m = น้ำหนักของสารสกัด (กรัม)

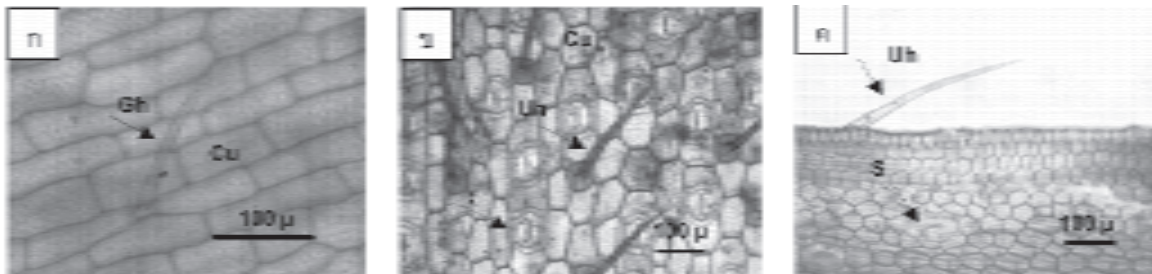
2.2.2 วิธีThin layer chromatography (Thin-layer chromatography, TLC) ใช้ตัวอย่างบดเป็นผง 1 กรัมของพืชแต่ละชนิดมาสกัดด้วยเมทานอล 5 มิลลิลิตร 15 นาที จากนั้นนำสารสกัด 5 ไมโครลิตร มาหยดบนแผ่น TLC (Silica gel 60 F²⁵⁴ หน้า 0.25 มิลลิเมตร Merck) ขนาด 5 cm x 10 cm โดยใช้ชุดตัวทำละลาย 2 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม : เอทิลแอซีเตต : เมทานอล : กรดฟอร์มิก : น้ำ (Chloroform : Ethyl acetate : Methanol : Formic acid : Water) อัตราส่วน 900 : 250 : 150 : 25 : 25 โดยใช้ β -Sitosterol และ Andrographolide เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วบันทึกผล จากนั้นสังเกตภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light, UV) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร บันทึกผล ส่วนตัวทำละลายชุดที่ 2 ประกอบด้วย เอทิลแอซีเตต : กรดฟอร์มิก : กรดแอซีติก : น้ำ (Ethyl acetate : Formic acid : Acetic acid : Water) อัตราส่วน 125 : 11 : 11 : 13.5 โดยใช้ Tannic acid เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ ตรวจสอบด้วยน้ำยา 2% เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride) ในเอทานอล แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วบันทึกผล ตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ (Aluminum chloride) ในเอทานอล โดยใช้ Rutin เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วบันทึกผล จากนั้นสังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร บันทึกผล (Wagner et al., 1984)

ผลการทดลอง

การวิจัยจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบ

หญ้าม้ากั้ง (*M. bracteata*) เนื้อเยื่อผิว (Epidermis) ทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทิน (Cutin) สะสมเห็นชัดเจนลักษณะเป็นลวดลายร่างแห (Reticulate) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม รูปร่างเซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่าและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบ ปากใบ (Stomata) พบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ เรียงเป็นแถวอย่างเป็น

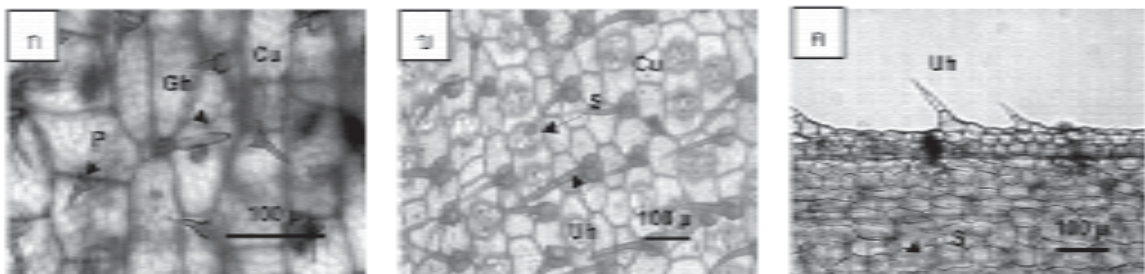
ระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง และกระจายบริเวณใกล้ขอบเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนเซลล์ขน พบชนิดที่มี 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นเซลล์ต่อมรูปกระบอง (Glandular micro-hairs) ยาว 80 - 120 ไมโครเมตร ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง และพบขนขนาดใหญ่ (Macro hairs) 4-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว (Uniseriate-hairs) กระจายทั่วไปเฉพาะเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง ขอบใบ (Margins) เซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม พบขนปุ่ม (Papillae) และขนขนาดใหญ่ 2-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของหญ้าม้ากั้ง ก. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านบน ข. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านล่าง ค. บริเวณขอบใบ (Cu = Cutin, Gh = Glandular micro-hair, S = Stoma, Uh = Uniseriate-hair)

ผักลิ้มผิวใหญ่ (*M. loriformis*) เนื้อเยื่อผิว ทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทินสะสมเห็นชัดเจนลักษณะเป็นลวดลายร่างแห เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลมขนาดรูปร่างเซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่าและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบ ปากใบ พบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ เรียงเป็นแถวอย่างเป็นระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่าง และกระจายบริเวณใกล้ขอบเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน

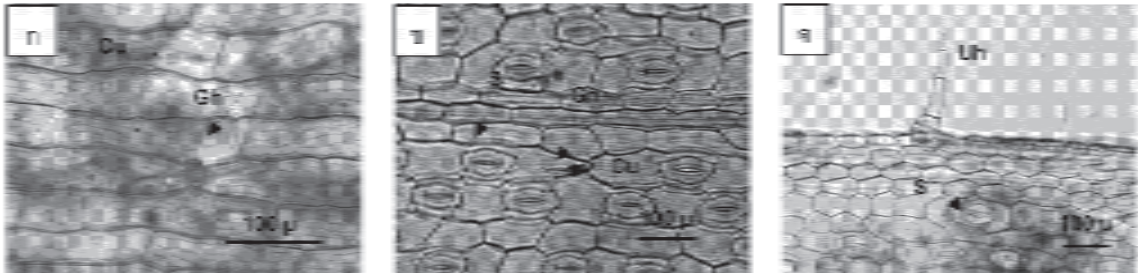
เซลล์ขน พบชนิดที่มี 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นเซลล์ต่อมรูปกระบองยาว 60-100 ไมโครเมตร ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง และพบขนหนามปลายแหลม (Prickle hairs) ยาว 50-100 ไมโครเมตร กระจายทั่วไปบนเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน และพบขนขนาดใหญ่ 2-4 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว กระจายทั่วไปที่เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านล่าง ขอบใบ เซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม พบขนปุ่ม และขนขนาดใหญ่ 2-7 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของผักลิ้มผิวใหญ่ ก. เนื้อเยื่อผิวแผ่นด้านบน ข. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านล่าง ค. บริเวณขอบใบ (Cu = Cutin, Gh = Glandular micro-hair, P = Prickle hair, S = Stoma, Uh = Uniseriate-hair)

กินกุ่มน้อย (*M. nudiflora*) เนื้อเยื่อผิว ทั้งด้านบนและด้านล่างมีคิวทินสะสมเห็นชัดเจนลักษณะเป็นลายขวางร่างแห (Striate) เนื้อเยื่อผิวใบด้านบนรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ส่วนเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างมีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม รูปร่างเซลล์ที่อยู่บริเวณเส้นกลางใบมีขนาดเล็กกว่าและยาวกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณแผ่นใบ ปากใบ พบชนิดที่มีเซลล์ข้างเคียงเซลล์คุม 6 เซลล์ เรียงเป็นแถวอย่างเป็น

ระเบียบบริเวณระหว่างเส้นใบของเนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างและกระจายบริเวณใกล้ขอบเนื้อเยื่อผิวใบด้านบน เซลล์ขน พบชนิดที่มี 3 เซลล์ เซลล์ปลายเป็นเซลล์ต่อมรูปกระบองยาว 50-100 ไมโครเมตร ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง ไม่พบขนขนาดใหญ่ทั้งเนื้อเยื่อผิวใบด้านบนและด้านล่าง ขอบใบ เซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมค่อนข้างกลม พบขนปุ่ม และขนขนาดใหญ่ 2-5 เซลล์เรียงเป็นแถวเดียว (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 แสดงลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของกินกุ่มน้อย ก. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านบน ข. เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านล่าง ค. บริเวณขอบใบ (Cu = Cutin, Gh = Glandular micro-hair, S = Stoma, Uh = Uniseriate-hair)

การวิจัยทางพฤกษเคมี

วิธีประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ พบว่าปริมาณร้อยละของสารที่สกัดด้วยเมทานอลและสกัดด้วยน้ำของหญ้าปักกิ่ง ผักลิ้มผัวใหญ่ และกินกุ่มน้อยมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือ ปริมาณร้อยละของสารที่สกัดด้วยเมทานอลมีค่าเป็น 4.13 ± 0.61 , 4.26 ± 0.39 และ 3.88 ± 0.92 ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารสกัดด้วยน้ำมีค่าเป็น 3.26 ± 0.49 , 3.38 ± 0.63 และ 3.03 ± 0.23 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สำหรับปริมาณรวมของสารฟีนอลิกที่สกัดด้วยเมทานอลคิดเป็น

มิลลิกรัมต่อกรัม (มก./ก) ของสารสกัด พบว่าหญ้าปักกิ่งมีปริมาณมากที่สุดคือ 74.61 ± 6.36 มก./ก ของสารสกัด รองลงมาคือผักลิ้มผัวใหญ่มีค่าเป็น 37.95 ± 4.16 มก./ก ของสารสกัด และกินกุ่มน้อยมีค่าเป็น 16.31 ± 1.68 มก./ก ของสารสกัด ตามลำดับ ส่วนปริมาณรวมของสารฟีนอลิกที่สกัดด้วยน้ำ พบว่าหญ้าปักกิ่งและผักลิ้มผัวใหญ่มีปริมาณใกล้เคียงกันคือ 55.78 ± 2.35 และ 56.26 ± 2.27 มก./ก ของสารสกัด ตามลำดับ ส่วนกินกุ่มน้อยมีเพียง 37.91 ± 1.80 มก./ก ของสารสกัด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษาด้วยคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

พารามิเตอร์	หญ้าปักกิ่ง	ผักลิ้มผัวใหญ่	กินกุ่มน้อย
ร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเมทานอล	4.13 ± 0.61	4.26 ± 0.39	3.88 ± 0.92
ร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยน้ำ	3.26 ± 0.49	3.38 ± 0.63	3.03 ± 0.23
ปริมาณรวมของฟีนอลิกที่สกัดด้วยเมทานอล (มก./ก)	74.61 ± 6.36	37.95 ± 4.16	16.31 ± 1.68
ปริมาณรวมของฟีนอลิกที่สกัดด้วยน้ำ (มก./ก)	55.78 ± 2.35	56.26 ± 2.27	37.91 ± 1.80

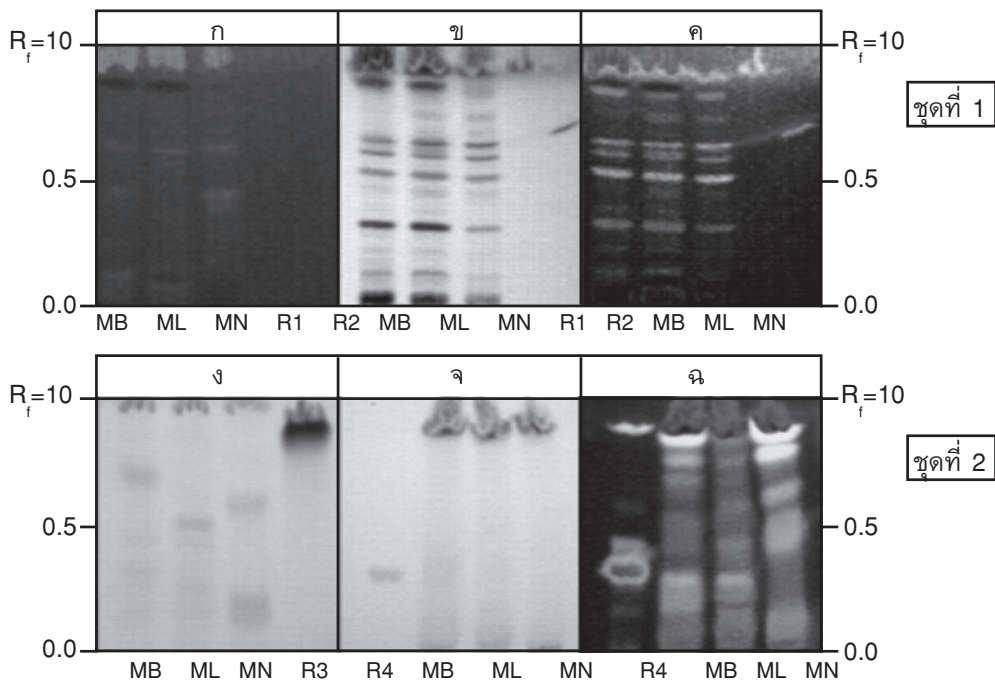
ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วิธีthin layer chromatography สำหรับโครมาโตแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอล (TLC fingerprint profile of methanol extract) ของพืชทั้ง 3 ชนิด ในตัวทำละลายชุดที่ 1 พบว่าภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร สารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิด จะปรากฏแถบสะท้อนแสงสีแดง (รูปที่ 5-ก) ที่ค่า R_f

ประมาณ 0.65, 0.85 และ 0.95 และปรากฏแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.15, 0.45 และ 0.65 เมื่อตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอลปรากฏแถบสีม่วงแดง (รูปที่ 5-ข) ของสารมาตรฐาน β -Sitosterol (R1) และ Andrographolide (R2) มีค่า R_f ประมาณ 0.9 และ 0.7 ตามลำดับ จะเห็นแถบสีที่

ค่า R_f ต่างๆ ของสารสกัดจากพืชทั้ง 3 ชนิด แต่พบว่ามีแถบสีน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.8 ในสารสกัดหยาบบักกิงและผักลิมผัวใหญ่ และเมื่อสังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร (รูปที่ 5-ค) จะเห็นแถบสะท้อนแสงสีแดง สีเขียวและสีชมพูของพืชทั้ง 3 ชนิด ที่มีค่า R_f ต่างๆ ของแถบสารในแต่ละสีใกล้เคียงกันแต่พบแถบสีน้ำเงินเข้มที่ค่า R_f ประมาณ 0.8 ในสารสกัดหยาบบักกิงและผักลิมผัวใหญ่ ส่วนตัวทำละลายชุดที่ 2 เมื่อตรวจสอบด้วย 2% เฟอริกคลอไรด์ในเอทานอล (รูปที่ 5-ง) สารมาตรฐานของกรดแทนนิก (Tannic acid) (R3) ปรากฏแถบสีน้ำเงินมีค่า R_f ประมาณ 0.9 สารสกัดหยาบบักกิงปรากฏแถบสีน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.4 และแถบสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.2, 0.3 และ 0.7 สารสกัดผักลิมผัวใหญ่ปรากฏแถบสีน้ำเงินที่ค่า R_f ประมาณ 0.4 และ 0.5 แถบสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.2 และ 0.3 สารสกัดกิงกุ่มน้อยไม่ปรากฏแถบสีน้ำเงินแต่จะปรากฏแถบสีเขียวที่ค่า R_f ประมาณ 0.2, 0.25

และ 0.55 และเมื่อตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล (รูปที่ 5-จ) สารมาตรฐานรูทีน (Rutin) (R4) ปรากฏแถบสีเหลืองมีค่า R_f ประมาณ 0.3 สารสกัดหยาบบักกิงและผักลิมผัวใหญ่ปรากฏแถบสีเหลืองที่ค่า R_f ประมาณ 0.7 และ 0.55 ตามลำดับ ส่วนสารสกัดกิงกุ่มน้อยมีค่า R_f ประมาณ 0.1, 0.5 และ 0.6 และเห็นชัดเจนขึ้นเมื่อสังเกตภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 366 นาโนเมตร สารมาตรฐานรูทีน (R4) ปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลือง (รูปที่ 5-ฉ) สารสกัดหยาบบักกิงปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลืองที่ค่า R_f ประมาณ 0.1, 0.2, 0.5 และ 0.7 แถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.25, 0.8 และ 0.85 สารสกัดผักลิมผัวใหญ่ปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลืองที่ค่า R_f ประมาณ 0.1, 0.2, 0.55 และ 0.7 แถบสารสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.3 สารสกัดกิงกุ่มน้อยปรากฏแถบสะท้อนแสงสีเหลืองที่ค่า R_f ประมาณ 0.2, 0.35, 0.5 และ 0.65 แถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R_f ประมาณ 0.8 และ 0.85



รูปที่ 5 ทินเลเยอร์โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลของหยาบบักกิง (*M. bracteata*) ผักลิมผัวใหญ่ (*M. loriformis*) และกิงกุ่มน้อย (*M. nudiflora*) ก-ค, ในตัวทำละลายชุดที่ 1 (คลอโรฟอร์ม:เอทิลแอลกอฮอล์:เมทานอล:กรดฟอร์มิก น้ำ = 900:250:150:25:25) ก. สังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร ข. ตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล ค. หลังจากตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล สังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร ง-ฉ, ในตัวทำละลายชุดที่ 2 (เอทิลแอลกอฮอล์:กรดฟอร์มิก:กรดอะซิติก:น้ำ = 125:11:11:13.5) ง. ตรวจสอบด้วยน้ำยา 2% เฟอริกคลอไรด์ในเอทานอล จ. ตรวจสอบด้วยน้ำยา 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล ฉ. หลังจากตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล สังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร (MB = *M. bracteata*, ML = *M. loriformis*, MN = *M. nudiflora*, R1 = β -Sitosterol, R2 = Andrographolide, R3 = Tannic acid, R4 = Rutin)

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาจุลลักษณะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบของพืชทั้ง 3 ชนิด พบจุลลักษณะที่ปรากฏทั่วไปมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Tomlinson (1969), Faden and Inman (1996) และ Thitimetharoch et al. (2004) โดยลักษณะลวดลายการสะสมคิวทินที่เนื้อเยื่อผิวแผ่นใบสามารถใช้เป็นจุลลักษณะวินิจฉัยในระดับสกุลได้ ซึ่งหญ้าปากกิ้ง (*M. bracteata*) และผัก

ลิมผัวใหญ่ (*M. loriformis*) มีการสะสมคิวทินลวดลายลักษณะร่างแห ส่วนกินกึ่งน้อย (*M. nudiflora*) มีลวดลายตามยาวลักษณะเป็นเส้นขนาน ขนขนาดใหญ่ที่เนื้อเยื่อผิวใบด้านล่างจะพบเฉพาะในหญ้าปากกิ้งและผักลิมผัวใหญ่ แต่ขนหนามปลายแหลมพบเฉพาะเนื้อเยื่อผิวแผ่นใบด้านบนของผักลิมผัวใหญ่เท่านั้น (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จุลลักษณะวินิจฉัยของเนื้อเยื่อผิวใบของหญ้าปากกิ้ง ผักลิมผัวใหญ่และกินกึ่งน้อย

จุลลักษณะวินิจฉัย	หญ้าปากกิ้ง	ผักลิมผัวใหญ่	กินกึ่งน้อย
ลวดลายคิวทิน	ร่างแห	ร่างแห	ขนานตามยาว
ขนขนาดใหญ่			
- ผิวแผ่นใบด้านบน	ไม่พบ	ขนหนาม	ไม่พบ
- ผิวแผ่นใบด้านล่าง	4-7 เซลล์ เรียงเป็นแถวเดียว	2-4 เซลล์ เรียงเป็นแถวเดียว	ไม่พบ

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางพิษเคมี โดยวิธีการประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ไม่เห็นความแตกต่างร้อยละของปริมาณสารสกัดด้วยเมทานอลและน้ำ แต่เห็นความแตกต่างในปริมาณรวมของสารฟีนอลิกที่สกัดด้วยเมทานอล ซึ่งพบมากที่สุด ในหญ้าปากกิ้งมีปริมาณมากกว่า ผักลิมผัวใหญ่ประมาณ 2 และประมาณ 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกินกึ่งน้อย และปริมาณรวมของสารฟีนอลิกที่สกัดด้วยน้ำจะเห็นว่าหญ้าปากกิ้งและผักลิมผัวใหญ่มีปริมาณมากกว่ากินกึ่งน้อยประมาณ 1.5 เท่า

โครมาโทแกรมของสารสกัดด้วยเมทานอลของพืชทั้ง 3 ชนิด ในตัวทำละลายชุดที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน β -Sitosterol (R1) และ Andrographolide (R2) (รูปที่ 5 ก-ค) หลังจากตรวจสอบด้วย 10% กรดกำมะถันในเอทานอล และสังเกตภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร พบแถบสีโดยทั่วไปคล้ายคลึงกันและคาดว่าส่วนมากจะเป็นสารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (Terpenoids) โดยเปรียบเทียบกับแถบสีม่วงของสารมาตรฐาน โดยแถบสะท้อนแสงสีแดงของคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) มีค่า R_f ใกล้เคียงกัน แต่

ที่เห็นต่างกันชัดเจนคือแถบสีน้ำเงินที่ R_f ประมาณ 0.8 ที่พบได้เฉพาะสารสกัดจากหญ้าปากกิ้งและผักลิมผัวใหญ่เท่านั้น ในตัวทำละลายชุดที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Tannic acid (R3) และ Rutin (R4) (รูปที่ 5 ง-ฉ) หลังจากตรวจสอบด้วย 2% เฟอริก-คลอไรด์ในเอทานอล ที่มีสารมาตรฐาน Tannic acid เปรียบเทียบกับสารสกัดกับพืชตัวอย่าง ซึ่งสารทดสอบจะทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มแทนนินทำให้พบแถบสีของสารสกัดโดยทั่วไปมีความแตกต่างกัน โดยแถบสีน้ำเงินของสารกลุ่ม Hydrolysable tannins พบได้ในสารสกัดจากหญ้าปากกิ้งและผักลิมผัวใหญ่แต่พบความแตกต่างที่ค่า R_f ประมาณ 0.5 มีความเข้มของแถบสีน้ำเงินซึ่งพบได้เฉพาะในผักลิมผัวใหญ่เท่านั้น ส่วนแถบสีเขียวของสารกลุ่ม Condensed tannins พบได้ในสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิด แต่สารสกัดหญ้าปากกิ้งและกินกึ่งน้อยพบแถบสีเขียวได้ชัดเจนและแตกต่างกันที่ค่า R_f ประมาณ 0.7 และ 0.55 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบด้วย 1% อะลูมิเนียมคลอไรด์ในเอทานอล ที่มีสารมาตรฐาน Rutin เปรียบเทียบกับสารสกัดกับพืชตัวอย่าง ซึ่งสารทดสอบจะทำปฏิกิริยากับกลุ่มไฮดรอกซิลของกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก

โดยเฉพาะสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ปรากฏแถบสีเหลือง และน้ำตาลอ่อนของสารสกัดหยาบบักกิงและผักลิ้มผิวใหญ่ในรูปแบบคล้ายคลึงกัน แต่จะพบแถบสีที่หนาในสารสกัดของผักลิ้มผิวใหญ่ที่ค่า R_f ประมาณ 0.5 ขณะที่แถบสีเหลืองหนาจะปรากฏในสารสกัดกินกึ่งน้อย 2 แถบอย่างเห็นชัดเจนที่ค่า R_f ประมาณ 0.1 และ 0.5 โดยปรากฏชัดเจนภายใต้แสง UV-366 นาโนเมตร และเห็นแถบสะท้อนแสงสีฟ้าที่ค่า R ประมาณ 0.3 ของสารสกัดหยาบบักกิงและผักลิ้มผิวใหญ่ แต่ไม่พบในสารสกัดกินกึ่งน้อยที่ค่า R_f ดังกล่าว

หยาบบักกิง (*M. bracteata*) และ ผักลิ้มผิวใหญ่ (*M. loriformis*) มีจุลลักษณะและองค์ประกอบพื้นฐานทางพฤกษเคมีคล้ายคลึงกันมากกว่ากินกึ่งน้อย (*M. nudiflora*) ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้ ยังแสดงให้เห็นถึงบางลักษณะที่แตกต่างกัน (ลดตายคิวทิน ขนขนาดใหญ่ ปริมาณรวมของสารฟีนอลิก ทินเลเยอร์โครมาโทแกรม) และสามารถนำลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะประกอบในการระบุชนิดได้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับความสนับสนุนชุดอุปกรณ์การวิจัยจาก รศ.ดร. สมาน เทตนา ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย (GS-KKU 49111118) และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับการสนับสนุนเพิ่มเติมจากโครงการศึกษาจุลลักษณะวินิจฉัยแผ่นใบของพืชสกุลหยาบบักกิง (TRF-MRG 5080006) ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งประเทศไทย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

- วีณา จิรัชฌริยากุล. 2542. สารต้านมะเร็ง จากหยาบบักกิง. *จุลสารข้อมูลสมุนไพร*. 16(3): 10-13.
- Faden RB, Inman KE. 1996. Leaf Anatomy of the African Genera Commelinaceae. In: *Anthericopsis and Murdannia. The Biodiversity of African Plants*. Kluwer Academic Publishers, Netherland. pp 464-471.
- Folin O, Ciocalteu V. 1927. On Tyrosine and Tryptophane Determination in Proteins. *J Biol Chem* 27: 627-650.
- Intiyot Y, Kinouchi T, Kataoka K, et al., 2002. Antimutagenicity of *Murdannia loriformis* in the *Salmonella* Mutation Assay and its Inhibitory Effects on Azoxymethane-induced DNA Methylation and Aberrant *crypt* Focus Formation in Male F344 Rats. *J Med Investigation* 49(1-2): 25-34.
- Intiyot Y, Kinouchi T, Vinitketkumnien U, et al., 1998. Effect of *Murnannia loriformis* Extract on Xenobiotic Metabolizing Enzyme Introduction and AOM-Induced Colon Cancer in Rats. *The 3^d International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations*. Bangkok, Thailand. pp116.
- Jain SK, De Filippis RA. 1991. *Medicinal Plants of India*. Vol. I. Reference Publications, Algonac, Michigan, USA. pp249-251.
- Jiratchariyakul W, Mongkarndi P, Okabe H, et al., 1998. Cytotoxic Glycosphingolipid from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao & Kammathy. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* 5(20): 10-20.

- Jirawongse VA. 2000. *Thai Herbal Pharmacopoeia*. Vol. II. Prachachon co., Ltd., Bangkok, Thailand. pp4.
- Perry LM, Metzger J. 1980. *Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses*. The MIT Press Cambridge, Massachusetts, London, England. pp 82.
- Phetsuk P, Hahnvajjanawong C, Lulitanond V, et al., 2005. Immunomodulatory Effect of Thai Plant [Master of Science Thesis in Medical Microbiology]. Khon Kaen, The Graduate School, Khon Kaen University. (abstract)
- Saralamp P, Chuakul W, Temsiririkkul R, et al., 1996. *Medicinal Plants in Thailand. Vol. I*. Amarin Printing and Publishing Public Co.,Ltd. Bangkok,Thailand. pp 162.
- Thitimetharoch T, Chantaranothai P, Thammathaworn A, Faden RB. 2004. Taxonomic Studies of the Family Commelinaceae in Thailand. [Ph.D. Philosophy Thesis in Biology]. Khon Kaen, The Graduate School, Khon Kaen University. pp 75-190.
- Tomlinson PB. 1969. *Anatomy of the Monocotyledons III (Commelinales-Zingiberales)*. The Clarendon Press, Oxford. pp 371-395.
- Vinitketkumnuen U, Charoenkunathum W, Kongtawelert P, et al., 1996. Antimutagenicity and DT-diaphorase Inducer Activity of Thai Medicinal Plant, *Murdannia loriformis*. *Herbs Spices Medicinal Plants* 4: 45-52.
- Vinitketkumnuen U, Chewonarin T, Dhumtanom P. et al., 1999. Aflatoxalbumin Adducts Formation after Single and Multiple Dose of Aflatoxin B1 in Rats Treated with Thai Medicinal Plants. *Mutation Research* 428: 345-51.
- Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984. *Plant Drug Analysis*. Springer-Verlag, New York, USA. pp 349-354.