

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัย (Project)
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

ส่วนที่ 1 สรุปผลการดำเนินงานโครงการวิจัย (Project)

1.1 รหัส ว-ท (ด) 132.52 ชื่อโครงการ **การสกัดสีและตรวจสอบความเป็นพิษในระดับยีนของสีที่สกัดจากพืชและไฮยาโนแบคทีเรียเพื่อพัฒนาไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม**

1.2 ลักษณะโครงการ ☒ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว
☐ เป็นโครงการย่อยในชุดโครงการวิจัย (ระบุชื่อชุดโครงการวิจัย)

1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ นางสาว ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม

1.4 หน่วยงานหลักรับผิดชอบ สาขาวิชาพันธุศาสตร์ และสาขาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

1.5 ประเภทโครงการ ☒ โครงการวิจัย 3 สาขา ☐ เกษตรศาสตร์ ☒ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
☐ สังคมศาสตร์

- ☐ โครงการวิจัยสถาบันเพื่อพัฒนาคุณภาพ
- ☐ โครงการวิจัยและถ่ายทอดงานวิจัยสู่ประชาชน
- ☐ โครงการเสริมสร้างความเข้มแข็งด้านการวิจัย
- ☐ โครงการวิจัยเพื่อพัฒนาหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชี่ยวชาญเฉพาะ (SRU)
- ☐ โครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงบูรณาการเพื่อการแข่งขัน
- ☐ โครงการวิจัยพัฒนาร่วมภาครัฐและเอกชน

1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 1 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2552 ถึงปีงบประมาณ 2552

1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ และสาขาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ 230,000 บาท ประกอบด้วย

ปีงบประมาณ 2552 ได้รับ 109,250 บาท ปีงบประมาณ 2552 ได้รับ 109,250 บาท
 ปีงบประมาณ ได้รับ บาท ปีงบประมาณ ได้รับ บาท
 ปีงบประมาณ ได้รับ บาท ปีงบประมาณ ได้รับ บาท

1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาวิธีการสกัดสีจากพืชท้องถิ่นและไฮยาโนแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อใช้ทดแทนสีสังเคราะห์ที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อลดปัญหามลภาวะเป็นพิษ และลดการใช้สารเคมีและลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าสีสังเคราะห์

2. ทดสอบความเป็นพิษของสีที่สกัดได้โดยการศึกษาความเป็นพิษของสีในระดับโครโมโซมโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นตัวทดสอบ เพื่อพัฒนาสีที่ได้นำไปใช้เป็นสีสังเคราะห์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ

ปีที่ เดือนที่ ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้

1. 1-6 ศึกษาชนิดของพืชในท้องถิ่นและไชยาโนแบคทีเรีย ทดสอบสารให้สีเบื้องต้น และเลือกชนิดของพืชและไชยาโนแบคทีเรียที่มีปริมาณสารให้สีมาก เพื่อนำมาสกัดสีสกัดสารให้สีจากพืชและไชยาโนแบคทีเรียด้วยตัวทำละลายต่างๆทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว

7-12 ทดสอบความเป็นพิษของสีสกัดจากพืช สีสกัดจากไชยาโนแบคทีเรียและสีสังเคราะห์เคมีโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) เป็นตัวทดสอบโดยการนำเลือดจากมนุษย์มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

- 1.1 ทำการทดลองเบื้องต้นหาระดับความเข้มข้นของสารทดสอบที่เหมาะสม
- 1.2 การเตรียมเลือดและเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว
- 1.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์และการเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม
- 1.4 คัดเลือกเซลล์เพื่อตรวจนับโครโมโซม และวิเคราะห์
- 1.5 บันทึกภาพและบันทึกผล

1.11 สรุปการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์ (ตามแผน)	เป้าหมาย / ผลที่คาด (ตามแผน)	ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)
ต.ค.2552– ธ.ค. 2553 1.ศึกษาชนิดของพืชในท้องถิ่นและไชยาโนแบคทีเรีย ทดสอบสารให้สีเบื้องต้น และเลือกชนิดของพืชและไชยาโนแบคทีเรียที่มีปริมาณสารให้สีมาก เพื่อนำมาสกัดสี 2.สกัดสารให้สีจากพืชและไชยาโนแบคทีเรีย ด้วยตัวทำละลายต่างๆทั้งมีขั้วและไม่มีขั้ว ม.ค. 2553 – มี.ค.2553 1.ศึกษาโครงสร้างของสารให้สีเพื่อจำแนกประเภทสารให้สีด้วยวิธีทางเคมี	ต.ค.2552– ธ.ค. 2553 1.เป็นข้อมูลของชนิดของพืชและไชยาโนแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการเตรียมสีย้อมเพื่อทดแทนสีย้อมทางเคมี 2.เพื่อศึกษาวิธีการสกัดสีที่ประหยัด สะดวก ง่าย และเหมาะสมที่สุด ม.ค. 2553 – มี.ค.2553 1.เพื่อเป็นคลังข้อมูลทางโครงสร้างสีที่สกัดจากพืชและไชยาโนแบคทีเรีย	ต.ค.2552– ธ.ค. 2553 1.ได้ข้อมูลของชนิดของพืชและไชยาโนแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการเตรียมสีย้อมเพื่อทดแทนสีย้อมทางเคมี 2.ได้วิธีการสกัดสีที่ประหยัด สะดวก ง่าย และเหมาะสมที่สุดกับพืชและไชยาโนแบคทีเรีย ม.ค. 2553 – มี.ค.2553 1.เลือกศึกษาโครงสร้างของสารสีที่สกัดจากพืชและสามารถจำแนกกลุ่มของสารสีได้
เม.ย.2553 – ส.ค. 2553 1. ทดสอบความเป็นพิษของสีสังเคราะห์ สีสกัดจากพืช และสีสกัดจากไชยาโนแบคทีเรียโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) เป็นตัวทดสอบโดยการนำเลือดจากมนุษย์มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง (in vitro) 1.1 ทำการทดลองเบื้องต้นหาระดับความเข้มข้นของสารทดสอบที่เหมาะสม 1.2 การเตรียมเลือดและเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว 1.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์และการเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม 1.4 คัดเลือกเซลล์เพื่อตรวจนับโครโมโซม และวิเคราะห์ 1.5 บันทึกภาพและบันทึกผล	เม.ย.2553 – ส.ค. 2553 1.เพื่อศึกษาถึงผลของสีสังเคราะห์ สีสกัดจากพืช และสีสกัดจากไชยาโนแบคทีเรียต่ออัตราการเปลี่ยนแปลงการแบ่งเซลล์ไมโทซิสและความผิดปกติของโครโมโซมที่อาจเกิดขึ้นในรูปแบบต่างๆ เช่นการหักของโครโมโซม	เม.ย.2553 – ส.ค. 2553 1.จากผลการทดลองพบว่าผลของสีสกัดจากพืช สีสกัดจากไชยาโนแบคทีเรียไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์ และไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมขณะที่สีสังเคราะห์เคมีก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราการเกิดไมโทซิส และก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในรูปแบบต่างๆ

1.12 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

☒ บรรลุ เป็นไปตามแผนทุกประการ

☐ บรรลุบางส่วน (ร้อยละ.....) เหตุผล.....

☐ ไม่บรรลุ เหตุผล.....

1.13 ผลผลิต/ สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs) (โปรดระบุรายละเอียด)

☒ องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐาน

ได้ข้อมูลพื้นฐานของชนิดของพืชและไฮยาโนแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการเตรียมสีย้อมเพื่อทดแทนสีย้อมทางเคมี และข้อมูลวิธีการสกัดสีที่ประหยัด สะดวก ง่าย และเหมาะสมที่สุดต่อพืชตัวอย่างต่างๆกันไป และได้ทราบถึงผลของสีสกัดจากพืช สีสกัดจากไฮยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์ และไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม แต่สีสังเคราะห์เคมีก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราการเกิดไมโทซิส และก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในรูปแบบต่างๆ

☐ สายพันธุ์พืช/สัตว์/จุลินทรีย์.....

☐ ผลิตภัณฑ์.....

☐ สิ่งประดิษฐ์.....

☐ เทคโนโลยี/นวัตกรรม.....

☐ ฐานข้อมูล/ซอฟต์แวร์.....

☐ คู่มือ.....

☐ วิดีทัศน์.....

☒ การสร้างนักวิจัย/สนับสนุนนิสิตปริญญาตรี 3 คน ปริญญาโท คน ปริญญาเอก คน

☒ สนับสนุนการศึกษาค้นคว้าพิเศษ 1 เรื่อง

การสกัดสารสีจากสาหร่ายสไปรูลีนาเพื่อนำมาใช้เป็นสีย้อม

☐ อื่นๆ (ระบุ).....

1.14 ผลลัพธ์/ผลสำเร็จที่ได้/หรือคาดว่าจะได้จากการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

(1) เป้าหมายการนำไปใช้ประโยชน์ (ระบุกลุ่มเป้าหมายของงานวิจัยเชิงปริมาณ/คุณภาพ)

☒ ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนการสอน

นำข้อมูลพื้นฐานของชนิดของพืชและไฮยาโนแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการเตรียมสีย้อมเพื่อทดแทนสีย้อมทางเคมี และข้อมูลวิธีการสกัดสีที่ประหยัด สะดวก ง่าย และเหมาะสมที่สุดต่อพืชตัวอย่างต่างๆกันมาเสริมในวิชาเรียนได้ และนำมาใช้ย้อมสีดูโครโมโซมได้

☐ ด้านการเกษตร.....

☐ ด้านอุตสาหกรรม.....

☒ ด้านทรัพยากรธรรมชาติ/สิ่งแวดล้อม.....

ใช้สีที่ผลิตจากธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม

☒ ด้านคุณภาพชีวิต สุขภาพอนามัย.....

ใช้สีที่ผลิตจากธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพ และปราศจากโลหะหนักซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงมีการนำภูมิปัญญาท้องถิ่นในเรื่องการใช้สีจากส่วนต่างๆของพืช เช่น ใบ ดอก เพื่อประโยชน์สูงสุดและเพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตให้กับตัวผู้บริโภคให้มีข้อมูลและมีทางเลือกเพิ่มขึ้น

- ☐ ด้านเศรษฐกิจ.....
- ☐ ด้านสังคม.....
- ☐ ด้านการทำนุบำรุงศิลป ศาสนา วัฒนธรรม.....
- ☐ ด้านการถ่ายทอดเทคโนโลยี/ฝึกอบรมแก่กลุ่มเป้าหมาย.....
- ☐ เสนอภาครัฐ เพื่อใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ
- ☒ นำความรู้ไปวิจัย/พัฒนาขั้นต่อไป.....

พัฒนาสีสกัดจากพืชและใยนาโนแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบความปลอดภัยว่าไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนและโครโมโซมเพื่อนำไปใช้เป็นสีผสมอาหาร หรือสีผสมเครื่องดื่ม หรือไวน์ ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

- ☐ ก่อให้เกิดความร่วมมือระหว่างหน่วยงาน/การสร้างเครือข่าย.....
- ☐ อื่นๆ (ระบุ).....

(2) สรุปผลการนำผลการวิจัยไปเผยแพร่ / ถ่ายทอด **ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดโครงการ** (ระบุรายละเอียด อยู่ระหว่างดำเนินการส่งตีพิมพ์/ตีพิมพ์แล้วในรูปแบบเอกสารอ้างอิงและแนบสำเนาเป็น ภาคผนวกของรายงาน)

- ☐ ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการต่างประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☒ ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ..... เรื่อง อยู่ระหว่างดำเนินการส่งตีพิมพ์.....
- ☐ นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ต่างประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☐ นำเสนอในการประชุม/สัมมนา ในประเทศ..... เรื่อง (ระบุ).....
- ☐ นำเสนอทางวิทยุ/โทรทัศน์/Website..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ นำเสนอทางนิทรรศการ เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ บทความ/เอกสารสิ่งพิมพ์/วีดิทัศน์..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ ถ่ายทอด/ฝึกอบรมแก่เกษตรกร/ผู้สนใจ..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชน/อุตสาหกรรม/ผู้ประกอบการ (ประโยชน์เชิงพาณิชย์)..... เรื่อง/ครั้ง (ระบุ).....
- ☐ ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย ฯลฯ (ระบุ).....
- ☐ มีผู้นำผลงานวิจัยไปอ้างอิง (ระบุ).....
- ☐ อื่นๆ (ระบุ).....

1.15 การยื่นจด ☐ สิทธิบัตร ☐ อนุสิทธิบัตร ☐ ลิขสิทธิ์

☐ มีศักยภาพที่จะยื่นจด (ระบุ)..... ☐ ยื่นจดแล้ว เมื่อ.....

1.16 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ (ระบุว่าก่อให้เกิดผลกระทบอย่างไร)

- ☐ ด้านความมั่นคง อาทิ การเมืองการปกครอง กฎหมาย การต่างประเทศ โครงสร้างพื้นฐาน และบริการโทรคมนาคม ฯลฯ (ระบุ).....
- ☐ ด้านการเศรษฐกิจ อาทิ การพาณิชย์กรรม การเกษตรกรรม การอุตสาหกรรม การท่องเที่ยว วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พลังงาน ฯลฯ (ระบุ).....
- ☒ ด้านคุณภาพชีวิตและสังคม ศักยภาพของคนและการศึกษา การแพทย์และสาธารณสุข หลักประกันความมั่นคง สวัสดิการสังคม วัฒนธรรม จริยธรรมและค่านิยม ฯลฯ (ระบุ).....
 ใช้สีที่ผลิตจากธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพ และปราศจากโลหะหนักซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงมีการนำภูมิปัญญาท้องถิ่นในเรื่องการใช้สีจากส่วนต่างๆของพืช เช่น ใบ ดอก เพื่อประโยชน์สูงสุดและเพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตให้กับตัวผู้บริโภคให้มีข้อมูลและมีทางเลือกเพิ่มขึ้น
- ☒ ด้านทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม การบริการจัดการการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์ การป้องกันการทำลาย ลดการสูญเสีย การฟื้นฟูทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม ฯลฯ
 ใช้สีที่ผลิตจากธรรมชาติไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม
- ☐ อื่นๆ (ระบุ).....

1.17 ผลการดำเนินงานวิจัยสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ชาติ ในด้าน

- ☐ ยุทธศาสตร์การจัดความยากจน
- ☒ ยุทธศาสตร์การพัฒนาคคนและสังคมที่มีคุณภาพ
- ☐ ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุล และแข่งขันได้
- ☒ ยุทธศาสตร์การบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
- ☐ ยุทธศาสตร์การต่างประเทศและเศรษฐกิจระหว่างประเทศ
- ☐ ยุทธศาสตร์การพัฒนากฎหมายและส่งเสริมการบริหารกิจการบ้านเมืองที่ดี
- ☐ ยุทธศาสตร์การส่งเสริมประชาธิปไตยและกระบวนการประชาธิปไตย
- ☐ ยุทธศาสตร์การรักษาความมั่นคงของรัฐ
- ☐ ยุทธศาสตร์การรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลก
- ☐ อื่นๆ โปรดระบุ.....

1.18 ปัญหา อุปสรรค ในการดำเนินงานวิจัยและแนวทางแก้ไข

..... พบปัญหาด้านงบประมาณเนื่องจากงบประมาณที่ขอสำหรับโครงการวิจัยนี้ขอไว้ 2 ปี แต่ได้เพียงปีเดียวจึงมีปัญหาในการซื้อสารเคมีและอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนมากที่สุด
งบประมาณที่จำกัดนี้

1.19 งานที่จะทำต่อไป/คำชี้แจงเพิ่มเติม

ศึกษาโครงสร้างของสารให้สีเพื่อจำแนกประเภทสารให้สีด้วยวิธีทางเคมี

1.20 ได้แนบ “รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project)” ตามหัวข้อ ในส่วนที่ 2
(หน้าถัดไป) มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....ศิริลักษณ์ เขียมธรรม.....หัวหน้าโครงการ
(นางสาว ศิริลักษณ์ เขียมธรรม)

...8... / ...ก.ค.... / 58...วัน/เดือน/ปี ที่รายงาน

ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

โครงการวิจัยรหัส ว-ท (ด)132.52

ชื่อโครงการภาษาไทย การสกัดสีและตรวจสอบความเป็นพิษในระดับยีนของสีที่สกัดจากพืชและไชยาโนแบคทีเรียเพื่อพัฒนาไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

ชื่อโครงการภาษาอังกฤษ Plant and cyanobacteria pigment: The extraction and genotoxicity test to develop for industrial scale.

ตอนที่ 1 การสกัดสีจากไชยาโนแบคทีเรีย

ชื่อผู้วิจัยภาษาไทย นางสาว ศิริลักษณ์ เขียมธรรม ⁽¹⁾นางสาว วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์⁽²⁾

นางสาวพรทิพย์ อนันต์⁽³⁾

ชื่อผู้วิจัยภาษาอังกฤษ Miss Siriluck lamtham ⁽¹⁾ Miss Wanpen Laosripaiboon ⁽²⁾ Porntip Anan⁽³⁾

^(1,3) (ภาษาไทย) สาขาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มก. กำแพงแสน

(ภาษาอังกฤษ) *Department of Genetics Faculty of Liberal Art and Sciences*

⁽²⁾ (ภาษาไทย) สาขาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มก. กำแพงแสน

(ภาษาอังกฤษ) *Department of Chemistry Faculty of Liberal Art and Sciences*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ ศึกษาวิธีการสกัดสารสีจากสาหร่ายสไปรูลิน่าเพื่อนำมาใช้เป็นสีย้อม สาหร่ายสไปรูลิน่าเจริญอยู่ในอาหารเหลวสูตร Zarrouk ที่อุณหภูมิ 27-32 องศาเซลเซียส pH 9-11 พบว่าช่วงเวลา 4 สัปดาห์ของการเลี้ยงสาหร่าย ความหนาแน่นของเซลล์ ปริมาณน้ำหนักแห้งเซลล์และปริมาณคลอโรฟิลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นและสาหร่ายมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 18 ของการเลี้ยง การสกัดสารสีจากสาหร่ายสไปรูลิน่าใช้น้ำใช้อัตราส่วนเซลล์สาหร่ายสดต่อตัวทำละลายหลายชนิดในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าตัวทำละลายที่ใช้ CaCl_2 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.09 โมลาร์ ได้ปริมาณไฟโคไซยานินสารสีน้ำเงินอ่อน และเมื่อใช้อัตราส่วนเซลล์สาหร่ายสดต่อตัวทำละลาย 1 กรัมต่อ 5 มิลลิลิตร แห้งแล้วละลาย พบว่า CaCl_2 ความเข้มข้น 0.1 และ 0.09 โมลาร์ 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.8 และเอนไซม์ไลโซไซม์ ได้ปริมาณไฟโคไซยานินสารสีน้ำเงิน ส่วนตัวทำละลายชนิดอื่นได้สารสีเขียว

คำสำคัญ: สไปรูลิน่า อาหารเหลวสูตร Zarrouk ไฟโคไซยานิน

ABSTRACT

Attempts were made to culture *Spirulina platensis* to achieve the optimization of phycocyanin extraction from the algae. *Spirulina platensis* was cultured in Zarrouk medium at 25 - 37 °C, pH 9-11. The density, dry weight and chlorophyll content were gradually increased in the four weeks of the cultivation. Excellent algae growth occurred around the 18th day of the culture. The extraction of pigment from *Spirulina platensis* were performed by using different solvents at a ratio of 1 g algae: 10 ml of each solvent. All of the mixed solutions were shaken at 30°C for 24, 48 and 72 hours. The result showed that the CaCl₂ 0.1 and 0.09 M solvent have an ability to extract the phycocyanin blue pigment from the algae. The methodology of freeze and thaw of algae cells in different solvents at ratio of fresh algae 1 g: 5 ml solvent was use as an alternative method. The optimum condition of the extraction of the blue phycocyanin from *Spirulina platensis* were the extract with the CaCl₂ 0.1 and 0.09 M, 50 mM phosphate buffer pH 6.8 and lysozyme. Meanwhile, the green pigments were extracted from other solvents.

Key words: *Spirulina*, phycocyanin

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการศึกษาและนำสาหร่ายสไปรูลินามาใช้ให้เกิดประโยชน์มากมาย ไม่ว่าจะเป็นการบริโภคโดยตรงและการใช้ในทางอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสาหร่ายสไปรูลินามีหลายรูปแบบ เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง หรือผลิตยาเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันแก่ร่างกาย รวมทั้งเป็นส่วนประกอบในวุ้นและเยลลี่ผสมในอาหารสัตว์เพื่อเร่งสีในปลาสวยงาม หรือการใช้สาหร่ายสไปรูลินาเพื่อบำบัดคุณภาพน้ำในโรงงานอุตสาหกรรมและนาุ้ง (สรวิต, 2543)

สาหร่ายสไปรูลินาประกอบด้วยรงควัตถุต่างๆมากมายดังนี้

1. ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) เป็นโปรตีนที่สีน้ำเงิน ประกอบด้วยธาตุแมกนีเซียมกับธาตุเหล็กจึงทำให้เห็นสาหร่ายสไปรูลินาเป็นสีน้ำเงินเข้มเมื่อรวมกับคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นสีเขียวบางครั้งเรียกกันง่าย ๆ ว่า สาหร่ายน้ำเงิน-เขียว (Blue Green Algae) ไฟโคไซยานินมีความเข้มข้นถึงร้อยละ 14 โดยน้ำหนัก ซึ่งไฟโคไซยานินจะมีแต่ในสาหร่ายสไปรูลินาเท่านั้น ในสาหร่ายคลอเรลล่า (*Chlorella*) ซึ่งเคยเป็นสาหร่ายที่นิยมบริโภค จะไม่มีไฟโคไซยานินจึงไม่มีสีน้ำเงินอยู่ด้วย (สมศักดิ์, 2547) นอกจากนี้ยังมี ซี - ไฟโคไซยานิน ซึ่งจัดอยู่ในพวก รงควัตถุประกอบประเภทไฟโคบิลิน (phycobilin) รงควัตถุประกอบประเภทนี้แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีกคือ ซี - แอลโลไฟโคไซยานิน (c-allophycocyanin) และ ซี-ไฟโคอีริทริน (c-phycoerythrin) (การมีอักษรซีนำหน้าเป็นการชี้ว่าเป็นรงควัตถุที่อยู่ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน) ไฟโคบิลินมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่ละลายได้ดีในน้ำ ไฟโคบิลินแต่ละชนิดจะอยู่รวมกับโปรตีนอย่างใกล้ชิดมาก กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเรียกว่า ไฟ

โคบิลินโปรตีน ในสาหร่ายสไปรูลีนา ซี - ไฟโคไซยานิน จะอยู่ร่วมกับไฟโคบิลินโปรตีนชนิดอื่นๆ (ที่สำคัญคือ ซี- แอลโลไฟโคไซยานิน) กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น เรียกว่า ไฟโคบิลิซม (phycobilisomes) ซึ่งจะเกาะอยู่บนผิวด้านนอกของไทลาคอยด์ (thylakoid) ภายในไทลาคอยด์มีคลอโรฟิลล์เอบรรจุอยู่ ไฟโคบิลิซมทำหน้าที่รับพลังงานรังสีจากแสงแล้วส่งให้แก่คลอโรฟิลล์เอ จากการที่ทำหน้าที่เป็นรงควัตถุประกอบ ทำให้ไฟโคบิลิซมมีปริมาณลดลง เมื่อความเข้มแสงเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Myers และ Kratz ที่พบว่า ไฟโคไซยานินจะมีปริมาณมากขึ้นเมื่อมีแสงจำกัด นอกจากนี้ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินยังมีไฟโคไซยานินเป็นแหล่งสะสมไนโตรเจนซึ่งจะให้ธาตุไนโตรเจนแก่เซลล์สาหร่ายในยามที่ขาดแคลนธาตุไนโตรเจน (สุมาลี, 2535)

2. คลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) คลอโรฟิลล์เป็นรงควัตถุสีเขียว ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการสังเคราะห์แสง คลอโรฟิลล์มีหลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์ เอ บี ซี ดีและอี แต่คลอโรฟิลล์ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นคลอโรฟิลล์เอเท่านั้น คลอโรฟิลล์เอจัดเป็นรงควัตถุสังเคราะห์แสงขั้นต้น สามารถดูดกลืนแสงด้วยตัวเอง ส่วนคลอโรฟิลล์อื่นๆจัดเป็นรงควัตถุสังเคราะห์แสงขั้นสองซึ่งทำหน้าที่ดูดพลังงานรังสีจากแสงแล้วส่งต่อไปให้คลอโรฟิลล์เอ คลอโรฟิลล์เป็นสารประกอบอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ไม่ละลายในน้ำ แต่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์ ปริมาณคลอโรฟิลล์ที่พบในสาหร่ายทั่วไปปกติมีปริมาณ 0.5-1.5% ของน้ำหนักแห้ง และสามารถเพิ่มสูงได้ถึง 6% ในสาหร่ายที่เลี้ยงไว้ในที่มีแสงอ่อนๆ คลอโรฟิลล์เอเป็นดัชนีอย่างหนึ่งในการแสดงมวลสาหร่าย โดยมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณมวลสาหร่าย ปริมาณคลอโรฟิลล์เอจะผันแปรได้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ความเข้มแสง ปริมาณไนโตรเจนในอาหาร อายุเซลล์สาหร่าย และปัจจัยทางฟิสิกส์อื่นๆ

3. เบต้า-แคโรทีน (β -carotene) เป็นรงควัตถุที่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้โดยสัตว์แต่สามารถสังเคราะห์ได้โดยพืชและจุลินทรีย์ เบต้า-แคโรทีนเป็นแหล่งวิตามินของมนุษย์ ร่างกายเราจะเปลี่ยนเบต้า-แคโรทีน เป็นวิตามินเมื่อต้องการ สาหร่ายสไปรูลีนาเป็นอาหารที่มีเบต้า-แคโรทีนสูง และพบว่าเบต้า-แคโรทีนสามารถจับกับอนุมูลอิสระ peroxy โดยเฉพาะในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำ สมบัติการต้านออกซิเดชันของเบต้า-แคโรทีนขึ้นอยู่กับสมบัติในการจับ singlet oxygen และอนุมูลอิสระ peroxy ซึ่งขึ้นกับโครงสร้างของโมเลกุลและจำนวนพันธะคู่ของโมเลกุล (Sergio *et al.*, 1999) นอกจากนี้ เบต้า-แคโรทีนยังลดความเป็นพิษของอนุมูลอิสระซึ่งทำลายเซลล์และนำไปสู่โรคมะเร็ง เนื่องจากสาหร่ายสไปรูลีนามีเบต้า-แคโรทีนอยู่สูง จึงมีการนำเอามาทดสอบถึงผลในการต้านมะเร็งของเบต้า-แคโรทีนและสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลีนาที่มีต่อก่อนเนื้อร้ายในปากหนูพบว่าสามารถลดทั้งจำนวนและขนาดของก้อนเนื้อและทำให้ก้อนเนื้อหายไป (สมชาย, 2539)

เนื่องจากสาหร่ายสไปรูลีนามีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีธาตุต่างๆที่เป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญมากมายจึงมีการนำสาหร่ายไปใช้ประโยชน์ในหลายๆด้านเช่น

1. ใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีนของมนุษย์ สาหร่ายสไปรูลีนาเป็นอาหารเสริมที่มีคุณค่าสูงและได้ผ่านการทดลองอย่างดีในด้านการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์จากประเทศญี่ปุ่น ทั้งยังเป็นผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติที่มนุษย์ใช้เป็นอาหารอย่างปลอดภัยมานานนับพันปี ความเป็นอาหารพิเศษนั้นมีได้เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูงเพียงอย่างเดียว หากยังมีกรดอะมิโนที่จัดเรียงกันอย่างได้สัดส่วนสมดุลถึง 18 ชนิดและยังมีวิตามินที่มีคุณค่าอีกมากมาย

2. ใช้ในด้านการแพทย์ มีการทดลองเกี่ยวกับคุณสมบัติในการลดโคเลสเตอรอล ใช้เป็นยาเพื่อระงับการอยากอาหาร ลดการดูดซึมสำหรับผู้ที่ต้องการลดความอ้วน สามารถควบคุมและรักษาโรคต่างๆ ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคโลหิตจาง โรคตับอักเสบ โรคกระเพาะอาหารอักเสบ รักษาผิวพรรณและรักษาแผล ช่วยสร้างภูมิคุ้มกัน และทำให้ผมดกดำอีกด้วย (สมชาย, 2539)

3. ใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีนสำหรับสัตว์ คุณค่าทางอาหารที่สูงของสาหร่ายสไปรูลิน่าสามารถดูดซึมได้ง่าย จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นอาหารลูกกุ้งและปลาวัยอ่อน ผลของการกินอาหารที่ผสมของสาหร่ายสไปรูลิน่า ทำให้ปลามีสีดีขึ้น อัตราการรอดดี เพิ่มความสามารถในการตอบสนองต่อเชื้อโรคของระบบภูมิคุ้มกัน (อมรรัตน์ และ บุษกร, 2543) และยังมีการทดลองใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นอาหารแกะด้วย (ณรงค์ศักดิ์, 2533)

จากการที่สาหร่ายสไปรูลิน่ามีประโยชน์มากมายหลายด้านและมีการเจริญที่รวดเร็ว อีกทั้งในสภาวะปัจจุบันมีการใช้สารเคมีสังเคราะห์เพื่อใช้เป็นองค์ประกอบเครื่องอุปโภคและบริโภคต่างๆ เช่น อาหาร ยารักษาโรค เครื่องสำอาง ได้มีการนำพืชสมุนไพรต่างๆ มาใช้เสริมหรือทดแทนในกระบวนการผลิตเครื่องอุปโภคบริโภคจนมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว การใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าจึงน่าจะนำมาใช้แก้ปัญหาได้ โดยมีการนำเอามาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากขึ้นเพราะมีคุณค่าทางอาหารมากมายและมีสารสีที่เด่นเฉพาะตัว งานวิจัยนี้มีความสนใจเกี่ยวกับสาหร่ายสไปรูลิน่าคือ ทำการเพาะเลี้ยงให้มีระดับการเจริญเติบโตสูงสุดและให้ได้ปริมาณมากที่สุด เพื่อนำมาสกัดสารสี ถ้าสารสีที่ได้มีคุณภาพดี จะมีการนำมาใช้เป็นสีย้อมทางชีวภาพ เป็นสีผสมอาหารหรือนำสาหร่ายสไปรูลิน่าไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ ต่อไป ซึ่งข้อมูลงานวิจัยที่ได้อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานของการพัฒนาการวิจัยในระดับที่สูงกว่าในอนาคต

วิธีวิจัย

1. การเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าให้มีการเจริญเติบโตสูงสุด

เตรียมอุปกรณ์ที่จะเลี้ยงสาหร่าย เช่น อ่างเลี้ยงปลา ขวดรูปชมพู่ เครื่องปั๊มออกซิเจน หัวทราย เตรียมอาหารเหลว Zarrouk ปรับ pH 9-11 ทำการเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าในอ่างเลี้ยงปลา ความสูงของอาหารเหลวไม่เกิน 15 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 27-32 องศาเซลเซียสทำการวัดการเจริญเติบโตด้วยการเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 1000 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ใช้เซลล์สาหร่ายต่ออาหารอัตราส่วน 2 มิลลิลิตร ต่อ 10 มิลลิลิตร

1.1 วัดความหนาแน่นของเซลล์ในขวดรูปชมพู่ทั้ง 3 ขวด ที่ค่าการดูดกลืนแสง 560 นาโนเมตร (Sarada *et al.*, 1999) และที่ค่าการดูดกลืนแสง 670 นาโนเมตร (Silveira *et al.*, 2007) ทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.2 การชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์สาหร่ายในขวดรูปชมพู่ 3 ขวด ชั่งน้ำหนักทุกๆ 2 วันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยตวงเซลล์มาชั่งละ 10 มิลลิลิตร เทใส่ในถ้วยกระดาษฟอยด์ที่อบและทราบน้ำหนักแล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักสาหร่ายที่อบแล้ว นำน้ำหนักหลัง

อบสารห่วยไปลบกับน้ำหนักกระดาษฟอยด์ที่ทราบน้ำหนักจะได้ปริมาณน้ำหนักแห้งของสารห่วย บันทึกผลไว้ แล้วนำไปพล็อตกราฟการเจริญเติบโต

1.3 การวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ ทำการวัดทุกๆ 2 วันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยตวงเซลล์มาขูดละ 10 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ ทั้งส่วนใส เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลูกปัดแก้ว 5 เม็ด ตีเซลล์ด้วยการใช้เครื่องผสมสาร นำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงเอาส่วนใสสีเขียวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 และ 665 นาโนเมตร บันทึกค่า Absorbance ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ ดังสูตรการคำนวณปริมาณคลอโรฟิลล์

การคำนวณหาปริมาณคลอโรฟิลล์ (นิติมา, 2547)

ปริมาณคลอโรฟิลล์ B = $(16.5 \times A_{665}) - (8.3 \times A_{650})$ mg/l

ปริมาณคลอโรฟิลล์ a = B $\times$ 2 mg/l

2. การสกัดสารสีสารห่วยสไปรูลินาด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยวิธีของ Sarada *et al.* (1999) และ Silveira *et al.* (2007)

2.1 ใช้เซลล์สารห่วยต่อตัวทำละลายอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ยาที่อุณหภูมิห้อง ในช่วงเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วนำไปเปรียบเทียบกับสารสีไฟโคไซยานิน ซึ่งตัวทำละลายที่ใช้ได้แก่

น้ำกลั่น

NaCl ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ และ 0.7 โมลาร์

CaCl₂ ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ และ 0.09 โมลาร์

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 นอร์มอล

10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0

50 mM Sodium phosphate buffer pH 6.8

10 mM Sodium acetate buffer pH 5.0

50 mM phosphate buffer pH 6.8

เอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 0.05 0.07 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ

กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 0.16

เปอร์เซ็นต์

โดยวิธีของ ปิยนารถ (2550) ซึ่งสามารถเตรียมตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้

2.2 ใช้เซลล์สารห่วยต่อตัวทำละลายอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 5 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง แล้วละลายที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส ทำการแช่แข็งและละลายตั้งแต่ 1-4 ครั้ง นำมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วนำไปเปรียบเทียบกับสารสีไฟโคไซยานิน ตัวทำละลายที่ใช้เช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่ไม่ใช้กรดไฮโดรคลอริก

2.3 เมื่อทำการสกัดแล้วดูว่าวิธีการและตัวทำละลายชนิดใดให้สารสีไฟโคไซยานินที่ดีที่สุดแล้วทำการสกัดให้ได้ปริมาณมากขึ้นจึงนำไปย้อมเซลล์รากหอม แต่ก่อนนำไปย้อมเซลล์รากหอมนำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporato

ผลและวิจารณ์

1. การเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าให้มีการเจริญเติบโตสูงสุด

ผลการทดลองเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยอาหารเหลว Zarrouk ที่อุณหภูมิ 27-32 องศาเซลเซียส pH 9-11 ในห้องปฏิบัติการสาขาพันธุศาสตร์ที่มีแสงส่องสว่างอย่างทั่วถึงได้ (ภาพที่ 1 ก-ง) พบว่าสาหร่ายสไปรูลิน่าเจริญได้ดีและได้ปริมาณเซลล์จำนวนเพิ่มมากขึ้นพอที่จะนำมาใช้ในการสกัดสารสี ดังตารางบันทึกผลค่าการวัดการเจริญเติบโตของสาหร่าย ซึ่งผลการเจริญเติบโตที่ได้ดูจากกราฟการวัดความขุ่นของเซลล์ (ภาพที่ 2) การชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ภาพที่ 3) และการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ (ภาพที่ 4)



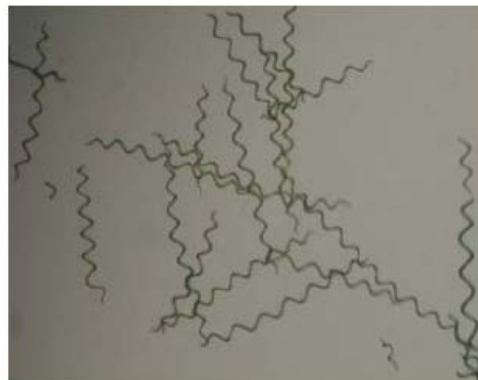
ก



ข

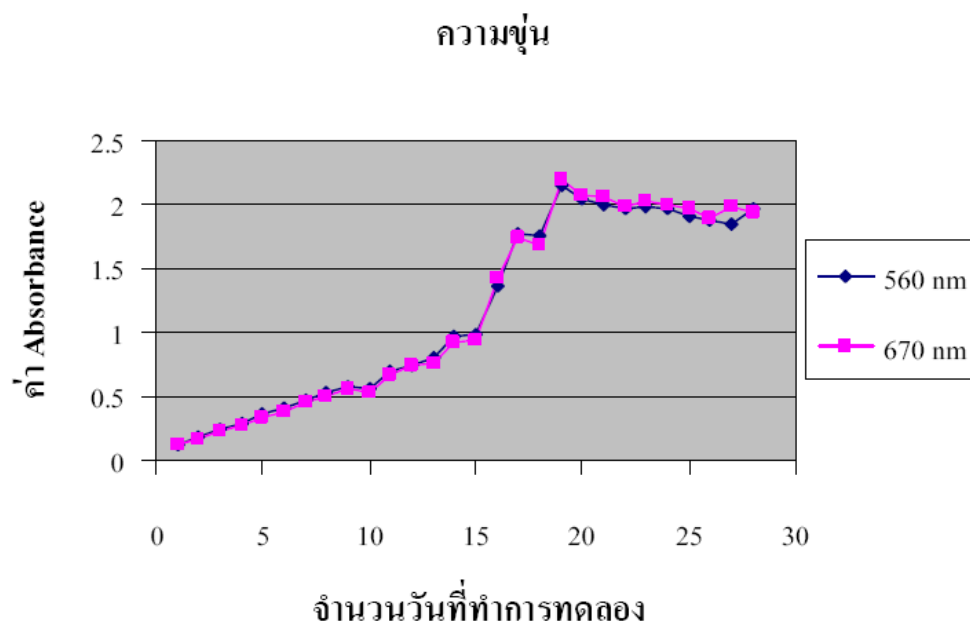


ค

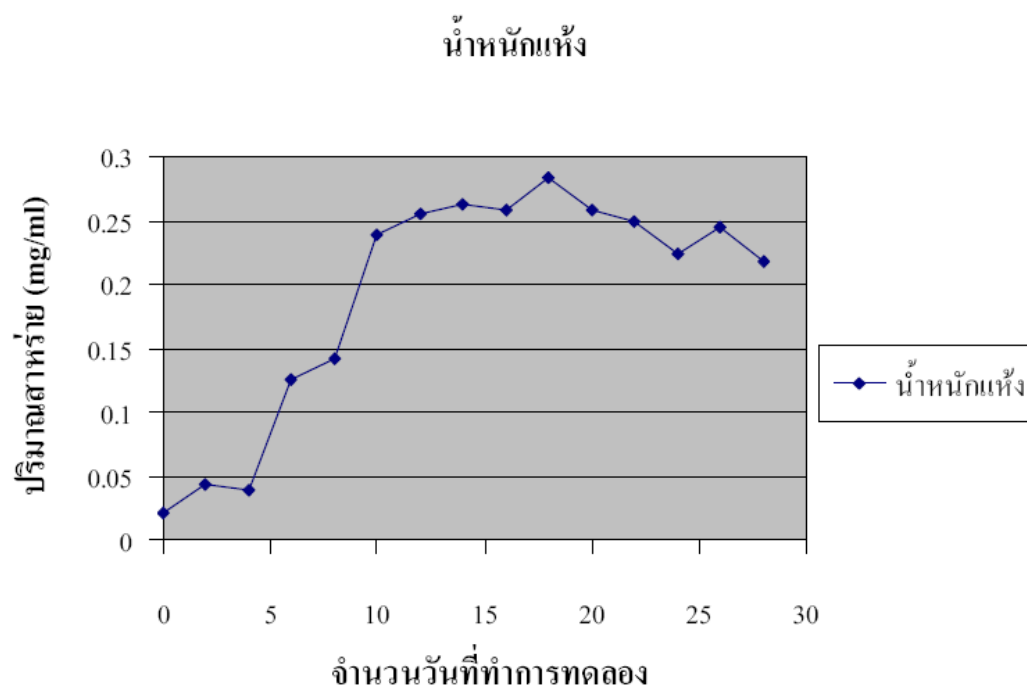


ง

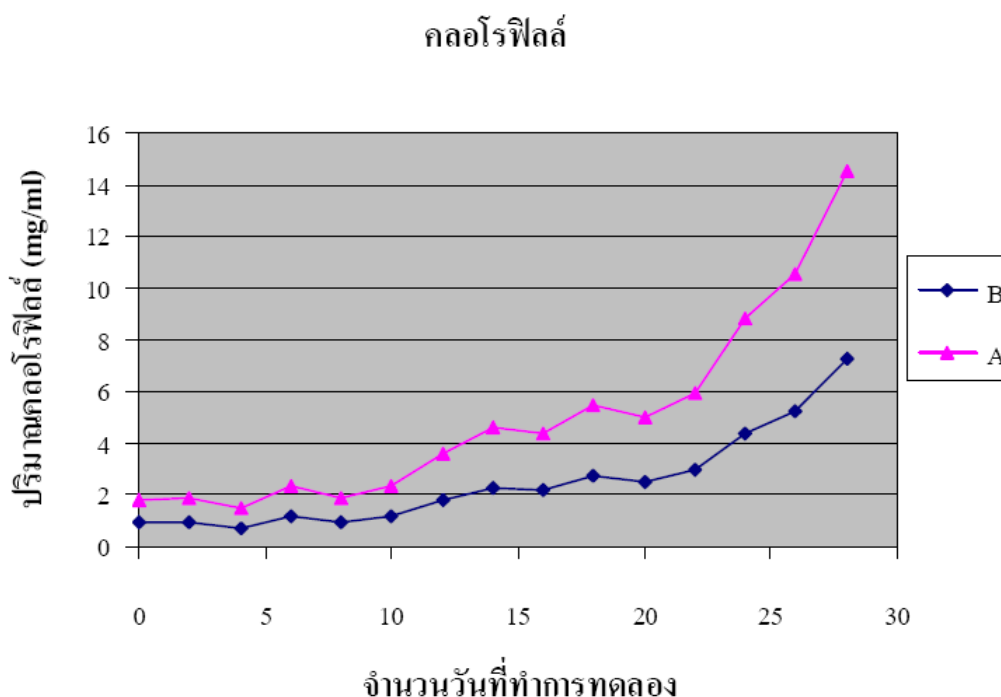
ภาพที่ 1 สภาวะการเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลิน่า ก. สไปรูลิน่าเลี้ยงในอ่างเลี้ยงปลา ข. สไปรูลิน่าเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ค. การเก็บตัวเซลล์สาหร่าย ง. ลักษณะรูปร่างเซลล์สาหร่ายสไปรูลิน่า



ภาพที่ 2 กราฟแสดงค่าการวัดความขุ่นของเซลล์สาหร่ายสไปรูลีนา ที่ช่วงการดูดกลืนแสง 560 และ 670 นาโนเมตร ระยะเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 3 กราฟแสดงค่าน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสไปรูลีนา ในช่วงระยะเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 4 กราฟแสดงค่าการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่า ในช่วงระยะเวลา 4 สัปดาห์

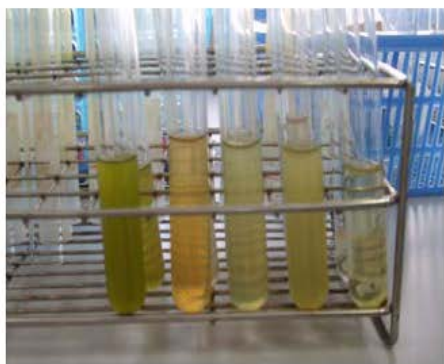
2. การสกัดสารสีสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

2.1 การสกัดสารสีสาหร่ายสไปรูลิน่า

การสกัดสารสีสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเนื่องจาก ซี-ไฟโคไซยานินเป็นสารที่อยู่ภายในเซลล์ดังนั้นการสกัดหรือการแยกสารที่อยู่ภายในเซลล์จำเป็นต้องทำให้เซลล์แตกก่อนแล้วจึงสกัดสารภายในออกมา (Alkinson *et al.*, 1987) ได้แบ่งการทำให้เซลล์แตกออกเป็น 3 วิธีคือ การใช้เอนไซม์ (Enzymatic cell disruption) วิธีทางเคมี (Chemical method) และวิธีทางฟิสิกส์ (Physical method) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ 3 วิธีการคือ การสกัดโดยใช้เอนไซม์ไลโซไซม์ วิธีทางเคมีโดยการสกัดใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ วิธีทางกลศาสตร์คือการแช่แข็งแล้วละลายที่อุณหภูมิต่างๆ ผลการทดลองการสกัดสารสีจากสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการสกัดตั้งแต่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าลักษณะของสารสีที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำกลั่น NaCl 0.15 และ 0.17 M, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0, 50 mM Sodium phosphate buffer pH 6.8, 50 mM phosphate buffer pH 6.8, Lysozyme 0.05, 0.07, 0.1 เปอร์เซนต์ สารสีที่ได้เป็นสีเขียวเหลือง ตัวทำละลาย กรด HCl ความเข้มข้น 2,4 และ 6 N สารสีที่ได้เป็นสีเขียว กรด HCl ความเข้มข้น 8 และ 10 N สารสีที่ได้เป็นสีเขียวเข้ม ตัวทำละลาย 10 mM Sodium acetate buffer pH 5 สารสีที่ได้เป็นสีใส ส่วนตัวทำละลาย CaCl_2 0.1 และ 0.09 M สารสีที่ได้เป็นสีน้ำเงินอ่อน (ตารางที่ 1 และภาพที่ 5 ก-ด)

ตารางที่ 1 ลักษณะของสารสกัดที่ได้จากการสกัดสารสีหาหายสไปรูลินาด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตัวทำละลาย	เวลาที่ใช้ในการสกัด/ลักษณะของสารสกัด		
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.
น้ำกลั่น	เขียวขุ่นใส	เขียวขุ่นใส	เขียวขุ่นใส
NaCl 0.15 M	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง
NaCl 0.17 M	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง
CaCl ₂ 0.1 M	สีน้ำเงินอ่อน	สีน้ำเงินอ่อน	สีน้ำเงินอ่อน
CaCl ₂ 0.09 M	สีน้ำเงินอ่อน	สีน้ำเงินอ่อน	สีน้ำเงินอ่อน
HCl 2 N	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว
HCl 4 N	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว
HCl 6 N	สีเขียว	สีเขียว	สีเขียว
HCl 8 N	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม
HCl 10 N	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม
10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง
50 mM Sodium phosphate buffer pH 6.8	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง
10 mM Sodium acetate buffer pH 5.0	ใส	ใส	ใส
50 mM phosphate buffer pH 6.8	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง
Lysozyme 0.05 %	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง
Lysozyme 0.07 %	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง
Lysozyme 0.1 %	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง	สีเขียวเหลือง



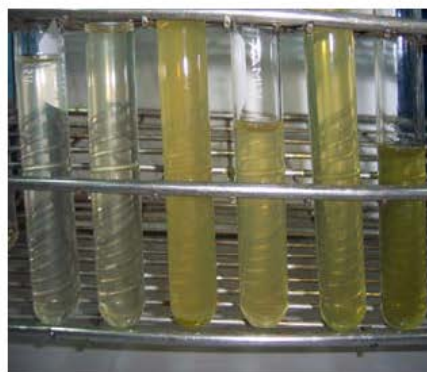
ก



ข



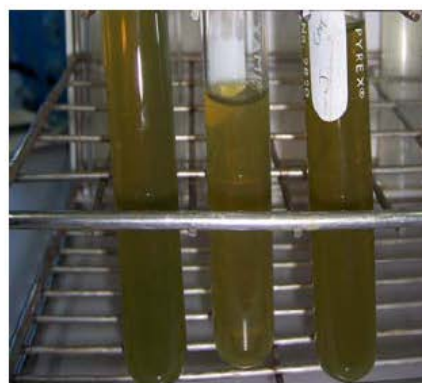
ค



ง



จ



ฉ

ภาพที่ 5 ลักษณะสารสีที่ได้จากการสกัดสารหว่าสไปรูลินาด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ หลังจากเขย่าที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ก. สกัดด้วยน้ำกลั่น NaCl 0.15 และ 0.17 M ข. สกัดด้วย CaCl_2 0.1 และ 0.09 M ค. สกัดด้วยกรด HCl 4, 6, 8, 10 N ง. สกัดด้วย Sodium phosphate buffer จ. สกัด ด้วย Sodium acetate buffer ฉ. สกัดด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ 0.05, 0.07 และ 0.1%

2.2 การสกัดสารสีจากสาหร่ายสไปรูลินาด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยการแช่แข็งแล้วละลายที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองการสกัดสารสีจากสาหร่ายสไปรูลินาด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยการแช่แข็งแล้วละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าลักษณะของสีที่ได้เมื่อสกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำกลั่น NaCl 0.15 และ 0.17 M, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0, 50 mM Sodium phosphate buffer pH 6.8, 10 mM Sodium acetate buffer pH 5 สารสีที่ได้เป็นสีเขียว ตัวทำละลาย CaCl_2 0.1M และ 50 mM phosphate buffer pH 6.8 สารสีที่ได้เป็นสีน้ำเงินอมม่วง ตัวทำละลาย CaCl_2 0.09 M, Lysozyme 0.05, 0.07, 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารสีที่ได้เป็นสีน้ำเงินและเมื่อละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สารสีที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลาย น้ำกลั่น NaCl 0.15 และ 0.17 M, 10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0, 50 mM Sodium phosphate buffer pH 6.8, 10 mM Sodium acetate buffer pH 5 สารสีที่ได้เป็นสีเขียว ตัวทำละลาย CaCl_2 0.1 และ 0.09 M, Lysozyme 0.05, 0.07, 0.1 เปอร์เซ็นต์ สารสีที่ได้เป็นน้ำเงินอ่อน ตัวทำละลาย 50 mM phosphate buffer pH 6.8 สารสีที่ได้เป็นสีน้ำเงิน (ตารางที่ 2 และภาพที่ 6 ก-ค)

ตารางที่ 2 ลักษณะของสารสกัดที่ได้จากการสกัดสารสีจากสาหร่ายสไปรูลินาด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ โดยการแช่แข็งแล้วละลายที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส

ตัวทำละลาย	อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด/ลักษณะของสารสกัด	
	40° C	60° C
น้ำกลั่น	สีเขียว	สีเขียว-เหลือง
NaCl 0.15 M	สีเขียว	สีเขียว
NaCl 0.17 M	สีเขียว	สีเขียว
CaCl_2 0.1 M	สีน้ำเงินอมม่วง	สีน้ำเงินอ่อน
CaCl_2 0.09 M	สีน้ำเงิน	สีน้ำเงินอ่อน
10 mM Sodium phosphate buffer pH 7.0	สีเขียว	สีเขียว
50 mM Sodium phosphate buffer pH 6.8	สีเขียว	สีเขียว
10 mM Sodium acetate buffer pH 5.0	สีเขียว	สีเขียว
50 mM phosphate buffer pH 6.8	สีน้ำเงินอมม่วง	สีน้ำเงิน
Lysozyme 0.05 %	สีน้ำเงิน	สีน้ำเงินอ่อน
Lysozyme 0.07 %	สีน้ำเงิน	สีน้ำเงินอ่อน
Lysozyme 0.1 %	สีน้ำเงิน	สีน้ำเงินอ่อน



ก



ข



ค



ง



จ



ฉ

ภาพที่ 6 ลักษณะสารสีจากการสกัดสาหร่ายสไปรูลินาด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ หลังการแช่แข็ง

เพื่อนำไปละลายที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส ก. ลักษณะของสาหร่ายก่อนการแช่แข็ง ข. ลักษณะของสาหร่ายหลังการแช่แข็ง ค. สารสีของสาหร่ายใน CaCl_2 ที่จะละลายที่ 40 องศาเซลเซียส ง. สารสีของสาหร่ายใน CaCl_2 ที่จะละลายที่ 60 องศาเซลเซียส จ. สารสีของสาหร่ายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่จะละลายที่ 40 องศาเซลเซียส ฉ. สารสีของสาหร่ายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่จะละลายที่ 60 องศาเซลเซียส

2.3 พิจารณาว่าวิธีการและตัวทำละลายชนิดใดให้สารสีไฟโคไซยานินที่ดีที่สุด แล้วทำการสกัดให้ได้ปริมาณมากขึ้นและนำสารสกัดที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายออก

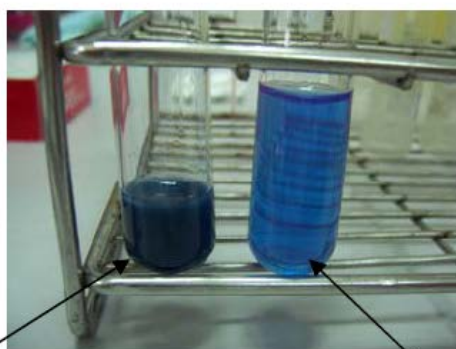
ผลการทดลองการสกัดสารสีจากสาหร่ายสไปรูลินาเมื่อพิจารณาแล้วพบว่า การสกัดด้วยตัวทำละลาย CaCl_2 0.1 และ 0.09 M, 50 mM phosphate buffer pH 6.8 และไลโซไซม์โดยการแช่แข็งแล้วละลายที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส ได้สารสีไฟโคไซยานินซึ่งเป็นสีน้ำเงินได้ดีกว่าการสกัดด้วยวิธีเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และจากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 7ก-ค)



ก



ข



ค

สีที่ระเหยตัวทำละลายออก

สีที่ยังไม่ระเหยตัวทำละลายออก

ภาพที่ 7 ลักษณะสารสีไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา

- ก. ตัวอย่างสารสีที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินาด้วยตัวทำละลาย CaCl_2 0.1 M
- ข. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator
- ค. เปรียบเทียบสารสีที่ระเหยตัวทำละลายออกกับที่ยังไม่ระเหยตัวทำละลายออก

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. ในการเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของสาหร่ายได้แก่ อาหาร อุณหภูมิ ความเข้มแสง ความเป็นกรด-ด่างและการกวน ในการทดลองได้ใช้อาหารเหลว Zarrouk ที่อุณหภูมิ 27-32 องศาเซลเซียส pH 9-11 ใช้เครื่องปั๊มออกซิเจนในการตีฟองอากาศ เลี้ยงในห้องปฏิบัติการสาขาพันธุศาสตร์ที่มีแสงส่องสว่างอย่างทั่วถึงได้ เพื่อให้ทราบถึงการเจริญของสาหร่ายได้ทำการวัดความขุ่นของเซลล์ การชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ และการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสีของเซลล์สาหร่ายมีสีเขียวเข้มขึ้นเรื่อยๆ แสดงว่าในสภาวะดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการเจริญของสาหร่ายได้เป็นอย่างดีและได้ปริมาณเซลล์จำนวนเพิ่มมากขึ้นพอที่จะนำมาใช้ในการสกัดสารสี

2. ในการสกัดสารสีจากสาหร่ายสไปรูลินาวิธีการที่เหมาะสมคือ การสกัดโดยวิธีการแช่แข็งเซลล์แล้วละลายที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส ด้วยตัวทำละลาย CaCl_2 , 50 mM phosphate buffer pH 6.8 และ Lysozyme เพราะได้สารสีน้ำเงินของไฟโคไซยานินและ CaCl_2 เป็นตัวทำละลายที่ใช้สกัดได้ดีทั้ง 2 วิธีการ คือ วิธีการแช่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและวิธีการแช่แข็งเซลล์สอดคล้องกับงานทดลองของสุริยาและคณะ (2543) ที่สกัดสารไฟโคไซยานินโดยใช้ CaCl_2 0.1 โมลาร์ สกัดเซลล์สดของสาหร่าย *A. siamensis* อย่างน้อย 6 ชั่วโมงจึงจะให้ปริมาณสารสีสูง เมื่อได้วิธีการและตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดแล้วทำการสกัดให้ได้สารสีปริมาณมากขึ้น แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นการทำให้สารสีเข้มข้น

เอกสารอ้างอิง

ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ. 2533. การใช้สาหร่ายสไปรูลินา (SPIRULINA SP.) เป็นแหล่งของรงควัตถุคาโรทีนอยด์สำหรับผสมอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (PENAEUS MONODON FABRICIUS).

วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 112 น.

นิติมา ศาลากิจ. 2547. คุณค่าทางโภชนาการของสาหร่าย *Phormidium angustissima*, *Nostoc commune*, *Calothrix marchica* และ *Gloeocapsa* sp. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 62 น.

ปิยนารถ ศรชัย. 2550. การแยก Spheroplasts จากไซยาโนแบคทีเรีย *Spirulina platensis*. น. 113. ใน รายงานการประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 3 (คณะวิทยาศาสตร์). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ

สุมาลี ดุลยอนุกิจ. 2535. ผลของระดับความเข้มข้นต่างๆ ของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสในสูตรอาหาร ZARROUK ต่อการเลี้ยงสาหร่ายเกลียวทอง (SPIRULINA SP.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 140 น.

สุริยา สารนรกกิจ, กนกอร จารุจารีต, จักรพงษ์ ลิ้มปณัสสรณ์, ทวิช ทำนาเมือง, นवलพรรณ ณ ระนอง, เปรมสุตา สมาน, วีนา ชูโชติ, สุพจน์ บุญแรง, สุรสิทธิ์ ชัยสวัสดิ์, โสภณ สิริศรัทธา และ อัจฉรา คอประเสริฐศักดิ์. 2543. **การผลิตสารสีธรรมชาติจากสาหร่ายเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม**. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 87 น.

สมชาย บุญสม. 2539. **สาหร่ายเกลียวทอง**. กรีนไดมอนด์, กรุงเทพฯ. 42 น.

สมศักดิ์ วรรณสิน. 2547. **สาหร่ายอาหารของอนาคต**. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 124 น.

สรวิศ เผ่าทองสุข. 2543. **สาหร่าย ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์จากสาหร่ายในประเทศไทย**. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 356 น.

อมรรัตน์ และบุษกร. 2543. **อาหารปลาสวยงาม**. เอกสารเผยแพร่ สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ, กรุงเทพฯ.

Alkinson, T., D.S. Michael and M.P. Hammond. 1987. **Biotechnology: Enzyme Technology**. VCH, Weinheim.

Sarada, R., M.G. Pillai. and G.A. Ravishankar. 1999. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**. 34:795-801 p.

Sergio, A.R. Paiva and M. Russell Robert. 1999. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidant. **Journal of the American College**. 18: 426-433 p.

Silveira, S.T., J.F.M. Burkert., J.A.V. Costa., C.A.V. Bukert. and S.J. Kalil. 2007. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresourcenechnology**. 98: 1629-1634

ตอนที่ 2 การศึกษาโครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินที่สกัดจากพืช เพื่อย้อมโครโมโซม

ชื่อผู้วิจัยภาษาไทย นางสาว ศิริลักษณ์ เขียมธรรม⁽¹⁾ นางสาวนวลจันทร์ มัจฉริยกุล⁽²⁾ นางสาว จินตหรา เล็กประยูร⁽³⁾

ชื่อผู้วิจัยภาษาอังกฤษ Miss Siriluck Iamtham⁽¹⁾ Miss Nuanchan Mutchariyakul⁽²⁾ Miss Jintara Lakprayoon⁽³⁾

^(1,3) (ภาษาไทย) สาขาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มก. กำแพงแสน

(ภาษาอังกฤษ) *Department of Genetics Faculty of Liberal Art and Sciences*

⁽²⁾ (ภาษาไทย) สาขาเคมี คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มก. กำแพงแสน

(ภาษาอังกฤษ) *Department of Chemistry Faculty of Liberal Art and Sciences*

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะสกัดสีจากพืชธรรมชาติเพื่อทดแทนสีทางเคมีที่มีความอันตรายและมีราคาที่สูงกว่า และเพื่อศึกษาโครงสร้างทางเคมี โดยใช้พืช ได้แก่ หม่อน (ผล) หว้า (ผล) แก้วมังกร (ผล) และกะหล่ำปลีสีม่วง (ใบ) นำมาสกัดสีด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1% ในเมทานอล และกรดอะซิติก 0.1% ในเมทานอล ที่อัตราส่วนต่างๆ กัน คือ 1:1 , 1:2 และ 1:3 พบว่า หม่อนที่สกัดจากกรดไฮโดรคลอริก 0.1% ในเมทานอล 1:1 สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้ดีที่สุด รองลงมาคืออัตราส่วน 1:2 และ 1:3 ส่วนสารสกัดสีจากหว้า แก้วมังกร สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้น้อยกว่าสีเคมี และกะหล่ำปลีสีม่วงไม่สามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้ นำสีที่ได้จากพืชตัวอย่างทุกชนิดที่สกัดด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1% ในเมทานอล อัตราส่วน 1:1 มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วย้อมปลายรากหอม พบว่า หม่อนสามารถย้อมติดเซลล์โครโมโซมได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นกะหล่ำปลีสีม่วง หว้า และแก้วมังกร ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้ไม่แตกต่างจากก่อนการทำบริสุทธิ์ จากนั้นนำแอนโทไซยานินบริสุทธิ์ที่ได้จากหม่อนมาศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วยเครื่อง NMR Spectrometer โดยค่าเคมีคัลชิฟท์ ที่ได้บ่งบอกถึงจำนวนของหมู่ Hydroxyl ในโครงสร้างของแอนโทไซยานิน ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับมาตรฐานแล้ว สามารถสรุปได้ว่าเป็นแอนโทไซยานิน ในกลุ่มของ ไชยานิดิน(Cyanidin)

คำสำคัญ: แอนโทไซยานิน ไชยานิดิน

ABSTRACT

The aim of this study is to extract the chromosome staining from natural plant which can replace the use of hazardous chemicals dye staining and also determine the chemical structure of the purify plant extracts. The extraction of *Hylocereus undatus* (fruits), *Syzygium cumini* (fruits), *Morus alba* L. (fruits), and *Brassica oleracea* L. (leafs) using 0.1% HCl in methanol and 0.1% acetic acid in methanol at the ratio 1:1, 1:2 and 1:3 were established. The research results showed that *M. alba* with the extraction of 0.1% HCl in methanol 1:1 produced the most effective in chromosome staining following with the same extraction solvent at the ratio of 1:2 and 1:3. The

extraction from *S. cumini* and *H. undatus* contain lower effective in chromosome staining compare to the chemical dye staining. By the way, the extract from *B. oleracea* could not stain the chromosome. The sample plants, with the extraction of 0.1% HCl in methanol at the ratio of 1:1 were purified, and the products were used as the dye for chromosome staining again. The extracts with or without purification showed the same results for chromosome staining which mean *M. alba* is the most effective for chromosome staining following with *B. oleracea*, *S. cumini* and *H. undatus*, respectively. Purify anthocyanins from *M. alba* was choose to study the chemical structure using NMR spectrometer. The chemical shift value imply the number of the hydroxyl group in the anthocyanin structure. It can concluded that the anthocyanin is in cyanidin groups.

Keywords: anthocyanins, cyanidin

บทนำ

สีย้อมโครโมโซมมีความสำคัญมากในการศึกษาลักษณะของโครโมโซม เมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการศึกษาลักษณะโครโมโซมมีบทบาทต่อการศึกษาทางพันธุศาสตร์โมเลกุล (Molecular Genetics) ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วมาก และแพร่หลายมากขึ้น สีย้อมที่นิยมนำมาย้อมปลายรากหอม คือ สีออร์ซีน และสีคาร์มีน สีทั้งสองชนิดนี้มีราคาค่อนข้างแพง และมีความเป็นอันตรายต่อผู้เตรียมสีและผู้ใช้งาน จึงมักมีการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้แทนที่สีเหล่านี้ ซึ่งเป็นสารที่มีเป็นพิษน้อยกว่าสีเคมี แอนโทไซยานิน เป็นสีที่สามารถสกัดได้จากพืชทั่วไป ที่มีความเป็นพิษน้อยมาก โดยเป็นสารประเภท flavonoid phenolic compounds ที่มีใน ผลไม้ เบอร์รี่ และดอกไม้ (Cooper-Driver, 2001) จะให้สี เช่น สีส้ม สีแดง และสีน้ำเงิน เป็นสีที่สามารถละลายน้ำได้ และมักถูกนำมาใช้ในการประกอบอาหาร (Pazmino-Duran *et al.*, 2001) แอนโทไซยานินสามารถย้อมติดโครโมโซมได้ดี และสกัดได้จากผลไม้ที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น จึงทำให้มีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่ามาก

จากผลไม้ที่สามารถหาได้ง่าย จึงนำผลไม้ เช่น หม่อน หวีว แก้วมังกร และกะหล่ำปลีสีม่วงมาทำการสกัดแอนโทไซยานิน เพื่อนำมาใช้ในการย้อมโครโมโซม และศึกษาโครงสร้างทางเคมี เพื่อเป็นการบ่งชี้ความจำเพาะของชนิดของแอนโทไซยานินที่สกัดได้ ทั้งนี้เพื่อให้ได้สีที่มีคุณภาพใกล้เคียงสีเคมี แต่มีราคาที่ถูกกว่าและมีความเป็นอันตรายที่ต่ำกว่าสีเคมี

1. ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับพืชที่นำมาใช้ในการสกัดสี

แอนโทไซยานิน เป็นสารประเภท flavonoid phenolic compounds จะกระจายอยู่ทั่วในผลไม้ เบอร์รี่ และดอกไม้ จะให้สี เช่น สีส้ม สีแดง และสีน้ำเงิน flavonoids เป็นสารที่มีอยู่มากและแพร่หลายใน ส่วนประกอบของพืช ซึ่งโครงสร้างหลักจะมีนิวเคลียสของ flavonoids เป็นนิวเคลียสของ flaven โดยมี 2 aromatic rings ที่เป็นการเชื่อมกันของหมู่คาร์บอน flavonoids แบ่งเป็น 11 กลุ่มย่อยของ flavenes ซึ่ง

flavonols และ anthocyanins เป็นหนึ่งในนั้นด้วย aromatic rings A และ B เป็น hydroxyl groups ตำแหน่งที่ 5, 7 ของ A ring เป็น hydroxyl และรูปแบบของ hydroxylation ของ B ring เป็นรูปแบบของกรด cinnamic การอธิบายโครงสร้างทางเคมีของ แอนโทไซยานิน เพื่อความถูกต้องควรแยกแล้วนำมาเปรียบเทียบกับมาตรฐาน โดยวิธีการที่ทันสมัยและมีประสิทธิภาพสูง คือ Chromatography และ Spectroscopy ที่สามารถจำแนกแอนโทไซยานิน ตามโครงสร้างได้ 210 ชนิด

ผลไม้ส่วนมากจะมีแอนโทไซยานินในแบบผสมหลายชนิด ซึ่งรูปแบบต่างๆ ที่มีเพียง 1 ชนิด มีในผลเสาวรธ (Ishikura, 1975) และในลูกแพร์ (Timberlak and Bridle, 1971) ส่วนรูปแบบสารประกอบที่มากกว่า 20 ชนิดมีอยู่ในองุ่นบางชนิด (Williams *et al.*, 1978, Wulf and Nagel, 1978) แอนโทไซยานิน สามารถพบได้ในพืชมากกว่า 200 ชนิด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงชนิดของ glycoside (Jeana, 1987)

พืชที่ใช้ในการทดลองการสกัดแอนโทไซยานินเพื่อใช้ย้อมโครโมโซม และศึกษาโครงสร้างทางเคมี มีดังนี้

1.1 แก้วมังกร (Dragon fruit)



ภาพที่ 1 แก้วมังกรเนื้อแดง (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton&Rose.)

ที่มา: อุไร (2547)

Kingdom	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Order	: Caryophyllales
Family	: Cactaceae
Species	: <i>H. undatus</i>

แก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงผิวผลแดง เป็นพันธุ์ที่มีเนื้อผลสีแดง (ภาพที่ 1) ผิวผลสีแดงคล้ายๆ กับแก้วมังกรเนื้อขาวเปลือกแดง มีขนาดผลเล็กกว่าเนื้อขาว แต่มีความหวานมากกว่า มีหลายชนิดด้วยกัน เช่น

- *Hylocereus costaricensis* (Weber) Britt. Et Rose เนื้อผลมีกลิ่นหอม มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศคอสตาริกา

- *Hylocereus esculentus* Kimnach เป็นต้นที่ออกดอกติดผลง่าย แต่ขนาดผลไม่สม่ำเสมอ พบในกัวเตมาลา

- *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britt. Et Rose เป็นแก้วมังกรที่ออกดอกดก แต่ติดผลยาก พบในโคลัมเบียและปานามา และ *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britt. Et Rose- เป็นต้นที่ดอกมีกลิ่นหอม พบในปานามาไปจนถึงเอกวาดอร์ เป็นต้น (วิจิตร, 2546)

ลักษณะทั่วไปของแก้วมังกร เป็นไม้อวบน้ำในวงศ์เดียวกับกระบองเพชรที่จัดเป็นพืชอิงอาศัย มีถิ่นกำเนิดในประเทศเขตร้อนของอเมริกา ลำต้นเป็นสามเหลี่ยม แต่ละสันหยักว่าเป็นพูและมีหนามแหลมตามรอยหยัก ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศออกตามรอยหยักที่ลำต้น ผลิบานในช่วงเดือนมกราคมถึงมีนาคม ดอกเป็นหลอดยาว 15-25 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 20-25 เซนติเมตร มีกลีบรวมรูปแถบปลายแหลม มักบานตอนกลางคืนและมีกลิ่นหอม เมื่อติดผลกลีบดอกจะร่วงไป ผลขยายขนาดขึ้นเป็นรูปรี เส้นผ่าศูนย์กลาง 10-12 เซนติเมตร ยาว 10-15 เซนติเมตร ผิวผลมีกลีบติดอยู่คล้ายเกร็ด เมื่อสุกมีสีชมพูเข้ม ภายในมีเนื้อนุ่มฉ่ำน้ำ และเมล็ดสีดำเล็กๆ กระจายทั่ว ปัจจุบันแก้วมังกรที่นิยมบริโภค มี 2 พันธุ์ คือ พันธุ์เนื้อสีขาว ผลรูปรี กลีบบนผลยาวเรียว มีทั้งพันธุ์ไทยและพันธุ์เวียดนาม แตกต่างกันที่ขนาดผล โดยพันธุ์ไทยจะมีผลยาวเรียวและมีรสหวานอมเปรี้ยว ส่วนพันธุ์เวียดนาม ผลป้อม และมีรสหวานกว่า และพันธุ์เนื้อสีแดง ผลกลมเล็ก กลีบบนผลถี่และสั้น รสหวานกว่าพันธุ์เนื้อสีขาว ปัจจุบันยังไม่มีผู้ปลูกมากนัก จึงมีราคาค่อนข้างแพง คุณค่าอื่นๆ จากการวิจัยทางโภชนาการพบว่า เนื้อผลของแก้วมังกรประกอบด้วยใยอาหาร วิตามินซี และแร่ธาตุอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์มากมาย ทั้งยังให้แคลอรีต่ำ (อุไร, 2547)

1.2 หว้า (Jambolan)



ภาพที่ 2 หว้า (*Syzygium cumini* (L.) Skeeis.)

ที่มา: นิจศิริ (2547)

Kingdom : Plantae
 Division : Magnoliophyta
 Class : Magnoliopsida
 Order : Myrtales
 Family : Myrtaceae
 Species : *S. cumini*

หว่า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Syzygium cumini* (L.) Skeels. และมีชื่ออื่นๆ ว่า หว่าซี่แพะ ห่ามะห่า ห่าซี่แพะ (เหนือ) (ศูนย์พัฒนาตำราการแพทย์แผนไทย, 2547) มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ คือ เป็นไม้ยืนต้น สูงประมาณ 10-25 เมตร เปลือกลำต้นเรียบ สีน้ำตาลปนเทา ใบเป็นใบเดี่ยว ออกตรงข้ามกันเป็นคู่ ใบรูปไข่หรือรูปรี กว้าง 3-7 เซนติเมตร ยาว 8-14 เซนติเมตร แผ่นใบเรียบค่อนข้างหนา หลังใบเรียบเป็นมันลื่น ท้องใบเรียบสีอ่อนกว่า ขอบใบเรียบ ดอกออกเป็นช่อ ออกตามซอกใบ หรือที่ปลายยอด แกนช่อยาว 4.5-10 เซนติเมตร ฐานรองดอกรูปกระสวย ขนาด 0.2-0.5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงมี 4 กลีบ กลีบดอกมีสีขาวอมเหลือง มี 4 กลีบ เกสรเป็นเส้นสีขาวจำนวนมากผลเป็นรูปรีแกมรูปไข่ (ภาพที่ 2) มีเนื้อผลมาก มีรสฝาดเปรี้ยว ผิวมันเรียบ ยาวประมาณ 1-1.2 เซนติเมตร พอแก่จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงดำ เมล็ดเดี่ยว มีสรรพคุณ คือ ใบแก้บิดมูกเลือด ต้มชำระบาดแผล ตำทาแก้โรคผิวหนัง เปลือกต้น แก้ท้องร่วง ปวดธาตุ แก้น้ำลายเหนียว ต้มชำระล้างบาดแผล และเมล็ด ต้มหรืออบรับประทาน แก้เบาหวาน แก้บิด ท้องร่วง แก้อหิวาตกโรค (นิจศิริ, 2547) หว่า เป็นต้นไม้ประจำจังหวัดเพชรบุรี เป็นไม้ต้นที่พบปลูกอยู่ตามสวนผลไม้หลายแหล่ง มีพุ่มใบค่อนข้างแน่น ให้ร่มเงาได้ดี และด้วยรสหวานอมเปรี้ยวปนฝาดของผลและยอด จึงเป็นที่ถูกใจของหลายคน (อุไร, 2547)

1.3 หม่อน (Mulberry)



ภาพที่ 3 หม่อน (*Morus alba* L.)

ที่มา: อุไร (2547)

Kingdom : Plantae
 Division : Magnoliophyta
 Class : Magnoliopsida
 Order : Rosales
 Family : Moraceae
 Species : *Morus* L.

หม่อนมีถิ่นกำเนิดที่ประเทศจีน ในธรรมชาติพบตามป่าเบญจพรรณทั่วทุกภาค เป็นไม้ต้นที่สูงได้ถึง 5 เมตร ทุกส่วนของต้นเมื่อหักจะมีน้ำยางสีขาวข้นไหลออกมา ต้นหม่อนปลูกมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยมีไม่ต่ำกว่า 20 สายพันธุ์ เช่น หม่อนน้อย หม่อนมี หม่อนไผ่ หม่อนส้ม หม่อนสา ฯลฯ (อุไร, 2547)

หม่อนเป็นไม้พุ่ม ลำต้นตั้งตรง มีหลายพันธุ์ ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไข่ ขอบเรียบหรือหยักเว้าเป็นพู ขึ้นกับพันธุ์ กว้าง 8-14 ซม. ยาว 12-16 ซม. ผิวใบสากคาย ดอกช่อ รูปทรงกระบอกออกที่ซอกใบ แยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน กลีบรวมสีขาวหม่นหรือสีขาวแกมเขียว ผลเป็นผลรวม (ภาพที่ 3) รูปทรงกระบอก เมื่อสุกสีม่วงแดง (วงศ์สฤติ, 2543) หม่อนมีการนำมาใช้ประโยชน์ เป็นสมุนไพร ได้แก่ ส่วนของใบ ต้มดื่มต่างน้ำชา แก้ไข้ ตัวร้อน กระจายน้ำ แก้ไอ เจ็บคอ ระวังประสาท ต้มเอาน้ำล้างตา แก้ตาแดง ตาฝ้าฟาง ลดน้ำตาลในเลือด และในส่วนของผล ทำให้ชุ่มคอ บำรุงไต ตับร้อน แก้อาการวิงเวียนหน้ามืด ตาลาย (ศูนย์พัฒนาตำราการแพทย์แผนไทย, 2547)

1.4 กะหล่ำปลีสีม่วง (Red cabbage)



ภาพที่ 4 กะหล่ำปลีสีม่วง (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.)

ที่มา: อุไร(2547)

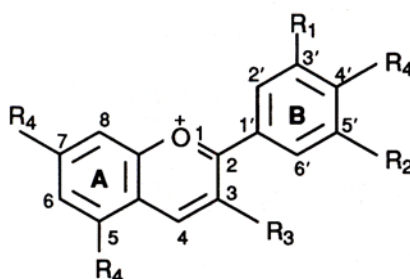
Kingdom	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Order	: Brassicales
Family	: Brassicaceae
Species	: <i>B. oleracea</i>

กะหล่ำปลีสีแดง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. และมีชื่อสามัญว่า Red cabbage ใบมีสีม่วงแดง เนื่องจากมีสาร anthocyanins มากเป็นพิเศษ นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ แต่กินได้เช่นเดียวกับกะหล่ำปลีธรรมดา กะหล่ำปลีเป็นไม้ล้มลุกอายุสองปี ลำต้นสั้นมาก ใบเดี่ยว รูปกลมหรือรูปไข่ กว้าง เรียงสลับซ้อนกันแน่นหลายชั้นเป็นก้นกลมแบนหรือกลมรี แผ่นใบหนา ใบชั้นนอกสุดมีนวล (ภาพที่ 4)

กะหล่ำปลีมีถิ่นกำเนิดในทวีปยุโรปตอนใต้ ได้มีผู้นำเข้ามาทดลองปลูกในประเทศไทยก่อน พ.ศ. 2470 พบว่าปลูกได้ดีในภาคเหนือซึ่งมีอากาศเย็น ต่อมาผู้นิยมกินมากขึ้น จึงได้มีการค้นคว้าพัฒนาพันธุ์ กะหล่ำปลีพันธุ์ร้อนขึ้น ปัจจุบันจึงปลูกกะหล่ำปลีได้ทุกฤดูกาล (ราชบัณฑิตยสถาน, 2547)

2. การสกัดสารสีจากพืชธรรมชาติ

แอนโทไซยานินมาจากรากศัพท์ภาษากรีก ที่ว่า *anthos* แปลว่าดอกไม้ และ *kyanos* ที่แปลว่า สีน้ำเงิน เป็นกลุ่มที่มีมากในพืช และเป็นส่วนหนึ่งของสารกลุ่ม flavonoids glycosides ได้มาจาก polyhydroxy และ polymethoxy ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ 2-phenylbenzopyrylium หรือ flavylium salts ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ภาพแสดงโครงสร้างของแอนโทไซยานิน แคตไอออนของ flavylium โดย R_1 และ R_2 เป็น H, OH หรือ OCH_3 R_3 เป็น glycosyl หรือ H และ R_4 เป็น OH หรือ glycosyl **ที่มา:** Mazza and Miniati (1945)

ความแตกต่างของแอนโทไซยานินแต่ละตัวจะอยู่ที่จำนวนของหมู่ hydroxyl ในธรรมชาติจำนวนของน้ำตาลในโมเลกุลและตำแหน่งที่เกาะในโมเลกุล แอนโทไซยานินที่พบในธรรมชาติ จะมีโครงสร้าง ดังในตารางที่ 1 โดยมี 6 ชนิดที่พบได้มากในพืช ได้แก่ Pelargonidin, Cyanidin, Peonidin, Delphinidin, Petunidin และ Malvidin (Mazza and Miniati, 1945)

ตารางที่ 1 แอนโทไซยานินที่พบในธรรมชาติ (Mazza and Miniati, 1945)

ชื่อสาร	รูปแบบการแทนที่							
	3	5	6	7	3'	4'	5'	สี
Apigeninidin(Ap)	H	OH	H	OH	H	OH	H	ส้ม
Aurantindin(Au)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	ส้ม
Capensinidin(Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	แดงอมน้ำเงิน
Cyanidin(Cy)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	แดงอมส้ม
Delphinidin(Dp)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	แดงอมน้ำเงิน
Europinidin(Eu)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	แดงอมน้ำเงิน
Hirsutidin(Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	แดงอมน้ำเงิน
6-Hydroxycyanidin(6OHCy)	OH	OH	OH	OH	OH	H		แดง
Luteolinidin(Lt)	H	OH	H	OH	OH	OH	H	ส้ม
Malvidin(Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	OMe	แดงอมน้ำเงิน
5-Methylcyanidin(5-Mcy)	OH	OMe	H	OH	OH	H		แดงอมส้ม
Pelargonidin(Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H	ส้ม
Peonidin(Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	แดงอมส้ม
Petunidin(Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	แดงอมน้ำเงิน
Pulchellidin(Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	แดงอมน้ำเงิน
Rosinidin(Rs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	แดง
Tricetinidin(Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	แดง

ซึ่งการสกัดแอนโทไซยานินสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกของเบอร์รี่สายพันธุ์ *Smilax aspera*. ด้วย 0.1% กรดไฮโดรคลอริก ในเมทานอล เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด นำส่วนผสมที่ได้มากรอง และล้างส่วนที่เหลืออยู่ด้วย 0.1% กรดไฮโดรคลอริก ในเมทานอล จนกระทั่งสารละลายใส แล้วนำส่วนผสมที่กรองได้มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่ 30 องศาเซลเซียส นำส่วนที่ได้มาละลายใน 0.01% กรดไฮโดรคลอริก (Giuseppe and Luigia, 2004)

การสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกลิ้นจี่ โดยสกัดไว้ค้างคืนที่ 25 องศาเซลเซียส ในตัวกลางที่ประกอบด้วย 0.5 M HCl (ในน้ำ) ด้วยวิธีของ Zhang และคณะ (2001) นำสารที่ได้มากรองด้วย กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และกรองกากออก นำสารสกัดมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer นำมากรองและผ่านเครื่อง Rotary evaporator ที่ 40 องศาเซลเซียส และนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป (Zhang et al., 2004)

เกียรติศักดิ์ (2535) ทำการสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันด้วยกรดไฮโดรคลอริก pH 4.5 เป็นตัวทำละลายโดยมีอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายกับดอกอัญชันเท่ากับ 120:3 ใช้เวลา 73 นาที และมีการเขย่าระหว่างสกัดทำให้ได้ปริมาณแอนโทไซยานินสูงสุด ส่วนอุณหภูมิในการเก็บควรเก็บที่ห้องเย็น 4 องศาเซลเซียส ให้ผลในการชะลอการลดลงของปริมาณแอนโทไซยานิน และมีการสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุดโดยใช้ตัวทำละลายคือ 1 N HCl, 1 N H₂SO₄, 1 N H₃PO₄, 1% HCl ในเมทานอล และ 1% ในบิวทานอล พบว่า 1

N HCl ให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงสุด (สุภาพรรณ, 2529)

3. การศึกษาโครงสร้างทางเคมี

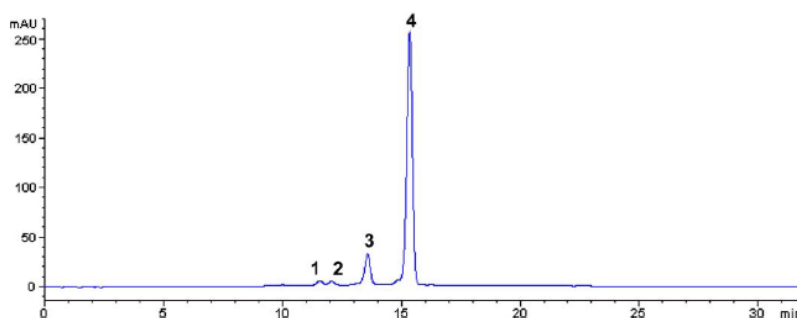
โครงสร้างทางเคมีเป็นตัวบ่งชี้สถานะของสารนั้น และยังเป็นการแสดงถึงคุณสมบัติต่างๆ ทางเคมีอีกด้วย ว่าสารนั้นๆ มีความสามารถในการทำปฏิกิริยามากน้อยเพียงใด การวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีจึงมีความสำคัญในการนำมาเปรียบเทียบสารและจำแนกสารแต่ละชนิด ตัวอย่างเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาโครงสร้างทางเคมี เช่น

ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography , TLC) หรือวงเคลือบบางเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับการแยกและตรวจเอกลักษณ์ (identify) สารทั้งในรูปแบบสารเดี่ยว สารสกัดจากยาสำเร็จรูป วัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ เทคนิคทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีจะคล้ายกับเปเปอร์โครมาโทกราฟีตรงที่ทั้ง 2 เทคนิคมีเฟสอยู่กับที่เป็นแบบเปิด (open bed) ที่อาศัยหลักความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของสาร เมื่อให้สารละลายเคลื่อนที่ผ่าน (solvent flow) สารตัวอย่างบนกระดาษหรือแอคซอร์เบนต์ แต่มีข้อดีกว่าเปเปอร์โครมาโทกราฟี คือสามารถแยกได้เร็วกว่า ใช้สารตัวอย่างน้อยกว่า จึงมีความไวในการตรวจสอบมากกว่า นอกจากนี้ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีจะมีการแยกสารดีกว่าเปเปอร์โครมาโทกราฟี เนื่องจากมีเส้นใย (fiber) ทำให้มีการกระจายของแถบน้อย แอคซอร์เบนต์ของทินเลเยอร์โครมาโทกราฟีส่วนใหญ่ใช้ซิลิกาเจล อะลูมินาหรือเซลลูโลส (รัตน, 2547)

เอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี (NMR spectroscopy) NMR เป็นคำย่อของ Nuclear Magnetic Resonance โดยที่ Nuclear คือ นิวเคลียส (รวมทั้งโปรตอนและนิวตรอนที่อยู่ในนิวเคลียสด้วย), Magnetic คือ สนามแม่เหล็กภายนอก (external magnetic field) , Resonance คือ ปรากฏการณ์เรโซแนนซ์ (resonance effect) เอ็นเอ็มอาร์มีประโยชน์หลายอย่าง เช่น การระบุตำแหน่งของอะตอมในโมเลกุล, การระบุโครงสร้างของสาร, การวัดอัตราส่วนของสารในสารผสม, การบอกโครงสร้างแบบสัมพัทธ์ (สถาบันนวัตกรรมและพัฒนาระบบการเรียนรู้, 2553)

นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์โครงสร้างและการจำแนกแอนโทไซยานินโดยใช้เครื่อง HPLC-MS ตัวอย่างเช่นการนำสารละลายแอนโทไซยานินบริสุทธิ์จากลิ้นจี่ 20 ไมโครลิตรมาใส่ในเครื่อง HPLC-MS ซึ่งจะประกอบด้วยระบบของ Hewlett-Packard 1040A photodiode และระบบ Hewlett-Packard 9000 ในคอมพิวเตอร์ ตรวจสอบที่ 280 nm (Zhang *et al.*,2002) และสารละลายในลักษณะที่คล้ายกันแอนโทไซยานินยังสามารถวิเคราะห์ได้จากเครื่อง HPLC-DAD-MS ความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์แอนโทไซยานินอยู่ที่ 520 nm ทำให้เกิดกราฟที่มีจุดพีคของการดูดกลืนคลื่นแสง ที่สามารถ นำมาวิเคราะห์ผลได้จาก cyaniding-3-glocoside ที่เจือจาง (Giuseppe and Luigia, 2004)

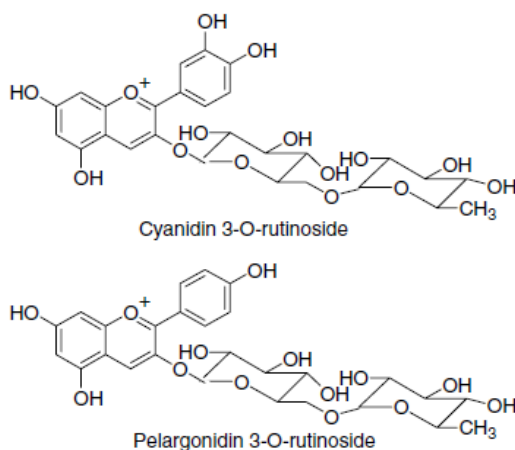
Giuseppe and Luigia (2004) ศึกษาโครงสร้างของแอนโทไซยานิน ที่สกัดจากผล *Smilax aspera* L. แล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC-DAD-MS. ที่ 520 nm พบว่าเป็นแอนโทไซยานิน ชนิด Cyanidin 3-O-rutinoside และ Pelargonidin 3-O-rutinoside ดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 แสดงกราฟของการวิเคราะห์แอนโทไซยานิน

ที่มา: Giuseppe and Luigia (2004)

ซึ่งจากกราฟที่แสดงด้านบนจะสามารถเห็นจุดพีคได้ 4 จุด โดยมีจุดพีคที่ 1 และ 2 เป็นจุดที่มีพื้นที่กราฟน้อยกว่า 3% และไม่เพียงพอต่อการนำมาพิจารณาได้ ในส่วนของแอนโทไซยานินจะมีอยู่สองจุดที่มีพื้นที่กราฟมาก คือ จุดพีคที่ 3 และ 4 ซึ่งโครงสร้างที่ได้จะเป็นดังภาพที่ 7 ที่มีอัตราส่วน 13% และ 83% ตามลำดับ โครงสร้างทางเคมีที่ได้จากการวิเคราะห์จากกราฟนี้ คือ Cyanidin 3-O-rutinoside และ Pelargonidin 3-O-rutinoside.



ภาพที่ 7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ Cyanidin 3-O-rutinoside และ Pelargonidin 3-O-rutinoside

ที่มา: Giuseppe and Luigia (2004)

จึงได้มีการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินในพืชอื่นๆ เพื่อเปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของแอนโทไซยานินกับโครงสร้างทางเคมีของสีย้อมเคมี

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาวิธีการสกัดสีจากพืชธรรมชาติที่เหมาะสมในการนำมาย้อมโครโมโซมเพื่อใช้ทดแทนสีเคมี และศึกษาอายุการใช้งาน และคุณภาพของสีที่ได้ หลังจากสกัดสารให้สีจากพืชที่บริสุทธิ์ และนำไปวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของสารสกัดสีจากพืชเพื่อเปรียบเทียบถึงความแตกต่างทางโครงสร้างกับสีสังเคราะห์ทางเคมี

วิธีวิจัย

1. การคงสภาพปลายรากหอม

1.1 การเลี้ยงปลายรากหอม

นำหัวหอมแชกมาตัดเอาปลายรากเก่าออก แล้วนำมาเลี้ยงบนแผ่นโฟมที่เจาะช่องให้หัวหอมจุ่มหัวลงไปอยู่ในน้ำสะอาด ประมาณครึ่งหัว เป็นเวลาประมาณ 3-4 วัน โดยเปลี่ยนน้ำที่ใช้เลี้ยงทุกวัน

1.2 การคงสภาพปลายรากหอม

เมื่อปลายรากมีความยาวพอประมาณ นำมาตัดเหนือหมวกรากขึ้นมาประมาณ 1 นิ้ว มาใส่ในสาร fixative (เมทานอล: กรดอะซิติก, 3:1) แช่ปลายรากหอมในน้ำยาคงสภาพประมาณ 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปใช้ต่อไป

2. การเตรียมตัวทำละลาย

2.1 การเตรียมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1% ในเมทานอลจากกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% ที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.18 g/cm^3

2.2 การเตรียมกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1% ในเมทานอลจากกรดอะซิติกเข้มข้น 100% ที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.06 g/cm^3

3. การสกัดสารแอนโทไซยานิน

นำพืชที่ใช้ทดลอง คือ แก้วมังกร (เนื้อ), หว้า(ผล), หม่อน(ผล) และกะหล่ำปลี(ใบ) สีม่วงมาล้างในขวดรูปชมพู่ และใส่ตัวทำละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1% ในเมทานอล ลงไปในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:3 (w/v) เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วเก็บไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปย้อมเซลล์รากหอม และเปลี่ยนมาสกัดด้วยตัวทำละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1% ในเมทานอล ด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน

4. การย้อมปลายรากหอม

นำปลายรากหอมที่เตรียมไว้ในน้ำยาคงสภาพ มาตัดเอาเฉพาะส่วนปลายรากสีขาว ชู่นยาวประมาณ 2-3 มิลลิเมตร วางบนสไลด์ที่สะอาด 1-2 ราก หยดกรด HCl ไปบนส่วนของ ราก 1-2 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีเพื่อละลายส่วนของผนังเซลล์ที่ติดกัน ชั้กรดออกให้หมด อาจหยดน้ำลงไปเพื่อล้างกรด แล้วชั้ น้ำออก หยดสีย้อมโครโมโซมที่ได้จากการสกัดในข้อ 3 ลงไป 1-2 หยด ใช้เข็มเย็บปลายแบนขยี้ปลาย

รากให้ละเอียดเพื่อทำให้เซลล์แยกออกจากกันได้มากที่สุด แยกเอาส่วนที่มีขนาดใหญ่ และขยะต่างๆทิ้งไป ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ทิ้งไว้ 3-5 นาที นำสไลด์ผ่านเปลวไฟ แล้วใช้เทคนิค squash แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ศึกษาระยะต่างๆของการแบ่งเซลล์ การย่อยปลายรากหอม จะย้อมครั้งแรกหลังจากการกรอง และ จะทำการย้อม ในทุกๆ เดือน เป็นเวลา 3-9 เดือน เพื่อดูคุณภาพของสีในการย้อมโครโมโซม

5. การทำแอนโทไซยานินให้บริสุทธิ์

นำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออก ด้วย Rotary Evaporator ที่ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำสารละลายที่ได้มาผ่านคอลัมน์ C18- LP. (Bruker Avance 300) โดยทำคอลัมน์ให้เปียกด้วย เมทานอล 3 ml. เติมสารสกัดตัวอย่าง 1 ml. แล้วชะสารในกลุ่มของกรดน้ำตาล และสารประกอบน้ำอื่นๆ ด้วย 0.01% HCl (v/v) ในน้ำปราศจากไอออน 3 ml. ชะสารในกลุ่ม Polyphenolics ออกมาด้วย ethyl acetate 3 ml. แล้วชะด้วย 0.01% HCl (v/v) ในเมทานอล 3 ml. เพื่อเก็บส่วนของแอนโทไซยานิน ล้างคอลัมน์ด้วย น้ำปราศจากไอออน 5 ml. จากนั้นนำแอนโทไซยานิน มาระเหยตัวพาทิ้งด้วย Rotary Evaporator ที่ 30 องศาเซลเซียส ละลายใน 0.01% HCl (v/v) ในน้ำปราศจากไอออน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

6. การศึกษาโครงสร้างสารสกัดด้วย NMR Spectrometer

นำสารสกัดเข้มข้นที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR spectrometer (Bruker Avance 300 spectrometer) ในสาร MeOD (CD_3OD) ที่ 300 MHz. ผลที่ได้นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Susana และคณะ (2008) และ Du และคณะ (2008)

ผลและวิจารณ์

1. การย้อมติดสีโครโมโซมในพืชต่างๆ ก่อนการสกัดสีให้บริสุทธิ์

จากตัวอย่างสีที่ใช้ คือ ผลหว่า ผลหม่อน ผลแก้วมังกร และใบกะหล่ำปลีสีม่วง พบว่าสีที่ได้จาก ผลหม่อนสามารถย้อมติดสีโครโมโซมได้ชัดเจนมากที่สุด ส่วนสารสกัดสีจาก ผลหว่า ผลแก้วมังกร ติดสีโครโมโซมจางกว่าสีเคมี และ สารสกัดสีจากใบกะหล่ำปลีสีม่วงไม่ติดสีโครโมโซมเมื่อนำผลการติดสีบนโครโมโซมของสารสกัดสีจากพืชธรรมชาติมาเปรียบเทียบกับสีทางเคมี คือสีออร์ซิน และสีคาร์มีน พบว่า สีของสารสกัดจากหม่อน มีสีที่มีความเข้มใกล้เคียงหรือเทียบเท่ากับสีทั้งสอง และสารสกัดสีที่ได้จาก หว่า แก้วมังกร และกะหล่ำปลีสีม่วงมีการติดสีที่น้อยกว่าสีทางเคมี คือสามารถย้อมติดเซลล์โครโมโซมแต่มีสีจาง ดังตารางที่ 2 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ ศรันณวิทย์ (2549) ทำให้พบว่าการสกัดสีจากพืชสามารถย้อมติดโครโมโซมได้ ทั้งติดสีเข้มเช่นในหนามแดง และสีจาง เช่นในอัญชัน

ตารางที่ 2 แสดงผลการติดสีโครโมโซมของสปีสจากพืชก่อนการสกดสีให้บริสุทธิ์

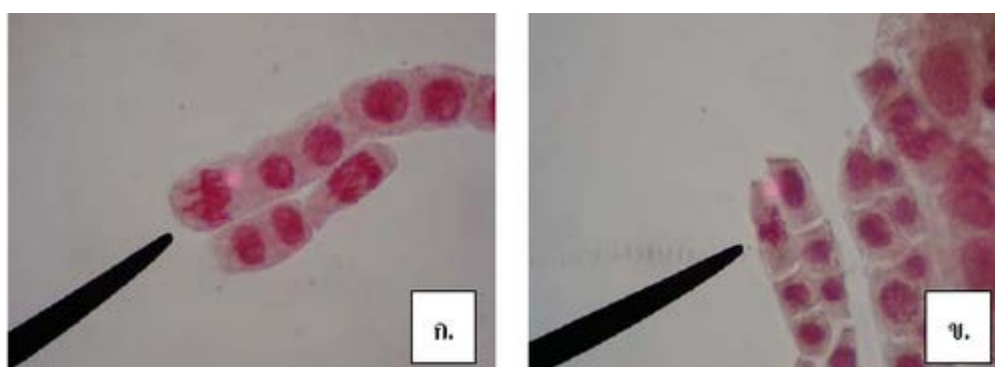
สีที่ได้จากการสกด	การติดสีบนโครโมโซม			
	เดือนที่ 1	เดือนที่ 2	เดือนที่ 3	เดือนที่ 4
หัวัว(acetic 1:1)	+	+	+	-
หัวัว(acetic 1:2)	+	+	+	-
หัวัว(acetic 1:3)	-	-	-	+
หัวัว(HCl 1:1)	+++	++	++	-
หัวัว(HCl 1:2)	++	+	+	-
หัวัว(HCl 1:3)	+	-	-	-
หม่อน(acetic 1:1)	++	-	+++	+++
หม่อน(acetic 1:2)	++	-	+++	+++
หม่อน(acetic 1:3)	++	+	++	+++
หม่อน(HCl 1:1)	++++	++++	++++	+++
หม่อน(HCl 1:2)	+++	+++	+++	+++
หม่อน(HCl 1:3)	+++	++	+++	+++
กะหล่ำปลีสีม่วง(acetic 1:1)	-	-	-	-
กะหล่ำปลีสีม่วง(acetic 1:2)	-	-	-	-
กะหล่ำปลีสีม่วง(acetic 1:3)	-	-	-	-
กะหล่ำปลีสีม่วง(HCl 1:1)	-	-	-	-
กะหล่ำปลีสีม่วง(HCl 1:2)	-	-	-	-
กะหล่ำปลีสีม่วง(HCl 1:3)	-	-	-	-
แก้วมังกร(acetic 1:1)	-	-	-	-
แก้วมังกร(acetic 1:2)	-	-	-	-
แก้วมังกร(acetic 1:3)	-	-	-	-
แก้วมังกร(HCl 1:1)	++	+	+	-
แก้วมังกร(HCl 1:2)	+	++	+	-
แก้วมังกร(HCl 1:3)	+	++	+	-

โดยกำหนดให้ผลการติดสี เป็นดังนี้

- ++++ คือติดสีมากที่สุด
- +++ คือติดสีมาก
- ++ คือติดสีปานกลาง
- +
- คือไม่ติดสีที่โครโมโซม

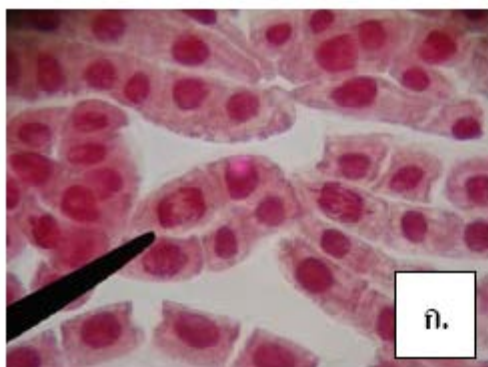
2. การสกัดสีจากพืชโดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิด และความเข้มข้นต่างกัน

จากการสกัดสีจากพืชด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ กรดไฮโดรคลอริก 0.1% ในเมทานอล และ กรดอะซิติก 0.1% ในเมทานอล ให้ผลคือ สารสกัดสีที่สกัดด้วยตัวทำละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1% ในเมทานอล สามารถย้อมติดสีบนโครโมโซมของปลายรากหอม ได้ดีกว่าสารสกัดสีที่ได้จากตัวทำละลายกรดอะซิติก 0.1% ในเมทานอล สามารถมองเห็นสีได้ชัดเจนกว่าดังภาพที่ 8 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัย ของ สุภาพรรณ (2529) ที่สกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชันด้วย 1 N HCl, 1 N H₂SO₄, 1 N H₃PO₄, 1% HCl ในเมทานอล และ 1% HCl ในบิวทานอล พบว่า 1 N HCl ให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงสุด เห็นได้ว่ากรดไฮโดรคลอริก สามารถสกัดแอนโทไซยานินได้ดี และความเข้มข้นมากจะยังสามารถสกัดแอนโทไซยานินได้มาก



ภาพที่ 8 การติดสีย้อมปลายรากหอมในระยะเมทาเฟสด้วยสารสกัดสีจากหม่อนที่ตัวทำละลายแตกต่างกัน
 ก. ใช้ตัวทำละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1% ในเมทานอล
 ข. ใช้ตัวทำละลายกรดอะซิติก 0.1% ในเมทานอล

และเมื่อศึกษาอัตราส่วนที่ต่างๆ กันของตัวทำละลายโดยใช้ที่อัตราส่วน 1 : 1 , 1 : 2 และ 1 : 3 (ตัวอย่าง : ตัวทำละลาย) ผลที่ได้เป็นไปตาม ตารางที่ 1 คือ ที่อัตราส่วน 1 : 1 ให้สีที่มีความเข้มข้นมากที่สุด รองลงมาคือ อัตราส่วน 1 : 2 มีสีเข้มน้อยลงมาจากสีแรก และที่อัตราส่วน 1 : 3 ให้สีที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุด ที่จะย้อมโครโมโซมให้ติดสีได้ดังภาพที่ 9 เนื่องจาก อัตราส่วนตัวทำละลายที่มากขึ้นทำให้ความเข้มข้นของสีน้อยลง สีที่ถูกสกัดออกมาจึงมีสีจางลง



ภาพที่ 9 การย้อมติดสีในระยะแอนาเฟสด้วยสารสกัดสีจากหม่อนในตัวทำละลายกรดอะซิติก 0.1% ในเมทานอลที่อัตราส่วนต่างๆ ก. อัตราส่วน 1 : 1 ข. อัตราส่วน 1 : 2 ค. อัตราส่วน 1 : 3

3. ศึกษาอายุของสีในการเก็บรักษา และคุณภาพของสีย้อม

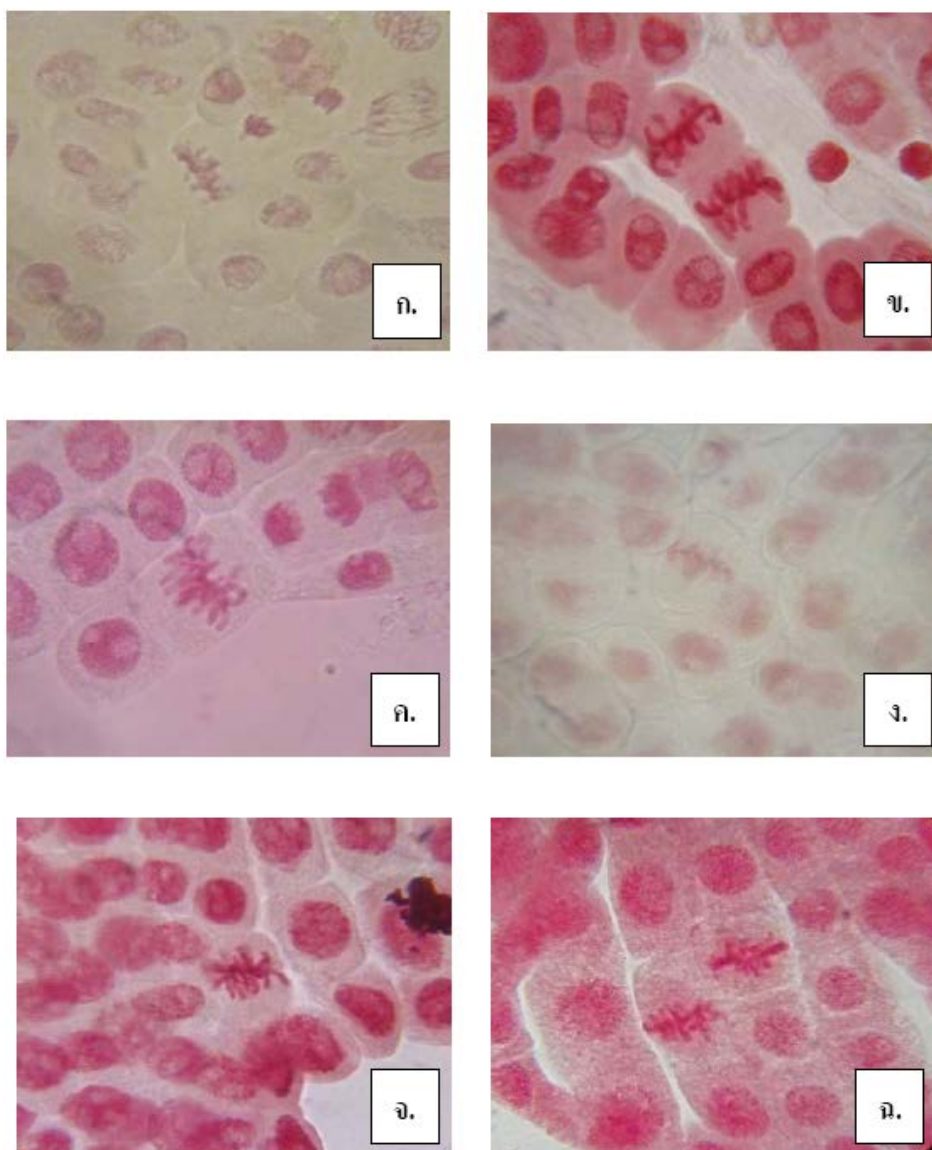
สารสกัดสีที่ได้สามารถเก็บไว้ย้อมเซลล์ปลายรากหอมทุกๆ เดือน พบว่า สารสกัดสีที่ได้สามารถย้อมติดเซลล์โครโมโซมได้ใกล้เคียงกับเดือนแรก (หลังการสกัดสารสกัดสี) ดังผลในตารางที่ 2 จากการศึกษาอายุของสีเป็น เวลา 3 เดือน ให้ผลว่าสียังสามารถมีความคงทนได้อยู่ และสีมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย แต่ในสารสกัดที่ได้จากหัวนั้น มีการตกตะกอนของสารในกลุ่มของแป้งเป็นลักษณะสีขาวอมเหลือง และในเดือน 9 ได้ย้อมสารสกัดสี พบว่า สารสกัดจากหม่อน และกะหล่ำปลีสีม่วง ยังคงติดสีโครโมโซมเช่นเดิม สารสกัดที่ได้จากแก้วมังกร และหัว ย้อมไม่ติดโครโมโซม โดยสารสกัดสีจากหัว เปลี่ยนแปลงไปเป็นสีน้ำตาล จากงานวิจัยของ เกียรติศักดิ์ (2535) พบว่า อุณหภูมิในการเก็บ ควรเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส บวกลบ 1 องศาเซลเซียส ให้ผลในการชะลอการลดลงของปริมาณแอนโทไซยานิน และสามารถเก็บได้มากกว่า 4 เดือน

4. การย้อมสีโครโมโซมในพืชต่างๆ หลังการสกัดสีให้บริสุทธิ์

หลังจากนำสารสกัด (ในตัวทำละลายกรดไฮโดรคลอริก อัตราส่วน 1 : 1) ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์แล้ว สีที่ได้มีสีเข้มกว่าก่อนทำบริสุทธิ์ และมีสีแดงอมส้ม นำมาย้อมปลายรากหอมอีกครั้ง ผลที่ได้คือ สีจากหอมอ่อนไม่มีการเปลี่ยนแปลง สีที่ได้จากหัว และ แก้วมังกร มีการติดสีที่น้อยลง และสีที่ได้จากกะหล่ำปลีสีม่วงมีการติดสีที่เพิ่มมากขึ้น ตามตารางที่ 3 และภาพที่ 10

ตารางที่ 3 การติดสีโครโมโซมจากสีที่สกัดได้หลังการสกัดสีให้บริสุทธิ์

สีที่ได้จากการสกัด	การติดสีบนโครโมโซม
หัว	+
หอมอ่อน	++++
กะหล่ำปลีสีม่วง	++
แก้วมังกร	+
คาร์มีน	++++
ออริซีน	++++

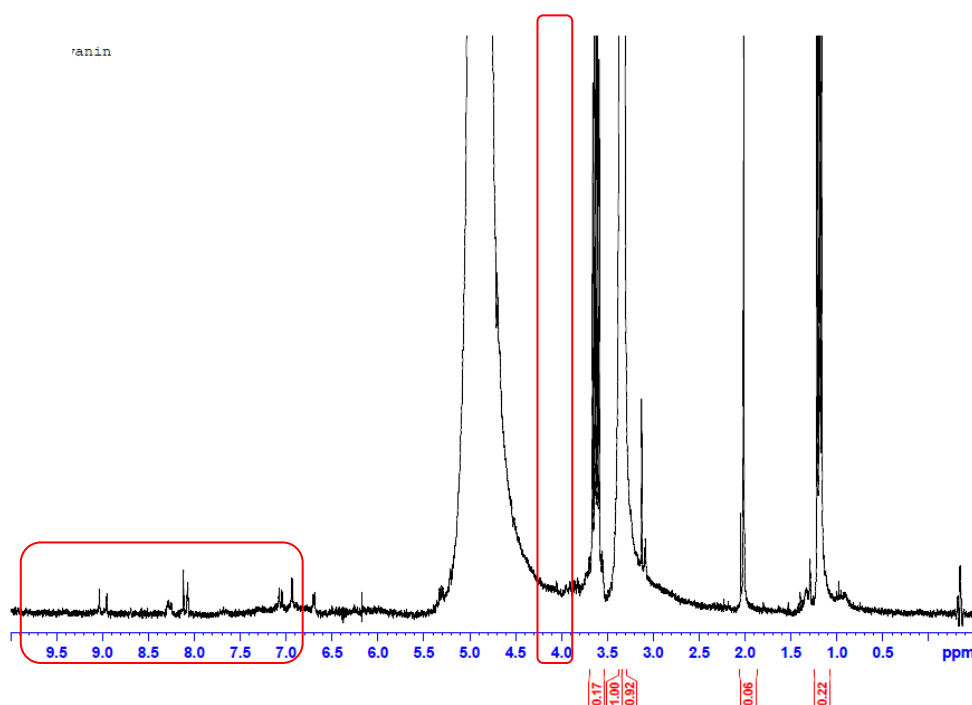


ภาพที่ 10 การติดสีโครโมโซมที่ย้อมด้วยสีสกัดจากพืชชนิดต่างๆ หลังสกัดสีให้บริสุทธิ์

ก. หว่า ข. หม่อน ค. กะหล่ำปลีสีม่วง ง. แก้วมังกร จ. สีสอร์ซิน ฉ. สีคาร์มิน

5. การศึกษาโครงสร้างสารสกัดแอนโทไซยานินด้วยเครื่อง NMR Spectrometer

เนื่องจากสีที่สกัดได้จากหม่อนสามารถย้อมติดโครโมโซมได้ ชัดเจนมากที่สุด จึงนำมาศึกษาโครงสร้างด้วย NMR Spectroscopy (Bruker Avance 300 spectrometer) ในสารละลาย MeOD (CD_3OD) ที่ 300 MHz. ได้ผลดังภาพที่ 11 โดยให้ค่าเคมีคัลชิฟท์ เป็น 3.365 (H-G5-5) , 9.033 (H4-F), 8.953 (-), 8.118 (H-2E) , 7.050 (H-5E), 6.900 (-) ppm (Susana *et al.*, 2008) ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงจำนวนของหมู่ Hydroxyl ที่มีอยู่ในโครงสร้างของแอนโทไซยานินนั้น ทำให้สามารถสรุปได้ว่าสารแอนโทไซยานินที่ได้จากหม่อน อยู่ในกลุ่มของ Cyanidin ซึ่งสารสกัดสีจากเปลือกลิ้นจี่ ที่เป็นแอนโทไซยานิน พบว่าอยู่ในกลุ่ม Cyanidin เช่นกัน (Zhang, 2004)



ภาพที่ 11 NMR Spectrum ของสารสกัดจากหม่อน

สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลจากการสกัดสีจาก หม่อน หว้า แก้วมังกร และกะหล่ำปลีสีม่วง ด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1% ในเมทานอล และกรดอะซิติกเข้มข้น 0.1% ในเมทานอล ที่อัตราส่วนต่างๆ แล้วนำมาแยกโครโมโซมปลายรากหอม แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสีที่ได้สามารถย้อมติดเซลล์โครโมโซมได้ โดยสารสกัดสีจากหม่อนสามารถย้อมติดได้ใกล้เคียง หรือเทียบเท่าสีทางเคมี และสารสกัดสีที่ได้จาก หว้า แก้วมังกร และกะหล่ำปลีสีม่วง ย้อมติดสีบนเซลล์โครโมโซมได้น้อยและจางกว่าสีทางเคมี โดยมีอายุการใช้งาน หากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ได้มากถึง 9 เดือน ในหม่อน สารสกัดจากพืชบางชนิดไม่สามารถเก็บได้ มีการเสื่อมสภาพไป คือ หว้า และแก้วมังกร และสภาวะที่เหมาะสมแก่การสกัดสาร คือตัวทำละลายที่เป็นไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1% ในเมทานอล ที่อัตราส่วน 1:1 เมื่อทำการทำบริสุทธิ์แล้วนำไปศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วย เครื่อง NMR Spectrometer แล้ว พบว่า สารแอนโทไซยานินที่ได้จัดอยู่ในกลุ่มของ Cyanidin แต่ยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนว่าเป็นสารตัวใดอย่างเฉพาะเจาะจง เนื่องจากต้องใช้เทคนิคที่มากกว่า 1 เทคนิค เพื่อให้มีข้อมูลมากเพียงพอในการวิเคราะห์ผล

เอกสารอ้างอิง

เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย. 2535. การสกัดแอนโทไซยานินจากดอกอัญชัน *Clitoria ternatea* L. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิจศิริ เรืองรังสี. 2547. สมุนไพรไทย เล่ม1. สำนักพิมพ์ บี เฮลท์ดี, กรุงเทพฯ.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2547. **อนุกรมวิธานพืช อักษร ก**. พิมพ์ครั้งที่2. กรุงเทพฯ. 544 น.

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพรร**.
พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. 215 น.

วิจิตร วังโน. 2546. **ชนิดและพันธุ์ไม้ผลเมืองไทย**. บริษัท ฮีฟ อฟ(ประเทศไทย), กรุงเทพฯ.

สถาบันนวัตกรรมและพัฒนากระบวนการเรียนรู้. 2553. **บทที่ 2 บทนำสู่เอ็นเอ็มอาร์สเปกโทรสโกปี**.

แหล่งที่มา : http://chem.sci.ubu.ac.th/iNMR_th/nmr/introduction_nmr/nmr_spectroscopy.html.

วันที่ 22 มกราคม 2553.

สุภาพวรรณ ดุลยพิรุฬห์ศิลป์. 2529. **การสกัดแอนโทไซยานินจากเปลือกมังคุด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศูนย์พัฒนาตำราทางการแพทย์แผนไทย. 2547. **ผักพื้นบ้านภาคใต้**. พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัท สามเจริญ
พาณิชย์ (กรุงเทพ) จำกัด, กรุงเทพฯ.

ศรันธวิทย์ ต้นชนะศักดิ์. 2549. **การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด *Carissa Carandas* สำหรับ
การย้อมโครโมโซม**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สายวิทยาศาสาตร์ คณะศิลปศาสตร์และ
วิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุไร จิรมงคลการ. 2547. **ผลไม้ในสวน**. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน),
กรุงเทพฯ.

Cooper Driver, G. A. 2001. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of
anthocyanins. *Journal of Phytochemistry* 56: 229-236.

Du Q., Zheng J., Xu Y. 2008. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant
activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 21. 390-395.

Giuseppe V. and Luigia L. 2004. **Extraction and identification of anthocyanins from
Smilax aspera L. berries**. Dipartimento di Ingegneria dell'Innovazione. Univercita di Lecce.
Via per Arnesano km1. 73100 Lecce, Italy.

Mazza G. and Miniati E. 1945. **Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains**. Direct all inquiries to CRC Press, Inc., Florida.

Ishikura, N. 1975. A survey of anthocyanins in fruits of some angiosperms. 1st ed. **Bot. Mag.** Tokyo 88. 41-45.

Jeana G. 1987. **Pigments in Fruits**. Great Britain at the Alden Press, Oxford.

Pazmino, D., Giusti, M., Wrolstad, R., & Gloria, M. 2001. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants. **Journal of Food Chemistry** 75. 211-216.

Susana G. M., Jose J. P., Yoplanda S. M., Nuno M., Artur M.S. S., Victor D. F., Celestino S. B. 2008 . Flavanol-anthocyanin pigments in corn: NMR characterization and presence in different purple corn varieties. **Journal of Food Composition and Analysis** 21. 521-526.

Timberlake, C. F. and Bridle, P. 1971. The anthocyanins of apples and pears : the occurrence of acyl derivatives. **Journal of Science Food Agriculture** 22. 509-513.

Williams, M., Hrazdina, G., Wilkinson, M. M., Sweeney, J. G. and Iacobucci, G. 1978. High-pressure liquid chromatographic separation of 3-glucosides, 3,5-diglucosides, 3-(6-O-*p*-coumaryl) glucosides and 3-(6-O-*p*-coumaryl glycosides)-5-glucosides of anthocyanins. **Journal of Chromatogr** 155. 389-398.

Wulf, L. W. and Nagel, C. W. 1978. High-pressur liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. **Am. J. Enol. Vitic** 29. 42-49.

Zhang, D. L., Quantick, P. C., and Grigor, J. M. 2000. Changes in phenolic compounds in Litchi (*Litchi chinensis* Soon.) fruit during postharvest storage. **Postharvest Biology and Technology** 19. 165-172.

Zhang, Z. Q., Pang, X. Q., Ji, Z. L., Jiang, Y. M. 2001. Roles of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. **Journal of Food Chemistry** 72. 217-221.

Zhang Z., Pang X., Chong Y., Zuoliang J., Yueming J. 2004. Purification and structural analysis of anthocyanins from litchi pericarp. **Journal of Food Chemistry** 84. 601-604.

ตอนที่ 3 ผลทางไซโตจีนิติกของสีสกัดจากพืช(ลูกหม่อน) สีสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย (*Spirulina platensis*)และสีสังเคราะห์เคมี(Erythrosine)ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยง

ชื่อผู้วิจัยภาษาไทย นางสาว ศิริลักษณ์ เขี่ยมธรรม ⁽¹⁾นางสาว นฤพร เพ็ชรกลาง ⁽²⁾ นางสาวชุตินา ศรีนโรจน์ ⁽³⁾
นางสาว กรภัทร พึ่งฤทธิ์⁽⁴⁾

ชื่อผู้วิจัยภาษาอังกฤษ Miss Siriluck lamtham ⁽¹⁾ Miss Naruporn Pedklang ⁽²⁾ Miss Chutima Srinroch ⁽³⁾
Miss Koraphat Puengrit ⁽⁴⁾

^(1,2,3,4) (ภาษาไทย) สาขาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มก. กำแพงแสน

(ภาษาอังกฤษ) Department of Genetics Faculty of Liberal

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันได้มีการใช้สีผสมอาหารอินทรีย์สังเคราะห์กับอาหารที่เราบริโภคกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งสีที่ใช้เหล่านี้เมื่อได้รับในปริมาณที่มากเกินไปอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อร่างกายได้ การทดลองนี้ได้เลือกสีชมพูที่มีสารเอริโทรซินเป็นองค์ประกอบ รวมทั้งสีสกัดจากพืชคือลูกหม่อนและ สีสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย (*Spirulina platensis*) มาศึกษาผลทางไซโตจีนิติกต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในอาหารเพาะเลี้ยง โดยได้ทำการใส่สีสกัดจากพืช ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ 1 1.5 2 2.5 และ 3 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตร และสีสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตร และสีผสมอาหารชนิดอินทรีย์สังเคราะห์เอริโทรซินที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 4 ระดับ คือ 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตร ผลของสีสกัดจากพืช และสีสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียที่มีต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อทำการตรวจอัตราการแบ่งเซลล์พบว่าสีผสมอาหารในทุกๆระดับความเข้มข้นไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวและไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม negative control แต่มีความแตกต่างจากกลุ่ม positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าสีที่สกัดจากพืช และสีสกัดจากไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในรูปแบบต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น ความผิดปกติของโครโมโซม การหัก แบบหดสั้น แบบไม่คงรูปและเกาะกลุ่มเหนียว ไม่มีความแตกต่างกับ negative control แต่มีความแตกต่างกับ positive control ในการก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบหัก จึงไม่จัดเป็นสาร Mutagen ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อโครโมโซม ส่วนผลของสารเอริโทรซินที่มีต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเมื่อทำการตรวจอัตราการแบ่งเซลล์พบว่าสีผสมอาหารในทุกๆระดับความเข้มข้นมีผลทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงและมีความแตกต่างจากกลุ่มnegative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอัตราการแบ่งเซลล์ที่ลดลงจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารทดสอบที่เพิ่มขึ้น สีผสมอาหารยังสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหักของโครโมโซมในระยะเมทาเฟส ซึ่งมีค่าแตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม positive control จึงจัดว่าสีผสมอาหารเป็นสารที่สามารถก่อให้เกิดการหักของโครโมโซม (clastogen)

คำสำคัญ: เอริโทรซิน ไซยาโนแบคทีเรีย

ABSTRACT

Presently, the synthetic organic food colorants have been used widely for consumption. When people accumulated these food colorants in excess, they may cause abnormalities of the body. The Erythrosine, a pink synthetic organic food colorants, pigments extracted from plant (*Hylocereus undatus*, fruits) and also pigments extracted from cyanobacteria (*Spirulina platensis*) were chosen in this trial to study the cytogenetics effects on human lymphocyte cultures. The lymphocyte cells culture were treated with 4 different concentrations of pigments extracted from plant: 1 1.5 2 2.5 and 3 ml/5ml of cell culture and pigments extracted from cyanobacteria at concentration of 4 different levels: 1 2 3 4 and 5 ml/5ml of cell culture and also the 4 different concentrations of Erythrosine: 3 4 5 and 6 mg/5 ml of cell culture. The result showed that pigments extracted from plant and pigments extracted from cyanobacteria does not affect the mitotic index and no difference from negative control group, but differ from the positive control group statistically significant. We also found that the pigments extracted from plant and pigments extracted from cyanobacteria do not cause chromosomal abnormalities in various forms such as chromosomal abnormalities, chromosome breaking, short chromosome contraction or chromosome tough crowd. There is no difference with negative control, but there is a difference in the positive control causing an abnormality of chromosome break. The results may be summarized that the pigments extracted from plants and pigments extracted from cyanobacteria are not classified as mutagen. In contrast to the Erythrosine, every concentration of the tester led to the reduction of the mitotic index and the difference in the mitotic index of all treatments on Erythrosine was statistically significant when compared with the negative control. The decrease of mitotic index depended on the increase of the Erythrosine concentrations. Erythrosine could induce the four types of chromosome aberrations and the differences in four types of chromosome aberrations of all treatments were statistically significant when compared with the negative controls; but when compared with the positive controls they were non-significant. Thus, the synthetic organic food colorants could induce all four types of chromosome aberrations which can classified as a clastogen.

Keyword: Erythrosine, cyanobacteria

บทนำ

ประชาชนให้ความสนใจในเรื่องของอาหารโดยเฉพาะพิษภัยในอาหารมากขึ้น สีสผสมอาหารจัดเป็นสารเจือปนอาหารชนิดหนึ่งซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในปัจจุบัน เนื่องจากสีที่เติมลงไปในการอาหารอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค บางชนิดแม้จะปลอดภัยเมื่อใช้ในปริมาณน้อย แต่หากรับประทานในปริมาณมากหรือรับประทานต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานก็อาจเกิดโทษได้ ซึ่งสีผสมอาหารชนิดอินทรีย์สังเคราะห์เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก เพื่อให้สินค้าที่บริโภคมีสีสันที่น่ารับประทานยิ่งขึ้น โดยสีผสมอาหารซึ่งเป็นสีอินทรีย์ที่ได้จากการสังเคราะห์นี้ ถ้ามีปริมาณที่มากเกินไปก็จะทำให้เกิดอันตรายได้ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค กระทรวงสาธารณสุขจึงได้มีประกาศให้สีผสมอาหารเป็นสารควบคุมทั้งชนิดและปริมาณ และมีการกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 21, 2522)

อันตรายที่เกิดจากการใช้สีผสมอาหารนั้นเกิดมาจากตัวสีเอง เนื่องจากในสีผสมอาหารแต่ละชนิด หรือแต่ละสีนั้น จะมีส่วนผสมของโลหะหนักอยู่ในปริมาณที่กฎหมายกำหนด เช่น ตะกั่ว สารหนู โครเมียม สังกะสี ซึ่งหากผู้ผลิตอาหารใช้สีผสมอาหารในปริมาณที่มากเกินไป และผู้บริโภครับประทานอาหารที่ผสมสีดังกล่าวเป็นประจำอาจทำให้ร่างกายได้รับปริมาณโลหะหนักเป็นจำนวนมาก และเกิดการสะสมในร่างกายจนอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้

สำหรับการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จะศึกษาผลของสีผสมอาหารซึ่งเป็นสีอินทรีย์ที่ได้จากการสังเคราะห์ที่มีผลต่อความผิดปกติของโครโมโซมเม็ดเลือดขาวในระยะเมตาเฟส เพื่อตรวจสอบความเป็นพิษของสาร ซึ่งวิธีทางไซโตจีนิติกเป็นวิธีที่ให้ผลการทดลองได้อย่างรวดเร็วอีกด้วย

สีผสมอาหารสังเคราะห์

การใช้สีแต่งอาหารมีมาตั้งแต่สมัยโบราณ ในสมัยแรกๆ จนถึงราวกลางศตวรรษที่ 19 การแต่งสีอาหารนั้นใช้สีจากธรรมชาติเพียงอย่างเดียว การใช้สีสังเคราะห์ผสมอาหารได้ทำกันอย่างแพร่หลายภายหลังจากที่ได้มีการสังเคราะห์สีอินทรีย์ขึ้นในปี ค.ศ. 1856 โดย Sir William Henry Perkin สีสังเคราะห์ตัวแรกนี้มีชื่อว่า Mauve มีสีม่วงแดง จากนั้นก็ได้มีการสังเคราะห์สีขึ้นอีกมากมายหลายร้อยชนิด ซึ่งหลายชนิดในจำนวนนี้ถูกนำไปใช้แต่งสีในอาหาร ต่อมาได้มีการศึกษาในสหรัฐอเมริกาเพื่อตรวจสอบว่า สีตัวใดปลอดภัยที่จะใช้ในอาหาร และมีขอบเขตหรือข้อจำกัดอย่างไรในการใช้ สำหรับในประเทศไทย สีผสมอาหารเป็นสารเจือปนอาหารที่ใช้กันมากเช่นกัน อาหารผสมสีมีขายอยู่ทั่วไป ผู้ผลิตอาหารมักใช้สีสังเคราะห์ในการปรุงแต่งสีอาหารมากกว่าสีธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากเหตุผลหลายประการ เป็นต้นว่า สีสังเคราะห์ราคาถูก หาซื้อได้ง่าย และใช้ในปริมาณน้อย ฯลฯ ซึ่งผู้บริโภคไม่มีโอกาสทราบได้ว่าอาหารนั้นๆ ผสมหรือแต่งด้วยสีที่ปลอดภัยและมีปริมาณสีเกินขีดความปลอดภัยหรือไม่ นอกจากจะมีการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเหมาะสม สำหรับประเทศไทยนั้น ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (6, 7, 8) ได้กำหนดให้สีผสมอาหารเป็นอาหารควบคุมเฉพาะ และกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐาน การใช้ การผสม และฉลากสำหรับสีผสมอาหาร ได้มีการกำหนดปริมาณการใช้สีอินทรีย์ที่ได้จากการสังเคราะห์ (ดวงพร, 2530)

อาหารประเภทเครื่องดื่ม ไอศกรีม ลูกกวาด และขนมหวานที่ใช้สีผสมอาหารชนิดอินทรีย์สังเคราะห์ให้ใช้ได้ไม่เกิน 70 มิลลิกรัมต่ออาหารในลักษณะที่จะใช้บริโภค 1 กิโลกรัม

ปองโซ 4 อาร์ (Ponceau 4 R) ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่ออาหารในลักษณะที่จะใช้บริโภค 1 กิโลกรัม

คาร์โมอีซีนหรือเอโซรูบิน (Carmoisine or Azorubine) ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่ออาหารในลักษณะที่จะใช้บริโภค 1 กิโลกรัม

เออริธโรซิน (Erythrosine) ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่ออาหารในลักษณะที่จะใช้บริโภค 1 กิโลกรัม

ตาร์ตราซีน (Tartrazine) ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่ออาหารในลักษณะที่จะใช้บริโภค 1 กิโลกรัม

ซันเซต เยลโลว์ เอฟซีเอฟ (Sunset yellow FCF) ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่ออาหารในลักษณะที่จะใช้บริโภค 1 กิโลกรัม

ฟาสต์ กรีน เอฟซีเอฟ (Fast green FCF) ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่ออาหารในลักษณะที่จะใช้บริโภค 1 กิโลกรัม

อินดิโกคาร์มีน หรือ อินดิโกติน (Indigo carmine or Indigotine) ไม่เกิน 200 มิลลิกรัมต่ออาหารในลักษณะที่จะใช้บริโภค 1 กิโลกรัม

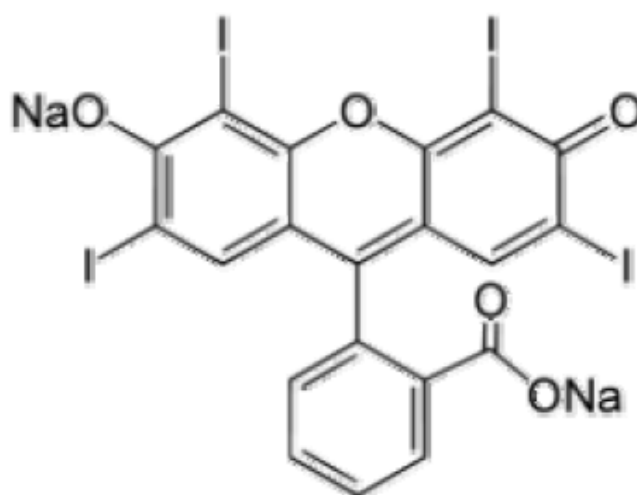
บริลเลียนท์ บลู เอฟซีเอฟ (Brilliant blue FCF) ไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่ออาหารในลักษณะที่จะใช้บริโภค 1 กิโลกรัม

การใช้สีรวมกันตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ต้องมีปริมาณรวมของสีทุกชนิดไม่เกินปริมาณของสีชนิดที่กำหนดให้ใช้ได้น้อยที่สุด (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 66, 2525)

นอกจากนั้นในสีผสมอาหารยังมีโลหะหนักปนเปื้อนอยู่ เช่น สารหนูเมื่อเข้าไปในร่างกายจะสะสมอยู่ตามกล้ามเนื้อ กระดูก ผิวหนัง ตับและไต เมื่อสะสมในร่างกายมากจะทำให้เกิดอาการอ่อนเพลีย กล้ามเนื้ออ่อนแรง อาการน้ำลายฟูมปาก หายใจไม่ออก เกิดความผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร โลหิตจาง ส่วนตะกั่ว จะมีพิษต่อระบบประสาททั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรังอาจทำให้ถึงกับชีวิตใน 1-2 วัน ส่วนอาการพิษเรื้อรังนั้นจะพบเส้นตะกั่วสีม่วงคล้ำที่เหงือก มือตก เท้าตก เป็นอัมพาต เกิดอาการผิดปกติของทางเดินอาหาร คลื่นไส้ อาเจียน และอาจพบอาการทางระบบประสาทได้ สีสังเคราะห์บางชนิดถ้าใช้บ่อยในปริมาณมากอาจทำให้เกิดพิษได้ เนื่องจากสีอาจจะไปเกาะหรือเคลือบตามเยื่อบุกระเพาะ ลำไส้ ทำให้การดูดซึมของกระเพาะลำไส้ไม่มีประสิทธิภาพ เกิดอาการท้องเดิน อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ น้ำหนักลด ซีดพร และการหายใจอ่อน ถ้าเป็นมากประสาทและสมองเป็นอัมพาต อาจเป็นมะเร็งในต่อมน้ำเหลืองและในที่อื่นๆ (เพยาร์, 2525) ดังนั้นก่อนจะรับประทาน ลูกกวาด ขนมหวาน หรืออาหารจำพวกที่ต้องเติมแต่งสีสั้ให้สวยงาม ควรเพิ่มความระมัดระวังในการเลือก และปริมาณที่บริโภคให้เหมาะสม เพื่อความปลอดภัย ซึ่งคุณลักษณะของสีผสมอาหารที่ได้มาตรฐาน มีดังต่อไปนี้คือไม่มีสารที่ทำให้เกิดพิษ และตัวสีเองไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ร่างกายของผู้บริโภค มีโครเมียม (Cr) หรือ แคดเมียม (Cd) หรือปรอท (Hg) ไม่เกิน 1 ส่วนในล้านส่วนโดยน้ำหนัก มีสารหนู (As) ไม่เกิน 5 ส่วนในล้านส่วนโดยน้ำหนัก มีตะกั่ว (Pb) ไม่เกิน 20 ส่วนในล้านส่วนโดยน้ำหนัก มีโลหะหนักชนิดต่างๆ นอกจากตะกั่ว รวมกันไม่เกิน 20 ส่วนในล้านส่วนโดยน้ำหนัก (พรชัย และคณะ, 2528)

สีสังเคราะห์จะมีโลหะหนักผสมอยู่ มีธาตุแคดเมียม, ปปรอท, ตะกั่ว, สารหนู ซึ่งกฎหมายหรือพระราชบัญญัติควบคุมการใช้สีผสมอาหารแต่ละประเทศจะกำหนดปริมาณของโลหะหนักแต่ละชนิดว่าไม่ให้มีเกินปริมาณสูงสุดที่ยอมให้มีได้ ส่วนข้อกำหนดปลีกย่อยต่างๆ จะแตกต่างกันออกไปในแต่ละประเทศ การอนุญาตให้ใช้สีได้ในแต่ละประเทศก็จะผิดแผกออกไป

เออริโทรซิน (Erythrosine)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของเออริโทรซิน

ที่มา: Wikipedia (2009)

ชื่อสามัญ	เออริโทรซิน (Erythrosine)
ชื่อ IUPAC	2-(6-hydroxy-2,4,5,7-tetraiodo-3-oxo-xanthen-9-yl)benzoic acid
เลขดัชนีสี	C.I. (1956) No.45430
ชื่อทางเคมี	เกลือโซเดียมหรือไดโปตัสเซียม 2',4'5',7' เทตราไอโอโดฟลูออเรสซีน (2',4',5',7' tetra-iodofluorescein, disodium or dipotassium salt)
สูตรเคมี	$C_{20}H_6I_4Na_2O_5$ หรือ $C_{20}H_6I_4K_2O_5$
น้ำหนักโมเลกุล	879.87 (เกลือโซเดียม) 912.10 (เกลือโพตัสเซียม)

1. คุณสมบัติ

1.1 เป็นผงสีแดง ละลายได้ง่ายในน้ำ และละลายได้ในเอทานอล มีสีอยู่ไม่น้อยกว่าร้อยละ 85 ของน้ำหนัก

1.2 จำนวนน้ำหนัที่หายไป โดยการอบแห้งที่ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง รวมกับจำนวนคลอไรด์และซัลเฟต คิดคำนวณเป็นโซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมซัลเฟต หรือโปตัสเซียมคลอไรด์และโปตัสเซียมซัลเฟต ตามลำดับ ทั้งหมดต้องไม่เกินร้อยละ 15 ของน้ำหนัก

1.3 สารที่ไม่ละลายน้ำ (Water-insoluble matter) ไม่เกินร้อยละ 0.2 ของน้ำหนัก

1.4 สารที่สกัดได้ด้วยอีเทอร์จากสารละลายที่เป็นด่างเท่านั้น (Ether-extractable matter from alkaline solutions only) ไม่เกินร้อยละ 0.2 ของน้ำหนัก

1.5 สารหนู (คิดเป็น As) ไม่เกิน 3 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม

1.6 ตะกั่ว (คิดเป็น Pb) ไม่เกิน 10 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม

1.7 สีอื่นๆ (Subsidiary dyes) ไม่เกินร้อยละ 4 ของน้ำหนัก

1.8 สารที่เกิดขึ้นระหว่างการสังเคราะห์ (Intermediates) ไม่เกินร้อยละ 0.5 ของน้ำหนัก (กระทรวงสาธารณสุข, 2522)

เอริโธรซีน (Erythrosine) เป็นสีที่ไม่สลายตัวในระบบทางเดินอาหารและถูกดูดซึมได้น้อยมาก จากการทดลองทั้งระยะสั้นและระยะยาว ไม่พบว่าทำให้เกิดพิษแต่อย่างใด นอกจากเมื่อกินมากๆ อาจทำให้อุจจาระเป็นสีแดงเนื่องจากขับถ่ายทางอุจจาระเป็นส่วนใหญ่ (ดวงพร, 2530)

ในปี 1982, IDRC ได้ทำการทดลองความเป็นพิษของสีเอริโธรซีน โดยให้หนูทดลองบริโภคอาหารที่มีสีชนิดนี้ร้อยละ 4 หรือ 2,464 มก./กก./วัน พบว่าจะทำให้เกิดเนื้องอกที่ต่อมไทรอยด์ขึ้นและชะงักการเปลี่ยนฮอร์โมนไทรอกซีน (Thyroxine) ไปเป็นฮอร์โมน ไทรโอไอโดไทโรนีน (Triiodothyronine) ทำให้ต่อมได้สมองขับไทโรโทรปิน (Thyrotropin) ออกมากขึ้น เป็นสาเหตุให้เกิดเนื้องอกที่ต่อมไทรอยด์ (ศิวาพร, 2535)

2. การประยุกต์ใช้

ในสหภาพยุโรป สารเอริโธรซีนได้รับอนุญาตให้ใช้ได้เพียงแค่น้ำตาลสีน้ำตาลเท่านั้น คือ ในค็อกเทลและลูกกวาดเชอร์รี่สามารถใช้ได้สูงสุดถึง 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ในเชอร์รี่ในน้ำเชื่อมและในค็อกเทลเชอร์รี่สามารถใช้ได้สูงสุดถึง 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

เอริโธรซีนที่สามารถรับได้ต่อวันมีค่าเท่ากับ 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ของน้ำหนักร่างกาย/วัน ได้มีการจัดแบ่งจากการร่วมมือของ FAO/WHO โดยคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญด้านสิ่งเจือปนในอาหาร (JECFA) และคณะกรรมการทางวิทยาศาสตร์การอาหาร (SCF)

ในสีชนิดนี้มีองค์ประกอบของไอโอดีนอยู่ในโมเลกุลและได้มีการบ่งบอกว่าการมีสารไอโอดีนเพิ่มเติมในอาหารอาจทำให้เชื่อมโยงกับการเพิ่มขึ้นของอัตราการเกิดโรคพิษไทรอยด์ (ปริมาณที่ผลิตได้มีมากเกินไปจากฮอร์โมนไทรอกซีนจากต่อมไทรอยด์) ด้วยเหตุนี้การใช้สาร เอริโธรซีนจึงมีการจำกัดเขตอยู่ในสหภาพยุโรปและในสหรัฐอเมริกา

3. การศึกษาที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ. 1983 Vorhees และคณะ ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของสี FD&C ชนิดสีแดงเบอร์ 3 (erythrosine) ในหนู rat ชนิด Sprague-Dawley ที่โตเต็มวัยจะถูกให้อาหารที่มีส่วนผสมของสีดังกล่าวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนให้มีการผสมพันธุ์ และมีการให้อาหารต่อไปในเพศเมียที่ตั้งครรภ์จนกระทั่งการให้นมลูกที่เกิดขึ้น โดยทำการทดลองเป็น 2 กรณีคือ กรณีที่ 1 จะมีการให้หนูกินอาหารที่มีส่วนผสมของสี FD&C ชนิดสีแดงเบอร์ 3 ที่ความเข้มข้น 0.00, 0.25, 0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนักในอาหาร ร่วมกับสาร toxin hydroxyurea (50 mg/kg/day) และกรณีที่ 2 จะให้หนูกินอาหารที่มีส่วนผสมของสี FD&C ชนิดสีแดงเบอร์ 3 เพียงอย่างเดียวโดยใช้ความเข้มข้นเดียวกับกรณีที่ 1 พบว่าลูกหนูจะมีการตายก่อนกำหนดคลอดในการทดลองกรณีที่ 1 เท่านั้น แต่ในกรณีที่ 2 ลูกหนูและแม่หนูสามารถดำรงชีวิตได้ตามปกติ ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าสี FD&C ชนิดสีแดงเบอร์ 3 นั้นเป็นสารที่ก่อให้เกิดพิษในหนู

จากการทดลองของ Miyachi และ Tsutsui (2005) จากสารที่ใช้ในการย้อมสีเคลือบฟันพบว่าสาร erythrosine B ไม่เหนี่ยวนำให้เกิด SCE ขึ้น แต่สี acid fuchsin และ basic fuchsin ทำให้เกิดผลดังกล่าว

ทั้งนี้ยังได้มีการศึกษาผลของสาร erythrosine (สีแดง 3), สาร rose bengal B (สีแดง 105) และการผ่าตัดต่อมไทรอยด์ ในการพัฒนาของเนื้องอกต่อมไทรอยด์ของหนู rat ชนิด Wistar เพศผู้โดยเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งโดยใช้สาร N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) และมีการให้อาหารที่มีส่วนผสมของสีแดง 3 และสีแดง 105 ประมาณ 4% โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 19 สัปดาห์ พบว่า อัตราการเกิดของเนื้องอกในหนูที่ 91% เกิดจากการให้สารสีแดง 3 และการเหนี่ยวนำด้วยสาร DHPN, ที่ 100% เกิดจากการให้สารสีแดง 105 และการเหนี่ยวนำด้วยสาร DHPN และที่ 64% เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยสาร DHPN ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าสาร erythrosine (สีแดง 3) และสาร rose bengal B (สีแดง 105) เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อหนูจะทำให้เกิดการพัฒนาระบบของเนื้องอกขึ้นได้ (Hiasa และคณะ, 1988)

Tanaka (2001) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษในระบบสืบพันธุ์และพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทจากการให้สารเอริโทรซินในหนู mice ที่ควบคุมอาหารได้ทำการใส่สารเอริโทรซินลงในอาหารที่จัดเตรียมไว้โดยแบ่งระดับเป็น 0 (ชุดควบคุม), 0.005, 0.015 และ 0.045% เป็นเวลา 5 สัปดาห์ในหนูรุ่น F(0) และ เป็นเวลา 9 สัปดาห์ในรุ่น F(1) ของหนู และทำการคัดเลือกจากระบบสืบพันธุ์และพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทเป็นปัจจัยกำหนดในการชีวิต พบว่าไม่มีผลกระทบที่เป็นอันตรายของเอริโทรซินต่อขนาด, น้ำหนัก หรืออัตราส่วนของเพศของลูกหนู ค่าเฉลี่ยน้ำหนักร่างกายของลูกหลานเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทั้งสองเพศระหว่างช่วงการให้นมที่ระดับการให้เป็นแบบ middle-dose ในเรื่องของความพัฒนาการด้านพฤติกรรม ปัจจัยที่กำหนดมีความแปรปรวนบ้างแสดงให้เห็นว่าไม่เกิดผลกระทบที่เป็นอันตรายในแต่ละเพศในช่วงการให้นม จากการสำรวจพฤติกรรมการเคลื่อนไหว ปัจจัยหลายตัวที่มีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับกลุ่ม High-dose และผลกระทบของแต่ละ dose เหล่านั้นจะเกี่ยวข้องกันในหนูเพศเมียที่โตเต็มวัยจากรุ่น F(0) และรุ่น F(1) และในหนูเพศผู้รุ่นลูก F(1) ระดับของการให้สารเอริโทรซินทำให้เกิดผลกระทบที่เป็นอันตรายเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ และพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทซึ่งเป็นปัจจัยที่กำหนดขึ้นในหนู

ในปี 1997 Abdel *et al.* ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ของสาร เออร์โรชิน (ER, FD & C Red No.3) ในหนูเพศผู้ มีแนวโน้มที่จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิตสเปิร์ม ซึ่งได้ทำการตรวจสอบในหนูเพศผู้ที่โตเต็มวัย พบว่าบริเวณอัณฑะจะมีเอนไซม์ lactic dehydrogenase (LDH-X) ในช่วงระยะ pachytene ของกระบวนการผลิตสเปิร์ม ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ค่าความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ โดยระดับนัยสำคัญได้มีการลดลงเป็น 71.8% และ 68.6% จากชุดควบคุม ภายหลังจากการใส่สารเออร์โรชิน ติดต่อกันเป็นเวลา 21 วัน ในปริมาณ 68 และ 136 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ในเวลาเดียวกัน ค่าเฉลี่ยปกติของบริเวณ epididymal sperm มีค่าเทียบเท่ากับเปอร์เซ็นต์ของการเคลื่อนที่ของ sperm ซึ่งมีความสำคัญต่อการยับยั้งประมาณ 50% และ 57% ตามลำดับ ยิ่งกว่านั้นเออร์โรชินได้เหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของรูปร่างบริเวณหัวสเปิร์ม ดังนั้นหลังจากการให้สารติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน ในปริมาณ 680 และ 1360 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (มีจำนวนเท่ากับ 10 และ 20% ของค่า LD50) จะเกิดการเพิ่มขึ้นของสเปิร์มที่มีลักษณะผิดปกตินี้ประมาณ 57% และ 65% ตามลำดับ การชักนำให้เกิดลักษณะผิดปกติของสเปิร์มสามารถทำให้เกิดกระบวนการผลิตสเปิร์มผิดปกติไป อีกทั้งยังสามารถทำให้เซลล์สืบพันธุ์มีการกลายพันธุ์ได้

David *et al.* (1987) ได้ศึกษาผลกระทบจากการรับประทานสารเออร์โรชิน (2', 4', 5', 7' - tetraiodofluorescein) ต่อหน้าที่ของไทรอยด์ในผู้ชายที่มีสุขภาพดี ซึ่งทำการศึกษาโดยให้ผู้ชายที่มีสุขภาพดี จำนวน 30 คน แบ่งเท่าๆ กันออกเป็น 3 กลุ่ม โดยให้แต่ละกลุ่มได้รับสารกลุ่มละ 14 วัน โดยการรับประทานสารเออร์โรชินเข้าไปในปริมาณ 20, 60 และ 200 มิลลิกรัม/วัน ตามลำดับ และทำการวัดระดับสาร Serum thyroxine (T4), triiodothyronine (T3), reverse T3 (rT3), thyroid stimulating hormone (TSH), protein-bound iodide (PBI) และความเข้มข้นของไอโอดีนทั้งหมด, serum T3-charcoal ที่ถูกดูดซึมและภายใน 24 ชั่วโมงไอโอดีนจะถูกขับถ่ายออกทางปัสสาวะ โดยจะทำการวัดในช่วงวันที่ 1, 8 และ 15 จากการตรวจสอบฮอร์โมน Thyrotropin-releasing hormone (TRH) จะแสดงผลในช่วงวันที่ 1 และวันที่ 15 ซึ่งไม่มีระดับนัยสำคัญที่เปลี่ยนแปลงค่าที่ปริมาณใดๆ ในซีรัม T4, T3, rT3 และ T3-charcoal ที่ถูกดูดซึม ในผู้ชายที่ได้รับปริมาณ 200 มิลลิกรัม เออร์โรชิน/วัน แสดงว่าแรกเริ่มความเข้มข้นของซีรัม TSH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จาก 1.7 ± 0.1 (SE) ในวันที่ 1 กลายเป็น 2.2 ± 0.1 μ U/ml ในวันที่ 15 ($p < 0.05$) และค่าเฉลี่ยสูงสุดของการเพิ่มขึ้นของ TSH หลังจากที่ได้รับ TRH เพิ่มขึ้นจาก 6.3 ± 0.5 ไปเป็น 10.5 ± 1.0 μ U/ml ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของฮอร์โมน TSH ที่มีการตอบสนองในผู้ชายที่ได้รับ 20 หรือ 60 มิลลิกรัมเออร์โรชิน/วัน แสดงให้เห็นว่าความเกี่ยวเนื่องกันของปริมาณยาที่เพิ่มขึ้นในซีรัมทั้งหมดในไอโอดีนและความเข้มข้นของ PBI ที่ปรากฏระหว่างปริมาณสารทั้ง 3 ช่วง และความสำคัญของความเกี่ยวเนื่องกันในปริมาณยาที่เพิ่มขึ้นในไอโอดีนที่พบในปัสสาวะที่ขับถ่ายออกมาจะปรากฏค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 60 และ 200 มิลลิกรัม/วันจากปริมาณของสารเออร์โรชิน จากข้อมูลนี้เป็นการเตือนให้ทราบว่าการเพิ่มขึ้นของการหลังฮอร์โมน TSH สามารถเหนี่ยวนำได้จากการใช้สารเออร์โรชินซึ่งเชื่อมโยงกับผลกระทบของแอนตี้ไทรอยด์ที่มีการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นซีรัมไอโอดีน ซึ่งค่อนข้างมากกว่าผลกระทบโดยตรงของสารเออร์โรชินต่อฮอร์โมนไทรอยด์ที่มีการหลั่งออกมาหรือจากกระบวนการเมตาบอลิซึม

การศึกษาทางไซโตจีนิติก

พันธุศาสตร์ของเซลล์หรือไซโตจีนิติก (Cytogenetics) เป็นวิทยาศาสตร์สาขาหนึ่งที่ทำให้ความรู้เกี่ยวกับหน้าที่และพฤติกรรมของออร์แกเนลล์ (Organelle) ภายในเซลล์ เนื่องจากโครโมโซมเป็นออร์แกเนลล์ที่สำคัญในการถ่ายทอดทางพันธุกรรม การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซมในรูปแบบใดก็ตามย่อมมีผลโดยตรงต่อการถ่ายทอดทางพันธุกรรมด้วย

การศึกษาวิชานี้จึงเน้นพฤติกรรมต่างๆ ของโครโมโซมที่อธิบายได้จากการมองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการศึกษาโครโมโซมในระดับหนึ่งสามารถบอกถึงพฤติกรรมและองค์ประกอบในระดับโมเลกุลของยีนได้ การค้นคว้าทางไซโตจีนิติกพร้อมกับความรู้ในสาขาอื่นๆ อันได้แก่ เคมี ฟิสิกส์ และชีวโมเลกุลช่วยทำให้เกิดความเข้าใจถึงพฤติกรรมของโครโมโซมมากขึ้น เทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลผนวกกับด้านไซโตจีนิติกแล้วทำให้เกิดความเข้าใจกลไกการทำงานของยีนที่ควบคุมสิ่งมีชีวิตอย่างสมบูรณ์ อันเป็นประโยชน์มากในการนำมาปรับใช้ทั้งด้านการแพทย์และการเกษตรในปัจจุบัน

การตรวจสอบความเป็นพิษของสารเคมีด้วยวิธีทางไซโตจีนิติก

เดิมการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารเคมีใดๆ นั้น นิยมใช้วิธีทาง Epidemiology โดยทดลองกับผิวของสัตว์ทดลอง และรอผลปรากฏเป็นเนื้อร้ายมะเร็ง แต่วิธีการเช่นนี้ในบางครั้งใช้ระยะเวลามากกว่า 1 ปี จึงสามารถสรุปผลออกมาได้ รวมทั้งค่าใช้จ่ายในการทดลองค่อนข้างสูง จึงนับว่าคุ้มกับการทดสอบสารเคมีต่างๆ ซึ่งมีการเพิ่มชนิดของการผลิตมากขึ้นทุกๆ ปี จึงมีวิธีการทดลองแบบใหม่ที่ให้ผลงานในระยะเวลาน้อย (short-term test) และรวมไปถึงการสิ้นเปลืองเงินน้อยที่สุดด้วย

วิธีทดสอบที่ให้ผลงานในระยะสั้นแบบแรกที่ยอมรับกันเมื่อ 15 ปีก่อนคือ Ames test โดยจากการศึกษาของ Bruce Ames เป็นการทดสอบการกลายพันธุ์ในยีน โดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella Typhimurium* สายพันธุ์ที่เป็นมิวแทนท์ (mutant) ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ histidine (his-) เป็นตัวทดสอบสารเคมีบางชนิด ถ้าสารเคมีใดสามารถเหนี่ยวนำให้ *Salmonella Typhimurium* ชนิดนี้มีผลของ reverse mutation (กลายเป็น his+) ได้นั้น อาจเชื่อได้ว่าสารเคมีนั้นเป็นสารก่อมะเร็ง ด้วยวิธี Ames test นี้สามารถใช้เวลาทดสอบเพียง 2-3 วัน และค่าใช้จ่ายไม่สูงเกินไปด้วย ปัจจุบันได้มีการทดสอบวิธีคล้าย Ames test อีกมากมาย

ชนิดของการทดสอบสารก่อมะเร็งทางไซโตจีนิติก เพื่อศึกษาผลของสารเคมีต่อความผิดปกติของโครโมโซม อาจจำแนกวิธีวิเคราะห์ได้เป็น 4 แบบ แบบแรกเป็นการศึกษาความผิดปกติในรูปของการหักและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม (chromosome aberration) โดยตรวจดูฟิโนไทป์ของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส แบบที่สองเป็นการศึกษาผลของการสลับชิ้นส่วนของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส (sister chromatid exchanges: SCE) แบบที่สามคือการศึกษาจากผลการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติอันเป็นผลทำให้เกิดพบ acentric fragment และ chromatin bridge ในเซลล์ระยะแอนาเฟส แบบที่สี่เป็นการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมในรูปของmicronuclei (MN) ที่ปรากฏในเซลล์ระยะอินเทอร์เฟส ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าการศึกษาโครโมโซมในระยะเมตาเฟสเป็นระยะที่เหมาะสมมากที่สุด โดยเฉพาะวิธีที่หนึ่งนั้นเป็นที่นิยมมากที่สุด ทั้งนี้

เพราะมีเทคนิคที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มาหยุดในระยะเมทาเฟสได้ จึงทำให้มีจำนวนเซลล์เมทาเฟสมากมายเพียงพอในการศึกษา อีกทั้งรูปร่างของโครโมโซมในระยะนี้ชัดเจนมาก รอยหักและการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมแบบต่างๆ จึงสังเกตดูได้ง่าย

จากที่พบแล้วว่าการตรวจสอบความผิดปกติเนื่องจากการหักและการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมนั้นนิยมตรวจจากเซลล์ในระยะเมทาเฟส แต่อย่างไรก็ตามต้องคำนึงว่าการหักของโครโมโซมเกิดขึ้นได้ในทุกระยะของวัฏจักรเซลล์ (G1, S, G2) เมื่อเซลล์เคลื่อนตามวัฏจักรจนถึงระยะเมทาเฟสแล้ว จึงนำมาศึกษารูปร่างของโครโมโซม ตลอดระยะที่เซลล์ผ่านวงจรมานี้จะมีเหตุการณ์ต่างๆ เกิดขึ้นคือ

1. โครโมโซมหักแล้วอาจมีการเชื่อมต่อกับรอยหักเดิม ทำให้โครโมโซมมีรูปร่างเหมือนเดิม
2. โครโมโซมหักแล้วอาจเชื่อมกับชิ้นส่วนหักอื่นๆ ที่ไม่ใช่ชิ้นส่วนเดิม ซึ่งอาจเป็นโครโมโซมเดิมหรือโครโมโซมใหม่ก็ได้ จึงทำให้เกิดเป็นรูปของการแลกเปลี่ยนชิ้น ปรากฏรูปร่างของโครโมโซมที่ผิดปกติออกไป
3. โครโมโซมหักแล้วไม่สามารถเชื่อมต่อกันได้อีก ทำให้ปรากฏเป็นรอยขาดหรือหักของโครโมโซม (อมรา, 2546)

นอกจากนี้ยังสามารถนำโครโมโซมมาใช้เป็นตัวทดสอบเพื่อตรวจหาความรุนแรงของสารเคมีรวมทั้งพลังงานจากรังสีต่างๆ ด้วย โดยสามารถจำแนกชนิดของสารที่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้เป็น 4 ชนิด คือ

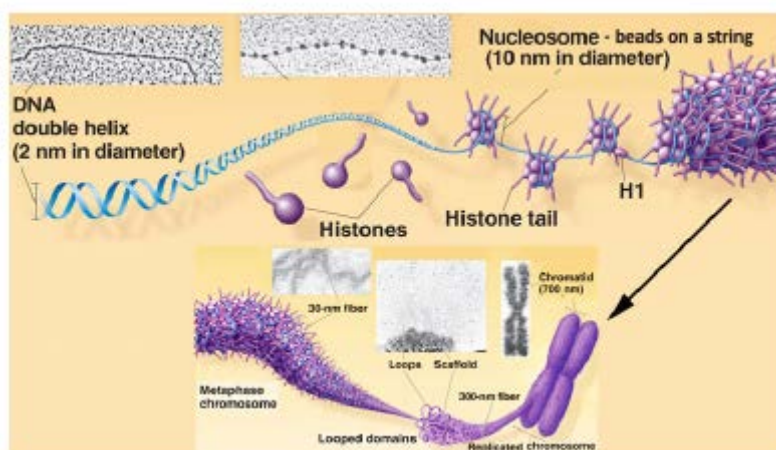
1. mutagen เป็นสารที่ก่อให้เกิดมิวเตชันขึ้นกับยีนบนโครโมโซม
2. clastogen เป็นสารที่ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซม
3. teratogen เป็นสารที่ก่อให้เกิดการพัฒนาตัวอ่อนที่ผิดปกติ และ
4. carcinogen เป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์มะเร็ง จะเห็นได้ว่าความรู้ทางไซโตจีนิตีคสามารถช่วยเหลื้ครอบคลุมไปได้กว้างขวางทั้งด้านสาธารณสุขและสิ่งแวดล้อม (อมรา, 2546)

การศึกษาโครโมโซมจากการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการศึกษาโครโมโซมคนโดยวิธีอ้อม คือผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว เนื่องจากมีความรวดเร็วและง่ายในการทำ จากการตรวจแต่ละครั้งจะใช้เลือดจากบริเวณปลายนิ้วมือ สั้นทำหรือจากเส้นโลหิตดำบริเวณท้องแขนในปริมาณน้อยเพียง 3-5 มิลลิลิตร เท่านั้น ซึ่งเลือดเพียงปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรนี้จะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวอยู่ประมาณ 2×10^6 ผสมเลือดกับสาร heparin เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัวแล้วทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดจะมีส่วนประกอบของ Phytohemagglutinin (PHA) อยู่ด้วย ซึ่ง PHA เป็นสาร mitogen (สารก่อเกิดการแบ่งไมโทซิส) จะช่วยกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T lymphocyte เพิ่มจำนวนมากขึ้นและเริ่มมีการแบ่งเซลล์ไมโทซิส เซลล์จะเจริญในสภาพแขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยง (ไม่เกาะติดพื้นภาชนะที่ใช้เลี้ยง) การเพาะเลี้ยงเลือดนี้จะเพาะเลี้ยงดูอบที่มีอุณหภูมิเท่ากับร่างกายของมนุษย์ คือ ที่อุณหภูมิ 37°C นานประมาณ 48-96 ชั่วโมง โดยที่เซลล์เม็ดเลือดขาวจะแบ่งครบวงจรที่หนึ่งในเวลา 48 ชั่วโมง และครบวงจรที่สองในเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะเก็บเกี่ยวเซลล์ประมาณ 30 นาที ต้องทำการหยุดสารละลายคอลชิซินเพื่อช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสให้มากขึ้น แล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยวิธีทำให้เซลล์พองขยายมากด้วยสารละลายเกลือ hypotonic (KCl)

และตรึงเซลล์ให้อยู่ในสภาพคงที่ด้วยสารละลาย fixative ของ methanol และ acetic acid (อัตราส่วน 3: 1) หยดเซลล์ที่เตรียมได้บนสไลด์ และเมื่อต้องการย้อมแถบสีโครโมโซมจะต้องทำขณะที่เตรียมเซลล์ใหม่ๆ จะได้ผลที่ดีกว่า (อมรา, 2546)

Osgood ได้ทำการทดลองในปี ค.ศ. 1949-1955 โดยได้นำเอาเซลล์เม็ดเลือดขาวมาเพาะเลี้ยงและพัฒนาการทดลองโดยเติมสารชนิด phytohemagglutinin (PHA) ซึ่งเป็นสารที่สกัดจากเมล็ดถั่วแดง *Phaseolus vulgaris* สารนี้มีประโยชน์ในการช่วยแยกเม็ดเลือดขาวออกจากเม็ดเลือดแดงโดยวิธีทำให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน นอกจากนั้นยังช่วยเหนี่ยวนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้ การนำเอาเซลล์เม็ดเลือดขาวมาเพาะเลี้ยงในหลอดแก้ว โดยใช้เวลาการเพาะเลี้ยงเพียง 3 วันแล้วสามารถตรวจดูโครโมโซมได้ เรียกวิธีการนี้ว่าการเพาะเลี้ยงระยะสั้น (short term culture) ในปัจจุบันงานเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวได้แพร่หลายกันมากขึ้น ซึ่งทำให้การศึกษาโครโมโซมทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขได้ก้าวหน้ามาก และได้นำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวร่วมกับการย้อมสีโครโมโซมให้เห็นเป็นแถบสี (band) ทำให้สามารถวิเคราะห์หรือกำหนดได้ว่าโครโมโซมที่สังเกตนั้นเป็นแท่งที่เท่าใด ช่วยในการตรวจสอบโรคพันธุกรรมของมนุษย์มากมาย และสาเหตุของโรคมะเร็งหลายชนิดอันมีผลเนื่องจากความผิดปกติของโครโมโซม เพื่อเป็นประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคทางพันธุกรรม (อมรา, 2546)



ภาพที่ 2 ลักษณะของโครโมโซม

ที่มา: นิรนาม (2010)

1. เพื่อทดสอบผลทางไซโตจีนิติกของสืผสมอาหารชนิดอินทรีย์สังเคราะห์ที่อาจมีผลก่อให้เกิดความผิดปกติต่อโครโมโซมรวมถึงการแบ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์
2. เพื่อศึกษาถึงผลกระทบอื่นๆ ที่อาจพบในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ อันเนื่องมาจาก สืผสมอาหารชนิดอินทรีย์สังเคราะห์

วิธีวิจัย

1. การวางแผนการทดลอง

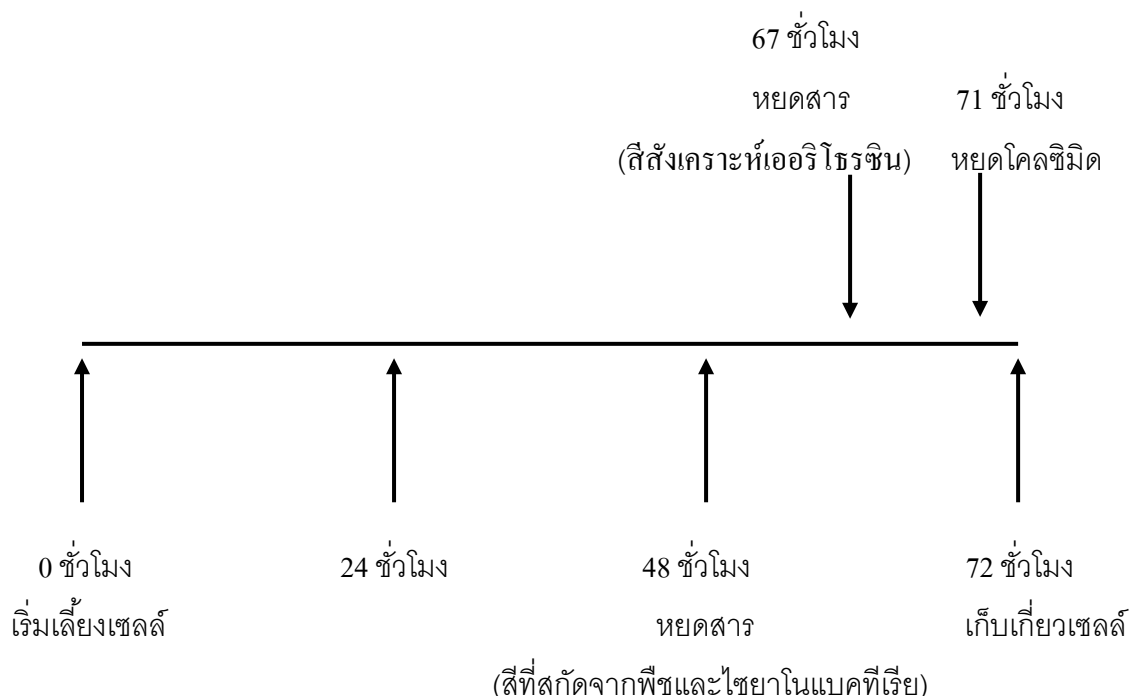
การทดลองนี้จัดสิ่งทดลอง (treatment) แบบความแปรปรวนอย่างสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และวางแผนการทดลองเป็นแบบ factorial experimental โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (replication) ซึ่งได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่ม negative control ใช้เป็นกลุ่มมาตรฐานเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3 โดยกลุ่มนี้จะไม่ใส่สารทดสอบใดๆ จนครบ 72 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่ม positive control ใช้เป็นกลุ่มมาตรฐานเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3 โดยใส่สารไมโตมัยซิน- ซี (mitomycin- c) ในระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไมโตมัยซิน- ซี นี้ เป็นสารที่ได้รับการวิจัยแล้วว่า เป็นสารก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมประเภท clastogen

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มทดลอง ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามสารที่ใช้ทดสอบ คือ สีสกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย สีสกัดจากพืช และสีสังเคราะห์เอริโทรซิน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างตามที่ได้ทำการทดลองเบื้องต้นมาก่อนแล้ว

เมื่อครบชั่วโมงที่ 48 หยดสารทดสอบสีที่สกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย และสีที่สกัดจากพืช ซึ่งจะทำการสารทดสอบสัมผัสกับเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์ ส่วนสีสังเคราะห์เอริโทรซิน เมื่อครบชั่วโมงที่ 67 จึงหยดสารทดสอบเพื่อให้สารทดสอบสัมผัสกับเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 5 ชั่วโมงก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์ และเมื่อครบชั่วโมงที่ 71 หยดโคลซีมิด (colcemid) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปทุกขวดขวดละ 25 ไมโครลิตร ทุกขั้นตอนทำโดยวิธีปลอดเชื้อ (sterile technique) ตามแผนผังดังนี้



การเติมสารโคเลซิมิด (colcemid) เพื่อระงับการสร้างสายสปินเดิล ทำให้เซลล์ที่แบ่งไมโทซิสจะหยุดอยู่ที่ระยะเมทาเฟสเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นระยะที่ง่ายต่อการศึกษารูปร่างและรูปร่างของโครโมโซม เพราะโครโมโซมจะมีลักษณะหดสั้นและมองเห็นได้ชัดเจน ใช้ในการตรวจนับค่าการหักของโครโมโซม และศึกษาถึงความผิดปกติของโครโมโซมที่อาจเกิดขึ้นในรูปแบบของการหัก (break) หักกลับ (inversion) และหักแลกเปลี่ยน (translocation) เป็นต้น

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมเลือด

เจ้าหน้าที่ผู้ชำนาญดูดเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขน (Basilic vein) ประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดฉีดยาที่มีเฮปาริน (heparin) หมุนหลอดเบาๆ ให้เลือดกับเฮปารินเข้ากัน โดยใช้เฮปาริน 50 I.U. ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว และเนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ได้แบ่งออกเป็นหลายกลุ่มทดสอบ จึงเลือกวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบใช้เลือดปริมาณน้อย (whole blood microculture) โดยในการเลี้ยงจะใช้เลือดที่ดูดออกมาทั้งหมด จะแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงอีกวิธีหนึ่งคือ แบบใช้เลือดในปริมาณมาก (blood macroculture) ซึ่งวิธีนี้จะต้องนำเลือดไปปั่นเพื่อแยกชั้นของเลือดก่อน แล้วนำเฉพาะส่วนของเม็ดเลือดขาวที่อยู่ตรงกลาง (buffy coat) มาเลี้ยง ทำให้ในการเลี้ยงครั้งหนึ่งๆ จะต้องดูดเลือดออกมาเป็นปริมาณมากกว่าวิธีแรก เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวเพียงพอต่อการแบ่งเป็นหลายกลุ่มทดสอบตามต้องการ ดังนั้น การเลี้ยงแบบใช้เลือดปริมาณน้อย จึงมีความเหมาะสมมากกว่า

2.2 การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

เตรียมขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อแล้ว ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ (complete media) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย RPMI medium 1640 with L- glutamine 80% และ fetal bovine serum 20% แล้วใส่เลือดลงไป 0.2 มิลลิลิตร (ประมาณ 10 หยด) ในขั้นตอนสุดท้าย จึงใส่ phytohemagglutinin- m (PHA) 100 ไมโครลิตร เพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ปิดจุกขวดให้สนิท เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ก่อนเก็บไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อครบชั่วโมงที่ 48 หยดสารทดสอบคือคือ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอสายพันธุ์ขาวแป้น และ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้มโอสายพันธุ์ทองดี ตามความเข้มข้นในระดับต่างๆ 5 ระดับดังกล่าวลงในกลุ่มทดลอง ซึ่งจะทำให้สารทดสอบสัมผัสกับเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์ เมื่อครบชั่วโมงที่ 71 หยดโคลชิไมด์ (colchimid) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปทุกขวด ขวดละ 25 ไมโครลิตร ทุกขั้นตอนทำโดยกรรมวิธีปลอดเชื้อ (sterile technique)

2.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์

- เมื่อเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดครบ 72 ชั่วโมง จะเก็บเกี่ยวเซลล์โดยเทอาหารและเซลล์ลงในหลอดทดลอง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการแยกเซลล์ออกจากอาหารเพาะเลี้ยง
- สังเกตพบว่า เซลล์จะตกลงมารวมกันอยู่ที่ก้นหลอด ดูดเอาน้ำใสตอนบนทิ้งไป โดยให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าหลอดเบาๆ บนเครื่องเขย่า (vortex) เพื่อให้ตะกอนเซลล์กระจายตัวไม่จับตัวเป็นก้อน ใส่สารละลาย hanks' balanced salt solution (HBSS) ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร เพื่อล้างคราบสารอาหารและสิ่งสกปรกออกจากเซลล์ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้ง แล้วเติม HBSS ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตรอีกครั้ง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 10 นาที
- ดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้ง ใส่สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ต่อลิตร ที่นำไปปรับอุณหภูมิให้ใกล้เคียง 37 องศาเซลเซียสเรียบร้อยแล้ว ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ ซึ่งมีสภาวะเป็น hypotonic solution ช่วยทำให้เซลล์พองตัว และโครโมโซมภายในเซลล์จะกระจายออก ง่ายต่อการศึกษา แยกสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ทิ้ง โดยการนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้ง แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตรอีกครั้ง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 10 นาที
- ดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้ง ในขั้นตอนต่อไปจะคงสภาพเซลล์ ซึ่งต้องทำด้วยความระมัดระวัง เริ่มจากการทำการเขย่าหลอดเบาๆ บนเครื่องเขย่า (vortex) เพื่อให้ตะกอนเซลล์กระจายตัว ไม่จับตัวเป็นก้อน เนื่องจากถ้าเซลล์ไม่กระจายตัวอย่างเพียงพอแล้ว เมื่อถูกน้ำยาคงสภาพ เซลล์เหล่านั้นจะจับตัวเป็นตะกอนสีน้ำตาลเข้ม ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เมื่อเขย่าหลอดจนเซลล์กระจายตัวดีแล้ว จึงค่อยๆ หยดน้ำยาคงสภาพเซลล์

(fixative) ซึ่งประกอบด้วย เมทานอล (methanol) 3 ส่วนและกรดอะซิติก (acetic acid) 1 ส่วน ลงไปในหลอดครั้งละ 1 หยด โดยยังคงเขย่าหลอดอยู่ตลอดเวลา โดยการตั้งหลอดค้ำไว้บนเครื่องเขย่า เติมน้ำยาคงสภาพจนในหลอดมีน้ำยาดังกล่าวอยู่ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบ/ นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำส่วนใสตอนบนทิ้ง เติมน้ำยาคงสภาพลงใหม่ ทำเช่นเดิมอีกประมาณ 2-3 ครั้ง จนพบว่า ตะกอนสีขาวที่ก้นหลอดทดลองสะอาดดี ซึ่งก็คือกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ต้องการศึกษา

2.4 การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม

นำสไลด์ไปแช่ในกรดอะซิติก 1-2 คืน เพื่อทำการขจัดคราบโปรตีนและสิ่งสกปรกออกจากสไลด์ จากนั้นล้างกรดอะซิติกออกด้วยน้ำสะอาด แล้วนำสไลด์ไปแช่ต่อในเมทานอลความเข้มข้น 70-90% 1 คืน ในขั้นตอนสุดท้ายจะนำสไลด์ที่ได้มาขัดด้วยผ้าขาวบางสะอาด

การหยดเซลล์ทำโดยดูดน้ำยาคงสภาพออกจากหลอดจนเหลือประมาณ 0.5 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำยาคงสภาพที่เตรียมใหม่และเย็นจัดลงไปประมาณ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ Pasteur pipette เป่าลมลงไปในหลอดเพื่อกระจายเซลล์ที่ก้นหลอดขึ้นมา เมื่อเซลล์กระจายดีแล้ว ดูดเซลล์มาหยดลงบนสไลด์ที่เตรียมไว้ 1 หยด ถ้าสไลด์สะอาดดีจะพบว่า เซลล์ที่หยดจะกระจายตัวออกเป็นวงกลมอย่างรวดเร็ว จากนั้นหยดน้ำยาคงสภาพที่เตรียมใหม่และเย็นจัดตามลงไปอีก 1-2 หยด เพื่อช่วยให้เซลล์กระจายตัวดียิ่งขึ้น แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง (air dry technique)

2.5 การย้อมสีโครโมโซม

นำสไลด์ที่แห้งดีแล้วไปย้อมสีโครโมโซมโดยใช้สีจีมาซ่า (Giemsa) ความเข้มข้น 5% ในไวส์บัฟเฟอร์ pH7.2 นานประมาณ 7-10 นาที แล้วนำมาผ่านน้ำไหลเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

2.6 คัดเลือกเซลล์เพื่อตรวจนับโครโมโซม และวิเคราะห์ผล โดยอ้างอิงตามหลักของ Evans and Riordan (1975) และ Brogger (1982)

2.6.1 วิธีการเลือกเซลล์ที่ทำการตรวจนับ

ในการตรวจนับโครโมโซมจะกระทำเฉพาะเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส (metaphase) เท่านั้น โดยนำกระจกสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมสีแล้วมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งตรวจนับจำนวนของชนิดรูปแบบที่ผิดปกติของโครโมโซม เปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของโครโมโซมของกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม โดยเซลล์ที่จะนับควรมีจำนวนโครโมโซมไม่น้อยกว่า 45 และไม่เกิน 48 โครโมโซม และทำการตรวจนับเซลล์ไม่น้อยกว่า 100 เซลล์ ในแต่ละซ้ำของการทดลอง ยกเว้นกรณีที่ไม้อาจหาเซลล์ที่มีการแบ่งมากไปกว่านี้ได้

2.6.2 วิธีการวัดอัตราการแบ่งเซลล์ของลิมโฟไซต์ (mitotic index)

การตรวจดูผลของการแบ่งเซลล์โดยศึกษาจากค่า mitotic index ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งจำนวน 2,000 เซลล์ ที่ได้รับสารละลายน้ำยาบ้วนปากต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งในจำนวน 2,000 เซลล์ในกลุ่มควบคุม คือ

$$\text{Mitotic index (\%)} = (A/B) \times 100$$

เมื่อ A= จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในกลุ่มทดลอง

B= จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในกลุ่มควบคุม

2.6.3 กรณีสารทดสอบอาจก่อให้เกิดการหักของโครโมโซม

ศึกษาจากเซลล์ระยะเมทาเฟสที่มีโครโมโซมกระจายดีและแต่ละเซลล์มีจำนวนโครโมโซม 46 แท่ง ถ้ามีจำนวนขาดหรือเกินจะอยู่ในจำนวน 46 ± 1 แท่งเท่านั้น แล้วศึกษาผลที่มีต่อโครโมโซมด้วยวิธีการนับจำนวนหัก (Break หรือ b) ของโครโมโซมจากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์จดบันทึกชนิดของการหัก และนับจำนวนหักตามชนิดการหัก ดังนี้

- Single chromatid gap (SG) ความผิดปกติจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในโครมาทิด (chromatid) แท่งใดแท่งหนึ่ง แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยังมีเส้นใยโครมาติน (chromatin) ยึดให้เห็นเป็นเส้นบาง ๆ ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SG

- Isochromatid gap (ISCG) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างขึ้นในส่วนหนึ่งของโครมาทิดทั้งสองแท่งของโครโมโซมเดียวกัน แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกันและแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยังมีเส้นใยโครมาตินยึดให้เห็นบาง ๆ การนับจำนวนหักจะนับเป็น 2 หักต่อ 1 ISCG

- Single chromatid breaks (SB) เป็นความผิดปกติที่มีโครมาทิดแท่งหนึ่งเกิดการหักหรือขาดออกจากกันโดยสิ้นเชิงและแนวของปลายที่หักไม่อยู่ในแนวเดียวกัน การนับจำนวนหักจะนับจำนวนที่หักเป็น 1 หักต่อ 1 SB

- Isochromatid breaks (ISCB) เป็นความผิดปกติที่จะมีโครมาทิดทั้งสองแท่งเกิดการหักหรือขาดออกจากกันโดยสิ้นเชิงและแนวของปลายที่หักไม่อยู่ในแนวเดียวกัน การนับจำนวนหักจะนับจำนวนที่หักเป็น 2 หักต่อ 1 ISCB

- Translocation เป็นความผิดปกติที่มีการหักและต่อสลับของโครโมโซมต่างคู่กัน นับจำนวนหักเป็น 4 หักต่อ 1 translocation

- Deletion คือ การที่มีเนื้อโครโมโซมขาดหายไปจากแขนข้างใดข้างหนึ่ง ซึ่งจะนับเป็น 1 หักต่อ 1 deletion

ในการคำนวณจำนวนหักต่อเซลล์ (Break per cell หรือ b/c) จะนับจำนวนหักทั้งหมดคำนวณหา ค่าเฉลี่ยต่อเซลล์ในแต่ละกลุ่มที่ศึกษาและนำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษาในทั้งสี่ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2.7 การบันทึกภาพ

จากการศึกษาความผิดปกติที่เกิดขึ้น จะบันทึกภาพที่เป็นตัวแทนความผิดปกติแบบต่างๆ และ รายงานในผลการทดลอง

ผลและวิจารณ์

ผลการทดลอง

1. การทดสอบเบื้องต้น (preliminary test)

เป็นการทดลองเพื่อทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสารทดสอบ คือ สีสกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย สีสกัดจากพืช และสีสังเคราะห์เออริโทรซิน ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาว ของมนุษย์ในหลอดทดลอง

1.1 ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสีที่สกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย (สาหร่ายสีไปรูลิน่า)

ทำการทดลองโดยการหยดสีที่สกัดจากไชยาโนแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตร ต่อ 5 มิลลิลิตร ก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ 24 ชั่วโมง แล้วนับอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index: MI) ของเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ พบว่าอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นและลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยความเข้มข้นที่ใช้ในระดับต่ำสุด คือ 1 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร มีค่า MI ประมาณ 98.97 เปอร์เซ็นต์ แล้วที่ระดับความเข้มข้นมากที่สุด คือ 5 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร มีค่า MI ประมาณ 103.89 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการทดลอง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสีย้อมที่สกัดจากไชยานินแบคทีเรีย

ความเข้มข้นของสีย้อมที่สกัดจากไชยานิน แบคทีเรีย (ml/5 ml)	mitotic index (%)
Control	100.00
1	98.97
2	101.35
3	100.11
4	102.63
5	103.89

1.2 ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสีย้อมที่สกัดจากพืช (ลูกหม่อน)

ทำการทดลองโดยการหยดสีย้อมที่สกัดจากพืชที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร ก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ 24 ชั่วโมง แล้วนับอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index: MI) ของเซลล์ในระยะเมทาเฟส จากเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ พบว่าอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นและลดลงเพียงเล็กน้อยจากกลุ่มควบคุม โดยความเข้มข้นที่ใช้ในระดับต่ำสุด คือ 1 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร มีค่า MI ประมาณ 101.66 เปอร์เซ็นต์ แล้วที่ระดับความเข้มข้นมากที่สุด คือ 5 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร ไม่สามารถนับอัตราการแบ่งเซลล์ได้ เนื่องจากสีย้อม สกัดเข้มข้นมากเกินไป ส่งผลทำให้มองเห็นเซลล์ได้ไม่ชัดเจน จึงทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 (น้ำกลั่นต่อสีย้อม) และลดระดับความเข้มข้นลง โดยใช้ความเข้มข้น 1 1.5 2 2.5 และ 3 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร และเลือกความเข้มข้นดังกล่าวในการทดลอง (ตารางที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 2 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสีย้อมที่สกัดจากพืช (ครั้งที่ 1)

ความเข้มข้นของสีย้อมที่สกัดจากพืช (ml/5 ml)	mitotic index (%)
Control	100.00
1	101.66
2	99.73
3	100.25
4	ไม่สามารถนับได้
5	ไม่สามารถนับได้

ตารางที่ 3 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสีที่สกัดจากพืช (ครั้งที่ 2)

ความเข้มข้นของสีที่สกัดจากพืช (ml/5 ml)	mitotic index (%)
Control	100.00
1	101.98
1.5	99.76
2	100.12
2.5	102.00
3	101.03

1.3 ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสีสังเคราะห์เออริ โธโรซิน

ทำการทดลองที่ระดับความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 มิลลิลิตร) โดยทำการหยดสารทดสอบก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ 5 ชั่วโมง แล้วนับอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index: MI) ของเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากเซลล์เม็ตเล็ดขาว 2,000 เซลล์

ตารางที่ 4 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสีผสมอาหารเออริโธโรซิน (ครั้งที่ 1)

ความเข้มข้นของสีผสมอาหารเออริโธโรซิน (mg/5 ml)	mitotic index (%)
Control	100.00
10	19.79
20	เซลล์ตาย
30	เซลล์ตาย
40	เซลล์ตาย
50	เซลล์ตาย

จากตารางที่ 4 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นสีผสมอาหารเออริโธโรซิน (Erythrosine) 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร นั้นเซลล์ไม่สามารถอยู่รอดได้ แต่ในระดับความเข้มข้นสีผสมอาหารเออริโธโรซิน 10 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร นั้นพบว่าเซลล์มีชีวิตรอดและแสดงความผิดปกติให้พบได้ แต่มีจำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสไม่เพียงพอต่อการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซม จึงเลือกใช้ระดับความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง 2 – 5 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร คือที่ระดับความเข้มข้น 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร ในการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองจริงในครั้งต่อไป

ตารางที่ 5 การทดสอบหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสีผสมอาหารเอริโทรซิน (ครั้งที่ 2)

ความเข้มข้นของสีผสมอาหารเอริโทรซิน (mg/5 ml)	mitotic index (%)
Control	100.00
2	96.60
3	79.09
4	76.47
5	57.67

จากตารางที่ 5 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นสีผสมอาหารเอริโทรซิน (Erythrosine) 2 3 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร นั้นเซลล์สามารถอยู่รอดได้และแสดงความผิดปกติให้เห็น จึงตัดสินใจเลือกความเข้มข้นของสีผสมอาหารเอริโทรซินในการทดลองจริงที่ 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร

2. ผลของสีที่สกัดจากไชยานแบคทีเรีย สีที่สกัดจากพืช และสีสังเคราะห์เอริโทรซินต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการเกิดไมโทซิส โดยวิธีวัดค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index)

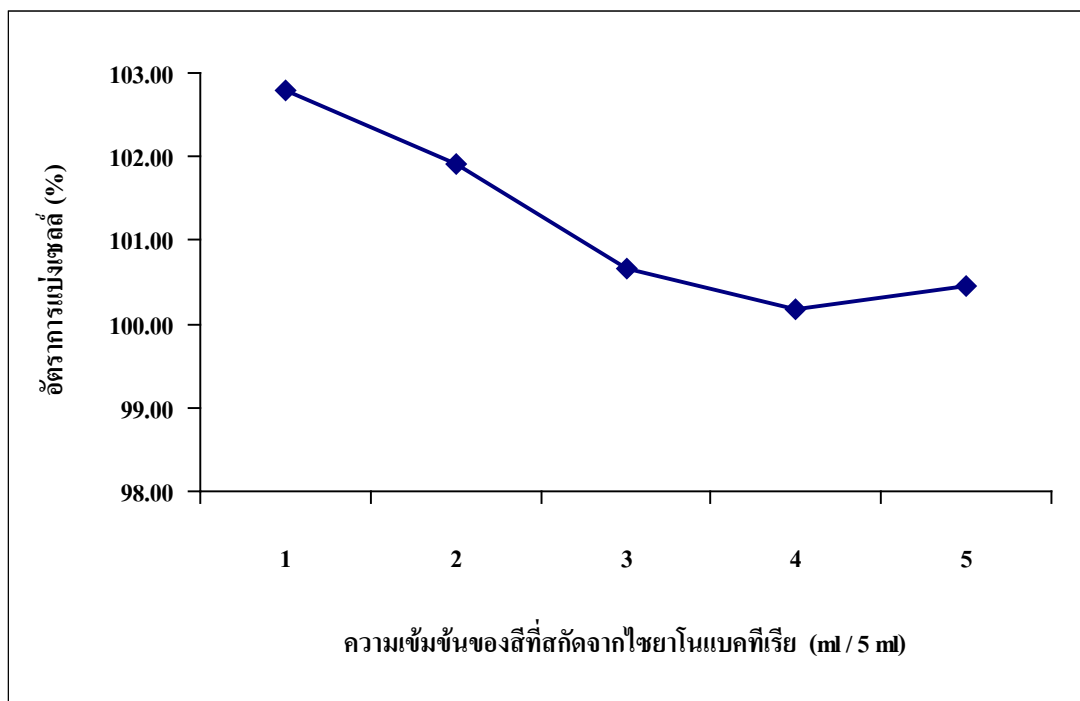
จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในหลอดทดลองเพื่อให้ได้รับสารทดสอบ คือ สีที่สกัดจากไชยานแบคทีเรีย สีที่สกัดจากพืช และสีสังเคราะห์เอริโทรซิน ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิด โดยให้เซลล์เม็ดเลือดขาวสัมผัสกับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 24 และ 5 ชั่วโมงก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ พบว่าในสีที่สกัดจากไชยานแบคทีเรีย อัตราการแบ่งเซลล์ของกลุ่มทดลองซึ่งมีค่า MI ต่ำสุด ประมาณ 100.18 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร และมากที่สุด ประมาณ 102.80 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตรนั้นไม่แตกต่างกับกลุ่ม negative control แต่แตกต่างกับกลุ่ม positive control ซึ่งใส่สารไมโตมายซิน-ซี มีค่า MI ประมาณ 30.04 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ และในสีที่สกัดจากพืช อัตราการแบ่งเซลล์ของกลุ่มทดลองซึ่งมีค่า MI ต่ำสุด ประมาณ 100.33 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร และมากที่สุด ประมาณ 101.73 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตรนั้นไม่แตกต่างกับกลุ่ม negative control แต่แตกต่างกับกลุ่ม positive control ซึ่งมีค่า MI ประมาณ 30.56 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ และในสีสังเคราะห์เอริโทรซินนั้น มีผลทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลงแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น โดยอัตราการแบ่งเซลล์ของกลุ่ม negative control มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ทดลองด้วยสีผสมอาหารเอริโทรซินที่ระดับความเข้มข้น 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยของอัตราการแบ่งเซลล์ เท่ากับ 61.18 55.00 38.53 33.82 และ 20.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนกลุ่ม positive control ได้ทำการใส่สารไมโตมายซิน-ซีที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยของอัตราการแบ่งเซลล์เท่ากับ 28.83 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) (ภาพที่ 3 – 5)

ตารางที่ 6 แสดงค่าอัตราการแบ่งเซลล์เนื่องจากผลของคือ สีสกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย สีสกัดจากพืช และ สีสั่งเคราะห์เออร์โรซินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในอาหาร

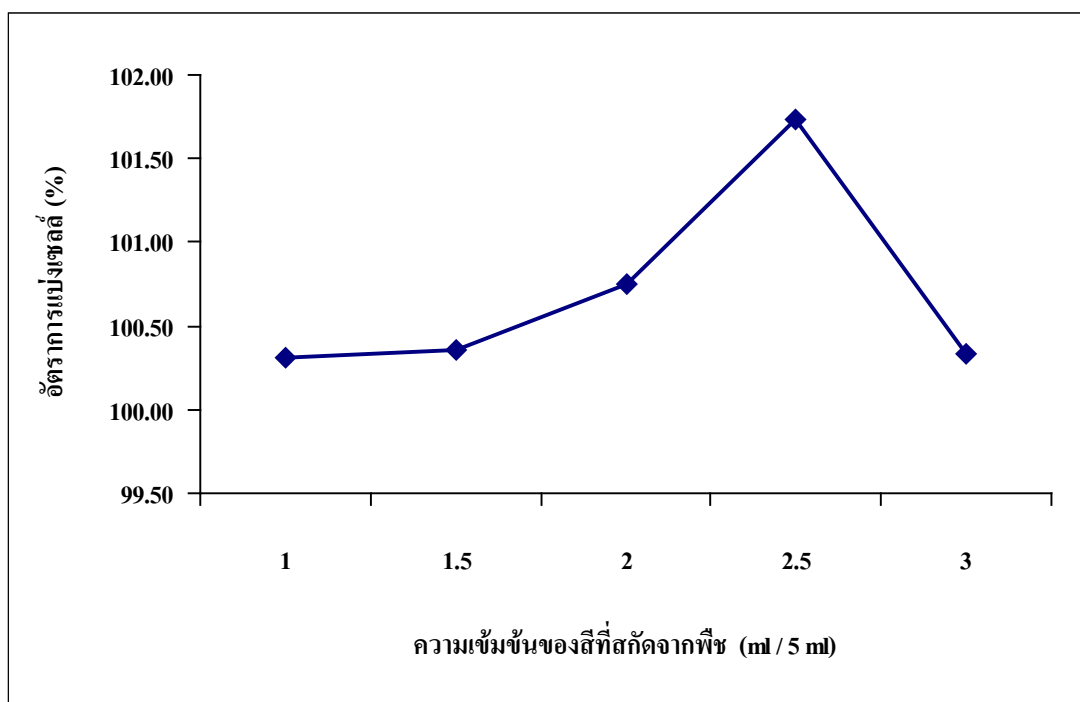
สารทดสอบ	ชนิดของ กลุ่มทดลอง	ความ เข้มข้น (ml/5 ml)	Mitotic index (%)			เฉลี่ย
			1	2	3	
สีที่สกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย	negative control	0	100.00	100.00	100.00	100.00 ^{NS}
	positive control	0.5 µg/ml	28.41	33.72	27.99	30.04 ^{SI}
	กลุ่มทดลอง	1	99.13	102.37	106.89	102.80 ^{NS}
		2	107.24	96.97	101.56	101.92 ^{NS}
		3	100.38	102.61	99.02	100.67 ^{NS}
		4	97.29	99.50	103.74	100.18 ^{NS}
		5	100.92	103.07	97.35	100.45 ^{NS}
สีที่สกัดจากพืช	negative control	0	100.00	100.00	100.00	100.00 ^{NS}
	positive control	0.5 µg/ml	20.53	31.49	23.97	25.33 ^{SI}
	กลุ่มทดลอง	1	102.63	94.32	105.79	100.91 ^{NS}
		1.5	98.71	100.37	101.99	100.36 ^{NS}
		2	104.70	95.31	102.25	100.75 ^{NS}
		2.5	99.10	101.65	104.43	101.73 ^{NS}
		3	103.06	99.18	98.76	100.33 ^{NS}
สีสังเคราะห์เออร์โรซิน	negative control	0	100.00	100.00	100.00	100.00 ^{SI}
	positive control	0.5 µg/ml	42.99	23.97	19.54	28.83 ^{NS}
	กลุ่มทดลอง	3 mg	61.77	75.89	45.88	61.18 ^{NS}
		4 mg	52.06	68.83	44.12	55.00 ^{NS}
		5 mg	38.83	46.77	30.00	38.53 ^{NS}
		6 mg	33.53	34.41	33.53	33.82 ^{NS}

* ^{SI} แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

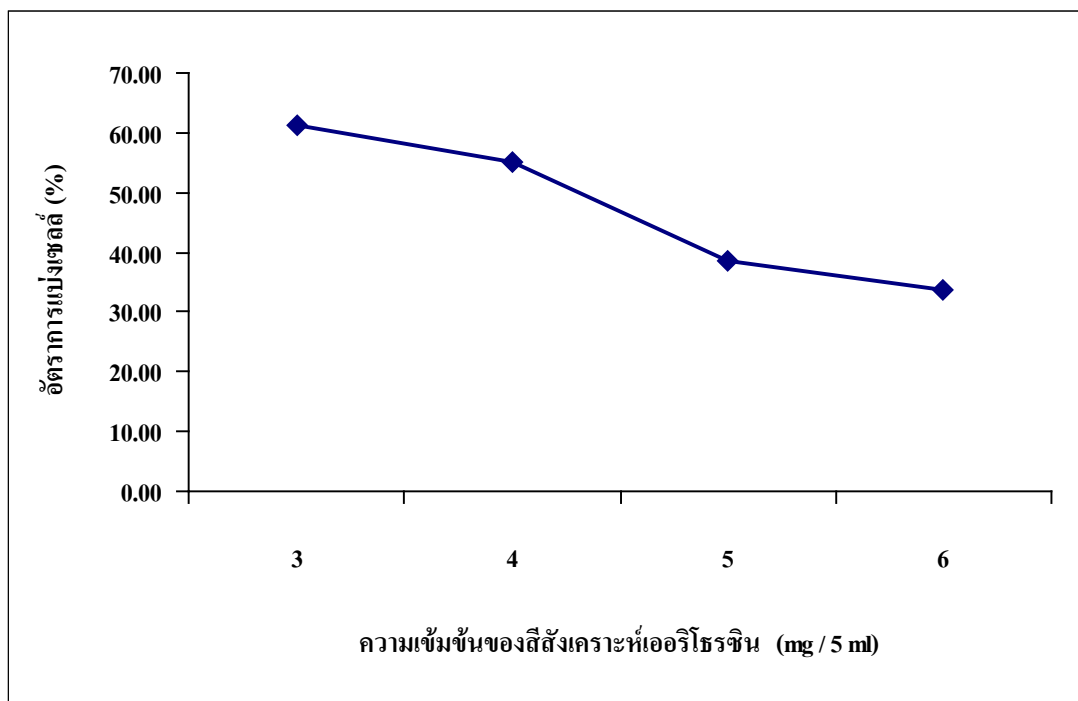
^{NS} ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์



ภาพที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสีกากีจากไชยาโนแบคทีเรียกับ อัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวคิดเป็นเปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสีกากีจากพืชกับอัตราการแบ่งเซลล์ ของเซลล์เม็ดเลือดขาวคิดเป็นเปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสีสังเคราะห์เออริโทรซินกับอัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวคิดเป็นเปอร์เซ็นต์

2. ผลของสีที่สกัดจากไชยานินแบคทีเรีย สีที่สกัดจากพืช และสีสังเคราะห์เออริโทรซินที่มีต่อความผิดปกติต่อโครโมโซม

จากการทดลองพบว่าในทุกระดับความเข้มข้นของสีที่สกัดจากไชยานินแบคทีเรีย และสีที่สกัดจากพืช ทั้ง 2 ชนิดนั้น พบความผิดปกติของโครโมโซมแบบหักเพียงรูปแบบเดียวเท่านั้น แต่สีสังเคราะห์เออริโทรซิน พบความผิดปกติของโครโมโซม ในรูปแบบต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น การหัก การหดสั้น การไม่คงรูป และการเกาะกลุ่มเหนียวของโครโมโซม

2.1 ความผิดปกติการหักของโครโมโซมโดยวัดอัตราการหักของโครโมโซม คิดเป็นจำนวน break/cell (b/c)

สีที่สกัดจากไชยานินแบคทีเรีย และสีที่สกัดจากพืช พบความผิดปกติของโครโมโซมแบบหัก ซึ่งเกิดขึ้นในจำนวนที่น้อย และ ในบางความเข้มข้นของสีทั้ง 2 ชนิดก็ไม่พบการผิดปกติของโครโมโซมเลย และจากการนำค่าเฉลี่ยจำนวนการหักของโครโมโซมไปวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของสารทดสอบ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่ม negative control ซึ่งมีจำนวน break/cell เป็น 0 (ภาพที่ 7) แต่จะมีความแตกต่างกับกลุ่ม positive control ซึ่งใส่สารไมโตมายซิน-ซี ซึ่งมีจำนวน break/cell เป็น 0.49 (ภาพที่ 8 และ 11-12) (ตารางที่ 7 และ 8)

ตารางที่ 7 แสดงอัตราการหักของโครโมโซม คิดเป็น break/cell เนื่องจากผลของสียที่สกัดจากไชยานินแบคทีเรีย ในระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยนับจำนวนการหักจากเซลล์เมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์ต่อแต่ละหน่วยทดลอง

ชนิดของกลุ่มทดลอง	ความเข้มข้น (ml/ 5 ml)	อัตราการหักของโครโมโซม			เฉลี่ย
		1	2	3	
negative control	0	1	0	0	0.0067 ^{NS}
positive control	0.5 µg/ml	29	18	27	0.4933 ^{SI}
กลุ่มทดลอง	1	0	0	1	0.0067 ^{NS}
	2	0	2	0	0.0133 ^{NS}
	3	1	0	0	0.0067 ^{NS}
	4	0	0	0	0.0000 ^{NS}
	5	0	1	0	0.0067 ^{NS}

* ^{SI} แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

^{NS} ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 8 แสดงอัตราการหักของโครโมโซม คิดเป็น break/cell เนื่องจากผลของสียที่สกัดจากพืชในระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยนับจำนวนการหักจากเซลล์เมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์ต่อแต่ละหน่วยทดลอง

ชนิดของกลุ่มทดลอง	ความเข้มข้น (µl/ 5 ml)	อัตราการหักของโครโมโซม			เฉลี่ย
		1	2	3	
negative control	0	0	0	0	0.0000 ^{NS}
positive control	0.5 µg/ml	24	17	33	0.4933 ^{SI}
กลุ่มทดลอง	1	0	0	0	0.0000 ^{NS}
	1.5	0	1	0	0.0067 ^{NS}
	2	1	0	0	0.0067 ^{NS}
	2.5	0	0	0	0.0000 ^{NS}
	3	0	0	0	0.0000 ^{NS}

* ^{SI} แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

^{NS} ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ส่วนสี่สังเคราะห์เอริโทรซินพบว่าในทุกความเข้มข้นของกลุ่มทดลองสามารถก่อให้เกิดการหักของโครโมโซมได้ดังข้อมูลในตารางที่ 9 เมื่อเทียบกับโครโมโซมของมนุษย์ปกติ (ภาพที่ 7) คือพบการหักของโครโมโซมได้ 4 แบบ คือ SG SB ISCG และ ISCB (ภาพที่ 9-10) โดยอัตราการหักของโครโมโซมในกลุ่ม negative control มีจำนวน break/cell เป็น 0 และกลุ่มทดลองที่ระดับความเข้มข้น 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร จะมีจำนวน break/cell เป็น 0.25 0.32 0.34 และ 0.37 ตามลำดับ และกลุ่ม positive control ที่ทำการใส่สารไมโทมัยซิน-ซีที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีการหักของโครโมโซมในรูปแบบต่างๆ คือ SG ISCG SB และ ISCB (ภาพที่ 8) โดยอัตราการหักของโครโมโซมเนื่องจากผลของสารไมโทมัยซิน-ซีนี้ มีค่าจำนวน break/cell เป็น 0.33 (ตารางที่ 9)

จากการนำค่าเฉลี่ยจำนวนหักของโครโมโซมของกลุ่ม negative control และกลุ่มทดลองในทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (= 0.05) พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของกลุ่มทดลองให้ค่าอัตราการหักของโครโมโซมแตกต่างไปจากกลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อนำกลุ่มทดลองในทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์กับ positive control พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของกลุ่มทดลองให้ค่าอัตราการหักของโครโมโซมไม่แตกต่างไปจากกลุ่ม positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 9 แสดงอัตราการหักของโครโมโซมทั้ง 4 รูปแบบ เนื่องจากผลของสีผสมอาหารเอริโทรซินในระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยนับรวมจากจำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟส จำนวน 50 เซลล์ต่อแต่ละหน่วยทดลองทั้ง 3 ซ้ำ

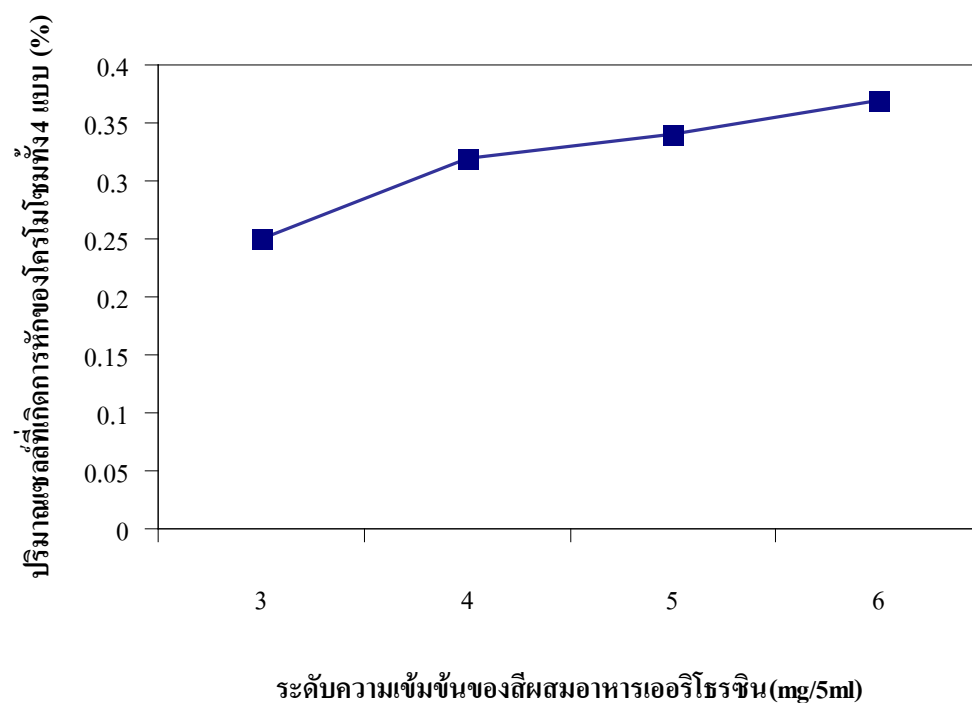
ชนิดของกลุ่มทดลอง	ระดับความเข้มข้นของสารทดสอบ (mg/5 ml)	SG	SB	ISCG	ISCB	รวม	เฉลี่ย
negative control	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0.00 ^{A, b}
positive control	0.5 (µg/ml)	7.00	4.00	3.33	2.33	50	0.33 ^{a, B}
กลุ่มทดลอง	3	6.67	1.67	2.67	1.67	38	0.25 ^{a, B}
	4	5.33	4.67	2.33	3.67	48	0.32 ^{a, B}
	5	5.33	4.67	4.33	2.67	51	0.34 ^{a, B}
	6	5	4.67	4.33	4.67	56	0.37 ^{a, B}

หมายเหตุ ^A ไม่มีความแตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

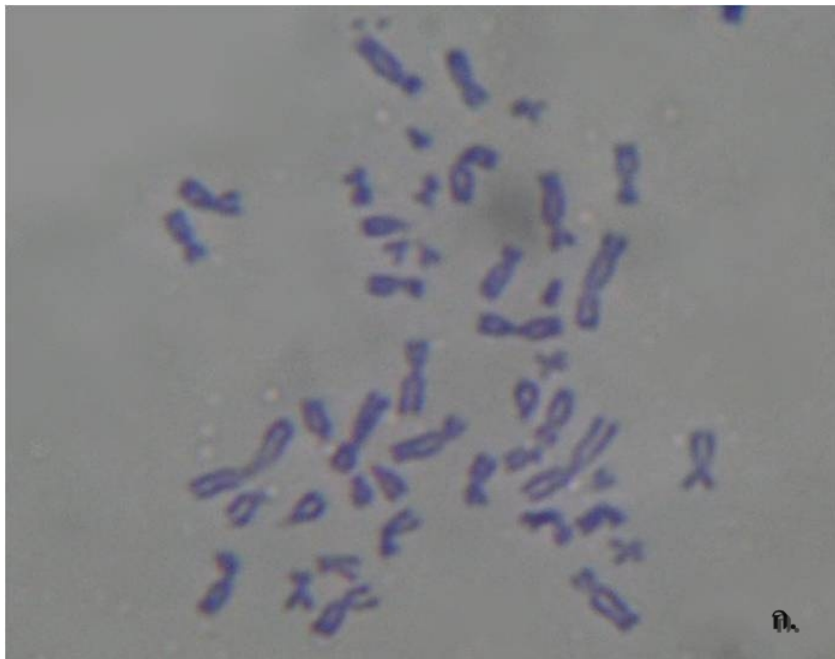
^a มีความแตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

^B ไม่มีความแตกต่างจาก positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

^b มีความแตกต่างจาก positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



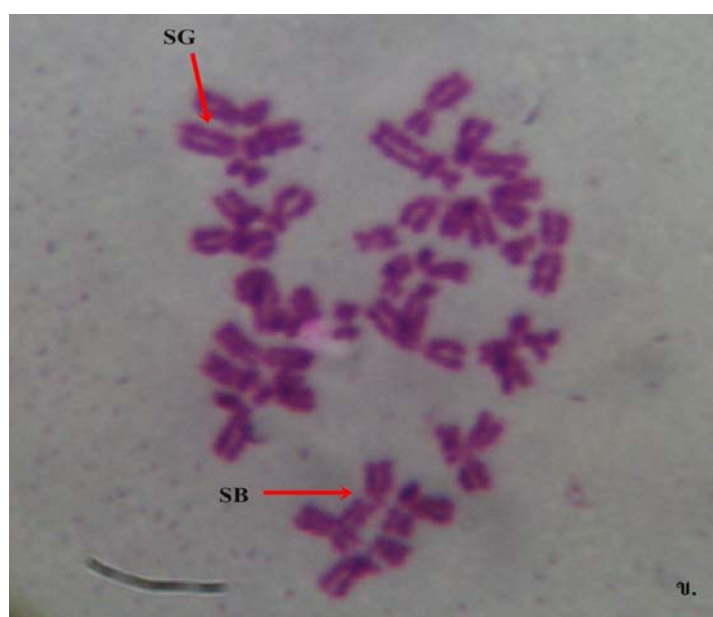
ภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสียผสมอาหารเอริทริซิน (mg/5ml) กับอัตราการเกิดการหักของโครโมโซมทั้ง 4 แบบ



ภาพที่ 7 ลักษณะของโครโมโซมปกติในระยะเมทาเฟสของเซลล์เม็ดเลือดขาว

ก. โครโมโซมเพศชาย (46, XY)

ข. โครโมโซมเพศหญิง (46, XX)



ภาพที่ 8 ลักษณะของโครโมโซมที่ผิดปกติในระยะเมทาเฟสซึ่งเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำด้วย

ไมโตมายซิน-ซี ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

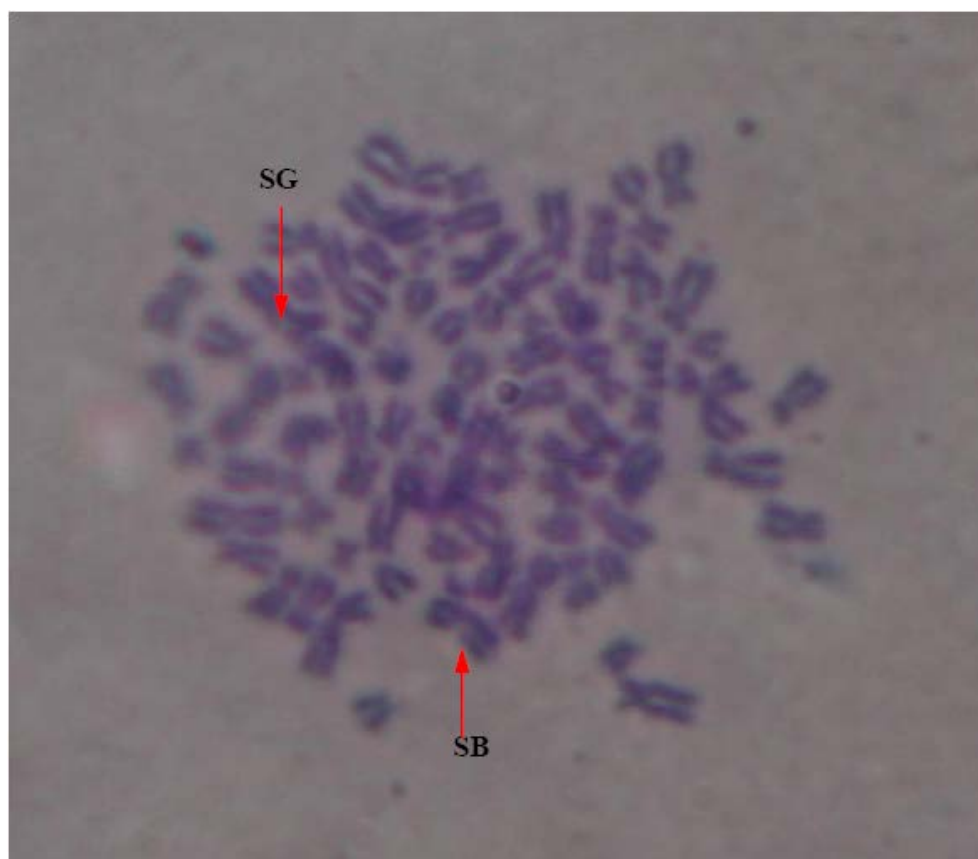
(บริเวณที่ลูกศรชี้ คือ → บริเวณที่มีความผิดปกติ)

ก. ความผิดปกติแบบ Isochromatid gap (ISCG)

ความผิดปกติแบบ Single chromatid gap (SG)

ข. ความผิดปกติแบบ Single chromatid gap (SG)

ความผิดปกติแบบ Single chromatid break (SB)



ภาพที่ 9 ลักษณะของโครโมโซมที่ผิดปกติในระยะเมทาเฟสซึ่งเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำด้วย
 ผสมอาหารเอริโทรซินที่ระดับความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร
 (บริเวณที่ถูกสร → ชี้ คือบริเวณที่มีความผิดปกติ)

- ความผิดปกติแบบ Single chromatid break (SB)
- ความผิดปกติแบบ Single chromatid gap (SG)



ภาพที่ 10 ลักษณะของโครโมโซมที่ผิดปกติในระยะเมทาเฟสซึ่งเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำด้วยสียผสม

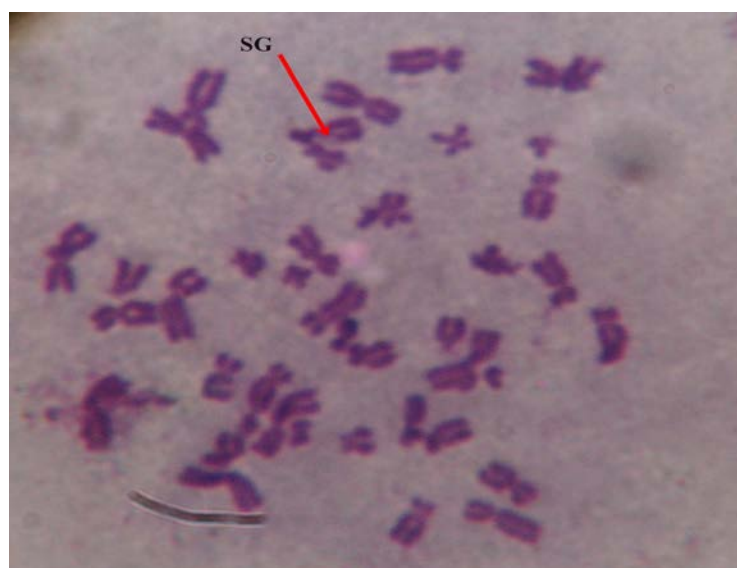
อาหารเออริโทรซินที่ระดับความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร

(บริเวณที่ลูกศร → ชี้ คือบริเวณที่มีความผิดปกติ)

- ความผิดปกติแบบ Isochromatid break (ISCB)
- ความผิดปกติแบบ Isochromatid gap (ISCG)



ภาพที่ 11 ลักษณะของโครโมโซมที่ผิดปกติในระยะเมทาเฟสซึ่งเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำด้วยสีสกัดจากไซยาโนแบคทีเรีย ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร
(บริเวณที่ลูกศร → ชี้ คือบริเวณที่มีความผิดปกติ)
- ความผิดปกติแบบ Deletion



ภาพที่ 12 ลักษณะของโครโมโซมที่ผิดปกติในระยะเมทาเฟสซึ่งเป็นผลมาจากการเหนี่ยวนำด้วยสีสกัดจากพืช ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร
(บริเวณที่ลูกศร → ชี้ คือบริเวณที่มีความผิดปกติ)
- ความผิดปกติแบบ single chromatid gap (SG)

2.2 ความผิดปกติของโครโมโซมในรูปแบบอื่นๆ โดยวิธีวัดจากจำนวนเซลล์ที่เกิดความผิดปกติ

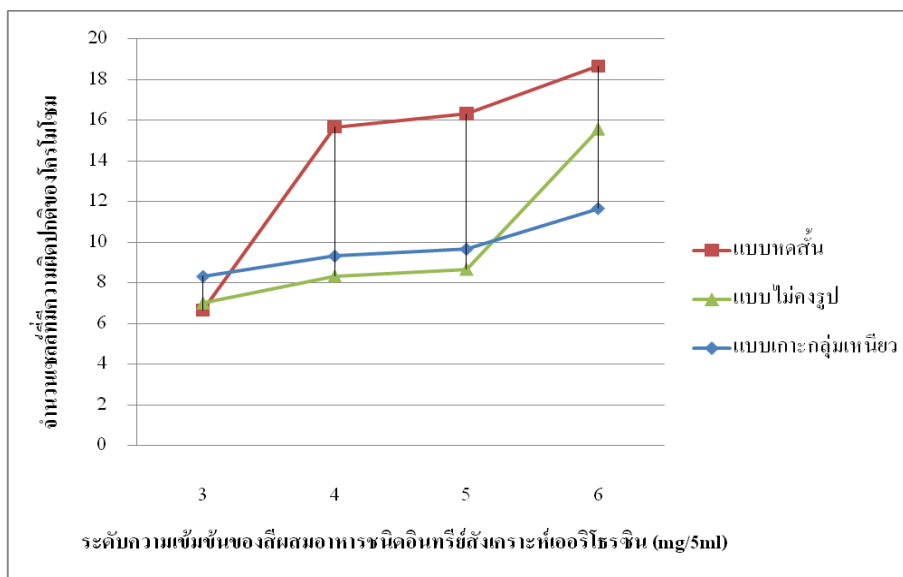
เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสารทดสอบสี่ผสมอาหารเออีโรซินทั้ง 4 ระดับที่ทำการทดสอบ ได้แก่ ที่ระดับความเข้มข้น 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อขวดเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิตร พบว่าทุกระดับความเข้มข้นจะก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในรูปแบบอื่นๆ ได้แก่ การหดสั้น การไม่คงรูป และการเกาะกลุ่มเหนียวของโครโมโซม จากการเปรียบเทียบกับโครโมโซมมนุษย์ปกติ (ภาพที่ 14) ซึ่งพบว่าในกลุ่มควบคุมจะไม่พบความผิดปกติของโครโมโซมเลย และจำนวนเซลล์ที่มีความผิดปกตินี้จะแปรผันตามระดับความเข้มข้นของสี่ผสมอาหารเออีโรซินที่เพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 13) ดังข้อมูลในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลของสี่ผสมอาหารเออีโรซิน ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบหดสั้น ในเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์ต่อแต่ละหน่วยทดลอง

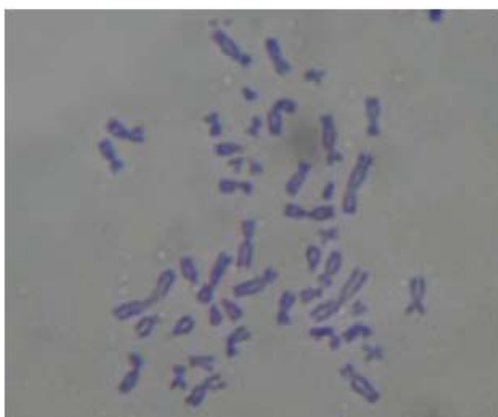
ชนิดของกลุ่มทดลอง	ระดับความเข้มข้นของสารทดสอบ (mg/5 ml)	ค่าเฉลี่ยอัตราการเกิดความผิดปกติที่เกิดขึ้น		
		แบบหดสั้น	แบบไม่คงรูป	แบบเกาะกลุ่มเหนียว
Negative control	0	0.00 ^{SI}	0.00 ^{SI}	0.00 ^{SI}
Positive control	0.5 (µg/ml)	0.00 ^{SI}	0.00 ^{SI}	0.00 ^{SI}
กลุ่มทดลอง	3	6.67 ^{NS}	7.00 ^{NS}	8.33 ^{NS}
	4	15.67 ^{NS}	8.33 ^{NS}	9.33 ^{NS}
	5	16.33 ^{NS}	8.67 ^{NS}	9.67 ^{NS}
	6	18.67 ^{NS}	15.57 ^{NS}	11.67 ^{NS}

หมายเหตุ ^{SI} ไม่มีความแตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

^{NS} มีความแตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 13 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเกิดจำนวนเซลล์ที่มีความผิดปกติของโครโมโซมใน 3 รูปแบบ ได้แก่ ความผิดปกติของโครโมโซมแบบหัดสั้น (สีแดง) ความผิดปกติของโครโมโซมแบบไม่คงรูป (สีเขียว) และความผิดปกติของโครโมโซมแบบเกาะกลุ่มเหนียว (สีฟ้า)



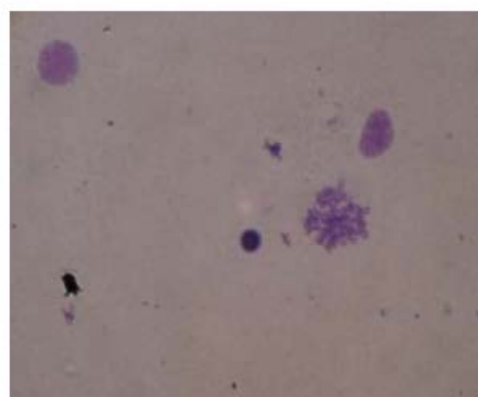
ก.



ข.



ค.



ง.

ภาพที่ 14 ลักษณะของโครโมโซมที่ผิดปกติในระยะเมทาเฟสแบบต่างๆ ที่ได้รับสืผสมอาหารเออร์โรซิน

ก. โครโมโซมผู้ชายปกติ (46, XY) จากชุด negative control

ข. โครโมโซมที่ผิดปกติแบบหูดสั้นเมื่อได้รับสืผสมอาหารเออร์โรซินที่
ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร

ค. โครโมโซมที่ผิดปกติแบบไม่คงรูปเมื่อได้รับสืผสมอาหารเออร์โรซินที่ระดับ
ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร

ง. โครโมโซมที่ผิดปกติแบบเกาะกลุ่มเหนียวเมื่อได้รับสืผสมอาหาร
เออร์โรซินที่ระดับความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร

วิจารณ์

จากการศึกษาผลของสีที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียและพืช พบว่า สีที่สกัดได้คือ ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin) และ แอนโทไซยานิน (Anthocyanin) ตามลำดับ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Sarada, 1999) และได้ทดลองศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด โดยการนำเซลล์เม็ดเลือดขาวเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วใส่สารทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ เมื่อครบ 72 ชั่วโมงพบว่าสีที่สกัดจากไซยาโนแบคทีเรียไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์ เมื่อนำค่าอัตราการแบ่งเซลล์ของกลุ่มที่ใส่สารทดสอบในทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ posmyk และคณะ (2009) ที่ได้ทำการทดลองสกัดแอนโทไซยานินจากกะหล่ำปลีแดง และนำมาทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ พบว่าไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของเม็ดเลือดขาว และยังมีผลช่วยลดความเป็นพิษของโลหะหนักอย่างทองแดงอีกด้วย ส่วนไฟโคไซยานินนั้น พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งมีอยู่มากในไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลิน่า มีผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งรวมทั้งยังสามารถควบคุมการผลิตเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นได้ในขณะที่สเต็มของไขกระดูกสันหลังถูกทำให้เกิดความเสียหายจากสารเคมีหรือรังสี (Cheng-wu, 1994)

จากการศึกษาผลของสีผสมอาหารเอริโทรซิน โดยการนำเซลล์เม็ดเลือดขาวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วใส่สารทดสอบดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อขวดเลี้ยงเซลล์ (5 มิลลิลิตร) เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมงก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อครบ 72 ชั่วโมง พบว่าสีผสมอาหารเอริโทรซินมีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์โดยทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลงซึ่งแปรผันตรงกับความเข้มข้นของสารทดสอบที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อทำการนำค่าอัตราการแบ่งเซลล์ของกลุ่ม negative control และกลุ่มทดลองทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติเป็นรายคู่พบว่า ในทุกระดับความเข้มข้นของสารมีค่าอัตราการแบ่งเซลล์แตกต่างจาก negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันความผิดปกติของรูปร่างโครโมโซมจะพบเพิ่มมากขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับปริมาณของสีผสมอาหารในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งความผิดปกตินี้จะอยู่ในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ การหักของโครโมโซมซึ่งการหักของโครโมโซมจะพบทั้ง 4 รูปแบบ คือ Single chromatid gap (SG), Single chromatid break (SB), Isochromatid gap (ISCG) และ Isochromatid breaks (ISCB) นำค่าเฉลี่ยจำนวนหักของโครโมโซมของกลุ่ม negative control และกลุ่มทดลองในทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($\alpha = 0.05$) พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของกลุ่มทดลองให้ค่าอัตราการหักของโครโมโซมแตกต่างไปจากกลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อนำกลุ่มทดลองในทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์กับ positive control (MMC) พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของกลุ่มทดลองให้ค่าอัตราการหักของโครโมโซมไม่แตกต่างไปจากกลุ่ม positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติทางไซโตจีนิติกจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารที่ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซม (Clastogen) และสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติในการแบ่งเซลล์ ซึ่งเป็นสารที่มี

ผลกับ mitotic apparatus เรียกสารชนิดนี้ว่า mitotic poison โดยสารบางชนิดอาจมีคุณสมบัติที่เป็นได้ทั้ง clastogen และ mitotic poison (นฤพร, 2546)

ดังนั้นสีผสมอาหารเอริโทรซินจึงจัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น clastogen คือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหักของโครโมโซม นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติแบบอื่นๆ ได้แก่ ความผิดปกติของโครโมโซมแบบหดสั้น แบบไม่คงรูปและแบบเกาะกลุ่มเหนียว พบว่าให้ค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน

ความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดการหักขึ้นนี้ Andersson, H.C. และ Kihlman. B.A. (1989) ได้กล่าวไว้ว่าอาจเป็นผลมาจากการที่เซลล์ได้รับสิ่งแปลกปลอมที่ทำให้ผิดปกติ ซึ่งถ้าได้รับในช่วง G_1 ของวัฏจักรเซลล์ซึ่งเป็นระยะก่อนทำการสังเคราะห์สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ โดยโครโมโซมในระยะนี้ยังมีสภาพเป็นเส้นเดี่ยวทำให้สามารถเกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบ Chromosome type aberrations แต่ถ้าเซลล์ได้รับสิ่งแปลกปลอมในช่วงระยะ S และ G_2 จะเกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบ Chromatid type aberrations ได้นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการทำงานของ mitotic apparatus เช่น spindle fiber, centriole และ kinetochore ผลดังกล่าว ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมชนิด nondisjunction และมีผลทำให้เซลล์ลูกที่แบ่งได้มีความผิดปกติของโครโมโซมด้วย (อมร, 2546 และ Hsu et al., 1986)

โดยการเกิดความผิดปกติทั้ง 3 แบบ คือการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบหดสั้น แบบไม่คงรูป และแบบเกาะกลุ่มเหนียวอาจเป็นผลเนื่องมาจากการที่สารทดสอบเข้าไปรบกวนการพันเกลียวของ DNA กับโปรตีน histone และ nonhistone ทำให้การประกอบตัวของ DNA กับโปรตีนเป็นแท่งโครโมโซมเกิดความผิดปกติไปซึ่งอาจส่งผลต่อการจำลองตัวของ DNA ได้ หากได้รับเข้าไปในร่างกายมากอาจมีผลต่อการลดอัตราการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ หรืออาจมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ผิดปกติต่อไป และยังสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองศึกษาผลของสีที่สกัดจากไชยาโนแบคทีเรีย สีที่สกัดจากพืช และสีสังเคราะห์เอริโทรซินที่มีต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง อัตราการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส โดยวิธีวัดอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index) พบว่าสีที่สกัดจากไชยาโนแบคทีเรียและพืชไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว โดยสีที่สกัดจากไชยาโนแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยของอัตราการแบ่งเซลล์เท่ากับ 102.80 101.92 100.67 100.18 และ 100.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสีที่สกัดจากพืชที่ระดับความเข้มข้น 1 1.5 2 2.5 และ 3 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยของอัตราการแบ่งเซลล์เท่ากับ 100.91 100.36 100.75 101.73 และ 100.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการแบ่งเซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อเปรียบเทียบสีที่สกัดจากธรรมชาติทั้งจากไชยาโนแบคทีเรียและพืชที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทั้ง 5 ระดับ พบว่าไม่มีความแตกต่างกับ negative control แต่มีความแตกต่างกับ positive control ส่วนสีสังเคราะห์เอริโทรซินมีผลทำให้อัตราการแบ่ง

เซลล์แบบไมโทซิสเปลี่ยนแปลง ซึ่งพบว่าอัตราการแบ่งเซลล์มีค่าลดลงโดยแปรผกผันกับความเข้มข้นของสีผสมอาหารเออร์โทรซินที่เพิ่มมากขึ้น ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของสีผสมอาหารชนิดอินทรีย์สังเคราะห์เออร์โทรซิน คือ 3 4 5 และ 6 มิลลิกรัมต่อขวดเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิตร มีค่าเฉลี่ยของอัตราการแบ่งเซลล์เท่ากับ 61.18 55.00 38.53 33.82 และ 20.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของสีที่สกัดจากไชยาโนแบคทีเรียและพืชต่อความผิดปกติของโครโมโซม พบว่าสีที่สกัดจากธรรมชาติทั้ง 2 ชนิดไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในรูปแบบต่างๆ ไม่ว่าจะเป็น ความผิดปกติของโครโมโซม การหัก แบบหดสั้น แบบไม่คงรูปและเกาะกลุ่มเหนียว และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ระดับความเข้มข้นของสีที่สกัดจากธรรมชาติที่ทำการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกับ negative control แต่มีความแตกต่างกับ positive control ในการก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบหัก จึงไม่จัดเป็นสาร Mutagen ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อโครโมโซม แต่ผลของสีสังเคราะห์เออร์โทรซินต่อความผิดปกติของโครโมโซม พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ การหักของโครโมโซมซึ่งการหักของโครโมโซมจะพบทั้ง 4 รูปแบบ คือ Single chromatid gap (SG), Single chromatid breaks (SB), Isochromatid gap (ISCG) และ Isochromatid breaks (ISCB) โดยการหักของโครโมโซมแบบ Single chromatid gap (SG) จะเกิดมากที่สุด นำค่าเฉลี่ยจำนวนหักของโครโมโซมของกลุ่ม negative control และกลุ่มทดลองในทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($\alpha = 0.05$) พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของกลุ่มทดลองให้ค่าอัตราการหักของโครโมโซมแตกต่างไปจากกลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อนำกลุ่มทดลองในทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์กับ positive control (MMC) พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของกลุ่มทดลองให้ค่าอัตราการหักของโครโมโซมไม่แตกต่างไปจากกลุ่ม positive control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสีผสมอาหารเออร์โทรซินจึงจัดเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น clastogen คือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหักของโครโมโซมนอกจากนี้ยังพบความผิดปกติแบบอื่นๆ ได้แก่ ความผิดปกติของโครโมโซมแบบหดสั้น แบบไม่คงรูปและแบบเกาะกลุ่มเหนียว พบว่าให้ค่าที่แตกต่างจากกลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

นฤพร เพ็ชรกลาง. 2546. ผลทางไซโตจีนิติกของยาสลบชนิดสูดดม Diethyl Ether Halothane และ Isoflurane ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรา คัมภีรานนท์. 2546. พันธุศาสตร์ของเซลล์. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Hsu, T. C., C. L. Jan and L. K. halli. 1986. Cytogenetic assays for mitotic poisons aromatic animal cells. **Chem. Mut.** 10: 155-181.

Posmyk, M.M., K.M. Janas and R. Kontek. 2009. Red cabbage anthocyanin extract alleviates copper-induced cytological disturbances in plant meristematic tissue and human lymphocytes. **Biometals.** 22(3):479-90.

Sarada, R., M.G. Pillai. and G.A. Ravishankar. 1999. Phycocyanin from Spirulina sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry.** 34:795-801.