การขยายพันธุ์ในหลอดทดลองและรูปแบบโครมาโทกราฟฟีของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ และแคลลัส

นางสาว รวิกานต์ ระลึกฤาเดช 5136644733

นางสาว อาอีชะห์ เจะเอาะ 5136710433

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

MICROPROPAGATION AND CHROMATOGRAPHIC PATTERNS OF *Afgekia mahidoliae* B. L. Burtt & Chermsir. IN NATURALLY-GROWN PLANT AND CALLUS

Rawikarn Ralukruedej 5136644733

Ar-i-sha J-oah 5136710433

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2012

หัวข้อโครงการปริญญานิพนธ์	การขยายพันธุ์ในหลอดทดลองและรูปแบบโครมาโทกราฟฟีของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ แคลลัส และเซลล์แขวนตะกอน (MICROPROPAGATION AND CHROMATOGRAPHIC PATTERNS OF *Afgekia mahidoliae* B. L. Burtt & Chermsir. IN NATURALLY-GROWN PLANT AND CALLUS)
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นางสาว รวิกานต์ ระลึกฤาเดช นางสาว อาอีชะห์ เจะเอาะ
สาขาวิชา	เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ภญ.ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สรกนก วิมลมั่งคั่ง

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

.....คณบดี

(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร)

.....ประธานแขนงค้นพบยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร. บุญศรี องค์พิพัฒนกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ภญ.ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สรกนก วิมลมั่งคั่ง)

โครงการลำดับที่ 3.9
วันที่ 7 มกราคม 2556

บทคัดย่อปริญญานิพนธ์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การขยายพันธุ์ในหลอดทดลองและรูปแบบโครมาโทกราฟฟีของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ และแคลลัส

ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : **MICROPROPAGATION AND CHROMATOGRAPHIC PATTERNS OF *Afgekia mahidoliae* B. L. Burtt & Chermsir. IN NATURALLY-GROWN PLANT AND CALLUS**

หัวหน้าโครงการ : นางสาว อาอีชะห์ เจะเอาะ 5136710433

ผู้ร่วมโครงการ : นางสาว รวิกานต์ ระลึกฤาเดช 5136644733

อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ภญ.ร.ต.อ.หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง
อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สรกนก วิมลมั่งคั่ง

ภาควิชา : เภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยเพิ่มจำนวนพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และสามารถผลิตสารสำคัญเพื่อทดแทนการสกัดโดยตรงจากธรรมชาติ การศึกษานี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสของกันภัยมหิดล (*Afgekia mahidoliae* B. L. Burtt & Chermsir) ซึ่งเป็นต้นไม้หายาก โดยการชักนำจากชิ้นส่วนของใบและก้านในอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) และ 6-benzylaminopurine (BA) ที่ความเข้มข้นต่างๆในช่วง 0.1 – 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสม พบว่า สูตรอาหารที่มีความสามารถชักนำใบและก้านของต้นกันภัยมหิดลให้เกิดแคลลัสได้ดี คือ สูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยแคลลัสที่ได้มีลักษณะเป็นก้อน นิ่ม และมีสีเหลืองอมเขียว นอกจากนี้ในการศึกษารูปแบบโครมาโทกราฟฟีของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัสในรูปสารสกัดหยาบในเมทานอลด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography ในระบบตัวทำละลาย 3 ระบบ ได้แก่ hexane : ethyl acetate (7:3), ethyl acetate : dichloromethane (2:3) และ dichloromethane : methanol (10:1) และเมื่อตรวจสอบภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร, 365 นาโนเมตร และพ่นด้วยกรดกำมะถันความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่า รูปแบบโครมาโทกราฟฟีของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมและแคลลัสมีความแตกต่างกัน โดยองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ของสารสกัดหยาบแคลลัสค่อนข้างมีขั้วสูงกว่าสารสกัดหยาบของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....
อาจารย์ที่ปรึกษา

Project no. 3.9

Date 7 January 2013

THESIS ABSTRACT

Thesis Title : **MICROPROPAGATION AND CHROMATOGRAPHIC PATTERNS OF *Afgekia mahidoliae* B. L.Burtt & Chermsir. IN NATURALLY-GROWN PLANT AND CALLUS**

Students' name : Miss Ar-i-sha J-oah 5136710433

: Miss Rawikarn Ralukruedej 5136644733

Thesis Advisors : Associate Professor Suchada Sukrong, Ph.D.

Sornkanok Vimolmangkang, Ph.D.

Department : Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Tissue culture technique is one of advantageous methods for plant breeding. In addition, it can be used to effectively yield active compound substituting for plant extract from natural resources. In the study, callus cultures of *Afgekia mahidoliae* B. L. Burtt & Chermsir (known as Kan Phai Mahidol), a rare tropical climber, were established to determine an appropriate composition of callus induction medium. Their chemical profiles were compared to those of naturally-grown plant. Calli were induced from leaves and nodes in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2, 4-dichlorophenoxy-acetic acid (2, 4-D) and 6-benzylaminopurine (BA). MS medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BA showed the highest callus induction percentage. The calli and naturally-grown leaves were extracted in ethanol and their chemical profiles were analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC) using three mobile systems including hexane : ethyl acetate (7:3), ethyl acetate : dichloromethane (2:3), and dichloromethane : methanol (10:1). Chromatographic patterns on TLC showed that chemical profiles of both extracts were different when detected under ultraviolet (UV) light at 254 and 365 nm. After sprayed with 10% sulfuric acid and detected under UV_{365}, callus extract showed moderate to high polarity of chemical compounds which were not observed in the naturally-grown leaf extract.

Academic Section Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

.....

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญานิพนธ์ครั้งนี้ จะสำเร็จมิได้หากขาดผู้ให้คำแนะนำ คำปรึกษาและความช่วยเหลือในหลายๆด้าน ผู้ศึกษาขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ภญ.ร.ต.อ. หญิง ดร.สุชาดา สุขหร่อง และอาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สรกนก วิมลมั่งคั่ง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการปริญญานิพนธ์ ที่ให้ความกรุณาในด้านคำแนะนำ ความช่วย ความสะดวกระหว่างปฏิบัติการต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่อง ให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งตลอดมาจนสำเร็จโครงการนี้

ขอขอบคุณ เภสัชกรเฉลิมรัช สุขทัพภ์ ตลอดจนพี่ๆนิสิตปริญญาโทและเจ้าหน้าที่ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและห้องปฏิบัติการในการศึกษาครั้งนี้

คำนำ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต ประจำปีการศึกษา 2555 ซึ่งได้ทำการศึกษาการขยายพันธุ์ในหลอดทดลองและรูปแบบโครมาโทกราฟฟีของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ แคลลัสและเซลล์แขวนตะกอน การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นให้นิสิตเกิดกระบวนการเรียนรู้ วางแผนการทำงาน คิดไตร่ตรองการดำเนินงาน สร้างความรับผิดชอบต่องานที่ได้รับมอบหมาย เรียนรู้การแก้ปัญหาระยะสั้นและระยะยาว ตลอดจนการทำงานร่วมกับผู้อื่น โดยมีอาจารย์คอยให้คำปรึกษาและคำแนะนำเสมอมา ซึ่งคณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับผู้ที่สนใจพัฒนาองค์ความรู้ในงานวิจัยต่อไปในอนาคต

หากโครงการปริญญานิพนธ์ฉบับนี้มีความผิดพลาดประการใด ต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

บทคัดย่อภาษาไทย……ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……จ
กิตติกรรมประกาศ……ฉ
คำนำ……..ช
สารบัญ……..ซ
สารบัญตาราง……ญ
สารบัญรูปภาพ……..ฎ
บทที่
1. บทนำ…… 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ……1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย……2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……...2
2. ปริทัศน์วรรณกรรม……3
2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ต้นกันภัยมหิดล……3
2.2 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ……..5
2.3 การแยกสาร โดยใช้ Thin Layer Chromatography (TLC)……..9
2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay……....12
3. วิธีดำเนินการวิจัย ……14
3.1 พืช อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ ……14
3.2 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ……...15
3.3 การเตรียมชิ้นส่วนของพืช โดยกระบวนการ Surface sterilization และการชักนำชิ้นส่วนของพืชให้เกิดแคลลัส……...16
3.4 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบกันภัยมหิดล……...17
3.5 การศึกษารูปแบบโครมาโทกราฟฟีเบื้องต้น โดยใช้แผ่น TLC ……17

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

4. ผลการวิจัย……19
4.1 การชักนำชิ้นส่วนของกันภัยมหิดลให้เกิดแคลลัส……...19
4.2 รูปแบบโครมาโทกราฟฟีเบื้องต้นของกันภัยมหิดล…….24
5. อภิปรายและสรุปผลการวิจัย……...29
รายการอ้างอิง……...31
ภาคผนวก…….....33

สารบัญตาราง

เรื่อง **หน้า**

ตารางที่ 1 ผลของอาหารสูตร MS และสารควบคุมการเจริญเติบโต
ต่อการชักนำการเกิดแคลลัส……20
ตารางที่ 2 แสดงเนื้อเยื่อแคลลัสในสัปดาห์ที่ 2 ……....21
ตารางที่ 3 แสดงเนื้อเยื่อแคลลัสในสัปดาห์ที่ 4 ……....22
ตารางที่ 4 แสดงขนรากที่เจริญขึ้นจากแคลลัสกันภัยมหิดลในสัปดาห์ที่ 8 ……..23
ตารางที่ 5 แสดงรูปแบบโครมาโทกราฟฟีกันภัยมหิดลโดยใช้ระบบตัวทำละลายผสม
hexane : ethyl acetate (7:3) ……25
ตารางที่ 6 แสดงรูปแบบโครมาโทกราฟฟีกันภัยมหิดลโดยใช้ระบบตัวทำละลายผสม
ethyl acetate : dichloromethane (2:3) ……26
ตารางที่ 7 แสดงรูปแบบโครมาโทกราฟฟีกันภัยมหิดลโดยใช้ระบบตัวทำละลายผสม
dichloromethane : methanol (10:1) ……...27
ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น ……..28

สารบัญรูปภาพ

เรื่อง **หน้า**

รูปที่ 1 ต้นกันภัยมหิดลและดอก ……4

รูปที่ 2 แสดงลักษณะการจุดสารตัวอย่างบน TLC plate……10

รูปที่ 3 แสดงบรรยากาศภายใน chamber เมื่อเกิดการอิ่มตัวโดยใช้
กระดาษกรองเป็นตัวช่วย……...10

รูปที่ 4 แสดงเส้นที่ใช้ในการคำนวน R_f ……...11

รูปที่ 5 การหาความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ……12

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

ในปัจจุบันมีพืชหลายชนิดใกล้สูญพันธุ์ กันภัยมหิดล (*Afgekia mahidoliae* Burtt et Chermsirivathana) [1],[2] เป็นหนึ่งในต้นไม้ดังกล่าวซึ่งโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ขึ้นสถานะให้ต้นกันภัยมหิดลเป็นต้นไม้ถิ่นเดียวและหายาก[3] มีลักษณะเป็นไม้เลื้อยพุ่มเนื้อแข็ง พบได้บริเวณป่าเต็งรัง ภูเขาหินปูนทางภาคตะวันตก ช่อดอกมีสีชมพูอมม่วงสวยงาม การขยายพันธุ์ตามธรรมชาติต้องอาศัยเมล็ดที่เกิดขึ้นภายในฝัก [4] แต่การเจริญเติบโตตามธรรมชาติของต้นกันภัยมหิดลมักติดฝักน้อยทำให้เป็นข้อจำกัดในการขยายพันธุ์ นอกจากนี้สารสกัดส่วนใบกันภัยมหิดลในชั้นปิโตรเลียมอีเธอร์มีสาร n-octatriacontanal ซึ่งมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) และสารสกัดส่วนใบในชั้นเมทานอลมีฤทธิ์ต้านเชื้อ Staphylo-coccus aureus อย่างอ่อนอีกด้วย[5] กันภัยมหิดลจึงเป็นพืชที่น่าศึกษาวิจัยการเพิ่มจำนวน ตลอดจนมีรายงานการศึกษาจำนวนน้อย ดังนั้นการศึกษาการขยายพันธุ์กันภัยมหิดลด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดทดลองจึงเป็นวิธีที่น่าสนใจ ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนเนื้อเยื่อพืชและขยายพันธุ์พืชโดยไม่ต้องใช้เมล็ดได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาอันสั้น ตลอดจนต้นพืชที่ได้มีลักษณะเหมือนต้นแม่อีกด้วย

วัตถุประสงค์การวิจัย

<u>วัตถุประสงค์ทั่วไป</u>

- เพื่อศึกษาเทคนิควิธีการเพิ่มจำนวนและเพื่ออนุรักษ์พืชที่ปลูกยากโดยอาศัยการขยายพันธุ์ในหลอดทดลอง (micropropagation)
- เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของกันภัยมหิดล

<u>วัตถุประสงค์เฉพาะ</u>

- เพื่อศึกษาผลของอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2, 4-dichlorophenoxy-acetic acid (2, 4-D) และ 6-benzylaminopurine (BA) ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ต่อการชักนำชิ้นส่วนของพืชเกิดเนื้อเยื่อแคลลัสของกันภัยมหิดล
- เพื่อสร้างโครมาโทแกรมของสารสกัดของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การขยายพันธุ์กันภัยมหิดลในหลอดทดลองจะเป็นแหล่ง (source) ของสารตั้งต้น/สารที่มีฤทธิ์ จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในงานวิจัยและงานวิเคราะห์หาสารสำคัญหรือเมตาโบไลต์ (metabolite) ตัวอื่นๆ ของและการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา นอกจากนี้รูปแบบโครมาโทแกรมที่ได้จากชนิดโครมาโทกราฟฟีแบบผิวบางสามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของกันภัยมหิดลได้อีกด้วย

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ต้นกันภัยมหิดล

ชื่อท้องถิ่น	กันภัย (กลาง,สระบุรี)
ชื่อสามัญ	กันภัยมหิดล (Kan Pai Mahidol)
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Afgekia mahidoliae* Burtt et Chermsirivathana
วงศ์	Fabaceae (วงศ์ย่อย Papilionaceae)
สกุล	Afgekia
การปลูกและการขยายพันธุ์	แสงแดดจัด เพาะเมล็ด
ระยะเวลาติดดอก-ผล	สิงหาคม – พฤศจิกายน [6]

ลักษณะของต้นกันภัยมหิดล

ลักษณะเป็นไม้เลื้อย ไม้เถาเนื้อแข็ง มีอายุได้หลายปี กิ่งอ่อนจะมีสีเขียว มักมีขนปกคลุมโดยรอบขนนุ่มหนาแน่น ใบประกอบแบบขนนกชั้นเดียว เรียงเรียบสลับ มีใบย่อย 9-11 ใบ รูปไข่หรือรูปไข่กลับปลายมน และมีติ่งสั้น โคนมน ก้านสั้น ดอกสีม่วงออกเป็นช่อตั้งที่ปลายกิ่ง โคนก้านดอกมีใบประดับ ร่วงง่าย ดอกรูปดอกถั่ว กลีบเลี้ยงซ้อนกัน ปลายแยกเป็น 5 แฉก กลีบดอก 5 กลีบ เกสรเพศผู้ 10 อัน โคนเชื่อมกัน 9 อัน แยกต่างหาก 1 อัน ผล เป็นฝักแบน เมื่อแก่แตก 2 ซีก เมล็ดค่อนข้างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร [1],[6]

ประวัติของต้นกันภัยมหิดล

กันภัยมหิดลพบ ครั้งแรกเมื่อวันที่ 14 กันยายน พ.ศ.2510 โดยนายเกษม จันทรประสงค์ ซึ่งขณะนั้นเป็นข้าราชการกองพืชพรรณ กรมวิชาการเกษตร (ปัจจุบันเป็นนายกสมาคมไม้ประดับแห่งประเทศไทย) ขณะที่ท่านกำลังเดินทางและหยุดพักที่บริเวณใกล้ๆกับแม่น้ำแควน้อย ท่านได้พบกับดอกไม้ที่มีลักษณะคล้ายต้นถั่วแปบช้างจึงนำตัวอย่างดอกแห้งกลับมาเพื่อพิสูจน์ และนำผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรายุพิน จันทรประสงค์ (เจิมศิริวัฒน์) กลับไปเก็บตัวอย่างให้สมบูรณ์ โดยเก็บฝักที่เริ่มแก่และขุดต้นพืชกลับไปปลูกเพื่อพิสูจน์สายพันธุ์พืช และนำตัวอย่างส่งไปที่สหราชอาณาจักรเพื่อพิสูจน์ต้นพืชโดย Mr. B. L. Burtt และขอพระราชทานชื่อว่า *mahidolae* ตีพิมพ์การค้นพบครั้งแรกในนิตยสาร Notes from the Botanic Garden Edinburgh Vol.31 No.1 และเมื่อปีพุทธศักราช 2514 ต้นกันภัยมหิดลจึงมีชื่อวิทยาศาสตร์ที่สมบูรณ์ว่า *Afgekia mahidolae* B. L. Burtt & Chermsir. แต่ยังไม่มีชื่อเป็นทางการเป็นภาษาไทย เมื่อปรึกษาศาสตราจารย์เต็ม สมิตินันทน์ ผู้เชี่ยวชาญทาง

พฤกษศาสตร์กรมป่าไม้ ท่านได้ให้ความเห็นว่าควรเรียกชื่อพืชชนิดนี้ว่า กันภัย หรือเติมคำว่ามหิดลตามชื่อที่ได้รับพระราชทานว่า กันภัยมหิดล ในปี พ.ศ. 2548 ได้มีการเปลี่ยนชื่อทางวิทยาศาสตร์ของต้นกันภัยมหิดลใหม่เพื่อให้สอดคล้องกับหลักของภาษาละตินและตีพิมพ์อยู่ใน International Code of Botanical Nomenclature ฉบับล่าสุดโดยแก้เป็น *Afgekia mahidoliae* [4]

รูปที่ 1 ต้นกันภัยมหิดลและดอก

การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับต้นกันภัยมหิดล

การศึกษาความสัมพันธ์ของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ในการงอกของยอดต้นกันภัยมหิดล เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนข้อ (nodes) มาเลี้ยงบนอาหารสูตร half Murashige & Skoog ($^1/_2$MS) ที่เติม 6-benzylaminopurine (BA) เปรียบเทียบกับ Thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้นในช่วง 0-4.0 ไมโครโมลาร์ พบว่า จำนวนของยอดและความยาวต่างกันไม่มีผลต่างกัน แต่ TDZ กระตุ้นได้ดีกว่าเล็กน้อย จึงทำการศึกษาต่อโดยเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS กับ TDZ 2.0ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนย้ายลงสู่อาหาร $^1/_2$MS ที่มีความเข้มข้นของ Gibberellic acid (GA_3) ในช่วง 0-15.0 ไมโครโมลาร์ พบว่าสามารถเพิ่มความยาวของรากได้มากขึ้น[7]

การศึกษาการขยายพันธุ์ของต้นกันภัยมหิดลด้วยระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม BA ความเข้มข้นต่างกันในช่วง 0-100 ส่วนในล้านส่วน พบว่าที่ความเข้มข้น 10 ส่วนในล้านส่วน มีจำนวนยอดมากที่สุด และที่ความเข้มข้น 1 ส่วนในล้านส่วน ทำให้จำนวนใบต่อยอดเพิ่มได้ดีที่สุด [8]

การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดปิโตรเลียมอีเธอร์ของใบกันภัยมหิดล พบว่าเมื่อนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) พบว่าสารสกัดเมทานอลจากส่วนใบออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยมีค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งได้ 50% (EC_{50}) 22.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 4 ชนิด ด้วยวิธี disc diffusion และวิธี broth dilution พบว่า สารสกัดเมธานอลจากส่วนก้านดอกมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylo-coccus aureus* (ATCC 25923) อย่างอ่อน เมื่อนำสารสกัด

ปิโตรเลียมอีเธอร์จากส่วนใบมาแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตรกราฟฟีแล้ววิเคราะห์ด้วยวิธีทางสเปคโตรสโครปี พบว่าได้สารบริสุทธิ์ 4 ชนิดคือ n-pentacosane, 1-triacontanol, butyldotriacontanoate และ n-octatriacontanal ตามลำดับ และมีเพียง n-octatriacontanal เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[5]

2.2 เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีจุดมุ่งหมายหลายประการ ได้แก่ การเพิ่มจำนวนต้นพืชหรือการเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อช่วยผลิตสารสำคัญที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม ในการเลี้ยงเพื่อช่วยผลิตสารสำคัญอาจจะเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสขึ้นมาก่อน แคลลัส (callus) คือกลุ่มเซลล์ที่ไม่สามารถจำแนกได้ว่าจะกลายเป็นส่วนใดของพืช แคลลัสจึงเป็นสิ่งที่ได้รับความสนใจศึกษา การเปลี่ยนแปลงตัวแคลลัสนำไปสู่การสร้างสารที่ต้องการ โดยเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้เนื้อเยื่อที่มีคุณสมบัติตามต้องการ หรือนำไปชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่จำนวนมาก เพื่อนำไปลงดินปลูก เพื่อช่วยในการขยายพันธุ์ต้นพืชหายาก ใกล้สูญพันธุ์หรือเพิ่มจำนวนได้ยาก

หลักการสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาใช้อาจจะเป็นเซลล์เดี่ยว แคลลัส ชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชหรือชิ้นส่วนของพืช (explants) ก็ได้ แต่ชิ้นส่วนนั้นควรเป็นชิ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญ
2. ต้องเลี้ยงในสภาพที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา เนื่องมาจากส่วนประกอบของอาหารมีน้ำตาลรวมอยู่ด้วย เป็นแหล่งคาร์บอนชั้นดีที่เชื้อต่างๆจะนำไปใช้เป็นอาหารและเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วกว่าเนื้อเยื่อของเซลล์พืช มีการเจริญเติบโตมากอาจจะทำลายเนื้อเยื่อพืชให้เสียหายได้
3. ควรเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อถึงเวลาที่เหมาะสม ขึ้นกับชนิดของพืชและจุดประสงค์ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพราะการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไว้ในอาหารเดิมเป็นเวลานานจะทำให้เนื้อเยื่อพืชขาดอาหาร และเนื้อเยื่อจะไม่เจริญเติบโตดี เพราะมีของเสียที่พืชปล่อยมาสะสมอยู่

การเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสมนั้นควรมาจากต้นอ่อนที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ เป็นชิ้นส่วนที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหาร เพราะทุกส่วนของพืชมีการเจริญเติบโต แต่ในความเป็นจริงอาจจะไม่สามารถเพาะต้นพืชที่เป็นต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อได้ ก็สามารถใช้ชิ้นส่วนต่างๆของพืชที่อยู่ในสภาพสามารถเจริญเติบโตได้มาใช้เป็นเนื้อเยื่อตั้งต้นได้ทั้งสิ้น

การเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับเพาะเลี้ยง จะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ

1. การเตรียมชิ้นส่วนที่จะนำมาเลี้ยง (Preparation of explants) โดยทั่วไปทำได้โดยการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่เหมาะสม สำหรับขนาด และรูปร่างของเนื้อเยื่อแต่ละชนิดไม่มีขอบเขตจำกัดแน่นอน ขึ้นกับดุลพินิจของผู้ทำการทดลอง โดยทั่วไปควรเลือกขนาดใหญ่พอประมาณ (1x1 ตารางเซนติเมตร) เพราะมีโอกาสให้เซลล์ได้เจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้มากขึ้น ไม่ควรมีขนาดใหญ่มากจนเกินไปเพราะจะทำให้โอกาสติดเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น แต่ถ้ามีขนาดเล็กเกินไปโอกาสรอดของเนื้อเยื่อพืชก็ละลดตามลงไปด้วย การตัดชิ้นส่วนพืชจะใช้มีดที่สะอาดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยอาจผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมาแล้ว (autoclave) ควรมีความคมเพื่อลดการเสียดสีกับเนื้อเยื่อ การตัดชิ้นส่วนพืชอาจจำแนกได้ 2 วิธี

1. การตัดชิ้นส่วนก่อนฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ผิว ทำได้โดยการนำส่วนของพืชมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วตัดส่วนที่ปกคลุม และไม่ต้องการใช้ออกให้หมด ใช้มีดตัดเอาส่วนที่ต้องการเลี้ยงออกเป็นชิ้นให้มีขนาดตามต้องการ นำมารวมกันหลายๆชิ้น นำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ
2. การตัดชิ้นส่วนของพืชหลังจากผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บริเวณพื้นผิวมาแล้ว ทำได้โดยตัดส่วนที่ไม่ต้องการออกให้หมด ในกรณีชิ้นใหญ่ควรแบ่งให้เป็นท่อนหรือมีชิ้นที่เล็กลง ล้างน้ำให้สะอาด นำไปฆ่าเชื้อที่พื้นผิวด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อได้ชิ้นส่วนของพืชที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ใช้มีที่คมและปราศจากเชื้อตัดชิ้นส่วนของพืชให้มีขนาดตามต้องการภายในตู้ปลอดเชื้อ

การฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวของเนื้อเยื่อ (Surface sterilization)

ชิ้นส่วนของที่นำมาจากธรรมชาติเพื่อนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น ต้องผ่านการฟอกฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่อยู่ตามพื้นผิวของพืชด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ (sterilizing agent) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด การเลือกชนิดและความเข้มข้นของน้ำยาฆ่าเชื้อเป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึง โดยน้ำยาฆ่าเชื้อที่เลือกนั้นต้องไม่มีผลหรือมีผลน้อยที่สุดต่อเนื้อเยื่อของพืชที่นำมาฆ่าเชื้อ และควรล้างออกได้โดยง่าย เพราะถ้าล้าง

ออกไม่หมดจะทำให้เนื้อเยื่อพืชของชิ้นส่วนที่ใช้ตายได้ การล้างด้วยน้ำกลั่นซ้ำๆกันหลายครั้งเป็นการชะน้ำยาฆ่าเชื้อได้ดี ปกติแล้วจะนิยมใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่แตกตัวให้ chlorine เป็นตัวออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อ เช่น sodium hypochlorite (Clorox®)

การเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เช่น detergent (Teepol®) หรือ TWEEN®-80 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำยาฆ่าเชื้อได้ เนื่องจากจะช่วยทำให้บริเวณพื้นผิวของพืชสัมผัสกับสารฟอกฆ่าเชื้อได้มากขึ้น อีกวิธีหนึ่งที่ช่วยกำจัดเชื้อ คือ การจุ่มชิ้นส่วนของพืชลงในแอลกอฮอล์เป็นเวลาสั้นๆ ก่อนนำมาแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ ความเข้มข้นของสารฟอกฆ่าเชื้อที่ใช้และเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อจะแตกต่างกัน แม้จะเป็นพืชต้นเดียวกัน ปัจจัยสำคัญที่มีผล คือ ชนิดของพืช ชิ้นส่วนของพืช และแหล่งที่มาของพืช เป็นต้น

การเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สำหรับอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นสามารถเตรียมได้ทั้ง เตรียมเป็น Stock solution แล้วจึงนำ stock solution แต่ละสูตรมาผสมกัน หรือเตรียมจากผงอาหารสำเร็จรูป ในที่นี้จะขอกล่าวถึงการเตรียมอาหารโดยวิธีการใช้ผงสำเร็จรูป สูตรอาหารที่ใช้คือสูตร Murashige and Skoog (MS;1962) โดยเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 3 ของสูตรอาหาร ปรับความเป็นกรดด่างด้วยสารละลาย Hydrochloric (HCl) และสารละลาย Sodium hydroxide (NaOH) เติมวุ้น (agar) ร้อยละ 8 ของสูตรอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

การถ่ายเนื้อเยื่อและการเก็บรักษา

เนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นต้องมีการถ่ายเนื้อเยื่อลงอาหารใหม่ภายในช่วงเวลาที่เหมาะสม เนื่องจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ในอาหารเดิมนานๆจะทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการขาดอาหาร และยังมีของเสียที่พืชปล่อยออกมา ทำให้เนื้อเยื่อพืชไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ โดยทั่วไปแล้วจะถ่ายเนื้อเยื่อที่เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งทุก 4-6 สัปดาห์ มากหรือน้อยกว่านี้จะขึ้นกับชนิดของพืชและจุดประสงค์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

กรณีที่ต้องการหยุดการเจริญเติบโตและเก็บรักษาเนื้อเยื่อโดยไม่ให้เนื้อเยื่อตายสามารถทำได้โดยเก็บเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์ไว้ในอุณหภูมิที่ต่ำมากๆ เช่น ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ที่มีอุณหภูมิต่ำ (-196 องศาเซลเซียส) การเก็บเนื้อเยื่อพืชด้วยวิธีการนี้เนื้อเยื่อพืชจะไม่มีการเจริญเติบโตแต่ยังมีชีวิตอยู่ เมื่อนำมาเลี้ยวบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อปกติอีกครั้ง เนื้อเยื่อก็ยังมีความสามารถเจริญเติบโตได้

การเก็บเกี่ยวเนื้อเยื่อ

การเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสเพื่อนำสารมาวิเคราะห์นั้น จะเก็บเกี่ยวเนื้อเยื่อแคลลัสที่มีสภาพเหมาะสมที่จะนำมาวิเคราะห์หาสารสำคัญ เมื่อแคลลัสอายุต่างกันอาจจะผลิตสารต่างกันหรือสารเดียวกันแต่มีปริมาณต่างกันได้ ควรวางแผนในการเก็บเกี่ยวให้ดี โดยทั่วไปจะนิยมเริ่มเก็บเกี่ยวแคลลัสเมื่อมีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 2 เดือนขึ้นไป โดยนำเอาแคลลัสออกจากอาหารที่ใช้เลี้ยงแล้วจึงนำไปผ่านกระบวนการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งเพื่อระเหยน้ำก่อนนำไปสกัดต่อไป

ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. <u>สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช</u> (Plants growth regulators) สารเร่งการเจริญเติบโตของพืชทำหน้าที่คล้ายกับฮอร์โมนของพืชในธรรมชาติ สารเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง เพราะช่วยให้พืชเจริญเติบโตและสามารถพัฒนาไปเป็น ราก ใบ ดอก ผล เมล็ด หรือลำต้นได้ ซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นและชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ใช้ สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ ขยายเซลล์ และการเกิดอวัยวะของเนื้อเยื่อพืช (organogenesis) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 กลุ่มอ๊อกซิน (Auxin) สารในกลุ่มนี้เป็นสารกลุ่มแรกที่เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ค้นพบ มีบทบาทช่วยในการขยายตัวของเซลล์ (cell enlargement) ทั้งในด้านกว้างและด้านยาว ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น การใช้ในระดับโปรโตพลาสต์พบว่า อ๊อกซินยังช่วยในการสร้างผนังเซลล์ของพืช ด้านการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายพันธุ์(micropropagation) นิยมใช้อ๊อกซินในการชักนำรากของเนื้อเยื่อพืช และอ๊อกซินยังมีผลต่อการผลิต secondary product ในพืชอีกด้วย อ๊อกซินที่ได้จากการสังเคราะห์ ได้แก่ indole-3 acetic acid (IAA) ซึ่งพบได้ในธรรมชาติแต่ยังไม่นิยมใช้แบบที่เป็นฮอร์โมนพืช ตัวอื่นๆ ได้แก่ naphthalene-1-acetic acid (NAA), indole-3-butyric acid (IBA), chlorophenoxyacetic acid (CPA) และ 2,4-dichlorophe noxyacetic acid (2,4-D)

1.2 กลุ่มไซโตคินิน (Cytokinin) สารในกลุ่มนี้มีหน้าที่เกี่ยวกับการแบ่งเซลล์ของพืชและการสังเคราะห์สารประกอบประเภทโปรตีน ด้านการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายพันธุ์ นิยมใช้ไซโตคินินในการชักนำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดยอด การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนิยมใช้ไซโตคินินที่ได้จากการสังเคราะห์เช่นเดียวกับอ๊อกซิน ได้แก่ Kinetin ซึ่งพบได้ในฮอร์โมนพืชแต่นิยมใช้ในรูปจากการสังเคราะห์เนื่องจากยังไม่มีการสกัดฮอร์โมนพืชมาเพื่อใช้ ตัวอื่นๆ เช่น 6-benzylaminopurine (BAP)

ส่วนประกอบของอาหาร

อาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแต่ละสูตรจะประกอบด้วยแร่ธาตุที่แตกต่างกันไป เพื่อให้เหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยง พืชแต่ละชนิดจะเหมาะสมต่ออาหารแตกต่างกัน ส่วนประกอบของอาหาร ได้แก่ ส่วนผสมของธาตุอาหารหลักซึ่งเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เป็นต้น ธาตุอาหารรองซึ่งเป็นธาตุอาหารที่พืชต้องการเพียงเล็กน้อย เช่น เหล็กและสังกะสี เป็นต้น นอกจากนี้ น้ำตาลซึ่งถูกใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน วิตามินเป็นส่วนจำเป็นต่อการทำงานและการเจริญเติบโตของพืช เช่น thiamine และ nicotinic acid เป็นต้น

สูตรอาหารที่ได้รับความนิยมมากคือสูตร MS มีข้อสังเกตคือสูตรนี้ใช้ ammonium nitrate เป็นแหล่งของไนโตรเจน และยังมีปริมาณธาตุอาหารรองมากกว่าสูตรอื่นๆอีกด้วย

สภาวะแวดล้อมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สภาวะแวดล้อมที่กล่าวถึงได้แก่ แสง และอุณหภูมิ เพราะมีความสำคัญในการเกิด morphogenesis ของเนื้อเยื่อพืช การให้แสงนั้นควรคำนึงถึงความเข้มของแสง, ระยะเวลาที่พืชได้รับแสงต่อวัน และแหล่งกำเนิดแสงด้วย ส่วนอุณหภูมินั้นปกติแล้วจะควบคุมให้มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่พืชบางชนิดอาจต้องการอุณหภูมิที่สูงกว่าเพื่อการเจริญเติบโต สำหรับห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่มีอุณหภูมิสูงเกินไปอาจทำให้เกิดการนึ่งสุกของเนื้อเยื่อพืชได้ [9]

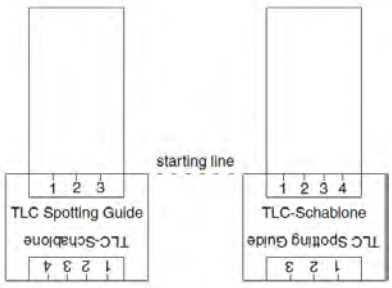
2.3 การแยกสารโดยใช้ Thin Layer Chromatography (TLC)

การเตรียมสารตัวอย่าง

สารตัวอย่างที่ใช้สำหรับการแยกด้วยวิธีโครมาโทกราฟีกต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสม จึงต้องมีการควบคุมการบดสารเพื่อสกัด การสกัด และการกรอง

การประยุกต์ใช้สารตัวอย่าง

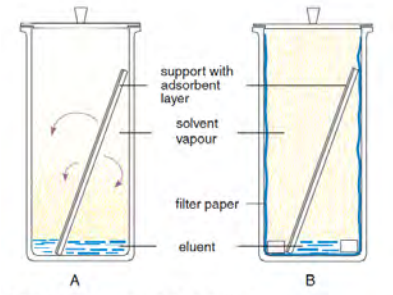
จุดมุ่งหมายในการใช้กระบวนการแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟิก คือ การหารูปแบบวิธีที่เหมาะสมในการแยกของสารบน TLC plate นิยมใช้ปลายหลอดแก้ว capillary เป็นตัวจุด (spot) หรือลาก (steak) สารตัวอย่าง การวัดปริมาณสารจะนิยมใช้การลากมากกว่าเพราะสามารถวัดได้ง่ายกว่า



รูปที่ 2 แสดงลักษณะการจุดสารตัวอย่างบน TLC plate

การพัฒนาโครมาโทแกรมและเทคนิคการแยกสาร

เทคนิคการแยกที่ได้รับความนิยม คือ เทคนิค TLC ภายใต้ภาชนะที่มีฝาปิด (chamber) โดยปกติวิธีนี้จะเป็นการพัฒนาระบบตัวทำละลาย ให้มีความเหมาะสม ถ้าเป็นงานคัดกรองสารเบื้องต้นที่ยังไม่รู้ว่าสารในธรรมชาติเป็นกลุ่มใด อาจจะต้องทำการปรับเปลี่ยนไปเรื่อยๆจนมีระบบที่เหมาะสม และสามารถตีความหมายออกมาได้อย่างชัดเจนในสิ่งที่พบจากการแยก สิ่งที่ไม่ควรละเลยในขั้นตอนการทำการแยกสารคือ บรรยากาศ (atmosphere) ภายใน chamber เพราะการที่สารเคลื่อนผ่าน TLC plate นั้นอาศัยหลักการเคลื่อนย้ายสารตาม Polarities ดังนั้นภายใน chamber ควรมีการอิ่มตัวของไอสารที่ใช้เป็นระบบตัวทำละลาย เพื่อให้ได้เส้นขอบ (lines) ของการดูดซับบน TLC plate อย่างสม่ำเสมอ ถ้าไม่เกิดการอิ่มตัวของไอของระบบตัวทำละลาย อาจทำให้เส้นขอบที่เกิดขึ้นไม่ตรง

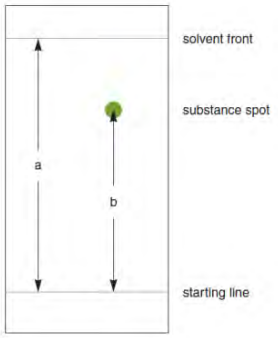


รูปที่ 3 แสดงบรรยากาศภายใน chamber เมื่อเกิดการอิ่มตัวโดยใช้กระดาษกรองเป็นตัวช่วย

การแปลผลโครมาโทแกรม

การแปลผลโครมาโทแกรมขึ้นกับวัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโทกราฟฟีในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพการแปลความหมายจากการเคลื่อนที่ของ sample ที่ทำการทดสอบก็เพียงพอในการประมวลผล นิยมใช้ R_f value เป็นพาราเมเตอร์ที่ใช้ในการวัดผล โดยค่านี้หาได้จาก

$$R_f = \frac{Distance\ starting\ line - Middle\ of\ spot}{Distance\ starting\ line - Solvent\ front} = \frac{b}{a}$$



รูปที่ 4 แสดงเส้นที่ใช้ในการคำนวน R_f

R_f values ที่ได้ควรมีค่าอยู่ในช่วง 0-1 และมีค่าดีที่สุดเมื่ออยู่ในช่วง 0.1-0.8 เมื่อศึกษาค่าพารามิเตอร์ตัวนี้ สิ่งสำคัญที่ควรเคร่งคัด เช่น การอิ่มตัวของไอสารใน chamber, ค่าสัดส่วนของสารที่ใช้ผสม, อุณหภูมิควรมีค่าคงที่ และมีการควบคุมที่เคร่งครัด

Standard silica TLC layers

การแยกสารโดยใช้ TLC เป็นที่นิยมมานานและเป็นมาตรฐานที่ใช้เป็นประจำในการตรวจสอบภายในห้องปฏิบัติการ TLC layers ที่ใช้ควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

- มีการเคลือบที่เรียบและเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneous coating)
- มีความหนาของสารเคลือบทั่วทั้งแผ่น (Homogeneous thickness of layer)
- มีความหนาแน่นสูงและอัดแน่น (High packing density)
- เป็นพื้นผิวที่มีความมั่นคงไม่ลอกง่าย (Firming adherent layers)
- มีคุณสมบัติในการแยก (Consistent chromatographic properties)

การเคลือบโดยใช้ silica เป็นมาตรฐานของการเคลือบที่นิยมใช้กันมากที่สุด สำหรับ TLC plate ถ้ามีการใช้ Silica gel 60 หมายความว่าขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของรูบน TLC plate ที่

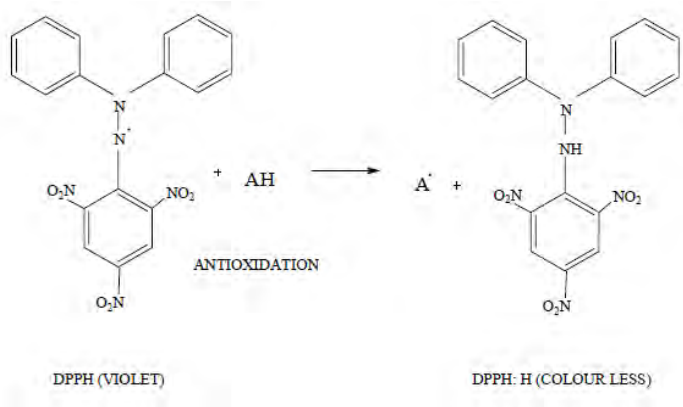
เคลือบด้วย silica gel มีขนาด 60 Å และเมื่อใช้ fluorescent เป็น indicators นิยมที่จะใช้ zinc-silicate สำหรับการส่องภายใต้ short-wave UV (254 นาโนเมตร) และสารที่เป็น fluorescent pigment กลุ่มอนินทรีย์ชนิดพิเศษสำหรับการส่องใต้ long-wave UV (365-366 นาโนเมตร) [10]

Reagent สำหรับ TLC

ในขั้นตอนการตรวจสอบหลังจากทำการแยกสารบน TLC plate แล้วนั้น บางกรณีอาจไม่เห็นว่ามีการแยกสารที่ชัดเจน หรือต้องการการทดสอบอย่างรวดเร็วว่าแถบของสารที่เกิดขึ้นเป็นสารกลุ่มใด จึงมีการพัฒนาสาร (reagents) เพื่อช่วยตรวจสอบความน่าจะเป็นของสารที่ได้จากการสกัดแยกอย่างคร่าวๆ สำหรับ reagent ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ กรดกำมะถัน ความเข้มข้นร้อยละ 10 ซึ่งสามารถตรวจสอบกลุ่มสารประกอบที่มีขั้ว เช่น คาร์โบไฮเดรต [11]

2.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH Radical Scavenging Assay

เป็นการทดสอบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยให้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรมีสีม่วง เมื่อ DPPH ได้รับอิเล็กตรอนหรืออนุมูลอิสระไฮโดรเจน จะเปลี่ยนเป็น DPPH:H ติดตามผลการทดลองโดยวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517นาโนเมตร ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH



รูปที่ 5 การหาความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ

เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูล DPPH จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสี คือ จากสีม่วงเข้มเป็นสีเหลืองใส และค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรก็จะลดลง ซึ่งเป็นวิธีการศึกษากิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) [12]

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืช อุปกรณ์ สารเคมีและเครื่องมือ

พืช

กันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัสของกันภัยมหิดล

อุปกรณ์

1. Beaker ขนาด 50, 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร
2. แท่งแก้วคน
3. ช้อนเขา
4. Aluminium foil
5. คีม (forceps)
6. Capillary
7. ขวดแก้วมีฝาปิด
8. TLC plates
9. TLC Tank
10. Micropipette
11. Tip
12. มีดสำหรับตัดแบ่งเนื้อเยื่อ
13. Petridish
14. กระดาษกรอง

สารเคมี

1. Ethanol 70% และ 95% v/v
2. Distilled methanol
3. Distilled hexane
4. Distilled dichloromethane
5. Distilled ethyl acetate
6. 10% Sulfuric acid
7. 2, 4-dichlorophenoxy-acetic acid (2, 4-D)

8. 6-benzylaminopurine (BA)
9. MURASHIGE & SKOOG (MS)
10. Sodium hydroxide
11. Hydrochloric acid
12. น้ำตาล
13. Agar
14. สารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
15.น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Sterile-distilled water)

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
3. ไมโครเวฟ
4. เครื่องนึ่งไอน้ำความดันสูง (Autoclave)
5. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar-flow cabinet)
6. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)
7. เครื่องผสมกวนสาร (Homogenizer)
8. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilizer)
9. เครื่องเขย่า (Shaker)

3.2 การเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในการทดลองครั้งนี้ใช้อาหารสูตร MURASHIGE & SKOOG (MS) และสารควบคุมการเจริญเติบโต 2 ชนิด ได้แก่ 2, 4-dichlorophenoxy-acetic acid (2, 4-D) และ 6-benzylaminopurine (BA) ซึ่งเตรียมในรูปอาหารกึ่งแข็งที่มี Agar 8 กรัม/1000 มิลลิลิตร เป็นสารช่วยพยุง และน้ำตาลทราย 30 กรัม/1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 5.67-5.7 นำอาหารที่เตรียมได้ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งไอน้ำความดันสูง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 20 นาที

การศึกษาครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) โดยอาศัยการสังเกตเปรียบเทียบกลุ่มศึกษา (study group) คือ กลุ่มที่ได้รับสารเร่งการเจริญเติบโตชนิด

2, 4-dichlorophenoxy-acetic acid (2, 4-D) และชนิด 6-benzylaminopurine (BA) ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นต่างๆ กับกลุ่มควบคุม (control group) คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับสารเร่งการเจริญเติบโตทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่

1. อาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต (กลุ่มควบคุม)
2. อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร
3. อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร
4. อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2, 4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร
5. อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2, 4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร
6. อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2, 4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ BA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

3.3 การเตรียมชิ้นส่วนของพืชโดยกระบวนการ Surface sterilization และการชักนำชิ้นส่วนของพืชให้เกิดแคลลัส

กลุ่มตัวอย่างที่เป็นตัวแทนในการศึกษา คือ ต้นกันภัยมหิดลที่ปลูกในเรือนเพาะชำของคณะเภสัชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นการสุ่มตัวอย่างแบบเฉพาะเจาะจง (purposive sampling) นำต้นกันภัยมหิดลมาตัดแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนใบและก้าน ให้มีขนาดพอเหมาะ หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำไหลสะอาดเป็นเวลา 10 นาที เติมสารลดแรงตึงผิวและล้างออก นำชิ้นส่วนที่ได้ไปแช่ในน้ำยาฟอก Clorox® 15% ที่ผสมสารลดแรงตึงผิวเล็กน้อยแล้วจึงนำไปวางบนเครื่องเขย่า โดยส่วนของใบใช้เวลาฟอก 10 นาทีและส่วนก้านใช้เวลาฟอก 20 นาที หลังจากนั้นจึงเทน้ำยาฟอกออกให้หมด ล้างชิ้นส่วนของพืชภายใต้ Laminar-flow cabinet ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อครั้งละ 100 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 5 นาที ล้างซ้ำจำนวน 3 ครั้ง จะได้ชิ้นส่วนของพืชที่ปราศจากเชื้อ

นำชิ้นส่วนของพืชที่ปราศจากเชื้อมาถ่ายลงสู่อาหารสูตรต่างๆ ภายใต้ Laminar-flow cabinet โดยนำชิ้นส่วนของพืชวางบน petridish ที่ปราศจากเชื้อ ใช้มีดและ forceps จับชิ้นส่วนของพืชและตัดให้มีขนาด 1×1 ตารางเซนติเมตร แล้วจึงถ่ายชิ้นส่วนของพืชที่ได้ลงในขวดอาหารโดย aseptic technique นำชิ้นส่วนของพืชแต่ละขวดไปเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมที่ควบคุมระยะเวลาให้แสง 14 ชั่วโมงโดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ที่ให้ความเข้มแสง 3 k ลักซ์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ สังเกต เก็บภาพและบันทึกผลการเกิดแคลลัส

ทำการทดลองการชักนำชิ้นส่วนของพืชให้เกิดแคลลัส 2 ซ้ำการทดลอง ครั้งละ 6 สูตรอาหาร ในแต่ละสูตรอาหารใช้ชิ้นส่วนของส่วนใบ 20 ชิ้น และส่วนก้าน 20 ชิ้น (รวมใบ 40 ชิ้น และก้าน 40 ชิ้น ต่อ 1 สูตรอาหาร 2 ซ้ำการทดลอง) ซึ่งแปลผลโดยการคำนวณค่าเฉลี่ยของร้อยละการ

ชักนำการเกิดแคลลัส ทดสอบความต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และการวิเคราะห์ข้อมูลจากแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCBD) ด้วยวิธี Ducan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05

หลังจาก 4 สัปดาห์ทำการเปลี่ยนถ่ายแคลลัสที่เกิดขึ้นลงสู่อาหารขวดใหม่เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส สำหรับนำไปศึกษารูปแบบโครมาโทกราฟฟี

3.4 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบกันภัยมหิดล

3.4.1 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ

นำต้นกันภัยมหิดลที่ล้างสะอาดแล้วผ่านกระบวนการบดหยาบ จากนั้นนำมาแช่สกัดด้วยวิธี maceration โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจึงกรองส่วนกากออกไปและเก็บสารละลายเมทานอลไว้แล้วจึงนำไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งโดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 95 องศาเซลเซียส จะได้สิ่งสกัดหยาบกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ

3.4.2 การเตรียมสิ่งสกัดหยาบกันภัยมหิดลที่ได้จากแคลลัส

นำแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารผ่านกระบวนการทำให้แห้งเพื่อเอาน้ำออกไปแล้วจึงเติมเมทานอลลงไปจนท่วมและนำไปปั่นเพื่อให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง homogenizer เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นระหว่างกากและสารละลายที่ความเร็วรอบ 5,800 rpm (revolution per minute) 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนสารละลายใสออกมาเพื่อนำไประเหยตัวทำละลายออกจนแห้งภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator ได้สิ่งสกัดหยาบแคลลัสกันภัยมหิดล (methanol extract)

3.5 การศึกษารูปแบบโครมาโทกราฟฟีเบื้องต้นโดยใช้แผ่น TLC (Thin-layer chromatography)

ละลายสิ่งสกัดหยาบกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตรต่างๆด้วยตัวทำละลายเมทานอล แล้วจุดสารลงบนแผ่น TLC นำแผ่นที่จุดสารเรียบร้อยแล้วใส่ลงในภาชนะแก้วที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมที่มีกระดาษกรองซึ่งทำให้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ขึ้นด้านบนเร็วขึ้นจนถึงแนวของตัวทำละลาย (solvent front) จึงนำแผ่น TLC ออกจากภาชนะแก้ว ในการทดลองนี้ ศึกษาโครมาโทแกรมที่ได้จากระบบตัวทำละลายผสม 3 ระบบ ได้แก่ hexane : ethyl acetate (7:3), ethyl acetate : dichloromethane (2:3) และ dichloromethane : methanol (10:1)

ซึ่งตรวจสอบภายใต้แสงที่มีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร, 365 นาโนเมตร และภายหลังพ่นกรดกำมะถันความเข้มข้นร้อยละ10 ภายใต้แสงขาวและแสงที่มีความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

ทำการทดลองซ้ำอีกครั้งโดยนำโครมาโทแกรมที่ได้พ่นด้วยสารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดหยาบในเมทานอลของกันภัยมหิดล

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การชักนำชิ้นส่วนของกันภัยมหิดลให้เกิดแคลลัส

เมื่อนำใบและก้านของกันภัยมหิดลผ่านกระบวนการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวจนได้ชิ้นส่วนของพืชที่ปราศจากเชื้อและนำไปเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิด 2,4-D และ BA ในความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยใช้จำนวนใบ 40 ชิ้น และก้าน 40 ชิ้น ต่อ1 กลุ่มการทดลอง ผลการศึกษาพบว่า สูตรอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญ เติบโต 2,4-D และ BA ความเข้มข้นแตกต่างกันมีผลต่อการชักนำชิ้นส่วนของพืชให้เกิดแคลลัส จากตารางที่ 1 สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมในการชักนำกันภัยมหิดลได้ดี คือ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตรและ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยของร้อยละการชักนำการเกิดแคลลัสของใบและก้าน เท่ากับ 95.00 และ 92.50 ตามลำดับ สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำกันภัยมหิดลให้เกิดแคลลัสได้ดีรองลงมา คือ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตรและ BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งให้ค่าเฉลี่ยของร้อยละการชักนำการเกิดแคลลัสของใบและก้าน เท่ากับ 92.50 และ 87.50 ตามลำดับ ความสามารถในการชักนำใบและก้านของกันภัยมหิดลของอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตรและ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตรและ BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งทดสอบด้วยวิธี DMRT

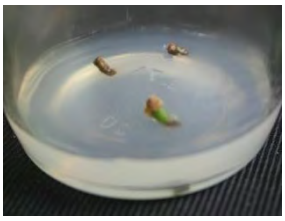
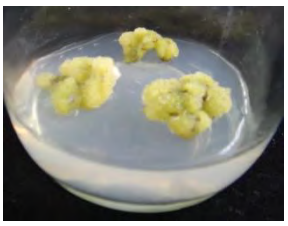
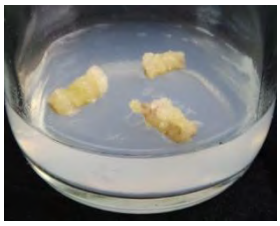
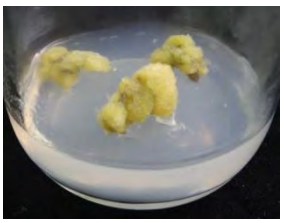
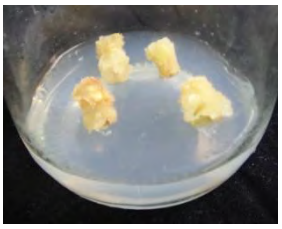
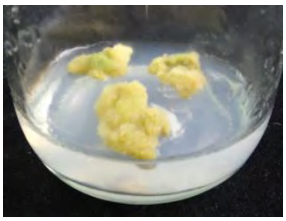
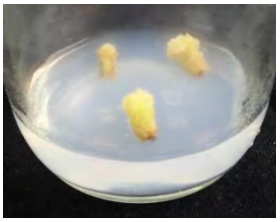
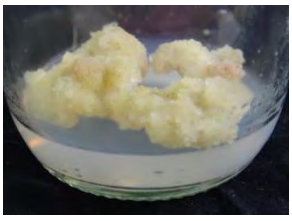
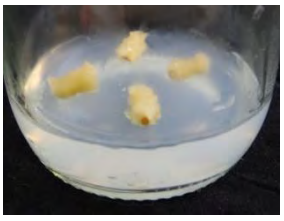
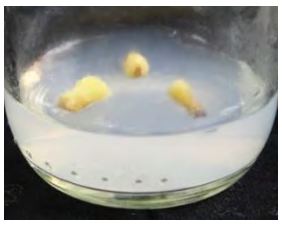
หลังจากการชักนำใบและก้านให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า แคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอยแผลของใบและก้าน และเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งสังเกตได้ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 2 (ตารางที่ 2) หลังจากชักนำใบและก้านให้เกิดแคลลัสเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 3) แคลลัสที่ได้ขึ้นปกคลุมชิ้นส่วนของใบและก้าน มีลักษณะเป็นก้อน นิ่ม มีของเหลวมาก สีเหลืองอมเขียว แคลลัสที่ได้จากการชักนำส่วนใบสามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วกว่าแคลลัสที่ถูกชักนำจากส่วนก้าน นอกจากนี้หลังจากถ่ายเนื้อเยื่อแคลลัสลงสู่อาหารขวดใหม่ในสัปดาห์ที่ 4 เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส เมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 7 พบว่า อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตรและ BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตรและ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร มีขนรากปรากฏขึ้นและสังเกตได้ชัดเจนในสัปดาห์ที่ 8 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 ผลของอาหารสูตร MS และสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการชักนำการเกิดแคลลัส

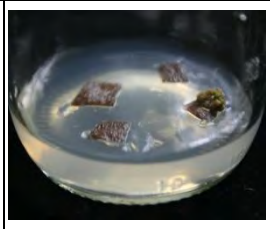
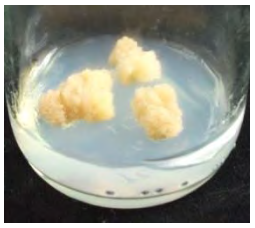
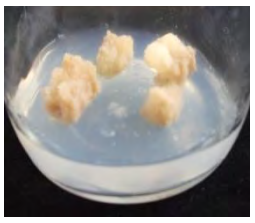
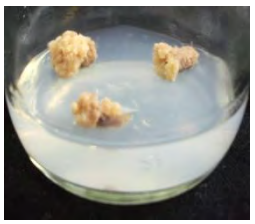
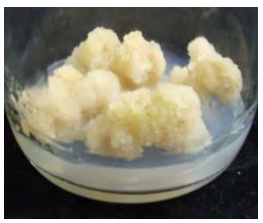
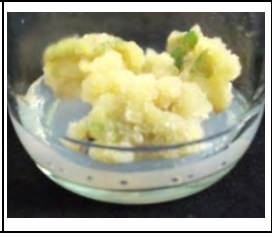
MS + สารควบคุมการเจริญเติบโต		**ค่าเฉลี่ยของร้อยละการชักนำการเกิดแคลลัส ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน**	
2,4-D (มิลลิกรัม/ลิตร)	**BA (มิลลิกรัม/ลิตร)**	**ใบ**	**ก้าน**
0	0	10.00 ± 30.38 [a]	5.00 ± 22.07 [a]
0.5	0.5	92.50 ± 26.67 [de]	87.50 ± 33.49 [bc]
0.5	0.1	77.50 ± 42.29 [cd]	72.50 ± 45.22 [b]
0.1	0.5	57.50 ± 50.06 [b]	85.00 ± 36.16 [bc]
1.0	0.1	95.00 ± 22.07 [e]	92.50 ± 26.67 [c]
0.1	1.0	67.50 ± 47.43 [bc]	85.00 ± 36.16 [bc]

a,b,c,d,e ในแต่ละคอลัมน์แสดงถึงค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยวิธี DMRT

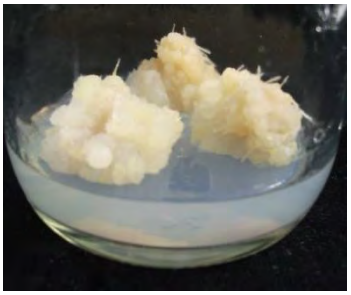
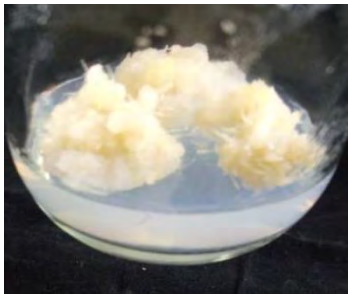
ตารางที่ 2 แสดงเนื้อเยื่อแคลลัสในสัปดาห์ที่ 2

MS + สารควบคุมการเจริญเติบโต		**เนื้อเยื่อแคลลัสในสัปดาห์ที่ 2 จากการชักนำ**	
2,4-D (มก./ลิตร)	**BA (มก./ลิตร)**	**ใบ**	**ก้าน**
0	0		
0.5	0.5		
0.5	0.1		
0.1	0.5		
1.0	0.1		
0.1	1.0		

ตารางที่ 3 แสดงเนื้อเยื่อแคลลัสในสัปดาห์ที่ 4

MS + สารควบคุมการเจริญเติบโต		**เนื้อเยื่อแคลลัสในสัปดาห์ที่ 4 จากการชักนำ**	
2,4-D (มก./ลิตร)	**BA (มก./ลิตร)**	**ใบ**	**ก้าน**
0	0		
0.5	0.5		
0.5	0.1		
0.1	0.5		
1.0	0.1		
0.1	1.0		

ตารางที่ 4 แสดงขนรากที่เจริญขึ้นจากแคลลัสกันภัยมหิดลในสัปดาห์ที่ 8

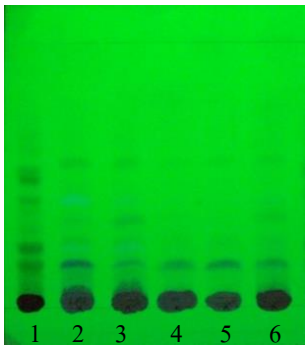
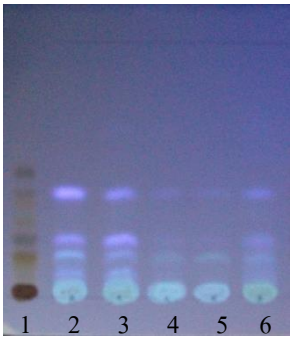
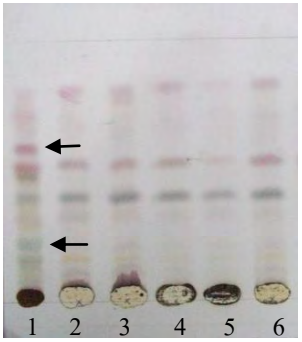
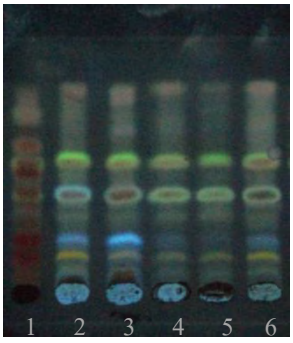
MS + สารควบคุมการเจริญเติบโต		**เนื้อเยื่อแคลลัสที่มีขนรากขึ้น สัปดาห์ที่ 8**
2,4-D (มก./ลิตร)	**BA (มก./ลิตร)**	
0.5	0.5	
1.0	0.1	

4.2 รูปแบบโครมาโทกราฟฟีเบื้องต้นของกันภัยมหิดล

เมื่อนำสารสกัดหยาบในเมทานอลของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัสมาศึกษาในเชิงคุณภาพโดยการเปรียบเทียบโครมาโทแกรมด้วยวิธี Thin-Layer Chromatography ซึ่งใช้ระบบตัวทำละลายเรียงจากความเป็นขั้วน้อยไปมาก 3 ระบบ ได้แก่ hexane : ethyl acetate (7:3), ethyl acetate : dichloromethane (2:3) และ dichloromethane : methanol (10:1) และตรวจสอบภายใต้แสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 365 นาโนเมตร และพ่นด้วยกรดกำมะถันความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่า รูปแบบโครมาโทกราฟฟีของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมและแคลลัสมีความแตกต่างกัน และรูปแบบโครมาโทกราฟฟีของแคลลัสกันภัยมหิดลจาก 5 สูตรอาหาร ได้แก่ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย (1) 2,4-D 0.5 มก./ลิตรและ BA 0.5 มก./ลิตร (2) 2,4-D 0.5 มก./ลิตรและ BA 0.1 มก./ลิตร (3) 2,4-D 0.1 มก./ลิตรและ BA 0.5 มก./ลิตร (4) 2,4-D 1.0 มก./ลิตรและ BA 0.1 มก./ลิตร (5) 2,4-D 0.1 มก./ลิตรและ BA 1.0 มก./ลิตร มีโครมาโทแกรมคล้ายคลึงกันดังภาพในตารางที่ 5, 6 และ 7 โครมาโทแกรมที่ได้จากการพ่นกรดกำมะถันความเข้มข้นร้อยละ10 ของระบบตัวทำลายทั้ง 3 ระบบ พบว่า องค์ประ กอบทางเคมีส่วนใหญ่ของสารสกัดแคลลัสค่อนข้างมีขั้วสูงกว่าสารสกัดของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ

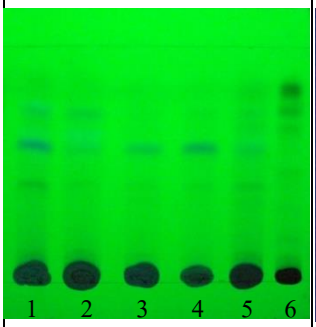
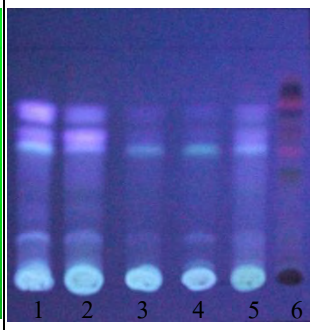
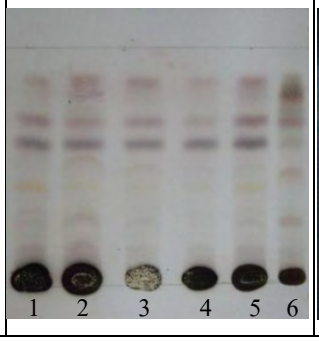
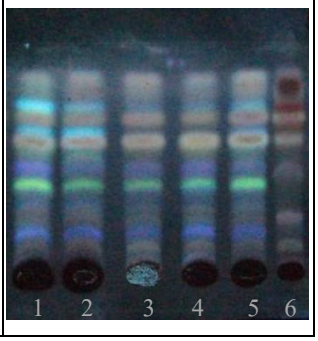
การศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดแคลลัสและกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติโดยการพ่นสารละลาย DPPH ลงบนแผ่นโครมาโทแกรม พบว่า รูปแบบโครมาโทกราฟฟีของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัส เปลี่ยนสีของสารละลาย DPPH จากสีม่วงเป็นสีเหลืองที่ตำแหน่งแตกต่างกัน(R_fไม่เท่ากัน)

ตารางที่ 5 แสดงรูปแบบโครมาโทกราฟฟีกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสม hexane : ethyl acetate (7:3)

ระบบตัวทำละลาย	**ก่อน/หลัง พ่นกรดกำมะถันร้อยละ 10**	**ตรวจสอบภายใต้แสงความยาวคลื่น (นาโนเมตร)**	
hexane : ethyl acetate (7:3)	ก่อนพ่นกรดกำมะถันร้อยละ 10	254 นาโนเมตร 	365 นาโนเมตร 
	หลังพ่นกรดกำมะถันร้อยละ 10	แสงขาว 	365 นาโนเมตร 

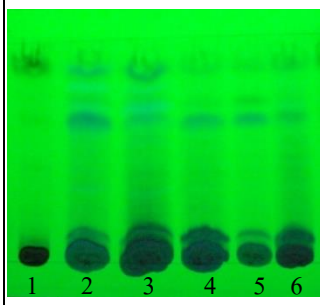
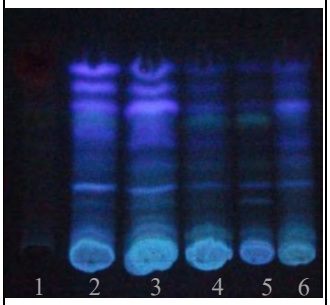
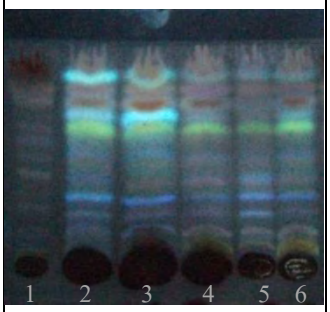
(1) สารสกัดกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ (2) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร (3) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (4) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร (5) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (6) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

ตารางที่ 6 แสดงรูปแบบโครมาโทกราฟฟีกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสม ethyl acetate : dichloromethane (2:3)

ระบบตัวทำละลาย	ก่อน/หลัง พ่นกรดกำมะถันร้อยละ 10	ตรวจสอบภายใต้แสงความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	
ethyl acetate : dichloromethane (2:3)	ก่อนพ่นกรดกำมะถันร้อยละ 10	254 นาโนเมตร 	365 นาโนเมตร 
	หลังพ่นกรดกำมะถันร้อยละ 10	แสงขาว 	365 นาโนเมตร 

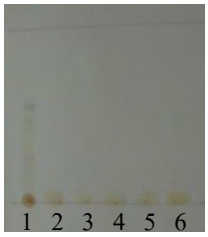
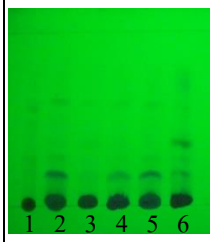
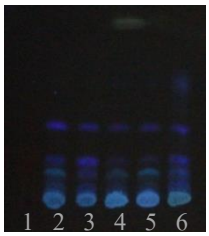
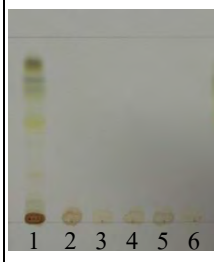
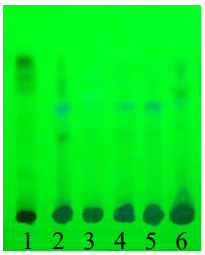
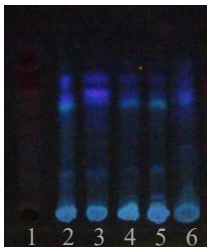
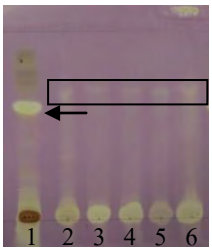
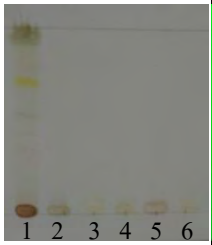
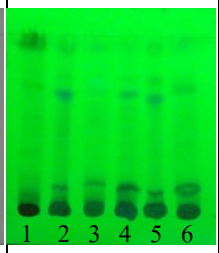
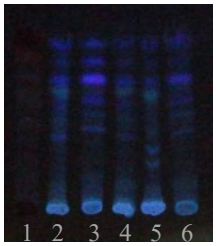
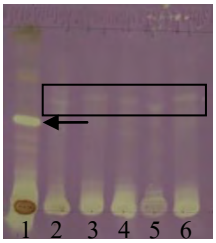
(1) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร (2) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (3) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร (4) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (5) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร (6) สารสกัดกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ

ตารางที่ 7 แสดงรูปแบบโครมาโทกราฟฟีกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัสที่ได้จากอาหารสูตรต่างๆ โดยใช้ระบบตัวทำละลายผสม dichloromethane : methanol (10:1)

ระบบตัวทำละลาย	ก่อน/หลัง พ่นกรดกำมะถันร้อยละ 10	ตรวจสอบภายใต้แสงความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	
dichloromethane : methanol (10:1)	ก่อนพ่นกรดกำมะถันร้อยละ 10	254 นาโนเมตร 	365 นาโนเมตร 
	หลังพ่นกรดกำมะถันร้อยละ 10	แสงขาว	365 นาโนเมตร 

(1) สารสกัดกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ (2) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร (3) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (4) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร (5) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (6) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น

ระบบตัวทำละลาย	แสงขาว	แสง 254 นาโนเมตร	แสง 365 นาโนเมตร	หลังพ่นสารละลาย DPPH
hexane : ethyl acetate (7:3)				
ethyl acetate : dichloromethane (2:3)				
dichloromethane : methanol (10:1)				

(1) สารสกัดกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติ (2) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร (3) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (4) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร (5) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร (6) สารสกัดแคลลัสจากอาหารสูตร MS + 2, 4-D 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร + BA 1.0 มิลลิกรัม/ลิตร

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกันภัยมหิดลผ่านการชักนำชิ้นส่วนของใบและก้าน พบว่า มีศักยภาพที่ดีในการเกิดแคลลัสซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณต่อไปได้อย่างรวดเร็ว โดยอาศัยสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมทั้งชนิดและความเข้มข้น สูตรอาหาร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตผสม ได้แก่ 2,4-D และ BA สามารถทำงานร่วมกันในการชักนำการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนของใบและก้าน การศึกษาวิจัยเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในครั้งนี้ พบว่า อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตรและ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 0.5 มิลลิกรัม/ลิตรและ BA 0.5 มิลลิกรัม /ลิตร มีค่าเฉลี่ยของร้อยละการชักนำการเกิดแคลลัสกันภัยมหิดลมากที่สุดและรองลงมาตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของร้อยละการชักนำการเกิดแคลลัสของสูตรอาหารที่มีปริมาณ 2,4-D เท่ากับหรือมากกว่าปริมาณของ BA พบว่าส่วนใบของกันภัยมหิดลสามารถถูกชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีกว่าส่วนก้านกันภัยมหิดล โดยผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มอ๊อกซินชนิด 2,4-D เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีศักยภาพในการชักนำการเริ่มต้นการเกิดแคลลัสและการรักษาสภาพความเป็นแคลลัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งการชักนำจากใบให้เกิดแคลลัส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชลิลลี่ (*Lilium longiflorum*; Easter lily)[13] และงานวิจัยของพืช *Gardenia jasminoides* Ellis[14] นอกจากนี้ อาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตรและ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ค่าเฉลี่ยของร้อยละการชักนำการเกิดแคลลัสดีที่สุดสำหรับกันภัยมหิดล โดยผลการวิจัยกันภัยมหิดลครั้งนี้สอดคล้องกับผลศึกษาการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตผสมต่อการชักนำการเกิดแคลลัสของ Chinese jiaotou (*Allium chinensis* G. Don) คือ สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม/ลิตรและ BA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ให้ค่าเฉลี่ยของร้อยละการชักนำให้เกิดแคลลัสสูงสุด (65.2%) เช่นเดียวกัน[15]

สำหรับรูปแบบโครมาโทกราฟฟีของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัสมีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าชนิดของเซลล์ที่แตกต่างกันส่งผลให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิที่แตกต่างกัน กันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัสจึงมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันและพบลักษณะที่แตกต่างคล้ายกันนี้ในมะหาด (*Artocarpus lakoocha* Roxb.) คือ พบสาร oxyresveratrol ในมะหาดที่ปลูกตามธรรมชาติแต่ไม่พบสารดังกล่าวในเนื้อเยื่อแคลลัส [16] อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ที่จะพบองค์ประกอบทางเคมีทั้งในพืชตามธรรมชาติและในแคลลัส ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้พบได้ใน *Taxus baccata* ที่มีสาร taxane ทั้งในพืชที่ปลูกตามธรรมชาติและในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธีเซลล์แขวนตะกอน[17]

การตรวจสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยการพ่นสารละลาย DPPH ลงบนโครมาโทแกรมของสารสกัดเมทานอลของกันภัยมหิดลที่ปลูกตามธรรมชาติและแคลลัสจากทุกสูตรอาหารพบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งแคลลัสทุกสูตรอาหารสามารถเปลี่ยนสีของสารละลาย DPPH จากสีม่วงเป็นสีเหลืองที่ตำแหน่ง (R_f) ใกล้เคียงกัน แสดงถึงแคลลัสทุกสูตรอาหารมีองค์ประกอบทางเคมีที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระคล้ายคลึงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดกันภัยมหิดลในธรรมชาติ พบว่าจุดที่สีเปลี่ยนอยู่ที่ตำแหน่ง (R_f) ต่างกัน แสดงถึงองค์ประกอบทางเคมีที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ต่างกัน

รายการอ้างอิง

[1] ศูนย์ข้อมูลพืช สำนักวิชาการ-วิจัย องค์การสวนพฤกษศาสตร์ [โฮมเพจบนอินเตอร์เนต]. ไทย. ©2547 [ปรับปรุงข้อมูลล่าสุดเมื่อ 1 มกราคม 2556; สืบค้น 7 มกราคม 2556]. เข้าถึงได้จาก:http://www.qsbg.org/database/botanic_book%20full%20option/search_ detail.asp?Botanic_ID=882

[2] เต็ม สมิตินันทน์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544. กรุงเทพ: ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้; 2544.

[3] สำนักงานโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี [โฮมเพจบนอินเตอร์เนต]. ไทย. ©2544 [สืบค้น 7 มกราคม 2556]. เข้าถึงได้จาก: http://www.rspg.or.th/plants_data/pdata_04.htm

[4] ศศิวิมล แสวงผล และ ทยา เจนจิตติกุล. กันภัยมหิดล: พรรณไม้สัญลักษณ์ของมหาวิทยาลัยมหิดล. [Online]. [สืบค้น 7 มกราคม 2556]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/ENG/kan-phai.pdf

[5] กฤติยา ไชยนอก. การแยกสารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดปิโตรเลียมอีเธอร์ของใบกันภัยมหิดล. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล 2553.

[6] อุทยานหลวงราชพฤกษ์. [โฮมเพจบนอินเตอร์เนต]. ไทย. ©2544 [สืบค้น 7 มกราคม 2556]. เข้าถึงได้จาก:http://www.royalparkrajapruek.org/main3/vegetation_ detail. php?id=11

[7] สาวินีย์ ลายทอง และ ศรีสม สุวรรณวงศ์. ผลของ BA และ TDZ ต่อการเพิ่มปริมาณ และ GA3 ต่อการยืดยาวของยอดกันภัยมหิดลในสภาพปลอดเชื้อ. การประชุมวิชาการทางพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5. ภาควิชา พฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

[8] จิรนันท์ ธนสมบัติ และ วัชระ จินตโกวิท.การขยายพันธุ์ต้นกันภัยมหิดลด้วยระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช [Online]. [สืบค้น 7 มกราคม 2556]; [1 หน้า]. เข้าถึงได้จาก: http://www.sc.mahidol.ac.th/sciex2010/Abstract/Kanchanaburi/KA-O-01.pdf

[9] จารุวรรณ ลอรัชวี, จิราภรณ์ อุษณกรกุล และบัณฑิตา สัคยารักษ์. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2534.

[10] MN. Basic principles of TLC [Online]. [Cited 7 JAN 2013]; [45 pages]. Available at: http://www.watrex.cz/watrex/cz/dwn_ds.php?id=MACHEREY_NAGEL_TLC.pdf

[11] ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE. TLC Visualization Reagents [Online]. [Cited 7 JAN 2013]; [14 pages]. Available at: http://lcso.epfl.ch/files/content/sites/lcso/files/load/TLC_Stains.pdf

[12] ปิยศิริ สุนทรนนท์. สารต้านอนุมูลอิสระในดอกดาหลา.วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2551

[13] Kanchanapoom K, Ponpiboon T, Wirakiat W, Kanchanapoom K. Regeneration of lily (Lilium longiflorum “Easter lily”) by callus derived from leaf explants cultured in vitro. ScienceAsia. 2011;37:373-6.

[14] Sayd SS, Taie HA, Taha LS. Micropropagation, antioxidantactivity, total phenolics and flavonoids content of Gardenia jasminoides Ellis as affected by growth regulators. ijar. 2010;2(3):184-91.

[15] Yan M-M, Xu C, Kim C-H, Um Y-C, Bah AA, Guo D-P. Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (Allium chinense). Scientia Horticulturae. 2009;123(1):124-8.

[16] Maneechai S, De-Eknamkul W, Umehara K, Noguchi H, Likhitwitayawuid K. Flavonoid and stilbenoid production in callus cultures of Artocarpus lakoocha. Phytochemistry. 2012;81(0):42-9.

[17] Malik S, Cusidó RM, Mirjalili MH, Moyano E, Palazón J, Bonfill M. Production of the anticancer drug taxol in Taxus baccata suspension cultures: A review. Process Biochemistry. 2011;46(1):23-34.

ภาคผนวก

สูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

Nutrient	Culture media		
	MS	DKW	BTM
	g dL^{-1}		
Macronutrients			
NH_4NO_3	1.650	1.416	0.165
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	0.240
$CaCl_2$	0.326	0.109	0.0326
$Ca(NO_3) \times 4H_2O$	-	1.960	0.640
KH_2PO_4	0.170	0.258	0.170
K_2SO_4	-	1.560	0.860
KNO_3	1.9	-	0.190
$MgSO_4$	0.1805	0.383	0.1805
Micronutrients			
H_3BO_3	0.0062	0.0124	0.0062
$CuSO_4 \times 5H_2O$	2.5×10^{-5}	5×10^{-5}	2.5×10^{-4}
$MnSO_4 \times H_2O$	0.0169	0.032	0.0169
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	2.5×10^{-5}	5×10^{-4}	2.5×10^{-4}
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	0.0086	0.0212	0.0086
KI	0.00083	0.0016	0.00015
$CoCl_2 \times 6H_2O$	2.5×10^{-5}	5×10^{-5}	2×10^{-5}
$FeSO_4$Na EDTA	0.0367	0.0367	0.0367
Amino acids			
Glycine	0.002	0.001	-
Cysteine	-	0.001	-
Vitamins			
Nicotinic acid	0.0005	0.001	-
Thiamine HCl	0.0004	0.001	-
Pyridoxine	0.0005	0.001	-
Ca Pantothenate	-	0.001	-
Biotin	-	1×10^{-6}	-
Mioinositol	0.1	0.1	-

Adapted from Murashige and Skoog (1962); Driver and Kuniyuki (1984); Chalupa (1981); and Lloyd and McCown (1980). MS: Murashige and Skoog, DKW: Driver Kuniyuki Walnut, BTM: Broadleaf Tree, WPM: Woody Plant.