



การศึกษาวិธีการสกัดและผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อปริมาณสารพฤกษเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูล
อิสระในสารสกัดจากใบไผ่

โดย

นางสาวสิรินดา เกษมสุขไพศาล



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การศึกษาวិธีการสกัดและผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อปริมาณสารฟุกุซเคมี และฤทธิ์การ
ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบไม้



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

EXTRACTION METHODS AND EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON
PHYTOCHEMICAL CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN BAMBOO LEAF
EXTRACT



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOLOGY)
Department of BIOLOGY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2021
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ การศึกษาวิธีการสกัดและผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อปริมาณ
สารพฤษเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบไผ่
โดย นางสาวสิรินดา เกษมสุขไพศาล
สาขาวิชา ชีววิทยา แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโท
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณยพร มากทรัพย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุศลชาติ ออบสุวรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณยพร มากทรัพย์)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยศเวช สิริจามร)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วาสิณี พงษ์ประยูร)

630720025 : ชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : ความเครียดจากสิ่งแวดล้อม, โครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง, ฟลาโวนโกลโคไซด์, สารสกัดใบไม้, ฤดูเก็บเกี่ยว, วิธีการสกัด, สารพฤกษเคมี

นางสาว สิริริตา เกษมสุขไพศาล: การศึกษาวิธีการสกัดและผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อปริมาณสารพฤกษเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบไม้ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณยพร มากทรัพย์

ไม้เป็นพืชในวงศ์หญ้า (Poacea) ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและมีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วทั้งประเทศไทย ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงของสารสกัดจากใบไม้ รวมถึงการทดสอบศักยภาพในการนำไปใช้งานในทางเภสัชกรรมด้านต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม ชนิดและปริมาณของสารพฤกษเคมีในสารสกัดจากใบไม้อาจแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ทั้งปัจจัยภายใน เช่น ความหลากหลายทางพันธุกรรม และอายุของใบไม้ และปัจจัยภายนอก เช่น วิธีการสกัดสาร ฤดูกาลเก็บเกี่ยว หรือความเครียดจากสิ่งแวดล้อม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและผลของปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่อปริมาณสารพฤกษเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบไม้ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมีกลุ่มหลักที่พบในใบไม้ 2 ชนิด ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ รวมถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิค spectrophotometry และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารพฤกษเคมี 8 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid, isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid, vitexin, isovitexin และ apigenin ในสารสกัดจากใบไม้ด้วยเทคนิค Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) ผลการศึกษาพบว่าวิธีการสกัด ตัวทำละลาย และอายุใบไม้ที่ต่างกันส่งผลต่อปริมาณสารพฤกษเคมี โดยจากการทดลองสารออกฤทธิ์สำคัญในใบไม้ละลายได้ดีในตัวทำละลาย 60% เอทานอล และใบไม้มีการสะสมสารพฤกษเคมีมากกว่าใบอ่อน รวมถึงพบว่าไม้จำนวน 11 ชนิดที่เก็บเกี่ยวในฤดูหนาวมีการสะสมสารออกฤทธิ์สำคัญสูงกว่าไม้ที่เก็บเกี่ยวในฤดูร้อน ไม้แต่ละชนิดสะสมสารพฤกษเคมีไม่เท่ากัน โดยพบว่าไม้ข้าวหลามกาบแดง (*Schizostachyum* sp.) มีการสะสมสารพฤกษเคมีสูงสุดจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ caffeic acid, isoorientin, orientin และ isovitexin ส่วนไม้ช่างหม่น (*Dendrocalamus sericeus* Munro) และไม้เลียง (*Thyrsocalamus liang* Sungkaew & W.L. Goh) พบมีสารออกฤทธิ์สำคัญครบทั้ง 8 ชนิด นอกจากนี้ปัจจัยความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกก็ส่งผลให้การเจริญเติบโตของไม้ลดลง แต่มีการสะสมสารพฤกษเคมีสูงขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียด โดยเฉพาะความเครียดจากการขาดน้ำ ดังผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าทั้งปัจจัยภายในและภายนอกมีผลต่อการสะสมสารพฤกษเคมีของไม้ ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จึงอาจมีส่วนช่วยในการพัฒนาศักยภาพในการนำสารสกัดจากใบไม้ไปใช้งานทางเภสัชกรรมหรือส่งเสริมผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากสารสกัดใบไม้ในอนาคต

630720025 : Major (BIOLOGY)

Keyword : Abiotic stress, Bamboo leaf extract, Extraction methods, Flavone C-glycoside, Harvesting season, Phytochemical, RP-HPLC

MISS SIRINTA KASEMSUKPHAISAN : EXTRACTION METHODS AND EFFECT OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON PHYTOCHEMICAL CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN BAMBOO LEAF EXTRACT THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR DR. SARUNYAPORN MAKSUP

Bamboo is a plant in the grass family (Poacea) with high genetic diversity and distributes throughout Thailand. Currently, there are many studies on the accumulation of bioactive compounds with high antioxidant capacity in bamboo leaf extracts (BLE), including a testing for potential applications in various pharmaceutical aspects. However, the type and amount of phytochemicals in bamboo leaf extracts may differ depending on internal factors e.g., genetic diversity, age of bamboo leaves, and external factors e.g., extraction methods, harvest season, or environmental stresses. Therefore, this research was aimed to study the extraction methods and the effect of environmental factors on phytochemical contents and antioxidant activities in bamboo leaf extracts. Two main groups of phytochemicals were found in BLE, phenolic compounds and flavonoids, and antioxidant activity were analyzed by spectrophotometry. Types and quantities of 8 phytochemicals namely chlorogenic acid, caffeic acid, isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid, vitexin, isovitexin, and apigenin in BLE were analyzed by Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). The results showed that different extraction methods, solvents, and leaf maturity affected the phytochemical content. From the experiment, the main active ingredient in bamboo leaves was highly soluble in 60% ethanol, and the older leaves had more phytochemical accumulation than the younger leaves. It was found that leaves from 11 genotypes of bamboo harvested in winter had higher concentrations of active ingredients than those harvested in summer. Different genotypes of bamboo accumulate different phytochemicals. It was found that the *Schizostachyum* sp. had the highest accumulation of 4 phytochemicals, namely caffeic acid, isoorientin, orientin, and isovitexin. BLE of *Dendrocalamus sericeus* Munro and *Thyrsocalamus liang* Sungkaew & W.L. Goh contained all 8 active substances. In addition, environmental stresses resulted in a decrease in bamboo growth while there was a higher accumulation of phytochemicals in response to the stresses, especially drought stress. Therefore, both internal and external factors affect the phytochemical accumulation in BLE. The knowledge gained from this research may helpful for pharmaceutical applications or food supplements used of BLE in the future.



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้ประกอบด้วยการทำงานหลายขั้นตอน ตั้งแต่เริ่มแรกจนกระทั่งจัดทำเป็นรูปเล่มวิทยานิพนธ์ ผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำในด้านต่างๆ ตลอดจนได้รับกำลังใจจากหลายบุคคล ผู้จัดทำตระหนักและซาบซึ้งในความกรุณาเป็นอย่างยิ่ง ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณยพร มากทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยผู้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และความช่วยเหลือทั้งในด้านการทำงานและการใช้ชีวิต รวมถึงคณาจารย์ในภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความรู้สูงสุดความสามารถเสมอมา ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวก และเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณเพื่อนนักศึกษาและครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการศึกษา

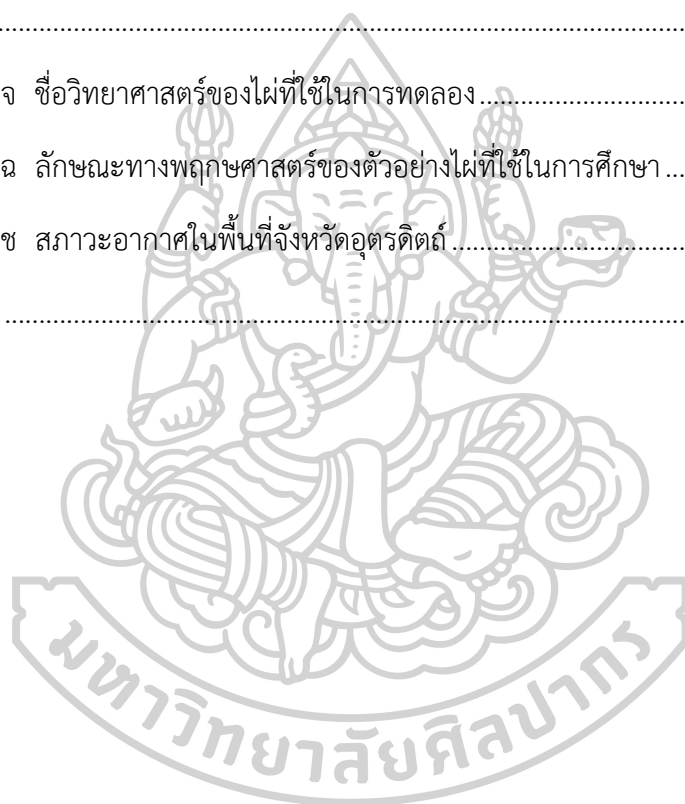
ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อผลิตผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ จากกองทุนสนับสนุนการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (ทุนหมายเลขที่ SRIF-JRG-2563-09) และทุนการศึกษาสำหรับนักศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตเพื่อเป็นผู้ช่วยวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2563 รวมถึงบุคคลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่ได้กล่าวนามทั้งหมด ข้าพเจ้าขอขอบคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

นางสาว สิริริตา เกษมสุขไพศาล

สารบัญ

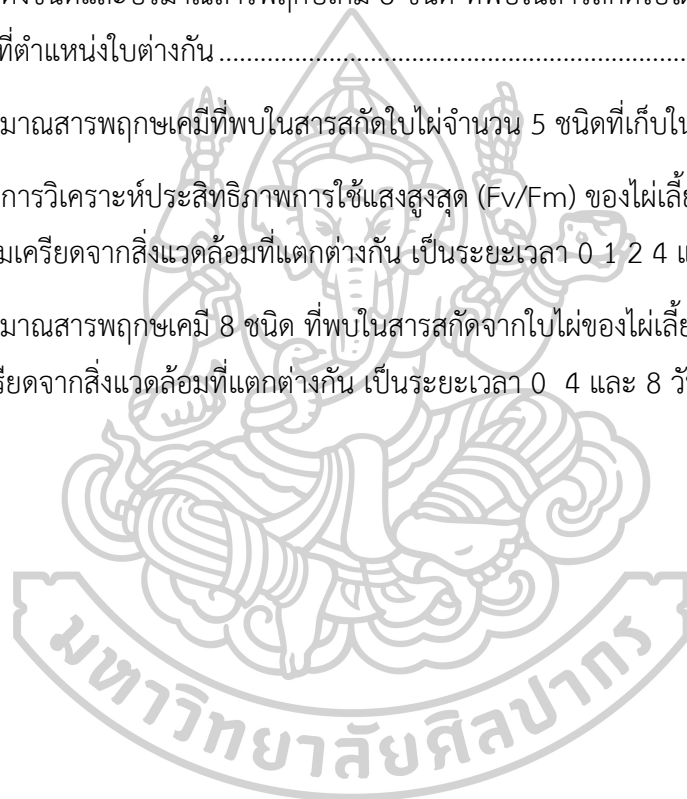
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	14
บทที่ 2 เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	41
การทดลองที่ 1.....	45
การทดลองที่ 2.....	52
การทดลองที่ 3.....	56
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	61
การทดลองที่ 1.....	61
การทดลองที่ 2.....	68
การทดลองที่ 3.....	74
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	94
การทดลองที่ 1.....	94
การทดลองที่ 2.....	98
การทดลองที่ 3.....	102
สรุปผลการศึกษา.....	107

รายการอ้างอิง.....	2
ภาคผนวก	12
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	13
ภาคผนวก ข สีของสารมาตรฐานหลังเกิดปฏิกิริยาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานและการคำนวณ	17
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานของสารพฤษเคมี 8 ชนิด ในการวิเคราะห์ RP-HPLC	21
ภาคผนวก ง ความเข้มแสง อุณหภูมิ และความชื้นของบริเวณพื้นที่ทดลองปลูกไม้ของการทดลอง ที่ 3	22
ภาคผนวก จ ชื่อวิทยาศาสตร์ของไม้ที่ใช้ในการทดลอง.....	24
ภาคผนวก ฉ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตัวอย่างไม้ที่ใช้ในการศึกษา.....	25
ภาคผนวก ช สภาวะอากาศในพื้นที่จังหวัดอุดรดิตถ์.....	31
ประวัติผู้เขียน	32



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลักษณะทั่วไปและประโยชน์ของไม้ที่ใช้ศึกษา.....	23
ตารางที่ 2 แสดง gradient elution program ของ mobile phase ที่ใช้ในการทดลอง ดัดแปลง จาก Jin et al. (2011)	51
ตารางที่ 3 แสดงชนิดและปริมาณสารพิษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดใบไม้ปักกิ่งที่สกัดโดยใช้ วิธีการต่างกันที่ตำแหน่งใบต่างกัน	67
ตารางที่ 4 ปริมาณสารพิษเคมีที่พบในสารสกัดใบไม้จำนวน 5 ชนิดที่เก็บในฤดูหนาว	73
ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (Fv/Fm) ของไม้เลื้อย และไม้ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 1 2 4 และ 8 วัน	79
ตารางที่ 6 ปริมาณสารพิษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดจากใบไม้ของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลาม หลัง ได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน	93



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 กาบหุ้มลำ (culm sheath) และใบแท้ (foliage leaf) ของไผ่.....	21
รูปที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากไผ่.....	25
รูปที่ 3 ความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ.....	27
รูปที่ 4 กลุ่มของสารโพลีฟีนอล.....	31
รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากในใบไผ่.....	33
รูปที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ flavone C-glycoside ได้แก่ orientin (a), isoorientin (b), vitexin (c), และ isovitexin (d).....	35
รูปที่ 7 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 8 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid (CA), isoorientin (IO), orientin (O), vitexin (V), isovitexin (IV), ferulic acid (FA), luteolin (LU) และ apigenin (AP).....	37
รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของสารพฤษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดใบไผ่จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ B. arundinacea, B. vulgaris, D. strictus และ P. parvifolia.....	37
รูปที่ 9 ลักษณะใบไผ่ปักกิ่งที่ใช้ในการศึกษา ตัวเลขในรูปแสดงตำแหน่งใบ.....	45
รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิก (gallic acid).....	47
รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของฟลาโวนอยด์ (quercetin).....	47
รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox.....	49
รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay.....	50
รูปที่ 14 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 8 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid (CH), caffeic acid (CA), isoorientin (IO), orientin (O), p-coumaric acid (PA), vitexin (V), isovitexin (IV) และ apigenin (AP).....	51
รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิก (gallic acid) ของการทดลองที่ 2 ที่เก็บในฤดูร้อน (a) และฤดูหนาว (b).....	53

รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานของฟลาโวนอยด์ (quercetin) ของการทดลองที่ 2 ที่เก็บในฤดูร้อน (a) และฤดูหนาว (b)	54
รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานของการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ของการทดลองที่ 2 ที่เก็บในฤดูร้อน (a) และฤดูหนาว (b)	55
รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิก (gallic acid) ของการทดลองที่ 3.....	59
รูปที่ 19 กราฟมาตรฐานของฟลาโวนอยด์ (quercetin) ของการทดลองที่ 3.....	59
รูปที่ 20 กราฟมาตรฐานของการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ของการทดลองที่ 3.....	60
รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ของการทดลองที่ 3	60
รูปที่ 22 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (a) และฟลาโวนอยด์รวม (b) ของสารสกัดจากใบไม้ปักกิ่งที่สกัดโดยใช้วิธีการต่างกันในตำแหน่งใบต่างกัน	62
รูปที่ 23 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay แสดงผลในรูป IC ₅₀ (a) และ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (b) และวิธี FRAP assay (c) ของสารสกัดจากใบไม้ปักกิ่งที่สกัดโดยใช้วิธีการต่างกันในตำแหน่งใบต่างกัน.....	64
รูปที่ 24 แสดงโครมาโตแกรมของสารพิษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดใบไม้ปักกิ่งที่สกัดโดยใช้วิธีการต่างกันในตำแหน่งใบต่างกัน	66
รูปที่ 25 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (a) และฟลาโวนอยด์รวม (b) ของสารสกัดจากใบไม้ที่เก็บในฤดูกาลที่แตกต่างกัน	69
รูปที่ 26 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากใบไม้ ที่เก็บในฤดูกาลที่แตกต่างกัน	70
รูปที่ 27 โครมาโตแกรมของสารพิษเคมีที่พบในสารสกัดใบไม้จำนวน 5 ชนิดที่เก็บในฤดูหนาว ได้แก่ ไม้ข้าวหลามกาดแดง (a), ไม้ขางนวล (b), ไม้ขางหม่น (c), ไม้เลี้ยว (d), และไม้หางช้าง (e)...	71
รูปที่ 28 ลักษณะใบของใบไม้เลี้ยว หลังได้รับสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 2 4 และ 8 วัน.....	75
รูปที่ 29 ลักษณะใบของใบไม้ข้าวหลาม หลังได้รับสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 2 4 และ 8 วัน.....	76

รูปที่ 30 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (Fv/Fm) ของไม้เลื้อย (a) และไม้ข้าวหลาม (b) หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 1 2 4 และ 8 วัน 78

รูปที่ 31 ผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (a), คลอโรฟิลล์บี (b), คลอโรฟิลล์รวม (c), และแคโรทีนอยด์ (d) ของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 8 วัน.....81

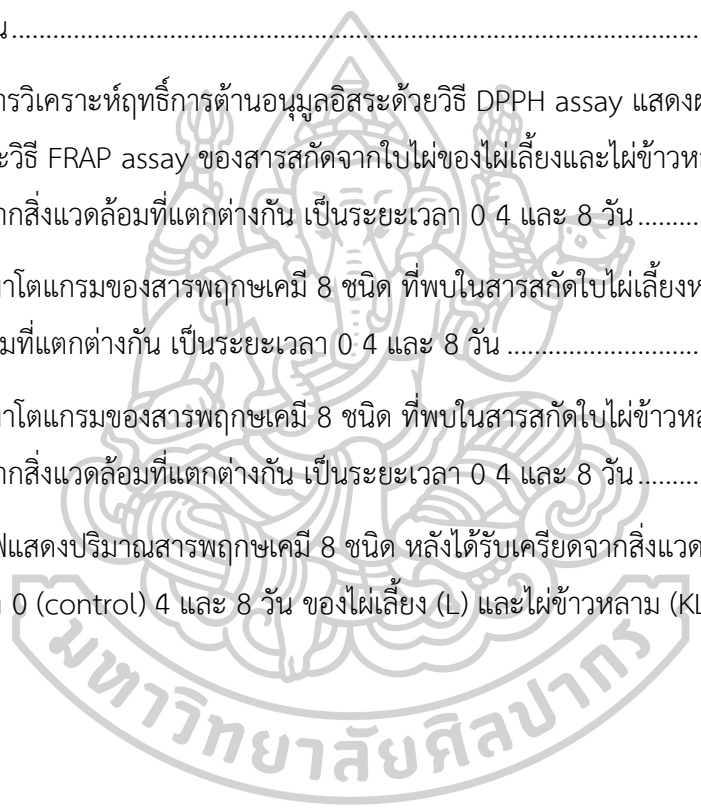
รูปที่ 32 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (a) และฟลาโวนอยด์รวม (b) ของสารสกัดจากใบไม้ของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน.....83

รูปที่ 33 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay แสดงผลในรูป IC₅₀ (a) และ TEAC (b) และวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากใบไม้ของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน85

รูปที่ 34 โครมาโตแกรมของสารพิษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดใบไม้เลื้อยหลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน87

รูปที่ 35 โครมาโตแกรมของสารพิษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดใบไม้ข้าวหลามหลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน89

รูปที่ 36 กราฟแสดงปริมาณสารพิษเคมี 8 ชนิด หลังได้รับเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 (control) 4 และ 8 วัน ของไม้เลื้อย (L) และไม้ข้าวหลาม (KL).....91



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การดำเนินชีวิตประจำวันไม่อาจหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยง อาทิ มลภาวะทางอากาศ ควันบุหรี่ รังสี ที่สามารถกระตุ้นการเกิด oxidative stress หรือภาวะความเครียดจากอนุมูลอิสระเข้าไปทำลายระบบต่าง ๆ ในร่างกาย (Langseth, 1995) อันเป็นสาเหตุของโรคหรือเพิ่มระดับความรุนแรงของโรคไม่ติดต่อเรื้อรังหลายชนิด เช่น โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดสมองตีบ โรคมะเร็ง (Dalle-Donne et al., 2006) แม้ว่าโดยปกติแล้วร่างกายมีกลไกการปกป้องตนเองจากอนุมูลอิสระ แต่การที่ยังต้องเผชิญกับสภาพมลภาวะในระหว่างทำกิจกรรมแต่ละวัน อาศัยเพียงกลไกของร่างกายจึงไม่เพียงพอต้องมีการได้รับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากภายนอกเพื่อยับยั้งการเกิด oxidative stress ซึ่งแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่พบได้ คือ พืช ผัก ผลไม้ เครื่องเทศ สมุนไพร หรือสารสกัดจากพืช (Anbudhasan et al., 2014; Stagos, 2019)

ไผ่ เป็นพืชในวงศ์หญ้า (Poacea) ที่มีความสำคัญทั้งกับระบบนิเวศและเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นพืชที่โตเร็ว มีการกระจายตัวอยู่ทั่วประเทศไทย โดยคาดว่าประเทศไทยมีไผ่ที่ขึ้นอยู่ตามธรรมชาติ 15-20 สกุล ประมาณ 80-100 ชนิด (สรารุช สังข์แก้ว และคณะ, 2554) และจากรายงานการนำเข้าและส่งออกของกรมป่าไม้ ในปี 2550 พบว่า ไผ่มีมูลค่าการแปรรูปภายในประเทศประมาณ 1,400 ล้านบาท และส่งออกไม่ต่ำกว่า 1,000 ล้านบาท (ศูนย์ฝึกอบรมวนศาสตร์ชุมชนแห่งภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก, 2557) การใช้ประโยชน์จากไผ่ส่วนมากเป็นการบริโภคหน่อไม้ และตัดลำเพื่อการแปรรูปในเชิงอุตสาหกรรม แต่จากความรู้ในปัจจุบันทำให้เห็นถึงศักยภาพว่าไผ่เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่สำคัญ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ 2 กลุ่มที่พบเป็นส่วนประกอบหลักในสารสกัดใบไผ่ คือ กรดฟีนอลิกหลายชนิด เช่น ferulic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid และกลุ่มสารประกอบฟลาโวนอยด์ เช่น apigenin และ rutin (Gagliano et al., 2021; Nirmala et al., 2018) โดยเฉพาะฟลาโวนอยด์กลุ่มที่มีฤทธิ์ทางเภสัชกรรมสูง คือ flavones C-glycoside จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ orientin, isoorientin, vitexin และ isovitexin (Wang et al., 2012) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว การศึกษาในปัจจุบันจึงมีการให้ความ

สนใจนำไผ่ไปใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรมมากขึ้น และการบริโภคผลิตภัณฑ์จากไผ่เป็นประจำจึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งของการดูแลสุขภาพ ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากอนุมูลอิสระ (Goyal et al., 2017)

อย่างไรก็ตาม ในด้านปัจจัยภายใน เช่น ชนิดของไผ่ (genotypes) หรือตำแหน่งใบที่ต่างกัน ก็มีการสะสมสารพฤกษเคมี (phytochemical) ดังที่กล่าวมาข้างต้นในปริมาณไม่เท่ากัน (Mansi et al., 2020; Wang et al., 2012; เพ็ญญา การะเวก และคณะ, 2562) และด้านปัจจัยภายนอก เช่น ฤดูกาลเก็บเกี่ยวหรือความเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (abiotic stress) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศที่ทวีความรุนแรงขึ้นทั่วโลก ทำให้พืชไม่สามารถหลีกเลี่ยงการเผชิญความเครียดได้ ล้วนเป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อการสะสมสารสำคัญของพืช (Akula & Ravishankar, 2011; Devireddy et al., 2021; Ni et al., 2014) ที่กล่าวมา นอกจากนี้ยังมีปัจจัยในเรื่องของวิธีการสกัด และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ซึ่งจะส่งผลต่อชนิด ปริมาณ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากไผ่อีกด้วย (Karawak et al., 2020; Zhu et al., 2018) ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนีจึงสนใจศึกษาผลของวิธีการสกัด และปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อชนิดและปริมาณของสารพฤกษเคมีที่พบในสารสกัดไผ่ รวมถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยในการศึกษานี้จะศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม และวิเคราะห์ชนิดของสารพฤกษเคมีในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ที่พบในไผ่โดยวิธี Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ในสารสกัดจากไผ่ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างชนิด และมาจากตำแหน่งใบย่อยที่ต่างกัน จากนั้นเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารที่ได้จากไผ่ที่เก็บในฤดูกาลที่แตกต่างกัน รวมถึงจากไผ่ที่ได้รับปัจจัยความเครียดต่างกัน 4 แบบ ได้แก่ ความเค็ม (salinity) ความเป็นกรด (pH) โลหะหนักสังกะสี (zinc) และการขาดน้ำ (drought) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการส่งเสริมการใช้ส่วนประกอบต่าง ๆ ของไผ่ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดของตัวทำละลายและวิธีสกัดต่อปริมาณสารฟุกุซเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไผ่ที่สกัดจากตำแหน่งใบที่แตกต่างกัน
2. เพื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารฟุกุซเคมีในสารสกัดใบไผ่จากใบไผ่ที่เก็บในฤดูกาลที่แตกต่างกัน
3. เพื่อศึกษาผลของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (abiotic stress) ได้แก่ ความเค็ม (salinity) ความเป็นกรด (pH) โลหะหนักสังกะสี (zinc) และการขาดน้ำ (drought) ต่อปริมาณสารฟุกุซเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบไผ่



3. ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบไม้ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน คือ น้ำ 60% เอทานอล และสกัดด้วยน้ำตามวิธีการชงชาในอัตราส่วนไม้ 1.0 และ 0.1 กรัมต่อตัวทำละลาย 10 มิลลิตร จากตำแหน่งใบที่แตกต่างกัน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ใบม้วน ตำแหน่งใบที่ 1-2 ตำแหน่งใบที่ 3-4 ตำแหน่งใบที่ 5-6 ตำแหน่งใบที่ 7-8 และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีของสารสกัดใบไม้ ด้วยวิธี RP-HPLC โดยใช้ไม้ปักกิ่ง (*Dendrocalamus sp.*) เป็นตัวแทนในการศึกษา

2. ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไม้จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ ไม้ข้าวหลามกาบแดง (*Schizostachyum sp.*) ไม้ชางนวล (*Dendrocalamus membranaceus* Munro) ไม้ชางหม่น (*Dendrocalamus sericeus* Munro.) ไม้ด้ามขวาน (*Dendrocalamus sp.*) ไม้โดนหวาน (*Bambusa cf. burmanica* Gumble) ไม้โปกพม่า (*Dendrocalamus sp.*) ไม้มันหมู (*Dendrocalamus copelandii* (Gamble ex Brandis) N.H. Xia & Stapleton) ไม้แม่ตะวอ (*Dendrocalamus copelandii*) ไม้ยักษ์ (*Dendrocalamus giganteus* Munro) ไม้เลี้ยง (*Thyrsocalamus liang* Sungkaew & W.L. Goh) ไม้หางช้าง (*Bambusa oliveriana* Gamble) ที่เก็บในฤดูร้อน (มีนาคม) และฤดูหนาว (ธันวาคม) และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารพฤษเคมี โดยวิธี RP-HPLC

3. ศึกษาผลของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (abiotic stress) ได้แก่ ความเค็ม (salinity) ความเป็นกรด (pH) โลหะหนักสังกะสี (zinc) และการขาดน้ำ (drought) ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบไม้ 2 ชนิด คือ ไม้ข้าวหลาม (*Schizostachyum pergracile* (Munro) R.B. Majumdar) และ ไม้เลี้ยง (*Thyrsocalamus liang* Sungkaew & W.L. Goh) และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารพฤษเคมี โดยวิธี RP-HPLC

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไผ่ รวมถึงแนวทางการเลือกตัวทำละลาย วิธีการสกัด และตำแหน่งใบย่อยที่เหมาะสมที่ใช้สกัดสารสกัดจากใบไผ่เพื่อให้ได้สารสำคัญและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากสารสกัดใบไผ่ต่อไป

2. ทราบฤดูกาลที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวผลผลิตใบไผ่ที่ให้ปริมาณสารสำคัญและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด ซึ่งอาจช่วยให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูงขึ้น

3. ทราบถึงผลกระทบของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกต่อการสะสมสารฟฤกษเคมีและการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบไผ่ ซึ่งความรู้ที่ได้อาจนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตไผ่ให้มีคุณสมบัติสะสมสารสำคัญสูงขึ้น เป็นผลดีต่อการนำไปเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์จากไผ่ รวมถึงเป็นข้อมูลความรู้พื้นฐานเพื่อนำไปต่อยอดใช้ประโยชน์อื่น ๆ ได้ต่อไป



บทที่ 2

เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ไม้

ไม้ จัดอยู่ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว วงศ์หญ้า (Poacea) วงศ์ย่อยไม้ (Subfamily Bambusoideae) ส่วนที่โดดเด่นและมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย คือ ลำไม้ (culms) ที่มีลักษณะเป็นข้อปล้อง คล้ายกับการมีเนื้อไม้ (woody bamboo) ทำให้แตกต่างจากหญ้าชนิดอื่น ๆ แม้อยู่ในวงศ์เดียวกัน ไม้มีระบบการเจริญเป็นกิ่ง (branch complement) ที่ซับซ้อนและแข็งแรง เจริญเติบโตเป็นกอหรือเป็นลำเดี่ยว มักมีขนาดสูงใหญ่ โตเร็ว โดยไม้บางชนิดสามารถเจริญเติบโตสูงสุดได้ถึง 40 เมตรและบางชนิดสามารถมีอัตราการเจริญเติบโตได้ถึงวันละ 50 เซนติเมตร ไม้มีการแพร่กระจายอยู่เกือบทุกภูมิภาคทั่วโลก ยกเว้นในทวีปยุโรป ขั้วโลกเหนือ และขั้วโลกใต้ และสำหรับประเทศไทยคาดว่ามีไม้ที่ขึ้นอยู่ตามธรรมชาติทั้งสิ้น 15-20 สกุล ประมาณ 80-100 ชนิด พบมากบริเวณป่าเบญจพรรณ หรือป่าผสมผลัดใบ และป่าดิบชื้น (สราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554)

1.1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของไม้

เหง้า (rhizome) หน่อและลำไม้ (culm shoot and culm) กิ่ง (branch) ใบ (leaf) และดอก (flower or floret) เป็นส่วนประกอบซึ่งมีความสำคัญต่อการจำแนกชนิดของไม้ มีลักษณะโดยสังเขปดังนี้

เหง้า คือ ส่วนลำต้นใต้ดิน ทำหน้าที่ในการค้ำจุน สะสมอาหาร และแตกเหง้าใหม่เพื่อพัฒนาเป็นหน่อต่อไป การเจริญเติบโตของเหง้าไม้สามารถใช้จำแนกชนิดของไม้ได้ โดยการเจริญของเหง้าไม้สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มหลัก คือ การเจริญของเหง้าแบบแตกกอ (sympodial) เหง้าหรือลำใหม่จะแตกออกจากตาข้างของเหง้าเดิม ไม้ชนิดที่มีการเจริญด้วยระบบนี้ลักษณะกอจะค่อนข้างแน่น ลำไม้ชิดติดกัน เช่น สกุลไผ่ป่า (*Bambusa bambos*) ไผ่ตง (*Dendrocalamus asper*) และกลุ่มที่มีการเจริญของเหง้าแบบลำเดี่ยว (monopodial) โดยแม้เหง้าหรือลำใหม่จะแตกออกจากตาข้างของเหง้าเดิมเช่นเดียวกับระบบเหง้าแบบกอ แต่มีเพียงบางตาที่สามารถพัฒนาเป็นเหง้าใหม่ได้ ทำให้ไม้ชนิดที่มีระบบรากแบบนี้ลำจะอยู่ค่อนข้างห่างกันเช่น สกุลไผ่ญี่ปุ่น (*Phyllostachys Siebold & Zucc.*)

หน่อและลำไผ่ หน่อไผ่ เป็นส่วนที่ต่อมาจะพัฒนาเป็นลำ มีกาบหุ้มอยู่มิด ลักษณะรูปทรง และรายละเอียดแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดไผ่ และส่วนลำไผ่ที่ลักษณะคล้ายกับการมีเนื้อไม้ประกอบด้วย ส่วนข้อ (node) และส่วนที่อยู่ระหว่างข้อ เรียกว่า ปล้อง (internode) ความหนาและลักษณะพิเศษของปล้อง เช่น การมีผงแป้ง สีส้น จะแตกต่างกันในไผ่แต่ละชนิดหรือสกุล ทำให้สามารถจำแนกชนิดของไผ่ได้

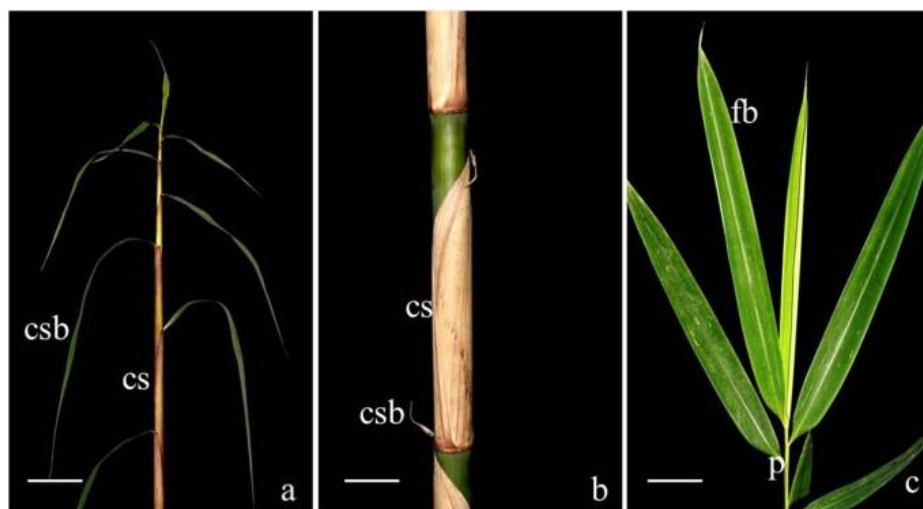
กิ่ง ระบบการเจริญของกิ่งที่ซับซ้อน เป็นลักษณะหนึ่งที่ทำให้ไผ่แตกต่างจากหญ้าซึ่งเป็นพืชในวงศ์เดียวกัน โดยบนลำไผ่ที่บริเวณข้อจะประกอบด้วยตาข้างที่อยู่ภายในใบหุ้มตา (prophyll) รูปร่างสามเหลี่ยมหรือหยดน้ำ ตาข้างนี้เป็นส่วนที่จะพัฒนากลายเป็นกิ่งใหม่ต่อไป ไผ่บางชนิดมีตาข้างที่มีขนาดเล็ก ๆ หลายตา หรือบางชนิดมีตาข้างเดียว แต่มีการเจริญเป็นกิ่งหลักแล้วแตกแขนงเป็นกิ่งรองหลายกิ่งในภายหลัง

ใบ ใบไผ่สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ ใบหุ้มตา และใบที่ข้อ โดยใบที่ข้อนั้นมีรูปร่างหลายแบบและมีชื่อเรียกตามตำแหน่งที่อยู่ อาทิ กาบหุ้มลำ (culm sheath) พบที่บริเวณข้อของลำไผ่ และใบแท้ (foliage leaf) คือ ใบสีเขียวที่อยู่บริเวณข้อตามกิ่ง (รูปที่ 1)

ดอก มีลักษณะเป็นช่อดอกย่อยเทียม (pseudospikelet) โดยกลีบดอกของไผ่เป็นเพียงเยื่อบาง ๆ ไม่มีสีสันโดดเด่น และเนื่องจากดอกไผ่มีขนาดค่อนข้างเล็กจึงเรียกว่า ดอกย่อย (floret) หุ้มด้วยใบประดับ 2 ชั้น สามารถพบได้ทั้งแบบสมบูรณ์เพศและเพศเดียว ดอกย่อยเรียงสลับสองแถวอยู่บนแกนช่อดอก (rachilla) ด้านล่างของช่อดอกย่อยมีกาบหรือใบประดับ เรียกว่า กลุม (glume) รองรับอยู่ โดยช่อดอกอาจไม่มีกลุมไปจนถึงมีหลายกลุมรองรับขึ้นอยู่กับชนิดไผ่ โดยส่วนประกอบทั้งหมดนี้รวมเรียกว่า ช่อดอกย่อย (spikelet) ใต้กลุมมีใบประดับรองรับตา (bract subtending bud) รองอยู่ ซึ่งมักมีตาที่จะเจริญเป็นช่อดอกย่อยอันต่อไป เกิดเป็นก้อนช่อดอกกระจุก เรียกว่า ช่อดอกย่อยเทียม แต่อย่างไรก็ตามช่อดอกย่อยไผ่ที่ประกอบด้วยหลายดอกนั้น จะมีเพียงดอกเดียวที่ติดผล รูปร่างผลขนาดเล็กคล้ายเป็นเมล็ด รู้จักกันในชื่อ ขุยไผ่ สามารถนำไปหุงกินแทนข้าว (สราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554)

ลักษณะการเจริญเติบโตของไผ่ คือ หน่อไผ่จะเจริญทางความสูงเต็มที่ภายในฤดูเดียว โดยเริ่มเจริญเติบโตในช่วงต้นฤดูฝนจนสูงเต็มที่ตอนสิ้นสุดฤดูฝน จากนั้นจึงมีการพัฒนาส่วนอื่น ๆ เช่น การ

แตกกิ่ง แขนง และใบ เพื่อเตรียมการสะสมอาหารต่อไป (ศูนย์ฝึกรวมวงวนศาสตร์ชุมชนแห่งภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก, 2557)



รูปที่ 1 กาบหุ้มลำ (culm sheath) และใบแท้ (foliage leaf) ของไผ่
 หมายเหตุ: ไผ่ *Fargesia yunnanensis* Hsueh & T.P.Yi โดยส่วนประกอบต่าง ๆ แทนด้วยชื่อและ
 สัญลักษณ์ ดังนี้ (a,b) กาบหุ้มลำ (culm sheath, cs) และแผ่นใบกาบหุ้มลำ (culm sheath blade,
 csb) (c) แผ่นใบจริง (foliage leaf blade, fb) และก้านใบ (petiole, p) ที่มา: Wang (2017)

1.1 ความสำคัญและประโยชน์ของไผ่

ไผ่เป็นทรัพยากรที่มีความสำคัญต่อประเทศไทย เป็นพืชที่โตเร็ว มีรอบการตัดที่สั้น และทุก
 ส่วนของไผ่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างอเนกประสงค์ โดยในด้านเศรษฐกิจไผ่ทุกชนิดจัดเป็น
 หนึ่งในไม้มีค่า 58 ชนิด ตามกฎกระทรวง มาตรา 8(6) แห่งพระราชบัญญัติหลักประกันทางธุรกิจ
 พ.ศ. 2558 เป็นพืชที่สามารถนำมาใช้เป็นหลักประกันทางธุรกิจได้ (เทคโนโลยีชาวบ้าน, 2562)
 ปัจจุบันแนวโน้มความต้องการไผ่ภายในประเทศเพิ่มขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้ในด้านเกษตรกรรม
 การเพาะเลี้ยง การประมง อย่างไรก็ตามในด้านข้อมูลมูลค่าทางเศรษฐกิจของไผ่และผลิตภัณฑ์จากไผ่
 นั้นยังไม่ชัดเจน แต่จากข้อมูลโดยกรมป่าไม้ในปีพุทธศักราช 2550 มีการรายงานถึงส่วนของหน่อไม้ไว้
 ว่ามีมูลค่าการแปรรูปภายในประเทศประมาณ 1,400 ล้านบาท และมีมูลค่าการส่งออกไม่ต่ำกว่า
 1,000 ล้านบาท ส่วนผลิตภัณฑ์จากไม้ไผ่ มีมูลค่าการส่งออกสู่ตลาดต่างประเทศกว่า 130 ล้านบาท
 (ศูนย์ฝึกรวมวงวนศาสตร์ชุมชนแห่งภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก, 2557)

การนำไฟไปใช้ประโยชน์นั้นมีมาอย่างยาวนานคู่กับวิถีชีวิตของผู้คน โดยไฟสามารถนำไปใช้ได้ทั้งในทางตรง เช่น การรับประทานหน่อ การใช้ลำไฟเพื่อเป็นวัสดุก่อสร้าง การปลูกเพื่อประดับตกแต่ง หรือการนำไปใช้ในทางอ้อม เช่น การสร้างเป็นผลิตภัณฑ์แปรรูป ไม่ว่าจะเป็น กระจาด เครื่องเรือน เครื่องใช้ต่าง ๆ หรือการปลูกไฟเพื่อฟื้นฟูป่า เพราะใบไฟที่ร่วงสู่พื้นสามารถช่วยเพิ่มอินทรีย์วัตถุให้กับดิน ระบบรากที่อึดแน่นแข็งแรงจะช่วยป้องกันดินถล่ม และไฟยังมีความสามารถในการผลิตก๊าซออกซิเจนได้มากกว่าต้นไม้ทั่วไป (สรารุส สังข์แก้ว และคณะ, 2554)

ในด้านการบริโภค ไฟจัดเป็นพืชอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการชนิดหนึ่ง หน่อไม่มีการสะสมวิตามิน และแร่ธาตุหลายชนิด (Nirmala et al., 2018) รวมถึงมีใยอาหารสูง สามารถนำไปประกอบอาหารได้หลากหลายทั้งของคาวและของหวาน หน่อและใบของไฟสามารถเป็นแหล่งอาหารของสัตว์ เช่น แพนด้า ช้างป่า กระต๊อง รวมถึงเมล็ดไฟ หรือ ชูยไฟ ก็มีปริมาณแป้งสูง สามารถหุงกินแทนข้าวได้

ในเชิงอุตสาหกรรม ไฟสามารถนำไปผ่านการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องมือเครื่องใช้ เครื่องจักสาน เฟอร์นิเจอร์ และเป็นวัสดุที่นิยมใช้ในการก่อสร้าง เนื่องจากลำไฟมีความแข็งแรง ยืดหยุ่น น้ำหนักเบา และราคาถูก สามารถเข้าถึงได้ง่าย โดยการเลือกใช้ไฟให้เหมาะสมกับงานแต่ละอย่างขึ้นอยู่กับชนิดของไฟ เช่น การทำเครื่องจักสานจะเลือกไฟที่เนื้อไม้เหนียว แข็งแรง และยืดหยุ่น การทำเฟอร์นิเจอร์จะต้องเลือกไฟที่มีเนื้อหนาลึบค่อนข้างตัน เป็นต้น

1.2 ชนิดของไฟที่ใช้ในการศึกษา

ไฟที่ใช้ในการศึกษาประกอบไปด้วยไฟหลายชนิด ซึ่งเป็นไฟที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ และเป็นที่นิยมของเกษตรกร เนื่องจากสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย และระบุชนิดที่ใช้ศึกษาโดยใช้รูปวิธานจาก สรารุส สังข์แก้ว และคณะ (2554) (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2)

ตารางที่ 1 ลักษณะทั่วไปและประโยชน์ของไม้ที่ใช้ศึกษา

ชนิด	ลักษณะทั่วไปและประโยชน์
ไม้ข้าวหลาม <i>(Schizostachyum pergracile</i> <i>(Munro) R.B. Majumdar)</i>	เป็นไม้ขนาดกลาง เนื้อบาง ลำอ่อนอายุ 5-7 เดือน ใช้ทำกระบอกข้าวหลาม ลำ ใช้ก่อสร้าง เครื่องจักสานและหัตถกรรม เป็นภาชนะหุงต้มและปรุงอาหาร หน่อไม่นิยมรับประทานเพราะมีรสขม นิยมปลูกเป็นไม้ประดับหรือปลูกตาม บ้านเพราะมีชื่อเป็นสิริมงคล (สรารุช สังข์แก้ว และคณะ, 2554)
ไม้ข้าวหลามกาบแดง <i>(Schizostachyum sp.)</i>	เป็นไม้ประเภทเหง้ากอที่มีขนาดเล็กถึงปานกลาง เส้นผ่านศูนย์กลางลำ 2.5-8 เซนติเมตร ลำมีนวลขาวปกคลุม กาบหุ้มลำร่วงตามกาลเวลาหรือร่วงค่อนข้าง ช้า ลำใช้ก่อสร้าง ทำฝาบ้าน ทำเครื่องจักสาน ในบางพื้นที่นิยมนำลำไปทำ ข้าวหลาม หน่อรับประทานได้ แต่ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากมีรสขม (สรารุช สังข์ แก้ว และคณะ, 2554)
ไม้ชางนวล <i>(Dendrocalamus</i> <i>membranaceus Munro)</i>	เป็นไม้ประเภทเหง้ากอขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ 5-12 เซนติเมตร ลำตรง เนื้ออ่อน กอแน่น ลำอ่อนมีนวลสีขาวปกคลุมหนาแน่น ลำ แก่สีเขียวอ่อน สามารถใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ทั้งอุตสาหกรรมจักสาน การ ก่อสร้าง ทำเยื่อกระดาษ ตะเกียบ หน่อรับประทานได้ (สรารุช สังข์แก้ว และ คณะ, 2554; ัญญพิสิษฐ์ พวงจิก และคณะ, 2559)
ไม้ด้ามขวาน หรือ ไม้ต้น <i>(Dendrocalamus sp.)</i>	เป็นไม้ประเภทเหง้ากอที่มีขนาดเล็กถึงปานกลาง เส้นผ่านศูนย์กลางลำ 3-5 เซนติเมตร ใบดก หนาแน่น ลักษณะลำรูปทรงกลมหนาเกือบตัน เหนียวและ ทนทาน นิยมใช้ในการก่อสร้าง หน่ออ่อนสามารถรับประทานได้ (ไทยรัฐ ออนไลน์, 2560)
ไม้โดนหวาน หรือ ไม้บงหวาน <i>(Bambusa cf. burmanica</i> <i>Gumble)</i>	เป็นไม้ประเภทเหง้ากอ ขนาดเล็กถึงขนาดกลาง เส้นผ่านศูนย์กลางลำ 3.5-10 เซนติเมตร บางครั้งลำอาจตัน ลำอ่อนมีนวลสีขาวปกคลุม แต่ละข้อมีหลายกิ่ง หน่อมีรสหวาน สามารถรับประทานได้ (สรารุช สังข์แก้ว และคณะ, 2554)

ตารางที่ 1 ลักษณะทั่วไปและประโยชน์ของไม้ที่ใช้ศึกษา (ต่อ)

ชนิด	ลักษณะทั่วไปและประโยชน์
ไผ่ชางหม่น (<i>Dendrocalamus sericeus</i> Munro.)	เป็นหนึ่งในไม้เศรษฐกิจชนิดที่นิยมปลูกของประเทศไทย มีลักษณะลำต้นตรง ยาว แข็งแรง เนื้อไม้หนา สามารถใช้ในการทำเครื่องเรือน อุตสาหกรรมการก่อสร้าง หรือใช้เพื่อผลิตถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) ได้ (Chaowana et al., 2015; Talabgaew & Laemlaksakul, 2007)
ไผ่ปักกิ่ง (<i>Dendrocalamus</i> sp.)	เป็นไผ่ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ที่มีการนำเข้ามาจากต่างประเทศ ปลูกง่าย ให้น้ำหนักเกือบตลอดทั้งปี เส้นผ่านศูนย์กลางลำ 7-15 เซนติเมตร เนื้อหนา ลำต้นสีเขียวเข้ม ใบมีขนาดใหญ่ใช้ห่ออาหารได้ หน่อสีน้ำตาลอมม่วง นิยมนำมารับประทานทั้งในรูปแบบสดและแปรรูปเป็นแบบแห้ง ลำใช้ทำเส้นใย ตะเกียบ (ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก และคณะ, 2556)
ไผ่โปกพม่า หรือ ไผ่ยักษ์พม่า (<i>Dendrocalamus</i> sp.)	เป็นไผ่ขนาดใหญ่ ลำอ่อนมีแป้งขาวคลุมบาง ๆ อาจมีเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 12 เซนติเมตร เนื้อแข็งหนา และเหนียว ใช้ในการก่อสร้าง หน่อมีขนาดใหญ่ สีม่วงอมดำ สามารถรับประทานได้ (ผดุงศักดิ์ คงศิริธวัช, 2562)
ไผ่มันหมู (<i>Dendrocalamus copelandii</i> (Gamble ex Brandis) N.H. Xia & Stapleton)	เป็นไผ่ประเภทเหง้ากอนขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ 8-20 เซนติเมตร ลำตรงอัดเป็นกอนแน่น เนื้อค่อนข้างบาง ลำอ่อนมีนวลสีขาวปกคลุมหนา กาบหุ้มลำติดนาน ลำแก่สีเขียวอมเทา สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการก่อสร้าง ทำเฟอร์นิเจอร์ รางน้ำ หน่อรับประทานได้ (สรารุช สังข์แก้ว และคณะ, 2554; ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก และคณะ, 2559)
ไผ่แม่ตะวอ (<i>Dendrocalamus copelandii</i>)	เป็นไผ่ขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ 15-20 เซนติเมตร ลำอ่อนมีแป้งสีขาวติดที่ลำ กาบหุ้มลำหลุดยาก หน่อสามารถรับประทานได้ มีขนาดใหญ่ เนื้อเยื่อ สีเหลืองอ่อน ราคาคดี (ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก และคณะ, 2559)
ไผ่ยักษ์ (<i>Dendrocalamus giganteus</i> Munro)	เป็นไผ่ประเภทเหง้ากอนขนาดใหญ่ สูงได้ถึง 20 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางลำ 20-30 เซนติเมตร ลำอ่อนมีนวลสีขาวปกคลุม ลำแก่สีเขียวหรือเขียวอมเทา ใบมีขนาดใหญ่ กาบหุ้มลำโดยทั่วไปมีสองสี ลำใช้ในการก่อสร้าง เฟอร์นิเจอร์ รางน้ำ หน่อสามารถรับประทานได้แม้มีความสูง 1-2 เมตร (สรารุช สังข์แก้ว และคณะ, 2554)

ตารางที่ 1 ลักษณะทั่วไปและประโยชน์ของไม้ที่ใช้ศึกษา (ต่อ)

ชนิด	ลักษณะทั่วไปและประโยชน์
ไผ่เลี้ยง (<i>Thyrsoclamus liang</i> Sungkaew & W.L. Goh)	เป็นไผ่ประเภทเหง้ากอที่มีขนาดเล็กถึงปานกลาง เส้นผ่านศูนย์กลางลำ 3-5 เซนติเมตร เนื้อลำหนา พบปลูกทั่วทุกภาคในประเทศไทย สามารถใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง หน่อนำมาเป็นอาหาร ลำใช้ก่อสร้าง ไม้ค้ำยัน เฟอร์นิเจอร์ นิยมปลูกเป็นแนวรั้วเนื่องจากมีกอสวยงาม ลำสม้าเสมอไม่แน่น (สราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554)
ไผ่ทางช้าง (<i>Bambusa oliveriana</i> Gamble)	เป็นไผ่ประเภทเหง้ากอขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางลำ 3-7 เซนติเมตร เนื้อลำหนา ลำอ่อนมีขนและนวลสีขาวปกคลุม ลำแก่สีเขียวหรือเขียวเข้มอมเทา กาบหุ้มลำร่วงช้า ลำใช้ในการก่อสร้าง ทำไม้ค้ำยัน สามารถปลูกเป็นไม้ประดับ (สราวุธ สังข์แก้ว และคณะ, 2554)



รูปที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากไผ่

หมายเหตุ: ภาพจาก Bamboo import (2020)

2. อนุมูลอิสระ

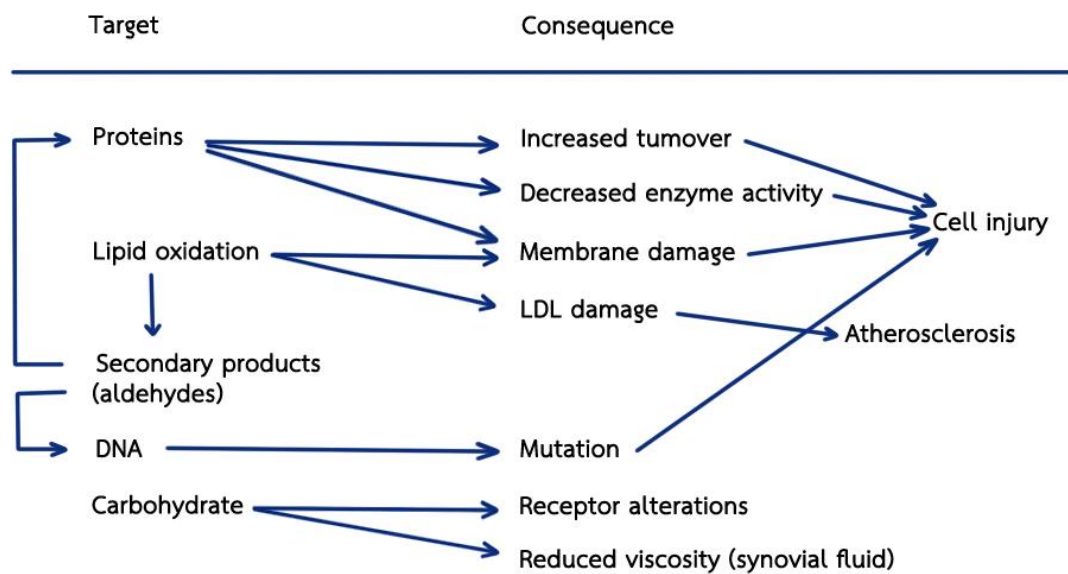
ในปัจจุบัน ที่ผู้คนทั่วโลกได้หันมาให้ความสนใจกับการรักษาสุขภาพมากขึ้น จึงมีงานวิจัยที่ศึกษาถึงที่มาและปัจจัยที่ก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพออกมาอย่างแพร่หลาย โดยหนึ่งในปัจจัยที่ผู้คนต่างให้ความสนใจเป็นอย่างมาก คือ อนุมูลอิสระ (free radical) เนื่องจากเป็นสาเหตุของความเสื่อมสภาพของร่างกายและผิวพรรณ และการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังหลายชนิด รวมถึงการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งมีกลไกการทำงานที่สามารถป้องกันและยับยั้งอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้

อนุมูลอิสระคือสารหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่อย่างน้อยหนึ่งอิเล็กตรอนภายในโมเลกุล ทำให้โมเลกุลขาดความเสถียรและมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลข้างเคียง ก่อให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาต่อไปจนกลายเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction)

ที่มาของอนุมูลอิสระเกิดจากปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก ปัจจัยภายใน คือ อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเองในร่างกาย โดยเกิดจากกระบวนการเผาผลาญสารอาหารในร่างกาย (metabolism) ที่ต้องอาศัยโมเลกุลของออกซิเจนในการให้อิเล็กตรอนในระหว่างขั้นตอนการทำปฏิกิริยาต่างๆ จึงเกิดเป็น reactive oxygen species (ROS) ชนิดต่าง ๆ และชนิดของ ROS ที่สำคัญ เช่น hydroxyl radical (HO), superoxide radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), oxygen singlet (1O_2), hypochlorite (ClO^-) และ nitric oxide radical (NO) (Langseth, 1995; Lobo et al., 2010) ส่วนปัจจัยภายนอก คือ อนุมูลอิสระที่ได้รับจากนอกร่างกาย โดยสามารถมีสาเหตุจากการพบเจอสถานะที่มีความเสี่ยงไปจนถึงการทำกิจกรรมในชีวิตประจำวันทั่วไป เช่น การได้รับรังสี UV ครันบูหรือมลภาวะ การสัมผัสกับเชื้อโรค โอโซน และอื่น ๆ (Bagchi & Puri, 1998; Butnariu & Samfira, 2012)

อนุมูลอิสระเป็นสารที่อันตรายต่อสุขภาพ เนื่องจากมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย อาทิ ไขมัน (Lipid) โปรตีน (Protein) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) และสารพันธุกรรม (nucleic acid) (Bagchi & Puri, 1998) ดังนั้นในกรณีที่ร่างกายไม่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระและมีการสะสมอนุมูลอิสระในร่างกายมากจนขาดความสมดุล จะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress หรือ ภาวะความเครียดที่เกิดจากอนุมูลอิสระเข้าไปทำลายระบบต่าง ๆ ในร่างกาย เซลล์

ทำงานผิดปกติ เนื้อเยื่อเสียหาย (รูปที่ 3) เป็นสาเหตุของความเสื่อมสภาพของร่างกายและผิวพรรณ รวมไปถึงโรคไม่ติดต่อเรื้อรังหลายชนิด อาทิ โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดสมองตีบ โรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น (Dalle-Donne et al., 2006; Warner et al., 2004)



รูปที่ 3 ความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

หมายเหตุ: ดัดแปลงจาก Langseth (1995)

3. สารต้านอนุมูลอิสระ

เนื่องจากร่างกายมีการสร้างอนุมูลอิสระในระหว่างกระบวนการเมตาบอลิซึม ดังนั้นจึงต้องมีกลไกที่ใช้เพื่อกำจัดหรือลดความเสียหายจากอนุมูลอิสระ โดยหนึ่งในกลไกที่สำคัญที่ร่างกายใช้คืออาศัยการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzyme) อาทิ glutathione peroxidases, catalase และ superoxide dismutases ซึ่งจะทำหน้าที่บางอย่างเพื่อลดอันตรายของอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutases สามารถเปลี่ยน ROS ชนิด superoxide radical ให้กลายเป็นโมเลกุลออกซิเจนกับ hydrogen peroxide ซึ่งเป็น ROS ชนิดที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาน้อยกว่า (Goyal et al., 2017) เป็นต้น นอกจากนี้แร่ธาตุบางชนิดก็มีส่วนสำคัญในการส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น selenium, copper, manganese และ zinc (Bagchi & Puri, 1998; Langseth, 1995) แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าร่างกายจะมีกลไกที่ใช้กำจัดอนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นเองแล้ว แต่จากการดำเนินชีวิตในปัจจุบันที่ไม่สามารถหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงซึ่งเป็นสาเหตุของอนุมูลอิสระต่าง ๆ ได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก เพื่อรักษาสมดุลของอนุมูลอิสระภายในร่างกาย และสามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่สะสมอยู่ออกไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) คือ สารที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนสูง สามารถป้องกันหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยกำจัดและลดปริมาณอนุมูลอิสระ ความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระเข้าไปทำลายระบบต่าง ๆ ในร่างกาย (Kumar, 2014) โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายชนิดและแต่ละชนิดก็มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระได้แตกต่างกัน ซึ่งกลไกต่าง ๆ ที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระ สามารถแบ่งได้ 4 แบบ ดังนี้ (Choe & Min, 2009)

1. Free radical scavenging คือ กลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น โดยสารต้านอนุมูลอิสระให้ไฮโดรเจนและอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้นโดยเมื่อสารต้านอนุมูลอิสระสูญเสียอิเล็กตรอนและกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่จะมีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิม และสามารถเกิดการรวมตัวกันกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่งได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เสถียร สารต้านอนุมูลอิสระที่มีกลไกประเภทนี้ เช่น phenolic compounds, flavonoids, phenolic acids, ubiquinone (coenzyme Q), carotenoids, ascorbic acids และ amino acids เป็นต้น

2. Metal chelating คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย เนื่องจากสามารถจับกับโลหะหนักที่มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ในร่างกายและกระตุ้นให้เกิด

อนุมูลอิสระ เช่น Fe^{2+} , Fe^{3+} และ Cu^{2+} โดยสารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น

3. Singlet oxygen quenching ($^1\text{O}_2$) คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์โดยการเปลี่ยน Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) ให้อยู่ในรูป triplet oxygen ($^3\text{O}_2$) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำงานโดยอาศัยกลไกนี้ เช่น tocopherols, carotenoids, curcumin, phenolics, urate และ ascorbate

4. Enzyme inhibitor เป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ อาทิสารประกอบ phenolics บางชนิด เช่น flavonoids, phenolic acid และ gallates ที่สามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กที่ทำหน้าที่เป็น cofactor ของเอนไซม์ lipoxygenase ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้

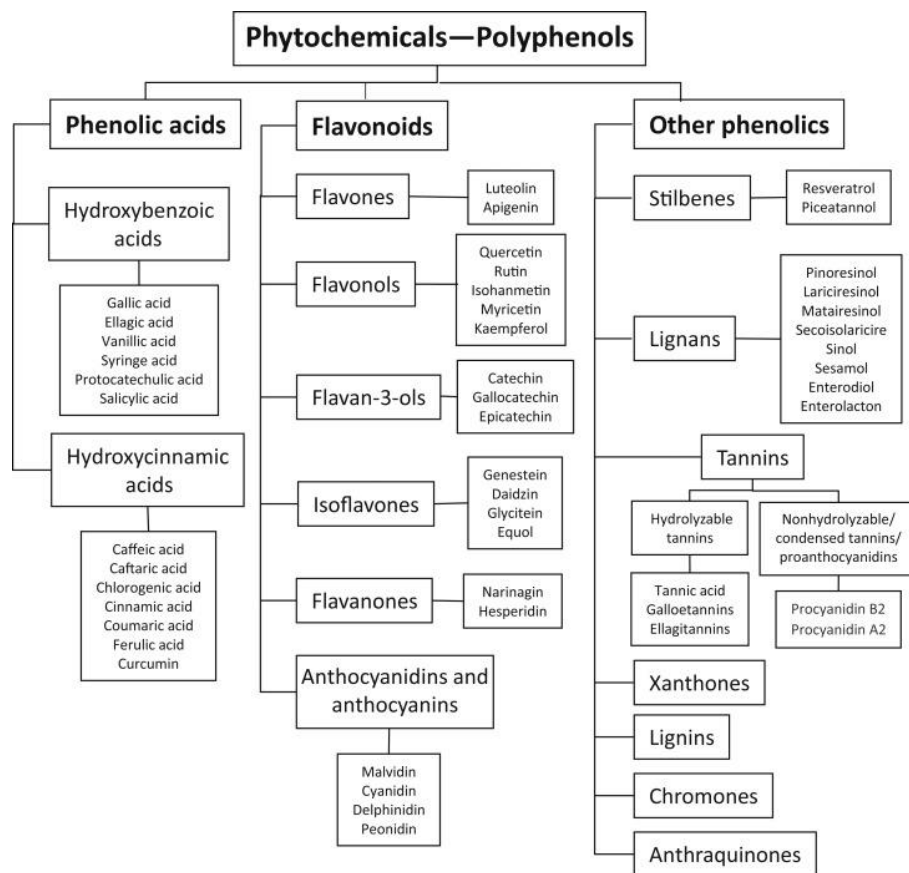
หลายงานวิจัยได้ให้ความสนใจและศึกษาเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยสารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งประเภทตามแหล่งที่มาได้ 2 ประเภท คือ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidant) โดยสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง รวมถึงทางเภสัชกรรมต่าง ๆ และชนิดที่เป็นที่นิยมมากคือสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ฟีนอลิก เช่น butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT) และ butylhydroxyquinone (TBHQ) เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วย conjugated ring และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) จึงทำให้มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระและเกิดความเสถียรได้ (Valenzuela & Nieto, 1996)

แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการสังเคราะห์นั้นยังคงมีข้อถกเถียงและกังวลถึงผลข้างเคียงในการใช้ ดังนั้นผู้คนจึงหันมาให้ความสนใจกับสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากแหล่งธรรมชาติซึ่งสามารถพบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช มากกว่า โดยเฉพาะสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่ได้จากสารสกัดพืช และสมุนไพรต่าง ๆ เนื่องจากไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม และมีความเชื่อมั่นในความปลอดภัย (Caleja et al., 2017) ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติที่เป็นที่รู้จัก เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิก เช่น แชนโธน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) (Anbudhasan et al., 2014) เป็นต้น

4. สารพฤกษเคมี

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) หมายถึง สารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ต่อสิ่งมีชีวิต โดยสามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้ทั้งเชิงบวกและเชิงลบ อาจมีฤทธิ์ในการรักษาหรือเป็นพิษขึ้นอยู่กับ ชนิด ปริมาณ (dose) หรือ ความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบนั้น แหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยในพืชจะอยู่ในรูปสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการป้องกันตัวเองหรือการส่งสัญญาณในพืช (Guaadaoui et al., 2014)

สารพฤกษเคมี (phytochemicals) คือสารเคมีที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เป็นสารทุติยภูมิที่พบได้ใน ผัก ผลไม้ ธัญพืช และพืชอาหารชนิดอื่น ๆ มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช ปกป้องพืชจากเชื้อจุลินทรีย์และแมลงศัตรูพืช รวมถึงความเครียดที่เกิดจากปัจจัยทางกายภาพ อาทิ รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) และอุณหภูมิ นอกจากนี้ สารพฤกษเคมียังเป็นสารที่กำหนดสีและรสชาติของพืช โดยพืชต่างชนิด ต่างอวัยวะ จะสามารถพบชนิดและปริมาณของสารพฤกษเคมีได้แตกต่างกัน และในสภาวะที่พืชเกิดความเครียดอาจทำให้พืชมีการสะสมสารพฤกษเคมีมากขึ้น โดยมีโพลีฟีนอล (polyphenols) ซึ่งเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่สุด (รูปที่ 4) มีโครงสร้างทางเคมีประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) (Martinez et al., 2017)



รูปที่ 4 กลุ่มของสารโพลีฟีนอล

หมายเหตุ: ภาพจาก Martinez et al. (2017)

พืชหลายชนิดมีการรายงานถึงการพบสารพฤกษเคมี และจากที่กล่าวมาข้างต้นว่าไผ่เป็นพืชที่มีความโดดเด่นในด้านการนำไปใช้เพื่อการบริโภคและการนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรม แต่นอกจากคุณประโยชน์ดังกล่าวแล้ว ไผ่ยังเป็นพืชที่สามารถนำมาใช้เพื่อการรักษาโรคได้ นานมาแล้วในประเทศจีน อินเดีย และประเทศในแถบตะวันออกเฉียงใต้ ได้มีการใช้ไผ่เป็นยารักษาโรคหลายชนิด เช่น แก้ไอ แก้ไข้ แก้อาการบวม น้ำ ความดันโลหิต เบาหวาน มะเร็ง และโรคอื่น ๆ (Gagliano et al., 2021; Goyal et al., 2017; Nirmala et al., 2018) และจากพื้นฐานความรู้ที่เกี่ยวข้องเนื่องมาจากภูมิปัญญาพื้นบ้านนี้ ต่อมาจึงได้มีการศึกษาและพบว่าไผ่เป็นหนึ่งในพืชที่เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติหลายชนิด โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นสารออกฤทธิ์หลักในไผ่ประกอบด้วยสาร 2 กลุ่ม คือ กลุ่มกรดฟีนอลิกและกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Gagliano et al., 2021; Nirmala et al., 2018)

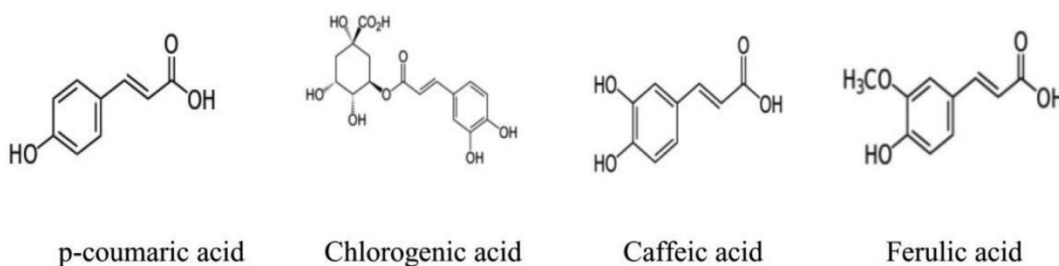
5. ฟีนอลิก

ฟีนอลิก (phenolic) เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ในทุก ๆ ส่วนของพืช มีบทบาทสำคัญในการสนับสนุนกลไกภายในพืช ด้านเชื้อโรค ป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต รวมถึงเป็นสารสีในพืช (Dai & Mumper, 2010) สามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยกลไกการออกฤทธิ์ของฟีนอลิก คือจะทำหน้าที่ดักจับอนุมูลอิสระด้วยการให้โมเลกุลไฮโดรเจน หรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ รวมถึงสามารถเปลี่ยน Singlet oxygen ให้อยู่ในรูป triplet oxygen และเข้าจับกับไอออนของเหล็กที่ทำหน้าที่เป็น cofactor ของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระได้ (Choe & Min, 2009) ดังนั้นจากความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากการต้านอนุมูลอิสระ ทำให้สารประกอบฟีนอลิกมีการนำไปใช้เป็นประโยชน์เพื่อการบำบัดรักษาโรคบางชนิด เช่น มะเร็ง หลอดเลือดหัวใจ หรือการนำไปเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เพื่อการยืดอายุ (Gagliano et al., 2021)

ส่วนสารประกอบฟีนอลิกในไม้ พบว่างานวิจัยส่วนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดไม้ กว่า 56% ของงานวิจัยมีการรายงานการพบสารประกอบฟีนอลิกเป็นส่วนประกอบของสารสกัด (Gagliano et al., 2021) ซึ่งกลุ่มฟีนอลิกชนิดที่มีรายงานว่าสามารถพบได้ในสารสกัดไม้ และมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid และ *p*-coumaric acid (รูปที่ 5) (Gong et al., 2016; Nirmala et al., 2018) ซึ่งจำนวนชนิด ปริมาณการสะสมของฟีนอลิกมีความแตกต่างกันไม่แต่ละชนิด ดังที่ปรากฏในตัวอย่างจากงานวิจัยบางส่วน ดังนี้

จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) โดย Gong และคณะ (2016) แสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกแต่ละกลุ่มดังที่กล่าวข้างต้นไม่เท่ากันเมื่อใช้ตัวทำละลายในการสกัดที่แตกต่างกันเนื่องจากคุณสมบัติความมีขี้ของสาร นอกจากนั้นแล้วในการศึกษาของ Jiang และคณะ (2019) ในกาบหน่อไม้ของไม้ *Phyllostachys praececox* พบว่าสามารถวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมได้ในช่วง 64.8-85.3 mg GAE/g DW เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลโดยอาศัยวิธี Ultrasonic-Assisted method และจากการศึกษาของ Goyal และคณะ (2017) ในสารสกัดจากไม้ *Bambusa balcooa* Roxb. ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมอยู่ที่ 219.96 mg GAE/g DW หรือในงานวิจัยของ Wróblewska

และคณะ (2019) ที่ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดจากใบไม้พื้นเมืองของ ประเทศบราซิลจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure., *Chusquea bambusoides* Rupr. ex Döll, *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure, *Chusquea meyeriana* Rupr. และ *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกค่าอยู่ในช่วง 43.64-87.81 mg GAE/g DW เมื่อมีการสกัดด้วย แอลกอฮอล์ผสมน้ำ ดังนั้นจึงสังเกตได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่วัดได้ใน สารสกัดจากใบไม้ ยังรวมไปถึงวิธีการสกัด วิธีการวัด และตัวทำละลายที่ใช้สกัดด้วย



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากในใบไม้
 หมายเหตุ: ดัดแปลงจาก Nirmala et al. (2018)



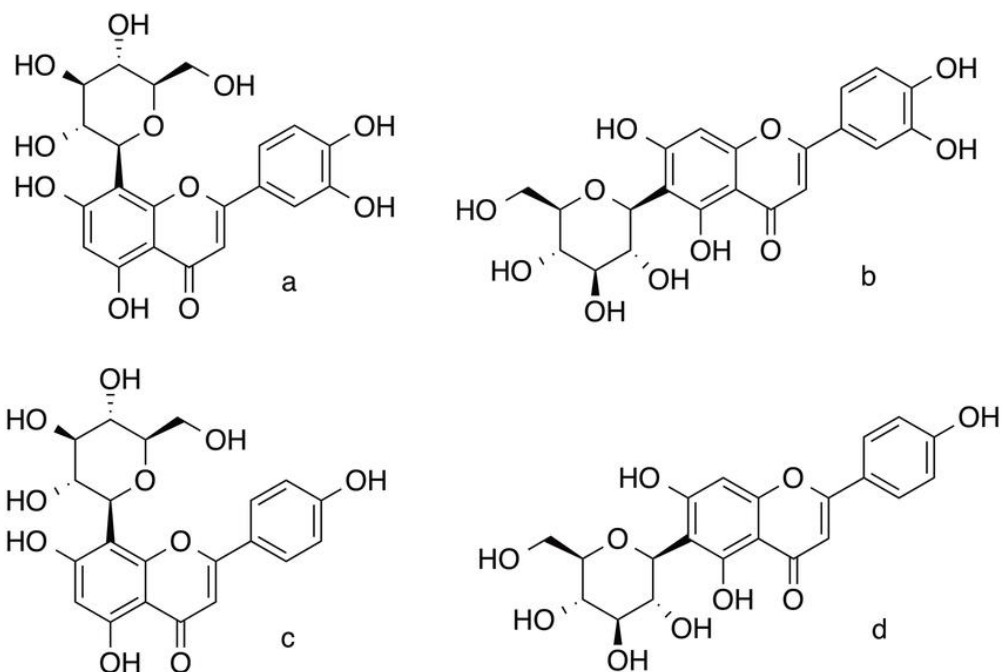
6. ฟลาโวนอยด์

ฟลาโวนอยด์ เป็น secondary metabolites กลุ่มใหญ่ในพืช สามารถพบฟลาโวนอยด์ได้ใน ผักและผลไม้ชนิดต่าง ๆ จัดเป็นสารธรรมชาติในกลุ่มของฟีนอลิกที่มีการรายงานถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก เนื่องจากโครงสร้างของฟลาโวนอยด์เป็นลักษณะโครงสร้างที่เหมาะสมในการทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ไม่ว่าจะเป็นการดักจับอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอนการเข้าจับกับโลหะและการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Choe & Min, 2009) และสามารถปกป้อง DNA จาก hydroxyl radical ปัจจุบันฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มักถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญของผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ยา และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่าง ๆ เนื่องจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการกลายพันธุ์ (mutation) และด้านการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสามารถในการต้านมะเร็งและโรคเรื้อรังอื่น ๆ ได้อีกด้วย (Panche et al., 2016)

ส่วนการศึกษาสารสกัดจากใบไผ่ นั้น จากการศึกษาของ Goyal และคณะ (2017) ในสารสกัดจากใบไผ่ *Bambusa balcooa* Roxb. ที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกัน คือ เอทานอล เมทานอล และน้ำ พบว่าผลของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีความแตกต่างกัน โดยจากการวัดปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในการสกัดใบไผ่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่ามีปริมาณอยู่ที่ 227.20 mg QE/g DW หรือในงานวิจัยของ Wróblewska และคณะ (2019) ที่พบปริมาณฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบ *Chusquea bambusoides* Rupr. ex Döll มีค่าสูงสุด คือ 6.44 mg QE/g DW เมื่อมีการสกัดด้วยแอลกอฮอล์ผสมน้ำ ดังนั้นปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดใบไผ่ นอกจากจะแตกต่างกันด้วยชนิดพันธุ์แล้ว ตัวทำละลายที่ใช้ วิธีการศึกษาก็ล้วนมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ซึ่งมีผลโดยตรงต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วย (Goyal et al., 2017; Mansi et al., 2020)

ในสารสกัดใบไผ่ ฟลาโวนอยด์เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกที่มีรายงานการพบมากที่สุด (Gagliano et al., 2021) โดยชนิดที่พบและมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง คือ apigenin, luteolin, tricetin และสารฟลาโวนอยด์กลุ่ม flavone C-glycosides ได้แก่ isoorientin, isovitexin, orientin และ vitexin (Nirmala et al., 2018) โดยเฉพาะสารฟลาโวนอยด์กลุ่ม flavone C-glycosides (รูปที่ 6) ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่โครงสร้างทางเคมีมีความเสถียร จากคุณสมบัติตำแหน่งการแทนที่ของ hydroxyl group และ methoxyl group ภายในโมเลกุลและอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อ metabolism สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการบำบัดรักษา อาทิ การต้านไวรัส (antiviral) ต้านเบาหวาน (antidiabetic) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านมะเร็ง (anticancer) และเนื้องอก (antitumor) รวมถึงช่วยในการชะลอวัย (antiaging) (Xiao et al., 2016) จึงทำให้

flavone C-glycosides สามารถใช้เป็นเครื่องหมาย (marker) ในการวัดคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางการค้าจากใบไม้ได้ (Wang et al., 2012) โดยที่สารทั้ง 4 ชนิดนี้สามารถพบในปริมาณแตกต่างกัน หรืออาจไม่พบเลยในใบไม้ต่างชนิด (Gong et al., 2016; Wang et al., 2012)



รูปที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของ flavone C-glycoside ได้แก่ orientin (a), isoorientin (b), vitexin (c), และ isovitexin (d)

หมายเหตุ: ภาพจาก Ma et al. (2015)

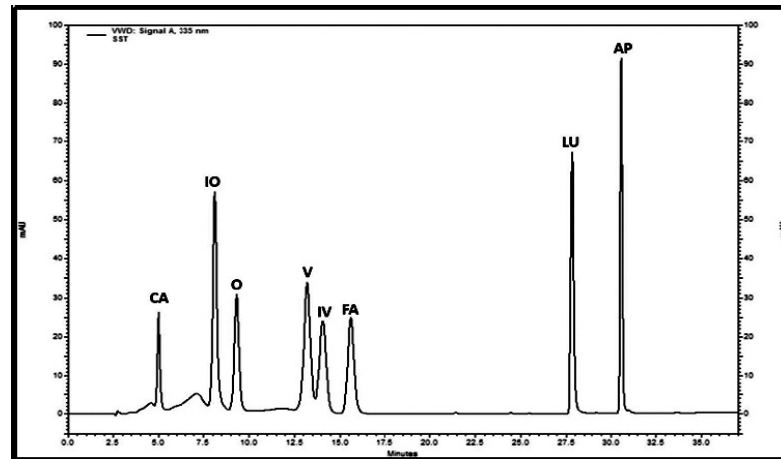
7. เทคนิคการวิเคราะห์สาร flavones C-glycoside และกรดฟีนอลิก โดยวิธี RP-HPLC

High performance liquid chromatography หรือ HPLC เป็นวิธีการวิเคราะห์เพื่อการแยกสารผสมร่วมกับการใช้ความดันสูงที่ทำหน้าที่สูบลำตัวทำละลายผ่านเข้าไปในคอลัมน์ ทำให้สารแยกออกมาได้ในเวลาต่างกันจากคุณสมบัติการละลายและถูกดูดซับในตัวทำละลายที่แตกต่างกันของสารผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด detector และส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ แสดงผลออกมาในลักษณะโครมาโตแกรม (chromatogram) ที่แต่ละ peak จะเป็นตัวแทนของสารและพื้นที่ใต้เส้นกราฟแสดงถึงปริมาณของสาร

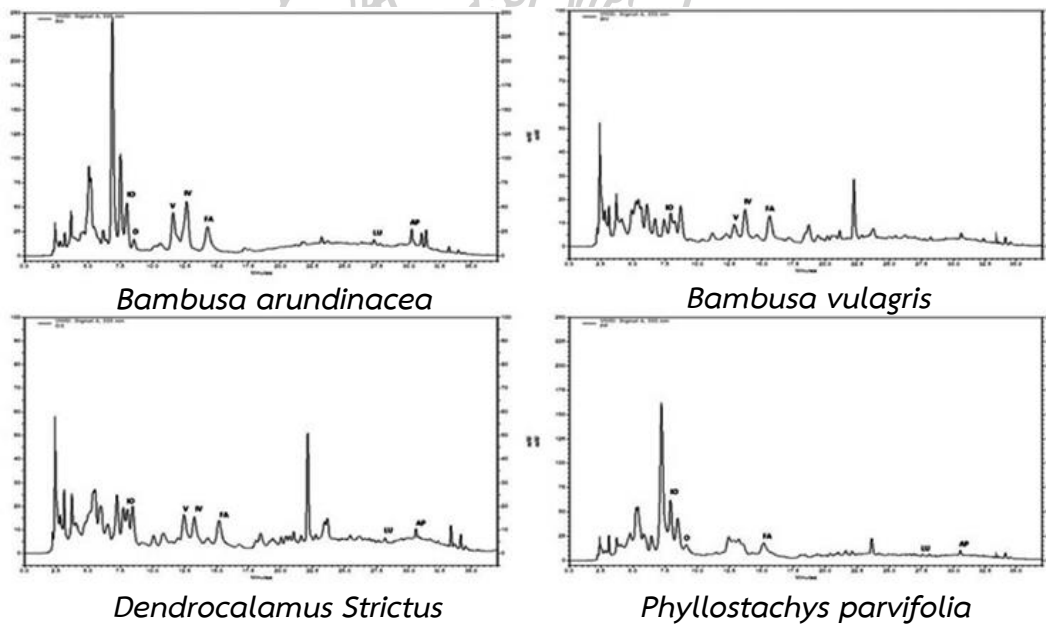
เทคนิค HPLC เป็นวิธีที่เป็นที่นิยมในการวิเคราะห์จำแนกชนิดและวัดปริมาณของสาร ซึ่งต่อมาก็ได้มีการพัฒนาเทคนิค reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) ขึ้นในภายหลังเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการวิเคราะห์ให้ดียิ่งขึ้น โดยมีความแตกต่างคือตัวทำละลายที่ใช้ในวิธี RP-HPLC นี้จะเป็นชนิดที่มีขั้ว เช่น น้ำ เมทานอล (methanol) หรือ อะซิโตนไนไตร (acetonitrile) ซึ่งมีข้อดีคือทำให้การวิเคราะห์มีความเสถียร สามารถทำซ้ำและให้ผลที่แม่นยำ

เช่นเดียวกันกับการศึกษาสารสำคัญในสารสกัดใบไผ่ เทคนิค HPLC หรือ RP-HPLC เป็นเทคนิคที่มีรายงานการนำมาใช้เพื่อการศึกษาชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีมากที่สุด (Gagliano et al., 2021) และตัวอย่างงานวิจัยที่มีการใช้เทคนิค RP-HPLC เพื่อศึกษาสารสกัดใบไผ่ เช่น ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งความเสียหายของสารพันธุกรรมจากรังสีของสารสกัดใบไผ่ โดย Mansi และคณะ (2019) ซึ่งทำการศึกษาและรายงานสารพฤกษเคมีที่พบในสารสกัดใบไผ่จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ isoorientin, isovitexin, orientin, vitexin, chlorogenic acid, ferulic acid, luteolin and apigenin (รูปที่ 7) ในไผ่ 4 ชนิด ได้แก่ *Bambusa arundinacea*, *Bambusa vulgaris*, *Dendrocalamus strictus* และ *Phyllostachys parvifolia* โดยจากผลการทดลองพบว่โครมาโตแกรมที่ได้แสดงให้เห็นว่าไผ่แต่ละชนิดปรากฏ peak ไม่เท่ากัน แสดงว่ามีการสะสมสารพฤกษเคมีในชนิดละปริมาณที่ต่างกัน (รูปที่ 8) และในการทดสอบด้วยวิธี Cytokinesis-blocked micronucleus assay พบว่าไผ่แต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านอันตรายจากรังสีต่อสารพันธุกรรมได้ไม่เท่ากัน ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากการสะสมสารพฤกษเคมีที่ไม่เท่ากัน และอีกหลายงานวิจัยที่ได้มีการตรวจสอบวิเคราะห์ชนิดและปริมาณการสะสมสารในสารสกัดใบไผ่ชนิดต่าง ๆ และพบสารพฤกษเคมีในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์หลายชนิด อาทิ rutin, gallic acid และ β -sitosterol (Goyal et al., 2017) และพบสารในกลุ่ม Flavone C-glycoside จำนวน 4 ชนิด

ได้แก่ isoorientin, isovitexin, orientin และ vitexin (Jin et al., 2011; Mansi et al., 2020; Ni et al., 2014) และ *p*-coumaric acid (Gong et al., 2015; Ni et al., 2014)



รูปที่ 7 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 8 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid (CA), isoorientin (IO), orientin (O), vitexin (V), isovitexin (IV), ferulic acid (FA), luteolin (LU) และ apigenin (AP)



รูปที่ 8 โครมาโตแกรมของสารพฤษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดใบไผ่จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *B. arundinacea*, *B. vulgaris*, *D. strictus* และ *P. parvifolia*

อย่างไรก็ตาม ในพืชแต่ละชนิดจะสามารถพบชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน และจากการศึกษาพบว่าในไม้ต่างชนิดต่างก็มีการสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่ไม่เท่ากัน (Nirmala et al., 2018) นอกจากนี้แล้วยังมีปัจจัยด้านอื่น ๆ อีกที่ส่งผลต่อปริมาณสารสำคัญ โดยจากงานวิจัยของ Keski-Saari และคณะ (2008) ที่ได้มีการศึกษาปริมาณฟีนอลิกที่สะสมในลำต้นไม้เองก็ได้มีการค้นพบว่าสารสำคัญบางชนิดซึ่งสามารถพบได้ในไม้ที่โตเต็มที่แต่จะไม่พบในไม้อายุน้อย (1-2 ปี) ในขณะที่สารสำคัญชนิดอื่น ๆ ซึ่งไม่ใช่สารทุติยภูมิอาจมีปริมาณลดลงเมื่อไม้มีอายุมากขึ้น และในบางงานวิจัย พบว่าการสกัดสารสำคัญในไม้ชนิดเดียวกันจากต่างอวัยวะ เช่น ใบ ราก ลำต้น หน่อไม้ จะพบชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีแตกต่างกัน (Tanaka et al., 2014) และในการศึกษาสารสกัดในใบอ่อน ใบกลาง และใบแก่ ของไม้ชางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro.) ก็ปรากฏผลไปในทางเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าอายุของใบก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกับปริมาณสารสำคัญ (เพ็ญนภา การะเวก และคณะ, 2562) ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาต่อไป

7.1 สารพฤษเคมีจำนวน 8 ชนิดที่ใช้ในงานวิจัย

7.1.1 กลุ่มฟีนอลิก

ในการทดลอง สารพฤษเคมีที่ใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ RP-HPLC ซึ่งอยู่ในกลุ่มฟีนอลิกจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid, และ *p*-coumaric acid สารแต่ละชนิดมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง พบได้ในพืชหลายชนิด และมีรายงานถึงฤทธิ์ทางเภสัชกรรม ดังนี้ จากการศึกษาทั้งในรูปแบบ *in vivo* และ *in vitro* มีรายงานว่า chlorogenic acid มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย ลดระดับน้ำตาลในเลือด (hypoglycemic) ลดไขมัน (lipid lowering) ยับยั้งการกลายพันธุ์ (antimutagenic) ต้านมะเร็ง (anticancer) ปรับสมดุลภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) และอื่น ๆ (Miao & Xiang, 2020) caffeic acid พบว่ามีรายงานถึงประโยชน์ต่อสุขภาพหลายประการ โดยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ การป้องกันการอักเสบ ป้องกันโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (neurodegenerative diseases) ป้องกันโรคเบาหวาน (diabetes) ต้านมะเร็ง เป็นต้น (Birková et al., 2020) และสุดท้าย *p*-coumaric acid เป็นสารในกลุ่ม phenolic acid ซึ่งมีรายงานศักยภาพทางเภสัชกรรมหลากหลาย เช่นเดียวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพข้างต้น อาทิ ความสามารถในการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระสูง (high free radical scavenging) ต้านการอักเสบ ต้านจุลชีพ (antineoplastic) ยับยั้งกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activities) และบรรเทาโรคเบาหวาน (diabetes mitigation) เป็นต้น (Ferreira et al., 2018)

7.1.2 กลุ่มฟลาโวนอยด์

สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่ใช้ในงานวิจัยประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เคยมีรายงานในไฟ้จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ apigenin และสารกลุ่ม flavone C-glycoside (isoorientin, orientin, isovitexin, และ vitexin) apigenin มีรายงานถึงบทบาทในการป้องกันโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง และศักยภาพในการส่งเสริมสุขภาพจากการศึกษาในสัตว์ทดลองหรือในมนุษย์ (*in vivo*) อาทิ การต้านเบาหวาน ภาวะความจำเสื่อม (amnesia) โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคซึมเศร้า (depression) และภาวะนอนไม่หลับ (insomnia) เป็นต้น (Salehi et al., 2019) และ flavone C-glycoside ทั้ง 4 ชนิด isoorientin (luteolin-6-C glucoside) เป็นสารที่มีรายงานว่าสามารถพบได้ในพืชหลายชนิด มีคุณสมบัติทางเภสัชกรรมหลายประการ อาทิ ต้านเบาหวาน ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง รวมถึงด้านการปวด (antinociceptive) ได้ แสดงให้เห็นศักยภาพในการนำไปใช้เพื่อการบำบัดรักษา (Küpeli et al., 2004) ต่อมา orientin (luteolin-8-C glucoside) เป็นหนึ่งในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สามารถสกัดได้จากพืชสมุนไพรทางยาหลายชนิด ศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ที่ได้รับการยืนยันแล้วหลายประการ อาทิ ต้านอนุมูลอิสระ ชะลออายุ ต้านไวรัสและแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ป้องกันอันตรายจากรังสี (radioprotective) และอื่น ๆ (Lam et al., 2016) ในส่วน isovitexin (apigenin-6-C glucoside) เป็น isomer ของ vitexin สามารถสกัดได้จากพืชหลายชนิด มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และมีการทดสอบเพื่อนำไปใช้ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านโรคอัลไซเมอร์ ป้องกันระบบประสาท และอาจมีศักยภาพในการเป็นสารที่ส่งเสริมผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ (He et al., 2016) สุดท้าย vitexin (apigenin-8-C glucoside) เป็นสารที่พบได้ในพืชซึ่งมีความสำคัญและสามารถนำไปต่อยอดเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้กว้างขวาง โดยมีรายงานถึงคุณสมบัติทางเภสัชกรรม อาทิ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง และอื่นๆ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ROS ต้านการเกิด lipid peroxidation และป้องกันภาวะความเครียดจากอนุมูลอิสระ (oxidative stress) (Babaei et al., 2020)

อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแล้ว ในบรรดาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีในการศึกษาจำนวน 8 ชนิดนี้ ในการศึกษาของ Gong และคณะ (2016) รายงานว่า caffeic acid เป็นสารพฤกษเคมีที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงที่สุด ตามด้วย chlorogenic acid, orientin, isoorientin, *p*-coumaric acid, vitexin และ isovitexin ตามลำดับ และจากการสืบค้นเพิ่มเติมพบว่า apigenin มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพอใกล้เคียงกับ vitexin และ isovitexin (Zhu et al., 2017)

8. ผลของฤดูกาลและความเครียดจากสิ่งแวดล้อมต่อปริมาณสารพฤกษเคมีในใบไม้

ปัจจุบันปัญหาการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (climate change) ทวีความรุนแรง ทำให้พืชต้องเผชิญกับปัจจัยความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต การเจริญพัฒนา และการสูญเสียผลผลิตของพืช โดยเฉพาะความเครียดจากความเค็ม (salinity) ความร้อน (heat) การขาดน้ำ (drought) และโลหะหนัก (metal toxicity) ที่ส่งผลกระทบต่อพืชเป็นอย่างมาก ดังนั้นเพื่อความอยู่รอดพืชจึงจำเป็นต้องมีการปรับตัว โดยอาศัยกลไกต่าง ๆ ทั้งการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน การแสดงออกของโปรตีนที่ตอบสนองต่อความเครียด การสร้างฮอร์โมน การผลิตสารเมตาบอไลต์ (metabolite) (Mohanta et al., 2017) และกลไกการตอบสนองที่สำคัญอย่างหนึ่งของพืชก็คือ การสะสมสารทุติยภูมิซึ่งมักจะมีการสะสมเพิ่มมากขึ้นในสภาวะที่พืชต้องเผชิญกับความเครียด (Akula & Ravishankar, 2011; Samec et al., 2021)

ไม้ เป็นพืชที่สามารถได้รับผลกระทบจากความเครียดต่าง ๆ ได้เช่นเดียวกัน ในการศึกษาผลของความเครียดจากการขาดน้ำกับไม้ Moso (*Phyllostachys edulis*) ซึ่งเป็นไม้ชนิดหนึ่งที่ชอบเจริญในสภาพที่มีความชื้นสูงพอเหมาะ พบว่าไม้โมโซมีการสะสมสารเมตาบอไลต์สูงขึ้น 6 กลุ่ม ได้แก่ แอนโทไซยานิน (anthocyanins) โกลโคไซด์ (glycosides) สารอินทรีย์ (organic acids) กรดอะมิโน (amino acids) น้ำตาลหลายชนิด และกลุ่มอื่นๆ อาทิ ฮอร์โมนพืช วิตามิน ฟลาโวนอยด์ และอัลคาลอยด์ ซึ่งการสะสมสารเหล่านี้มากขึ้นคาดว่าเพื่อช่วยตอบสนองกระบวนการทำงานภายในพืชให้สามารถทนต่อสภาวะแล้งได้มากขึ้น อาทิ กระบวนการปรับแรงดันออสโมติกของเซลล์ การต้านอนุมูลอิสระ และการควบคุมฮอร์โมน (Devireddy et al., 2021; Tong et al., 2020)

นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาผลของฤดูกาลเกี่ยวกับปริมาณสารทุติยภูมิในไม้ 2 ชนิด คือ *Shibataea chinensis* Nakai และ *Pleiblastus kongosanensis* f. *aureostriatus* Muroi & Yu.Tanaka โดยจากการศึกษาพบว่าการสะสมสารพฤกษเคมีในแต่ละฤดูกาลมีความแตกต่างกัน โดยฤดูกาลที่ไม้มีการสะสมสารทุติยภูมิมากที่สุดคือ ฤดูหนาว ซึ่งผลของฤดูกาลเกี่ยวกับเรื่องนี้ คาดว่าเป็นผลกระทบมาจากอุณหภูมิ แสง และปริมาณน้ำที่ได้รับที่แตกต่างกัน (Liebelt et al., 2019; Ni et al., 2014) แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยเรื่องของชนิด ลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) สรีรวิทยา (physiology) และระยะการเจริญเติบโต (developmental stage) ก็เป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้พืชมีความสามารถในการทนทานและปรับตัว หรือสะสมสารทุติยภูมิได้ไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อไป เพื่อความรู้ความเข้าใจที่อาจจะส่งผลดีต่ออุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์จากไม้ ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม เครื่องสำอาง หรือเพื่อการใช้ผลผลิตจากไม้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในอนาคต

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการสกัดสารสกัดจากใบไม้

- 1.1 กระดาษชั่งสาร
- 1.2 กรรไกร
- 1.3 โกร่งบดและสาก
- 1.4 ผ้าขาวบางและกรวยกรอง
- 1.5 ซ้อนตักสาร (Isolab, Germany)
- 1.6 หลอดเซนติฟิว ขนาด 15, 50 ml (Sarstedt, Germany)
- 1.7 ไมโครปิเปตต์ทีป ขนาดใหญ่สีฟ้า และขนาดกลางสีเหลือง
- 1.8 ตู้แช่แข็ง (multi freezer) รุ่น SJC-318-WH (Sharp, Thailand)
- 1.9 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น UL60 (Memmert, Germany)
- 1.10 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WNB 45 (Memmert, Germany)
- 1.11 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น ME204 (Mettler Toledo, Switzerland)
- 1.12 เครื่องcentrifugeรุ่น Heraeus Megafuge 8R (Marshall, Germany)
- 1.13 เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (mini vortex mixer) รุ่น TT-2800-VVM (Hercuvan, Malaysia)
- 1.14 auto micropipetteขนาด 200 และ 1000 รุ่น NT-200 และ NT-1000 (Watson, Japan)

2. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์แสงของสารสกัดจากใบไม้

- 2.1 แท่งแก้วคนสาร
- 2.2 ขวดใส่สารละลาย
- 2.3 glass vial
- 2.4 rask วางหลอดทดลอง
- 2.5 หลอดเซนติฟิว ขนาด 15 ml (Sarstedt, Germany)
- 2.6 quartz cuvette (Starna scientific, UK)

- 2.7 volumetric flask ขนาด 100 ml
- 2.8 ปีกเกอร์แก้ว ขนาด 50, 100 และ 500 ml
- 2.9 ไมโครปิเปตต์ทึบ ขนาด 100 และ 1000 μ l
- 2.10 เครื่อง pH meter
- 2.11 เครื่อง UV-VIS spectrophotometer รุ่น Optizen 3220UV (Mecasys, Korea)
- 2.12 เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (mini vortex mixer) รุ่น TT-2800-VVM (Hercuvan, Malaysia)
- 2.13 auto micropipette ขนาด 200 และ 1000 รุ่น NT-200 และ NT-1000 (Watson, Japan)
- 2.14 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WNB 45 (Mettler, Germany)
- 3. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีในสารสกัดใบไม้ ด้วยวิธี RP-HPLC
 - 3.1 Agilent 5 TC-C18 (2) (250 x 4.6 mm)
 - 3.2 0.22 μ m syringe filter
 - 3.3 เครื่อง HPLC รุ่น Agilent HPLC 1260 Infinity II bioinert (Agilent Technologies, Germany) ซึ่งระบบประกอบด้วย binary solvent manager, auto-sampler, และ Waters 2996 diode array detector ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศิลปากร
- 4. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการดูแลไม้ข้าวหลามและไม้เลื้อยให้ได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม
 - 4.1 ถาดรองกระดาษ
 - 4.2 กิ่งตอนไม้ข้าวหลาม และไม้เลื้อย
 - 4.3 บัวรดน้ำพลาสติก
- 5. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการวัดประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (Fv/Fm)
 - 5.1 เครื่อง chlorophyll fluorimeter

2. สารเคมี

- 1. สารเคมีสำหรับการสกัดสารสกัดจากใบไม้
 - 1.1 Ethanol, C_2H_6O , MW 46.07 g/mol (VWR chemicals, France)
 - 1.2 น้ำกลั่น
 - 1.3 ไนโตรเจนเหลว

2. สารเคมีสำหรับการวัดปริมาณฟีนอลิก

2.1 Folin ciocalteu reagent, $C_{10}H_5NaO_5S$, MW 260.2 g/mol

2.2 Sodium carbonate, Na_2CO_3 , MW 105.9888 g/mol

2.3 Gallic acid, $C_7H_6O_5$, MW 170.72 g/mol

3. สารเคมีสำหรับการวัดปริมาณฟลาโวนอยด์

3.1 Aluminium chloride, $AlCl_3$, MW 133.34 g/mol (VWR chemicals, Belgium)

3.2 Methanol, CH_4O , MW 32.04 g/mol (VWR chemicals, France)

3.2 Potassium acetate, CH_3CO_2K , MW 98.15 g/mol

3.3 Quercetin, $C_{15}H_{10}O_7$, MW 302.236 g/mol (Sigma Life Science, India)

4. สารเคมีสำหรับการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

วิธี DPPH radical scavenging

4.1 Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), $C_{14}H_{18}O_4$, MW=250.29 g/mol (SIGMA-ALORICH, Switzerland)

4.2 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), $C_{18}H_{12}N_5O_6$, MW= 394. 32 g/ mol (SIGMA-ALORICH, Germany)

4.3 Methanol, CH_4O , MW 32.04 g/mol (VWR chemicals, France)

วิธี Ferric reducing power assay (FRAP assay)

4.4 Acetic acid, CH_3COOH , MW 60.05 g/mol (BDH chemicals, England)

4.5 Sodium acetate, CH_3COONa , MW 82.03 g/mol (EMSURE, Germany)

4.6 Iron (III) Chloride hexahydrate, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, MW= 270.30 g/ mol (VWR Chemicals BDH, Germany)

4.7 2,4,6-Tri (2-pyridyl)-s-triazine, TPTZ, MW 312.33 g/mol (SIGMA-ALORICH, Germany)

4.8 Hydrochloric acid, HCl, MW 36.46 g/mol (Quality Reagent Chemical, New Zealand)

4.9 Iron (III) sulphate heptahydrate, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, MW 278.01 g/mol (VWR Chemicals BDH, Belgium)

5. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษเคมีด้วยวิธี RP-HPLC

5.1 Ethanol, C_2H_6O , MW 46.07 g/mol (VWR chemicals, France)

5.2 น้ำกลั่น

5.3 Methanol, CH_4O , MW 32.04 g/mol (RCI Labscan Limited, Thailand)

5.4 Acetic acid, CH_3COOH , MW 60.05 g/mol (BDH chemicals, England)

5.5 Acetonitrile, CH_3CN , MW 41.05 g/mol (Supelco, Germany)

5.6 สารมาตรฐานฟลาโวนไกลโคไซด์ ได้แก่

5.6.1 Isoorientin, $C_{21}H_{20}O_{11}$, MW 448.38 g/mol (Sigma-aldrish, USA)

5.6.2 Orientin, $C_{21}H_{20}O_{11}$, MW 448.38 g/mol (Sigma-aldrish, USA)

5.6.3 Isovitexin, $C_{21}H_{20}O_{10}$, MW 432.38 g/mol (Sigma-aldrish, USA)

5.6.4 Vitexin, $C_{21}H_{20}O_{10}$, MW 432.38 g/mol (Sigma-aldrish, USA)

5.7 สารมาตรฐานฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ชนิดอื่นๆ ดังนี้

5.7.1 Apigenin, $C_{15}H_{10}O_5$, MW 270.24 g/mol (Sigma-aldrish, USA)

5.7.2 Caffeic acid, $C_9H_8O_4$, MW 180.16 g/mol (Sigma-aldrish, USA)

5.7.3 Chlorogenic acid, $C_{16}H_{18}O_9$, MW 354.31 g/mol (Sigma-aldrish, USA)

5.7.4 *p*-coumaric acid, $C_9H_8O_3$, MW 164.16 g/mol (Sigma-aldrish, USA)

5.8 น้ำ Deionization (DI)

6. สารเคมีสำหรับการวัดปริมาณรังควัตถุในการสังเคราะห์แสง

6.1 ไนโตรเจนเหลว

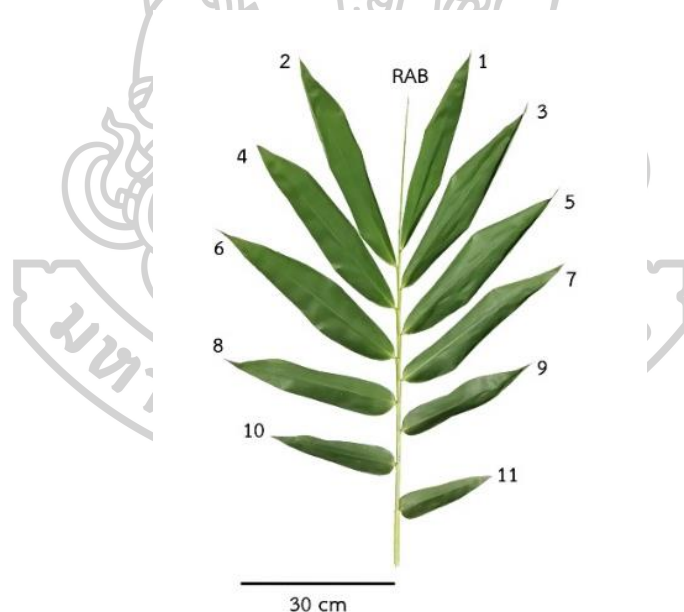
6.2 Acetone, C_3H_6O , MW 58.08 g/mol (VWR chemicals, France)

3. วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายและวิธีสกัดต่อปริมาณสารฟฤษเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไม้ที่สกัดจากตำแหน่งใบย่อยที่แตกต่างกัน

1.1. การเก็บตัวอย่างและการเตรียมสารสกัดจากใบไม้

ดำเนินการเก็บตัวอย่างใบไม้ปังกิ่ง (*Dendrocalamus* sp.) โดยเก็บจำนวน 4 ซ้ำ จากนั้นล้างตัวอย่างใบไม้ด้วยน้ำให้สะอาด ก่อนแยกเก็บใบไม้ปังกิ่งเป็น 5 ส่วน ซึ่งสามารถเรียงความอ่อนแก่ของใบได้ตามลำดับ ดังนี้ ใบม้วน (Rolled apical blade, RAB) เป็นส่วนใบอ่อนที่มีอายุน้อยที่สุด ส่วนที่ 2 ตำแหน่งใบที่ 1-2 (Position 1-2, P1-2) ส่วนที่ 3 ตำแหน่งใบที่ 3-4 (Position 3-4, P3-4) ส่วนที่ 4 ตำแหน่งใบที่ 5-6 (Position 5-6, P5-6) และส่วนที่ 5 ตำแหน่งใบที่ 7-8 (Position 7-8, P7-8) ซึ่งเป็นใบแก่ที่มีอายุมากที่สุด จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนนำไปบดเป็นผง แล้วสกัดด้วยวิธีการทางเคมีด้วยเอทานอลและน้ำ เปรียบเทียบกับสารสกัดที่ได้จากการเลียนแบบวิธีการชงชา



รูปที่ 9 ลักษณะใบไม้ปังกิ่งที่ใช้ในการศึกษา ตัวเลขในรูปแสดงตำแหน่งใบ

1.2 การเตรียมสารสกัดจากใบไผ่ด้วยเอทานอลและน้ำ

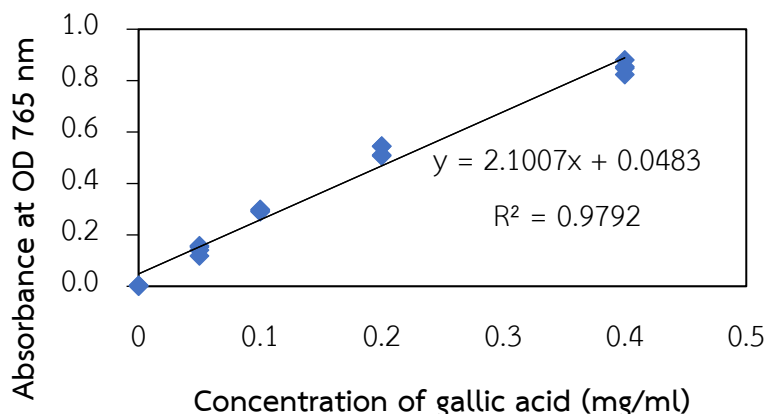
นำตัวอย่างใบไผ่แห้งแต่ละส่วนมาบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปสกัดสารโดยใช้ตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ 60% ethanol (วิธีที่ 1) และน้ำ (วิธีที่ 2) ตามวิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Macwan et al. (2010) และ Sutharut & Sudarat (2012) ซึ่งมีวิธีดังนี้ ซึ่งตัวอย่างบดละเอียด 1 กรัม เติมตัวทำละลาย 3 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 20 นาที โดยนำออกมาเขย่าทุก 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำสารละลายส่วนในสมาเก็บไว้ ทำการสกัดซ้ำอีก 3 ครั้ง นำสารละลายส่วนในมารวมกันและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยตัวทำละลายเดียวกัน Һ้มหลอดด้วยแผ่นฟอยด์ สุดท้ายนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C (ทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง)

1.3 การเตรียมสารสกัดที่สกัดตามวิธีการชงชาใบไผ่

นำตัวอย่างใบไผ่แห้งแต่ละส่วนมาตัดให้เป็นชิ้นขนาดไม่เกิน 0.1 ตารางเซนติเมตร จากนั้นบดตัวอย่างที่ตัดแล้วเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปสกัดด้วยวิธีการชงชา ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Hashish et al. (2018) โดยการชงตัวอย่าง 1 กรัม (วิธีที่ 3) และ 0.1 กรัม (วิธีที่ 4) เติมน้ำกัลันที่อุณหภูมิ 95°C ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปแช่ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 95°C เพื่อรักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกกากออก ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำ Һ้มหลอดด้วยแผ่นฟอยด์ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C (ทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง)

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

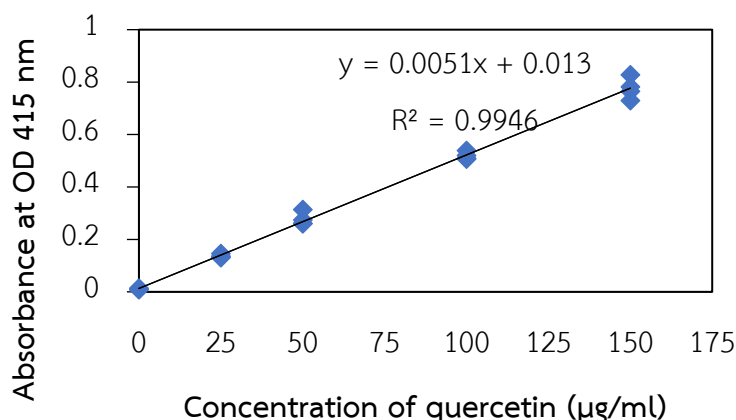
ดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมตามวิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Macwan et al. (2010) และ Singleton and Rossi (1965) ซึ่งมีวิธีดังนี้ เติมสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรและ 10% Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในขวด vial ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ในที่มืด 1 นาที จากนั้นเติม 7.5% Sodium carbonate ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรรวมเป็น 4 มิลลิลิตรด้วยน้ำกัลัน ผสมให้เข้ากันก่อนวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer รุ่น Optizen 3220UV ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยมีน้ำกัลันเป็น blank (วัดซ้ำ 2 ครั้ง) นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของฟีนอลิก (gallic acid) โดยทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ คำนวณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดฟีนอลิก (Gallic acid equivalents; GAE) ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่างใบไผ่ ซึ่งมีหน่วยเป็น mg GAE/g DW



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิก (gallic acid)

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

ดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมตามวิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Macwan et al. (2010) ซึ่งมีวิธีดังนี้ เติมน้ำสกัดตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรและเมทานอล ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรลงในขวด vial ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 10% aluminium chloride ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรและ 1.0 M potassium acetate ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร รวมเป็น 5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันก่อนวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer รุ่น Optizen 3220UV ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยมีน้ำกลั่นเป็น blank (วัดซ้ำ 2 ครั้ง) นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของฟลาโวนอยด์ (quercetin) โดยทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ คำนวณสารฟลาโวนอยด์รวมในรูป ไมโครกรัมสมมูลของควอซีติน (Quercetin equivalents; QE) ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง ใบไม้ ซึ่งมีหน่วยเป็น $\mu\text{g QE/g DW}$



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของฟลาโวนอยด์ (quercetin)

1.6. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

1.6.1 วิธี DPPH scavenging assay

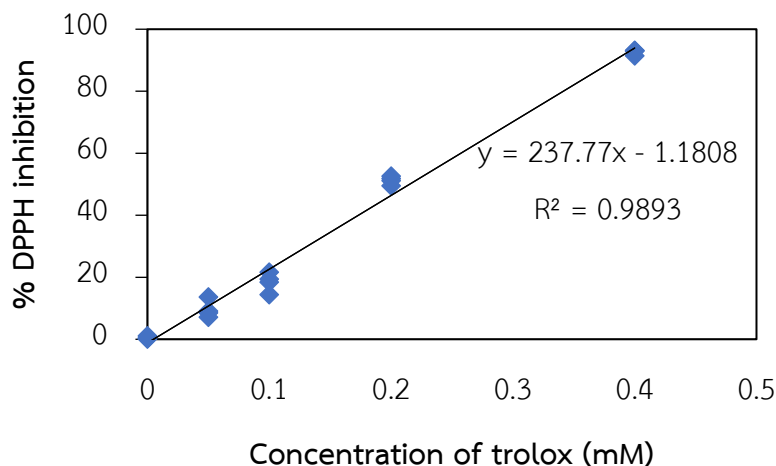
ดำเนินการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Saini et al. (2014) ซึ่งมีวิธีดังนี้ ผสม methanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตรกับ สารละลาย DPPH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer รุ่น Optizen 3220UV ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ทันที (OD_{t_0}) จากนั้นนำสารมาตรฐาน trolox ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มิลลิโมลาร์ หรือสารสกัด ตัวอย่างความเข้มข้น 0, 4, 8, 16 และ 32 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ สารละลาย DPPH ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ($OD_{t_{30}}$) โดยทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH (%DPPH inhibition) ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังนี้

$$\% \text{ DPPH inhibition} = (OD_{t_0} - OD_{t_{30}} / OD_{t_0}) \times 100$$

เมื่อ OD_{t_0} = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH กับ methanol ที่ 0 นาที

$OD_{t_{30}}$ = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH กับสารสกัดตัวอย่างที่ 30 นาที

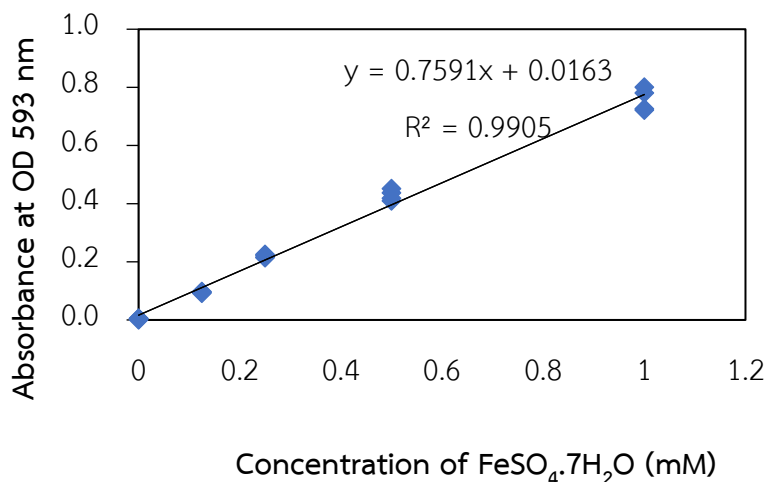
จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดตัวอย่างหรือสารมาตรฐานกับค่าร้อยละของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH และคำนวณหาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน trolox หรือค่า TEAC (Trolox Equivalents Antioxidant Capacity) ซึ่งมีหน่วยเป็น mM trolox/g DW โดยนำค่าความชันของกราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหารด้วยค่าความชันของกราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานของการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox

1.6.2 วิธี FRAP assay

ดำเนินการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP หรือวิธีวัดความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ (Ferric reducing antioxidant power, FRAP) ตามวิธีของ Liu et al. (2016) โดยเตรียมสารละลาย FRAP ซึ่งประกอบด้วย 300 mM acetate buffer pH 3.6, 10 mM TPTZ และ 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ในอัตราส่วน 10:1:1 จากนั้นผสมสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 150 ไมโครลิตร กับสารละลาย FRAP ปริมาตร 2,850 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer รุ่น Optizen 3220UV ที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้นำไปเทียบหาความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานของ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ แสดงเป็นค่า FRAP value มีหน่วยเป็น mM Fe(II)/g DW ทั้งนี้สารละลายทุกชนิดต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง โดยเฉพาะสาร 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ควรเตรียมเป็นสารสุดท้ายและระวังการสัมผัสอากาศ



รูปที่ 13 กราฟมาตรฐานของการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay

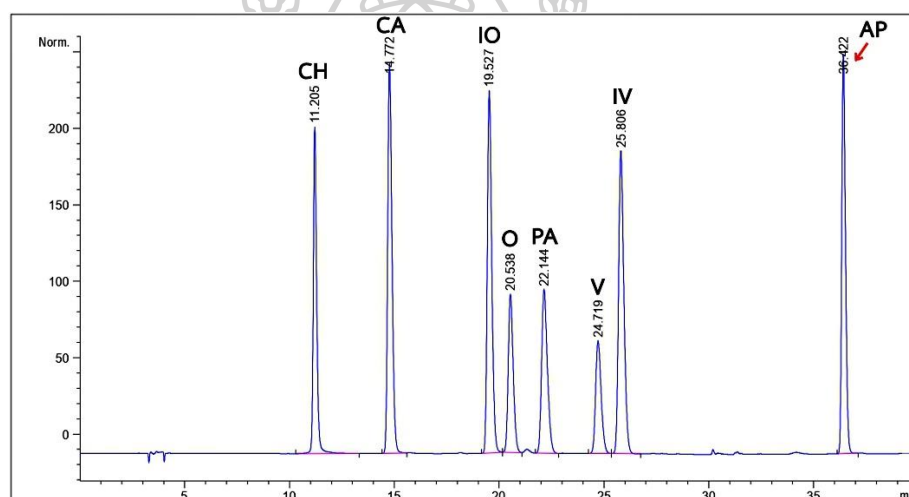
1.7 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี RP-HPLC

เลือกตัวอย่างสารสกัดจากใบไม้ 3 ตำแหน่งตามความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นตัวแทนเรียงตามอายุจากใบอ่อน ใบกลาง และใบแก่ คือ RAB, P1-2 และ P5-6 ตามลำดับ ดำเนินการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยทำการวิเคราะห์ ณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศิลปากร ใช้วิธีซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Jin et al. (2011) ดังนี้ นำสารสกัดหยาบปริมาตร 3 มิลลิลิตร มาระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง จากนั้นนำผงของสารสกัดหยาบมาละลายในตัวทำละลาย methanol ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารสกัดตัวอย่างด้วย 0.22 μm syringe filter ฉีดสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC Agilent HPLC 1260 Infinity II bioinert (Agilent Technologies, Germany) ซึ่งระบบประกอบด้วย binary solvent manager, auto-sampler, และ Waters 2996 diode array detector คอลัมน์ที่ใช้เป็น Agilent 5 TC-C18 (2) (250 x 4.6 mm) ที่อุณหภูมิ 25°C ตัวทำละลาย (mobile phase) ประกอบด้วย acetonitrile (A) และ acetic acid/water (0.8: 100, v/v) (B) ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และความยาวคลื่น 335 นาโนเมตร โดยมีสารมาตรฐานจำนวน 8 ชนิดประกอบด้วย chlorogenic acid (CH), caffeic acid (CA), isoorientin (IO), orientin (O), *p*-coumaric acid (PA), vitexin (V), isovitexin (IV), และ apigenin (AP) ซึ่งถูกละลายใน methanol ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 แสดง gradient elution program ของ mobile phase ที่ใช้ในการทดลอง ดัดแปลง จาก Jin et al. (2011)

Time (min)	A% (Acetonitrile)	B% (Acetic acid/water)
0-2	10-10	90-90
2-6	10-14	90-86
6-16	14-17	86-83
16-23	17-19	83-81
23-28	19-40	81-60

หมายเหตุ : เวลาที่ใช้สำหรับล้างคอลัมน์ 10 นาที



รูปที่ 14 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐาน 8 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid (CH), caffeic acid (CA), isoorientin (IO), orientin (O), *p*-coumaric acid (PA), vitexin (V), isovitexin (IV) และ apigenin (AP)

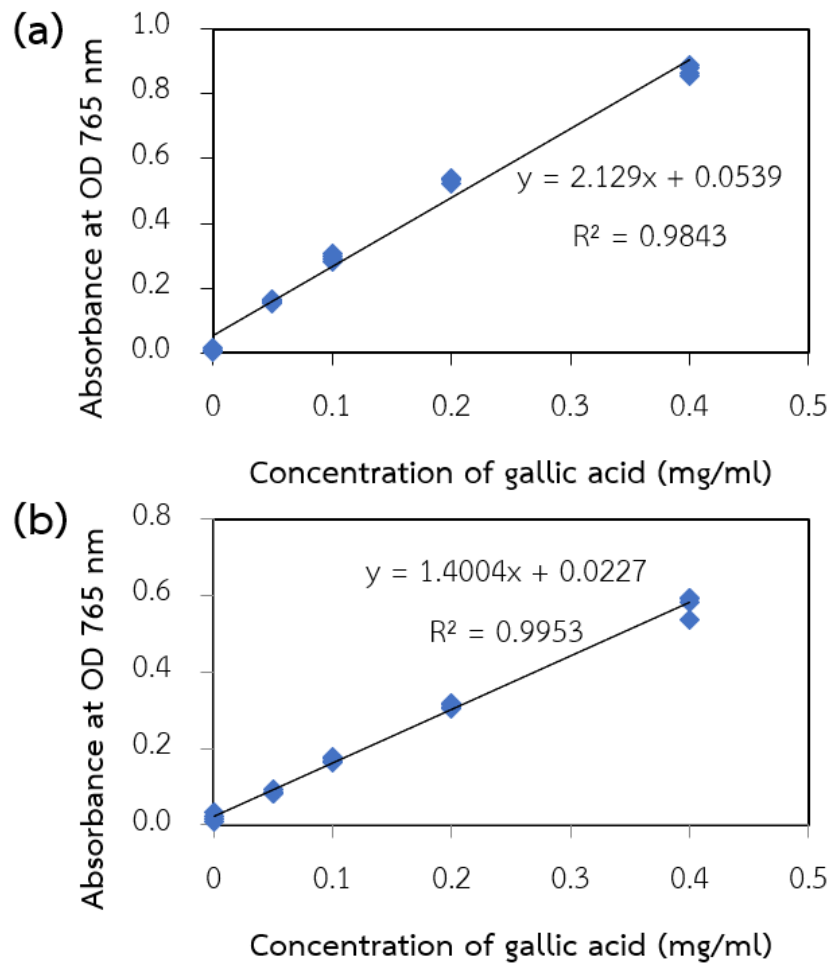
1.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

คำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานด้วยสถิติ one-way ANOVA และ Post Hoc test วิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics

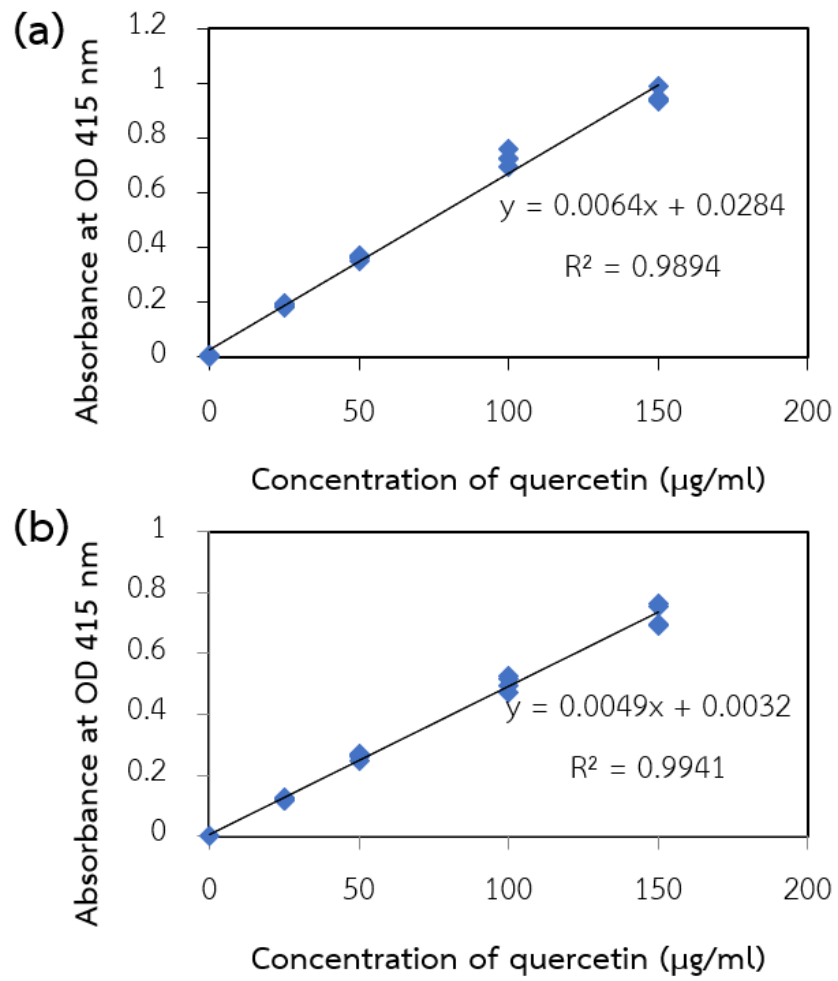
การทดลองที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีในสารสกัดใบไผ่จากใบไผ่ที่เก็บในฤดูกาลที่แตกต่างกัน

ดำเนินการเก็บตัวอย่างใบไผ่จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ ไผ่ข้าวหลามกาบแดง ไผ่ชางนวล ไผ่ชางหม่น ไผ่ด้ามขวาน ไผ่โดนหวาน ไผ่โปกพม่า ไผ่มันหมู ไผ่แม่ตะวอ ไผ่ยักษ์ ไผ่เลี้ยง และไผ่หางช้าง (สามารถตรวจสอบชนิดตามตารางที่ 1 ภาคผนวก จ) จากพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี อ.ท่าปลา จ.อุตรดิตถ์ ในช่วงฤดูร้อน ระหว่างวันที่ 25-27 มีนาคม พ.ศ. 2562 และช่วงฤดูหนาว ในระหว่างวันที่ 16-17 ธันวาคม พ.ศ. 2563 โดยเก็บชนิดละ 4 ซ้ำ ก่อนนำตัวอย่างใบไผ่ไปสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 60% ethanol จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารพฤษเคมี โดยวิธี RP-HPLC ตามวิธีการเดียวกับการทดลองที่ 1

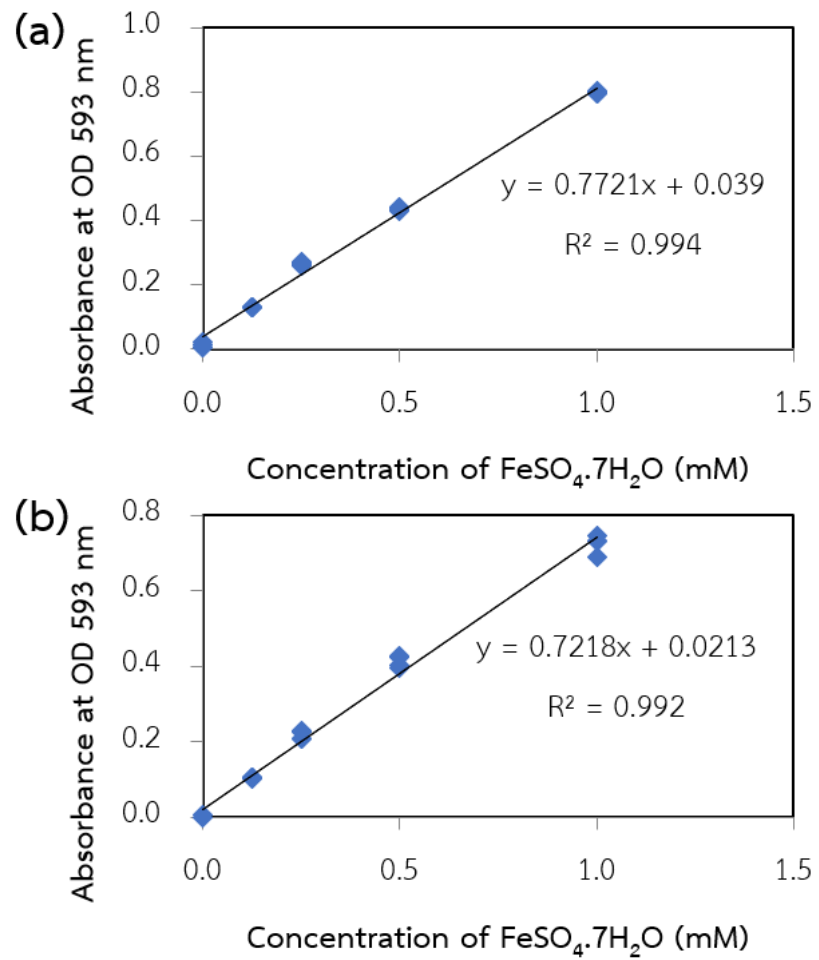




รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิก (gallic acid) ของการทดลองที่ 2 ที่เก็บในฤดูร้อน (a) และฤดูหนาว (b)



รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานของฟลาโวนอยด์ (quercetin) ของการทดลองที่ 2 ที่เก็บในฤดูร้อน (a) และฤดูหนาว (b)



รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานของการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ของการทดลองที่ 2 ที่เก็บในฤดูร้อน (a) และฤดูหนาว (b)

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (abiotic stress) ได้แก่ ความเค็ม (salinity) ความเป็นกรด (pH) โลหะหนักสังกะสี (zinc) และการขาดน้ำ (drought) ต่อปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบไม้

ดำเนินการศึกษาในไม้ 2 ชนิด ได้แก่ ไม้ข้าวหลาม (*Schizostachyum pergracile* (Munro) R.B. Majumdar) และไม้เลียง (*Thyrsocalamus liang* Sungkaew & W.L. Goh) โดยให้ไม้ได้รับความเครียดจำนวน 4 รูปแบบ ได้แก่ ความเค็ม ความเป็นกรด โลหะหนักสังกะสี และการขาดน้ำ ทำการคัดเลือกกิ่งตอนของไม้ข้าวหลามและไม้ชางหม่น จากชมรมปลูกไม้ประเทศไทย ต.ผาเลือด อ.ท่าปลา จ.อุตรดิตถ์ อายุประมาณ 6 เดือน ให้ได้ต้นที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (ความสูงของกิ่งประมาณ 120 เซนติเมตร) รองกระถางด้วยถาดรองเพื่อป้องกันน้ำไหลออก จากนั้นแบ่งเป็น 5 กลุ่มทดลอง กลุ่มละ 4 ต้น เพื่อให้แต่ละกลุ่มได้รับปัจจัยความเครียดที่แตกต่างกัน โดยใช้วิธีรดสารละลายในปริมาตร 150 มิลลิลิตรทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 รดด้วยน้ำ Reverse Osmosis water pH 7.5 (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 รดด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 100 mM pH 7.2 (กลุ่มที่ได้รับความเครียดจากความเค็ม)

กลุ่มที่ 3 รดด้วยน้ำ pH 4.0 ซึ่งปรับ pH โดยใช้ HCl (กลุ่มที่ได้รับความเครียดจากดินเป็นกรด)

กลุ่มที่ 4 รดด้วยสารละลาย $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ความเข้มข้น 200 mM pH 7.8 (กลุ่มที่ได้รับความเครียดจากโลหะหนักสังกะสี; Zn)

กลุ่มที่ 5 ไม่รดน้ำหรือสารละลาย (กลุ่มที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ)

ทำการทดลองเป็นเวลา 8 วัน โดยมีการบันทึกภาพ บันทึกการเจริญเติบโต สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและบันทึกผล ดังนี้

3.1 การวัดประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสง

วัดประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (Fv/Fm) ของใบไม้ในตำแหน่งใบที่ 4 นับจากยอด หลังจากได้รับความเครียดในวันที่ 0 1 2 4 และ 8 ด้วยเครื่อง chlorophyll fluorimeter ซึ่งเครื่องจะทำหน้าที่วัดค่า F_0 (minimum, quasi-dark fluorescence yield) และ F_m (maximum total fluorescence yield) โดยก่อนทำการวัดค่าให้เก็บใบไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที (dark adaptation) จากนั้นค่าที่ได้นำไปคำนวณค่า Fv/Fm ดังสมการ

$$Fv/Fm = (Fm - F_0) / Fm$$

3.2 การวัดปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง

เก็บตัวอย่างใบไม้จากแต่ละกลุ่มการทดลองทั้ง 5 กลุ่ม ในวันที่ 0 2 4 และ 8 ที่ตำแหน่งใบที่ 4 นับจากยอด เพื่อนำมาสกัดรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง ได้แก่ chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll และ carotenoids ตามวิธีการของ Lichtenthaler (1987) และ Shabala et al. (1998) ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้ ชั่งตัวอย่างใบไม้สด 100 มิลลิกรัม ตัดและบดตัวอย่างใบไม้ให้ละเอียด โดยใช้ไนโตรเจนเหลว ใส่ลงในขวด vial เติม 95.5% (v/v) acetone ปริมาตร 5 มิลลิตร ปิดฝาและเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex พันฝาขวดด้วยพาราฟิล์ม ห่อฟอยด์ให้สารอยู่ในที่มืด จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้งในแต่ละกลุ่มการทดลอง) เมื่อครบกำหนดเวลาให้ดูดสารละลายส่วนบนของสารสกัดใบไม้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 662, 644 และ 470 นาโนเมตร โดยระวังไม่ให้เกิดการรบกวนตะกอนด้านล่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณรงควัตถุแต่ละชนิด ดังสมการ

$$\text{ปริมาณ chlorophyll a (chl}_a\text{)} = 9.784 \text{ OD}_{662} - 0.99 \text{ OD}_{644} \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$\text{ปริมาณ chlorophyll b (chl}_b\text{)} = 21.42 \text{ OD}_{644} - 4.65 \text{ OD}_{662} \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$\text{ปริมาณ total chlorophyll (Total chl)} = \text{chl}_a + \text{chl}_b \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$\text{ปริมาณ carotenoid} = (1000 \text{ OD}_{470} - 1.90 \text{ chl}_a - 63.14$$

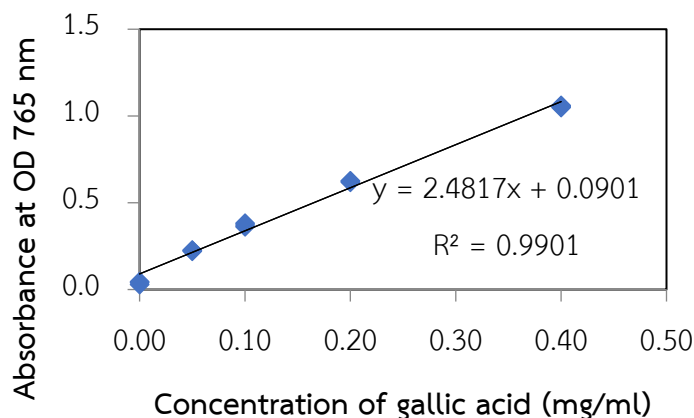
chl_b)/214

3.3 การเตรียมสารสกัดจากใบไผ่

เก็บตัวอย่างใบไผ่จากแต่ละกลุ่มการทดลองทั้ง 5 กลุ่ม ในวันที่ 0 4 และ 8 เพื่อนำมาใช้ในการสกัด ตัวอย่างใบก่อนสกัดให้นำไปล้างทำความสะอาดและอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำตัวอย่างใบไผ่แห้งแต่ละกลุ่มมาบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 60% เอทานอล ตามวิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Macwan et al. (2010) และ Sutharut and Sudarat (2012) ซึ่งมีวิธีดังนี้ ชั่งตัวอย่างบดละเอียด 0.5 กรัม เติมตัวทำละลาย 6 มิลลิลิตร ในรอบแรก เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex) เป็นเวลา 30 วินาที แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยนำออกมาเขย่าทุก 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,800 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ตุนำสารละลายส่วนในใสมาเก็บไว้ ทำการสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยเติมตัวทำละลาย 3 มิลลิลิตร/รอบ ตุนำสารละลายส่วนในใสมารวมกันและปรับปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรด้วยตัวทำละลายเดียวกัน ทุ้มหลอดด้วยแผ่นฟอยด์ สุดท้ายนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C (ทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง) เพื่อนำไปใช้ในการวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสาร flavones C-glycoside และกรดฟีนอลิก โดยวิธี RP-HPLC ต่อไป

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

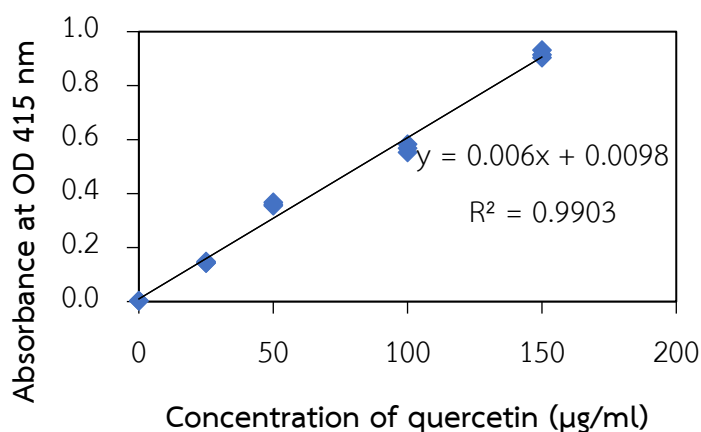
ดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมตามวิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Macwan et al. (2010) และ Singleton and Rossi (1965) ซึ่งมีวิธีดังนี้ เติมสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรและ 10% Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรลงในขวด vial ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ในที่มืด 1 นาที จากนั้นเติม 75% Sodium carbonate ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรรวมเป็น 2 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันก่อนวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยมีน้ำกลั่นเป็น blank (วัดซ้ำ 2 ครั้ง) นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของฟีนอลิก (gallic acid) โดยทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ คำนวณสารประกอบฟีนอลิกรวมในรูปมิลลิกรัมสมมูลของกรดฟีนอลิก (Gallic acid equivalents; GAE) ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่างใบไผ่ ซึ่งมีหน่วยเป็น mg GAE/g DW



รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานของสารประกอบฟีนอลิก (gallic acid) ของการทดลองที่ 3

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม

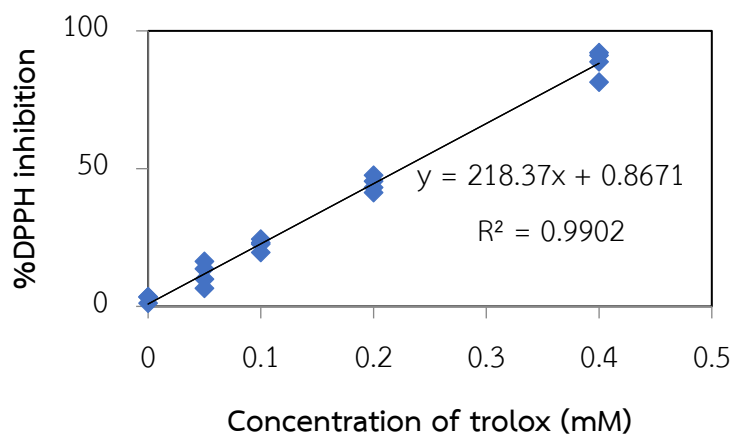
ดำเนินการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมตามวิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Macwan et al. (2010) ซึ่งมีวิธีดังนี้ เติมสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรและเมทานอล ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตรลงในขวด vial ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 10% aluminium chloride ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตรและ 1.0 M potassium acetate ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรรวมเป็น 2.5 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันก่อนวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยมีน้ำกลั่นเป็น blank (วัดซ้ำ 2 ครั้ง) นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของฟลาโวนอยด์ (quercetin) โดยทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ คำนวณสารฟลาโวนอยด์รวมในรูปไมโครกรัมสมมูลของควอซีติน (Quercetin equivalents; QE) ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่างใบไม้ ซึ่งมีหน่วยเป็น $\mu\text{g QE/g DW}$



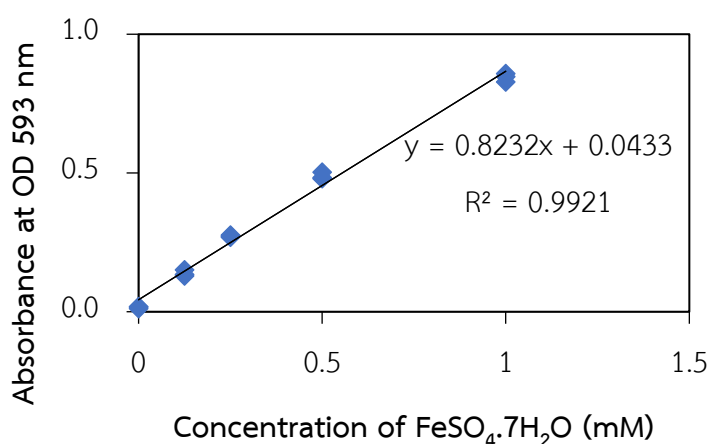
รูปที่ 19 กราฟมาตรฐานของฟลาโวนอยด์ (quercetin) ของการทดลองที่ 3

3.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยวิธี RP-HPLC

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสาร flavones C-glycoside และกรดฟีนอลิก โดยวิธี RP-HPLC ดำเนินการวิจัยตามวิธีการในการทดลองที่ 1 ทั้งนี้ความเข้มข้นสารสกัดใ้ใช้ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay ในการทดลองนี้ใช้เป็น 0, 2, 4, 8 และ 16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมีกราฟมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ 20 และในการวิเคราะห์ด้วย FRAP assay มีกราฟมาตรฐานดังแสดงในรูปที่ 21



รูปที่ 20 กราฟมาตรฐานของการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ของการทดลองที่ 3



รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของการวัดฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP assay ของการทดลองที่ 3

บทที่ 4

ผลการทดลอง

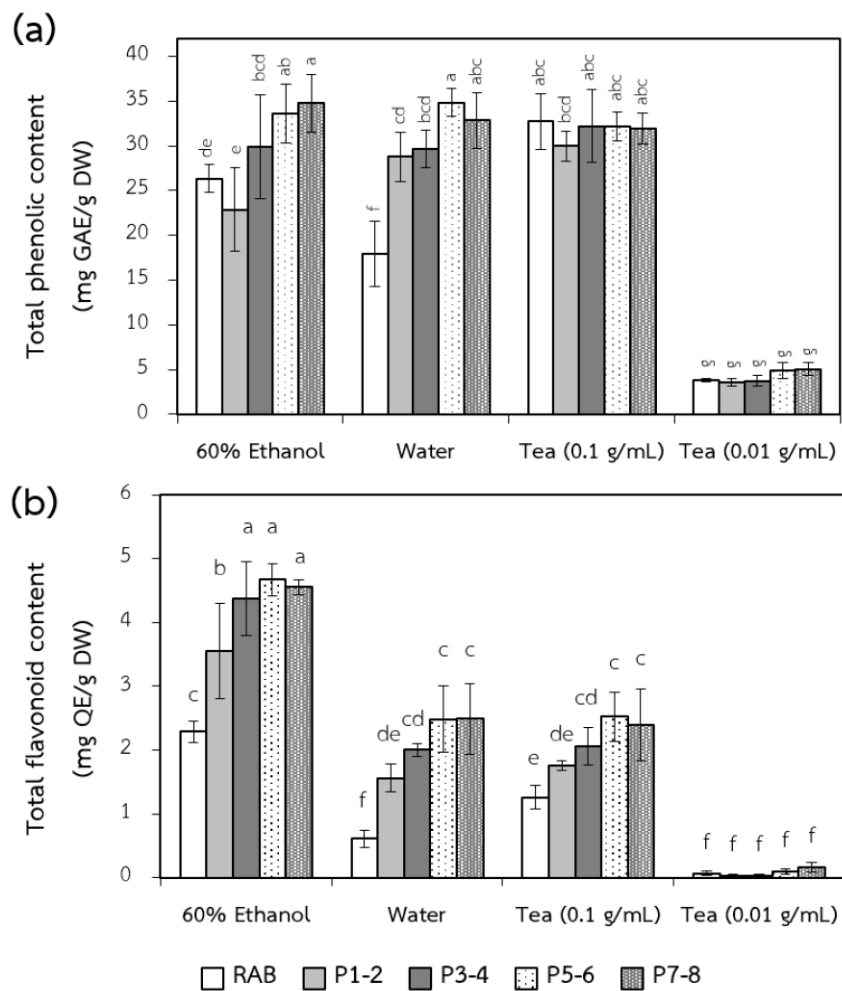
การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายและวิธีสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไม้ที่สกัดจากตำแหน่งใบย่อยที่แตกต่างกัน

ศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย spectrophotometer รวมถึงศึกษาชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญด้วยเทคนิค RP-HPLC จากการนำตัวอย่างไม้ปักกิ่ง (*Dendrocalamus sp.*) มาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายและวิธีการสกัดที่ต่างกันแบ่งได้เป็น 4 วิธี ได้แก่ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเป็น 60% เอทานอล (วิธีที่ 1) ใช้ น้ำเป็นตัวทำละลาย (วิธีที่ 2) สกัดด้วยวิธีที่คล้ายกับการชงชาโดยใช้อัตราส่วนไม้ต่อตัวทำละลายเป็น 0.1 กรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีที่ 1 และ 2 (วิธีที่ 3) และสกัดด้วยวิธีที่คล้ายกับการชงชาแต่ใช้อัตราส่วนไม้ต่อตัวทำละลายเป็น 0.01 กรัม/มิลลิลิตร เลียนแบบอัตราส่วนในการชงชาจริง (วิธีที่ 4) ดำเนินงานวิจัยโดยสกัดด้วย 4 วิธีดังกล่าวจากตำแหน่งใบย่อยที่แตกต่างกัน เรียงตามอายุจากใบอ่อน-ใบแก่ ได้เป็น RAB, P1-2, P3-4, P5-6 และ P7-8 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังนี้

1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

ผลการศึกษาปริมาณสารฟลาโวนอยด์กลุ่มหลักที่พบในสารสกัดใบไม้ทั้ง 2 กลุ่ม ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกรวม แสดงผลการทดลองในรูปแบบมิลลิกรัม (mg) ของ Gallic acid equivalents (GAE) ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่างใบไม้ ซึ่งมีหน่วยเป็น mg GAE/g DW (รูปที่ 22a) และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมแสดงผลการทดลองในรูปแบบมิลลิกรัม (mg) ของ Quercetin equivalents (QE) ต่อกรัมของน้ำหนักแห้งของตัวอย่างใบไม้ ซึ่งมีหน่วยเป็น mg QE/g DW (รูปที่ 22b) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารสกัดใบไม้ปักกิ่งของทุกวิธีการสกัดและทุกตำแหน่งใบรวมกันด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม แสดงให้เห็นว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมจากแต่ละวิธีการสกัด ณ ตำแหน่งใบที่ RAB และ P1-2 มีปริมาณต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยวิธีสกัดที่ปรากฏปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดตามลำดับ คือ วิธีที่ 3 (32.70 ± 3.09 และ 29.97 ± 1.68 mg GAE/g DW) วิธีที่ 1 (26.35 ± 1.55 และ 22.89 ± 4.63 mg GAE/g DW) วิธีที่ 2 (17.97 ± 3.66 และ 28.75 ± 2.79 mg GAE/g DW) และ วิธีที่ 4 (3.79 ± 0.18 และ 3.58 ± 0.44 mg GAE/g DW) ในขณะที่การพิจารณาจากปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัด วิธีที่ 1 ที่ใช้ตัวทำละลาย 60% เอทานอลมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับตำแหน่งใบเดียวกันทุก

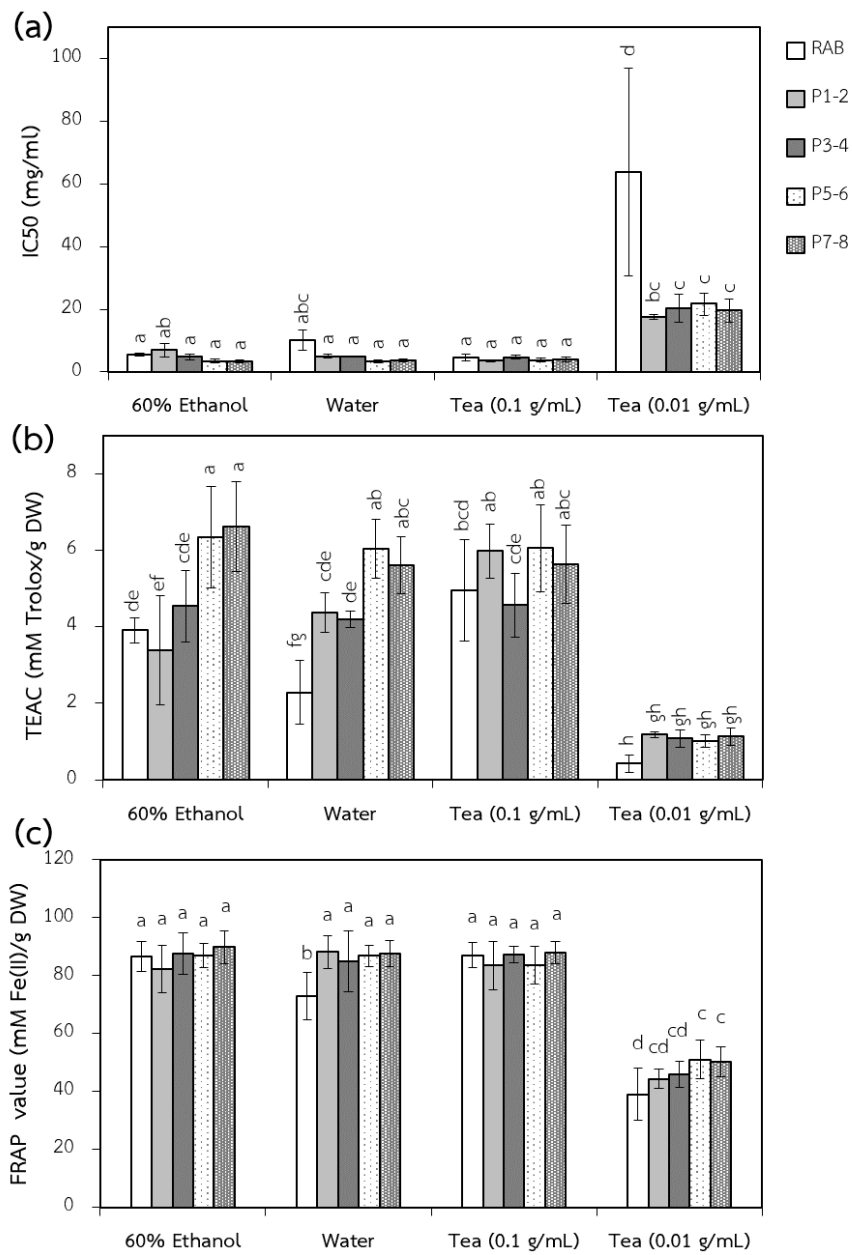
ตำแหน่งที่ต่างวิธีสกัด โดย ณ ตำแหน่งใบจาก RAB ถึง P7-8 มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมอยู่ในช่วง 2.29 ± 0.17 ถึง 4.55 ± 0.12 mg QE/g DW และเมื่อพิจารณาถึงปัจจัยด้านอายุใบ จะเห็นว่าผลการทดลองของปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในทุกวิธีการสกัดมีผลการทดลองเช่นเดียวกัน คือ ที่ตำแหน่ง RAB ซึ่งเป็นใบอ่อนจะมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่ต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามด้วยตำแหน่ง P1-2 และ P3-4 ที่มีการจัดกลุ่มทางสถิติใกล้เคียงกัน และสุดท้ายตำแหน่ง P5-6 และ P7-8 ที่มีการสะสมปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 22)



รูปที่ 22 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (a) และฟลาโวนอยด์รวม (b) ของสารสกัดจากใบไม้ปักกิ่งที่สกัดโดยใช้วิธีการต่างกันที่ตำแหน่งใบต่างกัน

1.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ 2 วิธีทดสอบ คือ วิธี DPPH scavenging assay รายงานผลในรูป IC_{50} ในหน่วย mg/mL (รูปที่ 23a) และ TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ซึ่งมีหน่วยเป็น mM trolox/g DW (รูปที่ 23b) และวิธี FRAP assay ที่รายงานผลการทดลองในรูป FRAP value แสดงความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐาน $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ มีหน่วยเป็น mM Fe(II)/g DW (รูปที่ 23c) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารสกัดใบไผ่ปักกิ่งของทุกวิธีการสกัดและต่างตำแหน่งใบรวมกันด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในรูปของค่า IC_{50} และ TEAC พิจารณาที่ตำแหน่งใบ RAB และ P1-2 ของแต่ละวิธีการสกัดจะเห็นว่า IC_{50} ของ วิธีที่ 3 ซึ่งเป็นการสกัดโดยวิธีชงชาในอัตราส่วน 0.1 กรัม/มิลลิลิตร มีค่าต่ำที่สุด และมีค่า TEAC สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมก่อนหน้า ในขณะที่การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ผลการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติมากนักในทุกวิธีการสกัดและตำแหน่งใบ ยกเว้น วิธีที่ 4 ที่เป็นการสกัดตามอัตราส่วนในการชงชาที่แสดงให้เห็นว่าที่ตำแหน่งใบ RAB มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีแนวโน้มมากขึ้นในตำแหน่งใบที่มีอายุมากขึ้น เช่นเดียวกับผลของ IC_{50} และจาก TEAC หากพิจารณาจากตำแหน่งใบที่ต่างกันในทุกวิธีการสกัด ก็จะแสดงผลในทำนองเดียวกันคือใบที่มีอายุน้อยมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าใบที่มีอายุมากขึ้น เห็นได้ชัดใน วิธีที่ 2 ที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดสามารถแบ่งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้เป็นต่ำปานกลาง และสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนี้ RAB มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระต่ำสุด ตำแหน่ง P1-2 กับ P3-4 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระปานกลาง และตำแหน่ง P5-6 กับ P7-8 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด (รูปที่ 23)

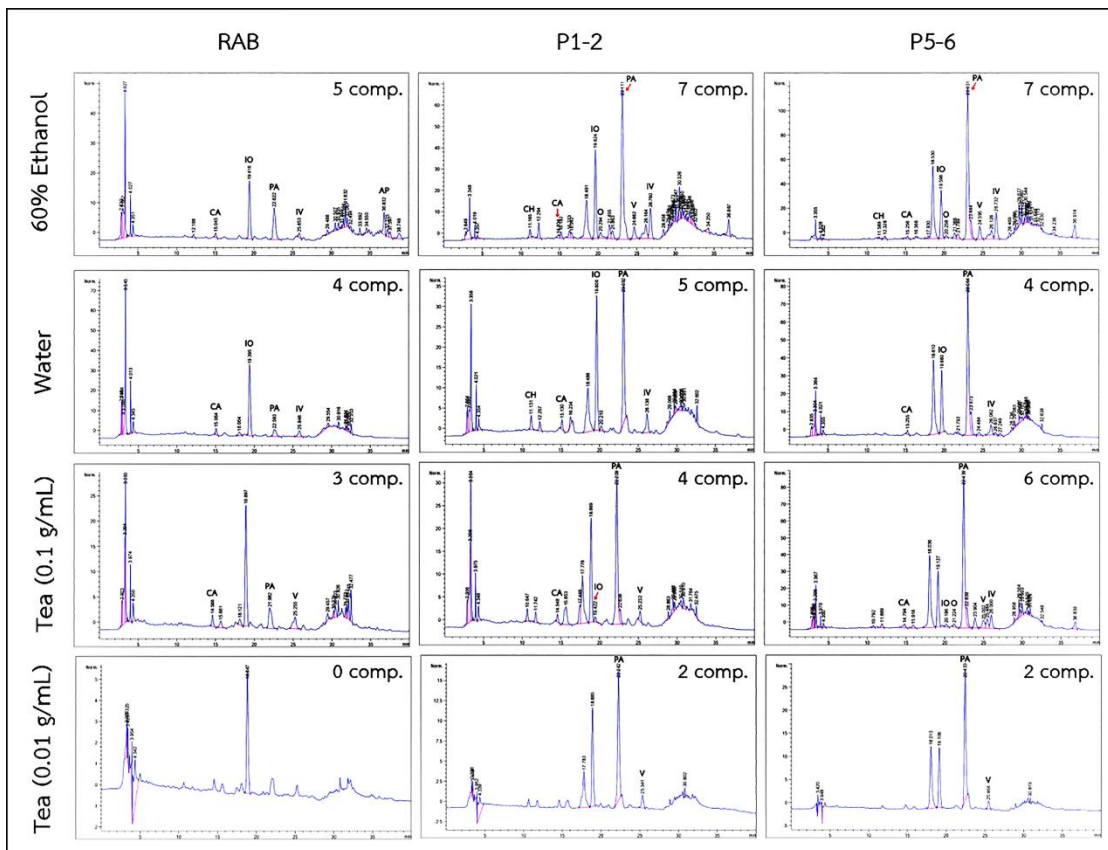


รูปที่ 23 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay แสดงผลในรูป IC₅₀ (a) และ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (b) และวิธี FRAP assay (c) ของสารสกัดจากใบไผ่ป่ากึ่งที่สกัดโดยใช้วิธีการต่างกันอย่างที่ตำแหน่งใบต่างกัน

1.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีด้วยวิธี RP-HPLC

ผลการศึกษาชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงในสารสกัดใบไผ่ปักกิ่งจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid, isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid, vitexin, isovitexin และ apigenin โดยใช้วิธีการสกัดที่ต่างกัน 4 วิธี และตำแหน่งใบที่นำมาวิเคราะห์ 3 ตำแหน่ง ซึ่งพิจารณาจากปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในรูป TEAC ที่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ ตำแหน่ง RAB, P1-2, และ P5-6 เป็นตัวแทนของใบอ่อน ใบกลาง และใบแก่ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในรูปแบบโครมาโตแกรม (รูปที่ 24) และตารางผลที่มีการแสดงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ละชนิดในหน่วย mg/g (ตารางที่ 3) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและค่าการกระจายตัวของค่าเฉลี่ย (standard error, SE) ของปริมาณสารพฤกษเคมีแต่ละชนิดด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$

จากภาพโครมาโตแกรม แสดงให้เห็นว่าแต่ละวิธีการสกัด ณ ตำแหน่งใบเดียวกันมีการพบสารพฤกษเคมีเป็นจำนวนชนิดไม่เท่ากัน ที่ตำแหน่ง RAB ซึ่งเป็นตำแหน่งใบอ่อน แต่ละวิธีการสกัดสามารถพบสารต่างกันคือ วิธีที่ 1 พบสาร 5 ชนิด ได้แก่ CA, IO, PA, IV และ AP วิธีที่ 2 พบสาร 4 ชนิด ได้แก่ CA, IO, PA, และ IV วิธีที่ 3 พบสาร 3 ชนิด ได้แก่ CA, PA และ V และวิธีที่ 4 ไม่สามารถตรวจพบสารพฤกษเคมี ที่ตำแหน่ง P1-2 ซึ่งเป็นตำแหน่งใบกลาง แต่ละวิธีการสกัดสามารถพบสารต่างกันคือ วิธีที่ 1 พบสาร 7 ชนิด ได้แก่ CH, CA, IO, O, PA, V และ IV วิธีที่ 2 พบสาร 5 ชนิด ได้แก่ CH, CA, IO, PA และ IV วิธีที่ 3 พบสาร 4 ชนิด ได้แก่ CA, IO, PA และ V และวิธีที่ 4 พบสาร 2 ชนิด คือ PA และ V ในขณะที่ตำแหน่ง P5-6 ซึ่งเป็นตำแหน่งใบแก่ แต่ละวิธีการสกัดสามารถพบสารต่างกันคือ วิธีที่ 1 พบสาร 7 ชนิด ได้แก่ CH, CA, IO, O, PA, V และ IV, วิธีที่ 2 พบสาร 4 ชนิด ได้แก่ CA, IO, PA และ IV, วิธีที่ 3 พบสาร 6 ชนิด ได้แก่ CA, IO, O, PA, V และ IV และวิธีที่ 4 พบสาร 2 ชนิด คือ PA และ V ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าวิธีที่ 1 ซึ่งใช้ 60% เอทานอล เป็นตัวทำละลายในการสกัดสามารถพบจำนวนชนิดของสารพฤกษเคมีได้มากที่สุดเมื่อพิจารณาที่ทุกตำแหน่งใบ และหากพิจารณาจากแต่ละวิธีการสกัด ตำแหน่งใบที่มีอายุมากกว่าจะพบชนิดสารพฤกษเคมีได้หลากชนิดมากกว่า (รูปที่ 24)



รูปที่ 24 แสดงโครมาโตแกรมของสารพฤกษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดใบไผ่ปักกิ่งที่สกัดโดยใช้วิธีการต่างกันที่ตำแหน่งใบต่างกัน

พิจารณาในเชิงปริมาณ จากตารางแสดงชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมี จะเห็นว่าสารพฤกษเคมีแต่ละชนิดมีการสะสมปริมาณสูงสุดที่ตำแหน่งใบ P5-6, P1-2 และ RAB ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ โดยวิธีการสกัดที่พบชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีมากที่สุด คือ วิธีที่ 1 สังเกตจากการที่มีสารพฤกษเคมีจำนวน 4 ชนิดที่สามารถพบได้สูงสุดที่วิธีที่ 1 ณ ตำแหน่งใบ P5-6 ได้แก่ isoorientin (1.44 ± 0.23 mg/g), *p*-coumaric acid (8.62 ± 1.24 mg/g), vitexin (1.43 ± 0.42 mg/g) และ isovitexin (1.21 ± 0.48 mg/g) นอกจากนี้ที่ตำแหน่งใบ RAB การสกัดด้วยวิธีที่ 1 ยังเป็นวิธีการสกัดเดียวที่มีการพบ apigenin (0.26 ± 0.09 mg/g) อีกด้วย ทั้งนี้ วิธีที่ 4 ซึ่งเป็นการสกัดเลียนแบบการชงชาดื่มพบว่า สามารถพบสารพฤกษเคมีได้ 2 ชนิด โดยพบสูงสุดที่ตำแหน่งใบแก่ P5-6 คือ *p*-coumaric acid (9.02 ± 1.70 mg/g) และ vitexin (1.30 ± 0.13 mg/g) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดใบไผ่กึ่งที่สกัดโดยใช้วิธีการต่างกันในตำแหน่งใบต่างกัน

Phytochemical contents in bamboo leaf extracts of Pai Pak King (mg/g)*											
Method	Position	Chlorogenic acid		Caffeic acid		Isoorientin	Orientin	p-coumaric acid	Vitexin	Isovitexin	Apigenin
60%	RAB	ND	0.10±0.00 ^b	0.78±0.03 ^c	ND	1.00±0.04 ^{de}	ND	0.11±0.00 ^c	0.26±0.09 ^a		
Ethanol	P1-2	0.21±0.01 ^a	0.13±0.01 ^b	1.28±0.12 ^{ab}	0.26±0.05 ^b	4.80±0.43 ^b	0.65±0.06 ^{bc}	0.57±0.07 ^b	ND		
	P5-6	0.14±0.02 ^c	0.12±0.03 ^b	1.44±0.23 ^a	0.71±0.25 ^a	8.62±1.24 ^a	1.43±0.42 ^a	1.21±0.48 ^a	ND		
Water	RAB	ND	0.13±0.01 ^b	1.00±0.12 ^{bc}	ND	0.58±0.21 ^{de}	ND	0.19±0.01 ^{bc}	ND		
	P1-2	0.19±0.02 ^b	0.11±0.01 ^b	1.05±0.09 ^{bc}	ND	2.02±0.13 ^{de}	ND	0.24±0.01 ^{bc}	ND		
	P5-6	ND	0.12±0.01 ^b	1.28±0.23 ^{ab}	ND	5.70±0.96 ^b	ND	0.33±0.05 ^{bc}	ND		
Tea (0.1 g/mL)	RAB	ND	0.12±0.01 ^b	ND	ND	0.39±0.07 ^{de}	0.49±0.03 ^{bc}	ND	ND		
	P1-2	ND	0.11±0.01 ^b	0.15±0.01 ^d	ND	2.46±0.38 ^{cd}	0.36±0.08 ^{cd}	ND	ND		
	P5-6	ND	0.17±0.00 ^a	0.16±0.01 ^d	0.24±0.02 ^{bc}	6.03±0.29 ^b	0.58±0.19 ^{bc}	0.47±0.04 ^{bc}	ND		
Tea (0.01 g/mL)	RAB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
	P1-2	ND	ND	ND	ND	4.61±0.87 ^{bc}	0.87±0.09 ^b	ND	ND		
	P5-6	ND	ND	ND	ND	9.02±1.70 ^a	1.30±0.13 ^a	ND	ND		

*Mean ± standard error (n = 3); ND = ไม่สามารถตรวจสอบได้

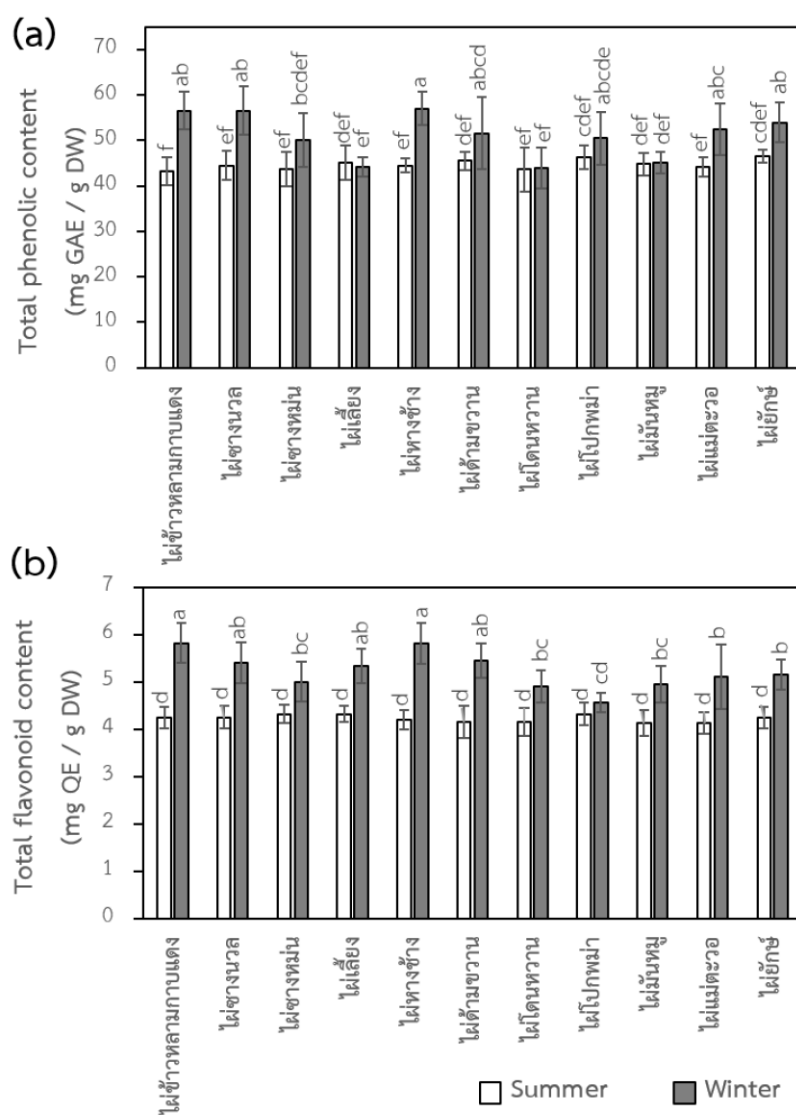
** ตัวอักษรภาษาอังกฤษในตารางที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของสารพฤกษเคมีแต่ละชนิดด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$

การทดลองที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีในสารสกัดใบไม้จากใบไม้ที่เก็บในฤดูกาลที่แตกต่างกัน

ศึกษาชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ spectrophotometer และเทคนิค RP-HPLC จากการสกัดตัวอย่างใบไม้ที่เก็บในฤดูกาลแตกต่างกัน คือ ฤดูร้อน (มีนาคม 2562) และฤดูหนาว (ธันวาคม 2563) จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ ไม้ข้าวหลามกาบแดง ไม้ชางนวล ไม้ชางหม่น ไม้ด้ามขวาน ไม้โดนหวาน ไม้โปกพม่า ไม้มันหมู ไม้แม่ตะวอ ไม้ยักซ์ ไม้เลียง และไม้หางช้าง ผลการทดลองแสดงดังนี้

2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์

ผลการศึกษาปริมาณสารพฤกษเคมีที่สำคัญในสารสกัดใบไม้ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกรวม แสดงผลการทดลองในหน่วย mg GAE/g DW (รูปที่ 25a) และฟลาโวนอยด์รวมแสดงผลการทดลองในหน่วย mg QE/g DW (รูปที่ 25b) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารสกัดใบไม้ของตัวอย่างไม้ทุกชนิดจากทั้ง 2 ฤดูกาลรวมกันด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม แสดงให้เห็นว่าไม้ที่เก็บในช่วงฤดูหนาวทุกชนิดมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าไม้ที่เก็บในฤดูร้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของไม้ 3 ชนิด ได้แก่ ไม้โดนหวาน ไม้มันหมู และไม้เลียง และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมในไม้โปกพม่า ที่แม้มีการสะสมสูงกว่าในตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาว แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับตัวอย่างที่เก็บในฤดูร้อน และจากการทดลองสารสกัดไม้จำนวน 7 ตัวอย่าง ที่มีการสะสมปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ล้วนเป็นตัวอย่างไม้ที่สกัดจากใบไม้ที่เก็บในช่วงฤดูหนาว ได้แก่ ไม้หางช้าง ไม้ข้าวหลามกาบแดง ไม้ชางนวล ไม้ยักซ์ ไม้แม่ตะวอ ไม้ด้ามขวาน และไม้โปกพม่า ตามลำดับ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 50.50 ± 5.81 ถึง 57.01 ± 3.70 mg GAE/g DW และสารสกัดไม้จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่มีการสะสมปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ก็เป็นตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาวเช่นกัน ได้แก่ ไม้ข้าวหลามกาบแดง ไม้หางช้าง ไม้ด้ามขวาน ไม้ชางหม่น และ ไม้เลียง ตามลำดับ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.34 ± 0.36 ถึง 5.82 ± 0.42 mg QE/g DW (รูปที่ 25)

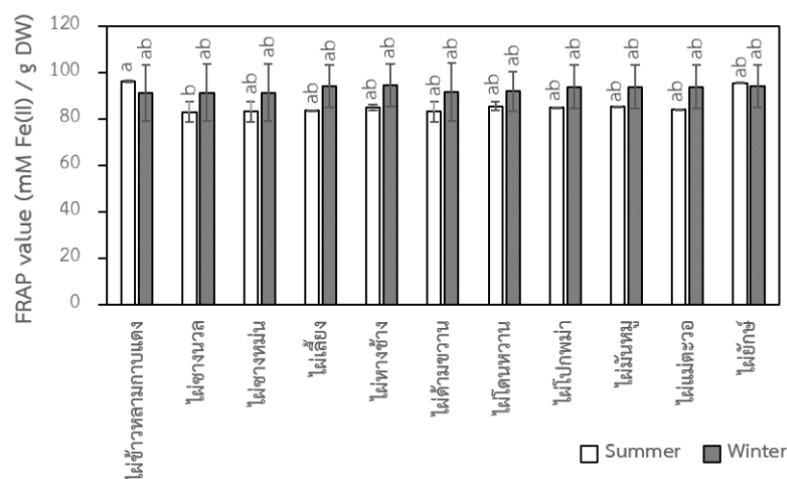


รูปที่ 25 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (a) และฟลาโวนอยด์รวม (b) ของสารสกัดจากใบไม้ที่เก็บในฤดูกาลที่แตกต่างกัน

2.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ FRAP assay เป็นวิธีทดสอบ ซึ่งรายงานผลการทดลองในรูปแบบ FRAP value มีหน่วยเป็น mM Fe(II)/g DW วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารสกัดใบไม้ของตัวอย่างไม้ทุกชนิดจากทั้ง 2 ฤดูกาลรวมกันด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ผลการทดลองฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี FRAP assay มีความสอดคล้องกับผลการทดลองปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ก่อนหน้า คือ

ตัวอย่างไม้ที่เก็บในช่วงฤดูหนาวมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูร้อน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยตัวอย่างไม้ทั้ง 2 ฤดูมีค่า FRAP value อยู่ในช่วง 82.85 ± 4.40 ถึง 95.97 ± 0.47 mM Fe(II)/g DW (รูปที่ 26)

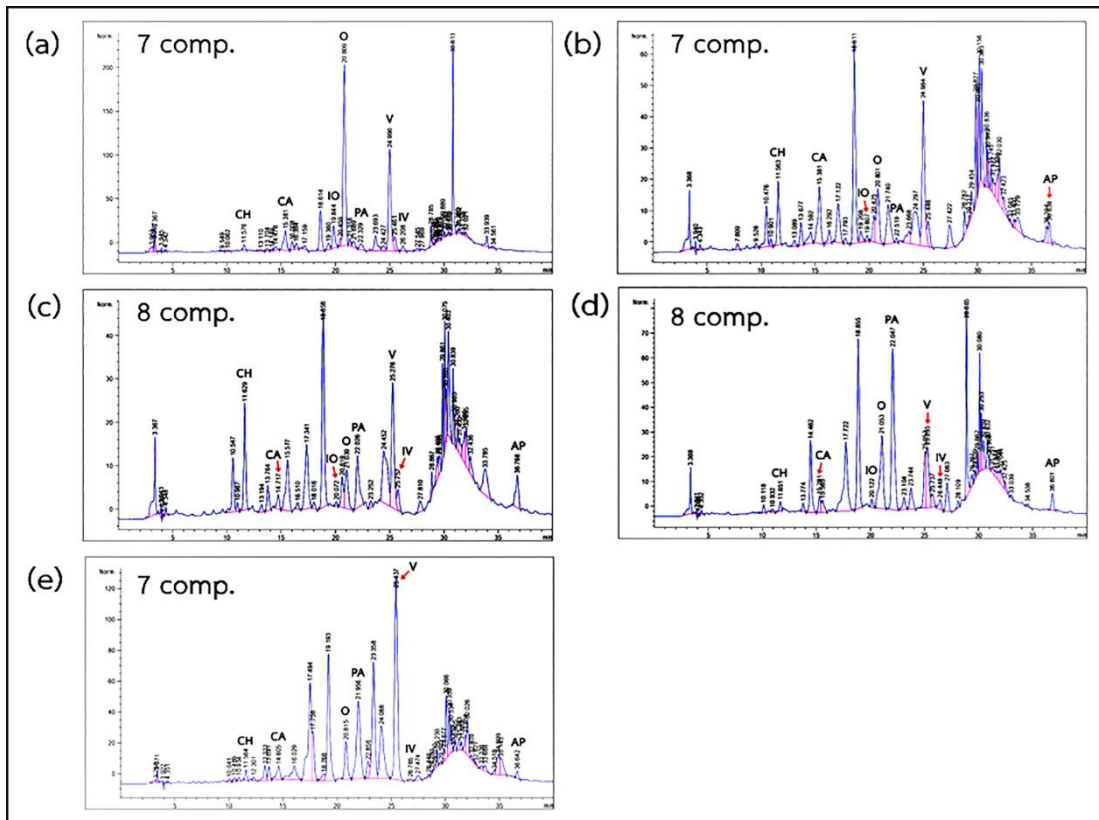


รูปที่ 26 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากใบไม้ที่เก็บในฤดูกาลที่ต่างกัน

1.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีด้วยวิธี RP-HPLC

สารสกัดใบไม้จำนวน 5 ชนิดที่เก็บในฤดูหนาว ได้แก่ ไม้ข้าวหลามกาบแดง ไม้ชางนวล ไม้ชางหม่น ไม้เลียง และไม้หางช้าง ซึ่งจากผลการทดลองก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ และเป็นไม้ชนิดที่นิยมปลูกในประเทศไทย นำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid, isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid, vitexin, isovitexin และ apigenin ผลการทดลองแสดงในรูปโครมาโตแกรม (รูปที่ 27) และตารางผลที่มีการแสดงปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแต่ละชนิดในหน่วย mg/g (ตารางที่ 4)

จากโครมาโตแกรม ลักษณะ peak ที่ปรากฏแสดงให้เห็นว่าไม้แต่ละชนิดมีรูปแบบความสูงของ peak ที่แตกต่างกัน และชนิดของสารพฤกษเคมีที่พบแตกต่างกัน ซึ่งไม้ข้าวหลามกาบแดง ไม้ชางนวล และไม้หางช้าง สามารถพบสารพฤกษเคมีได้จำนวน 7 ชนิด โดยไม้แต่ละชนิดไม่พบ apigenin, isovitexin และ isoorientin ตามลำดับ ในขณะที่ไม้ชางหม่นและไม้เลียงสามารถพบสารพฤกษเคมีได้ทั้ง 8 ชนิด (รูปที่ 27)



รูปที่ 27 โครมาโตแกรมของสารฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดใบไม้จำนวน 5 ชนิดที่เก็บในฤดูหนาว ได้แก่ ไม้ข้าวหลามกาบแดง (a), ไม้ชางนวล (b), ไม้ชางหม่น (c), ไม้เลี้ยง (d), และไม้หางช้าง (e)

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่พบสามารถพิจารณาจากตารางที่ 4 ซึ่งวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและค่าการกระจายตัวของค่าเฉลี่ย (SE) ของปริมาณสารฟลาโวนอยด์แต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ผลการทดลองจะเห็นว่าไม้แต่ละชนิดมีสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นชนิดเด่นแตกต่างกัน ดังนี้ ไม้ข้าวหลามกาบแดงพบ orientin (13.82 ± 1.59 mg/g) เป็นชนิดเด่น ส่วนไม้ชางนวล ไม้ชางหม่น และไม้หางช้าง พบ vitexin เป็นชนิดเด่น มีปริมาณ 4.01 ± 0.40 mg/g, 2.33 ± 0.32 mg/g และ 17.67 ± 1.82 mg/g ตามลำดับ และไม้เลี้ยงพบ *p*-coumaric acid (4.12 ± 0.32 mg/g) เป็นชนิดเด่น ทั้งนี้จากผลการทดลองพบว่า สารฟลาโวนอยด์จำนวน 8 ชนิด แต่ละชนิดมีการสะสมสูงสุดได้ในไม้ต่างชนิด โดย chlorogenic acid พบสูงสุดในไม้ชางนวล (1.01 ± 0.06 mg/g) และไม้ชางหม่น (0.96 ± 0.10 mg/g) ส่วน apigenin พบสูงสุดในไม้ชางนวล (0.27 ± 0.02 mg/g) ไม้ชางหม่น (0.29 ± 0.01 mg/g) และไม้เลี้ยง (0.30 ± 0.01 mg/g) ในขณะที่ *p*-coumaric acid (5.27 ± 0.27 mg/g) และ vitexin (17.67 ± 1.82 mg/g) พบสูงสุดใน

ไม้หางช้าง และสารพฤกษเคมีชนิดอื่น ๆ จำนวน 4 ชนิด สามารถพบการสะสมสูงสุดใน ไม้ข้าวหลามกาบแดง ได้แก่ caffeic acid (0.86 ± 0.18 mg/g), isorientin (0.93 ± 0.05 mg/g), orientin (13.82 ± 1.59 mg/g) และ isovitexin (0.29 ± 0.01 mg/g) โดย caffeic acid ยังพบสูงสุดใน ไม้ชางนวลอีกด้วย (0.77 ± 0.03 mg/g)



ตารางที่ 4 ปริมาณสารพฤกษเคมีที่พบในสารสกัดใบไม้จำนวน 5 ชนิดที่เก็บในฤดูหนาว

Samples	Phytochemicals content (mg/g)*									
	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Isorientin	Orientin	<i>p</i> -coumaric acid	Vitexin	Isovitexin	Apigenin		
ไม้ข้าวหลามกาบแดง	0.35 ± 0.02 ^b	0.86 ± 0.18 ^a	0.93 ± 0.05 ^a	13.82 ± 1.59 ^a	0.62 ± 0.03 ^{cd}	11.65 ± 0.06 ^b	0.29 ± 0.01 ^a	ND		
ไม้ชางนวล	1.01 ± 0.06 ^a	0.77 ± 0.03 ^a	0.13 ± 0.01 ^b	1.57 ± 0.03 ^b	0.14 ± 0.01 ^d	4.01 ± 0.40 ^c	ND	0.27 ± 0.02 ^{ab}		
ไม้ชางหม่น	0.96 ± 0.10 ^a	0.16 ± 0.01 ^c	0.13 ± 0.01 ^b	0.76 ± 0.08 ^b	0.97 ± 0.03 ^c	2.33 ± 0.32 ^c	0.18 ± 0.02 ^b	0.29 ± 0.01 ^{ab}		
ไม้เลียง	0.20 ± 0.01 ^b	0.22 ± 0.02 ^c	0.17 ± 0.01 ^b	2.82 ± 0.16 ^b	4.12 ± 0.32 ^b	2.42 ± 0.26 ^c	0.14 ± 0.00 ^c	0.30 ± 0.01 ^a		
ไม้หางช้าง	0.31 ± 0.02 ^b	0.50 ± 0.04 ^b	ND	2.43 ± 0.2 ^b	5.27 ± 0.27 ^a	17.67 ± 1.82 ^a	0.11 ± 0.01 ^c	0.25 ± 0.02 ^b		

*Mean ± standard error (n = 3); ND = ไม่สามารถตรวจสอบได้

** ตัวอักษรภาษาอังกฤษในตารางที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของสารพฤกษเคมีแต่ละชนิดด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$

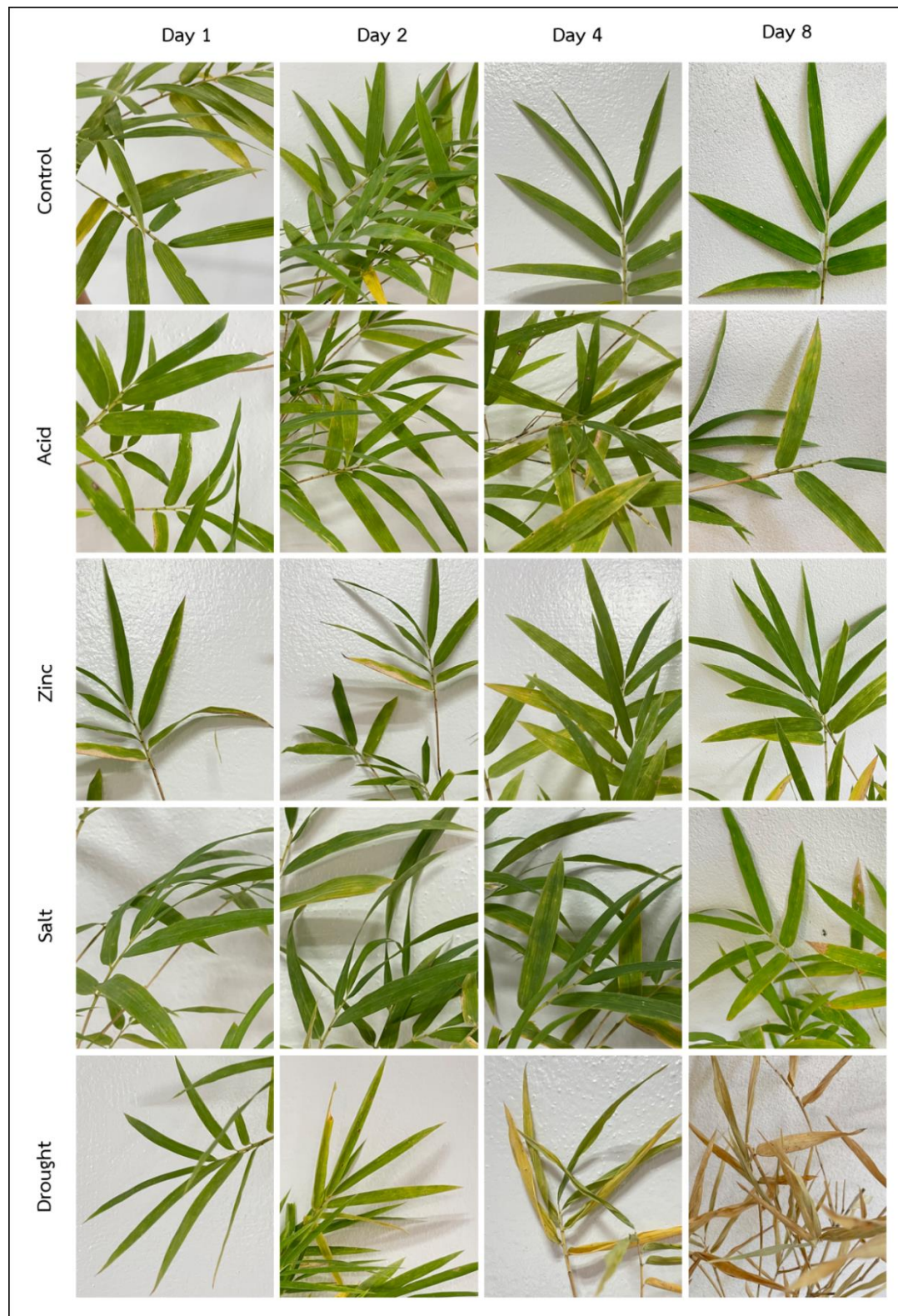
การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ ความเค็ม ความเป็นกรด โลหะหนักสังกะสี และการขาดน้ำ ต่อปริมาณสารพิษพิษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบไผ่

ศึกษาผลของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับ ความเครียด ได้แก่ ความเค็ม (salt) ความเป็นกรด (acid) โลหะหนักสังกะสี (zinc) และการขาดน้ำ (drought) ทำการทดลองในไผ่ 2 ชนิด คือ ไผ่เลี้ยงและไผ่ข้าวหลาม ผลการทดลองแบ่งเป็นศึกษาผลของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกต่อการเจริญเติบโต โดยการสังเกตลักษณะใบด้วยตาเปล่าและบันทึกภาพ การเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยา โดยวัดประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด และปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง และในด้านการสะสมสารพิษพิษเคมี วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบไผ่ รวมถึงวิเคราะห์ RP-HPLC

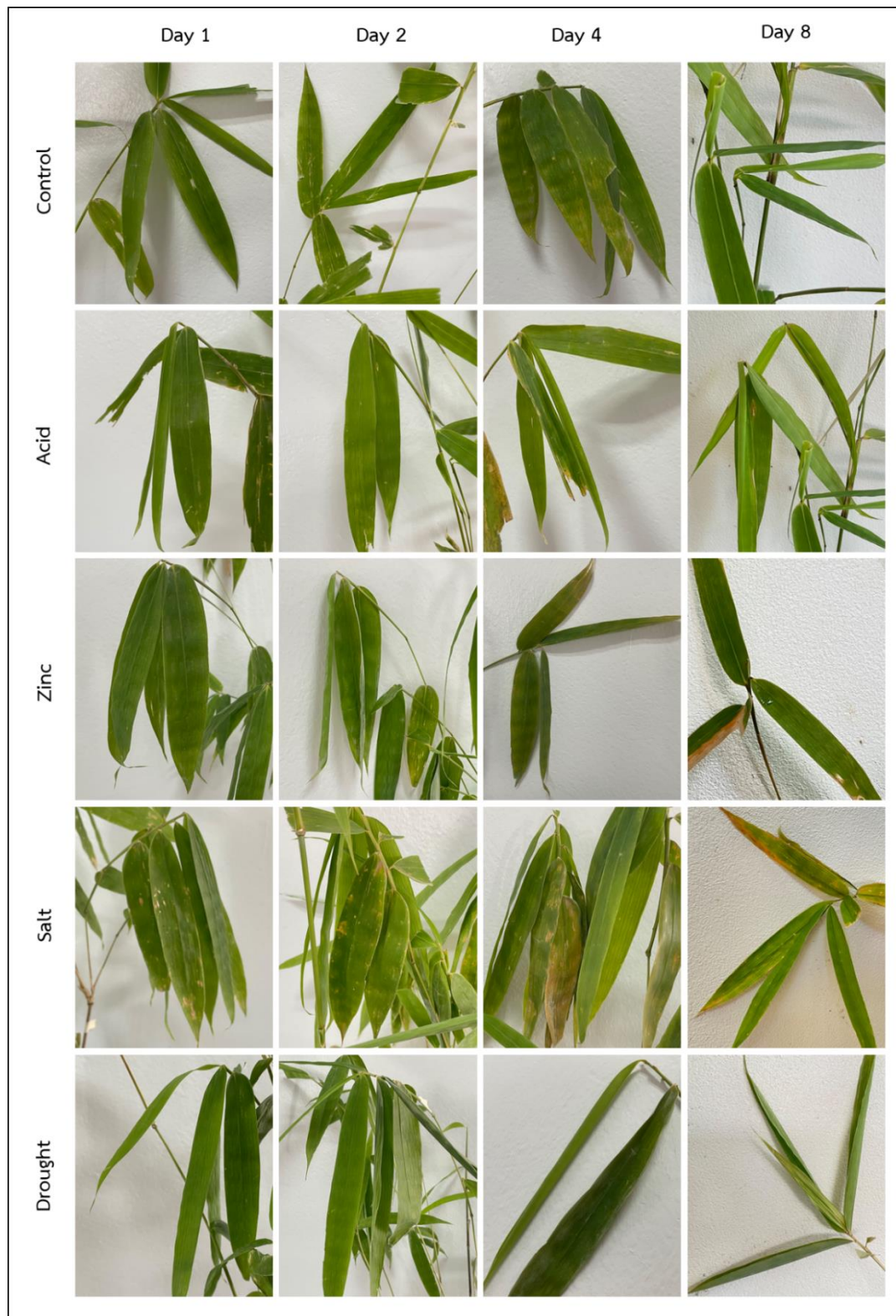
3.1 ผลกระทบของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกต่อการเจริญเติบโต

3.1.1 ลักษณะใบของไผ่เลี้ยงและไผ่ข้าวหลาม

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของใบไผ่เลี้ยงและไผ่ข้าวหลามหลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 2 4 และ 8 วัน โดยแต่ละวันมีการรดด้วยน้ำเป็นชุดการทดลองควบคุม จากการสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่า ลักษณะใบของไผ่เลี้ยง ชุดควบคุมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่ใบซึ่งได้รับความเครียดจากความเป็นกรด โลหะหนักสังกะสี และความเค็ม ใบไผ่เลี้ยงมีลักษณะเริ่มเหลืองเล็กน้อยวันที่ 4 และใบเหลืองทั่วทั้งใบมากขึ้นในวันที่ 8 ในขณะที่ใบไผ่เลี้ยงที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ ใบมีลักษณะเริ่มเหลืองตั้งแต่หลังได้รับความเครียดเป็นวันที่ 2 ต่อมาใบมีลักษณะเหี่ยวแห้งและซีดเหลืองมากขึ้นในวันที่ 4 เมื่อถึงวันที่ 8 ใบก็มีลักษณะแห้งเหี่ยวและมีสีน้ำตาล ยืนต้นตาย (รูปที่ 28) ส่วนลักษณะใบของไผ่ข้าวหลาม ชุดควบคุมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เช่นเดียวกับที่พบในไผ่เลี้ยง ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากความเป็นกรด ใบมีลักษณะเริ่มแห้งและห่อม้วนในวันที่ 8 ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากโลหะหนักสังกะสีและความเค็มไม่ค่อยปรากฏความเปลี่ยนแปลง สูดถ่ายใบไผ่ข้าวหลามในชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ หลังได้รับความเครียดวันที่ 4 ใบมีสีออกเหลืองเพียงเล็กน้อย และในวันที่ 8 ใบมีลักษณะแห้งและเหี่ยวมากขึ้นแต่ไม่รุนแรงเท่าที่พบในไผ่เลี้ยง (รูปที่ 29)



รูปที่ 28 ลักษณะใบของไผ่ไผ่เลี้ยง หลังได้รับสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 1 2 4 และ 8 วัน



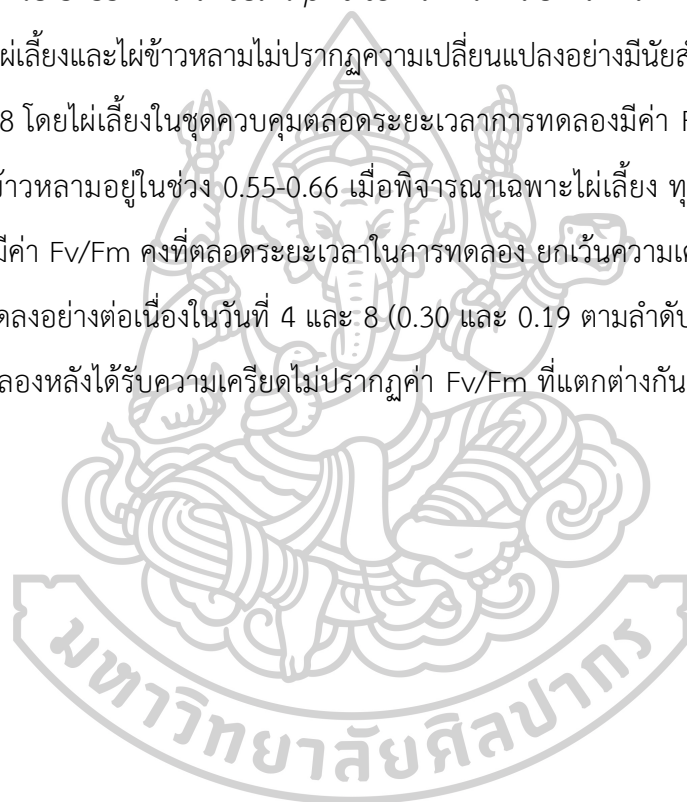
รูปที่ 29 ลักษณะใบของใบไผ่ข้าวหลาม หลังได้รับสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็น

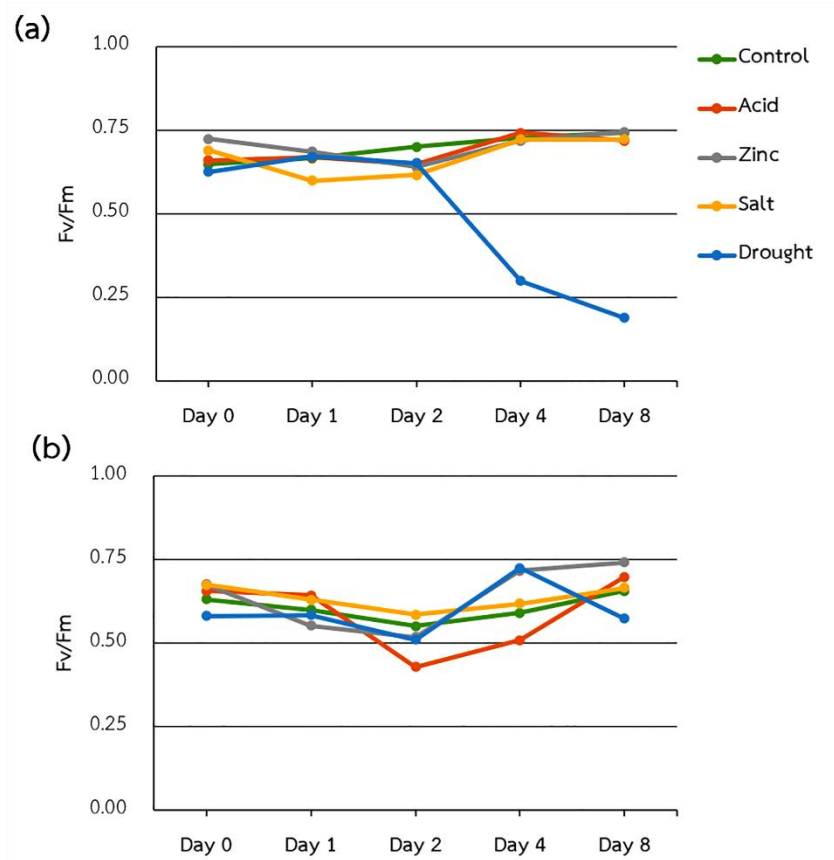
ระยะเวลา 1 2 4 และ 8 วัน

3.2 ผลกระทบของความเครียดจากสิ่งแวดลอมภายนอกต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยา

3.2.1 ประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด

จากการทดลองวัดประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด แสดงในรูปค่า F_v/F_m ของใผ่เลี้ยงและใผ่ข้าวหลาม หลังได้รับความจากสิ่งแวดลอมที่ต่างกัน ได้แก่ ความเป็นกรด โลหะหนักสังกะสี ความเค็ม และการขาดน้ำ เป็นระยะเวลา 0 1 2 4 และ 8 วัน วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของใผ่แต่ละชนิดที่ได้รับความเครียดจากสิ่งแวดลอมเป็นระยะเวลา 0 1 2 4 และ 8 วัน ด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่า F_v/F_m ของชุดควบคุมทั้งในใผ่เลี้ยงและใผ่ข้าวหลามไม่ปรากฏความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 8 โดยใผ่เลี้ยงในชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการทดลองมีค่า F_v/F_m อยู่ในช่วง 0.65-0.74 และใผ่ข้าวหลามอยู่ในช่วง 0.55-0.66 เมื่อพิจารณาเฉพาะใผ่เลี้ยง ทุกชุดการทดลองที่ได้รับความเครียด มีค่า F_v/F_m คงที่ตลอดระยะเวลาในการทดลอง ยกเว้นความเครียดจากการขาดน้ำที่มีค่า F_v/F_m ลดลงอย่างต่อเนื่องในวันที่ 4 และ 8 (0.30 และ 0.19 ตามลำดับ) ในขณะที่ใผ่ข้าวหลามทุกชุดการทดลองหลังได้รับความเครียดไม่ปรากฏค่า F_v/F_m ที่แตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 30 และตารางที่ 5)





รูปที่ 30 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (Fv/Fm) ของใผ่เลี้ยง (a) และใผ่ข้าวหลาม (b) หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 1 2 4 และ 8 วัน



ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด (Fv/Fm) ของไม้เลื้อย และไม้ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 1 2 4 และ 8 วัน

Species	Treatment	ค่า Fv/Fm				
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 4	Day 8
ไม้เลื้อย	Control	0.65±0.12 ^a	0.67±0.08 ^a	0.70±0.03 ^a	0.73±0.03 ^a	0.74±0.01 ^a
	Acid	0.66±0.09 ^a	0.67±0.04 ^a	0.65±0.03 ^a	0.74±0.03 ^a	0.72±0.03 ^a
	Zinc	0.72±0.04 ^a	0.69±0.04 ^a	0.64±0.06 ^a	0.72±0.02 ^a	0.74±0.03 ^a
	Salt	0.69±0.05 ^a	0.60±0.12 ^a	0.62±0.07 ^a	0.72±0.04 ^a	0.72±0.04 ^a
	Drought	0.62±0.11 ^a	0.67±0.8 ^a	0.65±0.07 ^a	0.30±0.28 ^b	0.19±0.36 ^b
ไม้ข้าวหลาม	Control	0.63±0.08	0.60±0.08	0.55±0.11	0.59±0.12	0.66±0.05
	Acid	0.66±0.15	0.64±0.07	0.43±0.07	0.51±0.06	0.70±0.14
	Zinc	0.68±0.08	0.55±0.08	0.52±0.13	0.72±0.04	0.74±0.04
	Salt	0.67±0.07	0.63±0.07	0.59±0.16	0.62±0.07	0.67±0.05
	Drought	0.58±0.15	0.58±0.10	0.51±0.12	0.72±0.05	0.57±0.37

*Mean ± SD (n = 4);

** ตัวอักษรภาษาอังกฤษในตารางที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของไม้แต่ละชนิดที่ได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เป็นระยะเวลา 0 1 2 4 และ 8 วัน ด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$

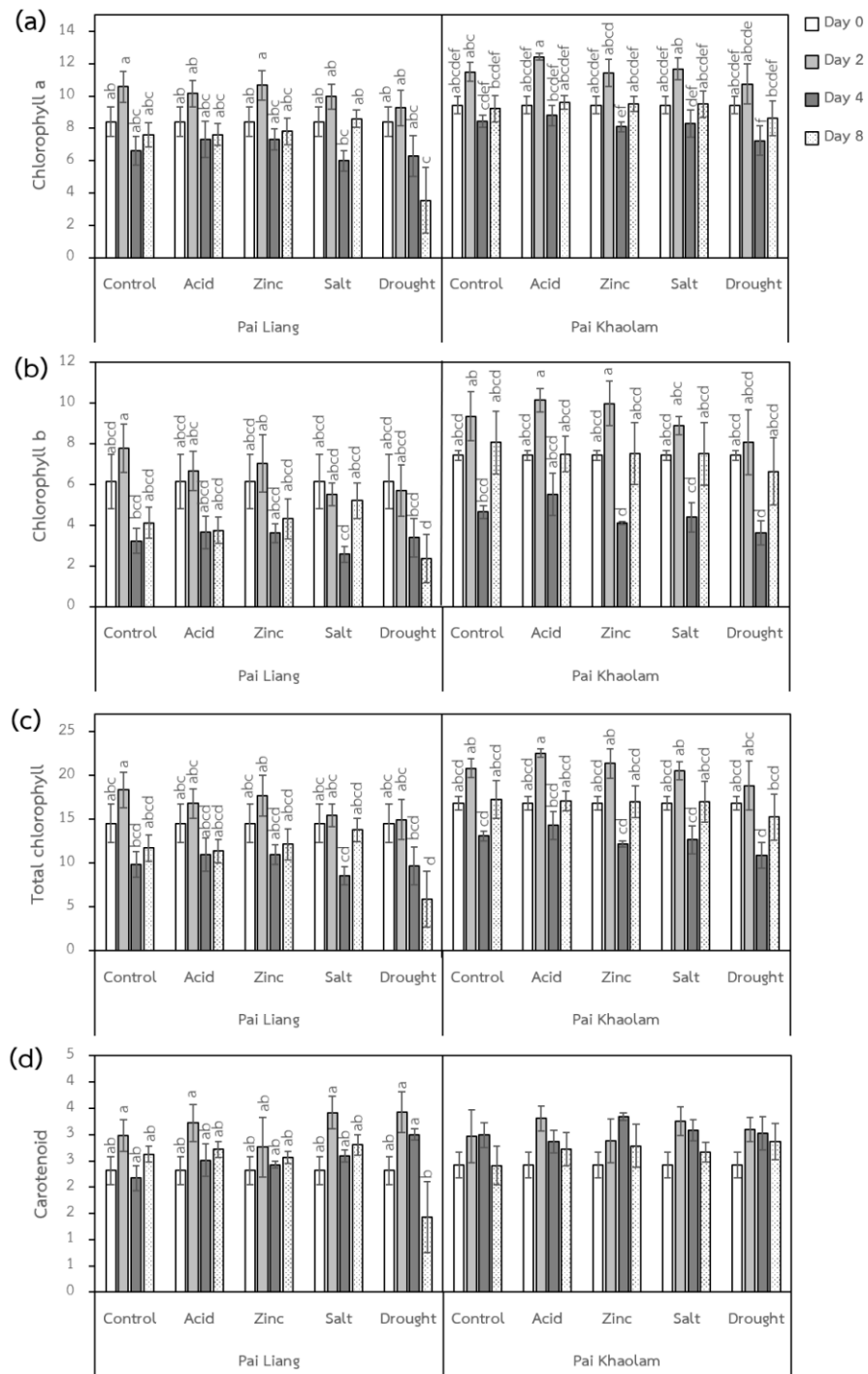
3.2.2 ปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง

วิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี คลอโรฟิลล์รวม และแคโรทีนอยด์ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ณ ใบตำแหน่งที่ 4 ของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 8 วัน วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติของไม้แต่ละชนิดด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.01$ และแสดงความคาดเคลื่อนในรูปค่าการกระจายตัวของค่าเฉลี่ย (SE) (รูปที่ 31) ผลการทดลองแสดงดังนี้

ปริมาณคลอโรฟิลล์เอและคลอโรฟิลล์บี โดยภาพรวมของไม้เลื้อยมีค่าน้อยกว่าในไม้ข้าวหลาม โดยหลังจากได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันเป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 8 วัน ปริมาณคลอโรฟิลล์เอของไม้เลื้อยมีค่าอยู่ในช่วง 3.55 ± 2.03 ถึง $10.67 \pm 0.91 \mu\text{g}/\text{mL}$ และในไม้ข้าวหลามมีค่าอยู่ในช่วง 7.24 ± 0.90 ถึง $12.41 \pm 0.21 \mu\text{g}/\text{mL}$ ส่วนปริมาณคลอโรฟิลล์บีของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลาม มีค่าอยู่ในช่วง 2.36 ± 1.18 ถึง $7.78 \pm 1.18 \mu\text{g}/\text{mL}$ และ 3.63 ± 0.60 ถึง 10.14 ± 0.56

$\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (รูปที่ 31a, 31b) นอกจากนี้หากพิจารณาจากปริมาณคลอโรฟิลด์รวม ซึ่งเป็นผลรวมของปริมาณคลอโรฟิลด์เอและบี ก็ปรากฏผลเช่นเดียวกัน โดยปริมาณคลอโรฟิลด์รวมของไผ่เลี้ยงและไผ่ข้าวหลามมีค่าอยู่ในช่วง 5.91 ± 3.21 ถึง $17.69 \pm 2.31 \mu\text{g/mL}$ และ 10.87 ± 1.45 ถึง $22.55 \pm 0.48 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ จากการทดลองแม้ว่าปริมาณคลอโรฟิลด์เอ คลอโรฟิลด์บี และคลอโรฟิลด์รวมของทั้งไผ่เลี้ยงและไผ่ข้าวหลามจะมีแนวโน้มลดลงหลังได้รับความเครียด แต่จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและค่าการกระจายตัวของค่าเฉลี่ย ไม่ปรากฏความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดเทียบกับชุดควบคุม แต่ยังสามารถเห็นแนวโน้มได้ว่าปริมาณรงควัตถุดังกล่าวข้างต้นมีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัดที่สุดในชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยเฉพาะในไผ่เลี้ยง (รูปที่ 31c)

ปริมาณแคโรทีนอยด์ ของไผ่เลี้ยงและไผ่ข้าวหลามหลังจากได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันเป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 8 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 1.43 ± 0.68 ถึง $3.43 \pm 0.39 \mu\text{g/mL}$ และ 2.41 ± 0.37 ถึง $3.34 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและค่าการกระจายตัวของค่าเฉลี่ย ปริมาณแคโรทีนอยด์ของไผ่เลี้ยงไม่ปรากฏความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลองเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้นปริมาณแคโรทีนอยด์ในชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ ในวันที่ 8 ที่มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับชุดควบคุม ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์ของไผ่ข้าวหลามไม่ปรากฏความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลองตลอดระยะเวลาในการทดลอง (รูปที่ 31d)



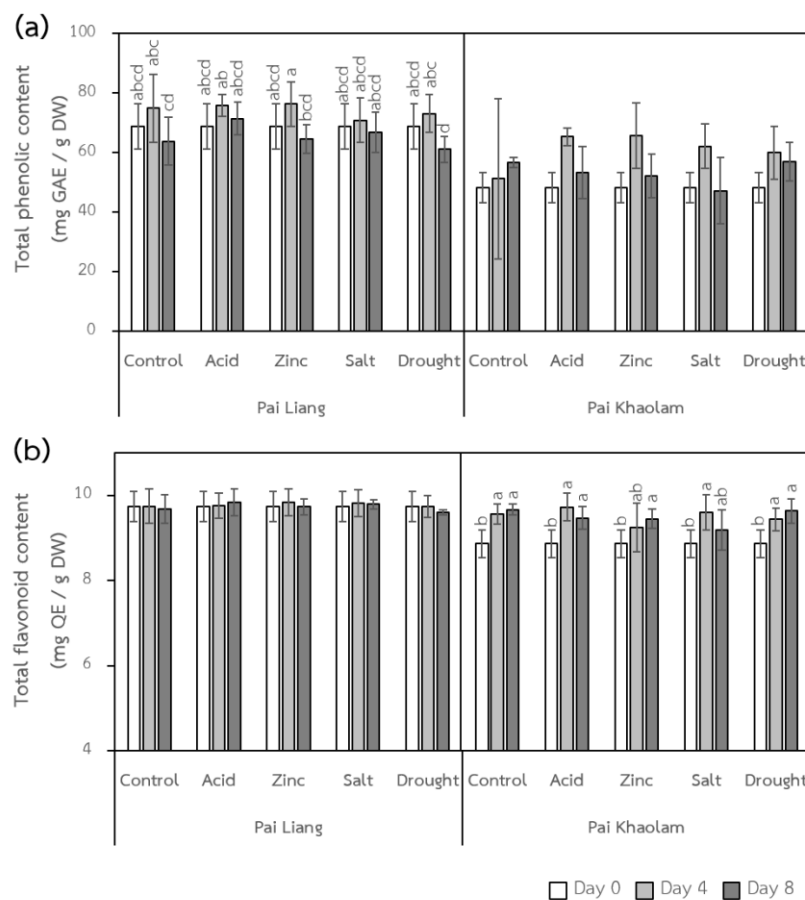
รูปที่ 31 ผลการวิเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์เอ (a), คลอโรฟิลล์บี (b), คลอโรฟิลล์รวม (c), และแคโรทีนอยด์ (d) ของไม้เลี้ยงและไม้ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 8 วัน

3.3 ผลกระทบของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกต่อปริมาณสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวม

วิเคราะห์ปริมาณสารพฤกษเคมีที่สำคัญในสารสกัดใบไม้ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกรวม (mg GAE/g DW) และฟลาโวนอยด์รวม (mg QE/g DW) ของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของไม้แต่ละชนิดที่ได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน ด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$

จากการทดลองเห็นว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมที่พบในไม้เลื้อยโดยภาพรวมมีการสะสมสูงกว่าในไม้ข้าวหลาม ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลามหลังจากได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันเป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 61.02 ± 4.36 ถึง 76.32 ± 7.49 mg GAE/g DW และ 47.18 ± 11.12 ถึง 65.61 ± 10.97 mg GAE/g DW ตามลำดับ และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลามมีค่าอยู่ในช่วง 9.60 ± 0.06 ถึง 9.84 ± 0.32 mg QE/g DW และ 8.86 ± 0.32 ถึง 9.72 ± 0.33 mg QE/g DW ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานพบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของทั้งไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลามไม่ปรากฏความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลองเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 32)



รูปที่ 32 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม (a) และฟลาโวนอยด์รวม (b) ของสารสกัดจากใบไม้ของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน

3.3.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

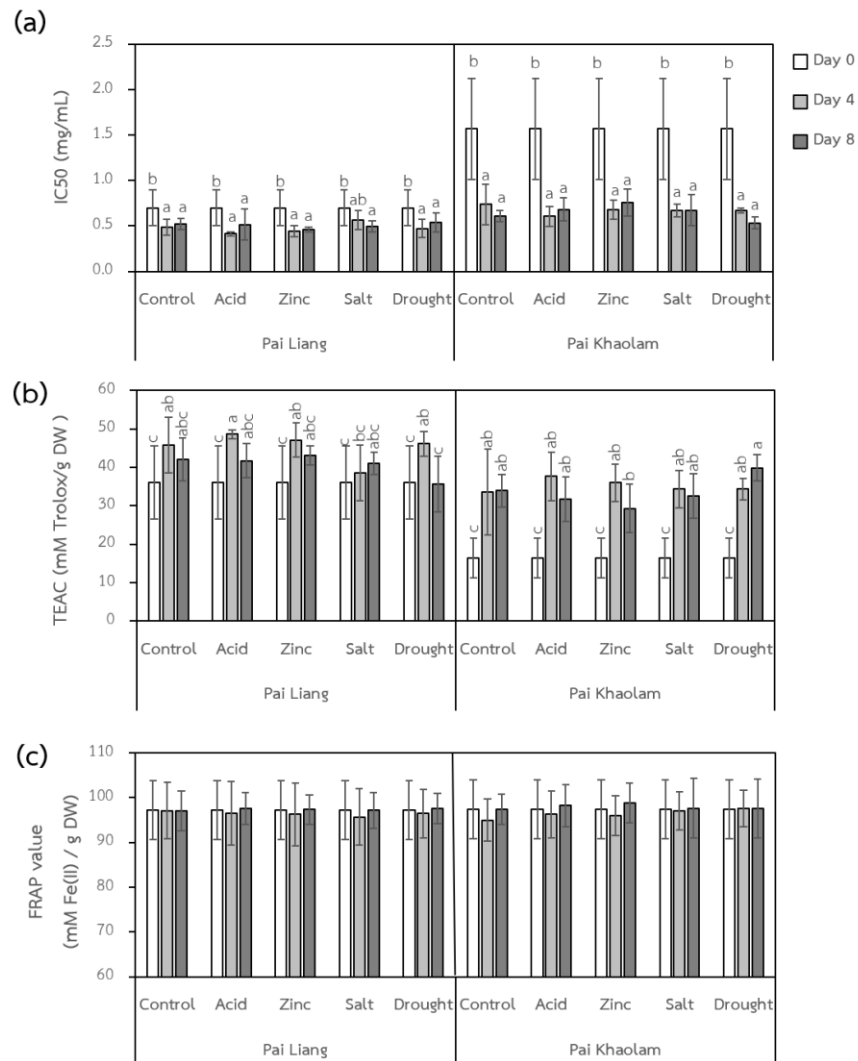
ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้ 2 วิธีทดสอบ คือ วิธี DPPH scavenging assay รายงานผลในรูป IC_{50} (mg/mL) และ TEAC (mM trolox/g DW) และวิธี FRAP assay รายงานผลการทดลองในรูป FRAP value (mM Fe(II)/g DW) ของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของไม้แต่ละชนิดที่ได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน ด้วย SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$ (รูปที่ 33) ผลการทดลองแสดงดังนี้

ค่า IC_{50} หรือ 50% Inhibitory concentration คือ ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งต้านอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง ดังนั้นค่า IC_{50} น้อยหมายถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาก จากการทดลอง

ค่า IC_{50} ของไม้เลื้อยโดยภาพรวมมีค่าน้อยกว่าในไม้ข้าวหลาม สอดคล้องกับปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่พบก่อนหน้านี้ ซึ่งค่า IC_{50} ของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลามหลังจากได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันเป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 0.41 ± 0.02 ถึง 0.70 ± 0.20 mg/mL และ 0.53 ± 0.06 ถึง 1.57 ± 0.56 mg/mL ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่า IC_{50} ของทั้งไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลามของทุกชุดการทดลองหลังได้รับความเครียดไม่ปรากฏความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 33a)

เช่นเดียวกับค่า TEAC ของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลาม โดยผลการทดลองพบว่าหลังจากได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันเป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 35.69 ± 7.26 ถึง 48.60 ± 1.13 mM trolox/g DW และ 16.49 ± 5.18 ถึง 39.88 ± 3.45 mM trolox/g DW ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่า TEAC ของทั้งไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลามของทุกชุดการทดลองหลังได้รับความเครียดไม่ปรากฏความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 33b)

ค่า FRAP value ของไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลามหลังจากได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันเป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 95.67 ± 6.29 ถึง 97.56 ± 3.39 mM Fe(II)/g DW และ 94.99 ± 4.68 ถึง 98.79 ± 4.71 mM Fe(II)/g DW ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน พบว่าไม่พบความแตกต่างทางสถิติของค่า FRAP value ในทั้งไม้เลื้อยและไม้ข้าวหลาม (รูปที่ 33c)



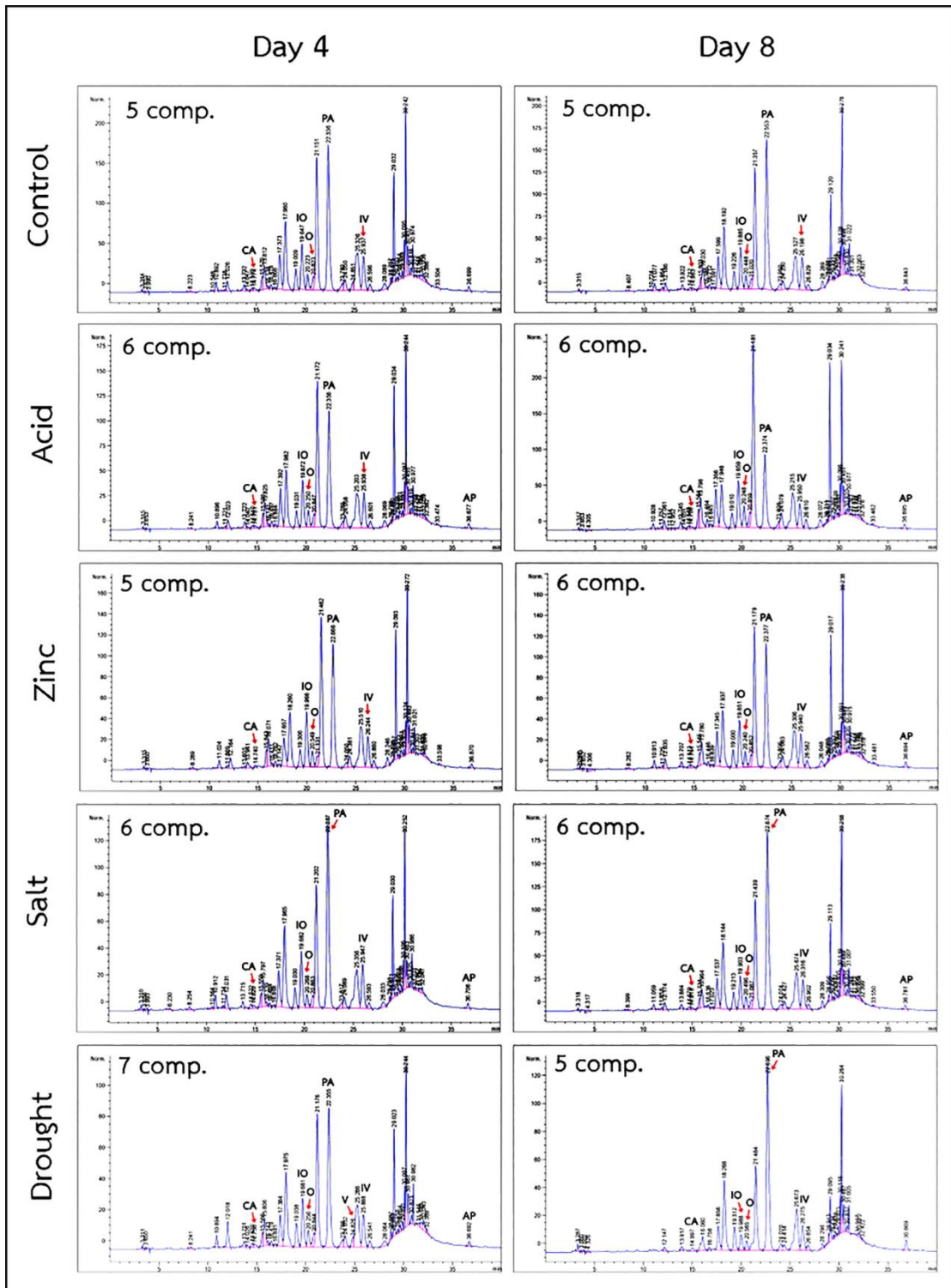
รูปที่ 33 ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay แสดงผลในรูป IC₅₀ (a) และ TEAC (b) และวิธี FRAP assay ของสารสกัดจากใบไผ่ของไผ่เลี้ยงและไผ่ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน

3.3.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีด้วยวิธี RP-HPLC

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid, isorientin, orientin, *p*-coumaric acid, vitexin, isovitexin และ apigenin จากสารสกัดใบไผ่ของไผ่เลี้ยงและไผ่ข้าวหลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน ได้แก่ ความเป็นกรด โลหะหนักสังกะสี ความเค็ม และการขาดน้ำ เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน ด้วยเทคนิค RP-HPLC ผลการทดลองแสดงดังนี้

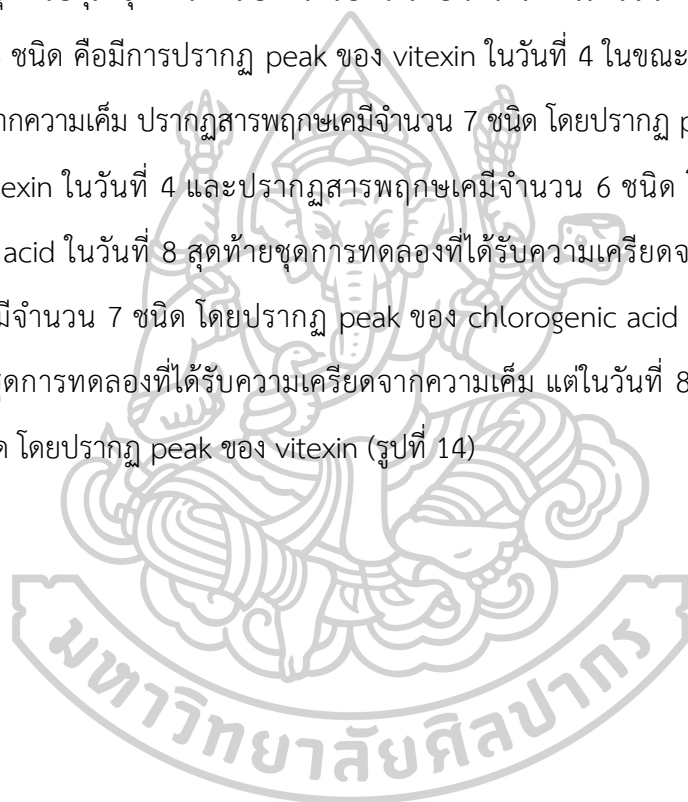
จากรูปแสดงโครมาโตแกรมของสารพฤษเคมีที่พบในไผ่เลี้ยง พบว่าจำนวนชนิดของสารพฤษเคมีในไผ่เลี้ยงในวันที่ 4 และ 8 ชุดควบคุมมีการพบสารพฤษเคมีจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ caffeic acid, isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid และ isovitexin ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดอื่น ๆ พบจำนวนชนิดของสารพฤษเคมีเพิ่มขึ้น โดยชุดการทดลองที่ได้รับความเป็นกรดและความเค็มพบสารพฤษเคมีจำนวน 6 ชนิด โดยพบ apigenin เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำพบสารพฤษเคมีจำนวน 7 ชนิด โดยพบ vitexin และ apigenin เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุม ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากโลหะหนักสังกะสีพบสารพฤษเคมี 5 ชนิดไม่แตกต่างจากชุดควบคุม และในวันที่ 8 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดมีจำนวนชนิดสารพฤษเคมีเพิ่มขึ้นเป็น 6 ชนิด โดยพบ apigenin เพิ่มขึ้นในชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากความเป็นกรด โลหะหนักสังกะสี และความเค็ม ในขณะที่ชุดการทดลองซึ่งได้รับความเครียดจากการขาดน้ำพบสารพฤษเคมีเช่นเดียวกับที่ปรากฏในชุดควบคุม (รูปที่ 34)

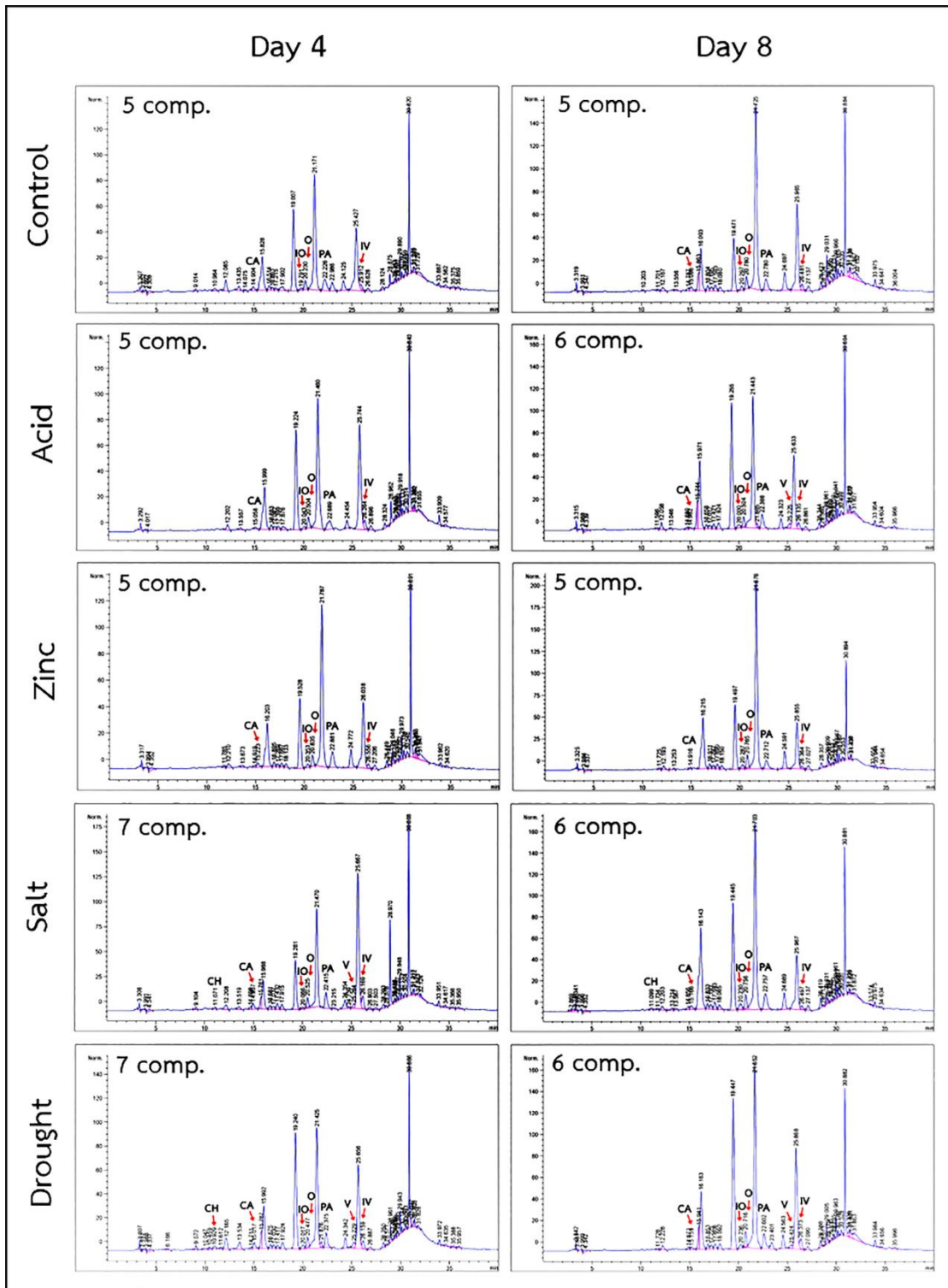




รูปที่ 34 โครมาโตแกรมของสารพฤษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดใบไม้เลี้ยงหลังได้รับความเครียด จากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน

จากรูปแสดงโครมาโตแกรมของสารพฤษเคมีที่พบในใผ่ข้าวหลาม พบว่า หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดแตกต่างกันมีการสะสมสารพฤษเคมีจำนวนชนิดมากขึ้น ยกเว้นชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากโลหะหนักสังกะสีเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยชุดควบคุมของใผ่ข้าวหลามปรากฏสารพฤษเคมีจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ caffeic acid, isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid และ isovitexin เช่นเดียวกับที่ปรากฏในชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากโลหะหนักสังกะสี ทั้งนี้ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดอื่น ๆ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดมีการสะสมสารพฤษเคมีจำนวนชนิดมากขึ้นเป็น 6 ชนิด คือมีการปรากฏ peak ของ vitexin ในวันที่ 4 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากความเค็ม ปรากฏสารพฤษเคมีจำนวน 7 ชนิด โดยปรากฏ peak ของ chlorogenic acid และ vitexin ในวันที่ 4 และปรากฏสารพฤษเคมีจำนวน 6 ชนิด โดยปรากฏ peak ของ chlorogenic acid ในวันที่ 8 สุดท้ายชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ ปรากฏสารพฤษเคมีจำนวน 7 ชนิด โดยปรากฏ peak ของ chlorogenic acid และ vitexin ในวันที่ 4 เช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากความเค็ม แต่ในวันที่ 8 ปรากฏสารพฤษเคมีจำนวน 6 ชนิด โดยปรากฏ peak ของ vitexin (รูปที่ 14)

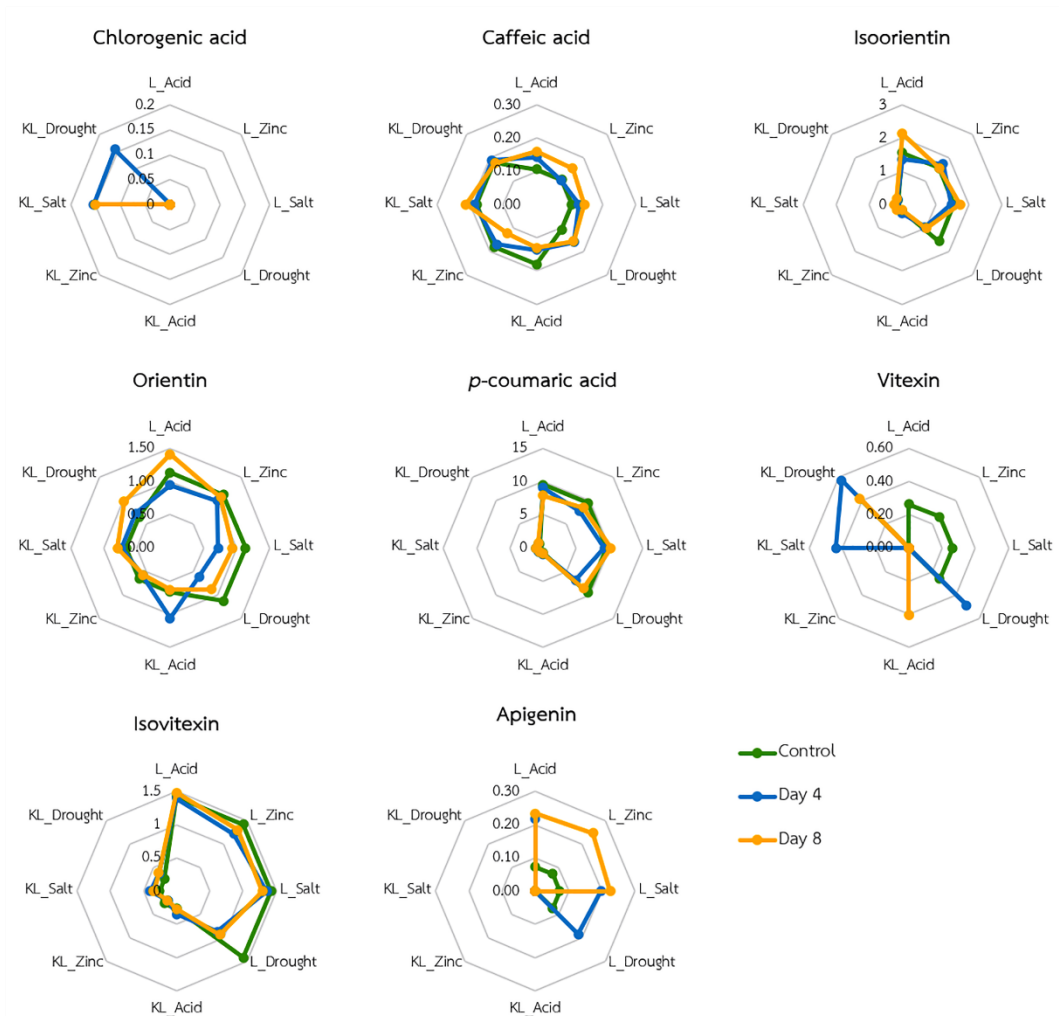




รูปที่ 35 โครมาโตแกรมของสารพิษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดใบไม้ข้าวหลามหลังได้รับ
ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน

จากรูปที่ 36 แผนผังใยแมงมุมซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพฤกษเคมีแต่ละชนิดจำนวน 8 ชนิด ที่พบในชุดควบคุมซึ่งคำนวณจากค่าเฉลี่ยปริมาณสารพฤกษเคมีที่พบในชุดควบคุมวันที่ 0 4 และ 8 (เส้นกราฟสีเขียว) และสารพฤกษเคมีที่พบหลังได้รับความเครียดที่แตกต่างกันในวันที่ 4 (เส้นกราฟสีฟ้า) และวันที่ 8 (เส้นกราฟสีเหลือง) ของไม้เลื้อย (ด้านขวา) และไม้ข้าวหลาม (ด้านซ้าย) ผลการทดลองพบว่าไม้ทั้งสองชนิดมีการสะสมปริมาณสารพฤกษเคมีแต่ละชนิดแตกต่างกัน สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระก่อนหน้า ซึ่งเห็นว่าไม้เลื้อยมีการสะสมสารพฤกษเคมีบางชนิด เช่น isoorientin, *p*-coumaric acid, isovitexin และ apigenin ในปริมาณสูงกว่าในไม้ข้าวหลาม สังเกตจากที่แผนผังใยแมงมุมของสารพฤกษเคมี มีลักษณะเอียงไปด้านขวา โดยพบว่าไม้เลื้อยไม่ปรากฏการสะสม chlorogenic acid ในขณะที่ไม้ข้าวหลามไม่ปรากฏการสะสม apigenin

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาในเชิงปริมาณร่วมกัน ดังที่แสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 6 ซึ่งวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยและค่าการกระจายตัวของค่าเฉลี่ยของสารสกัดใบไม้หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วันรวมกัน โดยที่พิจารณาค่าทางสถิติของปริมาณสารพฤกษเคมีแต่ละชนิดจำนวน 8 ชนิดแยกกันในไม้แต่ละชนิด โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS ที่ความเชื่อมั่น $p < 0.05$ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไม้ทั้งสองชนิดมีการสะสมสารพฤกษเคมีชนิดหลักแตกต่างกัน จากสารพฤกษเคมีจำนวน 8 ชนิดที่ทำการตรวจสอบในไม้เลื้อยมี *p*-coumaric acid เป็นสารพฤกษเคมีชนิดหลัก มีค่าอยู่ในช่วง 6.92 ± 0.48 ถึง 10.23 ± 1.52 mg/g ในขณะที่ไม้ข้าวหลามมี orientin และ *p*-coumaric acid เป็นสารพฤกษเคมีชนิดหลัก โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.58 ± 0.07 ถึง 1.06 ± 0.07 mg/g และ 0.72 ± 0.01 ถึง 1.13 ± 0.17 mg/g ตามลำดับ



รูปที่ 36 กราฟแสดงปริมาณสารพฤกษเคมี 8 ชนิด หลังได้รับเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 (control) 4 และ 8 วัน ของไผ่เลี้ยง (L) และไผ่ข้าวหลาม (KL)

จากการทดลองยังสามารถสังเกตได้อีกว่าไผ่เลี้ยงและไผ่ข้าวหลามมีการตอบสนองต่อความเครียดแตกต่างกัน โดยในไผ่เลี้ยงปรากฏสารพฤกษเคมีจำนวน 3 ชนิดที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ caffeic acid, vitexin และ apigenin ในขณะที่ไผ่ข้าวหลามปรากฏสารพฤกษเคมีจำนวน 4 ชนิดที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังได้รับความเครียดอย่างมีนัยสำคัญ หรือสามารถตรวจพบได้หลังได้รับความเครียด ได้แก่ chlorogenic acid, orientin, vitexin และ isovitexin ซึ่งสามารถชี้แจงผลการทดลองได้ดังนี้

จากตารางที่ 6 ในไผ่เลี้ยง ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากความเป็นกรดและโลหะหนักสังกะสี ปรากฏสารพฤกษเคมี 2 ชนิด ได้แก่ caffeic acid และ apigenin มีการสะสมเพิ่มขึ้น

อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของปริมาณสารพฤกษเคมีที่พบในชุดควบคุมวันที่ 0 (control) 4 และ 8 และการสะสมมีแนวโน้มมากขึ้นในวันที่ 8 ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากความเค็ม ปรากฏ apigenin มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยการสะสมเพิ่มขึ้นในวันที่ 8 อย่างมีนัยสำคัญ สุดท้ายไม่เปลี่ยนแปลงในชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ ในวันที่ 4 สารพฤกษเคมี 3 ชนิด มีการสะสมในปริมาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ caffeic acid, vitexin และ apigenin เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่ในวันที่ 8 สารพฤกษเคมี 2 ชนิดที่พบได้ในวันที่ 4 กลับไม่สามารถตรวจพบ ได้แก่ vitexin และ apigenin

ในฝั้วข้าวหลาม ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากโลหะหนักสังกะสีไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางสถิติของสารพฤกษเคมีชนิดใด ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากความเป็นกรด ปรากฏ orientin มีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และมีการตรวจพบ vitexin ที่ไม่สามารถตรวจพบได้ในชุดควบคุม ชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากความเค็ม ปรากฏ isovitexin มีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และมีการตรวจพบ chlorogenic acid และ vitexin ที่ไม่สามารถตรวจพบได้ในชุดควบคุม สุดท้ายฝั้วข้าวหลามในชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ ปรากฏสารพฤกษเคมี 2 ชนิด คือ orientin และ isovitexin มีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และมีการตรวจพบ chlorogenic acid และ vitexin ที่ไม่สามารถตรวจพบได้ในชุดควบคุม



ตารางที่ 6 ปริมาณสารพฤกษเคมี 8 ชนิด ที่พบในสารสกัดจากใบไผ่ของไผ่เลี้ยงและไผ่เข้าหกลาม หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน

Phytochemical contents in bamboo leaf extracts of Pai Liang and Pai Khaolam (mg/g)*											
Species	Treatment	Day	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Isoorientin	Orientin	p-coumaric acid	Vitexin	Isovitexin	Apigenin	
Liang	Control		ND	0.11±0.00 ^b	1.56±0.16 ^{abc}	1.13±0.29	9.53±0.33	0.26±0.00 ^b	1.42±0.15 ^a	0.07±0.01 ^e	
	Acid	4	ND	0.14±0.01 ^{ab}	1.37±0.16 ^{bc}	0.95±0.09	9.08±1.00	ND	1.39±0.04 ^a	0.22±0.00 ^{bc}	
		8	ND	0.16±0.01 ^a	2.14±0.25 ^a	1.41±0.43	7.90±0.47	ND	1.48±0.15 ^a	0.23±0.01 ^{ab}	
	Zinc	4	ND	0.10±0.00 ^b	1.73±0.15 ^{ab}	1.00±0.20	7.81±0.26	ND	1.22±0.04 ^a	ND	
		8	ND	0.15±0.00 ^a	1.56±0.10 ^{abc}	1.07±0.06	8.57±0.18	ND	1.30±0.03 ^a	0.25±0.01 ^a	
	Salt	4	ND	0.13±0.02 ^{ab}	1.47±0.13 ^{bc}	0.72±0.05	9.21±0.83	ND	1.36±0.02 ^a	0.20±0.01 ^{cd}	
		8	ND	0.14±0.00 ^{ab}	1.73±0.25 ^{ab}	0.94±0.03	10.23±1.52	ND	1.29±0.13 ^a	0.23±0.01 ^{ab}	
	Drought	4	ND	0.16±0.01 ^a	0.95±0.12 ^c	0.62±0.03	6.92±0.48	0.49±0.00 ^a	0.86±0.02 ^b	0.18±0.01 ^d	
		8	ND	0.16±0.03 ^a	1.01±0.26 ^c	0.88±0.26	8.60±0.58	ND	0.92±0.08 ^b	ND	
	Khaolam	Control	0	ND	0.18±0.02	0.19±0.02	0.66±0.07 ^c	0.74±0.01	ND	0.26±0.02 ^{cd}	ND
		Acid	4	ND	0.14±0.03	0.28±0.05	1.06±0.07 ^a	0.92±0.08	ND	0.35±0.04 ^{abc}	ND
			8	ND	0.13±0.01	0.17±0.02	0.63±0.03 ^c	0.85±0.06	0.40±0.04 ^b	0.27±0.05 ^{bcd}	ND
Zinc		4	ND	0.17±0.02	0.18±0.03	0.59±0.12 ^c	0.89±0.06	ND	0.19±0.01 ^d	ND	
		8	ND	0.12±0.03	0.23±0.03	0.58±0.07 ^c	0.85±0.08	ND	0.20±0.02 ^d	ND	
Salt		4	0.15±0.00	0.19±0.04	0.20±0.03	0.73±0.06 ^c	1.10±0.05	0.44±0.02 ^b	0.40±0.04 ^a	ND	
		8	0.15±0.00	0.21±0.01	0.23±0.04	0.79±0.06 ^{bc}	1.13±0.17	ND	0.35±0.02 ^{abc}	ND	
Drought		4	0.16±0.01	0.19±0.02	0.21±0.01	0.73±0.05 ^c	0.92±0.02	0.57±0.04 ^a	0.37±0.05 ^{ab}	ND	
		8	ND	0.18±0.02	0.24±0.01	0.98±0.11 ^{ab}	1.03±0.08	0.42±0.03 ^b	0.38±0.03 ^a	ND	

*Mean ± standard error (n = 3); p<0.05; ND = ไม่สามารถตรวจพบได้

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายและวิธีสกัดต่อปริมาณสารฟุกุซเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไม้ที่สกัดจากตำแหน่งใบย่อยที่แตกต่างกัน

1.1 ชนิดของตัวทำละลายและวิธีการสกัดส่งผลต่อชนิดและปริมาณสารฟุกุซเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไม้

จากการนำตัวอย่างไม้ปักกิ่ง (*Dendrocalamus sp.*) ตำแหน่งต่าง ๆ มาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายและวิธีการสกัดที่ต่างกันแบ่งได้เป็น 4 วิธี ได้แก่ การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเป็น 60% เอทานอล (วิธีที่ 1), ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย (วิธีที่ 2), สกัดด้วยวิธีที่คล้ายกับการชงชาตามวิธีการของ (Hashish et al., 2018) โดยใช้อัตราส่วนไม้ต่อตัวทำละลายเป็น 0.1 กรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับวิธีที่ 1 และ 2 (วิธีที่ 3) และสกัดด้วยวิธีที่คล้ายกับการชงชาแต่ใช้อัตราส่วนไม้ต่อตัวทำละลายเป็น 0.01 กรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่พบได้ในเครื่องดื่มชา (วิธีที่ 4) ผลการศึกษาพบว่า วิธีการสกัดมีผลต่อปริมาณสารฟุกุซเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากใบไม้ปักกิ่ง พิจารณาจากที่ตำแหน่งใบเดียวกัน ณ ตำแหน่ง RAB และ P1-2 ของทั้ง 4 วิธีการสกัด การสกัดด้วยวิธีที่ 3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระซึ่งรายงานในรูปค่า TEAC สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่างจากวิธีการสกัดอื่น (รูปที่ 22 และ 23) รวมถึงวิธีที่ 1-2 ซึ่งใช้อัตราส่วนไม้ต่อตัวทำละลายเท่ากัน แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่ใช้มีผลต่อปริมาณสารฟุกุซเคมี (Karawak et al., 2020) แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นว่า วิธีการสกัดที่ 2 และ 3 เป็นวิธีการสกัดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเหมือนกัน แต่วิธีที่ 3 ให้ปริมาณสารฟุกุซเคมีสูงกว่า มีความเป็นไปได้ว่าอาจเพราะฟีนอลิกละลายได้ดีในอุณหภูมิสูงกว่า ดังที่ปรากฏในงานวิจัยของ Irakli และคณะ (2018) ที่ทดลองวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกในสารสกัดใบมะกอกที่สกัดที่อุณหภูมิต่าง ๆ และพบว่าฟีนอลิกมีปริมาณสูงขึ้นที่อุณหภูมิสูง โดยจากการทดลองนี้สารสกัดจากใบไม้ปักกิ่งวิธีที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 60°C และวิธีที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 95°C ซึ่งสูงกว่าค่อนข้างมาก อย่างไรก็ตามที่ตำแหน่งใบ P3-8 ของวิธีการสกัดที่ 1-3 ซึ่งใช้อัตราส่วนไม้ต่อตัวทำละลายเท่ากันไม่พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณฟีนอลิกรวมและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่จากการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมพบว่า ในวิธีที่ 1 ซึ่งใช้ 60% เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดมีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดต่างจากวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ

เทียบกับตำแหน่งใบเดียวกัน จึงอาจกล่าวได้ว่า ฟลาโวนอยด์สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลาย แอลกอฮอล์ผสมน้ำมากกว่าตัวทำละลายน้ำ โดยอัตราส่วนตัวทำละลายที่ให้ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงที่สุดอยู่ในช่วงประมาณ 50-70% สำหรับตัวทำละลายเอทานอล (Dirar et al., 2019; Li et al., 2021; Zhu et al., 2018) และจากผลการทดลอง ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมีความสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกรวม แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง (Wróblewska et al., 2019; Zhu et al., 2018) นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารพฤษเคมีจำนวน 8 ชนิด ด้วยวิธี RP-HPLC ภาพโครมาโตแกรมแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดที่แตกต่างกัน (วิธีที่ 1-4) ณ ตำแหน่งใบเดียวกันปรากฏจำนวนชนิดสารพฤษเคมีที่สนใจศึกษาไม่เท่ากัน โดยพบจำนวนชนิดสูงที่สุดในวิธีการสกัดที่ 1 ในทุกตำแหน่งใบ (รูปที่ 24) อีกทั้งสารพฤษเคมีจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ isoorientin, *p*-coumaric acid, vitexin และ isovitexin ยังพบในปริมาณสูงสุดจากการสกัดด้วยวิธีที่ 1 อีกด้วย (ตารางที่ 3) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวทำละลาย 60% เอทานอล เป็นตัวทำละลายที่ดีในการสกัดสารพฤษเคมี

1.2 อายุของใบส่งผลต่อชนิดและปริมาณสารพฤษเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไม้

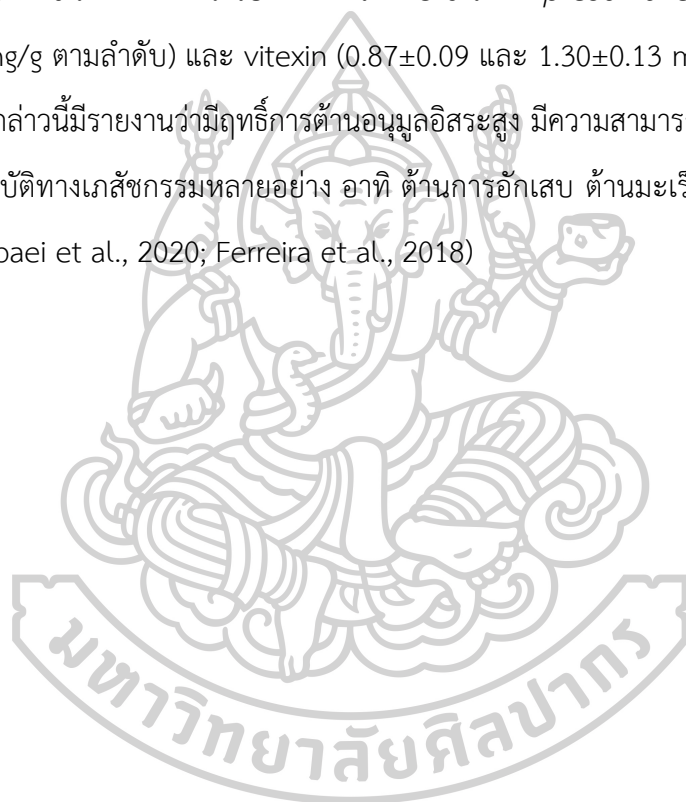
จากการนำตัวอย่างไม้ปักกิ่ง (*Dendrocalamus* sp.) ตำแหน่งต่าง ๆ มาสกัดโดยใช้ตัวทำละลายและวิธีการสกัดที่ต่างกันแบ่งได้เป็น 5 ตำแหน่งใบเรียงจากใบอ่อนไปจนถึงใบแก่ ได้แก่ ใบม้วน (RAB) ตำแหน่ง 1-2 (P1-2) ตำแหน่ง 3-4 (P3-4) ตำแหน่ง 5-6 (P5-6) และตำแหน่ง 7-8 (P7-8) ผลการศึกษาพบว่าอายุใบส่งผลต่อปริมาณสารพฤษเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไม้ พิจารณาจากปริมาณฟีนอลิกรวมที่ตำแหน่งอ่อน RAB และ P1-2 มีปริมาณน้อยกว่าที่พบในตำแหน่งใบอายุมากกว่า (P3-8) (รูปที่ 22) รวมถึงปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าใบอ่อน (RAB) ใบกลาง (P1-4) และใบแก่ (P5-8) มีปริมาณฟลาโวนอยด์จากน้อยไปมากตามลำดับ สอดคล้องกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (รูปที่ 23) นอกจากนี้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค RP-HPLC พบว่าวิธีที่ 1 ซึ่งเป็นวิธีการสกัดที่ได้ชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีสูงสุด ที่ตำแหน่งใบกลางและใบแก่พบสารพฤษเคมี 7 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid, isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid, vitexin และ isovitexin มากกว่าที่ตำแหน่งใบอ่อนที่พบสารพฤษเคมี 5 ชนิด ได้แก่ caffeic acid, isoorientin, *p*-coumaric acid, isovitexin และ apigenin นอกจากนี้ยังพบว่า

ในวิธีการสกัดเดียวกัน สารฟลาโวนอยด์แต่ละชนิดมีการสะสมปริมาณสูงสุดที่ตำแหน่งใบ P5-6, P1-2, และ RAB ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดลองข้างต้นนี้สอดคล้องกับรายงานของเพ็ญนภา การะเวก และคณะ (2562) ที่มีการตรวจสอบปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของสารสกัดจากใบอ่อน ใบกลาง และใบแก่ ของไผ่ชางหม่น “นวลราชินี” (*Dendrocalamus sericeus* Munro.) พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมในใบแก่สูงกว่าใบอ่อน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Nobossé และคณะ (2018) ที่รายงานว่าในสารสกัดจากใบ *Moringa oleifera* L. ที่มีอายุ 60 วัน มีการสะสมสารโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์รวม และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าในใบอ่อนที่มีอายุ 30 และ 45 วัน แสดงให้เห็นว่าอายุของใบเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกับปริมาณสารสำคัญ เนื่องจากสารโพลีฟีนอล ฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ซึ่งจะมีการสะสมมากขึ้นเมื่อพืชมีอายุมากขึ้นหรือเมื่อเผชิญกับความเครียด เพื่อทำหน้าที่ในการปกป้องพืช และทำให้พืชสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม (Li et al., 2020) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่า สารฟลาโวนอยด์ชนิด apigenin พบได้เฉพาะวิธีการสกัดที่ 1 ที่ตำแหน่งใบอ่อน (RAB) เนื่องจากวิธีที่ 1 ใช้ 60% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย และ apigenin เป็นสารฟลาโวนอยด์ที่ละลายไม่ดีในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ (Salehi et al., 2019) และที่พบแต่ในใบอ่อนอาจมีสาเหตุมาจาก apigenin เป็นสารที่มีบทบาทในการปกป้องพืชจากรังสี UV-B ตามรายงานวิจัยโดย Righini และคณะ (2019) ที่ทำการทดสอบในข้าวโพด และพบว่าข้าวโพดที่มีการสะสม apigenin เกิดความเสียหายจาก UV-B น้อยกว่าข้าวโพดปกติ ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าในช่วงเวลาที่ใบยังอ่อน ไม่มีการสะสมของลิกนินที่มีคุณสมบัติในการปกป้องพืชมากพอ ใบไผ่จึงต้องมีการสะสม apigenin เพื่อป้องกันการถูกทำลายจากรังสี UV-B และต่อมาที่ไม่มีการตรวจพบ apigenin ในใบแก่ เนื่องจาก apigenin สามารถเปลี่ยนเป็นสารอนุพันธ์ชนิดอื่น เช่น isovitexin หรือ vitexin เมื่อใบมีอายุมากขึ้น (Ali et al., 2017)

1.3 *p*-coumaric acid และ vitexin เป็นสารฟลาโวนอยด์หลักที่พบในชาใบไผ่ของไผ่ปักกิ่ง

ชาใบไผ่เป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่รสชาติดีและดีต่อสุขภาพ เป็นที่นิยมในประเทศแถบเอเชีย และกำลังแพร่กระจายเข้าสู่ตลาดในภูมิภาคอื่น ๆ อาทิ แถบยุโรป โดยชาใบไผ่มีรายงานว่าอุดมไปด้วยสารอาหารโปรตีน แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม เป็นเครื่องดื่มที่มีสรรพคุณในทางเภสัชกรรม ได้รับการแนะนำให้ดื่มเพื่อรักษาสุขภาพโดยเฉพาะเพื่อบรรเทาอาการปวดท้อง (Horn & Häser, 2016) อย่างไรก็ตามชาใบไผ่ที่ผ่านกระบวนการชงด้วยน้ำร้อน อาจมีชนิดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์แตกต่าง

จากที่รายงานในสารสกัดจากใบไผ่ตามที่รายงานในการศึกษาทั่วไป และการศึกษาชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมียังมีข้อมูลค่อนข้างน้อย จากการศึกษาพบว่า ชาจากใบไผ่ปักกิ่ง (วิธีที่ 3-4) ปรากฏชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมีสูงสุดในตำแหน่งใบแก่ (P5-6) ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยในชาไผ่เข้มข้น (วิธีที่ 3) พบพฤกษเคมี 6 ชนิด ได้แก่ caffeic acid, isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid, vitexin และ isovitexin โดยพบ *p*-coumaric acid เป็นชนิดหลัก มีค่าอยู่ในช่วง 0.39 ± 0.07 ถึง 6.03 ± 0.29 mg/g และในวิธีที่ 4 ซึ่งเป็นชาใบไผ่ในอัตราส่วนเดียวกับเครื่องดื่มชาทั่วไป พบสารพฤกษเคมี 2 ชนิด ที่ตำแหน่งใบ P1-2 และ P5-6 ได้แก่ *p*-coumaric acid (4.61 ± 0.87 และ 9.02 ± 1.70 mg/g ตามลำดับ) และ vitexin (0.87 ± 0.09 และ 1.30 ± 0.13 mg/g ตามลำดับ) ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวนี้มีรายงานว่ามีการต้านอนุมูลอิสระสูง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ROS มีคุณสมบัติทางเภสัชกรรมหลายอย่าง อาทิ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง บรรเทาโรคเบาหวาน และอื่นๆ (Babaei et al., 2020; Ferreira et al., 2018)



การทดลองที่ 2 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารพฤษเคมีในสารสกัดใบไม้จากใบไม้ที่เก็บในฤดูกาลที่ต่างกัน

2.1 สารพฤษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไม้ที่เก็บในฤดูหนาวสูงกว่าในฤดูร้อน

ศึกษาชนิดและปริมาณสารพฤษเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดตัวอย่างใบไม้ที่เก็บในฤดูกาลแตกต่างกัน คือ ฤดูร้อน (มีนาคม 2562) และฤดูหนาว (ธันวาคม 2563) จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ ไม้ข้าวหลามกาบแดง ไม้ชางนวล ไม้ชางหม่น ไม้ด้ามขวาน ไม้โดนหวาน ไม้โปกพม่า ไม้มันหมู ไม้แม่ตะวอ ไม้ยักซ์ ไม้เลียง และไม้หางช้าง ซึ่งจากการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างใบไม้ที่เก็บในช่วงฤดูหนาวมีการสะสมปริมาณสารทั้งสองชนิดดังกล่าวสูงกว่าตัวอย่างไม้ที่เก็บในฤดูร้อนอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 25) ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดำเนินการวิเคราะห์โดยวิธี FRAP assay (รูปที่ 26) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างไม้ที่เก็บในฤดูหนาวมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระปรากฏในแนวโน้มสูงกว่าตัวอย่างไม้ชนิดที่เก็บในฤดูร้อน ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Ni และคณะ (2014) ที่มีการศึกษาปริมาณสารพฤษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากใบไม้ 2 ชนิด (*Shibataea chinensis* และ *Pleioblastus kongosanensis* f. *aureostriatus*) ที่ดำเนินการเก็บตัวอย่างในแต่ละเดือนและพบว่าสารสกัดใบไม้มีแนวโน้มการสะสมสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในช่วงฤดูหนาว โดยสารพฤษเคมีที่มีรายงานว่ามีการเพิ่มปริมาณสูงขึ้นในฤดูหนาวตามรายงาน คือ chlorogenic acid, caffeic acid และ isoorientin แสดงให้เห็นว่าฤดูกาลเก็บเกี่ยวเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการสะสมของสารพฤษเคมี (Alhathloul et al., 2021; Ilyas et al., 2022; Liebelt et al., 2019; Ni et al., 2014) โดยเป็นผลมาจากการที่พืชมีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมแต่ละฤดูกาลซึ่งมีปริมาณความชื้น ความเข้มแสง อุณหภูมิ และปริมาณน้ำฝนต่างกัน ทำให้ทรัพยากรที่พืชนำมาใช้ในการดำรงชีวิตได้มีจำกัดไม่เท่ากัน (Liebelt et al., 2019)

ทั้งนี้หากพิจารณาจากสภาวะอากาศในพื้นที่จังหวัดอุดรดิษฐ์ที่ทำการเก็บตัวอย่างใบไม้แล้วพบว่าอุณหภูมิและปริมาณน้ำฝนที่ได้รับของทั้ง 2 ช่วงเวลาที่ดำเนินการเก็บตัวอย่างมีความแตกต่างกัน โดยอาจกล่าวได้ว่าที่สารพฤษเคมีมีการสะสมในฤดูหนาวมากกว่าอาจเป็นผลมาจากการที่ตัวอย่างไม้ที่เก็บในฤดูหนาวเผชิญกับความเครียดจากการขาดน้ำ (drought stress) และความเครียดจากอุณหภูมิต่ำ (cold stress) ที่รุนแรงกว่าในฤดูร้อน เนื่องจากตามรายงานของกรมอุตุนิยมวิทยา (ตารางที่ 1 ภาคผนวก ข) ในฤดูร้อน (มีนาคม 2562) พื้นที่จังหวัดอุดรดิษฐ์มีอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ที่ 29.7°C และแม้ว่าฝนจะไม่ได้ตกในเดือนมีนาคมที่ดำเนินการเก็บตัวอย่าง แต่ในเดือนก่อนหน้า (กุมภาพันธ์ 2562) ภายในพื้นที่ยังคงมีรายงานปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยอยู่ที่ 5.4 มม. ในขณะที่ฤดูหนาว

2.2 สารสกัดใบไม้เป็นแหล่งของสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ใบไม้เป็นพืชที่มีรายงานว่าอุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Gagliano et al., 2021; Nirmala et al., 2018) จากการศึกษาชนิดและปริมาณสารพฤกษเคมี และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างใบไม้จำนวน 11 ชนิด ที่เก็บในฤดูร้อนและฤดูหนาว พบว่าใบไม้ที่มีการสะสมปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญเป็นตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาว จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ ใบหางช้าง ใบข้าวหลามกาบแดง ใบชางนวล ใบยักซ์ ใบแม่ตะวอ ใบด้ามขวาน และใบโปกพม่า ตามลำดับ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 50.50 ± 5.81 ถึง 57.01 ± 3.70 mg GAE/g DW (รูปที่ 25a) ซึ่งเมื่อเทียบกับสารสกัด 50% เอทานอลจากบอระเพ็ด (*Tinospora bakis*) มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 26.9 mg GAE/g sample น้อยกว่าที่พบในสารสกัดใบไม้ประมาณ 2 เท่า (Dirar et al., 2019) เทียบกับสารสกัดจากใบมะกอก (22.2 mg GAE/g DM) และใบมะเดื่อฝรั่ง (11.1 mg GAE/g DM) ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย 50% เอทานอล สารสกัดใบไม้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมมากกว่าถึง 2.4 เท่า และ 5 เท่า ตามลำดับ (Alcántara et al., 2020) ส่วนปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากการศึกษาพบว่าและสารสกัดใบไม้จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่มีการสะสมปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ เป็นตัวอย่างที่เก็บในฤดูหนาวเช่นกัน ได้แก่ ใบข้าวหลามกาบแดง ใบหางช้าง ใบด้ามขวาน ใบชางหม่น และ ใบเลี้ยง ตามลำดับ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.34 ± 0.36 ถึง 5.82 ± 0.42 mg QE/g DW (รูปที่ 25b) โดยเมื่อเทียบกับสารสกัด 50% เอทานอล จากหญ้าแห้วหมู (2.77 mg QE/g sample) พบว่าสารสกัดใบไม้มีปริมาณฟลาโวนอยด์รวมสูงกว่าประมาณ 2 เท่า (Dirar et al., 2019) และมีปริมาณมากกว่าที่พบในสารสกัดเอทานอลจากใบมังคุด (3.20 mg QE/g dry material) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญของไทยอยู่ 1.7 เท่า (Chatatikun & Chiabchalard, 2017) โดยสารสกัดจากใบไม้หลายชนิดมีการนำไปทดสอบสรรพคุณทางเภสัชกรรมมากมาย อาทิ สารสกัดจากใบไม้ *Bambusa balcooa* Roxb. มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation และสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองได้ (Goyal et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสามารถในการป้องกันสารพิษอนุมูลถูกทำลายจากรังสีแกมมาของสารสกัดใบไม้ 4 ชนิด ได้แก่ *Bambusa arundinacea*, *B. vulgaris*, *Dendrocalamus strictus* และ *Phyllostachys parvifolia* พบว่าสารสกัดใบไม้ช่วยลดการเกิดการแตกหักของโครโมโซมได้ (Mansi et al., 2020) อีกทั้งเมื่อมีการศึกษานำสารสกัดใบไม้ *B. vulgaris* ไปใช้เพื่อรักษาลิวพดยังพบอีกว่า สารสกัดจากใบไม้มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ (Chilicka et al., 2022) เป็นต้น

นอกจากนี้หลังจากตรวจสอบปริมาณสารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดใบไผ่ที่เก็บตัวอย่างในช่วงฤดูหนาวจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ ไผ่ข้าวหลามกาบแดง ไผ่ชางนวล ไผ่ชางหม่น ไผ่เลี้ยง และไผ่ทางช้าง ได้รับคัดเลือกโดยพิจารณาจากมีการสะสมปริมาณสารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง อีกทั้งเป็นไผ่ที่นิยมปลูกในประเทศไทยเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไปโดยอาศัยเทคนิค RP-HPLC ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการศึกษาชนิดและปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดจากใบไผ่ (Jin et al., 2011; Karawak et al., 2020; Ma et al., 2020; Seo & Song, 2021) เนื่องจากมีสิทธิภาพความเร็วและความแม่นยำสูง จากการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid, isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid, vitexin, isovitexin และ apigenin ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าไผ่แต่ละชนิดแสดงชนิดและปริมาณการสะสมสารฟลาโวนอยด์แตกต่างกัน (รูปที่ 27 และตารางที่ 4) ซึ่งทำให้ไผ่แต่ละชนิดมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ไม่เท่ากัน โดยไผ่ชนิดที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูง จะมีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดียิ่งขึ้น (Mansi et al., 2020) จากผลการทดลองไผ่แต่ละชนิดมีการสะสมสารฟลาโวนอยด์ที่เป็นชนิดเด่นแตกต่างกัน ดังนี้ ไผ่ข้าวหลามกาบแดงพบ orientin (13.82 ± 1.59 mg/g) เป็นชนิดเด่น ส่วนไผ่ชางนวล ไผ่ชางหม่น และไผ่ทางช้างพบ vitexin เป็นชนิดเด่น มีปริมาณ 4.01 ± 0.40 mg/g, 2.33 ± 0.32 mg/g และ 17.67 ± 1.82 mg/g ตามลำดับ และไผ่เลี้ยงพบ *p*-coumaric acid (4.12 ± 0.32 mg/g) เป็นชนิดเด่น ทั้งนี้จากผลการทดลองพบว่า สารฟลาโวนอยด์จำนวน 8 ชนิด แต่ละชนิดมีการสะสมสูงสุดได้ในไผ่ต่างชนิด โดยไผ่ข้าวหลามกาบแดง เป็นไผ่ชนิดเดียวที่สามารถพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีปริมาณสูงสุดได้ถึง 4 ชนิด ได้แก่ caffeic acid (0.86 ± 0.18 mg/g), isoorientin (0.93 ± 0.05 mg/g), orientin (13.82 ± 1.59 mg/g) และ isovitexin (0.29 ± 0.01 mg/g) นอกจากนี้ยังพบ vitexin ในปริมาณสูงถึง 11.65 ± 0.06 mg/g รองจากไผ่ทางช้าง ซึ่งอย่างไรก็ตามหากพิจารณาจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระแล้ว ในบรรดาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีในการศึกษานี้ caffeic acid เป็นสารฟลาโวนอยด์ที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ตามด้วย chlorogenic acid, ferulic acid, orientin, isoorientin, *p*-coumaric acid, vitexin และ isovitexin ตามลำดับ (Gong et al., 2016) และจากรายงานของ Zhu และคณะ (2017) พบว่า apigenin มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ vitexin และ isovitexin ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นจึงเป็นไปได้ว่าในการศึกษานี้ ไผ่ข้าวหลามกาบแดงอาจเป็นไผ่ที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงที่สุด

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ ความเค็ม, ความเป็นกรด, โลหะหนักสังกะสี และการขาดน้ำ ต่อปริมาณสารพิกษเคมีและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบไผ่

3.1 ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกส่งผลต่อการเจริญเติบโตของไผ่

จากการศึกษาผลของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุม (control) และกลุ่มที่ได้รับความเครียด ได้แก่ ความเค็ม (salt) ความเป็นกรด (acid) โลหะหนักสังกะสี (zinc) และการขาดน้ำ (drought) ทำการทดลองในไผ่ 2 ชนิด คือ ไผ่เลี้ยง และ ไผ่ข้าวหลาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกส่งผลต่อการเจริญเติบโต โดยการสังเกตลักษณะใบหลังได้รับความเครียดพบว่า ใบไผ่แสดงอาการใบเหลือง ชิดเมื่อได้รับความเครียดนานขึ้น โดยเฉพาะชุดการทดลองซึ่งได้รับความเครียดจากการขาดน้ำที่แสดงอาการใบเหลือง ชิด และแห้ง ที่รวดเร็วและรุนแรงกว่าความเครียดชนิดอื่น (รูปที่ 28 และ 29) สอดคล้องกับผลการวัดประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุด ที่เห็นว่าไผ่ทั้งสองชนิดหลังได้รับความเครียดก็มีค่า F_v/F_m ไม่แตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม ยกเว้นในไผ่เลี้ยงที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำซึ่งมีค่า F_v/F_m ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 31 และตารางที่ 5) ซึ่งหมายความว่าไผ่กำลังอยู่ในสภาวะเครียดและเกิดกระบวนการยับยั้งการสังเคราะห์แสง (Photoinhibition) (Maxwell & Johnson, 2000) สอดคล้องกับรายงานผลของ He และคณะ (2020) ที่ไผ่ *Dendrocalamus minor* var. *amoenus* มีค่า F_v/F_m ลดลงหลังได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ ทั้งนี้สาเหตุที่ไผ่ไม่มีการตอบสนองรุนแรงต่อความเครียดจากการขาดน้ำอย่างเห็นได้ชัด อาจเนื่องจากไผ่ชนิดนี้เป็นพืชที่จะเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่ดินมีความชื้น (Tong et al., 2020) มีรายงานว่าโดยปกติไผ่จะใช้เวลาในการเจริญเติบโตเต็มที่ทั้งในด้านความสูงและการแตกกอประมาณ 3 ปี แต่หากอยู่ในสภาพที่ดินแห้ง อาจต้องใช้เวลายาวนานถึง 5 ปี (Borowski, 2022) นอกจากนี้ยังพบว่า การได้รับความเครียดจากการขาดน้ำมากขึ้น ทำให้ไผ่ *D. minor* var. *amoenus* มีอัตราการสังเคราะห์แสงและการคายน้ำลดลง (He et al., 2020) อย่างไรก็ตามในการวัดปริมาณรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงในไผ่พบว่าปริมาณรงควัตถุของต้นไผ่หลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกมีแนวโน้มลดลงเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 31) สอดคล้องกับรายงานของ Pulavarty และ Sarangi (2018) ที่พบว่าปริมาณรงควัตถุ (Chlorophyll) ของไผ่ 3 ชนิด ได้แก่ *Dendrocalamus strictus*, *D. longispathus* และ

Bambusa bambos ลดลงหลังได้รับความเครียดจากความเค็ม นอกจากนี้ศึกษาเพิ่มเติมยังอาจพบว่ามวลชีวภาพของต้นไผ่มีการลดลงหลังได้รับความเครียด ดังที่ปรากฏในรายงานของ Wu และคณะ (2018) ที่ศึกษาผลของความเครียดจากการขาดน้ำในไผ่ *Phyllostachys edulis* ทั้งนี้จึงกล่าวได้ว่าความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (abiotic stress) เป็นปัจจัยที่ส่งกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืช (Devireddy et al., 2021; Pulavarty & Sarangi, 2018; Tong et al., 2020) เมื่อพืชได้รับความเครียดการตอบสนองของพืชจะอาศัยการส่งสัญญาณของโมเลกุลต่าง ๆ อาทิ ฮอรัโมนพืช หรือ reactive oxygen species (ROS) เพื่อตอบสนองโดยจะมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างการทำงานภายในพืชในระดับตั้งแต่ transcriptomic, metabolic และ proteomic เพื่อการปรับตัวมีชีวิตรอด (Devireddy et al., 2021)

3.2 ไผ่มีการสะสมสารพิษเคมีสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาเกี่ยวกับผลของความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกต่อการเจริญเติบโตของไผ่ มีรายงานว่าความเครียดจาก cold stress และ drought stress ส่งผลต่อการเจริญเติบโต การออกดอก การสังเคราะห์แสง และการแสดงออกของโปรตีนในไผ่ (Biswas et al., 2021; He et al., 2020) และรายงานว่าเมื่อไผ่เผชิญกับความเครียดจากการขาดน้ำมีการสะสมสารสำคัญหลายกลุ่มเพิ่มขึ้น (Tong et al., 2020) แต่งานวิจัยที่ศึกษาผลของความเครียดต่อการสะสมปริมาณสารพิษเคมีโดยละเอียดในไผ่ยังมีจำนวนน้อยและไม่มีข้อมูลชัดเจน อย่างไรก็ตามจากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบไผ่ที่ได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 0 4 และ 8 วัน ในไผ่เลี้ยงและไผ่ข้าวหลาม (รูปที่ 32 และ 33) พบว่าไผ่ทั้ง 2 ชนิด แต่ละชนิดหลังได้รับความเครียดต่าง ๆ แล้วไม่ปรากฏความแตกต่างทางสถิติของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ฟลาโวนอยด์รวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่เมื่อใช้เทคนิคการวิเคราะห์ RP-HPLC ซึ่งมีความละเอียดและแม่นยำสูงขึ้นจึงพบว่า ไผ่เลี้ยงและไผ่ข้าวหลามหลังได้รับความเครียดมีการสะสมสารพิษเคมีจำนวนชนิดเพิ่มขึ้นเทียบกับชุดควบคุม ยกเว้นชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากโลหะหนักสังกะสีในไผ่ข้าวหลาม (รูปที่ 34 และ 35) ในด้านปริมาณสารพิษเคมีบางชนิดมีการตอบสนองโดยมีการสะสมสูงขึ้นหลังจากไผ่ได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารพิษเคมีที่ตอบสนองต่อความเครียดในไผ่แต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกัน ในไผ่เลี้ยงสารพิษเคมีที่ตอบสนองต่อความเครียดเป็นหลักโดยมีการสะสมในปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ คือ

caffeic acid และ apigenin ในขณะที่ไฟข้าวหลามเป็นสารพฤษเคมีชนิด chlorogenic acid, vitexin และ isovitexin โดยในการศึกษานี้ความเครียดจากการขาดน้ำเป็นชุดการทดลองที่ไฟทั้งสองชนิดมีจำนวนชนิดของสารพฤษเคมีที่มีการสะสมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็นจำนวนมากที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดชนิดอื่นในไฟแต่ละชนิด หลังได้รับความเครียดจากการขาดน้ำไฟเลี้ยงมีสารพฤษเคมีที่มีการสะสมสูงขึ้นจำนวน 3 ชนิด คือ caffeic acid, vitexin, และ apigenin ไฟข้าวหลามมีจำนวน 4 ชนิด คือ chlorogenic acid, orientin, vitexin และ isovitexin สอดคล้องกับการศึกษาในผักโขม (*Amaranthus tricolor*) ที่พบว่าหลังได้รับความเครียดจากการขาดน้ำมีการสะสมสารพฤษเคมีหลายชนิดปริมาณสูงขึ้น อาทิ caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, rutin และอื่น ๆ (Sarker & Oba, 2018) หรือการศึกษาใน *Achillea pachycephala* ที่มีความเข้มข้นสารพฤษเคมีหลายชนิดสูงขึ้นภายใต้สภาวะขาดน้ำ อาทิ *p*-coumaric acid และ apigenin (Gharibi et al., 2019) และการศึกษาใน *Aegilops cylindrica* ที่หลังได้รับความเครียดจากความเค็ม มีการสะสมสารประกอบฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น รวมถึงมีการสะสมสารพฤษเคมีอีกหลายชนิดปริมาณสูงขึ้น อาทิ chlorogenic acid, ferulic acid, caffeic acid, gallic acid, apigenin และ rutin เป็นต้น (Kiani et al., 2021) ซึ่งการตอบสนองของสารพฤษเคมีแต่ละชนิดหลังได้รับความเครียดอาจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดพันธุ์ (Kiani et al., 2021; Shin et al., 2020) หรือระยะเวลาและระดับความเครียดที่ได้รับซึ่งจะมีการสะสมสารพฤษเคมีสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียดเป็นระยะเวลานานหรือระดับรุนแรงขึ้น (Gharibi et al., 2019; Kiani et al., 2021; Sarker & Oba, 2018) กล่าวได้ว่าความเครียดส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืชอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณและกระบวนการเมตาบอลิซึม เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารเมตาบอลิต์ในพืช ทำลายสมดุลแรงดันออสโมติก สมดุลฮอร์โมน เกิดอนุมูลอิสระ ROS และความเครียด oxidative (Devireddy et al., 2021) ดังนั้นการสร้างสารทุติยภูมิหรือสารพฤษเคมีจึงเป็นกลไกที่ช่วยให้พืชปรับตัวให้เข้ากับความเครียดโดยการเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ทำลายไอออนที่มีความเป็นพิษ ควบคุมการลำเลียงสารอาหาร และปรับสมดุลฮอร์โมนภายในเซลล์พืช (Riaz et al., 2019)

อย่างไรก็ตามสารพฤษเคมีแต่ละชนิดมีบทบาทในกลไกการตอบสนองต่อความเครียดต่างกัน อาทิ จากการศึกษาพบว่า caffeic acid เป็นสารพฤษเคมีที่มีบทบาทต่อการตอบสนองต่อ

ความเครียดอย่างมากชนิดหนึ่ง โดย caffeic acid เกี่ยวข้องกับการสร้าง lignin ซึ่งจะช่วยให้ผนังเซลล์พืชหนาและทนต่อความเป็นพิษของไฮดรอกซิเดียมและโลหะหนักได้ดีขึ้น และยังเกี่ยวข้องกับการดูดซับพลังงาน (energy radiation) ของเซลล์มีโซฟิลล์ภายใต้สภาวะขาดน้ำอีกด้วย (Riaz et al., 2019) ส่วน chlorogenic acid มีรายงานว่าช่วยลดความรุนแรงของความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในพืชโดยการทำให้คลอโรฟิลล์ถูกทำลายน้อยลง เพิ่มศักยภาพการทำงานของระบบสังเคราะห์แสงที่ 2 (Fv/Fm) ลดการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์และการเกิด lipid peroxidation ด้วยการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระ อาทิ peroxidase, catalase และ polyphenol oxidase (Mei et al., 2020) และมีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่มีโครงสร้างอยู่ในรูป glycoside มีการละลาย การกระจาย และซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี และเป็นสารที่อาจช่วยในกระบวนการการลดความเป็นพิษ (detoxification processes) ภายในเซลล์ได้ (Samec et al., 2021) เป็นต้น ดังนั้นสาร flavone C-glycoside ที่พบจึงน่าจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการลดความเป็นพิษต่อเซลล์ (cell detoxification)

3.3 ไม้ข้าวหลามสามารถทนต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ดีกว่าไม้เลียง

ลักษณะใบไม้เลียงหลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ปรากฏลักษณะสีเหลืองตั้งแต่วันที่ 4 ความเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเร็วและเห็นได้ชัดกว่าที่ปรากฏในไม้ข้าวหลาม (รูปที่ 28 และ 29) ค่า Fv/Fm ก็แสดงความแตกต่างทางสถิติโดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังได้รับความเครียดจากการขาดน้ำรุนแรง (รูปที่ 30 และตารางที่ 5) และจากผลการทดลองยังเห็นว่ารวงควัดฤดูที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์บี และคลอโรฟิลล์รวมของไม้เลียงยังมีปริมาณอยู่ในช่วงที่น้อยกว่าไม้ข้าวหลาม และเห็นแนวโน้มการลดลงได้ชัดเจนมากกว่า รวมถึงปริมาณแคโรทีนอยด์ในชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำในวันที่ 8 ของไม้เลียงก็มีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 31) ซึ่งไม้เลียงมีปริมาณรงควัตถุลดลงมากกว่าในไม้ข้าวหลาม เป็นไปได้ว่าอาจมีสาเหตุจากใบของไม้เลียงมีขนาดเล็กแต่มีจำนวนใบมากกว่าใบไม้ข้าวหลาม จึงมีพื้นที่ในการคายน้ำและสูญเสียน้ำมากกว่า จึงเกิด osmotic stress และ oxidative stress ที่รุนแรงกว่า ทำให้เมื่อต้องเผชิญกับความเครียดโดยเฉพาะการขาดน้ำปริมาณรงควัตถุที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์แสงจึงลดลงไปมากกว่า ดังนั้นจึงเห็นว่าไม้ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการทนต่อความเครียดได้ไม่เท่ากัน สอดคล้องกับรายงานของ Pulavarty และ Sarangi (2018) ที่พบว่าปริมาณ

รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของไม้ 3 ชนิด ได้แก่ *Dendrocalamus strictus*, *D. longispathus* และ *Bambusa bambos* ลดลงในร้อยละที่ไม่เท่ากัน และไม้ *D. longispathus* ซึ่งมีปริมาณรงควัตถุลดลงมากที่สุดเป็นชนิดที่ทนความเครียดจากความเค็มได้น้อยที่สุดเทียบกับไม้อีก 2 ชนิด นอกจากนี้หากพิจารณาจากปริมาณสารฟลักซ์เคมีจะพบว่า ไม้ไผ่เลี้ยงจะมีปริมาณสารฟลักซ์เคมีสูงขึ้นหลังได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ แต่ยังเห็นว่าในชุดการทดลองที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำในวันที่ 8 ไม้ไผ่เลี้ยงอยู่ในสภาพสีเหลือง น้ำตาลแห้ง ใกล้ตาย ค่า Fv/Fm ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ, และปริมาณรงควัตถุลดลง ยังพบอีกด้วยว่าในวันที่ 8 สารฟลักซ์เคมีหลายชนิดมีแนวโน้มลดลงเทียบกับชุดควบคุม ได้แก่ isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid, และ isovitexin ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังพบว่าสารฟลักซ์เคมี 2 ชนิดที่พบได้ในวันที่ 4 กลับไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 8 เป็นไปได้ว่าอาจสลายไปเพราะทนต่อความเครียดไม่ได้ ได้แก่ vitexin และ apigenin และไม้ทั้งสองชนิดที่ได้รับความเครียดจากโลหะหนักสังกะสีในระดับความเข้มข้นเท่ากัน (200 mM ZnSO₄·7H₂O) ไม้ข้าวหลามไม่มีการตอบสนองต่อความเครียด ดังนั้นจากการทดลองจึงกล่าวได้ว่าไม้ข้าวหลามทนต่อความเครียดได้ดีกว่าไม้เลี้ยง และปัจจัยชนิดพันธุ์ส่งผลต่อความสามารถในการตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Akula & Ravishankar, 2011; Ni et al., 2014; Pulavarty & Sarangi, 2018)



สรุปผลการศึกษา

การทดลองที่ 1

การศึกษาชนิดของตัวทำละลายและวิธีสกัดต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบไผ่ปักกิ่งที่สกัดจากตำแหน่งใบย่อยที่แตกต่างกัน พบว่าวิธีการสกัดและตัวทำละลายส่งผลต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยจากวิธีการสกัด 4 วิธี การสกัดสารสกัดใบไผ่ด้วยตัวทำละลาย 60% เอทานอลมีชนิดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์มากที่สุด ทั้งนี้ปริมาณสารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในใบแก่สูงกว่าในใบอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนชาใบไผ่จากใบปักกิ่ง พบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก 2 ชนิด ได้แก่ *p*-coumaric acid และ vitexin

การทดลองที่ 2

การศึกษาเปรียบเทียบชนิดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดใบไผ่จากใบไผ่จำนวน 11 ชนิด ที่เก็บในฤดูกาลที่แตกต่างกัน (ฤดูร้อนและฤดูหนาว) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างใบไผ่ที่เก็บในฤดูหนาวมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงกว่าที่เก็บในฤดูร้อน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเผชิญกับความเครียดจากความเย็น (cold stress) และการขาดน้ำ (drought stress) นอกจากนี้ในแต่ละชนิดยังมีการสะสมชนิดและปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่แตกต่างกัน ในการทดลองนี้ ใบข้าวหลามกาบแดงมีการสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ caffeic acid (0.86 ± 0.18 mg/g) และสารในกลุ่ม flavone C-glycoside ได้แก่ isoorientin (0.93 ± 0.05 mg/g), orientin (13.82 ± 1.59 mg/g) และ isovitexin (0.29 ± 0.01 mg/g) โดยใบชางหม่นกับใบข้าวหลามสามารถพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ทั้ง 8 ชนิด

การทดลองที่ 3

การศึกษาผลของความเครียดจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ความเค็ม (100 mM NaCl) ความเป็นกรด (pH 4.0) โลหะหนักสังกะสี (200 mM ZnSO₄·7H₂O) และการขาดน้ำ (ไม่รดน้ำ) ต่อปริมาณสารฟลาโวนอยด์และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดใบไผ่เลี้ยงและใบข้าวหลาม เมื่อได้รับความเครียดเป็นระยะเวลา 8 วัน พบว่า ความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกทำให้การเจริญเติบโตของไผ่ลดลง โดยความสามารถในการทนต่อความเครียดขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันแล้วจากการทดลองนี้ ใบข้าวหลามสามารถทนต่อความเครียดได้ดีกว่าใบเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่าไผ่มีการสะสมสารฟลาโวนอยด์สูงขึ้นหลังได้รับความเครียด ไผ่แต่ละชนิดมีชนิดของสารฟลาโวนอยด์ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อความเครียดต่างกัน ในใบเลี้ยงมีสารฟลาโวนอยด์ที่ตอบสนองต่อความเครียด คือ caffeic acid และ apigenin ส่วนใบข้าวหลามมีสารฟลาโวนอยด์ที่ตอบสนองต่อความเครียด คือ

chlorogenic acid, vitexin และ isovitexin และความเครียดจากการขาดน้ำต่อเนื่องเป็นเวลา 4 และ 8 วัน ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและปริมาณสารสำคัญในไผ่ที่ศึกษามากที่สุด





รายการอ้างอิง

- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Alcántara, C., Žugčić, T., Abdelkebir, R., García-Pérez, J. V., Jambak, A. R., Lorenzo, J. M., . . . Barba, F. J. (2020). Effects of ultrasound-assisted extraction and solvent on the phenolic profile, bacterial growth, and anti-inflammatory/antioxidant activities of Mediterranean olive and fig leaves extracts. *Molecules*, 25(7), 1718.
- Alhathloul, H. A. S., Galal, F. H., & Seufi, A. M. (2021). Effect of extreme temperature changes on phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *PeerJ*, 9, e11193.
- Ali, F., Rahul, Naz, F., Jyoti, S., & Siddique, Y. H. (2017). Health functionality of apigenin: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(6), 1197–1238.
- Anbudhasan, P., Surendraraj, A., Karkuzhali, S., & Sathishkumaran, S. (2014). Natural antioxidants and its benefits. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 3(6), 225-232.
- Babaei, F., Moafizad, A., Darvishvand, Z., Mirzababaei, M., Hosseinzadeh, H., & Nassiri-Asl, M. (2020). Review of the effects of vitexin in oxidative stress-related diseases. *Food Science and Nutrition*, 8, 2569-2580.
- Bagchi, K., & Puri, S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease. *La Revue de Sante de la Mediterraneeorientale*, 4(2), 350-360.
- Bamboo import. (2020). 1000 Products made from bamboo. Access 18 March 2021 from <https://www.bambooimport.com/en/products-from-bamboo>
- Birková, A., Hubková, B., Bolerázská, B., Mareková, M., & Čižmarová, B. (2020). Caffeic Acid: a brief overview of its presence, metabolism, and bioactivity. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 3(4), 74-81.
- Biswas, S., Sarkar, A., Kharlyngdoh, E., Somkuwar, B., Biswas, P., Dutta, S., . . . Das, M. (2021). Evidence of stress induced flowering in bamboo and comments on probable biochemical and molecular factors. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 30, 1020-1026.

- Borowski, P. F. (2022). Management of energy enterprises in zero-emission conditions: Bamboo as an innovative biomass for the production of green energy by power plants. *Energies*, *15*, 1928.
- Butnariu, M., & Samfira, I. (2012). Free radicals and oxidative stress. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, *4*(3), 4-6.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, *216*, 342-346.
- Chaowana, P., Jindawong, K., & Sungkaew, S. (2015). Adhesion and bonding performance of laminated bamboo lumber made from *Dendrocalamus sericeus*. In *Product Design and Technology, The 10th World Bamboo Congress, Korea 2015*.
- Chatatikun, M., & Chiabchalard, A. (2017). Thai plants with high antioxidant levels, free radical scavenging activity, antityrosinase and anti-collagenase activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *17*(1), 487.
- Chilicka, K., Rogowska, A. M., Rusztowicz, M., Szyguta, R., Yanakieva, A., Asanova, B., & Wilczyński, S. (2022). The effects of green tea (*Camellia sinensis*), bamboo extract (*Bambusa vulgaris*) and lactic acid on sebum production in young women with acne vulgaris using sonophoresis treatment. *Healthcare*, *10*(4), 684.
- Choe, E., & Min, D. B. (2009). Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *8*, 345-358.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, *15*, 7313-7352.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, *52*(4), 601-623.
- Devireddy, A. R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Mittler, R. (2021). Integration of reactive oxygen species and hormone signaling during abiotic stress. *The Plant Journal*, *105*, 459-476.

- Dirar, A. I., Alsaadi, D. H. M., Wada, M., Mohamed, M. A., Watanabe, T., & Devkota, H. P. (2019). Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*, *120*, 261–267.
- Ferreira, P. S., Victorelli, F. D., Fonseca-Santos, B., & Chorilli, M. (2018). A review of analytical methods for *p*-coumaric acid in plant-based products, beverages, and biological matrices. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *49*, 21-31.
- Freitas, G. M. d., Thomas, J., Liyanage, R., O. Lay, J., Basu, S., Ramegowda, V., . . . Pereira, A. (2019). Cold tolerance response mechanisms revealed through comparative analysis of gene and protein expression in multiple rice genotypes. *PLoS ONE*, *14*(6), e0218019.
- Gagliano, J., Anselmo-Moreira, F., Sala-Carvalho, W. R., & Maria Furlan, C. (2021). What is known about the medicinal potential of bamboo? *Advances in Traditional Medicine*, 1-29. doi:10.1007/s13596-020-00536-5
- Gharibi, S., Tabatabaei, B. E. S., Saeidi, G., Talebi, M., & Matkowski, A. (2019). The effect of drought stress on polyphenolic compounds and expression of flavonoid biosynthesis related genes in *Achillea pachycephala* Rech.f. *Phytochemistry*, *162*, 90–98.
- Gong, J., Huang, J., Xiao, G., Chen, F., Lee, B., Ge, Q., . . . Zhang, Y. (2016). Antioxidant capacities of fractions of bamboo shaving extract and their antioxidant components. *Molecules*, *21*(8), 996.
- Gong, J., Xia, D., Huang, J., Ge, Q., Mao, J., Liu, S., & Zhang, Y. (2015). Functional components of bamboo shavings and bamboo leaf extracts and their antioxidant activities *in vitro*. *Journal of Medicinal Food*, *18*, 453–459.
- Goyal, A. K., Sen, A., Middha, S. K., & Usha, T. (2017). Analysis of toxic, antidiabetic and antioxidant potential of *Bambusa balcooa* Roxb. leaf extracts in alloxan-induced diabetic rats. *3 Biotech*, *120*(7), 1-11.
- Guaadaoui, A., Benaicha, S., Elmajdoub, N., Bellaoui, M., & Hamal, A. (2014). What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, *3*(3), 174-179.

- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, *368*(6488), 266-269.
- Hashish, A., Zein, H., & El-Bhnsawy, R. M. (2018). Evaluation of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity of black and green tea drink among some available brands in the Egyptian market. *Current Science International*, *7*(4), 721-730.
- He, M., Min, J.-W., Kong, W.-L., He, X.-H., Li, J.-X., & Peng, B.-W. (2016). A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, *115*, 74–85.
- He, T., Fan, L., Tarin, M., Shen, S., Xie, D., Liguang, C., . . . Zheng, Y. (2020). Physiological and proteomic responses of *Dendrocalamus minor* var. *amoenus* (ghost bamboo) under drought stress. *Applied Ecology and Environmental Research*, *18*, 4817-4838.
- Horn, T., & Häser, A. (2016). Bamboo tea: reduction of taxonomic complexity and application of DNA diagnostics based on rbcL and matK sequence data. *PeerJ*, *4*, e2781.
- Ilyas, M., Khan, W. A., Ali, T., Ahmad, N., Khan, Z., Fazal, H., . . . Rizwan, M. (2022). Cold stress-induced seed germination and biosynthesis of polyphenolics content in medicinally important *Brassica rapa*. *Phytomedicine Plus*, *2*, 100185.
- Iraklia, M., Chatzopoulou, P., & Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops & Products*, *128*, 382–388.
- Jiang, L., Belwal, T., Huang, H., Ge, Z., Limwachiranon, J., Zhao, Y., . . . Luo, Z. (2019). Extraction and characterization of phenolic compounds from bamboo shoot shell under optimized ultrasonic-assisted conditions: a potential source of nutraceutical compounds. *Food and Bioprocess Technology*, *12*, 1741–1755.
- Jin, Y.-c., Liu, H.-l., & Yuan, K. (2011). Simultaneous determination of seven effective constituents in the leaves of bamboo by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(23), 5630-5635.
- Karawak, P., Sengsai, S., Thepsithar, C., & Maksup, S. (2020). Phytochemical content and

- antioxidant activity of leaf extracts from nine bamboo species and determination of flavone C-glycosides by TLC and HPLC. *International Society for Horticultural Science (ISHS)*, 1298, 359-370.
- Keski-Saari, S., Ossipov, V., Julkunen-Tiitto, R., Jia, J., Danell, K., Veteli, T., . . . Niemelä, P. (2008). Phenolics from the culms of five bamboo species in the Tangjiahe and Wolong Giant Panda Reserves, Sichuan, China. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 758-765.
- Kiani, R., Arzani, A., & Maibody, S. A. M. M. (2021). Polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity involved in salt tolerance in wheat, *Aegilops cylindrica* and their amphidiploids. *Frontiers in Plant Science*, 12, 646221.
- Kumar, S. (2014). The Importance of antioxidant and their role in pharmaceutical science- A review. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 27-44.
- Küpeli, E., Aslan, M., Gürbüz, I. I., & Yesilada, E. (2004). Evaluation of in vivo biological activity profile of isoorientin. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 59, 787-790.
- Lam, K. Y., Ling, A. P. K., Koh, R. Y., Wong, Y. P., & Say, Y. H. (2016). A review on medicinal properties of orientin. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2016, 4104595.
- Langseth, L. (1995). *Oxidants, antioxidants, and disease prevention* (U. Bracco Ed. 1st ed.). Belgium: ILSI Europe.
- Li, X., Tao, W., Xun, H., Yao, X., Wang, J., Sun, J., . . . Tang, F. (2021). Simultaneous determination of flavonoids from bamboo leaf extracts using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 31, 347-352.
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Liebelt, D. J., Jordan, J. T., & Doherty, C. J. (2019). Only a matter of time: the impact of

- daily and seasonal rhythms on phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*, 18, 1409–1433.
- Liu, M.-H., Ko, C.-H., Tan, P.-W., Fu, W.-M., & He, J.-Y. (2016). Chemical profiles, antioxidant and anti-obesity effects of extract of *Bambusa textilis* McClure leaves. *Journal of Functional Foods*, 22, 533–546.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126.
- Ma, N.-H., Guo, J., Chen, S.-H. X., Yuan, X.-R., Zhang, T., & Ding, Y. (2020). Antioxidant and compositional HPLC analysis of three common bamboo leaves. *Molecules*, 25, 409.
- Ma, X., Wang, E., Lu, Y., Wang, Y., Ou, S., & Yan, R. (2015). Acylation of antioxidant of bamboo leaves with fatty acids by lipase and the acylated derivatives' efficiency in the inhibition of acrylamide formation in fried potato crisps. *PLoS ONE*, 10(6), e0130680.
- Macwan, C., Patel, H. V., & Kalia, K. (2010). A comparative evaluation of in vitro antioxidant properties of bamboo *Bambusa arundinacea* leaves extracts. *Journal of cell and tissue Research*, 10(3), 2413.
- Mansi, P., Shikha, T., Dhara, B., Sonal, B., Snehal, P., & Mehta, P. (2020). *In vitro* evaluation for protective effect of bamboo leaves against gamma radiation induced genetic damage and their polyphenols quantification using RP-HPLC. *Indian Drugs*, 57(01), 27-37.
- Martinez, K. B., Mackert, J. D., & McIntosh, M. K. (2017). Polyphenols and intestinal health. *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*, 191-210.
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668.
- Mei, Y., Sun, H., Du, G., Wang, X., & Lyu, D. (2020). Exogenous chlorogenic acid alleviates oxidative stress in apple leaves by enhancing antioxidant capacity. *Scientia Horticulturae*, 274, 109676.
- Miao, M., & Xiang, L. (2020). Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. *Advances in Pharmacology*, 87, 71-88.

- Mohanta, T. K., Bashir, T., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2017). System biology approach in plant abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *121*, 58-73.
- Ni, Q., Zhang, Y., Xu, G., Gao, Q., Gong, L., & Zhang, Y. (2014). Influence of harvest season and drying method on the antioxidant activity and active compounds of two bamboo grass leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(4), 1565–1576.
- Nirmala, C., Bisht, M. S., Bajwa, H. K., & Santosh, O. (2018). Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. *Trends in Food Science & Technology*, *77*, 91-99.
- Nobossé, P., Fombang, E. N., & Mbofung, C. M. F. (2018). Effects of age and extraction solvent on phytochemical content and antioxidant activity of fresh *Moringa oleifera* L. leaves. *Food Science & Nutrition*, *6*, 2188–2198.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*, 1-15.
- Pulavarty, A., & Sarangi, B. K. (2018). Screening bamboo species for salt tolerance using growth parameters, physiological response and osmolytes accumulation as effective indicators. *Chemistry and Ecology*, *34*(4), 340-354.
- Riaz, U., Kharal, M. A., Murtaza, G., Zaman, Q. u., Javaid, S., Malik, H. A., . . . Abbas, Z. (2019). Prospective roles and mechanisms of caffeic acid in counter plant stress: A mini review. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, *32*(1), 8-19.
- Righini, S., Rodriguez, E. J., Berosich, C., Grotewold, E., Casati, P., & Ferreyra, M. L. F. (2019). Apigenin produced by maize flavone synthase I and II protects plants against UV-B-induced damage. *Plant, Cell & Environment*, *42*, 495–508.
- Saini, M., Shrivastava, D., & Kumar, G. (2014). Phytochemical composition and antioxidant potential of methanolic extract of *Dendrobium Sonia* (Orchidaceae) flower. *Inroads*, *3*(2), 438-443.
- Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., . . . Martins, N. (2019). The therapeutic potential of apigenin. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6), 1305.

- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Bok, V. V. c. c., & Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants* 10, 118.
- Sarker, U., & Oba, S. (2018). Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of *Amaranthus* leafy vegetable. *BMC Plant Biology*, 18, 258.
- Seo, C.-S., & Song, K.-H. (2021). Phytochemical characterization for quality control of *Phyllostachys pubescens* leaves using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and tandem mass detector. *Plants*, 11, 50.
- Shabala, S. N., Shabala, S. I., Martynenko, A. I., Babourina, O., & Newman, I. A. (1998). Salinity effect on bioelectric activity, growth, Na⁺ accumulation and chlorophyll fluorescence of maize leaves: A comparative survey and prospects for screening. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25, 609-616.
- Shin, Y. K., Bhandari, S. R., Jo, J. S., Song, J. W., Cho, M. C., Yang, E. Y., & Lee, J. G. (2020). Response to salt stress in lettuce: Changes in chlorophyll fluorescence parameters, phytochemical contents, and antioxidant activities. *Agronomy*, 10(11), 1627.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Stagos, D. (2019). Antioxidant activity of polyphenolic plant extracts. *Antioxidants*, 9(1), 19.
- Sutharut, J., & Sudarat, J. (2012). Total anthocyanin content and antioxidant activity of germinated colored rice. *International Food Research Journal*, 19(1), 215-221.
- Talabgaew, S., & Laemlaksakul, V. (2007). Experimental studies on the mechanical property of laminated bamboo in Thailand. *World Academy of Sci Eng and Technol*, 34, 327-331.
- Tanaka, A., Zhu, Q., Tan, H., Horiba, H., Ohnuki, K., Mori, Y., . . . Shimizu, K. (2014). Biological activities and phytochemical profiles of extracts from different parts of bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *Molecules*, 19(6), 8238–8260.
- Tong, R., Zhou, B., Cao, Y., Ge, X., & Jiang, L. (2020). Metabolic profiles of moso bamboo

- in response to drought stress in a field investigation. *Science of the Total Environment*, 720, 137722.
- Valenzuela B, A., & Nieto K, S. (1996). Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. *Grasas y Aceites*, 4(3), 186-196.
- Wang, J., Yue, Y.-d., Jiang, H., & Tang, F. (2012). Rapid screening for flavones c-glycosides in the leaves of different species of bamboo and simultaneous quantitation of four marker compounds by HPLC-UV/DAD. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 1-8.
- Wang, S. (2017). Bamboo sheath-A modified branch based on the anatomical observations. *Scientific Reports*, 7, 16132.
- Warner, D. S., Sheng, H., & Batinic´-Haberle, I. (2004). Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *The Journal of Experimental Biology*, 207, 3221–3231.
- Wróblewska, K. B., Baby, A. R., Guaratini, M. T. G., & Moreno, P. R. H. (2019). *In vitro* antioxidant and photoprotective activity of five native Brazilian bamboo species. *Industrial Crops & Products*, 130, 208–215.
- Wu, Z. Z., Ying, Y. Q., Zhang, Y. B., Bi, Y. F., Wang, A. K., & Du, X. H. (2018). Alleviation of drought stress in *Phyllostachys edulis* by N and P application. *Scientific Reports*, 8(1), 228.
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A. R., & Miron, A. (2016). Advance on the flavonoid c-glycosides and health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 29-45.
- Zhao, N., Su, X., Wang, Y., Chen, J., & Zhuang, W. (2020). Traditional chinese herbal medicine for whitening. *Natural Product Communications*, 15, 1-12.
- Zhu, D., Wang, C., Zhang, Y., Yang, Y., Shang, Y., Niu, X., . . . Wei1, Z. (2018). Insight into solvent effects on phenolic content and antioxidant activity of bamboo leaves extracts by HPLC analysis. *Journal of Food Measurement and Characterization* 12, 2240–2246.
- Zhu, L., Chen, J., Tan, J., Liu, X., & Wang, B. (2017). Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: Free radical scavenging and DNA oxidative damage protection activities and analysis of bioactivity-structure relationship based on molecular and electronic structures. *Molecules*, 22(3), 195.

- เทคโนโลยีชาวบ้าน. (2562). 58 พันธุ์ไม้มีค่า. Access 4 พฤศจิกายน 2562 from https://www.technologychaoban.com/bullet-news-today/article_84963
- ไทยรัฐออนไลน์. (2560). “ไผ่ตัน” เนื้อไม้เหนียวกับความเชื่อดีๆ. Access 18 มีนาคม 2564 from <https://www.thairath.co.th/news/local/1075259>
- ฉัญพิสิษฐ์ พวงจิก, ปภาภานต์ พรหมคล้าย, & เยาวพา จิระเกียรติกุล. (2556). การศึกษาการเจริญเติบโตของไผ่บางพันธุ์. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21(6), 533-542.
- ฉัญพิสิษฐ์ พวงจิก, พรชัย หาระโคตร, & คณางค์ หิรัญยัษฐิติ. (2559). การศึกษาการเจริญเติบโตของไผ่ 6 พันธุ์. *Thai Journal of Science and Technology*, 3(5), 256-264.
- ผดุงศักดิ์ คังศิริวงศ์. (2562). ไผ่ยักษ์พม่า. Access 18 มีนาคม 2564 from <https://www.nanagarden.com/product/304842>
- เพ็ญภา การะเวก, โชคพิสิษฐ์ เทพสิทธา, สุพรรณัญญา เสี่ยงสาย, & ศรีณยพร มากทรัพย์. (2562). การวิเคราะห์สารพลาโวนโกลโคไซด์ในสารสกัดจากใบไผ่ขางหม่น “นวลราชินี” ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University*, 6(5), 85-94.
- ศูนย์ฝึกอบรมวนศาสตร์ชุมชนแห่งภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก. (2557). ไผ่กับวิถีชีวิตคนไทย : องค์ความรู้และรูปแบบการจัดการของท้องถิ่น. กรุงเทพมหานคร: บริษัท ดุมาเยส จำกัด.
- สรารุธ สังข์แก้ว, อัจฉรา ตีระพัฒนานนท์, & กิตติศักดิ์ จินดาวงศ์. (2554). *BAMBOO of Thailand* ไผ่ในเมืองไทย (พิมพ์ครั้งที่ 1 ed.). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ข สีของสารมาตรฐานหลังเกิดปฏิกิริยาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานและการคำนวณ

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานของสารพฤษเคมี 8 ชนิด ในการวิเคราะห์ RP-HPLC

ภาคผนวก ง ความเข้มข้น อุณหภูมิ และความชื้นของบริเวณพื้นที่ทดลองปลูกไม้ของการทดลองที่ 3

ภาคผนวก จ ชื่อวิทยาศาสตร์ของไม้ที่ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ฉ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตัวอย่างไม้ที่ใช้ในการศึกษา

ภาคผนวก ช สภาวะอากาศในพื้นที่จังหวัดอุดรดิตถ์



ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

1.1 10% Folin - Ciocalteu reagent

ดูดสารละลาย Folin – Ciocalteu reagent ละลายในน้ำกลั่น (10 : 90) โดยมีข้อควรระวัง คือ ควรเตรียมสด ปฏิบัติงานและเก็บสารภายในที่มืด เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพ

1.2 7.5% Sodium carbonate

ชั่ง Sodium carbonate ปริมาณ 7.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

1.3 สารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่งสารมาตรฐาน Gallic acid ปริมาณ 1 มิลลิกรัม จากนั้นหยดเอทานอลแค่พอละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 ไมโครลิตร ก่อนนำไป vortex ให้เข้ากัน จะได้ stock ของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปรับให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยน้ำกลั่นโดยใช้สมการ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

C_1 = ความเข้มข้นของสารเริ่มต้น

C_2 = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารเริ่มต้น

V_2 = ปริมาตรของสารที่ต้องการ

2. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

2.1 10% aluminium chloride

ชั่ง aluminium chloride ปริมาณ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยมีข้อควรระวัง คือ ควรเตรียมภายใน hood

2.2 1M potassium acetate

ชั่ง potassium acetate (MW = 98.15 g/mol) ปริมาณ 9.815 กรัม ละลายในเมทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.3 สารมาตรฐาน Quercetin ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ละลาย Quercetin ปริมาณ 5 มิลลิกรัม หยดเมทานอลแค่พอละลาย จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร จะได้ stock ของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปรับให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยน้ำกลั่นโดยใช้สมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

3. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging assay

3.1 DPPH solution

ชั่ง DPPH ปริมาณ 0.0125 กรัม ละลายในเมทานอลปริมาตร 500 มิลลิลิตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร โดยมีข้อควรระวัง คือ ต้องใช้ขวดสีชาหรือท่อฟอยล์ และสารที่เตรียมแล้วควรใช้ทันทีหรือเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -4°C โดยเก็บไว้ไม่เกิน 2-3 วัน

3.2 สารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่ง Trolox ปริมาณ 0.001 กรัม ละลายในเมทานอล 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปรับให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยน้ำกลั่นโดยใช้สมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

4. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay

4.1 การเตรียม FRAP reagent

FRAP reagent เป็นสารผสมระหว่าง 300 mM Sodium acetate buffer: TPTZ: FeCl_3 ในอัตราส่วน 10: 1: 1 โดยมีข้อควรระวัง คือ ควรผสมสารตามลำดับ เมื่อสารแต่ละชนิดรวมกันควรได้สารละลายสีส้ม (ฟางข้าว) หากเป็นสีม่วงไม่สามารถนำมาใช้ได้เนื่องจากสารเกิดการ oxidized และ FRAP reagent ต้องเตรียมสดทุกครั้งในวันที่ต้องการใช้งาน

4.1.1 300 mM Sodium acetate buffer

ชั่ง sodium acetate ปริมาณ 1.55 กรัม เติม acetic acid ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร สุดท้ายปรับ pH เป็น 3.6 สารละลายที่ได้มีสีใส ควรเตรียมสดในวันที่ใช้งาน

4.1.2 10 mM TPTZ ใน 40 mM HCl

- เตรียม 40 mM HCl (MW = 36.46 g/mol) โดยตวง HCl ปริมาตร 3.31 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร (สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน โดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง)

- ชั่ง TPTZ ปริมาณ 0.0312 กรัม ละลายใน 40 mM HCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลายหลังผสมจะมีสีใสหรืออาจมีสีฟ้าใสอ่อน ๆ เตรียมสดในวันที่ใช้งาน

4.1.3 20 mM FeCl₃.6H₂O

ชั่ง FeCl₃.6H₂O ปริมาณ 0.05406 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยในการเตรียมสารละลายนี้มีข้อควรระวัง คือ เตรียมสดในวันที่ใช้งาน โดยควรเตรียมสารละลายนี้เป็นลำดับสุดท้าย ตักสารโดยใช้ช้อนพลาสติกเท่านั้น หลีกเลี่ยงช้อนโลหะ ระวังอย่าให้สารสัมผัสอากาศนาน ปิดฝาหลังเตรียมเสร็จทันที และสารละลายที่ได้มีสีเหลืองใส

4.2 สารมาตรฐาน FeSO₄.7H₂O ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่ง FeSO₄.7H₂O (MW = 278.01 g/mol) ปริมาณ 0.0695 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร จะได้ stock ของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 mM FeSO₄.7H₂O ปรับให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการด้วยน้ำกลั่นโดยใช้สมการ $C_1V_1 = C_2V_2$

5. การวัดปริมาณรงควัตถุในการสังเคราะห์แสง

5.1 95.5% (v/v) Acetone

ผสม acetone กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 95.5: 5

6. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพฤษเคมี 8 ชนิด ด้วยวิธี RP-HPLC

6.1 Acetic acid / water (0.8: 100, v/v)

ตวง Acetic acid ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เติมนลงในน้ำกลั่น DI (deionized water) โดยใช้ขวดปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร และควบคุม pH ให้เป็น 2.7 โดยสารละลายนี้ไม่ควรเตรียมทิ้งไว้นาน ๆ ควรใช้งานภายใน 3-4 วัน

6.2 การเตรียมสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid, isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid, vitexin, isovitexin, และ apigenin ชั่งสารมาตรฐาน 0.001 กรัม

ละลายสารมาตรฐานแต่ละชนิด โดยใช้เมทานอล 1 มิลลิลิตร จะได้ stock ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร หรือ 1,000 ppm

7. การเตรียมสารละลายสำหรับรดต้นไม้ในการทดลองศึกษาต้นไม้ภายใต้สภาวะความเครียดจาก ลิ่งแวนด์ล้อม

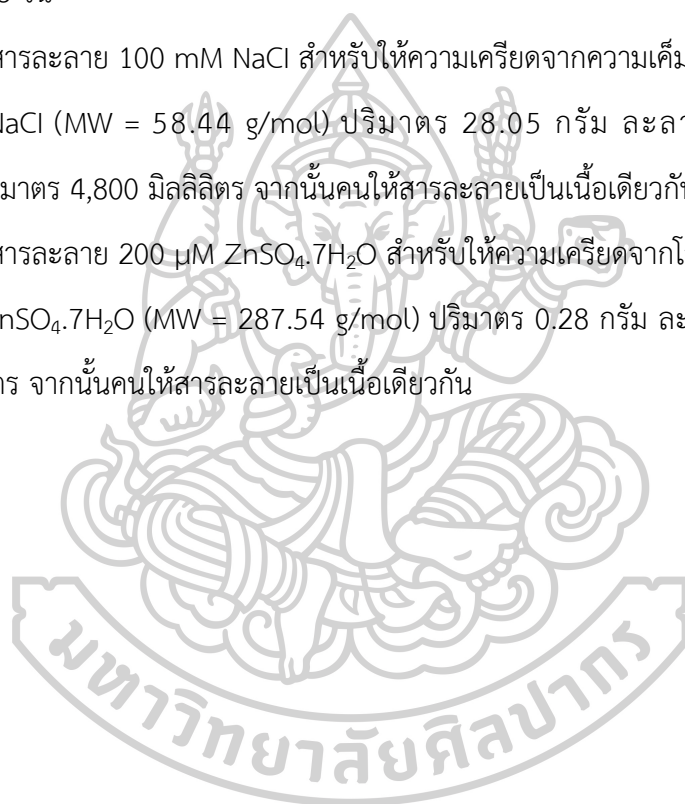
เตรียมสารละลายปริมาตร 4,800 มิลลิลิตร สำหรับรดวันละ 150 มิลลิลิตร/ต้น จำนวน 4 ต้น เป็นเวลา 8 วัน

7.1 สารละลาย 100 mM NaCl สำหรับให้ความเครียดจากความเค็ม

ซึ่ง NaCl (MW = 58.44 g/mol) ปริมาตร 28.05 กรัม ละลายในน้ำ RO (Reverse Osmosis) ปริมาตร 4,800 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

7.2 สารละลาย 200 μ M ZnSO₄·7H₂O สำหรับให้ความเครียดจากโลหะหนัก (Zn)

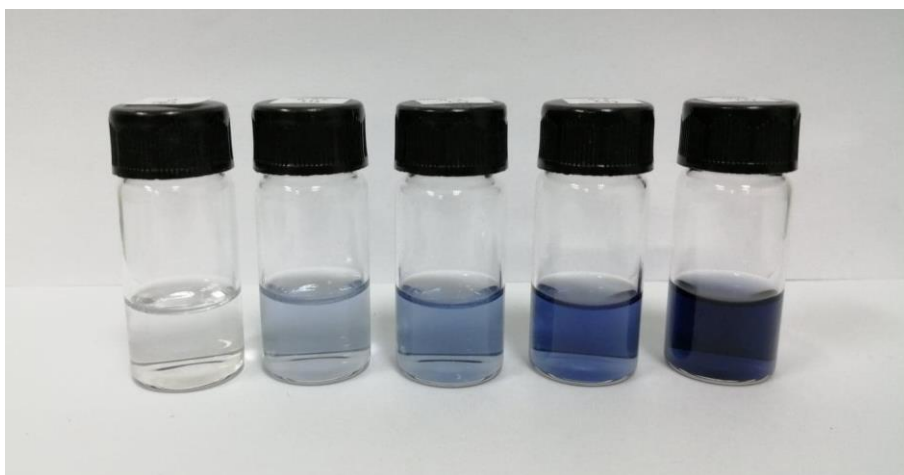
ซึ่ง ZnSO₄·7H₂O (MW = 287.54 g/mol) ปริมาตร 0.28 กรัม ละลายในน้ำ RO ปริมาตร 4,800 มิลลิลิตร จากนั้นคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน



ภาคผนวก ข

สีของสารมาตรฐานหลังเกิดปฏิกิริยาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานและการคำนวณ

สารมาตรฐาน Gallic acid



รูปที่ 1 สารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 mg/ml ตามลำดับ
หลังทำปฏิกิริยาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

การคำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม

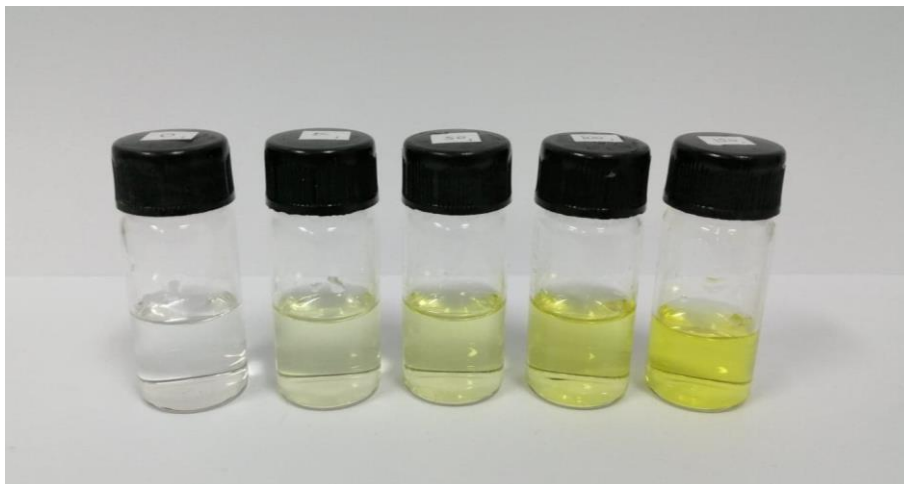
การคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมที่วัดได้จากเทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic acid ทำได้ดังนี้

สารสกัดไผ่ 10 มิลลิลิตร มีตัวอย่างไผ่ 1 กรัม ดังนั้น สารสกัดไผ่ 0.1 มิลลิลิตร มีตัวอย่างไผ่ 0.01 กรัม แสดงว่าไผ่ 0.01 กรัม มีฟีนอลิกรวมเทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic acid เป็น X mg GAE/0.01 g DW

ไผ่ 1 กรัม มีฟีนอลิกรวมเทียบกับกราฟมาตรฐาน Gallic acid เป็น $(X \times 1) / 0.01$ mg GAE/g DW

หมายเหตุ: X ได้จากการนำค่า OD แทนในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

สารมาตรฐาน Quercetin



รูปที่ 2 สารมาตรฐาน Quercetin ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100 และ 150 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ หลังทำปฏิกิริยาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

การคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

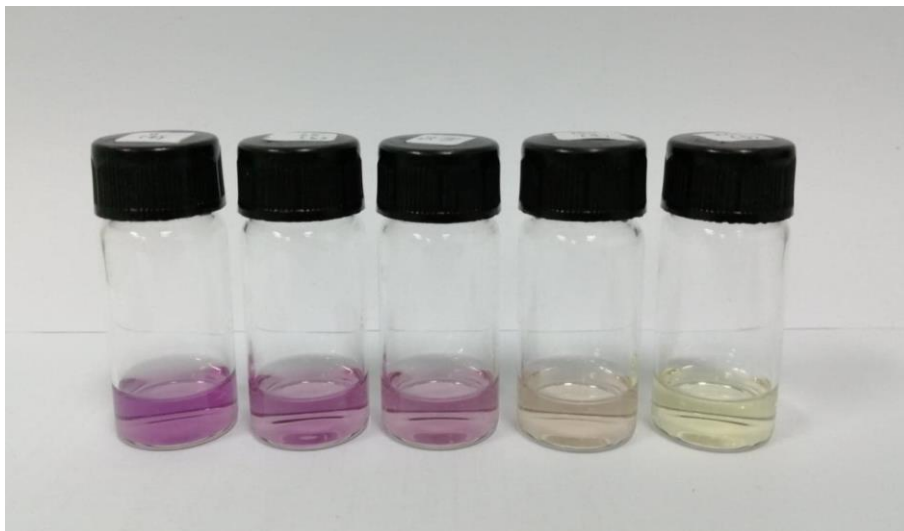
การคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวมที่วัดได้จากเทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟมาตรฐาน Quercetin ทำได้ดังนี้

สารสกัดใฝ่ 10 มิลลิลิตร มีตัวอย่างใฝ่ 1 กรัม ดังนั้น สารสกัดใฝ่ 0.5 มิลลิลิตร มีตัวอย่างใฝ่ 0.05 กรัม แสดงว่าใฝ่ 0.05 กรัม มีฟลาโวนอยด์รวมเทียบกับกราฟมาตรฐาน Quercetin เป็น $X \mu\text{g QE}/0.05 \text{ g DW}$

ใฝ่ 1 กรัม มีฟลาโวนอยด์รวมเทียบกับกราฟมาตรฐาน Quercetin เป็น $(X*1)/0.05 \mu\text{g QE}/\text{g DW}$ สุดท้ายนำค่าที่ได้หารด้วย 1,000 เพื่อแปลงหน่วยเป็น $\text{mg QE}/\text{gDW}$

หมายเหตุ: X ได้จากการนำค่า OD แทนในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

สารมาตรฐาน Trolox



รูปที่ 3 สารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 mM ตามลำดับ หลังทำปฏิกิริยาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ วิธี DPPH assay

การคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ วิธี DPPH assay

การคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดตัวอย่างเทียบกับสารมาตรฐาน trolox หรือค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ซึ่งมีหน่วยเป็น $\mu\text{mol trolox/g DW}$ ทำได้โดยนำค่าความชันของกราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดหารด้วยค่าความชันของกราฟมาตรฐานการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารมาตรฐาน Trolox

ทั้งนี้ ความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้สร้างกราฟการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดคำนวณเทียบกับการทำปฏิกิริยากับ DPPH solution ดังนี้

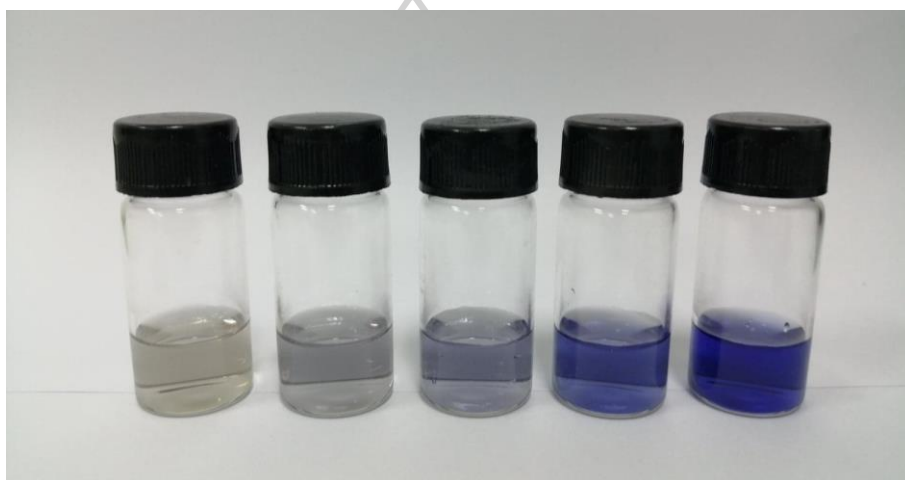
จาก สารสกัดไผ่ 10 มิลลิลิตร มีไผ่ 1 กรัม ดังนั้น สารสกัด 1 มิลลิลิตร มีไผ่ 0.1 กรัม (100 มิลลิกรัม) จากนั้น dilute สารสกัดไผ่เป็นความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละการทดลอง ตั้งแต่ 0, 1, 2, 4, 8, 16 และ 32 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ที่ความเข้มข้น X มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารสกัด 100 ไมโครลิตร มีไผ่ X/10 มิลลิกรัม ดังนั้นในการทำปฏิกิริยา ใช้สารสกัด 100 ไมโครลิตร, DPPH solution ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมเป็น 2,100 ไมโครลิตร

ดังนั้นจากปริมาตร 2,100 ไมโครลิตร มีไฟ X/10 มิลลิกรัม ใน 1,000 มิลลิลิตร มีไฟ $[(X/10) \times 1000] / 2,100$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

สรุปได้ว่า จากสารสกัดไฟความเข้มข้นต่าง ๆ ในแต่ละการทดลอง ตั้งแต่ 0, 1, 2, 4, 8, 16 และ 32 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไฟที่ทำปฏิกิริยาเทียบกับ DPPH solution คิดเป็น 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.6 ตามลำดับ

สารมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



รูปที่ 4 สารมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 mM ตามลำดับ หลังทำปฏิกิริยาเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ วิธี FRAP assay

การคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ วิธี FRAP assay

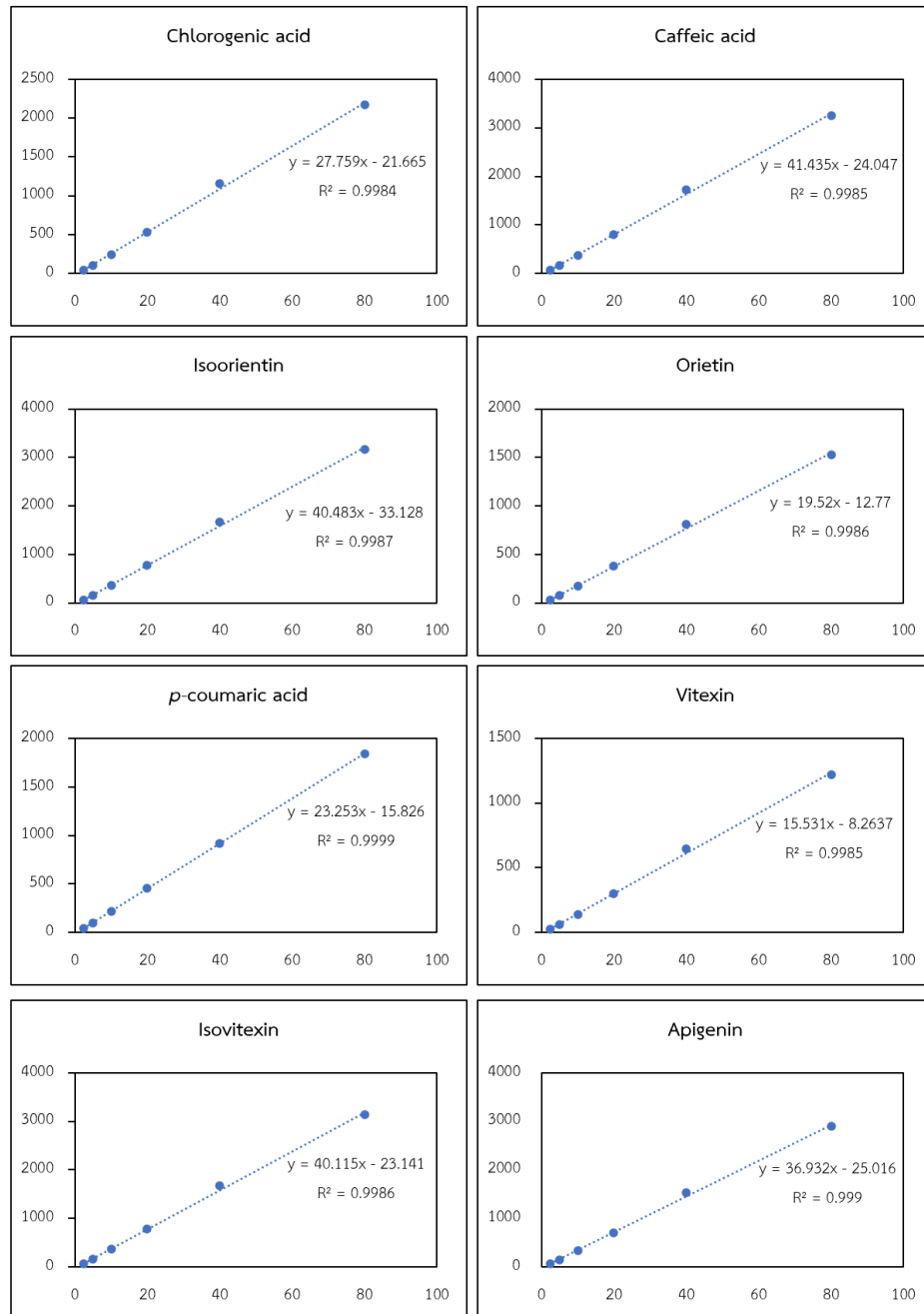
การคำนวณฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ วิธี FRAP assay ที่วัดได้จากเทคนิคการวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ทำได้ดังนี้

สารสกัดไฟ 10 มิลลิลิตร มีตัวอย่างไฟ 1 กรัม ดังนั้น สารสกัดไฟ 0.15 มิลลิลิตร มีตัวอย่างไฟ 0.015 กรัม แสดงว่าไฟ 0.015 กรัม ทำให้เกิด Fe(II) เป็น X mM

ไฟ 1 กรัม เกิด Fe(II) เทียบกับกราฟมาตรฐาน $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เป็น $(X \times 1) / 0.015$ mM/g DW
หมายเหตุ: X ได้จากการนำค่า OD แทนในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานของสารพฤกษเคมี 8 ชนิด ในการวิเคราะห์ RP-HPLC



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารพฤกษเคมีจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ chlorogenic acid, caffeic acid, isoorientin, orientin, *p*-coumaric acid, vitexin, isovitexin, และ apigenin ที่ความเข้มข้น 80 ppm

ภาคผนวก ง

ความเข้มแสง อุณหภูมิ และความชื้นของบริเวณพื้นที่ทดลองปลูกไม้ของการทดลองที่ 3

ตารางที่ 1 แสดงความเข้มแสง อุณหภูมิ และความชื้นเฉลี่ยแต่ละช่วงเวลาในวันที่ 0 1 2 4 และ 8 ของพื้นที่ทดลองปลูกไม้

วันที่	เวลา	ความเข้มแสง (klux) วัด 3 จุด	ความเข้มแสง เฉลี่ย (klux)	อุณหภูมิ (°C)	ความชื้น (%)
0 20/12/2563	8.00-12.00	-	-	-	-
	12.00-16.00	-	-	-	-
	16.00-20.00	-	-	-	-
1 21/12/2563	8.00-12.00	-	-	-	-
	12.00-16.00	60.2, 59.1, 54.2	57.8	26	63
	16.00-20.00	5.0, 5.5, 6.2	7.2	26	45
2 22/12/2563	8.00-12.00	15.3, 29.3, 17.3	20.6	31	31
	12.00-16.00	64.0, 63.9, 59.9	62.6	26	39
	16.00-20.00	2.3, 2.4, 2.4	2.4	26	40
4 24/12/2563	8.00-12.00	9.9, 9.6, 9.4	9.6	25	51
	12.00-16.00	26.6, 27.8, 28.7	27.7	30	39
	16.00-20.00	0.2, 0.2, 0.3	0.7	28	48
8 28/12/2563	8.00-12.00	5.8, 6.0, 6.2	6	29	64
	12.00-16.00	49.9, 51.3, 33.4	44.9	33	54
	16.00-20.00	-	-	-	-

ตารางที่ 2 แสดงความเข้มแสง อุณหภูมิ และความชื้นเฉลี่ยแต่ละช่วงเวลาในวันที่ 0 1 2 4 และ 8 ของบริเวณจังหวัดนครปฐม ละติจูด: 13.82 | ลองจิจูด: 100.04 | การพยากรณ์สำหรับความสูง: 4 m

วันที่	เวลา	อุณหภูมิ (°C)	ความชื้น (%)	อุณหภูมิ สูงสุด/ต่ำสุด ประจำวัน (°C)
0 20/12/2563	8.00 น.	22	69	28/19
	12.00 น.	27	51	
	16.00 น.	28	48	
	20.00 น.	24	69	
1 21/12/2563	8.00 น.	20	69	27/18
	12.00 น.	25	51	
	16.00 น.	27	45	
	20.00 น.	24	50	
2 22/12/2563	8.00 น.	21	60	29/19
	12.00 น.	26	48	
	16.00 น.	28	42	
	20.00 น.	25	54	
4 24/12/2563	8.00 น.	24	65	31/20
	12.00 น.	29	51	
	16.00 น.	31	49	
	20.00 น.	29	55	
8 28/12/2563	8.00 น.	27	89	34/25
	12.00 น.	32	55	
	16.00 น.	33	49	
	20.00 น.	29	70	

ที่มา: th.freemeteo.com

ภาคผนวก จ

ชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 1 ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชใช้ในการทดลอง

ลำดับ	สกุล	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	อ้างอิง
1	<i>Bambusa</i>	<i>B. oliveriana</i> Gamble	ไผ่ทางช้าง	สรารุฑ สังข์แก้ว และคณะ, 2554
2		<i>Bambusa</i> sp.	ไผ่โดนหวาน	
3		<i>D. copelandii</i>	ไผ่แม่ตะวอ	ธัญพิสิษฐ์ พวงจิก และคณะ, 2559
4		<i>D. copelandii</i> (Gamble ex Brandis) N.H.Xia & Stapleton	ไผ่ไม้หนุ่ย	สรารุฑ สังข์แก้ว และคณะ, 2554
5		<i>D. giganteus</i> Munro	ไผ่ยักษ์	
6	<i>Dendrocalamus</i>	<i>D. membranaceus</i> Munro	ไผ่ชางนวล	Karawak et al., 2020
7		<i>D. sericeus</i>	ไผ่ชางหม่น	
8		<i>Dendrocalamus</i> sp.	ไผ่ดงมขาน	
9		<i>Dendrocalamus</i> sp.	ไผ่บกกิง	สรารุฑ สังข์แก้ว และคณะ, 2554
10		<i>Dendrocalamus</i> sp.	ไผ่โปกพม่า	
11	<i>Schizostachyum</i>	<i>S. pergracile</i> (Munro) R.B.Majumdar	ไผ่ข้าวทลามา	สรารุฑ สังข์แก้ว และคณะ, 2554
12		<i>Schizostachyum</i> sp.	ไผ่ข้าวทลามาแบบแดง	
13	<i>Thyrsocalamus</i>	<i>T. liang</i> Sungkaew & W.L. Goh	ไผ่เลี้ยง	Goh et al., 2018

ภาคผนวก ฉ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตัวอย่างไม้ที่ใช้ในการศึกษา

การทดลองที่ 1



รูปที่ 1: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ป่ากิ้ง

การทดลองที่ 2



รูปที่ 2: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ข้าวหลามกาบแดง



รูปที่ 3: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ซางหม่น



รูปที่ 4: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ซางหม่น



รูปที่ 5: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ดำมขวาน



รูปที่ 6: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่โดนหวาน



รูปที่ 7: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่โปกพม่า



รูปที่ 8: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่มันหมู



รูปที่ 9: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่แม่ตะวอ



รูปที่ 10: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ยักษ์



รูปที่ 11: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่เลี้ยง



รูปที่ 12: ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของไผ่ทางช้าง

การทดลองที่ 3



รูปที่ 13: ลักษณะต้นของไผ่เลี้ยง หลังได้รับสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็นระยะเวลา

0 1 2 4 และ 8 วัน



รูปที่ 14: ลักษณะต้นของไผ่ข้าวหลาม หลังได้รับสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เป็น

ระยะเวลา 0 1 2 4 และ 8 วัน

ภาคผนวก ข

สภาวะอากาศในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์

ตารางที่ 1 สภาวะอากาศในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ ปี พุทธศักราช 2562-2563

ปี	เดือน	อุณหภูมิเฉลี่ย (°C)	ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย (มม)
2562	มกราคม	25.8	5.6
	กุมภาพันธ์	27.5	5.4
	มีนาคม	29.7	0.0
	เมษายน	32.8	0.6
	พฤษภาคม	32.4	89.2
	มิถุนายน	29.9	139.7
	กรกฎาคม	29.4	85.7
	สิงหาคม	28.0	287.2
	กันยายน	28.7	123.9
	ตุลาคม	29.3	72.6
	พฤศจิกายน	27.3	32.9
	ธันวาคม	24.6	0.0
2563	มกราคม	26.2	0.0
	กุมภาพันธ์	27.1	0.0
	มีนาคม	30.4	0.7
	เมษายน	31.6	84.0
	พฤษภาคม	32.1	76.8
	มิถุนายน	30.5	101.4
	กรกฎาคม	28.4	0.4
	สิงหาคม	28.4	393.5
	กันยายน	29.0	231.5
	ตุลาคม	27.6	48.1
	พฤศจิกายน	27.5	0.0
	ธันวาคม	24.9	0.0

ที่มา : ศูนย์ภูมิอากาศ กรมอุตุนิยมวิทยา

<http://climate.tmd.go.th/content/category/16>

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	สิรินตา เกษมสุขไพศาล
วัน เดือน ปี เกิด	17 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2541
สถานที่เกิด	จังหวัด ราชบุรี
วุฒิการศึกษา	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับ 1 2563 คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	381 หมู่ที่ 2 ตำบล ไร่ใหม่ อำเภอ สามร้อยยอด จังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ 77180
ผลงานตีพิมพ์	Leaf age affects phytochemical profiling and antioxidant activity in bamboo leaf tea of Pai Pak King (<i>Dendrocalamus</i> sp.)

