

บทที่ 4

ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การเตรียมชิ้นส่วนเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง

การเพิ่มปริมาณ เซลล์เนื้อเยื่อเจริญของ บัวหลวงในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อเจริญบัวหลวง คือ หน่ออ่อน และคัพภะ มาฟอกฆ่าเชื้อด้วย ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลานาน 1 นาทีตามด้วย สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที แล้วฟอกตามด้วยสารละลายเมทิลริกคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับ tween 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลานาน 10 นาที และ calcium hypochlorite 5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ tween 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลานาน 30 นาที และ calcium hypochlorite 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ tween 20 จำนวน 2 หยด เป็นเวลานาน 10 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง เป็นเวลานานครั้งละ 5 นาที นำชิ้นส่วนที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเลี้ยงในอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ร่วมกับ NAA เข้มข้น $0.54 \mu\text{M}$ และ BA เข้มข้น $4.44 \mu\text{M}$ (กนกกรส ทองสุคติ และสุเม อริญนารถ, 2553) เป็นสูตรอาหารที่ทำให้เซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวงมีการเจริญเติบโตได้ดังแสดงในภาพที่ 4.1



(ก)

(ข)

(ค)

ภาพที่ 4.1 การเกิดยอดของบัวหลวงเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ร่วมกับ NAA เข้มข้น $0.54 \mu\text{M}$ และ BA เข้มข้น $4.44 \mu\text{M}$ 1 แสดงระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดของเกสรบัวหลวงระยะเวลา 1 สัปดาห์ (ข) ระยะเวลา 2 สัปดาห์ (ค) ระยะเวลา 3 สัปดาห์



ภาพที่ 4.2 ลักษณะเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวงที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช



(ก)



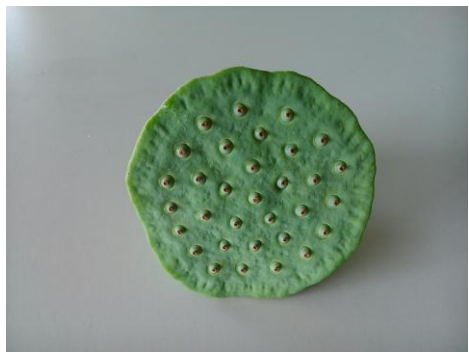
(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

ภาพที่ 4.3 ลักษณะของวัตถุดิบส่วนต่างๆของบัวหลวง (ก) ก้าน (ข) เมล็ด (ค) เกสรตัวผู้ (ง) เซลล์เนื้อเยื่อ
เจริญ (จ) ฝัก และ (ฉ) กลีบ

4.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง

การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี (พฤกษเคมี, Phytochemistry) เป็นการตรวจสอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดพืช สมุนไพรที่ใช้ระยะเวลาสั้น ง่าย และใช้เครื่องมือที่น้อยที่สุด โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีง่าย ๆ ซึ่งจะให้ผลเป็นสีต่าง ๆ หรือการตกตะกอน เพื่อบอกถึงกลุ่มสารสำคัญ ผลการตรวจสอบทางพฤกษเคมีของสารสกัดหยาดเมทานอล เซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง พบว่า มีกลุ่มสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ที่สำคัญ คือ เทอร์ปีนอยด์ สเตอรอยด์ แอลคาลอยด์ และ ฟลาโวนอยด์ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบทาง พฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากพืช โดยการใช้ปฏิกิริยาทางเคมีในการตรวจสอบสารสกัดด้วยปฏิกิริยาสีหรือการตกตะกอนผลการทดสอบที่ได้ อาจจะพบข้อผิดพลาดแบบ false positive หรือ false negative ได้ในบางกรณีแต่ยังคงให้ข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานที่มีประโยชน์สำหรับตรวจสอบว่าในสารสกัดมี กลุ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ สารสำคัญกลุ่มใด หรือมีโครงสร้าง เคมีที่มีคุณสมบัติทางเคมีคล้ายสารกลุ่มใดเพื่อประโยชน์ในการวางแผนงานวิจัยในการแยกสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

ตารางที่ 4.1 กลุ่มสารสำคัญที่พบในสารสกัดหยาดเมทานอลเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง

กลุ่มสารที่ทำการตรวจสอบ	กลุ่มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบ
Alkaloids	✓
Tannins	-
Phenolic compounds	✓
Terpenoids	✓
Steroids	✓
Flavonoids	✓
Antraquinones	-
Cardiac glycosides	-
Coumarins	✓
Saponins	-

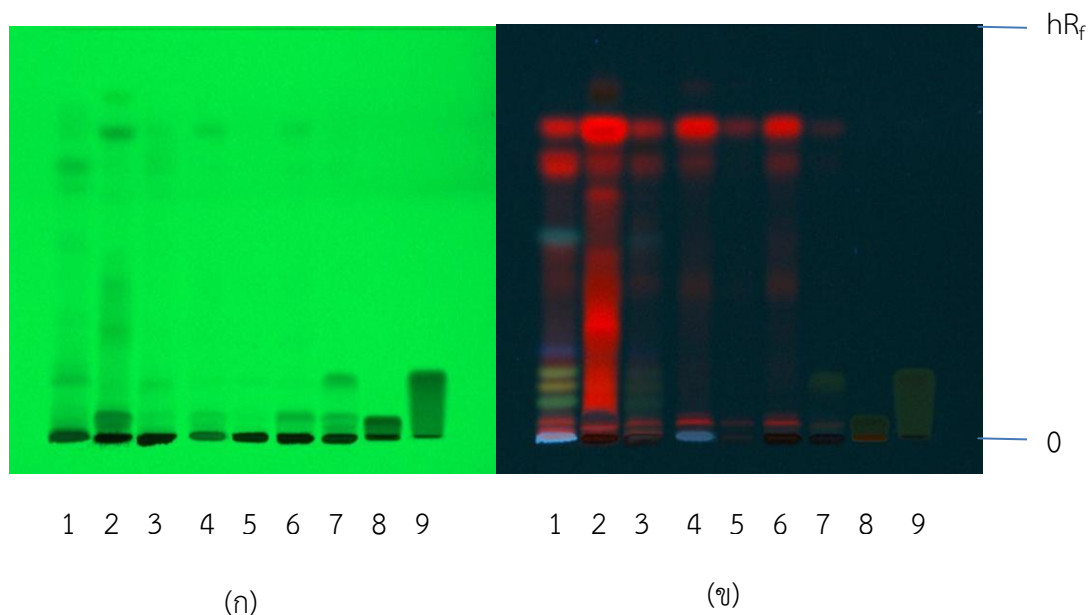
4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวงโดยใช้เทคนิค TLC

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบเมทานอลเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง ซึ่งมีลักษณะ และสีของสารสกัดดังแสดงในภาพที่ 4.4 โดยใช้เทคนิค TLC และตรวจสอบด้วยน้ำยาตรวจสอบต่างๆ ที่ทำให้เกิดสี จะได้โครมาโตแกรม (TLC fingerprints) ของสารสกัดหยาบเมทานอลเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง (ภาพที่ 4.5 – 4.10) จากการตรวจวัดด้วยแสงยูวี (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) และการตรวจสอบหาสารกลุ่มสเตอรอยด์ และเทอร์ปีนส์โดยพ่นด้วยน้ำยา กรดอะซิติก -กรดซัลฟิวริก น้ำยากรดซัลฟิวริก และน้ำยาวานิลลิน-กรดซัลฟิวริก ให้แถบสีม่วง (violet), แดง (red), ม่วงแดง (purple) และเขียว (green) (ดังแสดงในภาพที่ 4.5-4.8) จึงวิเคราะห์ได้ว่าสารสกัดหยาบเมทานอลเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวงประกอบด้วยสารกลุ่มสเตอรอยด์ และเทอร์ปีนส์ ส่วน TLC fingerprints ของสารสกัดแอลกอฮอล์จากสารสกัดหยาบเมทานอลเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของ บัวหลวงเมื่อพ่นด้วยน้ำยาตราเจนดอร์ฟ พบว่าให้แถบสีส้ม (แสดงดังภาพที่ 4. 9) จึงวิเคราะห์ได้ว่าสารสกัดหยาบเมทานอลเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของ บัวหลวงประกอบด้วยสารกลุ่มแอลกอฮอล์ และ TLC fingerprints ของสารสกัดหยาบเมทานอลเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของ บัวหลวงเมื่อพ่นด้วยน้ำยาโปรแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) แล้วตรวจวัดด้วยแสงยูวี (ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร) พบแถบเรืองแสงสีเขียวของฟลาโวนส์ และฟลาโวนอล แถบเรืองแสงสีส้มของฟลาโวนอล และแถบเรืองแสงสีฟ้าของฟีนอลคาร์บอกซิลิกแอซิด หรือกลุ่มคูมาริน (แสดงดังภาพที่ 4.10) จึงวิเคราะห์ได้ว่าสารสกัดหยาบเมทานอลเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวงประกอบด้วยสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ หรือคูมาริน และสารกลุ่มฟีนอลคาร์บอกซิลิกแอซิด ดังนั้นสารสกัดหยาบเมทานอลเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวงจะมีสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ คือ สเตอรอยด์ เทอร์ปีนส์ แอลกอฮอล์ ฟลาโวนอยด์ และคูมาริน และเมื่อทำ การเปรียบเทียบแถบลายนิ้วมือ (finger print) ขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเมทานอลเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวงพบว่ามีความแตกต่างกับแถบลายนิ้วมือ ขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบเมทานอลส่วนใบ ส่วนเกสร ส่วนก้าน ส่วนเมล็ด ส่วนฝักที่ไม่มีส่วนเมล็ด และส่วน; กลีบของบัวหลวง โดยสารสกัดหยาบเมทานอลเซลล์เนื้อเยื่อเจริญ จะมีจำนวนสารที่เป็นองค์ประกอบมากกว่าส่วนต่างๆ ของบัวหลวง องค์ประกอบทางเคมี ของการ สารสกัดหยาบเมทานอลของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของ บัวหลวง พบว่ามีลักษณะจำเพาะซึ่งสามารถนำไปใช้สำหรับตรวจเอกลักษณ์ทางพฤกษเคมี

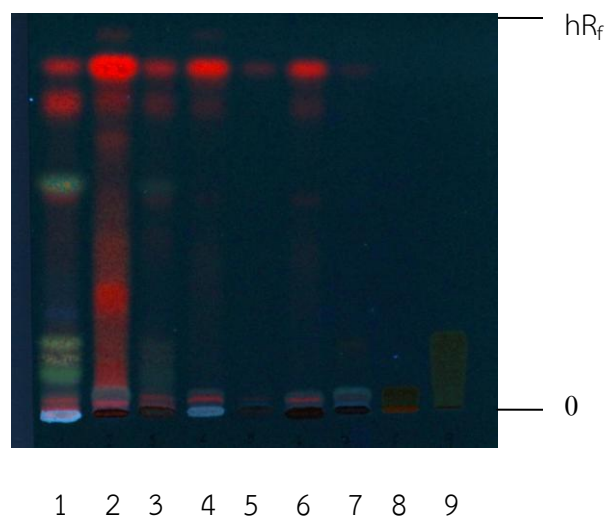
เบื้องต้นของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวงได้ ซึ่งการวิเคราะห์ หากกลุ่มสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในสมุนไพรมัน โดยเทคนิค TLC นี้เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ใช้เครื่องมือน้อย และวิธีการตรวจสอบค่อนข้างจำเพาะ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ดีกว่าการตรวจสอบด้วย ปฏิกิริยาสีในหลอดทดลอง เนื่องจากสามารถแยกสาร และ ตรวจสอบสารไปพร้อมกัน โดยสารที่พบปริมาณมากจะปรากฏแถบสารที่เป็นแถบกว้าง ทั้งยังสามารถประมาณ สภาพมีขั้ว (polarity) ของสารจากค่า R_f (R_f value = $100 \times$ ระยะทางที่สารเคลื่อนไป/ระยะทาง ที่น้ำยาแยกสารเคลื่อนที่) สารที่มีค่า R_f ต่ำจะเป็นกลุ่มสารที่มีความมีขั้ว (polar) ส่วนสารที่มีค่า R_f สูงจะเป็นกลุ่มสารที่ไม่มีขั้ว (non-polar) ซึ่งสามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของพืชสมุนไพรด้วย เทคนิคทาง column chromatography ให้ได้สาร ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์สำหรับ พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ และความงามตลอดไป (บุปผาชาติ พุดตวง และคณะ, 2556)



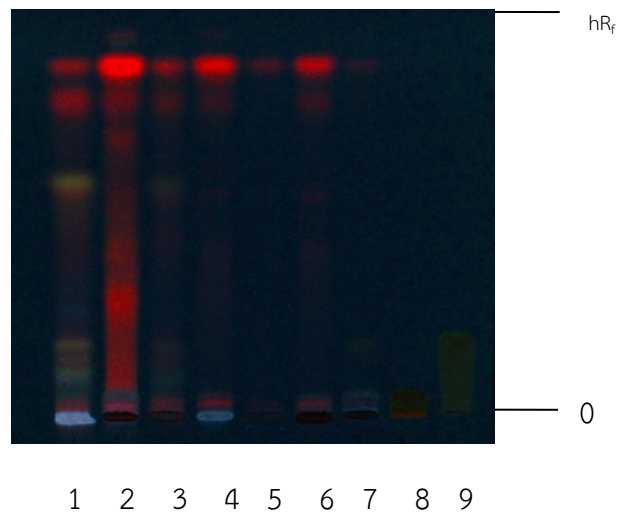
ภาพที่ 4.4 ลักษณะของสารสกัดสารสกัดหยาบเมทานอลของเซลล์เนื้อเยื่อเจริญของบัวหลวง



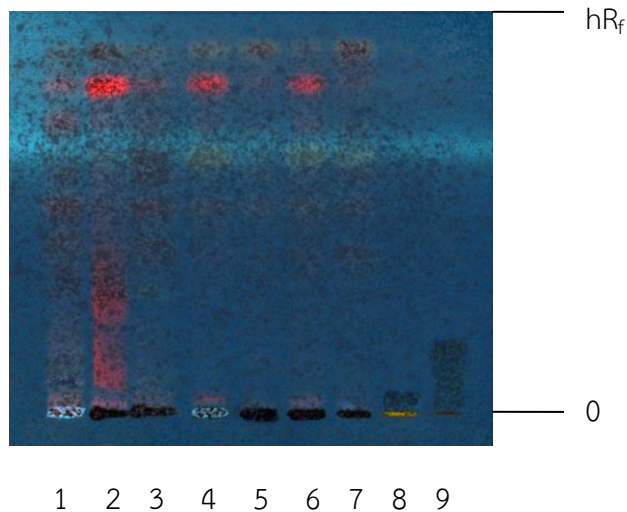
ภาพที่ 4.5 ลักษณะทางโครมาโทแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดหยาบเมทานอลของบัวหลวง หมายเลข 1 = เซลล์เนื้อเยื่อเจริญ; หมายเลข 2 = ใบ; หมายเลข 3 = เกสร; หมายเลข 4 = ก้าน; หมายเลข 5 = เมล็ด; หมายเลข 6 = ฝักที่ไม่มีส่วนเมล็ด; หมายเลข 7 = กลีบ; หมายเลข 8 = สารมาตรฐาน quercetin; หมายเลข 9 = สารมาตรฐาน kaempferol ที่ความเข้มข้น 10 μL โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ benzene:chloroform:ethyl acetate (50:30:20) หลังจากนั้น ก) ส่องภาพใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ข) ส่องภาพใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร



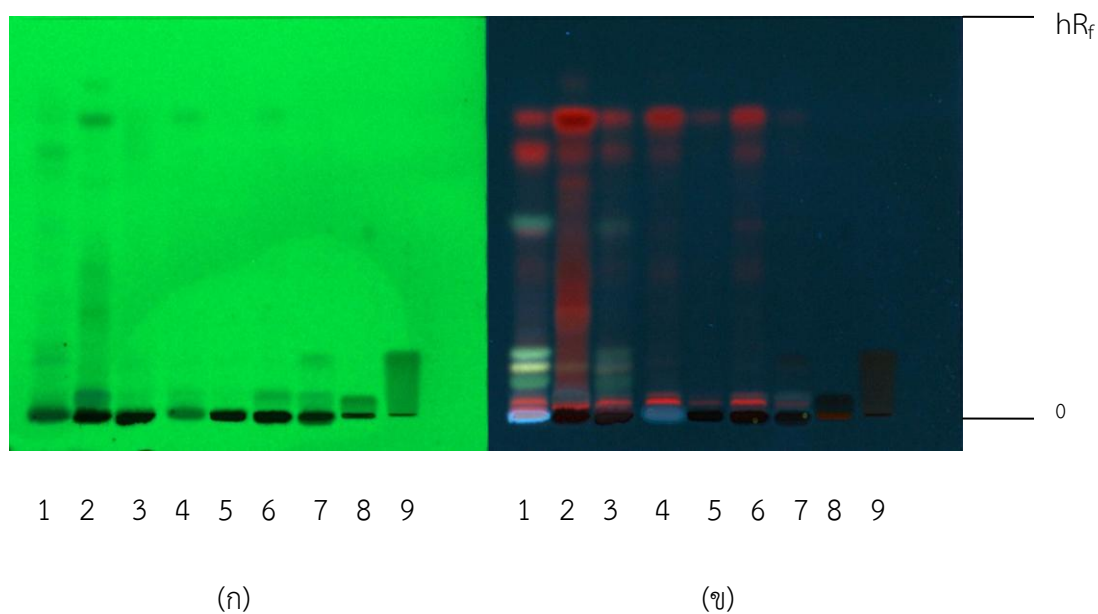
ภาพที่ 4.6 ลักษณะทางโครมาโทแกรมชนิดผิวบางของสารสกัดหยาบเมทานอลของบัวหลวง หมายเลข 1 = เซลล์เนื้อเยื่อเจริญ; หมายเลข 2 = ใบ; หมายเลข 3 = เกสร; หมายเลข 4 = ก้าน; หมายเลข 5 = เมล็ด; หมายเลข 6 = ฝักที่ไม่มีส่วนเมล็ด; หมายเลข 7 = กลีบ; หมายเลข 8 = สารมาตรฐาน quercetin ; หมายเลข 9 = สารมาตรฐาน kaempferol ที่ความเข้มข้น 10 μL โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ benzene:chloroform:ethyl acetate (50:30:20) หลังจากนั้นสเปรย์ด้วยน้ำยา Acetic acid-Sulphuric acid-Ethanol และส่องภาพได้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร



ภาพที่ 4.7 ลักษณะทางโครมาโทแกรมชนิดผิวบางของสารสกัด หยาบเมทานอลของบัวหลวง หมายเลข 1 = เซลล์เนื้อเยื่อเจริญ; หมายเลข 2 = ใบ; หมายเลข 3 = เกสร; หมายเลข 4 = ก้าน; หมายเลข 5 = เมล็ด; หมายเลข 6 = ฝักที่ไม่มีส่วนเมล็ด; หมายเลข 7 = กลีบ; หมายเลข 8 = สารมาตรฐาน quercetin ; หมายเลข 9 = สารมาตรฐาน kaempferol ที่ความเข้มข้น 10 μ L โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ benzene:chloroform:ethyl acetate (50:30:20) หลังจากนั้นสเปรย์ด้วยน้ำยา Sulphuric acid และส่องภาพใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร

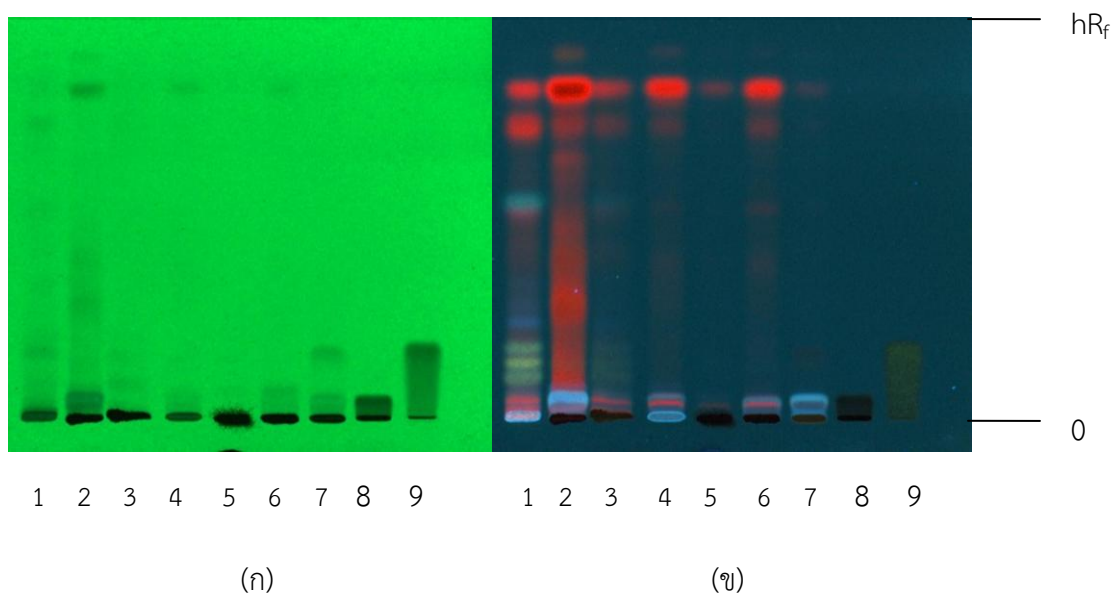


ภาพที่ 4.8 ลักษณะทางโครมาโทแกรมชนิดผิวบางของสารสกัด หยาบเมทานอลของบัวหลวง หมายเลข 1 = เซลล์เนื้อเยื่อเจริญ; หมายเลข 2 = ใบ; หมายเลข 3 = เกสร; หมายเลข 4 = ก้าน; หมายเลข 5 = เมล็ด; หมายเลข 6 = ฝักที่ไม่มีส่วนเมล็ด; หมายเลข 7 = กลีบ; หมายเลข 8 = สารมาตรฐาน quercetin ; หมายเลข 9 = สารมาตรฐาน kaempferol ที่ความเข้มข้น 10 μL โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ benzene:chloroform:ethyl acetate (50:30:20) หลังจากนั้นสเปรย์ด้วยน้ำยา Vanillin/Sulphuric acid และส่องภาพได้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร



ภาพที่ 4.9 ลักษณะทางโครมาโทแกรมชนิดผิวบางของสารสกัด หยาบเมทานอลของบัวหลวง หมายเลข 1 = เซลล์เนื้อเยื่อเจริญ; หมายเลข 2 = ใบ; หมายเลข 3 = เกสร; หมายเลข 4 = ก้าน; หมายเลข 5 = เมล็ด; หมายเลข 6 = ฝักที่ไม่มีส่วนเมล็ด; หมายเลข 7 = กลีบ; หมายเลข 8 = สารมาตรฐาน quercetin ; หมายเลข 9 = สารมาตรฐาน kaempferol ที่ความเข้มข้น 10 μL โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ benzene:chloroform:ethyl acetate (50:30:20) หลังจากนั้น ก) สเปรย์ด้วยน้ำยา Dragendorff และส่องภาพใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น

254 นาโนเมตร ข) สเปรย์ด้วยน้ำยา Dragendorff และส่องภาพใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร



ภาพที่ 4.10 ลักษณะทางโครมาโทแกรมชนิดผิวบางของสารสกัด หยาบเมทานอลของบัวหลวง หมายถึง 1 = เซลล์เนื้อเยื่อเจริญ; หมายถึง 2 = ใบ; หมายถึง 3 = เกสร; หมายถึง 4 = ก้าน; หมายถึง 5 = เมล็ด; หมายถึง 6 = ฝักที่ไม่มีส่วนเมล็ด; หมายถึง 7 = กลีบ; หมายถึง 8 = สารมาตรฐาน quercetin ; หมายถึง 9 = สารมาตรฐาน kaempferol ที่ความเข้มข้น 10 μ L โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ benzene:chloroform:ethyl acetate

(50:30:20) หลังจากนั้น ก) สเปรย์ด้วยน้ำยา Potassium hydroxide และส่องภาพไตแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ข) สเปรย์ด้วยน้ำยา Potassium hydroxide และส่องภาพไตแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร