

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

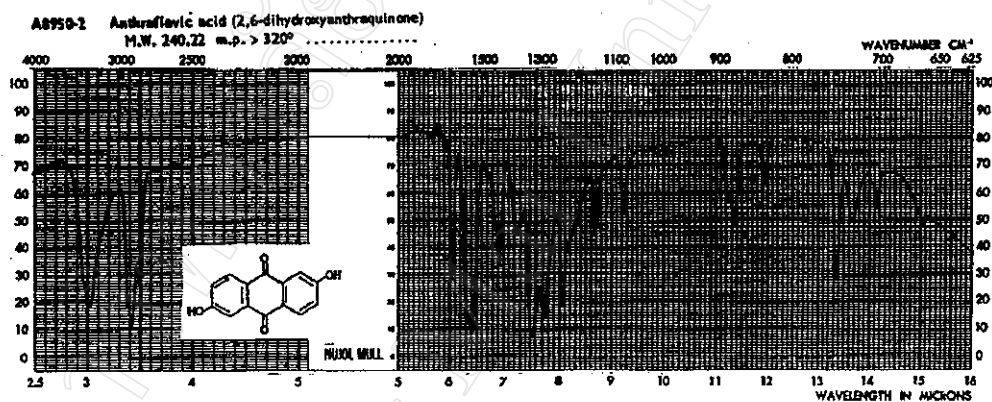
การทดลองการผลิตรงควัตถุสีแดงจากรากยอป่าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและขบวนการหมักเริ่มจากการสกัดสารสีแดงจากรากยอป่าสายพันธุ์ *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. มาทำการตรวจสอบกลุ่มของสารให้สีด้วยวิธีทางเคมีซึ่งพบว่าเป็นสารให้สีกลุ่มแอนทราควิโนนเช่นเดียวกับที่มีผู้พบว่าสารให้สีกลุ่มนี้ผลิตโดยพืชสกุล *Morinda* วงศ์ต่างๆที่พบในประเทศไทย เช่น *Morinda coreia* Ham. หรือสลักป่า กุย *Morinda citrifolia* Linn. หรือยอบ้าน มะกล่ำตาเสือ *Morinda lucida* หรือยอเถื่อน¹ ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นพืชหลักที่ใช้ย้อมสีแดงบนผ้าฝ้ายไหมและขนสัตว์ในประเทศอินเดียและไทย ซึ่งพืชในสกุล *Morinda* นี้จะผลิตสารให้สีที่เปลือกรากในระยะเวลา 2-3 ปีแรกของการปลูก ผู้วิจัยได้คัดเลือกรากยอป่าสายพันธุ์ *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. มาศึกษาเนื่องจากมีมากในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ตามที่ราบสูง เป็นไม้พุ่มขนาดเล็กที่มีรากขนไชไปตามพื้นดินและขยายพันธุ์ง่าย

เมื่อนำสารให้สีจากรากยอป่าที่สกัดด้วยเอธานอลมาทำการแยกและวิเคราะห์หาองค์ประกอบหลักพบว่า จะมีองค์ประกอบหลักที่มีปริมาณมากที่สุดตรวจสอบได้อยู่ 2 ชนิดและมีอยู่เพียงชนิดเดียวที่มีปริมาณมากที่สุดคือประมาณ 1.5% โดยน้ำหนักของผงรากบด ในขณะที่สารสกัดหยาบที่รวมองค์ประกอบอื่นๆจะมีประมาณ 14% ของน้ำหนักรากแห้ง เปอร์เซนต์สารให้สีที่ได้จากการสกัดจะใกล้เคียงกับปริมาณสารให้สีที่พบทั่วไปในพืชให้สีในส่วนที่เป็นราก เมื่อทำการแยกบริสุทธิ์สารให้สีหลักที่มีปริมาณมากที่สุด จนได้ผลึกสารบริสุทธิ์เป็นผลึกรูปเข็มสีส้มมาทำการตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีโดยการวัดด้วย UV-visible spectrum ใน absolute ethanol พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 446 นาโนเมตร และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย mass spectrophotometer พบ molecular ion (M-H) ที่ m/e เท่ากับ 269 ซึ่งเป็นผลที่วัดได้โดยใช้ FAB- (negative mode) ดังนั้นมวลโมเลกุลของสารนี้ควรเป็น 270 ส่วน C^{13} - NMR สเปกตรัมของสารประกอบนั้นจะเหมือนกันกับสารประกอบมาตรฐาน morindone ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าสารประกอบหลักของสารให้สีที่สกัดจากรากยอป่าสายพันธุ์ *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. เป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลเป็น 270 ซึ่งมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{10}O_5$ และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น morindone ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงสีตามพีเอช กล่าวคือในสารละลายกรดจะให้สีเหลืองและในสารละลายเบสจะให้สีส้มถึงแดงส้ม

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเริ่มจากเซลล์รากยอบป่าในภาคสนามที่ขุดรากยอบป่ามาล้างน้ำสะอาดและแช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อ แล้วจึงเพาะในอาหารวุ้นไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในดิน การเก็บรากสดมาเพาะในห้องปฏิบัติการทำได้ยากเนื่องจากกว่าจะมาถึงห้องปฏิบัติการ รากที่ขุดได้มีลักษณะแข็งมากยากแก่การตัดชิ้นส่วน ผู้วิจัยจึงได้หาวิธีใหม่ในการผลิตรากปลอดเชื้อโดยเริ่มจากการเก็บเมล็ดรากยอบป่ามาเพาะบนอาหารวุ้น เมล็ดรากยอบป่าจากหนึ่งดอกจะมีอยู่ 4 เมล็ด เมล็ดอ่อนสีเขียว เมล็ดแก่จะออกสีดำ ได้ทำการเพาะทั้งเมล็ดอ่อนและเมล็ดแก่เปรียบเทียบกัน พบว่าเมล็ดแก่ที่มีลักษณะสีเขียวปนสีม่วงดำมีการเจริญเกิดรากงอกออกมาบนอาหารวุ้นที่เลี้ยงประมาณ 14-30 วัน ได้เป็นรากปลอดเชื้อซึ่งทำการขยายปริมาณเซลล์รากต่อ โดยตัดรากมาวางในอาหารวุ้นที่ประกอบด้วยสูตรอาหาร Gamborg's B₅ ในที่มืดที่ 25 °C เป็นเวลา 30 วัน ได้เซลล์รากเจริญออกมาเพิ่มขึ้น จากนั้นก็ทำการเลี้ยงกลุ่มเซลล์รากดังกล่าวในอาหารที่มีสูตรกระตุ้นการผลิตสีโดยแบ่งเป็น 2 แบบ คืออาหารเหลว ทำการเขย่า 100 รอบต่อนาทีที่ 25 °C เป็นเวลา 30 วัน เทียบกับอาหารวุ้นที่เลี้ยงในที่มืด ที่ 25 °C เป็นเวลา 30 วัน พบว่าเซลล์เจริญช้ามากในอาหารเหลวเนื่องจากยังไม่ได้ภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม ในขณะที่การเลี้ยงเซลล์รากในอาหาร Gamborg's B₅ เซลล์เจริญเติบโตดีมาก เป็นกลุ่มเซลล์รากที่มีทั้งสารสีแดงส้มและสีเหลืองปนกัน ซึ่งเมื่อสกัดและวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า เป็นสารให้สีกลุ่ม anthraquinone ซึ่งแยกเป็นสารประกอบหลัก 2 ชนิด เมื่อทำการแยกด้วย TLC พบว่าเป็นสารสีแดงและสารสีเหลืองโดยสารสีแดงมีค่า R_f เท่ากับสารให้สีมาตรฐาน morindone และสารสีเหลืองมีค่า R_f เท่ากับสารสีเหลืองที่พบในสารสกัดหยาบจากรากยอบป่า ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ากลุ่มเซลล์รากยอบป่าสายพันธุ์นี้ที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น Gamborg's B₅ สามารถผลิตสารให้สีชนิดเดียวกับสารให้สีที่สกัดจากรากยอบป่าสายพันธุ์เดียวกัน

เซลล์รากที่มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์สีเหลืองได้ทำการสกัดสารให้สีด้วยคลอโรฟอร์ม และแยกด้วย TLC พบว่ามีสารให้สีหลัก 2 ชนิดที่มีค่า R_f ใกล้เคียงกับสารให้สีจากรากยอบป่าที่สกัดด้วยเอทานอล โดยชนิดหนึ่งเป็น R_f ของ morindone ส่วนอีกชนิดหนึ่งมีค่า R_f ตรงกับสารให้สีที่สกัดด้วยน้ำค้าง การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารให้สีโดยเทคนิค UV-visible spectroscopy จาก spectrum พบว่าสารให้สีที่สกัดจากรากยอบป่าและที่สกัดด้วยน้ำค้างมีการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารให้สีที่ความยาวคลื่น 425 และ 412 นาโนเมตร ตามลำดับซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารให้สีมาตรฐาน morindone ซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 441 นาโนเมตร แสดงว่าสารให้สีจากทั้ง 2 แหล่ง เป็นสารในกลุ่ม anthraquinone ที่ไม่ใช่ morindone

การแยกสารให้สีจากการเพาะเลี้ยงเซลล์รากและสารให้สีที่สกัดด้วยน้ำต่างโดย preparative TLC และชะด้วยคลอโรฟอร์ม : เมทานอล (9:1) และวิเคราะห์โครงสร้างของสารให้สีหลักที่สกัดได้จากทั้ง 2 แหล่งมาทำการตรวจหาหมู่ฟังก์ชันโดยวิธีอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี พบว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน และจากผลของ UV และ IR spectrum ที่ได้ใกล้เคียงกับสารในกลุ่ม anthraquinone ที่เป็นกรดแอนทราฟลาวิก (2,6-dihydroxyanthraquinone)²² ดังแสดงในรูป 4.1 โดยมีหมู่ฟังก์ชันคล้ายกัน แต่ข้อมูลที่ได้ยังไม่เพียงพอที่จะบอกโครงสร้างทางเคมีได้ ในการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารนั้นจะต้องใช้ข้อมูลจากทั้ง Mass Spectrometry (MS) ซึ่งจะทราบมวลโมเลกุล และ C^{13} Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (C^{13} -NMR) ของสารบริสุทธิ์มาประกอบกันจึงสามารถยืนยันได้²¹



รูป 4.1 IR spectrum ของกรดแอนทราฟลาวิก²²

การตรวจสอบปริมาณการผลิตสารให้สีกลุ่ม anthraquinone (morindone) จากเซลล์รากที่เพาะเลี้ยง 3 เดือน เปรียบเทียบกับที่เลี้ยง 5 เดือน พบว่าการเลี้ยง 5 เดือน มีการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นและมีการผลิตสารให้สีในกลุ่ม anthraquinone (morindone) เพิ่มขึ้น กล่าวคือ เซลล์รากอายุ 3 เดือน อบแห้งได้ 0.15 มก. ขณะที่เซลล์รากอายุ 5 เดือน อบแห้งได้ 0.39 มก. ซึ่งเมื่อเทียบปริมาณสารให้สีในกลุ่ม anthraquinone (morindone) ที่เซลล์รากผลิตขึ้น โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารมาตรฐาน morindone เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าสามารถผลิตสารให้สีกลุ่ม anthraquinone (morindone) ได้ 0.65% และ 0.89% ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์สัดส่วนการเจริญ การผลิตสี และอายุของเซลล์รากในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณเท่ากัน พบว่า เซลล์รากที่มีอายุเพิ่มขึ้น 2 เดือน มีน้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้น 2.6 เท่า และมีการผลิตสีเพิ่มขึ้นประมาณ 1.4 เท่า อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองยังไม่สามารถชี้ชัดถึงระยะเวลาเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์รากเพื่อ

ผลิตสารให้สีในปริมาณที่สูง ควรจะมีการทดลองต่อไปในแง่ภาวะที่เหมาะสม ระยะเวลาการเลี้ยง และสูตรอาหารที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้เซลล์รากมีการผลิตสารให้สีในกลุ่ม anthraquinone (morindone) เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองเลี้ยงเซลล์รากยอบา 5 เดือน ได้สารให้สีประมาณ 0.9% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ขณะที่รากยอบาที่ได้จากการปลูกลานอย่างน้อย 2-3 ปี จะให้สารสีหลักเพียง 1.5% ของน้ำหนักรากแห้งเท่านั้น การเพิ่มปริมาณการผลิตสารให้สีโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์รากจึงมีแนวโน้มที่ดี เนื่องจากใช้เวลาและเนื้อที่น้อยกว่า และสามารถปรับปรุงให้ผลิตสารให้สีเพิ่มขึ้นโดยปรับภาวะการเลี้ยงและสูตรอาหารที่เหมาะสม และยังแยกสีออกได้ง่ายกว่าด้วย นอกจากนี้ควรหาวิธีเก็บเซลล์รากจากเชื้อที่ขยายได้ในลักษณะแห้งเพื่อให้เพาะเลี้ยงต่อโดยไม่ต้องเริ่มจากการเพาะเมล็ดรากยอบา เป็นสิ่งที่ควรที่จะกระทำอย่างยิ่ง

สรุปผลการทดลอง

การเพิ่มผลผลิตสารให้สีในกลุ่มแอนทราควิโนนโดยการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์รากยอบาสายพันธุ์ *Morinda angustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. มีแนวโน้มสูงที่จะใช้เสริมการขยายการปลูกลานยอบาสายพันธุ์เดียวกัน หากมีการปรับปรุงสภาวะการเลี้ยง ระยะเวลา ตลอดจนสูตรอาหารที่เหมาะสม เนื่องจากสามารถผลิตได้มากในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่สั้นกว่าและการสกัดสารให้สีกระทำได้ง่ายและสะดวกกว่า