ผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of Culture Periods on Secondary Metabolite Contents and Antioxidant Activity of *In Vitro Bacopa monnieri* Shoots

เจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล, เยาวพา จิระเกียรติกุล* และภาณุมาศ ฤทธิไชย

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

อรุณพร อิฐรัตน์

สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Jermaroon Autaijamsripon, Yaowapha Jirakiattikul* 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

พรมมิ [*Bacopa monnieri* (L.) Penn.] เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการบำรุงสมอง และช่วยเพิ่มความจำ มีสารทุติยภูมิที่สำคัญหลายชนิด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีรายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรมมิแล้ว แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงผลของระยะเวลาการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อต่อปริมาณสารทุติยภูมิของยอดพรมมิ ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงส่วนข้อบนอาหารสูตร MS (Murashige & Skoog) ที่เติม 0.1 mg/l BA (6-benzyladenine) เป็นระยะเวลานาน 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (total phenolic compound) สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid content) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ของยอดพรมมิเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อระยะเวลาต่างกัน เปรียบเทียบกับยอดที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ จากการทดลองพบว่ายอดพรมมิที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 2 และ 8 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงเท่ากับ 198.48$\pm$4.43 และ

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** yjira@yahoo.com

186.81±6.92 mg catechin/g DW ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างสิ่งทดลอง ส่วนยอดที่เจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อทุกระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดน้อยกว่ายอดที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ไม่แตกต่างกันทางสถิติในทุกสิ่งทดลอง

คำสำคัญ : พรมมิ; ระยะเวลาเพาะเลี้ยง; สารทุติยภูมิ; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Bacopa monnieri (L.) Penn., a medicinal plant, has been used as brain tonic and improving human memory formation. This plant species contains several types of secondary metabolites and has antioxidant activity. Plant tissue culture of *B. monnieri* has been studied but there is no report on effect of *in vitro* culture periods on secondary metabolite contents in *B. monnieri* shoots. Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of culture periods on secondary metabolite contents and antioxidant activity of *B. monnieri* shoots grown under *in vitro* condition. Single node segments were cultured on MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with 0.1 mg/l BA (6-benzyladenine) for 2, 4, 6 and 8 weeks. Then, the contents of total phenolic and total flavonoid, and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging capacity of regenerated shoots at different culture periods were determined. *B. monnieri* shoots grown under *in vivo* conditions were used as a control treatment. The results showed that the 2 and 8 week-old regenerated shoots exhibited high total flavonoid contents of 198.48±4.43 and 186.81±6.92 mg catechin/g DW, respectively which were not significantly different between the treatments. Total phenolic and total flavonoid contents of *In vitro* regenerated shoots at all culture periods were significantly lower than those grown under *in vivo.* However, DPPH radical scavenging activity (EC_{50}) were not significantly different among the treatments.

Keywords: antioxidant activity; *Bacopa monnieri*; culture period; flavonoid; phenolic compound

1. บทนำ

พรมมิ [*Bacopa monnieri* (L.) Penn.] เป็นพืชในวงศ์ Scrophulariaceae เป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็ก พบขึ้นตามริมน้ำและที่ชื้นแฉะ มีถิ่นกำเนิดจากประเทศเนปาลและอินเดีย จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่ามีสรรพคุณในการบำรุงสมอง ช่วยเสริมความจำ ป้องกันเซลล์ประสาท ต้านการซึมเศร้า และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [1] มีองค์ประกอบของสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) หลายกลุ่ม ได้แก่ อัลคาลอยด์ (alkaloid) ไกลโคไซด์ (glycoside) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และซาโปนิน (saponin) [2] จากการที่พรมมิเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณมาก ทำให้เป็นที่ต้องการทางการแพทย์ แต่การสกัดสารสำคัญให้ได้ปริมาณมากนั้นจำเป็นต้องใช้ต้นพืชเป็นจำนวนมาก

ด้วยเช่นกัน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จึงมีบทบาทอย่างยิ่งในด้านการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนต้นพรมมิให้ได้จำนวนมากในระยะเวลาที่สั้นกว่าการเพาะปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งจะทำให้สามารถสกัดสารทุติยภูมิที่สำคัญให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการได้ โดยปริมาณสารทุติยภูมิของพืชที่ผลิตในสภาพปลอดเชื้อนี้ จะไม่แปรผันตามสภาพภูมิประเทศ และสภาพภูมิอากาศ [3] การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพรมมิได้มีรายงานแล้วโดย ยงศักดิ์ และอัญชลี [4] พบว่าการเพาะเลี้ยงข้อของพรมมิบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดสูงสุด ส่วนสารสกัดของพรมมิ Mohan และคณะ [5] รายงานว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบของพรมมิบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA (1-naphthyl acetic acid) ความเข้มข้น 0.5 mg/l ร่วมกับ TDZ (N-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol-5-yl urea) ความเข้มข้น 0.25 mg/l เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค (phenolic compound) ฟลาโวนอยด์ แคโรทีนอยด์ (carotenoid) และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าลำต้นที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ นอกจากนี้ ศิริลักษณ์ และคณะ [6] พบว่าแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงส่วนของลำต้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin (furfurylamino purine) ความเข้มข้น 1 mg/l ร่วมกับ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) ความเข้มข้น 0.5 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีปริมาณสารกลุ่มซูโดจูจูโบจีนิน (Pseudojujubogenin) สูงสุด เท่ากับ 9.29± 1.62 mg/g DW

การผลิตสารทุติยภูมิด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น พบว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณสารทุติยภูมิ [7] โดย Chen และ Chen [8] ศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของ *Salvia miltiorrhiza* เป็นเวลา 5 ถึง 16 วัน พบว่าปริมาณ total cryptotanshinone และ cryptotanshinone เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง แต่ปริมาณ rosmarinic acid เพิ่มขึ้นสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน และลดลงเรื่อย ๆ ตามอายุการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้จากการศึกษาปริมาณ dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l เป็นเวลา 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์ พบว่ายอดมีปริมาณสาร dioscorealide B สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 10 และ 12 สัปดาห์ [7] ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหากนำต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาสกัดสารเร็วเกินไปอาจส่งผลให้ได้ปริมาณสารน้อย แต่หากสกัดสารจากต้นที่เพาะเลี้ยงนานเกินไปปริมาณสารที่ได้อาจไม่แตกต่างกันกับต้นที่มีระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่า นอกจากนี้ยังทำให้เสียเวลาในการเพาะเลี้ยงรวมถึงผลิตสารได้ช้าลงด้วย ซึ่งปริมาณสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในยอดพรมมิในสภาพปลอดเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานต่างกันยังไม่มีรายงาน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดพรมมิในสภาพปลอดเชื้อเปรียบเทียบกับยอดที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

นำยอดพรมมิที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมาตัดใช้เฉพาะส่วนข้อ ให้มีความยาวประมาณ 0.5 cm เพาะเลี้ยงชิ้นส่วนดังกล่าวบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 mg/l น้ำตาล 30 g/l และวุ้น 8 g/l นำไปวางในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2 °C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน โดยเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็น

เวลา 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับยอดที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 5 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ และแต่ละซ้ำมีจำนวนยอดมากพอที่จะให้น้ำหนักแห้ง 2 g เมื่อครบกำหนดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงชั่งน้ำหนักสดยอด แล้วนำยอดไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งยอด จากนั้นนำตัวอย่างแห้งมาสกัดตามวิธีของ Jaiarree [9] ด้วย ethanol ความเข้มข้น 95 % ใช้ตัวอย่างแห้งและ ethanol อัตรา 1:3 โดยสกัดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งสกัดนาน 3 วัน แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 นำสารสกัดที่ได้มาระเหยใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จนกว่าสารสกัดตัวอย่างจะมีน้ำหนักคงที่ และนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity โดยวิธีการวิเคราะห์มีดังนี้

2.1 ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมดในยอดพรมมิ โดยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Folin and Ciocalteu [10] โดยละลายสารสกัดพรมมิ 1 mg ด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายปริมาตร 20 µl ลงใน 96 well-microplate เติมสารละลาย 2 M Folin-Ciocalteu's reagent ที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 100 µl และเติมสารละลาย 7.5 % w/v Na_2CO_3 ปริมาตร 80 µl ทำซ้ำ 4 หลุม microplate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ด้วยเครื่อง microplate reader 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 คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในสารตัวอย่าง (mg/GAE/g dry extract) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid

2.2 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Zhu และคณะ [11] นำสารสกัดพรมมิมาละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml ปิเปตสารละลายปริมาตร 500 µl ลงในหลอดทดลอง เติม 5 % w/v $NaNO_2$ ปริมาตร 75 µl และเติม 10 % w/v $AlCl_3$ ปริมาตร 150 µl ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติม 1 M NaOH ปริมาตร 500 µl และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 275 µl บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารละลายปริมาตร 200 µl ลงใน 96 well-microplate แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 nm ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mg catechin/g DW) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน catechin

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity โดยดัดแปลงจากวิธีของ Yamasaki และคณะ (1994) ซึ่งอ้างโดย Jaiarree [9] นำสารสกัดพรมมิมาละลายด้วยตัวทำละลาย absolute ethanol อัตราส่วน 1 mg/ml นำไป sonicate เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 200, 100ม 50 และ 25 µg/ml จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 100 µl ลงใน 96 well-microplate และเติมสารละลาย DPPH (2, 2-diphenyl-1-

picrylhadrazyl) ปริมาตร 100 µl ทำซ้ำ 3 หลุม microplate ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดนาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่อง microplate reader โดยใช้สารละลายตัวอย่างความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 100 µl และเติม absolute ethanol ปริมาตร 100 µl เป็น blank ของสารละลายตัวอย่าง และใช้ absolute ethanol ปริมาตร 100 µl ร่วมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 µl เป็น control คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูล DPPH จากนั้นคำนวณหาค่า EC_{50} (ค่าความสามารถของสารสกัดที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ที่ 50 %)

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ด้วยโปรแกรม SAS

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

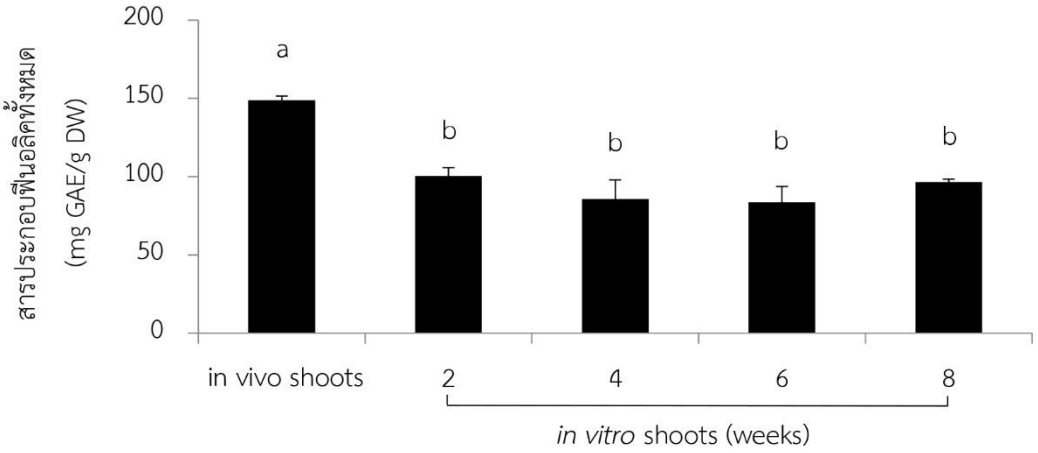
3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (148.80±2.73 mg/GAE/g dry extract) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่เจริญ เติบโตในสภาพปลอดเชื้อทุกระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 1) โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดพรมมิที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 2-8 สัปดาห์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 83.67±10.04 ถึง 100.50±5.24 mg/GAE/g dry extract จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Mohan และคณะ [5] ที่รายงานว่าสารประกอบฟีนอลิคของต้นพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (686.5 µg/ml) สูงกว่าในแคลลัส (660.5 µg/ml) ที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จากผลการทดลองนี้ยังแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดพรมมิที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ ทั้งนี้อาจเนื่องจากยอดของพรมมิมีการผลิตสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดในปริมาณเพียงเท่านี้ไม่สามารถผลิตเพิ่มขึ้นได้แม้ว่าจะมีการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของทิพย์สุคนธ์ [12] ที่เพาะเลี้ยงยอดข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill) เป็นเวลา 4-16 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดมีค่าอยู่ในช่วง 56.70±5.76 ถึง 65.23±3.05 mg GAE/g dry extract ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติในแต่ละระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง เช่นเดียวกันกับยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 4-12 สัปดาห์ พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยปริมาณสารดังกล่าวอยู่ในช่วง 54.17±0.05 ถึง 68.14±0.03 mg GAE/g dry extract [13]

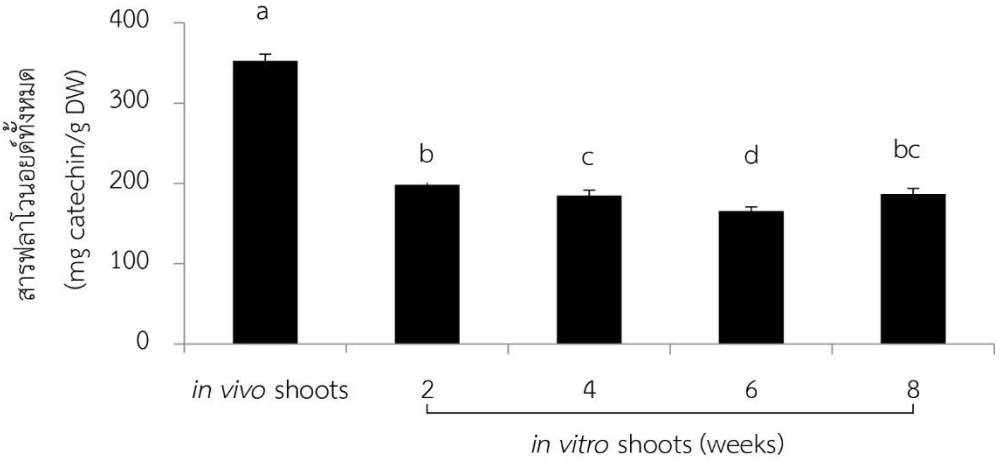
3.2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (357.48±8.52 mg catechin/g DW) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของยอดที่เจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อทุกระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 2) โดยผลการทดลองนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และสอดคล้องกับรายงานของ Mohan และคณะ [5] ที่พบว่าต้นพรมมิที่ปลูกในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ 585.5 µg/ml ในขณะที่แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของพรมมิมีปริมาณสารดังกล่าว 535 µg/ml จากการทดลองนี้พบว่ายอด

พรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดลดลงตามระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง ในช่วง 2-6 สัปดาห์ โดยยอดพรมมิที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูง เท่ากับ 198.48±4.43 mg catechin/g DW เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 และ 6 สัปดาห์ ปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดลดลง เท่ากับ 184.76±6.87 และ 165.43±5.28 mg catechin/g DW ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อเพาะเลี้ยงยอดเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เท่ากับ 186.81±6.92 mg catechin/g DW ซึ่งไม่แตกต่างต่างกันทางสถิติกับปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดพรมมิที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์



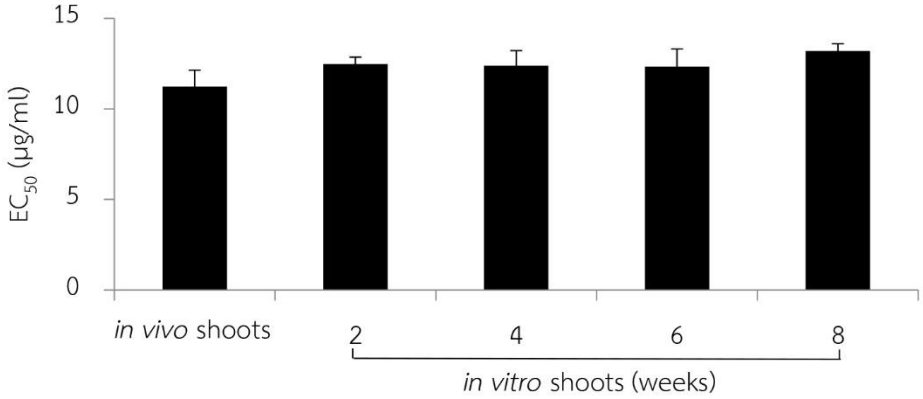
รูปที่ 1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลานาน 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์



รูปที่ 2 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะ เวลานาน 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์

3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH

ยอดพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและสภาพปลอดเชื้อที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (รูปที่ 3) โดยยอดพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (EC_{50}) เท่ากับ 11.23±0.91 µg/ml ส่วนยอดพรมมิที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 2-8 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (EC_{50}) อยู่ในช่วง 12.48±0.38 ถึง 13.21±0.39 µg/ml แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของยอดในสภาพปลอดเชื้อมีฤทธิ์ดีใกล้เคียงกับยอดที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ อย่างไรก็ตาม ได้มีรายงานว่าต้นพรมมิที่ปลูกในสภาพธรรมชาติมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (76.55 %) สูงกว่าในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบในสภาพปลอดเชื้อ (71.17 %) [5] จากการที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดพรมมิ และสอดคล้องกับรายงานของทิพย์สุคนธ์ [12] ที่พบว่ายอดข้าวเย็นใต้ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4-16 วัน มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 45.70±0.19 ถึง 54.38±7.87µg/ml เช่นเดียวกับรัชนีวรรณ และคณะ [13] พบว่ายอดหัวข้าวเย็นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4-12 สัปดาห์ โดยมีค่า EC_{50} อยู่ในช่วง 39.89±2.14 ถึง 49.97±9.23 µg/ml



รูปที่ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (EC_{50}) ของยอดพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติและสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลานาน 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ายอดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถสังเคราะห์สารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกับพืชที่ปลูกในสภาพธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของวราภรณ์ [3] ที่กล่าวว่าพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีลักษณะทางพันธุกรรมไม่แตกต่างกับต้นที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ จึงสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้เช่นเดียวกัน แต่ปริมาณสารที่ได้จากต้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจน้อยกว่าต้นที่ปลูกในธรรมชาติ ดังที่ได้รายงานโดย Mohan และคณะ [5] ที่พบว่าสารประกอบฟีนอลิค ฟลาโวนอยด์ และสารต้านอนุมูลอิสระในแคลลัสของพรมมิมีปริมาณน้อยกว่าต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ เช่นเดียวกันกับ

ปริมาณสารซูโดจูจูโบจีนินที่พบในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (9.29±1.62 mg/g DW) มีปริมาณน้อยกว่าต้นพรมมิที่ได้จากธรรมชาติอายุ 4 เดือน (16.75±3.14 mg/g DW) [6] และ Schmeda-Hirschmann และคณะ [14] พบว่าต้นอ่อน *Solidago chilensis* Meyen ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการผลิตสาร solidagenon เท่ากับ 0.3 % DW ในขณะที่ต้นจากธรรมชาติมีปริมาณสาร solidagenon เท่ากับ 0.5-3.5 % DW อย่างไรก็ตาม มีพืชอีกหลายชนิดที่พบว่าปริมาณสารทุติยภูมิที่ได้จากเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อสูงกว่าต้นที่ปลูกหรือเจริญเติบโตในธรรมชาติ เช่น มะรุม พบว่าแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรากของมะรุมมีปริมาณสาร peroxidase (167.25±16.12 unit/mg protein) สูงกว่ารากมะรุมที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (19.73±0.18 unit/mg protein) [15] และในผักหวานบ้าน พบว่าปลายยอดของผักหวานบ้านที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อและผ่านการให้รังสียูวีซีเป็นเวลา 5 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC_{50}) สารประกอบฟีนอลิคและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 10.13±0.99 mg/ml 15.54±1.56 mg GAE/100g FW และ 63.64±3.67 mg QE/100 g FW ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าปลายยอดที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติที่มีปริมาณสารดังกล่าวเท่ากับ 18.77±2.83 mg/ml 6.02±0.49 mg GAE/100 g FW และ 41.99±1.49 mg QE/100 g FW ตามลำดับ [16]

ถึงแม้ว่าจากการทดลองนี้ยอดพรมมิที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผลิตสารทุติยภูมิได้ในปริมาณที่น้อยกว่ายอดที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ แต่หากพิจารณาถึงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่ายอดพรมมิที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถผลิตสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงเมื่อยอดมีอายุเพียง 2 สัปดาห์ ซึ่งการผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมต่อการผลิตสารของพืช ปริมาณสารไม่ผันแปรตามสภาพภูมิประเทศ และสภาพอากาศ สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตลอดเวลา และสารทุติยภูมิที่ได้จะไม่แตกต่างกันระหว่างรุ่นการผลิต [3]

4. สรุป

การผลิตสารทุติยภูมิจากพรมมิในสภาพปลอดเชื้อ ควรเพาะเลี้ยงยอดพรมมิเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ โดยมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูง 198.48±4.43 mg catechin/g DW และยอดพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดน้อยกว่ายอดพรมมิที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

6. รายการอ้างอิง

[1] Russo, A. and Borrelli, F. 2005. *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: An overview, Phytomedicine 12: 305-317.

[2] Mathew, J., Paul, J., Nandhu, M.S. and Paulose, C.S., 2010, *Bacopa monnieri* and Bacoside-A for ameliorating epilepsy associated behavioral deficits, Fitoterapia

81: 315-322.

[3] วราภรณ์ ภูตะลุน, 2551, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร : แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา, ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา, ขอนแก่น, 120 น.

[4] ยงศักดิ์ ขจรผดุงกิตติ และอัญชลี จาละ, 2557, อิทธิพลของ BA และ NAA ที่มีต่อการเพิ่มจำนวนยอดต้นพรมมิโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, Thai J. Sci. Technol. 3: 8-14.

[5] Mohan, N., Jassal P.S., Kumar, V. and Singh, R.P., 2011, Comparative *in vitro* and *in vivo* study of antioxidants and phytochemical content in *Bacopa monnieri*, Recent Res. Sci. Technol. 3: 78-83.

[6] ศิริลักษณ์ กมลวรรณสิทธิ์ วราภรณ์ ภูตะลุน วธู พรหมพิทยารัตน์ กรกนก อิงคนินันท์ และฮิโรยูกิ ทานากะ. 2550. การสร้างสารกลุ่มซูโดจูจูโบจีนินจากแคลลัสเพาะเลี้ยงพรมมิ. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 3: 53-59.

[7] ทิพย์สุคนธ์ บุญยืน, เยาวพา จิระเกียรติกุล, ภาณุมาศ ฤทธิไชย, ศรีโสภา เรืองหนู และอรุณพร อิฐรัตน์, 2557, ปริมาณ dioscorealide B ของยอดข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranecea* Pierre ex Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างกัน, แก่นเกษตร 42: 306-310.

[8] 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.

[9] Jaiarree, N., 2010, Biological activities of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill extract and its active ingredients, Dissertation in Medical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Centre, Pathum Thani.

[10] Folin, O. and Ciocalteu, V., 1927, On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, J. Biol. Chem. 73: 627-650.

[11] 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.

[12] ทิพย์สุคนธ์ บุญยืน, 2557, ผลของ Jasmonic acid และ Salicylic acid ต่อปริมาณ dioscorealide B ในการเพาะเลี้ยง ยอดของข้าวเย็นใต้ (*Dioscorea membranacea* Pierre ex Prain & Burkill), วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต, ปทุมธานี.

[13] รัชนีวรรณ จิระพงศ์พัฒนา, เยาวพา จิระเกียรติกุล และภาณุมาศ ฤทธิไชย, 2559, ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดหัวข้าวเย็น (*Dioscorea birmanica* Prain & Burkill) ในสภาพปลอดเชื้อที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างกัน, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 40-48.

[14] Schmeda-Hirschmann, G., Jordan, M., Gerth, A. and Wilken, D., 2005, Secondary metabolite content in rhizomes, callus cultures and *in vitro* regenerated plantlets of *Solidago chilensis*, Zeitschrift fur Natur-

forschung C. 60: 5-10.

[15] Shank, L.P., Riyathong, T., Lee, V.S. and Dheeranupattana, S., 2013, Peroxidase activity in native and callus culture of *Moringa oleifera* Lam., J. Med. Bioeng. 2: 163-167.

[16] รัชนี เพ็ชร์ช้าง, 2557, การส่งเสริมสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในปลายยอดผักหวานบ้านที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการฉายรังสียูวีซี, Naresuan Univ. J. Sci. Technol. 22: 116-125.