

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการประเมินทางเคมีของมะขามบางสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายที่ดี



นางสาวปฏิภาณี ชันธโกศ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DNA FINGERPRINT AND CHEMICAL ASSESSMENT OF SELECTED TAMARIND CULTIVARS WITH
HIGH LAXATIVE ACTIVITY

Miss Patipanee Khanthapok



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science


Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

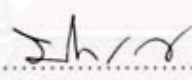
หัวข้อวิทยานิพนธ์	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการประเมินทางเคมีของมะขามบางสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายที่ดี
โดย	นางสาวปฎิภาณี ชันธโคก
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ปาริชาติ ภู่งว่าง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ


คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ปาริชาติ ภู่งว่าง)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุนันท์ พงษ์สามารถ)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ร.ต.อ.หญิง ดร. สุชาดา สุขหรั่ง)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภัคตีบำรุง)

ปฏิภาณี ชันธโภาค : ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการประเมินทางเคมีของมะขามบางสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์เป็นยา
ระบายที่ดี. (DNA FINGERPRINT AND CHEMICAL ASSESSMENT OF SELECTED TAMARIND CULTIVARS
WITH HIGH LAXATIVE ACTIVITY) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ปาริชาติ ภู่งว้าง, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.สุนันท์
พงษ์สามารถ จำนวนหน้า 204 หน้า.

มะขาม (*Tamarindus indica* L.) เป็นผลไม้ที่มีคุณประโยชน์กว้างทางยา โดยเฉพาะการใช้เป็นยาระบาย แก้อาการ
ท้องผูกมาตั้งแต่สมัยโบราณต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน ประเทศไทยมีมะขามที่นิยมปลูกหลายพันธุ์ปลูก ซึ่งทุกพันธุ์ปลูกมีชื่อ
วิทยาศาสตร์เดียวกัน คือ *T. indica* ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของมะขามต่างพันธุ์ปลูกที่มีฤทธิ์
ยาระบายที่เพาะปลูกในประเทศไทย โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับองค์ประกอบเคมีในเนื้อมะขาม เทคนิค
การศึกษาเครื่องหมายระดับโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบนยีน *rbcl* ในคลอโรพลาสต์และดีเอ็นเอส่วน ITS ในนิวเคลียส
และโดยการวิเคราะห์โดยเทคนิค RAPD-PCR จากตัวอย่างมะขามที่มีฤทธิ์ยาระบายชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และชนิด
เปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่เพาะปลูกที่จังหวัดเพชรบูรณ์ จากการทดลองพบว่า มะขามทั้งชนิดหวานและชนิดเปรี้ยวมีคุณค่า
ทางโภชนาการทุกพันธุ์ปลูก มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและน้ำตาลรีดิวซ์สูง มีโปรตีนและไขมันต่ำ และมีความเป็นกรด วิเคราะห์
ชนิดและปริมาณขององค์ประกอบเคมีในเนื้อมะขามด้วยเทคนิค HPLC จากการทดลองพบว่า เทคนิค HPLC สามารถนำไปใช้
วิเคราะห์กรดอินทรีย์ในเนื้อมะขามได้มีความถูกต้องสมบูรณ์ กรดอินทรีย์ที่พบในตัวอย่าง ได้แก่ กรดทาร์ทาริก มาลิก ซิตริก
และออกซาลิก กรดทาร์ทาริกพบปริมาณสูงมากใน 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ขณะที่ 'ศรีชมภู' มีปริมาณกรดทาร์ทาริกต่ำ ปริมาณ
กรดทาร์ทาริกที่พบในมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' มี
ปริมาณกรดทาร์ทาริก 18.102 ± 0.134 กรัม/100 กรัม ขณะที่ 'ขันตี' และ 'ศรีชมภู' มีปริมาณเท่ากับ 2.134 ± 0.117 และ
 1.628 ± 0.117 กรัม/100 กรัม ตามลำดับ แต่มีกรดมาลิกและซิตริกสูงกว่า 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' วิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอของ
ยีน *rbcl* ในมะขามชนิดหวานพบว่า มีความยาวเท่ากับ 1,428 bp ส่วนมะขามชนิดเปรี้ยววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน
ของยีน *rbcl* ความยาว 1,398 bp เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสบางส่วนของยีน *rbcl* (accession no. Z70160) ที่มีอยู่ใน
ฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีการแทนที่ของเบสทั้งหมด 24 ตำแหน่ง และเมื่อวิเคราะห์การแทนที่ของเบสด้วยวิธี UPGMA
สามารถแบ่งมะขามออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ประกอบด้วย 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' เป็นมะขามชนิดหวานและกลุ่มที่สอง
ได้แก่ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' คือ มะขามชนิดเปรี้ยว เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS ไม่พบความ
แตกต่างกัน การศึกษาเพิ่มเติมโดยเทคนิค RAPD สามารถระบุได้ว่าการแปรผันทางพันธุกรรมของมะขามต่างพันธุ์ปลูกและ
ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของแต่ละพันธุ์ปลูกที่มีลักษณะเฉพาะ ค่าดัชนีความเหมือนระหว่างมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกเท่ากับ
0.7284-0.8722 เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยวิธี NJ สามารถแบ่งมะขามออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ประกอบด้วย 'ศรีชมภู'
และ 'ขันตี' เป็นมะขามชนิดหวาน และกลุ่มที่สอง ได้แก่ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' คือ มะขามชนิดเปรี้ยว ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ
ยีน *rbcl* ผลการทดลองเสนอแนะได้ว่า ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และเทคนิค RAPD สามารถใช้เป็นเครื่องหมาย
ทางโมเลกุลร่วมกับองค์ประกอบเคมีของกรดอินทรีย์ทาร์ทาริกในเนื้อมะขามในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของมะขามต่างพันธุ์ปลูกได้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต..... ปฏิภาณี ชันธโภาค
ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ.ปาริชาติ ภู่งว้าง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... รศ.ดร.สุนันท์ พงษ์สามารถ

4772356023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: *Tamarindus indica* / ORGANIC ACIDS / DNA FINGERPRINT / *rbcl* GENE / ITS REGIONS/ RAPD

PATIPANEE KHANTHAPOK : DNA FINGERPRINT AND CHEMICAL ASSESSMENT OF SELECTED TAMARIND CULTIVARS WITH HIGH LAXATIVE ACTIVITY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PARICHART BHUSAWANG, THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. SUNANTA PONGSAMART, Ph.D., 204 pp.

Tamarind (Tamarindus indica L.) is a versatile fruit widely used in medicinal purposes, especially, in constipation as a mild laxative in traditional medicine. There are different cultivars of tamarind cultivate in Thailand with the same scientific name, *T. indica*. This study aimed to characterize and identify Thai tamarind cultivars with laxative effect by using DNA fingerprint analysis in combination with chemical assessment in tamarind pulps. Molecular markers were studied by sequencing the *rbcl* gene in chloroplast genome, the ITS regions in nuclear genome and also RAPD-PCR analysis in tamarind with laxative activity from sweet tamarind 'Srichomphu' and 'Khanti' and sour tamarind 'Priaoyak' from Phetchabun province. The results showed that both of sweet and sour tamarinds are nutritious fruit. Each cultivar possessed high carbohydrate and reducing sugar, low protein and fat and high organic acids. Organic acids contents in tamarind pulps were first qualitatively and quantitatively determined by using HPLC. The HPLC method showed the validity for organic acids analysis in tamarind pulps. The major organic acids content in tamarind pulp extracts were tartaric, malic, citric, and oxalic acid. Very high content of tartaric acid was found in 'Priaoyak', whereas, 'Srichomphu' contained low content of tartaric acid. Tartaric acid contents in tamarind pulps between different tamarind cultivars were significantly different ($p < 0.05$). Tartaric acid content in 'Priaoyak' was 18.102 ± 0.134 g/100 g, whereas, 'Khanti' and 'Srichomphu' was 2.134 ± 0.117 and 1.628 ± 0.117 g/100 g, respectively. However, malic and citric acid contents in sweet tamarinds were not different ($p > 0.05$), but higher than that of 'Priaoyak' ($p < 0.05$). The *rbcl* gene sequences of sweet tamarinds were 1,428 bp in length, whereas, parts of *rbcl* gene of sour tamarind of 1,398 bp were sequenced. In comparison with the previous report in GenBank (accession no. Z70169), 24 sites of nucleotide substitutions were found. The dendrogram was generated based on UPGMA method. The result indicated that tamarind cultivars from Phetchabun province were divided into two groups, first group including 'Srichomphu' and 'Khanti' was sweet type and second group was 'Priaoyak' of sour type. Nucleotide substitutions were not found in the ITS regions. The RAPD study indicated that Thai tamarind cultivars exhibited genetic variation. The RAPD profiles showed the specific patterns of different tamarind cultivars and similarity index values were from 0.7284-0.8722. The dendrogram was constructs by NJ method. Tamarind cultivars were also divided into two groups, first group including 'Srichomphu' and 'Khanti' of sweet type and second group was 'Priaoyak' of sour type. The results were corresponding with the result obtained by the *rbcl* gene studied. The results suggested that the *rbcl* gene sequence and the polymorphic band profiles of RAPD could be used as molecular markers together with tartaric acid content in tamarind pulps for identification and characterization of tamarind cultivars.

Field of study Biotechnology

Academic year 2007

Student's signature.....PATIPANEE KHANTHAPOK.....

Advisor's signature.....*Parichart Bhusawang*.....

Co-advisor's signature.....*Sunanta Pongsamart*.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ปาริชาติ ภู่ว่าง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร. สุพันธ์ พงษ์สามารถ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ร.ต.อ.หญิง ดร. สุชาดา สุขห่อง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยจนสำเร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภัคดีบำรุง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความเห็นเห็นและคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาเภสัชเวช ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ คณาจารย์หลักสูตรสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำวิจัย และคำแนะนำรวมทั้งความช่วยเหลือตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณนางนาวิน ปานแสงทินกร นักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาเภสัชเวช ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ หลักสูตรสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำทุกๆ ด้านตลอดมา

ขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทบวงมหาวิทยาลัย กระทรวงศึกษาธิการ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ และน้อง ที่คณะเภสัชศาสตร์และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกคนที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือและคำแนะนำด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนญาติพี่น้อง ที่ได้เลี้ยงดู ให้ความรัก ความเอาใจใส่ ให้กำลังใจ และสนับสนุนตลอดมา

สารบัญ

บทที่	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	ท
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	5
ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
1. สาเหตุและอาการท้องผูก.....	7
2. พืชสมุนไพรที่ใช้เป็นยาระบาย.....	8
3. มะขาม.....	9
4. กรดอินทรีย์ในมะขาม.....	11
5. วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ในผลไม้.....	16
6. โมเลกุลเครื่องหมาย.....	17
7. ยีน ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (<i>rbcl</i>).....	24
8. Internal Transcribed Spacer (ITS).....	24
9. การออกแบบไพรเมอร์.....	27
10. การเปรียบเทียบความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีน.....	27
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
วัสดุอุปกรณ์.....	29
1. สารเคมี.....	29

บทที่	หน้า
2. อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	30
3. ตัวอย่างพืช.....	31
วิธีดำเนินการวิจัย.....	34
1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	34
2. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	48
3. การประเมินลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับการประเมินองค์ประกอบกรดอินทรีย์ ของตัวอย่างมะขามที่มีฤทธิ์เป็นยาระบาย.....	58
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล.....	59
1. การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบทางเคมี.....	59
2. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	84
3. การหาความสัมพันธ์โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับองค์ประกอบกรดอินทรีย์ ในเนื้อมะขามที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายเพื่อการพิสูจน์มะขามต่างพันธุ์ปลูก.....	119
5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	121
รายการอ้างอิง.....	124
ภาคผนวก.....	136
ภาคผนวก ก.....	137
ภาคผนวก ข.....	138
ภาคผนวก ค.....	142
ภาคผนวก ง.....	145
ภาคผนวก จ.....	149
ภาคผนวก ฉ.....	152
ภาคผนวก ช.....	156
ภาคผนวก ซ.....	191
ภาคผนวก ฌ.....	201
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	204

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 การออกดอกและติดฝักของมะขามหวาน.....	3
2 ปริมาณของส่วนประกอบของสารอาหารในเนื้อมะขามอบแห้ง.....	12
3 ปริมาณของส่วนประกอบของแร่ธาตุในเนื้อมะขาม.....	12
4 ปริมาณกรดทาร์ทาริกในเนื้อมะขามหวานจากประเทศไทย.....	14
5 ข้อมูลของการเก็บตัวอย่างมะขาม 3 พันธุ์ปลูก คือ มะขามชนิดหวาน ได้แก่ 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว ได้แก่ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์.....	32
6 ความเข้มข้นของสารละลายผสมกรดอินทรีย์มาตรฐาน จำนวน 3 ความเข้มข้นที่ใช้ในการยืนยันความถูกต้องของเทคนิค HPLC.....	46
7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i>	52
8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD.....	56
9 ปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ของผลมะขามสด.....	60
10 ปริมาณขององค์ประกอบน้ำในเนื้อมะขามสด.....	60
11 ปริมาณของส่วนประกอบของสารอาหารในเนื้อมะขามอบแห้ง.....	61
12 ปริมาณของส่วนประกอบของแร่ธาตุในเนื้อมะขาม.....	62
13 สมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ใน 0.5 % (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	65
14 ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วยเทคนิค HPLC.....	68
15 ค่าการแยกจากกันของกรดอินทรีย์มาตรฐานและสารมาตรฐานภายในจากคอลัมน์ Inertsil ODS-3, C18 ขนาด 150x4.6 mm i.d., 5 μm ; 0.5 % (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 2.9 ที่ความยาวคลื่น 210 nm.....	71
16 สรุปความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดอินทรีย์มาตรฐานกับสารมาตรฐานภายในต่อความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐานและค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอินทรีย์ที่สามารถวิเคราะห์ได้.....	73

ตาราง	หน้า
17 ความเที่ยงตรงแม่นยำเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันของกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก แอสคอบิก และซิตริก.....	74
18 ความเที่ยงตรงแม่นยำเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันของกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก แอสคอบิก และซิตริก.....	76
19 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์กรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก แอสคอบิก และซิตริก.....	78
20 ปริมาณขององค์ประกอบกรดอินทรีย์ในเนื้อมะขามสดจากการวิเคราะห์ด้วย วิธี HPLC method.....	80
21 ส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ ยีน <i>rbcL</i>	90
22 การแทนที่ใน 24 ตำแหน่ง ของนิวคลีโอไทด์ในยีน <i>rbcL</i> ของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากจังหวัดเพชรบูรณ์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน <i>rbcL</i> ของ <i>T. indica</i> L. (accessions no. Z70160) ที่มีใน GenBank โดยเริ่มเปรียบเทียบตั้งแต่ตำแหน่งที่ 31 ของตำแหน่ง 5' ของยีน <i>rbcL</i>	96
23 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในยีน <i>rbcL</i> ของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากจังหวัดเพชรบูรณ์.....	97
24 ส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอส่วน ITS.....	102
25 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอส่วน ITS (Internal transcribed spacer) ของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากจังหวัด เพชรบูรณ์.....	107
26 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD-PCR.....	109
27 ส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RAPD-PCR เพื่อศึกษา ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	110
28 ค่าดัชนีความเหมือน (Similarity index, S. I.) เมื่อเทียบระหว่างตัวอย่างมะขาม <i>T. indica</i> จำนวน 3 พันธุ์ปลูก.....	115

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1 เนื้อที่เพาะปลูกมะขามในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2546.....	2
2 สูตรโครงสร้างของกรดอินทรีย์หลักที่พบในเนื้อมะขาม.....	15
3 แผนผังแสดงระดับอนุกรมวิธานโดยประมาณของยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ นิวเคลียส และไม่โตคอนเดรีย และดีเอ็นเอในบริเวณต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา วงศ์วานวิวัฒนาการโดยตั้งสมมติฐานจากพีซีเอ็มดีเอก.....	21
4 แผนที่ยีน (gene map) ในคลอโรพลาสต์จีโนมของ <i>Gossypium hirsutum</i>	25
5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcL</i> บางส่วนของ <i>Tamarindus indica</i> (accession no.Z70160) ที่มีอยู่ใน GenBank.....	26
6 โครงสร้างของ Internal Transcribed Spacer (ITS) ในนิวเคลียส.....	26
7 ลักษณะฝักและเนื้อของมะขามพันธุ์ปลูกต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัด เพชรบูรณ์.....	33
8 Ribosomal DNA และตำแหน่งของไพรเมอร์ 18-25S 5'F และ 18-25S 3'R ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ.....	50
9 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนยีน <i>rbcL</i>	52
10 Ribosomal DNA และตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ.....	53
11 ผลของความเป็นกรดต่าง (pH) ของเฟสเคลื่อนที่ต่อการแยก (retention time) ของกรดอินทรีย์ด้วยคอลัมน์ Inertsil ODS-3, C18 ขนาด 150 x 4.6 mm i.d., 5 μ m ที่ความยาวคลื่น 210 nm.....	67
12 โครมาโทแกรม HPLC ของสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานผสม.....	69
13 โครมาโทแกรม HPLC ของกรดอินทรีย์ในน้ำสกัดมะขาม 'ขันตี' ที่เติม สารละลายผสมกรดอินทรีย์มาตรฐาน.....	77
14 โครมาโทแกรม HPLC ของกรดอินทรีย์ในน้ำสกัดมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู'.....	81
15 โครมาโทแกรม HPLC ของกรดอินทรีย์ในน้ำสกัดมะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี'.....	81
16 โครมาโทแกรม HPLC ของกรดอินทรีย์ในน้ำสกัด 'มะขามเปรี้ยวยักษ์'.....	82
17 แถบจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูกที่ใช้ในการวิจัย.....	86

ภาพประกอบ	หน้า
18 แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ 18-25S 5'F กับ 18-25S 3'R ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก.....	87
19 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcL</i> บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcL</i> ของ <i>Arabidopsis thaliana</i> (accession no. NC_000932) ที่มีใน Genbank.....	89
20 แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ <i>rbcL</i> -tam-F01 กับ <i>rbcL</i> -tam-R02 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก.....	91
21 แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ <i>rbcL</i> -tam-F03 กับ <i>rbcL</i> -tam-R04 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก.....	92
22 แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ Rbc-BMP-fixF-01 กับ <i>rbcL</i> BMP684R ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก.....	93
23 แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ Rbc-BMP-fixF-03 กับ Rbc-BMP-fixR-04 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก.....	94
24 เคนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะขาม <i>T. indica</i> ทั้ง 3 พันธุ์ปลูก คือ 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcL</i> ด้วยวิธี UPGMA.....	99
25 แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ Stmn-ITS-F กับ ITS4 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก.....	103
26 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA, ITS-1, 5.8S rDNA, ITS-2 และ 26S rDNA ของมะขาม <i>T. indica</i> ชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และ มะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>Trifolium hybridum</i> (accession no. EU348779); <i>Eperua schomburgkiana</i> (accession no. AY955808); <i>Baikiaea insignis</i> (accession no. AY955811); <i>Tessmannia anomala</i> (accession no. AY955813); <i>Copaifera officinalis</i> (accession no.	

ภาพประกอบ	หน้า
AY955816); <i>Detarium macrocarpum</i> (accession no. AY955817) และ <i>Sindora bruggemanii</i> (accession no. AY955824) ที่มีใน GenBank.....	104
27 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอส่วน 18S rDNA, ITS-1, 5.8S rDNA, ITS-2 และ 26S rDNA ของมะขาม <i>T. indica</i> 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์'.....	106
28 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-02, OPA-13 และ SD-03.....	111
29 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-02, OPA-13 และ SD-03.....	112
30 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี' จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-02, SD-18 และ OPA-13.....	113
31 เคนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะขาม <i>T. indica</i> ทั้ง 3 พันธุ์ปลูก คือ 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากวิธี UPGMA จาก การสุ่มค่า Bootstrap value 1,000 replicates ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย RAPD.....	116
44 เคนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะขาม <i>T. indica</i> ทั้ง 3 พันธุ์ปลูก คือ 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากวิธี Neighbor-joining จากการสุ่มค่า Bootstrap value 1,000 replicates ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย RAPD.....	117

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

%	Percentage
5.8S rDNA	5.8S ribosomal RNA gene
18S rDNA	18S ribosomal RNA gene
26S rDNA	26S ribosomal RNA gene
AA	Ascorbic acid
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AR	Analytical reagent
BSU	BioService Unit
CA	Citric acid
cpDNA	Chloroplast DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid
dATP	Deoxyadenosine-5' triphosphate
dCTP	Deoxycytidine-5' triphosphate
ddH ₂ O	Double distilled water
dGTP	Deoxyguanosine-5' triphosphate
DI	Deionized
dTTP	Deoxythymidine-5' triphosphate
FA	Fumaric acid
g	Gram
GA	Gallic acid
HPLC	High-performance liquid chromatography
ITS	Internal transcribed spacer
ITS1	Internal transcribed spacer 1
ITS2	Internal transcribed spacer 2
KCl	Potassium chloride
MA	Malic acid
MgCl ₂	Magnesium chloride
mtDNA	Mitochondrial DNA
nDNA	Nuclear DNA

NJ	Neighbor-joining
nm	nanometer
OA	Oxalic acid
PAUP	Phylogenetic analysis using parsimony
PCR	Polymerase chain reaction
<i>rbcL</i>	Gene coding for the large subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/ oxygenase
RAPD-PCR	Random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribonucleic acid
SA	Succinic acid
S. I.	Similarity index
TA	Tartaric acid
<i>trnF</i>	Gene encoding for tRNA ^{Phe}
<i>trnG</i>	Gene encoding for tRNA ^{Gly}
<i>trnK</i>	Gene encoding for tRNA ^{Lys}
<i>trnL</i>	Gene encoding for tRNA ^{Leu}
<i>trnS</i>	Gene encoding for tRNA ^{Ser}
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic averages
UV	Ultraviolet
w/v	Weight by volume

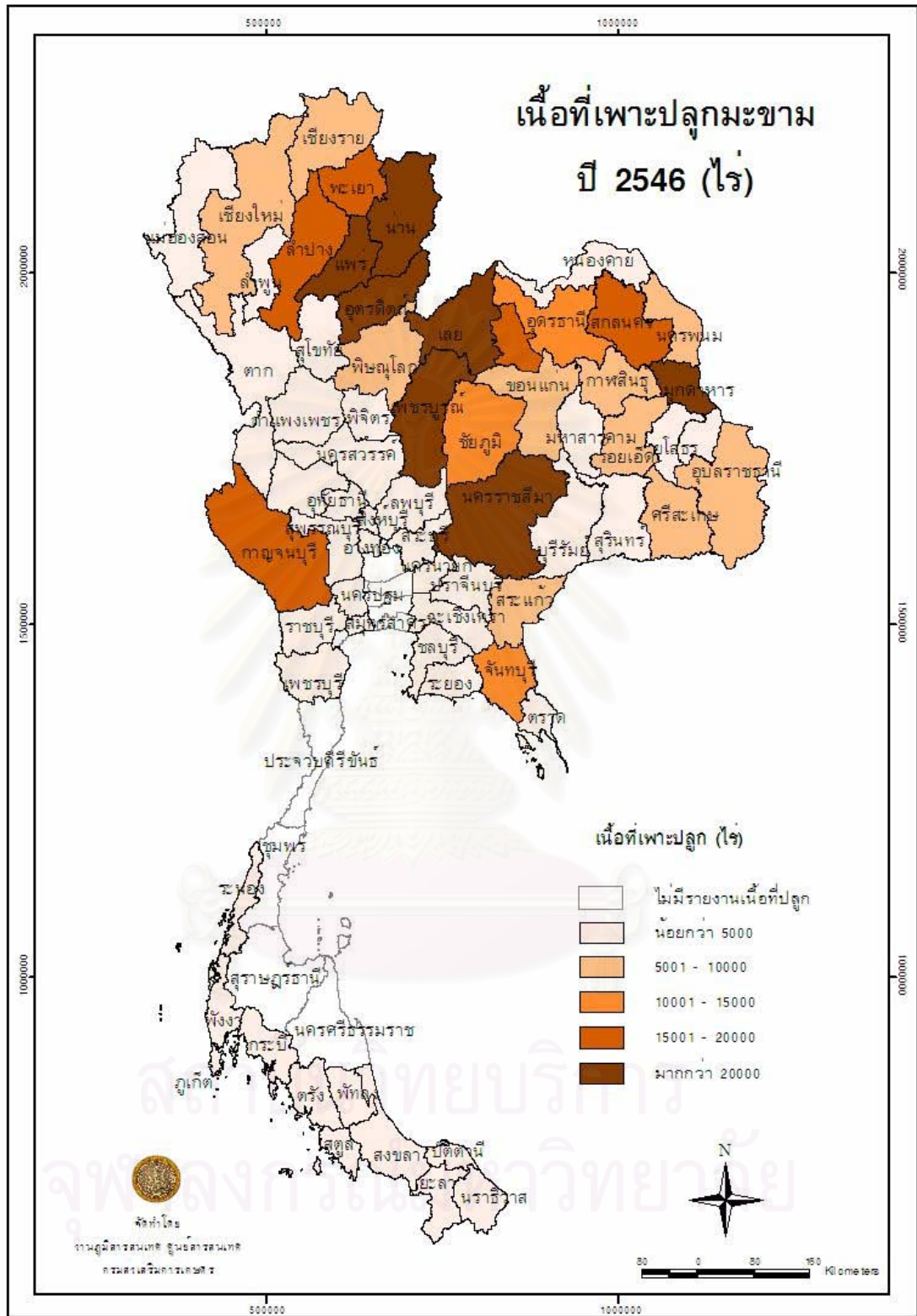
บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันอาการท้องผูกเป็นอาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นกับคนส่วนใหญ่ โดยเกิดจากสาเหตุหลายประการ ที่สำคัญ คือ การรับประทานอาหารที่มีเส้นใยน้อย เมื่อร่างกายมีอาการท้องผูก ทำให้มีของเสียสะสมอยู่ในลำไส้และจะทำให้ถ่ายยากและอาจทำให้เกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคริดสีดวงทวาร มะเร็งลำไส้ เป็นต้น (สุรพล สุรางค์ศรีรัฐ และ สมชาย ลีลากุลวงศ์, 2543) ในปัจจุบันวิถีแก้ไขอาการท้องผูกที่ผู้ป่วยนิยม คือ การใช้ยาระบาย ยาระบายนั้นมีทั้งยาแผนปัจจุบันและยาสมุนไพร โดยยาแผนปัจจุบัน ได้แก่ มิลก์ ออฟ แมกนีเซียม ซึ่งมีข้อเสีย คือ สารแมกนีเซียมอาจสะสมในร่างกายจึงห้ามใช้ในผู้ป่วยโรคไต (สุรพล สุรางค์ศรีรัฐ และ สมชาย ลีลากุลวงศ์, 2543) ส่วนยาสมุนไพร ได้แก่ มะขามแขก ซึ่งนิยมใช้มากในปัจจุบัน แต่ข้อเสียของมะขามแขก คือ ทำให้ระดับโพแทสเซียมในร่างกายลดลงและทำให้ระบบประสาทที่ควบคุมการบีบตัวของลำไส้เสียหาย (ดวงรัตน์ เขียวชาญวิทย์, 2545) ดังนั้นยาสมุนไพรชนิดอื่นๆ ที่มีสรรพคุณเป็นยาระบาย เช่น มะขาม จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกที่ดีอีกทางหนึ่งของผู้ป่วยท้องผูกได้

มะขามมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tamarindus indica* Linn. (เต็ม สมิตินันท์, 2544) เป็นพืชอยู่ในชั้น Dicotyledonae อันดับ Leguminales วงศ์ Leguminosae วงศ์ย่อย Caesalpinioideae สกุล *Tamarindus* ชนิด *indica* มีชุดโครโมโซม $2n = 24$ มะขามเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ มีรสเปรี้ยวทั้งส่วนใบ ดอก และฝัก มะขามมีถิ่นกำเนิดในป่าที่ราบแห้งเขตร้อนของทวีปแอฟริกาตะวันออก แล้วกระจายไปในแถบละตินอเมริกา หมู่เกาะแคริบเบียน และทวีปเอเชีย (Gibbon และ Pain, 1985; Purseglove, 1968) มะขามได้เข้ามามีถิ่นกำเนิดรองในเขตร้อนของทวีปเอเชียมาเป็นเวลานาน ปัจจุบันได้มีการปลูกมะขามกันอยู่ทุกประเทศในเขตร้อน และเป็นพืชเศรษฐกิจพื้นบ้านที่สำคัญของประเทศอินเดีย และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์, 2538; Gibbon และ Pain, 1985; Purseglove, 1968) ในประเทศไทยมีการปลูกทั้งมะขามเปรี้ยวและมะขามหวานตามจังหวัดต่างๆ เนื้อที่เพาะปลูกมะขามในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2546 แสดงดังภาพที่ 1 จังหวัดที่มีการปลูกมาก ได้แก่ เพชรบูรณ์ แพร่ อุตรดิตถ์ มุกดาหาร เลย และนครราชสีมา โดยมะขามที่นิยมปลูกมาก คือ มะขามเปรี้ยวยักษ์ สีทอง ศรีชมภู หมื่นจง ชันดี น้ำผึ้ง และอินทผลัม (ชูศักดิ์ สัจจพงษ์, 2550) มะขามแต่ละพันธุ์ปลูก (cultivar) มีช่วงระยะเวลาการออกดอกและติดฝักแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 1 เนื้อที่เพาะปลูกมะขามในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2546 (งานภูมิสารสนเทศ ศูนย์สารสนเทศ กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2546)

ตารางที่ 1 การออกดอกและติดฝักของมะขามหวาน (พิจิตร ไซคพัฒนา, 2546)

พันธุ์ปลูก	ออกดอก	ฝักสุก
ขันตี	เมษายน	ธันวาคม
น้ำผึ้ง	เมษายน	ธันวาคม
ศรีชมภู	เมษายน	ธันวาคม
เจ้าเนื้อเศรษฐกิจ	เมษายน	ธันวาคม
หมื่นจง	พฤษภาคม	มกราคม
อินทผาลัม	พฤษภาคม	มกราคม
ปากดุก	พฤษภาคม	มกราคม
เพชรเกษตร	พฤษภาคม	มกราคม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มะขามเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เพราะมะขามมีคาร์โบไฮเดรต โปรตีน กลีโคแลร์ โพลีแซ็กคาไรด์ ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม วิตามินซี วิตามิน บี1 บี2 และ บี3 สูง ส่วนเหล็กและวิตามิน เอ มีปริมาณน้อย กรดอินทรีย์ที่พบในมะขาม คือ กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก และกรดมาลิก เนื้อมะขามมีปริมาณกรดทาร์ทาริกอยู่ประมาณร้อยละ 10 โพลีแซ็กคาไรด์ร้อยละ 8 และน้ำตาลอินเวิร์ทร้อยละ 25-40 โดยความเป็นกรดทั้งหมดในเนื้อมะขามมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 10-16 มะขามที่มีวิตามิน ซี และกรดทาร์ทาริก (ร้อยละ 10 ขึ้นไป) สูงจะให้รสเปรี้ยว นอกจากนี้ มะขามยังสามารถใช้เป็นยารักษาโรคต่างๆ ได้ มะขามมีสรรพคุณเป็นยาถ่ายเสมหะโลหิต ฟอกเลือด แก้ไข้ ระบายอุจจาระ และแก้ท้องเฟ้อได้ โดยเนื้อจะมีผลโดยตรงต่อระบบการย่อยอาหารและการขับถ่าย ในด้านการใช้เป็นยาระบายนั้น สารสำคัญในการออกฤทธิ์เป็นยาระบายในเนื้อมะขาม คือ กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก และกรดมาลิก โดยใช้มะขามในรูปของ tamarind whey สามารถเตรียมโดยนำเนื้อมะขามต้มสุกมาผสมกับนมในอัตราส่วน 1 ต่อ 40 ขนาดที่ใช้ คือ 5-57 มิลลิลิตร (กัญญา ดิวีเศษ และคณะ, 2537; Felter และ Lloyd, 1898; British Pharmaceutical Codex, 1911; Morton, 1967, 1987; Prakas, Gupta และ Mathur , 1979; Larsen และคณะ, 1984; Gunasena, Hughes และ International Centre for Underutilized Crops, Institute of Irrigation and Development Studies, University of Southampton; 2000, 2001)

ในปัจจุบัน ประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาและวิจัยองค์ประกอบและสรรพคุณของมะขามพันธุ์ปลูกต่างๆที่นิยมปลูกในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในเนื้อมะขามจึงทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่ามะขามพันธุ์ปลูกใดมีฤทธิ์เป็นยาระบายที่ดี จากงานวิจัยของ Zhanguo และ Jiuru (2002) ที่ทำการศึกษาวิธีการแยกพร้อมกันกับการหาปริมาณของกรดอินทรีย์ คือ กรดออกซาลิก กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก วิตามินซี กรดซิตริก และกรดซัคซินิก ในพืชสมุนไพรวัย *Fructus mume* ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่า วิธีการที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถแยกและหาปริมาณกรดอินทรีย์ 6 ชนิด พร้อมกันได้ภายในเวลา 7 นาที ดังนั้นวิธีการนี้จึงน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในเนื้อมะขามได้

การควบคุมคุณภาพและมาตรฐานในการผลิตยาจากพืชสมุนไพรวัยในปัจจุบันนี้ นอกจากการตรวจวิเคราะห์สารทุติยภูมิที่ผลิตจากพืชสมุนไพรวัยนั้นๆ แล้วยังสามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีหรือตัวยาที่ออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรวัยด้วย (Joshi และคณะ, 2004) เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นสาร

พันธุกรรมซึ่งมีเอกลักษณ์เฉพาะไม่ซ้ำกันในสิ่งมีชีวิต เช่นเดียวกับลายพิมพ์ของนิ้วมือที่ไม่เหมือนกันในแต่ละบุคคล จึงเรียกเอกลักษณ์เฉพาะนี้ว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) (วิชัย บุญแสง และคณะ, 2537) ข้อดีของการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ มีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะในสิ่งมีชีวิต และไม่มีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ตัวอย่างของพืชสมุนไพรที่มีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ เช่น ขมิ้น และโสม การเปรียบเทียบวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogeny) เช่น ในพืชชนิด *Panax* โดยการหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA และยีน *trnK* ของพืชสมุนไพรดังกล่าว เป็นต้น (Sasaki และคณะ, 2001, 2002; Zhu และคณะ, 2002, 2003) และใช้ในการค้นหาแหล่งกำเนิดของพืชชนิดต่างๆ เช่น การศึกษาแหล่งกำเนิดและความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะขามจากประเทศในทวีปต่างๆ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ (RAPD-PCR) (Diallo และคณะ, 2007)

มะขามเป็นไม้ผลที่มีคุณประโยชน์นานับประการ เพราะทุกส่วนของมะขามสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นทางด้านยา อาหาร เครื่องสำอาง และใช้ประโยชน์อื่นๆ โดยเฉพาะการใช้เป็นยาระบายแก้อาการท้องผูกในหลายประเทศมาตั้งแต่สมัยโบราณต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน และในประเทศไทยนั้นมีมะขามที่นิยมปลูกหลายพันธุ์ปลูก ซึ่งทุกพันธุ์ปลูกนั้นมีชื่อวิทยาศาสตร์ชื่อเดียวกันตามที่ได้กล่าวมาตั้งขั้นต้นแล้ว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะพิสูจน์เอกลักษณ์ของมะขามต่างพันธุ์ปลูกโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับองค์ประกอบเคมีของมะขามพันธุ์ปลูกที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายที่ดี การวิจัยอาจนำมาใช้ประโยชน์ในการเลือกพันธุ์ปลูกของมะขามเพื่อนำมาใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ยาระบายจากมะขามซึ่งมีราคาถูกและมีอันตรายน้อยกว่ายาระบายที่ใช้ในปัจจุบัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์มะขามต่างพันธุ์ปลูกที่มีฤทธิ์ยาระบายที่เพาะปลูกในประเทศไทย โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับองค์ประกอบเคมีในเนื้อมะขาม เทคนิคการศึกษาเครื่องหมายระดับโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบนยีน ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (*rbcL*) ในคลอโรพลาสต์และดีเอ็นเอส่วน internal transcribed (ITS) ในนิวเคลียส และโดยวิธีการวิเคราะห์โดยเทคนิค RAPD-PCR จากตัวอย่างมะขามที่มีฤทธิ์ยาระบายชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่เพาะปลูกที่จังหวัดเพชรบูรณ์

ขอบเขตและวิธีดำเนินการวิจัย

1. คัดเลือกพันธุ์ปลู๊กของมะขามชนิดเปรี้ยวและหวาน อย่างน้อย 3 พันธุ์ปลู๊ก ที่ปลู๊กมากในประเทศไทยและรวบรวมเก็บตัวอย่างที่เลือกศึกษา
2. ศึกษาข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของสารอาหารและวิธีการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้อง
3. เตรียมน้ำสกัดมะขามและส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ฤทธิ์ยาระบายในสัตว์ทดลองหนูขาว (rats) ที่ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. คัดเลือกมะขาม 3 พันธุ์ปลู๊ก ที่มีฤทธิ์ยาระบายมาศึกษาต่อไป
5. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารอาหารและเกลือแร่ในตัวอย่างมะขามพันธุ์ปลู๊กที่คัดเลือกมาศึกษา
6. วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างมะขาม 3 พันธุ์ปลู๊ก ที่เลือกศึกษาโดยเทคนิค HPLC
7. ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างมะขาม 3 พันธุ์ปลู๊ก ที่เลือกศึกษาโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบนยีน *rbcL* และดีเอ็นเอส่วน ITS และโดยวิธี RAPD-PCR
8. พิสูจน์พันธุ์ปลู๊กของมะขามโดยประเมินลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับองค์ประกอบกรดอินทรีย์ของมะขาม 3 พันธุ์ปลู๊ก ที่มีฤทธิ์ยาระบายที่เลือกมาศึกษา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของสารอาหาร เกลือแร่ ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลู๊ก และวิธีการประเมินหาพันธุ์ปลู๊กของมะขามที่มีฤทธิ์ยาระบายที่ดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. สาเหตุและอาการท้องผูก (สุรพล สุรางค์ศรีรัฐ และ สมชาย ลีลากุลสงวงศ์, 2543)

ท้องผูก หมายถึง ความผิดปกติในจำนวนครั้งของการถ่ายอุจจาระ คือ มีช่วงระยะเวลาเว้นห่างในการถ่ายนานกว่าปกติ (ถ่ายน้อยกว่า 3 ครั้งต่อสัปดาห์) และถ่ายลำบาก เนื่องจากอุจจาระแข็งและมีอาการอื่นๆ เกิดร่วมด้วย เช่น อาการท้องอืด แน่นท้อง ลึนเป็นฝ้า และหายใจมีกลิ่นเหม็น เป็นต้น ท้องผูกไม่ใช่อาการร้ายแรงแต่เป็นอาการที่ก่อให้เกิดปัญหาในคนทุกเพศทุกวัย โดยเฉพาะผู้สูงอายุ เพราะอาการท้องผูกไม่เพียงแต่สร้างความอึดอัด แต่ยังส่งผลให้สุขภาพทรุดโทรมลงอีกด้วย เช่น เป็นโรคริดสีดวงทวารหนัก อารมณ์แปรปรวนทำให้มีผลต่อมนุษยสัมพันธ์และบุคลิกภาพในทางลบ และถ้าปล่อยให้ท้องผูกเป็นระยะเวลานานโดยไม่รักษา อาจทำให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

1.1 สาเหตุของท้องผูก

อาการท้องผูกอาจเกิดได้จากสาเหตุต่างๆ เช่น ลำไส้เคลื่อนไหวน้อยผิดปกติหรือโรคอื่นๆ ที่มีผลต่อระบบทางเดินอาหาร โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง โรคของต่อมไร้ท่อ เช่น เบาหวาน ต่อมไทรอยด์ทำงานผิดปกติ การรับประทานยาที่มีเส้นใยน้อย ได้แก่ อาหารพวกแป้งและเนื้อสัตว์ ความเครียด การกลั้นอุจจาระเป็นประจำ และลำไส้อุดตัน เป็นต้น

1.2 การรักษา

การรักษาอาการท้องผูกขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เป็น ความรุนแรงของอาการ การควบคุมปัจจัยที่ส่งเสริมอาการท้องผูก อายุของผู้ป่วยและสาเหตุ โดยทั่วไปอาจเริ่มต้นด้วยการรับประทานอาหารที่มีเส้นใยเพิ่มมากขึ้น ดื่มน้ำให้เพียงพอ ออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ หรือรับประทานยาระบาย แต่ไม่ควรรับประทานยาระบายติดต่อกันเป็นเวลานาน เพราะจะทำให้ลำไส้เคยชินต่อการกระตุ้นทำให้ต้องรับประทานเป็นประจำและอาจต้องเพิ่มขนาดของยา

1.3 การป้องกัน

เมื่อเริ่มมีอาการท้องผูกให้ปฏิบัติดังนี้ ฝึกถ่ายอุจจาระให้เป็นเวลา รับประทานอาหารที่มีเส้นใยสูง ดื่มน้ำให้เพียงพอ และออกกำลังกายสม่ำเสมอ

2. พืชสมุนไพรที่ใช้เป็นยาระบาย

จากตำรับยาแผนโบราณของไทย พบว่า มีพืชสมุนไพรที่ใช้รักษาและบรรเทาอาการท้องผูกหลายชนิด เช่น

2.1 มะขามแขก

มะขามแขก (*Cassia angustifolia* Vahl.) เป็นพืชสมุนไพรยาระบายที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน ส่วนที่นำมาทำเป็นยา คือ ใบและฝักแห้ง แต่ใบจะทำให้มีอาการใช้ท้องมากกว่า สารออกฤทธิ์สำคัญ คือ แอนทราควิโนน (anthraquinone) ซึ่งประกอบด้วยสารเซนโนไซด์ (sennoside) A, B, C และ D โดยออกฤทธิ์กระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย ข้อควรระวังในการใช้ยาระบายมะขามแขก คือ การใช้ยาระบายมะขามแขกติดต่อกันเป็นระยะเวลานานจะทำให้ร่างกายขาดโพแทสเซียมและทำลายระบบประสาทที่ควบคุมการบีบตัวของลำไส้ ไม่ควรใช้ในหญิงมีครรภ์ ผู้ป่วยโรคลำไส้อักเสบ โรคทางเดินอาหารอุดตัน และห้ามใช้ในเด็กอายุต่ำกว่า 6 ปี (ดวงรัตน์ เขียวชาญวิทย์, 2545; Ploss, 1975; Smith, 1968)

2.2 เมล็ดแมงลัก

เมล็ดแมงลัก (*Ocimum basilicum* Linn.) เป็นยาระบายที่ช่วยเพิ่มกากอาหารทำให้มีปริมาณอุจจาระมากขึ้น โดยเมือกจะช่วยหล่อลื่นและทำให้อุจจาระอ่อนตัว ข้อควรระวัง คือ ต้องใช้น้ำให้มากพอเพื่อให้เมล็ดแมงลักพองตัวเต็มที่ หากเมล็ดแมงลักพองตัวไม่เต็มที่จะไปอุดตันจากกระเพาะอาหารและลำไส้ ทำให้อุจจาระแข็งและอุดตัน (วิทยาลัยพยาบาลสภากาชาดไทย, 2549)

2.3 ชุมเห็ดเทศ

ชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata* Linn.) เป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์เป็นยาระบาย โดยมีแอนทราควิโนนและไกลโคไซด์ (glycoside) เป็นสารออกฤทธิ์กระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ใหญ่ เช่นเดียวกับมะขามแขก ข้อควรระวัง คือ ไม่ควรใช้ชุมเห็ดเทศติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน เพราะอาจทำให้ร่างกายสูญเสียน้ำและเกลือแร่ ห้ามใช้ในผู้ป่วยที่ลำไส้อุดตันหรือมีอาการอักเสบของลำไส้อย่างเฉียบพลัน (Ogunti และ Elujoba, 1993; Thamlikitkul และคณะ, 1990)

2.4 กัลยน้ำว่า

กัลยน้ำว่าสุก (*Musa sapientum* Linn.) ใช้แก้อาการท้องผูกได้ดี เพราะมีเพกติน (pectin) สูง และช่วยเพิ่มกากอาหาร นอกจากนี้ ยังมีเมือกช่วยในการขับถ่ายให้สะดวกยิ่งขึ้น

2.5 มะขาม

มะขาม (*Tamarindus indica* Linn.) มีฤทธิ์เป็นยาระบาย โดยเนื้อจะมีผลโดยตรงต่อระบบการย่อยอาหารและการขับถ่าย สารสำคัญในการออกฤทธิ์เป็นยาระบายในเนื้อมะขาม คือ กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดทาร์ทาริก กรดซิตริก และกรดมาลิก โดยออกฤทธิ์กระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ (Martindale, 1989; Felter และ Lloyd, 1998; British Pharmaceutical Codex, 1911; Morton, 1967, 1987)

3. มะขาม (*Tamarindus indica* Linn.)

มะขามมีถิ่นกำเนิดในป่าที่ราบแห้งเขตร้อนของทวีปแอฟริกาตะวันออก แล้วกระจายไปในแถบละตินอเมริกา หมู่เกาะแถบแคริบเบียน และทวีปเอเชีย (Gibbon และ Pain, 1985; Purseglove, 1968) มะขามได้เข้ามามีถิ่นกำเนิดรองในเขตร้อนของทวีปเอเชียมาเป็นเวลานาน ปัจจุบันได้มีการปลูกมะขามกันอยู่ทุกประเทศในเขตร้อน และเป็นพืชเศรษฐกิจพื้นบ้านที่สำคัญของประเทศอินเดีย และประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์, 2538; Gibbon และ Pain, 1985; Purseglove, 1968) ในประเทศไทยมีการปลูกทั้งมะขามเปรี้ยวและมะขามหวานตามจังหวัดต่างๆ จังหวัดที่มีการปลูกมาก ได้แก่ เพชรบูรณ์ เลย ลำปาง เชียงใหม่ นครราชสีมา และอุบลราชธานี โดยมะขามที่นิยมปลูกมาก คือ มะขามเปรี้ยวยักษ์ สีทอง ศรีชมภู หมื่นจง ชันดี น้ำผึ้ง และอินทผลัม (ชูศักดิ์ สัจจพงษ์, 2550)

3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะขามมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tamarindus indica* Linn. (เต็ม สมิตินันท์, 2544) เป็นพืชอยู่ในชั้น (class) Dicotyledonae อันดับ (order) Leguminales วงศ์ (family) Leguminosae วงศ์ย่อย (subfamily) Caesalpinioideae สกุล (genus) *Tamarindus* ชนิด (species) *indica* มีชุดโครโมโซม $2n = 24$ (Gibbon และ Pain, 1985; Purseglove, 1968) มะขามเป็นไม้ยืนต้นตระกูลถั่วขนาดใหญ่ มีการเจริญเติบโตช้า โดยมีอัตราการเจริญเติบโตประมาณ 0.5-0.8 เมตรต่อปี เป็นพวกกึ่งเขียวตลอดปี (semi-evergreen) สามารถเจริญเติบโตแก่กิ่งก้านออกไปได้ถึง 25 เมตร (Gibbon และ Pain, 1985) เป็นพืชที่มีขนาดทรงพุ่มใหญ่ มีความสูง 20 เมตร (Purseglove, 1968; Williams และคณะ, 1979)

3.2 การใช้ประโยชน์

มะขามเป็นพืชที่มีประโยชน์มาก เกือบทุกส่วนของต้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นพืชสมุนไพรรักษาโรคเบื้องต้น เช่น การใช้เป็นยาระบายและบรรเทาอาการไข้ ใช้ประกอบอาหาร เป็นต้น จึงพอจำแนกการใช้ประโยชน์จากส่วนต่างๆ ได้ ดังนี้

3.2.1 ลำต้น

ลำต้นของมะขามจะให้ไม้เนื้อแข็ง จึงนิยมนำมาหั่นเสกเสริม เป็นต้น นอกจากนี้แก่นไม้มะขามซึ่งแข็งแรงใช้ทำโครงไม้ ส่วนเนื้อไม้ใช้เผาถ่านได้ถ่านที่มีคุณภาพดีด้วย (Gibbon และ Pain, 1985; Purseglove, 1968)

3.2.2 เนื้อ

เนื้อมะขามเป็นส่วนที่มีค่ามากที่สุดของมะขาม เนื่องจากมีการนำไปใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายทั้งในครัวเรือนและวงการอุตสาหกรรม (Kulkarni และคณะ, 1993) เนื้อมะขามถูกใช้ประโยชน์ในการเป็นยารักษาโรคมาเป็นเวลานานตั้งแต่สมัยโบราณมาจนถึงปัจจุบัน โดยเฉพาะการใช้เป็นยาระบายสารสำคัญในการออกฤทธิ์เป็นยาระบายในเนื้อมะขาม คือ กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก และกรดมาลิก โดยใช้มะขามในรูปของ tamarind whey สามารถเตรียมโดยนำเนื้อมะขามต้มสุกมาผสมกับนมในอัตราส่วน 1 ต่อ 40 ขนาดที่ใช้ คือ 5-57 มิลลิกรัม (กัญจนานันท์ และคณะ, 2537; Felter และ Lloyd, 1898; British Pharmaceutical Codex, 1911; Morton, 1967, 1987; Prakas, Gupta และ Mathur, 1979; Larsen และคณะ, 1984; Gunasena, Hughes และ International Centre for Underutilized Crops, Institute of Irrigation and Development Studies, University of Southampton; 2000, 2001)

3.2.3 เมล็ด

เมล็ดมะขามเป็นส่วนที่เหลือ (by-product) จากการแปรรูปฝักมะขาม อย่างไรก็ตาม เมล็ดมะขามยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ในอดีตเมล็ดมะขามเป็นเพียงของเสีย แต่ในปี ค.ศ. 1942 นักวิทยาศาสตร์ประเทศอินเดีย Ghose และ Krishna พบว่า เนื้อในเมล็ดมะขามมีสารที่ทำให้เกิดเจลได้ (gel-forming substance) ถึง 46-48 % Savur (1948) ได้จดสิทธิบัตรกระบวนการผลิตสารดังกล่าวที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว เรียกว่า เจลโลส (jellose) พอลิโอส (polyose) หรือเพกติน ซึ่งมีประโยชน์ในการเก็บรักษาผลไม้ ใช้เป็นสารคงสภาพ (stabiliser) ในการผลิตไอศกรีม และเป็นสารหรือส่วนประกอบในการผลิตยา (Morton, 1987)

3.3 คุณค่าทางโภชนาการ

มะขามเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เพราะมะขามมีคาร์โบไฮเดรต โปรตีน เกลือแร่ โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม วิตามินซี วิตามิน บี1 บี2 และ บี3 สูง ส่วนเหล็กและวิตามิน เอ มีปริมาณน้อย กรดอินทรีย์ที่พบในมะขาม คือ กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก และ กรดมาลิก เนื้อมะขามมีปริมาณกรดทาร์ทาริกอยู่ประมาณร้อยละ 10 โพแทสเซียมทาร์ทเรต ร้อยละ 8 และน้ำตาลอินเวิร์ตร้อยละ 25-40 โดยความเป็นกรดทั้งหมดในเนื้อมะขามมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 10-16 มะขามที่มีวิตามิน ซี และกรดทาร์ทาริก (ร้อยละ 10 ขึ้นไป) สูงจะให้รสเปรี้ยว (Morton, 1967, 1987; Prakas, Gupta และ Mathur , 1979; Larsen และคณะ, 1984; Gunasena, Hughes และ International Centre for Underutilized Crops, Institute of Irrigation and Development Studies, University of Southampton; 2000, 2001)

จากการศึกษาของ Anon (1976), Duke (1981), Ishola และคณะ (1990) และ Meillon (1974) พบว่าปริมาณของส่วนประกอบของสารอาหารในเนื้อมะขามอบแห้งมีค่าดังแสดงในตารางที่ 2 และปริมาณของส่วนประกอบของแร่ธาตุในเนื้อมะขามมีค่าดังแสดงในตารางที่ 3 (Bhattcharya และคณะ, 1994; Ishola และคณะ; Marangoni และคณะ, 1988)

4. กรดอินทรีย์ในมะขาม

ลักษณะเด่นของมะขาม คือ เนื้อมะขามมีความเป็นกรดสูง เพราะกรดอินทรีย์ในเนื้อมะขาม เนื้อมะขามชนิดเปรี้ยวมีปริมาณกรดทาร์ทาริกสูงถึง 12.20-23.80 % ซึ่งสูงกว่าพืชชนิดอื่นๆ ที่มีการศึกษาไว้ (Ulrich, 1970) นอกจากกรดทาร์ทาริกแล้วยังมีกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่พบในมะขาม คือ กรดออกซาลิก มาลิก แอสคอบิก ซักซินิก และซิตริก (Lewis และ Neelakantan, 1964; Singh, 1973; Anon, 1976) โดยกรดแอสคอบิกที่พบในมะขามจะมีปริมาณน้อยมาก ประมาณ 2-20 มิลลิกรัม/100 กรัม (Ishola และคณะ, 1990; Lefevre, 1971) กรดอินทรีย์ที่พบปริมาณมากในเนื้อมะขามมีดังนี้

ตารางที่ 2 ปริมาณของส่วนประกอบของสารอาหารในเนื้อมะขามอบแห้ง (Anon, 1976; Duke, 1981; Ishola และคณะ, 1990; Meillon, 1974)

Constituent	Percentage
Moisture	15.00–30.00
Carbohydrates, total	56.70–70.70
Reducing sugars	25.00–45.00
Proteins	2.00–8.79
Fat/oil/lipid, crude	0.50–2.53
Fiber, crude	2.20–18.30
Total ash	2.10–2.90

ตารางที่ 3 ปริมาณของส่วนประกอบของแร่ธาตุในเนื้อมะขาม (Bhattacharyya และคณะ, 1994; Ishola และคณะ; Marangoni และคณะ, 1988)

Mineral	mg/100g
Potassium	62.00 – 570.00
Magnesium	72.00
Phosphorus	86.00 – 190.00
Calcium	81.00 - 466.00
Sodium	3.00 – 76.70
Copper	21.80
Iron	1.30 - 10.90
Manganese	-
Zinc	1.1

4.1 กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid)

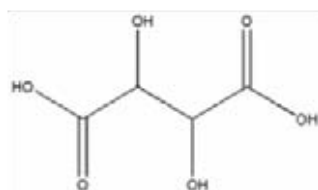
กรดทาร์ทาริก ($C_4H_6O_6$) เป็น dihydroxydicarboxylic acid มีค่า pK_{a1} และ pK_{a2} ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ 2.98 และ 4.34 ตามลำดับ (Gomis, 1992) สูตรโครงสร้าง ของกรดทาร์ทาริกแสดงดังภาพที่ 2 กรดทาร์ทาริกเป็นกรดที่พบได้ในพืชทุกชนิด โดยเฉพาะใน องุ่น กัญชง และมะขาม โดยในเนื้อมะขามพบปริมาณของกรดทาร์ทาริกมากที่สุด (Ulrich, 1970) สารละลายกรดทาร์ทาริกมีฤทธิ์เป็นยาระบาย โดยไปกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ แต่ในทางกลับกัน ถ้ารับประทานกรดทาร์ทาริกในปริมาณสูงมากจะทำให้กระเพาะและลำไส้อักเสบได้เช่นกัน (Martindale, 1989) ปริมาณกรดทาร์ทาริกในเนื้อมะขามจากประเทศไทยแสดงดังตารางที่ 4 (Feungchan และคณะ, 1996)

4.2 กรดมาลิก (Malic acid)

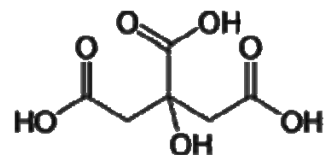
กรดมาลิก ($C_4H_6O_5$) เป็น dihydroxydicarboxylic acid มีค่า pK_{a1} และ pK_{a2} ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ 3.40 และ 5.11 ตามลำดับ (Gomis, 1992) สูตรโครงสร้าง ของกรดมาลิก แสดงดังภาพที่ 2 กรดมาลิกมีโครงสร้าง 2 แบบ คือ L-form (L-malic acid) และ D-form (D-malic acid) ในธรรมชาติจะพบ L-malic acid อยู่ในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากกรดมาลิก เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ใน citric acid cycle ส่วน D-malic acid ได้จากการสังเคราะห์ ในห้องปฏิบัติการ กรดมาลิกพบในผลไม้ที่มีรสเปรี้ยวและมีฤทธิ์เป็นยาระบาย โดยไปกระตุ้นการ บีบตัวของลำไส้ เช่นเดียวกับกรดทาร์ทาริก (Martindale, 1989)

4.3 กรดซิตริก (Citric acid)

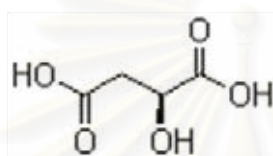
กรดซิตริก ($C_6H_8O_7$) เป็น hydroxytricarboxylic acid มีค่า pK_{a1} , pK_{a2} และ pK_{a3} ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เท่ากับ 3.14, 4.77 และ 6.93 ตามลำดับ (Gomis, 1992) สูตรโครงสร้างของกรดซิตริก แสดงดังภาพที่ 2 ในธรรมชาติจะพบกรดซิตริกอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุก ชนิด เนื่องจากกรดซิตริกเป็นสารตัวกลางที่มีบทบาทสำคัญใน citric acid cycle กรดซิตริกพบใน ผักและผลไม้หลายชนิด เช่น มะขาม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชตระกูลส้ม (citrus fruits) เช่น มะนาว ซึ่งพบปริมาณสูงถึง 8 % ของน้ำหนักแห้ง กรดซิตริกมีฤทธิ์เป็นยาระบาย โดยไปกระตุ้น การบีบตัวของลำไส้เช่นเดียวกับกรดทาร์ทาริกและมาลิก นอกจากนี้ กรดซิตริกยังมีสมบัติเป็นสาร ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) อีกด้วย (Martindale, 1989)



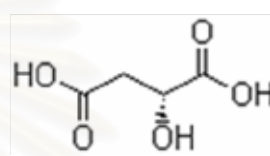
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 2

สูตรโครงสร้างของกรดอินทรีย์หลักที่พบในเนื้อมะขาม (ก) tartaric acid (ข)

citric acid (ค) L-malic acid และ (ง) D-malic acid

(แหล่งที่มา: <http://www.chemblink.com/structures/97-67-6>)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ปริมาณกรดทาร์ทาริกในเนื้อมะขามหวานจากประเทศไทย (Feungchan และคณะ, 1996)

Tamarind cultivar	Tartaric acid (%)
Sithong (สีทอง)	3.18
Piyai (ไผ่ใหญ่)	2.01
Praroj (พระโรจน์)	2.70
Srichomphu (ศรีชมภู)	2.39
Kru-in (ครูอินทร์)	2.70

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ในผลไม้

วิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ในผลไม้ มีดังนี้

5.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมทรี (Spectrophotometric method)

วิธีสเปกโตรโฟโตเมทรีวิเคราะห์กรดอินทรีย์โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างกรดอินทรีย์กับสารทดสอบแล้วเกิดสารประกอบหรือสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีซึ่งสามารถตรวจวัดได้ที่ความยาวคลื่นที่ใช้ในการทดสอบ ก่อนทำการทดสอบต้องทำให้กรดอินทรีย์บริสุทธิ์ด้วย ionic exchange resin และการตกตะกอน เป็นต้น เพื่อป้องกันการรบกวนจากสารชนิดอื่น (Mato และคณะ, 2005) วิธีนี้สามารถใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดทาร์ทาริก มาลิก และแลคติกได้ แต่ไม่สามารถหาปริมาณกรดอินทรีย์สำคัญ คือ กรดซัคซินิก ซิตริก และอะซีติกในน้ำองุ่นและไวน์ได้ (Rebelein, 1961)

5.2 คัพิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Capillary electrophoresis, CE)

เทคนิคคัพิลลารีอิเล็กโตรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE) เป็นเทคนิคการแยกสารที่มีประจุภายในคอลัมน์ขนาดเล็ก (capillary column) ที่บรรจุบัฟเฟอร์ หรือเจลที่มีบัฟเฟอร์ภายใต้สนามไฟฟ้า การแยกสารด้วยเทคนิค CE ใช้ปริมาณสารตัวอย่างน้อยกว่าการแยกสารด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) และโครมาโทกราฟีของเหลว (liquid chromatography) ค่าใช้จ่ายน้อย สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพในการแยกสารดี สามารถใช้แยกสารประเภทต่างๆ ได้ เช่น กรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิก สารอินทรีย์ และกรดอินทรีย์ เป็นต้น CE แบ่งเป็นเทคนิคย่อยได้หลายวิธี เช่น คัพิลลารีโซนอิเล็กโตรโฟรีซิส (capillary zone electrophoresis, CZE) และคัพิลลารีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (capillary gel electrophoresis, CGE) เป็นต้น โดย CZE เป็นวิธีที่ง่ายและมีการใช้มากที่สุดในปัจจุบัน ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CE จะใช้ตัวอย่างและบัฟเฟอร์น้อยกว่า และมีความสามารถในการแยกที่ดีกว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) แต่เครื่องมักจะมีราคาแพงกว่าและยังมีข้อจำกัดในเรื่องปัญหาของส่วนหัวฉีดซึ่งไม่ได้ฉีดด้วยไซริงก์แบบโครมาโทกราฟี ความจำเป็นที่ต้องใช้ความต่างศักย์ที่สูงมาก และบัฟเฟอร์ที่ใช้ต้องมีความเข้มข้นสูง (ลีณา สุนทรสุข, 2544; อรรชมา ภูประเสริฐ และ มาลัย สติรพันธุ์, 2549)

ตัวอย่างการใช้เทคนิค CE ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ ได้แก่ การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอบิกในผลของ *Lycopersicon* (Galiana-Balaguer และคณะ, 2001) และการ

วิเคราะห์ปริมาณกรดทาร์ทาริก มาลิก และซิตริกในน้ำองุ่น และกรดทาร์ทาริก มาลิก ซักซินิก อะซีติก แลคติก และซิตริกในไวน์โดยเทคนิค CZE ด้วยยูวี ดีเทคเตอร์ (Mato และคณะ, 2007)

5.3 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)

เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้แยกสารประกอบ (substance) โดยอาศัยหลักการความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของสารประกอบในเฟสคงที่ (stationary phase) ของคอลัมน์โดยมีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นตัวพาไป เมื่อต่อเข้ากับดีเทคเตอร์ (detector) จะสามารถตรวจวัดสารที่ออกมาจากคอลัมน์ได้อย่างต่อเนื่อง โดยสามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพ (qualitative analysis) และเชิงปริมาณ (quantitative analysis) เทคนิค HPLC สามารถวิเคราะห์สารได้หลายชนิด เช่น สารอินทรีย์และสารประกอบทางชีวภาพ เป็นต้น การแยกสารจะประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อสารมีอัตราการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์ สารประกอบที่ถูกแยกจะเคลื่อนที่ไปตามความยาวทั้งหมดของคอลัมน์โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป Horvath และคณะ (1976) พบว่า เฟสคงที่ที่ไม่มีขั้ว เช่น octadecyl silica (C18) สามารถแยกสารมีขั้ว เช่น กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ดี โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า pH ที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการแตกตัวของไอออน (ionization) ของสารที่ต้องการแยก

โดยทั่วไปในการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ในผลไม้ ไวน์ สมุนไพรรหรืออาหาร นิยมใช้เทคนิค HPLC เฟสผั้กลับ (reverse-phase HPLC) โดยเฟสคงที่ที่นิยมใช้มากในการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ คือ C18 (C18 column) และเฟสเคลื่อนที่มักใช้น้ำ บัฟเฟอร์เพื่อรักษาค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และความแรงไอออน (ionic strength) หรือใช้สารผสมระหว่างน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอลหรืออะซีโตไนล์ ตัวอย่างการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ในผลไม้ ไวน์ สมุนไพรรหรืออาหาร เช่น การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ในพืชสมุนไพรร *Fructus mume* (Zhanguo และ Jiuru, 2002) น้ำผลไม้และน้ำหวานของเกสรดอกไม้ (Cunha และคณะ, 2002) และไวน์ขาว (Kordis-Krapez และคณะ, 2001) ด้วยเทคนิค reverse-phase HPLC

6. การศึกษาในระดับโมเลกุลของพืช (Molecular markers)

โมเลกุลเครื่องหมาย หรือตัวบ่งชี้ระดับโมเลกุล (molecular markers) หมายถึงชิ้นส่วนของสายดีเอ็นเอ หรือโปรตีนที่ใช้เป็นเครื่องหมายในการจัดจำแนกพันธุ์ปลูกของพืชแต่ละชนิดออกจากกัน โดยอาศัยพันธุกรรมและวิธีทางอณูชีววิทยาที่กระทำต่อสารพันธุกรรม ทั้งวิธีที่

ใช้จีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) โดยตรง หรือวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) จากดีเอ็นเอต้นแบบและตัดสายดีเอ็นเอของผลผลิต PCR (PCR product) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เพื่อให้ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) หรือวิธีการอื่นๆ ที่ทำให้เกิดรูปแบบจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิดซึ่งเรียกว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ทำให้สามารถทราบถึงความแตกต่างของสายดีเอ็นเอหรือโปรตีนเครื่องหมายที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิดได้

การเกิดรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิดจะใช้วิธีการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction, PCR) เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด ซึ่งสามารถแบ่งวิธีการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือความหลากหลายของพืชแต่ละชนิดออกเป็น 3 วิธี คือ

- 1) Hybridization-based methods เป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดสายจีโนมิกดีเอ็นเอได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ตามความจำเพาะในการตัดสายดีเอ็นเอของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ แยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) และตรวจสอบด้วยการจับ (hybridization) ของดีเอ็นเอตรวจจับ (DNA probe) ที่เป็นดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA) ซึ่งติดฉลากด้วยกัมมันตรังสีหรือสารเคมี จะได้รูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายตำแหน่ง (multilocus band pattern) ที่มีความหลากหลาย
- 2) Sequencing-based methods เป็นวิธีการจำแนกชนิดของพืช โดยวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในรูปแบบต่างๆ เช่น การเพิ่ม (insertion) การแทนที่ (substitution) หรือการขาดหาย (deletion) ที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 1 นิวคลีโอไทด์ ขึ้นไป ในส่วนของยีนที่มีการใช้ในการศึกษา เช่น Internal transcribed spacer (ITS) และยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น ยีน *trnK* ยีน *matK* และยีน *rbcL* เป็นต้น
- 3) PCR-based method เป็นวิธีที่ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) หรือไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับและดำเนินปฏิกิริยา PCR สร้างสายดีเอ็นเอเป้าหมายขึ้นมาใหม่ ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส จะได้รูปแบบหรือชิ้นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด ซึ่งสามารถใช้จำแนกความหลากหลายของพืชได้

นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้วิธีการอื่นเข้าร่วมกับปฏิกิริยา PCR เช่น ใช้การตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เป็นต้น การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชชนิดต่างๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงวิธีการตรวจวิเคราะห์พันธุกรรม การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรม (genotype identification) ออนุกรมวิธาน (taxonomy) การปรับปรุงพันธุ์พืช (plant breeding) การตรวจวิเคราะห์โรค (diagnostics) ระบาดวิทยา (epidemiology) ในพืชชนิดต่างๆ ซึ่งมีความรวดเร็วและถูกต้องมากขึ้น เมื่อเทียบกับการตรวจสอบโดยใช้สัณฐานวิทยา (morphology) (ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ, 2550)

6.1 Hybridization-based methods

ตัวอย่างเช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นวิธีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ การตัดสายดีเอ็นเอจะมีตำแหน่งจำเพาะและมีความแม่นยำทุกครั้ง ถ้าดีเอ็นเอพืชเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่มีการตัดสายของเอนไซม์ ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งแบบ deletion และ insertion ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถตัดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นได้ เกิดเป็นรูปแบบของดีเอ็นเอที่ต่างออกไป ซึ่งจะแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น วิธีนี้มีเทคนิคดังนี้ หลังจากตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและแยกชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้ายดีเอ็นเอไปไว้บนตัวกลางผิวบาง (membrane) ด้วยวิธี southern blotting แล้วนำมาจับกับดีเอ็นเอตรวจจับที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสีหรือสารเคมี จะได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปแล้วเทคนิค RFLPs ใช้ในการพิสูจน์ต้นกำเนิดของพืชชนิดพิเศษโดยอาศัยแผนผังลำดับวิวัฒนาการ แต่ข้อเสียของเทคนิคนี้เมื่อนำไปใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ ผลวิเคราะห์ที่ได้ไม่ได้แสดงถึงความเหมือนกันของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด อย่างจำเพาะเจาะจง มีค่าใช้จ่ายสูง และจำนวนตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนสายดีเอ็นเอควรมีอย่างน้อย 2-3 ตำแหน่ง (Vasudevan, 2007)

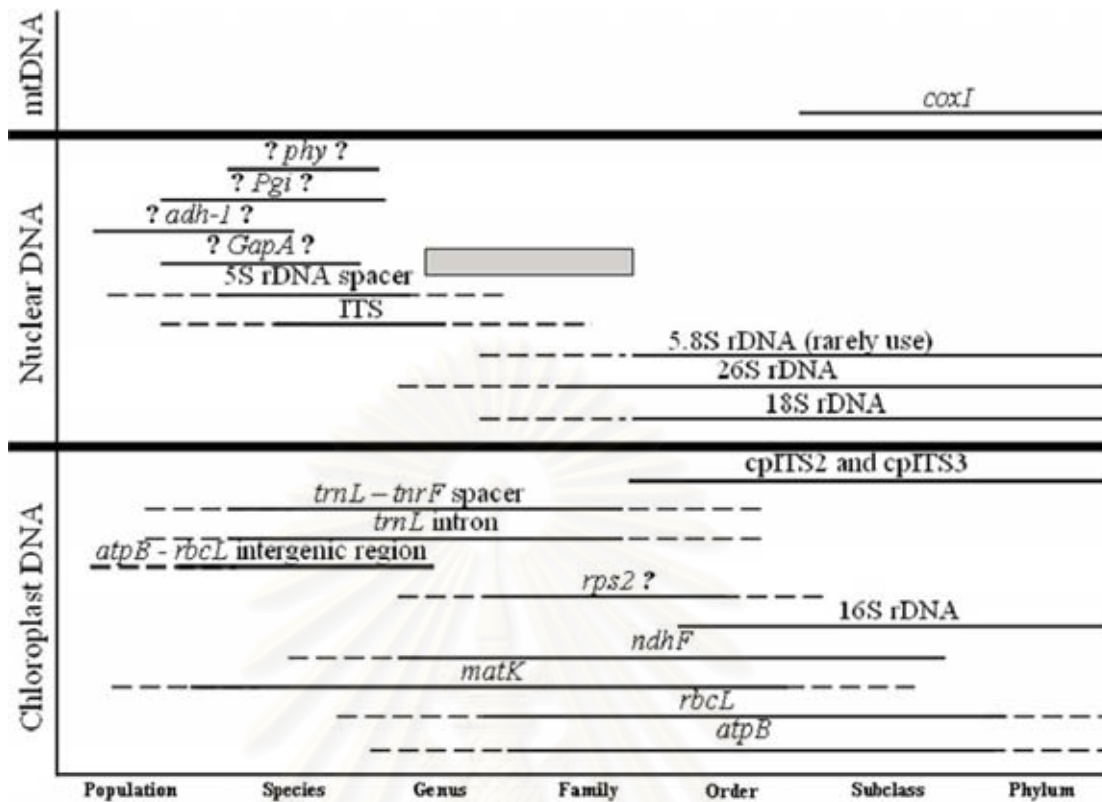
6.2 Sequencing-based methods

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการ (phylogeny) ข้อมูลและการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์มีความสำคัญในการจัดจำแนกระดับโมเลกุล (molecular systematic) และการทำอนุกรมวิธานพืช (plant systematic) เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นหน่วยพื้นฐาน (basic unit) ของดีเอ็นเอในการแปลรหัสเป็นโปรตีนในสิ่งมีชีวิต และชุดข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เป็นข้อมูลที่ละเอียดและมี

ประสิทธิภาพเหมาะแก่การศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการ ถึงแม้เทคนิคนี้จะสามารถตรวจสอบความแตกต่างของพืชได้อย่างละเอียดและมีประสิทธิภาพ แต่เทคนิคนี้มีค่าใช้จ่ายสูง คือ ถ้ายีนที่ทำการศึกษามีความยาวมากเท่าใด ค่าใช้จ่ายในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ก็จะเพิ่มมากขึ้น ยิ่งไปกว่านั้น ยีนหรือหรือดีเอ็นเอส่วนต่างๆ ของจีโนม (genome) อาจมีอัตราการพัฒนาแตกต่างกัน ส่วนการเลือกยีนหรือดีเอ็นเอส่วนต่างๆ ของจีโนมมาศึกษานั้นขึ้นอยู่กับระดับของการจัดจำแนกพืชที่ต้องการศึกษา (Soltis และ Soltis, 1998; ฤทธิ วัฒนชัยยิ่งเจริญ, 2550)

จีโนมของพืชประกอบด้วย 3 ส่วนด้วยกัน คือ นิวเคลียร์จีโนม (nuclear genome, nDNA) คลอโรพลาสต์จีโนม (chloroplast genome, cpDNA) และไมโทคอนเดรียจีโนม (mitochondria genome, mtDNA) ซึ่ง 2 ส่วนหลังจัดเป็นออร์กาเนลล์จีโนม (organelle genome) ทั้ง cpDNA และ mtDNA ประกอบด้วยดีเอ็นเอที่ให้รหัสสร้าง RNA และโปรตีนที่จำเป็นของออร์กาเนลล์เอง mtDNA ไม่นิยมใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายเนื่องจากโครงสร้าง ขนาด และการจัดเรียงตัวของยีนมีความแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช nDNA และ cpDNA เป็นดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกระดับโมเลกุลและการทำอนุกรมวิธานพืช nDNA มีความซับซ้อน (complexity) และ มีการเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำ (repetitive) สูง ในขณะที่ cpDNA เหมาะสำหรับการศึกษารพัฒนาและวงศ์วานวิวัฒนาการในระดับที่สูงกว่าระดับสกุล (species level) เพราะ 1) cpDNA เป็นส่วนที่มีปริมาณมากที่สุดของดีเอ็นเอทั้งหมด 2) มีจำนวน primarily single copy gene สูง และ 3) มี conservative rate ของการเกิดการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) สูง nuclear ribosomal DNA (rDNA) เป็นยีนที่พบได้ทั่วไปใน nDNA ซึ่งประกอบด้วยบริเวณคัดลอก (transcribed region) ที่มี external transcribed spacer (ETS), 18S rDNA, internal transcribed spacer 1 (ITS-1), 5.8S rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS-2) และ 26S rDNA ตามลำดับ ลำดับเบสซ้ำถูกแยกออกจากลำดับเบสถัดไปด้วย intergenic spacer (Soltis และ Soltis, 1998)

ยีนที่นิยมใช้ศึกษาความหลากหลายด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 3) ได้แก่ ยีน *rbcs* และยีน *Adh* ในนิวเคลียส ดีเอ็นเอส่วน ITS และ 5.8S หรือ 18-26S rDNA และยีน *rbcl* และยีน *matK* ในคลอโรพลาสต์ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้ในการศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) และจำแนกพืชในระดับที่ต่ำกว่าสกุล (genus) หรือลึกลงไปกว่านั้นได้ (Soltis และ Soltis, 1998) เช่น การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ศึกษาความสัมพันธ์ในระดับสกุล (generic relationship) ภายในวงศ์เดียวกันของพืชมีดอก (flowering plant) ในพืชวงศ์ Onagraceae



ภาพที่ 3 แผนผังแสดงระดับอนุกรมวิธานโดยประมาณของยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ นิวเคลียส และไมโทคอนเดรีย และดีเอ็นเอในบริเวณต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการโดยตั้งสมมติฐานจากพืชมีดอก เครื่องหมายปรัชนีย์ (?) แสดงถึง ยีนที่ไม่นิยมใช้ในการศึกษา เส้นประ แสดงถึง ระดับอนุกรมวิธานที่สามารถนำยีนหรือดีเอ็นเอนั้นๆ ไปประยุกต์ใช้ได้ คือ ในพืชบางกลุ่มสามารถใช้ยีนหรือดีเอ็นเอส่วนนี้ศึกษาในระดับอนุกรมวิธานที่ต้องการได้ (Johnson และ Soltis, 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(Conti และคณะ, 1993), *Delephinium viridescens* (Morgan และคณะ, 1994) และ Berberidaceae (Kim และ Jansen, 1996) การใช้ดีเอ็นเอส่วน ITS ศึกษาหาความสัมพันธ์ในพืชสกุล *Lilium* (Nishikawa และคณะ, 1999) และ *Bauhinia* สกุลย่อย *Phanera* (Hao และคณะ, 2003) และการศึกษาหาความสัมพันธ์ในพืชสกุล *Lathyrus* โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS ร่วมกับดีเอ็นเอบริเวณ *trnL-F* และ *trnS-G* (Kenicer และคณะ, 2005) เป็นต้น

6.3 PCR-based methods

เป็นวิธีที่มีการใช้ปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมด้วย วิธีการนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่มีความจำเพาะ (specific segment) ในหลอดทดลองด้วยการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะและเป็นดีเอ็นเอคู่สม ซึ่งไพรเมอร์จะเป็นตัวกำหนดความยาวของสายดีเอ็นเอและใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) ในการนำเบสต่างๆ คือ dATP dCTP dGTP และ dTTP มาต่อกันทำให้สายของดีเอ็นเอยาวขึ้น การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีที่มีการใช้ปฏิกิริยา PCR ได้แก่

6.3.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD เป็นวิธีการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR แบบสุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลักษณะพิเศษ ซึ่งเรียกว่า Arbitrarily primer หรือ Anchor primer มีความยาวเพียง 10 นิวคลีโอไทด์ โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชชนิดนั้นๆ มาก่อน ผลผลิต PCR ที่ได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันหลายชิ้น ซึ่งมีรูปแบบคล้ายลายพิมพ์ เรียกว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หากพืชชนิดใดมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน จะได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แผนที่พันธุกรรม (genetic maps) หรือเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งสามารถบ่งบอกลักษณะจำเพาะของสายพันธุ์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกันในพืชชนิดต่างๆ และอาจพัฒนาไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ต่างๆ ได้ เช่น การพิสูจน์ชนิด จำแนกพันธุ์ปลูก และตรวจสอบแหล่งกำเนิดของพืช นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ในรูปแบบต่างๆ มาใช้โดยอาศัยวิธีการนี้ เช่น Sequence-Tagged Sites (STS) marker (สุชาติดา สุขห่อง, 2548; ฤทธิ วัฒนชัยยิ่งเจริญ, 2550) ตัวอย่างการใช้เทคนิค RAPD ได้แก่ การใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกชนิดของพืชสกุล *Derris* จำนวน 5 ชนิด คือ *D. scandens*, *D. elliptica*, *D. malaccensis*, *D. trifoliata* และ *D. reticulata*

(Sukrong และคณะ, 2005) Encheverrigaray และคณะ (2001) ใช้เทคนิค RAPD และองค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยในการจำแนกพันธุ์ปลูกของไทย ได้แก่ พันธุ์ปลูก Burpee Blumen Battle SEM Isla และพันธุ์ปลูกพื้นเมือง Brandolini และคณะ (2005, 2006) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบเคมีร่วมกับสารพันธุกรรมของกระเทียมและข้าวในประเทศอิตาลี จากผลการทดลองพบว่าองค์ประกอบเคมีของกระเทียมอิตาลีสัมพันธ์กับสารพันธุกรรม แต่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในข้าว นอกจากนี้การใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกชนิดและพันธุ์ปลูกของพืชแล้ว เทคนิค PARD ยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบแหล่งกำเนิดของมะขามได้อีกด้วย โดยมะขามน่าจะมีแหล่งกำเนิดมาจากทวีปแอฟริกา (Diallow และคณะ, 2007)

ถึงแม้ว่านักวิจัยหลายกลุ่มนิยมใช้เทคนิค RAPD ในการวิจัย เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถทำได้รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายไม่สูงเหมือนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชที่ต้องการศึกษามาก่อน แต่เทคนิคนี้มีข้อเสีย คือ มีความสามารถในการซ้ำต่ำ ดังนั้นจึงควรทำการทดลองซ้ำในส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อให้ได้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถทำซ้ำได้ (Atienzar และ Jha, 2006)

6.3.2 Amplified Fragment Length polymorphism (AFLP)

AFLP เป็นวิธีที่มีความไวสูงต่อการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของซันดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งตรวจสอบได้โดยปฏิกิริยา RCR ซึ่งเป็นการรวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน สารพันธุกรรมจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีตำแหน่งจดจำแตกต่างกัน ซันดีเอ็นเอที่ได้จะถูกต่อเข้ากับซันดีเอ็นเอสังเคราะห์ที่ทราบรหัส (adapter) 2 ชนิด และเพิ่มปริมาณซันดีเอ็นเอบางชิ้นด้วยปฏิกิริยา PCR โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับซันดีเอ็นเอสังเคราะห์ทราบรหัสและเบสคัดเลือก และตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสใน polyacrylamide gel (Vos, 1995) ข้อดีของ AFLP คือมีความแน่นอนของผลการตรวจสอบสูงเหมือน RFLP และสามารถตรวจสอบความหลากหลายได้หลายตำแหน่งภายในสารพันธุกรรมเหมือน RAPD ตัวอย่างของการนำเทคนิค AFLP ไปใช้ประโยชน์ เช่น Dhar และคณะ (2006) ใช้ข้อมูลที่ได้จากเทคนิค AFLP ร่วมกับองค์ประกอบเคมีในการศึกษา *Withania somnifera*

7. ยีน ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (*rbcl*)

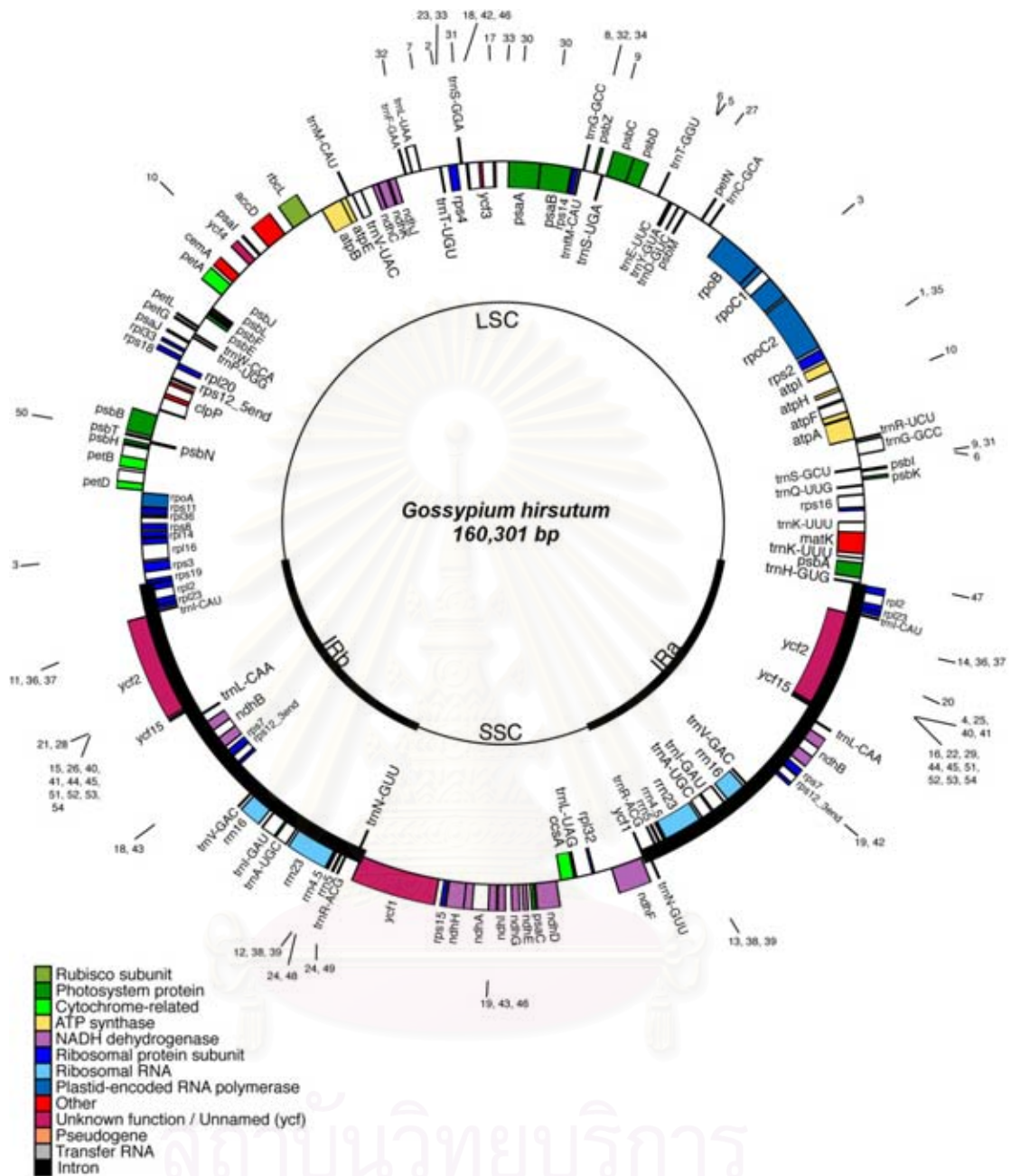
ยีน ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (*rbcl*) มีตำแหน่งอยู่ในบริเวณ large single-copy ของคลอโรพลาสต์จีโนม ถอดรหัส (encode) ให้ large subunit ของ ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (RUBISCO) ซึ่งมีหน้าที่ตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ ยีน *rbcl* มีขนาดประมาณ 1,428, 1,431 หรือ 1,434 bp โดยขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ตำแหน่งของยีน *rbcl* บน large single-copy ของคลอโรพลาสต์จีโนม แสดงดังภาพที่ 4

นักวิจัยกลุ่มต่างๆ นิยมใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในการศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogeny) หรือจำแนกชนิดของพืช เพราะยีน *rbcl* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แน่นอน (unambiguous), ไม่มี intron แทรกอยู่ภายในยีน และเกิดการเพิ่มหรือการขาดหายไปของเบส (indels) ต่ำ (Clegg, 1993; Soltis และ Soltis, 1998) การนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ การศึกษาหาความสัมพันธ์ในระดับสกุล (generic relationship) ภายในวงศ์เดียวกันของพืชมีดอก (flowering plant) ในพืชวงศ์ Onagraceae (Conti และคณะ, 1993), *Delephinium viridescens* (Morgan และคณะ, 1994) และ Berberidaceae (Kim และ Jansen, 1996) เป็นต้น และในบางกรณีที่สามารถใช้ ยีน *rbcl* ในการศึกษาความสัมพันธ์ในระดับชนิดร่วมสกุลเดียวกัน (congeneric species) ได้ เช่น พืชสกุล *Cornus* (Xiang และคณะ, 1993), *Saxifraga* (Soltis และคณะ, 1996) และ *Drosera* (Williams และคณะ, 1994) แต่ข้อจำกัดของการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม คือ สามารถใช้ศึกษาในระดับสกุลขึ้นไปเท่านั้น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* บางส่วนของ *Tamarindus indica* ที่ Kaess (1995) ได้ทำการศึกษา รายงานไว้ใน GenBank (accession no. Z70160) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* บางส่วนของ *T. indica* แสดงดังภาพที่ 5

8. Internal Transcribed Spacer (ITS)

ดีเอ็นเอส่วน Internal Transcribed Spacer (ITS) เป็นส่วนหนึ่งของ 18S-26S rDNA ที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear genome) แต่ไม่ได้อยู่รวมเป็นส่วนหนึ่งของไรโบโซม (ภาพที่ 6) ดีเอ็นเอส่วน ITS (ITS-1 และ ITS-2) มีบทบาทในการพัฒนาของ rRNAs ที่อยู่ในนิวเคลียส โดยนำ processing domain ของ large และ small subunit ให้เข้ามาใกล้กัน จากหน้าที่ดังกล่าวทำให้เกิดข้อจำกัดทางวิวัฒนาการของโครงสร้างและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-1 และ ITS-2 (Hershkovitz และ Zimmer, 1996) ITS-1 และ ITS-2 นิยมใช้ในการศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการหรือจำแนกชนิดของ

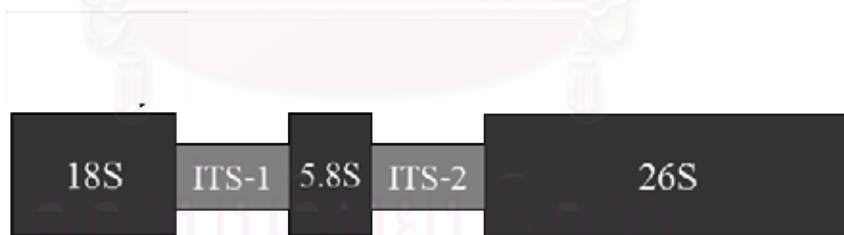


ภาพที่ 4 แผนที่ยีน (gene map) ในคลอโรพลาสต์จีโนมของ *Gossypium hirsutum* ยีนที่มีตำแหน่งอยู่ด้านในของแผนที่มีการแปลรหัสในทิศทางทวนเข็มนาฬิกา (counterclockwise) และยีนที่มีตำแหน่งอยู่ด้านนอกของแผนที่มีการแปลรหัสในทิศทางตามเข็มนาฬิกา (clockwise) ตำแหน่งของ Small Single-Copy (SSC), Large Single-Copy (LSC) และ Inverted repeats (IR) แสดงในแผนผังวงกลมเล็ก บริเวณเส้นที่บนแผนที่ยีน คือ IRs (แหล่งที่มา: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/7/61/figure/F1>)


```

1 aagtgttggg ttcaaagctg gtgttaaaga ttataaattg acttattata ctccctgacta
61 tgaaaccaaa gatactgata tcttggcagc attccgagta actcctcaac ctggagttcc
121 gcccgaagaa gcaggtgccg aggtagctgc tgaatcttct actggtacat ggacaactgt
181 gtggaccgac gggcttacca gccttgatcg ttacaaagga cgatgctacc acatcgagcc
241 cgttgctgga gaagaaaatc aatatattgc ttatgtagct tacccttag acctttttga
301 agaaggttct gttactaaca tgtttacttc cattgtgggt aatgtttttg ggttcaaggc
361 cctgcgcgct ctacgtctgg aggatttgcg aatccctact gcttatacta aaactttcca
421 ggggtccgcct cacggcatcc aagttgagag agataaattg aacaagtatg gccgtcccct
481 attgggatgt actattaaac ctaaattggg gttatccgct aagaattacg gtagagcggg
541 ttatgaatgt ctccgcgggtg gacttgattt taccaaagat gatgagaacg tgaattccca
601 accatztatg cgttggagag accgtttctt attttgtgcc gaagcaattt ataaagcaca
661 ggccgaaacg ggtgaaatta aagggcatta cttgaatgct actgcgggta catgggaaga
721 aatgataaaa agagctgtat ttgcgagaga attgggagtt cctatcgtaa tgcagacta
781 cttaacaggg ggattcaccg caaatactag cttggctcat tattgtcggg ataatggtct
841 acttcttcac atccatcgtg caatgcagc agttatcgat agacagaaga atcatggtat
901 gcattttcgt gtactagcta aagcgttacg tttgtctggt ggagatcata ttcacgctgg
961 tactgtagta ggtaaactgg aaggggaaaag agaaatcact ttaggttttg ttgatttact
1021 acgtgatgat tttattgaaa aagatcgaag ccgcggtatt tatttcactc aagattgggt
1081 ctctctaccg ggtgttctgc ccggtgcttc gggaggtatt cacgtttggc atatgcccgc
1141 tctgaccgag atctttggag atgattccgt actacaattt ggtggaggaa ctttaggaca
1201 cccttgggga aatgcacccg gtgccgtagc taatcgagta gctctagaag catgtgtaca
1261 agctcgtaat gagggacgtg atcttgctcg tgagggtaat gaaattatcc gtgaggctag
1321 caaatggagt cctgaattag ctgctgcttg tgaagtatgg aaggaaat
    
```

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* บางส่วนของ *Tamarindus indica* (accession no.Z70160) ที่มีอยู่ใน GenBank



ภาพที่ 6 โครงสร้างของ Internal Transcribed Spacer (ITS) ในนิวเคลียส

พืชเช่นเดียวกันกับยีน *rbcl* เพราะ ITS เป็นดีเอ็นเอที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) (Hershkovitz และ Zimmer, 1996) และสามารถใช้ในการจำแนกพืชได้ทั้งในระดับชนิดและสกุล (Baldwin และคณะ, 1995) ตัวอย่างเช่น การศึกษาหาความสัมพันธ์ในพืชสกุล *Lilium* (Nishikawa และคณะ, 1999) และ *Bauhinia* สกุลย่อย *Phanera* (Hao และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังมีการใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์อีกด้วย เช่น การศึกษาหาความสัมพันธ์ในพืชสกุล *Lathyrus* โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS ร่วมกับดีเอ็นเอบริเวณ *trnL-F* และ *trnS-G* (Kenicer และคณะ, 2005)

9. การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

ไพรเมอร์ที่ดีควรมีความยาวตั้งแต่ 18 ถึง 24 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย G+C ประมาณ 40-60% และมีปริมาณใกล้เคียงกันทั้งสองสาย (forward และ reverse) เพื่อที่ดีเอ็นเอต้นแบบจะได้จับกับไพรเมอร์ทั้งสองอย่างมีความจำเพาะเจาะจงที่อุณหภูมิเดียวกัน ไม่มีโครงสร้างทุติยภูมิเกิดขึ้นภายในสายไพรเมอร์ (secondary structure), การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ทั้งคู่ไม่มีเบสคู่สมกัน (complementary) เพื่อป้องกันการเกิดการจับกันระหว่างไพรเมอร์ (primer dimer) และ มีค่า T_m อยู่ในช่วง 55- 65 องศาเซลเซียส และค่า T_m ของไพรเมอร์ทั้งคู่ควรมีค่าใกล้เคียงกัน (Dieffenbach และ Dveksler, 2003)

10. การเปรียบเทียบความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีน (Sequence alignment)

ในการศึกษาด้านชีวสารสนเทศ (bioinformatics) การทำ sequence alignment คือ การเปรียบเทียบความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนที่มีอยู่เพื่อหาช่วงลำดับอนุรักษ์ (conserved sequence) ของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือโปรตีนกลุ่มนั้นเพื่อประโยชน์สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ในปฏิกิริยา PCR ในกรณีของลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนใช้การทำ sequence alignment เพื่อหาว่าช่วงใดมีความสำคัญควรศึกษาหรือวิเคราะห์ต่อไป ผลลัพธ์จากการทำ sequence alignment ยังสามารถนำไปสู่การทำนายลักษณะโครงสร้างทางทุติยภูมิ ตติยภูมิของโปรตีน ตำแหน่ง ความคงตัว จุดกำเนิด หน้าที่และกิจกรรม (activity) ของยีนหรือโปรตีน นอกจากนี้ผลลัพธ์จากการทำนายโครงสร้างดังกล่าวยังนำมาใช้แบ่งกลุ่มโปรตีน ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและวงศาวินิจฉัยวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้อีกด้วย โดยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งถือเป็นข้อมูลดิบจะถูกนำไปเปรียบเทียบเพื่อหาความคล้ายกันด้วยเครื่องมือทาง

ชีวสารสนเทศ (bioinformatics tools) เครื่องมือทางชีวสารสนเทศที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), Clustal และ BioEdit เป็นต้น (วิเชษฐ ลีลามานิตย์, 2550)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. สารเคมี

- Acetone, L-ascorbic acid, chloroform, citric acid, oxalic acid, perchloric acid, petroleum ether, selenium เกรด AR และ methanol เกรด HPLC, Fisher Scientific (UK)
- Ammonium dihydrogen orthophosphate, orthophosphoric acid, sodium carbonate anhydrous, succinic acid และ (+)-tartaric acid เกรด AR, Ajax Finechem (Australia)
- Ammonium molybdate, DL-malic acid และ potassium sodium tartarate เกรด AR, Carlo Erba (Italy)
- Anthrone, boric acid, copper sulfate, Copper (II) sulfate 5-hydrate, D (+)-glucose anhydrous, hydrochloric acid, nitric acid, n-octanol, potassium hydroxide, potassium sulfate, sodium chloride, sodium hydrogen carbonate และ sodium sulfate anhydrous เกรด AR, Merck (Germany)
- Celite[®] และ di-sodium hydrogen arsenate heptahydrate เกรด AR, Fluka (Switzerland)
- EDTA (Disodium ethylenediaminetetraacetate dihydrate), ethidium bromide solution 10 mg/ml และ 50X TAE (Tris/Acetic acid/EDTA) buffer, Bio-Rad (Italy)
- Ethyl alcohol absolute anhydrous เกรด AR, Mallinckrodt (Mexico)
- Gallic acid, β -mercaptoethanol และ TRIZMA[®] HYDROCHLORIDE (Tris [hydroxymethyl] aminomethane hydrochloride) เกรด AR, Sigma-Aldrich (Germany)
- GENE CLEAN[®] II KIT, MP Biomedicals (France)
- GenePure LE Agarose, ISC BIOEXPRESS (Spain)
- GoTaq[®] Flexi DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), blue/orange 6X loading dye และ 1kb DNA ladder, Promega (USA)

- Hydrochloric acid, iso-amyl alcohol และ sulfuric acid เกรด AR, J.T. Baker (USA)
- Liquid nitrogen, ไทยอินดัสเตรียล แก๊ส (ประเทศไทย)
- Methyl red, MAY & BAKER (UK)
- Sodium hydroxide, APS Finechem (Australia)

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องชั่ง Precisa รุ่น XT 620M, บริษัท Precisa Instrument AG (Switzerland)
- เครื่องวิเคราะห์ความชื้น Precisa รุ่น XM 60, บริษัท Precisa Instrument AG (Switzerland)
- เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง Mettler Toledo รุ่น SevenMulti, บริษัท Mettler-Toledo GmbH (Switzerland)
- ตู้อบลมร้อน รุ่น YCO-NO1, บริษัท Gemmy Industrial (Taiwan)
- เครื่องระเหย BÜCHI Rotavapor R-200, บริษัท BÜCHI (Switzerland)
- เครื่อง Spectrophotometer รุ่น Educator, บริษัท Thermo Electron Co. (USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ HIMAC รุ่น SCR20B ประกอบด้วย โรเตอร์ RPR9-2, บริษัท Hitachi Koki Co., Ltd. (Japan)
- เครื่องควบคุมปฏิกิริยาถูกใช้เพื่อลิเมอเลส Eppendorf Mastercycler[®], บริษัท Perkin-Elmer, Co. (USA)
- ชุด Sub-Cell[®] GT agarose gel electrophoresis systems ประกอบด้วย ภาดเจลขนาด 10x15 cm, บริษัท Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
- เครื่องถ่ายภาพ Gel documentation รุ่น Gel Doc XR ประกอบด้วย Quantity One 1-D Analysis software, บริษัท Bio-Rad Laboratories, Inc. (Canada)
- เครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer รุ่น Spectra AA-300, บริษัท Varian, Inc. (USA)
- เครื่อง Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer รุ่น Plasma 1000, บริษัท Perkin-Elmer, Co. (USA)
- เตาเผาควบคุมอุณหภูมิ Nabertherm รุ่น LT 15/11/B170, บริษัท Nabertherm GmbH (Germany)
- ชุดสกัด PYREX[®] 500 ml Extractor System ประกอบด้วย Soxhlet Extractor และ Allihn Condenser, บริษัท Corning Incorporated Life Sciences (USA)

- ชุดเครื่องวิเคราะห์เส้นใย Raw fiber extractor รุ่น FIWE6, บริษัท VELP® Scientifica (Italy)
- ชุดเครื่องกลั่นไนโตรเจน ประกอบด้วย BÜCHI Digestion unit K-424, BÜCHI Scrubber B-414 และ BÜCHI Distillation unit B-324, บริษัท BÜCHI (Switzerland)
- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง Shimadzu Class-VP HPLC system ประกอบด้วย class-VP software version 6.1, system controller (SCL-10Avp), pumps (LC-10ADvp), an auto-sampler (SIL-10ADvp), a column oven (CTO-10ASvp) และ UV-Vis detector (SPD-10AVvp), บริษัท Shimadzu Corporation (Japan)
- คอลัมน์ HPLC Inertsil ODS-3, C18 ขนาด 150x4.6 mm i.d., 5 µm, บริษัท GL Sciences Inc. (Japan)

3. ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างมะขาม *Tamarindus indica* L. ตรวจสอบชื่อพืชกับหนังสือชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย (เต็ม สมิตินันท์, 2544) เก็บรวบรวมตัวอย่างใบและฝักของมะขาม 3 พันธุ์ปลูกคือ ชนิดมะขามหวาน ได้แก่ 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และชนิดมะขามเปรี้ยว ได้แก่ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' เก็บมาจากไร่ชนิกา จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยเก็บมาพันธุ์ปลูกละ 5 ตัวอย่าง แสดงข้อมูลในการเก็บตัวอย่างดังตารางที่ 5 จัดทำเฮอริบารีียม (herbarium specimen) ของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกและเก็บรักษาไว้ที่ พิพิธภัณฑ์สมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ลักษณะฝักและเนื้อของมะขามพันธุ์ปลูกต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองแสดงดังภาพที่ 7

3.1 การเตรียมตัวอย่างใบมะขาม

บดตัวอย่างใบมะขามสดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวแล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในตู้แช่แข็งเพื่อใช้วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป

3.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อมะขาม

นำตัวอย่างฝักมะขามมาปอกเปลือกและแยกเมล็ดออกจากเนื้อ นำเนื้อมะขามไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่อไป

ตารางที่ 5 ข้อมูลของการเก็บตัวอย่างมะขาม 3 พันธุ์ปลูก คือ มะขามชนิดหวาน ได้แก่ 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว ได้แก่ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อพันธุ์ปลูก	รหัสตัวอย่าง	หมายเลขตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ	ส่วนที่เก็บ	วันที่เก็บ
<i>Tamarindus indica</i> L.	'ศรีชมภู'	TI-SP/P1	PCUTI-SP/P1	ไร่ชนิกา 319 หมู่ 9 ต.ชัยสมอทอด อ.บึงสามพัน	ฝัก	8 มกราคม 2548
		TI-SP/P2	PCUTI-SP/P2	จ.เพชรบูรณ์	ใบ	21 กรกฎาคม 2548
		TI-SP/P3	PCUTI-SP/P3			
		TI-SP/P4	PCUTI-SP/P4			
		TI-SP/P5	PCUTI-SP/P5			
<i>Tamarindus indica</i> L.	'ขันตี'	TI-K/P1	PCUTI-K/P1	ไร่ชนิกา 319 หมู่ 9 ต.ชัยสมอทอด อ.บึงสามพัน	ฝัก	8 มกราคม 2548
		TI-K/P2	PCUTI-K/P2	จ.เพชรบูรณ์	ใบ	21 กรกฎาคม 2548
		TI-K/P3	PCUTI-K/P3			
		TI-K/P4	PCUTI-K/P4			
		TI-K/P5	PCUTI-K/P5			
<i>Tamarindus indica</i> L.	'มะขามเปรี้ยวยักษ์'	TI-PY/P1	PCUTI-PY/P1	ไร่ชนิกา 319 หมู่ 9 ต.ชัยสมอทอด อ.บึงสามพัน	ฝัก	5 เมษายน 2548
		TI-PY/P2	PCUTI-PY/P2	จ.เพชรบูรณ์	ใบ	21 กรกฎาคม 2548
		TI-PY/P3	PCUTI-PY/P3			
		TI-PY/P4	PCUTI-PY/P4			
		TI-PY/P5	PCUTI-PY/P5			



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 7 ลักษณะฝักและเนื้อของมะขามพันธุ์ปลูกต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์: (ก) 'ชันที้' (ข) 'ศรีสมณ' และ (ค) 'มะขามเปรี้ยวยักษ์'

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1.1 สารอาหาร (Food content)

1.1.1 ปริมาณความชื้น (Moisture)

วิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยนำตัวอย่างมะขามสดและอบแห้งมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งน้ำหนัก 3 กรัม ด้วยเครื่องวิเคราะห์ความชื้น Precisa รุ่น XM 60 (Precisa, Switzerland) โดยกำหนดการใช้ความร้อนแบบมาตรฐานที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส และให้เครื่องหยุดทำงานเมื่อน้ำหนักของตัวอย่างลดลงน้อยกว่า 2 มิลลิกรัม ภายในเวลา 60 วินาที ชั่งน้ำหนักตัวอย่างแล้วคำนวณหาปริมาณความชื้นเป็น % moisture ในเนื้อมะขาม ทำการทดลองซ้ำแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง

$$\% \text{ moisture} = \frac{(\text{น้ำหนักเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักสุดท้าย}) \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$$

1.1.2 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Total available carbohydrate)

วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดยวิธีของ Manual Clegg Anthrone (Manual Clegg Anthrone method) (Osborne และ Voogt, 1978) ดังนี้

ชั่งตัวอย่างมะขามบดละเอียด 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร คนให้ตัวอย่างกระจายตัว เติมสารละลายกรดเปอร์คลอริก ความเข้มข้น 52 % ปริมาตร 13 มิลลิลิตร จากนั้นคนสารตัวอย่างเป็นเวลา 20 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วกรองผ่านกระดาษกรองลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 250 มิลลิลิตร

นำสารสกัดตัวอย่างที่ได้มาเจือจาง 20 เท่า ด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองและปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองเป็น blank เติมสารละลาย anthrone reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองและหลอด blank อย่างรวดเร็วและผสมให้เข้ากัน นำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 12 นาที ทำให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

630 นาโนเมตร (nm) โดยใช้หลอด blank ปรับศูนย์ นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในรูปของกลูโคส (% glucose) จากกราฟของสารละลายมาตรฐานกลูโคสเพื่อคำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ทำการทดลองซ้ำแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง

1.1.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar)

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Nelson-Somogyi (Nelson-Somogyi method) (Chaplin, 1994) ดังนี้

ซึ่งตัวอย่างมะขามบดละเอียด 1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 35 มิลลิลิตร คนให้ตัวอย่างกระจายตัว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,851 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส นำตะกอนที่ได้มาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 35 มิลลิลิตร และ 30 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำส่วนใสที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 ครั้ง มารวมกันในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

นำสารสกัดตัวอย่างที่ได้มาเจือจาง 40 เท่า ด้วยน้ำกลั่น ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองและปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองเป็น blank เติมสารละลาย C (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มใน water bath เป็นเวลา 15 นาที ทำให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้องอย่างรวดเร็ว เติมสารละลาย D (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ใช้หลอด blank ปรับศูนย์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปของ กลูโคส (% glucose) จากกราฟของสารละลายมาตรฐานกลูโคส ทำการทดลองซ้ำแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง

1.1.4 ปริมาณโปรตีน (Protein)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Kjeldahl (Osborne และ Voogt, 1978) ทำ โดยใช้ชุดเครื่องกลั่นไนโตรเจน (BÜCHI, Switzerland) ซึ่งตัวอย่างมะขามบดละเอียดประมาณ 0.2 กรัม ใส่ใน digestion tube ซึ่งมีสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ 1.1 กรัม ของ salt catalyst mixture (100g K₂SO₄; 10g CuSO₄; 1g Se) ย่อยตัวอย่างด้วยเครื่อง BÜCHI digestion Unit รุ่น K-424 (BÜCHI, สวิตเซอร์แลนด์) จนได้สารละลายสีเขียวใส

นำออกมาตั้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 % ปริมาตร 85 มิลลิลิตร แล้วนำไปกลั่นด้วยเครื่อง BÜCHI Distillation Unit รุ่น B-324 (BÜCHI, สวิตเซอร์แลนด์) ไล่แอมโมเนียที่ได้จากการกลั่นออกมาผสมภายใต้สารละลายกรดบอริก ความเข้มข้น 2 % ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และเมธิลเรดิอินดิเคเตอร์ จำนวน 2 หยด ที่บรรจุใน flask สารละลายใน flask จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวและกลั่นต่อไปเป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายกรดบอริกหลังการกลั่นมาไตเตรตด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.005 N จนได้สารละลายเป็นกลางโดยเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงแดง คำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างตามสูตร ทำการทดลองซ้ำแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง

$$\% \text{ โปรตีน} = \frac{V \times N \times 1.4 \times CF}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ V คือ ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรต (มิลลิลิตร)
 N คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรต (นอร์มัล)
 CF คือ conversion factor สำหรับเปลี่ยนค่าไนโตรเจนเป็นค่าโปรตีน โดยใช้ค่า 6.25

1.1.5 ปริมาณไขมัน (Fat)

วิเคราะห์ปริมาณไขมันในตัวอย่างมะขามโดยนำตัวอย่างบดละเอียดมาสกัดไขมันออกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) แล้วชั่งน้ำหนักของไขมันที่สกัดออกมาได้โดยวิธี Soxhlet (Soxhlet method) (Osborne และ Voogt, 1978) ซึ่งทำการวิเคราะห์ดังนี้

ชั่งตัวอย่างมะขามบดละเอียดประมาณ 2 กรัม ใส่ลงใน extraction thimble แล้วนำมาสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ ซึ่งมีจุดเดือด 40-60 องศาเซลเซียส ด้วยชุดสกัด Soxhlet ที่มี reflux condenser และขวดก้นกลมซึ่งทำการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว ทำการสกัดโดยใช้เตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิปานกลางเป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง โดยให้มีการไซฟอน (syphons) 10 ครั้ง นำขวดก้นกลมไประเหยปิโตรเลียมอีเธอร์ ออกแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ในตู้อบลมร้อนเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและชั่งจนได้น้ำหนักคงที่ ทำการทดลองซ้ำแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง คำนวณหาปริมาณไขมันในตัวอย่างดังสูตร

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักของขวดก้นกลมรวมกับไขมันหลังทำการสกัด (กรัม)
 W_2 คือ น้ำหนักของขวดก้นกลมก่อนทำการสกัด (กรัม)

1.1.6 ปริมาณเส้นใยอาหาร (Crude fiber)

ทำการวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างมะขามบดละเอียดมาย่อยด้วยกรดและด่าง ส่วนที่เหลือจากการย่อยนี้เป็นเส้นใยอาหาร วิเคราะห์เส้นใยอาหารด้วยเครื่อง Raw fiber extractor โดยดัดแปลงจากวิธีของ Lee (Lee, 1975) ซึ่งทำการทดลองดังนี้

ซึ่งตัวอย่างมะขามอบแห้งซึ่งบดละเอียดแล้วประมาณ 1.2-1.3 กรัม ใส่ใน sintered glass filter crucible ที่มี celite ซึ่งทำการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้วบรรจุอยู่ นำไปใส่ในเครื่อง Raw fiber extractor รุ่น FIWE6 (VELP® Scientifica, Italy) เติมสารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1.25 % ที่ร้อน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร และ n-octanol (antifoam) จำนวน 3-5 หยด ตามลำดับ ต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที ระบายกรดซัลฟูริกออกด้วยระบบสุญญากาศ ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง ครั้งละ 30 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.25 % ที่ร้อน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร และ n-octanol (antifoam) จำนวน 3-5 หยด ต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที ระบายสารละลายออก จากนั้นล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นร้อน 3 ครั้ง และน้ำกลั่นเย็น 1 ครั้ง ล้างตะกอนด้วยอะซิโตน 3 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร โดยให้ความร้อนทุกครั้งทำการล้าง จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ในตู้อบลมร้อน จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ นำไปเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส ในเตาเผาควบคุมอุณหภูมิ (muffle furnace) จนน้ำหนักคงที่ ทำการทดลองซ้ำแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง นำมาคำนวณปริมาณเส้นใยอาหารในตัวอย่างดังนี้

$$\% \text{ เส้นใยอาหาร} = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักของส่วนผสมรวมกับ crucible หลังเผาที่อุณหภูมิ 105°ซ (กรัม)
 W_2 คือ น้ำหนักของส่วนผสมรวมกับ crucible หลังเผาที่อุณหภูมิ 600°ซ (กรัม)

1.1.7 ปริมาณเถ้า (Ash)

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเถ้าของตัวอย่างมะขามโดยวิธี Dry ashing (Harold และคณะ, 1981; Osborne และ Voogt, 1978) โดยชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด 2 กรัม ใส่ใน crucible ซึ่งเตรียมไว้โดยแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 N ที่ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วล้างจนสะอาดอบแห้งและเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และชั่งน้ำหนักไว้แล้ว นำตัวอย่างใน crucible มาเผาบนเตาไฟฟ้า (hot plate) ที่อุณหภูมิต่ำจนกระทั่งไม่มีควันออกมาอีก นำตัวอย่างไปทำให้เป็นเถ้าโดยเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเถ้าเป็นสีขาว ทิ้งไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) ให้เย็น ชั่งน้ำหนักแล้วเผาซ้ำครั้งละ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักตัวอย่างคงที่ ทำการทดลองซ้ำแต่ละตัวอย่าง 3 ครั้ง และคำนวณปริมาณเถ้าในตัวอย่าง ดังสูตร

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักของเถ้ารวมกับ crucible (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักของ crucible (กรัม)

1.1.8 การวิเคราะห์แร่ธาตุ (Mineral analysis)

การวิเคราะห์ทำโดยวิธี Atomic Absorption (AOAC, 1995) วิเคราะห์ธาตุแคลเซียม (Ca), แมกนีเซียม (Mg), เหล็ก (Fe), สังกะสี (Zn), ทองแดง (Cu), แมงกานีส (Mn), โซเดียม (Na) และโพแทสเซียม (K) ด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer (Spectra AA-300, Varian) และโดยวิธี Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy (AOAC, 1995) วิเคราะห์ธาตุอะลูมิเนียม (Al), อาร์เซนิก (As), ฟอสฟอรัส (P), ตะกั่ว (Pb) และซิลิกอน (Si) ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer (Plasma 1000, Perkin-Elmer) โดยเตรียมตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิธีการเตรียมตัวอย่างมีดังนี้

1.1.8.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์โดยวิธี Atomic Absorption Spectroscopy

ชั่งตัวอย่างมะขามบดละเอียดประมาณ 2 กรัม แล้วนำไปเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส ตามวิธี 1.1.7 จนได้เถ้าสีขาวและมีน้ำหนักคงที่ นำเถ้าที่ได้ใส่ในจาน porcelain ซึ่งได้เตรียมไว้โดยแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 N ที่งัวข้ามคืน ล้างจนสะอาดและอบแห้งไว้แล้ว จากนั้นหยดน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) ลงในเถ้าให้เปียกเล็กน้อย และเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 50 % ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วระเหยให้แห้งบน water bath ในตู้ดูดควัน ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 10 % แล้วถ่ายใส่ volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้น้ำ DI ล้าง porcelain เเทวมลงไปใน flask และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ DI นำตัวอย่างไปวิเคราะห์แร่ธาตุด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer รุ่น AA-300 (Varian, USA) ทำการทดลองซ้ำแต่ละตัวอย่าง 2 ครั้ง

1.1.8.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์โดยวิธี Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy

อบตัวอย่างมะขามบดละเอียดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในตู้อบลมร้อนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ใส่ในจาน porcelain แล้วย่อยด้วยสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ระเหยให้แห้งบน water bath ในตู้ดูดควัน ทำการย่อยตัวอย่างซ้ำจนกระทั่งไม่มีตะกอนสีดำ (charred material) ตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายกรดไนตริกเข้มข้น และสารละลายกรดเปอร์คลอริก ความเข้มข้น 70 % อย่างละ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่อยๆ ให้ความร้อนแก่สารละลายจนกระทั่งได้สารละลายใสแล้วนำไประเหยให้แห้งบน water bath นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยสารละลายกรดไนตริกเข้มข้นแล้วจึงเติมน้ำ DI ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงไป กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองที่ล้างด้วยกรดแล้ว (acid-washed filter paper) ลงใน volumetric flask ขนาด 50 มิลลิลิตร ล้างกระดาษกรองและปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ DI นำตัวอย่างไปวิเคราะห์แร่ธาตุด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer (Perkin-Elmer, USA) ทำการทดลองซ้ำแต่ละตัวอย่าง 2 ครั้ง

1.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างเนื้อมะขาม

1.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ซึ่งตัวอย่างมะขามปริมาณ 150 กรัม น้ำหนักสด ใส่ในเครื่องปั่น เติมน้ำ DI ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วตั้งทิ้งค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง นำมะขามไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,800 xg เป็นเวลา 20 นาที ในเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Hitachi, Japan) ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำสกัดใส นำตะกอนมาสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง โดยใช้น้ำ DI ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,800 xg เป็นเวลา 20 นาที ในเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำสกัดใสที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้ง มารวมกัน แล้วระเหยน้ำทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องระเหย BÜCHI Rotavapor R-200 (BÜCHI, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันต่ำ เหน้สกัดเข้มข้นใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI จนครบปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำน้ำสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,800 xg เป็นเวลา 20 นาที ในเครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิอีกครั้งและเก็บส่วนน้ำสกัดใสไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ได้แก่

- วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์
- วิเคราะห์ฤทธิ์การเป็นยาระบายโดยส่งตัวอย่างไปทดสอบฤทธิ์ยาระบายในหนูขาว ที่ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1.2.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์ในน้ำสกัดมะขามด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography: HPLC)

1.2.2.1 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วย HPLC

1) คอลัมน์

คอลัมน์ Inertsil ODS-3 C18 (GL Sciences, Japan) ซึ่งเป็นคอลัมน์ที่สามารถใช้เพื่อการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก ซิตริก ซักซินิก และวิตามินซี ที่ทำการศึกษานี้สามารถละลายในน้ำและตัวทำละลายที่มีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำได้ดี เช่น ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2) สารมาตรฐานภายใน (Internal standard)

สารมาตรฐานภายในควรมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับกรดอินทรีย์ที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งจะมีเวลาที่ถูกหน่วงเหนี่ยวในคอลัมน์ (Retention time) โดยผ่านคอลัมน์ตามหลังตัวอย่างในเวลาใกล้เคียงกันและแยกออกจากสารตัวอย่างได้อย่างสมบูรณ์ (completely resolved) และไม่ทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของสารตัวอย่าง มีสมบัติการดูดกลืนแสง ณ ความยาวคลื่นที่เลือกใช้ และที่สำคัญสารที่จะเลือกใช้นั้นต้องเป็นสารบริสุทธิ์และไม่เป็นองค์ประกอบหรือมีอยู่ในสารตัวอย่าง โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกกรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานภายใน

3) Ultraviolet Detector (UV Detector)

การทดลองหาความยาวคลื่นแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต (Ultraviolet) ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์เตรียมสารละลายมาตรฐานของกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก วิตามินซี ซิตริก ซักซินิก และสารละลายผสมของกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด (standard organic acid mixture) ในเฟสเคลื่อนที่ (0.5 % (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$) จากนั้นสแกนการดูดกลืนแสงของสารละลายในช่วงความยาวคลื่น 190-370 nm โดยมีการสแกนความยาวคลื่นทุกๆ 1 nm (scan step มีค่าเท่ากับ 1 nm)

4) ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

ทดสอบเพื่อเลือกค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 % (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ที่ pH 2.5, 2.7, 2.8 และ 2.9 ตามลำดับฉีด standard organic acid mixture ในคอลัมน์ HPLC แล้วใช้เฟสเคลื่อนที่ที่มีค่า pH ต่างๆ ชะ standard organic acid mixture ออกมาจากคอลัมน์ จากนั้นจึงนำ retention time ของกรดอินทรีย์ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ pH ต่างๆ มาเปรียบเทียบกันเพื่อหา pH ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในวิธีวิเคราะห์นี้

1.2.2.2 การเตรียมสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานและสารมาตรฐานภายใน (Organic acids and internal standard stock solutions)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน stock solution โดยละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานและสารมาตรฐานภายในด้วยน้ำบริสุทธิ์ โดยเตรียมสารละลายตั้งต้นของกรดออกซาลิก

ทาร์ทาริก มาลิก วิตามินซี ซิตริก ซักซินิก และแกลลิก มีความเข้มข้นเท่ากับ 25.24, 30.02, 26.82, 35.25, 42.03, 23.64 และ 4.01 กรัม/ลิตร, ตามลำดับ จากนั้นบีเปตสารละลายตั้งต้นของกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก วิตามินซี ซิตริก และซักซินิก ปริมาตร 0.2, 2.0, 2.0, 0.1, 2 และ 3 มิลลิลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยเฟสเคลื่อนที่จนมีปริมาตรเท่ากับ 10 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็นสารละลาย standard solution เพื่อการวิเคราะห์สารตัวอย่างต่อไป

1.2.2.3 การยืนยันความถูกต้องสมบูรณ์ของวิธีวิเคราะห์ (Validation of Analysis Technique)

ยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษา ดังนี้

1) ความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

วิธีวิเคราะห์จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการแยกเมื่อค่าการแยก (Resolution) มีค่ามากกว่า 1.5 (USP 27, 2004)

นำสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานและสารมาตรฐานภายในที่เตรียมได้จากข้อ 1.2.2.2 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก วิตามินซี ซิตริก ซักซินิก และแกลลิก เท่ากับ 0.25, 3.00, 2.68, 0.18, 4.21, 3.55 และ 0.04 กรัม/ลิตร ตามลำดับ กรองสารละลายผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปฉีดเข้าคอลัมน์ HPLC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม คำนวณค่าการแยก (Resolution) ดังสูตร

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{(W_2 + W_1)}$$

เมื่อ R คือ ค่า resolution ระหว่างพีคของกรดอินทรีย์ที่สนใจ (พีคที่ 2) กับพีคของสารที่แยกออกมาก่อน (พีคที่ 1)

t_2 คือ retention time ของพีคที่ 2

t_1 คือ retention time ของพีคที่ 1

W_2 คือ ความกว้างของฐานของพีคที่ 2

W_1 คือ ความกว้างของฐานของพีคที่ 1

2) ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดอินทรีย์มาตรฐานต่อสารมาตรฐานภายใน (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐาน

เตรียมสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.0037-0.3000 กรัม/ลิตร ของกรดออกซาลิก 0.3300-4.3300 กรัม/ลิตร ของกรดทาร์ทาริก 0.0130-2.1500 กรัม/ลิตร ของกรดมาลิก 0.0005-0.3000 กรัม/ลิตร ของวิตามินซี 0.0100-0.8100 กรัม/ลิตร ของกรดซิตริก และ 0.0400 กรัม/ลิตร ของกรดแกลลิก กรองสารละลายผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร ไปฉีดสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานเข้าคอลัมน์ HPLC ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง ของแต่ละความเข้มข้น นำค่าเฉลี่ยมาสร้างเส้นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ของกราฟมาตรฐาน ใช้ linear regression ในการสร้างสมการเส้นตรง

3) ความไวของวิธีวิเคราะห์ (Sensitivity)

ความไวของวิธีวิเคราะห์แสดงถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอินทรีย์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ถูกต้อง (Limit of Detection, LOD)

เตรียมสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานของกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก วิตามินซี ซิตริก และซัคซินิก ดังข้อ 1) กรองสารละลายผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปฉีดเข้าคอลัมน์ HPLC ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยทำการฉีดซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง คำนวณค่า LOD ของกรดอินทรีย์แต่ละชนิด ดังสูตร

$$\text{LOD (ASTM)} = C \times (S/N) \times N/H$$

เมื่อ

- S/N คือ อัตราส่วนระหว่างสัญญาณของกรดอินทรีย์กับสัญญาณรบกวนของเฟสเคลื่อนที่ (Signal to noise ratio), $S/N = 3.3$
- C คือ ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์
- H คือ สัญญาณของกรดอินทรีย์เมื่อทำการวิเคราะห์
- N คือ สัญญาณรบกวนของเฟสเคลื่อนที่เมื่อทำการวิเคราะห์

4) ความเที่ยงตรงแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ประกอบด้วยความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (Intra-day precision) และความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน (Inter-day precision) ซึ่งแสดงผลในรูปของเปอร์เซ็นต์ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation, % RSD)

4.1) ความเที่ยงตรงแม่นยำเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (Intra-day precision)

เตรียมสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานจำนวน 5 ความเข้มข้น โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 0.04-0.20 กรัม/ลิตร ของกรดออกซาลิก, 1.00-3.67 กรัม/ลิตร ของกรดทาร์ทาริก, 0.04-2.00 กรัม/ลิตร ของกรดมาลิก, 0.03-0.15 กรัม/ลิตร ของวิตามินซี, 0.17-0.70 กรัม/ลิตร ของกรดซิตริก และ 0.04 กรัม/ลิตร ของกรดแกลลิก โดยเตรียมความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง (n=3) กรองสารละลายผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปฉีดเข้าคอลัมน์ HPLC ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม โดยทำการฉีดซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของกรดอินทรีย์เทียบจากเส้นกราฟมาตรฐาน ค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ต้องมีค่า % RSD ไม่เกิน 2 % จึงถือว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรง (USP 27, 2004)

4.2) ความเที่ยงตรงแม่นยำเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน (Inter-day precision)

ทำการทดลองเหมือนกับข้อ 4.1) โดยทำการฉีดสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานเข้าคอลัมน์ HPLC ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในแต่ละวันเป็นเวลา 3 วัน แตกต่างกันและทำการฉีดซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง นำค่าที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของกรดอินทรีย์เทียบจากเส้นกราฟมาตรฐาน ค่าความเข้มข้นที่วิเคราะห์ได้ต้องมีค่า % RSD ไม่เกิน 2 % จึงถือว่าวิธีวิเคราะห์มีความเที่ยงตรง (USP 27, 2004)

5) ความถูกต้องแน่นอนของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงด้วยค่าเปอร์เซ็นต์คืนกลับ (% recovery) ดังสูตร

$$\% \text{ recovery} = \frac{C_2 \times 100}{C_1}$$

เมื่อ C_2 คือ ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่วิเคราะห์ได้
 C_1 คือ ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่มีอยู่จริง

5.1) เตรียมสารละลายน้ำสกัดมะขามที่มีสารมาตรฐานภายในเข้มข้น 0.04 กรัม/ลิตร โดยเจือจางน้ำสกัดมะขามเข้มข้นของมะขามตัวอย่าง ในอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยเฟสเคลื่อนที่

5.2) เตรียมสารละลายเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐานมีกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก แอสคอบิก ซิตริก และแกลลิก ดังตารางที่ 6 นำมาเตรียมสารละลายผสมกรดอินทรีย์มาตรฐาน 3 ความเข้มข้น

5.3) เติม (spiked) สารละลายน้ำสกัดตัวอย่างมะขามผสมจากข้อ 5.1 ด้วยสารละลายเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐานจากข้อ 5.2 โดยเจือจางน้ำสกัดมะขามเข้มข้นของมะขามตัวอย่างและ spiked ด้วยสารละลายผสมของกรดอินทรีย์จนได้ความเข้มข้นต่างๆ 3 ค่า ดังที่แสดงในตารางที่ 6

กรองสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 5.1) 5.2) และ 5.3) ผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยฉีดสารละลายแต่ละข้อซ้ำ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ไปคำนวณหาความเข้มข้นของกรดอินทรีย์จากตัวอย่างโดยวิเคราะห์

- ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในสารละลายน้ำสกัดมะขาม (C1)
- ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐาน (C2)
- ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในสารละลายน้ำสกัดตัวอย่างมะขามที่ spiked ด้วยสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐาน (C3)

ตารางที่ 6

ความเข้มข้นของสารละลายผสมกรดอินทรีย์มาตรฐาน จำนวน 3 ความเข้มข้น ที่ใช้ในการยืนยันความถูกต้องของเทคนิค HPLC

สารละลายผสมกรดอินทรีย์	ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ (g/L)					
	ออกซาลิก	ทาร์ทาริก	มาลิก	แอสคอบิก	ซิตริก	แกลลิก
ความเข้มข้นที่ 1	0.04	0.85	0.23	0.03	0.16	0.04
ความเข้มข้นที่ 2	0.12	1.70	0.46	0.09	0.33	0.04
ความเข้มข้นที่ 3	0.20	2.55	0.68	0.15	0.49	0.04

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำค่าความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในสารละลายที่วิเคราะห์ได้ (C1, C2 และ C3) ไปคำนวณค่า % recovery ดังสูตรที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนี้

$$\% \text{ recovery} = \frac{C3}{C1 + C2} \times 100$$

ถ้าค่า recovery ที่คำนวณได้มีค่าอยู่ในช่วง 75-120% แสดงว่า วิธีวิเคราะห์ที่ยอมรับได้ (AOAC, 2002)

1.2.2.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำสกัดมะขาม

นำน้ำสกัดมะขามเข้มข้นพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' (น้ำสกัดมะขามพันธุ์ปลูกละ 3 ตัวอย่าง, n=3) มาเจือจางด้วยเฟสเคลื่อนที่ในอัตราส่วน 1:6, 1:8 และ 1:42 ตามลำดับ สารละลายตัวอย่างมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกเติมด้วยสารมาตรฐานภายในในปริมาณความเข้มข้น 0.04 กรัม/ลิตร กรองสารละลายตัวอย่างผ่าน nylon syringe filter ที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้พีค (Peak area ratio) ของกรดอินทรีย์มาตรฐานกับสารมาตรฐานภายในที่วิเคราะห์ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำสกัดมะขามโดยเทียบจากเส้นกราฟมาตรฐาน และรายงานค่าที่วิเคราะห์ได้ แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)

1.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างมะขาม ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (One-Way Analysis of Variance, ONE-WAY ANOVA) โดยใช้วิธีการของ Fisher's Least Significant Difference (LSD) และวิธีการของ Tukey (Tukey's HSD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.5 ผลการวิเคราะห์แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติขององค์ประกอบทางเคมีระหว่างพันธุ์ปลูกของมะขามที่นำมาศึกษา เมื่อ $p < 0.05$

2. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint studies)

2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA extraction)

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบมะขามด้วยวิธี CTAB extraction (Dellaporta และคณะ, 1983; Murray และ Thompson, 1980) ดังนี้

นำตัวอย่างพืชประมาณ 100 มิลลิกรัม สกัดด้วยสารละลาย CTAB solution (Cetyl trimethylammonium bromide, CTAB 2 %; Tris-Cl, pH 8.0 100 มิลลิโมลาร์; EDTA, pH 8.0 20 มิลลิโมลาร์; NaCl 1.4 มิลลิโมลาร์ และ 2-mercaptoethanol 2 %) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นสกัดต่อด้วยสารละลาย chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 xg เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใส เติมสารละลาย CTAB/NaCl solution ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดกลับไปมา สกัดต่อด้วยสารละลาย chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 440 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 xg เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใส เติมสารละลาย CTAB precipitation (CTAB 1 %; Tris-Cl, pH 8.0 50 มิลลิโมลาร์ และ EDTA, pH 8.0 10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 500 xg เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย high salt TE buffer (Tris-Cl, pH 8.0 10 มิลลิโมลาร์; NaCl 1 โมลาร์ และ EDTA, pH 8.0 0.1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 xg เป็นเวลา 15 นาที ปิเปตส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 80 % ethanol ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายดีเอ็นเอด้วย ddH₂O ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้ชุดสำเร็จรูป GENECLEAN[®] II KIT (MP Biomedicals, France) จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

2.2 การตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอ

2.2.1 การแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis)

ตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที ในสารละลาย Tris-acetate (TAE) buffer, pH 8.0 (Tris-acetate 0.04 โมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์) ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจล (agarose gel)

ความเข้มข้น 1.0 % เป็นตัวกลาง และใช้ 1kb DNA ladder (Promega, USA) เป็น marker ย้อมแผ่นอะกาโรสเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel documentation รุ่น Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Canada)

2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ribosomal RNA (rRNA) ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ดังนี้

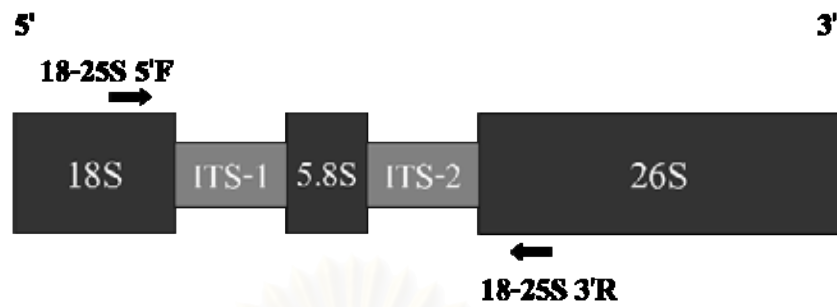
Forward primer 18-25S 5'F: 5'-GTA GGT GAA CCT GCA GAA GGA TCA-3'

Reverse primer 18-25S 3'R: 5'-CCA TGC TTA AAC TCA GCG GGT-3'

เตรียมสารละลายสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า (KCl 50 มิลลิโมลาร์; Tris-HCl, pH 9.0 10 มิลลิโมลาร์ และ Triton X-100 0.1 %) MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์ Taq DNA polymerase จำนวน 1 ยูนิต และจีโนมิกดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Eppendorf Mastercycler[®], Perkin-Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

- | | |
|--|----------|
| ขั้นที่ 1 Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที | } 30 รอบ |
| ขั้นที่ 2 Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที | |
| ขั้นที่ 3 Primer annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที | |
| ขั้นที่ 4 Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที | |
| ขั้นที่ 5 Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที | |

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (PCR product) มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ภาพที่ 8 แสดง ribosomal DNA และตำแหน่งของไพรเมอร์ 18-25S 5'F และ 18-25S 3'R ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ



ภาพที่ 8

ribosomal DNA และตำแหน่งของไพรเมอร์ 18-25S 5'F และ 18-25S 3'R ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

ยีนเป้าหมายในการศึกษาครั้งนี้ คือ

ยีน 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (*rbcL*) เป็นยีนที่พบในคลอโรพลาสต์ ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *rbcL* ของ *Tamarindus indica* L. (accession no. Z70160) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของ *Arabidopsis thaliana* (accession no. NC_000932) ที่มีไว้ใน GenBank เป็นต้นแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* สังเคราะห์โดยบริษัท Sigma (Sigma-Genosys, Australia) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง แสดงดังตารางที่ 7 ตำแหน่งของไพรเมอร์บนยีน *rbcL* แสดงดังภาพที่ 9

ดีเอ็นเอส่วน Internal Transcribed Spacer (ITS) เป็นดีเอ็นเอส่วนที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear genome) ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S, 5.8S, 26S rDNA และ ดีเอ็นเอส่วน ITS-1 และ ITS-2 ของ *Stemona japonica* จากข้อมูลที่มีไว้ใน GenBank (accession no. AF207028) เป็นต้นแบบ สังเคราะห์โดยบริษัท Operon (OPERON Biotechnologies, Germany) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้

Stmn-ITS-F: 5'-GAG AAG TCC ACT GAA CCT TAT C-3'

ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (White และคณะ, 1990)

ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่จับกับสายดีเอ็นเอแสดงดังภาพที่ 10

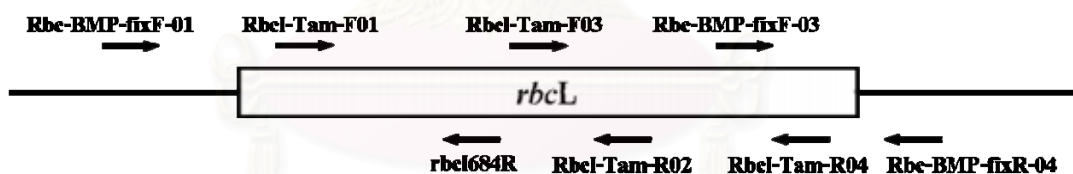
2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA amplification and nucleotide sequencing)

2.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* (DNA amplification and nucleotide sequencing of *rbcL* gene)

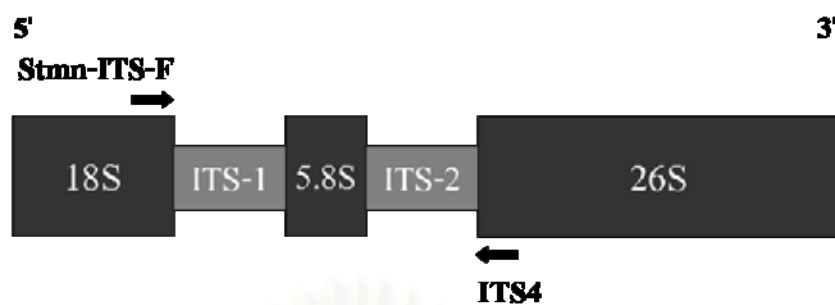
เตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ไพรเมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase จำนวน 1.5 ยูนิต และจีโนมดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Eppendorf Mastercycler[®], Perkin-Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL*

Primers	Nucleotide sequences 5' to 3'
Rbcl-Tam-F01	TGG GTT CAA AGC TGG TGT TA
Rbcl-Tam-R02	CAA GCT AGT ATT TGC GGT GAA T
Rbcl-Tam-F03	CAT GGG AAG AAA TGA TAA AAA
Rbcl-Tam-R04	GCA GCA GCT AAT TCA GGA CTC
Rbc-BMP-fixF-01	GTC GAG TAG ACC TTG TTG TTT TG
rbclBMP684R	TGC CCT TTG ATT TCA CCT GTT TC
Rbc-BMP-fixF-03	GTT GCT TCG GGA GGT ATT CAC G
Rbc-BMP-fixR-04	ATT CGG CTC AAT CCT TTT AGT A



ภาพที่ 9 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rbcL*: Rbcl-Tam-F01, Rbcl-Tam-R02, Rbcl-Tam-F03 และ Rbcl-Tam-R04; ไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์: Rbc-BMP-fixF-01, rbclBMP684R, Rbc-BMP-fixF-03 และ Rbc-BMP-fixR-04



ภาพที่ 10 Ribosomal DNA และตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ;
Stmn-ITS-F และ ITS4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที	} 35 รอบ
ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที	
ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที	
ขั้นที่ 4 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 5 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	

ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี

2.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS (DNA amplification and nucleotide sequencing of ITS)

เตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพร์เมอร์ 0.25 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase จำนวน 1 ยูนิต และจีโนมดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Eppendorf Mastercycler[®], Perkin-Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที	} 30 รอบ
ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที	
ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที	
ขั้นที่ 4 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 5 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	

ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส และส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี

2.4.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

เตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer ความเข้มข้น 1 เท่า (NaCl 50 มิลลิโมลาร์; Tris-HCl, pH 9.0 50 มิลลิโมลาร์ และ blue-yellow dye) MgCl₂ ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ dNTPs 0.33 มิลลิโมลาร์ ไพร์เมอร์ 2 ไมโครโมลาร์ (ตารางที่ 8) Taq DNA polymerase จำนวน 2 ยูนิต และจีโนมดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาอุณหภูมิโพลิเมอเรส (Eppendorf Mastercycler[®], Perkin-Elmer, USA) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที	} 40 รอบ
ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 4 ที่อุณหภูมิ 74 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 5 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 6 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที	
ขั้นที่ 7 ที่อุณหภูมิ 74 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที	

ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 80 โวลท์ ในสารละลาย TAE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้กะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.0 % เป็นตัวกลาง และใช้ 1kb DNA ladder (Promega, USA) เป็น marker ย้อมแผ่นกะกาโรสเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และถ่ายรูปด้วยเครื่อง Gel documentation รุ่น Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Canada)

2.5 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint analysis)

2.5.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และดีเอ็นเอส่วน ITS (Nucleotide analysis of *rbcl* gene and ITS)

เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rbcl* ของมะขาม 3 พันธุ์ ปลูกกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rbcl* ของ *Tamarindus indica* L. (accession no. Z70160) และเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอส่วน ITS ระหว่างมะขาม 3 พันธุ์ปลูก โดยใช้โปรแกรม 'Multiple sequence alignment with hierarchical clustering' (Corpet, 1988)

ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD

RAPD Primer number	Nucleotide sequences 5' to 3'
SD-03	GTC GCC GTC A
SD-18	GAG AGC CAA C
SO-10	TCA GAG CGC C
SO-16	TCG GCG GTT C
OPA-02	TGC CGA GCT G
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-09	GGG TAA CGC C
OPA-13	CAG CAC CCA C
OPA-16	AGC CAG CGA A
OPA-20	GTT GCG ATC C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT (Hall, 1999) ลงทะเบียน (submitted) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างผ่านทางฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ/EMBL/GenBank)

2.5.2 การวิเคราะห์ข้อมูลและประมวลผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD (RAPD band scoring and DNA fingerprint analysis)

ตรวจนับแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad Laboratories, Canada) และให้คะแนน (scored) โดยให้คะแนนจากการปรากฏ (present) ของแถบที่ตำแหน่งนั้นๆ ให้เท่ากับ 1 และการไม่ปรากฏแถบ (absent) เท่ากับ 0 นำชุดข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเหมือนหรือใกล้เคียงกัน (Similarity index, S.I.) ตามสมการของ Nei และ Li (1979) ดังนี้

$$S.I. = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

เมื่อ	x และ y	คือ	มะขามพันธุ์ปลูก x และ y
	N_{xy}	คือ	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตำแหน่งเดียวกันในทั้งมะขามพันธุ์ปลูก x และ y
	N_x และ N_y	คือ	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก

โดยใช้โปรแกรม BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT (Hall, 1999) และสร้างแผนภาพเดนโดรแกรม (dendrogram) โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0 beta version 10 (Sinauer Assoc, Inc., USA) ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) และวิธี unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) ซึ่ง NJ และ UPGMA เป็นวิธีที่ใช้ระยะทางสร้างเดนโดรแกรมโดยอาศัยความสัมพันธ์ในเชิงความเหมือนของลำดับในวงศักราววิวัฒนาการ (Sneath และ Sokal, 1973 และ Sokal และ Rohlf, 1981)

3. การประเมินลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับการประเมินองค์ประกอบกรดอินทรีย์ของตัวอย่างมะขามที่มีฤทธิ์เป็นยาระบาย (Correlation of DNA fingerprint and organic acids assessment of selected tamarind cultivars with laxative activity)

ทำการประเมินผลวิธีการวิเคราะห์โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับองค์ประกอบกรดอินทรีย์ของตัวอย่างมะขามที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากจังหวัดเพชรบูรณ์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพิสูจน์เอกลักษณ์มะขามต่างพันธุ์ปลูกที่เพาะปลูกในประเทศไทยในพื้นที่เดียวกัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบทางเคมี

1.1 ปริมาณและองค์ประกอบของผลมะขามและสารอาหาร (Food content)

มะขามเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของเนื้อมะขาม ผลของมะขามประกอบด้วยเปลือกสีน้ำตาล เนื้อมีสีน้ำตาลและเหนียวห่อหุ้มเมล็ดอยู่ และมีเส้นใยที่เรียกว่า รก (Placenta) จำนวน 3 เส้น ยึดติดอยู่กับเนื้อทอดไปตามความยาวของฝัก (Gibbon และ Pain, 1985; Purseglov, 1968; Williams และคณะ, 1980) ปริมาณของส่วนประกอบต่างๆ ของผลมะขามสดจะมีปริมาณแตกต่างกันไป โดยขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่างมะขาม ปริมาณของส่วนประกอบต่างๆของผลมะขาม *Tamarindus indica* L. จำนวน 3 พันธุ์ปลูก (cultivar) จากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่ใช้ในการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 9 มีส่วนประกอบเป็นเนื้อ 47.008-50.400 % เปลือกและรก 21.397-31.813 % และเมล็ด 19.966-29.617 % ส่วนประกอบของผลมะขามโดยทั่วไปแล้วที่มีการรายงานไว้ประกอบไปด้วย เนื้อ 30-50 % (Purseglove, 1987, Shankarachrya, 1998) เปลือกและรก 11-30 % และเมล็ด 25-40 % ของผลมะขาม (Chapman และคณะ, 1984; Shankarachrya, 1998) จะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่นำมาทดลองได้ผลมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่มีรายงานไว้

ผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารต่างๆ ได้แก่ ความชื้น คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด น้ำตาลรีดิซซ์ โปรตีน ไขมัน เส้นใยอาหาร เถ้า และแร่ธาตุของมะขามจากจังหวัดเพชรบูรณ์ พันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' TI-SP/P และ 'ขันตี' TI-K/P เป็นชนิด "หวาน (sweet)" และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' TI-PY/P เป็นชนิด "เปรี้ยว (sour)" โดยการวิเคราะห์หาความชื้นจากมะขามสดและวิเคราะห์สารอาหารทางเคมีได้แสดงไว้ในตารางที่ 10 11 และ 12 จากตารางจะเห็นได้ว่าเนื้อมะขามสดและเนื้อหลังจากอบแห้งมีปริมาณความชื้นเท่ากับ 13.233-21.097 % และ 8.710-11.347 % ตามลำดับ ซึ่งแต่ละพันธุ์ปลูกมีปริมาณความชื้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' มีปริมาณความชื้นมากที่สุดทั้งในเนื้อมะขามสดและอบแห้ง ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดและน้ำตาลรีดิซซ์ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก มีค่าเท่ากับ 62.480-74.821 % และ 30.747-55.706 % ตามลำดับ ซึ่งแต่ละพันธุ์ปลูกมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดและน้ำตาลรีดิซซ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมะขามพันธุ์ปลูกที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดและน้ำตาลรีดิซซ์สูงสุด คือ 'ศรีชมภู' รองลงมา คือ 'ขันตี' ซึ่งเป็น

ตารางที่ 9 ปริมาณส่วนประกอบต่างๆ ของผลมะขามสด คิดเป็น กรัม/100 กรัม

Tamarind cultivar	ปริมาณส่วนประกอบของผลมะขาม, g/100g, แสดงค่า mean (SD)		
	Hulls	Pulp	Seed
TI-SP/P (ศรีชมภู)	21.397 (0.309)	47.008 (0.661)	29.617 (0.471)
TI-K/P (ขันตี)	21.972 (0.371)	50.400 (0.850)	25.282 (0.645)
TI-PY/P (เปรี้ยวยักษ์)	31.813 (0.297)	47.635 (0.846)	19.966 (1.107)

ตารางที่ 10 ปริมาณขององค์ประกอบน้ำในเนื้อมะขามสด

Tamarind cultivar	Moisture weight, g/100g mean (SD)
TI-SP/P (ศรีชมภู)	13.233 ^c (0.281)
TI-K/P (ขันตี)	15.937 ^b (0.182)
TI-PY/P (เปรี้ยวยักษ์)	21.097 ^a (0.095)

a, b และ c = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างพันธุ์ปลูก ($P < 0.05$)

ตารางที่ 11 ปริมาณของส่วนประกอบของสารอาหารในเนื้อมะขามอบแห้ง คิดเป็น กรัม/100 กรัม แสดงค่า mean (SD)

Tamarind cultivar	Moisture (%)	Carbohydrate (% glucose)	Reducing Sugar (% glucose)	Protein (%)	Lipid (%)	Fiber (%)	Ash (%)
TI-SP/P (ศรีชมภู)	8.710 ^b (0.036)	74.821 ^a (1.386)	55.706 ^a (1.253)	2.977 ^a (0.012)	1.328 (0.242)	3.067 ^c (0.025)	3.670 ^a (0.078)
TI-K/P (ขันตี)	6.927 ^c (0.102)	65.487 ^b (0.692)	50.541 ^b (1.251)	2.653 ^b (0.024)	0.968 (0.020)	3.761 ^b (0.026)	3.557 ^a (0.134)
TI-PY/P (เป็รียวยักษ์)	11.347 ^a (0.254)	62.480 ^c (0.000)	30.747 ^c (0.626)	1.602 ^c (0.020)	1.480 (0.294)	6.048 ^a (0.051)	2.719 ^b (0.049)

a, b และ c = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างพันธุ์ปลูก ($P < 0.05$)

ตารางที่ 12 ปริมาณของส่วนประกอบของแร่ธาตุในเนื้อมะขาม แสดงค่า mean (SD)

Tamarind cultivar	Minerals												
	mg/100 g					ppm							
	K	Mg	P	Ca	Na	Cu	Fe	Mn	Zn	Si	Al	As	Pb
TI-SP/P (ศรีชมภู)	1299.365 ^a (12.099)	127.335 ^a (3.203)	125.547 ^a (0.982)	123.735 ^a (3.401)	7.745 (1.619)	0.298 (0.031)	1.094 (1.114)	0.178 ^a (0.023)	0.273 ^a (0.043)	0.009 ^b (0.007)	NONE	NONE	NONE
TI-K/P (ขันตี)	1190.860 ^a (63.880)	122.445 ^a (17.656)	117.460 ^b (1.195)	82.015 ^b (5.579)	15.705 (8.662)	0.319 (0.018)	0.168 (0.059)	0.175 ^a (0.001)	0.168 ^a (0.004)	0.029 ^a (0.009)	NONE	NONE	NONE
TI-PY/P (เปรี้ยวยักษ์)	958.020 ^b (8.853)	40.220 ^b (0.170)	90.200 ^c (1.101)	64.630 ^c (0.537)	17.520 (6.208)	0.263 (0.004)	0.312 (0.208)	0.019 ^b (0.008)	0.030 ^b (0.001)	0.022 ^{a, b} (0.003)	NONE	NONE	NONE

a, b และ c = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างพันธุ์ปลูก ($P < 0.05$)

ชนิด “หวาน” และ ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ซึ่งเป็นชนิด “เปรี้ยว” ปริมาณน้ำตาลในมะขามชนิด “หวาน” จะสูงกว่าชนิด “เปรี้ยว” มาก ปริมาณโปรตีนในเนื้อมะขามมีอยู่ประมาณ 1.602-2.977 % และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มะขามแต่ละพันธุ์ปลูกมีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ พบปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดและน้อยกว่ามะขามหวานเกือบ 2 เท่า ส่วน ‘ศรีชมภู’ มีปริมาณของโปรตีนสูงกว่า ‘ขันตี’ เล็กน้อย ปริมาณของไขมันพบน้อยมากในเนื้อมะขาม โดยมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก พบปริมาณไขมันเพียง 0.968-1.480 % ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เส้นใยอาหารที่พบในเนื้อมะขามมีปริมาณ 3.06-6.048 % ซึ่งแต่ละพันธุ์ปลูกมีปริมาณเส้นใยอาหารแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมะขามพันธุ์ปลูกที่มีปริมาณเส้นใยอาหารสูงสุด คือ ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ พบว่ามีปริมาณเส้นใยอาหารสูงกว่ามะขามชนิดหวานประมาณ 2 เท่า ส่วนปริมาณของเถ้าที่พบในเนื้อมะขามมีค่าเท่ากับ 2.719-3.670 % โดยที่ปริมาณเถ้าในมะขามหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ มีปริมาณเถ้าสูงกว่ามะขามเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ปริมาณแร่ธาตุในเนื้อมะขามแสดงไว้ในตารางที่ 12 จะเห็นได้ว่าแร่ธาตุที่พบมากในมะขาม ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส และแคลเซียม จะพบปริมาณสูงในมะขามชนิดหวานพันธุ์ปลูก ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ สูงกว่าในมะขามเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ขณะที่ปริมาณของโซเดียมพบใน ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ สูงกว่า ‘ขันตี’ และ ‘ศรีชมภู’ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างพันธุ์ปลูก เนื้อมะขามทุกพันธุ์ปลูกจะมีปริมาณโพแทสเซียมสูงประมาณ 1 กรัม/100 กรัม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเนื้อมะขามชนิดหวาน ส่วนแร่ธาตุอื่นๆ ได้แก่ ทองแดง เหล็ก แมงกานีส สังกะสี และซิลิกอน พบในปริมาณน้อยมาก (ตารางที่ 12) ในขณะที่แร่ธาตุอื่นๆ คือ อะลูมิเนียม อาร์เซนิก และตะกั่ว ตรวจไม่พบเลยในเนื้อมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก จากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่นำมาวิเคราะห์ จากผลการทดลองสรุปได้ว่ามะขามมีคุณค่าทางโภชนาการทั้งชนิด “หวาน” และชนิด “เปรี้ยว”

เมื่อนำผลการทดลองของการวิเคราะห์สารอาหารและแร่ธาตุในเนื้อมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก มาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานไว้จากแหล่งอื่นๆ (ตารางที่ 2 และ 3) พบว่าปริมาณสารอาหารในตัวอย่างเนื้อมะขาม ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต น้ำตาลรีดิวซ์ โปรตีน ไขมัน และเส้นใยอาหาร มีใกล้เคียงกับค่าที่มีการรายงานไว้ (ตารางที่ 2) ส่วนปริมาณความชื้นและเถ้ามีค่าแตกต่างกับค่าที่มีการรายงานไว้แล้ว จากการวิเคราะห์ปริมาณแร่ธาตุในเนื้อมะขามพบว่ามะขามที่ใช้ในการทดลองทุกพันธุ์ปลูกมีปริมาณโพแทสเซียมสูงกว่าค่าที่มีการรายงานไว้แล้ว (ตารางที่ 3) ถึงสองเท่า ปริมาณของแมกนีเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม และโซเดียม มีปริมาณใกล้เคียงกับค่าที่มีการรายงานไว้ ส่วนทองแดง เหล็ก และสังกะสี มีปริมาณน้อยกว่าค่าที่มีการรายงานไว้มาก

คือ 0.263-0.319, 0.168-1.094 และ 0.030-0.273 ppm (ไมโครกรัม/กรัม) ตามลำดับ อีกทั้งยังพบแมงกานีสในเนื้อมะขามที่นำมาทดลองพบมีปริมาณ 0.019-0.178 ppm ซึ่งยังไม่พบมีรายงานปริมาณของแมงกานีสในเนื้อมะขาม

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณสารอาหารและแร่ธาตุที่มีรายงานไว้ร่วมกับผลการทดลองที่วิเคราะห์ได้ จะเห็นได้ว่ามะขามเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการเหมาะสมแก่การรับประทาน คือ มะขามมีปริมาณแร่ธาตุสูง เช่น โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม และแมกนีเซียม เป็นต้น ซึ่งแร่ธาตุต่างๆ เหล่านี้มีหน้าที่รักษาสมดุลในร่างกาย โดยแคลเซียม แมกนีเซียม และโพแทสเซียม มีหน้าที่ช่วยทำให้กระดูกและฟันแข็งแรง อีกทั้งยังมีบทบาทในการเสริมสร้างกล้ามเนื้อและสุขภาพที่แข็งแรงอีกด้วย เนื่องจากมะขามมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้ำตาล (โดยเฉพาะในมะขามชนิดหวาน) และโปรตีน มะขามจึงสามารถให้พลังงานแก่ร่างกายและมีส่วนช่วยในการสร้างกล้ามเนื้อที่แข็งแรงและมีประสิทธิภาพได้อีกด้วย (ICUC, 2001) ข้อมูลปริมาณของเกลือแร่ในมะขามที่ปลูกในประเทศไทยอาจมีประโยชน์ในการแนะนำด้านโภชนาการในคนไข้บางประเภทที่ต้องควบคุมปริมาณโพแทสเซียม เป็นต้น

1.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างเนื้อมะขาม

1.2.1 ภาวะที่เหมาะสมของการวิเคราะห์ด้วย HPLC

Ultraviolet Detector (UV Detector)

ผลการศึกษาความยาวคลื่นแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตที่ใช้วิเคราะห์ของกรดออกซาลิก มาลิก วิตามินซี ซิตริก ซักซินิก และสารละลายผสมของกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด แสดงในตารางที่ 13 (สเปกตรัมของกรดแต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก ข) จากตารางที่ 13 พบว่ากรดอินทรีย์แต่ละชนิดและสารละลายผสมของกรดอินทรีย์มีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วง 198-212 nm จะเห็นได้ว่ากรดทาร์ทาริกซึ่งเป็นกรดที่พบมากในเนื้อมะขามและสารละลายผสมของกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด มีค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 210 nm ดังนั้นในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างเนื้อมะขามจึงใช้ความยาวคลื่นแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตที่ 210 nm

ตารางที่ 13 สมบัติการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ
ใน 0.5 % (w/w) $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$

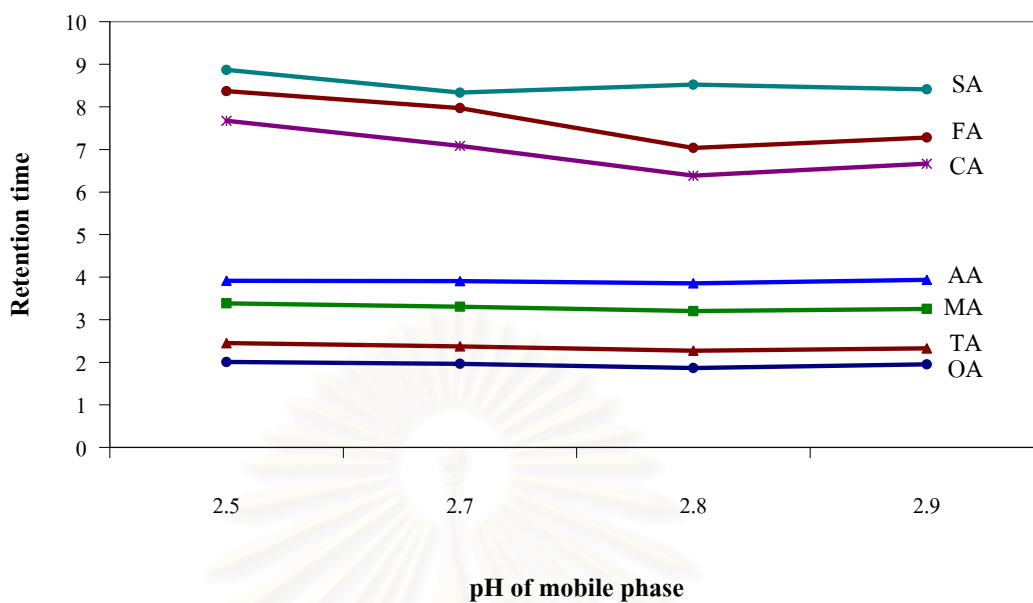
กรดอินทรีย์	ค่าความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}); nm
กรดออกซาลิก	198
กรดทาร์ทาริก	210
กรดมาลิก	206
กรดแอสคอบิก (วิตามินซี)	212
กรดซิตริก	203
กรดซัคซินิก	202
กรดอินทรีย์ผสมทั้ง 6 ชนิด	210

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของเฟสเคลื่อนที่

จากการวิเคราะห์สารละลายผสมของกรดออกซาลิก ทาร์ตริก มาลิก วิตามินซี ซิตริก ซักซินิก และฟumaric ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 % (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ที่ pH 2.5, 2.7, 2.8 และ 2.9 ตามลำดับ เป็นเฟสเคลื่อนที่ ค่า retention time ของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่ pH ต่างๆ แสดงดังภาพที่ 11 จากรูปจะเห็นได้ว่ากรดออกซาลิก มาลิก วิตามินซี ซิตริก และซักซินิก มี retention time อยู่ในช่วง 1.5-4.0 นาที และมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงมากเมื่อวิเคราะห์โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 % (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ที่ pH ต่างๆ สำหรับกรดซิตริกและซักซินิกมี retention time อยู่ในช่วง 6.5-9.0 นาที และมีค่าเปลี่ยนแปลงเมื่อวิเคราะห์โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 % (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ที่ pH ต่างกัน ที่น่าสังเกตคือ ในช่วงเวลาที่ 7.5-8.0 นาที ปรากฏพีกของกรดฟumaric เพิ่มขึ้นมาอีกหนึ่งพีก การพบพีกของกรดฟumaric เป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นทุกครั้งเมื่อทำการวิเคราะห์กรดมาลิก เพราะกรดฟumaric เป็น impurity ของกรดมาลิก การสังเคราะห์กรดมาลิกที่มีความบริสุทธิ์สูงทำได้ยาก ดังนั้นในกระบวนการผลิตจึงสามารถทำให้กรดมาลิกบริสุทธิ์ได้มากที่สุด คือ 99 % และมีกรดฟumaric เป็น impurity หลัก ถึงแม้ว่าปริมาณกรดฟumaric ที่เจือปนในกรดมาลิกจะมีปริมาณน้อย แต่เมื่อทำการวิเคราะห์แล้ว พบว่าขนาดของพีกกรดฟumaric ที่ปรากฏนั้นมีขนาดใกล้เคียงกับพีกกรดมาลิก เพราะกรดฟumaric มีค่า molar absorptivity สูงกว่ากรดมาลิก ประมาณ 100 เท่า (Kindness, 2006) พีกของกรดฟumaric มีตำแหน่งอยู่ระหว่างพีกของกรดซิตริกและซักซินิก ดังนั้นถ้าเฟสเคลื่อนที่มีค่า pH ที่ไม่เหมาะสม พีกของกรดฟumaric อาจไปรบกวน (interfered) พีกกรดซิตริกหรือซักซินิกได้ ส่งผลให้ค่าความเข้มข้นของกรดซิตริกหรือซักซินิกที่ได้จากการวิเคราะห์มีความผิดพลาด ด้วยเหตุนี้จึงเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 % (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ที่ pH 2.9 เป็น เฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างเนื้อมะขาม

จากผลการทดลองและข้อมูลต่างๆ ดังกล่าว จึงเลือกภาวะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างเนื้อมะขามด้วยเทคนิค HPLC ดังสรุปไว้ในตารางที่ 14 และแสดง HPLC chromatogram ของสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานผสมในภาพที่ 12

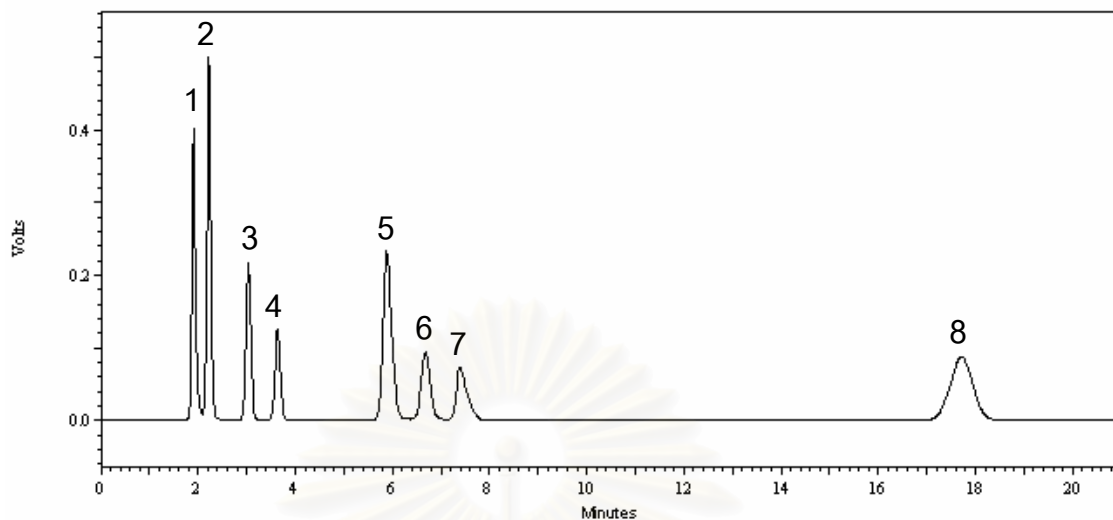


ภาพที่ 11 ผลของความเป็นกรดต่าง (pH) ของเฟสเคลื่อนที่ต่อการแยก (retention time) ของกรดอินทรีย์ด้วยคอลัมน์ Inertsil ODS-3, C18 ขนาด 150 x 4.6 mm i.d., 5 μ m ที่ความยาวคลื่น 210 nm; OA: กรดออกซาลิก, TA: กรดทาร์ทาริก, MA: กรดมาลิก, AA: กรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี), CA: กรดซิตริก, FA: กรดฟูมาริก และ SA: กรดซัคซินิก

ตารางที่ 14 ภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วยเทคนิค HPLC

HPLC parameters	Optimized conditions
คอลัมน์	Inertsil ODS-3, C18 ขนาด 150x4.6 mm i.d., 5 μ m
เฟสเคลื่อนที่	0.5 % (w/w) $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 2.9
อัตราการไหล	1 มิลลิลิตร/นาที
เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์	21 นาที
ดีเทคเตอร์	UV detector
ความยาวคลื่น	210 nm
อุณหภูมิ	25 องศาเซลเซียส
สารมาตรฐานภายใน	กรดแกลลิก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 12 โครมาโทแกรม HPLC ของสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานผสม พีคที่ 1: กรดออกซาลิก, 2: กรดทาร์ตาริก, 3: กรดมาลิก, 4: กรดแอสคอบิก, 5: กรดซิตริก, 6: กรดฟูมาริก, 7: กรดซัคซินิก และ 8: กรดแกลลิก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.2 การยืนยันความถูกต้องสมบูรณ์ของวิธีวิเคราะห์ (Validation of Analysis Technique)

1) ความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

จากการวิเคราะห์สารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานและสารมาตรฐานภายในด้วยเทคนิค HPLC สามารถคำนวณค่า resolution ระหว่างพีคของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ได้ดังแสดงในตารางที่ 15 วิธีวิเคราะห์จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการแยกเมื่อค่า resolution มีค่ามากกว่า 1.5 (USP 27, 2004) และค่า resolution ยิ่งมีค่ามากแสดงว่าการแยกระหว่างพีค 2 พีค ยิ่งดีขึ้นเท่านั้น (แมน อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, 2534) จากตารางที่ 15 พบว่า ค่า resolution ระหว่างพีคของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดมีค่าเท่ากับ 1.58-15.77 แสดงว่าเทคนิค HPLC ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารมาตรฐานภายในและกรดอินทรีย์ต่างๆ ที่วิเคราะห์ (กรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก วิตามินซี ซิตริก และ ซักซินิก) ในตัวอย่างเนื้อมะขาม

2) ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linearity) ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดอินทรีย์มาตรฐานต่อสารมาตรฐานภายใน (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐาน

แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดอินทรีย์มาตรฐานต่อสารมาตรฐานภายใน (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐานจากสมการเส้นตรง

$$y = ax + b$$

เมื่อ	y	คือ	อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดอินทรีย์มาตรฐานต่อกรดแกลลิก (Peak area ratio)
	x	คือ	ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐาน (g/L)
	a	คือ	ความชันของเส้นกราฟ
	b	คือ	ค่าจุดตัดแกน y ของเส้นกราฟ

ตารางที่ 15 ค่าการแยกจากกัน (Resolution) ของกรดอินทรีย์มาตรฐานและสารมาตรฐาน ภายในจากคอลัมน์ Inertsil ODS-3, C18 ขนาด 150x4.6 mm i.d., 5 μ m; 0.5 % (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 2.9 ที่ความยาวคลื่น 210 nm

กรดอินทรีย์	Resolution
กรดออกซาลิก	1.58
กรดทาร์ทาริก	2.11
กรดมาลิก	4.87
กรดแอสคอบิก (วิตามินซี)	3.08
กรดซิตริก	8.19
กรดฟูมาริก	2.41
กรดซัคซินิก	1.81
กรดแกลลิก	15.77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่วงความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงและสมการเส้นตรงของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการยืนยันความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง peak area ratio และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐานแสดงดังตารางที่ 16 และเส้นกราฟที่ได้แสดงในภาคผนวก ค จากตารางที่ 16 พบว่า ค่า r^2 ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความเป็นเส้นตรงของเส้นกราฟของกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก และวิตามินซี มีค่าเท่ากับ 0.9999 กรดมาลิกและซิตริกมีค่า r^2 เท่ากับ 1.0000 และ 0.9996 ตามลำดับ แสดงว่ากรดอินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง peak area ratio ต่อความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่ยอมรับได้

3) ความไวของวิธีวิเคราะห์ (Limit of Detection, LOD)

ความไวของวิธีวิเคราะห์แสดงถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอินทรีย์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ถูกต้อง (Limit of Detection, LOD) (แมน อมรสิทธิ์ และอมร เพชรสม, 2534) ค่า LOD ของกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก แอสคอบิก และซิตริก มีค่าเท่ากับ 0.0001, 0.0005, 0.0007, 0.0003, และ 0.0011 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 16) วิธีวิเคราะห์นี้มีความไวต่อกรดออกซาลิกมากที่สุด รองลงมา คือ กรดแอสคอบิก ทาร์ทาริก มาลิก และซิตริก ตามลำดับ จากค่า LOD ของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่วิเคราะห์ได้แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความไวต่อการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ที่พบในเนื้อตัวอย่างมะขาม

4) ความเที่ยงตรงแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision)

ความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันแสดงผลในรูปของ % RSD

4.1) ความเที่ยงตรงแม่นยำเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน (Intra-day precision)

การวิเคราะห์สารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานจำนวน 5 ความเข้มข้น ภายในหนึ่งวันได้ค่า RSD อยู่ในช่วง 0.51-1.62 % สำหรับกรดออกซาลิก, 0.05-1.26 % สำหรับกรดทาร์ทาริก, 0.09-1.77 % สำหรับกรดมาลิก, 0.53-1.36 % สำหรับกรดแอสคอบิก และ 0.04-1.16 % สำหรับกรดซิตริก ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 16 สรุปความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดอินทรีย์มาตรฐานกับสารมาตรฐานภายในต่อความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐานและค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอินทรีย์ที่สามารถวิเคราะห์ได้

Organic acids	Linear range (g/L)	Regression equation ^a	r^2	LOD ^b (g/L)
กรดออกซาลิก (OA)	0.0037-0.3000	$y=3.0909x-0.0009$	0.9999	0.0001
กรดทาร์ทาริก (TA)	0.3300-4.3300	$y=0.3674x-0.0015$	0.9999	0.0005
กรดมาลิก (MA)	0.0130-2.1500	$y=0.3098x-0.0030$	1.0000	0.0007
กรดแอสคอบิก (AA)	0.0005-0.3000	$y=2.0053x-0.0032$	0.9999	0.0003
กรดซิตริก (CA)	0.0100-0.8100	$y=0.2251x-0.0026$	0.9996	0.0011

^a y: อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดอินทรีย์มาตรฐานกับสารมาตรฐานภายใน

x: ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐาน

^b ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอินทรีย์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ (Limit of Detection; LOD),

S/N = 3.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 ความเที่ยงตรงแม่นยำเมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันของกรดออกซาลิก
ทาร์ทาริก มาลิก แอสคอบิก และซิตริก แสดงผลในรูป % RSD (n=3)

Organic acids	% RSD				
	ความเข้มข้นที่ 1	ความเข้มข้นที่ 2	ความเข้มข้นที่ 3	ความเข้มข้นที่ 4	ความเข้มข้นที่ 5
กรดออกซาลิก	1.62	0.51	0.95	0.89	1.59
กรดทาร์ทาริก	0.75	0.84	1.00	1.26	0.05
กรดมาลิก	0.43	1.32	0.65	0.09	1.77
กรดแอสคอบิก	1.26	0.53	1.28	1.31	1.36
กรดซิตริก	0.04	1.16	0.51	0.20	0.31

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2) ความเที่ยงตรงแม่นยำเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกัน (Inter-day precision)

การวิเคราะห์สารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานจำนวน 5 ความเข้มข้น เป็นเวลา 3 วัน ได้ค่า RSD อยู่ในช่วง 0.20-0.43 % สำหรับกรดออกซาลิก, 0.52-1.43 % สำหรับกรดทาร์ทาริก, 0.35-2.45 % สำหรับกรดมาลิก, 3.05-8.70 % สำหรับกรดแอสคอบิก และ 0.34-1.16 % สำหรับกรดซิตริก ดังแสดงในตารางที่ 18

ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ทั้งการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันสำหรับกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก แอสคอบิก และซิตริก และเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันสำหรับกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก และซิตริก มีค่า RSD ไม่เกิน 2 % แสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วยเทคนิค HPLC นี้ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด ภายในวันเดียวกันหรือวันอื่นๆ ได้ผลแบบเดียวกัน ในกรณีของกรดแอสคอบิกพบว่า ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันมีค่า RSD ไม่เกิน 2 % แต่ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันมีค่า RSD เกิน 2 % เป็นเพราะความไม่เสถียรของกรดแอสคอบิกจึงทำให้ค่าความเข้มข้นของกรดแอสคอบิกที่วิเคราะห์ได้ลดลงในแต่ละวัน ดังนั้นในการวิเคราะห์กรดแอสคอบิกในตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC จึงควรวิเคราะห์ให้เสร็จภายในวันเดียวกันหรือควรเตรียมตัวอย่างใหม่ทุกครั้งในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแอสคอบิกในแต่ละวัน

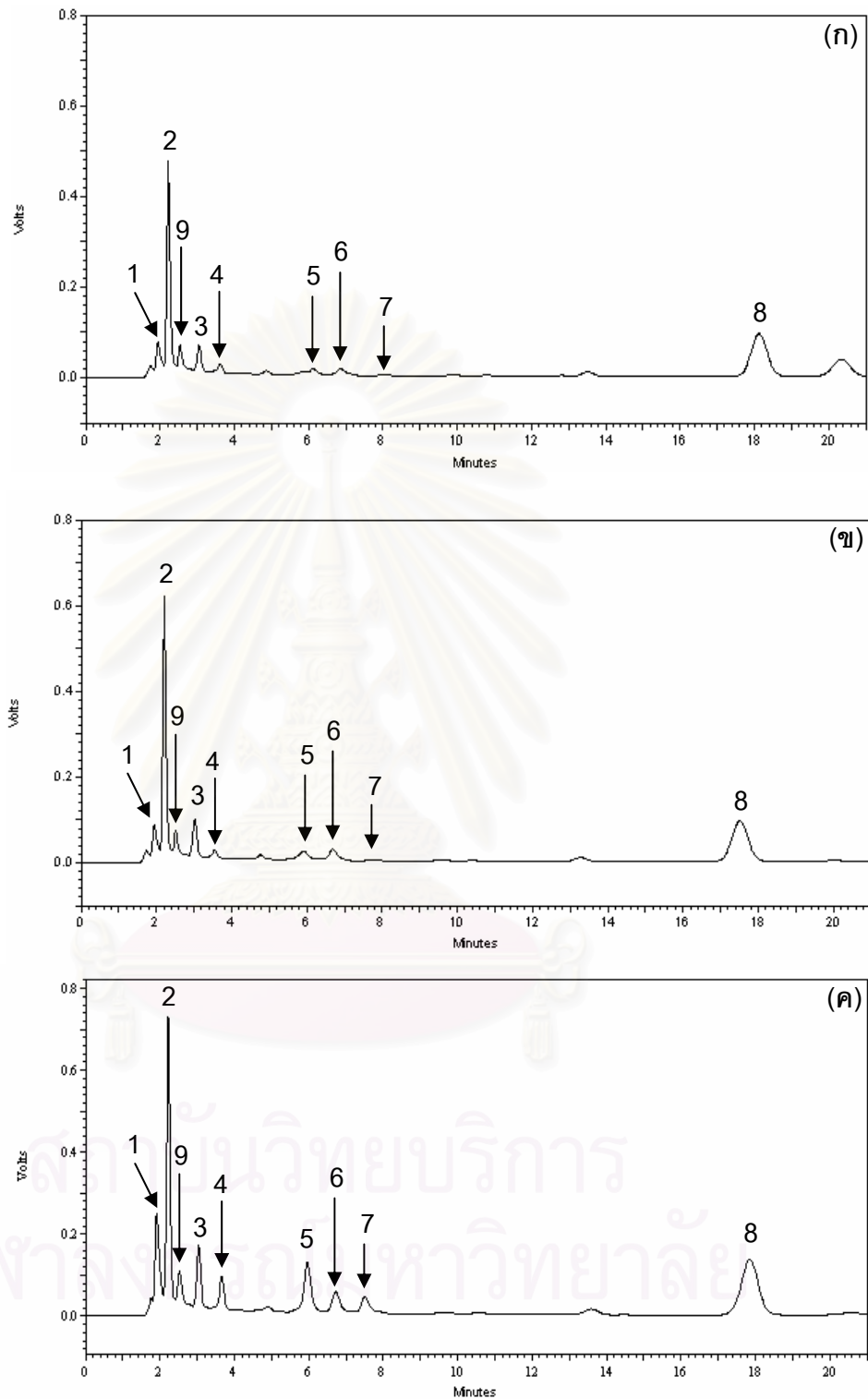
5) ความถูกต้องแน่นอนของวิธีวิเคราะห์ (Accuracy)

ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงด้วย % recovery จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ (กรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก แอสคอบิก และซิตริก) ในตัวอย่างที่เติม (spiked) สารละลายผสมของกรดอินทรีย์มาตรฐานทั้ง 5 ชนิด จำนวน 3 ความเข้มข้น (ภาพที่ 13) ได้ค่า recovery อยู่ในช่วง 101.55-113.44 % สำหรับกรดออกซาลิก, 93.75-99.42 % สำหรับกรดทาร์ทาริก, 97.02-103.04 % สำหรับกรดมาลิก, 91.94-97.87 % สำหรับกรดแอสคอบิก และ 93.83-101.71 % สำหรับกรดซิตริก ดังแสดงในตารางที่ 19 ค่า % recovery ของกรดอินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด อยู่ในช่วง 75-120 % ตามเกณฑ์ที่กำหนด (AOAC, 2002) ดังนั้นวิธีวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วยเทคนิค HPLC จากการใช้ภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมที่กำหนดในตารางที่ 14 มีความถูกต้องสามารถนำไปใช้วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างเนื้อมะขามต่อไปได้

ตารางที่ 18 ความเที่ยงตรงแม่นยำเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันของกรดออกซาลิก ทาร์ทริก มาลิก แอสคอร์บิก และซีตริก แสดงผลในรูป % RSD (n=3)

Organic acids	% RSD				
	ความเข้มข้นที่ 1	ความเข้มข้นที่ 2	ความเข้มข้นที่ 3	ความเข้มข้นที่ 4	ความเข้มข้นที่ 5
กรดออกซาลิก	0.20	0.43	0.20	0.22	0.40
กรดทาร์ทริก	0.53	1.11	1.43	0.88	0.52
กรดมาลิก	2.45	1.16	0.65	0.35	0.42
กรดแอสคอร์บิก	8.70	5.39	3.51	3.05	3.35
กรดซีตริก	0.75	0.34	1.16	0.99	1.06

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 13

โครมาโทแกรม HPLC ของกรดอินทรีย์ในน้ำสกัดมะขาม 'ขันตี' ที่เติม (spiked) สารละลายผสมกรดอินทรีย์มาตรฐานความเข้มข้นที่ 1 (ก), 2 (ข) และ 3 (ค) พีคที่ 1: กรดออกซาลิก, 2: กรดทาร์ทาริก, 3: กรดมาลิก, 4: กรดแอสคอบิก, 5: กรดซิตริก, 6: กรดฟumaric, 7 กรดซัคซินิก, 8: กรดกลูติก และ 9: unknown

ตารางที่ 19 ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ในการวิเคราะห์กรดออกซาลิก ทาร์ตาริก มาลิก แอสคอร์บิก และซิตริก แสดงผลในรูป % recovery (n=3)

Organic acids	Original (g/L)	Added (g/L)	Found (g/L)	% recovery	% RSD
Oxalic acid	0.08	0.04	0.13	113.44	0.16
		0.12	0.20	101.65	0.27
		0.20	0.28	101.55	0.65
Tartaric acid	2.22	0.85	3.06	99.42	1.79
		1.70	3.70	94.27	0.80
		2.55	4.48	93.75	0.51
Malic acid	0.98	0.23	0.82	103.04	2.98
		0.46	1.00	97.96	1.03
		0.68	1.21	97.02	2.74
Ascorbic acid	0.13	0.03	0.15	95.67	0.08
		0.09	0.20	91.94	0.14
		0.15	0.27	97.87	0.40
Citric acid	0.33	0.16	0.50	101.71	1.33
		0.33	0.62	95.06	1.92
		0.49	0.77	93.83	5.33

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำสกัดมะขาม

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำสกัดมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ด้วยเทคนิค HPLC พบกรดอินทรีย์ 5 ชนิด ตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ คือ กรดทาร์ทาริก มาลิก ซิตริก ออกซาลิก และแอสคอบิก ปริมาณกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่พบในตัวอย่างเนื้อมะขามแสดงดังตารางที่ 20 และโครมาโทแกรม HPLC ของกรดอินทรีย์ในน้ำสกัดมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' แสดงดังภาพที่ 14-16 ตามลำดับ จากตารางที่ 20 จะเห็นได้ว่ากรดอินทรีย์ที่พบมากในมะขามชนิดหวาน 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' คือ กรดทาร์ทาริก ส่วนมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' มีปริมาณกรดทาร์ทาริกต่ำกว่าแต่มีปริมาณกรดมาลิกสูงสุด ปริมาณกรดทาร์ทาริกที่พบในเนื้อมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' พบปริมาณกรดทาร์ทาริกมากที่สุดเท่ากับ 18.102 % มีปริมาณกรดมาลิก ซิตริก และออกซาลิก เท่ากับ 0.591, 0.217 และ 0.100 % ตามลำดับ มะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' พบปริมาณกรดมาลิกและซิตริกสูงกว่าในมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' และพบกรดออกซาลิกในปริมาณที่ต่ำกว่าใน 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ปริมาณกรดมาลิก ซิตริก และออกซาลิกที่พบในมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' มีปริมาณไม่ต่างกันแต่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับปริมาณกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ที่พบในมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ส่วนกรดแอสคอบิกพบปริมาณสูงจากมากไปน้อยในมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ตามลำดับ และปริมาณกรดแอสคอบิกที่พบในมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

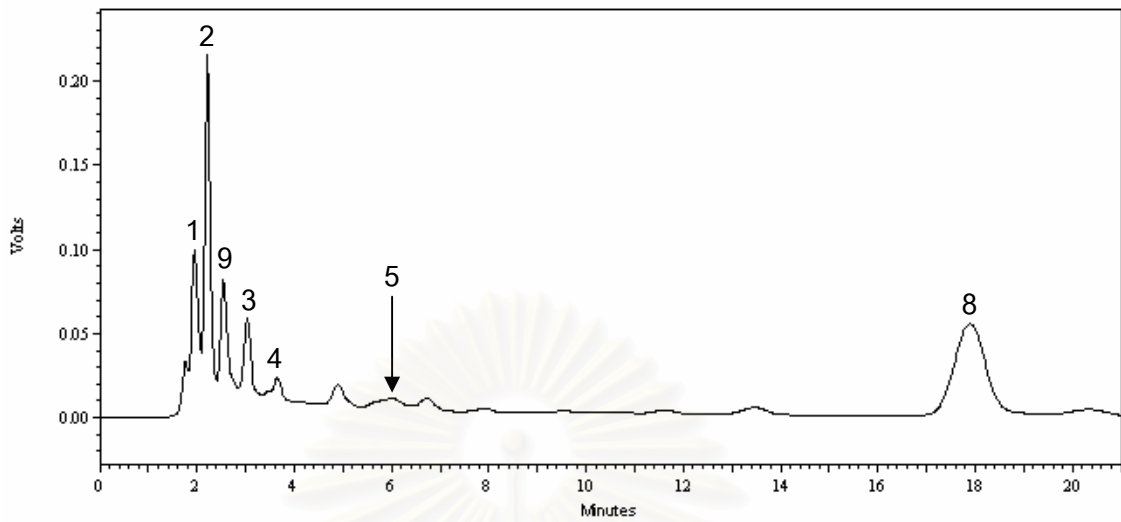
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 ปริมาณขององค์ประกอบกรดอินทรีย์ในเนื้อมะขามสดจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC method

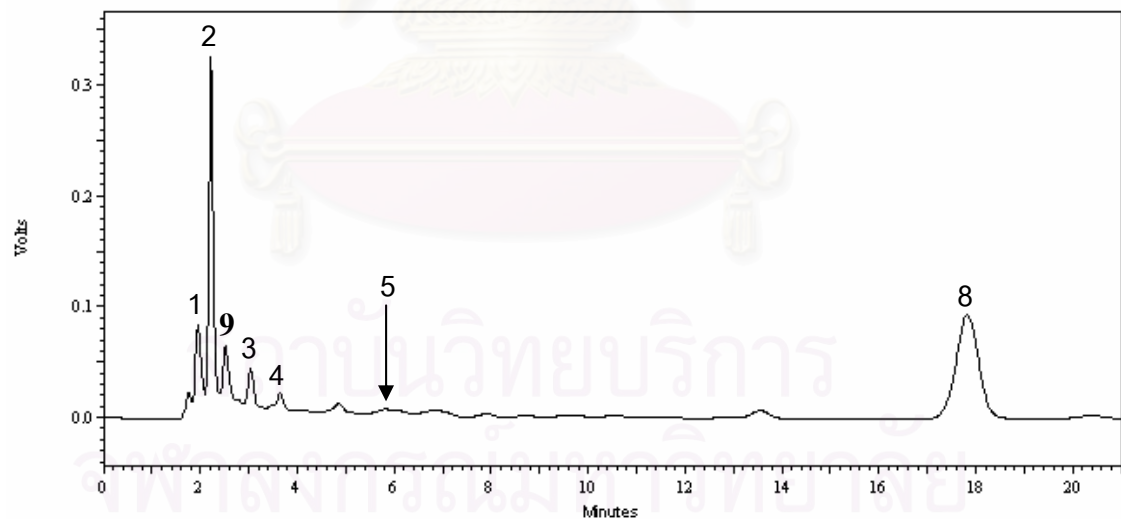
Tamarind	Organic acids				
	g/100 g			mg/100 g	
	Tartaric acid	Malic acid	Citric acid	Oxalic acid	Ascorbic acid
TI-SP/P (ศรีชมภู)	1.628 ^c (0.117)	1.888 ^a (0.057)	0.631 ^a (0.030)	89.047 ^b (3.028)	78.406 ^a (0.971)
TI-K/P (ขันตี)	2.134 ^b (0.117)	1.837 ^a (0.015)	0.652 ^a (0.014)	84.054 ^b (0.573)	57.911 ^b (2.498)
TI-PY/P (เปรี้ยวยักษ์)	18.102 ^a (0.134)	0.591 ^b (0.034)	0.217 ^b (0.003)	100.667 ^a (2.812)	16.237 ^c (2.812)

a, b และ c = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างพันธุ์ปลูก ($P < 0.05$)

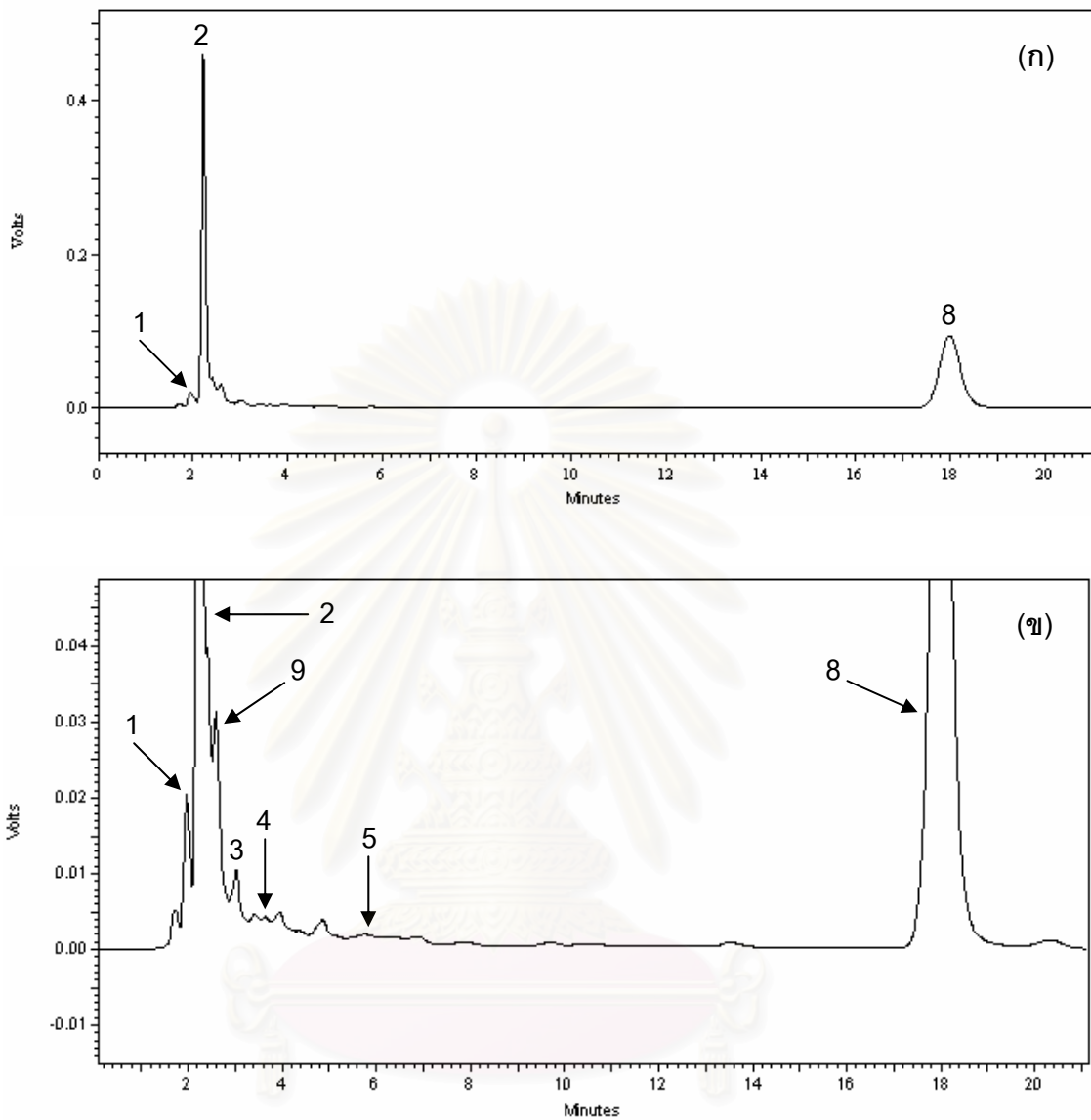
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 14 โครมาโทแกรม HPLC ของกรดอินทรีย์ในน้ำสกัดมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู'; พีคที่ 1: กรดออกซาลิก, 2: กรดทาร์ทาริก, 3: กรดมาลิก, 4: กรดแอสคอบิก, 5: กรดซิตริก, 8: กรดแกลลิก และ 9: unknown



ภาพที่ 15 โครมาโทแกรม HPLC ของกรดอินทรีย์ในน้ำสกัดมะขามพันธุ์ปลูก 'ชันดี'; พีคที่ 1: กรดออกซาลิก, 2: กรดทาร์ทาริก, 3: กรดมาลิก, 4: กรดแอสคอบิก, 5: กรดซิตริก, 8: กรดแกลลิก และ 9: unknown



ภาพที่ 16 โคโรมาโทแกรม HPLC ของกรดอินทรีย์ในน้ำสกัด 'มะขามเปรี้ยวยักษ์', (ก) และ โคโรมาโทแกรมขยายขนาดของ (ก): (ข); พีคที่ 1: กรดออกซาลิก, 2: กรดทาร์ทาริก, 3: กรดมาลิก, 4: กรดแอสคอบิก, 5: กรดซิตริก 8: กรดแกดลิก และ 9: unknown

ลักษณะเด่นของมะขาม คือ เนื้อมะขามมีกรดอินทรีย์สูง โดยเนื้อมะขามชนิดเปรี้ยวมีปริมาณกรดทาร์ทาริกสูงถึง 12.20-23.80 % ซึ่งสูงกว่าพีชชนิดอื่นๆ ที่มีการศึกษาไว้ (Ulrich, 1970) นอกจากกรดทาร์ทาริกแล้วยังมีกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่พบในมะขาม คือ กรดออกซาลิก กรดแอสคอร์บิก ซักซินิก ซิตริก และควินิก (Lewis และ Neelakantan, 1964 a; Singh, 1973; Anon, 1976) โดยกรดแอสคอร์บิกที่พบในมะขามจะมีปริมาณน้อยมาก ประมาณ 2-20 มิลลิกรัม/100 กรัม (Ishola และคณะ, 1990; Lefevre, 1971) สำหรับการทดลองนี้กรดอินทรีย์ที่พบในเนื้อมะขาม คือ กรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก แอสคอร์บิก และซิตริก แต่ไม่พบกรดซักซินิก และควินิกตามข้อมูลที่มีการรายงานไว้แล้ว มีนักวิจัยแต่ละกลุ่มได้รายงานปริมาณของกรดทาร์ทาริกในเนื้อมะขามที่มีค่าแตกต่างกันไป ได้แก่ Hasan และ Ijaz (1972) พบว่าในเนื้อมะขามชนิดเปรี้ยวในประเทศปากีสถานมีปริมาณกรดทาร์ทาริกประมาณ 8.40-12.40 % ปริมาณกรดทาร์ทาริกของมะขามในประเทศไทยพบประมาณ 2.50-11.30 % โดยมะขามชนิดหวานมีปริมาณกรดทาร์ทาริกน้อยกว่ามะขามชนิดเปรี้ยว คือ มีค่าต่ำกว่า 2.00-3.20 % (Feungchan และคณะ, 1996) ดังแสดงในตารางที่ 4 ขณะที่ ชูศักดิ์ สัจจพงษ์ และคณะ (2542) พบว่ามะขามชนิดเปรี้ยวมีปริมาณกรดทาร์ทาริกประมาณ 12.00-17.00 %

เมื่อนำข้อมูลของคณะผู้วิจัยต่างๆ ที่มีรายงานไว้แล้วมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า มะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ จากจังหวัดเพชรบูรณ์ มีปริมาณของกรดทาร์ทาริกใกล้เคียงกับค่าที่ชูศักดิ์ สัจจพงษ์ และคณะ (2542) ได้รายงานไว้ มะขามชนิดหวาน ‘ขันตี’ มีปริมาณกรดทาร์ทาริกใกล้เคียงกับค่าที่ Feungchan และคณะ (1996) ได้รายงานไว้ ส่วน ‘ศรีชมภู’ มีปริมาณกรดทาร์ทาริกน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับมะขามพันธุ์ปลูกอื่นและเปรียบเทียบกับค่าที่ได้รายงานไว้แล้ว

จากผลการทดลองในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอินทรีย์ในเนื้อมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก จากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่เลือกนำมาวิจัย ปริมาณกรดอินทรีย์ในมะขามชนิดเปรี้ยวจะมีปริมาณกรดทาร์ทาริกและออกซาลิกสูงกว่ามะขามชนิดหวาน ส่วนปริมาณกรดมาลิกและซิตริกมีปริมาณต่ำกว่า

จากการส่งตัวอย่างน้ำสกัดมะขามชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ และมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ไปทดสอบฤทธิ์การเป็นยาระบายในหนูขาว ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่ากรดอินทรีย์ 3 ชนิด ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานควบคุม ได้แก่ กรดทาร์ทาริก มาลิก และซิตริก มีฤทธิ์กระตุ้นในการระบาย โดยกรดอินทรีย์ที่มีฤทธิ์

กระตุ้นการระบายมากที่สุดในความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม คือ กรดทาร์ทาริก ซิตริก และ มาลิก ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาวของกรดทาร์ทาริก ซิตริก และมาลิก เท่ากับ 62.56 ± 13.77 , 60.45 ± 4.50 และ 57.03 ± 5.01 ตามลำดับ ส่วนน้ำสกัดตัวอย่างมะขาม พบว่าน้ำสกัดความเข้มข้น 20% ของมะขามชนิดหวาน 'ขันตี' 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' และมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' มีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาว เท่ากับ 54.09 ± 5.23 , 53.97 ± 1.72 และ 52.05 ± 6.83 ตามลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุม (control) ที่ให้น้ำกลั่นมีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาว เท่ากับ 45.96 ± 2.03 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่มทดลอง ($p < 0.05$) (รายละเอียดและผลการทดสอบฤทธิ์การเป็นยาระบายของตัวอย่างน้ำสกัดมะขามและกรดอินทรีย์มาตรฐานในหนูขาวแสดงดังภาคผนวก ง) เมื่อพิจารณาผลการทดสอบฤทธิ์การเป็นยาระบายของกรดทาร์ทาริก มาลิก ซิตริก และน้ำสกัดมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' พบว่า น้ำสกัดมะขามทั้งชนิดเปรี้ยวและหวานมีฤทธิ์ในการระบายได้เช่นเดียวกับกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่ากรดอินทรีย์ที่พบในมะขามมีผลออกฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เกิดการระบายในหนูขาว

จากผลการทดลองในสัตว์ทดลองดังที่ได้กล่าวข้างต้น อาจสรุปได้ว่ามะขามมีฤทธิ์เป็นยาระบายอ่อนๆ โดยมีกรดอินทรีย์ คือ กรดทาร์ทาริก มาลิก และซิตริก เป็นสารออกฤทธิ์กระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ร่วมกัน

2. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint studies)

2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Genomic DNA extraction)

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ด้วยวิธี CTAB extraction (Dellaporta และคณะ, 1983; Murray และ Thompson, 1980) ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ชุดสำเร็จรูป GENECLEAN[®] II KIT (MP Biomedicals, France) เพื่อกำจัดพอลิแซ็กคาไรด์ในตัวอย่างไม่ให้พอลิแซ็กคาไรด์อาจไปรบกวนปฏิกิริยา PCR ได้ โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ปนเปื้อนอยู่ในดีเอ็นเอจะไปยับยั้งการทำงานของ DNA polymerase (Kim, 2000; Peist, 2001) ได้สารสกัดดีเอ็นเอบริสุทธิ์แสดงให้เห็น 1 แถบ (band) ของจีโนมิกดีเอ็นเอ (ภาพที่ 17) เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

2.2 การตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอ

2.2.1 การแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis)

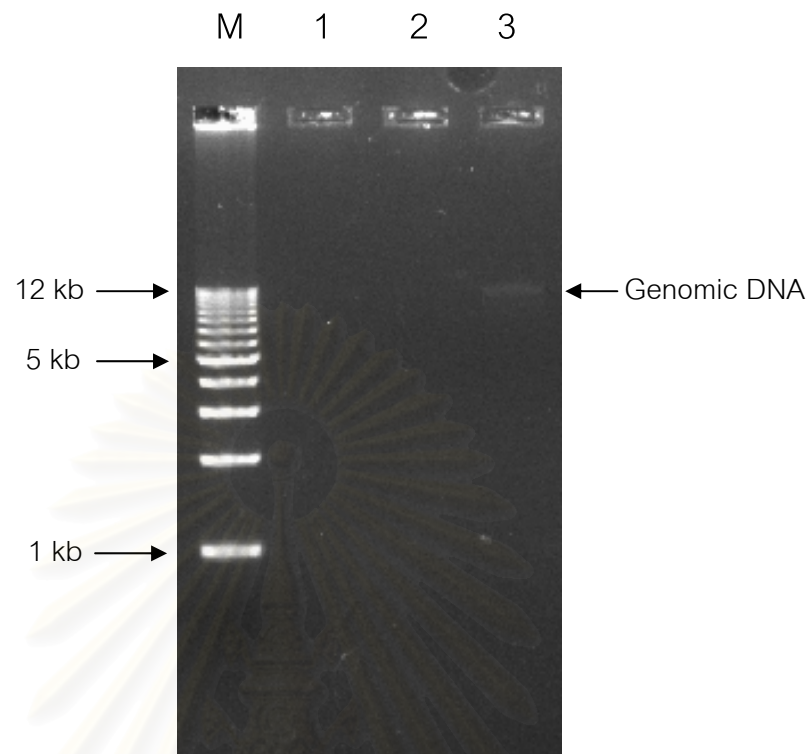
ตรวจสอบจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 100 โวลท์ เป็นเวลา 15 นาที ในสารละลาย TAE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.0 % เป็นตัวกลาง และใช้ 1kb DNA ladder (Promega, USA) เป็น marker ดังแสดงในภาพที่ 17 จากภาพจะเห็นได้ว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่กว่า 12 kb และมีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นจึงเพิ่มจำนวนของจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยการนำไปทำปฏิกิริยา PCR

2.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

ตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 18-25S 5'F และ 18-25S 3'R ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 100 โวลท์ เป็นเวลา 15 นาที ในสารละลาย TAE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.0 % และใช้ 1kb DNA ladder (Promega, USA) เป็น marker ผลผลิต PCR มีขนาดเล็กกว่า 1 kb ดังแสดงในภาพที่ 18 จะเห็นได้ว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดีพอที่จะใช้วิเคราะห์ด้วยปฏิกิริยา PCR ในการทดลองขั้นต่อไปได้

2.3 การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน (partial sequence) ของยีน *rbcL* ของ *T. indica* L. (accession no. Z70160) ที่มีใน GenBank เป็นต้นแบบ มีดังนี้ Rbcl-Tam-F01, Rbcl-Tam-R02, Rbcl-Tam-F03 และ Rbcl-Tam-R04 ส่วนไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของ *Arabidopsis thaliana* (accession no. NC_000932) ที่มีใน GenBank เป็นต้นแบบ มีดังนี้ Rbc-BMP-fixF-01, rbcIBMP684R, Rbc-BMP-fixF-03 และ Rbc-BMP-fixR-04 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 7



ภาพที่ 17 แถบสีโนมิคทีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูกที่ใช้ในการวิจัย เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 %

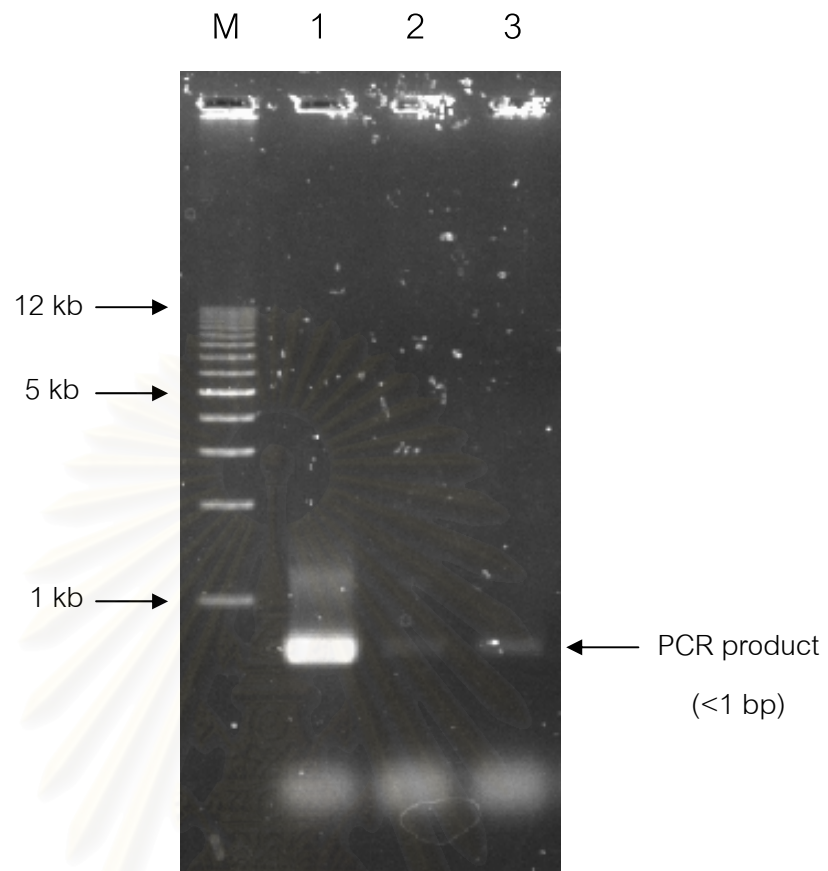
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 4 (TI-PY/P4)

Lane 2: 'ศรีชมภู' ต้นที่ 1 (TI-SP/P1)

Lane 3: 'ขันตี' ต้นที่ 1 (TI-K/P1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 18

แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ 18-25S 5'F กับ 18-25S 3'R ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมิตีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 %

M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1: 'ขันตี' ต้นที่ 1 (TI-K/P1)

Lane 2: 'ศรีชมภู' ต้นที่ 1 (TI-SP/P1)

Lane 3: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 1 (TI-PY/P1)

นอกจากการใช้ไพรเมอร์ Rbcl-Tam-F01 กับ Rbcl-Tam-R02 และ Rbcl-Tam-F03 กับ Rbcl-Tam-R04 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ยังใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* อีกด้วย ตำแหน่งและทิศทางของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองบนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของ *Arabidopsis thaliana* (accession no. NC_000932) ที่มีใน GenBank แสดงดังภาพที่ 19

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS ออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S, 5.8S และ 26S rDNA และดีเอ็นเอส่วน ITS-1 และ ITS-2 ของ *Stemona japonica* (accession no. AF207028) ที่มีใน GenBank เป็นต้นแบบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้

Stmn-ITS-F: 5'-GAG AAG TCC ACT GAA CCT TAT C-3'

ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (White และคณะ, 1990)

2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* (DNA amplification, nucleotide sequencing, and nucleotide alignment of *rbcl* gene)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rbcl* ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Rbcl-Tam-F01, Rbcl-Tam-R02, Rbcl-Tam-F03, Rbcl-Tam-R04, Rbc-BMP-fixF-01, rbcBMP684R, Rbc-BMP-fixF-03 และ Rbc-BMP-fixR-04 ส่วนประกอบและภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR แสดงดังตารางที่ 21 ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ annealing temperature ที่ให้ปริมาณผลผลิต PCR สูงสุด เท่ากับ 2.5 มิลลิโมลาร์ และ 50 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ความต่างศักย์ 100 โวลท์ โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.0 % พบว่า ผลผลิต PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ “Rbcl-Tam-F01 กับ Rbcl-Tam-R02” และ “Rbcl-Tam-F03 กับ Rbcl-Tam-R04” มีขนาดประมาณ 800 และ 650 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 20 และ 21) ส่วนผลผลิต PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ “Rbc-BMP-fixF-01 กับ rbcBMP684R” และ “Rbc-BMP-fixF-03 กับ Rbc-BMP-fixR-04” มีขนาดประมาณ 800 และ 450 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 22 และ 23)

ส่งผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ Rbcl-Tam-F01, Rbcl-Tam-R02, Rbcl-Tam-F03, Rbcl-Tam-R04, Rbc-BMP-fixF-01, rbcBMP684R, Rbc-BMP-fixF-03 และ Rbc-BMP-fixR-04 ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ

5'

1 gaaagaatat acaataatga tgtatttggc gaatcaaata tcatggtcta ataaagaata
61 attctgatta gttgataatt ttgtgaaaga ttctctgtgaa aaagggttaat taaatctatt

Rbc-BMP-fixF-01

121 cctaatttat gtcgagtaga ccttgttgtt ttgtttttatt gcaagaattc taaattcatg

181 acttgttagg agggactt at gtcaccacaa acagagacta aagcaagtgt tgggttcaaa

Rbcl-tam-F01

241 gctggtggtta aagagtataa attgacttac tatactcctg aatatgaaac caaggatact
301 gatatacttg cagcattccg agtaactcct caacctggag ttccacctga agaagcaggg
361 gctgcggttag ctgctgaatc ttctactggg acatggacaa ctgtgtggac cgatgggctt
421 accagccttg atcgttacaa aggacgatgc taccacatcg agcccgttcc aggagaagaa
481 actcaattta ttgcgtatgt agcttatccc ttagaccttt ttgaagaagg ttcggttact
541 aacatgttta cctcgattgt gggtaatgta tttgggttca aagccctggc tgctctacgt
601 ctagaggatc tgcgaatccc tcctgcttat actaaaactt tccaaggacc acctcatggt
661 atccaagttg aaagagataa attgaacaag tatggacgct ccctattagg atgtactatt
721 aaaccaaagt tggggttatc cgcgaaaaac tatggtagag cagtttatga atgtctacgt
781 ggtggacttg attttaccaa agatgatgag aatgtgaact cccaaccatt tatgctgttg

rbcI684R

841 agagaccggt tcttattttg tgccgaagct atttataaat cacaggctga aacagggtgaa

Rbcl-tam-F03

901 atcaaagggc attatttgaa tgctactgcg ggtacatgcg aagaaatgat caaaagagct

961 gtatttgcca gagaattggg agttcctatc gtaatgcatg actacttaac aggggggattc

Rbcl-tam-R02

1021 accgcaaata ctagtgtgtc tcattattgc cgagataatg gcttacttct tcacatccac
1081 cgtgcaatgc acgctgttat tgatagacag aagaatcatg gtatgcactt ccgtgtacta
1141 gctaaagctt tacgtctatc tgggtggagat catattcacg cgggtacagt agtaggtaaa
1201 cttgaaggag acagggagtc aactttgggc tttgttgatt tactgcgcga tgattatggt
1261 gaaaaagatc gaagccgcgg tatctttttc actcaagatt ggggtctcact acctggtggt

Rbc-BMP-fixF-03

1321 ctgcctgtgg cttcagggggg tattcacggt tggcatatgc ctgctttgac cgagatcttt
1381 ggagatgatt ctgtactaca attcggtgga ggaacttttag gccacccttg gggaaatgca
1441 ccgggtgccc tagccaaccg agtagctctg gaagcatgtg tacaagctcg taatgagga
1501 cgtgatcttg cagtcgaggg taatgaaatt atccgtgaa cttgcaaatg gagtctgaa

Rbcl-tam-R04

1561 cttagctgctg cttgtgaagt atggaaagag atcacattta acttccaac catcgataaa

Stop codon

1621 ttagatggcc aagag tagat gaattagatt tagtaattca cgtttgtttt attagtttaa

Rbc-BMP-fixR-04

1681 ttgcactcgg ctcaatcttt tttttactaa aaaagattga gccgagggtta tctgttgat
1741 atactatctt ttttgataga tacatactta aatntagata gaaaaaaaaac tcttcaataa

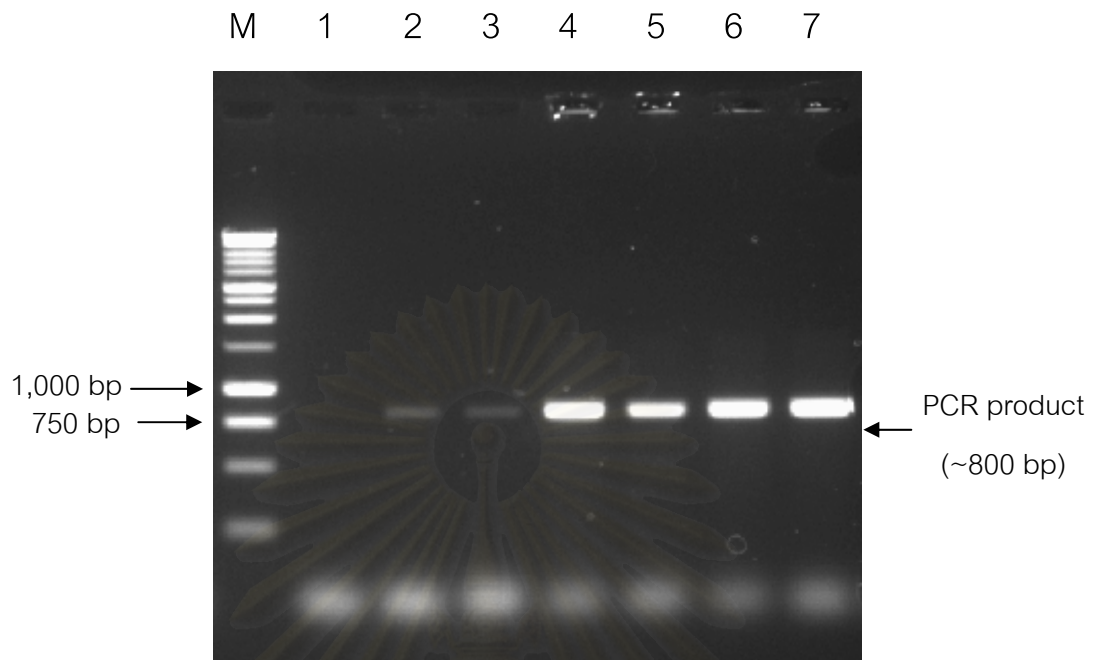
3'

ภาพที่ 19 ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์
ของยีน *rbcL* บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของ *Arabidopsis thaliana*
(accession no. NC_000932) ที่มีใน Genbank

ตารางที่ 21 ส่วนประกอบและภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *rbcL* ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร

PCR parameters	Optimised condition for <i>rbcL</i> gene amplification
PCR buffer (10 X)	1 X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0 and 0.1 % Triton X-100)
MgCl ₂ concentration	2.5 mM
Primer concentration	0.25 μM
dATP, dTTP, dCTP and dGTP mixture	0.2 mM
<i>Taq</i> DNA polymerase	1.5 U
DNA template	100 ng per a reaction
Thermal cycling condition	First cycle: 95°C for 2 min. 35 cycles: 95°C for 40 sec, 50°C for 40 sec, 72°C for 1 min. Last cycle: 72°C for 5 min.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 20 แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ที่ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ rbcL-tam-F01 กับ rbcL-tam-R02 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 %

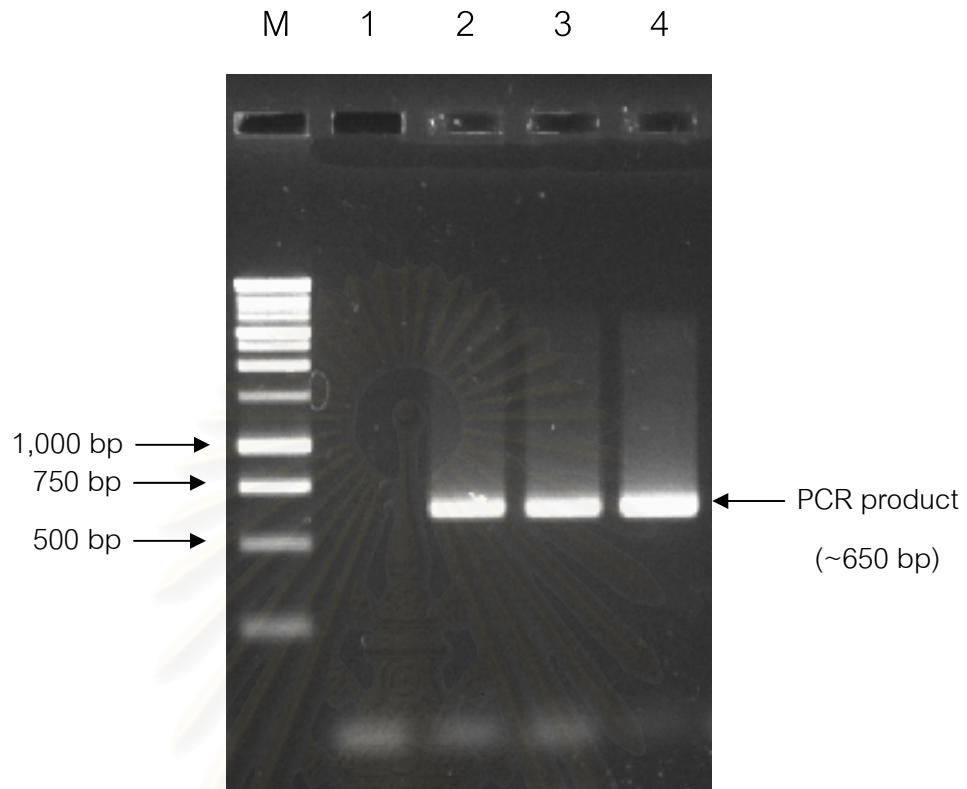
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1: Negative control

Lane 2, 3: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 และ 3 (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

Lane 4, 5: 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 และ 4 (TI-SP/P3 และ TI-SP/P4)

Lane 6, 7: 'ขันตี' ต้นที่ 1 และ 4 (TI-K/P1 และ TI-K/P4)



ภาพที่ 21 แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ rbcL-tam-F03 กับ rbcL-tam-R04 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 %

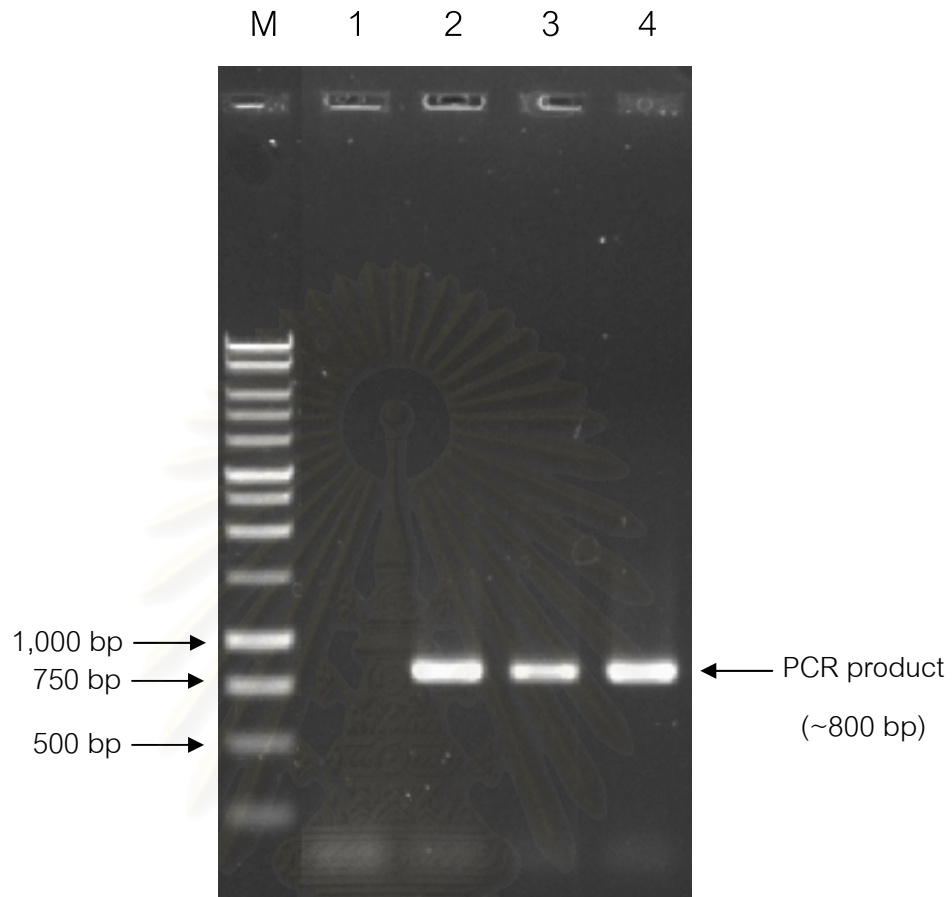
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1: Negative control

Lane 2: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 (TI-PY/P2)

Lane 3: 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 (TI-SP/P3)

Lane 4: 'ขันตี' ต้นที่ 1 (TI-K/P1)



ภาพที่ 22 แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ Rbc-BMP-fixF-01 กับ rbcBMP684R ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 %

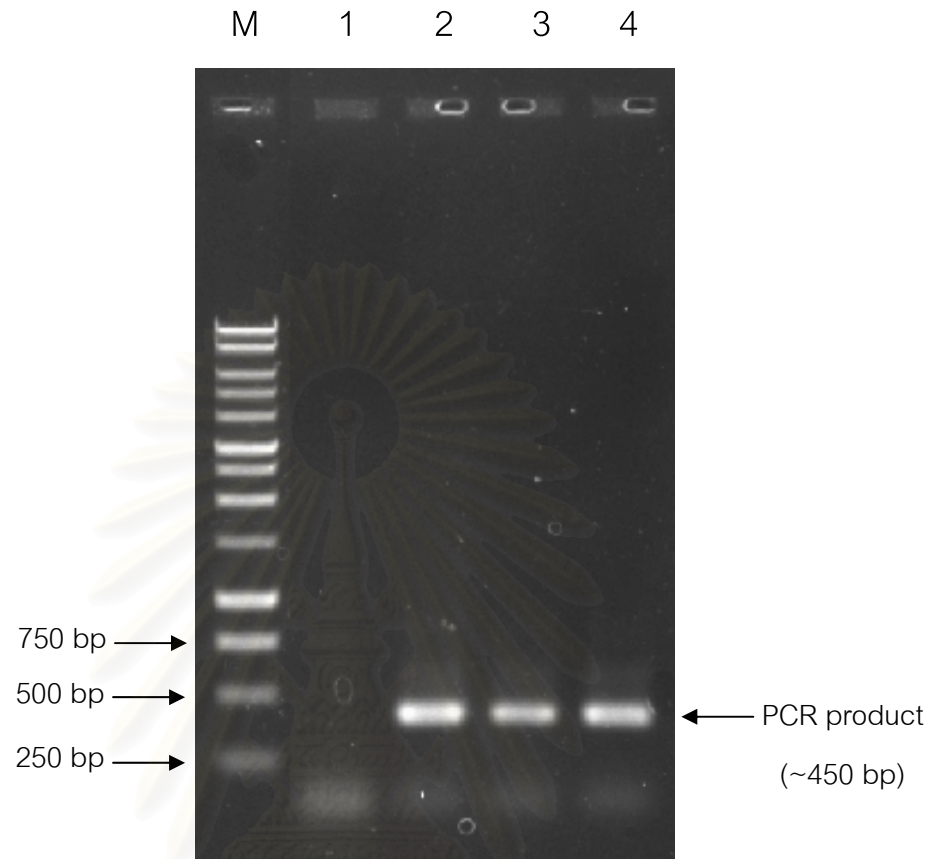
Lane 1: 1 kb DNA Ladder

Lane 2: Negative control

Lane 3: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 (TI-PY/P2)

Lane 4: 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 (TI-SP/P3)

Lane 5: 'ขันตี' ต้นที่ 1 (TI-K/P1)



ภาพที่ 23 แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ Rbc-BMP-fixF-03 กับ Rbc-BMP-fixR-04 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมที่ดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 %

M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1: Negative control

Lane 2: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 (TI-PY/P2)

Lane 3: 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 (TI-SP/P3)

Lane 4: 'ขันตี' ต้นที่ 1 (TI-K/P1)

เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จัดเรียง (align) และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rbcL* ของตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rbcL* ของ *Tamarindus indica* L. (accession no. Z70160); *Nicotiana tabacum* (accession no. Z00044); *Pisum sativum* (accession no. X03853) และ *Medicago truncatula* (accession no. NC_003119) ที่มีใน GenBank ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) ดังแสดงในภาคผนวก จ

จากผลการทดลองในภาคผนวก จ พบว่ายีน *rbcL* ของมะขามชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ มีขนาดเท่ากับ 1,428 bp ส่วนมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *rbcL* มีขนาดเท่ากับ 1,398 bp โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เริ่ม จากตำแหน่งที่ 31 ของตำแหน่ง 5' ของยีน *rbcL* จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก กับ *T. indica* L. (accession no. Z70160) ได้ผลดังแสดงในภาคผนวก ฉ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของมะขามชนิดหวานและ ชนิดเปรี้ยวที่ใช้ในการวิจัยจากจังหวัดเพชรบูรณ์แตกต่างจาก *T. indica* L. (accession no. Z70160) ทั้งหมด 24 ตำแหน่ง จากการเปรียบเทียบ 1,368 ตำแหน่ง (1.75 %) ดังแสดงในตารางที่ 22 ดังนี้

- มะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก ที่เพาะปลูกในประเทศไทยมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ที่ตำแหน่งที่ 96, 167, 168, 290, 372, 427, 434, 462 และ 1,221 ด้วย guanine, cytosine, adenine, thymine, cytosine, thymine, thymine, thymine และ guanine ตามลำดับ
- ‘ศรีชมภู’ มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ซึ่งแตกต่างจาก ‘ขันตี’ และ ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ที่ตำแหน่งที่ 850, 885, 1,060, 1,061 และ 1,064 ด้วย adenine, guanine, thymine, guanine และ thymine ตามลำดับ
- ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ซึ่งแตกต่างจาก ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ ที่ตำแหน่งที่ 31, 43, 44 และ 696 ด้วย cytosine, adenine, guanine, และ cytosine ตามลำดับ

อย่างไรก็ดี เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ ปลูก พบว่าในกลุ่มตัวอย่างของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกพบ variation ดังนี้

ตารางที่ 22 การแทนที่ใน 24 ตำแหน่ง ของนิวคลีโอไทด์ในยีน *rbcL* ของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากจังหวัดเพชรบูรณ์ เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *rbcL* ของ *T. indica* L. (accessions no. Z70160) ที่มีใน GenBank โดยเริ่มเปรียบเทียบตั้งแต่ตำแหน่งที่ 31 ของตำแหน่ง 5' ของยีน *rbcL*

Species	Cultivars	No.	Voucher no.	Nucleotide positions																							
				31	42	43	44	96	167	168	290	372	427	434	462	696	705	736	738	850	885	954	964	1060	1061	1064	1221
<i>T. indica</i> L.	non-identified	-	-	G	A	G	C	A	A	G	A	T	G	C	C	G	T	A	A	T	T	A	G	A	T	A	A
<i>T. indica</i> L.	'Srichomphu'	1	PCUTI-SP/P1	*	G	*	*	G	C	A	T	C	T	T	T	*	*	*	*	A	G	*	*	T	G	T	G
		2	PCUTI-SP/P2	*	*	*	*	G	C	A	T	C	T	T	T	*	*	*	*	A	G	*	*	T	G	T	G
		3	PCUTI-SP/P3	*	*	*	*	G	C	A	T	C	T	T	T	*	*	*	*	A	G	*	*	T	G	T	G
		4	PCUTI-SP/P4	*	*	*	*	G	C	A	T	C	T	T	T	*	*	*	*	A	G	*	*	T	G	T	G
		5	PCUTI-SP/P5	*	*	*	*	G	C	A	T	C	T	T	T	A	*	*	C	A	G	*	*	T	G	T	G
<i>T. indica</i> L.	'Khanti'	1	PCUTI-K/P1	*	*	*	*	G	C	A	T	C	T	T	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G
		2	PCUTI-K/P2	*	*	*	*	G	C	A	T	C	T	T	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G
		3	PCUTI-K/P3	*	*	*	*	G	C	A	T	C	T	T	T	A	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G
		4	PCUTI-K/P4	*	*	*	*	G	C	A	T	C	T	T	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G
		5	PCUTI-K/P5	*	*	*	*	G	C	A	T	C	T	T	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G
<i>T. indica</i> L.	'Priaoyak'	3	PCUTI-PY/P3	C	*	A	G	G	C	A	T	C	T	T	T	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G
		4	PCUTI-PY/P4	C	*	A	G	G	C	A	T	C	T	T	T	C	*	T	*	*	*	C	C	*	*	*	G
		5	PCUTI-PY/P5	C	*	A	G	G	C	A	T	C	T	T	T	C	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	G

เครื่องหมาย * แทนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของ *T. indica* (accession no. Z70160) ที่มีใน GenBank

ตารางที่ 23 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในยีน *rbcL* ของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากจังหวัดเพชรบูรณ์

Species	Cultivars	Accession no.	Voucher no.	Nucleotide positions															
				31	42	43	44	696	705	736	738	850	885	954	964	1060	1061	1064	
<i>T. indica</i> L.	'Srichomphu'	AB378725	PCUTI-SP/P1	G	G	G	C	G	T	A	A	A	G	A	G	T	G	T	
			PCUTI-SP/P2	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		AB378726	PCUTI-SP/P3	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
			PCUTI-SP/P4	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		AB378727	PCUTI-SP/P5	*	A	*	*	A	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>T. indica</i> L.	'Khanti'		PCUTI-K/P1	*	A	*	*	*	*	*	*	T	T	*	*	A	T	A	
			PCUTI-K/P2	*	A	*	*	*	*	*	*	T	T	*	*	A	T	A	
		AB378728	PCUTI-K/P4	*	A	*	*	*	*	*	*	T	T	*	*	A	T	A	
			PCUTI-K/P5	*	A	*	*	*	*	*	*	T	T	*	*	A	T	A	
		AB378729	PCUTI-K/P3	*	A	*	*	A	C	*	*	T	T	*	*	A	T	A	
<i>T. indica</i> L.	'Priaoyak'	AB378730	PCUTI-PY/P3	C	A	A	G	C	*	*	*	T	T	*	*	A	T	A	
		AB378731	PCUTI-PY/P4	C	A	A	G	C	*	T	*	T	T	C	C	A	T	A	
		AB378732	PCUTI-PY/P5	C	A	A	G	C	*	T	*	T	T	*	*	A	T	A	

เครื่องหมาย * แทนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 'ศรีชมภู' ต้นที่ 1 (PCUTI-SP/P1)

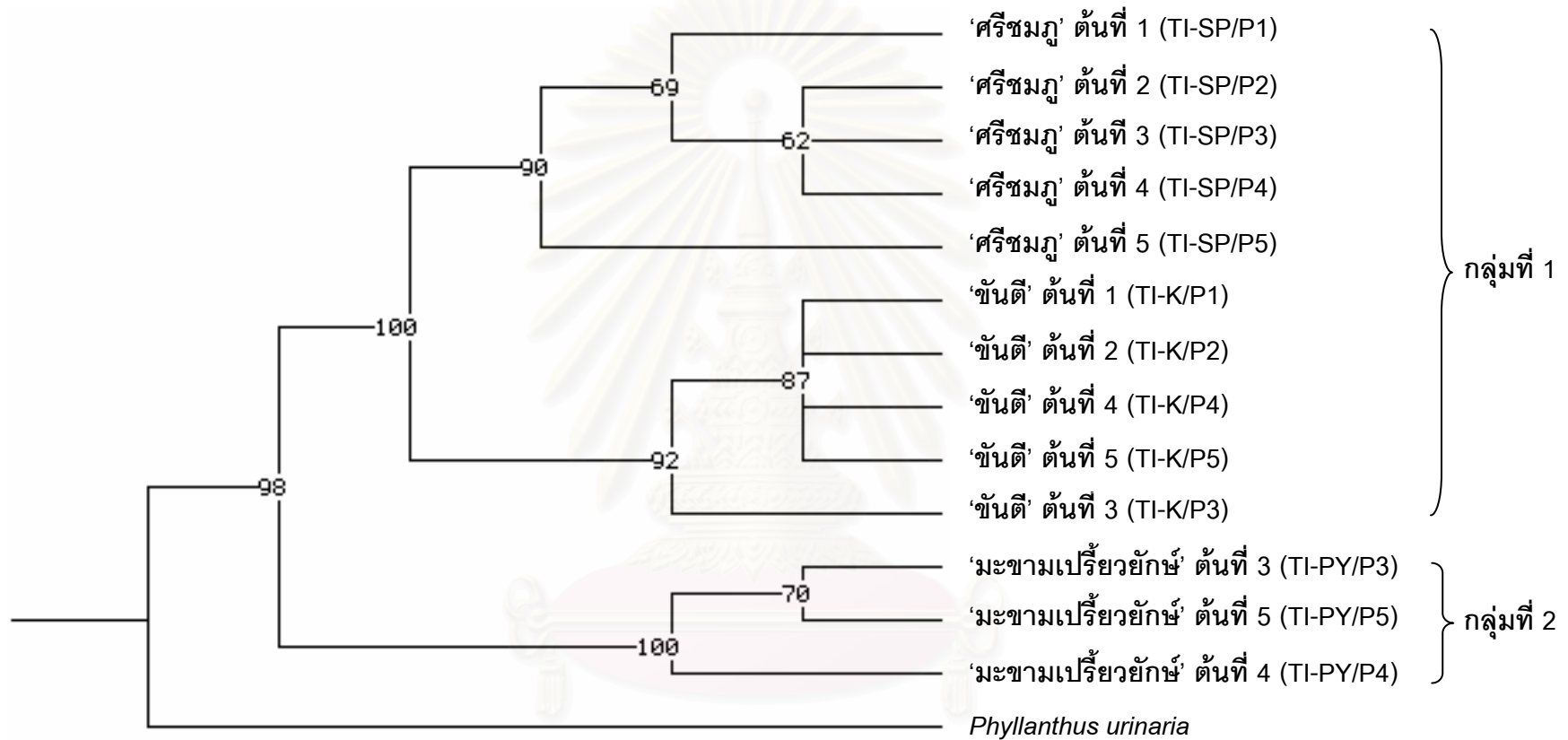
- ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 'ศรีษมภู' ต้นที่ 1 เกิดการแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 42 ด้วย guanine และ 'ศรีษมภู' ต้นที่ 5 เกิดการแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 696 และ 738 ด้วย adenine และ cytosine ตามลำดับ คิดเป็นการเกิด variation ในกลุ่มตัวอย่าง เท่ากับ 0.21 %
- ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 'ขันตี' ต้นที่ 3 เกิดการแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 696 และ 705 ด้วย adenine และ cytosine ตามลำดับ คิดเป็นการเกิด variation ในกลุ่มตัวอย่าง เท่ากับ 0.14 %
- ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 3 เกิดการแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 736 ด้วย adenine และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 4 เกิดการแทนที่ที่ตำแหน่งที่ 954 และ 964 ด้วย cytosine คิดเป็นการเกิด variation ในกลุ่มตัวอย่าง เท่ากับ 0.21 %

จากผลการทดลองสรุปได้ว่านิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 31, 43, 44, 696, 850, 885, 1,060, 1,061 และ 1,064 สามารถใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายในการจำแนกพันธุ์ปลูกของมะขามชนิดหวานและชนิดเปรี้ยวได้

จากนั้นลงทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามชนิดหวาน 'ศรีษมภู' และ 'ขันตี' และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *rbcl* ของมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์ผ่านทางฐานข้อมูล DDBJ/EMBL/GenBank ข้อมูลในการลงทะเบียนและ accession no. ของแต่ละตัวอย่างแสดงในภาคผนวก ข

สร้างแผนภาพเดนโดรแกรม (dendrogram) จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0 beta version 10 (Sinauer Assoc, Inc., USA) ได้ผลดังภาพที่ 24 จากเดนโดรแกรม พบว่าพันธุ์ปลูกของมะขามจากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่ใช้ในการทดลอง จำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ประกอบด้วย 'ศรีษมภู' และ 'ขันตี' เป็นมะขามชนิดหวาน และกลุ่มที่สอง ได้แก่ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' คือ มะขามชนิดเปรี้ยว

ระยะห่างภูมิศาสตร์ของพืช (plant geographical distance) ไม่มีผลต่อความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ระหว่างประชากรในพืชชนิดเดียวกัน โดยเฉพาะพืชที่มีการกระจายพันธุ์ในบริเวณกว้าง (Irwin, 2001; Qui และคณะ, 2004) มะขามก็เช่นเดียวกัน จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า โดยส่วนใหญ่แล้วลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของ *T. indica* (accession no. Z70160) และตัวอย่างมะขามชนิดหวานและชนิดเปรี้ยวจากจังหวัดเพชรบูรณ์มีความเหมือนกันมาก อีกทั้งมะขามชนิดหวาน 'ขันตี' และชนิดเปรี้ยว



ภาพที่ 24 เดนไดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะขาม *T. indica* ทั้ง 3 พันธุ์ปลูก คือ 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ด้วยวิธี UPGMA จากการสุ่มค่า Bootstrap value 1,000 replicates

‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันที่ไม่แตกต่างจาก *T. indica* (accession no. Z70160) คือ ตำแหน่งที่ 850, 885, 1,060, 1,061 และ 1,064 แต่แตกต่างจากมะขามชนิดหวาน ‘ศรีชมพู’ ซึ่งถูกแทนที่ด้วย adenine, guanine, thymine, guanine และ thymine ตามลำดับ ดังนั้นจึงอาจสันนิษฐานได้ว่ามะขามชนิดเปรี้ยวและชนิดหวานน่าจะมีวิวัฒนาการที่ต่างกันมาก่อนแล้วเกิดการกระจายพันธุ์ไปตามพื้นที่ต่างๆ พร้อมกับเกิดการคัดเลือก พัฒนา และปรับปรุงพันธุ์ จนได้มะขามชนิดเปรี้ยวและชนิดหวานพันธุ์ปลูกต่างๆ มากมาย ซึ่งมีการเพาะปลูกและเจริญตามธรรมชาติตามพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก

นักวิจัยกลุ่มต่างๆ นิยมใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในการศึกษาวงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogeny) หรือจำแนกชนิดของพืช เนื่องจากยีน *rbcL* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แน่นอน (unambiguous) ไม่มี intron แทรกอยู่ภายในยีน และเกิดการเพิ่มหรือการขาดหายไปของเบส (indels) ต่ำ (Clegg, 1993; Soltis และ Soltis, 1998) ตัวอย่างการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ การศึกษาหาความสัมพันธ์ในระดับสกุล (generic relationship) ภายในวงศ์เดียวกันของพืชมีดอก (flowering plant) ในพืชวงศ์ Onagraceae (Conti และคณะ, 1993) *Delephinium viridescens* (Morgan และคณะ, 1994) และ Berberidaceae (Kim และ Jansen, 1996) เป็นต้น และในบางกรณีสามารถใช้ยีน *rbcL* ในการศึกษาความสัมพันธ์ในระดับชนิดร่วมสกุลเดียวกัน (congeneric species) ได้ เช่น พืชสกุล *Cornus* (Xiang และคณะ, 1993) *Saxifraga* (Soltis และคณะ, 1996) และ *Drosera* (Williams และคณะ, 1994) สำหรับการทดลองนี้จะเห็นได้ว่ายีน *rbcL* สามารถใช้จำแนกพันธุ์ปลูกของมะขามได้

นอกจากจะใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือดีเอ็นเอส่วนต่างๆ เช่น ยีน *rbcL* ยีน *matK* ดีเอ็นเอบริเวณ *trnL* และ *trnS* ซึ่งเป็นดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์แล้ว ยังมีนักวิจัยหลายกลุ่มนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหรือดีเอ็นเอในส่วนต่างๆ ของพืช ในส่วนนิวเคลียส เช่น ITS หรือข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอื่นๆ เช่น RAPD และ RFLP ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบทนำ มาพิจารณาร่วมกันและนำไปใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวงศ์วานวิวัฒนาการในพืชชนิดต่างๆ ตัวอย่างเช่น Käss และ Wink (1997) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์ย่อย Papilionoideae (วงศ์ Leguminosae) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในคลอโรพลาสต์ร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS-1 และ 2 ในนิวเคลียส Kenicer และคณะ (2005) ศึกษาความสัมพันธ์ในพืชสกุล *Lathyrus* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS และ 5.8S rDNA ในนิวเคลียสร่วมกับลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ *trnL-F* และ *trnS-G* ในคลอโรพลาสต์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงสนใจศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS และข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD-PCR ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูกเพิ่มเติมเพื่อนำมาใช้พิจารณาร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ในการจำแนกพันธุ์ปลูกของมะขามจากจังหวัดเพชรบูรณ์

2.5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS (Internal transcribed spacer) (DNA amplification, nucleotide sequencing, and nucleotide alignment of ITS)

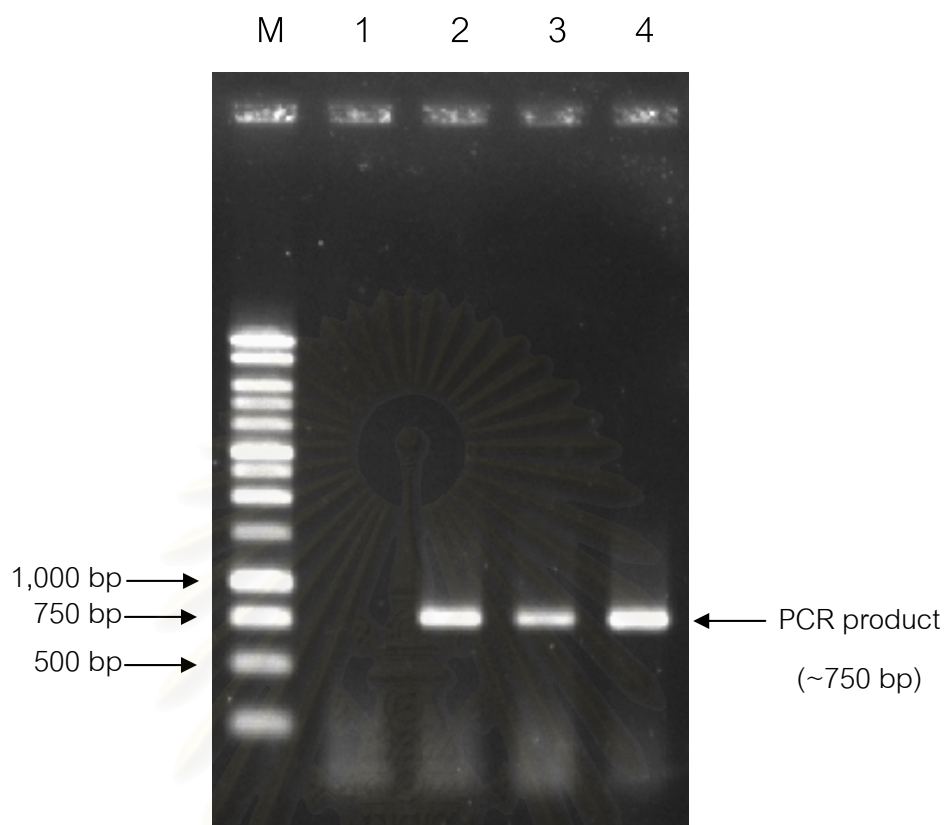
เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน ITS ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Stmn-ITS-F และ ITS4 ส่วนประกอบและภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR แสดงดังตารางที่ 24 ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ annealing temperature ที่ให้ปริมาณผลผลิต PCR สูงสุด เท่ากับ 2.5 มิลลิโมลาร์ และ 51 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ ความต่างศักย์ 100 โวลท์ โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.0 % พบว่าผลผลิต PCR มีขนาด ประมาณ 750 bp ดังภาพที่ 25 ส่งผลผลิต PCR ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ Stmn-ITS-F และ ITS4 ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี จัดเรียงและตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Trifolium hybridum* (accession no. EU348779); *Eperua schomburgkiana* (accession no. AY955808); *Baikiaea insignis* (accession no. AY955811); *Tessmannia anomala*, accession no. AY955813; *Copaifera officinalis*, accession no. AY955816; *Detarium macrocarpum* (accession no. AY955817) และ *Sindora bruggemanii* (accession no. AY955824) ด้วยโปรแกรม 'Multiple sequence alignment with hierarchical clustering' (Corpet, 1988) และ BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT (Hall, 1999) ดังภาพที่ 26

จากภาพที่ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์ 18S rDNA, ITS-1, 5.8S rDNA, ITS-2 และ 26S rDNA ของมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' มีขนาดเท่ากับ 775, 730 และ 773 bp ตามลำดับ เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ 18S rDNA, ITS-1, 5.8S rDNA, ITS-2 และ 26S rDNA ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก ด้วยโปรแกรม 'Multiple sequence alignment with hierarchical clustering' (Corpet, 1988) และ

ตารางที่ 24 ส่วนประกอบและภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอส่วน ITS (Internal Transcribed Spacer) ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร

PCR parameters	Optimised condition for ITS region amplification
PCR buffer (10 X)	1 X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0 and 0.1 % Triton X-100)
MgCl ₂ concentration	2.5 mM
Primer concentration	0.25 μM
dATP, dTTP, dCTP and dGTP mixture	0.2 mM
<i>Taq</i> DNA polymerase	1.0 U
DNA template	100 ng per a reaction
Thermal cycling condition	First cycle: 95°C for 3 min. 30 cycles: 95°C for 40 sec, 51°C for 40 sec, 72°C for 1 min. Last cycle: 72°C for 5 min.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 25 แถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่สังเคราะห์ได้เมื่อใช้ไพรเมอร์ Stmn-ITS-F กับ ITS4 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากจีโนมิกดีเอ็นเอของมะขามต่างพันธุ์ปลูก เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 %

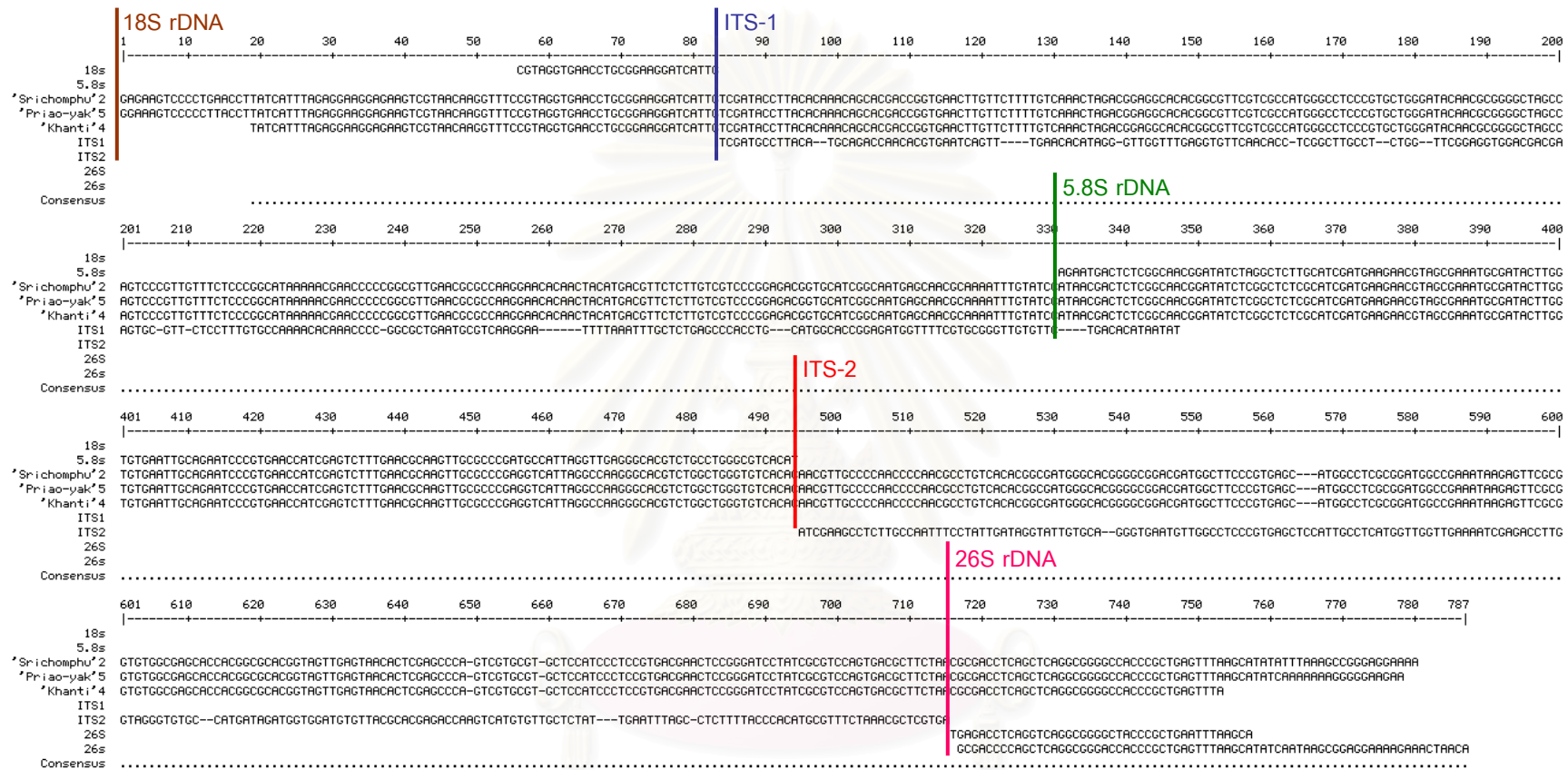
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1: Negative control

Lane 2: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 4 (TI-PY/P4)

Lane 3: 'ศรีชมภู' ต้นที่ 2 (TI-SP/P2)

Lane 4: 'ขันตี' ต้นที่ 4 (TI-K/P4)



ภาพที่ 26 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA, ITS-1, 5.8S rDNA, ITS-2 และ 26S rDNA ของมะขาม *T. indica* ชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ และมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Trifolium hybridum* (accession no. EU348779); *Eperua schomburgkiana* (accession no. AY955808); *Baikiaea insignis* (accession no. AY955811); *Tessmannia anomala* (accession no. AY955813); *Copaifera officinalis* (accession no. AY955816); *Detarium macrocarpum* (accession no. AY955817) และ *Sindora bruggemanii* (accession no. AY955824) ที่มีใน GenBank

BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT (Hall, 1999) ผลการเปรียบเทียบและตำแหน่งของ 18S rDNA, ITS-1, 5.8S rDNA, ITS-2 และ 26S rDNA แสดงดังภาพที่ 27 จากผลการทดลองพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS-1, 5.8S rDNA และ ITS-2 ของมะขามทั้งมะขามชนิดหวานและเปรี้ยวไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S และ 26S rDNA ในมะขามชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 25) ดังนี้

ส่วน 18S rDNA

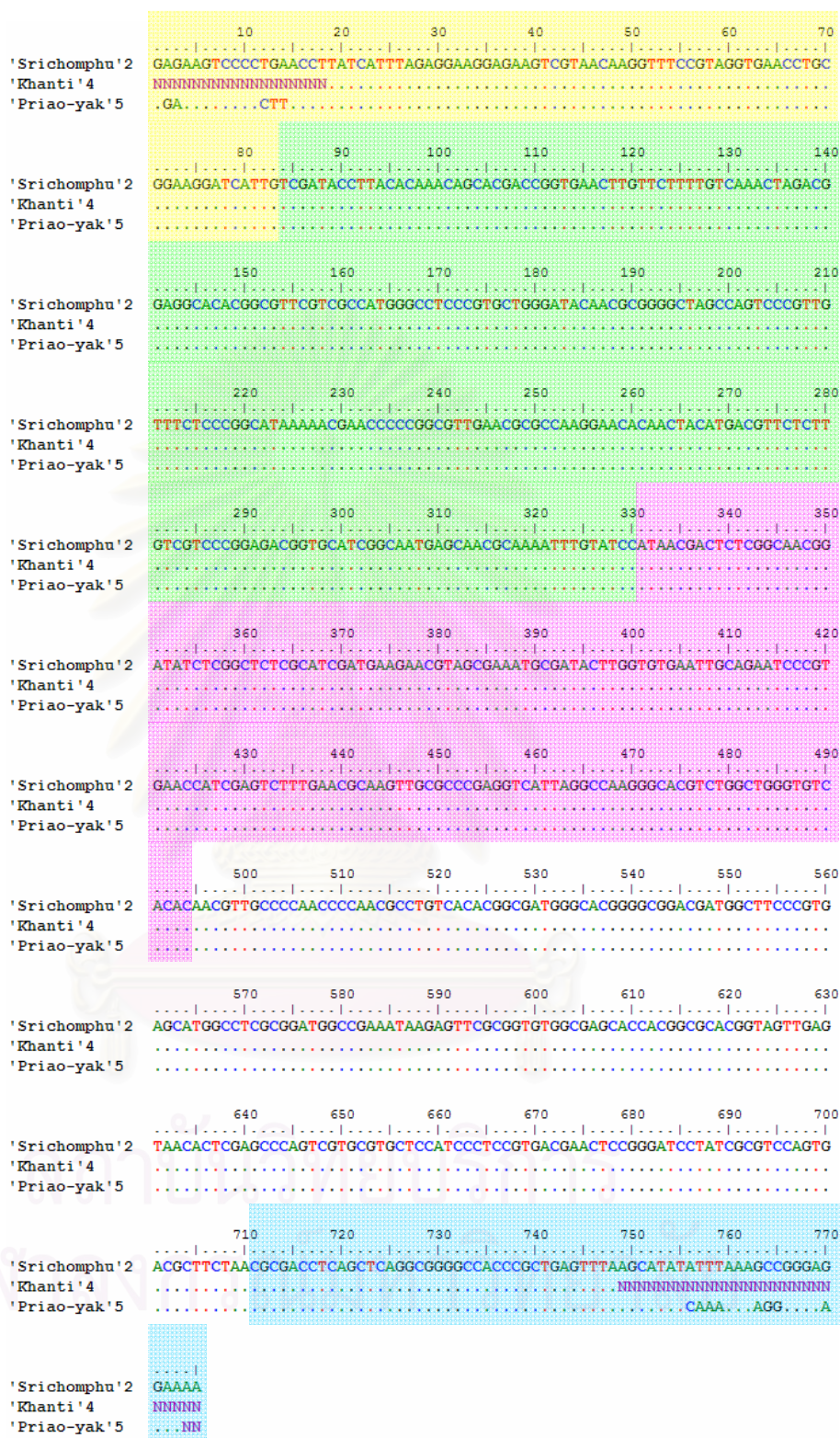
- ‘ศรีชมภู’ ที่ตำแหน่งที่ 2, 3, 12, 13 และ 14 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ด้วย adenine, guanine, thymine, guanine และ adenine ตามลำดับ
- ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ที่ตำแหน่งที่ 2, 3, 12, 13 และ 14 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ด้วย guanine, adenine, cytosine และ thymine ตามลำดับ

ส่วน 26S rDNA

- ‘ศรีชมภู’ ที่ตำแหน่งที่ 756, 757, 758, 759, 763, 764, 765 และ 770 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ด้วย adenine, thymine, thymine, thymine, guanine, cytosine, cytosine และ guanine ตามลำดับ
- ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ที่ตำแหน่งที่ 756, 757, 758, 759, 763, 764, 765 และ 770 มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ด้วย cytosine, adenine, adenine, adenine, adenine, guanine, guanine และ adenine ตามลำดับ

จากนั้นลงทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA, ITS-1, 5.8S rDNA, ITS-2 และ 26S rDNA ของมะขามชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ และมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์ผ่านทางฐานข้อมูล DDBJ/EMBL/GenBank ข้อมูลในการลงทะเบียนและ accession no. ของแต่ละตัวอย่างแสดงในภาคผนวก ข

ดีเอ็นเอส่วน ITS เป็นดีเอ็นเออีกส่วนหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการชาติพันธุ์หรือจำแนกชนิดของพืชเช่นเดียวกับยีน *rbcL* เพราะ ITS เป็นดีเอ็นเอที่พัฒนาได้เร็ว ถึงแม้ว่าจะมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) สูงก็ตาม (Hershkovitz และ Zimmer, 1996) และสามารถใช้ในการจำแนกพืชได้ทั้งในระดับชนิดและสกุล (Baldwin และคณะ, 1995) ตัวอย่างเช่น การศึกษาหาความสัมพันธ์ในพืชสกุล *Lilium* (Nishikawa และคณะ, 2005) และ *Bauhinia* สกุลย่อย *Phanera* (Hao และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังมีการใช้ข้อมูลของลำดับ



ภาพที่ 27

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอส่วน 18S rDNA (กรอบสีเขียว), ITS-1 (กรอบสีเหลือง), 5.8S rDNA (กรอบสีชมพู), ITS-2 (กรอบสีฟ้า) และ 26S rDNA (กรอบสีฟ้า) ของมะขาม *T. indica* 'ศรีชมภู' 'ขันทิ' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์'

ตารางที่ 25 การแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอส่วน ITS (Internal transcribed spacer) ของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันที้' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากจังหวัดเพชรบูรณ์

Species	Cultivars	Accession no.	Voucher no.	Nucleotide positions												
				18S rDNA					26S rDNA							
				2	3	12	13	14	756	757	758	759	763	764	765	770
<i>T. indica</i> L.	'Srichomphu'	AB378733	PCUTI-SP/P2	A	G	T	G	A	A	T	T	T	G	C	C	G
	'Khanti'	AB378734	PCUTI-K/P4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	'Piao-yak'	AB378735	PCUTI-PY/P5	G	A	C	T	T	C	A	A	A	A	G	G	A

นิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์อีกด้วย เช่น การศึกษาหาความสัมพันธ์ในพืชสกุล *Lathyrus* โดยใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS ร่วมกับดีเอ็นเอบริเวณ *trnL-F* และ *trnS-G* (Kenicer และคณะ, 2005) แต่ในกรณีของการจำแนกพันธุ์ปลูกของมะขาม *T. indica* ชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ และมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ในการวิจัยนี้พบว่าไม่สามารถใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอส่วน ITS ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* จำแนกพันธุ์ปลูกของมะขามได้ เพราะไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก อย่างไรก็ตาม ยังมีอีกเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจและสามารถนำมาใช้จำแนกพันธุ์ปลูกของมะขามร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ได้ คือ เทคนิค RAPD-PCR ซึ่งเทคนิคนี้ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย ราคาไม่แพง และไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของพืชมาก่อน (Atienzar และ Jha, 2006) ดังนั้นเทคนิค RAPD-PCR จึงคาดว่าจะจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถใช้แยกพันธุ์ปลูกของมะขามในการวิจัยครั้งนี้ได้

2.6 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic (RAPD) DNA

จากการตรวจสอบ random primer จำนวน 60 ไพร์เมอร์ คือ ไพร์เมอร์ชุด SD, SO และ OPA (Operon Biotechnologies, Germany) พบว่ามีไพร์เมอร์ จำนวน 11 ไพร์เมอร์ ที่แสดงแถบดีเอ็นเอครบทั้ง 3 ตัวอย่าง และแสดงความแตกต่าง (polymorphism) ของแถบดีเอ็นเอระหว่างมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แสดงดังตารางที่ 26 ส่วนประกอบและภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RAPD-PCR แสดงดังตารางที่ 27 ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และ annealing temperature ที่ให้ปริมาณผลผลิต PCR สูงสุด เท่ากับ 3.0 มิลลิโมลาร์ และ 50 องศาเซลเซียส ใช้ไพร์เมอร์อย่างน้อย 3 ไพร์เมอร์ คัดเลือกตัวแทนของตัวอย่างมะขามแต่ละพันธุ์ปลูก โดยตัวแทนของตัวอย่างที่ดีต้องแสดงแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนครบทั้ง 3 ไพร์เมอร์ ดังนี้ OPA-02, OPA-13 และ SD-03 สำหรับมะขามชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ (ภาพที่ 28 และ 29) และ OPA-02, SD-18 และ OPA-13 สำหรับมะขามชนิดหวาน ‘ขันตี’ (ภาพที่ 30) จากการทดลองพบว่าตัวแทนของตัวอย่างมะขามชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ และมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ที่คัดเลือกมามีดังนี้ ‘ศรีชมภู’ ต้นที่ 3 (TI-SP/P3) และ 4 (TI-SP/P4) ‘ขันตี’ ต้นที่ 1 (TI-K/P1) และ 4 (TI-K/P4) และ ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ต้นที่ 2 (TI-PY/P2) และ 3 (TI-PY/P3) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD ของตัวอย่างโดยใช้ไพร์เมอร์ดังแสดงในตารางที่ 26 (ยกเว้นไพร์เมอร์ SD-18

ตารางที่ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD-PCR

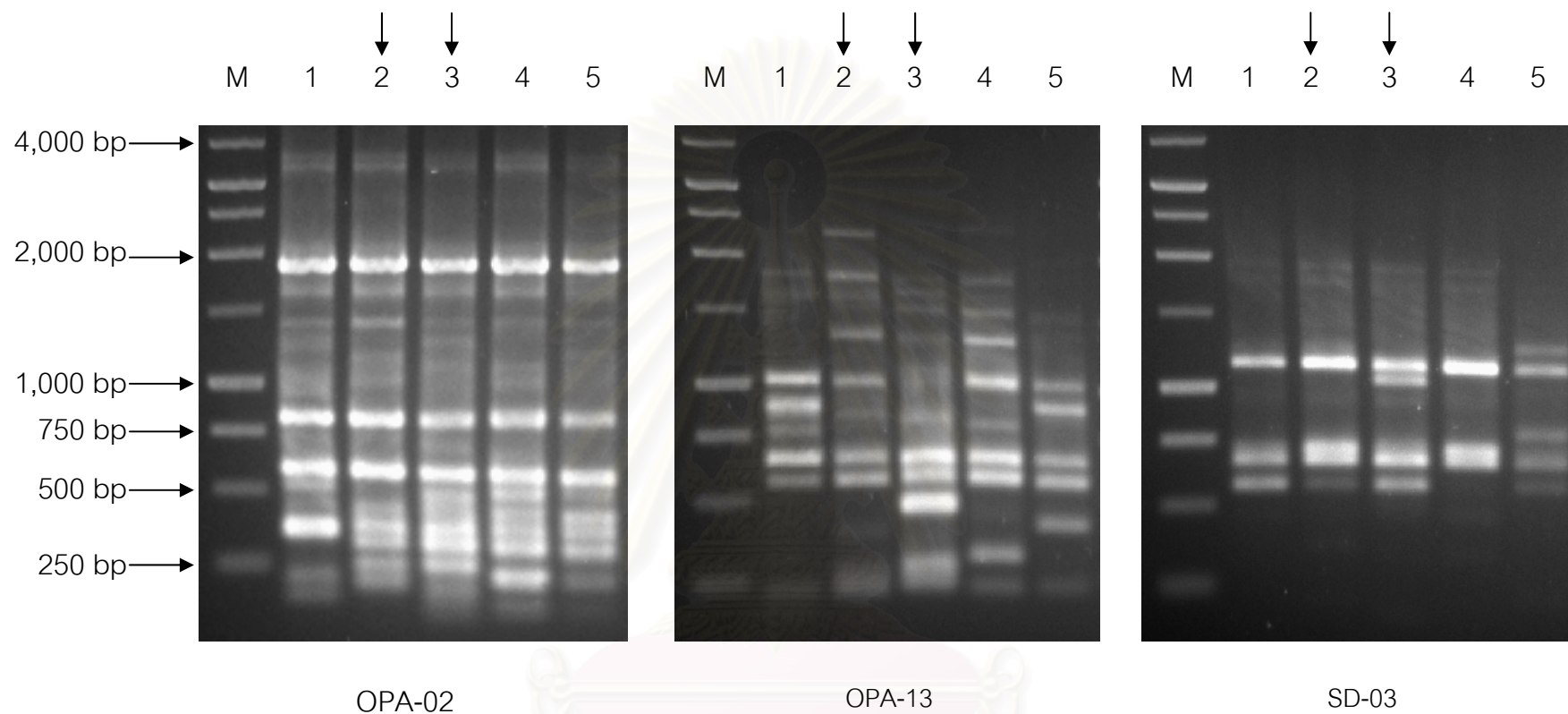
RAPD Primer number	Nucleotide sequences 5' to 3'
SD-03	GTC GCC GTC A
SD-18	GAG AGC CAA C
SO-10	TCA GAG CGC C
SO-16	TCG GCG GTT C
OPA-02	TGC CGA GCT G
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-09	GGG TAA CGC C
OPA-13	CAG CAC CCA C
OPA-16	AGC CAG CGA A
OPA-20	GTT GCG ATC C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 27 ส่วนประกอบและภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RAPD-PCR เพื่อศึกษา
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร

PCR parameters	Optimised condition for RAPD amplification
PCR buffer (5 X)	1 X (50 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 9.0 and blue-yellow dye)
MgCl ₂ concentration	3.0 mM
Primer concentration	2.0 μM
dATP, dTTP, dCTP and dGTP mixture	0.33 mM
<i>Taq</i> DNA polymerase	2.0 U
DNA template	100 ng per a reaction
Thermal cycling condition	First cycle: 95°C for 4 min. 40 cycles: 95°C for 1 min, 50°C for 1 min, 74°C for 1 min. Last cycle: 74°C for 10 min.

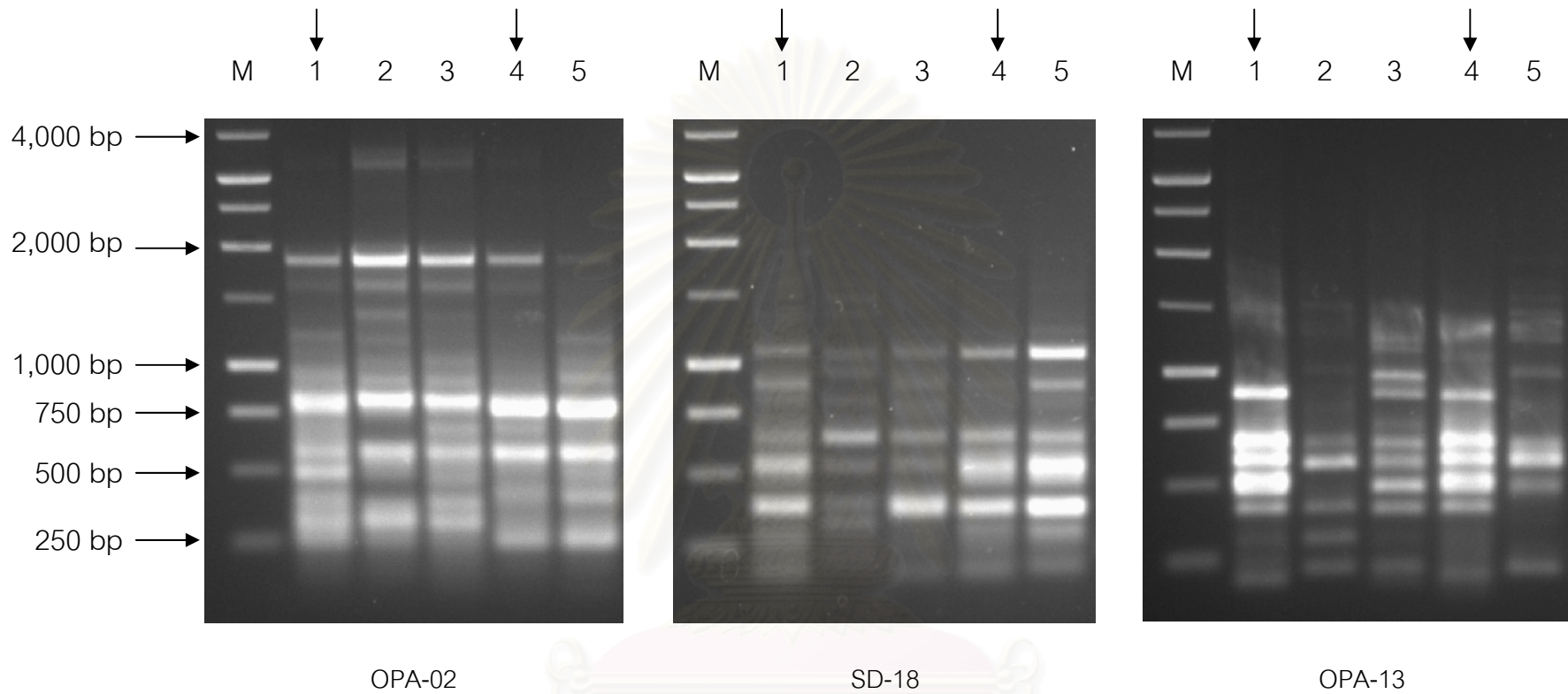
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 29 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ (TI-PY/P) จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-02, OPA-13 และ SD-03 ตามลำดับ ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 % lane ที่มีลูกศรชี้ คือ ตัวแทนของตัวอย่างของมะขามพันธุ์ปลูก ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’

Lane M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1-5: มะขามเปรี้ยวยักษ์ จำนวน 5 ตัวอย่าง (TI-PY/P1, TI-PY/P2, TI-PY/P3, TI-PY/P4 และ TI-PY/P5)



ภาพที่ 30 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูกลง 'ขันตี' (TI-K/P) จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-02, SD-18 และ OPA-13 ตามลำดับ ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.0 % lane ที่มีลูกศรชี้ คือ ตัวแทนของตัวอย่างของมะขามพันธุ์ปลูกลง 'ขันตี'

M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1-5: มะขามพันธุ์ขันตี จำนวน 5 ตัวอย่าง (TI-K/P1, TI-K/P2, TI-K/P3, TI-K/P4 และ TI-K/P5)

เพราะเมื่อทำการทดลองซ้ำ SD-18 แสดงแถบดีเอ็นเอไม่ครบทั้ง 6 ตัวอย่าง) และใช้ *Phyllanthus urinaria* เป็น outgroup เมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่ความต่างศักย์ 80 โวลท์ โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.0 % พบความแตกต่างของแถบ ดีเอ็นเอของตัวอย่างมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกดังแสดงในภาคผนวก ข ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างกัน ในระดับพันธุกรรม

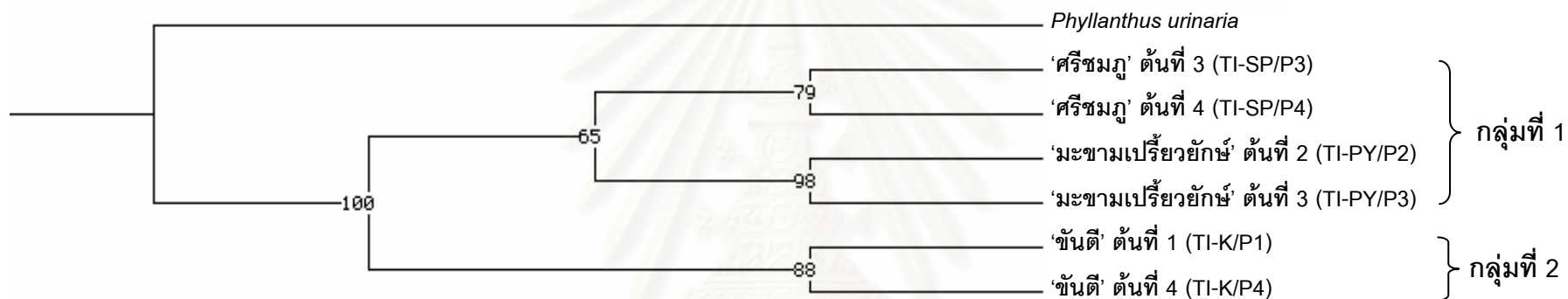
จำนวนแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกที่ได้จาก RAPD เท่ากับ 313 แถบ โดยมีค่า polymorphism bands/primer เท่ากับ 31.30 ไพร์เมอร์ที่ให้จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ RAPD มากที่สุด คือ SO-10 จำนวน 45 แถบ และไพร์เมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ RAPD น้อยที่สุด คือ OPA-20 จำนวน 11 แถบ แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 161 bp ถึง 2.3 kb เมื่อเทียบกับ 1kb DNA ladder จากการทดลองพบว่า OPA-13 เป็นไพร์เมอร์ที่ให้รูปแบบของ แถบดีเอ็นเอของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดมากที่สุด เมื่อเทียบกับไพร์เมอร์ อื่นๆ

ความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ระหว่างมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' คำนวณได้จากข้อมูลของแถบดีเอ็นเอ RAPD นับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยโปรแกรม Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad Laboratories, Inc., Canada) กำหนดให้ 1 แทนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ (presence) และ 0 แทนแถบดีเอ็นเอที่ไม่ ปรากฏ (absence) ณ ตำแหน่งนั้น ข้อมูลของแถบดีเอ็นเอ RAPD ในรูป binary presence-absence data matrix แสดงในภาคผนวก ฉ คำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index, S. I.) ตามวิธีของ Nei และ Li (1979) ค่าดัชนีความเหมือนมีค่าอยู่ในช่วง 0-1 ดังแสดงในตารางที่ 28 จากตารางที่ 28 พบว่าค่าดัชนีความเหมือนระหว่างมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และมะขาม ชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' มีค่าเท่ากับ 0.7284-0.8722 โดยคู่พันธุ์ปลูกของมะขามที่ให้ค่า ดัชนีความเหมือนต่ำสุด คือ มะขามชนิดหวาน 'ขันตี' (TI-K/P4) และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขาม เปรี้ยวยักษ์' (TI-PY/P3) ส่วนคู่พันธุ์ปลูกของมะขามที่ให้ค่าดัชนีความเหมือนสูงสุด คือ มะขาม ชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

สร้างแผนภาพเดนโดรแกรม (dendrogram) จากข้อมูลของแถบดีเอ็นเอ RAPD ในภาคผนวก ฉ ด้วยวิธี UPGMA และ Neighbor-joining (NJ) โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0 beta version 10 (Sinauer Assoc, Inc., USA) ได้ผลดังภาพที่ 31 และ 32 จากเดนโดรแกรมที่สร้าง จากวิธี UPGMA พบว่าพันธุ์ปลูกของมะขามที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์จำแนกได้เป็น

ตารางที่ 28 ค่าดัชนีความเหมือน (Similarity index, S. I.) เมื่อเทียบระหว่างตัวอย่างมะขาม *T. indica* จำนวน 3 พันธุ์ปลูก

Taxa	TI-SP/P3	TI-SP/P4	TI-K/P1	TI-K/P4	TI-PY/P2	TI-PY/P3
'ศรีชมภู' 3 (TI-SP/P3)	1.0000	0.8403	0.7380	0.7476	0.7891	0.7508
'ศรีชมภู' 4 (TI-SP/P4)		1.0000	0.8275	0.7795	0.8275	0.7827
'ขันตี' 1 (TI-K/P1)			1.0000	0.8498	0.7700	0.7380
'ขันตี' 4 (TI-K/P4)				1.0000	0.7800	0.7284
'มะขามเปรี้ยวยักษ์' 2 (TI-PY/P2)					1.0000	0.8722
'มะขามเปรี้ยวยักษ์' 3 (TI-PY/P3)						1.0000



ภาพที่ 31 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะขาม *T. indica* ทั้ง 3 พันธุ์ปลูก คือ 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากวิธี UPGMA จากการสุ่มค่า Bootstrap value 1,000 replicates ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย RAPD



ภาพที่ 32

เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะขาม *T. indica* ทั้ง 3 พันธุ์ปลูก คือ 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากวิธี Neighbor-joining จากการสุ่มค่า Bootstrap value 1,000 replicates ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย RAPD

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 กลุ่ม กลุ่มแรก ประกอบด้วย 'ศรีษมภู' เป็นมะขามชนิดหวาน และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' เป็นมะขามชนิดเปรี้ยวและกลุ่มที่สอง ได้แก่ 'ขันตี' คือ มะขามชนิดหวาน จะเห็นได้ว่ามะขามชนิดหวาน 'ศรีษมภู' มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' มากกว่ามะขามชนิดหวาน 'ขันตี' โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 65.0 % ส่วนมะขามชนิดหวาน 'ขันตี' แยกออกมาอยู่อีกกลุ่มหนึ่ง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของ 'ขันตี' กับ 'ศรีษมภู' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' (ภาพที่ 31) แต่การจัดกลุ่มโดยทั่วไปแยกตามรสของมะขามโดย 'ขันตี' และ 'ศรีษมภู' จัดอยู่ในกลุ่มมะขามชนิดหวาน อย่างไรก็ตามทิศทางของ 'ขันตี' จะมีรสเปรี้ยวกว่า 'ศรีษมภู' และมีรสหวานกว่า 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ซึ่งไม่มีรสหวานเลย เมื่อพิจารณาเดนไดรแกรมที่สร้างจากวิธี Neighbor-joining พบว่าพันธุ์ปลูกของมะขามที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์ จำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ประกอบด้วย 'ศรีษมภู' และ 'ขันตี' เป็นมะขามชนิดหวาน โดยมีค่า bootstrap เท่ากับ 71.0 % และกลุ่มที่สอง ได้แก่ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' คือ มะขามชนิดเปรี้ยว (ภาพที่ 32)

วิธีการทางสถิติบางวิธีได้ถูกนำมาใช้เพื่อประเมินค่าความมั่นใจต่อเดนไดรแกรมที่สร้างขึ้น วิธีที่นิยมใช้ ได้แก่ วิธี bootstrap ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยการทดลองสับเปลี่ยนค่าของข้อมูลโดยการแทนที่ คือ จะเริ่มจากการสุ่มดึงเอาข้อมูลส่วนใดส่วนหนึ่งออกจากตารางเมทริกซ์ แล้วทำให้เมทริกซ์นั้นมีขนาดเท่าเดิมโดยการเพิ่มจำนวนซ้ำของข้อมูลส่วนอื่นเข้ามาแทนที่ แล้วสร้างเดนไดรแกรมใหม่ขึ้นมา หลังจากที่ทำกรทดลองดังกล่าวไปหลายๆ รอบ เดนไดรแกรมทั้งหมดที่สร้างขึ้นจะถูกนำมาวิเคราะห์หาความมั่นใจที่กิ่ง (branch) ต่างๆ โดยจะแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์ ถ้าค่า bootstrap มีค่าใกล้ 100 % สามารถมั่นใจได้ว่า กิ่งหรือเคลด (clade) บนกิ่งนั้น น่าจะเกิดขึ้นได้จริงบนเดนไดรแกรมที่ถูกต้อง (เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์, 2545) โดยค่า bootstrap ที่มีค่าอยู่ในช่วง 85-100 % แสดงถึงค่าความเชื่อมั่นในระดับสูง (strong support) ค่า bootstrap 71-84 % แสดงถึงค่าความเชื่อมั่นในระดับปานกลาง (moderate support) ค่า bootstrap 50-70 % แสดงถึงค่าความเชื่อมั่นในระดับต่ำ (weak support) ของเดนไดรแกรมที่สร้างได้ (Richardson และคณะ, 2000) เมื่อวิเคราะห์ภาพที่ 31 และ 32 แล้ว พบว่าค่า bootstrap ของมะขามชนิดหวาน 'ศรีษมภู' กับมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' บนเดนไดรแกรมที่สร้างจากวิธี UPGMA มีค่าน้อยกว่าค่า bootstrap ของมะขามชนิดหวาน 'ศรีษมภู' และ 'ขันตี' บนเดนไดรแกรมที่สร้างจากวิธี NJ แสดงว่าเดนไดรแกรมที่สร้างจากวิธี NJ มีระดับความมั่นใจสูงกว่าวิธี UPGMA เพราะฉะนั้นการแบ่งกลุ่มพันธุ์ปลูกของมะขามจากเดนไดรแกรมที่สร้างด้วยวิธี NJ จึงน่าจะมีความน่าเชื่อถือมากกว่า ดังนั้นมะขามที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์ จำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ประกอบด้วย 'ศรีษมภู' และ 'ขันตี' เป็นมะขาม

ชนิดหวานและกลุ่มที่สอง ได้แก่ ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ คือ มะขามชนิดเปรี้ยว ซึ่งตรงกับการจัดกลุ่มโดยทั่วไปที่แยกตามรสของมะขามและการจำแนกพันธุ์ปลูกของมะขามจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*

นักวิจัยกลุ่มต่างๆ นิยมใช้เทคนิค RAPD ในการพิสูจน์ชนิด จำแนกพันธุ์ปลูก และตรวจสอบแหล่งกำเนิดของพืช เช่น การใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกชนิดของพืชสกุล *Derris* จำนวน 5 ชนิด คือ *D. scandens*, *D. elliptica*, *D. malaccencis*, *D. trifoliata* และ *D. reticulata* (สุชาติา สุขห่อง และคณะ, 2548) Encheverrigaray และคณะ (2001) ใช้เทคนิค RAPD และองค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยในการจำแนกพันธุ์ปลูกของไทย ได้แก่ พันธุ์ปลูก Burpee, Blumen Battle, SEM, Isla และพันธุ์ปลูกพื้นเมือง Brandolini และคณะ (2005, 2006) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบเคมีร่วมกับสารพันธุกรรมของกระเทียมและข้าวในประเทศอิตาลี จากผลการทดลองพบว่าองค์ประกอบเคมีของกระเทียมอิตาลีสัมพันธ์กับสารพันธุกรรม แต่ไม่พบความสัมพันธ์นี้ในข้าว นอกจากการใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกชนิดและพันธุ์ปลูกของพืชแล้ว เทคนิค PARD ยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบแหล่งกำเนิดของมะขามได้อีกด้วย โดยมีมะขามน่าจะมีแหล่งกำเนิดมาจากทวีปแอฟริกา (Diallow และคณะ, 2007) เป็นต้น และจากผลการทดลองดังที่ได้กล่าวข้างต้น พบว่าเทคนิค RAPD สามารถให้แถบดีเอ็นเอซึ่งแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูกของมะขามชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ และมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ ดังนั้นเทคนิค RAPD จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพันธุ์ปลูกของมะขามได้

3. การหาความสัมพันธ์โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับองค์ประกอบกรดอินทรีย์ในเนื้อมะขามที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายเพื่อการพิสูจน์มะขามต่างพันธุ์ปลูก (Correlation of DNA fingerprint and organic acids in tamarind pulps with laxative activity to identify tamarind cultivars)

ผลการทดลองวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD-PCR และจากเดนโดรแกรมที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* พบว่ามะขามชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ และมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ จากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่เลือกมาวิจัยมีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปลูก โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพันธุ์ปลูก ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ เป็นมะขามชนิดหวานกับกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ คือ มะขามชนิดเปรี้ยว จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในตัวอย่างน้ำสกัดเนื้อมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก ประกอบด้วยกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดทาร์ทาริก มาลิก และซิตริกเป็นหลัก (ตารางที่ 20)

พบว่ากรดทาร์ทาริกในเนื้อมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' แต่ละชนิดมีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ปลูกมะขามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' มีปริมาณกรดทาร์ทาริกสูงกว่ามะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' ประมาณ 11 และ 8 เท่า ตามลำดับ สำหรับกรดมาลิก ซิตริก และออกซาลิกในเนื้อมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' มีปริมาณไม่ต่างกัน ($p > 0.05$) แต่จะแตกต่างกับมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ปริมาณของกรดทาร์ทาริกอาจใช้เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งเพื่อใช้ในการพิสูจน์มะขามต่างพันธุ์ปลูกและพบความสัมพันธ์เมื่อประเมินปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ในเนื้อมะขาม (ตารางที่ 11) มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากมากไปน้อยในมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' เป็นทิศทางตรงกันข้ามกับปริมาณของกรดทาร์ทาริก

ในปัจจุบันมีนักวิจัยหลายกลุ่มใช้การประเมินลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับการประเมินองค์ประกอบทางเคมีเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ จำแนกชนิด และควบคุมคุณภาพของพืชสมุนไพรเป็นจำนวนมาก เช่น Xai และคณะ (2005) ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับการวิเคราะห์ทางเคมีในการพิสูจน์เอกลักษณ์และควบคุมคุณภาพของพืชสมุนไพรสกุล *Curcumae* ในประเทศจีน แต่ในกรณีของพืชสมุนไพรสกุล *Angelica* สามารถใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสกุลนี้และใช้การวิเคราะห์ทางเคมีในการหาปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ แต่ไม่สามารถใช้การวิเคราะห์ทางเคมีในการพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ เพราะปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญในพืชสมุนไพรสกุลนี้เปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาลและพื้นที่เพาะปลูก (Zhao และคณะ, 2003) เห็นได้ว่าการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการพิสูจน์เอกลักษณ์และจำแนกชนิดของพืช หรือวัสดุทางชีวภาพต่างๆ (biological material) ได้ดีกว่าการใช้วิธีวิเคราะห์ทางเคมี เพราะการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอใช้ปริมาณตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อยและที่สำคัญ คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะไม่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมและระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืช

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

มะขามเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการมีประโยชน์แก่การรับประทาน มะขามมีปริมาณแร่ธาตุสูง เช่น โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม และแมกนีเซียม เป็นต้น และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต และน้ำตาลรีดิวซ์ (โดยเฉพาะในมะขามชนิดหวาน) สูง มีโปรตีนและไขมันต่ำ นอกจากนี้ข้อมูลปริมาณของเกลือแร่ในมะขามที่ปลูกในประเทศไทยอาจมีประโยชน์ในการแนะนำด้านโภชนาการในคนไข้บางประเภทที่ต้องควบคุมปริมาณโพแทสเซียม

ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในเนื้อมะขามวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) เทคนิค HPLC มีความถูกต้องสมบูรณ์สำหรับการใช้วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอินทรีย์ในเนื้อมะขาม วิธีวิเคราะห์มีความจำเพาะเจาะจงต่อกรดอินทรีย์ในเนื้อมะขามที่ต้องการแยก (กรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก แอสคอบิก และซิตริก) และสารมาตรฐานภายใน โดยค่า resolution ระหว่างพีคของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดมีค่าอยู่ในช่วง 1.58-15.77 กรดอินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดอินทรีย์มาตรฐานต่อสารมาตรฐานภายใน (peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์มาตรฐานที่ยอมรับได้ ค่าความเป็นเส้นตรง (r^2) ของกรดอินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด มีค่าเท่ากับ 0.9996-1.0000 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอินทรีย์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ถูกต้อง (Limit of Detection, LOD) ซึ่งแสดงถึงความไวของวิธีวิเคราะห์ของกรดอินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด มีค่าเท่ากับ 0.0001-0.0011 g/L ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์แสดงผลในรูปของ % RSD ซึ่งควรมีค่าไม่เกิน 2 ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์เมื่อวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันสำหรับกรดอินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด มีค่า RSD อยู่ในช่วง 0.04-1.77 % และเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันสำหรับกรดออกซาลิก ทาร์ทาริก มาลิก และซิตริก มีค่า RSD อยู่ในช่วง 0.20-2.45 % ส่วนความเที่ยงตรงเมื่อวิเคราะห์ต่างวันกันสำหรับกรดแอสคอบิกมีค่า RSD อยู่ในช่วง 3.05-8.70 % ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์กรดแอสคอบิกในตัวอย่างให้เสร็จภายในวันเดียวกันหรือควรเตรียมตัวอย่างใหม่ทุกครั้งในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอบิกเมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างต่างวันกัน และค่า recovery ซึ่งแสดงถึงความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ของกรดอินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด มีค่าอยู่ในช่วง 91.94-113.33 %

กรดอินทรีย์หลักที่พบในตัวอย่างเนื้อมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ได้แก่ กรดทาร์ทาริก มาลิก และซิตริก ปริมาณกรดทาร์ทาริกที่

พบในเนื้อมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' มีปริมาณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' มีปริมาณกรดทาร์ทาริกสูงกว่ามะขามชนิดหวานพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' โดยปริมาณกรดทาร์ทาริกเท่ากับ 18.102 ± 0.134 % ใน 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' 1.628 ± 0.117 % ใน 'ศรีชมภู' และ 2.134 ± 0.117 % ใน 'ขันตี' ดังนั้นจึงอาจใช้ปริมาณกรดทาร์ทาริกร่วมกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการพิสูจน์เอกลักษณ์มะขามต่างพันธุ์ปลูกได้ ส่วนกรดมาลิกและซิตริกในเนื้อมะขาม 'ศรีชมภู' (1.888 ± 0.057 % และ 0.631 ± 0.030 %) และ 'ขันตี' (1.837 ± 0.015 % และ 0.652 ± 0.014 %) มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ มะขามหวาน แต่มีปริมาณสูงกว่าในเนื้อ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' (0.591 ± 0.034 % และ 0.217 ± 0.003 %) ซึ่งอยู่ในกลุ่มมะขามเปรี้ยวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ปริมาณกรดอินทรีย์ คือ กรดทาร์ทาริก มาลิก และซิตริก ในเนื้อมะขามเป็นสารออกฤทธิ์กระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ร่วมกันเมื่อทดสอบในสัตว์ทดลอง ทำให้มีผลเป็นยาระบาย

จากการศึกษาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก พบว่ายีน *rbcL* ของมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' มีขนาดเท่ากับ 1,428 bp ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *rbcL* ของมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' มีขนาดเท่ากับ 1,3928 bp ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก จากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่ใช้ในการทดลองแตกต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของ *T. indica* (accession no. Z70160) ที่มีอยู่ใน GenBank ทั้งหมด 24 ตำแหน่ง (1.75 %) มะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูกที่เพาะปลูกในจังหวัดเพชรบูรณ์มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 9 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 31, 43, 44, 696, 850, 885, 1,060, 1,061 และ 1,064 โดย 'ศรีชมภู' มีการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งแตกต่างจาก 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' 5 ตำแหน่ง และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' มีการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งแตกต่างจาก 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' 4 ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* จำนวน 9 ตำแหน่ง ข้างต้นสามารถใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายในการจำแนกพันธุ์ปลูกของมะขามชนิดหวานและชนิดเปรี้ยวได้ และจากภาพเดนโดรแกรมที่สร้างจากวิธี unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) สามารถแบ่งพันธุ์ปลูกของมะขามได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ประกอบด้วย 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' เป็นมะขามชนิดหวาน และกลุ่มที่สอง ได้แก่ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' คือ มะขามชนิดเปรี้ยว ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยเทคนิค HPLC แต่ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก จากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก ด้วยเทคนิค RAPD-PCR ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ ดังนี้ SD-03, SO-10, SO-16, OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-09, OPA-13, OPA-16 และ OPA-20 โดยมี *Phyllanthus urinaria* เป็น outgroup OPA-13 เป็นไพรเมอร์ที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดมากที่สุด ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index, S.I.) ระหว่างมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' มีค่าเท่ากับ 0.7284-0.8722 และจากภาพเดนโดรแกรมที่สร้างด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) สามารถแบ่งพันธุ์ปลูกของมะขามได้เป็น 2 กลุ่ม เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL*

จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ร่วมกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD ในการจำแนกพันธุ์ปลูกของมะขาม สามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างมะขามจากจังหวัดเพชรบูรณ์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' เป็นมะขามชนิดหวาน และกลุ่มที่สอง ได้แก่ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' คือ มะขามชนิดเปรี้ยว ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์จากส่วนประกอบปริมาณกรดอินทรีย์ ดังนั้นจึงสามารถนำเทคนิค RAPD และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ร่วมกับการประเมินทางเคมีไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกพันธุ์ปลูกของมะขามได้

ปริมาณกรดทาร์ทาริกและน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในเนื้อมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์ร่วมกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามทั้ง 3 พันธุ์ปลูก พบว่าปริมาณกรดทาร์ทาริกและน้ำตาลรีดิวซ์สัมพันธ์กับการแบ่งกลุ่มพันธุ์ปลูกของมะขาม ทำให้สามารถจำแนกมะขามแต่ละพันธุ์ปลูกออกจากกันได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการประเมินลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับองค์ประกอบกรดอินทรีย์ในเนื้อมะขามสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการพิสูจน์เอกลักษณ์มะขามต่างพันธุ์ปลูกที่มีฤทธิ์เป็นยาระบายได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กัญญา ตีวีเศษ, ศิริรัตน์ รุ่งเล็ก, โกศล ชัยประสิทธิ์กุล และ กัลยา วัชชิงเงิน. 2537. คู่มือเภสัชกรรมแผนโบราณ. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.
- เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2545. การสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการขึ้นมาใหม่ขั้นพื้นฐาน. ใน หนังสือการประชุมวิชาการเรื่อง Molecular techniques for biodiversity research. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ชูศักดิ์ สัจจงพงษ์. 2550. มะขาม พืชสร้างอนาคต. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มติชน.
- ดวงรัตน์ เขียวชาญวิทย์. 2545. มะขามแขก...ยาระบายไทย. ชีวจิต 44.
- อุทธิ วัฒนชัยยิ่งเจริญ. 2550. การศึกษาความหลากหลายของพืชโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย. ใน วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์ (บรรณาธิการ), เทคนิคชีวเคมีขั้นสูง: การวิจัยทางเภสัชศาสตร์และการพัฒนายาใหม่, หน้า 47-65. กรุงเทพมหานคร: พี.เอส.พรินท์.
- พิจิตร โชคพัฒนา. 2546. คู่มือการปลูกมะขามหวาน. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี: สำนักพิมพ์เกษตรสาส์น.
- แมน อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2534. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ: Principles and techniques of instrumental analysis. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ลีณา สุนทรสุข. 2544. แคปิลลารีอีเล็กโตรโฟรีซิส: เทคนิคใหม่สำหรับการวิเคราะห์ยา อาหาร และสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์. 2550. ชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics): ความรู้พื้นฐานที่ควรรู้. ใน วิเชษฐ์ ลีลามานิตย์ (บรรณาธิการ), เทคนิคชีวเคมีขั้นสูง: การวิจัยทางเภสัชศาสตร์และการพัฒนายาใหม่, หน้า 1-20. กรุงเทพมหานคร: พี.เอส.พรินท์.
- วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทศนาขจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิริดิถิลรัตน์, และ สกล พันธุ์ยิ้ม. 2547. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2546. สถานภาพงานบริการด้านเทคโนโลยีชีวภาพ. ปทุมธานี: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

- สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2547. เรียนรู้โปรแกรมชีวสารสนเทศด้วยตนเอง. กรุงเทพมหานคร: งานนิเทศสัมพันธ์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- สัมฤทธิ์ เพ็ญจันทร์. 2538. เทคโนโลยีผลไม้. พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สุชาติ สุหรั่ง. 2548. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ: หลักฐานทางพันธุกรรมในการพิสูจน์เอกลักษณ์สมุนไพร. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 19: 75-85.
- สุรพล สุรงค์ศรีรัฐ และ สมชาย ลีลากุลวงศ์. 2543. รู้คุณรู้โทษโภชนาการ. กรุงเทพมหานคร: ไรต์เดอส์ ไตเจสท์.
- ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็มสมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: บริษัทประชาชน จำกัด.
- อรอุมา ภูประเสริฐ และ มาลัย สติรพันธุ์. 2549. เทคนิคคู่มือเครื่องมือวิเคราะห์ทางเภสัชศาสตร์. วารสารไทยเภสัชชนิพนธ์ 3: 1-23.

ภาษาอังกฤษ

- Anon. 1976. *Tamarindus indica* L. In the wealth of India (Raw materials series) Vol. X, pp. 122-144. New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research.
- Atienzar, F. A., and Jha, A. N. 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. Mutation Research. 613: 76-102.
- Association of Official Analytical Chemists. 1980. Official Method for Analysis. 14th ed. Washington D. C.: Association of Official Analytical Chemists.
- Association of Official Analytical Chemists. 1995. Official method of analysis of AOAC International. vol. 1, 16th ed. Gaithersburg, MA: AOAC INTERNATIONAL.
- Association of Official Analytical Chemists. 2002. AOAC requirements for single laboratory validation of chemical methods[Online]. The Association of Official Agricultural Chemists. Available: http://www.aoac.org/Ag_Materials/additives/aoac_slv.pdf[2004, May 5]

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds. 2002. Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology. vol. 1, 5th ed. Toronto: John Wiley & Sons.
- Baldwin, B. G., Sanderson, J. M., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S., and Donoghue, M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden 82: 247-277.
- Bell, C. D. 2004. Preliminary phylogeny of Valerianaceae (Dipsacales) inferred from nuclear and chloroplast DNA sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution 31: 340-350.
- Bhattacharyya, P. K., Bal, S., and Mukherji, R. K. 1994. Studies on the characteristics of some products from tamarind (*Tamarindus indica* L.) kernels. Journal of Food Science and Technology (India) 31: 372-376.
- Brandolini, V., Tedeschi, P., Cereti, E., Maietti, A., Barile, D., Coisson, J. D., Mazzotta, D., Arlorio, M., and Martelli, A. 2005. Chemical and genomic combined approach applied to the characterization and identification of Italian *Allium sativum* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 678-683.
- Brandolini, V., Coisson, J. D., Tedeschi, P., Barile, D., Cereti, E., Maietti, A., Vecchiati, G., Martelli, A., and Arlorio, M. 2006. Chemometrical characterization of four Italian rice varieties based on genetic and chemical analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 9985-9991.
- Chaplin, M. F. 1994. Monosaccharide. In Chaplin, M. F., and Kenedy, J. F. (eds.), Carbohydrate Analyss: A Practical Approach, p. 4. Oxford: OXFORD UNIVERSITY PRESS.
- Chapman, K. R. 1984. Tamarind. In tropical tree fruits for Australia. Compiled by Page, P. E., In information series Q 183018, pp. 83-86. Brisbane: Queensland Department of Primary Industries.

- Clegg, M. T. 1993. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America 90: 363-367.
- Conti, E., Fischbach, A., and Sytsma, K. J. 1993. Tribal relationships in Onagraceae: implications from *rbcl* sequence data. Annals of the Missouri Botanical Garden 80: 672-685.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Research 16: 10881-10890.
- Cunha, S. C., Fernandes, J. O., and Ferreira, I. M. 2002. HPLC/UV determination of organic acids in fruit juices and nectars. European Food Research and Technology 214: 1438-2377.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA preparation version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.
- Dhar, R. S., Verm, V., Suri, K. A., Sangwan, R. S., Satti, N. K., Kumar, A., Tuli, R., and Qazi, G. N. 2006. Phytochemical and genetic analysis in selected chemotypes of *Withania somnifera*. Phytochemistry 67: 2269-2276.
- Diallo, B.O., Joly, H.I., McKey, D., Mckey, M.H., and Chevallier. 2007. Genetic diversity of *Tamarindus indica* populations: Any clues on the origin from its current distribution ?. American Journal of Biotechnology 6: 853-860.
- Dieffenbach, C. W., and Dveksler, G. S. 2003. PCR primer: Laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor.
- Duke, J. A. 1981. Handbook of legumes of world economic importance, pp. 228-230. New York: Plenum Press.
- Echeverrigaray, S., Agostini, G., Atti-Serfini, L., Paroul, N., Pauletti, G. F., and Santos, A. C. 2001. Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 4220-4223.
- Elujoba, B. A., Ajulo, A. A., and Iweibo, G. O. 1989. Chemical and biological analysis of Nigerian *Cassia* species for laxative activity. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 7: 1453-1457.

- Felter, H. W., and Lloyd, J. U. 1898. King's American Dispensatory. New York: Eclectic Medical Publications.
- Feungchan, S., Yimsawat, T., and Kitpowsong, P. 1996. Evaluation of tamarind cultivars on the chemical composition of pulp. Thai Journal of Agricultural Science 1: 28-33.
- Galiana-Balaguer, L., Rosello', S., Herrero-Marti'nez, J. M., Maquieira, A., and Nuez, F. 2001. Determination of L-ascorbic acid in *Lycopersicon* fruits by capillary zone electrophoresis. Analytical Biochemistry 296: 218-224.
- Gibbon, D., and Pain, A. 1985. Crop of Drier Regions of the Tropics. New York: Longman.
- Gomis, D. B. 1992. HPLC analysis of organic acids. In Nollet, L. M. L. (ed.), Food analysis by HPLC, pp. 371-385. New York: Marcel Dekker.
- Gunasena, H. P. M., and Hughes, A. 2000. Tamarind: *Tamarindus indica* L. 1st ed. Wiltshire: Redwood books.
- Hall, T.A. 1990. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Hamada, K., and Hagimori, M. 1996. RAPD-based method for cultivars-identification of calla lily (*Zantedeschia* spp.). Scientia Horticulture 65: 215-218.
- Hao, G., Zhang, D.-X., Zhang, M.-Y., Guo, L.-X., and Li, S.-J. 2003. Phylogenetics of *Bauhinia* subgenus *Phanera* (Leguminosae: Caesalpinioideae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Botanical Bulletin of Academia Sinica 44: 223-228.
- Hasan, S. K., and Ijaz, S. 1972. Tamarind-A review. Science Industry (Karachi) 9: 131-137.
- Hershkovitz, M A., and Zimmer, E. A. 1996. Conservation patterns in angiosperm rDNA-ITS2. Nucleic Acids Research 24: 2857-2867.
- Hidalgo, O., Garnatje, T., Susanna, A., and Mathez, J. 2004. Phylogeny of Valerianaceae based on *matK* and ITS markers, with reference to *matK* individual polymorphism. Annals of Botany 93: 283-293.

- Horváth, C., Melander, W., and Molnár, I. 1976. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. Journal of Chromatography A 125: 129-156.
- International Centre for Underutilized Crops Institute of Irrigation and Development Studies, University of Southampton. 2001. Tamarind: field manual for extension workers. Southampton: International Centre for Underutilized Crops.
- Irwin, R. E. 2001. Field and allozyme studies investigating optimal mating success in two sympatric spring-ephemeral plants, *Trillium* and *T. grandiflorum*. Hereity 87: 178-189.
- Isola, M. M., Agbaji, E. B., and Agbaji, A. S. 1990. A chemical study of *Tamarindus indica* (Tsamia) fruits grown in Nigeria. Journal of Science, Food and Agriculture 51: 141-143.
- Joshi, K., Chavan, P., Warude, D., and Patwardhan, B. 2004. Molecular markers in herbal drug technology. Current Science 87: 159-163.
- Käss, E., and Wink, M. 1997. Phylogenetic relationships in the Papilionoideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (*rbcL*) and ncDNA (ITS1 and 2). Molecular Phylogenetics and Evolution 8: 65-88.
- Kenicer, G. J., Kajita, T., Pennington, R. T., and Murata, J. 2005. Systematics and biogeography of *Lathyrus* (Leguminosae) based on Internal Transcribed Spacer and cpDNA sequence data. American Journal of Botany 92: 1199-1209.
- Kim, Y.-D., and Jansen, R. K. 1996. Phylogenetic implications of *rbcL* and ITS sequences variation in the Berberidaceae. Systematic Botany 21: 381-396.
- Kim, S., Labbe, R.G., and Ryu, S. 2000. Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens*. Applied and Environmental Microbiology. 66: 1213-1215.
- Kindness, A. 2006. Instrumental analysis, 49-50. Westville: School of Chemistry Durban Centre University of Kwazulu-Natal.
- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J.M., and Gessler, C. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 85: 901-904.

- Kordis-Krapez, M., Abram, V., Kac, M., and Ferjancic, S. 2001. Determination of organic acids in white wines by RP-HPLC. Food Technology and Biotechnology 39: 93-99.
- Kulkarni, R. S., Gangaprasad, S., and Swamy, G. S. K. 1993. Tamarind: Economically an important minor forest produce. Minor Forest Products News 3: 6.
- Larsen, K., Larsen, S. S., and Vidal, J. E. 1984. Leguminosae-Caesalpinioideae: Tamarindus. In Smitinand, T., and Larsen, K., (eds), Flora of Thailand. vol. 4, p. 124. Bangkok: The TISTR PRESS.
- Lee, R. 1975. Food analysis. In analytical and quality control methods for the food manufacturer and buyer. 3rd ed., p. 84. London: Leonard Hill Books.
- Lefevre, J. C. 1971. Review of the literature on the tamarind. Fruits 26: 687.
- Lewis, Y. S., and Neelakantan, S. 1964. The chemistry, biochemistry and technology of tamarind. Journal of Science and Industrial Research 23: 204.
- Mato, I., Luque, S. S., and Huidobro, J. F. 2005. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. Food Research International 38: 1175–1188.
- Mato, I., Luque, S. S., and Huidobro, J. F. 2007. Simple determination of main organic acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. Food Chemistry 102: 104–112.
- Maragoni, A., Alli, I., and Kermasha, S. 1988. Composition and properties of seeds of the true legume *Tamarindus indica*. Journal of Food Science 53: 1452-1455.
- Meillon, S. 1974. Process for making drinks, syrups, juice and liquor and solid extracts based on tamarind products thus obtained. French Patent No. 2231322.
- Morgan, D. R., Soltis, D. E., and Robertson, K. R. 1994. Genetic variation within and among populations of the narrow endemic, *Delphinium viridescens*. American Journal of Botany 81: 890-903.
- Morton, J. F. 1967. Medicinal plants-old and new. The Sixty-sixth Annual Meeting of the Medical Library Association, pp. 161-167. Miami, FL: Morton Collectanea University of Miami.

- Morton, J. F. 1987. Tamarind. In Julia F. Morton (ed.), Fruits of warm climates, pp. 115-121. Florida: Creative Resources Systems.
- Murray, M.G., and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4325.
- Nei, M., and Li, W., H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America 76: 5269-5273.
- Nishikawa, T., Okazaki, K., Uchino, T., Arakawa, K., and Nagamine, T. 1999. A molecular Phypeny of *Lilium* in the Internal Transcribed Spacer region of nuclear ribosomal DNA. Journal of Molecular Evolution 49: 238-249.
- Nyffeler, R., Bayer, C., Alverson, W. S., Yen, A., Whitlock, B. A., Chase, M. W., and Baum, D. A. 2005. Phylogenetic analysis of the Malvadendrina clade (Malvaceae s.l.) based on plastid DNA sequences. Organisms Diversity and Evolution 5: 109-123.
- Ogunti, E. O., and Elujoba, A. A. 1993. Laxative activity of *Cassia alata* (Leguminosae) oil leaf Thailand Fitoterapia 64: 437-439.
- Osborne, D. R., and Voogt, P. 1978. The analysis of nutrients in foods. London: ACADEMIC PRESS.
- Peist, R., Honsel, D., Twieling, G., and Löffert, D. 2001. PCR inhibitors in plant DNA preparations. QIAGEN News 3: 7-9.
- Liu Y. P., Luo, J. P., Feng, Y. F., Guo X. L., and Cao, H. 2002. DNA profiling of *Pogostemon cablin* chemotypes differing in essential oil composition. Yaoxue Xuebao 37: 304-308.
- Ploss, E. 1975. Synergism and potassium substitution as preferences in vegetable laxatives. Der Deutsche Apotheker 27: 334, 336-338.
- Prakas, A. O., Gupta, R. S., and Mathur, R. 1979. Effect of oral administration of forty-two indigenous plant extracts on early and late pregnancy in albino rats. Probe 17: 314-323.
- Purseglove, J. W. 1968. Tropical crops (Dicotyledons). London: Longman.

- Qui, W.-G., Schisler, N., and Stoltzfus, A. 2004. The evolutionary gain of spliceosomal introns: sequence and phase preferences. Molecular Biology and Evolution 21:1252-1263.
- Rebelein, H. 1961. Colorimetric determination of tartaric and lactic acids in wine and fruit juice. Deutsche Lebensmittel-Rundschau 57: 36-41.
- Reynolds, J. E. F. (ed.). 1989. Martindale: The extra pharmacopocia. London: The Pharmaceutical Press.
- Richardson, J. E., Fay, M. F., Cronk, Q. C. B., Bowman, D., and Chase, M. W. 2000. A phylogenetic analysis of RHAMNACEAE using *rbcL* and *trnL-F* plastid DNA sequences. American Journal of Botany 87: 1309-1324.
- Sasaki, Y., Fushimi, H., and Komastu, K. 2001. Molecular analysis of medicinally-used Chinese and Japanese *Curcumae* based on 18s rRNA gene and *trnK* gene sequences. Biological and Pharmaceuticsl Bulletin 24: 1389-1934.
- Sasaki, Y., Fushimi, H., Cai, S. Q., and Komastu, K. 2002. Sequence analysis of Chinese and Japanese *Curcumae* drugs on the 18s rRNA gene and *trnK* gene and the application of the amplification-refractory mutation system analysis for their authentication. Biological and Pharmaceuticsl Bulletin 25: 1593-1599.
- Savur, G. R. 1948. Isolation and characterization of tamarind seed polysaccharide. Journal of Biochemistry 199: 501-509.
- Shankaracharya, N. B. 1998. Tamarind-chemistry, technology and use-a critical appraisal. Journal of Food Technology 35: 193-208.
- Silva-Brandao, K. L., Solferini, V. N., and Trigo, J. R. 2006. Chemical and phylogenetic relationship among *Aristolochia* L. (Aristolochiaceae) from southeastern Brazil. Biochemical Systematics and Ecology 34: 291-302.
- Singh, P. P. 1973. Oxalic acid content of Indian foods. Plant Foods for Human Nutrition 22: 1573-9104.
- Sneath, P. H. A., and Sokai, R. R. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco, MA: Freeman.
- Smith, B. 1968. Effect of irritant purgatives on the myenteric plexus in man and the mouse. Gut 9:139-43.

- Sokal, R. R., and Rohlf, F. J. 1981. *Biometry: The principles and practice of statistics in biological research*. New York: W. H. Freeman and Company.
- Soltis, D. E., Kuzoff, R. K., Conti, E., Gornall, R., and Ferguson, K., 1996. *matK* and *rbcl* gene sequence data indicate that *Saxifraga* (Saxiragaceae) is polyphyletic. *American Journal of Botany* 83: 371-382.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., and Doyle, J. F. 1998. *Molecular Systematics of Plants II DNA sequencing*. Dordrecht, MC: KLUWER ACADEMIC PUBLISHING.
- Sudborough, J. J., and Vridhachalam, P. N. 1920. Tartaric acid from tamarinds. *Journal of Indian Institute of Science* 3: 61-80.
- Sukrong, S., Phadungchareon, Th., and Ruangrunsi, N. 2005. DNA fingerprinting of medicinally used *Derris* species by RAPD molecular markers. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences* 29: 155-163.
- Thamlikitkul V., Dechatiwonges T., and Chantrakul, C. 1990. Randomized cotrolled trial of *Cassia Alata* Linn. for constipation. *Journal of the Medical Association of Thailand* 73: 217-221.
- The council of the Pharmaceutical Society of Great Britain. 1911. *The British Pharmaceutical Codex*. London: The Pharmaceutical Press.
- Hacke, G., and Meisel, R.,eds. 2004. *The United States Pharmacopoeia XXVII and The National Formula XXII*. vol. 4, pp. 2278-2284 and 2622-2625. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention.
- Ulrich, R. 1970. Organic acids. In Hulme, A. C. (ed.), *The biochemistry of fruits and their products*. vol. 1, pp. 89-118. New York: Academic Press.
- Vasudevan, H. 2007. *DNA fingerprinting in the standardization of herbs and nutraceuticals*[Online]. *The Science Creative Quaterly*. Available from: <http://www.scq.ubc.ca/?p=286>[2007, March15].
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., and Kuiper, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Verhaar, L. G. 1948. Tartaric acid and other constituents in the fruits of *Tamarindus indica*. *Chronica Naturae* 104: 8-11.

- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Raton, FL: CRC Press.
- White, T. J., Burns, T., Lee S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., and White, T. (eds.), PCR protocols: a guide to methods and application, pp. 315–322. San Diego, CA: Academic Press.
- Williams, C. N., Chew, W. Y., and Rajaratnam, J. H. 1980. Tree and field crops of the wetter regions of the tropics. London: Longman.
- Williams, S. E., Albert, V. A., and Chase, M. W. 1994. Relationships of Droseraceae: a cladistic analysis of *rbcL* sequence and morphological data. American Journal of Botany 81: 1027-1037.
- Wissemann, V., and Ritz, C. M. 2005. The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and *atpB-rbcL* intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. Botanical Journal of the Linnean Society 147: 275-290.
- Xia, Q., Zhao, K. J., Huang, Z. G., Zhang, P., Dong, T. T. X., Li, S. P., and Tsim, W. K. 2005. Molecular genetic and chemical assessment of *Rhizoma Curcumae* in China. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 6019-6026.
- Xiang, Q.-Y., Soltis, D. E., Morgan, D. R., and Soltis, P. S. 1993. Phylogenetic relationships of *Cornus* s. 1. and putative relatives inferred from *rbcL* sequence data. Annals of the Missouri Botanical Garden 80: 723-734.
- Zhanguo, C., and Jiuru, L. 2002. Simultaneous and direct determination of oxalic acid, tartaric acid, malic acid, vitamin C, citric acid and succinic acid in *Fructus mume* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatographic Science 40: 35-39.
- Zhao, K. J., Dong, T. T. X., Tu, P. F., Song, Z. H., Lo, C. K., and Tsim, W. K. 2005. Molecular genetic and chemical assessment of *Radix Angelica* (Danggui) in China. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 2576-2583.

Zhu, S., Fushimi, H., Cai, S., and Komastu, K. 2002. Phylogenetic relationship in the genus *Panax*: Inferred from chloroplast *trnK* gene and nuclear 18s rRNA gene sequences. Planta Medica 69: 647-653.

Zhu, S., Fushimi, H., Cai, S., and Komastu, K. 2003. Species identification from ginseng drugs by Multiplex Amplification Refractory Mutation System (MARMS). Planta Medica 70: 189-192.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Nelson - Somogyi (Nelson-Somogyi method) (Chaplin, 1994)

1. สารละลาย A

ละลาย sodium potassium tartrate 15 กรัม และ anhydrous Na_2CO_3 30 กรัม ในน้ำ DI ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เติม NaHCO_3 20 กรัม แล้วผสมให้เข้ากัน ละลาย anhydrous Na_2SO_4 180 กรัม ในน้ำ DI เดือด ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิด เข้าด้วยกันและปรับปริมาตรให้ครบ ด้วยน้ำ DI ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร

2. สารละลาย B

ละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 กรัม และ anhydrous Na_2SO_4 45 กรัม ในน้ำ DI ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ DI ในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร

3. สารละลาย C

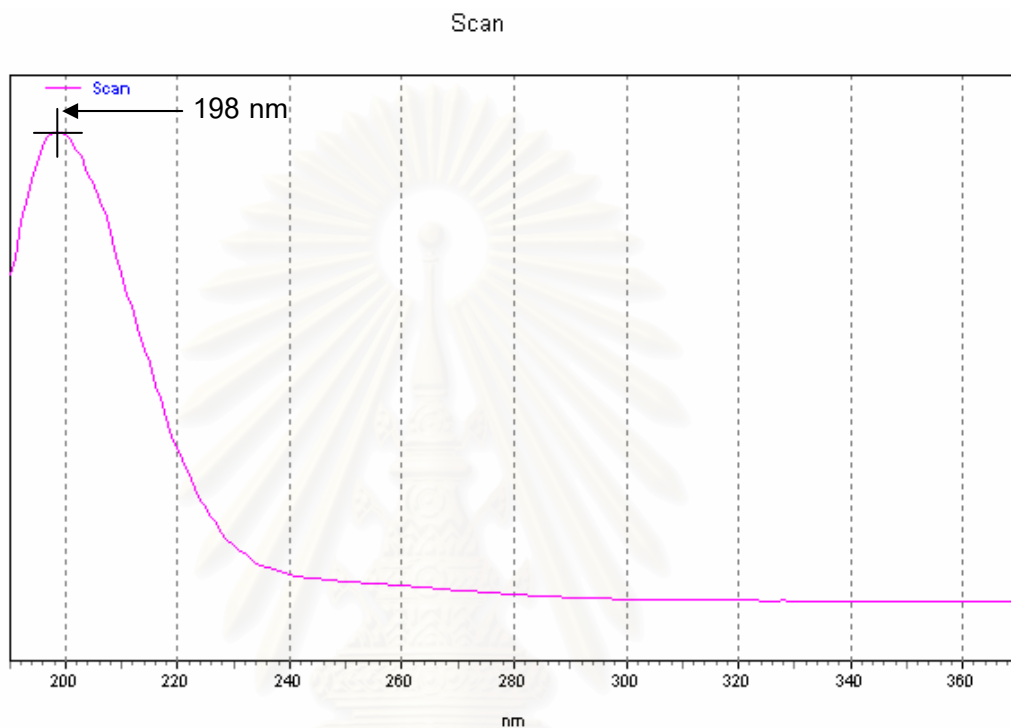
ผสมสารละลาย A และ B ในอัตราส่วน 4:1 ก่อนนำไปใช้

4. สารละลาย D

ละลาย ammonium molybdate 25 กรัม ในน้ำ DI ปริมาตร 450 มิลลิลิตร เติม กรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ละลาย $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 กรัม ในน้ำ DI ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วผสมลงในสารละลาย ammonium molybdate ผสมให้เข้ากัน และ ปั่นทิ้งไว้ในขวดสีชา เป็นเวลา 24-28 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้เจือจางด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.75 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:2

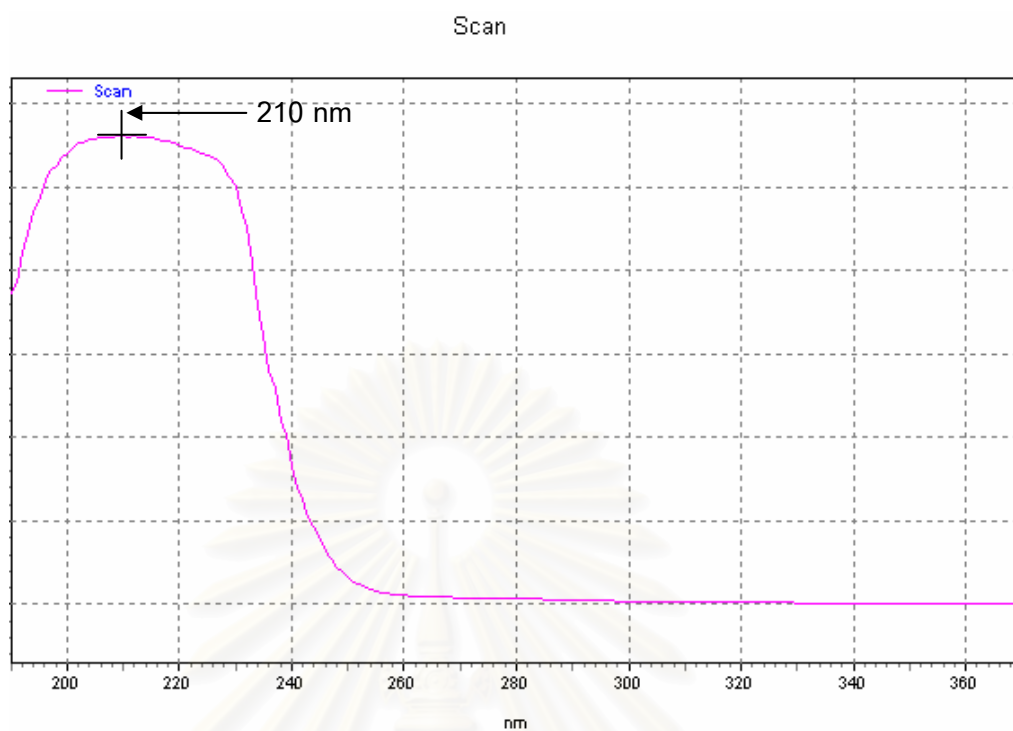
ภาคผนวก ข

สเปกตรัมของกรดออกซาลิก มาลิก วิตามินซี ซีตริก ซักซินิก และสารละลายผสมของกรดอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด

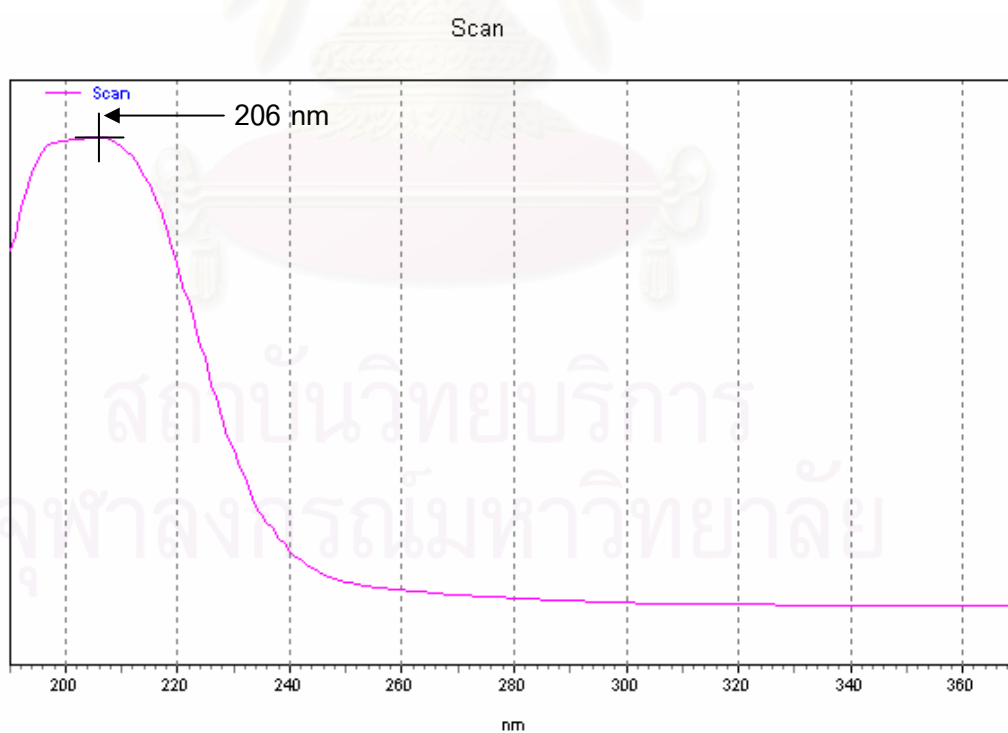


ภาพที่ 33 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของกรดออกซาลิกใน 0.5% (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$

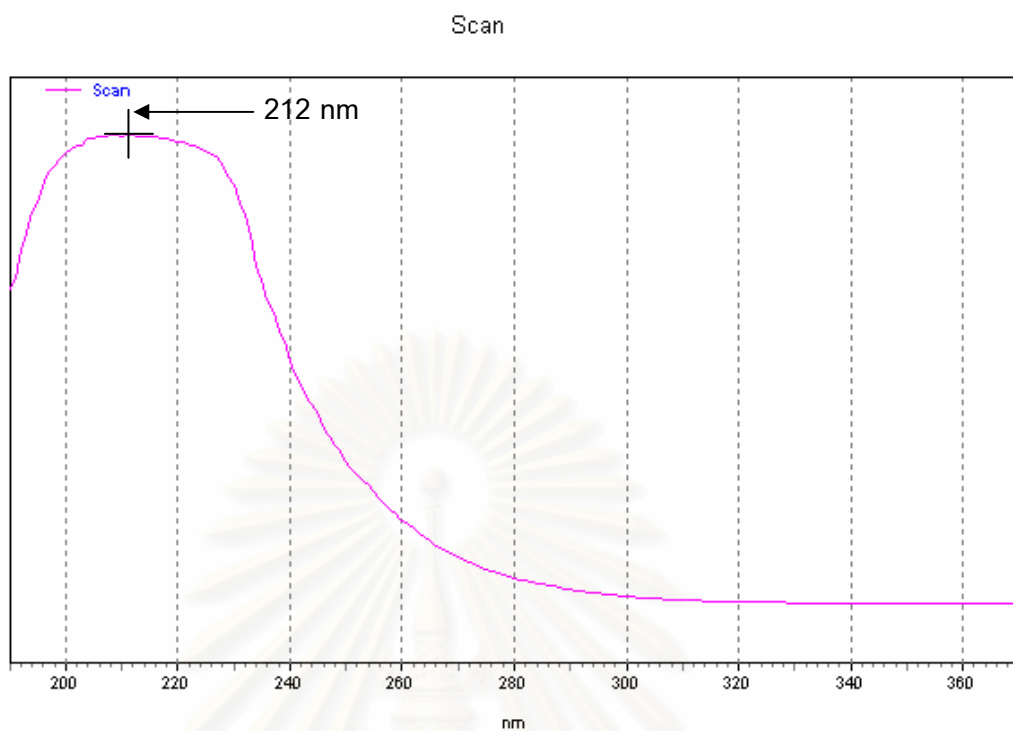
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



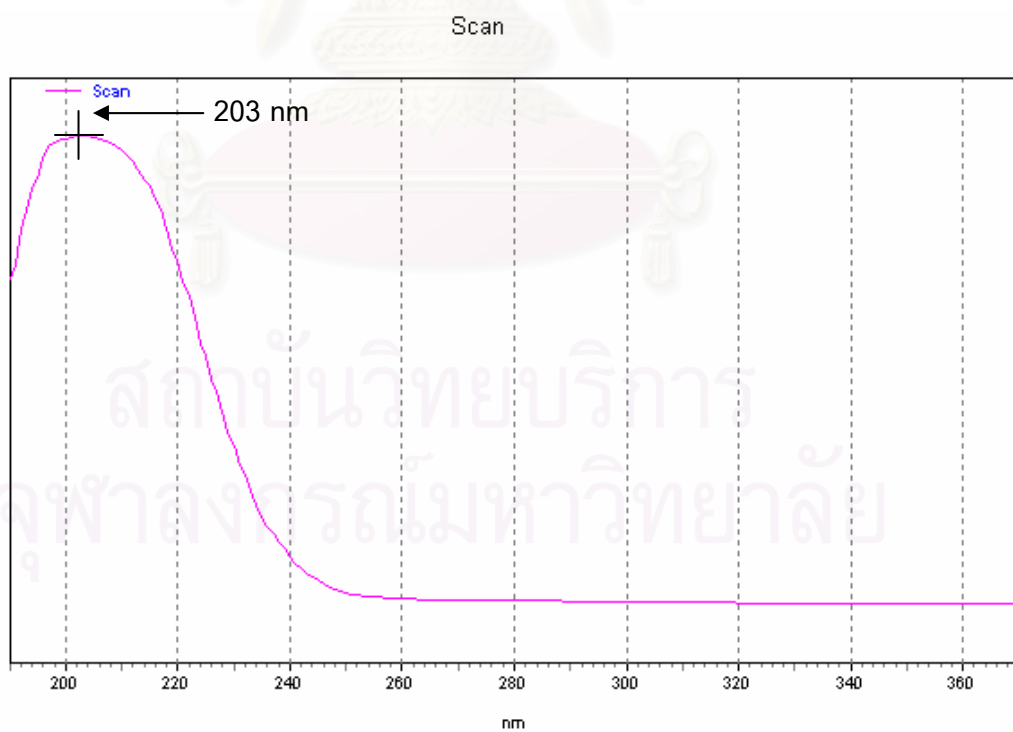
ภาพที่ 34 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของกรดทาร์ทริกใน 0.5% (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$



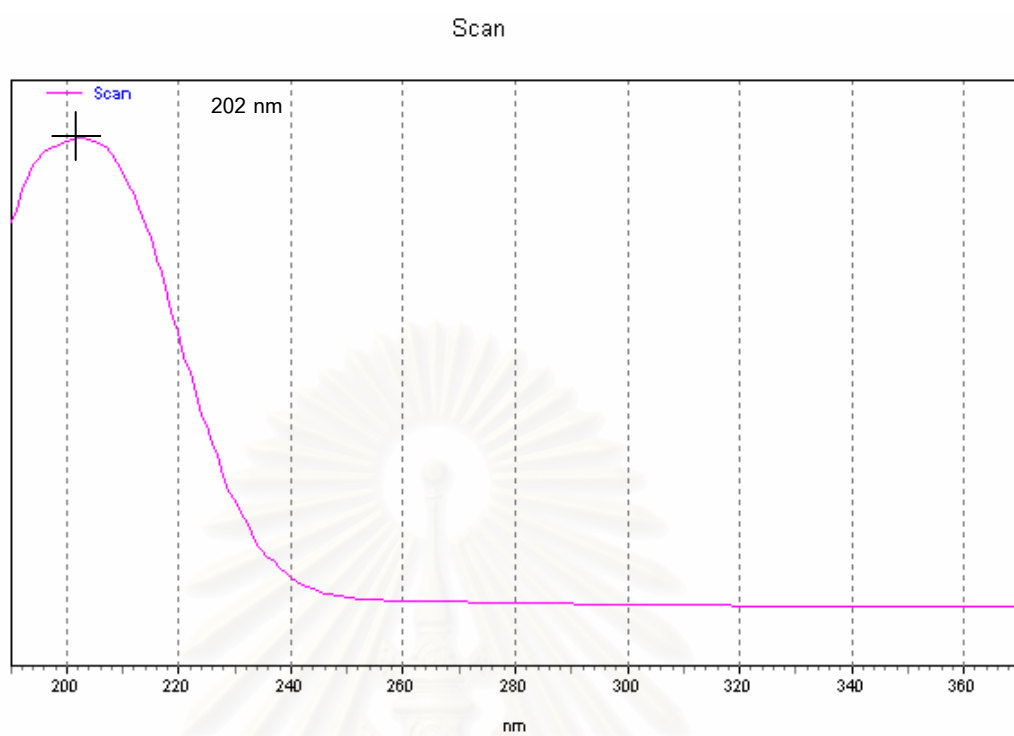
ภาพที่ 35 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของกรดมาลิกใน 0.5% (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$



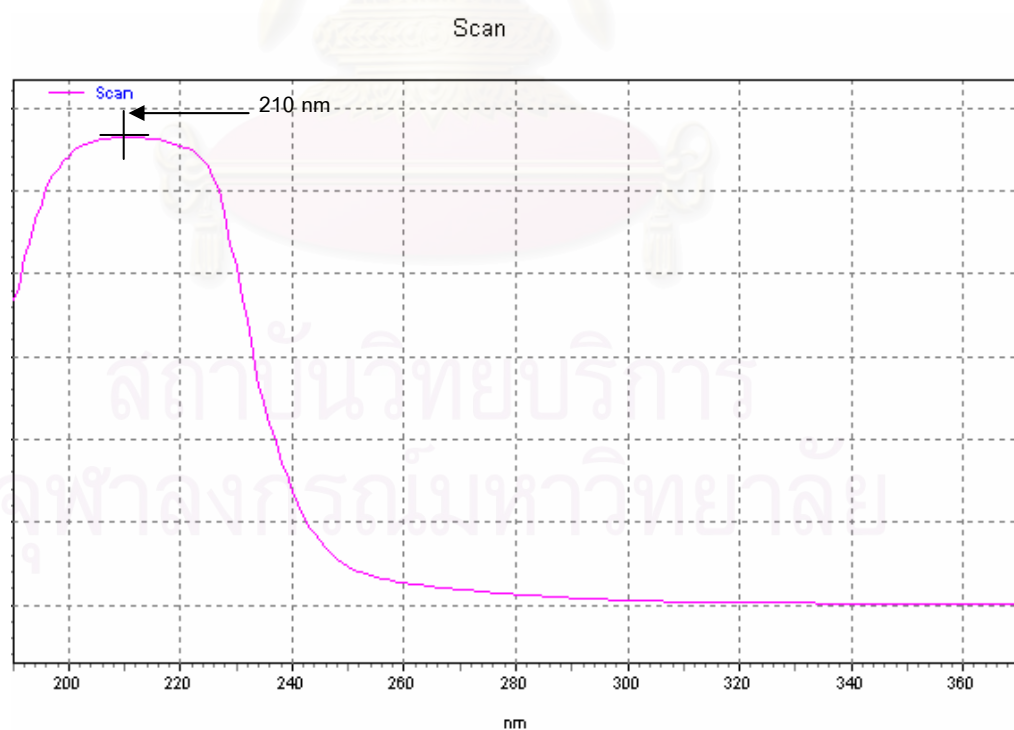
ภาพที่ 36 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของกรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) ใน 0.5% (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$



ภาพที่ 37 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของกรดซิตริก ใน 0.5% (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$



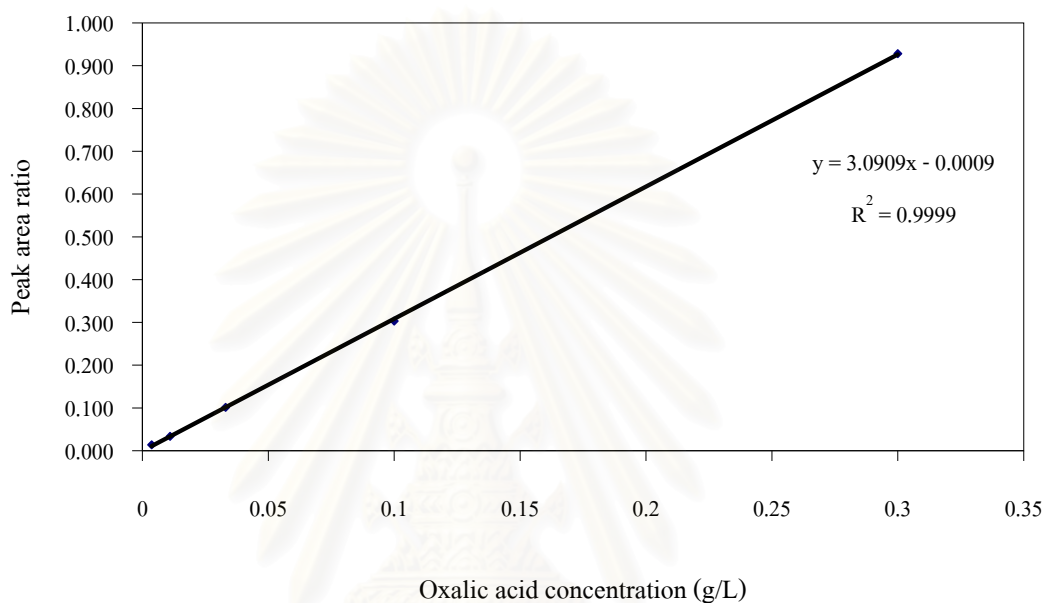
ภาพที่ 38 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตของกรดซิงค์คลอไรด์ ใน 0.5% (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$



ภาพที่ 39 สเปกตรัมอัลตราไวโอเล็ตกรดอินทรีย์ผสมทั้ง 6 ชนิด ใน 0.5% (w/w) $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$

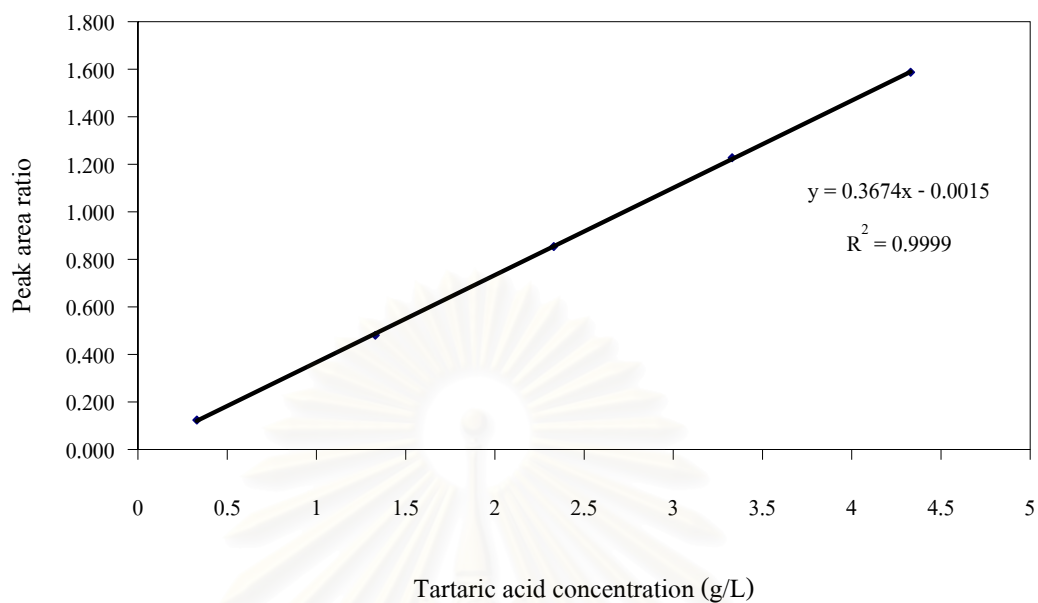
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดอินทรีย์มาตรฐานกับสารมาตรฐานภายใน (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดออกซาลิก ทาร์ทริก มาลิก วิตามินซี และซีตริก

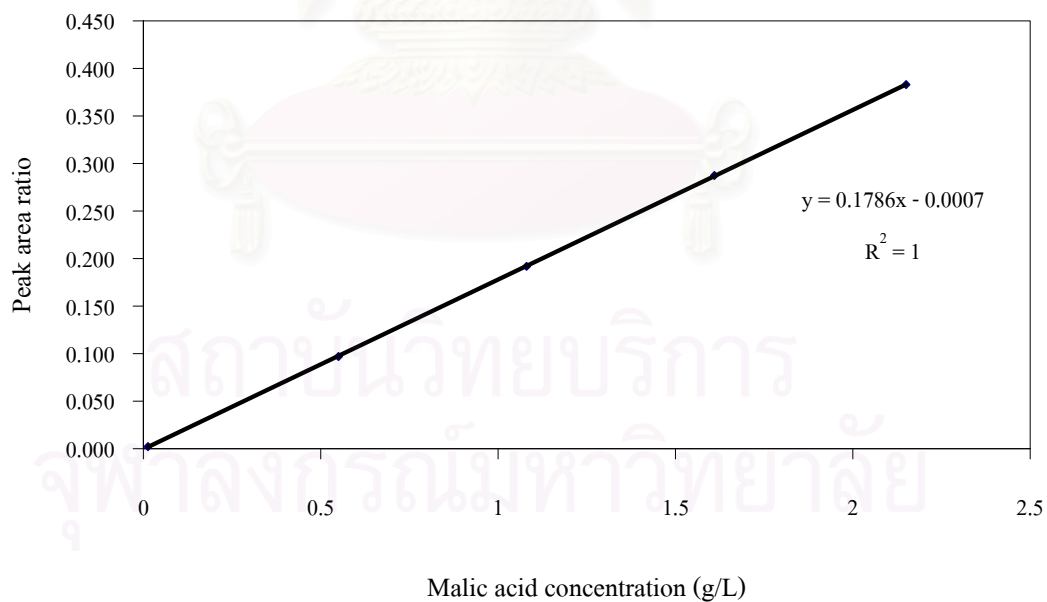


ภาพที่ 40 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดออกซาลิกกับสารมาตรฐานภายใน (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดออกซาลิก (g/L)

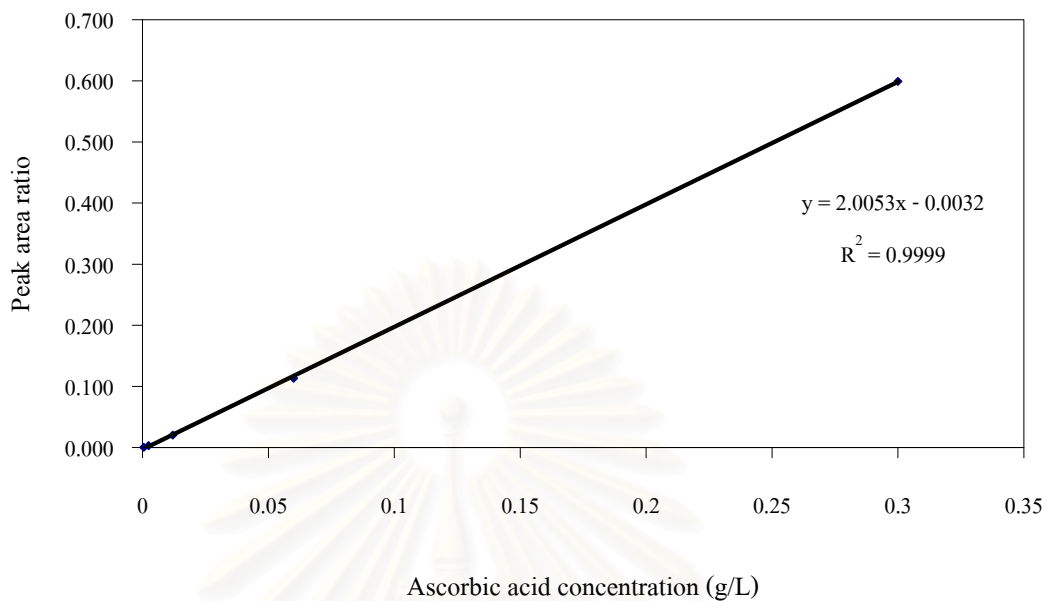
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



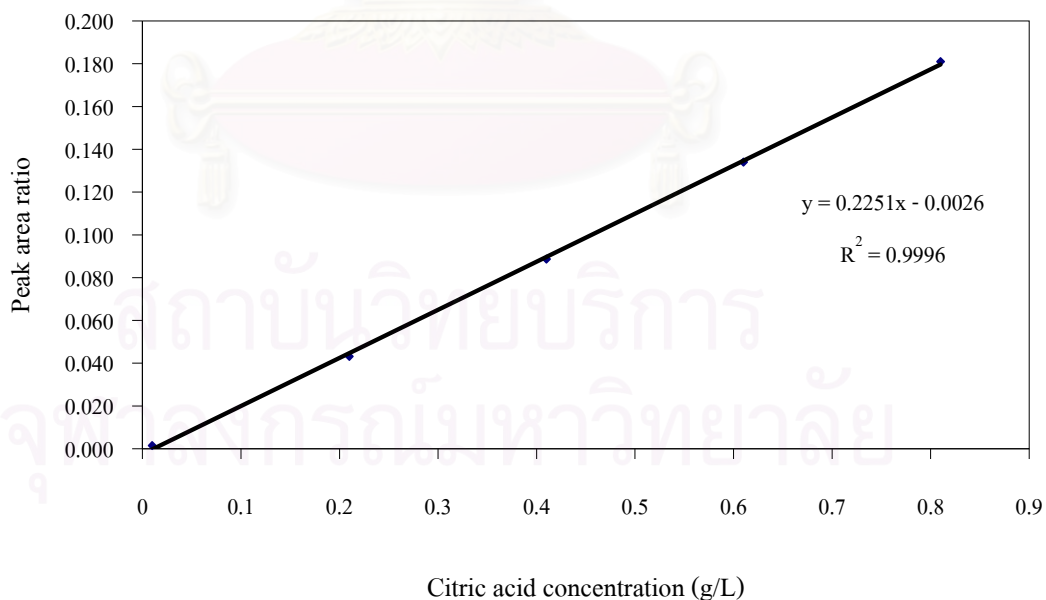
ภาพที่ 41 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดทาร์ทาริกกับสารมาตรฐานภายใน (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดทาร์ทาริก (g/L)



ภาพที่ 42 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดมาลิกกับสารมาตรฐานภายใน (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดมาลิก (g/L)



ภาพที่ 43 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดแอสคอร์บิกกับสารมาตรฐานภายใน (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (g/L)



ภาพที่ 44 กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของกรดซิตริกกับสารมาตรฐานภายใน (Peak area ratio) และความเข้มข้นของกรดซิตริก (g/L)

ภาคผนวก ง

การทดสอบฤทธิ์ในการเป็นยาระบายในหนูขาว

ทดสอบฤทธิ์การเป็นยาระบายของกรดอินทรีย์มาตรฐานที่พบในเนื้อมะขาม คือ กรดทาร์ทาริก มาลิก ซิตริก และน้ำสกัดมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' โดยส่งไปทดสอบในหนูขาว (rats) ที่ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดังนี้

นำหนูขาวที่มีน้ำหนักประมาณ 200 กรัม มาอดอาหารก่อนป้อนสารทดสอบเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แบ่งกลุ่มหนูออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มยาอ้างอิง (reference drug) และกลุ่มทดสอบ หนูกลุ่มควบคุมได้รับการป้อนน้ำ DI ขนาด 10 มิลลิลิตร/กิโลกรัม กลุ่มยาอ้างอิงได้รับน้ำลูกพรุนขนาด 10 เท่า ของขนาดที่คนน้ำหนัก 50 กิโลกรัม รับประทาน (น้ำลูกพรุนขนาด 1 เท่า มีปริมาตรเท่ากับ 42 มิลลิลิตร) คือ 8.4 10 มิลลิลิตร/กิโลกรัม กลุ่มทดสอบได้รับสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานและน้ำสกัดมะขาม ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ 10 มิลลิลิตร/กิโลกรัม ตามลำดับ ทั้งระยะเวลา 30 นาที แล้วจึงป้อนผงถ่านความเข้มข้น 3% (3% suspension of deactivated charcoal in 0.5% CMC) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทั้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จึงฆ่าหนูด้วย pentobarbital sodium วัดระยะเวลาเคลื่อนที่ของผงถ่านจากลำไส้ส่วน duodenum และความยาวของลำไส้ส่วน duodenum ถึง ileum แต่ละกลุ่มทำการทดลองซ้ำ 6 ครั้ง ศึกษาผลของสารทดสอบต่อการเคลื่อนที่ของผงถ่านจากลำไส้เล็กของหนูขาวจากค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่าน ซึ่งคำนวณได้ตามสูตร

$$\% \text{ การเคลื่อนที่ของผงถ่าน} = \frac{\text{ระยะเวลาเคลื่อนที่ของผงถ่านจากลำไส้ส่วน duodenum} \times 100}{\text{ความยาวของลำไส้ส่วน duodenum ถึง ileum}}$$

ผลการทดสอบฤทธิ์การเป็นยาระบายในหนูขาว

ผลการทดสอบฤทธิ์การเป็นยาระบายของกรดอินทรีย์มาตรฐานที่พบในมะขาม คือ กรดทาร์ทาริก มาลิก ซิตริก และน้ำสกัดมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' แสดงไว้ในตารางที่ 29 และ 30 ตามลำดับ

จากตารางที่ 29 พบว่าน้ำลูกพรุนในขนาดเป็น 10 เท่า ของขนาดรับประทานในคน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาวเท่ากับ 63.94 ± 7.40 ซึ่งสูงกว่า

ตารางที่ 29 ผลต่อการเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาวของน้ำลูกพรุนและกรดอินทรีย์มาตรฐาน

กลุ่ม	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่าน
กลุ่มควบคุม (น้ำ DI)	47.68±1.72
กลุ่มยาอ้างอิง (น้ำลูกพรุน 10 เท่า ขนาดรับประทานในคน)	63.94±7.40*
กลุ่มทดสอบกรดทาร์ทาริก (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	62.56±13.77*
กลุ่มทดสอบกรดมาลิก (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	57.03±5.01*
กลุ่มทดสอบกรดซิตริก (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	60.45±4.50*

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม ($P < 0.05$)

ตารางที่ 30 ผลต่อการเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาวของน้ำลูกพรุนและน้ำสกัดมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันที้' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์'

กลุ่ม	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่าน
กลุ่มควบคุม (น้ำ DI)	45.96±2.03
กลุ่มยาอ้างอิง (น้ำลูกพรุน 10 เท่า ขนาดรับประทานในคน)	59.65±2.65*
กลุ่มทดสอบน้ำสกัดมะขาม 'ศรีชมภู' (10 มิลลิลิตร/กิโลกรัม)	52.05±6.83*
กลุ่มทดสอบน้ำสกัดมะขาม 'ขันที้' (10 มิลลิลิตร/กิโลกรัม)	54.09±5.23*
กลุ่มทดสอบน้ำสกัด 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' (10 มิลลิลิตร/กิโลกรัม)	53.97±1.72*

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม ($P < 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาวในกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ 47.68 ± 1.72 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กรดอินทรีย์ 3 ชนิด คือ กรดทาร์ทาริก มาลิก และซิตริกมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาวเท่ากับ 62.56 ± 13.77 , 57.03 ± 5.01 และ 60.45 ± 4.50 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาวในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน

จากตารางที่ 30 พบว่าน้ำลูกพลุนในขนาดเป็น 10 เท่า ของขนาดรับประทานในคนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาวเท่ากับ 59.65 ± 2.65 ซึ่งสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาวในกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ 45.96 ± 2.03 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำสกัดมะขามชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ ‘ขันตี’ และมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาวเท่ากับ 52.05 ± 6.83 , 54.09 ± 5.23 และ 53.97 ± 1.72 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของผงถ่านในลำไส้เล็กของหนูขาวในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


```

      460      470      480      490      500      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
N_tabacum (Z00044) CCGCCTCATGGGATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCGCCCTGTTGGGATGTAATAAACCCTAAATGGGGTTATCTGCTAAAACTACGGTAGAGCTGTTTATGAATGTCTTCGGGGTGGACTTGATTTACC
P_sativum (X03853) ..T...C..A...T...G...A...A...A...A...A...T...C...G...T...T...A...C...G...
M_truncatula (NC_003119) ..T...C..A...T...G...A...A...A...A...T...C...T...T...A...A...T...
T.indica (Z70160) ..C..C...T...G...C...A...C...A...C...G...T...C...G...T...G...C...
'Srichomphu' ..C..T...G...C...A...C...G...T...G...C...
'Khanti' ..C..T...G...C...A...C...G...T...G...C...
'Priao-yak' ..C..T...G...C...A...C...G...T...G...C...

      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700      710      720      730      740      750
N_tabacum (Z00044) AAAGATGATGAGAACGTGAACCTCACACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTATTTTGTGCCGAAGCACTTATAAAGCACAGGCTGAAACAGGTGAAATCAAAGGGCATTACTTGAATGCTACTGCAGGTACATGCGAAGAAATG
P_sativum (X03853) .....A..T...C...C...C...A...T...C...G...T...A...T...G...T...
M_truncatula (NC_003119) .....A..T...C...C...TA...C...T...A...T...G...C...C...T...
T.indica (Z70160) .....T..C...C...A...A...C...G...T...G...G...G...
'Srichomphu' .....T..C...C...A...G...T...G...G...G...
'Khanti' .....T..C...C...A...G...T...G...G...G...
'Priao-yak' .....T..C...C...A...G...T...G...G...G...

      760      770      780      790      800      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
N_tabacum (Z00044) ATCAAAGAGCTGTATTTGCTAGAGAATTTGGCGTTCCGATCGTAATGCATGACTACTTAACGGGGGATTCACCCGAAATACTAGCTTGGCTCATTATTGCCGAGATAATGGTCTACTTCTTACATCCACCGTGCAATGCATGCGGTT
P_sativum (X03853) C.A...G...C...T...T...T...C...C...T...C...G...T...T...A...
M_truncatula (NC_003119) ..G...T...G...T...C...T...T...C...C...C...C...C...C...
T.indica (Z70160) ..A...G...G...A...T...A...A...A...T...T...G...T...T...A...
'Srichomphu' ..A...G...G...A...T...A...A...A...T...A...T...G...T...G...
'Khanti' ..A...G...G...A...T...A...A...A...T...T...G...T...T...A...
'Priao-yak' ..A...G...G...A...T...A...A...A...T...T...G...T...T...A...

      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
N_tabacum (Z00044) ATTGATAGACAGAAGAAATCATGGTATCCACTTCCGGGTATTAGCAAAAGCGTTACGTATGCTGGTGGAGATCATATTCACTCTGGTACCGTAGTAGGTAACCTTGAAGGTGAAAGAGACATAACTTTGGGCTTTGTTGATTTACTGCGT
P_sativum (X03853) ..C...A...A...G...T...T...T...C...T...T...G...T...T...A...G...G...T...A...T...A...
M_truncatula (NC_003119) ..C...A...G...T...T...T...C...T...T...A...G...T...G...A...G...T...T...A...T...A...
T.indica (Z70160) ..C...G...T...T...T...C...T...T...T...G...T...T...G...G...A...C...A...T...A...
'Srichomphu' ..C...G...T...T...T...C...T...T...T...G...T...T...G...G...A...C...A...T...A...
'Khanti' ..C...G...T...T...T...C...T...T...T...G...T...T...G...G...A...C...A...T...A...
'Priao-yak' ..C...G...T...T...T...C...T...T...T...G...T...T...G...G...A...C...A...T...A...

```

ภาพที่ 45 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของมะขาม *T. indica* ชนิดหวาน 'ศรีชมพู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' กับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rbcL* ของ *Tamarindus indica* L. (accession no. Z70160), *Nicotiana tabacum* (accession no. Z00044), *Pisum sativum* (accession no. X03853) และ *Medicago truncatula* (accession no. NC_003119)



ภาพที่ 46 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rbcL* ของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' กับยีน *rbcL* (accession no. Z70160) ที่มีใน GenBank ยีน *rbcL* ของมะขามที่ใช้ในการศึกษามีความยาวทั้งหมด 1,428 bp โดย start codon อยู่ที่ตำแหน่งที่ 1 และ stop codon อยู่ที่ตำแหน่งที่ 1,428



ภาพที่ 46 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rbcl* ของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' กับยีน *rbcl* (accession no. Z70160) ที่มีใน GenBank ยีน *rbcl* ของมะขามที่ใช้ในการศึกษามีความยาวทั้งหมด 1,428 bp โดย start codon อยู่ที่ตำแหน่งที่ 1 และ stop codon อยู่ที่ตำแหน่งที่ 1,428



ภาพที่ 46 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rbcL* ของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' กับยีน *rbcL* (accession no. Z70160) ที่มีใน GenBank ยีน *rbcL* ของมะขามที่ใช้ในการศึกษามีความยาวทั้งหมด 1,428 bp โดย start codon อยู่ที่ตำแหน่งที่ 1 และ stop codon อยู่ที่ตำแหน่งที่ 1,428

ภาคผนวก ข

1. ข้อมูลการลงทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์ผ่านทางฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ/EMBL/GenBank)

ตารางที่ 31 Accession no. ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ของมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์ในฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ/EMBL/GenBank)

Scientific name	Cultivar	Voucher no.	Size in bp	Genbank accession no.
<i>T. indica</i> L.	'Srichomphu' (‘ศรีชมภู’)	PCUTI-SP/P1	1,428	AB378725
		PCUTI-SP/P2	1,428	AB378726
		PCUTI-SP/P3		
		PCUTI-SP/P4		
		PCUTI-SP/P5	1,428	AB378727
<i>T. indica</i> L.	'Khanti' (‘ขันตี’)	PCUTI-K/P1	1,428	AB378728
		PCUTI-K/P2		
		PCUTI-K/P4		
		PCUTI-K/P5		
		PCUTI-K/P3	1,428	AB378729
<i>T. indica</i> L.	'Priaoyak' (‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’)	PCUTI-PY/P3	1,398	AB378730
		PCUTI-PY/P4		AB378731
		PCUTI-PY/P5		AB378732

1.1 มะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' (PCUTI-SP/P)

1.1.1 มะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' ต้นที่ 1 (PCUTI-SP/P1)

EntryID: 20080125000932.72971

[Contact Person]

E-mail: ssukrong@hotmail.com

Name: Suchada Sukrong

Institution: Chulalongkorn University

Department: Pharmacognosy

Country: Thailand

City: Bangkok

Street: Phyathai

Zip code: 10330

Phone: 6622188364

Fax: 6622188357

submitter: Suchada Sukrong

[Hold-date]

Immediate release: No

Hold-date: 2009/01/01

Kind of data: General data

[REFERENCE No.1]

Journal: Thesis (2007) Chulalongkorn University

Status: In Preparation

Year: 2008

Title: DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind cultivars with high laxative activity

author(s): Suchada Sukrong, Patipanee Khanthapok, Sunanta Pongsamart

[Sequence]

length: 1428 bp

Sequence:

```

atgtcaccac aaacagagac taaagcaagt gttgggttca aggctgggtg taaagattat
aaattgactt attatactcc tgactatgaa accaaggata ctgatatcct ggcagcattc
cgagtaactc ctcaacctgg agttccgccc gaagaagcag gtgccgcagt agctgctgaa
tcttctactg gtacatggac aactgtgtgg accgacgggc ttaccagcct tgatcgttac
aaaggacgat gctaccacat cgagcccgtt gctggagaag aaaatcaatt tattgcttat
gtagcttacc ccttagacct ttttgaagaa ggttctgtta ctaacatggt tacttccatt
gtgggtaatg tctttgggtt caaggccctg cgcgctctac gtctggagga tttgcaatc
cctacttctt atattaaaac tttccagggg cgcctcacg gtatccaagt tgagagagat
aaattgaaca agtatggccg tcccctattg ggatgtacta ttaaactaa attggggtta
tccgctaaga attacggtag agcggtttat gaatgtctcc gcggtggact tgattttacc
aaagatgatg agaacgtgaa ttcccaacca tttatgcgtt ggagagaccg tttcttattt
tgtgccgaag caatttataa agcacaggcc gaaacgggtg aaattaaagg gcattacttg
aatgctactg cgggtacatg ggaagaaatg ataaaaagag ctgtatattgc gagagaattg
ggagttccta tcgtaatgca tgactactta acagggggat tcaccgcaa tactagcttg
gctcattata gtcgggataa tggctactt cttcacatcc atcgggcaat gcatgcagtt
atcgatagac agaagaatca tggatgcat tttcgtgtac tagctaaagc gttacgtttg
tctgggtggag atcatattca cgctgggtact gtagtaggta aactggaagg ggaaagagaa
atcactttag gttttgttga tttactacgt gatgatTTTT gtgtaaaaga tcgaagccgc
ggatatttatt tcaactcaaga ttgggtctct ctaccgggtg ttctgcccgt tgcttcggga
ggatattcacg tttggcatat gcccgcctcg accgagatct ttggagatga ttccgtacta
caatttgggtg gaggaacttt gggacaccct tggggaaatg caccgggtgc cgtagctaata
cgagtagctc tagaagcatg tgtacaagct cgtaatgagg gacgtgatct tgctcgtag
ggtaatgaaa ttatccgtga ggctagcaaa tggagtcctg aattagctgc tgcttgtgaa
gtatggaagg aaatcaaatt tgaattccca gcaatggata ctttgtaa

```

[Organism]

organism	Tamarindus indica Linn.
mol_type	genomic DNA
collected_by	Patipanee Khanthapok
collection_date	21-JUL-2005
country	Thailand: Phetchabun Province
cultivar	Srichomphu
identified_by	Patipanee Khanthapok
note	Tamarindus indica Linn. chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, complete cds., specimen voucher PCUTI-SP/P1
organelle	plastid:chloroplast
specimen_voucher	PCUTI-SP/P1

Genetic code 11
 [CDS Feature No.1]
 Location 1..1428
 product the large subunit of ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase/
 oxygenase (RUBISCO)
 gene *rbcL*
 transl_table 11

translation:

MSPQTETKASVGFKAGVKDYKLTYYPDYETKDTDILAAFRVTPQPGVPPPEEAGAAVAE
 SSTGTWTTVWTDGLTSLDRYKGRCYHIEPVAGEENQFIAYVAYPLDLFEEGSVTNMFTSI
 VGNVFGFKALRALRLEDLRIPTSYIKTFQGPPhIQVERDKLNKYGRPLLGCITKPKLGL
 SAKNYGRAVYECLRGGLDFTKDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEAIYKAQAETGEIKGHYL
 NATAGTWEEMIKRAVFARELGVPIVMHDYLTGGFTANTSLAHYSRDNGLLLHIHRAMHAV
 IDRQKNHGMHFRVLAKALRLSGGDHIHAGTVVGKLEGEREITLGFVDLLRDDFCVKDRSR
 GIYFTQDWVSLPGVLPVASGGIHVWHMPALTEIFGDDSVLQFGGGTLGHPWGNAPGAVAN
 RVALEACVQARNEGRDLAREGNEI IREASKWSPELAAACEVWKEIKFEFPAMDTL

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.2 มะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' ต้นที่ 2, 3 และ 4 (PCUTI-SP/P2, PCUTI-SP/P3 และ PCUTI-SP/P4)

EntryID: 20080205114609.69056

[Contact Person]

E-mail: ssukrong@hotmail.com

Name: Suchada Sukrong

Institution: Chulalongkorn University

Department: Pharmacognosy

Country: Thailand

City: Bangkok

Street: Phyathai

Zip code: 10330

Phone: 6622188364

Fax: 6622188357

submitter: Suchada Sukrong

[Hold-date]

Immediate release: No

Hold-date: 2009/01/01

Kind of data: General data

[REFERENCE No.1]

Journal: Thesis (2007) Chulalongkorn University

Status: In Preparation

Year: 2008

Title: DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind cultivars with high laxative activity

author(s): Suchada Sukrong, Patipanee Khanthapok, Sunanta Pongsamart

[Sequence]

length: 1428 bp

Sequence:

```

atgtcaccac aaacagagac taaagcaagt gttgggttca aagctggtgt taaagattat
aaattgactt attatactcc tgactatgaa accaaggata ctgatatcct ggcagcattc
cgagtaactc ctcaacctgg agttccgccc gaagaagcag gtgccgcagt agctgctgaa
tcttctactg gtacatggac aactgtgtgg accgacgggc ttaccagcct tgatcgttac
aaaggacgat gctaccacat cgagcccgtt gctggagaag aaaatcaatt tattgcttat
gtagcttacc ccttagacct ttttgaagaa ggttctgtta ctaacatggt tacttccatt
gtgggtaatg tctttgggtt caaggccctg cgcgctctac gtctggagga tttgCGaatc
cctacttctt atattaaaac tttccagggt ccgctcacg gtatccaagt tgagagagat
aaattgaaca agtatggccg tcccctattg ggatgtacta ttaaaccctaa attggggtta
tccgctaaga attacggtag agcggtttat gaatgtctcc gcggtggact tgattttacc
aaagatgatg agaacgtgaa ttcccaacca tttatgcgtt ggagagaccg tttcttattt
tgtgccgaag caatttataa agcacaggcc gaaacgggtg aaattaaagg gcattacttg
aatgctactg cgggtacatg ggaagaaatg ataaaaagag ctgtatTTgc gagagaattg
ggagttccta tcgtaatgca tgactactta acagggggat tcaccgcaaa tactagcttg
gctcattata gtcgggataa tggctactt cttcacatcc atcgggcaat gcatgcagtt
atcgatagac agaagaatca tggtatgcat tttcgtgtac tagctaaagc gttacgTTtg
tctggTggag atcatattca cgctggTact gtagtaggta aactggaagg ggaaagagaa
atcactttag gttttgttga tttactacgt gatgatTTTT gtgtaaaaga tcgaagccgc
ggTatttatt tcaactcaaga ttgggtctct ctaccgggtg ttctgcccgt tgcttcggga
ggTattcacg tttggcatat gcccgcTctg accgagatct ttggagatga ttccgtacta
caatttggTg gaggaacttt gggacaccct tggggaaatg caccCGgtgc cgtagctaatt
cgagtagctc tagaagcatg tgtacaagct cgtaatgagg gacgtgatct tgctcgTgag
ggtaatgaaa ttatccgtga ggctagcaaa tggagTcctg aattagctgc tgcttGTgaa
gtatggaagg aaatcaaatt tgaattccca gcaatggata ctttGtaa

```

[Organism]

organism	Tamarindus indica Linn.
mol_type	genomic DNA
collected_by	Patipanee Khanthapok
collection_date	21-JUL-2005
country	Thailand: Phetchabun Province
cultivar	Srichomphu
identified_by	Patipanee Khanthapok
note	Tamarindus indica Linn. chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, complete cds., specimen voucher PCUTI-SP/P3
organelle	plastid:chloroplast
specimen_voucher	PCUTI-SP/P3
Genetic code	11

[CDS Feature No.1]

Location 1..1428
 product the large subunit of ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase/
 oxygenase (RUBISCO)
 gene *rbcL*
 transl_table 11
 translation:

MSPQTETKASVGFKAGVKDYKLTYYTPDYETKDTDILAAFRVTPQPGVPPEEAGAAVAAE
 SSTGTWTTVWTDGLTSLDRYKGRCYHIEPVAGEENQFIAYVAYPLDLFEEGSVTNMFTSI
 VGNVFGFKALRALRLEDLRIPTSYIKTFQGPPIHQVERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGL
 SAKNYGRAVYECLRGGLDFTKDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEAIYKAQAETGEIKGHYL
 NATAGTWEEMIKRAVFARELGVPIVMHDYLTGGFTANTSLAHYSRDNGLLLHIHRAMHAV
 IDRQKNHGMHFRVLAKALRLSGGDHIHAGTVVGKLEGEREITLGFVDLLRDDFCVKDRSR
 GIYFTQDWVSLPGVLPVASGGIHVWHMPALTEIFGDDSVLQFGGGTLGHPWGNAPGAVAN
 RVALEACVQARNEGRDLAREGNEIIREASKWSPELAAACEVWKEIKFEFPAMDTL



สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.3 มะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' ต้นที่ 5 (PCUTI-SP/P5)

EntryID: 20080205115933.73031

[Contact Person]

E-mail: ssukrong@hotmail.com

Name: Suchada Sukrong

Institution: Chulalongkorn University

Department: Pharmacognosy

Country: Thailand

City: Bangkok

Street: Phyathai

Zip code: 10330

Phone: 6622188364

Fax: 6622188357

submitter: Suchada Sukrong

[Hold-date]

Immediate release: No

Hold-date: 2009/01/01

Kind of data: General data

[REFERENCE No.1]

Journal: Thesis (2007) Chulalongkorn University

Status: In Preparation

Year: 2008

Title: DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind cultivars with high laxative activity

author(s): Suchada Sukrong, Patipanee Khanthapok, Sunanta Pongsamart

[Sequence]

length: 1428 bp

Sequence:

```

atgtcaccac aaacagagac taaagcaagt gttgggttca aagctgggtg taaagattat
aaattgactt attatactcc tgactatgaa accaaggata ctgatatctt ggagcattc
cgagtaactc ctcaacctgg agttccgccc gaagaagcag gtgccgcagt agctgctgaa
tcttctactg gtacatggac aactgtgtgg accgacgggc ttaccagcct tgatcgttac
aaaggacgat gctaccacat cgagcccgtt gctggagaag aaaatcaatt tattgcttat
gtagcttacc ccttagacct ttttgaagaa ggttctgtta ctaacatggt tacttccatt
gtgggtaatg tctttgggtt caaggccctg cgcgctctac gtctggagga tttgcgaatc
cctacttctt atattaaaac tttccagggt ccgctcacg gtatccaagt tgagagagat
aaattgaaca agtatggccg tcccctattg ggatgtacta ttaaaccctaa attgggggta
tccgctaaga attacggtag agcggtttat gaatgtctcc gcggtggact tgattttacc
aaagatgatg agaacgtgaa ttccaacca tttatgcggt ggagagaccg tttcttattt
tgtgccgaag caatttataa agcacaggcc gaaacagggtg aaattaaagg gcattacttg
aatgctactg cgggtacctg ggaagaaatg ataaaaagag ctgtatttgc gagagaattg
ggagttccta tcgtaatgca tgactactta acagggggat tcaccgcaaa tactagcttg
gctcattata gtccgggataa tgggtctactt cttcacatcc atcgggcaat gcatgcagtt
atcgatagac agaagaatca tggatgcat tttcgtgtac tagctaaagc gttacgtttg
tctgggtggag atcatattca cgctggtagt gtagtaggta aactggaagg ggaaagagaa
atcacttttag gttttgttga tttactacgt gatgattttt gtgtaaaaaga tcgaagccgc
ggatatttatt tcaactcaaga ttgggtctct ctaccgggtg ttctgcccgt tgcttcggga
ggtattcacg tttggcatat gcccgcctcg accgagatct ttggagatga ttccgtacta
caatttgggt gaggaacttt gggacaccct tggggaaatg caccgggtgc cgtagtaat
cgagtagctc tagaagcatg tgtacaagct cgtaatgagg gacgtgatct tgctcgtgag
ggtaatgaaa ttatccgtga ggctagcaaa tggagtctctg aattagctgc tgcttgtgaa
gtatggaagg aaatcaaatt tgaattccca gcaatggata ctttgtaa

```

[Organism]

organism	Tamarindus indica Linn.
mol_type	genomic DNA
collected_by	Patipanee Khanthapok
collection_date	21-JUL-2005
country	Thailand: Phetchabun Province
cultivar	Srichomphu
identified_by	Patipanee Khanthapok
note	Tamarindus indica Linn. chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, complete cds., specimen voucher PCUTI-SP/P5
organelle	plastid:chloroplast
specimen_voucher	PCUTI-SP/P5
Genetic code	11
[CDS Feature No.1]	
Location	1..1428

product the large subunit of ribulose 1,5- biphosphate carboxylase/
oxygenase (RUBISCO)

gene *rbcL*

transl_table 11

translation:

MSPQTETKASVGFKAGVKDYKLTYYTPDYETKDTDILAAFRVTPQPGVPPPEEAGAAVAE
SSTGTWTTVWTDGLTSLDRYKGRCYHIEPVAGEENQFIAYVAYPLDLFEEGSVTNMFTSI
VGNVFGFKALRALRLEDLRIPTSYIKTFQGPPhIQVERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGL
SAKNYGRAVYECLRGGLDFTKDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEAIYKAQAETGEIKGHYL
NATAGTWEEMIKRAVFARELGVPIVMHDYLTGGFTANTSLAHYSRDNGLLLHIHRAMHAV
IDRQKNHGMHFRVLAKALRLSGGDHIHAGTVVGKLEGEREITLGFVDLLRDDFCVKDRSR
GIYFTQDWVSLPGVLPVASGGIHVWHMPALTEIFGDDSVLQFGGGTLGHPWGNAPGAVAN
RVALEACVQARNEGRDLAREGNEI IREASKWSPELAAACEVWKEIKFEFPAMDTL



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 มะขามชนิดหวาน 'ขันตี' (PCUTI-K/P)

1.1.1 มะขามชนิดหวาน 'ขันตี' ต้นที่ 1, 2, 4 และ 5 (PCUTI-K/P1, PCUTI-K/P2, PCUTI-K/P4 และ PCUTI-K/P5)

EntryID: 20080205120823.03471

[Contact Person]

E-mail: ssukrong@hotmail.com

Name: Suchada Sukrong

Institution: Chulalongkorn University

Department: Pharmacognosy

Country: Thailand

City: Bangkok

Street: Phyathai

Zip code: 10330

Phone: 6622188364

Fax: 6622188357

submitter: Suchada Sukrong

[Hold-date]

Immediate release: No

Hold-date: 2009/01/01

Kind of data: General data

[REFERENCE No.1]

Journal: Thesis (2007) Chulalongkorn University

Status: In Preparation

Year: 2008

Title: DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind cultivars with high laxative activity

author(s): Suchada Sukrong, Patipanee Khanthapok, Sunanta Pongsamart

[Sequence]

length: 1428 bp

Sequence:

```

atgtcaccac aaacagagac taaagcaagt gttgggttca aagctggtgt taaagattat
aaattgactt attatactcc tgactatgaa accaaggata ctgatatcct ggcagcattc
cgagtaactc ctcaacctgg agttccgccc gaagaagcag gtgccgcagt agctgctgaa
tcttctactg gtacatggac aactgtgtgg accgacgggc ttaccagcct tgatcgttac
aaaggacgat gctaccacat cgagcccgtt gctggagaag aaaatcaatt tattgcttat
gtagcttacc ccttagacct ttttgaagaa ggttctgtta ctaacatggt tacttccatt
gtgggtaatg tctttgggtt caaggccctg cgcgctctac gtctggagga tttgcgaaatc
cctacttctt atattaaaac tttccagggg cgcctcacg gtatccaagt tgagagagat
aaattgaaca agtatggccg tcccctattg ggatgtacta ttaaaccctaa attggggtta
tccgctaaga attacggtag agcggtttat gaatgtctcc gcggtggact tgattttacc
aaagatgatg agaacgtgaa ttcccaacca tttatgcggt ggagagaccg tttcttattt
tgtgccgaag caatttataa agcacaggcc gaaacgggtg aaattaaagg gcattacttg
aatgctactg cgggtacatg ggaagaaatg ataaaaagag ctgtatattgc gagagaattg
ggagttccta tcgtaatgca tgactactta acagggggat tcaccgcaaa tactagcttg
gctcattatt gtcgggataa tggctactt cttcacatcc atcgtgcaat gcatgcagtt
atcgatagac agaagaatca tggtagcat tttcgtgtac tagctaaagc gttacgtttg
tctgggtggag atcatattca cgctgggtact gtagtaggta aactggaagg ggaaagagaa
atcactttag gttttgttga tttactacgt gatgatttta ttgaaaaaga tcgaagccgc
ggatatttatt tcaactcaaga ttgggtctct ctaccgggtg ttctgcccggt tgcttcggga
ggatattcacg tttggcatat gcccgcctcg accgagatct ttggagatga ttccgtacta
caatttggtg gaggaacttt gggacaccct tggggaaatg caccgggtgc cgtagctaata
cgagtagctc tagaagcatg tgtacaagct cgtaatgagg gacgtgatct tgctcgtgag
ggtaatgaaa ttatccgtga ggctagcaaa tggagtcctg aattagctgc tgcttgtgaa
gtatggaagg aaatcaaatt tgaattccca gcaatggata ctttgtaa

```

[Organism]

organism	Tamarindus indica Linn. cultivar Khanti
mol_type	genomic DNA
collected_by	Patipanee Khanthapok
collection_date	21-JUL-2005
country	Thailand: Phetchabun Province
cultivar	Khanti
identified_by	Patipanee Khanthapok
note	Tamarindus indica Linn. chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, complete cds., specimen voucher PCUTI-K/P1
organelle	plastid:chloroplast
specimen_voucher	PCUTI-K/P1

Genetic code 11
 [CDS Feature No.1]
 Location 1..1428
 product the large subunit of ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase/
 oxygenase (RUBISCO)
 gene *rbcL*
 transl_table 11
 translation:

MSPQTETKASVGFKAGVKDYKLTYYTPDYETKDTDILAAFRVTPQPGVPPPEEAGAAVAE
 SSTGTWTTVWTDGLTSLDRYKGRCYHIEPVAGEENQFIAYVAYPLDLFEEGSVTNMFTSI
 VGNVFGFKALRALRLEDLRIPTSYIKTFQGPPhGIQVERDKLNKYGRPLLGCITKPKLGL
 SAKNYGRAVYECLRGGLDFTKDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEAIYKAQAETGEIKGHYL
 NATAGTWEEMIKRAVFARELGVP IVMHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLLHIHRAMHAV
 IDRQKNHGMHFRVLAKALRLSGGDHIHAGTVVGKLEGEREITLGFVDLLRDDFIEKDRSR
 GIYFTQDWVSLPGVLPVASGGIHVWHMPALTEIFGDDSVLQFGGGTLGHPWGNAPGAVAN
 RVALEACVQARNEGRDLAREGNEI IREASKWSPELAAACEVWKEIKFEFPAMDTL

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1.2 มะขามชนิดหวาน 'ขันตี' ต้นที่ 3 (PCUTI-K/P3)

EntryID: 20080205121357.37979

[Contact Person]

E-mail: ssukrong@hotmail.com

Name: Suchada Sukrong

Institution: Chulalongkorn University

Department: Pharmacognosy

Country: Thailand

City: Bangkok

Street: Phyathai

Zip code: 10330

Phone: 6622188364

Fax: 6622188357

submitter: Suchada Sukrong

[Hold-date]

Immediate release: No

Hold-date: 2009/01/01

Kind of data: General data

[REFERENCE No.1]

Journal: Thesis (2007) Chulalongkorn University

Status: In Preparation

Year: 2008

Title: DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind cultivars with high laxative activity

author(s): Suchada Sukrong, Patipanee Khanthapok, Sunanta Pongsamart

[Sequence]

length: 1428 bp

Sequence:

```

atgtcaccac aaacagagac taaagcaagt gttgggttca aagctgggtg taaagattat
aaattgactt attatactcc tgactatgaa accaaggata ctgatatctt ggagcattc
cgagtaactc ctcaacctgg agttccgccc gaagaagcag gtgccgcagt agctgctgaa
tcttctactg gtacatggac aactgtgtgg accgacgggc ttaccagcct tgatcgttac
aaaggacgat gctaccacat cgagcccgtt gctggagaag aaaatcaatt tattgcttat
gtagcttacc ccttagacct ttttgaagaa ggttctgtta ctaacatggt tacttccatt
gtgggtaatg tctttgggtt caaggccctg cgcgctctac gtctggagga tttgcgaatc
cctacttctt atattaaaac tttccagggt ccgctcacg gtatccaagt tgagagagat
aaattgaaca agtatggccg tcccctattg ggatgtacta ttaaacctaa attggggtta
tccgctaaga attacggtag agcggtttat gaatgtctcc gcggtggact tgattttacc
aaagatgatg agaacgtgaa ttccaacca tttatgcggt ggagagaccg tttcttattt
tgtgccgaag caatttataa agcacaggcc gaaacagggt aatcaaagg gcattacttg
aatgctactg cgggtacatg ggaagaaatg ataaaaagag ctgtatttgc gagagaattg
ggagttccta tcgtaatgca tgactactta acagggggat tcaccgcaaa tactagcttg
gctcattatt gtccgggataa tgggtctactt cttcacatcc atcgtgcaat gcatgcagtt
atcgatagac agaagaatca tggatgcat tttcgtgtac tagctaaagc gttacgtttg
tctgggtggag atcatattca cgctggtagt gtagtaggta aactggaagg ggaaagagaa
atcacttttag gttttgttga tttactacgt gatgatttta ttgaaaaaga tcgaagccgc
ggatatttatt tcaactcaaga ttgggtctct ctaccgggtg ttctgcccgt tgcttcggga
ggtattcacg tttggcatat gcccgcctcg accgagatct ttggagatga ttccgtacta
caatttgggt gaggaacttt gggacaccct tggggaaatg caccgggtg cgtagtaat
cgagtagctc tagaagcatg tgtacaagct cgtaatgagg gacgtgatct tgctcgtgag
ggtaatgaaa ttatccgtga ggctagcaaa tggagtctct aattagctgc tgcttgtaa
gtatggaagg aaatcaaatt tgaattccca gcaatggata ctttgtaa

```

[Organism]

organism	Tamarindus indica Linn. cultivar Khanti
mol_type	genomic DNA
collected_by	Patipanee Khanthapok
collection_date	21-JUL-2005
country	Thailand: Phetchabun Province
cultivar	Khanti
identified_by	Patipanee Khanthapok
note	Tamarindus indica Linn. chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, complete cds., specimen voucher PCUTI-K/P3
organelle	plastid:chloroplast
specimen_voucher	PCUTI-K/P3
Genetic code	11
[CDS Feature No.1]	
Location	1..1428

product the large subunit of ribulose 1,5- biphosphate carboxylase/
oxygenase (RUBISCO)

gene *rbcL*

transl_table 11

translation:

MSPQTETKASVGFKAGVKDYKLTYYTPDYETKDTDILAAFRVTPQPGVPPPEEAGAAVAE
SSTGTWTTVWTDGLTSLDRYKGRCYHIEPVAGEENQFIAYVAYPLDLFEEGSVTNMFTSI
VGNVFGFKALRALRLEDLRIPTSYIKTFQGPPhIQVERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGL
SAKNYGRAVYECLRGGLDFTKDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEAIYKAQAETGEIKGHYL
NATAGTWEEMIKRAVFARELGVP IVMHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLLHIHRAMHAV
IDRQKNHGMHFRVLAKALRLSGGDHIHAGTVVGKLEGEREITLGFVDLLRDFIEKDRSR
GIYFTQDWVSLPGVLPVASGGIHVWHMPALTEIFGDDSVLQFGGGTLGHPWGNAPGAVAN
RVALEACVQARNEGRDLAREGNEI IREASKWSPELAAACEVWKEIKFEFPAMDTL



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 มะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' (PCUTI-PY/P)

1.3.1 มะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 3 (PCUTI-PY/P3)

EntryID: 20080205121953.93960

[Contact Person]

E-mail: ssukrong@hotmail.com

Name: Suchada Sukrong

Institution: Chulalongkorn University

Department: Pharmacognosy

Country: Thailand

City: Bangkok

Street: Phyathai

Zip code: 10330

Phone: 6622188364

Fax: 6622188357

submitter: Suchada Sukrong

[Hold-date]

Immediate release: No

Hold-date: 2009/01/01

Kind of data: General data

[REFERENCE No.1]

Journal: Thesis (2007) Chulalongkorn University

Status: In Preparation

Year: 2008

Title: DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind cultivars with high laxative activity

author(s): Suchada Sukrong, Patipanee Khanthapok, Sunanta Pongsamart

[Sequence]

length: 1398 bp

Sequence:

```

cttgggttca aaagcgggtg taaagattat aaattgactt attatactcc tgactatgaa
accaaggata ctgatatctt ggcagcattc cgagtaactc ctcaacctgg agttccgccc
gaagaagcag gtgccgcagt agctgctgaa tcttctactg gtacatggac aactgtgtgg
accgacgggc ttaccagcct tgatcgttac aaaggacgat gctaccacat cgagcccgtt
gctggagaag aaaatcaatt tattgcttat gtagcttacc ccttagacct ttttgaagaa
ggttctgtta ctaacatggt tacttccatt gtgggtaatg tctttgggtt caaggccctg
cgcgctctac gtctggagga tttgcaaatc cctacttctt atattaaaac tttccagggt
ccgcctcacg gtatccaagt tgagagagat aaattgaaca agtatggccg tcccctattg
ggatgtacta ttaaacctaa attgggggtta tccgctaaga attacggtag agcggtttat
gaatgtctcc gcggtggact tgattttacc aaagatgatg agaacgtgaa ttccaacca
tttatgcggt ggagagaccg tttcttattt tgtgccgaag caatttataa agcacaggcc
gaaacgggtg aaattaaagg gcattacttg aatgctactg cgggtacatg ggaagaaatg
ataaaaagag ctgtatttgc gagagaattg ggagttccta tcgtaatgca tgactactta
acagggggat tcaccgcaaa tactagcttg gctcattatt gtcgggataa tggctactt
cttcacatcc atcgtgcaat gcatgcagtt atcgatagac agaagaatca tggtagcat
tttcgtgtac tagctaaagc gttacgtttg tctggaggag atcatattca cgctggtagt
gtagtaggta aactggaagg ggaaagagaa atcactttag gttttgttga tttactactg
gatgatthta ttgaaaaaga tcgaagccgc ggtatttatt tcaactcaaga ttgggtctct
ctaccgggtg ttctgcccgt tgcttcggga ggtattcacg tttggcatat gcccgctctg
accgagatct ttggagatga ttccgtacta caatttggtg gaggaacttt gggacaccct
tggggaaatg caccgggtgc cgtagctaat cgagtagctc tagaagcatg tgtacaagct
cgtaatgagg gacgtgatct tgctcgtgag ggtaatgaaa ttatccgtga ggctagcaaa
tggagtctg aattagctgc tgcttgtaga gtatggaagg aatcaaatt tgaattcca
gcaatggata ctttgtaa

```

[Organism]

organism Tamarindus indica Linn. Cultivar Prio-yak

mol_type genomic DNA

collected_by Patipanee Khanthapok

collection_date 21-JUL-2005

country Thailand: Phetchabun Province

cultivar Prio-yak

identified_by Patipanee Khanthapok

note Tamarindus indica Linn. chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, complete cds., specimen voucher PCUTI-PY/P3

organelle plastid:chloroplast

specimen_voucher PCUTI-PY/P3

Genetic code 11

[CDS Feature No.1]

Location 1..1398
 product the large subunit of ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase/
 oxygenase (RUBISCO)
 gene *rbcL*
 transl_table 11
 translation:

LGFKSGVKDYKLTYYTPDYETKDTDILAAFRVTPQPGVPPPEEAGAAVAAESSTGTWTTVW
 TDGLTSLDRYKGRCYHIEPVAGEENQFIAYVAYPLDLFEEGSVTNMFTSIVGNVFGFKAL
 RALRLEDLRIPTSYIKTFQGPPIHQVERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNGRAVY
 ECLRGGLDFTKDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEAIYKAQAETGEIKGHYLNATAGTWEEM
 IKRAVFARELGVPIVMHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLLHIHRAMHAVIDRQKNHGMH
 FRVLAKALRLSGGDHIHAGTVVGKLEGEREITLGFVDLLRDDFIEKDRSGIYFTQDWVS
 LPGVLPVASGGIHVWHMPALTEIFGDDSVLQFGGGTLGHPWGNAPGAVANRVALEACVQA
 RNEGRDLAREGNEIIREASKWSPELAAACEVWKEIKFEFPAMDTL



สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.2 มะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 4 (PCUTI-PY/P4)

EntryID: 20080205123311.91906

[Contact Person]

E-mail: ssukrong@hotmail.com

Name: Suchada Sukrong

Institution: Chulalongkorn University

Department: Pharmacognosy

Country: Thailand

City: Bangkok

Street: Phyathai

Zip code: 10330

Phone: 6622188364

Fax: 6622188357

submitter: Suchada Sukrong

[Hold-date]

Immediate release: No

Hold-date: 2009/01/01

Kind of data: General data

[REFERENCE No.1]

Journal: Thesis (2007) Chulalongkorn University

Status: In Preparation

Year: 2008

Title: DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind cultivars with high laxative activity

author(s): Suchada Sukrong, Patipanee Khanthapok, Sunanta Pongsamart

[Sequence]

length: 1398 bp

Sequence:

```

cttgggttca aaagcgggtgt taaagattat aaattgactt attatactcc tgactatgaa
accaaggata ctgatatctt ggcagcattc cgagtaactc ctcaacctgg agttccgccc
gaagaagcag gtgccgcagt agctgctgaa tcttctactg gtacatggac aactgtgtgg
accgacgggc ttaccagcct tgatcgttac aaaggacgat gctaccacat cgagcccgtt
gctggagaag aaaatcaatt tattgcttat gtagcttacc ccttagacct ttttgaagaa
ggttctgtta ctaacatggt tacttccatt gtgggtaatg tctttgggtt caaggccctg
cgcgctctac gtctggagga tttgcaatc cctacttctt atattaaaac tttccagggt
ccgcctcacg gtatccaagt tgagagagat aaattgaaca agtatggccg tcccctattg
ggatgtacta ttaaacctaa attgggggta tccgctaaga attacggtag agcggtttat
gaatgtctcc gcgggtggact tgattttacc aaagatgatg agaacgtgaa ttccaacca
tttatgctgt ggagagaccg tttcttattt tgtgccgaag caatttataa agcacaggcc
gaaacgggtg aaattaaagg gcattacttg aatgctactg cgggttcatg ggaagaaatg
ataaaaagag ctgtatattg gagagaattg ggagttccta tcgtaatgca tgactactta
acagggggat tcaccgcaaa tactagcttg gctcattatt gtcgggataa tggctactt
cttcacatcc atcgtgcaat gcatgcagtt atcगतagac agaagaatca tggtatgcat
tttctgttac tagctaaagc gttccgtttg tctcgtggag atcatattca cgctgggtact
gtagtaggta aactggaagg ggaaagagaa atcactttag gttttgttga tttactacgt
gatgatttta ttgaaaaaga tcgaagccgc ggtatttatt tcactcaaga ttgggtctct
ctaccgggtg ttctgcccgt tgcttcggga ggtattcacg tttggcatat gcccgctctg
accgagatct ttggagatga ttccgtacta caatttgggt gaggaacttt gggacaccct
tggggaaatg caccgggtgc cgtagctaata cgagtagctc tagaagcatg tgcacaagct
cgtaatgagg gacgtgatct tgctcgtgag ggtaatgaaa ttatccgtga ggctagcaaa
tggagtctg aattagctgc tgcttgtgaa gtatggaagg aaatcaaatt tgaattccca
gcaatggata ctttgtaa

```

[Organism]

organism	Tamarindus indica Linn. Cultivar Prio-yak
mol_type	genomic DNA
collected_by	Patipanee Khanthapok
collection_date	21-JUL-2005
country	Thailand: Phetchabun Province
cultivar	Prio-yak
identified_by	Patipanee Khanthapok
note	Tamarindus indica Linn. chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, complete cds., specimen voucher PCUTI-PY/P4
organelle	plastid:chloroplast
specimen_voucher	PCUTI-PY/P4
Genetic code	11
[CDS Feature No.1]	
Location	1..1398

product the large subunit of ribulose 1,5- biphosphate carboxylase/
oxygenase (RUBISCO)

gene *rbcL*

transl_table 11

translation:

LGFKSGVKDYKLTYYTPDYETKDTDILAAFRVTPQPGVPPPEEAGA AVAAESSTGTWTTVW
TDGLTSLDRYKGRCYHIEPVAGEENQFIAYVAYPLDLFEEGSVTNMFTSIVGNVFGFKAL
RALRLEDLRIPTSYIKTFQPPHGIQVERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVY
ECLRGGLDFTKDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEAIYKAQAETGEIKGHYLNATAGSWEEM
IKRAVFARELGVP IVMHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLLHIHRAMHAVIDRQKNHGMH
FRVLAKAFRLSRGDHIHAGTVVGKLEGEREITLGFVDLLRDDFIEKDRSRGIYFTQDWVS
LPGVLPVASGGIHVWHMPALTEIFGDDSVLQFGGGTLGHPWGNAPGAVANRVALEACVQA
RNEGRDLAREGNEI IREASKWSPELAAACEVWKEIKFEFPAMDTL



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3.3 มะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 5 (PCUTI-PY/P5)

EntryID: 20080205123831.11234

[Contact Person]

E-mail: ssukrong@hotmail.com

Name: Suchada Sukrong

Institution: Chulalongkorn University

Department: Pharmacognosy

Country: Thailand

City: Bangkok

Street: Phyathai

Zip code: 10330

Phone: 6622188364

Fax: 6622188357

submitter: Suchada Sukrong

[Hold-date]

Immediate release: No

Hold-date: 2009/01/01

Kind of data: General data

[REFERENCE No.1]

Journal: Thesis (2007) Chulalongkorn University

Status: In Preparation

Year: 2008

Title: DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind cultivars with high laxative activity

author(s): Suchada Sukrong, Patipanee Khanthapok, Sunanta Pongsamart

[Sequence]

length: 1398 bp

Sequence:

```

cttgggttca aaagcgggtgt taaagattat aaattgactt attatactcc tgactatgaa
accaaggata ctgatatctt ggcagcattc cgagtaactc ctcaacctgg agttccgccc
gaagaagcag gtgccgcagt agctgctgaa tcttctactg gtacatggac aactgtgtgg
accgacgggc ttaccagcct tgatcgttac aaaggacgat gctaccacat cgagcccgtt
gctggagaag aaaatcaatt tattgcttat gtagcttacc ccttagacct ttttgaagaa
ggttctgtta ctaacatggt tacttccatt gtgggtaatg tctttgggtt caaggccctg
cgcgctctac gtctggagga tttgccaatc cctacttctt atattaaaac tttccagggt
ccgcctcacg gtatccaagt tgagagagat aaattgaaca agtatggccg tcccctattg
ggatgtacta ttaaacctaa attgggggta tccgctaaga attacggtag agcggtttat
gaatgtctcc gcggtggact tgattttacc aaagatgatg agaacgtgaa ttccaacca
tttatgctgt ggagagaccg tttcttattt tgtgccgaag caatttataa agcacaggcc
gaaacgggtg aaattaaagg gcattacttg aatgctactg cgggttcatt ggaagaaatg
ataaaaagag ctgtatattg gagagaattg ggagttccta tcgtaatgca tgactactta
acagggggat tcaccgcaaa tactagcttg gctcattatt gtcgggataa tggctactt
cttcacatcc atcgtgcaat gcatgcagtt atcगतatagac agaagaatca tggtatgcat
tttctgttac tagctaaagc gttacgtttg tctggtggag atcatattca cgctgggtact
gtagtaggta aactggaagg ggaaagagaa atcacttttag gttttgttga tttactacgt
gatgatttta ttgaaaaaga tcgaagccgc ggtatttatt tcactcaaga ttgggtctct
ctaccgggtg ttctgcccgt tgcttcggga ggtattcacg tttggcatat gcccgctctg
accgagatct ttggagatga ttccgtacta caatttgggt gaggaacttt gggacaccct
tggggaaatg caccgggtgc cgtagctaata cgagtagctc tagaagcatg tgcacaagct
cgtaatgagg gacgtgatct tgctcgtagg ggtaatgaaa ttatccgtga ggctagcaaa
tggagtctg aattagctgc tgcttgtaga gtatggaagg aaatcaaatt tgaattccca
gcaatggata ctttgtaa

```

[Organism]

organism	Tamarindus indica Linn. Cultivar Prio-yak
mol_type	genomic DNA
collected_by	Patipanee Khanthapok
collection_date	21-JUL-2005
country	Thailand: Phetchabun Province
cultivar	Prio-yak
identified_by	Patipanee Khanthapok
note	Tamarindus indica Linn. chloroplast rbcL gene for ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, complete cds., specimen voucher PCUTI-PY/P5
organelle	plastid:chloroplast
specimen_voucher	PCUTI-PY/P5
Genetic code	11
[CDS Feature No.1]	
Location	1..1398

product the large subunit of ribulose 1,5- biphosphate carboxylase/
oxygenase (RUBISCO)

gene *rbcL*

transl_table 11

translation:

LGFKSGVKDYKLTYYTPDYETKDTDILAAFRVTPQPGVPPPEEAGA AVAAESSTGTWTTVW
TDGLTSLDRYKGRCYHIEPVAGEENQFIAYVAYPLDLFEEGSVTNMFTSIVGNVFGFKAL
RALRLEDLRIPTSYIKTFQPPHGIQVERDKLNKYGRPLLGCTIKPKLGLSAKNYGRAVY
ECLRGGLDFTKDDENVNSQPFMRWRDRFLFCAEAIYKAQAETGEIKGHYLNATAGSWEEM
IKRAVFARELGVP IVMHDYLTGGFTANTSLAHYCRDNGLLLHIHRAMHAVIDRQKNHGMH
FRVLAKALRLSGGDHIHAGTVVGKLEGEREITLGFVDLLRDDFIEKDRSRGIYFTQDWVS
LPGVLPVASGGIHVWHMPALTEIFGDSDVLQFGGGTLGHPWGNAPGAVANRVALEACVQA
RNEGRDLAREGNEI IREASKWSPELAAACEVWKEIKFEFPAMDTL



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ข้อมูลการลงทะเบียนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA, ITS-1, 5.8S rDNA, ITS-2 และ 26S rDNA ของมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์ผ่านทางฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ/EMBL/GenBank)

ตารางที่ 32 Accession no. ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของของ 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 และ 26S rDNA ของมะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ใช้ในการทดลองจากจังหวัดเพชรบูรณ์ในฐานข้อมูล DNA Data Bank of Japan (DDBJ/EMBL/GenBank)

Scientific name	Cultivar	Voucher no.	Size in bp	Genbank accession no.
<i>T. indica</i> L.	'Srichomphu' ('ศรีชมภู')	PCUTI-SP/P2	775	AB378733
<i>T. indica</i> L.	'Khanti' ('ขันตี')	PCUTI-K/P4	730	AB378734
<i>T. indica</i> L.	'Priao-yak' ('มะขามเปรี้ยวยักษ์')	PCUTI-PY/P5	773	AB378735

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1 มะขามชนิดหวาน 'ศรีชมภู' ต้นที่ 2 (PCUTI-SP/P2)

EntryID: 20080127235249.69005

[Contact Person]

E-mail: ssukrong@hotmail.com

Name: Suchada Sukrong

Institution: Chulalongkorn University

Department: Pharmacognosy

Country: Thailand

City: Bangkok

Street: Phyathai

Zip code: 10330

Phone: 6622188364

Fax: 6622188357

submitter: Suchada Sukrong

[Hold-date]

Immediate release: No

Hold-date: 2009/01/01

Kind of data: General data

[REFERENCE No.1]

Journal: Thesis (2007) Chulalongkorn University

Status: In Preparation

Year: 2008

Title: DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind cultivars with high laxative activity

author(s): Suchada Sukrong, Patipanee Khanthapok, Sunanta Pongsamart

[Sequence]

length: 775 bp

Sequence:

```

gagaagtccc ctgaacctta tcatttagag gaaggagaag tcgtaacaag gtttccgtag
gtgaacctgc ggaaggatca ttgtcgatac cttacacaaa cagcacgacc ggtgaacttg
ttcttttgtc aaactagacg gaggcacacg gcgttcgctc ccatgggctt cccgtgctgg
gatacaacgc ggggctagcc agtcccgttg tttctcccgg cataaaaaacg aacccccggc
gttgaacgcg ccaaggaaca caactacatg acgttctctt gtcgtcccgg agacggtgca
tcggcaatga gcaacgcaaa atttgtatcc ataacgactc tcggcaacgg atatctcggc
tctcgcacg atgaagaacg tagcgaaatg cgatacttgg tgtgaattgc agaatcccgt
gaaccatcga gtctttgaac gcaagttgcg cccgaggtca ttaggccaaag ggcacgtctg
gctgggtgtc acacaacgtt gccccaaccc caacgcctgt cacacggcga tgggcacggg
gcggaacgatg gcttcccgtg agcatggcct cgcggatggc cgaaataaga gttcgcggtg
tggcgagcac cacggcgcac ggtagttgag taacactcga gccagtcgt gcgtgctcca
tccctccgtg acgaactccg ggatcctatc gcgtccagtg acgcttctaa cgcgacctca
gctcaggcgg gggcaccgcg tgagtttaag catatattta aagccgggag gaaaa

```

Organism]

organism	Tamarindus indica Linn. cultivar Srichomphu
mol_type	genomic DNA
collected_by	Patipanee Khanthapok
collection_date	21-JUL-2005
country	Thailand: Phetchabun province
cultivar	Srichomphu
identified_by	Patipanee Khanthapok
note	Tamarindus indica Linn. 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence, specimen voucher PCUTI-SP/P2
specimen_voucher	PCUTI-SP/P2
Genetic code	11

[Other Feature No.1 (rRNA)]

Location	<1..83
product	18S rRNA

[Other Feature No.2 (rRNA)]

Location	331..494
product	5.8S rRNA

[Other Feature No.3 (rRNA)]

Location 711..>775

product 26S rRNA

[Other Feature No.4 (misc_RNA)]

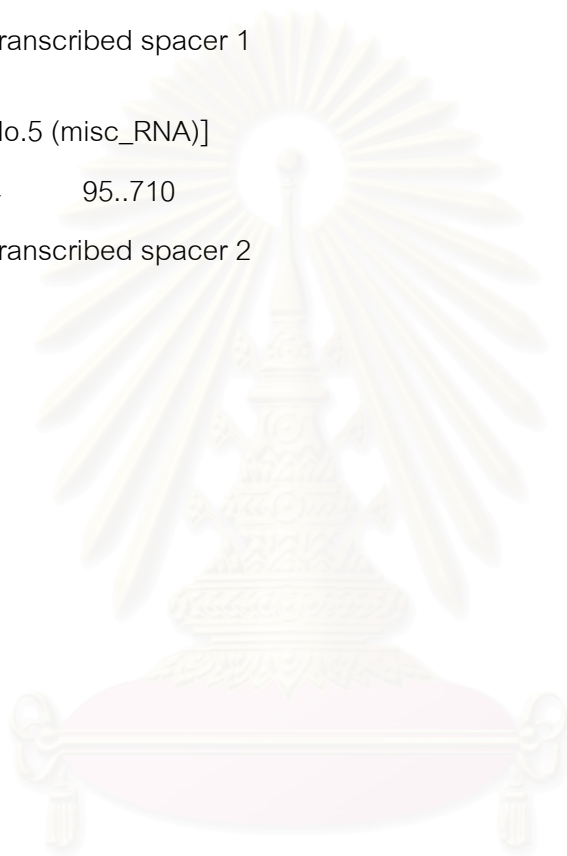
Location 84..330

note internal transcribed spacer 1

[Other Feature No.5 (misc_RNA)]

Location 4 95..710

note internal transcribed spacer 2



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 มะขามชนิดหวาน 'ขันตี' ต้นที่ 4 (PCUTI-K/P4)

EntryID: 20080205125707.27372

[Contact Person]

E-mail: ssukrong@hotmail.com

Name: Suchada Sukrong

Institution: Chulalongkorn University

Department: Pharmacognosy

Country: Thailand

City: Bangkok

Street: Phyathai

Zip code: 10330

Phone: 6622188364

Fax: 6622188357

submitter: Suchada Sukrong

[Hold-date]

Immediate release: No

Hold-date: 2009/01/01

Kind of data: General data

[REFERENCE No.1]

Journal: Thesis (2007) Chulalongkorn University

Status: In Preparation

Year: 2008

Title: DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind cultivars with high laxative activity

author(s): Suchada Sukrong, Patipanee Khanthapok, Sunanta Pongsamart

[Sequence]

length: 730 bp

Sequence:

```
tatcatttag aggaaggaga agtcgtaaca aggtttccgt aggtgaacct gcggaaggat
cattgtcgat accttacaca aacagcacga ccggtgaact tgttcttttg tcaaactaga
cggaggcaca cggcgttcgt cgccatgggc ctcccgtgct gggatacaac gcggggctag
ccagtcccgt tgtttctccc ggcataaaaa cgaacccccg gcgttgaacg cgccaaggaa
cacaactaca tgacgttctc ttgtcgtccc ggagacgggtg catcggcaat gagcaacgca
aaatgtgat ccataacgac tctcggcaac ggatatctcg gctctcgcat cgatgaagaa
cgtagcgaaa tgcgatactt ggtgtgaatt gcagaatccc gtgaaccatc gagtctttga
acgcaagttg cgcccagggt cattaggcca agggcacgtc tggctgggtg tcacacaacg
ttgccccaac cccaacgcct gtcacacggc gatgggcacg gggcggacga tggcttcccg
tgagcatggc ctcgcggatg gccgaaataa gagttcgcgg tgtggcgagc accacggcgc
acggtagttg agtaacactc gagcccagtc gtgcgtgctc catccctccg tgacgaactc
cgggatccta tcgcgtccag tgacgcttct aacgcgacct cagctcaggc ggggcccacc
gctgagttta
```

Organism]

organism	Tamarindus indica Linn. cultivar Khanti
mol_type	genomic DNA
collected_by	Patipanee Khanthapok
collection_date	21-JUL-2005
country	Thailand: Phetchabun province
cultivar	Khanti
identified_by	Patipanee Khanthapok
note	Tamarindus indica Linn. 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence, specimen voucher PCUTI-K/P4
specimen_voucher	PCUTI-K/P4
Genetic code	11

[Other Feature No.1 (rRNA)]

Location	<1..65
product	18S rRNA

[Other Feature No.2 (rRNA)]

Location	313..476
product	5.8S rRNA

[Other Feature No.3 (rRNA)]

Location 693..>730

product 26S rRNA

[Other Feature No.4 (misc_RNA)]

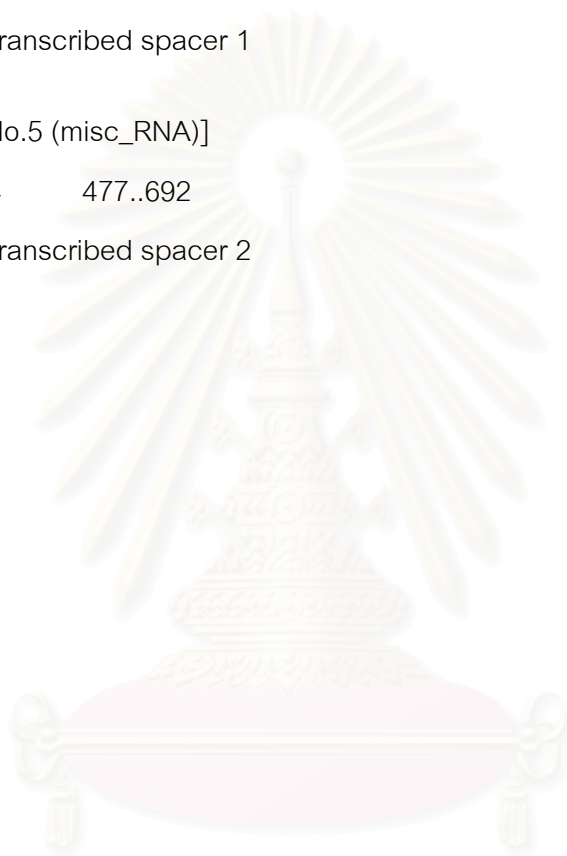
Location 66..312

note internal transcribed spacer 1

[Other Feature No.5 (misc_RNA)]

Location 4 477..692

note internal transcribed spacer 2



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 มะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 5 (PCUTI-PY/P5)

EntryID: 20080205130815.95350

[Contact Person]

E-mail: ssukrong@hotmail.com

Name: Suchada Sukrong

Institution: Chulalongkorn University

Department: Pharmacognosy

Country: Thailand

City: Bangkok

Street: Phyathai

Zip code: 10330

Phone: 6622188364

Fax: 6622188357

submitter: Suchada Sukrong

[Hold-date]

Immediate release: No

Hold-date: 2009/01/01

Kind of data: General data

[REFERENCE No.1]

Journal: Thesis (2007) Chulalongkorn University

Status: In Preparation

Year: 2008

Title: DNA fingerprint and chemical assessment of selected tamarind cultivars with high laxative activity

author(s): Suchada Sukrong, Patipanee Khanthapok, Sunanta Pongsamart

[Sequence]

length: 773 bp

Sequence:

```

ggaaagtccc ccttacctta tcatttagag gaaggagaag tcgtaacaag gtttccgtag
gtgaacctgc ggaaggatca ttgtcgatac cttacacaaa cagcacgacc ggtgaacttg
ttcttttgtc aaactagacg gaggcacacg gcgttcgctc ccatgggctt cccgtgctgg
gatacaacgc ggggctagcc agtcccgttg tttctcccgg cataaaaaacg aacccccggc
gttgaacgcg ccaaggaaca caactacatg acgttctctt gtcgtcccgg agacggtgca
tcggcaatga gcaacgcaaa atttgtatcc ataacgactc tcggcaacgg atatctcggc
tctcgcacg atgaagaacg tagcgaaatg cgatacttgg tgtgaattgc agaatcccg
gaaccatcga gtctttgaac gcaagttgcg cccgaggtca ttaggccaaag ggcacgtctg
gctgggtgtc acacaacgtt gccccaaccc caacgcctgt cacacggcga tgggcacggg
gcggaacgatg gcttcccgtg agcatggcct cgcggatggc cgaaataaga gttcgcggtg
tggcgagcac cacggcgcac ggtagttgag taacactcga gccagtcgt gcgtgctcca
tccctccgtg acgaactccg ggatcctatc gcgtccagtg acgcttctaa cgcgacctca
gctcaggcgg gggcaccgcg tgagttaaag catatcaaaa aaagggggaa gaa

```

Organism]

organism	Tamarindus indica Linn. cultivar Priao-yak
mol_type	genomic DNA
collected_by	Patipanee Khanthapok
collection_date	21-JUL-2005
country	Thailand: Phetchabun province
cultivar	Priao-yak
identified_by	Patipanee Khanthapok
note	Tamarindus indica Linn. 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence, specimen voucher PCUTI-PY/P5
specimen_voucher	PCUTI-PY/P5
Genetic code	11

[Other Feature No.1 (rRNA)]

Location	<1..83
product	18S rRNA

[Other Feature No.2 (rRNA)]

Location	331..494
product	5.8S rRNA

[Other Feature No.3 (rRNA)]

Location 711..>773

product 26S rRNA

[Other Feature No.4 (misc_RNA)]

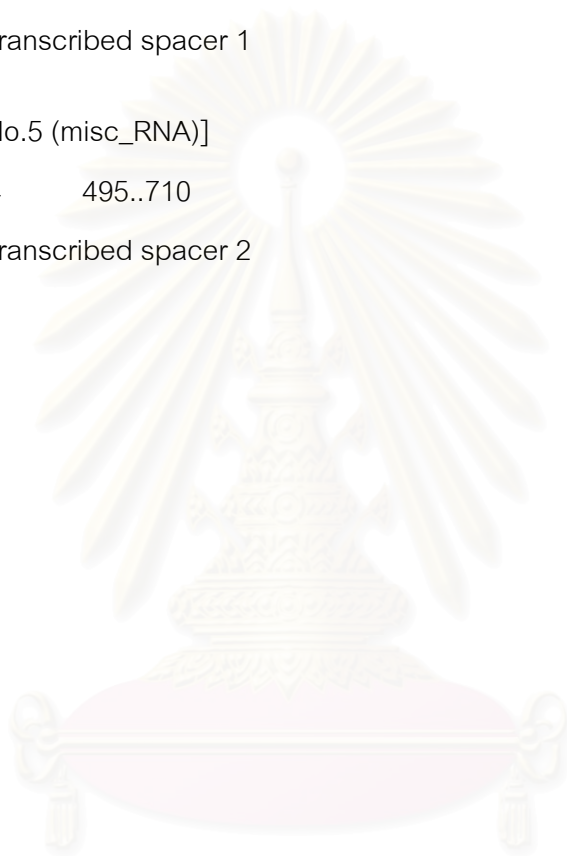
Location 84..330

note internal transcribed spacer 1

[Other Feature No.5 (misc_RNA)]

Location 4 495..710

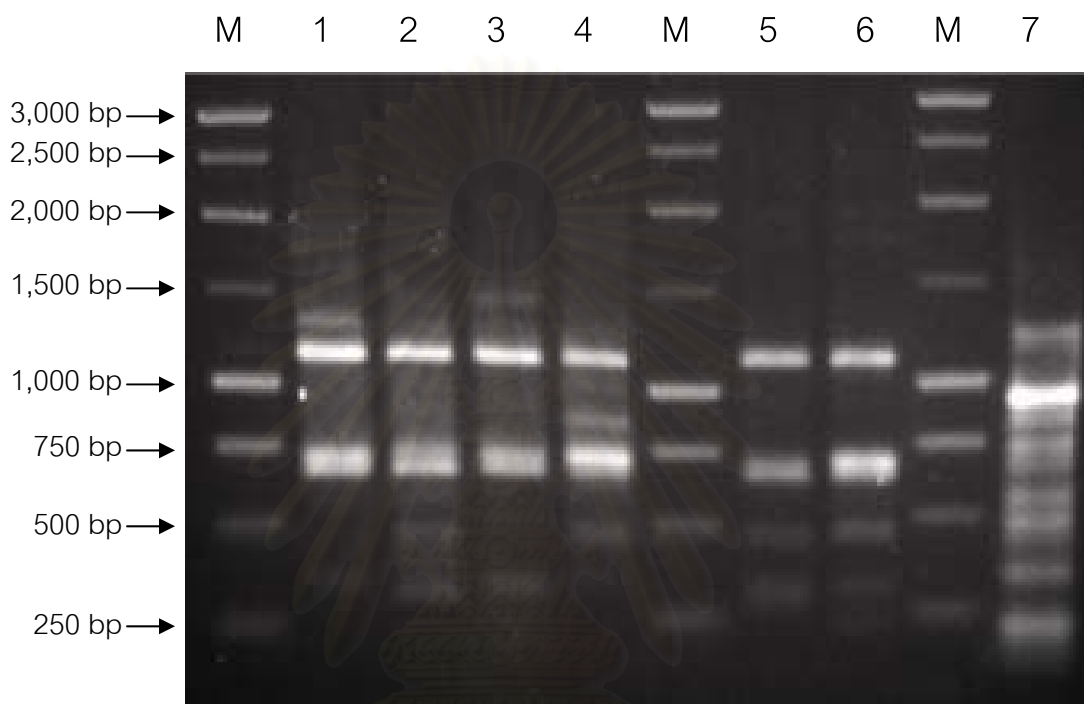
note internal transcribed spacer 2



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ซ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD



ภาพที่ 47 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ SD-03 เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 %

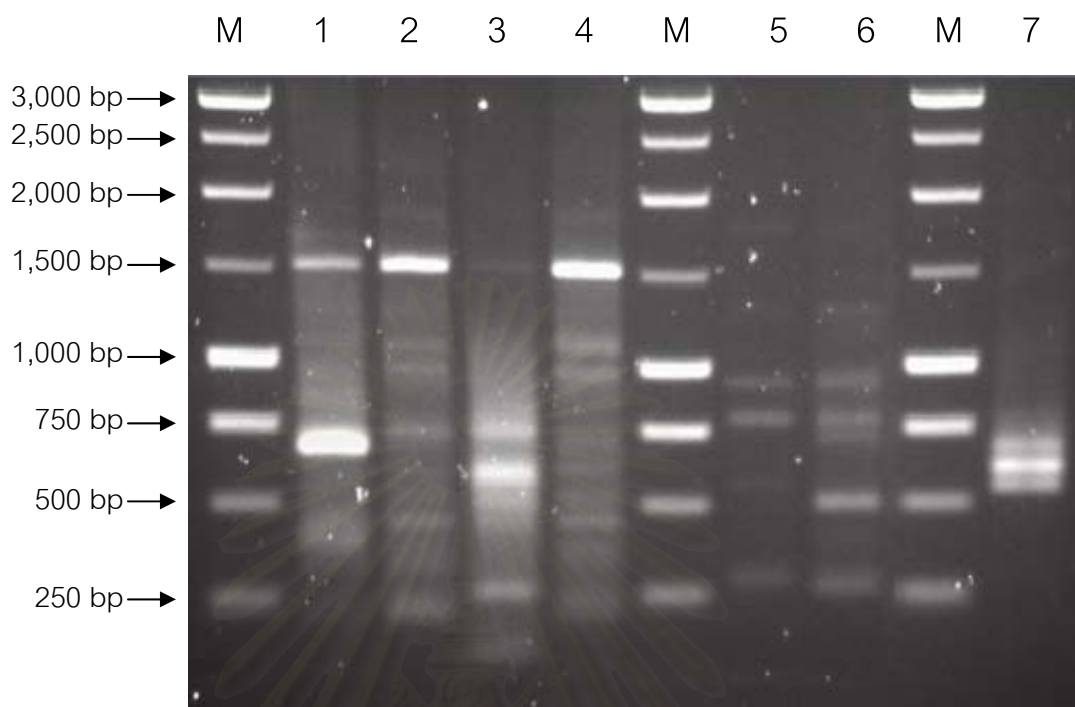
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1 และ 2: มะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 และ 4 (TI-SP/P3 และ TI-SP/P4)

Lane 3 และ 4: มะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี' ต้นที่ 1 และ 4 (TI-K/P1 และ TI-K/P4)

Lane 5 และ 6: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 และ 3 (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

Lane 7: *Phyllanthus urinaria* (out group)



ภาพที่ 48 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ SO-10 เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 %

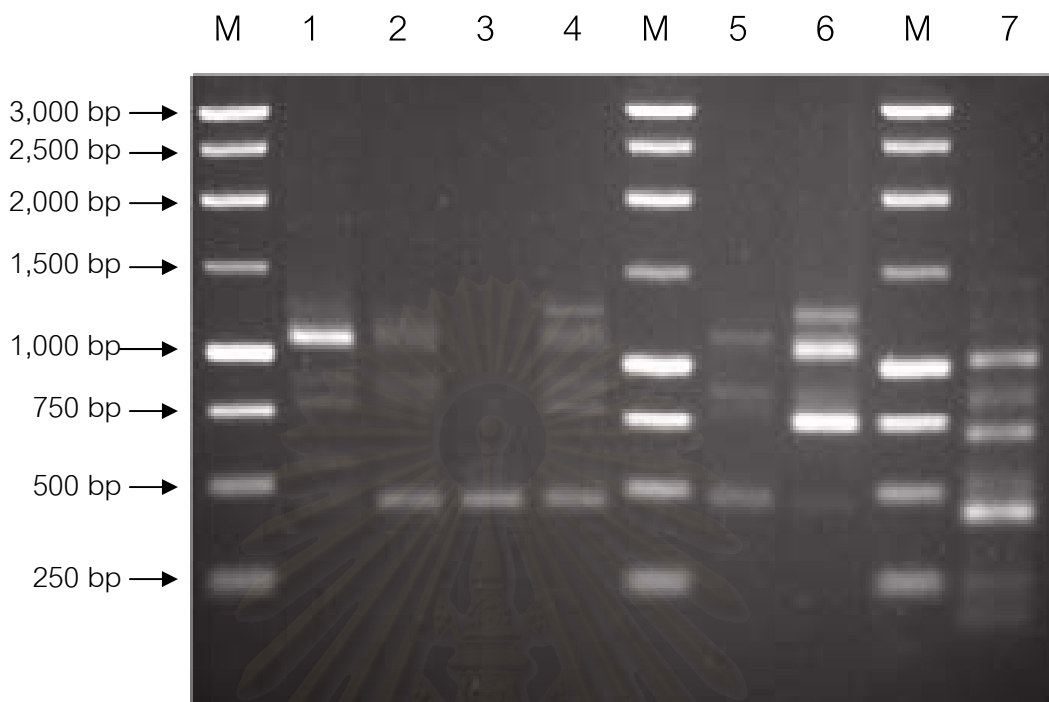
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1 และ 2: มะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 และ 4 (TI-SP/P3 และ TI-SP/P4)

Lane 3 และ 4: มะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี' ต้นที่ 1 และ 4 (TI-K/P1 และ TI-K/P4)

Lane 5 และ 6: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 และ 3 (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

Lane 7: *Phyllanthus urinaria* (out group)



ภาพที่ 49 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ SO-16 เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 %

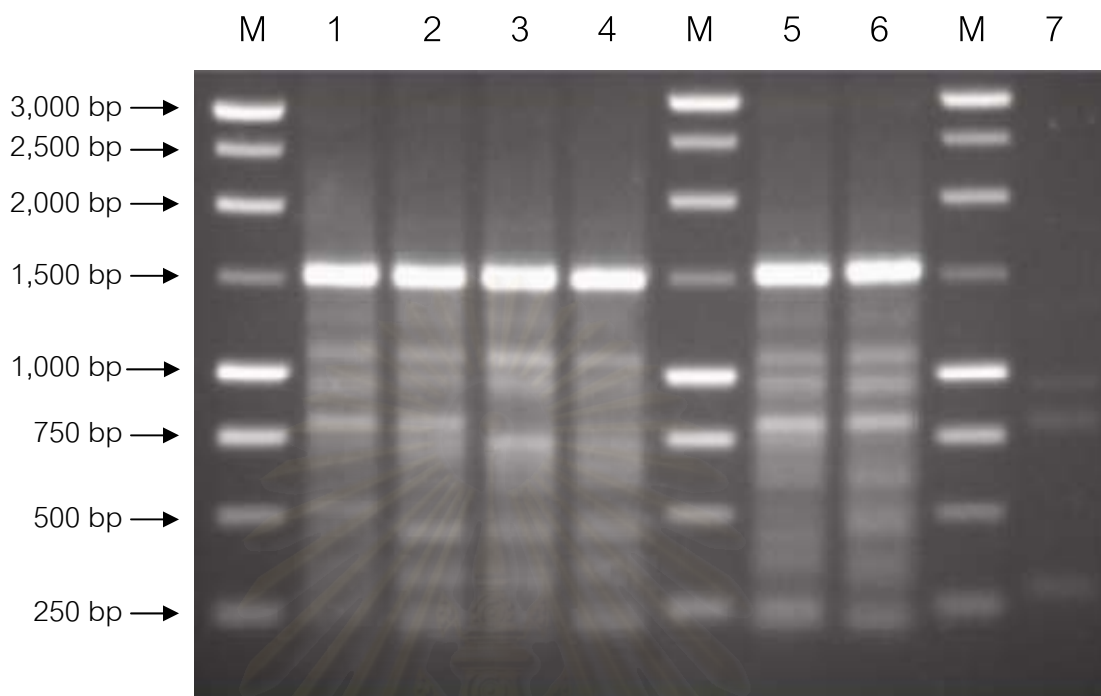
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1 และ 2: มะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 และ 4 (TI-SP/P3 และ TI-SP/P4)

Lane 3 และ 4: มะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี' ต้นที่ 1 และ 4 (TI-K/P1 และ TI-K/P4)

Lane 5 และ 6: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 และ 3 (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

Lane 7: *Phyllanthus urinaria* (out group)



ภาพที่ 50 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-02 เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 %

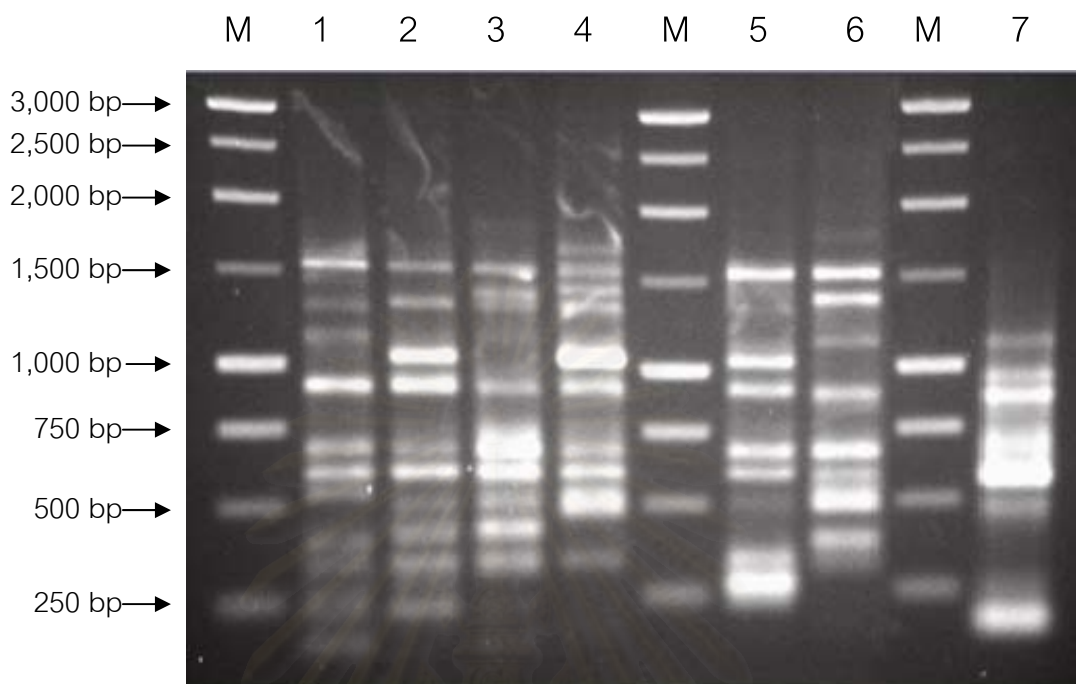
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1 และ 2: มะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 และ 4 (TI-SP/P3 และ TI-SP/P4)

Lane 3 และ 4: มะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี' ต้นที่ 1 และ 4 (TI-K/P1 และ TI-K/P4)

Lane 5 และ 6: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 และ 3 (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

Lane 7: *Phyllanthus urinaria* (out group)



ภาพที่ 51 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-03 เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 %

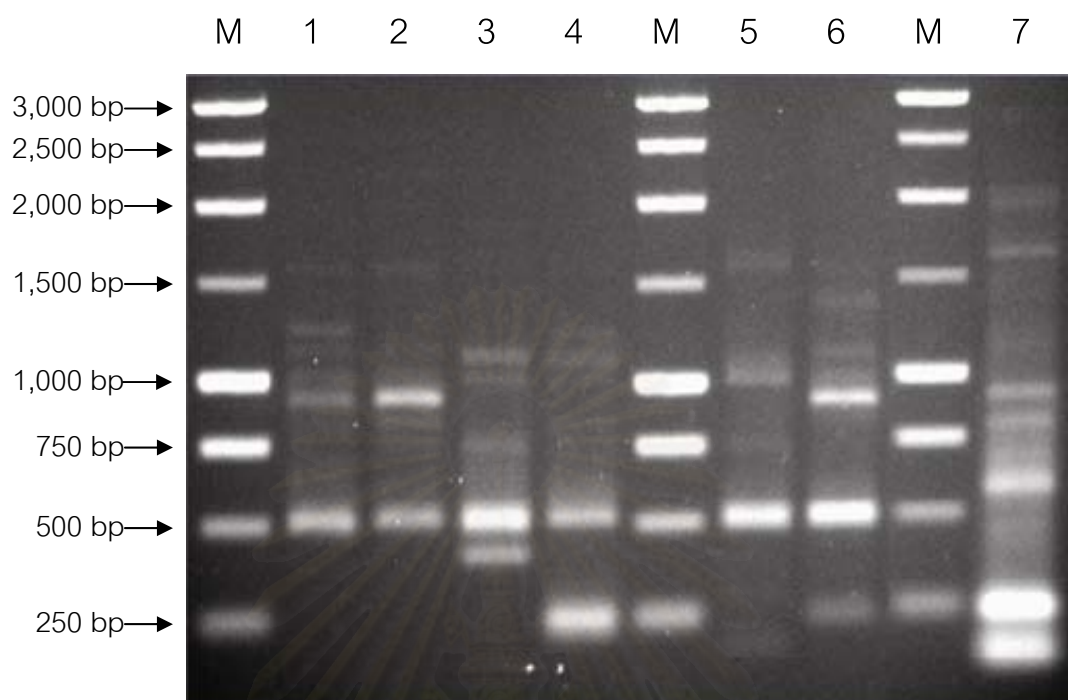
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1 และ 2: มะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 และ 4 (TI-SP/P3 และ TI-SP/P4)

Lane 3 และ 4: มะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี' ต้นที่ 1 และ 4 (TI-K/P1 และ TI-K/P4)

Lane 5 และ 6: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 และ 3 (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

Lane 7: *Phyllanthus urinaria* (out group)



ภาพที่ 52 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-04 เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 %

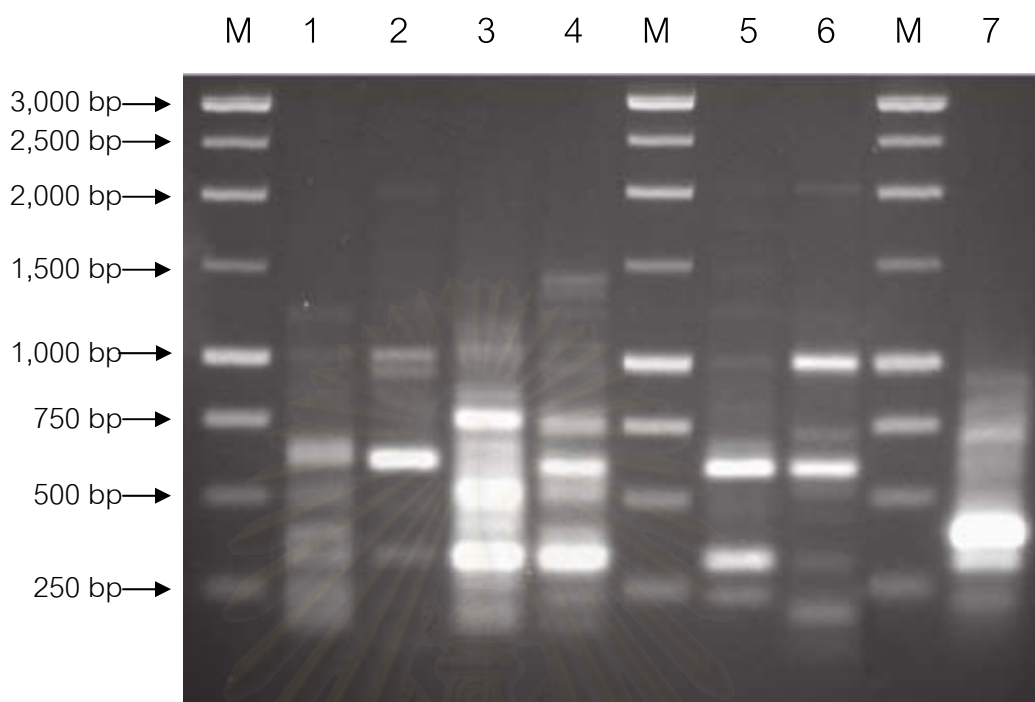
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1 และ 2: มะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 และ 4 (TI-SP/P3 และ TI-SP/P4)

Lane 3 และ 4: มะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี' ต้นที่ 1 และ 4 (TI-K/P1 และ TI-K/P4)

Lane 5 และ 6: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 และ 3 (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

Lane 7: *Phyllanthus urinaria* (out group)



ภาพที่ 53 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-09 เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 %

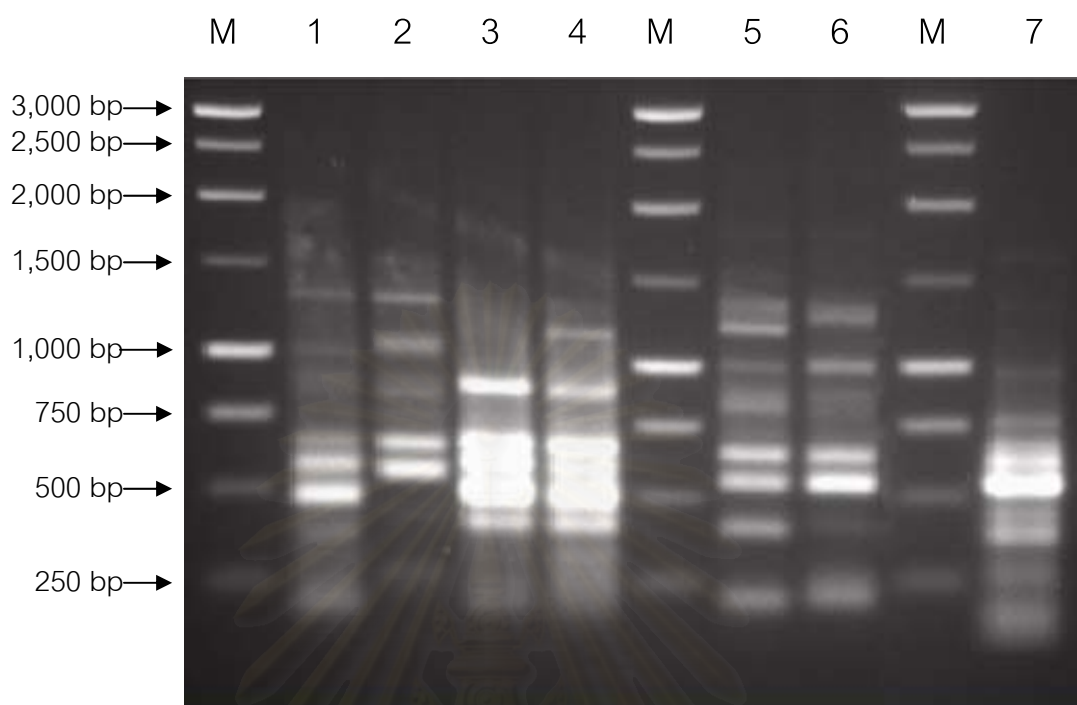
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1 และ 2: มะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 และ 4 (TI-SP/P3 และ TI-SP/P4)

Lane 3 และ 4: มะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี' ต้นที่ 1 และ 4 (TI-K/P1 และ TI-K/P4)

Lane 5 และ 6: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 และ 3 (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

Lane 7: *Phyllanthus urinaria* (out group)



ภาพที่ 54 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-13 เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 %

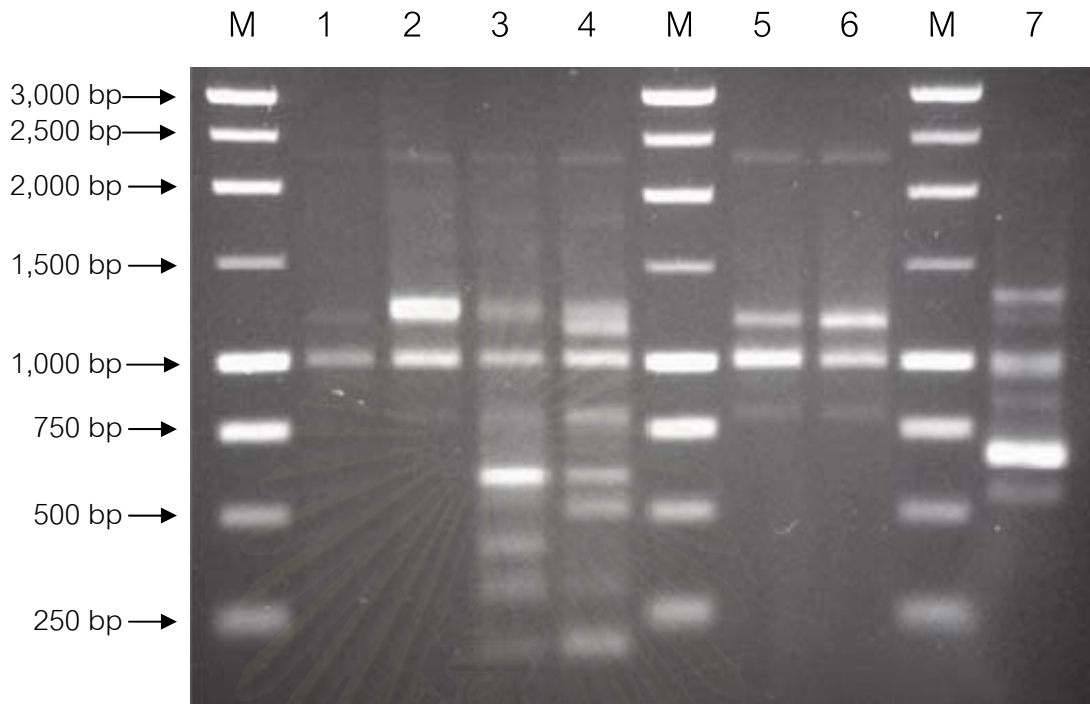
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1 และ 2: มะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 และ 4 (TI-SP/P3 และ TI-SP/P4)

Lane 3 และ 4: มะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี' ต้นที่ 1 และ 4 (TI-K/P1 และ TI-K/P4)

Lane 5 และ 6: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 และ 3 (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

Lane 7: *Phyllanthus urinaria* (out group)



ภาพที่ 55 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-16 เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 %

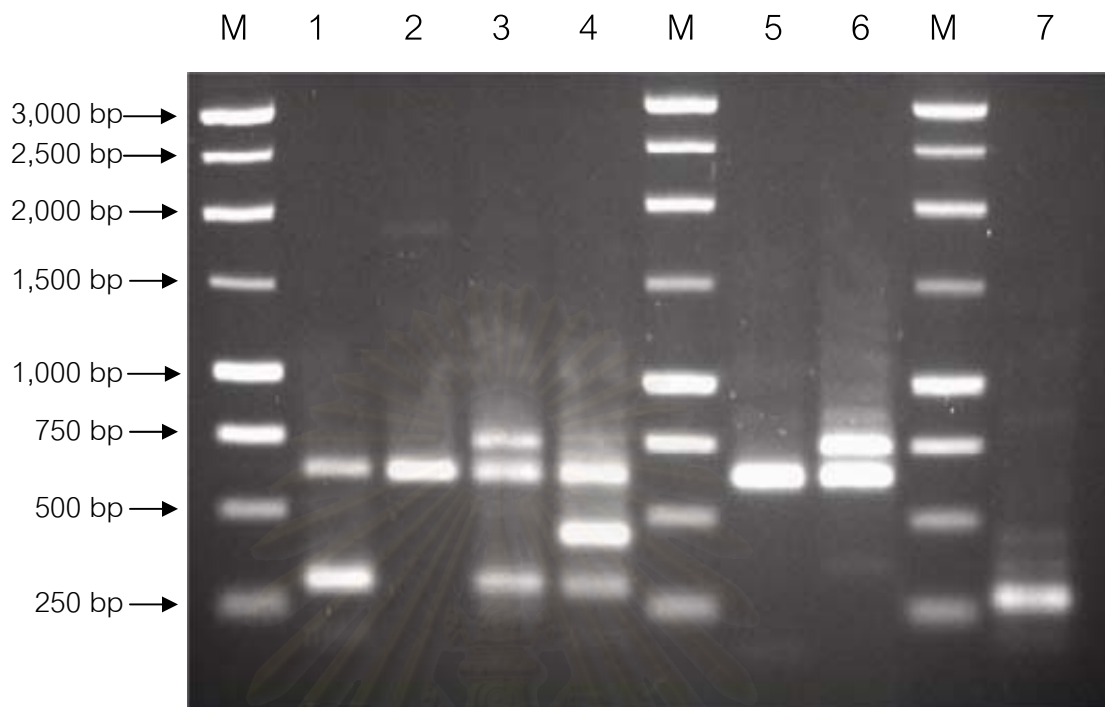
M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1 และ 2: มะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 และ 4 (TI-SP/P3 และ TI-SP/P4)

Lane 3 และ 4: มะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี' ต้นที่ 1 และ 4 (TI-K/P1 และ TI-K/P4)

Lane 5 และ 6: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 และ 3 (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

Lane 7: *Phyllanthus urinaria* (out group)



ภาพที่ 56 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' 'ขันตี' และ 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-20 เมื่อแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.0 %

M: 1 kb DNA Ladder

Lane 1 และ 2: มะขามพันธุ์ปลูก 'ศรีชมภู' ต้นที่ 3 และ 4 (TI-SP/P3 และ TI-SP/P4)

Lane 3 และ 4: มะขามพันธุ์ปลูก 'ขันตี' ต้นที่ 1 และ 4 (TI-K/P1 และ TI-K/P4)

Lane 5 และ 6: 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' ต้นที่ 2 และ 3 (TI-PY/P2 และ TI-PY/P3)

Lane 7: *Phyllanthus urinaria* (out group)

ภาคผนวก ฅ

ข้อมูลแถบดีเอ็นเอ RAPD (RAPD profiles) ในรูป binary presence-absence data matrix ของมะขาม *T. indica* ชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ และมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ จากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 33 ข้อมูลแถบดีเอ็นเอ RAPD (RAPD profiles) ในรูป binary presence-absence data matrix ของมะขาม *T. indica* ชนิดหวาน ‘ศรีชมภู’ และ ‘ขันตี’ และมะขามชนิดเปรี้ยว ‘มะขามเปรี้ยวยักษ์’ จากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

Tamarind cultivars	RAPD profiles
‘Srichomphu’ 3	111110100000100000001000100000001000010100000100000110100000101010001000101000010101100000001000000000000
‘Srichomphu’ 4	1111101000000000100000100000100001000010000010100000110001001001000100000100000010101100100001000000000000
‘Khanti’ 1	111100110100000100000100000100001100010000000100000110001001001000100000000000001100000100001001000000000
‘Khanti’ 4	111100110100000100001000000100101100010000010100000110001000001000000000000100001100000000001000000010000
‘Priaoyak’ 2	11111000001000001001000001000000100001000001010000011000100000110000000010000000010000010000100000000000
‘Priaoyak’ 3	111110000010001000010000010001001001000010000100000110001000010000000000110000100101000000001000000100000

ตารางที่ 33 (ต่อ)

ข้อมูลแถบดีเอ็นเอ RAPD (RAPD profiles) ในรูป binary presence-absence data matrix ของมะขาม *T. inica* ชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

Tamarind cultivars	RAPD profiles
'Srichomphu' 3	000001000100000100000010000100001010100000010001000101010000101010001000010100010010000000000000010100101
'Srichomphu' 4	100000000100100000000010000100000010000000000001001001010001101000000010000100010010010000000000010000000
'Khanti' 1	00000000100000010100010000100010001100001000000000000100000101010100100000110010010010110011100110000100
'Khanti' 4	000101010001000001000000101000100010001000001001010000100000101010100100000110010110010110101100010010100
'Priao-yak' 2	101001000100001010001000100000000010001000000101100100001000101000100000010100010010010000000000010000000
'Priao-yak' 3	100001000100000000100000110001000010000000100101000100100100101000100000010100010010010000000001110001000

ตารางที่ 33 (ต่อ)

ข้อมูลแถบดีเอ็นเอ RAPD (RAPD profiles) ในรูป binary presence-absence data matrix ของมะขาม *T. indica* ชนิดหวาน 'ศรีชมภู' และ 'ขันตี' และมะขามชนิดเปรี้ยว 'มะขามเปรี้ยวยักษ์' จากจังหวัดเพชรบูรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

Tamarind cultivars	RAPD profiles
'Srichomphu' 3	110101000001101000000100000001000011010000000100000000000100000000001000000100100010100000100100000000
'Srichomphu' 4	110001000001101001001000100000100001100000100000000010000010001000000001000000000100010000000000100000000
'Khanti' 1	111001000001100001000000100000100000000000100000000100010100000001000000100000000000000000000000000100000000
'Khanti' 4	1100011010011000010000000000001001001000000001000010000101010000000010000000100100010100000000100000000
'Priao-yak' 2	11000100000110000100000001000101000001001000000000000100000000010000000000000000100010100000000100000000
'Priao-yak' 3	1100010000011000010000000101010100000100100100000000001000000000100000000000010100010001000000100000000

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปฎิภาณี ชันธโกศ เกิดวันที่ 21 มกราคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ เมื่อปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2547

การเสนอผลงานวิจัย

โปสเตอร์

Chaipornpokin, W., Khanthapok, P., and Pongsamart, S. Determination of Organic Acids in Fresh Pulps of Thai Tamarind Cultivars by HPLC/UV. The 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics, and Pharmaceutical Technology. Barcelona, Spain, 2008.

Khanthapok, P., Bhusawang, P., and Pongsamart, S. Analysis of Organic Acids in Certain *Tamarindus indica* by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). The International Workshop on Medicinal and Aromatic Plants. Chiang Mai, Thailand, 2007.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย