

ผลของสีแคลลัสและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อ ปริมาณสารทุติยภูมิของแคลลัสกระเจี๊ยบแดง

Effects of Callus Color and Culture Period on Secondary Metabolite Contents of Roselle Callus

เยาวพา จิระเกียรติกุล*, ปพิชญา ขวานทอง และภาณุมาศ ฤทธิไชย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

อรุณพร อิฐรัตน์

สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Yaowapha Jirakiattikul*, Papichaya Kwanthong and Panumart Rithichai

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Arunporn Itharat

Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

สีของแคลลัสและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแคลลัสมีผลต่อปริมาณสารทุติยภูมิของพืชสมุนไพร งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสีแคลลัสกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแคลลัสสีแดงต่อปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH จากการศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิของแคลลัสสีเขียวขาว แดง และแดงเข้ม พบว่าแคลลัสสีแดงเข้มมีปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมด (0.38 ± 0.08 mg cyd-3-glu/L) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (28.29 ± 3.16 mg GAE/g dry extract) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (13.22 ± 2.11 mg CE/g dry extract) สูงกว่าและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ($EC_{50} = 78.82 \pm 6.61$ μ g/mL) ดีกว่าแคลลัสสีแดง และสีเขียวขาว ส่วนการเพาะเลี้ยงแคลลัสสีแดงเข้มเป็นระยะเวลา 7-28 วัน พบว่าแคลลัสสีแดงเข้มที่เพาะเลี้ยงนาน 28 วัน มีปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (0.45 ± 0.08 mg cyd-3-glu/L) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด (11.34 ± 2.60 mg CE/g dry extract) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ($EC_{50} = 85.70 \pm 12.86$ μ g/mL) ดีกว่าแคลลัสที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงนาน 7-21 วัน ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง

คำสำคัญ : แคลลัส; กระเจี๊ยบแดง; แอนโทไซยานิน; ฟีนอลิก; ฟลาโวนอยด์

Abstract

Color and culture period of callus play important roles on secondary metabolite contents of medicinal plants. The objectives of this study were to investigate the effects of different colors of roselle calli and callus culture periods of dark- red colored- callus on contents of total anthocyanin, total phenolic and total flavonoid including DPPH radical scavenging activities. The secondary metabolite contents of different colored- calli: green- white, red and dark red was determined. The results revealed that the dark- red colored- callus contained higher total anthocyanin content (0.38 ± 0.08 mg cyd-3- glu/L), total phenolic content (28.29 ± 3.16 mg GAE/g dry extract), flavonoids content (13.22 ± 2.11 mg CE/g dry extract) and greater DPPH radical scavenging activity ($EC_{50} = 78.82 \pm 6.61$ μ g/mL) than the red and green- white colored- calli. At different culture periods (7-28 days), it was found that the dark- red colored- callus cultured for 28 days contained the higher contents of total anthocyanin (0.45 ± 0.08 mg cyd-3- glu/L), total flavonoid (11.34 ± 2.60 mg CE/g dry extract) and the greatest DPPH radical scavenging activity ($EC_{50} = 85.70 \pm 12.86$ μ g/mL) than those cultured for 7-21 days. However, there was no significant difference in total phenolic contents at all culture periods.

Keywords: callus; *Hibiscus sabdariffa*; anthocyanin; phenolic; flavonoid

1. บทนำ

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) หรือ roselle เป็นพืชที่สามารถนำส่วนต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น ยอดอ่อนนำไปรับประทาน มีผลดีต่อระบบหมุนเวียนโลหิต เมล็ดใช้เป็นยาบำรุงกำลัง และกลีบเลี้ยง (calyx) เป็นส่วนที่มีสรรพคุณทางยามากที่สุด [1] ประกอบด้วยกรดอินทรีย์หลายชนิด เช่น กรดซิตริก (citric acid) กรดมาลิก (malic acid) และมีสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ในปริมาณมาก นอกจากนี้ยังมีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ฟีนอลิก (phenolic acid) และมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สูงอีกด้วย [2] กลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงมีสรรพคุณในการลดความ

ดันโลหิต ป้องกันการเกิดนิ่วในกระเพาะปัสสาวะ ลดไขมันในเส้นเลือด ลดไข้ บรรเทาอาการอักเสบ มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา [2-4] อย่างไรก็ตาม การผลิตกระเจี๊ยบแดงในสภาพธรรมชาติยังคงมีข้อจำกัดจากปัจจัยด้านสภาพแวดล้อม เนื่องจากกระเจี๊ยบแดงเป็นพืชวันสั้น (short day plant) อีกทั้งยังมีความเสี่ยงต่อการถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอย และเพลี้ยอ่อน [5,6] ทำให้ผลผลิตที่ได้อาจมีปริมาณและคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอ ซึ่งส่งผลกระทบต่อผลผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ปัจจุบันการผลิตสารทุติยภูมิจากพืชสมุนไพรในสภาพควบคุมของห้องปฏิบัติการจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง ให้คุณภาพสม่ำเสมอ

และใช้เวลาสั้นกว่าการปลูกพืชทั่วไป ซึ่งการเพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นหนึ่งในหลายรูปแบบของการเพาะเลี้ยงที่นิยมนำมาศึกษาเพื่อสกัดและเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิ [7] ปิพิชญา [8] ได้รายงานถึงการพัฒนาแคลลัสเมื่อเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม โดยพบว่าอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/L เป็นอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส นอกจากนี้พบการพัฒนาของแคลลัสสีแดงขึ้นบนก้อนแคลลัสสีเขียวขาว และสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนแคลลัสสีแดง ซึ่งแคลลัสสีแดงนี้น่าจะเป็นแหล่งของสารทุติยภูมิที่สำคัญ เช่น แอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด รวมถึงสารต้านอนุมูลอิสระ จากรายงานของ Ramachandra Rao และ Ravishankar [9] กล่าวว่า การคัดเลือก cell line ที่มีสารทุติยภูมิสูงสามารถทำได้ง่ายหากสารทุติยภูมิที่ต้องการเป็นสารที่มีสี เช่น การคัดเลือกกลุ่มเซลล์ของโปิยเซียน (*Euphorbia milli*) ที่มีสี พบว่าสามารถผลิตสารแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้น [10] หรือการคัดเลือกแคลลัสที่มีสีเหลืองที่พัฒนาจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงของต้น *Gynochthodes umbellata* L. และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L พบว่ามีปริมาณสารแอนทราควิโนน (anthraquinone) สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (18.19 ± 0.58 mg/g DW) [11] แสดงให้เห็นว่าสีของแคลลัสสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือก และนำมาผลิตสารให้มีปริมาณสารสูงขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานถึงปริมาณสารทุติยภูมิของแคลลัสสีต่างกันในระยะเลี้ยงแดง

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณสารทุติยภูมิ โดย ทิพย์สุคนธ์ และคณะ [12] พบว่ายอดข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) มีปริมาณสาร dioscorealide B สูงสุดเมื่อ

เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลานาน 10 และ 12 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/L หรือการศึกษาปริมาณ total cryptotanshinone และ cryptotanshinone ของเซลล์แขวนลอย *Salvia miltiorrhiza* เป็นเวลา 5-16 วัน พบว่าปริมาณสารทั้ง 2 ชนิด เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง แต่ปริมาณ rosmarinic acid เพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน และลดลงเรื่อย ๆ ตามอายุการเพาะเลี้ยง [13] อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสสีแดงของกระเจี๊ยบแดงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานต่างกันนั้นยังไม่มีรายงาน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสีแคลลัสที่ต่างกัน และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแคลลัสสีแดงต่อปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสกระเจี๊ยบแดงกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม

2. อุปกรณ์วิธีการ

ตัดแยกแคลลัสสีแดงที่พัฒนาขึ้นเป็นจุดเล็ก ๆ บนก้อนแคลลัสสีเขียวขาวจากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงที่มีกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม (รูปที่ 1 A) จากนั้นนำแคลลัสสีแดงมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L และ BA ความเข้มข้น 1 mg/L เพื่อเพิ่มจำนวน โดยแคลลัสสีแดงนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ แคลลัสที่มีสีแดง และสีแดงเข้ม แล้วย้ายเลี้ยงจนแคลลัสทุกสีมีปริมาณมากเพียงพอในการทำทดลอง

2.1 ผลของสีแคลลัสต่อปริมาณสารทุติยภูมิ

นำแคลลัสสีเขียวขาว (รูปที่ 1 B) สีแดง (รูปที่ 1 C) และสีแดงเข้ม (รูปที่ 1 D) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/L เป็นเวลานาน 14

วัน นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze drier (รุ่น FDB-5503, Gperon) นำตัวอย่างแห้งของแคลลัสสีเขียวขาว สีแดง และสีแดงเข้มมาสกัดด้วย 95 % ethanol อัตราส่วน 1 : 3 โดยปริมาตร เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® No. 1 นำตัวอย่างแห้งส่วนที่เหลือมาสกัดด้วย 95 % ethanol ตามวิธีข้างต้นอีก 2 ครั้ง ระเหยสารสกัดทั้งหมดให้แห้งด้วยเครื่อง vacuum drier (รุ่น VD53, WTB binder) ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 40 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารทุติยภูมิ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ โดยวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารประกอบฟลาโวนอยด์ รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity วิธีการมีดังนี้

2.1.1 ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด

วิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดด้วยวิธี pH-differential ดัดแปลงจากวิธีของ Lee และคณะ [14] โดยละลายสารสกัดจากแคลลัสกระเจียบแดง 3 mg ด้วย ethanol ปริมาตร 3 mL จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 mL ใส่หลอดทดลองจำนวน 2 หลอด โดยในหลอดทดลองที่ 1 เติม 0.025 M potassium chloride ที่ pH 1.0 ปริมาตร 5 mL และหลอดทดลองที่ 2 เติม 0.4 M sodium acetate ที่ pH 4.5 ปริมาตร 5 mL เขย่าสารให้เข้ากันในแต่ละหลอด จากนั้นนำสารในหลอดทดลองแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 nm ตามลำดับ ด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer (รุ่น TCC-240A, Shimadzu) โดยค่าการดูดกลืนแสง (A) ของตัวอย่างคำนวณจาก $A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$

รายงานผลในหน่วยของ cyanidin-3-glucoside equivalents (mg/L) สามารถคำนวณโดย

อ้างอิงกับ cyanidin-3-glucoside (cyd-3-glu) จากสูตร ปริมาณแอนโทไซยานินทั้งหมดในสารสกัด = $[(A \times MW \times DF \times 10^3) \div \epsilon \times l]$ เมื่อ A คือ ค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสง; MW คือ มวลโมเลกุล cyanidin-3-glucoside = 449.2 g/mole; DF คือ ปริมาตรของสารละลายทั้งหมด ÷ ปริมาตรของสารสกัด; 10^3 คือ เฟคเตอร์เปลี่ยนหน่วย จาก g เป็น mg; ϵ คือ ค่าสัมประสิทธิ์ cyd-3-glu = $26,900 \text{ L} \times \text{mole}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$; l คือ แสงที่ส่องผ่าน cuvette (1 cm)

2.1.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Folin และ Ciocalteu [15] เตรียมสารสกัดแคลลัสของกระเจียบแดง 1 mg ละลายด้วย absolute ethanol ปริมาตร 1 mL จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 20 μL ใส่ในหลุม 96 well-microplates เติมสารละลาย 2 M Folin-Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 100 μL และเติมสารละลาย 7.5 % w/v Na_2CO_3 ปริมาตร 80 μL จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง microplate Reader (รุ่น Power Ware XS, Biotex) โดยใช้ absolute ethanol ปริมาตร 20 μL ร่วมกับ Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 100 μL และ 7.5 % w/v Na_2CO_3 ปริมาตร 80 μL เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid โดยมีหน่วยเป็น mg ของ gallic acid equivalents (GAE) ต่อสารสกัดชั้น ethanol 1 g (mg GAE/g dry extract)

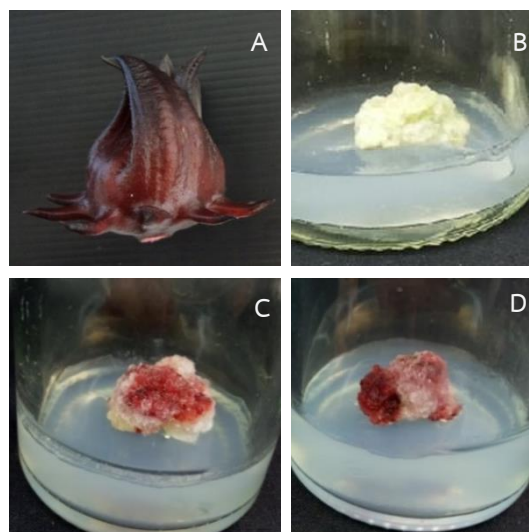
2.1.3 วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Zhu และคณะ [16] นำสารสกัดแคลลัสของกระเจี๊ยบแดง 1 mg ละลายใน absolute ethanol ปริมาตร 1 mL จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิดเตาสารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 μ L ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย 5 % NaNO_2 ปริมาตร 75 μ L ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10 % AlCl_3 ปริมาตร 150 μ L ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 6 นาที เติม 1 M NaOH และน้ำกลั่น ปริมาตร 500 และ 275 μ L ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลา ปิดเตาสารละลาย ปริมาตร 200 μ L ใส่ในหลุม 96 well-microplates และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ catechin โดยมีหน่วยเป็น mg ของ catechin equivalents (CE) ต่อสารสกัดขึ้น ethanol 1 g (mg CE/g dry extract)

2.1.4ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH radical scavenging activity

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Yamasaki และคณะ [17] นำสารสกัดแคลลัสของกระเจี๊ยบแดง 10 mg มาละลายในตัวทำละลาย absolute ethanol ปริมาตร 1 mL จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิดเตาสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200, 100, 50 และ 25 μ g/mL จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 μ L ใส่ลงในหลุม 96 well-microplates และเติมสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 μ L ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ 100 μ L

และเติม absolute ethanol ปริมาตร 100 μ L เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง ใช้ absolute ethanol ปริมาตร 100 μ L ร่วมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 μ L เป็น control และใช้ BHT เป็นสารแอนติออกซิแดนท์มาตรฐาน (positive control) คำนวณหา % การยับยั้งอนุมูล DPPH ตามสมการด้านล่าง และคำนวณหาค่า EC_{50} (ค่าความสามารถของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ที่ 50 %) โดย % inhibition = $[(\text{OD control} - \text{OD sample}) \div \text{OD control}] \times 100$ เมื่อ OD control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม; OD sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ



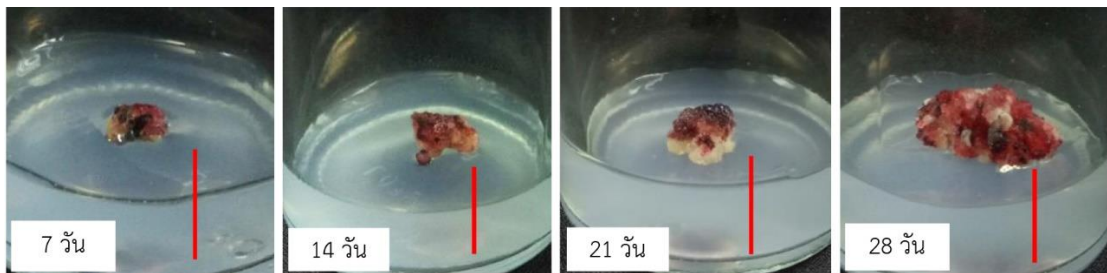
รูปที่ 1 (A) กลีบเลี้ยงสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดงที่นำมาศึกษา (B) แคลลัสกระเจี๊ยบแดงมีสีเขียว (C) สีแดง และ (D) สีแดงเข้ม

2.2 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิ

นำแคลลัสสีแดงเข้มมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/L เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28

วัน (รูปที่ 2) วางแผนการทดลองแบบ CRD แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ นำแคลลัสในทุกสิ่งทดลองไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze drier สกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สารประกอบฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ตามวิธีการที่กล่าวไปแล้วข้างต้น



รูปที่ 2 ลักษณะแคลลัสสีแดงเข้มกระจุกแน่นที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/L หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 7-28 วัน (ขีดสีแดงในภาพมีความยาว 1 cm)

3. ผลและวิจารณ์

3.1 ผลของสีแคลลัสต่อปริมาณสารทุติยภูมิ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดของแคลลัสสีเขียวขาว สีแดง และสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 14 วัน พบว่าแคลลัสสีแดงเข้มมีปริมาณสารแอนโทไซยานินสูง (0.38 ± 0.08 mg cyd-3-glu/L) และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแคลลัสสีแดง และแคลลัสสีเขียวขาวที่มีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 0.14 ± 0.04 และ 0.09 ± 0.02 mg cyd-3-glu/L ตามลำดับ (รูปที่ 3A) นอกจากนี้แคลลัสสีแดงเข้มมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 28.29 ± 3.16 mg GAE/g dry extract (รูปที่ 3B) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณดังกล่าวของแคลลัสสีแดง (21.37 ± 4.03 GAE/g dry extract) ในขณะที่แคลลัสสีเขียวขาวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดน้อยสุดเท่ากับ 7.68 ± 4.54 mg GAE/g dry extract ส่วนปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดพบว่า

แคลลัสสีแดงเข้มมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 13.22 ± 2.11 mg CE/g dry extract ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับแคลลัสสีแดง และสีเขียวขาวที่มีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 5.84 ± 0.29 และ 4.64 ± 1.48 mg CE/g dry extract ตามลำดับ (รูปที่ 3C) และแคลลัสสีแดงเข้มมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด ซึ่งมีค่า EC_{50} เท่ากับ 78.82 ± 6.61 μ g/mL (รูปที่ 3D) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าดังกล่าวของแคลลัสสีแดง ($EC_{50} = 123.90 \pm 9.93$ μ g/mL) ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของแคลลัสสีเขียวขาวพบว่ามีฤทธิ์น้อยสุด โดยมีค่า $EC_{50} = 1,796.83 \pm 678.71$ μ g/mL

ผลการทดลองแคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดง มีปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด (รูปที่ 3) แสดงให้เห็นว่าสีของแคลลัสสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกกลุ่มเซลล์

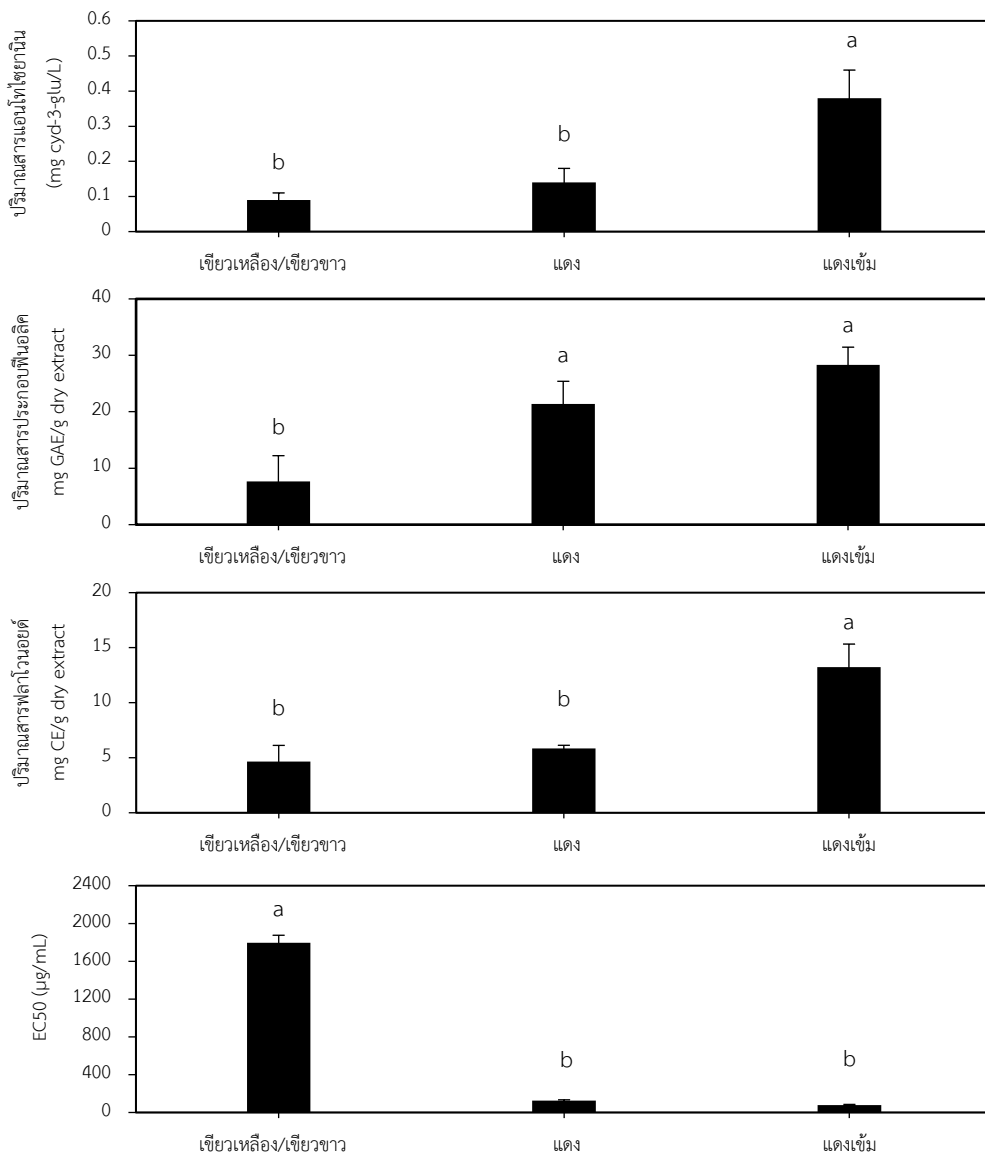
เพื่อใช้สกัดสารทุติยภูมิ ดังเช่นที่ Ramachandra Rao และ Ravishankar [9] กล่าวว่าในการคัดเลือก cell line ที่มีสารทุติยภูมิสูง จะทำได้ง่ายหากสารทุติยภูมิที่ต้องการเป็นสารที่มีสี เช่น การคัดเลือกกลุ่มเซลล์ของเป็ยเซียน (*E. milli*) โดยเลือกจากเซลล์ที่มีสีเกิดขึ้นก็สามารถผลิตสารแอนโทไซยานินได้เพิ่มขึ้น [10] หรือจากการศึกษาของ Anjusha และ Gangaprasad [11] ที่นำขึ้นส่วนใบและปล้องจากต้น *G. umbellata* L. ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ และเจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติมาชักนำให้เกิดแคลลัสบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L พบว่าแคลลัสที่พัฒนาส่วนใหญ่มีสีขาว ยกเว้นแคลลัสที่พัฒนาจากขึ้นส่วนใบเลี้ยงของต้นที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีสีเหลือง และเมื่อนำแคลลัสสีเหลืองนี้ไปทดสอบความเข้มข้นของ 2,4-D ที่เหมาะสมต่อการสร้างสาร anthraquinone โดยใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5-5.0 mg/L พบว่าการเพาะเลี้ยงแคลลัสสีเหลืองบนอาหารที่มี 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L มีปริมาณสาร anthraquinone สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (18.19 ± 0.58 mg/g DW) ดังนั้นแคลลัสสีแดงเข้มที่พัฒนาจากใบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงกลีบเลี้ยงสีแดงเข้ม เป็นแคลลัสที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ศึกษา เพื่อผลิตสารทุติยภูมิต่อไป

3.2 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิ

หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/L เป็นระยะเวลา 7-28 วัน พบว่าปริมาณสารแอนโทไซยานินคงที่ในช่วงแรก 7-21 วันหลังการเพาะเลี้ยง โดยมีปริมาณสารดังกล่าวอยู่ในช่วง 0.17 ± 0.06 ถึง 0.19 ± 0.06 mg cyd-3-glu/L แต่เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 28 วัน พบว่าแคลลัสมีการสร้างและสะสมสารแอนโท

ไซยานินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเท่ากับ 0.45 ± 0.08 mg cyd-3-glu/L (รูปที่ 4A) ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของแคลลัสสีแดงเข้ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยปริมาณสารดังกล่าวมีค่าอยู่ในช่วง 22.89 ± 2.12 ถึง 26.75 ± 4.15 mg GAE/g dry extract (รูปที่ 4B) ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของแคลลัสสีแดงเข้มสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 28 วัน โดยมีค่าเท่ากับ 11.34 ± 2.60 mg CE/g dry extract ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับปริมาณสารดังกล่าวของแคลลัสที่เพาะเลี้ยงนาน 7-21 วัน (6.08 ± 1.74 ถึง 8.39 ± 1.56 mg CE/g dry extract) (รูปที่ 4C) นอกจากนี้แคลลัสมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสนาน 7 และ 28 วัน โดยมีค่า $EC_{50} = 91.86 \pm 14.33$ และ 85.70 ± 12.86 μ g/mL ตามลำดับ ในขณะที่แคลลัสที่เพาะเลี้ยงนาน 14 และ 21 วัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำ โดยมีค่า EC_{50} 111.55 ± 17.98 และ 105.53 ± 9.36 μ g/mL ตามลำดับ (ภาพที่ 4 D) ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของ BHT ซึ่งเป็น positive control มีค่า EC_{50} เท่ากับ 16.75 ± 1.95 μ g/mL (ไม่ได้แสดงค่าในภาพ)

ผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดงมีการสะสมสารแอนโทไซยานิน ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 28 วัน อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิจะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ดังที่ Simões และคณะ [18] เพาะเลี้ยงแคลลัส *Cleome rosea* เป็นระยะเวลา 25 วัน โดยวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดของแคลลัสทุก ๆ 5 วัน พบว่าแคลลัสมีการสะสมสารแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 5-15 ของการเพาะเลี้ยง โดย



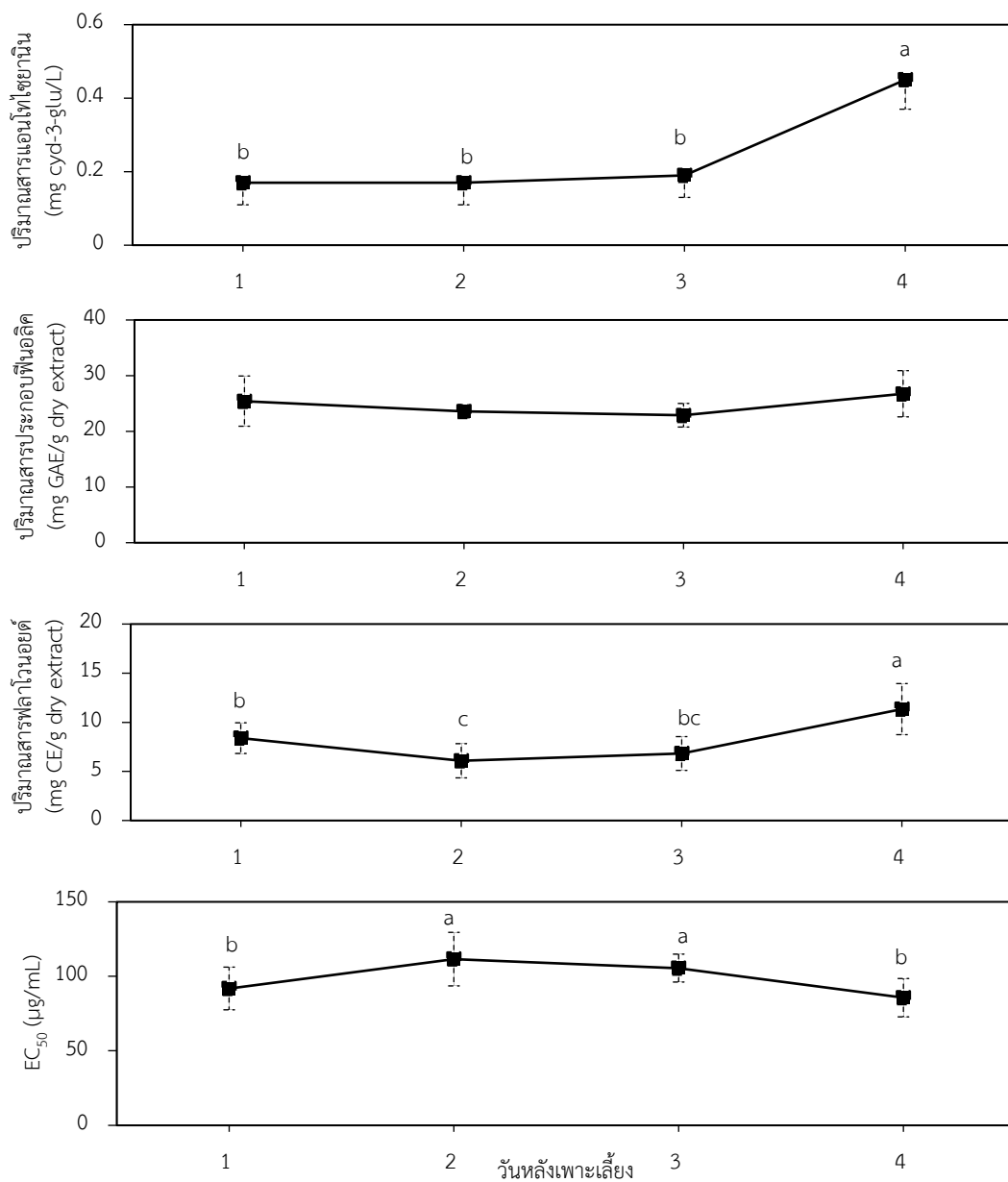
รูปที่ 3 (A) สารแอนโทไซยานินทั้งหมด (B) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (C) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และ (D) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของแคลลัสสี่ต่าง ๆ ของกระเจี๊ยบแดงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/L เป็นเวลา 14 วัน

ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงแคลลัสมีปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 10.04 ± 1.84 CV/g FW ซึ่งปริมาณสารแอนโทไซยานินนี้คงที่จนถึงวันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยง แต่หากเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารเดิมนานกว่า 25 วัน แคลลัสจะค่อย ๆ

เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งมีสาเหตุมาจากเกิดเสื่อมสลายของรงควัตถุ นอกจากนี้ยังมีรายงานในเซลล์แขวนลอย *Celastrus paniculatus* ที่พบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง เซลล์มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำ (6.77 ± 1.43 $\mu\text{g/g}$) แต่เมื่อ

เพาะเลี้ยงนานขึ้นเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์มีการสะสมสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงขึ้น ($8.30 \pm 1.34 \mu\text{g/g}$) และปริมาณสารลดลง ($5.30 \pm 1.52 \mu\text{g/g}$) หลังเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 72 ชั่วโมง [19] ดังนั้นชนิดของพืช

อาหารเพาะเลี้ยง รูปแบบการเพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการสะสมสารทุติยภูมิ [7]



รูปที่ 4 (A) สารแอนโทไซยานินทั้งหมด (B) สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (C) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และ (D)ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของแคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดงที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1 mg/L เป็นเวลานาน 7-28 วัน

4. สรุป

4.1 แคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดงมีปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าแคลลัสสีเขียว และสีแดง

4.2 แคลลัสสีแดงเข้มของกระเจี๊ยบแดงมีการสะสมสารแอนโทไซยานิน ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 28 วัน

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนา มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

6. รายการอ้างอิง

- [1] กฤษณา บุญศิริ, 2535, อิทธิพลของวันปลูก ระยะปลูก และการตัดยอดต่อผลผลิตและคุณภาพของกระเจี๊ยบแดง, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [2] Ali, B.H., Wabel, N.A. and Blunden, G., 2005, Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review, *Phytother. Res.* 19: 369-375.
- [3] Mahadevan, N., Shivali and Kamboj, P., 2009, *Hibiscus sabdariffa* Linn.: An overview, *Nat. Prod. Rad.* 8: 77-83.
- [4] Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I. and Heinrich, M., 2014, *Hibiscus sabdariffa* L.: A phytochemical and pharmacological review, *Food Chem.* 165: 424-443.
- [5] Morton, J.F., 1987, *Fruits of Warm Climate*, Florida Flair Books, Miami, 505 p.
- [6] Babatunde, F.E. and Mofoke, A.L.E., 2006, Performance of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as influenced by irrigation schedules, *Pak. J. Nutr.* 5: 363-367.
- [7] วราภรณ์ ภูตะลุน, 2551, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา, ขอนแก่น, 120 น.
- [8] ปพิชญา ขวานทอง, 2559, ผลของ Phenylalanine และ Jasmonic acid ต่อปริมาณสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ของแคลลัส กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) ในสภาพปลอดเชื้อ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.
- [9] Ramachandra Rao, S. and Ravishankar, G.A., 2002, Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* 20: 101-153.
- [10] Yamamoto, T., Mizugushi, R. and Yamada, Y., 1982, Selection of a high stable pigment producing strain in cultured *Euphorbia milli* cells, *Theor. Appl. Genet.* 16: 113-116.
- [11] Anjusha, S. and Gangaprasad, A.N., 2017, Callus culture and in vitro production of anthraquinone in *Gynochthodes umbellata* (L.) Razafim. & B. Bremer (Rubiaceae), *Ind. Crops Prod.* 95: 608-614.
- [12] ทิพย์สุคนธ์ บุญเย็น, เขาวพา จิระเกียรติกุล,

- ภาณุมาศ ฤทธิไชย, ศรีโสภา เรืองหนู และอรุณพร อัฐรัตน์, 2557, ปริมาณ dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างกัน, แก่นเกษตร 42: 306-310.
- [13] Chen, H. and Chen, F., 2000, Effect of yeast elicitor on the secondary metabolism of Ti-transformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension culture, Plant Cell Rep. 19: 710-717.
- [14] Lee, J., Durst, R.W. and Wrolstad, R.E., 2005, Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study, J. AOAC Int. 88: 1269-1278.
- [15] Folin, O. and Ciocalteu, V., 1927, On tyrosine and tryptophan determination in proteins, J. Bio. Chem. 27: 627-650.
- [16] Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y. and Tang, T., 2010, Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies, Food Anal. Methods. 3: 90-97.
- [17] Yamasaki, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T. and Sato, T., 1994, Electrochemical method for estimating the antioxidative effect of methanol feeding, Enzyme Microb. Tech. 36: 133-138.
- [18] Simões, C., Bizarri, C.H.B., Cordeiro, L.S., Castro, T.C., Coutada, L.C.M., Silva, A.J.R., Albarello, N. and Mansur, E., 2009, Anthocyanin production in callus cultures of *Cleome rosea*: Modulation by culture conditions and characterization of pigments by means of HPLC-DAD/ESIMS, Plant Physiol. Bioch. 45: 895-903.
- [19] Anusha, T.S., Joseph, M.V. and Elyas, K.K., 2016, Callus induction and elicitation of total phenolics in callus cell suspension culture of *Celastrus paniculatus* – willd, an endangered medicinal plant in India, Pharmacogn. J. 8: 471-475.