

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยจัดอยู่ในพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และมีพืชสมุนไพรที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เป็นจำนวนมาก ในปัจจุบันประชากรโลกได้ให้ความสำคัญกับการดูแลสุขภาพด้วยวิถีธรรมชาติ จึงทำให้พืชสมุนไพรได้รับความสนใจและเป็นที่ยอมรับอย่างมาก ทั้งในแง่ของการรักษาโดยแพทย์ทางเลือก หรือการใช้เพื่อป้องกันโรคและดูแลสุขภาพ ในประเทศไทยผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรมีการขยายตัวทางตลาดอย่างมาก โดยจะพบการเพิ่มจำนวนผลิตภัณฑ์มากขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะพืชสมุนไพรในวงศ์จิง (Zingiberaceae) ซึ่งพบว่ามีหลากหลายสูงโดยพบในประเทศไทยประมาณ 25 สกุล 270 ชนิด (Larsen, 2002) พืชวงศ์นี้มีลักษณะพิเศษคือ ทุกส่วนของต้นมีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร เป็นแหล่งสำคัญของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์อย่างมาก โดยที่พืชหลายตัวในวงศ์จิงจัดว่าเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่สามารถสร้างรายได้ให้แก่ประเทศได้ เช่น จิง ข่า ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย กระชาย กระชายดำ ไพล กระวาน กระเทียม เป็นต้น เนื่องจากพืชวงศ์จิงมีลักษณะภายนอกที่คล้ายกันมาก รวมถึงในการวางขายจะอยู่ในรูปแบบที่ผ่านการแปรรูป จึงทำให้การพิสูจน์และการจัดจำแนกตัวอย่างพืชหลังจากผ่านการแปรรูปมาแล้วเป็นไปได้ยากมาก ซึ่งการพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดจำแนกตัวอย่างพืชสมุนไพรเป็นสิ่งจำเป็นอย่างมากต่อทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค แม้ว่าการผลิตพืชสมุนไพรต่างๆ เพื่อการจำหน่าย จะต้องผ่านกระบวนการตรวจวิเคราะห์ก่อนการขึ้นทะเบียน แต่ต้องยอมรับว่าการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในท้องตลาดนั้นยังมีการตรวจสอบได้ไม่ทั่วถึงและยังไม่ครอบคลุม วิธีการตรวจสอบที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ การตรวจสอบโดยเทคนิคทางสัณฐานวิทยา การตรวจสอบลักษณะด้วยแว่นขยาย การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบทางเคมี ซึ่งการทดสอบทางเคมีอาจได้รับการยอมรับว่ามีความน่าเชื่อถือมาก โดยเฉพาะกรณีการตรวจหาสารสำคัญ หรือสารปนเปื้อน อย่างไรก็ตามเทคนิคต่างๆ ล้วนมีข้อจำกัด โดยเฉพาะในพืชสมุนไพรวงศ์จิงถึงแม้จะต่างชนิดแต่อยู่ในวงศ์เดียวกันซึ่งจะให้สารสำคัญใกล้เคียงกัน การใช้วิธีทางเคมีเพื่อพิสูจน์ทราบถึงชนิดของพืชสมุนไพร หรือแหล่งที่มาของสารสกัดหายากก็ไม่สามารถทำได้โดยง่ายเช่นกัน

จากความก้าวหน้าทางอนุชีววิทยา ทำให้เกิดเทคนิคใหม่ๆ ขึ้นมากมายที่เป็นประโยชน์ต่อการพิสูจน์ทราบหรือพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการนำเทคนิคทางอนุชีววิทยามาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืชสมุนไพรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เทคนิคทางอนุชีววิทยาที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้อาทิเช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis, Diagnostic Polymerase Chain Reaction (PCR), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านี้มีข้อดีและข้อจำกัดต่างกันไป นอกจากเทคนิคข้างต้นแล้ว การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcode) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งทางอนุชีววิทยาที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากเพราะมีประสิทธิภาพ และความแม่นยำ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ในระยะเวลาอันสั้น รวมทั้งเป็นประโยชน์สำหรับการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงการอนุรักษ์พันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต อีกด้วย (อรุณรัตน์, 2552)

การระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcode) นักวิทยาศาสตร์ได้แนวคิดมาจากการทำบาร์โค้ดในสินค้าต่างๆ แล้วนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดและจำแนกสิ่งมีชีวิตเพื่อลดความผิดพลาด มีความรวดเร็วในการจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยอาศัยหลักการว่า สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่แสดงลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งๆ แตกต่างไปจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นและสามารถจำแนกได้ทุกระยะของพัฒนาการชีวิต (วิชัย, 2552) นักวิทยาศาสตร์จึงได้เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์สั้นๆ ของดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดสูงแต่มีความต่างระหว่างชนิดเดียวกันต่ำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดในการจำแนกสิ่งมีชีวิต (Casiraghi *et al.*, 2010) แต่การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดก็ยังมีความเสี่ยงคือมีขั้นตอนเยอะ มีความยุ่งยาก ใช้งบประมาณสูง และสำหรับพืชวงศ์จิงมีความซับซ้อนทางด้านการเป็นอย่างมาก ดังนั้นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดเพียงตำแหน่งเดียวจึงไม่สามารถจำแนกพืชวงศ์จิงออกจากกันได้ อย่างมีประสิทธิภาพ (Selvaraj *et al.*, 2008) ในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้ประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcode) ร่วมกับเทคนิค High Resolution Melting analysis (HRM) เรียกว่า Bar-HRM ในการจำแนกพืชวงศ์จิง ซึ่งจะทำให้การจัดจำแนกพืชในวงศ์จิงมีความรวดเร็ว แม่นยำ และประหยัดงบประมาณมากยิ่งขึ้น โดยเทคนิค Bar-HRM เริ่มจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดมาใช้ในการวิเคราะห์ และออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาแล้ว จากนั้นจะใช้เทคนิค HRM ซึ่งเป็นการวิเคราะห์อุณหภูมิที่ใช้ในการคลายเกลียวของดีเอ็นเอมาวิเคราะห์แยกความแตกต่างของพืชแต่ละชนิด โดยเทคนิค HRM มีข้อดีคือสามารถวิเคราะห์แยก

ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์แค่เพียง 1-2 นิวคลีโอไทด์ จึงเป็นเทคนิคที่สามารถใช้จำแนกพืชแต่ละชนิดด้วยการใช้ดีเอ็นเอเพียงชิ้นส่วนสั้นๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Ganopoulos *et al.*, 2013; Madesis *et al.*, 2012; Madesis *et al.*, 2013)

งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิค Bar-HRM ที่จะสามารถนำมาใช้ในการระบุและจำแนกพืชสมุนไพรไทยในวงศ์จิงจวน 8 ชนิดที่เป็นสมุนไพรที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ และเป็นที่ยอมรับของคนไทย ได้แก่ จิง (*Zingiber officinale*) ขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*) กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) กระชาย (*Boesenbergia rotunda*) ไพล (*Zingiber montanum*) ข่า (*Alpinia galanga*) และกระวาน (*Amomum uliginosum*) เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการระบุชนิดของพืชวงศ์จิงได้อย่างถูกต้อง รวดเร็ว โดยการค้นหา เก็บรวบรวมข้อมูล และวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนในคลอโรพลาสต์ บริเวณตำแหน่ง *rbcL*, *trnL*, *matK*, *rpoC*, ITS และ *trnH-psbA* ซึ่งได้รับการยอมรับจากนักวิจัยหลายคณะว่าเป็นบริเวณดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดในพืช (CBOL Plant working group, 2009; Chase *et al.*, 2009; Hollingsworth *et al.*, 2009; Lahaye *et al.*, 2008) เพื่อนำมาพัฒนาไพรเมอร์สำหรับการใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกพืชสมุนไพรในวงศ์จิง ด้วยเทคนิค Bar-HRM ซึ่งวิธีนี้สามารถแยกความแตกต่างของพืชในระดับชนิดได้ ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นสากล มีประโยชน์ ในการระบุชนิดของพืชได้อย่างถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็วในกรณีที่เกิดความสับสนได้หรือกรณีที่ไม่มีข้อมูลทางฐานวิทยาศาสตร์ในการระบุชนิด นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของการใช้ตัวอย่างพืชแบบสดและแบบแห้ง และทดสอบจำแนกตัวอย่างพืชที่ถูกแปรรูปอีกด้วย ซึ่งจะนำไปสู่การสร้างมาตรฐานการตรวจสอบวัตถุดิบและมาตรฐานการผลิตสมุนไพรแปรรูป เพื่อความมั่นใจให้ผู้บริโภคและสามารถรับประกันคุณภาพของสมุนไพรไทยในการส่งออก และพัฒนาให้เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่สร้างรายได้ให้แก่ประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อพัฒนาโปรแกรมสำหรับการจำแนกพืชสมุนไพรในวงศ์จิงด้วยเทคนิค Bar-HRM
2. เพื่อจำแนกพืชสมุนไพรในวงศ์จิงจำนวน 8 ชนิด ด้วยเทคนิค Bar-HRM
3. เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างในการใช้เทคนิค Bar-HRM กับพืชตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง
4. เพื่อตรวจสอบและจำแนกผลิตภัณฑ์สมุนไพรในวงศ์จิงจากท้องตลาดด้วยเทคนิค Bar-HRM



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved