ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชในตำรายาสมุนไพรไทย เล่ม 1

นายประภาสพล อุดมกิจมงคล	5536548533
นางสาวปุญณดา สัตยารมณ์	5536553633
นายวรุตม์ เก่งกิตติภัทร	5536571933

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตรบัณฑิต สาขาเภสัชศาสตร์
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

DNA fingerprints of plants in Thai Herbal Pharmacopoeia Volume I

Mister Praphatphon Udomkitmongkhon	5536548533
Miss Poonnada Satayarom	5536553633
Mister Warut Kengkittipat	5536571933

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Doctor of Pharmacy Program in Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

2016

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการปริญญานิพนธ์	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชในตำรายาสมุนไพรไทย เล่ม 1
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นายประภาสพล อุดมกิจมงคล
	นางสาวปุญณดา สัตยารมณ์
	นายวรุตม์ เก่งกิตติภัทร
สาขาวิชา/ภาควิชา	การค้นพบและพัฒนายา/เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร้อยตำรวจเอกหญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต

.....คณบดี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รุ่งเพ็ชร สกุลบำรุงศิลป์)

..... ประธานสาขาการค้นพบและพัฒนายา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุญาณี พงษ์ธนานิกร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร้อยตำรวจเอกหญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

โครงการลำดับที่ 3.5

ปีการศึกษา 2559

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชในตำรายาสมุนไพรไทย เล่ม 1

ผู้ร่วมโครงการ : นายประภาสพล อุดมกิจมงคล 5536548533
นางสาวปุญณดา สัตยารมณ์ 5536553633
นายวรุตม์ เก่งกิตติภัทร 5536571933

อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร้อยตำรวจเอกหญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษา

สาขา/ภาควิชา : การค้นพบและพัฒนายา/เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เป็นตำรายาที่รวบรวมข้อกำหนดในการควบคุมคุณภาพมาตรฐานยาสมุนไพรแต่ละชนิด ปัจจุบันตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยมีทั้งหมด 4 เล่ม ชนิด ซึ่งมี สมุนไพร 44 ชนิด โดยจะมีข้อมูลลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ลักษณะของผง เซลล์ และเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สารสำคัญ เกณฑ์การยอมรับทางจุลชีววิทยาสำหรับยาเตรียมสมุนไพรรวมถึงวิธีทดสอบสมุนไพร เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ข้อมูลวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยยังคงมีข้อจำกัดบางประการ เช่น องค์ประกอบทางเคมีแปรผันตามแหล่งเพาะปลูก จึงน่าจะมีข้อมูลในส่วนของดีเอ็นเออันเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของสมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพรให้มีความแม่นยำมากขึ้น การวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการเพิ่มข้อมูลทางดีเอ็นเอในตำรายาสมุนไพรไทย เล่ม 1 ซึ่งประกอบด้วยสมุนไพรจำนวน10 ชนิด ได้แก่ บอระเพ็ด ชุมเห็ดเทศ ฟ้าทะลาย กะเพราแดง ขมิ้นชัน มะแว้งเครือ ไพล พริกไทยดำ สวาด และ ตานหม่อน โดยจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS2 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอในนิวเคลียส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS มาทำนายโครงสร้างทุติยภูมิพบว่าสมุนไพรแต่ละชนิดให้รูปแบบการขดตัวของโครงสร้างทุติยภูมิที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม น่าจะมีการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอตำแหน่งที่ได้รับการยอมรับอื่นๆ เพิ่มเติม ได้แก่ *mat*K, *rbc*L, COI และ *trn*H-*psb*Aเพื่อจัดทำเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่สมบูรณ์

คณะเภสัชศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....
จุฬาลงกรณ์มหาลัย ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

Project No 3.5

Academic year 2016

Abstract

Senior project tittle : DNA fingerprints of plants in Thai Herbal Pharmacopoeia Volume I

Students' name : Mister PraphatphonUdomkitmongkhon 5536548533

Miss PoonnadaSatayarom 5536553633

Mister WarutKengkittipat 5536571933

Advisor/Co-advisor : Assoc. Prof. SuchadaSukrongPh.D.

Assist. Prof. TaksinaChuanasaPh.D.

Field/Department : Drug discovery and development/Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Thai Herbal Pharmacopoeia (THP) is a manuscript that provides information of medicinal plants and their specifications used for their authentication and quality. Currently, there are 4 volumes of THP which include 44 medicinal plants. The information of individual medicinal plants in the THP is given in term of monograph that consists of description of the plant, powder appearance, tissues and cells under microscope, chemical constituents, basic assays for interpretation and etc. However, there are some limitations for authentication; for example, variable quantity of chemicals in the plants from various sources. To solve this problematic issue, information of DNA sequence of the plant would be an alternativedue to its uniqueness of individual species. This research is aimed to provide DNA information of 10 plants presented in the THP volume I including BORAPHET, CHUMHETTHET, FA-THA-LAI, KA-PHRAO-DAENG, KHAMIN CHAN, MAWAENG KRUEO, PHLAI, PHRIK THAI DAM, SAWAAT and TAAN MON. ITS2 sequence existing in nuclear DNA of the 10 plants was exploited to generate DNA fingerprint. Predicted secondary structures of the ITS2 of the 10 plants were thoroughly dissimilar. Other DNA sequences used as standard regions including *mat*K, *rbc*L, COI and*trn*H-*psb*A will be further analyzed to complete DNA barcoding.

Faculty of Pharmaceutical Sciences Student's signature .....

Chulalongkorn University Advisor's signature .....

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

คำนำ

โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตร์บัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอันมีวัตถุประสงค์ให้นิสิตเภสัชศาสตร์ได้ฝึกฝนตนเองให้มีความสามารถในการคิดและแก้ปัญหาอย่างเป็นระบบ มีความรู้ความสามารถในการวางแผนการดำเนินงาน สามารถร่วมพัฒนาและสรรค์สร้างงานทางด้านเภสัชศาสตร์จากองค์ความรู้ที่ได้รับจากการเรียนการสอนได้

รายงานโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ จัดทำขึ้นเพื่อนำเสนอผลการวิจัยในหัวข้อเรื่อง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชในตำรายาสมุนไพรไทย เล่ม 1 โดยเนื้อหาของรายงานโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ประกอบด้วยรายละเอียดเกี่ยวกับขั้นตอนและกระบวนการทำวิจัยตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ รวมถึงเนื้อหาเกี่ยวกับสารเคมี การวิเคราะห์ การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย เพื่อให้รายงานโครงการปริญญานิพนธ์นี้เกิดผลประโยชน์สูงสุดต่อผู้ที่สนใจ

รายงานโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ได้จัดทำขึ้นด้วยความตั้งใจของคณะผู้จัดทำ ทางคณะผู้จัดทำจึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจไม่มากก็น้อยและหากมีข้อบกพร่องประการใด ทางคณะผู้จัดทำใคร่ขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์นี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร้อยตำรวจเอกหญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.ทักษิณา ชวนอาษาอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และอาจารย์ เภสัชกร ดร.ณฐพล พรพุทธพงศ์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบคุณ ดร. จิรยุทธ์ ใจแผ้ว และ ดร. แก้วตา รัตนะพิสิฐนักวิทยาศาสตร์ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ และนายชยพล ตั้งพัฒน์ทอง นิสิตปริญญาโท ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ สำหรับการให้ความช่วยเหลือ เกี่ยวกับวิธีการทดลอง การใช้เครื่องมือ ตลอดจนคำแนะนำภาคทฤษฎีที่เกี่ยวข้องตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์สำหรับความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัยจนกระทั่งโครงการปริญญานิพนธ์นี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
คำนำ ..... ฉ
กิตติกรรมประกาศ ..... ช
สารบัญ ..... ซ
บทที่
1. บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 1
1.3 วิธีการดำเนินงานโดยย่อ 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
2. ปริทัศน์วรรณกรรม 3
3. วิธีการดำเนินการวิจัย 7
4. ผลการวิจัย 14
5. อภิปรายและสรุปผลการวิจัย 35
รายการอ้างอิง 36
ภาคผนวก 37

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ในยุคปัจจุบันมีการใช้พืชสมุนไพรเป็นวัตถุดิบในการผลิตยา ผลิตภัณฑ์ดูแลสุขภาพ และผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร มีการขายผลิตภัณฑ์สมุนไพรกันอย่างแพร่หลายทั้งภายในภูมิภาคต่างๆทั่วประเทศ รวมทั้งการส่งออกไปสู่ต่างประเทศ ประเทศไทยจึงต้องมีการจัดทำตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia)[2] ขึ้นเพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการควบคุมคุณภาพ โดยตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยในปัจจุบันได้จัดทำไว้ 4 เล่มด้วยกัน (Volume I – Volume IV) แต่อย่างไรก็ตามพืชสมุนไพรหลายชนิดมีความคล้ายคลึงกันจนยากต่อการระบุว่าเป็นพืชชนิดใดได้อย่างชัดเจน แม้ว่าพืชนั้นอาจมาจากต่างสกุลกันก็ตาม รวมไปถึงสมุนไพรที่ถูกแปรรูปแล้วซึ่งยากแก่การระบุชนิดของสมุนไพร จึงต้องมีการตรวจเอกลักษณ์เพื่อให้มั่นใจว่าเป็นพืชชนิดนั้นจริง

การตรวจเอกลักษณ์ (identification) ของพืชและสมุนไพร เป็นการยืนยันความถูกต้องในการระบุชนิดของพืชและสมุนไพร ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่จำเป็นต้องคำนึงถึงในการผลิตยาสมุนไพร ทั้งยังช่วยลดความเสี่ยงจากการใช้ยาสมุนไพรผิดชนิด[1] เป็นการเพิ่มความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคได้อีกด้วย โดยการระบุชนิดพืชและสมุนไพรที่ถูกต้องนั้น มีประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม ในขั้นตอนการคัดเลือกเครื่องยาที่ถูกต้อง ก่อนจะนำสมุนไพรเข้าสู่กระบวนการผลิตต่อไป เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุขภาพจากพืชสมุนไพรที่ให้ผลการรักษาตามที่ต้องการ และนำไปสู่การผลิตยาที่มีคุณภาพ และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

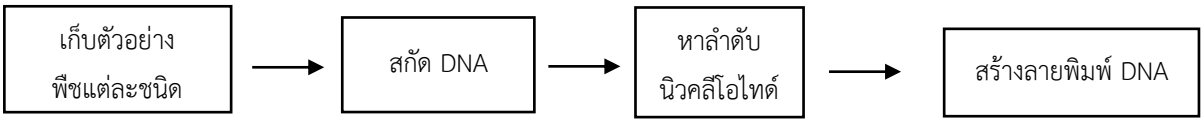
การตรวจเอกลักษณ์ของสมุนไพรทำได้หลายวิธี เช่น การจำแนกองค์ประกอบทางเคมี การจำแนกจากลักษณะทางมหทรรศน์ หรือการจำแนกจากลักษณะทางจุลทรรศน์ แต่การระบุพืชบางชนิดโดยการใช้วิธีดังกล่าวอาจไม่เพียงพอต่อการสรุป เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกันมาก และปริมาณสารสำคัญของพืช ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นอีกหลายประการ เช่น สภาพแวดล้อม ประเภทของดิน ปริมาณแสงแดด ปริมาณฝน และภูมิอากาศ จึงได้มีการนำเทคโนโลยีชีวโมเลกุลเข้ามาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยการใช้ลายพิมพ์ DNA ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแต่ละสิ่งมีชีวิต เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพร โดยโครงการนี้เลือกตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เล่ม 1 มาใช้ในการศึกษา เนื่องจากสมุนไพรในเล่มนี้เป็นสมุนไพรที่มีการใช้อย่างแพร่หลายที่สุด

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อสร้างลายพิมพ์ DNA ชนิดลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสมุนไพรในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย เล่ม 1

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

1.3 วิธีการดำเนินงานโดยย่อ



1. เก็บตัวอย่างพืชและตรวจสอบยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์
2. เตรียม Herbarium specimen เก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์สมุนไพร
3. สกัด DNA จากตัวอย่างพืชที่เก็บได้
4. ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการสกัด DNA โดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส
5. เพิ่มปริมาณ DNA ที่สนใจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)
6. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing)
7. ฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลนานาชาติ (Genbank)

ขั้นตอนการดำเนินการ	เดือน				
	มค 2559	มิ.ย.- ก.ค. 2559	ส.ค.-ก.ย. 2559	ต.ค.-ธ.ค. 2559	ม.ค.- มี.ค. 2560
เก็บตัวอย่างพืช ยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์	←	—	→		
สกัด DNA จากตัวอย่างพืช		←	—	→	
เพิ่มปริมาณ DNA ที่สนใจด้วย เทคนิค PCR		←	—	→	
หาลำดับนิวคลีโอไทด์			←	—	→
ฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล นานาชาติ			←	—	→
เขียนรูปเล่มปริญญานิพนธ์ จัดทำโปสเตอร์					← →

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยเล่ม 1 แต่ละชนิดได้

2. สามารถนำข้อมูลไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อควบคุมคุณภาพวัตถุดิบของสมุนไพรก่อนนำมาผลิตเป็นยา หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและตรวจสอบคุณภาพและการปลอมปนของพืชที่มีลักษณะคล้ายกัน

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia)

ตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (Thai Herbal Pharmacopoeia) เป็นตำรายาที่รวบรวมข้อกำหนดและข้อมูลอื่นๆ ในการควบคุมคุณภาพมาตรฐานยาสมุนไพรแต่ละชนิด และเป็นตำรายามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ที่กระทรวงสาธารณสุขประกาศรับรองในราชกิจจานุเบกษา โดยตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยมีทั้งหมด 4 เล่ม และมีฉบับเพิ่มเติม 2 เล่ม โดยมีภาพขาวดำและภาพสีประกอบแสดงลักษณะต้นไม้ เนื้อเยื่อและผงของยาสมุนไพร เนื้อหาจัดทำเป็นภาษาอังกฤษ โดยเนื้อหาแต่ละเล่มมีดังนี้

เล่มที่ 1 (volume I) ประกอบด้วยสมุนไพร 11 ชนิด ได้แก่ บอระเพ็ด ชุมเห็ดเทศ ฟ้าทะลาย กะเพราแดง ขมิ้นชัน มะแว้งเครือ ไพล พริกไทยดำ พริกไทยล่อน สวาด และ ตานหม่อน และวิธีทดสอบ 76 เรื่อง

เล่มที่ 2 (volume II) ประกอบด้วยสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ ใบมะกรูด ผิวมะกรูด กระเทียม ดีปลี สมอไทย สมอพิเภก ว่านน้ำ หมากสง มะขามป้อม และพลู และวิธีทดสอบ 72 เรื่อง

เล่มที่ 3 (volume III) ประกอบด้วยสมุนไพร 11 ชนิด ได้แก่ ชุมเห็ดไทย ขมิ้นเครือ กระชายดำ เทียนแดง เทียนดำ เทียนขาว เทียนข้าวเปลือก เทียนเกล็ดหอย เทียนตาตั๊กแตน เทียนเยาวพาณี และหญ้าหนวดแมว

เล่มที่ 4 (volume IV) ประกอบด้วยสมุนไพร 10 ชนิด ได้แก่ ใบรางจืด บุนนาค จันทน์แดง จันทน์ขาว เกสรบัวหลวง ลักจั่น เพชรสังฆาต พิกุล เทียนสัตตบุษย์ เทียนตากบ

ฉบับเพิ่มเติม ปี 2547 (Supplement to Thai Herbal Pharmacopoeia 2004) ประกอบด้วยสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ บัวบก ขมิ้นอ้อย และ ยาเตรียม 3 ตำรับ ยาชงชุมเห็ดเทศ ยาแคปซูลฟ้าทะลาย และยาแคปซูลขมิ้นชัน และวิธีทดสอบ 40 เรื่อง

ฉบับเพิ่มเติม ปี 2554 (Supplement to Thai Herbal Pharmacopoeia 2011)ประกอบด้วยสมุนไพร 2 ชนิด ได้แก่ ใบช้าพลูและพญายอ รวมทั้ง Dissolution ของยาแคปซูล ขมิ้นชันและเกณฑ์การยอมรับทางจุลชีววิทยาสำหรับยาเตรียมสมุนไพร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรไทย

ในยุคปัจจุบันที่ประชากรในประเทศไทยให้ความสำคัญกับการดูแลรักษาสุขภาพด้วยวิธีและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ทำให้พืชสมุนไพรได้รับความสนใจและเป็นที่นิยมใช้มากขึ้น ทั้งในแง่ของการใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เพื่อป้องกันโรคหรือดูแลรักษาสุขภาพ หรือในแง่ของการแพทย์ทางเลือก รวมถึงการใช้ในแง่ของวัตถุดิบตั้งต้นในการสกัดสารสำคัญเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมยา จึงเป็นเหตุให้ตลาดผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรมีการขยายตัวอย่างมาก เห็นได้จากจำนวนผลิตภัณฑ์ในตลาดที่มีเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว[1] การพิสูจน์เอกลักษณ์พืชสมุนไพรจึงเป็นสิ่งจำเป็นมากต่อทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค ทั้งนี้ไม่เฉพาะกับผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่มีการขึ้นทะเบียน แต่รวมถึงยาแผนโบราณที่จำหน่ายในร้านขายยาหรือยาที่ได้จากภูมิปัญญาชาวบ้าน ในการผลิตผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพรต่างๆเพื่อจำหน่ายจำเป็นต้องผ่านกระบวนการตรวจวิเคราะห์ก่อนการขึ้นทะเบียน แต่การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดนั้นยังมีการตรวจสอบได้ไม่ทั่วถึงและครอบคลุม การพิสูจน์เอกลักษณ์พืชสมุนไพรนั้นควรดำเนินการในทุกๆขั้นตอนตั้งแต่การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยวจนถึงการผลิตออกมาเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งต้องใช้วิธีการหลายๆวิธีร่วมกัน โดยวิธีการตรวจสอบที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ การตรวจสอบด้วยเทคนิคสัณฐานวิทยา การตรวจสอบลักษณะด้วยแว่นขยาย การส่องกล้องจุลทรรศน์และการทดสอบทางเคมี ซึ่งการทดสอบทางเคมีได้รับการยอมรับว่ามีความน่าเชื่อถือมาก โดยเฉพาะในกรณีการตรวจหาสารสำคัญ หรือสารปนเปื้อน อย่างไรก็ตามเทคนิคต่างๆล้วนมีข้อจำกัด ยกตัวอย่างเช่น ผลิตภัณฑ์พืชสมุนไพรต่างๆมักผ่านกระบวนการแปรรูป เช่นการทำแห้ง บดเป็นผง สกัดเป็นสารสกัดหยาบ ทำให้ลักษณะสัณฐานเดิมเสียไป จึงไม่สามารถตรวจสอบถึงที่มาของพืชได้โดยง่าย ในกรณีที่พืชสมุนไพรในวงศ์เดียวกันแต่ต่างสปีชีส์ที่ให้สารสำคัญที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกัน การใช้วิธีทางเคมีเพื่อพิสูจน์ทราบถึงสปีชีส์ของพืชสมุนไพร หรือแหล่งที่มาของสารสกัดหยาบก็ไม่สามารถทำได้โดยง่ายเช่นกัน[2]

จากการพัฒนาความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์ ทำให้เกิดเทคนิคใหม่ๆที่เป็นประโยชน์ต่อการพิสูจน์ทราบหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตขึ้นมากมาย ดังนั้นการจึงมีการนำเทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์มาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพร โดยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ อาทิเช่น Random Amplified Aolymorphic DNA (RAPD) analysis, Diagnostic Polymerase Chain Reaction (PCR), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) ซึ่งเทคนิคต่างๆเหล่านี้มีข้อดีและข้อจำกัดต่างๆกันไป นอกจากเทคนิคข้างต้นแล้ว เทคนิคการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) ก็เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพร และผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพร[3, 4]

การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด คือการใช้การจัดเรียงตัวของเบสในสายดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ ที่มีความผันแปรสูงมาจำแนกสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยช่วงดีเอ็นเอที่จะใช้ต้องเป็นช่วงดีเอ็นเอที่ผ่านการตกลงและยอมรับให้เป็น

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ หรือเรียกว่า standardized DNA กล่าวคือดีเอ็นเอช่วงนั้นต้องสามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆได้ ซึ่งในทางปฏิบัติอาจมีการกำหนดตำแหน่งดีเอ็นเอมาตรฐานมากกว่า 1 ช่วงสำหรับใช้เป็นบาร์โค้ดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกพืชแต่ละชนิด ในปัจจุบันมี ช่วงดีเอ็นเอที่ผ่านการศึกษาการใช้เป็นบาร์โค้ดสำหรับพืชหลายช่วงด้วยกัน ตัวอย่างเช่น matK, rbcL, internal transcribed spacers (ITS), psbA-trnH intergenic spacer[5] ซึ่งต้องมีความผันแปรระหว่างสปีชีส์สูงเพียงพอ มีความยาวเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับเบสและมี conserved sequence อยู่ที่ปลายทั้งสองด้านที่เหมาะแก่การออกแบบ PCR primer ที่สามารถใช้ได้กับพืชหลายสปีชีส์ (universal primer)

การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสมุนไพรและการจัดเก็บข้อมูลนั้นไว้ในฐานข้อมูลเพื่อการอ้างอิง และสืบค้นจะช่วยให้เราสามารถพิสูจน์ทราบได้ว่าตัวอย่างที่สนใจศึกษาหรือทดสอบ เป็นพืชสมุนไพรชนิดใดหรือเป็นสิ่งที่แปรรูปมาจากพืชสมุนไพรใด ซึ่งมีคุณค่ามากต่อผู้ผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพรในกรณีที่ต้องการตรวจสอบวัตถุดิบ และต่อหน่วยงานรัฐที่มีหน้าที่ในการคุ้มครองผู้บริโภค ในแง่การควบคุมการผลิตและคุ้มครองผู้บริโภคแล้ว การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดยังมีประโยชน์อื่นๆ อาทิเช่น สามารถใช้ในการอ้างอิงเพื่อคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญาด้านพืชสมุนไพร ใช้อ้างอิงเพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ หรือการอนุรักษ์พันธุ์พืชสมุนไพรหายากหรือใกล้จะสูญพันธุ์ ใช้ตรวจสอบการซื้อขายหรือลักลอบเคลื่อนย้ายพืชสมุนไพรควบคุมเป็นต้น แม้ว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะไม่ใช่เทคนิคเพื่อทดแทนเทคนิคทาง taxonomy แต่การใช้ทั้งสองเทคนิคร่วมกันจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยเฉพาะกรณีที่เทคนิคทาง taxonomy นั้นไม่สามารถใช้กับพืชสมุนไพรที่ผ่านการแปรรูปแล้ว

โครงสร้างทุติยภูมิของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS2

ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน Internal transcribed spacer (ITS) เป็นบริเวณหนึ่งที่ใช้ในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดอย่างแพร่หลาย ประกอบไปด้วยบริเวณ ITS1 และ ITS2 โดยมีอาร์เอ็นเอ 5.8s ขั้นกลาง ส่วน ITS2 นั้นเป็นส่วนที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงสุดในส่วนของ ITS นอกจากนี้ยังสั้นกว่าและง่ายต่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าบริเวณ ITS ทั้งบริเวณอีกด้วย จึงทำให้ส่วนของ ITS2 เป็นส่วนที่ได้รับการยอมรับในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด แต่อย่างไรก็ตาม บริเวณ ITS2 ยังมีข้อมูลไม่เพียงพอในการแยกสปีชีย์ในช่วงกว้าง โดยมีการประมาณว่าบริเวณนี้สามารถจำแนกไม่เกิน 70% ของสปีชีย์ได้อย่างสมบูรณ์[6] จึงมีการใช้ข้อมูลการวิวัฒนาการของ ITS2 มาพัฒนาเพื่อแก้ปัญหานี้ และพบว่าโครงสร้างทุติยภูมิของบริเวณ ITS แสดงให้เห็นว่ามีบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ บริเวณที่ขดเกลียวและบริเวณทั่วไปอยู่ ซึ่งนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้นั้นช่วยในการระบุตำแหน่งของดีเอ็นเอเมื่อมีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์หลายเส้นได้ และยังทำให้เห็นภาพความสัมพันธ์ของสัญฐานวิทยาในระดับที่สูงขึ้นด้วย[7, 8] นอกจากนี้โครงสร้างทุติยภูมิคงโครงสร้างอยู่ได้ด้วยพันธะระหว่างคู่เบส แบ่งเป็นคู่เบสมาตรฐาน (canonical base-pairs เช่น AU, GC) คู่เบสที่เสถียรแต่ไม่มาตรฐาน (non-canonical stable base-pair เช่น GU) คู่เบสที่ไม่เสถียร (unstable base-pair เช่น AC)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

และคู่เบสหายาก (uncommon pairs เช่น GA,AA) ซึ่งเบสที่มีคู่และเบสเดี่ยวที่ไม่จับกับเบสอื่นนี้ช่วยให้ข้อมูลของวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถหาได้ในโครงสร้างแบบปฐมภูมิ ดังนั้นเมื่อรวมข้อมูลเหล่านี้ ทำให้สามารถเพิ่มความสามารถในการจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างๆได้มากขึ้น[9]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 พืชสมุนไพร สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.1.1 พืชสมุนไพรที่ใช้ในการวิจัย

พืชสมุนไพรในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทยเล่ม 1 จำนวน 10 ชนิด ที่มีรายชื่อดังนี้

- บอระเพ็ด (*Tinospora crispa* (L.) Mier ex Hook.f. & Thomson)
- ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* Linn.)
- ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Wall. Ex Nees)
- กะเพราแดง (*Ocimum tenuiflorum* Linn.)
- ขมิ้นชัน (*Curcuma Longa* L.)
- มะแว้งเครือ (*Solanum trilobatum* Linn.)
- ไพล (*Zingiber cassumunar* Roxburgh)
- พริกไทย (*Piper nigrum* L.)
- สวาด (*Caesalpinia bonduc* Linn. Roxburgh)
- ตานหม่อน (*Vernonia elliptica* De Candolle)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการสกัด DNA

- Liquid nitrogen
- CTAB extraction buffer
- RNase solution A
- Chloroform/isoamyl alcohol (24:1)
- isopropanol
- Ethanol
- TE buffer
- Buffer ต่างๆจาก DNeasy® Plant Mini Kit

3.1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการทำ PCR

- 10X PCR buffer solution

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

- $MgCl_2$
- Taq polymerase
- dNTPs
- Primer

3.1.2.3 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการทำ Gel Electrophoresis

- Agarose (Molecular biology grade)
- TAE buffer
- Ethidium bromide
- 6X Gel loading dye

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- Mortar & pestle
- Automatic pipette & tips
- Examination glove
- Eppendorf tube (microcentrifuge tube)
- PCR tube
- Comb & tray
- Electrophoresis system
- PCR machine (DNA thermal cycler)
- Gel Doc XR
- Microwave
- weighing machine
- Dry bath incubator
- Centrifuge machine
- Vortex machine
- Refrigerator

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.2 การเก็บตัวอย่างพืช และการทำ Herbarium Specimen

3.2.1 การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างพืชที่ต้องการนำมาทำการวิจัย จากสถานที่ต่างๆ เช่น สวนสมุนไพรคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลาดนัดสวนจตุจักร และงานเกษตรแฟร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยส่วนของพืชที่เก็บ ควรประกอบด้วยส่วนของกิ่งที่มีใบ ดอกและผลติดอยู่อย่างสมบูรณ์ที่สุด และนำมายืนยันชนิดของต้นไม้และชื่อวิทยาศาสตร์โดยผู้เชี่ยวชาญ จากนั้นนำพืชที่เก็บได้ มาเก็บรักษาในรูป Herbarium specimen เพื่อใช้อ้างอิงในอนาคต

3.2.2 การทำ Herbarium specimen

นำตัวอย่างพืชที่เก็บได้ มาวางสอดในหน้ากระดาษหนังสือพิมพ์ โดยจัดเรียงใบให้เห็นทั้งด้านหน้าใบและหลังใบชัดเจน และนำกระดาษรองอัดพรรณไม้ (โดยมากใช้กระดาษลูกฟูกหรือกระดาษลัง) มาวางประกบทั้งด้านหน้าและด้านหลัง เพื่อช่วยให้ตัวอย่างพืชเรียบ จากนั้นนำไปใส่ในแผงอัดพรรณไม้ และมัดด้วยเชือกให้แน่น จากนั้นนำไปอบแห้ง โดยใช้เตาอบความร้อน หลังจากที่ตัวอย่างพืชแห้งแล้ว นำตัวอย่างพืชมาเย็บติดบนกระดาษสีขาว ขนาดกว้างยาวประมาณ 30 ซม. x 42 ซม. ชนิด 300 กรัม เพื่อช่วยให้กิ่งพันธุ์ไม้ตัวอย่างไม่เปราะหักง่ายเวลานำตัวอย่างพันธุ์ไม้ออกจากตู้มาศึกษา และปิดป้ายบันทึกข้อมูลซึ่งจะต้องเขียนรายละเอียดต่างๆ ที่ลอกมาจากสมุดบันทึกข้อมูล ที่จะต้องเขียนเพิ่มเติมคือ ชื่อผู้เก็บ (collector) หมายเลขลำดับที่เก็บ (collecting number) ชื่อวิทยาศาสตร์ และชื่อผู้ตรวจสอบหาชื่อของพันธุ์ไม้

3.3 การสกัด DNA จากตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชที่ต้องการสกัด DNA ส่วนมากนิยมใช้เนื้อเยื่อเจริญที่อยู่ตามปลายยอด ใบยอดอ่อน ปลายราก หน่อ หรือตาของพืช เพราะส่วนดังกล่าวมีกิจกรรมหลักคือการเจริญเติบโตสร้างเนื้อเยื่อ ทำให้มี DNA อยู่มาก ในขณะที่สารชนิดต่างๆที่พืชสร้างขึ้น (ที่เราต้องการแยกออกจาก DNA) มีปริมาณน้อยกว่าชิ้นส่วนบริเวณอื่น โดยในการวิจัยนี้ จะใช้ DNeasy® Plant Mini Kit จากบริษัท Qiagen เป็นชุดอุปกรณ์สำหรับสกัด DNA เป็นหลัก แต่เนื่องจากมีพืชบางชนิด ที่ไม่สามารถสกัด DNA ออกมาด้วย DNeasy® Plant Mini Kit นี้ได้ จึงต้องมีการใช้วิธีการสกัด DNA ด้วย CTAB extraction buffer ซึ่งเป็นวิธีการดั้งเดิมในการสกัด DNA ร่วมด้วย

3.3.1 วิธีการสกัด DNA จากตัวอย่างพืชโดยการใช้ DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)

1. นำตัวอย่างพืชที่ต้องการสกัด DNA มาบดให้เป็นผงละเอียดในโกร่งกระเบื้อง โดยใช้ liquid nitrogen ช่วยในการบด และชั่งผงตัวอย่างพืชที่ผ่านการบดละเอียด จำนวน 100 mg ใส่ในหลอด eppendorf tube พร้อมทั้งเขียน label ระบุบนฝาหลอดว่าเป็นตัวอย่างพืชชนิดใด

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2. เติม buffer AP1 จำนวน 400 µlและเติม RNase A จำนวน 4 µlและนำไป vortex เพื่อให้เข้ากัน และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นระยะเวลา 10 นาที คอยพลิกหลอดทุกๆ 2-3 นาที
3. เติม Buffer P3 จำนวน 130 µlและนำไป incubate บนน้ำแข็ง เป็นระยะเวลา 5 นาที
4. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นระยะเวลา 5 นาที
5. ถ่ายส่วนใสของตัวอย่างที่เกิดจากการ centrifuge ลงไปใส่ใน QIA shredder spin column ที่ต่อกับ collection tube ขนาด 2 ml พร้อมทั้งเขียน label และนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นระยะเวลา 2 นาที
6. ถ่ายสารละลายตัวอย่างที่ได้ ลงใน eppendorf tube อันใหม่ พร้อมทั้งเขียน label ระบุว่าเป็นตัวอย่างพืชชนิดใด และเติม buffer AW1 ลงไป 1.5 เท่าของปริมาตรของเหลวที่ถ่ายลงมา และผสมให้เข้ากันด้วยวิธี pipetting
7. ถ่ายสารละลายตัวอย่างที่ได้ จำนวน 650 µlลงไปใส่ใน DNeasy mini spin column ที่ต่อกับ collection tube ขนาด 2 ml พร้อมทั้งเขียน label และนำไป centrifuge ที่ความเร็วมากกว่า 8,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที และเทส่วนใสทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ หากมีสารละลายตัวอย่างเหลือ
8. นำ column ในข้อ 7. มาใส่บน collection tube ขนาด 2 ml อันใหม่ แล้วเติม buffer AW2 จำนวน 500 µlและนำไป centrifuge ที่ความเร็วมากกว่า 8,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที และเทส่วนใสทิ้ง
9. เติม buffer AW2 จำนวน 500 µlและนำไป centrifuge ที่ความเร็ว14,000 rpm เป็นระยะเวลา 2 นาที และเทส่วนใสทิ้ง
10. นำ column ในข้อ 9. มาใส่ใน eppendorf tube อันใหม่พร้อมทั้งเขียน label ฝาหลอด
11. เติม buffer AE 100 µlและ incubate ที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 5 นาที และนำไป centrifuge เป็นระยะเวลา 1 นาที ที่ความเร็วมากกว่า 8,000 rpm ทำขั้นตอนนี้ซ้ำ จะได้สารละลาย Genomic DNA ของตัวอย่างพืชที่ต้องการ จำนวน 200 µL

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

3.3.2 วิธีการสกัด DNA จากตัวอย่างพืชโดยการใช้ CTAB extraction buffer

1. นำตัวอย่างพืชที่ต้องการสกัด DNA มาบดให้เป็นผงละเอียดในโกร่งกระเบื้อง โดยใช้ liquid nitrogen ช่วยในการบด และชั่งผงตัวอย่างพืชที่ผ่านการบดละเอียด จำนวน 100 mg ใส่ในหลอด eppendorf tube พร้อมทั้งเขียน label ระบุบนฝาหลอดว่าเป็นตัวอย่างพืชชนิดใด
2. เติม CTAB extraction buffer 500 µlและนำไป vortex เพื่อให้เข้ากัน และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นระยะเวลา 30 นาที
3. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 g เป็นระยะเวลา 5 นาที
4. ถ่ายส่วนใสของตัวอย่างที่เกิดจากการ centrifuge ลงใน eppendorf tube อันใหม่ พร้อม label ฝาหลอด เติม RNase A 5 µlและ incubate ที่ 32°C เป็นเวลา 20 นาที
5. เติม Chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาตรที่เท่ากับสารละลายตัวอย่าง และนำไป vortex เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 g เป็นระยะเวลา 1 นาที เพื่อให้แยกชั้น และย้ายชั้นน้ำด้านบนไปใส่ใน eppendorf tube อันใหม่ พร้อม label ฝาหลอด ทำขั้นตอนนี้ซ้ำจนกว่าชั้นน้ำด้านบนจะใส
6. ย้ายชั้นน้ำด้านบนไปใส่ใน eppendorf tube อันใหม่พร้อม label ฝาหลอด และเติม isopropanol (เย็น) ปริมาตร 0.7 เท่าของสารละลายตัวอย่าง และ incubate ที่ -20°C เป็นระยะเวลา 15 นาที
7. นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 14,000 g เป็นระยะเวลา 10 นาที เทส่วนใสออกโดยไม่ให้รบกวน pellet ของ DNA ที่อยู่ด้านล่าง และล้างด้วย 70% ethanol (เย็น) จำนวน 500 µl เท ethanol ทิ้ง และตั้งทิ้งไว้ให้ ethanol ระเหยจนหมด
8. ละลาย pellet ของ DNA ด้วย TE buffer ปริมาตร 50 µlจะได้ สารละลาย Genomic DNA ของตัวอย่างพืชที่ต้องการ จำนวน 50 µl

3.4 การทำ Agarose gel electrophoresis

นำสารละลาย Genomic DNA ของพืชตัวอย่าง หรือ DNA ที่ผ่านการทำ PCR มาทำ gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ DNA ว่าสารละลาย Genomic DNA หรือ PCR productนั้นมี Band ของ DNA ในบริเวณที่ต้องการหรือไม่ โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้

1. ชั่ง agarose 0.8 g และตวง TAE Buffer ปริมาตร 100 ml นำมาผสมกันในขวดแก้ว และนำไปอุ่นใน microwave เพื่อให้ agarose ละลาย และเติม ehtidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg/ml จำนวน 3 µl ขณะยังร้อน และเขย่าให้เข้ากัน

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2. เทลงแม่พิมพ์ (Tray) โดยใช้ หวี (comb) สร้างร่องของเจล (well) เพื่อให้เติม สารละลาย DNA ได้ และทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
3. นำเจลที่แข็งตัวแล้วใส่ลงใน electrophoresis system โดยให้ well อยู่ฝั่งขั้วลบ เติมสารละลาย TAE buffer ลงในelectrophoresis system จนท่วมเจล
4. นำสารละลาย DNA ที่ต้องการตรวจสอบ ตัวอย่างละ 5 µl ผสมกับ 6x gel loading dye จำนวน 1 µl ด้วยวิธี pipetting จากนั้น นำไปใส่ลงใน well ของ agarose gel
5. ทำการตั้งค่า electrophoresis system โดยตั้งค่าความต่างศักย์ที่ 100V เป็นเวลา 15 นาที และกดปุ่ม run
6. นำ gel ที่ผ่านการทำ electrophoresis แล้ว ไปเข้าเครื่อง Gel Doc™ XR เพื่อถ่ายภาพ Band ที่เกิดขึ้น

3.5 การเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณที่สนใจด้วยเทคนิค PCR

เนื่องจาก Genomic DNA ของพืชมีความยาวมาก และมีปริมาณในสารละลาย DNA ค่อนข้างน้อย จำต้องทำการเพิ่มปริมาณ DNA เฉพาะในบริเวณที่สนใจ ด้วยเทคนิค PCR โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมหลอด PCR tube โดยใส่สารต่างๆเข้าไปในหลอดดังนี้ ผสมให้เข้ากันด้วยวิธี pipetting

PCR Buffer solution	10 µl
$MgCl_2$	4 µl
dNTPs	5 µl
Forward primer	2 µl
Reverse primer	2 µl
Taq polymerase	0.6 µl
Template DNA	5 µl
Ultra purified water	21.4 µl
Total	50 µl

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

2. ตั้งค่าเครื่อง PCR โดยตั้ง parameter ต่างๆดังนี้

Process	Temperature (°C)	Time (sec)
Pre-denature	95	120
Denature	95	60
Annealing	52	30
Extension	72	60
Final Extension	72	300
Keep	12	Forever

โดยตั้งค่าให้ ทำขั้นตอน Denature จนถึง Extension ทั้งหมด 30 รอบก่อนจะเริ่ม Final Extension และเมื่อปฏิกิริยาเสร็จแล้ว สามารถนำไปทำ agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบ band ของ DNA ที่เกิดขึ้นได้

3.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เนื่องจากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ต้องมีเครื่องมือเฉพาะในการวิเคราะห์ ซึ่งในคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไม่มีเครื่องมือนี้ จึงจำเป็นต้องใช้บริการ หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริษัท Bioneer ประเทศเกาหลี เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของผลผลิต PCR ที่ได้

3.7 การทำนายโครงสร้างทุติยภูมิของ ITS2 และการทำ sequence alignment

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบริษัท Bioneerมาทำการระบุตำแหน่งของ ITS2 ผ่านการ annotation กับฐานข้อมูลของ Genbankผ่านเว็บไซต์ (http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/) และนำข้อมูลลำดับเบสของ DNA บริเวณ ITS2, 5.8S และ 28S ที่ได้มาทำsequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega และทำการปรับแก้ให้มีความถูกต้องมากขึ้นโดยใช้โปรแกรม Bio Edit หลังจากนั้นจึงนำลำดับเบสที่แก้ไขจนถูกต้องแล้ว มาทำการทำนายโครงสร้างทุติยภูมิด้วยโปรแกรม MFOLD โดยตั้งค่าเป็น default condition จะได้รูปภาพของโครงสร้างทุติยภูมิของ ITS2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the Senior Project authors' files submitted through the faculty.

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

1 บอระเพ็ด
BORAPHET

Tinospora crispa (Linn.)

Fig 1a. Tinospora Stem (Tinospora caulis)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Fig 1b. *Tinospora crispa* (Linn.)

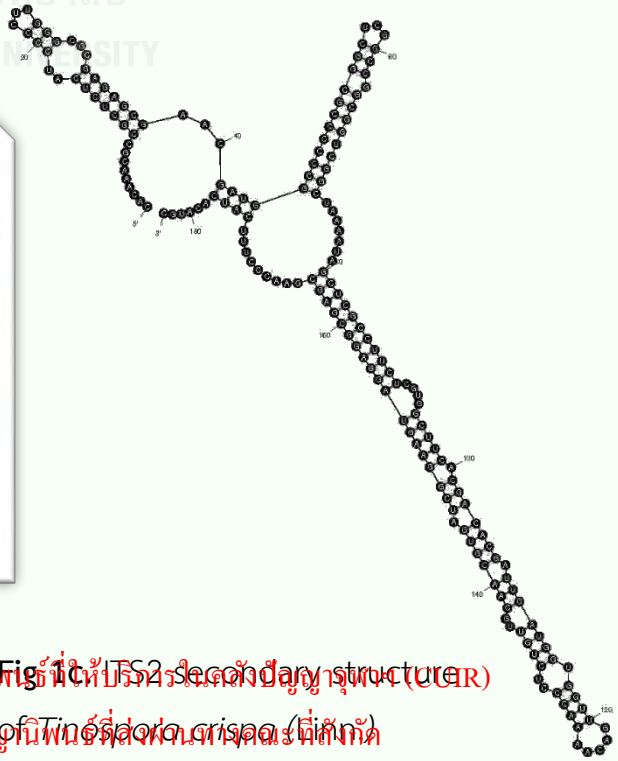


Fig 1c. ITS2 secondary structure of *Tinospora crispa* (Linn.)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์นี้ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

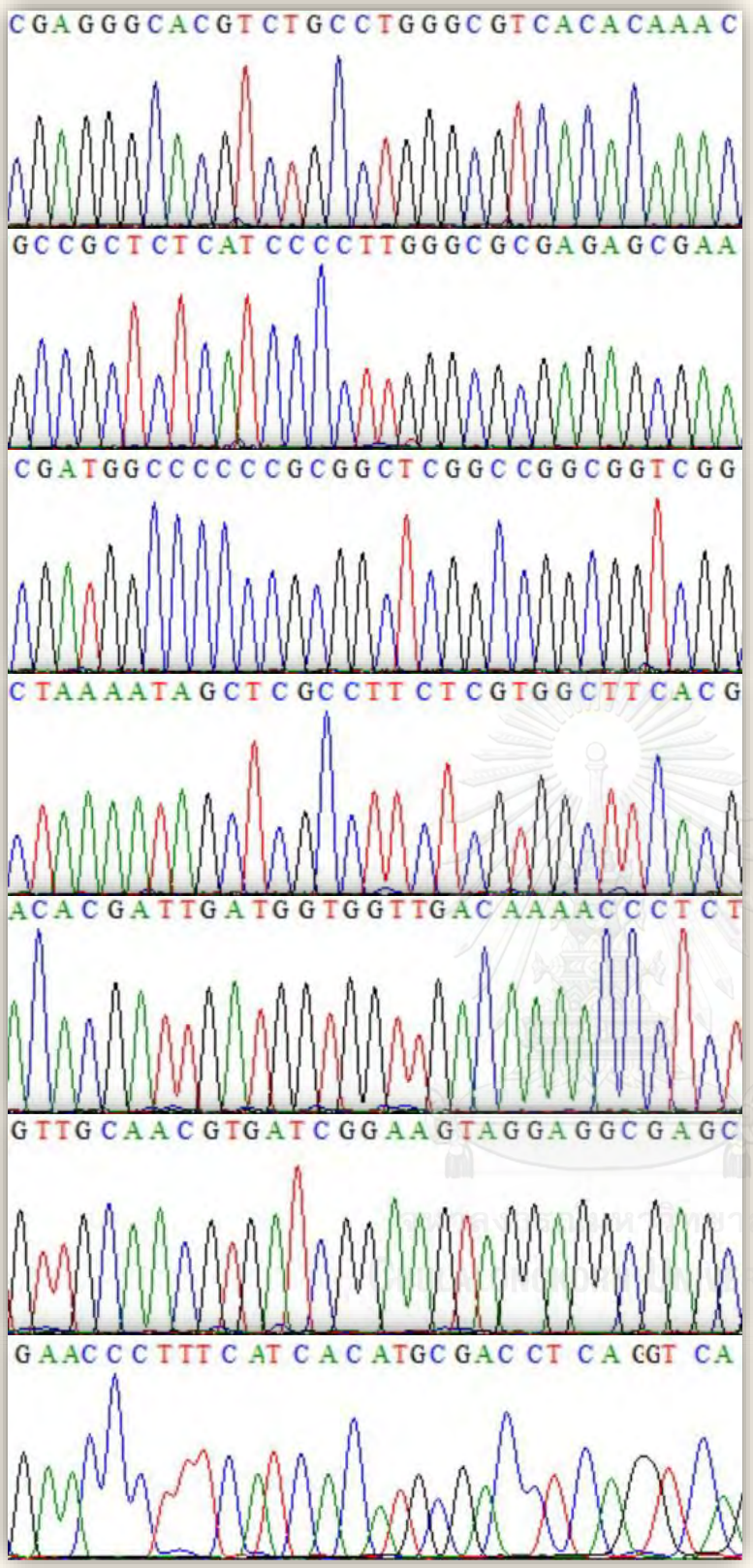


Fig 1d. Sequencing electropherogram of *Tinospora crispa* (Linn.)

```
1   CGAGGGCACG TCTGCCTGGG CGTCACACAA ACGCCGCTCT CATCCCCTTG GGCGCGAGAG
61  CGAACGATGG CCCCCCGCGG CTCGGCCGGC GGTCGGCTAA AATAGCTCGC CTTCTCGTGG
121 CTTCACGACA CGATTGATGG TGGTTGACAA AACCCTCTGT TGCAACGTGA TCGGAAGTAG
181 GAGGCGAGCG AACCCTTTCA TCACATGCGA CCTCAGGTCA

<1 - 25    5.8S ribosomal RNA
26 - 207   internal transcribed spacer 2
208 - >232 28S ribosomal RNA
```

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

Fig 1e. ITS2 region sequence of *Tinospora crispa* (Linn.)

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

2 ชุมเห็ดเทศ
CHUMHETTHET

Cassia alata Linn. (Senna alata Linn.)

Fig 2a. Cassia alata leaf (Cassia alata folium)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Fig 2b. *Cassia alata* Linn.

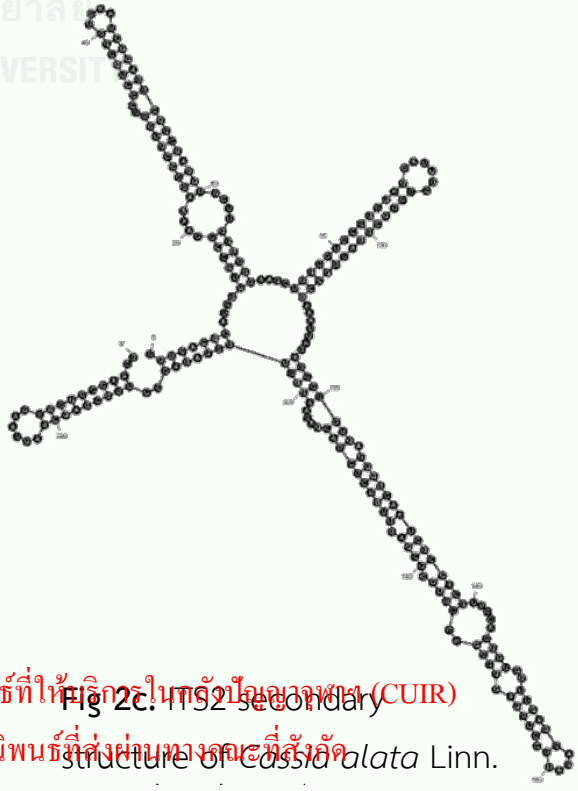


Fig 2c. 1152 secondary structure of *Cassia alata* Linn.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

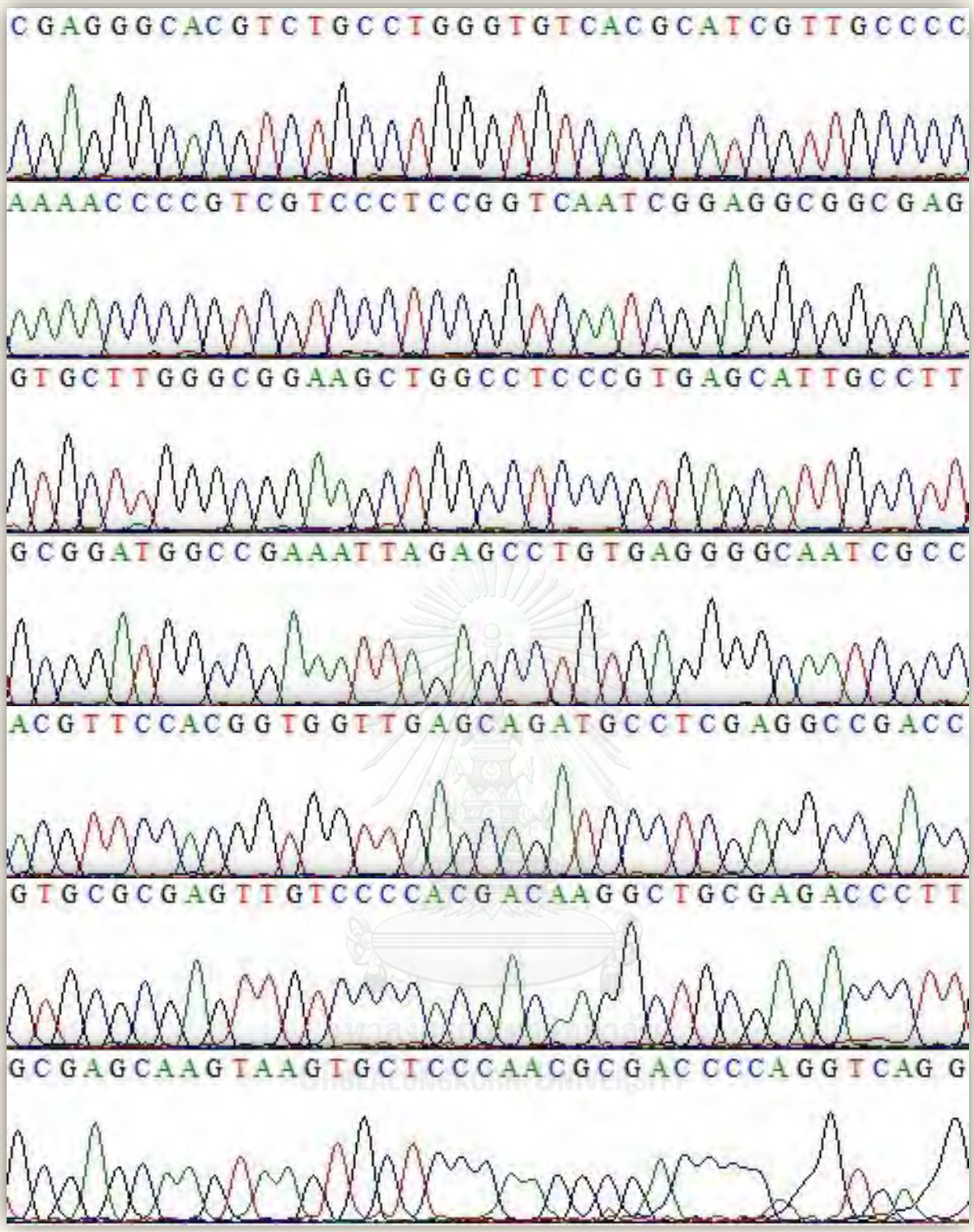


Fig 2d. Sequencing electropherogram of *Cassia alata* Linn.

```
1   CGAGGGCACG TCTGCCTGGG TGTCACGCAT CGTTGCCCCA AAACCCCGTC GTCCCTCCGG
61  TCAATCGGAG GCGGCGAGGT GCTTGGGCGG AAGCTGGCCT CCCGTGAGCA TTGCCTTGCG
121 GATGGCCGAA ATTAGAGCCT GTGAGGGGCA ATCGCCACGT TCCACGGTGG TTGAGCAGAT
181 GCCTCGAGGC CGACCGTGCG CGAGTTGTCC CCACGACAAG GCTGCGAGAC CCTTGCGAGC
241 AAGTAAGTGC TCCCAACGCG ACCCCAGGTC AGG

<1 - 25    5.8S ribosomal RNA
26 - 258   internal transcribed spacer 2
259 - >273 28S ribosomal RNA
```

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

Fig 2e. ITS2 region sequence of *Cassia alata* Linn.

3 ฟ้าทะลาย
FA-THA-LAI

Andrographis paniculate (Burmann filius)

Fig 3a. Andrographis herb (Andrographitis herba)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Fig 3b. *Andrographis paniculate* (Burmann filius)

Pending...

Fig 3c. ITS2 secondary structure of *Andrographis paniculate* (Burmann filius)

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์นี้ที่ใช้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

Pending...

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Fig 3d. Sequencing electropherogram of *Andrographis paniculate* (Burmann filius)

Pending...

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

Fig 3e. ITS2 region sequence of *Andrographis paniculate* (Burmann filius)

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

4 กะเพราแดง
KA-PHRAO-DAENG

Ocimum tenuiflorum Linn.

Fig 4a. Holy basil Leaf (Ocimi tenuiflori folium)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Fig 4b. *Ocimum tenuiflorum* Linn.

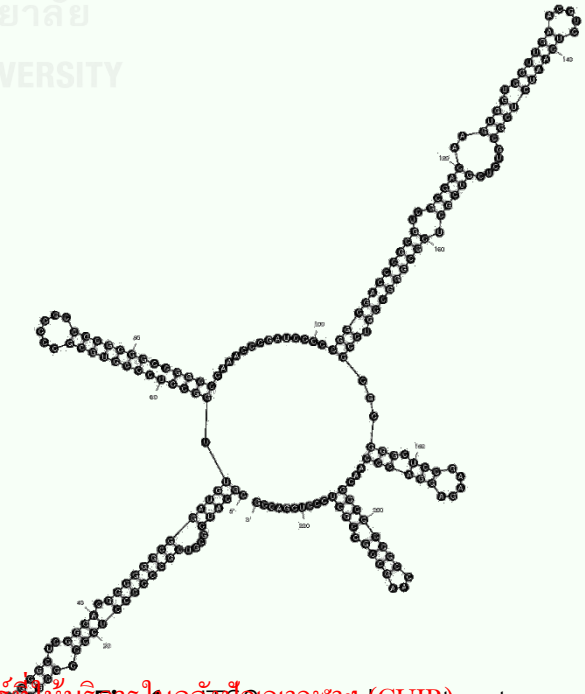


Fig 4c. 1S2 secondary structure of *Ocimum tenuiflorum* Linn.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์นี้ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

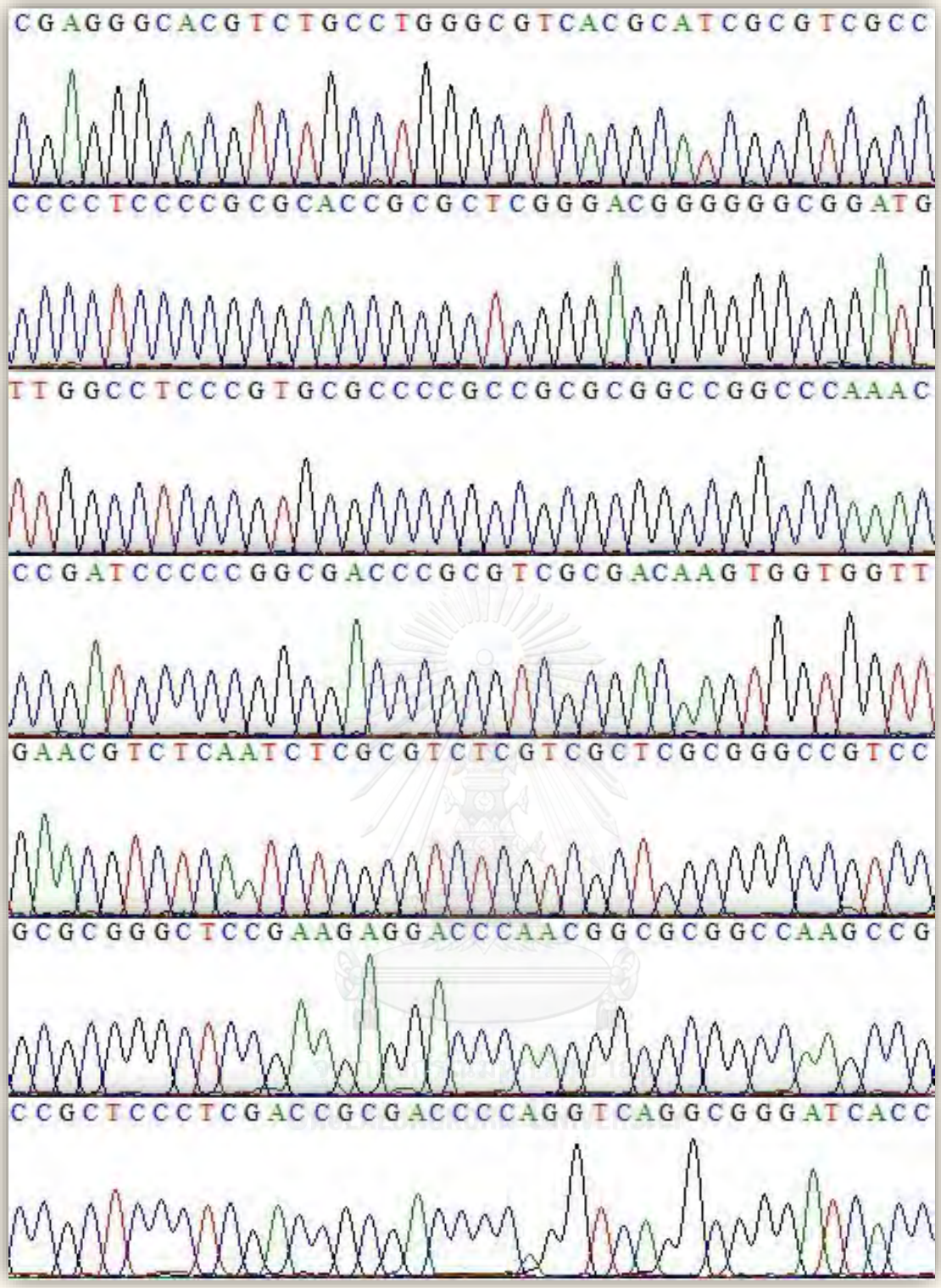


Fig 4d. Sequencing electropherogram of *Ocimum tenuiflorum* Linn.

```
1   CGAGGGCACG TCTGCCTGGG CGTCACGCAT CGCGTCGCCC CCCTCCCCGC GCACCGCGCT
61  CGGGACGGGG GGCGGATGTT GGCCTCCCGT GCGCCCCGCC GCGCGGCCGG CCCAAACCCG
121 ATCCCCCGGC GACCCGCGTC GCGACAAGTG GTGGTTGAAC GTCTCAATCT CGCGTCTCGT
181 CGCTCGCGGG CCGTCCGCGC GGGCTCCGAA GAGGACCCAA CGGCGCGGCC AAGCCGCCGC
241 TCCCTCGACC GCGACCCCAG GTCAGGCGGG ATCACC

<1 - 25    5.8S ribosomal RNA
26 - 251   internal transcribed spacer 2
252 - >276 28S ribosomal RNA
```

Fig 4e. ITS2 region sequence of *Ocimum tenuiflorum* Linn.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

5 ขมิ้นชัน
KHAMIN CHAN

Curcuma longa Linn.

Fig 5a. Tumeric (Curcumae longae rhizoma)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Fig 5b. *Curcuma longa* Linn.

Pending...

Fig 5c. ITS2 secondary structure of *Curcuma longa* Linn.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

Pending...

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Fig 5d. Sequencing electropherogram of *Curcuma longa* Linn.

Pending...

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

Fig 5e. ITS2 region sequence of *Curcuma longa* Linn.

The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

6 มะแว้งเครือ
MAWAENG KRUEO

Solanum trilobatum Linn.

Fig 6a. Solanum trilobatum friut (Solani trilobati fructus)

Fig 6b. *Solanum trilobatum* Linn.

Fig 6c. 1152 secondary structure of *Solanum trilobatum* Linn.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

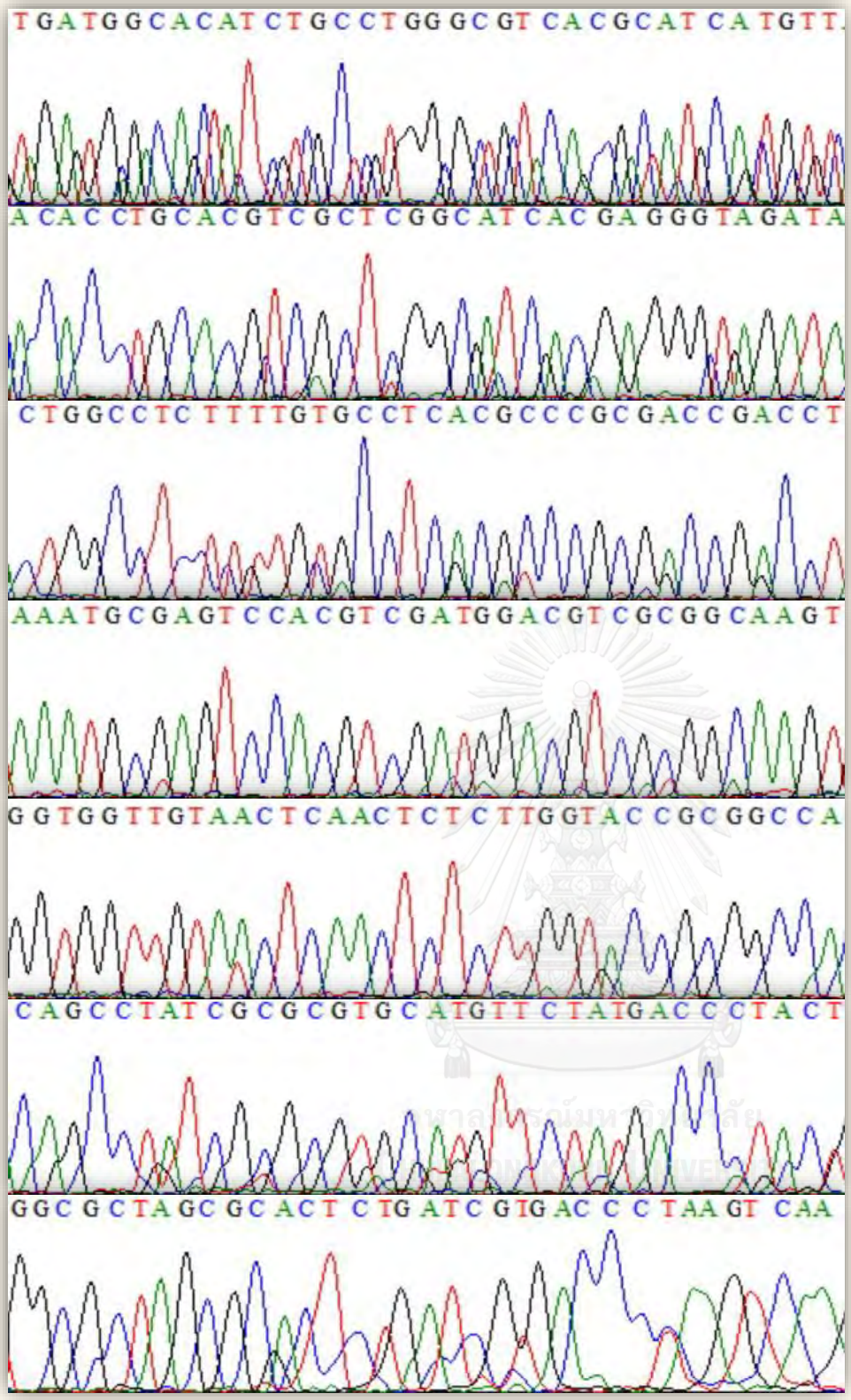


Fig 6d. Sequencing electropherogram of *Solanum trilobatum* Linn.

```
1   TGATGGCACA TCTGCCTGGG CGTCACGCAT CATGTTACAC CTGCACGTCG CTCGGCATCA
61  CGAGGGTAGA TACTGGCCTC TTTTGTGCCT CACGCCCGCG ACCGACCTAA ATGCGAGTCC
121 ACGTCGATGG ACGTCGCGGC AAGTGGTGGT TGTAACTCAA CTCTCTTGGT ACCGCGGCCA
181 CAGCCTATCG CGCGTGCATG TTCTATGACC CTACTGGCGC TAGCGCACTC TGATCGTGAC
241 CCTAAGTCAA

<1 - 25    5.8S ribosomal RNA
26 - 236   internal transcribed spacer 2
252 - >250 28S ribosomal RNA
```

Fig 6e. ITS2 region sequence of *Solanum trilobatum* Linn.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

7 ไพล
PHLAI

Zingiber cassumunar Roxburgh

Fig 7a. Zingiber cassumunar rhizome (Zingiberis cassumunaris rhizoma)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Fig 7b. *Zingiber cassumunar* Roxburgh

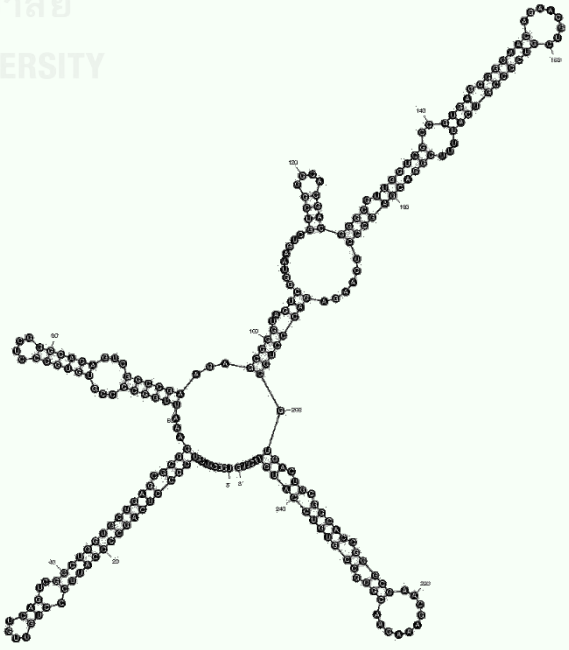


Fig 7c. ITS2 secondary structure of *Zingiber cassumunar* Roxburgh

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

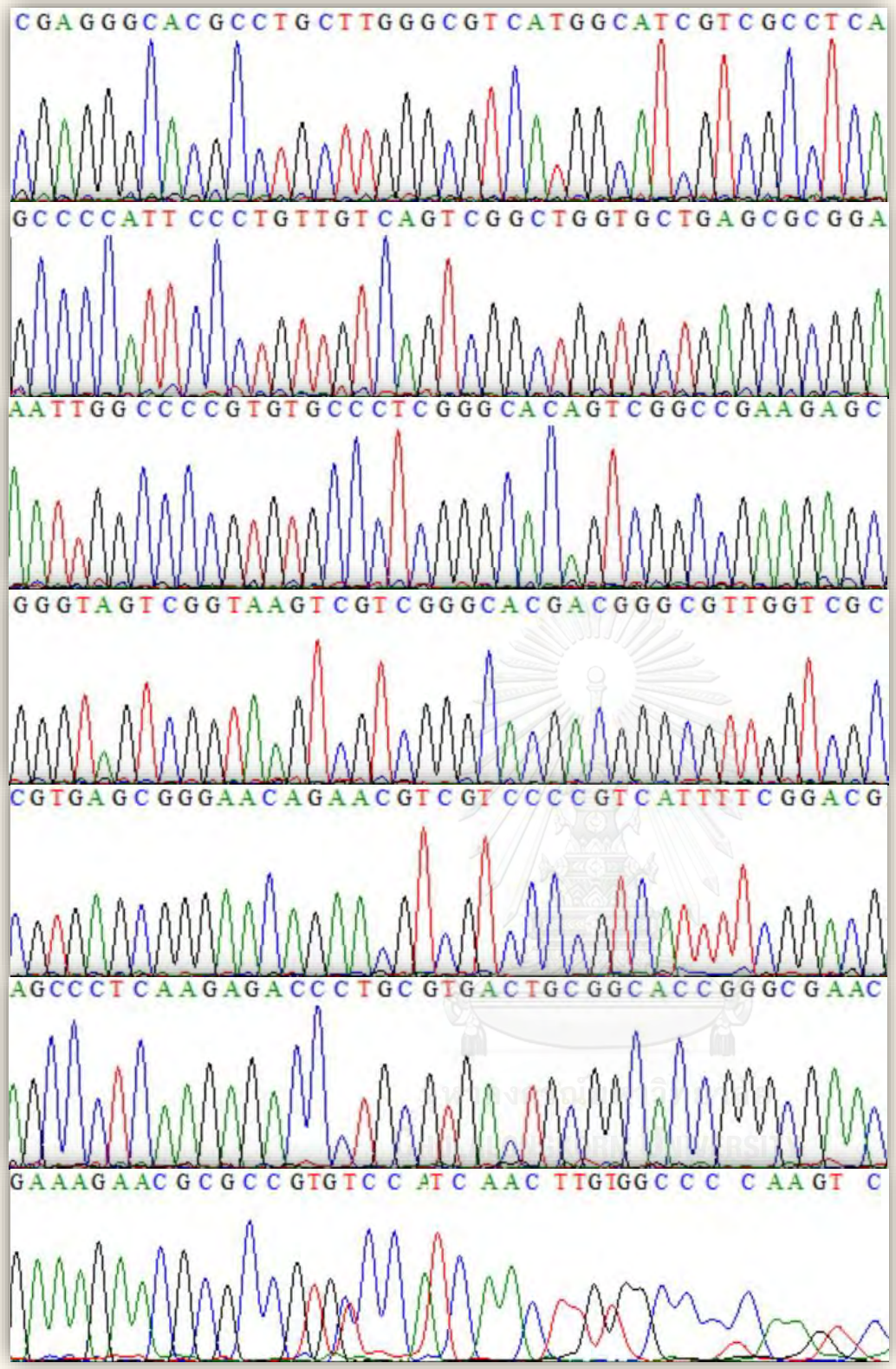


Fig 7d. Sequencing electropherogram of *Zingiber cassumunar* Roxburgh

```
1   CGAGGGCACG CCTGCTTGGG CGTCATGGCA TCGTCGCCTC AGCCCCATTC CCTGTTGTCA
61  GTCGGCTGGT GCTGAGCGCG GAAATTGGCC CCGTGTGCCC TCGGGCACAG TCGGCCGAAG
121 AGCGGGTAGT CGGTAAGTCG TCGGGCACGA CGGGCGTTGG TCGCCGTGAG CGGGAACAGA
181 ACGTCGTCCC CGTCATTTTC GGACGAGCCC TCAAGAGACC CTGCGTGACT GCGGCACCGG
241 GCGAACGAAA GAACGCGCCG TGTCCATCAA CTTGTGGCCC CAAGTC

<1 - 25    5.8S ribosomal RNA
26 - 274   internal transcribed spacer 2
275 - >286 28S ribosomal RNA
```

Fig 7e. ITS2 region sequence of *Zingiber cassumunar* Roxburgh

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

8 พริกไทยดำ
PHRIK THAI DAM

Piper nigrum Linn.

Fig 8a. Black pepper (Piperis nigri fructus)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Fig 8b. *Piper nigrum* Linn.

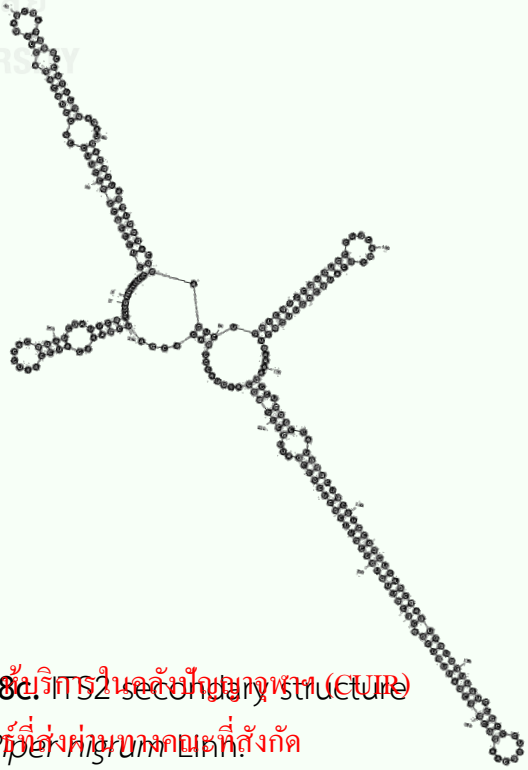


Fig 8c. ITS2 secondary structure of *Piper nigrum* Linn.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์นี้ที่ใช้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

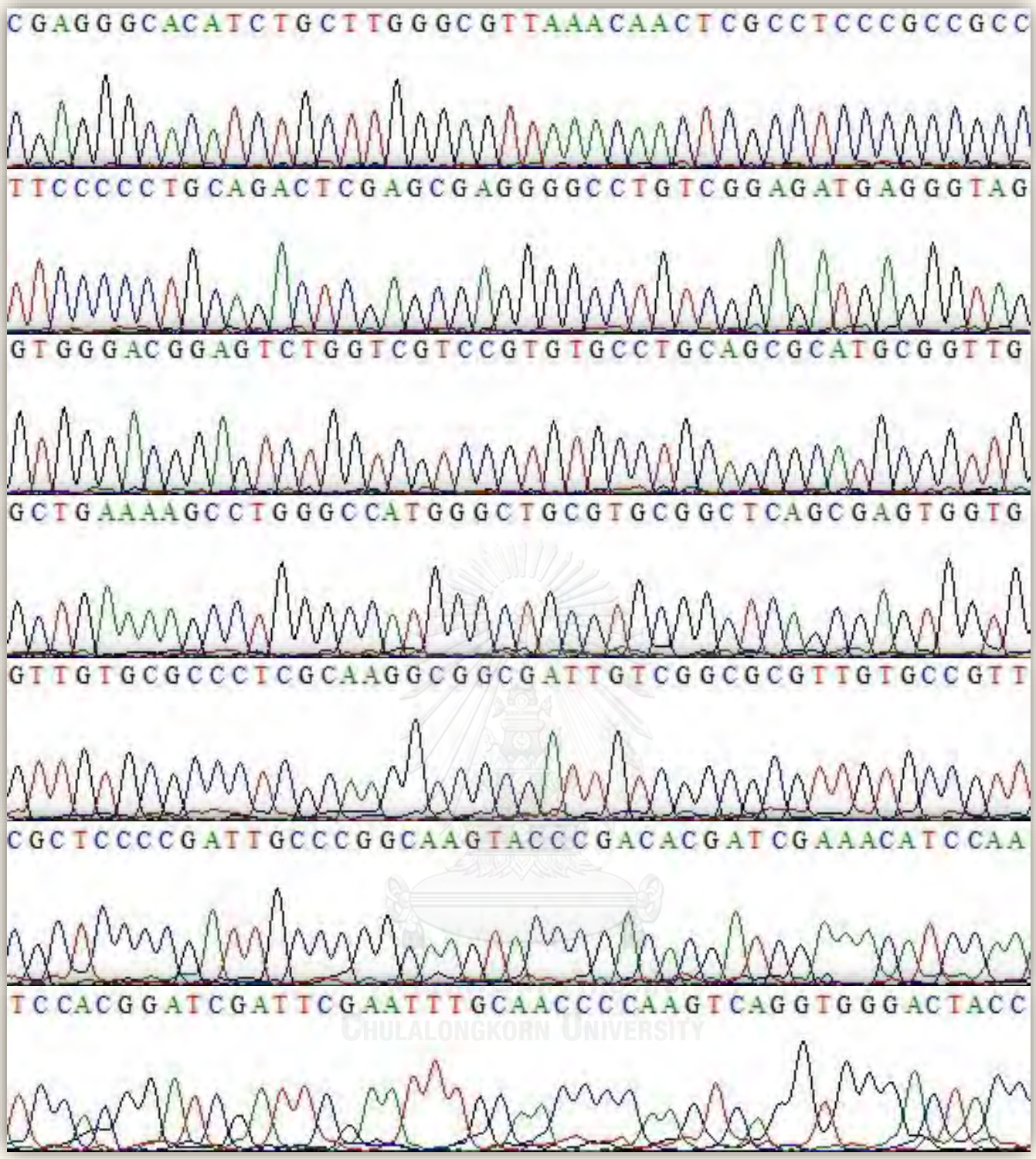


Fig 8d. Sequencing electropherogram of *Piper nigrum* Linn.

```
1   CGAGGGCACA TCTGCTTGGG CGTTAAACAA CTCGCCTCCC GCCGCCTTCC CCCTGCAGAC
61  TCGAGCGAGG GGCCTGTCGG AGATGAGGGT AGGTGGGACG GAGTCTGGTC GTCCGTGTGC
121 CTGCAGCGCA TGCGGTTGGC TGAAAAGCCT GGGCCATGGG CTGCGTGCGG CTCAGCGAGT
181 GGTGGTTGTG CGCCCTCGCA AGGCGGCGAT TGTCGGCGCG TTGTGCCGTT CGCTCCCCGA
241 TTGCCCGGCA AGTACCCGAC ACGATCGAAA CATCCAATCC ACGGATCGAT TCGAATTTGC
301 AACCCCAAGT CAGGTGGGAC TACC

<1 - 25    5.8S ribosomal RNA
26 - 299   internal transcribed spacer 2
300 - >324 28S ribosomal RNA
```

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

Fig 8e. ITS2 region sequence of *Piper nigrum* Linn.

9 สวาด
SAWAAT

Caesalpinia bonduc (Linn.)

Fig 9a. Nicker-nut leaf (Caesalpiniae bonducis folium)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Fig 9b. *Caesalpinia bonduc* Linn.

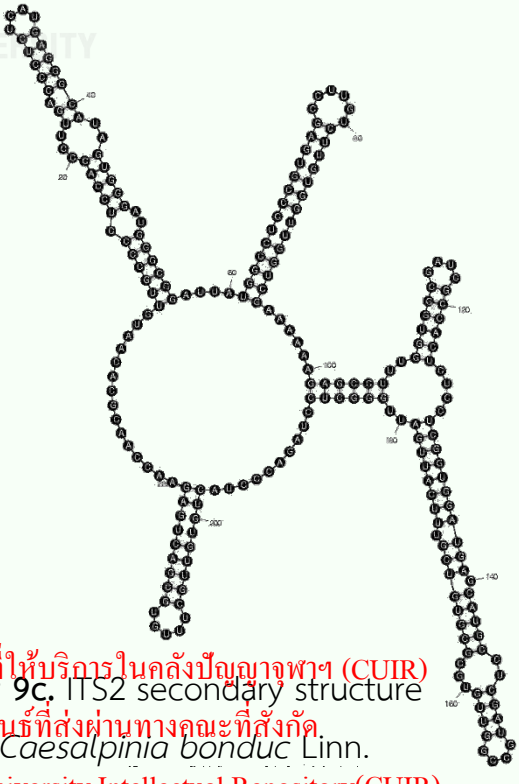


Fig 9c. ITS2 secondary structure of *Caesalpinia bonduc* Linn.

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

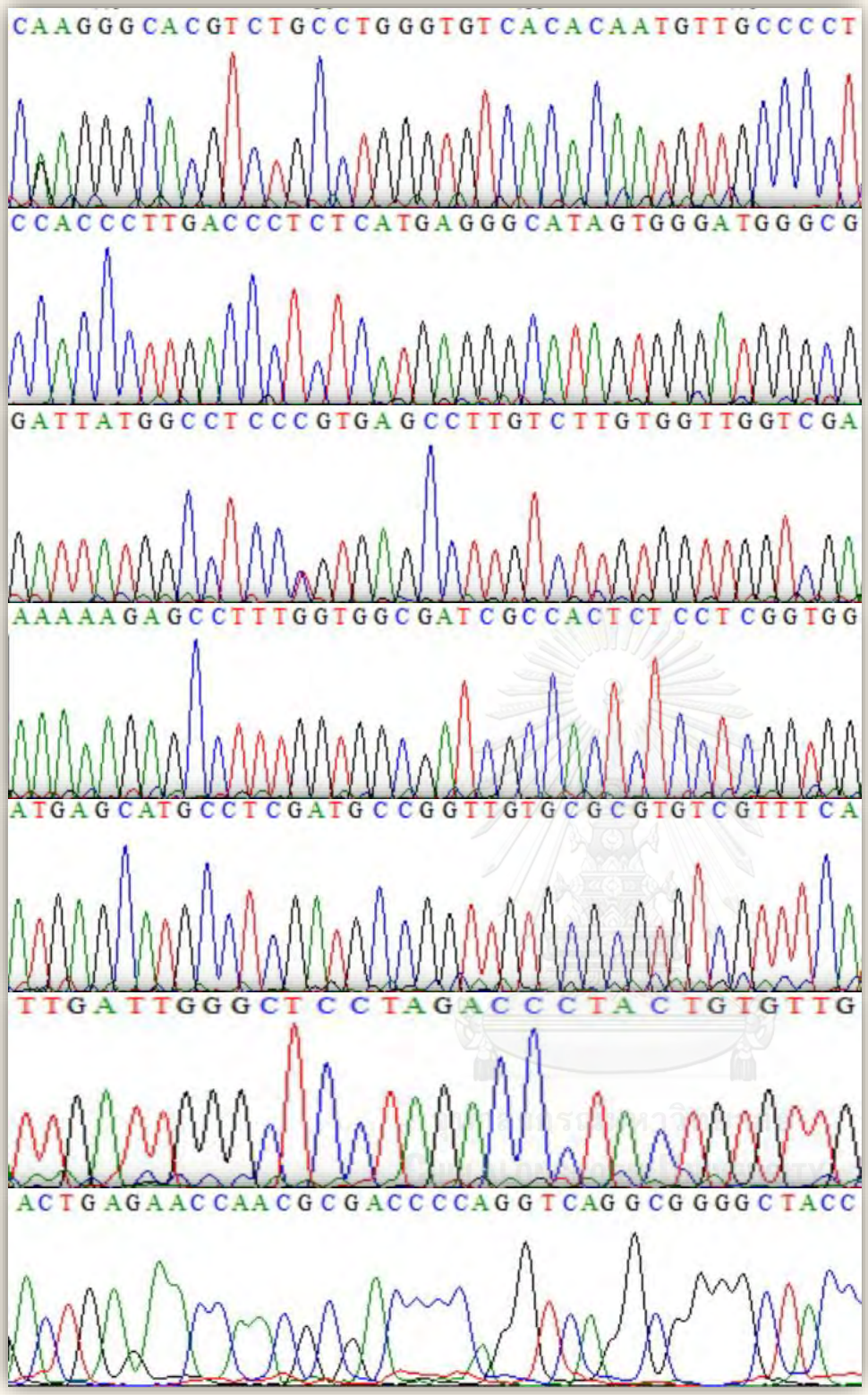


Fig 9d. Sequencing electropherogram of *Caesalpinia bonduc* Linn.

```
1   CGAGGGCACG TCTGCCTGGG TGTCACACAA TGTTGCCCCT CCACCCTTGA CCCTCTCATG
61  AGGGCATAGT GGGATGGGCG GATTATGGCC TCCCGTGAGC CTTGTCTTGT GGTTGGTCGA
121 AAAAAGAGCC TTTGGTGGCG ATCGCCACTC TCCTCGGTGG ATGAGCATGC CTCGATGCCG
181 GTTGTGCGCG TGTCGTTTCA TTGATTGGGC TCCTAGACCC TACTGTGTTG CTTTGTGCGA
241 CTGAGAACCA ACGCGACCCC AGGTCAGGCG GGGCTACC

<1 – 25     5.8S ribosomal RNA
26 - 253    internal transcribed spacer 2
254 - >278  28S ribosomal RNA
```

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

Fig 9e. ITS2 region sequence of *Caesalpinia bonduc* Linn.

10 ตานหม่อน
TAAN MON

Vernonia elliptica De Candolle

Fig 10a. Vernonia elliptica leaf (Vernoneum ellipticum folium)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Fig 10b. *Vernonia elliptica* De Candolle

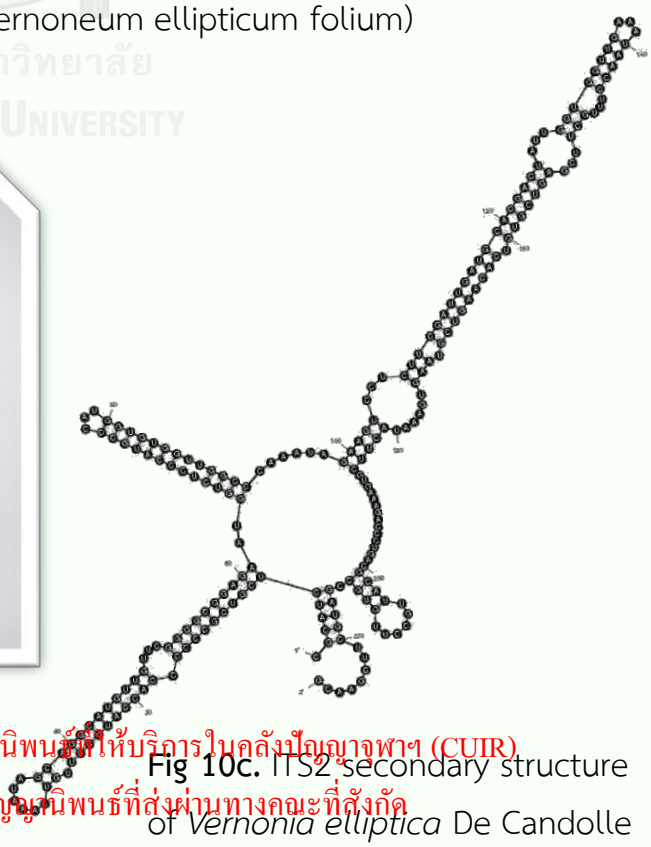


Fig 10c. ITS2 secondary structure of *Vernonia elliptica* De Candolle

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

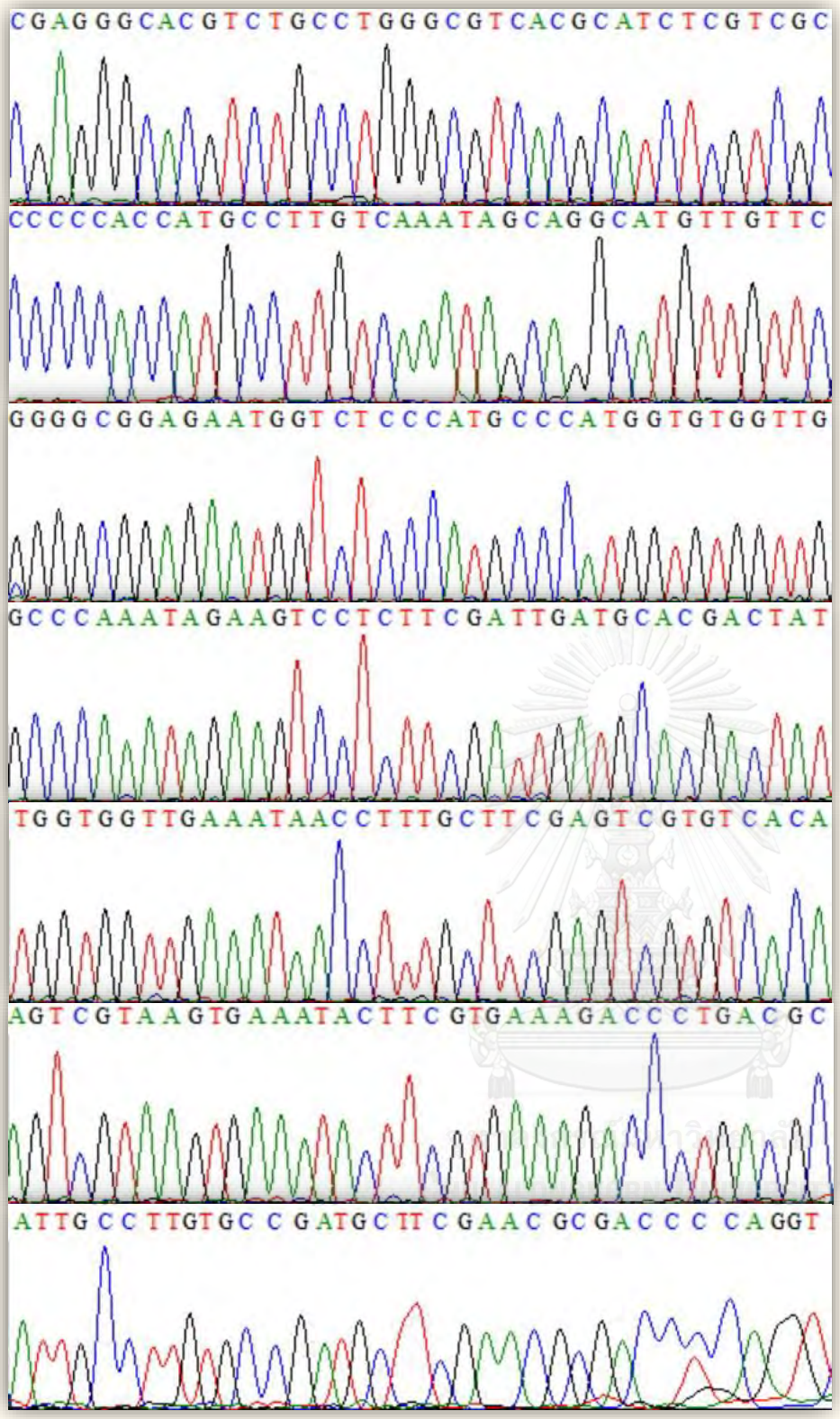


Fig 10d. Sequencing electropherogram of *Vernonia elliptica* De Candolle

```
1   CGAGGGCACG TCTGCCTGGG CGTCACGCAT CTCGTCGCCC CCCACCATGC CTTGTCAAAT
61  AGCAGGCATG TTGTTCGGGG CGGAGAATGG TCTCCCATGC CCATGGTGTG GTTGGCCCAA
121 ATAGAAGTCC TCTTCGATTG ATGCACGACT ATTGGTGGTT GAAATAACCT TTGCTTCGAG
181 TCGTGTCACA AGTCGTAAGT GAAATACTTC GTGAAAGACC CTGACGCATT GCCTTGTGCC
241 GATGCTTCGA ACGCGACCCC AGGT

<1 - 25    5.8S ribosomal RNA
26 - 253   internal transcribed spacer 2
254 - >264 28S ribosomal RNA
```

Fig 10e. ITS2 region sequence of *Vernonia elliptica* De Candolle

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

ในปัจจุบัน ยังคงได้รับความนิยมอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งในส่วนใหญ่สมุนไพรจะถูกแปรรูปหรืออยู่ในรูปของผสม จึงทำให้การที่จะระบุชนิดสมุนไพรนั้นทำได้ยาก ข้อมูลเกี่ยวกับลำดับดีเอ็นเอของพืช จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรเนื่องจากความเป็นเอกลักษณ์ในแต่ละสปีชีส์ โดยดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer 2 (ITS2) เป็นหนึ่งในตัวเลือกที่ถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน เนื่องจากเหตุผลหลายประการ เช่น การมีข้อมูลจากพืชหลากหลายชนิดในฐานข้อมูลนานาชาติ ทำให้ง่ายต่อการสร้างไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและเป็นบริเวณที่มีความผันแปรมากพอที่จะใช้แยก และระบุชนิดของพืชได้ดี ยิ่งไปกว่านั้น โครงสร้างทุติยภูมิของ ITS2 จะมีโครงสร้างจำเพาะ ซึ่งมีความผันแปรมากพอที่จะใช้แยกความแตกต่างระหว่างพืชที่มีสปีชีส์ใกล้เคียงกันได้

การศึกษาของเราแสดงให้เห็นว่า เราสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 โดยใช้ universal primer ได้เกือบทุกตัวอย่างพืช ยกเว้น ฟ้าทะลายโจร และ ขมิ้นชัน ซึ่งจำเป็นต้องใช้ primer ที่มีความจำเพาะเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป โดยผลการศึกษาพบว่าลำดับเบสและโครงสร้างของบริเวณ ITS2 มีความหลากหลายและมีเอกลักษณ์เฉพาะตัว ซึ่งอาจนำไปใช้เป็น DNA mini-barcode เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรได้ แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าโครงสร้างทุติยภูมิของ ITS2 จะมีโครงสร้างที่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างพืชที่มีสปีชีส์ใกล้เคียงกันได้ นักวิจัยหลายๆท่านก็ยอมรับว่าจำเป็นต้องมีการใช้ดีเอ็นเอจากหลายบริเวณมาใช้เป็นมาตรฐานเพื่อความแน่ชัดในการระบุชนิดและการแบ่งแยกประเภทของพืช ดังนั้นสำหรับงานวิจัยในอนาคต จึงควรมีการออกแบบและสร้างไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อต้น ฟ้าทะลายโจร และ ขมิ้นชัน และมีการนำดีเอ็นเอมาตรฐานบริเวณอื่น เช่น*mat*K, *psb*A-*trn*H, COI and *rbc*L มาใช้เพื่อช่วยในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรต่อไป

โดยสรุป โครงสร้างทุติยภูมิของ ITS2 นั้นสามารถนำไปใช้เป็น DNA mini-barcode และนำไปใช้ร่วมกับการศึกษาเกี่ยวกับ DNA barcode ในอนาคตเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรได้ ยิ่งไปกว่านั้นเป็นครั้งแรกของประเทศไทย ที่มีการนำข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS2 และโครงสร้างทุติยภูมิ มาใช้ในฐานะ Thai Herbal Pharmacopoeia DNA supplement

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

รายการอ้างอิง

1. Parveen I, Gafner S, Techen N, Murch SJ, Khan IA. DNA Barcoding for the Identification of Botanicals in Herbal Medicine and Dietary Supplements: Strengths and Limitations. Planta medica. 2016;82(14):1225-35.

2. Roy Upton AG, Georgina Jolliffe, Reinhard Länger, Elizabeth Williamson. American Herbal Pharmacopoeia: Botanical Pharmacognosy - Microscopic Characterization of Botanical Medicines: CRC Press 2011.

3. Chen S, Pang X, Song J, Shi L, Yao H, Han J, et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA. Biotechnology advances. 2014;32(7):1237-44.

4. de Boer HJ, Ichim MC, Newmaster SG. DNA Barcoding and Pharmacovigilance of Herbal Medicines. Drug safety. 2015;38(7):611-20.

5. Mishra P, Kumar A, Nagireddy A, Mani DN, Shukla AK, Tiwari R, et al. DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. Plant biotechnology journal. 2016;14(1):8-21.

6. Li DZ, Gao LM, Li HT, Wang H, Ge XJ, Liu JQ, et al. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(49):19641-6.

7. Kjer KM. Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs. Molecular phylogenetics and evolution. 1995;4(3):314-30.

8. Coleman AW, Mai JC. Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness. Journal of molecular evolution. 1997;45(2):168-77.

9. Zhang W, Yuan Y, Yang S, Huang J, Huang L. ITS2 Secondary Structure Improves Discrimination between Medicinal “Mu Tong” Species when Using DNA Barcoding. PLoS ONE. 2015;10(7).

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

ภาคผนวก

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของต้นบอระเพ็ด (FASTA format)

>Boraphet_ITS2

CACAAACGCCGCTCTCATCCCCTTGGGCGCGAGAGCGAACGATGGCCCCCCGCGGCTCGGCCGGCGGTCGG
CTAAAATAGCTCGCCTTCTCGTGGCTTCACGACACGATTGATGGTGGTTGACAAAACCCTCTGTTGCAACGT
GATCGGAAGTAGGAGGCGAGCGAACCCTTTCATCACATG

2. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของต้นชุมเห็ดเทศ (FASTA format)

>Chumhetthet_ITS2

CGCATCGTTGCCCCAAAACCCCGTCGTCCCTCCGGTCAATCGGAGGCGGCGAGGTGCTTGGGCGGAAGCTG
GCCTCCCGTGAGCATTGCCTTGCGGATGGCCGAAATTAGAGCCTGTGAGGGGCAATCGCCACGTTCCACGGT
GGTTGAGCAGATGCCTCGAGGCCGACCGTGCGCGAGTTGTCCCCACGACAAGGCTGCGAGACCCTTGCGAG
CAAGTAAGTGCTCCCAACG

3. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของต้นกะเพราแดง (FASTA format)

>Kaphraodaeng_ITS2

CGCATCGCGTCGCCCCCCTCCCCGCGCACCGCGCTCGGGACGGGGGGCGGATGTTGGCCTCCCGTGCGCCC
CGCCGCGCGGCCGGCCCAAACCCGATCCCCCGGCGACCCGCGTCGCGACAAGTGGTGGTTGAACGTCTCAA
TCTCGCGTCTCGTCGCTCGCGGGCCGTCCGCGCGGGCTCCGAAGAGGACCCAACGGCGCGGCCAAGCCGCC
GCTCCCTCGACCGCGAC

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของต้นมะแว้งเครือ (FASTA format)

>Mawaengkrueo_ITS2

CGCATCATGTTACACCTGCACGTCGCTCGGCATCACGAGGGTAGATACTGGCCTCTTTTGTGCCTCACGCCC
GCGACCGACCTAAATGCGAGTCCACGTCGATGGACGTCGCGGCAAGTGGTGGTTGTAACTCAACTCTCTTGG
TACCGCGGCCACAGCCTATCGCGCGTGCATG TTCTATGACCCTACTGGCGCTAGCGCACTCTGATCG

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

5. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของต้นไพล (FASTA format)

>Phlai_ITS2

TGGCATCGTCGCCTCAGCCCCATTCCCTGTTGTCAGTCGGCTGGTGCTGAGCGCGGAAATTGGCCCCGTGTG
CCCTCGGGCACAGTCGGCCGAAGAGCGGGTAGTCGGTAAGTCGTCGGGCACGACGGGCGTTGGTCGCCGTG
AGCGGGAACAGAACGTCGTCCCCGTCATTTTCGGACGAGCCCTCAAGAGACCCTGCGTGACTGCGGCACCG
GGCGAACGAAAGAACGCGCCGTGTCCATCAACTTG

6. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของต้นพริกไทย (FASTA format)

>Phrikthai_ITS2

AACAACTCGCCTCCCGCCGCCTTCCCCCTGCAGACTCGAGCGAGGGGCCTGTCGGAGATGAGGGTAGGTGG
GACGGAGTCTGGTCGTCCGTGTGCCTGCAGCGCATGCGGTTGGCTGAAAAGCCTGGGCCATGGGCTGCGTG
CGGCTCAGCGAGTGGTGGTTGTGCGCCCTCGCAAGGCGGCGATTGTCGGCGCGTTGTGCCGTTCGCTCCCC
GATTGCCCGGCAAGTACCCGACACGATCGAAACATCCAATCCACGGATCGATTCGAATTTG

7. นิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของต้นสวาด (FASTA format)

>Sawaat_ITS2

CACAATGTTGCCCCTCCACCCTTGACCCTCTCATGAGGGCATAGTGGGATGGGCGGATTATGGCCTCCCGTG
AGCCTTGTCTTGTGGTTGGTCGAAAAAAGAGCCTTTGGTGGCGATCGCCACTCTCCTCGGTGGATGAGCATG
CCTCGATGCCGGTTGTGCGCG TGTCGTTTCA TTGATTGGGC TCCTAGACCC TACTGTGTTG
CTTTGTGCGACTGAGAACCA ACG

8. นิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ของต้นตานหม่อน (FASTA format)

>Taanmon_ITS2

CGCATCTCGTCGCCCCCCACCATGCCTTGTCAAATAGCAGGCATGTTGTTCGGGGCGGAGAATGGTCTCCCA
TGCCCATGGTGTGGTTGGCCCAAATAGAAGTCCTCTTCGATTGATGCACGACTATTGGTGGTTGAAATAACC
TTTGCTTCGAGTCGTGTCACAAGTCGTAAGTGAAATACTTCGTGAAAGACCCTGACGCATTGCCTTGTGCCG
ATGCTTCGA ACG

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานปริญญานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of Senior Project in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)