P-ISSN 0858-4435
E-ISSN 2651-1231
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : *http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj*
ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 (มกราคม-กุมภาพันธ์ 2566) หน้า [64-72

ปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงในสภาพปลอดเชื้อ

Secondary Metabolite Contents in Shoot Cultures of Holy Basil Purple Type (*Ocimum sanctum* L.)

เจิมอรุณ อุทัยแจ่มศรีผล[1], เยาวพา จิระเกียรติกุล[1,*], ภาณุมาศ ฤทธิไชย[1], อรุณพร อิฐรัตน์[2]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

[2]สถานการแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

Jermaroon Autaijamsripon[1], Yaowapha Jirakiattikul[1,*], Panumart Rithichai[1], Arunporn Itharat[2]

[1]Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Pathum Thani 12120

[2]Department of Applied Thai Traditional Medicine, Faculty of Medicine,

Thammasat University, Pathum Thani 12120

Received 17 October 2022; Received in revised 25 January 2023; Accepted 1 February 2023

บทคัดย่อ

กะเพราแดง (holy basil purple type, *Ocimum sanctum* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่นิยมใช้ในทางการแพทย์ การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ โดยวิเคราะห์ปริมาณสารทุติยภูมิและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0.5 mg/L นาน 3-6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับใบจากต้นแม่และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ จากการทดลอง พบว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อทุกระยะเวลาเพาะเลี้ยงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากกว่า และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีกว่าใบจากต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ โดยยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ 152.10±7.94 mg GAE/g dry extract และ 122.04±3.66 mg CE/g dry extract ตามลำดับ นอกจากนี้ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดี

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** yjirakia@tu.ac.th

doi:

ที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 12.95±1.37 µg/mL ส่วนปริมาณสารยูจีนอลของใบกะเพราแดงจากต้นแม่ (2,931.17±286.61 µg/g dry extract) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (8,816.18±510.60 µg/g dry extract) สูงกว่ายอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ; ฟลาโวนอยด์; ยูจีนอล; สารประกอบฟีนอลิค; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Holy basil purple type (*Ocimum sanctum* L.) is a medicinal plant commonly used for medicinal purposes. This study aimed to investigate the secondary metabolite contents in shoot cultures of holy basil purple type. Secondary metabolite contents and radical scavenging activities of 3 to 6-week-old shoots cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 mg/L 6-benzyladenine (BA) were determined and compared with those of mother plant and transplantation plant grown under *in vivo* conditions. The results showed that the regenerated shoots had higher total phenolic and flavonoid contents, and radical scavenging activities than *in vivo* leaves. The greatest of total phenolic (152.10±7.94 mg GAE/g dry extract), total flavonoid contents (122.04±3.66 mg CE/g dry extract), and radical scavenging activity (EC_{50} of 12.95±1.37 µg/ml) were observed in 5-week-old regenerated shoots. However, the eugenol contents from leaves of mother plant l (2,931.17±286.61 µg/g dry extract) and transplantation plant (8,816.18±510.60 µg/g dry extract) were higher than *in vitro* regenerated shoots.

Keywords: Antioxidant activity; Eugenol; Flavonoids; Phenolic compounds; Plant tissue culture

1. บทนำ

กะเพราแดงเป็นกะเพราสายพันธุ์หนึ่งที่อยู่ในวงศ์ Lamiaceae [1] ส่วนต่างๆ ของกะเพราแดงมีองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย (essential oil) เช่น ยูจีนอล (eugenol) เมธิลยูจีนอล (methyl eugenol) รวมถึงสารทุติยภูมิในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิค (phenolic compounds) และสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) [2] ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถนำมาผลิตยาเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และภาคอุตสาหกรรมได้ เช่น ยาชา [3] ลดไขมันในกระแสเลือด ยารักษาโรคเบาหวาน [4] และอาหารเสริม [5] การปลูกกะเพราแดงในสภาพธรรมชาติมักเกิดปัญหาความแปรปรวนทางพันธุกรรม และความไม่สม่ำเสมอของปริมาณสารทุติยภูมิจากปัญหาของสภาพแวดล้อมที่แปรปรวน รวมถึงปัญหาของโรคและแมลง ปัจจุบันจึงมีการนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาใช้ขยายพันธุ์พืชชนิดนี้ เพื่อใช้เป็นแหล่งในการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญให้มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการ ซึ่งสารทุติยภูมิที่ผลิตได้จากเทคนิคนี้มีคุณภาพสม่ำเสมอ และปริมาณสารที่ได้ไม่ผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมซึ่งต่างจากการปลูกพืชในสภาพธรรมชาติ [6] Autaijamsripon et al. [7] ได้รายงานการขยายพันธุ์กะเพราแดงด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยพบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนยอด และชักนำให้เกิดราก คือ อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L และอาหารสูตร ½ MS ตามลำดับ นอกจากนี้ การศึกษาปริมาณสาร

ทุติยภูมิในกะเพราแดงและพืชอื่นๆ ได้มีรายงานแล้ว เช่น Yotchart et al. [8] พบว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 mg/L นาน 35 วัน มีสารยูจีนอล (13.91%) มากกว่าใบจากต้นแม่ที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (2.05%) เช่นเดียวกับใบโหระพาที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารยูจีนอล (85.30±2.72 µg/g DM) และสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (165.00±3.59 mg GAE/g DM) สูงกว่าใบจากต้นที่เจริญเติบโตในธรรมชาติ [9] อย่างไรก็ตาม มีพืชอีกหลายชนิด เช่น พรมมิ (*Bacopa monnieri*) [10] หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) [11] และ *Solidago chilensis* [12] พบว่า ชิ้นส่วนหรือเซลล์ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อสร้างสารทุติยภูมิได้ในปริมาณน้อยกว่าส่วนต่างๆ ของพืชที่พัฒนาในสภาพธรรมชาติ

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิของพืชที่เจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อ ดังรายงานของ Szopa et al. [13] ที่พบว่า ยอด *Schisandra chinensis* มีปริมาณกรดฟีนอลิค (38.46± 3.60 mg/100 g DW) และสารฟลาโวนอยด์ (17.21±2.15 mg/100 g DW) สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน และปริมาณสารดังกล่าวลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 40-60 วัน หรือจากรายงานของ Wang et al. [14] ที่พบว่า เซลล์แขวนลอยของ *Hypericum perforatum* เริ่มสร้างสารฟลาโวนอยด์หลังจากการเพาะเลี้ยง 10 วัน และปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 16 mg/g DW ในวันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นค่อยๆ ลดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 30 วัน จะเห็นได้ว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการสร้างและสะสมสารทุติยภูมินั้นแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด [15] ดังนั้น การเก็บเกี่ยวต้นพืชในระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมมาสกัดสารจะทำให้ได้สารสำคัญในปริมาณสูง ซึ่งจะทำให้การเพาะเลี้ยงพืชเพื่อผลิตสารทุติยภูมิในสภาพปลอดเชื้อมีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณสารทุติยภูมิของยอดกะเพราแดงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลานานต่างกัน ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษา ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของยอดกะเพราแดงที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเป็นระยะเวลาต่างกัน เปรียบเทียบกับใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ ซึ่งผลของการศึกษาครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญจากกะเพราแดงให้เพียงพอต่อความต้องการทางการแพทย์และภาคอุตสาหกรรมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พืชทดลอง

ทำการเพาะเลี้ยงข้อกะเพราแดงซึ่งตัดจากยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.5 mg/L น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% (w/v) และผงวุ้น ความเข้มข้น 0.8% (w/v) ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ 25±2°C ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 3 4 5 และ 6 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดตามระยะเวลา นำยอดที่พัฒนาตามระยะเวลาดังกล่าวมาวิเคราะห์ปริมาณสารยูจีนอล สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับใบกะเพราแดงจากต้นแม่อายุ 2 ปี ซึ่งเป็นต้นที่นำชิ้นส่วนข้อมาขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาตินาน 2 เดือน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 6 สิ่งทดลอง แต่ละสิ่งทดลองมี 3 ซ้ำ โดยวิธีการสกัดตัวอย่างพืช และวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระมีดังนี้

2.2 วิเคราะห์หาปริมาณสารยูจีนอล

นำตัวอย่างสดมาแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C นาน 1 คืน แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze drier (รุ่น FDB-5503, Gperon) นาน 24 ชั่วโมง บดตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างแห้งที่บดละเอียด 6 g มาสกัดแบบซอกเลต (soxhlet extraction) โดยดัดแปลงจากวิธี

ของ Sharma et al. [16] สกัดด้วย 99.9% methanol HPLC grade ปริมาตร 100 ml สกัดนาน 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 65°C แล้วนำมากรอง กลั่นระเหยสารสกัดให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator และนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารยูจีนอลด้วยวิธี HPLC ดัดแปลงตามวิธีของ Inam et al. [17] ละลายสารสกัดตัวอย่าง 10 mg ใน 99.9% methanol HPLC grade ปริมาตร 1 ml และนำไป sonicate เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายตัวอย่างผ่าน filter membrane ขนาด 0.22 µm ใส่ลงในขวด vial แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารยูจีนอลด้วยเครื่อง UHPLC (Shimadzu รุ่น Nexera LC-30 A) ใช้ column ชนิด Zorbax Eclipse XDB-C_{18} (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 µm) พร้อมกับ guard column ระบบที่ใช้คือ Isocratic ใช้ acetonitrile : water : methanol อัตราส่วน 50 : 40 : 10 เป็น mobile phase อัตราการเคลื่อนที่ของสารเท่ากับ 0.7 ml/min ปริมาตรสารที่ฉีดเข้าระบบเท่ากับ 10 µl แต่ละตัวอย่างฉีดซ้ำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งฉีดนาน 10 นาที และ column oven temp เท่ากับ 30°C วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

2.3 วิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

นำตัวอย่างสดมาอบที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และบดตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นนำตัวอย่างแห้งที่บดละเอียด 2 g มาสกัดด้วย ethanol ตามวิธีที่ได้รายงานโดย Phaisitsakulnat et al. [18] แล้วนำมากรอง นำสารสกัดที่ได้มาระเหยใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จนกว่าสารสกัดตัวอย่างจะมีน้ำหนักคงที่ นำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's colorimetric สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดด้วยวิธี aluminum chloride colorimetric และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity ตามวิธีที่ได้รายงานโดย Phaisitsakulnat et al. [18]

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SAS

3. ผลและวิจารณ์ผล

3.1 ปริมาณสารยูจีนอล

ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3 4 5 และ 6 สัปดาห์ มีปริมาณสารยูจีนอลไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 249.76±41.84 279.92±1.73 583.24±23.28 และ 509.61±3.78 µg/g dry extract ตามลำดับ แต่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของใบกะเพราแดงจากต้นแม่ (2,931.17±286.61 µg/g dry extract) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (8,816.18±510.60 µg/g dry extract) (Figure 1 A)

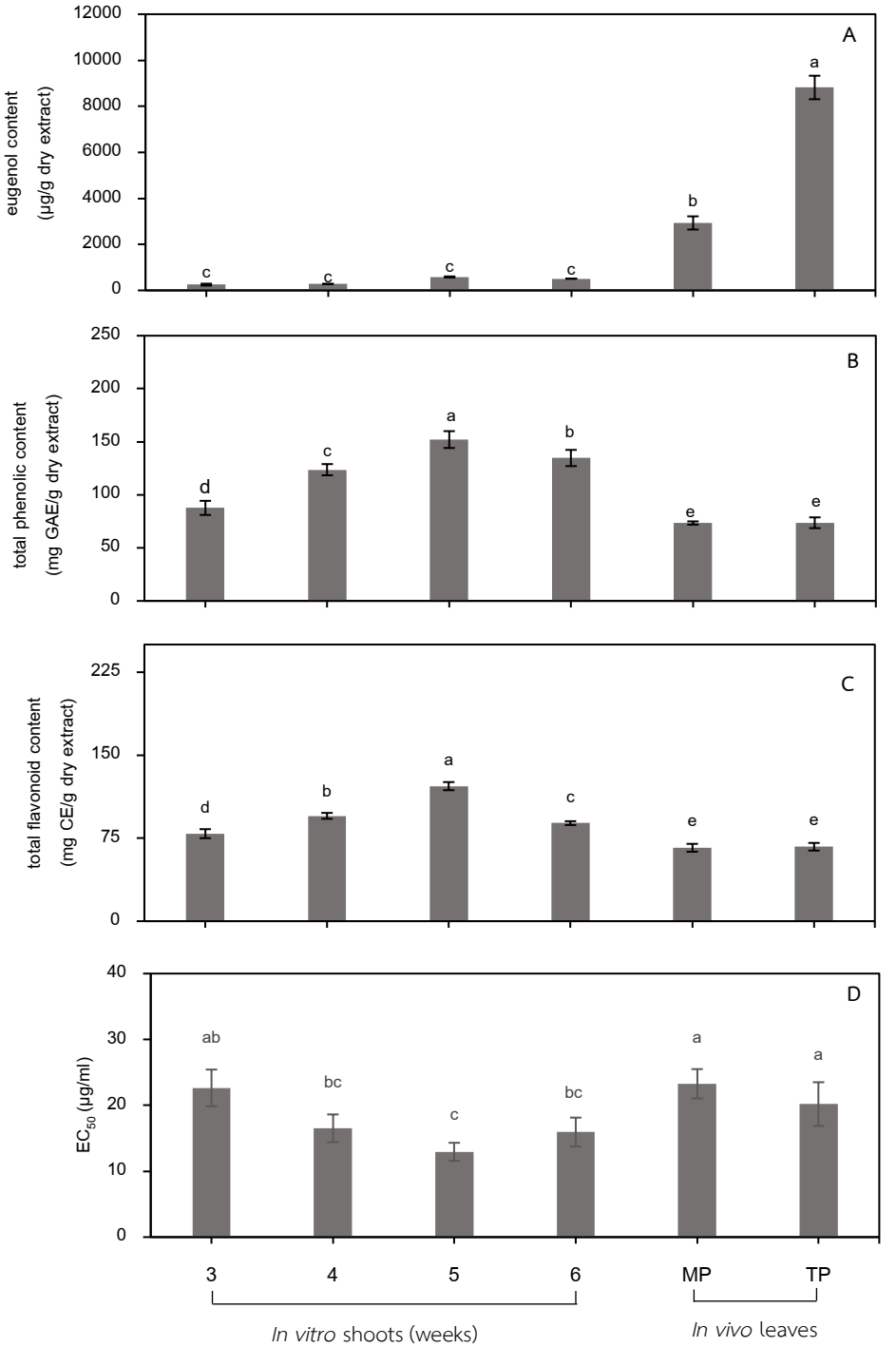

Figure 1. A) eugenol contents, B) total phenolic content, C) total flavonoid content and D) radical scavenging activities (EC_{50}) of *in vitro* shoots, and *in vivo* leaves from mother plant (MP) and transplantation plant (TP) of holy basil purple type

3.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ (87.71±6.65 ถึง 152.10±7.94 mg GAE/g dry extract) มีปริมาณสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของใบกะเพราแดงจากต้นแม่ (73.44±1.53 mg GAE/g dry extract) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (73.68±5.09 mg GAE/g dry extract) โดยยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 152.10±7.94 mg GAE/g dry extract (Figure 1 B)

3.3 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3-6 สัปดาห์ มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (79.09±4.07 ถึง 122.04±3.66 mg CE/g dry extract) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับค่าดังกล่าวของใบจากต้นแม่ (66.33±3.55 mg CE/g dry extract) และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ (67.27±3.45 mg CE/g dry extract) โดยปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีค่าสูงสุดในยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ (122.04±3.66 mg CE/g dry extract) (Figure 1 C) ซึ่งปริมาณสารดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด

3.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด มีค่า EC_{50} เท่ากับ 12.95±1.37 µg/ml แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 4 และ 6 สัปดาห์ (ค่า EC_{50} เท่ากับ 16.52±2.10 และ 15.95±2.19 µg/ml ตามลำดับ) ในขณะที่ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ ใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ และยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 3 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำและไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ค่า EC_{50} เท่ากับ 22.64±2.79 23.27±2.23 และ 20.19±3.32 µg/ml ตามลำดับ) (Figure 1 D)

จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อสามารถสังเคราะห์สารสำคัญได้เช่นเดียวกับต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องมาจากพืชได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีข้อมูลทางพันธุกรรม รวมถึงมีกระบวนการชีวสังเคราะห์สารทุติยภูมิไม่แตกต่างกับต้นที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ [19] โดยปริมาณสารดังกล่าวจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดพืช อาหารเพาะเลี้ยง รูปแบบการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง และสภาพแวดล้อมที่พืชเจริญเติบโต [15] จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยงต่างๆ สังเคราะห์สารยูจีนอลได้น้อยแต่กลับสร้างและสะสมสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดได้มากกว่าใบจากต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญบางชนิดเกิดขึ้น บริเวณต่อมหรือในเนื้อเยื่อพืชที่มีความเฉพาะเจาะจง [15] ซึ่งสารยูจีนอลเป็นน้ำมันหอมระเหยที่พบมากในใบของพืชสมุนไพรหลายชนิด เช่น กานพลู กระวาน [20] โหระพา และกะเพรา [21] จึงเป็นไปได้ว่าการใช้ยอดที่มีส่วนลำต้นมาวิเคราะห์สารยูจีนอลด้วยมีผลให้ปริมาณสารที่ได้มีค่าน้อยลง ในขณะที่การสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดไม่ได้มีข้อจำกัดของเนื้อเยื่อที่เฉพาะเจาะจง ดังนั้นจึงสามารถพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช [22] ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Thiruvengadam and Chung [23] ที่พบว่า ใบ *Cucumis anguria* L. ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (382.72 µg/g) และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (2,277.23 µg/g) สูงกว่าใบจากต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ (352.54 และ 2,153.36 µg/g ตามลำดับ)

นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิค

ทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ กล่าวคือ ยอดที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ มีปริมาณสารดังกล่าวน้อย จากนั้นค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ แต่หากเพาะเลี้ยงนานถึง 6 สัปดาห์ ส่งผลให้มีปริมาณสารดังกล่าวลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน พืชจะใช้พลังงานในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนยอดมากกว่าการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ เช่นเดียวกับที่รายงานโดย Figueiró et al. [24] สารที่พืชสังเคราะห์ได้จึงมีปริมาณลดลง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับยอด *S. chinensis* ที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 30 วัน มีปริมาณกรดฟีนอลิค (38.46± 3.60 mg/100 g DW) และสารฟลาโวนอยด์ (17.21±2.15 mg/100 g DW) สูงสุด หลังจากนั้นปริมาณสารดังกล่าวเริ่มลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 40-60 วัน (28.28±1.26 ถึง 32.14±4.19 และ 12.26±3.27 ถึง 16.72±3.10 mg/100 g DW ตามลำดับ) [13] สำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่ายอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุดนั้น เนื่องจากยอดที่พัฒนาในระยะเวลาดังกล่าวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการที่มีปริมาณสารดังกล่าวเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีขึ้นด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Danaee et al. [25] ที่พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นในแคลลัสของ *Phyllanthus pulcher* ส่งผลให้แคลลัสมีเปอร์เซ็นต์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

ถึงแม้ว่าจากการทดลองนี้ยอดกะเพราแดงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะผลิตสารยูจีนอลได้น้อยกว่าใบกะเพราแดงจากต้นแม่และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติ แต่ยอดที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อทุกระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูง และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีกว่าใบจากต้นที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ และเมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวยอดกะเพราแดงเพื่อนำไปสกัดสำหรับใช้ประโยชน์ทางการแพทย์และภาคอุตสาหกรรมนั้น ควรใช้ยอดกะเพราแดงที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด และสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด รวมถึงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด อย่างไรก็ตามจากการที่ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อมีปริมาณสารยูจีนอลน้อยกว่าใบที่เจริญเติบโตในสภาพธรรมชาติ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการเติมสารตั้งต้น ร่วมหรือไม่ร่วมกับสารกระตุ้นลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณสารดังกล่าวของยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อในต่อไป

4. สรุป

ยอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อนาน 5 สัปดาห์ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด สารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ดีที่สุด แต่ใบกะเพราแดงจากต้นแม่ และใบจากต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติมีปริมาณสารยูจีนอลสูงกว่ายอดกะเพราแดงที่พัฒนาในสภาพปลอดเชื้อ

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่สนับสนุนทุนวิจัย จากเงินกองทุนมหาวิทยาลัยธรรมศาตร์ ประเภททุน Fast track ปีงบประมาณ 2564

6. References

[1] Mondal S., Miranda, B. R. and Mahapatra, S. C., 2009, The science behind sacredness of tulsi (*Ocimum sanctum* Linn.), Ind. J. of Physiol. Pharmacol. 53: 291-306.

[2] Singh, E., Sharma, S., Dwivedi, J. and Sharma, S., 2012, Diversified potentials of *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi): An exhaustive survey, J. Nat. Prod. Plant Resource. 2: 39-48.

[3] Jadhav, B. K., Khaandelwal, K. R., Ketakr, A. R. and Pisal, S. S., 2004, Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for treatment of periodontal diseases, Drug dev. Ind. Pharma. 30: 195-203.

[4] Prakash, P. and Gupta, N., 2005, Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn (tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review, Indian J. Physiol. Pharmacol. 49: 125-131.

[5] Świzdor, A., Panek, A., Milecka-Tronina, N. and Kolek, T., 2012, Biotransformations utilizing beta-oxidation cycle reactions in the synthesis of natural compounds and medicines, Int. J. Mol. Sci. 13: 16514-16543.

[6] Smetanska, I., 2008, Production of secondary metabolites using plant cell cultures, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 111: 187-228.

[7] Autaijamsripon, J., Jirakiattikul, Y., Rithichai, P. and Itharat, A., 2018, Effect of plant growth regulators on shoot multiplication and root induction of *Ocimum sanctu*m L. (holy basil purple type) under aseptic conditions, Thai Journal of Science and Technology 27: 630-638. (in thai)

[8] Yotchart, Y., Kerdchoechuen, O. Laohakunjit, N. and Matta, F. B., 2015, Effect of plant growth regulators and volatile compounds synthesis in holy basil (*Ocimum sanctum* L. cv. Dang), Agricultural Sci. J. 46: 189-192. (in thai)

[9] Bhuvaneshwari, K., Gokulanathan, A., Jayanthi, M., Govindasamy, V., Milella, L., Lee, S., Yang, D. C. and Girija, S., 2016, Can *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum tenuiflorum* L. *in vitro* culture be a potential source of secondary metabolites?, Food Chem. 194: 55-60.

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

[11] Esmaeili, A. K., Taha, R. M., Mohajer, S. and Banisalam, B., 2016, *In vitro* regeneration and comparison of phenolic content, antioxidant and antityrosinase activity of *in vivo* and *in vitro* grown *Asparagus officinalis*, Sains Malays. 45: 373–381

[12] Schmeda-Hirschmann, G., Jordan, M., Gerth, A., and Wilken, D., 2005, Secondary metabolite content in rhizomes, callus cultures and *in vitro* regenerated plantlets of *Solidago chilensis*, Zeitschrift fur Naturforschung C. 60: 5-10.

[13] Szopa, A., Kokotkiewicz, A., Bednarz, M., Luczkiewicz, M. and Ekiert, H., 2017, Studies on the accumulation of phenolic acids and flavonoids in different *in vitro* culture systems of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. using a DAD-HPLC method, Phytochem Lett. 20: 462-469.

[14] Wang, J., Qian, J., Yao, L. and Lu, Y., 2015, Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*, Bioresour. Bioprocess. 2: 1-9.

[15] Smetanska, I., 2008, Production of secondary metabolites using plant cell cultures, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 111: 187-228.

[16] Sharma, V., Wani, S. R. and Chaudhary, P., 2016, Precursor mediated enhanced eugenol production in *Ocimum sanctum* L. through tissue culture methodologies and quantitative estimation through HPLC, J. Essent. Oil Bear. Pl. 19: 241-246.

[17] Inam, F., Deo, S. and Narkhede, N., 2014, HPLC –UV method development and quantification of eugenol from methanolic extracts of some spices, J. Chem. Biol. Phys. Sci. 3: 96-102.

[18] Phaisitsakulnat, N., Jirakiattikul, Y. and Rithichai, P., 2021, Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on antioxidant contents in callus cultures of holy basil purple type, Thai Science and Technology Journal 29: 641-652. (in thai)

[19] Banthorpe, B. V., 1994, Secondary metabolism in plant tissue culture: Scope and limitations, Nat. Prod. Rep. 11: 303-328.

[20] Mohammadi N., S., Özgüneş, H. and Başaran, N., 2017, Pharmacological and toxicological properties of eugenol, Turk. J. Pharm. Sci. 14: 201-206.

[21] Mahajan, N., Singh, J. and Sinha, S., 2014, Comparison of total flavonoid, phenolic content and antioxidant capacity in leaf and seed extracts from white holy basil (*Ocimum sanctum*), Int. J. Appl. Biol. Pharm. 5: 34-42.

[22] Srivastava, M. P., Tiwari, R. and Sharma, N., 2013, Assessment of phenol and flavonoid content in the plant materials, J. New Biol. Reports 2: 163-166.

[23] Thiruvengadam, M. and Chung, I. M., 2015, Phenolic compound production and biological activities from *in vitro* regenerated plants of gherkin (*Cucumis anguria* L.), Electron. J. Biotechnol. 18: 295-301.

[24] Figueiró, A. D. A., Correa, C. M., Astarita, L. V. and Santarém, E. R., 2010, Long-term maintenance of *in vitro* cultures affects growth and secondary metabolism of St. John's Wort, Cienc. Rural. 40: 2115-2121.

[25] Danaee, M., Farzinebrahimi, R., Kadir, M. A., Sinniah, U. R., Mohamad, R. and Taha, R. M., 2015, Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*, Braz. J. Bot. 38: 265–272.