สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
๓ แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานวิจัย

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารฟีนอลในสารสกัดจากแคลลัสของพืชสมุนไพรที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

Effect of Plant Growth regulators on Free Radical Scavenging Activities and Phenolic Content of Extracts from Selected Medicinal Plant Callii Cultured *in vitro*

โดย

อรสา สุริยาพันธ์

สมสุข มัจฉาชีพ

24 ธ.ค. 2552

264558

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก งบประมาณเงินแผ่นดิน มหาวิทยาลัยบูรพา ภายใต้แผนงานวิจัย สมุนไพรและภูมิปัญญาแพทย์แผนไทยในภาคตะวันออก

พ.ศ. 2552

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

รายชื่อนักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรสา สุริยาพันธ์ *

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สมสุข มัจฉาชีพ **

หน่วยงาน

* ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131 โทรศัพท์ 038-103139 โทรสาร 038-393492 email : orasa@buu.ac.th

** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131 โทรศัพท์ 038-393255 โทรสาร 038-393489 email : somsook@buu.ac.th

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ให้ความสะดวกในด้านสถานที่และอุปกรณ์เครื่องมือ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนงบดำเนินวิจัย และนางสาวจิรวพร ชัยวรกุล นางสาวสุดา เวชการี นางสาววีนัส ไหวดีตลอดถึง นิสิตภาควิชาชีววิทยา ที่ได้มีส่วนช่วยในการเพาะเลี้ยงแคลลัส และขั้นการวิเคราะห์ ทำให้การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัยนี้ คือ เพื่อศึกษาผลของชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตพืชต่อสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณสารฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดจากแคลลัสของมะระ(*Momordica charantia* L.) 2 สายพันธุ์ คือ มะระขี้นก (Bitter gourd) และมะระจีน (Bitter cucumber) ที่เพาะปลูกทั่วไปในภาคตะวันออกของประเทศไทย ขั้นตอนแรกคือการชักนำให้เกิดแคลลัสจากมะระทั้งสองชนิดในสภาพปลอดเชื้อ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่าง ๆ บนอาหารสูตร Murashige and Skoog ดัดแปลงที่เติม 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ร่วมกับ Benzyladenine (BA) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ วางแผนการทดลองแฟคทอเรียล 2 ปัจจัยแบบสุ่มสมบรูณ์ (Two-factor factorial experiment in CRD) บันทึกอัตราการเจริญเติบโต ขั้นตอนที่สองคือการทำแห้งแคลลัสที่ได้ด้วยวิธีการระเหิดภายใต้ความดันต่ำ เพื่อนำมาวิเคราะห์สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ($DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$) และปริมาณสารฟีนอลทั้งหมด ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อปริมาณสารฟีนอลทั้งหมดในแคลลัสมะระ คือชิ้นส่วนของมะระขี้นก (ใบเลี้ยง ลำต้นใต้ใบเลี้ยง และใบแท้) ที่เพาะในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี BA ในปริมาณสูง (2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ให้แคลลัสที่มีอัตราการเจริญเติบโตน้อย แต่มีปริมาณเฉลี่ยของสารฟีนอลทั้งหมดสูงกว่าแคลลัสที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูง สำหรับชิ้นส่วนจากมะระจีนพบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตเป็นแคลลัสที่ดีกว่าชิ้นส่วนจากมะระขี้นก แต่แคลลัสที่ได้มีปริมาณเฉลี่ยของสารฟีนอลทั้งหมดต่ำกว่า นอกจากนี้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงในเมล็ดของมะระจีนที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีให้แคลลัสที่มีปริมาณสารฟีนอลทั้งหมดสูง ซึ่งแตกต่างจากเมื่อใช้แคลลัสจากชิ้นส่วนใบเลี้ยง และลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่มีอัตราการเจริญเติบโตน้อย แต่มีปริมาณเฉลี่ยของสารฟีนอลทั้งหมดสูง ผลการประเมินสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2 ชนิด คือ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ ของสารสกัดจากแคลลัสโดยใช้เมธานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 เป็นสารสกัด พบว่าแคลลัสจากมะระทั้งสองสายพันธุ์แสดงสมบัติที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ โดย แคลลัสมะระขี้นกมีค่าร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ อยู่ในช่วง 46.96-90.53 และ 39.32-94.01 ตามลำดับ ขณะที่แคลลัสมะระจีนมีค่าร้อยละของการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ อยู่ในช่วง 62.30-92.12 และ 48.73-94.54 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารฟีนอลทั้งหมดและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ แสดงให้เห็นว่า สารที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ดีในแคลลัสอาจไม่จัดเป็นสารในกลุ่มของสารฟีนอล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

		หน้า
	บทคัดย่อ	ก
	กิตติกรรมประกาศ	ข
	สารบัญ	ค
	สารบัญตาราง	จ
	สารบัญภาพ	ฉ
บทที่		
1.	บทนำ	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	4
	สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
2.	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
	มะระ (*Momordica charantia* Linn.)	5
	แคลลัส	7
	สารควบคุมการเจริญเติบโต	8
	การผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงแคลลัส	9
	อนุมูลอิสระ (*Free Radical*)	13
	สารกำจัดอนุมูลอิสระ (Antioxidants)	14
	วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Folin-Ciocalteu's method)	18
	วิธีการวิเคราะห์สมบัติความสามารถรวมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Total Antioxidant Capacity; TAC)	19
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	21

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่		หน้า
3.	วิธีดำเนินการวิจัย	24
	ขั้นตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงแคลลัส	24
	ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ ของแคลลัสมะระจีน และมะระขี้นก	30
4.	ผลการทดลอง	35
5.	สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	53
บรรณานุกรม		55

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	ปริมาณเฉลี่ย (mg / 100 g fw) ของสารไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) ที่สกัดได้จากแคลลัสที่เพาะเลี้ยงได้จากชิ้นส่วนต่างๆ	11
3-1	ความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารชักนำสูตร MS	26
4-1	น้ำหนักเฉลี่ยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง (Cotyledon) ของมะระจีน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	35
4-2	ปริมาณเฉลี่ยสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง (Cotyledon) ของมะระจีน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	36
4-3	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ ของสารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง (Cotyledon) ของมะระจีน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	37
4-4	น้ำหนักเฉลี่ยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Hypocotyl) ของมะระจีน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	38
4-5	ปริมาณเฉลี่ยสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Hypocotyl) ของมะระจีน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	39
4-6	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ ของสารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Hypocotyl) ของมะระจีน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	39
4-7	น้ำหนักเฉลี่ยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบแท้ (Leaves) ของมะระจีนโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	40

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่		หน้า
4-8	ปริมาณเฉลี่ยสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบแท้ (Leaves) ของมะระจีน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	41
4-9	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ ของสารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบแท้ (Leaves) ของมะระจีน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	41
4-10	น้ำหนักเฉลี่ยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงในเมล็ด (Seed Cotyledon) ของมะระจีน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	42
4-11	ปริมาณเฉลี่ยสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงในเมล็ด (Seed Cotyledon) ของมะระจีน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	43
4-12	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ ของสารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยงในเมล็ด (Seed Cotyledon) ของมะระจีน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	43
4-13	น้ำหนักเฉลี่ยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง (Cotyledon) ของมะระขี้นก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	45
4-14	ปริมาณเฉลี่ยสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง (Cotyledon) ของมะระขี้นก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	46
4-15	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ ของสารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบเลี้ยง (Cotyledon) ของมะระขี้นก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	47
4-16	น้ำหนักเฉลี่ยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Hypocotyl) ของมะระขี้นก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	48

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่		หน้า
4-17	ปริมาณเฉลี่ยสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Hypocotyl) ของมะระขี้นก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	48
4-18	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ ของสารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยง (Hypocotyl) ของมะระขี้นก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	49
4-19	น้ำหนักเฉลี่ยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบแท้ (Leaves) ของมะระขี้นกโดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	50
4-20	ปริมาณเฉลี่ยสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบแท้ (Leaves) ของมะระขี้นก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	50
4-21	ค่าเฉลี่ยร้อยละการยับยั้งอนุมูล DPPH$^{\bullet}$ และ ABTS$^{\bullet+}$ ของสารสกัดจากแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบแท้ (Leaves) ของมะระขี้นก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	51
4-22	น้ำหนักเฉลี่ยแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนปล้อง (Internode) ของมะระขี้นก โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D ร่วมกับ BA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	51

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	ลักษณะปรากฏของผลมะระขี้นก (ก) และผลมะระจีน (ข)	5
2-2	โครงสร้างทางเคมีของ Momordicine II ที่ได้จากใบของมะระ	6
2-3	ลักษณะการเจริญเติบโตของแคลลัส	8
2-4	ปริมาณสารประกอบฟีโนลิกและฟลาโวนอยด์ของใบและแคลลัสของหญ้าหวาน	10
2-5	การเจริญและการผลิตไอโซฟลาโวนจากแคลลัสของ *P. candollei* var. *mirifica* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมออกซิน (2,4-D) ร่วมกับไซโตไคนิน (kinetin, BAP) ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และ 32±2องศาเซลเซียส (A) อัตราการเจริญของแคลลัส (B) ปริมาณสาร daidzein ที่ผลิตได้และ (C) ปริมาณสาร genistein ที่ผลิตได้ (D = 2,4-D, K = Kinetin, B = BAP) โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอล	11
2-6	การเจริญเติบโต (น้ำหนักแห้ง (mg)) และปริมาณสารแทนนินในการเพาะเลี้ยงแคลลัสของ *Q. acutissima* บนอาหารที่มีระดับความเข้มข้นของซูโครสต่างกัน	12
2-7	ระยะเวลาในการเจริญเติบโตและการผลิตสาร isoflavone ของแคลลัสจากชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS เติม 2,4-D 4.5 µM และ kinetin 0.46 µM ที่อุณหภูมิ 32±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน (A) น้ำหนักแห้งของเซลล์ (B) ปริมาณ diadzein (C) ปริมาณ genistein	13
2-8	โครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอล	16
2-9	โครงสร้างทั่วไปของกรดแกลลิก	16
2-10	การวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $ABTS^{\bullet+}$ ที่ลดลงเมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และโครงสร้างของสาร ABTS	20
2-11	การเกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูล $DPPH^{\bullet}$ กับสารกำจัดอนุมูลอิสระ	21
3-1	แผนผังแสดงวิธีดำเนินการทดลอง	29
4-1	น้ำหนักสดของแคลลัส (แสดงโดยกราฟแท่ง) ที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนต่างๆของมะระจีน (กรัม) และปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (แสดงโดยกราฟเส้น)	44
4-2	น้ำหนักสดของแคลลัส (แสดงโดยกราฟแท่ง) ที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนต่างๆของมะระขี้นก (กรัม) และปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (แสดงโดยกราฟเส้น)	52

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University