

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคองคิงจากส่วนใบ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคองคิงโดยใช้ส่วนใบ จากสูตรอาหารทั้ง 4 สูตรพบว่า สูตรอาหารทั้ง 4 สูตรสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสจากส่วนใบของคองคิงได้ ในสัปดาห์ที่ 4 โดยสูตรที่สามารถเกิดแคลลัสได้ดีที่สุดคือ สูตรที่ 2 คือ MS ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน BA 2 ppm และ NAA 1 ppm และสูตรดังกล่าวสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดรากได้ในสัปดาห์ที่ 12 ของการศึกษา โดยสามารถเก็บยอดอ่อนได้ด้วยดังแสดงในตารางที่ 2

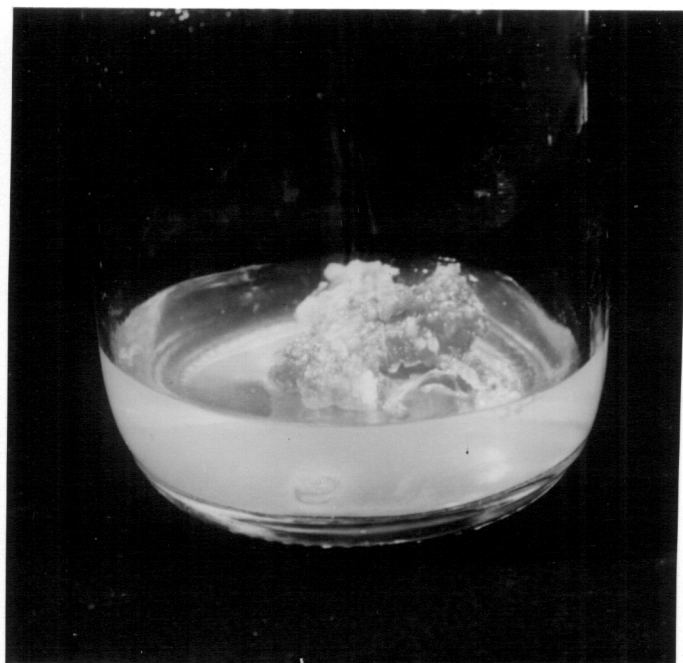
ตารางที่ 2 แสดงผลของสูตรอาหารต่อการเจริญของส่วนใบคองคิง

สูตรอาหาร	จำนวน ทั้งหมด	สัปดาห์ที่ 4 เกิดแคลลัส	สัปดาห์ที่ 8 เกิดแคลลัส	สัปดาห์ที่ 12	
				เกิดราก	เกิดใบหรือยอด
1	18	4	4	0	0
2	20	8	8	3	1*
3	20	2	2	0	0
4	19	2	2	0	0

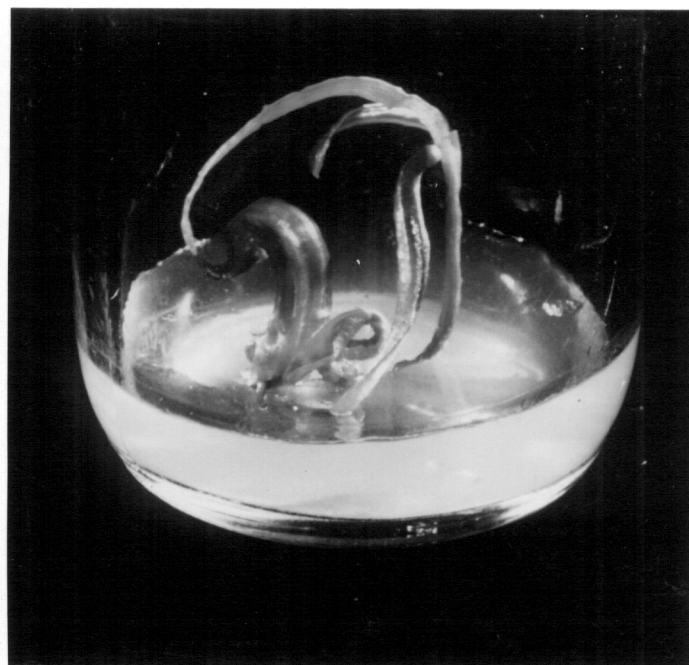
* เป็นการเกิดใบหรือยอดร่วมกับการเกิดราก

รูปที่ 3 แสดงลักษณะของแคลลัสที่เกิดจากสูตรอาหารที่ 2 มีลักษณะอยู่รวมกันแน่นมีสีเขียวอมเหลืองอ่อนและสีเขียวปน โดยสามารถเกิดเป็นรากได้ในสัปดาห์ที่ 12 ของการทดลองและพบว่าเกิดส่วนใบหรือส่วนยอดร่วมกับการเกิดรากจำนวน 1 ขวด แสดงดังรูปที่ 4

เมื่อทำการแยกเฉพาะส่วนรากที่เกิดจากสูตรที่ 2 มาเพาะเลี้ยงในสูตรที่ 2 เช่นเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเกิดรากเพาะเลี้ยงจำนวนมากขึ้น โดยมีลักษณะคล้ายนิ้วมือมีสีเขียวอมเหลืองแสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 3 ลักษณะของแคลลัสที่เกิดจากอาหารสูตรที่ 2



รูปที่ 4 ลักษณะของการเกิดส่วนใบร่วมกับการเกิดราก



รูปที่ 5 ลักษณะของรากพะเอียง

2. ผลการวิเคราะห์โคเลชิซีนเชิงคุณภาพโดยใช้ TLC

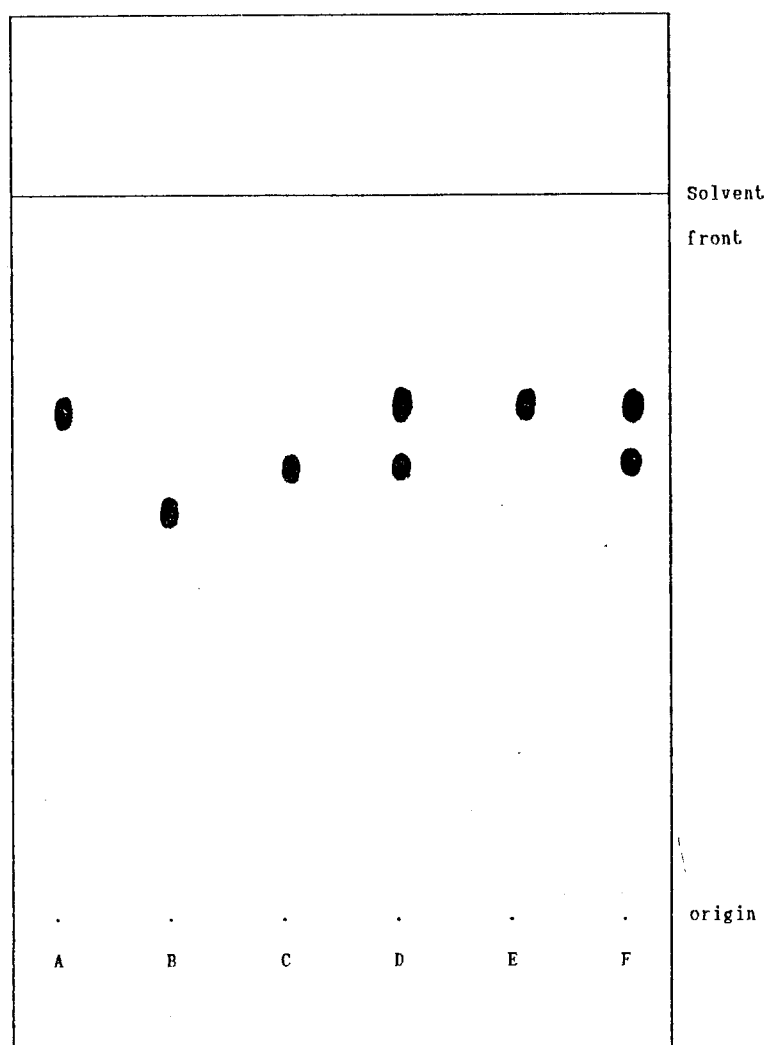
ผลการวิจัยจากการใช้ solvent system ทั้ง 2 ชนิด แสดงดังตารางที่ 3 และ 4 และลักษณะ spot ที่เกิดบนแผ่น TLC แสดงดังรูปที่ 6 และ 7 โดยจะพบว่าลักษณะ spot ที่พบในลำต้นได้คินจากธรรมชาติเหมือนกับที่พบในรากพะเอียง โดยในรากพะเอียงจะสามารถพบ โคเลชิซีนและ สาร 3-DMC ได้เช่นเดียวกับที่พบจากลำต้นได้คินจากธรรมชาติ

ตารางที่ 3 แสดงค่า Rf value ของสารโคลชิซินที่พบในลำต้นใต้ดินจากธรรมชาติ เมล็ดจากธรรมชาติ รากพะเลียงคองคิง เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน colchicine, 2-DMC และ 3-DMC ใน solvent system chloroform: acetone:diethylamine ในอัตราส่วน 5:4:1

ลำดับ	ระยะทางที่วิ่ง เคลื่อนที่ (cm)	ระยะทางที่วิ่งที่ละลาย เคลื่อนที่ (cm)	Rf value
1. colchicine USP	8.3	10	0.83
2. 2-DMC	6.1	9.3	0.65
3. 3-DMC	6.3	9.1	0.69
4. ลำต้นใต้ดิน จากธรรมชาติ	8.2 6.6	9.8 9.8	0.85 0.68
5. เมล็ดจากธรรมชาติ	8.3	9.8	0.84
6. รากพะเลียงคองคิง	8.2 6.6	9.7 9.7	0.83 0.68

ตารางที่ 4 แสดงค่า Rf value ของสารโคลชิซินที่พบในลำต้นใต้ดินจากธรรมชาติ เมล็ดจากธรรมชาติ รากพะเลียงคองคิง เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน colchicine, 2-DMC และ 3-DMC ใน solvent system benzene:ethylacetate:diethylamine:methanol ในอัตราส่วน 5:4:1:2

ลำดับ	ระยะทางที่วิ่ง เคลื่อนที่ (cm)	ระยะทางที่วิ่งที่ละลาย เคลื่อนที่ (cm)	Rf value
1. colchicine USP	6.7	10	0.67
2. 2-DMC	4.1	9.8	0.41
3. 3-DMC	4.6	9.8	0.46
4. ลำต้นใต้ดิน จากธรรมชาติ	6.6 4.6	9.9 9.9	0.66 0.46
5. เมล็ดจากธรรมชาติ	6.6	9.9	0.66
6. รากพะเลียงคองคิง	6.5 4.5	9.7 9.7	0.67 0.46

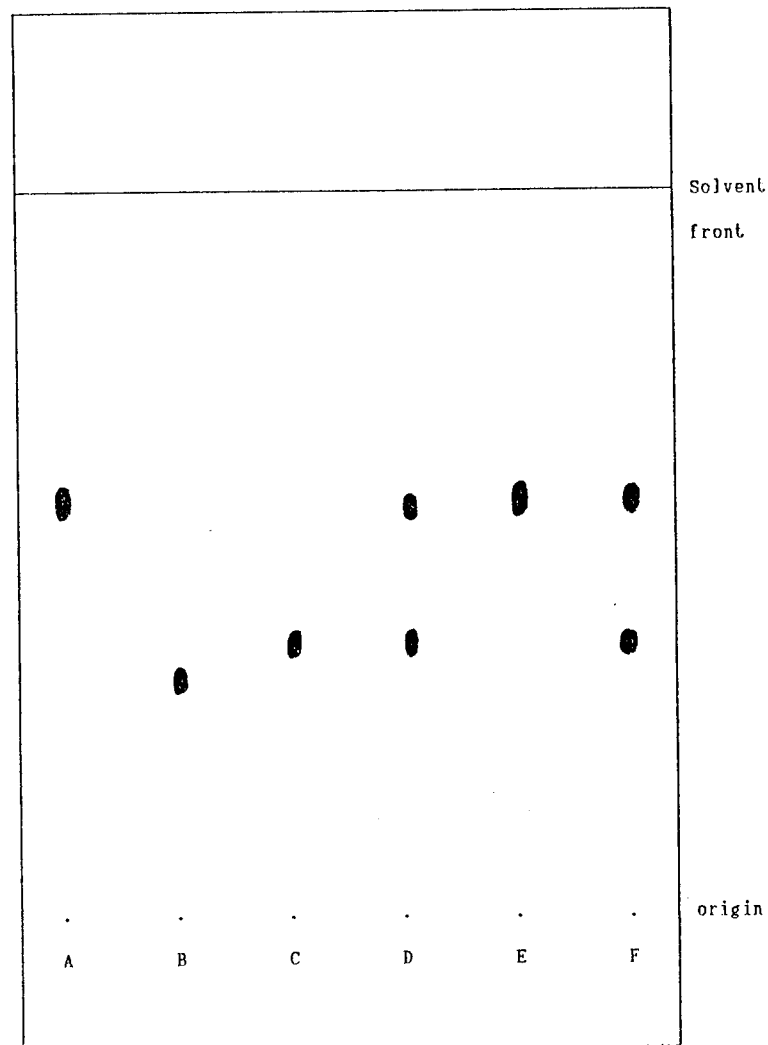


รูปที่ 6 แสดงถึงลักษณะ chromatogram ที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC ที่เคลือบด้วย silica gel GF 254

ใน solvent system chloroform:acetone:diethylamine ในอัตราส่วน 5:4:1

standard A colchicine B 2-DMC C 3-DMC

sample D ลำต้นไต้ดินจากธรรมชาติ E เมล็ดจากธรรมชาติ F รากพะวง



รูปที่ 7 แสดงถึงลักษณะ chromatogram ที่เกิดขึ้นบนแผ่น TLC ที่เคลือบด้วย silica gel GF 254

ใน solvent system benzene:ethylacetate:diethylamine:methanol ในอัตราส่วน 5:4:1:2

standard A colchicine B 2-DMC C 3-DMC

sample D ลำต้นไต้ดินจากธรรมชาติ E เมล็ดจากธรรมชาติ F รากพะยอม



3. ผลการวิเคราะห์โคลชิซินเชิงปริมาณโดยใช้ HPLC

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

จากการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณของโคลชิซินโดยวิธี HPLC รูปที่ 8 และ 9 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐานโคลชิซินและสารสกัดของรากพะเลียงคองคิง เมื่อนำไปสร้าง standard curve ของสารมาตรฐานโคลชิซินแสดงดังรูปที่ 10 ปริมาณของโคลชิซินที่พบในลำต้นใต้ดินจากธรรมชาติ เปรียบเทียบกับรากพะเลียงคองคิงเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์สารโคลชิซิน

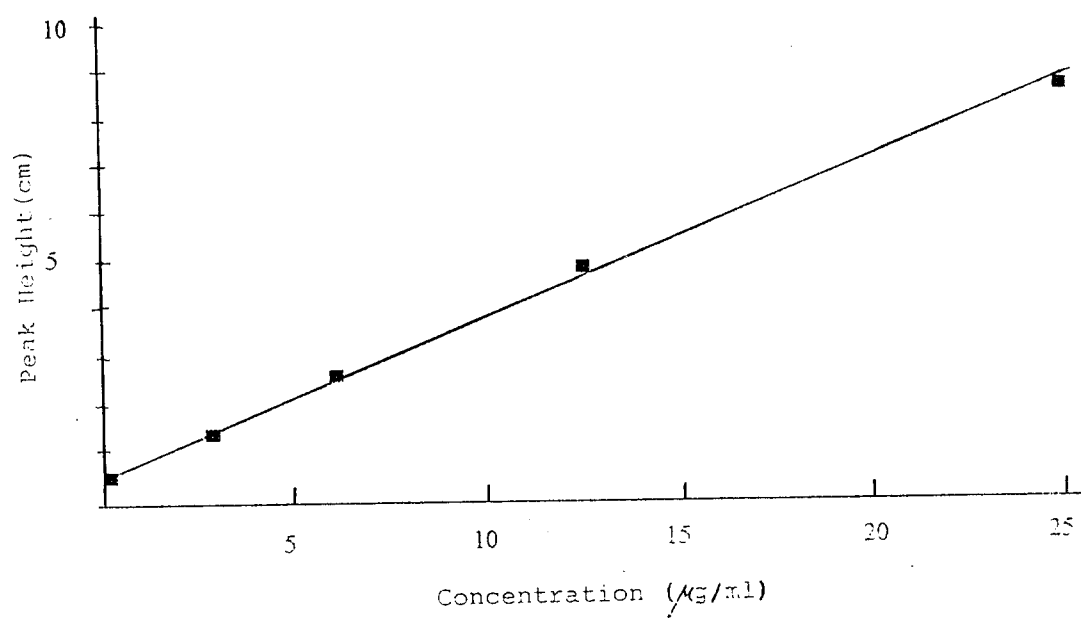
ตัวอย่าง	ปริมาณโคลชิซิน (% กรัม)
รากพะเลียง	0.0419
ลำต้นใต้ดินจากธรรมชาติ	0.1402



รูปที่ 8 แสดงถึง chromatogram ของสารละลายมาตรฐาน โคลชิซินที่วิเคราะห์โดย HPLC



รูปที่ 9 แสดงถึง chromatogram ของสารสกัดจากรากพะเอี่ยงคองคิง
โดยใช้เทคนิควิเคราะห์ทาง HPLC



$$Y = 0.2532X + 0.3301 \quad R = 0.9991$$

รูปที่ 10 แสดงถึง standard curve ของสารละลายมาตรฐาน โคลจิซีน
วิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC